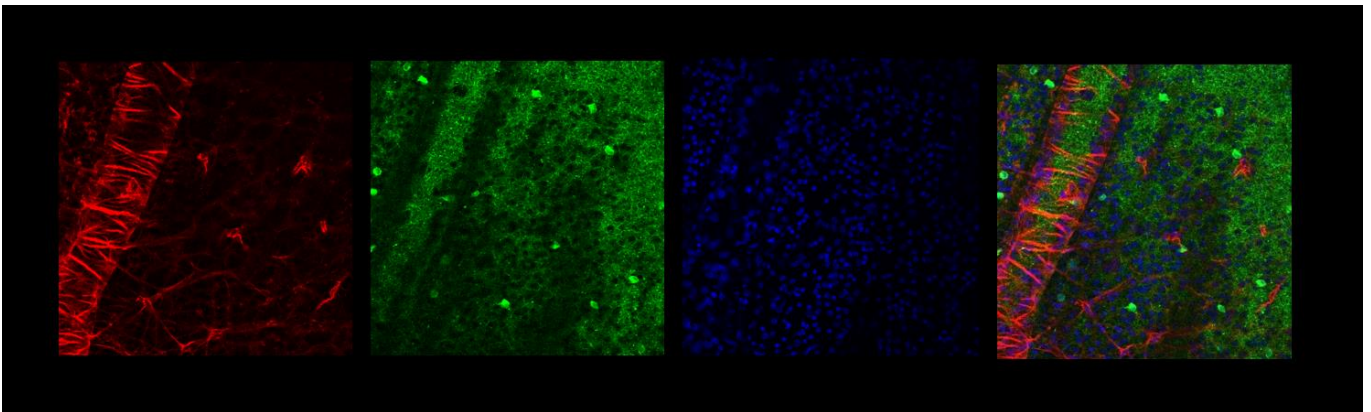


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Αμφιβληστροειδική βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης-  
GABAεργική νευροδιαβίβαση & ρήξη αιματο-  
αμφιβληστροειδικού φραγμού



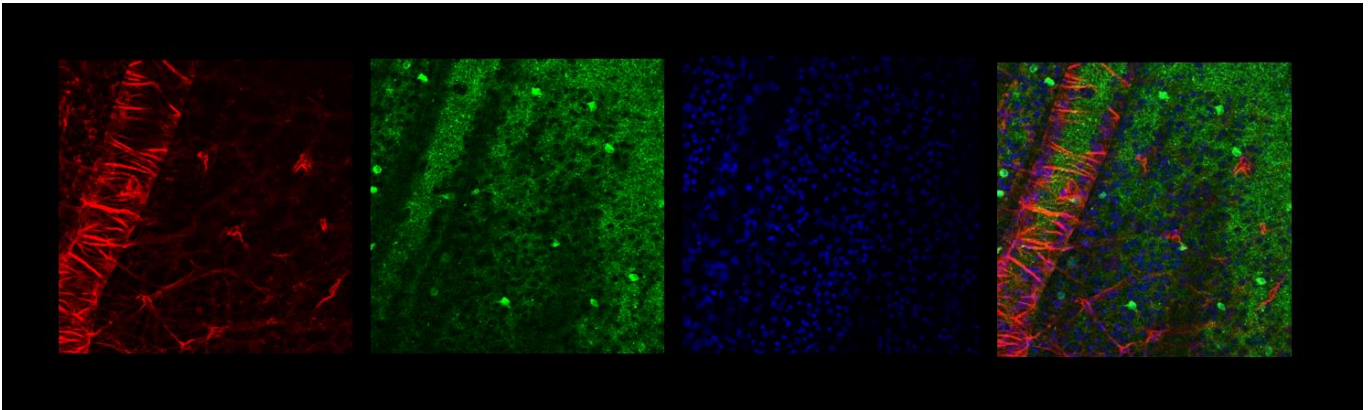
ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Σταμέλου Παναγιώτα του Κωνσταντίνου

Λάρισα, 2023

**UNIVERSITY OF THESSALY**  
**DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY**

**Retinal ischemia/reperfusion injury- GABAergic  
neurotransmission & breakdown of the blood-retinal barrier**



**BACHELOR'S THESIS**

**Stamelou Panagiota**

**Larisa, 2023**

## **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

**Άννα Βασιλάκη**, Επίκουρος Καθηγήτρια Φαρμακολογίας (Επιβλέπουσα)

*Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

**Ζίφα Αιμιλία**, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας - Νευροβιολογίας

(Συνεπιβλέπουσα)

*Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

**Χατζηευθυμίου Αποστολία**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής

Φυσιολογίας (Μέλος)

*Εργαστήριο Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2022 - 2023. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα όλους όσους συνέβαλλαν στην πραγματοποίηση και ολοκλήρωση της εργασίας αυτής. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην επιβλέπουσα καθηγήτρια μου Επίκουρο Καθηγήτρια Φαρμακολογίας κα. Βασιλάκη Άννα για την εμπιστοσύνη, τη στήριξη της και την ανεκτίμητη καθοδήγηση της καθ' όλη τη διάρκεια της πραγματοποίησης της πτυχιακής μου εργασίας καθώς και για τις πολύτιμες επιστημονικές γνώσεις που μοιράστηκε μαζί μου.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής για όλη την συνεισφορά τους στην πτυχιακή μου εργασία, την κα. Ζίφα Αιμιλία που δέχτηκε να συνεπιβλέψει την εργασία μου και την κα. Χατζηευθυμίου Αποστολία. Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τον κ. Μπέγα Ηλία, ΕΤΕΠ στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας, για τη συνεχή βοήθεια του σε ό, τι χρειάστηκα μέσα στο χώρο του εργαστηρίου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	8
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	9
<b>1. Αμφιβληστροειδής</b> .....	9
<b>1.1 Φυσιολογία</b> .....	9
<b>1.2 Νευρικά κύτταρα</b> .....	11
Φωτοϋποδοχείς.....	11
Γαγγλιακά κύτταρα.....	12
Βραχύινα κύτταρα .....	12
Δίπολα κύτταρα.....	12
Οριζόντια κύτταρα.....	13
<b>1.3 Κύτταρα γλοίας</b> .....	13
<b>2. Αιμάτωση του αμφιβληστροειδούς</b> .....	16
<b>3. Αιματο-αμφιβληστροειδικός φραγμός</b> .....	17
<b>4. Ισχαιμία</b> .....	18
<b>5. Επαναιμάτωση</b> .....	21
<b>6. Βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης</b> .....	21
<b>7. Νευροδιαβίβαση στον αμφιβληστροειδή</b> .....	23
<b>7.1 GABA-εργική νευροδιαβίβαση</b> .....	24
<b>7.2 GABA-εργική νευροδιαβίβαση στην ισχαιμία/επαναιμάτωση</b> .....	26
<b>ΣΚΟΠΟΣ</b> .....	29
<b>ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ</b> .....	30
<b>1. Πειραματόζωα</b> .....	30
<b>2. Ex vivo πείραμα ισχαιμίας-επαναιμάτωσης</b> .....	30
<b>3. Ανοσοϊστοχημεία - Ανοσοφθορισμός</b> .....	31
<b>3.1 Αρχή της μεθόδου</b> .....	31

3.2 Πειραματική Διαδικασία Ανοσοϊστοχημείας .....	31
4. Μελέτη της επίδρασης της <i>ex vivo</i> ισχαιμίας-επαναιμάτωσης στην GABAεργική νευροδιαβίβαση.....	32
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	33
1. GABAεργική ανοσοδραστικότητα στον αμφιβληστροειδή επίμυος υπό φυσιολογικές συνθήκες.....	33
2. Επίδραση της <i>ex vivo</i> ισχαιμίας στην GABAεργική ανοσοδραστικότητα στον αμφιβληστροειδή επίμυος.....	36
3. Επίδραση της <i>ex vivo</i> βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης στην GABAεργική ανοσοδραστικότητα στον αμφιβληστροειδή επίμυος .....	40
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	43
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	47

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ισχαιμία είναι μια παθολογική κατάσταση που εμφανίζεται λόγω διαταραχής της παροχής αίματος σε συγκεκριμένο ιστό ή όργανο και συνήθως ακολουθείται από επαναιμάτωση. Ο αμφιβληστροειδής είναι επιρρεπής στην βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, η οποία αποτελεί βασική αιτία διαταραχής της όρασης και συνεπώς τύφλωσης. Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν ο προσδιορισμός της GABAεργικής νευροδιαβίβασης στον αμφιβληστροειδή καθώς και οι μεταβολές του GABA κατά τη διάρκεια της *ex vivo* βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης στον αμφιβληστροειδή νεαρών ενήλικων αρσενικών επίμυων τύπου Wistar. Οι ιστοί απομονώθηκαν και διαχύθηκαν με τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό (arti-CSF/γλυκόζης κορεσμένο με 95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>, ροή: 1,2ml/min). Για τους ιστούς ελέγχου, έγινε διάχυση καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος με arti-CSF/γλυκόζης-O<sub>2</sub>, για τους ισχαιμικούς ιστούς διάχυση τα τελευταία 66min του πειράματος με arti-CSF/σουκρόζης κορεσμένο με 95%N<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub> ενώ, για του ιστούς στους οποίους επιτεύχθηκε ισχαιμία/επαναιμάτωση τα 66min ισχαιμίας ακολούθησαν 4h διάχυσης με arti-CSF/γλυκόζης-O<sub>2</sub>. Στο τέλος του πειράματος, οι ιστοί συλλέχθηκαν, μονιμοποιήθηκαν και σημάνθηκαν ανοσοϊστοχημικά για το GABA και την όξινη πρωτεΐνη των ενδιάμεσων ινιδίων της γλοίας (GFAP). Η παρατήρηση των ιστών πραγματοποιήθηκε σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, 66 λεπτά ισχαιμίας προκάλεσαν μείωση της GABAεργικής ανοσοδραστικότητας των βραχύνων κυττάρων και των αποφύσεων τους, ιδιαίτερα στο κέντρο του αμφιβληστροειδή, και μετατόπιση του σήματος στα αστροκύτταρα στη στιβάδα νευρικών ινών. Μετά από 4 ώρες επαναιμάτωσης, παρατηρήθηκε ανάκτηση της GABAεργικής ανοσοδραστικότητας στα βραχύνια κύτταρα κυρίως της μεσαίας περιοχής και της περιφέρειας του ιστού. Συμπερασματικά, το GABA φαίνεται να αποτελεί σημαντικό βιοδείκτη για τη μελέτη των πρώιμων σταδίων της βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, μια και είναι κατάλληλο για (1) τη διάκριση των σταδίων της βλάβης και (2) τη μελέτη της διαφορικής επίδρασης της στις διάφορες περιοχές του αμφιβληστροειδούς.

## **ABSTRACT**

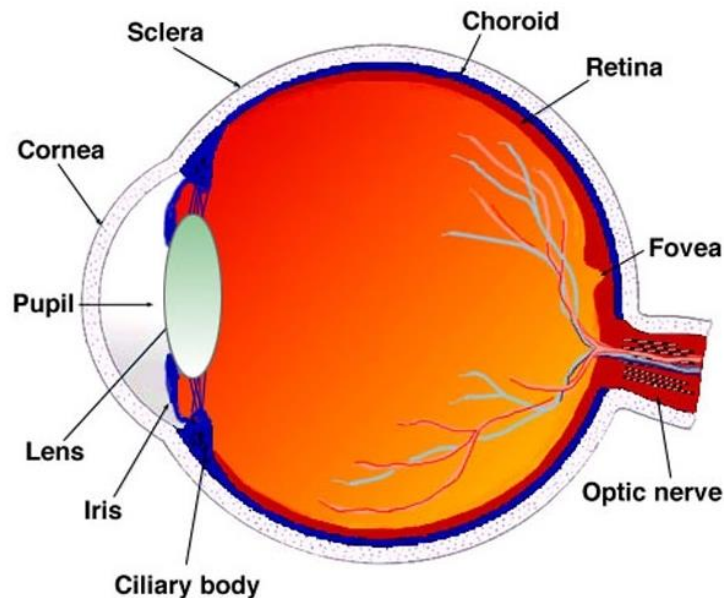
Ischemia is a pathological condition that occurs due to a disruption of blood supply to a specific tissue or organ and is usually followed by reperfusion. Retina is susceptible to ischemia/reperfusion injury, which is a major cause of visual impairment and blindness. The aim of this thesis was to determine GABAergic neurotransmission in the retina and the changes of GABA during *ex vivo* ischemia/reperfusion injury in the retina of young-adult male Wistar rats. Tissues were isolated and perfused with artificial cerebrospinal fluid (arti-CSF/glucose saturated with 95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>, flow rate: 1.2ml/min). For control tissues, perfusion was performed throughout the whole experiment with arti-CSF/glucose-O<sub>2</sub>, for ischemic tissues perfusion was performed during the last 66min of the experiment with arti-CSF/sucrose saturated with 95%N<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub> and, for tissues in which ischemia/reperfusion was achieved, 66min of ischemia was followed by 4h of perfusion with arti-CSF/glucose-O<sub>2</sub>. At the end of the experiment, tissues were harvested, fixated, and immunohistochemically labeled for GABA and glial fibrillary acidic protein (GFAP). Tissues were observed under a confocal microscope. According to our results, 66 minutes of ischemia led to a decrease of amacrine cell bodies' and processes' GABA-immunoreactivity, particularly in the center of the retina, and a signal shift to the astrocytes in the nerve fiber layer. After 4 hours of reperfusion, recovery of amacrine cell GABA-immunoactivity was observed mainly of the middle region and the periphery of the tissue. In conclusion, GABA appears to be an important biomarker for the study of the early stages of ischemia/reperfusion injury, and it is suitable for: (1) distinguishing the stages of the injury and (2) studying its differential effect on the various retinal regions.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1. Αμφιβληστροειδής

#### 1.1 Φυσιολογία

Ο αμφιβληστροειδής αποτελεί βασικό μέρος της όρασης. Αποτελεί προέκταση του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος. Ανατομικά είναι μια λεπτή μεμβράνη νευρικού ιστού που καλύπτει την εσωτερική επιφάνεια στο πίσω μέρος του ματιού. Δέχεται το φως που εστιάζει στην επιφάνειά του, το μετατρέπει σε νευρικά σήματα και μέσω του οπτικού νεύρου τα στέλνει στον εγκέφαλο, δημιουργώντας εικόνες και οπτικές αντιλήψεις. Το οπτικό νεύρο βρίσκεται στο κέντρο του αμφιβληστροειδούς, διαμορφώνεται από τους νευράξονες των γαγγλιακών κυττάρων, τα οποία αποτελούν νευρικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, ενώ από το κέντρο του εκτείνονται βασικά αιμοφόρα αγγεία του αμφιβληστροειδούς.

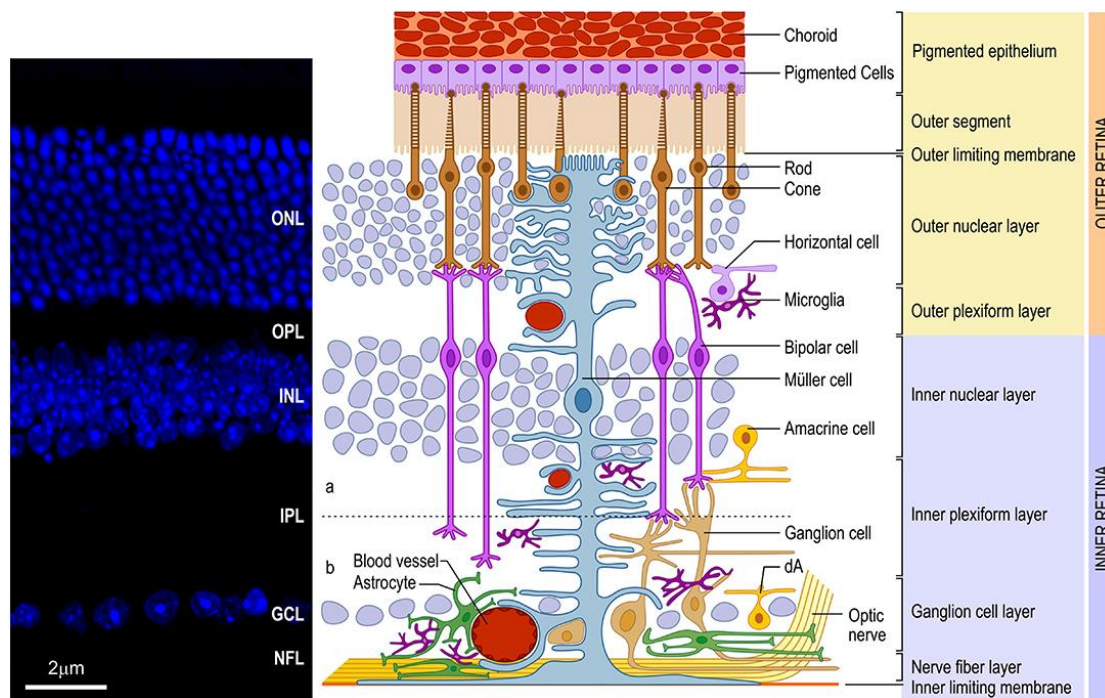


**Εικόνα 1. Ανατομία του οφθαλμού** (εικόνα χωρίς τροποποίηση από Kolb, 2001. Άδεια: Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) ).

Τα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς οργανώνονται σε στιβάδες σε όλο το πάχος του ιστού. Οι στιβάδες κατά σειρά με κατεύθυνση προς τον εγκέφαλο είναι (από μέσα προς τα έξω):

- Στιβάδα νευρικών ινών (NFL: Nerve Fiber Layer)
- Στιβάδα γαγγλιακών κυττάρων (GCL: Ganglion Cell Layer)

- Εσωτερική δικτυωτή στιβάδα (IPL: Inner Plexiform Layer)
- Εσωτερική πυρηνική ή κοκκώδης στιβάδα (INL: Inner Nuclear Layer)
- Εξωτερική δικτυωτή στιβάδα (OPL: Outer plexiform layer)
- Εξωτερική πυρηνική ή κοκκώδης στιβάδα (ONL: Outer Nuclear Layer)
- Στιβάδα φωτοϋποδοχέων
- Μελάγχρουν επιθήλιο (RPE: Retinal Pigment Epithelium)



**Εικόνα 2. Οργάνωση των στιβάδων του αμφιβληστροειδούς.** Αριστερά απεικονίζεται κατακόρυφη τομή αμφιβληστροειδούς ποντικού επισημασμένη με DAPI, το οποίο είναι μία φθορίζουσα χρωστική που βάφει πυρήνες. Δεξιά σχηματική απεικόνιση του αμφιβληστροειδούς. Διακρίνονται οι διαφορετικοί τύποι κυττάρων που βρίσκονται στις στιβάδες. Τα νευρικά κύτταρα: φωτοϋποδοχείς, οριζόντια, βραχύνια, δίπολα και γαγγλιακά κύτταρα και τα κύτταρα γλοίας: κύτταρα Müller, αστροκύτταρα και μικρογλοιακά κύτταρα. Στιβάδα Νευρικών Ινών (NFL), Στιβάδα γαγγλιακών κυττάρων (GCL), Εσωτερική Δικτυωτή Στιβάδα (IPL), Εσωτερική Πυρηνική Στιβάδα (INL), Εξωτερική Δικτυωτή Στιβάδα (OPL), Εξωτερική Πυρηνική Στιβάδα (ONL) (εικόνα χωρίς τροποποίηση από de Campos και συν., 2020 Άδεια: Attribution 4.0 International (CC BY 4.0)).

Η στιβάδα νευρικών ινών (NFL: Nerve Fiber Layer) περιέχει τους νευράξονες των γαγγλιακών κυττάρων. Τα νευρικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς είναι οι φωτοϋποδοχείς, τα οριζόντια, τα βραχύνια, τα δίπολα και τα γαγγλιακά κύτταρα. Οι τρεις κύριες στιβάδες νευρικών κυττάρων είναι, η εξωτερική κοκκώδης στιβάδα (ONL: Outer Nuclear Layer) η οποία αποτελείται από τα κυτταρικά σώματα των φωτοϋποδοχέων (τα κωνιοφόρα και τα ραβδιοφόρα κύτταρα), η εσωτερική κοκκώδης

στιβάδα (INL: Inner Nuclear Layer) στην οποία εντοπίζονται τα κυτταρικά σώματα των οριζοντίων, των διπόλων και των βραχύνων κυττάρων και η στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων (GCL: Ganglion Cell Layer) που αποτελείται από τα γαγγλιακά κύτταρα και κάποια έκτοπα βραχύινα κύτταρα. Όπως προαναφέρθηκε, υπάρχουν επίσης και οι ενδιάμεσες στιβάδες οι οποίες περιέχουν τις συνάψεις που σχηματίζουν τα νευρικά κύτταρα μεταξύ τους. Αυτές είναι: η εξωτερική δικτυωτή (OPL: Outer Plexiform Layer), όπου συνάπτονται οι φωτοϋποδοχείς με τα δίπολα και τα οριζόντια κύτταρα, και η εσωτερική δικτυωτή (IPL: Inner Plexiform Layer) όπου συνάπτονται τα γαγγλιακά κύτταρα με τα δίπολα και τα βραχύινα. Η εξώτερη στιβάδα στον αμφιβληστροειδή είναι το μελάγχρουν επιθήλιο (RPE: Retinal Pigment Epithelium), η οποία περιέχει επιθηλιακά κύτταρα και διαχωρίζει τον ιδίως αμφιβληστροειδή από τον χοριοειδή χιτώνα και βρίσκεται δίπλα στη μεμβράνη Bruch (Kolb 2001).

## **1.2 Νευρικά κύτταρα**

### Φωτοϋποδοχείς

Στον αμφιβληστροειδή διαδραματίζεται η διαδικασία της φωτομετατροπής, δηλαδή της μετατροπής του οπτικού σήματος σε νευρικό και η μεταφορά του στον εγκέφαλο. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται τους φωτοϋποδοχείς. Το φως διαπερνά τις υπόλοιπες στιβάδες νευρικών κυττάρων για να φτάσει στους φωτοϋποδοχείς. Το σήμα από τους φωτοϋποδοχείς μεταδίδεται στα δίπολα και από εκεί στα γαγγλιακά κύτταρα ενώ μέσω του οπτικού νεύρου που αυτά σχηματίζουν καταλήγει στον εγκέφαλο. Αυτή είναι γνωστή ως η κάθετη οδός μεταγωγής της οπτικής πληροφορίας.

Όπως προαναφέρθηκε τα δυο είδη φωτοϋποδοχέων είναι τα κωνιοφόρα και τα ραβδιοφόρα κύτταρα. Τα κωνιοφόρα έχουν χαμηλή ευαισθησία στο φως συνεπώς ενεργοποιούνται στο έντονο φως και είναι υπεύθυνα για την φωτοτοπική όραση την ημέρα. Υπάρχουν τρεις τύποι κωνιοφόρων καθένα από τα οποία περιέχει μια χρωστική που είναι ευαίσθητη για τρεις περιοχές του ορατού φωτός, το κόκκινο, το μπλε και το πράσινο. Συνεπώς τα κωνιοφόρα είναι υπεύθυνα για την έγχρωμη όραση, συμβάλλοντας στη διάκριση και αντίληψη των χρωμάτων. Συγκεντρώνονται στο κεντρικό βοθρίο του οφθαλμού και συντελούν στην οπτική ευκρίνεια και οξύτητα και στη χωρική αντίληψη.

Τα ραβδιοφόρα έχουν υψηλότερη ευαισθησία στο φως και ενεργοποιούνται σε καταστάσεις χαμηλής έντασης φωτός έτσι είναι υπεύθυνα για την σκοτοτοπική όραση

σε αμυδρό φως και στο σκοτάδι. Τα ραβδιοφόρα βρίσκονται στη περιφέρεια του αμφιβληστροειδούς. Συμβάλλουν στην όραση εκτός άξονα (Mahabadi και συν., 2022, Kolb, 2005).

#### Γαγγλιακά κύτταρα

Τα γαγγλιακά κύτταρα θεωρούνται το τρίτο είδος φωτοϋποδοχέων. Οι νευράξονες τους σχηματίζουν το οπτικό νεύρο και οι δενδρίτες τους εκτείνονται στην εσωτερική δικτυωτή στιβάδα, στην οποία δημιουργούν συνάψεις με τα δίπολα και τα βραχύινα κύτταρα. Τα γαγγλιακά κύτταρα εξειδικεύονται στην ανίχνευση των αντιθέσεων του φωτός καθώς και των ταχειών αλλαγών στην εικόνα. Υπάρχουν περίπου 20 διαφορετικά είδη γαγγλιακών κυττάρων, το 1-2% αυτών είναι εγγενώς φωτοευαίσθητα (ipRGC: intrinsically photosensitive Retinal Ganglion Cell). Αυτά τα κύτταρα οφείλουν τη φωτοευαισθησία τους στην έκφραση της μελανοψίνης, μια φωτοευαίσθητη χρωστική ουσία. Αυτός ο τύπος γαγγλιακών κυττάρων είναι υπεύθυνος για την απόκριση σε φωτεινά ερεθίσματα, τη ρύθμιση του κερκάρδιου ρυθμού και των σακκαδικών κινήσεων του οφθαλμού. (Mahabadi και συν., 2022, Kandel και συν., 2020).

#### Βραχύινα κύτταρα

Τα βραχύινα κύτταρα βρίσκονται στην εσωτερική κοκκώδη στιβάδα και είναι ενδιάμεσοι νευρώνες που απελευθερώνουν τον κύριο ανασταλτικό αναστολέα γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) και γλυκίνη. Υπάρχουν πολλοί τύποι βραχύνων κυττάρων που έχουν διαφορετικό σχήμα, μέγεθος και λειτουργία. Σχηματίζουν συνάψεις μεταξύ τους καθώς και με δενδρίτες γαγγλιακών κυττάρων αλλά και με τους άξονες των δίπολων κυττάρων. Έχουν την ιδιότητα να δρουν διεγερτικά και ανασταλτικά. Η διπλή αυτή δράση οφείλεται στο σχηματισμό χασμοσυνδέσμων με διαφορετικά κύτταρα, με τα οποία έχουν τη δυνατότητα επικοινωνίας, καθώς και με άλλα βραχύινα κύτταρα (Mahabadi και συν., 2022, Kolb, 2005).

#### Δίπολα κύτταρα

Τα δίπολα κύτταρα αποτελούν νευρώνες δεύτερης τάξης και βρίσκονται στην εσωτερική κοκκώδη στιβάδα. Από το κυτταρικό τους σώμα εκφύονται δύο σύνολα αποφύσεων το ένα εκ των οποίων αλληλεπιδρά με τους φωτοϋποδοχείς και το άλλο με τα γαγγλιακά κύτταρα. Κατά αυτό τον τρόπο συμβάλλουν στη σύνδεση μεταξύ της εσωτερικής στιβάδας και της εξωτερικής. Οι συνάψεις τους με τους φωτοϋποδοχείς

βρίσκονται στην εξωτερική δικτυωτή στιβάδα και οι συνάψεις με τα γαγγλιακά στην εσωτερική δικτυωτή στιβάδα.

Τα δίπολα κύτταρα επικοινωνούν με τα οριζόντια καθώς και με τα βραχύινα κύτταρα. Τα βραχύινα κύτταρα έχουν ανασταλτική δράση στα δίπολα κύτταρα. Τα οριζόντια κύτταρα συνάπτονται με τα δίπολα κύτταρα και τους στέλνουν τον ανασταλτικό νευροδιαβιβαστή GABA (γ-αμινοβουτυρικό οξύ). Επίσης οι φωτοϋποδοχείς απελευθερώνουν το διεγερτικό νευροδιαβιβαστή γλουταμινικό οξύ ο οποίος αναγνωρίζεται από υποδοχείς του που βρίσκονται στα δίπολα κύτταρα. Τα δίπολα έπειτα στέλνουν διεγερτικά νευρικά σήματα μέσω του γλουταμινικού οξέος στα γαγγλιακά και βραχύινα κύτταρα (Mahabadi και συν., 2022, Kolb, 2005).

#### Οριζόντια κύτταρα

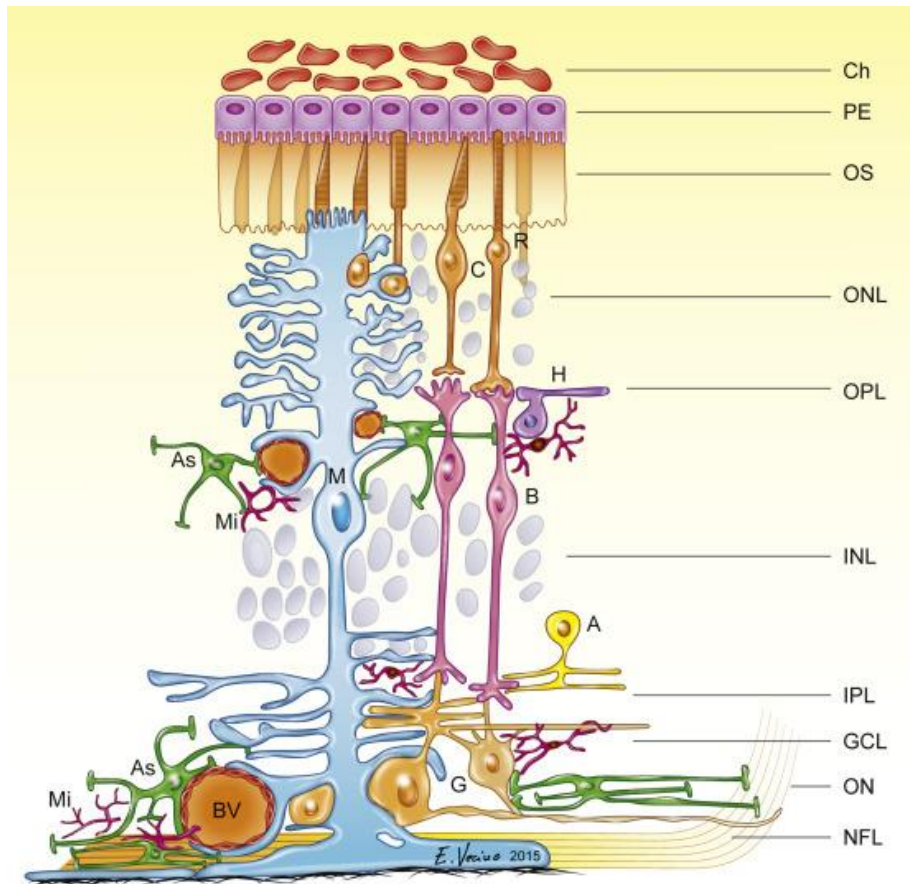
Τα οριζόντια κύτταρα, όπως και τα δίπολα και τα βραχύινα είναι ενδιάμεσοι νευρώνες. Τα κυτταρικά σώματα των οριζόντιων κυττάρων βρίσκονται στην εσωτερική κοκκώδη στιβάδα. Τα κύτταρα αυτά συμβάλλουν στη προσαρμογή του οφθαλμού σε καταστάσεις χαμηλού και υψηλού φωτισμού. Όπως ήδη αναφέρθηκε τα οριζόντια κύτταρα στέλνουν στα δίπολα κύτταρα ανασταλτική νευροδιαβίβαση μέσω του GABA. Κατά συνέπεια αναστέλλουν τη διέγερση της μετασυναπτικής μεμβράνης των δίπολων κυττάρων και την προσυναπτική μεμβράνη των φωτοϋποδοχέων. Ωστόσο υποστηρίζεται από ορισμένες μελέτες ότι η ανασταλτική αυτή δράση των οριζόντιων κυττάρων ενδέχεται να οφείλεται στη ιδιότητα τους να ρυθμίζουν το pH στη συναπτική σχισμή (Mahabadi και συν., 2022, Kolb, 2005).

### **1.3 Κύτταρα γλοίας**

Τα κύτταρα γλοίας είναι μη νευρικά κύτταρα που βρίσκονται στο νευρικό σύστημα. Ο αμφιβληστροειδής περιέχει τα κύτταρα Müller, τα αστροκύτταρα και τα μικρογλοιακά. Τα κύτταρα γλοίας έχουν υποστηρικτικό ρόλο για τα νευρικά κύτταρα του ΚΝΣ. Συγκεκριμένα κάποιες από τις φυσιολογικές τους λειτουργίες είναι οι εξής:

- Περιβάλλουν τους νευρώνες και τους παρέχουν δομική υποστήριξη και σταθερότητα.
- Παρέχουν θρεπτικά συστατικά στους νευρώνες.
- Απομακρύνουν τοξικά ή άχρηστα προϊόντα μετά από κάποια βλάβη.
- Μονώνουν τους νευρώνες.

- Συμμετέχουν στην ανακύκλωση νευροδιαβιβαστών (García-Bermúdez και συν., 2021).



**Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση των κυττάρων γλοίας στον αμφιβληστροειδή και οι αλληλεπιδράσεις τους με τα νευρικά κύτταρα.** Κύτταρα: Βραχύινα κύτταρα (A, amacrine cells), αστροκύτταρα (AS, astrocytes, με πράσινο χρώμα), δίπολα κύτταρα (B, bipolar cells), κωνιοφόρα (C, cones), γαγγλιακά κύτταρα (G, ganglion cells), οριζόντια κύτταρα (H, horizontal cells), κύτταρα Müller (M, με μπλε χρώμα), μικρογλοία (Mi, microglia με κόκκινο χρώμα), ραβδιοφόρα (R, rods). Στιβάδες: οπτικό νεύρο (ON optic nerve), στιβάδα νευρικών ινών (NFL, nerve fibre layer), στιβάδα γαγγλιακών κυττάρων (GCL, ganglion cell layer), εσωτερική δικτυωτή στιβάδα (IPL, inner plexiform layer), εσωτερικό κοκκώδη στιβάδα (INL, inner nuclear layer), εξωτερική δικτυωτή στιβάδα (OPL, outer plexiform layer), εξωτερική κοκκώδης στιβάδα (ONL, outer nuclear layer), μελάχρον επιθήλιο (PE, pigment epithelium), χοριοειδές πλέγμα (Ch, choroid). (Vecino και συν., 2016, license number: 5627020735644 ).

Τα κύτταρα της γλοίας διαχωρίζονται σε μικρο- και μακρο-γλοιακά. Η μακρογλοία αποτελείται από κύτταρα Müller και αστροκύτταρα και είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση της ομοιόστασης και του μεταβολισμού των νευρώνων του αμφιβληστροειδούς. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της ρύθμισης ανταλλαγής ιόντων, γλυκόζης και μεταφοράς νευροδιαβιβαστών (García-Bermúdez και συν., 2021).

Τα κύτταρα Müller εκτείνονται σε όλο το μήκος του αμφιβληστροειδούς και καθορίζουν τα όρια μεταξύ εξωτερικής (External) και εσωτερικής περιοριστικής μεμβράνης (Internal Limiting Membrane). Οι πυρήνες τους εντοπίζονται στην εσωτερική κοκκώδη στιβάδα (García-Bermúdez και συν., 2021). Φυσιολογικά συμβάλλουν στην ομαλή λειτουργία του αμφιβληστροειδούς. Οι ρόλοι τους είναι οι εξής:

- Έχουν την ιδιότητα να προσλαμβάνουν νευροδιαβιβαστές και να τους ανακυκλώνουν και κατά συνέπεια συμβάλλουν στην προστασία του αμφιβληστροειδή από την ύπαρξη περίσσειας ποσότητας νευροδιαβιβαστών και από τη διεγερτοτοξικότητα. Η διεγερτοτοξικότητα ορίζεται ως μια παθολογική διαδικασία υπερβολικής διέγερσης των νευρικών κυττάρων από διεγερτικούς νευροδιαβιβαστές, όπως είναι το γλουταμινικό (Choi, 1992). Παρέχουν, παράλληλα, στα νευρικά κύτταρα τα πρόδρομα μόρια που είναι απαραίτητα για τη σύνθεση των νευροδιαβιβαστών GABA και γλουταμινικό οξύ.
- Ρυθμίζουν την ομοιόσταση ιόντων (πρόσληψη εξωκυττάρου  $K^+$ ) καθώς και το pH του αμφιβληστροειδούς.
- Συμβάλλουν στο σχηματισμό και στη διατήρηση του αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού.
- Έχουν την ιδιότητα να κάνουν αναερόβιο μεταβολισμό και να παρέχουν γλυκογόνο στους νευρώνες για τον αερόβιο μεταβολισμό τους.
- Συμμετέχουν στην φαγοκυττάρωση υπολειμμάτων των νευρικών κυττάρων (Fletcher, 2007, Kolb, 2001).

Τα αστροκύτταρα βρίσκονται μόνο στο Στρώμα Νευρικών Ινών του αμφιβληστροειδούς, το οποίο περιέχει μόνο αγγεία και τους άξονες των γαγγλιακών κυττάρων. Ορισμένοι από τους ρόλους τους στο ΚΝΣ είναι οι εξής:

- Αποθήκευση γλυκογόνου, το οποίο μπορούν να διασπούν και να παρέχουν γλυκόζη στους νευρώνες με αποτέλεσμα την παραγωγή ενέργειας.
- Διατήρηση ιοντικής ομοιόστασης μέσω ρύθμισης της εξωκυττάριας συγκέντρωσης ιόντων  $K^+$ .
- Μεταβολισμός νευροδιαβιβαστών.
- Διατήρηση του αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού (Kolb, 2001).

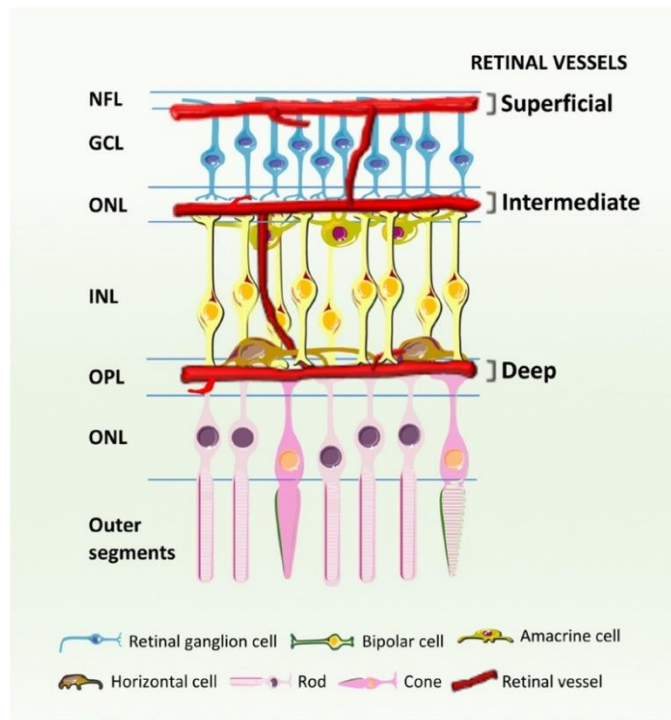
Η μικρογλοία είναι ένα είδος κύτταρων που ανήκουν στο ανοσοποιητικό σύστημα, και έχουν σημαντικό ρόλο στην προστασία του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) από παθολόγους μικροοργανισμούς και τραυματισμούς. Τα κύτταρα μικρογλοίας βρίσκονται σε όλες τις στιβάδες του αμφιβληστροειδούς. Ορισμένες από τις λειτουργίες τους στον αμφιβληστροειδή περιλαμβάνουν:

- Ρύθμιση φλεγμονωδών αντιδράσεων.
- Απομάκρυνση τοξικών παραπροϊόντων και κυτταρικών υπολειμμάτων.
- Παραγωγή νευροτροφικών παραγόντων.
- Συμμετοχή στην αγγειογένεση (Rathnasamy και συν., 2019).

## **2. Αιμάτωση του αμφιβληστροειδούς**

Ο αμφιβληστροειδής αποτελεί ιστό με διπλή αιμάτωση, η οποία καλύπτει τις ανάγκες του ιστού για υψηλά επίπεδα οξυγόνου. Αυτές οι ανάγκες οφείλονται στο γεγονός ότι ο αμφιβληστροειδής είναι μεταβολικά απαιτητικός ιστός καθώς παρουσιάζει την υψηλότερη κατανάλωση οξυγόνου σε σύγκριση με οποιονδήποτε άλλο ιστό. Η ροή του αίματος στον αμφιβληστροειδή είναι ανεξάρτητη από την ενδοφθάλμια πίεση, τη συστηματική αρτηριακή πίεση ή τη λειτουργία του συμπαθητικού νευρικού συστήματος αλλά εξαρτάται από τοπικούς παράγοντες, όπως το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και το διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>). Όπως και στον εγκέφαλο η ροή αίματος στον αμφιβληστροειδή θα αυξηθεί με την αύξηση συγκέντρωσης CO<sub>2</sub> και θα μειωθεί με την μείωση συγκέντρωσης του (Mahabadi και Khalili, 2022).

Η αγγείωση στον αμφιβληστροειδή είναι οριζόντια. Τριχοειδή αγγεία βρίσκονται σε όλη την έκταση του αμφιβληστροειδούς, από την στιβάδα νευρικών ινών έως την εξωτερική δικτυωτή στιβάδα. Η εξωτερική κοκκώδης στιβάδα, που περιέχει τα κυτταρικά σώματα των φωτοϋποδοχέων, και η εξωτερική δικτυωτή στιβάδα (OPL) αιματώνονται από τα τριχοειδή αιμοφόρα αγγεία του χοριοειδούς πλέγματος. Οι εσωτερικές στιβάδες του ιστού αιματώνονται από την κεντρική αρτηρία του αμφιβληστροειδούς, η οποία αποτελεί κλάδο της οφθαλμικής αρτηρίας. Η κεντρική αρτηρία διακλαδίζεται και προκύπτουν τρία στρώματα αγγειακών πλεγμάτων στον αμφιβληστροειδή (Osborne 2004).



**Εικόνα 4. Αιμάτωση του αμφιβληστροειδούς.** Τρία στρώματα αγγειακών πλεγμάτων είναι ενσωματωμένα μεταξύ των στιβάδων των νευρικών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς: το επιφανειακό στρώμα (*superficial layer*) βρίσκεται στη στιβάδα των νευρικών ινών (*NFL*) με κλάδους που εκτείνονται στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων (*GCL*). Το ενδιάμεσο (*intermediate layer*) και το βαθύ στρώμα (*deep layer*) εντοπίζονται παράλληλα διαταγμένα στις δύο πλευρές της εσωτερικής πυρηνικής στιβάδας (*INL*) (εικόνα χωρίς τροποποίηση από Santiago, και συν., 2018 Άδεια: Attribution 4.0 International (CC BY 4.0)).

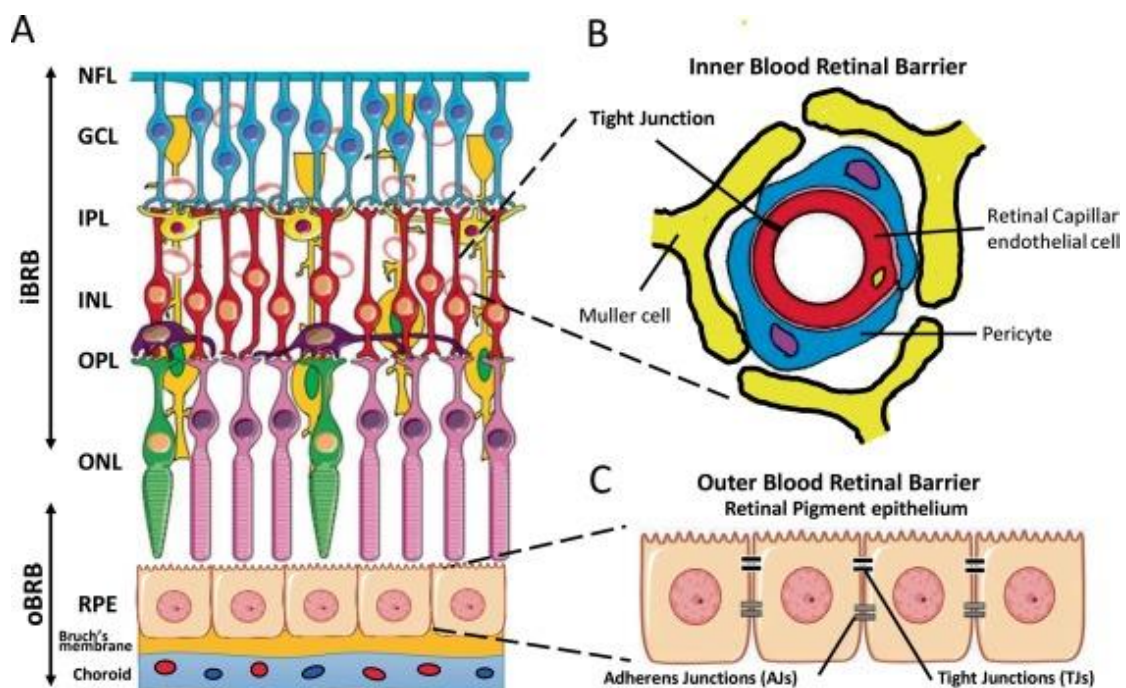
### 3. Αιματο-αμφιβληστροειδικός φραγμός

Ο αιματο-αμφιβληστροειδικός φραγμός αποτελεί έναν ζωτικής σημασίας φυσικό προστατευτικό φραγμό για τη διατήρηση της ομοιόστασης στον αμφιβληστροειδή και συνεπώς τη διατήρηση της όρασης. Ρυθμίζει την παροχή θρεπτικών συστατικών στον αμφιβληστροειδή, εμποδίζοντας την ελεύθερη είσοδο και έξοδο στον οφθαλμικό κυττάρων και μορίων όπως ιόντα, πρωτεΐνες και μόρια νερού (José Cunha-Vaz, 2011). Η διαταραχή του αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού αποτελεί βασικό αίτιο για πολλές ασθένειες του αμφιβληστροειδούς, όπως διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, ηλικιακή εκφύλιση ωχράς κηλίδας κ.α.

Ο αιματο-αμφιβληστροειδικός φραγμός αποτελείται από τον εσωτερικό και τον εξωτερικό αιματο-αμφιβληστροειδικό φραγμό. Ο εσωτερικός περιλαμβάνει αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, περικύτταρα, κύτταρα Müller και νευρώνες ενώ ο εξωτερικός

κύτταρα του μελάγχρου επιθηλίου του αμφιβληστροειδούς (RPE). Ο εξωτερικός αιματο-αμφιβληστροειδικός φραγμός περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις μεταξύ του χοριοειδούς πλέγματος, της μεμβράνης του Bruch και του RPE, διαχωρίζοντας το ιδίως αμφιβληστροειδή από το χοριοειδές πλέγμα και ρυθμίζοντας την ανταλλαγή μορίων μεταξύ τους.

Σημαντικό μέρος του φραγμού αποτελούν οι κυτταρικές συνδέσεις, οι οποίες συμβάλλουν στη ρύθμιση πρόσβασης μορίων στον ιστό. Στον εσωτερικό αιματο-αμφιβληστροειδικό φραγμό στενοσύνδεσμοι (tight junctions) βρίσκονται μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων ενώ στον εξωτερικό στενοσύνδεσμοι καθώς και σύνδεσμοι πρόσφυσης (tight & adherens junctions) μεταξύ των κυττάρων του μελάγχρου επιθηλίου. Αυτοί οι σύνδεσμοι σχηματίζουν ένα στεγανωτικό δακτύλιο στη περίμετρο των κυττάρων του μελάγχρου επιθηλίου που εμποδίζει την πρόσβαση μορίων στον φραγμό (O'Leary και Campbell 2021).

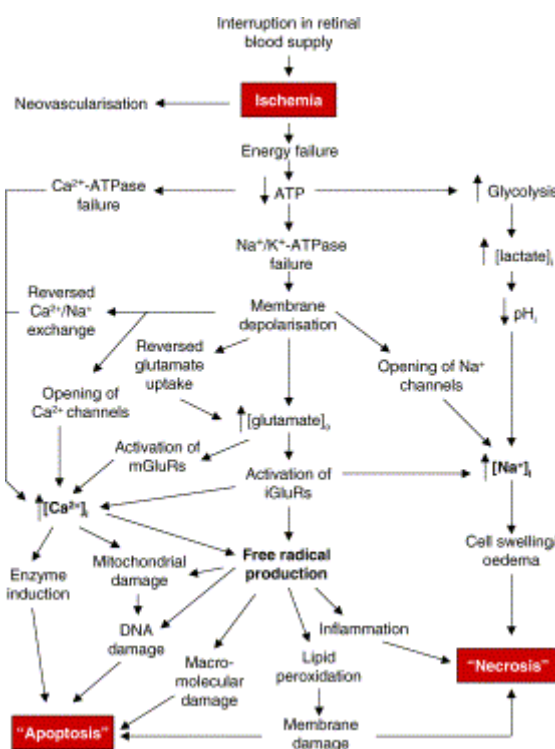


Εικόνα 5. Οργάνωση του αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού (Rudraraju και συν., 2020, license Number: 5627250678899).

#### 4. Ισχαιμία

Ο αμφιβληστροειδής είναι επιρρεπής στην ισχαιμική βλάβη, εξαιτίας των υψηλών μεταβολικών απαιτήσεών του που οφείλονται, όπως προαναφέρθηκε, στην υψηλή

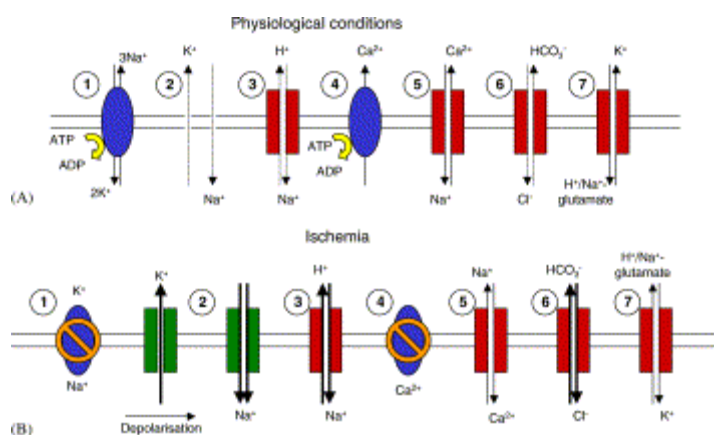
κατανάλωση οξυγόνου από τον ιστό. Η ισχαιμία του αμφιβληστροειδούς συνδέεται με ασθένειές του όπως το γλαύκωμα, η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και η απόφραξη της κεντρικής αρτηρίας του αμφιβληστροειδούς, που αποτελούν κύρια αιτία διαταραχής της όρασης ή τύφλωσης. Η ισχαιμία, γενικά, είναι μια κατάσταση που εμφανίζεται λόγω διαταραχής της παροχής αίματος σε συγκεκριμένο ιστό ή όργανο, η οποία διακόπτει την παροχή οξυγόνου και γλυκόζης και άλλων μεταβολικών υποστρωμάτων, πυροδοτώντας έναν καταρράκτη γεγονότων που καταλήγει σε κυτταρικό θάνατο. Η ισχαιμία αποτελεί βλάβη απουσία εισβολής παθογόνου (sterile inflammation) που προκαλεί φλεγμονώδη απόκριση.



**Εικόνα 6. Ισχαιμικός καταρράκτης** (Osborne και συν., 2004, License Number: 5627260521277).

Η ισχαιμία προκαλεί μορφολογικές και λειτουργικές μεταβολές στον αμφιβληστροειδή, εφόσον η μείωση γλυκόζης και οξυγόνου επιφέρει εξάντληση των ενεργειακών αποθεμάτων (ATP). Η παθογένεση της ισχαιμίας του αμφιβληστροειδούς περιλαμβάνει μια σειρά μοριακών γεγονότων, τον ισχαιμικό καταρράκτη. Ο αμφιβληστροειδής οδηγείται σε ενεργειακή αποτυχία, διεργετοτοξική βλάβη, ανισορροπία ασβεστίου, οξειδωτικό στρες. Συγκεκριμένα ο ισχαιμικός καταρράκτης χαρακτηρίζεται από μη λειτουργική αντλία  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  ( $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ -ATPάση), εκπόλωση της μεμβράνης, αύξηση κυτταροπλασματικής συγκέντρωσης ιόντων  $\text{Na}^+$  και  $\text{Ca}^{2+}$  και σχηματισμό ελεύθερων ριζών (Minhas και συν., 2016).

Η ενεργειακή αποτυχία που προκύπτει από τη βλάβη προκαλεί μείωση των επίπεδων ATP. Κατά συνέπεια οι αντλίες  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  και  $\text{Ca}^{+2}$ , οι οποίες είναι ATPάσες, σταματούν να λειτουργούν με αποτέλεσμα την αύξηση της κυτταροπλασματικής συγκέντρωσης των ιόντων  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  και της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης  $\text{Ca}^{+2}$ . Έτσι προκύπτει άνοιγμα διαύλων  $\text{K}^+$  με κατεύθυνση προς τα έξω και διαύλων  $\text{Na}^+$  με κατεύθυνση προς τα μέσα, αντιστροφή της ανταλλαγής ιόντων  $\text{Ca}^{+2}$ -  $\text{Na}^+$  και γίνεται πρόσληψη νευροδιαβιβαστών. Στη προσπάθεια να διατηρηθεί το pH στο εσωτερικό του κυττάρου, το οποίο διαρκώς αυξάνεται, τα πρωτόνια καθώς και τα ανιόντα  $\text{HCO}^{-3}$  αυξάνονται. Όλα αυτά οδηγούν στην περαιτέρω μετακίνηση στο εσωτερικό του κυττάρου ιόντων  $\text{Na}^+$  και  $\text{Cl}^-$  και κατά συνέπεια μετακίνηση νερού σύμφωνα με οσμωτική βαθμίδωση. Κατά αυτό το τρόπο προκαλείται κυτταρικό διόγκωση και οίδημα (εικόνα 7, Osborne και συν., 2004).



**Εικόνα 7. Λειτουργία ιοντικών διαύλων** A) Σε φυσιολογικές συνθήκες B) Σε συνθήκες ισχαιμίας (Osborne και συν., 2004, License Number: 5627260521277)

Ο αμφιβληστροειδής χαρακτηρίζεται από μια σχετική ανθεκτικότητα σε συνθήκες ισχαιμίας σε σχέση με τον εγκέφαλο, καθώς φαίνεται να επιβιώνει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε ισχαιμικές συνθήκες. Οι εσωτερικές στιβάδες του αμφιβληστροειδούς έχουν τη μεγαλύτερη ευαισθησία στις ισχαιμικές-υποξικές συνθήκες, ενώ οι εξωτερικές παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανοχή σε αυτές. Κάποιες θεωρίες που εξηγούν την ανθεκτικότητα του αμφιβληστροειδούς στην ισχαιμία είναι οι εξής:

1. Το υαλώδες σώμα παρέχει στον αμφιβληστροειδή γλυκόζη το χρονικό διάστημα που βρίσκεται σε ισχαιμία, καθώς περιέχει υψηλές ποσότητες γλυκόζης.

2. Υπάρχουν υψηλά αποθέματα γλυκογόνου στον αμφιβληστροειδή. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα Müller και τα αστροκύτταρα έχουν μεγάλες αποθήκες γλυκογόνου.
3. Ο αμφιβληστροειδής έχει την ικανότητα γλυκόλυσης απουσίας οξυγόνου και συνεπώς να παράγει ATP για την επιβίωση του (Osborne και συν., 2004).

## **5. Επαναιμάτωση**

Η επαναιμάτωση ορίζεται ως η επαναφορά της ροής του αίματος στον ιστό έπειτα από την ισχαιμία. Η επαναιμάτωση παρότι είναι αναγκαία για την επιβίωση του ιστού έχει αποδειχθεί ότι επιδεινώνει τη βλάβη που έχει προκληθεί από την ισχαιμία και μπορεί να προκαλέσει και περαιτέρω βλάβη στον ιστό με πιθανό αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Εισάγεται λοιπόν ο όρος βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (IRI: Ischaemia/Reperfusion injury), η οποία ορίζεται ως η παράδοξη παρόξυνση της κυτταρικής δυσλειτουργίας και του κυτταρικού θανάτου έπειτα από την αποκατάσταση της ροής αίματος σε προηγουμένως ισχαιμικό ιστό (Cowled και Fitridge, 2011).

## **6. Βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης**

Στη βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης μετά την αποκατάσταση ροής του αίματος επέρχεται επανοξυγόνωση του ιστού, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου ROS, η οποία οδηγεί σε οξειδωτικό στρες, βλάβη του ιστού και τελικά απόπτωση. Οι ROS ενδέχεται να είναι επιζήμιες για τα βιομόρια καθώς ενεργοποιούν φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Παράλληλα παρατηρούνται πολύπλευρες κυτταρικές αποκρίσεις κατά τη διάρκεια της βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης του αμφιβληστροειδούς, όπως σχηματισμός φλεγμονοσωμάτων, απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτταροκινών, ενεργοποίηση μακρογλοίας και μικρογλοίας, διαταραχή του αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού, κυτταρικό στρες και απόπτωση (Minhas και συν., 2016).

Οι αντλίες  $Ca^{+2}$ -ATPάσες όπως προαναφέρθηκε χάνουν τη λειτουργικότητά τους και συνεπώς παρατηρείται ενδοκυτταρική συσσώρευση ασβεστίου. Η αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ασβεστίου είναι επιζήμια για το κύτταρο καθώς ενεργοποιούνται διάφορα ένζυμα τα οποία προκαλούν αλλαγές που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο. Επιπρόσθετα το ασβέστιο αυξάνει τα επίπεδα ROS, καταστρέφει

τις κυτταρικές μεμβράνες, μεταβάλλει τη μιτοχονδριακή λειτουργία και επάγει την κυτταρική απόπτωση (Wu και συν., 2018). Η συγκέντρωση ενδοκυττάρου ασβεστίου μπορεί να αυξηθεί με πολλούς μηχανισμούς:

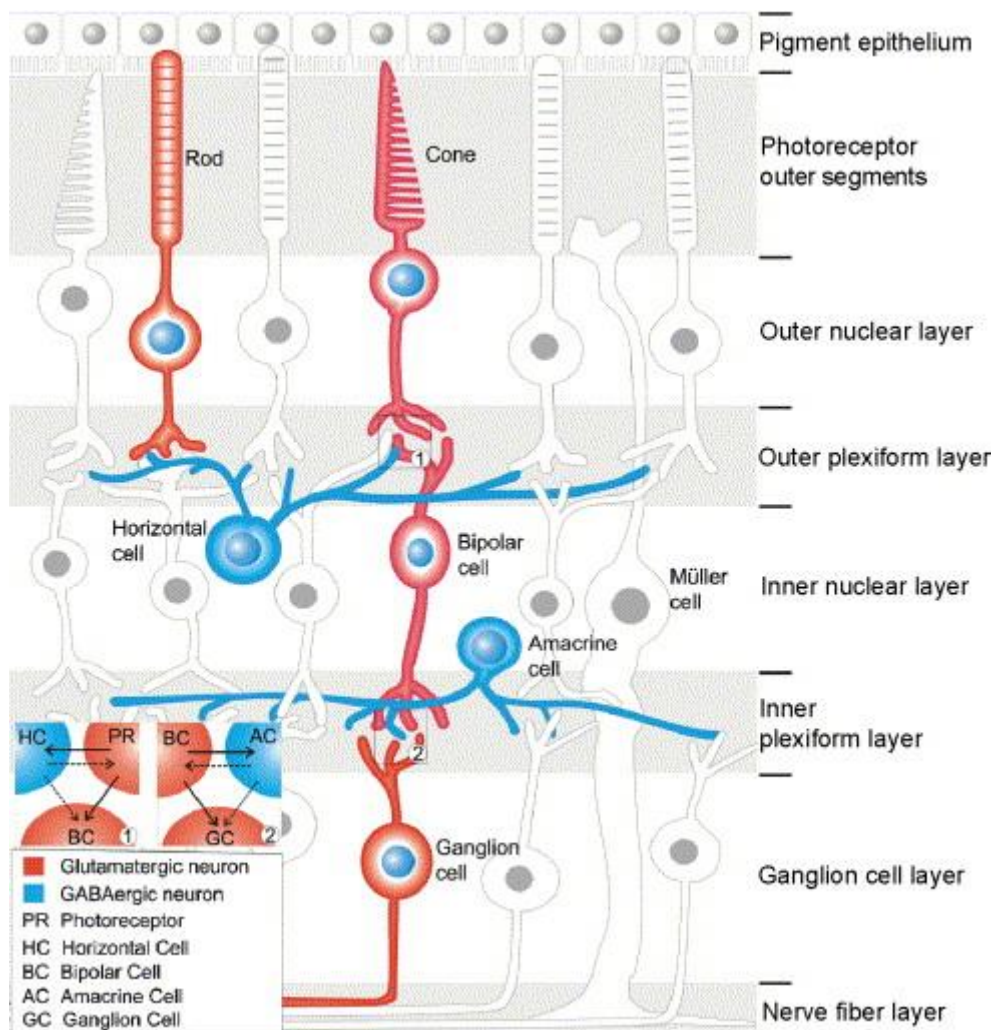
- Με διαύλους που συνδέονται με νευροδιαβιβαστές
- Με αναστροφή της ανταλλαγής  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$
- Με διέγερση των μεταβοτροπικών υποδοχέων νευροδιαβιβαστών, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ασβεστίου από ενδοκυτταρικές αποθήκες (Osborne και συν., 2004).

Κατά τη διάρκεια της βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης παρατηρείται διαταραχή και ρήξη του αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού. Η υποξία που προκύπτει από την ισχαιμία οδηγεί σε αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα και κατά συνέπεια σε διαταραχή του εσωτερικού αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού. Διάφοροι μηχανισμοί, όπως η αυξημένη παραγωγή του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) και  $\text{NO}$ , ελεύθερων ριζών και φλεγμονωδών μεσολαβητών ενδέχεται να είναι υπεύθυνοι για τη διαταραχή του αιματο-αμφιβληστροειδικού σε υποξικές-ισχαιμικές συνθήκες.

Ο VEGF είναι ένας αγγειογενετικός αυξητικός παράγοντας καθώς και παράγοντας ενίσχυσης της αγγειακής διαπερατότητας. Στον αμφιβληστροειδή σε υποξικές-ισχαιμικές συνθήκες αυξάνεται η έκφραση του VEGF από τα αστροκύτταρα και κύτταρα Müller. Ο αυξητικός αυτός παράγοντας μπορεί να επηρεάσει την αγγειακή διαπερατότητα επάγοντας τη δημιουργία οπών σε ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και την αναδιάταξη πρωτεϊνών κυτταρικής προσκόλλησης που συγκρατούν τον αιματο-αμφιβληστροειδικό φραγμό (Kaur και συν., 2008).

Ένας άλλος μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για τη διατάραξη του αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού είναι η συσσώρευση λευκοκυττάρων στο σημείο της βλάβης κατά τη διάρκεια ισχαιμίας. Η επαναιμάτωση προκαλεί διείσδυση των λευκοκυττάρων στο φραγμό με αποτέλεσμα τη παραβίασή του και τη δημιουργία οπών (Minhas και συν., 2016).

## 7. Νευροδιαβίβαση στον αμφιβληστροειδή



**Εικόνα 8. Σχηματική απεικόνιση οργάνωσης του αμφιβληστροειδή και της ροής του σήματος.** Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζονται οι γλουταμινεργικοί νευρώνες, δηλαδή οι φωτοϋποδοχείς, τα δίπολα και γαγγλιακά κύτταρα, ενώ με μπλε χρώμα οι GABAεργικοί νευρώνες, δηλαδή τα βραχύνια και οριζόντια κύτταρα. Στην εξωτερική δικτυωτή στιβάδα (OPL), τα οριζόντια κύτταρα δέχονται ερεθίσματα από τους φωτοϋποδοχείς και παρέχουν αρνητική ανατροφοδότηση στα κωνιοφόρα. Τα δίπολα κύτταρα δέχονται πληροφορίες τόσο από τους φωτοϋποδοχείς όσο και από τα οριζόντια κύτταρα. Στην εσωτερική δικτυωτή στιβάδα (IPL), τα δίπολα και βραχύνια κύτταρα σχηματίζουν αμοιβαίες συνάψεις και παρέχουν και οι δύο input στα γαγγλιακά κύτταρα (Yang 2004, License Number: 5627271152564).

Οι κυριότεροι νευροδιαβιβαστές που απελευθερώνονται από τα νευρικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς είναι το γλουταμινικό οξύ, το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) και η γλυκίνη. Το γλουταμινικό οξύ είναι υπεύθυνο για τη μετάδοση της πληροφορίας στο κάθετο μονοπάτι μετάδοσης σήματος του αμφιβληστροειδούς. Απελευθερώνεται από τους φωτοϋποδοχείς και από τα δίπολα κύτταρα καθώς και από κάποια γαγγλιακά κύτταρα. Η κάθετη μεταφορά ακολουθεί την εξής πορεία φωτοϋποδοχείς→ δίπολα

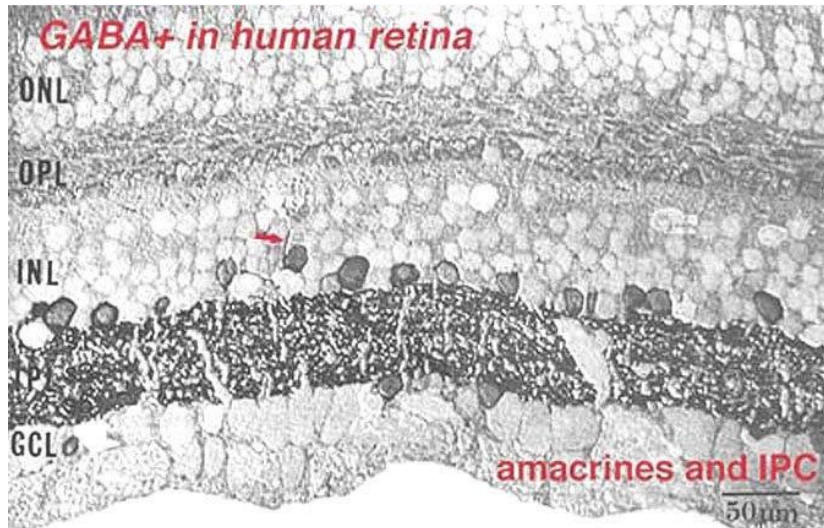
κύτταρα → γαγγλιακά κύτταρα. Τα δίπολα έχουν υποδοχείς είτε μεταβοτροπικούς είτε ιοντοτροπικούς.

### **7.1 GABA-εργική νευροδιαβίβαση**

Το GABA είναι ο κύριος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος. Το GABA συντίθεται από το γλουταμινικό οξύ μέσω της δράσης του ενζύμου αποκαρβοξυλάση του γλουταμινικού (GAD). Η βασική φυσιολογική λειτουργία του είναι η αναστολή της διέγερσης της μετασυναπτικής μεμβράνης ενός νευρώνα. Συντίθεται και αποθηκεύεται σε κυστίδια στο προσυναπτικό νευρώνα και απελευθερώνεται στη συναπτική σχισμή μέσω του κυστιδικού μεταφορέα VGAT (Vesicular GABA Transporter). Απελευθερώνεται ως απόκριση στο δυναμικό δράσης στη συναπτική σχισμή και έπειτα αναγνωρίζεται από ειδικούς υποδοχείς του στο μετασυναπτικό νευρώνα (Yazulla, 1986).

Το GABA εντοπίζεται σε μεγάλη συγκέντρωση σε νευρώνες του αμφιβληστροειδούς, οι οποίοι εμφανίζουν υψηλή δραστηριότητα του ενζύμου GAD. Οι νευρώνες αυτοί απελευθερώνουν GABA ως απόκριση στην αποπόλωση ή σε άλλα ερεθίσματα, όπως είναι το φως. Στον αμφιβληστροειδή GABA εντοπίζεται σε βραχύνα και οριζόντια κύτταρα τα οποία συμμετέχουν στο οριζόντιο μονοπάτι μετάδοσης του οπτικού σήματος. Το GABA απελευθερώνεται από τα βραχύνα κύτταρα με τρόπο εξαρτώμενο ή μη εξαρτώμενο από το ασβέστιο. Από τα οριζόντια κύτταρα απελευθερώνεται με τρόπο εξαρτώμενο από το νάτριο, αλλά ανεξάρτητο από το ασβέστιο. Σε ορισμένες μελέτες έχει φανεί ότι και από τα οριζόντια κύτταρα μπορεί να απελευθερώνεται και με τρόπο εξαρτώμενο από το ασβέστιο (Porona, 2014, Yazulla, 1986).

Είναι γνωστό ότι οι νευροδιαβιβαστές που είναι αμινοξέα, όπως το GABA, αποχωρούν από τη συναπτική σχισμή με τη βοήθεια ειδικών μεταφορέων (Wu 1998). Οι μεταφορείς του GABA (GAT: GABA Transporter) συμβάλλουν στη διατήρηση των εξωκυτταρικών επιπέδων GABA (Yang 2004). Συγκεκριμένα υπάρχουν οι μεταφορείς GAT1, οι οποίοι εξαρτώνται από νάτριο και χλώριο και είναι υπεύθυνοι για την απομάκρυνση του GABA από τη συναπτική σχισμή και κατά συνέπεια τον τερματισμό της νευροδιαβίβασης μέσω GABA (Qian και συν., 2018).

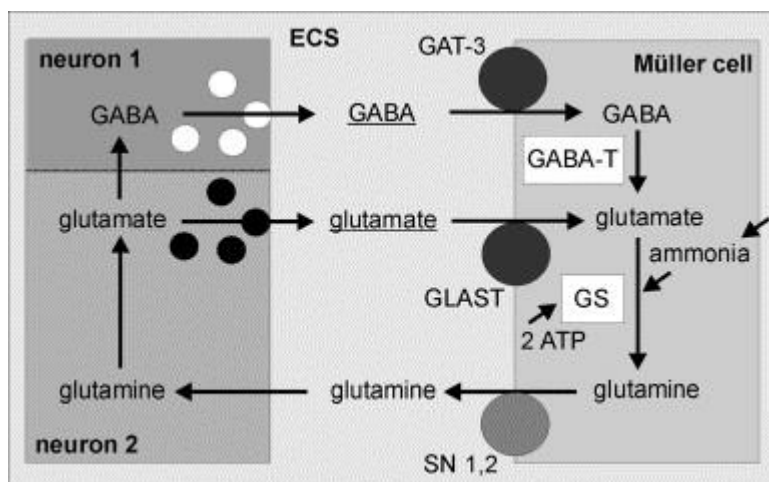


**Εικόνα 9. Ανοσοδραστικότητα GABA στον αμφιβληστροειδή ανθρώπου.** Έγινε σήμανση με αντίσωμα έναντι του GABA και παρατηρείται ανοσοδραστικότητα του σε πολλά βραχύνια κύτταρα στην εσωτερική πυρηνική στιβάδα (INL), σε κάποια έκτοπα βραχύνια στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων (GCL) και στην εσωτερική δικτυωτή στιβάδα (IPL) (εικόνα χωρίς τροποποίηση από Kolb, 2005 Άδεια: Attribution 4.0 International (CC BY 4.0)).

Οι δράσεις του GABA στον αμφιβληστροειδή διαμεσολαβούνται μέσω δυο ειδών υποδοχέων του, τους ιοντοτροπικούς GABA<sub>A</sub> και GABA<sub>C</sub> και τους μεταβοτροπικούς GABA<sub>B</sub>. Οι GABA<sub>A</sub> και GABA<sub>C</sub> είναι διάλυτοι ιόντων Cl<sup>-</sup>, οι οποίοι όταν προσδεθεί σε αυτούς το GABA επιτρέπουν την είσοδο Cl<sup>-</sup> στο εσωτερικό του κυττάρου και κατά συνέπεια η κυτταρική μεμβράνη οδηγείται σε υπερπόλωση. Οι GABA<sub>B</sub> είναι υποδοχείς συνδεδεμένοι με G πρωτεΐνες και με τη μεσολάβηση δεύτερων αγγελιαφόρων μονοπατιών μειώνουν την είσοδο Ca<sup>+2</sup> και επιτρέπουν την έξοδο K<sup>+</sup> από το κύτταρο με αποτέλεσμα και πάλι την υπερπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης. Οι GABA<sub>A</sub> υποδοχείς βρίσκονται σε δίπολα, οριζόντια, βραχύνια καθώς και σε γαγγλιακά κύτταρα. Οι GABA<sub>B</sub> υποδοχείς εκφράζονται προσυναπτικά σε οριζόντια και βραχύνια κύτταρα ενώ μετασυναπτικά σε γαγγλιακά κύτταρα. Τέλος οι GABA<sub>C</sub> υποδοχείς βρίσκονται κυρίως σε δίπολα κύτταρα (Yang 2004).

Τα κύτταρα της γλοίας και συγκεκριμένα τα κύτταρα Müller διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην κατανομή των νευροδιαβιβαστών στον αμφιβληστροειδή διότι συμμετέχουν στην ανακύκλωση τους. Υπάρχει έτσι μια επικοινωνία μεταξύ των νευρώνων του αμφιβληστροειδή και των κυττάρων Müller. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 10 το GABA αφού απελευθερωθεί από τον GABAεργικό νευρώνα στον εξωκυττάριο χώρο προσλαμβάνεται σε γρήγορο χρονικό διάστημα από το κύτταρο Müller με τη βοήθεια

μεταφορέων GAT. Στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου Müller το GABA μετατρέπεται σε γλουταμινικό μέσω της τρυσαμινάσης του GABA (GABA-T). Η GABA-T αποτελεί το βασικό ένζυμο που καταλύει τον καταβολισμό του GABA και βρίσκεται στα μιτοχόνδρια. Το γλουταμινικό με τη σειρά του μετατρέπεται στη μη-νευροδραστική ουσία γλουταμίνη μέσω του ενζύμου συνθάση της γλουταμίνης (GS: Glutamine Synthase). Η γλουταμίνη στη συνέχεια εξάγεται από τα κύτταρα Müller μέσω των μεταφορέων της, SN 1 και SN 2, στον εξωκυττάριο χώρο, από όπου οι νευρώνες μπορούν να τη πάρουν και να τη χρησιμοποιήσουν για εκ νέου σύνθεση γλουταμινικού και GABA. Παρόμοια πορεία ακολουθεί και το γλουταμινικό μια και αφού απελευθερωθεί από τους γλουταμινεργικούς νευρώνες στον εξωκυττάριο χώρο προσλαμβάνεται μέσω των μεταφορέων του (GLAST: Glutamate Aspartate Transporter) οι οποίοι εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων Müller όπου, μέσω του ενζύμου GS, μετατρέπεται σε γλουταμίνη. Η γλουταμίνη έπειτα έχει την ίδια πορεία με αυτή που προκύπτει από τον μεταβολισμό του GABA (Bringmann και συν., 2006).



**Εικόνα 10.** Ανακύκλωση γλουταμινικού οξέος και GABA στον αμφιβληστροειδή (Bringmann και συν., 2006, License Number: 5627260973000).

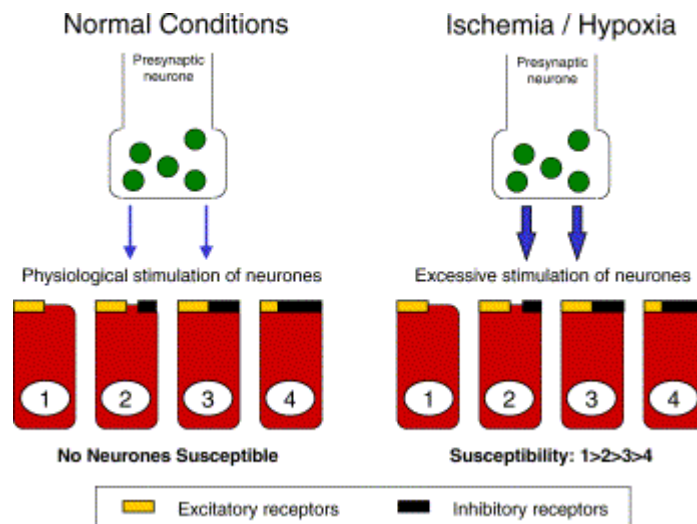
## 7.2 GABA-εργική νευροδιαβίβαση στην ισχαιμία/επαναιμάτωση

Το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) είναι αναγκαίο μόριο για τη φυσιολογική λειτουργία των νευρώνων και μεταβολές στη συγκέντρωσή του έχουν συσχετιστεί με

ασθένειες όπως οι νόσοι των Alzheimer, Parkinson. Το GABA αποτελεί ένα σημαντικό βιοδείκτη βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης καθώς κατά τη διάρκεια της βλάβης έχει αποδειχθεί ότι τα επίπεδα του, ο μεταβολισμός του, η σύνθεση του και η έκφραση των υποδοχέων του υφίστανται πολύπλοκες μεταβολές (Chen 2019).

Σε φυσιολογικές συνθήκες οι ποσότητες των νευροδιαβιβαστών που απελευθερώνονται στον εξωκυτταρικό χώρο είναι χαμηλές καθώς τα νευρικά κύτταρα και τα κύτταρα γλοίας μπορούν να τους απομακρύνουν αποτελεσματικά από τη συναπτική σχισμή αμέσως μετά την απελευθέρωση τους. Κατά τη διάρκεια ισχαιμίας ωστόσο παρατηρείται αύξηση των επιπέδων διαφόρων νευροδιαβιβαστών συγκεκριμένα του γλουταμινικού και του GABA (Neal και συν., 1994, Perlman, 1996). Έπειτα κατά την επαναιμάτωση τα αυξημένα επίπεδα νευροδιαβιβαστών του εξωκυτταρίου χώρου θα ενεργοποιήσουν τους υποδοχείς τους και θα συμβάλλουν στην επαγωγή του κυτταρικού θανάτου.

Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας υπάρχει ανισορροπία μεταξύ απελευθέρωσης γλουταμινικού και GABA. Η αυξημένη απελευθέρωση γλουταμινικού που προκύπτει έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί διεγερτοτοξικότητα στον αμφιβληστροειδή. Η διεγερτοτοξικότητα που προκαλείται από το γλουταμινικό αποτελεί αιτία για νευροεκφυλιστικές νόσους και νευροπάθειες του αμφιβληστροειδούς.



**Εικόνα 11. Ισορροπία μεταξύ διεγερτικών και ανασταλτικών νευροδιαβιβαστών και των υποδοχέων τους.** Αριστερά φαίνεται η ισορροπία σε φυσιολογικές συνθήκες. Δεξιά σε συνθήκες ισχαιμίας/υποξίας. Σε αυτές η επιβίωση του ιστού εξαρτάται από την αναλογία ανασταλτικών/διεγερτικών υποδοχέων στις συναπτικές απολήξεις. Στην εικόνα, η επιδεκτικότητα των νευρώνων στην ισχαιμική προσβολή ακολουθεί τη σειρά

1>2>3>4, αφού η σχετική αναλογία των ανασταλτικών υποδοχέων αυξάνεται σύμφωνα με αυτή τη σειρά (Osbourne και συν., 2004, License Number: 5627260521277).

Το GABA ως ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής θα έπρεπε να έχει νευροπροστατευτική δράση σε βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, εφόσον θεωρητικά, θα εκμηδενίσει τη δράση του γλουταμινικού στους νευρώνες προκαλώντας υπερπόλωση στις κυτταρικές μεμβράνες η οποία με τη σειρά της θα εξουδετερώσει την εκπόλωση που δημιουργείται από το γλουταμινικό. Κατά συνέπεια, το GABA θα αντισταθμίσει την διεγερτοτοξικότητα που προέρχεται από το γλουταμινικό (Saransaari και Oja, 2007). Εντούτοις, άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι το GABA δεν έχει προστατευτική δράση μετά από βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι οι αγωνιστές του GABA αποτυγχάνουν να προστατεύσουν τον αμφιβληστροειδή από την βλάβη της ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (Traustason και συν, 2009). Παράλληλα, έρευνες σε αμφιβληστροειδή κότας έδειξαν ότι η απενεργοποίηση των υποδοχέων των ανασταλτικών νευροδιαβιβαστών GABA και γλυκίνης είχαν νευροπροστατευτικά αποτελέσματα στον ιστό μετά από τον τραυματισμό ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (Chen και συν., 1999).

Σε όλη τη διάρκεια ισχαιμίας/επαναιμάτωσης η απελευθέρωση και επαναπρόσληψη του GABA καθώς και ο εντοπισμός του στις στιβάδες του αμφιβληστροειδούς μεταβάλλονται. Στα αρχικά στάδια της ισχαιμίας παρατηρείται αύξηση της απελευθέρωσης του GABA από τους προσυναπτικούς νευρώνες, λόγω της αύξησης της συγκέντρωσης ενδοκυτταρικού  $Ca^{2+}$ . Μετά την επαναιμάτωση αυξάνεται επίσης η έκφραση της αποκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού (GAD) στους νευρώνες και συντίθεται ξανά GABA. Έτσι επανέρχεται η λειτουργία του μεταφορέα GAT1 λόγω της αύξησης των επιπέδων του GABA. Αυτό προωθεί την κυτταρική επιβίωση αντισταθμίζοντας τα αποτελέσματα της βλάβης (Li και συν., 2010).

## ΣΚΟΠΟΣ

Προηγούμενες μελέτες *ex vivo* ισχαιμίας και επαναιμάτωσης αμφιβληστροειδούς στο εργαστήριο έδειξαν ότι 1 ώρα μετά την ισχαιμία η ανοσοδραστικότητα του GABA μειώνεται και 4 ώρες μετά την επαναιμάτωση του αμφιβληστροειδούς τα επίπεδα του GABA αυξάνουν (Trisokka και συν., 2022).

Με βάση τα παραπάνω, στόχος της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η περαιτέρω διερεύνηση:

- της GABAεργικής νευροδιαβίβασης στον αμφιβληστροειδή σε φυσιολογικές συνθήκες σε τρεις διαφορετικές περιοχές του αμφιβληστροειδούς (κέντρο, μέση και περιφέρεια)
- της επίδρασης της *ex vivo* ισχαιμίας και επαναιμάτωσης του αμφιβληστροειδούς στα επίπεδα του GABA, στην κατανομή του GABA στις στιβάδες του αμφιβληστροειδούς καθώς και της διαφορικής επίδρασης της *ex vivo* ισχαιμίας και επαναιμάτωσης στην έκφραση του GABA στις τρεις περιοχές του ιστού
- η αξιολόγηση του GABA ως βιοδείκτη για τη μελέτη των πρώιμων σταδίων της βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης

## ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

### 1. Πειραματόζωα

Χρησιμοποιήθηκαν νεαροί ενήλικοι αρσενικοί επίμυες τύπου Wistar, ηλικίας ενός έως ενάμιση μηνών, ( $41,7 \pm 0,3$  ημερών  $n=12$ ).

### 2. *Ex vivo* πείραμα ισχαιμίας-επαναιμάτωσης

Για τη πραγματοποίηση του πειράματος παρασκευάστηκαν διαλύματα τεχνητού εγκεφαλονωτιαίου υγρού (arti-CSF: artificial Cerebrospinal Fluid, Πίνακας 1). Όπως φαίνεται και στον πίνακα, το φυσιολογικό διάλυμα arti-CSF κορέστηκε σε 95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub> και περιείχε γλυκόζη ενώ το ισχαιμικό διάλυμα κορέστηκε σε 95%N<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub> και περιείχε σουκρόζη. Με τη βοήθεια του CO<sub>2</sub> το pH των διαλυμάτων σταθεροποιήθηκε στο 7,3-7,4. Η αντικατάσταση της γλυκόζης από σουκρόζη στο ισχαιμικό διάλυμα γίνεται για τη διατήρηση της ωσμωμοριακότητας του με τη βοήθεια σακχάρου που δε μεταβολίζει ο νευρικός ιστός.

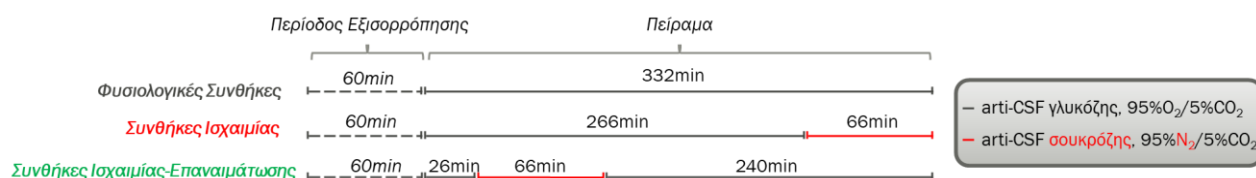
**Πίνακας 1:** Χημική σύσταση Φυσιολογικού τεχνητού εγκεφαλονωτιαίου υγρού και του αντίστοιχου της ισχαιμίας.

Φυσιολογικό τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό	Τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό για ισχαιμία
118mM NaCl	118mM NaCl
4,8mM KCl	4,8mM KCl
1,2mM MgSO <sub>4</sub>	1,2mM MgSO <sub>4</sub>
1,3mM CaCl <sub>2</sub>	1,3mM CaCl <sub>2</sub>
25mM NaHCO <sub>3</sub>	25mM NaHCO <sub>3</sub>
1,2mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,03mM Na <sub>2</sub> EDTA	0,03mM Na <sub>2</sub> EDTA
0,57mM ασκορβικό οξύ	0,57mM ασκορβικό οξύ
11 mM D-γλυκόζη	11 mM D-σουκρόζη
95% O <sub>2</sub> /5% CO <sub>2</sub>	95% N <sub>2</sub> /5% CO <sub>2</sub>

Έπειτα από τη προετοιμασία αυτών των διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε συλλογή του αμφιβληστροειδούς από τους επίμυες. Για τη συλλογή του ιστού τα ζώα θυσιάστηκαν δια αποκεφαλισμού με τη χρήση λαϊμητόμου. Η αποκόλληση του αμφιβληστροειδούς έγινε σε φυσιολογικό arti-CSF στον πάγο.

Το πείραμα *ex vivo* βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία  $35,7^{\circ}\text{C} \pm 0,2$ . Το σύστημα περιλάμβανε οχτώ φιαλίδια υπερδιάχυσης στα οποία υπήρχαν σωληνάρια εισροής και ένα εκροής ρυθμιστικού διαλύματος. Η ροή του arti-CSF στο πείραμα μας ρυθμίστηκε με τη βοήθεια περισταλτικής αντλίας στα 1,2

ml/min και ο συνολικός όγκος των φιαλιδίων στα 500μl. Αρχικά υπάρχει μια περίοδος εξισορρόπησης (1 ώρα) και στη συνέχεια για την επίτευξη φυσιολογικών, ισχαιμικών συνθηκών και συνθηκών ισχαιμίας/επαναιμάτωσης οι ιστοί διαχύθηκαν με τους δύο τύπους arti-CSF σύμφωνα με τους χρόνους της Εικόνας 12.



**Εικόνα 12. Χρονοδιάγραμμα ex vivo πειράματος ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (Βασιλάκη Άννα).**

Στο τέλος του πειράματος, οι ιστοί απλώθηκαν σε διηθητικό χαρτί και μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα 4% παραφορμαλδεΐδης [4% PFA σε 0,1M PB (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1:5), pH 7,4] για 30 λεπτά. Μετά τη μονιμοποίηση του έγινε έκπλυση των ιστών υπό συνεχή ανάδευση με 0,1M PB (2x15min), και συντηρήθηκαν στους -20°C με τη βοήθεια αντιψυκτικού διαλύματος μέχρι την ανοσοϊστοχημική τους χρώση.

### 3. Ανοσοϊστοχημεία - Ανοσοφθορισμός

#### 3.1 Αρχή της μεθόδου

Στο πείραμα μας χρησιμοποιήσαμε την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται δύο αντισώματα: το μη σημασμένο πρωτογενές αντίσωμα δεσμεύει ειδικά το μόριο-στόχο και το δευτερογενές αντίσωμα αναγνωρίζει το πρωτογενές αντίσωμα και συνδέεται με αυτό και φέρει το φθορίζουσα χρωστική (Magaki, 2019).

#### 3.2 Πειραματική Διαδικασία

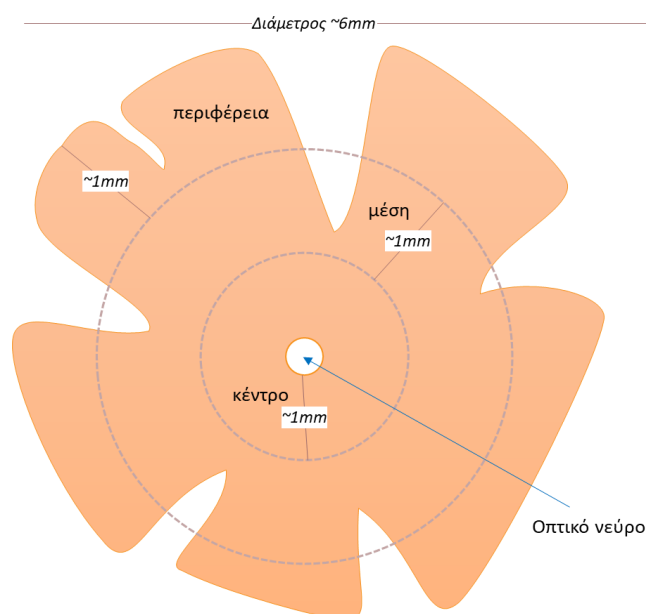
Οι ιστοί, αφού βγήκαν από τους -20°C αφαιρέθηκε το αντιψυκτικό διάλυμα και ξεπλύθηκαν με 0,1M PBS (137mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2-7,4), 3x15 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια, οι ιστοί επώασθηκαν με τα πρωτογενή αντισώματα για 72 ώρες στους 4°C και υπό συνεχή ανάδευση. Το διάλυμα των πρωτογενών αντισωμάτων (0,1M PBS) περιείχε 3,3% (v/v) φυσιολογικό ορό γαϊδουριού (Normal Donkey Serum, NDS), 0,5% (v/v) Triton x-100, 0,025% NaN<sub>3</sub> και αντισώματα έναντι του GABA (anti-GABA, συγκέντρωση 1:500, Sigma: AB131) και της όξινης πρωτεΐνης της ινδιακής γλοίας (GFAP, συγκέντρωση 1:500, Sigma: MAB360) φτιαγμένα σε κουνέλι και ποντίκι, αντίστοιχα.

Ακολούθησαν πλύσεις (3x45min) με 0,1M PBS στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση και επώαση με τα δευτερογενή αντισώματα (αντισώματα φτιαγμένα σε γαϊδούρι έναντι των IgG κουνελιού και ποντικού σημασμένα με CF488A και CF594, αντίστοιχα).

Ακολούθησαν έγιναν πλύσεις (3x45min) με 0,1M PBS στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση, επώαση των ιστών με 40μM DAPI (4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη: χρώση των πυρήνων των κυττάρων, με δέσμευση σε περιοχές του DNA πλούσιες σε αδενίνη-θυμίνη) σε 0,1M PBS για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος έγιναν πλύσεις (2x10min) των ιστών με 0,1M PBS και τοποθέτηση τους σε αντικειμενοφόρες πλάκες με τη χρήση πινέλου, με τα γαγγλιακά κύτταρα προς τα πάνω, δηλαδή σε επαφή με τη καλυπτρίδα.

#### 4. Μελέτη της επίδρασης της *ex vivo* ισχαιμίας-επαναιμάτωσης στην GABAεργική νευροδιαβίβαση

Η παρατήρηση των ιστών έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss LSM800 (Zeiss Axiovert, Jenna, Germany). Πραγματοποιήθηκε λήψη εικόνων (μεγέθυνση 20x) σε 3 διαφορετικές περιοχές σε σχέση με την απόσταση τους από το οπτικό νεύρο: κέντρο (απόσταση: 0 έως ~1mm), τη μεσαία περιοχή (απόσταση: ~1-2mm) και την περιφέρεια (απόσταση: ~2-3mm, Εικόνα 13).

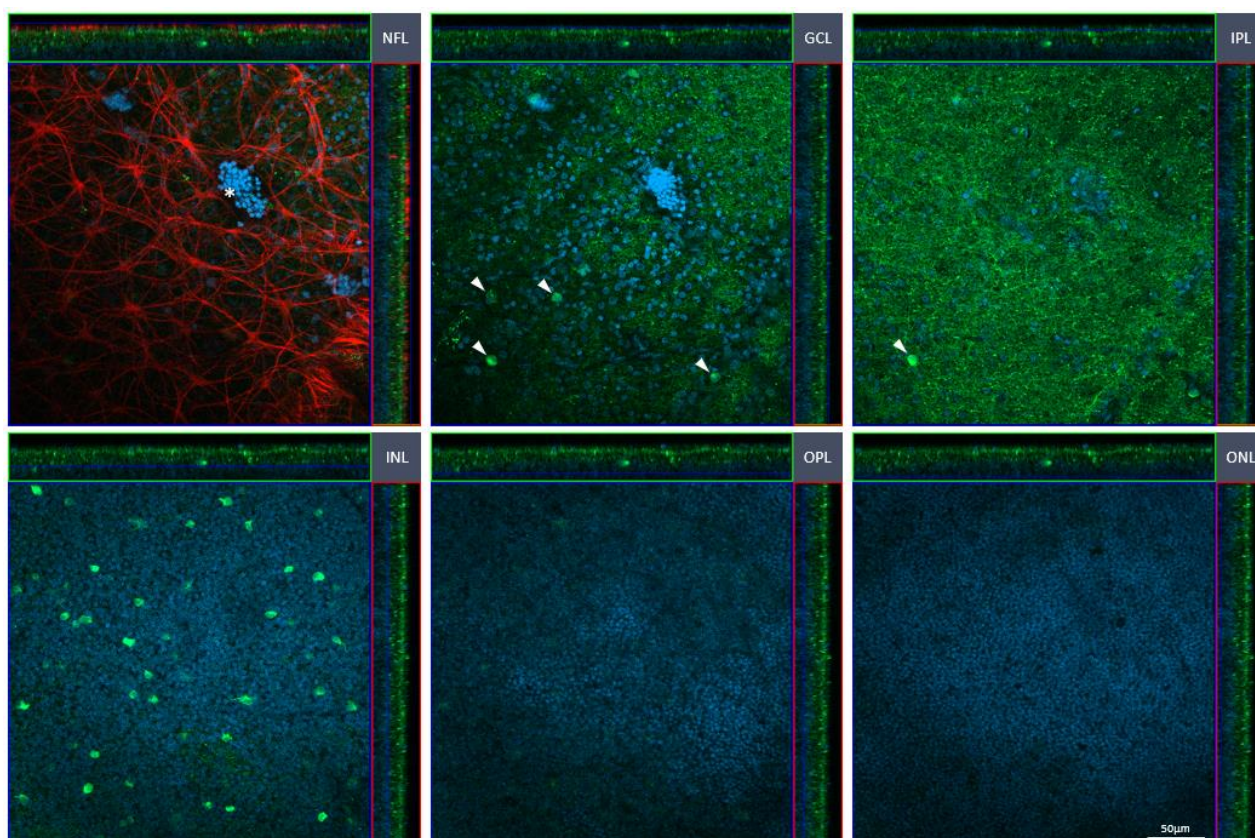


**Εικόνα 13:** Σχηματική απεικόνιση των περιοχών του αμφιβληστροειδούς. *Periphery*= Περιφέρεια, *Middle*=Μέση, *Center* = Κέντρο, *Optic nerve* = Οπτικό νεύρο (Βασιλάκη Άννα).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

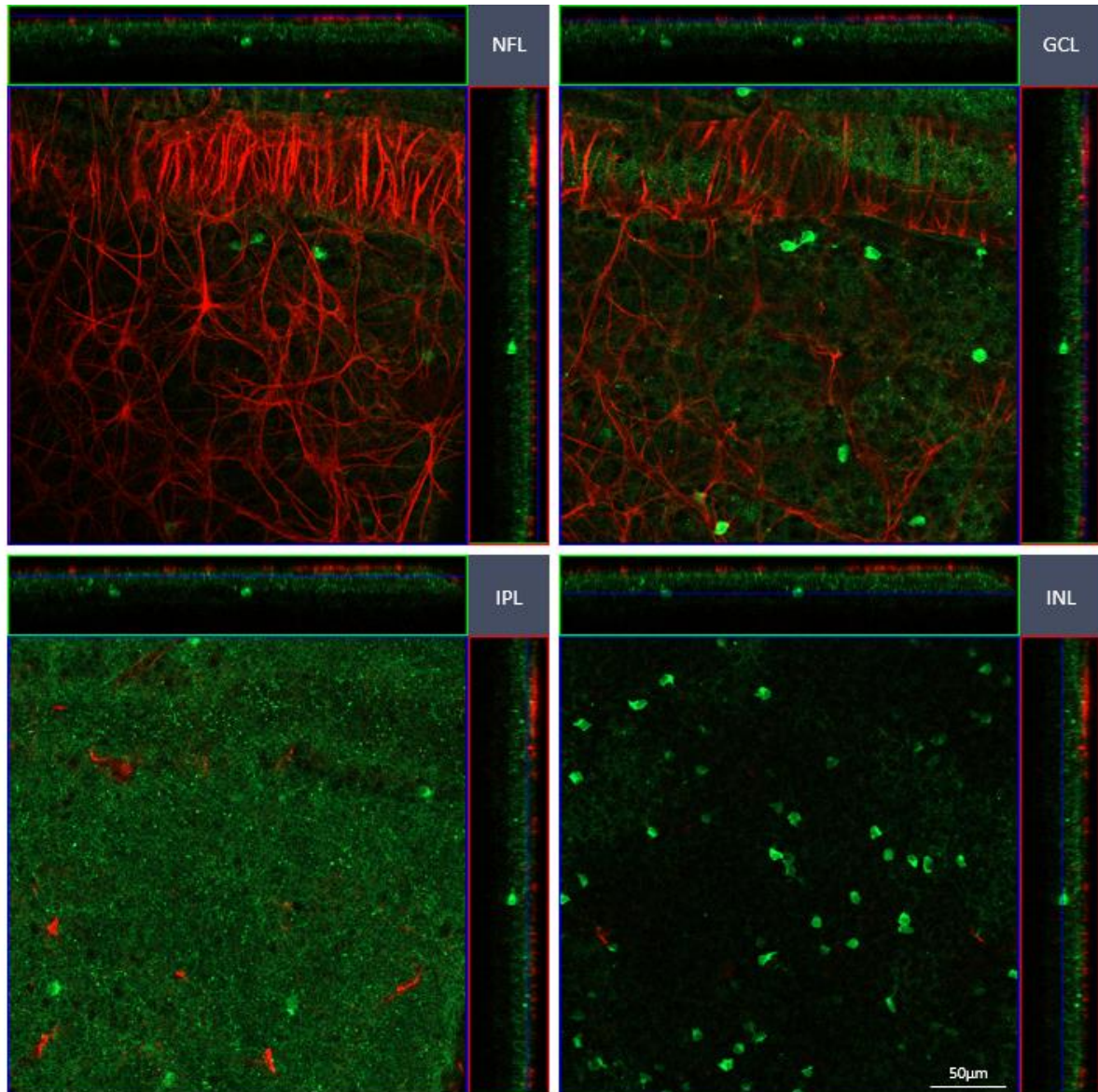
### 1. GABAεργική ανοσοδραστικότητα στον αμφιβληστροειδή επίμυος υπό φυσιολογικές συνθήκες

Για τον εντοπισμό της ανοσοδραστικότητας του GABA στον αμφιβληστροειδή χρησιμοποιήθηκαν οι τρισδιάστατες φωτογραφίες που λήφθηκαν από το συνεστιακό μικροσκόπιο. Για τον ευκολότερο εντοπισμό της GABAεργικής ανοσοδραστικότητας στα κύτταρα του αμφιβληστροειδή, έγινε ταυτόχρονα εντοπισμός της GFAP, η οποία είναι δείκτης αστροκυττάρων και κυττάρων Müller, ενώ οι πυρήνες των κυττάρων βάφθηκαν με DAPI που δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού των κυττάρων με βάση το σχήμα (ενδοθηλιακά vs. υπόλοιποι κυτταρικοί τύποι) και το μέγεθος τους.

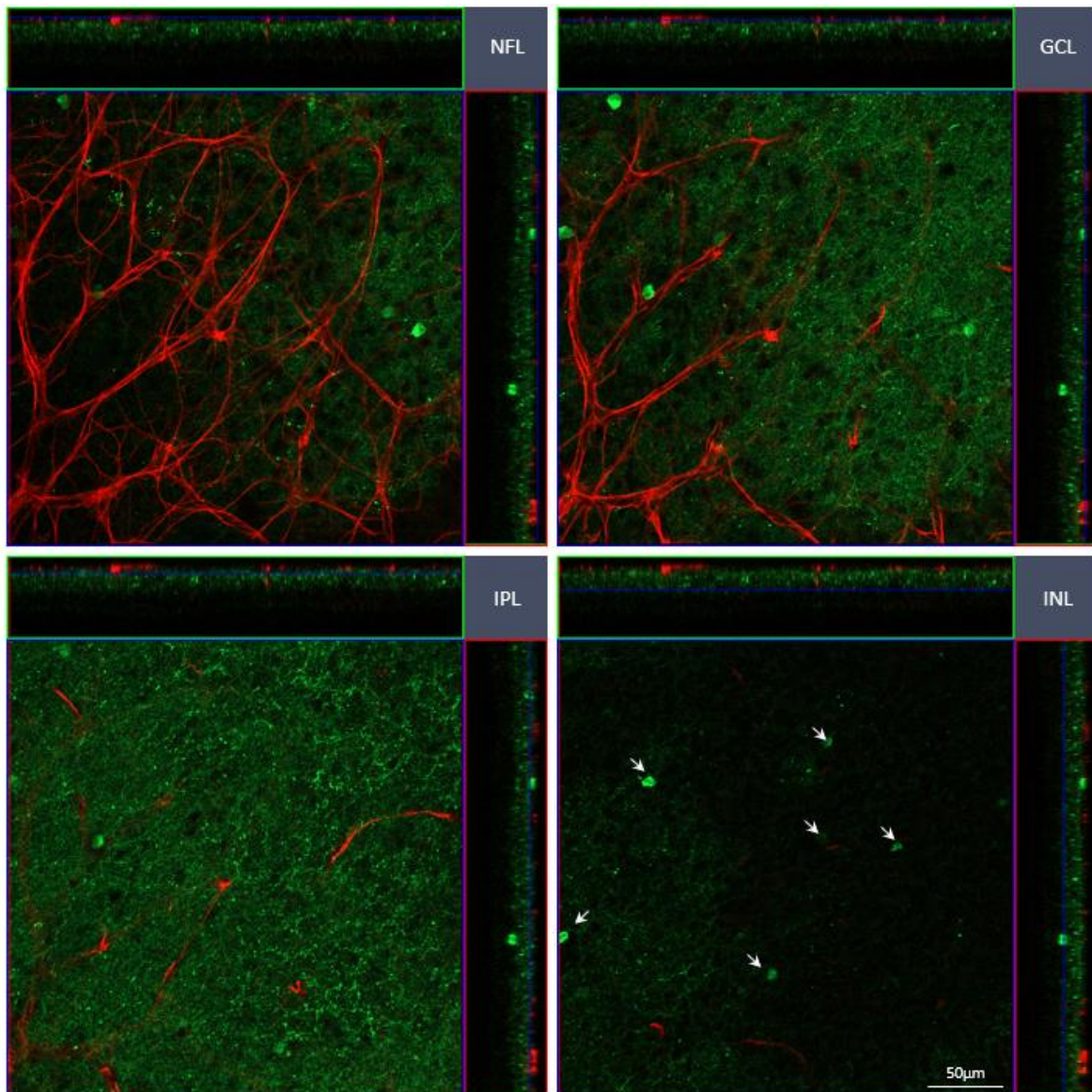


**Εικόνα 14.** Ανοσοδραστικότητα του GABA στο κέντρο του αμφιβληστροειδούς υπό φυσιολογικές συνθήκες. Φωτογραφίες τομών από το συνεστιακό μικροσκόπιο στον άξονα x/y. Με τα βέλη παρουσιάζονται τα κυτταρικά σώματα των βραχύνων κυττάρων. Μεγέθυνση: x20. (κόκκινο: GFAP, πράσινο: GABA, μπλε: DAPI). Στιβάδα Νευρικών Ινών (NFL), Στιβάδα γαγγλιακών κυττάρων (GCL), Εσωτερική Δικτυωτή Στιβάδα (IPL), Εσωτερική Πυρηνική Στιβάδα (INL), Εξωτερική Δικτυωτή Στιβάδα (OPL), Εξωτερική Πυρηνική Στιβάδα (ONL). \* : αναδίπλωση του ιστού.

Όπως παρατηρούμε στις Εικόνα 14-16, υπό φυσιολογικές συνθήκες GABAεργική ανοσοδραστικότητα εντοπίζεται στα κυτταρικά σώματα έκτοπων βραχύνων κυττάρων στη στιβάδα γαγγλιακών κυττάρων (GCL), στις αποφύσεις των βραχύνων κυττάρων στην εσωτερική δικτυωτή στιβάδα (IPL) καθώς και στα κυτταρικά σώματα βραχύνων και οριζόντιων κυττάρων στην εσωτερική κοκκώδη στιβάδα (INL).



**Εικόνα 15.** *Ανοσοδραστικότητα του GABA στη μεσαία περιοχή του αμφιβληστροειδούς υπό φυσιολογικές συνθήκες. Φωτογραφίες τομών από το συνεστιακό μικροσκόπιο στον άξονα x/y. Μεγέθυνση: x20. (κόκκινο: GFAP, πράσινο: GABA). Στιβάδα Νευρικών Ινών (NFL), Στιβάδα γαγγλιακών κυττάρων (GCL), Εσωτερική Δικτυωτή Στιβάδα (IPL), Εσωτερική Πυρηνική Στιβάδα (INL).*

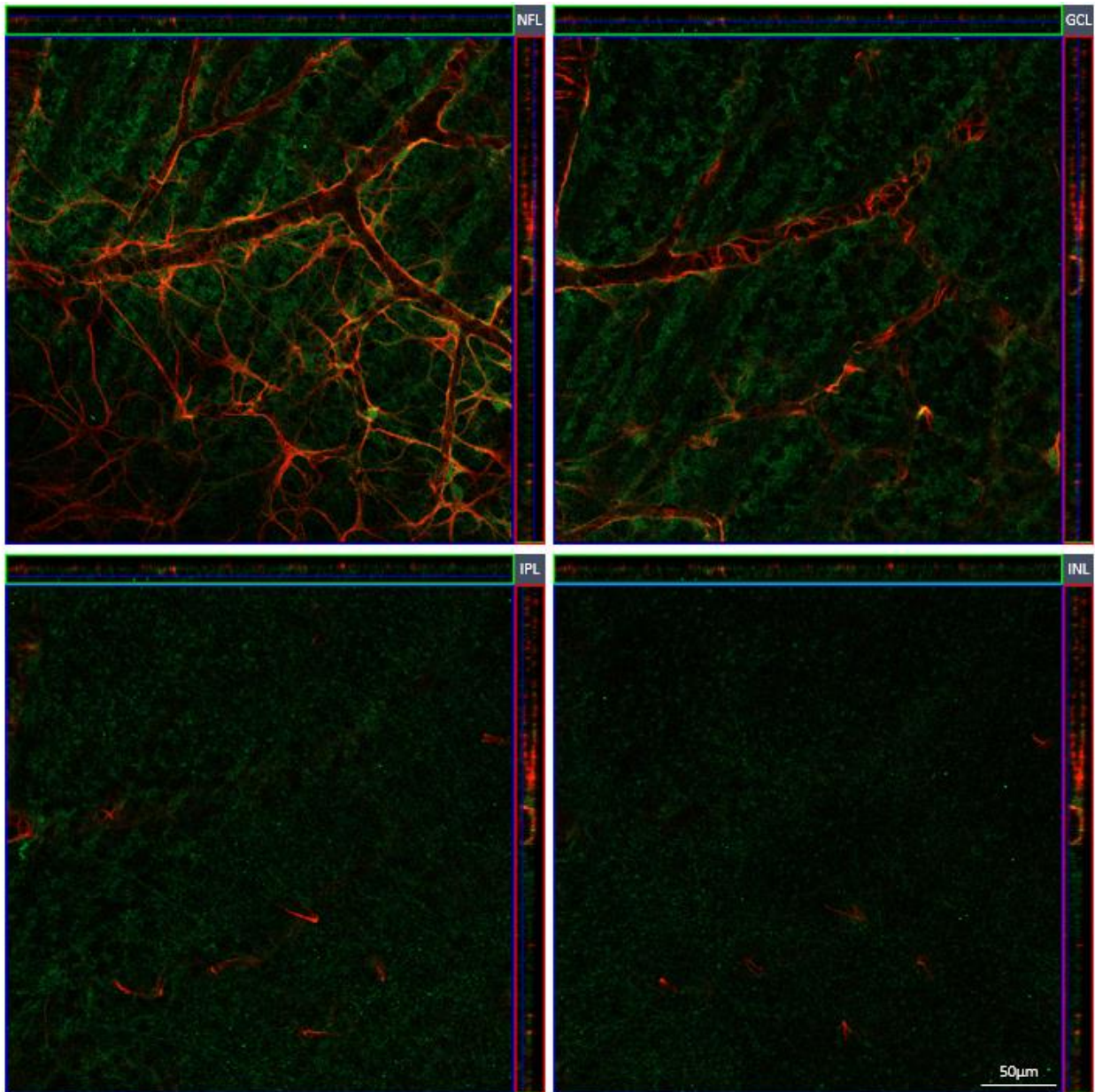


**Εικόνα 16. Ανοσοδραστικότητα του GABA στην περιφέρεια του αμφιβληστροειδούς υπό φυσιολογικές συνθήκες.** Φωτογραφίες τομών από το συνεστιακό μικροσκόπιο στον άξονα x/y. Με τα βέλη παρουσιάζονται τα κυτταρικά σώματα των βραχύνων κυττάρων. Μεγέθυνση: x20. (κόκκινο: GFAP, πράσινο: GABA). Στιβάδα Νευρικών Ινών (NFL), Στιβάδα γαγγλιακών κυττάρων (GCL), Εσωτερική Δικτυωτή Στιβάδα (IPL), Εσωτερική Πυρηνική Στιβάδα (INL).

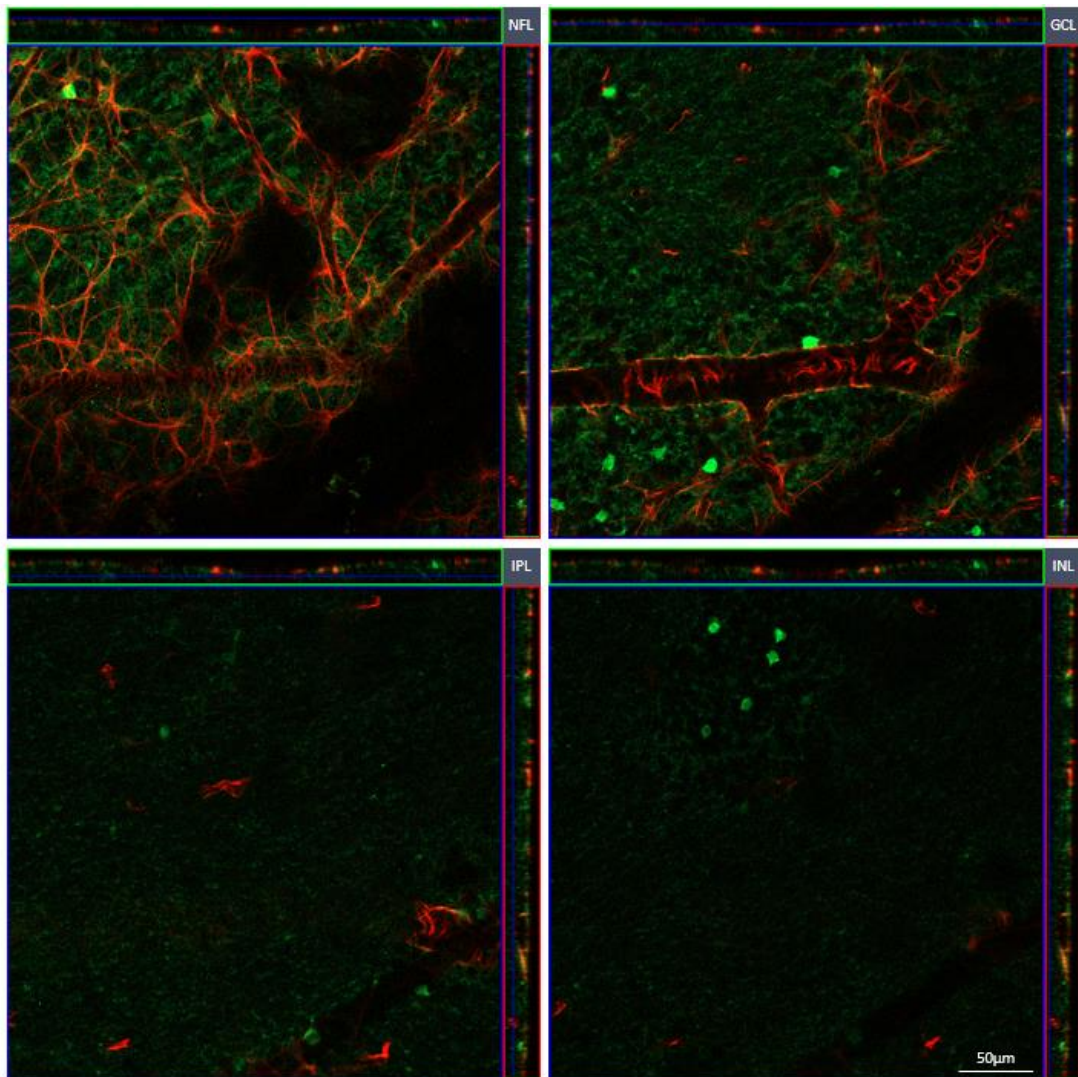
Συγκρίνοντας τις τρεις διαφορετικές περιοχές του αμφιβληστροειδούς παρατηρούμε έντονη ανοσοδραστικότητα του GABA στο δίκτυο των αποφύσεων των βραχύνων κυττάρων στην στιβάδα IPL και τις τρεις περιοχές του ιστού. Ωστόσο, στην περιφέρεια παρατηρείται μικρότερος αριθμός GABA<sup>+</sup> σωμάτων βραχύνων κυττάρων σε σύγκριση με την κεντρική και μεσαία περιοχή του ιστού.

## **2. Επίδραση της *ex vivo* ισχαιμίας στην GABAεργική ανοσοδραστικότητα στον αμφιβληστροειδή επίμυος**

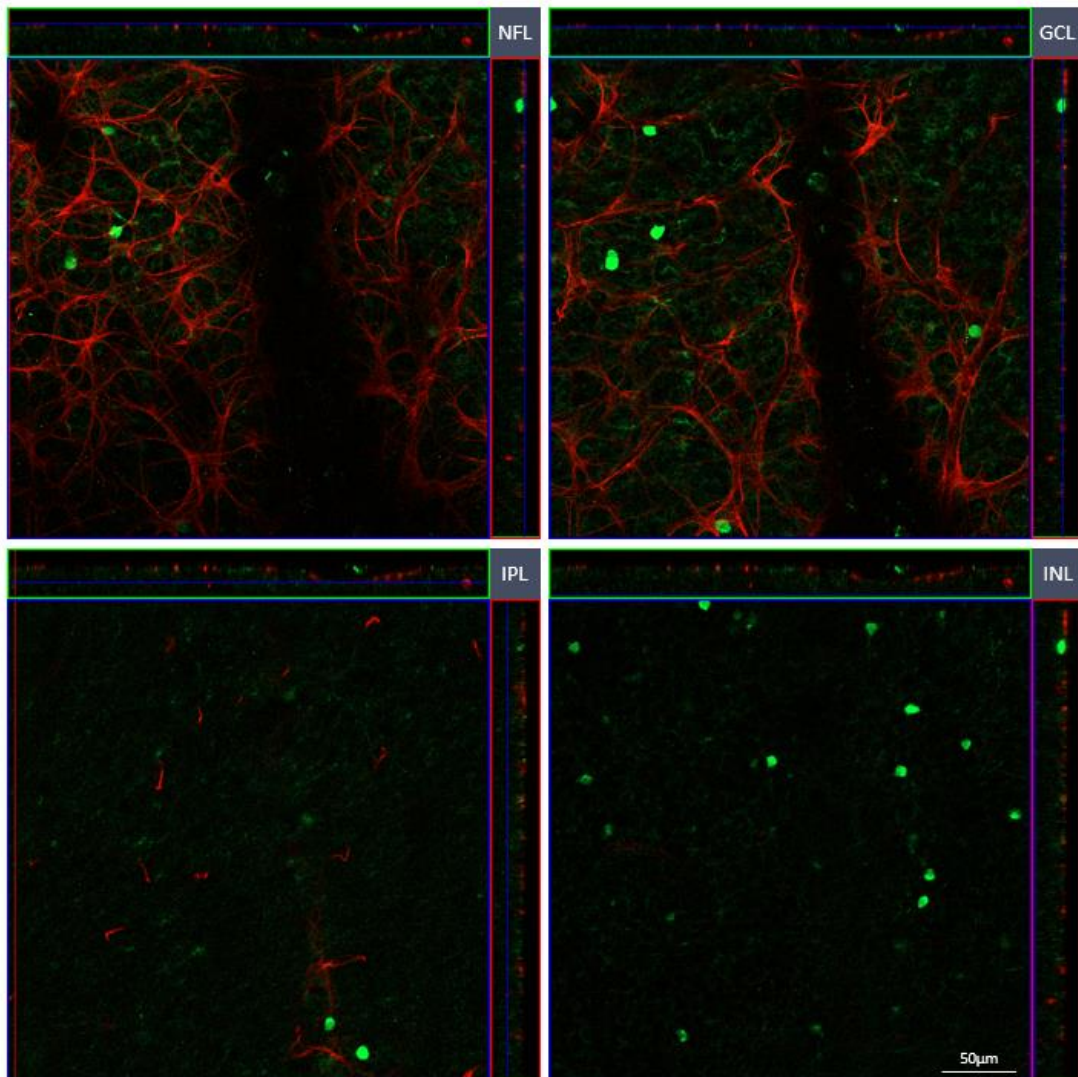
Μετά 66min *ex vivo* ισχαιμίας σημειώνεται σημαντική μείωση στην ανοσοδραστικότητα του GABA. Μειώνονται τα επίπεδα του νευροδιαβιβαστή στο δίκτυο των αποφύσεων των βραχύνων κυττάρων στην IPL καθώς και η ανοσοδραστικότητά του στα κυτταρικά σώματα των βραχύνων κύτταρων στην INL. Ωστόσο, παρατηρείται και μια μετατόπιση του GABA στην κατανομή του στις στιβάδες του αμφιβληστροειδούς καθώς εντοπίζεται GABAεργική ανοσοδραστικότητα στα αστροκύτταρα και στις αποφύσεις τους στη στιβάδα των νευρικών ιών (NFL). Παρατηρείται επίσης συσσώρευση του GABA στην επιφάνεια των αγγείων.



**Εικόνα 17. Ανοσοδραστικότητα του GABA στο κέντρο του αμφιβληστροειδούς σε συνθήκες ισχαιμίας. Φωτογραφίες τομών από το συνεστιακό μικροσκόπιο στους άξονες x/y. Μεγέθυνση: x20. (κόκκινο: GFAP, πράσινο: GABA). Στιβάδα Νευρικών Ινών (NFL), Στιβάδα γαγγλιακών κυττάρων (GCL), Εσωτερική Δικτυωτή Στοιβάδα (IPL), Εσωτερική Πορηγική Στοιβάδα (INL).**



**Εικόνα 18.** Ανοσοδραστικότητα του GABA στη μεσαία περιοχή του αμφιβληστροειδούς υπό συνθήκες ισχαιμίας. Φωτογραφία τομών από το συνεστιακό μικροσκόπιο στους άξονες x/y. Μεγέθυνση: x20. (κόκκινο: GFAP, πράσινο: GABA). Στιβάδα Νευρικών Ινών (NFL), Στιβάδα γαγγλιακών κυττάρων (GCL), Εσωτερική Δικτυωτή Στιβάδα (IPL), Εσωτερική Πυρηνική Στιβάδα (INL).

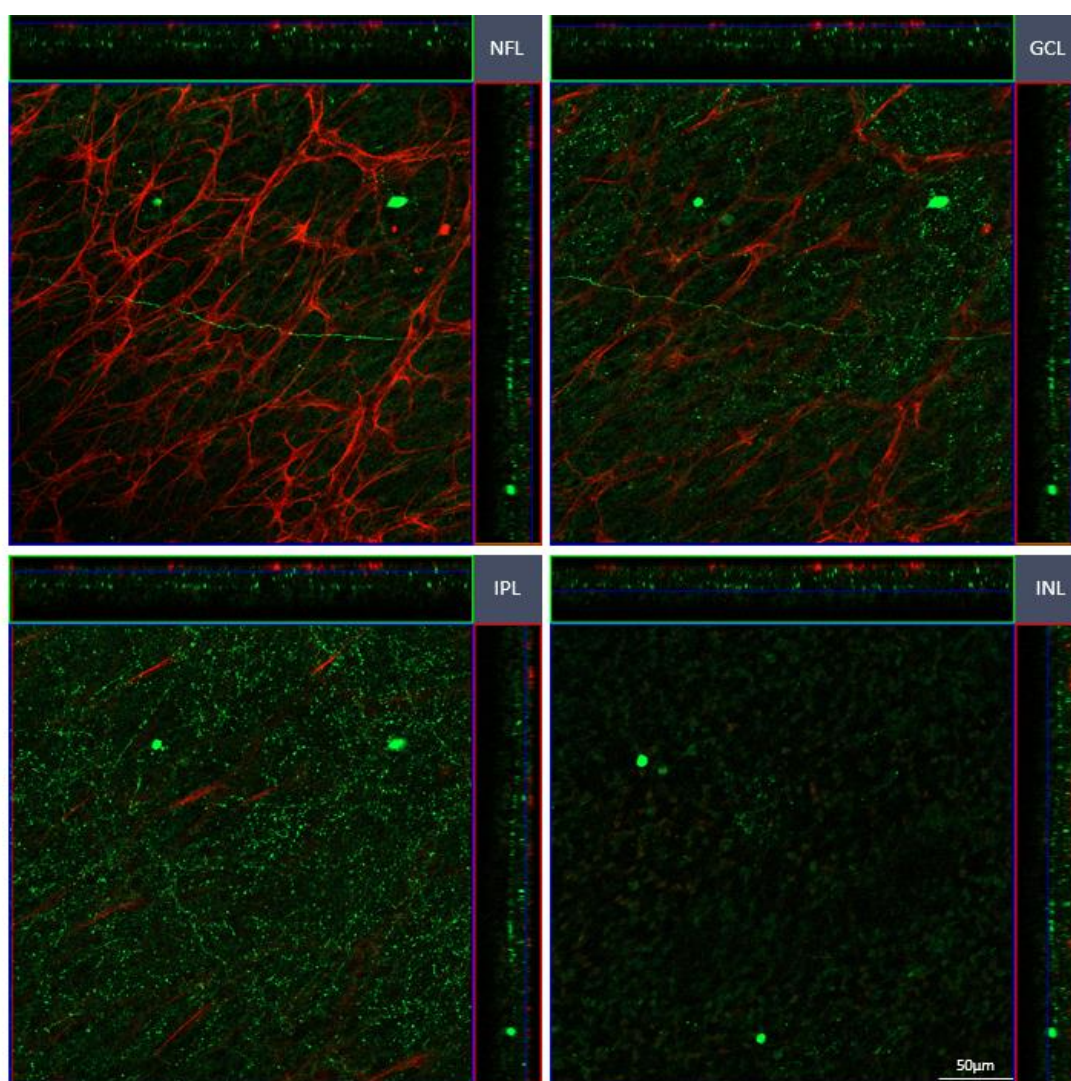


**Εικόνα 19.** *Ανοσοδραστικότητα του GABA στη περιφέρεια του αμφιβληστροειδούς υπό συνθήκες ισχαιμίας. Φωτογραφία τομών από το συνεστιακό μικροσκόπιο στους άξονες x/y. Μεγέθυνση: x20. (κόκκινο: GFAP, πράσινο: GABA). Στιβάδα Νευρικών Ινών (NFL), Στιβάδα γαγγλιακών κυττάρων (GCL), Εσωτερική Δικτυωτή Στιβάδα (IPL), Εσωτερική Πυρηνική Στιβάδα (INL).*

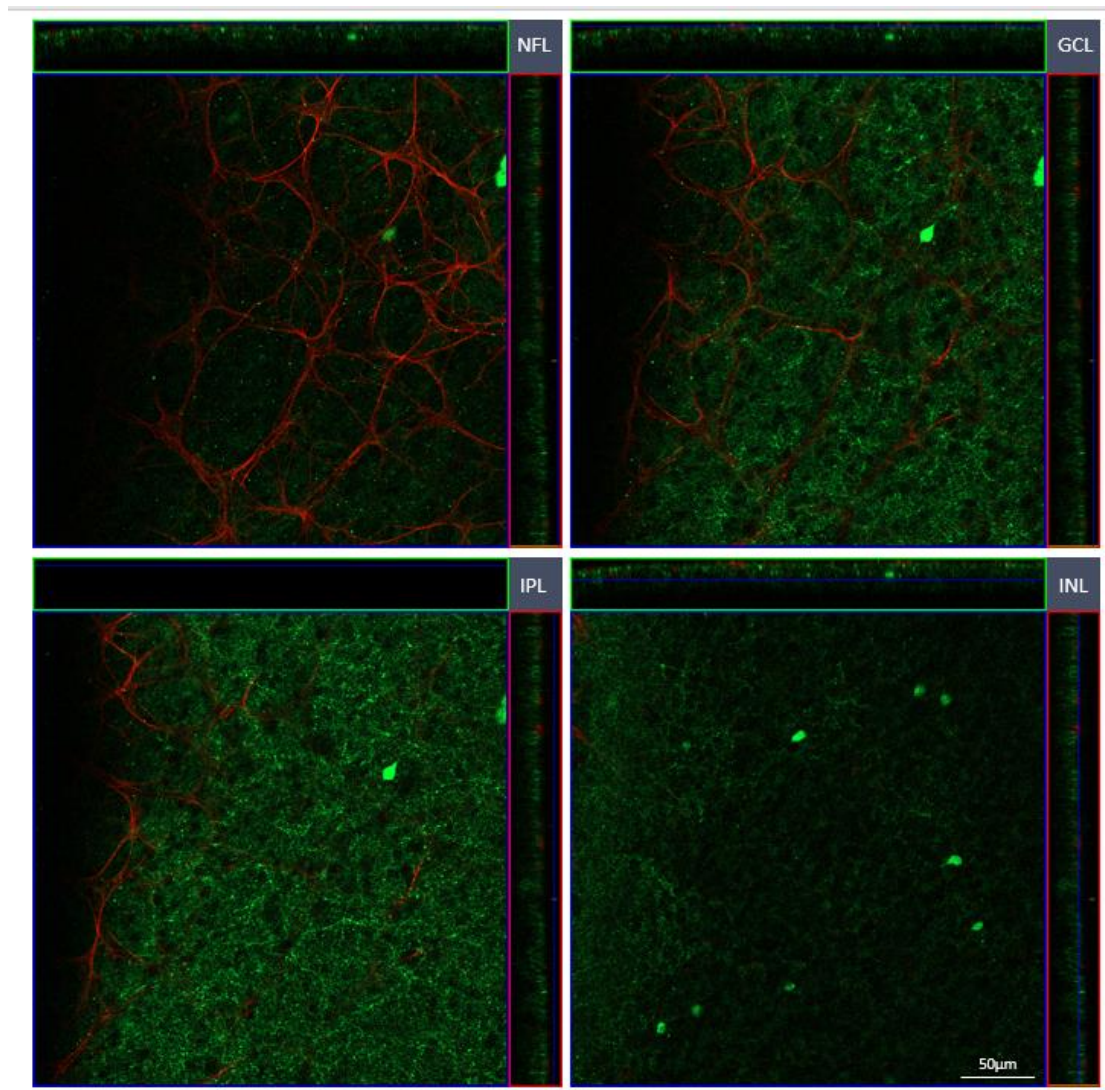
Τέλος, διαπιστώνεται ότι στη μεσαία περιοχή και την περιφέρεια του αμφιβληστροειδούς παραμένουν κάποια GABA<sup>+</sup> σώματα βραχύνων κυττάρων σε αντίθεση με το κέντρο όπου δεν εντοπίζονται καθόλου GABA<sup>+</sup> σώματα βραχύνων κυττάρων.

### 3. Επίδραση της *ex vivo* βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης στην GABAεργική ανοσοδραστικότητα στον αμφιβληστροειδή επίμυος

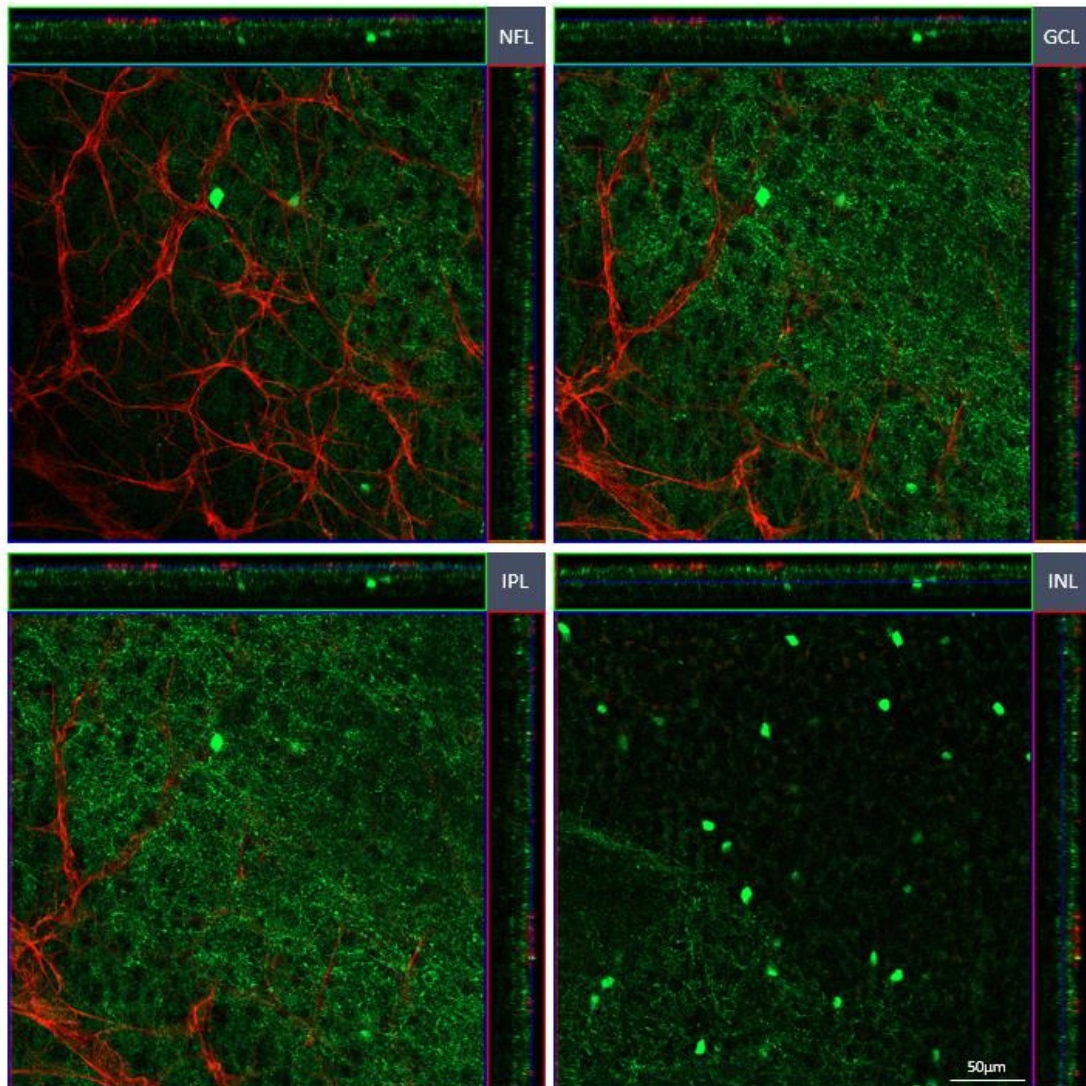
Στους ιστούς που προκλήθηκε *ex vivo* βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης παρατηρήθηκε ότι επαναφέρεται η ανοσοδραστικότητα του GABA στον αμφιβληστροειδή με κατανομή διαφορετική από ότι στις φυσιολογικές συνθήκες. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι 4 ώρες μετά την επαναιμάτωση του ιστού, GABAεργική ανοσοδραστικότητα εντοπίζεται σε κάποια έκτοπα βραχύινα κύτταρα στη GCL, στις αποφύσεις GABAεργικών κυττάρων στην IPL (σε υψηλά επίπεδα) και στα κυτταρικά σώματα των βραχύνιων κυττάρων στην INL.



**Εικόνα 20.** Ανοσοδραστικότητα του GABA στο κέντρο του αμφιβληστροειδούς υπό συνθήκες βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης. Φωτογραφίες τομών από το συνεστιακό μικροσκόπιο στους άξονες x/y. Μεγέθυνση: x20. (κόκκινο: GFAP, πράσινο: GABA). Στιβάδα Νευρικών Ινών (NFL), Στιβάδα γαγγλιακών κυττάρων (GCL), Εσωτερική Δικτυωτή Στιβάδα (IPL), Εσωτερική Πυρηνική Στιβάδα (INL).



**Εικόνα 21.** *Ανοσοδραστικότητα του GABA στη μεσαία περιοχή του αμφιβληστροειδούς υπό συνθήκες βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης. Φωτογραφίες τομών από το συνεστιακό μικροσκόπιο στους άξονες x/y. Μεγέθυνση: x20. (κόκκινο: GFAP, πράσινο: GABA). Στιβάδα Νευρικών Ινών (NFL), Στιβάδα γαγγλιακών κυττάρων (GCL), Εσωτερική Δικτυωτή Στιβάδα (IPL), Εσωτερική Πυρηνική Στιβάδα (INL).*



**Εικόνα 22.** *Ανοσοδραστικότητα του GABA στη περιφέρεια του αμφιβληστροειδούς υπό συνθήκες βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης. Φωτογραφίες τομών από το συνεστιακό μικροσκόπιο στους άξονες x/y. Μεγέθυνση: x20. (κόκκινο: GFAP, πράσινο: GABA). Στιβάδα Νευρικών Ινών (NFL), Στιβάδα γαγγλιακών κυττάρων (GCL), Εσωτερική Δικτυωτή Στιβάδα (IPL), Εσωτερική Πυρηνική Στιβάδα (INL).*

Στο κέντρο του αμφιβληστροειδούς παρατηρούνται λιγότερα GABA<sup>+</sup> σώματα βραχύνων κυττάρων σε σύγκριση με την μεσαία περιοχή και την περιφέρεια του ιστού.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης αποτελεί τη κυριότερη αιτία τύφλωσης. Καταδεικνύεται σημαντική λοιπόν η μελέτη βιοδεικτών της ισχαιμίας καθώς και φαρμακολογικών στόχων για την αντιμετώπιση της. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η GABAεργική νευροδιαβίβαση στον αμφιβληστροειδή και η διαφορική επίδραση της *ex vivo* ισχαιμίας και επαναιμάτωσης στην GABAεργική νευροδιαβίβαση. Σε φυσιολογικές συνθήκες GABA εντοπίζεται σε έκτοπα βραχύινα κύτταρα στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων, στις αποφύσεις των βραχύνων κυττάρων στην εσωτερική δικτυωτή στιβάδα και στα κυτταρικά σώματα αυτών στην εσωτερική πυρηνική στιβάδα. Η παρατηρούμενη ανοσοδραστικότητα του GABA, υπό τις *ex vivo* φυσιολογικές συνθήκες του πειράματος μας, συνάδει με προηγούμενες μελέτες εντοπισμού του ανασταλτικού αυτού νευροδιαβιβαστή στον ιστό (Kolb 2005, Saransaari και συν., 2008, Wu και συν., 1998, Yazulla και συν., 1986).

Μετά από 66 min *ex vivo* ισχαιμίας παρατηρούμε, ιδιαίτερα στο κέντρο του αμφιβληστροειδή, απουσία GABA<sup>+</sup> νευρικών κυτταρικών σωμάτων και αποφύσεων ενώ παράλληλα διαπιστώνουμε την παρουσία GABAεργικής ανοσοδραστικότητας στα αστροκύτταρα και στις αποφύσεις τους στη NFL καθώς και συσσώρευση του νευροδιαβιβαστή στην επιφάνεια των αγγείων. Μετά από 4 ώρες επαναιμάτωσης, παρατηρούμε ανάκτηση της GABAεργικής ανοσοδραστικότητας στα βραχύινα κύτταρα κυρίως της μεσαίας περιοχής και της περιφέρειας του αμφιβληστροειδή. Αν και από όσο γνωρίζουμε δεν υπάρχει στη βιβλιογραφία μελέτη της πιθανής διαφορετικής επίδρασης της ισχαιμίας στις διάφορες περιοχές του αμφιβληστροειδή, εντούτοις τα αποτελέσματά μας συνάδουν με αυτά προηγούμενων *ex vivo* μελετών του εργαστηρίου μας (Trisokka et al., 2022). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και από μελέτες *in vivo* ισχαιμίας/επαναιμάτωσης άλλων ερευνητών. Συγκεκριμένα οι Branett και Osborne παρατήρησαν μείωση των επιπέδων του GABA στα βραχύινα κύτταρα και στην IPL στον αμφιβληστροειδή επίμυον μετά από *in vivo* ισχαιμία (απόφραξη κεντρικής αρτηρίας του αμφιβληστροειδούς για 60 min) και επαναφορά της ανοσοδραστικότητας του GABA στα βραχύινα κύτταρα έπειτα από 60 λεπτά και 24 ώρες επαναιμάτωσης (Branett και Osborne, 1995). Ο Perlman και οι συνεργάτες του παρατήρησαν μείωση της GABAεργικής ανοσοδραστικότητας στο αμφιβληστροειδή επίμυον μετά από *in vivo* ισχαιμία (αύξηση της ενδοφθάλμιας πίεσης για 45min) στις

στιβάδες IPL και INL και επαναφορά της μετά από 2 έως 8 ώρες επαναιμάτωσης του ιστού. Εκτός αυτών των ευρημάτων οι ερευνητές αυτοί παρατήρησαν ανοσοδραστικότητα του GABA στα κύτταρα Müller στην ισχαιμία, η οποία κατά την επαναιμάτωση χάνεται (Perlman και συν., 1996). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ερευνητές αυτοί δεν έκαναν πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας σε παρασκευάσματα ολόκληρου αμφιβληστροειδή (whole mount flat retinas) αλλά σε τομές του ιστού με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η διάκριση μεταξύ των τελικών αποφύσεων των κυττάρων Müller και των αστροκυττάρων στην NFL όπου εντόπισαν την GABAεργική ανοσοδραστικότητα μετά την ισχαιμία. Από την άλλη, ο Kobayshi και οι συνεργάτες (1999) του διαπίστωσαν ότι, μετά από περίσφιξη του οπτικού νεύρου για 60 λεπτά η GABAεργική ανοσοδραστικότητα μετατοπίζεται από τα νευρικά κύτταρα στα περικάρυα και τις τελικές αποφύσεις (endfoot) των κυττάρων Müller στην INL.

Οι ίδιοι ερευνητές μελέτησαν και την δραστηριότητα των ενζύμων GAD και GABA-T και παρατήρησαν ότι μετά από 90 λεπτά ισχαιμίας η ενζυμική δραστηριότητα της GAD δεν μεταβάλλονται ενώ αυτά της GABA-T μειώνονται στο μισό. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας το GABA κανονικά συντίθεται από τη GAD αλλά, μετά την απελευθέρωση του από τα βραχύινα κύτταρα και την πρόσληψη του από τα κύτταρα Müller, συσσωρεύεται σε αυτά λόγω μειωμένου μεταβολισμού του από την τρανσαμινάση. Κατά αυτό το τρόπο το GABA δεν μπορεί να «φύγει» από τα κύτταρα Müller και να επαναπροσληφθεί από τους νευρώνες. Αυτός ενδέχεται να είναι ο λόγος που παρατηρούμε μειωμένη ανοσοδραστικότητα του νευροδιαβιβαστή στα νευρικά κύτταρα (Kobayshi και συν., 1999, Branett και Osborne, 1995).

Η παρουσία του GABA στα αστροκύτταρα στην στιβάδα NFL και στην επιφάνεια των αγγείων κατά τη διάρκεια ισχαιμίας είχε παρατηρηθεί προηγουμένως στο εργαστήριο μας (Trissoka και συν., 2022) ωστόσο δεν αναφέρεται στη βιβλιογραφία. Εντούτοις, αξίζει να σημειωθεί ότι σύμφωνα με τους Bek & Holmgaard (2012), η ενεργοποίηση των GABA<sub>A</sub> υποδοχέων στον περιαγγειακό αμφιβληστροειδή χοίρων οδηγεί σε αγγειοχαλάση μέσω μιας πολύπλοκης αλληλεπίδρασης με μια άλλη αγγειοδιασταλτική οδό η οποία περιλαμβάνει το γλουταμινικό, το ATP, την PGE<sub>2</sub> και διάφορα προϊόντα της COX. Επιπλέον, άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι, η ρύθμιση της διαμέτρου των αρτηριδίων και των τριχοειδών αγγείων στον εγκέφαλο επιτυγχάνεται με αλληλεπιδράσεις μεταξύ του γλουταμινικού, του GABA, της προσταγλανδίνης E και πουρινεργικών ενώσεων, με τα αστροκύτταρα να δρουν ως γέφυρα για τη μετάδοση

πληροφοριών σχετικά με τη νευρική δραστηριότητα στα αιμοφόρα αγγεία (Perriatt και συν., 2006, Gordon και συν., 2011). Με βάση λοιπόν τις παραπάνω μελέτες και δεδομένου ότι η πλειοψηφία των ιστολογικών μελετών που αφορούν τη βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης του αμφιβληστροειδούς πραγματοποιούνται σε τομές του ιστού και με τη βοήθεια απλού και όχι συνεστιακού μικροσκοπίου θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η παρουσία του GABA στα αστροκύτταρα και στην επιφάνεια των αγγείων κατά τη διάρκεια ισχαιμίας του αμφιβληστροειδή δεν είχε ως τώρα διαπιστωθεί γιατί δεν χρησιμοποιήθηκαν τα κατάλληλα ιστολογικά παρασκευάσματα και εργαλεία.

Όπως προαναφέρθηκε, σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, η έκφραση του GABA κατά την ισχαιμία και την επαναιμάτωση του αμφιβληστροειδή διαφέρει μεταξύ του κέντρου και των υπόλοιπων περιοχών του ιστού. Συγκεκριμένα, μετά από 66 min ισχαιμίας στη μεσαία περιοχή και την περιφέρεια του αμφιβληστροειδούς παραμένουν κάποια GABA<sup>+</sup> σώματα βραχύνων κυττάρων σε αντίθεση με το κέντρο όπου δεν εντοπίζονται καθόλου GABA<sup>+</sup> σώματα βραχύνων κυττάρων. Επιπλέον, 4 ώρες μετά την «επαναιμάτωση» στο κέντρο του αμφιβληστροειδούς παρατηρούνται λιγότερα GABA<sup>+</sup> σώματα βραχύνων κυττάρων σε σύγκριση με την μεσαία περιοχή και την περιφέρεια του ιστού. Διαπιστώνουμε δηλαδή ότι, οι επιπτώσεις της ισχαιμίας και της επαναιμάτωσης στην GABAεργική νευροδιαβίβαση στο κέντρο του ιστού είναι πιθανά πιο επιζήμιες από ότι στις άλλες δύο περιοχές. Αυτή η διαφορά ίσως να οφείλεται στη διαφορετική έκφραση και κατανομή διάφορων μεταβολιτών στις τρεις περιοχές του αμφιβληστροειδούς. Ο Bonelli και οι συνεργάτες του (2023) μελέτησαν τη χωρική κατανομή των μεταβολιτών στον αμφιβληστροειδή και βρήκαν περίπου 200 διαφορετικούς μεταβολίτες των οποίων η αφθονία στις περιοχές του αμφιβληστροειδή διαφέρει. Συγκεκριμένα, οι ερευνητές αυτοί διαπίστωσαν ότι οι μεταβολίτες που βρίσκονται σε ιδιαίτερα αυξημένη ποσότητα μόνο στο κέντρο του αμφιβληστροειδούς είναι οι μεταβολίτες του κύκλου του κιτρικού οξέος (TCA cycle), η καρνιτίνη, τα λυσοφωσφολιπίδια και αυτοί του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων ενώ οι μεταβολίτες των οποίων η ποσότητα μειώνεται γρήγορα κατευθυνόμενοι από την περιφέρεια προς το κέντρο του αμφιβληστροειδούς είναι η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, τα κεραμίδια, και αυτοί του μεταβολισμού της πολυαμίνης (Bonelli και συν., 2023).

Η LC3I είναι μια κυτοσολική πρωτεΐνη η οποία όταν συζευχθεί με την φωσφατιδυλαιθανολαμίνη δημιουργεί την LC3II η οποία εντοπίζεται στη μεμβράνη

των αυτοφαγοσωμάτων και αποτελεί έτσι βιοδείκτη για την αυτοφαγία. Ο Russo και οι συνεργάτες του (2011) μελέτησαν την έκφραση της πρωτεΐνης LC3II σε αμφιβληστροειδή επίμυων μετά από αύξηση της ενδοφθάλμιας πίεσης. Διαπίστωσαν ότι, στην αρχή της επαναιμάτωσης και μία ώρα μετά την επαναιμάτωση μειώνονται τα επίπεδα της LC3II. Αυτός είναι ένας λόγος που μπορεί να εξηγείται η αυξημένη κυτταρική επιβίωση και επομένως ο εντοπισμός GABA<sup>+</sup> βραχύνων κυττάρων στην περιφέρεια σε σύγκριση με το κέντρο του αμφιβληστροειδούς. Ακόμη μια πιθανή εξήγηση είναι η ύπαρξη κεραμιδίων στη περιφέρεια του αμφιβληστροειδούς. Τα κεραμίδια είναι πρόδρομη ουσία των σφιγγολιπιδίων και από τον μεταβολισμό τους προκύπτουν η σφιγγοσίνη (Sph) και 1-φωσφορική σφιγγοσίνη (S1P). Γενικά τα κεραμίδια και η σφιγγοσίνη προωθούν την απόπτωση ενώ η S1P προωθεί την κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό (Nakamura και συν., 2021). Παράλληλα δεν βρέθηκε κανένας μεταβολίτης του οποίου η αφθονία να είναι ιδιαίτερα ελαττωμένη μόνο στην περιφέρεια του αμφιβληστροειδή (Bonelli και συν., 2023). Κατά συνέπεια, η περιφέρεια φαίνεται να έχει πλεονέκτημα σε σχέση με το κέντρο και η προστατεύεται έως ένα βαθμό από τις επιπτώσεις της ισχαιμίας γενικότερα, και στα επίπεδα του GABA ειδικότερα.

Στο κέντρο του αμφιβληστροειδούς παρατηρείται σε υψηλά επίπεδα ο κύκλος του κιτρικού οξέος από τον οποίο προκύπτει ένα ενδιάμεσο, το α-κετογλουταρικό που θα δώσει στη συνέχεια γλουταμινικό το οποίο είναι πρόδρομο μόριο για τη σύνθεση του GABA. Σε καταστάσεις διατάραξης του μεταβολισμού όπως είναι η ισχαιμία τα επίπεδα α-κετογλουταρικού είναι χαμηλά. Επιπλέον, στο κέντρο του αμφιβληστροειδούς έχει βρεθεί σε υψηλά επίπεδα η ακετυλο-καρνιτίνη, η οποία παρέχει μια ακετυλο-ομάδα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόδρομος για το γλουταμινικό το οποίο με τη σειρά του δίνει GABA (Fortmann και Grant, 2018, Bonelli και συν., 2023). Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας λοιπόν παρατηρείται απώλεια αυτών των πρόδρομων μορίων για τη σύνθεση GABA και έτσι ίσως εξηγείται η μεγαλύτερη μείωση του GABA στο κέντρο σε σχέση με την μεσαία περιοχή και την περιφέρεια του αμφιβληστροειδούς.

Συμπερασματικά, το GABA θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για τη μελέτη των πρώιμων σταδίων της βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης μια και είναι κατάλληλο για (1) τη διάκριση των σταδίων της βλάβης και (2) τη μελέτη της διαφορικής επίδρασης της στις διάφορες περιοχές του αμφιβληστροειδούς.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Barnett NL, Osborne NN. Redistribution of GABA immunoreactivity following central retinal artery occlusion. *Brain Res.* 1995;677(2):337-340. doi:10.1016/0006-8993(95)00193-t

Bek T, Holmgaard K. GABA-induced relaxation of porcine retinal arterioles in vitro depends on inhibition from the perivascular retina and is mediated by GABAC receptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(7):3309-3315. Published 2012 Jun 5. doi:10.1167/iovs.12-9838

Bonelli R, Woods SM, Lockwood S, et al. Spatial distribution of metabolites in the retina and its relevance to studies of metabolic retinal disorders. *Metabolomics.* 2023;19(2):10. Published 2023 Feb 6. doi:10.1007/s11306-022-01969-6

Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, et al. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res.* 2006;25(4):397-424. doi:10.1016/j.preteyeres.2006.05.003.

Chen C, Zhou X, He J, Xie Z, Xia S, Lu G. The Roles of GABA in Ischemia-Reperfusion Injury in the Central Nervous System and Peripheral Organs. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:4028394. Published 2019 Nov 11. doi:10.1155/2019/4028394.

Chen Q, Moulder K, Tenkova T, Hardy K, Olney JW, Romano C. Excitotoxic cell death dependent on inhibitory receptor activation. *Exp Neurol.* 1999;160(1):215-225. doi:10.1006/exnr.1999.7179.

Choi DW. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol.* 1992;23(9):1261-1276. doi:10.1002/neu.480230915.

Cowled P, Fitridge R. Pathophysiology of Reperfusion Injury. In: Fitridge R, Thompson M, eds. *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists.* Adelaide (AU): University of Adelaide Press; 2011.

Cunha-Vaz J, Bernardes R, Lobo C. Blood-retinal barrier. *Eur J Ophthalmol.* 2011;21 Suppl 6:S3-S9. doi:10.5301/EJO.2010.6049.

de Campos VS, Calaza KC, Adesse D. Implications of TORCH Diseases in Retinal Development-Special Focus on Congenital Toxoplasmosis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:585727. Published 2020 Oct 26. doi:10.3389/fcimb.2020.585727.

Fletcher EL, Downie LE, Ly A, et al. A review of the role of glial cells in understanding retinal disease. *Clin Exp Optom.* 2008;91(1):67-77. doi:10.1111/j.1444-0938.2007.00204.x.

Fortmann SD, Grant MB. Molecular mechanisms of retinal ischemia. *Curr Opin Physiol.* 2019;7:41-48. doi:10.1016/j.cophys.2018.12.008

García-Bermúdez MY, Freude KK, Mouhammad ZA, van Wijngaarden P, Martin KK, Kolko M. Glial Cells in Glaucoma: Friends, Foes, and Potential Therapeutic Targets.

Front Neurol. 2021;12:624983. Published 2021 Mar 16.  
doi:10.3389/fneur.2021.624983.

Gordon GR, Howarth C, MacVicar BA. Bidirectional control of arteriole diameter by astrocytes. *Exp Physiol*. 2011;96(4):393-399. doi:10.1113/expphysiol.2010.053132

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Νευροεπιστήμη και Συμπεριφορά*, 2020, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Επιστημονική Επιμέλεια Ελληνικής Έκδοσης: Αζαρίας Καραμανλίδης.

Kaur C, Ling EA. Blood brain barrier in hypoxic-ischemic conditions. *Curr Neurovasc Res*. 2008;5(1):71-81. doi:10.2174/156720208783565645.

Kobayashi N, Ishiguro S, Tomita H, Nishikawa S, Tamai M. Changes of GABA metabolic enzymes in acute retinal ischemia. *Exp Eye Res*. 1999;69(1):91-96. doi:10.1006/exer.1999.0681

Kolb H. Glial Cells of the Retina. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, eds. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; May 1, 2001.

Kolb H. Gross Anatomy of the Eye. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, eds. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; May 1, 2005.

Kolb H. Neurotransmitters in the Retina. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, eds. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; May 1, 2005.

Li Y, Blanco GD, Lei Z, Xu ZC. Increased GAD expression in the striatum after transient cerebral ischemia. *Mol Cell Neurosci*. 2010;45(4):370-377. doi:10.1016/j.mcn.2010.07.010.

Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol*. 2019;1897:289-298. doi:10.1007/978-1-4939-8935-5\_25.

Mahabadi N, Al Khalili Y. Neuroanatomy, Retina. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; August 8, 2023.

Minhas G, Sharma J, Khan N. Cellular Stress Response and Immune Signaling in Retinal Ischemia-Reperfusion Injury. *Front Immunol*. 2016; 7:444. Published 2016 Oct 24. doi:10.3389/fimmu.2016.00444

Nakamura N, Honjo M, Yamagishi R, Kurano M, Yatomi Y, Watanabe S, Aihara M. Neuroprotective role of sphingolipid rheostat in excitotoxic retinal ganglion cell death. *Exp Eye Res*. 2021 Jul;208:108623. doi: 10.1016/j.exer.2021.108623. Epub 2021 May 19. PMID: 34022173.

Neal MJ, Cunningham JR, Hutson PH, Hogg J. Effects of ischaemia on neurotransmitter release from the isolated retina. *J Neurochem*. 1994;62(3):1025-1033. doi:10.1046/j.1471-4159.1994.62031025.x.

O'Leary F, Campbell M. The blood-retina barrier in health and disease. *FEBS J.* 2023;290(4):878-891. doi:10.1111/febs.16330.

Osborne NN, Casson RJ, Wood JP, Chidlow G, Graham M, Melena J. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res.* 2004;23(1):91-147. doi:10.1016/j.preteyeres.2003.12.001.

Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature.* 2006;443(7112):700-704. doi:10.1038/nature05193

Perlman JI, McCole SM, Pulluru P, Chang CJ, Lam TT, Tso MO. Disturbances in the distribution of neurotransmitters in the rat retina after ischemia. *Curr Eye Res.* 1996;15(6):589-596. doi:10.3109/02713689609008898

Perlman JI, McCole SM, Pulluru P, Chang CJ, Lam TT, Tso MO. Disturbances in the distribution of neurotransmitters in the rat retina after ischemia. *Curr Eye Res.* 1996;15(6):589-596. doi:10.3109/02713689609008898.

Popova E. Ionotropic GABA Receptors and Distal Retinal ON and OFF Responses. *Scientifica (Cairo).* 2014;2014:149187. doi:10.1155/2014/149187.

Qian Z, Lin Y, Xing J, Qiu Y, Ren L. Expression and functions of glutamate and  $\gamma$ -aminobutyric acid transporters in ischemic models. *Mol Med Rep.* 2018;17(6):8196-8202. doi:10.3892/mmr.2018.8888.

Rathnasamy G, Foulds WS, Ling EA, Kaur C. Retinal microglia - A key player in healthy and diseased retina. *Prog Neurobiol.* 2019;173:18-40. doi:10.1016/j.pneurobio.2018.05.006.

Rudraraju M, Narayanan SP, Somanath PR. Regulation of blood-retinal barrier cell-junctions in diabetic retinopathy. *Pharmacol Res.* 2020;161:105115. doi:10.1016/j.phrs.2020.105115.

Russo R, Berliocchi L, Adornetto A, et al. Calpain-mediated cleavage of Beclin-1 and autophagy deregulation following retinal ischemic injury in vivo. *Cell Death Dis.* 2011;2(4):e144. Published 2011 Apr 14. doi:10.1038/cddis.2011.29

Santiago AR, Boia R, Aires ID, Ambrósio AF, Fernandes R. Sweet Stress: Coping With Vascular Dysfunction in Diabetic Retinopathy. *Front Physiol.* 2018;9:820. Published 2018 Jul 13. doi:10.3389/fphys.2018.00820.

Saransaari P, Oja SS. GABA release under normal and ischemic conditions. *Neurochem Res.* 2008;33(5):962-969. doi:10.1007/s11064-007-9499-2.

Traustason S, Eysteinnsson T, Agnarsson BA, Stefánsson E. GABA agonists fail to protect the retina from ischemia-reperfusion injury. *Exp Eye Res.* 2009;88(3):361-366. doi:10.1016/j.exer.2008.07.019.

Trisokka P, Stamatiou R, Delkis N, Asproдини E, Hatziefthimiou, Vasilaki A Retinal ischemia/reperfusion injury: quest for early molecular biomarkers in a rat pharmacological target evaluation model. 12th Meeting of the Hellenic Society of Basic & Clinical Pharmacology. October 7-9 2022, Arta, Greece Proceedings; p53.

Vecino E, Rodriguez FD, Ruzafa N, Pereiro X, Sharma SC. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res.* 2016;51:1-40. doi:10.1016/j.preteyeres.2015.06.003.

Wu MY, Yiang GT, Liao WT, et al. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cell Physiol Biochem.* 2018;46(4):1650-1667. doi:10.1159/000489241.

Wu SM, Maple BR. Amino acid neurotransmitters in the retina: a functional overview. *Vision Res.* 1998;38(10):1371-1384. doi:10.1016/s0042-6989(97)00296-4.

Yang XL. Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. *Prog Neurobiol.* 2004;73(2):127-150. doi:10.1016/j.pneurobio.2004.04.002.

Yazulla S., Chapter 1 GABAergic mechanisms in the retina, *Progress in Retinal Research*, Volume 5, 1986, Pages 1-52, ISSN 0278-4327, [https://doi.org/10.1016/0278-4327\(86\)90004-0](https://doi.org/10.1016/0278-4327(86)90004-0).

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0278432786900040>).