



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική εργασία

**Διαφορική έκφραση της ενεργής μορφής της κινάσης Erk1/2 κατά
την *ex vivo* ισχαιμία & επαναιμάτωση του αμφιβληστροειδούς
επίμυος**

Νικολακοπούλου Δήμητρα του Χρήστου

Λάρισα, Σεπτέμβριος 2023



UNIVERSITY OF THESSALY

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY

Diploma Thesis

Differential expression of the active form of Erk1/2 kinase during *ex vivo* rat retina ischemia & reperfusion

Nikolakopoulou Dimitra

Larissa, October 2023

Τριμελής επιτροπή:

Άννα Βασιλάκη, Επίκουρος Καθηγήτρια Φαρμακολογίας (Υπεύθυνη Καθηγήτρια)
Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σταματία Παπουτσοπούλου, Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Ανοσοβιολογίας,
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, ΠΘ

Αποστολία Χατζγευθυμίου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Τμήμα
Ιατρικής, ΠΘ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας της Σχολής Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το ακαδημαϊκό έτος 2022-2023.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κ. Άννα Βασιλάκη, Επίκουρος Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την πολύτιμη καθοδήγηση που έλαβα καθώς και για τον χρόνο που αφιέρωσε προκειμένου να μου παρέχει χρήσιμες συμβουλές και κατευθύνσεις προκειμένου να ολοκληρωθεί η πτυχιακή μου εργασία.

Στο επόμενο σημείο, θα ήθελα να αποδώσω τις ειλικρινές μου ευχαριστίες προς τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής που επέλεξαν να αφιερώσουν τον χρόνο τους στην αξιολόγηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Την κ. Σταματία Παπουτσοπούλου, Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Ανοσοβιολογίας, καθώς και την κ. Χατζηευθυμίου Αποστολία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας.

Τέλος, επιθυμώ να εκφράσω την βαθιά μου ευγνωμοσύνη προς τον κ. Ηλία Μπέγα, ΕΤΕΠ Εργαστήριο Φαρμακολογίας, για την ανεκτίμητη υποστήριξη που παρείχε κατά την διάρκεια διεξαγωγής των ερευνητικών πειραμάτων στο εργαστήριο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	2
1. ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗΣ	2
1.1. Ανατομία	2
1.2. Νευρικά κύτταρα.....	3
1.2.1 Φωτοϋποδοχείς – Κωνιοφόρα και Ραβδιοφόρα Κύτταρα	3
1.2.2. Γαγγλιακά Κύτταρα (RGCs)	4
1.2.3. Βραχύινα κύτταρα	5
1.2.4. Δίπολα κύτταρα.....	5
1.2.5. Οριζόντια κύτταρα	5
1.3. Νευροδιαβίβαση.....	6
1.4. Κύτταρα γλοίας και αμφιβληστροειδής.....	8
Κύτταρα Müller.....	10
Αστροκύτταρα	12
Μικρογλοία.....	13
1.5. Αιμάτωση	13
2. ΙΣΧΑΙΜΙΑ	15
2.1 Εισαγωγή.....	15
2.2. Ορολογία	15
2.3. Παροχή αίματος στον αμφιβληστροειδή	16
2.4. Ζωικά μοντέλα ισχαιμίας αμφιβληστροειδούς	17
2.5. Αμφιβληστροειδική Ισχαιμία και νευρολογικοί μηχανισμοί.....	18
3. ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗ.....	20
4. ΒΛΑΒΗ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ/ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗΣ	20
Μοριακοί μηχανισμοί ισχαιμίας στο ΚΝΣ	21
Κυτταρικός θάνατος και ισχαιμία.....	23
Απόπτωση.....	24
Νέκρωση.....	25
Αυτοφαγία	26
5. ERK1/2 (p44/42) και ισχαιμία.....	27
5.1. MAP κινάσες.....	27

5.2. ERK1/2	29
ΣΚΟΠΟΣ	41
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	42
ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ	42
EX VIVO ΠΕΙΡΑΜΑ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ/ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗΣ	42
ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑ	44
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	47
Φυσιολογικές συνθήκες.....	47
Συνθήκες ισχαιμίας - Συνθήκες ισχαιμίας/επαναιμάτωσης.....	50
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	51
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	54

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ετυμολογικός όρος 'ισχαιμία' προέρχεται από τα ελληνικά 'ισχυρός'(ισχύς) και 'αίμα' και αναφέρεται σε μια κατάσταση που προκαλείται από μειωμένη ή έλλειψη αιμάτωσης σε ένα συγκεκριμένο μέρος του σώματος εξαιτίας περιορισμού ή διακοπής της αιμάτωσης μέσω των αγγείων. Τα κύτταρα δεν λαμβάνουν αρκετή ποσότητα θρεπτικών ουσιών καθώς και οξυγόνου με συχνό αποτέλεσμα να προκαλείται ζημιά στον ιστό ή στον οργανισμό. Η ισχαιμία μπορεί να επηρεάσει διάφορα μέρη του σώματος και ανάλογα με την διάρκεια και την σοβαρότητα μπορεί να προκαλέσει μέχρι και νέκρωση του ιστού. Ο ορισμός της βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης αναφέρεται στην παράδοση έξαρση της κυτταρικής δυσλειτουργίας, μετά από αποκατάσταση της ροής του αίματος σε προηγουμένως ισχαιμικούς ιστούς. Ο ρόλος της ERK1/2 στον αμφιβληστροειδή είναι σημαντικός καθώς συμμετέχει σε διάφορες λειτουργίες. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής μελέτης ήταν η περαιτέρω διερεύνηση της έκφρασης της ενεργής ERK1/2 στον αμφιβληστροειδή σε τρεις διαφορετικές περιοχές του αμφιβληστροειδούς (κέντρο, μέση και περιφέρεια). Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν οι αμφιβληστροειδείς Wistar αρσενικών αρουραίων ηλικίας 1-1,5 μηνών, οι οποίοι τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια διάχυσης με φυσιολογικό τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό (arti-CSF/γλυκόζης κορεσμένο με 95%O₂/5%CO₂) ροής 1,2 ml/min σε τελικό όγκο 500μl. Κάποιοι ιστοί παρέμειναν καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος σε φυσιολογικό art-CSF, άλλοι παρέμειναν αρχικά σε φυσιολογικό art-CSF και στην συνέχεια σε artiCSF/σουκρόζης κορεσμένο με 95%N₂/5%CO₂ (66min, συνθήκες ισχαιμίας), ενώ μία τελευταία ομάδα ιστών, παρέμεινε για τον ίδιο χρόνο που παρέμειναν και οι υπόλοιποι ιστοί φυσιολογικό art-CSF, μετά υπέστησαν ισχαιμία όπως και προηγουμένως και στην συνέχεια διαχύθηκαν για 4 ώρες με φυσιολογικό art-CSF (συνθήκες ισχαιμίας/επαναιμάτωσης). Μετά το πέρας της πειραματικής διαδικασίας και τη μονιμοποίηση των ιστών έγινε ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της pERK1/2 και της GFAP (για την ανίχνευση των αστροκυττάρων και των κυττάρων Muller) και παρατήρηση των ιστών σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, η ανοσοδραστικότητα της ενεργοποιημένη μορφής της ERK1/2 εντοπίζεται υπό φυσιολογικές συνθήκες στον έσω αμφιβληστροειδή (NFL-INL) επίμυος ενώ δεν παρατηρούνται διαφορές μεταξύ κέντρου, μέσης και περιφέρειας του ιστού ως προς την έκφραση της pERK. Συγκεκριμένα, η pERK εντοπίζεται στα αγγεία της NFL, σε puncta στην GCL και INL και σε κυτταρικής αποφύσεις στην IPL. Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες προκειμένου να διευκρινιστεί το είδος των κυττάρων του αμφιβληστροειδή που εκφράζουν την ενεργοποιημένη μορφή της ERK1/2 καθώς επίσης και η πιθανή διαφορική της έκφραση κατά την ισχαιμία και την επαναιμάτωση του ιστού μια και δεν κατέστη δυνατή η λήψη των αντίστοιχων φωτογραφιών λόγω προβλημάτων του συνεστιακού μικροσκοπίου.

ABSTRACT

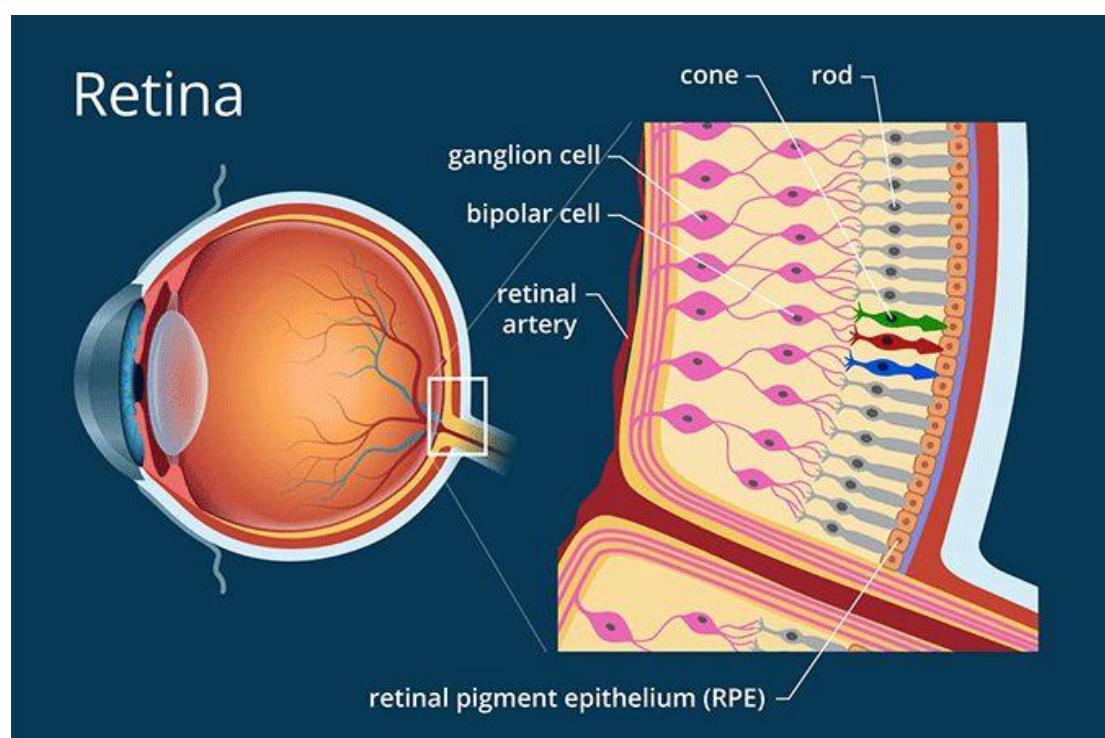
The etymological term 'ischemia' originates from the Greek words 'ischyros' (meaning strong or power) and 'blood' and refers to a condition caused by reduced or insufficient blood supply to a specific part of the body due to restriction or interruption of blood flow through the blood vessels. Cells do not receive an adequate amount of nutrients and oxygen, often resulting in damage to the tissue or the organism. Ischemia can affect various parts of the body and, depending on the duration and severity, may even lead to tissue necrosis. The definition of ischemia/reperfusion injury refers to the paradoxical exacerbation of cellular dysfunction following the restoration of blood flow to previously ischemic tissues. The role of ERK1/2 in the retina is significant as it is involved in various functions. The aim of this thesis study was to further investigate the expression of active ERK1/2 in the retina in three different regions of the retina (centre, middle, and periphery). For these experiments, the retinas of Wistar-type male rats aged 1-1.5 months, were placed in superfusion chambers and perfused at a flow of 1.2 ml/min with normal artificial cerebrospinal fluid (arti-CSF/glucose saturated with 95%O₂/5%CO₂) at a final volume of 500µl. Some tissues were perfused with normal arti-CSF throughout the experiment (physiological conditions), others were initially perfused with normal art-CSF and then with arti-CSF/sucrose saturated with 95%N₂/5%CO₂ (66min, ischemia conditions) while a third group of tissues, was initially perfused with normal arti-CSF, then suffered ischemia as before and finally perfused for 4 hours with normal arti-CSF (ischemia/reperfusion conditions). At the end of the experiment tissues were fixed and immunohistochemical detection of pERK1/2 and GFAP (for the detection of astrocytes and Müller cells) was performed. Tissues were observed under a confocal microscope. According to our results, pERK1/2 is localized under physiological conditions in the inner rat retina (NFL to INL) regardless retinal area studied (centre, middle, and periphery). In particular, pERK1/2 expression was localized on NLF vessels, in GCL and INL puncta and in IPL cellular processes. More studies are needed to further clarify the type of retinal cells expressing the activated form of ERK1/2 as well as its possible differential expression during ischemia and tissue reperfusion since it was not possible to take the corresponding photographs due to confocal microscope problems.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗΣ

1.1. Ανατομία

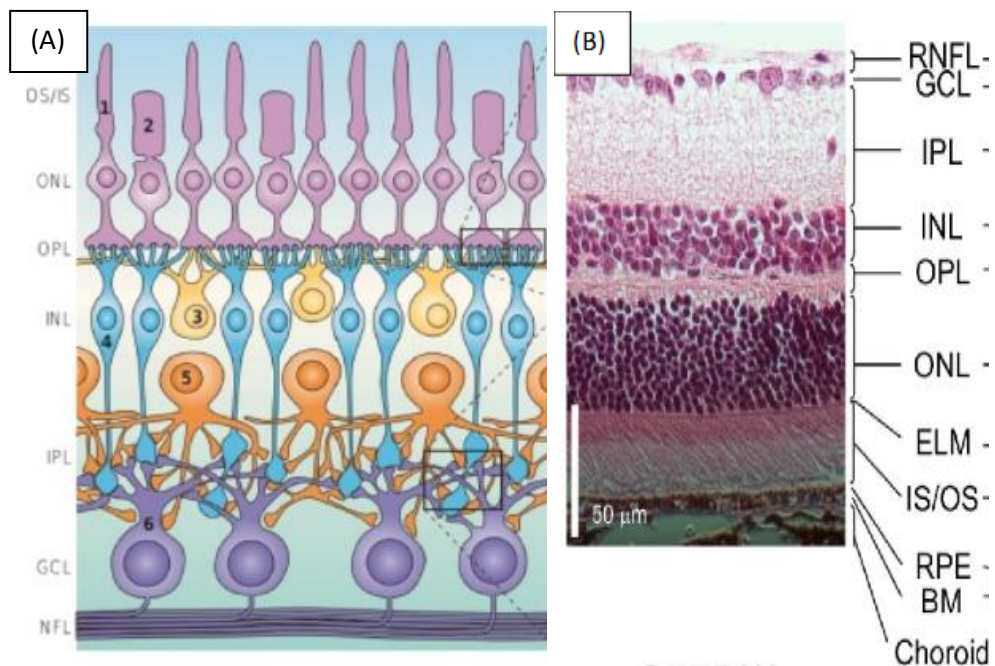
Ο αμφιβληστροειδής αποτελεί πύλη του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ), είναι ο πιο σημαντικός και εξειδικευμένος χιτώνας του οφθαλμού. Αποτελεί το πρώτο στάδιο της επεξεργασίας των οπτικών πληροφοριών στο μάτι. Οι πληροφορίες, έπειτα, αποστέλλονται στον εγκέφαλο μέσω του οπτικού νεύρου, για να επεξεργαστούν περαιτέρω και να δοθεί νόημα σε αυτές. Είναι η αισθητήρια μεμβράνη που καλύπτει την εσωτερική επιφάνεια του πίσω μέρους του βολβού του ματιού και έχει πάχος περίπου 50μm. Ως ‘επίκεντρος της όρασης’ ο αμφιβληστροειδής σε συνεργασία με τον εγκέφαλο παίζει σημαντικό ρόλο στην αντίληψη και κατανόηση του περιβάλλοντος. (Εικόνα 1)



Εικόνα 1 Ανατομία του αμφιβληστροειδούς

Τα κύτταρα-νευρώνες του αμφιβληστροειδή οργανώνονται σε τρεις στοιβάδες, κάθε μια από τις οποίες περιέχει διαφορετικούς τύπους νευρώνων με συγκεκριμένες λειτουργίες. Η εξωτερική κοκκώδης στοιβάδα (ONL: Outer nuclear layer) περιέχει τα κυτταρικά σώματα φωτοϋποδοχέων (**κωνιοφόρα και ραβδιοφόρα κύτταρα**), η εσωτερική κοκκώδης στοιβάδα (INL: Inner nuclear layer) περιέχει τα κυτταρικά

σώματα των **διπολικών, οριζόντιων και των βραχύνων κυττάρων** και η στοιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων(GCL: Ganglion cell layer) η οποία περιέχει τα κυτταρικά σώματα όλων των **RGCs** . Οι ενδιάμεσες στοιβάδες είναι η Έξω δικτυωτή (OPL: Outer plexiform layer) όπου περιέχει τα συναπτικά άκρα των φωτοϋποδοχέων και τους δενδρίτες των διπολικών και οριζόντιων κυττάρων και η Έσω δικτυωτή (IPL: Inner plexiform layer) που αποτελείται από συναπτικές συνδέσεις μεταξύ των αξόνων των διπολικών κυττάρων και των δενδριτών των γαγγλιακών κυττάρων (Εικόνα 2).



Εικόνα 2 Δομή αμφιβληστροειδούς (Α): Στιβάδες αμφιβληστροειδούς, κατηγορίες κυττάρων και συνδεσιμότητα. Οι αριθμοί δηλώνουν ράβδους (1), κώνους (2), οριζόντια κύτταρα (3), διπολικά κύτταρα (4), βραχύινα κύτταρα (5) και γαγγλιακά κύτταρα αμφιβληστροειδούς (RGCs)

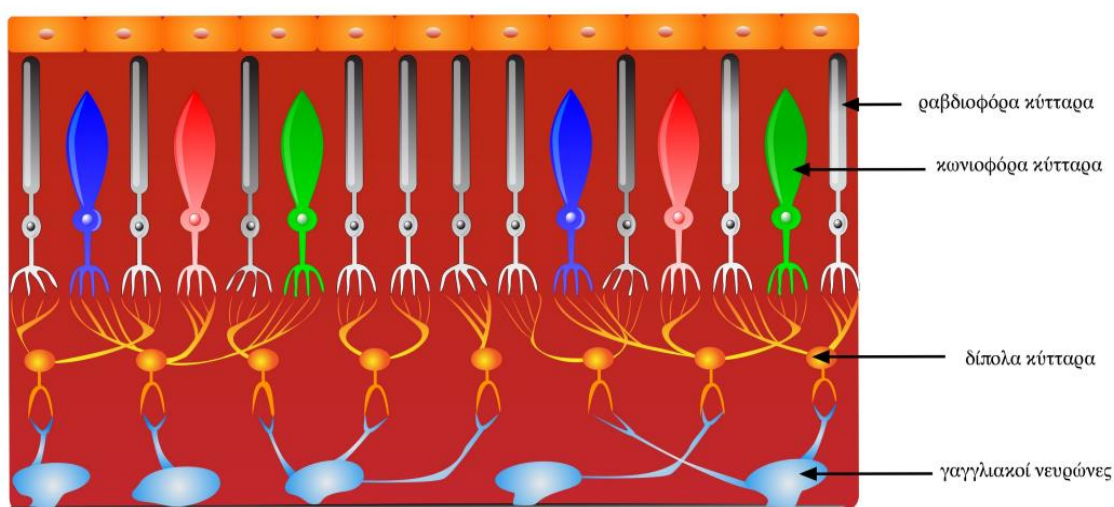
1.2. Νευρικά κύτταρα

1.2.1 Φωτοϋποδοχείς – Κωνιοφόρα και Ραβδιοφόρα Κύτταρα

Η βασικότερη διαδικασία που λαμβάνει χώρα στον αμφιβληστροειδή είναι η φωτοδιαβίβαση. Η διαδικασία αυτή αναφέρεται στον τρόπο με τον οποίο τα μάτια ανταποκρίνονται στο φως και μετατρέπουν το οπτικό ερέθισμα σε ηλεκτρικά σήματα. Αυτή η διαδικασία λαμβάνει χώρα στους φωτουποδοχείς των ματιών που βρίσκονται

επιφανειακά του αμφιβληστροειδή χιτώνα, που αποτελούνται από τα ραβδιοφόρα κύτταρα και τα κωνιοφόρα, τα οποία περιέχουν χημικές ουσίες που αλληλεπιδρούν με το φως (Εικόνα 3). Κατά την διάρκεια της φωτοδιαβίβασης, το φως προκαλεί αλλαγές στις χημικές δομές των φωτουποδοχέων και οι αλλαγές αυτές προκαλούν αλλαγές στην ηλεκτρική δυναμική των φωτουποδοχέων. Το ηλεκτρικό σήμα που παράγεται κατά την διάρκεια της φωτοδιαβίβασης, στέλνεται μέσω των νευρικών αξόνων των φωτουποδοχέων προς τον αμφιβληστροειδή και σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου που επεξεργάζονται τις οπτικές πληροφορίες και καταλήγει ώστε η εικόνα να γίνεται αντιληπτή.

Τα ραβδιοφόρα κύτταρα διεκπεραιώνουν την όραση τη νύχτα ενώ τα κωνιοφόρα κύτταρα διεκπεραιώνουν την όραση την ημέρα. Σε άτομα που έχει χαθεί η λειτουργία των κωνιοφόρων αγγείων θεωρούνται τυφλά. Τα κωνιοφόρα διακρίνονται σε 3 τύπους τα οποία αναφέρονται ως μικρού μήκους κύματος, μεσαίου και μεγάλου μήκους κύματος ή αλλιώς S, M, L- κώνους μήκους κύματος για συντομογραφία [1].



Εικόνα 3 Νευρικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς

1.2.2. Γαγγλιακά Κύτταρα (RGCs)

Τα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς (RGCs) είναι αυτά όπου συνδέουν τους οπτικούς υποδοχείς με τον εγκέφαλο σχηματίζοντας το νευρικό οπτικό σύστημα [2]. Η ισχαιμία έχει μελετηθεί ευρέως στον αμφιβληστροειδή, λόγω του ρόλου της. Σε πολλές ασθένειες όπως το γλαύκωμα, στην διαβητική

αμφιβληστροειδοπάθεια κ.α. έχει αποδειχθεί ότι οδηγούν σε λέπτυνση της στιβάδας των νευρικών ινών ως αποτέλεσμα τον τραυματισμό των γαγγλιακών κυττάρων [3].

Μεταξύ της στοιβάδας των φωτουποδοχέων και των γαγγλιακών κυττάρων υπάρχουν 3 ακόμη είδη νευρώνων: τα βραχύινα κύτταρα, τα δίπολα και τα οριζόντια κύτταρα.

1.2.3. Βραχύινα κύτταρα

Χάρη στις συναπτικές τους συνδέσεις, μαζί με τόσο την ομολογή όσο και την ετερόλογη ηλεκτρική σύζευξη, τα βραχύινα κύτταρα συνδέονται μεταξύ τους σε πολύπλοκα δίκτυα. Σε αντίθεση με τους κανονικούς νευρώνες, τα βραχύινα κύτταρα τυπικά στερούνται άξονα και έχουν συναπτική είσοδο και έξοδο σε κοντινή απόσταση από δενδρίτες.

1.2.4. Δίπολα κύτταρα

Τα δίπολα κύτταρα είναι νευρώνες που έχουν δύο αποφυάδες που είναι εξειδικευμένες λειτουργικά: ο δενδρίτης μεταφέρει πληροφορίες από την περιφέρεια προς το κυτταρικό σώμα και ο νευράξονας διαβιβάζει πληροφορίες από το κυτταρικό σώμα στο Κεντρικό νευρικό σύστημα

1.2.5. Οριζόντια κύτταρα

Τα οριζόντια κύτταρα στο εξωτερικό τμήμα του εσωτερικού πυρηνικού στρώματος του αμφιβληστροειδούς που βρίσκονται με τους άξονές τους παράλληλα με την επιφάνεια.

Είναι παγκοσμίως αποδεκτό ότι υπάρχει μια συνδετική αντίστοιχη σχέση ανάμεσα στις ράβδους του αμφιβληστροειδούς και τους κώνους ενός διαφορετικού τμήματος [4].

Ο αμφιβληστροειδής περιγράφεται ως μια υψηλά απαιτητική δομή όσον αφορά τις μεταβολικές ανάγκες τους ιστού. Απαιτεί μεγάλη ποσότητα οξυγόνου και ενέργειας για την λειτουργία του, καθώς επεξεργάζεται τις οπτικές πληροφορίες που λαμβάνονται από τα μάτια και τις μεταφέρει σε άλλα μέρη του εγκεφάλου για

επεξεργασία. Ο αμφιβληστροειδής είναι επιρρεπής σε περιπτώσεις ισχαιμίας (αποκοπές παροχής αίματος). Όταν η παροχή των μεταβολικών υποστρωμάτων παρεμποδίζεται λόγω ισχαιμίας, ο αμφιβληστροειδής και οι εσωτερικές του στοιβάδες γίνονται ευάλωτοι στη βλάβη. Πιο συγκεκριμένα, οι εσωτερικές στοιβάδες του αμφιβληστροειδούς όπου βρίσκονται στα γαγγλιακά κύτταρα, είναι πιο ευαίσθητες στην ισχαιμία συγκριτικά με τις εξωτερικές στοιβάδες. Αυτό οφείλεται στην ικανότητα φωτουποδοχέων να παράγουν ενέργεια κατά την αναερόβια διαδικασία. Η ισχαιμία στον αμφιβληστροειδή μπορεί να οδηγήσει σε ποικίλες αλλαγές στην μορφολογία και την λειτουργία και την λειτουργία του ιστού. Αυτές οι αλλαγές μπορούν να έχουν αντίκτυπο στην οπτική λειτουργία του ατόμου.

Ο αμφιβληστροειδής χαρακτηρίζεται προσβάσιμος για μελέτη σε ζώα και ερευνητικά πειράματα, έχει χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο για την κατανόηση της παθοφυσιολογίας της ισχαιμίας και για την ανάπτυξη θεραπευτικών προσεγγίσεων για την εγκεφαλική ισχαιμία.

1.3. Νευροδιαβίβαση

Τα οπτικά κύτταρα διακρίνονται σε δύο βασικούς τύπους, τα ραβδία και τα κωνία. Τα ραβδία είναι υπεύθυνα για την όραση σε συνθήκες αμυδρού φωτός, ενώ τα κωνία είναι υπεύθυνα για την όραση στο φως της ημέρας. Η πλασματική μεμβράνη του εξωτερικού τμήματος κάθε ραβδίου διαθέτει κανάλια Na^+ (νατρίου), μέσω των οποίων τα ιόντα νατρίου εισέρχονται στο κύτταρο. Τα ιόντα εξέρχονται επίσης μέσω μηχανισμών ανταλλαγής $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$. Αντίθετα, η πλασματική μεμβράνη του εσωτερικού τμήματος του ραβδίου περιλαμβάνει αντλίες Na^+/K^+ εξαρτώμενες από το ATP, που επιτρέπουν τη μεταφορά των ιόντων νατρίου προς τα έξω. Η πλασματική μεμβράνη του ραβδίου έχει ένα δυναμικό μεμβράνης που κυμαίνεται από -35 έως -45 mV (εσωτερικά αρνητικό) και αποπολώνεται στο σκοτάδι και υπερπολώνεται στο φως.

Η νευροδιαβίβαση στον αμφιβληστροειδή συμβαίνει μέσω ενός σύνθετου δικτύου νευρικών ινών και ανταποκρίνεται στη φωτός.

1. Φωτεινή πηγή: Το φως εισέρχεται στον αμφιβληστροειδή μέσω της κερατοειδή χιτώνα και του φακού.

2. Μετατροπή σήματος: Στην πίσω πλευρά του αμφιβληστροειδούς βρίσκονται οι φωτουποδοχείς, σήματα τα οποία περιέχουν φωτοδέκτες, που είναι ειδικά κύτταρα τα οποία αντιδρούν στο φως και μετατρέπουν αυτήν την αντίδραση σε ηλεκτρικά σήματα.
3. Διαβίβαση στον οπτικό δίσκο: Τα ηλεκτρικά σήματα που δημιουργούνται στους φωτουποδοχείς διαβιβάζονται στις νευρικές ίνες του αμφιβληστροειδούς.
4. Επεξεργασία σημάτων: Τα ηλεκτρικά σήματα υφίστανται πολλαπλές επεξεργασίες και αναδιατάξεις που επιτρέπουν την ανάγνωση και την ερμηνεία τους.
5. Μετάβαση στον οπτικό δίσκο: Το επεξεργασμένο σήμα αποστέλλεται στον οπτικό δίσκο, που βρίσκεται στον πίσω μέρος του αμφιβληστροειδούς.
6. Αποστολή στον εγκέφαλο: Το οπτικό σήμα διαβιβάζεται στον εγκέφαλο και εκεί επεξεργάζεται περαιτέρω για να δημιουργήσει την αντίληψη της εικόνας.

ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ GABA

Η σηματοδότηση του GABA στον αμφιβληστροειδή παίζει έναν σημαντικό ρόλο στην αναστολή και τη ρύθμιση της νευρικής δραστηριότητας στον αμφιβληστροειδή. Ο GABA είναι ένας ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής, που σημαίνει ότι μειώνει τη νευρική δραστηριότητα στα νευρικά κύτταρα που δέχονται αυτό το σήμα.

1. Σύνθεση του GABA: Ο GABA είναι ένας νευροδιαβιβαστής που συνθέτεται από το αμινοξύ γλουταμινικό οξύ. Κατά τη διάρκεια της νευρικής μετάδοσης, το γλουταμινικό οξύ μετατρέπεται σε GABA με τη βοήθεια ειδικών ενζύμων.
2. Απελευθέρωση του GABA: Τα νευρικά κύτταρα που χρησιμοποιούν GABA ως νευροδιαβιβαστή απελευθερώνουν το GABA στην συναπτική σχισμή.
3. Υποδοχείς GABA (GABA Receptors): Στον αμφιβληστροειδή, υπάρχουν υποδοχείς GABA στην επιφάνεια των νευρικών κυττάρων. Το GABA συνδέεται σε αυτούς, προκαλώντας αλλαγές στη μεμβράνη του νευρικού κυττάρου.
4. Αναστολή της νευρικής δραστηριότητας: Όταν το GABA συνδέεται με τους GABA υποδοχείς προκαλείται αύξηση της περατότητας της μεμβράνης για το Cl^- , προκαλώντας υπερπόλωση του νευρικού κυττάρου με αρνητικό φορτίο.

Αυτό το αρνητικό φορτίο καθιστά δυσκολότερη τη διέλευση των ερεθιστικών σημάτων και, κατά συνέπεια, αναστέλλει τη νευρική δραστηριότητα στο νευρικό κύτταρο που δέχεται το GABA.

ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ Glu

Η σηματοδότηση του γλουταμινικού (glutamate) στον αμφιβληστροειδή παίζει ρόλο στη μετάδοση των οπτικών πληροφοριών από φωτουποδοχείς προς τον αμφιβληστροειδή και, στη συνέχεια, προς τον εγκέφαλο. Το Glu λειτουργεί ως διεγερτικός νευροδιαβιβαστής, προκαλώντας την υπερπόλωση των νευρικών κυττάρων προς το θετικό φορτίο, επιτρέποντας τη μετάδοση των οπτικών σημάτων.

1. Φωτουποδοχείς: Τα ραβδία και κωνία βρίσκονται στον εσωτερικό του ματιού και αντιδρούν στο φως. Όταν ένα φωτόνιο συνδέεται σε έναν υποδοχέα, αυτό προκαλεί μια αλλαγή στο δυναμικό της μεμβράνης του.
2. Απελευθέρωση του Glu: Όταν οι φωτουποδοχείς αντιδρούν στο φως, αυξάνουν την απελευθέρωση του Glu στο συναπτική σχισμή.
3. Ενεργοποίηση των νευρικών κυττάρων: Όταν το Glu συνδεθεί με τους υποδοχείς του αυξάνεται η περατότητα της μεμβράνης σε Na και Ca, προκαλώντας υπερπόλωση του νευρικού κυττάρου με θετικό φορτίο. Αυτό δημιουργεί μια ηλεκτρική τάση που διαδίδει το οπτικό σήμα μέσα στο νευρικό κύτταρο.
4. Optic Nerve Pathway: Τα νευρικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς μεταδίδουν το οπτικό σήμα προς τον εγκέφαλο για την επεξεργασία.

1.4. Κύτταρα γλοίας και αμφιβληστροειδής

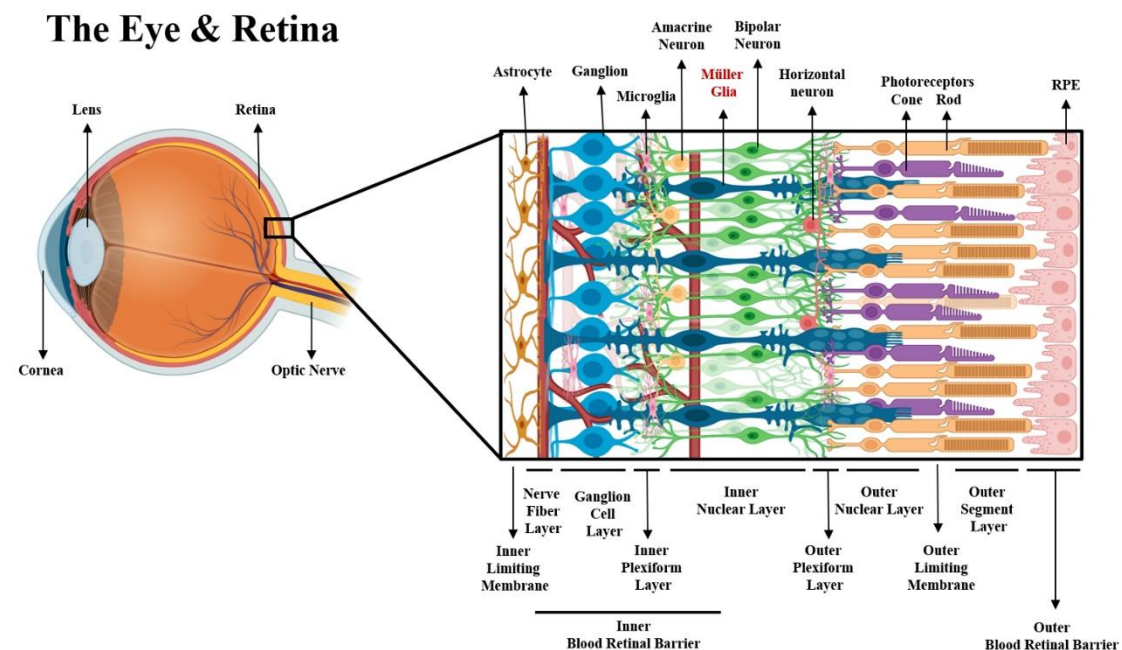
Τα νευρογλοιακά κύτταρα είναι μη νευρικά κύτταρα που αποτελούν το υποστηρικτικό σύστημα του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ). Έχουν σημαντικό ρόλο στην παροχή υποστήριξης και προστασίας των νευρώνων. Ορισμένα από τα βασικά καθήκοντά τους είναι:

1. Περιβάλλουν και διατηρούν τους νευρώνες στη θέση τους.
2. Παρέχουν οξυγόνο και θρεπτικά στους νευρώνες.
3. Λειτουργούν ως μονωτικό υλικό μεταξύ των νευρώνων.

4. Απομακρύνουν νεκρούς νευρώνες, άχρηστες ουσίες και καταστρέφουν παθογόνα.

Τα δύο βασικά είδη νευρογλοιακών κυττάρων στο ΚΝΣ είναι η μικρογλοία και η μακρογλοία. Η μικρογλοία προέρχεται από το εμβρυακό μεσόδερμα και αποτελεί κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Έχει ρόλο στην άμυνα έναντι παθογόνων μικροοργανισμών και στην προστασία του ΚΝΣ από τραυματισμούς, εκτελώντας λειτουργίες παρόμοιες με αυτές των μακροφάγων, όπως η διαδικασία φαγοκυττάρωσης. Η μακρογλοία, από την άλλη πλευρά, συμμετέχει στην παροχή θρεπτικών συστατικών και τον μεταβολισμό του νευρικού συστήματος. Επίσης, συμβάλλει στη βιοσύνθεση της μυελίνης, η οποία είναι ένα σημαντικό στοιχείο για τη μόνωση των νευρικών ινών. Τα κύτταρα της μακρογλοίας περιλαμβάνουν τα ολιγοδενδροκύτταρα, τα αστροκύτταρα και τα επενδυματικά κύτταρα, ενώ στην περιφέρεια συναντάμε τα κύτταρα Schwann και τα δορυφορικά κύτταρα.

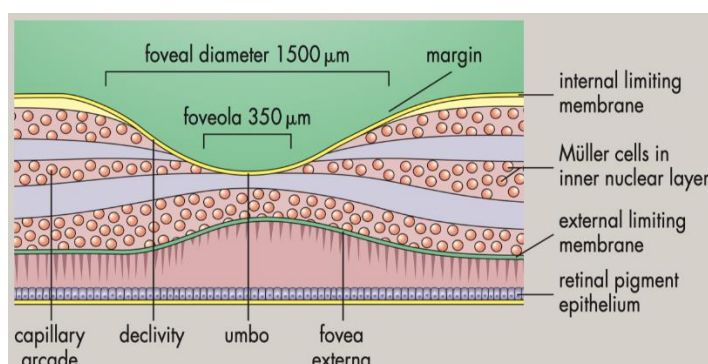
Στον αμφιβληστροειδή παρατηρούνται τρεις τύποι κυττάρων της γλοίας: τα κύτταρα Müller και τα αστροκύτταρα (μακρογλοία) που συμβάλλουν στην διατήρηση της ομοιόστασης και του μεταβολισμού των νευρώνων του αμφιβληστροειδή και τα μικρογλοιακά κύτταρα.



Εικόνα 4 Τα νευρογλοιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς

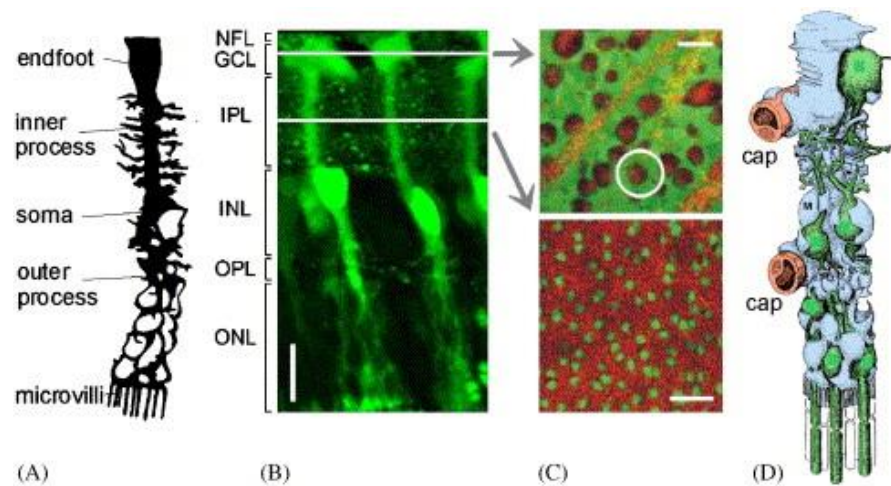
Κύτταρα Müller

Τα κύτταρα Müller είναι η κύρια κατηγορία νευρογλοιακών κυττάρων και οριοθετούν την Εξωτερική (External ή Outer) και την Εσωτερική Περιοριστική Μεμβράνη (Internal ή Inner Limiting Membrane). Η εξωτερική περιοριστική μεμβράνη λειτουργεί ως φράγμα ανάμεσα στο κυτταρικό σώμα των φωτοϋποδοχέων και το περιβάλλον τους. Από την άλλη πλευρά, η εσωτερική περιοριστική μεμβράνη έχει ρόλο στον προσδιορισμό του ορίου μεταξύ του αμφιβληστροειδούς και του υαλώδους σώματος. Αυτή η μεμβράνη δημιουργείται από τα άκρα των κυττάρων Müller και αστροκυττάρων και συμβάλλει στη διατήρηση της δομής και της λειτουργίας του αμφιβληστροειδούς.



Εικόνα 5 Η Εξωτερική και την Εσωτερική Περιοριστική Μεμβράνη

Τα κυτταρικά σώματα των κυττάρων Müller βρίσκονται στο εσωτερικό της κοκκώδους μεμβράνης και επεκτείνονται μέχρι τις δικτυωτές στοιβάδες του αμφιβληστροειδούς. Οι νευρώνες και τα κύτταρα Müller υποβάλλονται σε δύο φάσεις διαμόρφωσης [5,6]. Κατά την πρώτη φάση, δημιουργούνται τα "πρωτογενή" νευρικά κύτταρα, όπως τα κωνία, τα οριζόντια και τα γαγγλιακά κύτταρα, ενώ κατά τη δεύτερη φάση, αναπτύσσονται οι κύριες κυτταρικές κατηγορίες (ραβδία, δίπολα, βραχύινα και τα κύτταρα Müller) που προέρχονται από ένα κοινό προγονικό κύτταρο. Μετά την τελική διαφοροποίηση, αυτά τα κύτταρα μεταναστεύουν στις τελικές τους θέσεις, συμβάλλοντας στη δομή και τη λειτουργία του αμφιβληστροειδούς.



Εικόνα 6 Μορφολογία νευρογλοιακών κυττάρων Müller.

Τα κύτταρα Müller διαθέτουν σημαντικές λειτουργίες που ενισχύουν τη συμβιωτική τους σχέση με τους νευρώνες. Ανάμεσα σε αυτές τις λειτουργίες, συμπεριλαμβάνονται:

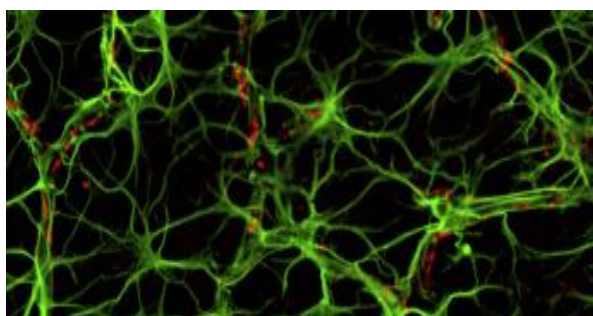
- Διάσπαση του γλυκογόνου: Τα κύτταρα Müller διασπούν το γλυκογόνο, το τελικό προϊόν του αναερόβιου μεταβολισμού, προκειμένου να παράσχουν την αναγκαία ενέργεια για την ενεργοποίηση του αερόβιου μεταβολισμού στα νευρικά κύτταρα.
- Προστασία από νευροδιαβιβαστές: Τα κύτταρα Müller προστατεύουν τους νευρώνες από την περίσσεια νευροδιαβιβαστών, όπως το γλουταμινικό οξύ, μέσω ανακύκλωσης αυτών των ουσιών.
- Φαγοκυττάρωση νευρωνικών υπολειμμάτων: Τα κύτταρα Müller συμμετέχουν στη φαγοκυττάρωση νευρώνων, συντηρώντας την υγεία του περιβάλλοντος τους.
- Σύνθεση ρετινοϊκού οξέος: Τα κύτταρα Müller συμβάλλουν στην σύνθεση του ρετινοϊκού οξέος από ρετινόλη, μια διαδικασία σημαντική για την όραση.
- Έλεγχος ομοιόστασης και προστασία από διαταραχές στην ιοντική ισορροπία: Τα κύτταρα Müller συμβάλλουν στον έλεγχο της ομοιόστασης του περιβάλλοντος και προστατεύουν τους νευρώνες από αλλαγές στη συγκέντρωση ιόντων, όπως το κάλιο.

Αστροκύτταρα

Στον αμφιβληστροειδή, τα αστροκύτταρα αναπτύσσονται από το οπτικό νεύρο, εισέρχονται στον αμφιβληστροειδή καθώς αυξάνεται και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη στήριξη των νευρώνων και στη μεταφορά σημάτων [6,7].

Οι κύριες λειτουργίες των αστροκυττάρων περιλαμβάνουν:

- Δομική στήριξη: Τα αστροκύτταρα παρέχουν θρεπτικά συστατικά και στηρίζουν δομικά τους νευρώνες, συνεισφέροντας στην καλή λειτουργία τους.
- Μεταγωγή σημάτων: Αποτελούν ενδιάμεσο στοιχείο στη μεταφορά σημάτων μεταξύ των νευρώνων και των αιμοφόρων αγγείων, βοηθώντας στη διασφάλιση της επικοινωνίας.
- Ρύθμιση ιόντων Ca^{2+} : Συμμετέχουν στον έλεγχο της συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) στους νευρώνες, ρυθμίζοντας την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών.
- Αποθήκευση γλυκογόνου: Διαθέτουν την ικανότητα να αποθηκεύουν γλυκογόνο, έτσι ώστε να υπάρχει απόθεμα γλυκόζης για του νευρώνες .
- Μεταφορά μορίων: Συμμετέχουν στη μεταφορά μορίων μεταξύ αιμοφόρων αγγείων και του περιβάλλοντος των νευρώνων [8].



Εικόνα 7 Απεικόνιση αμφιβληστροειδούς αρουραίου και επισήμανση αστροκυττάρων με GFAP (πράσινο) και ακουαπορίνης 4 (AQ4, κόκκινο)

Τα αστροκύτταρα συμπεριλαμβάνονται στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και προσαρμόζουν το σχήμα τους έτσι ώστε να περικλείουν τους άξονες των γαγγλιακών κυττάρων και τα αιμοφόρα αγγεία που διαπερνούν τη στοιβάδα των γαγγλιακών . Αυτή η διαδικασία επιτρέπει τη μεταφορά μορίων και θρεπτικών ουσιών από το αίμα στους νευρώνες [6,7].

Τα αστροκύτταρα που έχουν ενεργοποιηθεί αλλά και τα κυττάρα Müller μπορούν να εντοπιστούν με τη χρήση αντισωμάτων λόγω της αυξημένης έκφρασης της

ινιδιακής όξινης πρωτεΐνης της γλοίας (GFAP: glial fibrillary acidic protein) στα ενδιάμεσα νηματίων (IF: intermediate filament).

Μικρογλοία

Ο τρίτος τύπος γλοίας που βρίσκεται στον αμφιβληστροειδή είναι τα κύτταρα της μικρογλοίας. Παρόλο που η ακριβής προέλευση των μικρογλιακών κυττάρων δεν είναι ακόμη γνωστή, πιστεύεται ότι τα παρεγχυματικά μικρογλιακά κύτταρα προέρχονται από το εξώδερμα ενώ τα μικρογλιακά κύτταρα της νευροαγγειακής μονάδας προέρχονται από το μεσέγχυμα (ωοθηλακικός σάκος) και μεταφέρονται στον εγκέφαλο κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής φάσης.

Ο τραυματισμός και φλεγμονή του κεντρικού νευρικού συστήματος οδηγούν στη μετανάστευση των μικρογλιακών κυττάρων στο σημείο της βλάβης και στην ενεργοποίησή τους [6]. Η ενεργοποίηση της μικρογλοίας εξαρτάται επίσης από τη νευρωνική δραστηριότητα, δηλαδή αυξάνεται κατά την απελευθέρωση του γλουταμινικού και μειώνεται κατά την απελευθέρωση του GABA [9]. Η μικρογλοία εντοπίζεται σε όλες τις στοιβάδες του αμφιβληστροειδούς και διαθέτει τους εξής ρόλους:

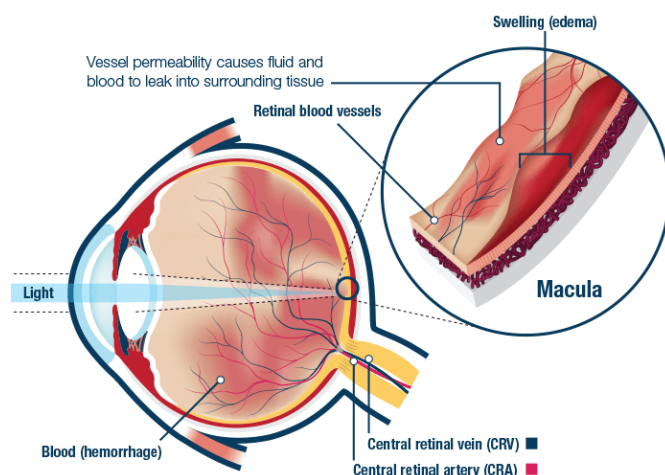
- Απομάκρυνση τοξικών παραπροϊόντων και κυτταρικών υπολειμμάτων
- Αντιφλεγμονώδης δράση: Ενεργοποιείται κατά τη φλεγμονή για την προστασία του εγκεφάλου
- Παραγωγή νευροτροφικών παραγόντων: Συμβάλλει στην παραγωγή μορίων που ενισχύουν την υγεία και την ανάπτυξη των νευρώνων.
- Προστασία νευρώνων από κυτταρικό θάνατο

1.5. Αιμάτωση

Ο αμφιβληστροειδής αντιπροσωπεύει έναν από τους πιο απαιτητικούς ιστούς σε ό,τι αφορά τη μεταβολική δραστηριότητα. Πιο συγκεκριμένα, το εξωτερικό τμήμα των φωτοϋποδοχέων αντιπροσωπεύει το νευρικό κύτταρο με το υψηλότερο επίπεδο μεταβολικής δραστηριότητας στο αμφιβληστροειδή. Αυτή η συνεχής ανάγκη για ενέργεια και θρεπτικά συστατικά υπογραμμίζει την αναγκαιότητα κατάλληλης

αιμάτωσης στον ιστό του αμφιβληστροειδούς για την ομαλή λειτουργία του ματιού και τη διατήρηση της όρασης.

Η αιμάτωση του αμφιβληστροειδούς γίνεται μέσω της κεντρικής αρτηρίας του, η οποία αιματώνει το εσωτερικό ενώ τα χοριοειδή αιμοφόρα αγγεία τροφοδοτούν το εξωτερικό τμήμα. Αυτό εξασφαλίζει ότι οι φωτοϋποδοχείς έχουν επαρκή αιμάτωση και τα αγγεία δεν παρεμβαίνουν σημαντικά στη φωτοδιαβίβαση.



Εικόνα 8 Αρτηρία αμφιβληστροειδούς

Η κεντρική αρτηρία του αμφιβληστροειδούς προέρχεται από διακλαδώσεις της οφθαλμικής αρτηρίας. Αυτή η κεντρική αρτηρία προσδίδει αίμα στις ενδοαμφιβληστροειδικές διακλαδώσεις που τροφοδοτούν τον εσωτερικό αμφιβληστροειδή, το ραδιακά περιφερικό τμήμα (RPCs) και τα τριχοειδή αγγεία τα οποία είναι πυκνότερα στο κέντρο του.

Κατά τη διάρκεια της αιμάτωσης, το αίμα κυκλοφορεί μέσα από τα αγγεία και τροφοδοτεί τους φωτοϋποδοχείς. Το αίμα που κυκλοφορεί μέσα από τα αρτηρίδια και τα τριχοειδή αγγεία τελικά καταλήγει στα φλεβίδια και τις φλέβες, με πορεία προς την κεντρική φλέβα του αμφιβληστροειδούς. Το αίμα αυτό, μέσω του οπτικού νεύρου, απομακρύνεται από το μάτι και απορροφάται από τον οργανισμό.

Το χοριοειδές πλέγμα είναι το στρώμα των αγγείων που παρέχει το μεγαλύτερο ποσοστό αιμάτωσης στον αμφιβληστροειδή, συγκριτικά με την κεντρική αρτηρία. Περίπου 65-85% της αιμάτωσης προέρχεται από το χοριοειδές πλέγμα, ενώ το υπόλοιπο 25-30% προέρχεται από την κεντρική αρτηρία. Το χοριοειδές πλέγμα βρίσκεται μεταξύ του σκληρού χιτώνα και του αμφιβληστροειδούς, χωρίζοντας αυτά τα δύο στρώματα.

Το χοριοειδές πλέγμα αποτελείται από τρείς στοιβάδες αγγείων:

- α. Οι αρτηρίες και οι φλέβες είναι παρούσες στην εξωτερική στοιβάδα
- β. Τα αρτηρίδια και τα φλεβίδια βρίσκονται στη μεσαία στοιβάδα
- γ. Τα τριχοειδή αγγεία εντοπίζονται στην εσωτερική στοιβάδα

2. ΙΣΧΑΙΜΙΑ

2.1 Εισαγωγή

Η ισχαιμία του αμφιβληστροειδούς αποτελεί μια ευρέως διαδεδομένη αιτία τύφλωσης, προκαλεί σημαντική κυτταρική βλάβη σε ανατομικό επίπεδο. Αυτή η βλάβη διαμορφώνεται ως ένα περίπλοκο συνδυασμό συμβαντικών διεργασιών που συμπεριλαμβάνουν νευρωνική εκπόλωση, εισροή ασβεστίου στα κύτταρα και οξειδωτικό στρες. Το τελευταίο προκύπτει ως αποτέλεσμα της ενεργειακής ανεπάρκειας και της υπερβολικής γλουταμινεργικής διέγερσης. Επιπλέον, παρατηρείται μια εξαιρετική ευαισθησία των κυττάρων αυτών στην παραπάνω αναφερθείσα βλάβη, με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η ισορροπία των υποδοχέων των νευροδιαβιβαστών στο εσωτερικό τους.

2.2. Ορολογία

Η λέξη ισχαιμία επινοήθηκε από τον Virchow, ο οποίος συνδύασε τις ελληνικές λέξεις ‘ίσχυρός’ (ισχύ) και το ‘αίμα’[10]. Ως εκ τούτου, η ισχαιμία αναφέρεται σε μια παθολογική κατάσταση κατά την οποία υπάρχει ανεπάρκεια (όχι απαραίτητα πλήρη έλλειψη) στη ροή αίματος προς έναν ιστό, με αδυναμία κάλυψης των απαιτήσεων κυτταρικής ενέργειας. Η ισχαιμία πρέπει να διακρίνεται από την ανοξία (όπου υπάρχει πλήρης έλλειψη οξυγόνου) και την υποξία (όπου παρατηρείται μείωση του οξυγόνου) αλλά η υποξία/ανοξία δεν συνδέονται απαραίτητα απο ισχαιμία. Για παράδειγμα, ο αμφιβληστροειδής μπορεί να γίνει υποξικός σε μεγάλα υψόμετρα, με κύρια αιτία την απώλεια όρασης, αλλά δεν είναι ισχαιμικός. Ομοίως, η αναιμία (μειωμένη συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης) είναι πάντα μέρος της ισχαιμίας, αλλά όχι το αντίστροφο.

Κατά την ισχαιμία παρατηρείται μειωμένη πρόσβαση των ιστών σε οξυγόνο και μεταβολικά υποστρώματα, όπως η γλυκόζη, που απαιτούνται για την κάλυψη των

ενεργειακών αναγκών τους, αλλά και μειωμένη απομάκρυνση των τοξικών παραπροϊόντων του μεταβολισμού. Η ισχαιμία οδηγεί στην ενεργοποίηση μονοπατιών που μπορεί να προκαλέσουν βλάβη στα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένης της συσσώρευσης μεταβολικών αποβλήτων, βλάβη των μιτοχονδρίων και αποδυνάμωση της ικανότητας διατήρησης των κυτταρικών μεμβρανών, με δυνητική απελευθέρωση πρωτεολυτικών ενζύμων.

2.3. Παροχή αίματος στον αμφιβληστροειδή

Η ισχαιμία του αμφιβληστροειδούς αναδεικνύεται όταν η κυκλοφορία του αίματος προς τον αμφιβληστροειδή είναι ανεπαρκής για να καλύψει τις μεταβολικές απαιτήσεις του. Οι απαιτήσεις αυτές αφορούν την παροχή ενέργειας και θρεπτικών ουσιών και μπορεί να προκύψουν από γενική κυκλοφορική ανεπάρκεια όπως σοβαρή ανεπάρκεια αριστερής κοιλίας ή συνήθως από τοπική κυκλοφορική ανεπάρκεια. Η απόφραξη μιας μη τελικής αρτηρίας δεν προκαλεί συνήθως σοβαρή βλάβη, αλλά η απόφραξη μιας τελικής αρτηρίας προκαλεί ισχαιμία ακόμη και έμφραγμα.

Ο αμφιβληστροειδής, ως μέρος του ανθρώπινου οφθαλμού, διακρίνεται από το γεγονός ότι διαθέτει διπλή παροχή αίματος. Αυτή η διπλή παροχή αίματος αντανακλά την εμβρυολογική του προέλευση και τον ρόλο του ως αναπόσπαστο στοιχείο του κεντρικού νευρικού συστήματος. Τα εσωτερικά στρώματα του αμφιβληστροειδούς τροφοδοτούνται από την κεντρική αρτηρία του αμφιβληστροειδούς, η οποία αναδύεται απευθείας από την οφθαλμική αρτηρία στην περιοχή του οπτικού τμήματος. Η αρτηρία εισέρχεται στο οπτικό νεύρο σε μήκος περίπου 10 mm και είναι στενά συνδεδεμένη με τη φλέβα του αμφιβληστροειδούς. Κατά την έξοδο από τον οπτικό δίσκο, οι αρτηρίες του αμφιβληστροειδούς διαιρούνται ακανόνιστα και διχοτομικά, απλώνονται στον αμφιβληστροειδή με ένα μοτίβο που είναι μοναδικό για κάθε άτομο. Τα κύρια αγγεία βρίσκονται επιφανειακά στο στρώμα της νευρικής ίνας ακριβώς πίσω από την εσωτερική περιοριστική μεμβράνη και εκπέμπουν αρτηριώδεις κλάδους που διαιρούνται διαδοχικά στο ίδιο επίπεδο. Με τον μηχανισμό αυτό προβλέπεται η παροχή θρεπτικών ουσιών σε όλο τον αμφιβληστροειδή, εκτός από την περιοχή στην άκρη του, όπου απουσιάζουν αγγεία, καθώς και γύρω από μια συγκεκριμένη περιοχή όπου τα αγγεία περικλείονται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας περιοχής προς την οπίσθια ζώνη χωρίς αγγεία (FAZ) με διάμετρο περίπου 0,5 mm. Τα κυριότερα αγγεία

του αμφιβληστροειδούς αναπτύσσουν δύο σημαντικά δίκτυα αγγείων: 1) το επιφανειακό τριχοειδές δίκτυο, το οποίο είναι τοποθετημένο στο επίπεδο της νευρικής ίνας και 2) το βαθύ τριχοειδές δίκτυο, το οποίο βρίσκεται στο όριο μεταξύ του εσωτερικού και εξωτερικού πυρηνικού στρώματος.

Ως εκ τούτου, η απόφραξη μιας αρτηρίας του αμφιβληστροειδούς επηρεάζει ολόκληρη την κατανομή της, προκαλώντας πλήρη εσωτερική ισχαιμία σε αυτήν την περιοχή. Ομοίως, η απόφραξη του αμφιβληστροειδή προκαλεί πλήρη ισχαιμία από την εσωτερική στοιβάδα σε ολόκληρο τον αμφιβληστροειδή.

2.4. Ζωικά μοντέλα ισχαιμίας αμφιβληστροειδούς

Για την εξέταση της ισχαιμίας του αμφιβληστροειδούς, έχουν αναπτυχθεί πολλά μοντέλα θηλαστικών, είτε στο πλαίσιο *in vivo* είτε *ex vivo*. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειώσουμε ότι η μετάφραση των αποτελεσμάτων από αυτά τα μοντέλα στην κλινική πραγματικότητα απαιτεί ένα μοντέλο που να προσομοιάζει επαρκώς την ισχαιμία του αμφιβληστροειδούς στους ανθρώπους. Ένα από τα βασικά εμπόδια είναι η υψηλή ποικιλομορφία των αγγειακών μοτίβων στον αμφιβληστροειδή μεταξύ διαφορετικών ειδών. Άλλα ανώτερα πρωτεύοντα μοιράζονται ουσιαστικά την ίδια ανατομία των αγγείων του αμφιβληστροειδούς με τον άνθρωπο, αλλά οικονομικοί, πρακτικοί και ηθικοί παράγοντες απαγορεύουν την ευρεία χρήση μοντέλων πρωτευόντων. Τα διάφορα εργαστηριακά ζώα που συνήθως χρησιμοποιούνται στην επιστημονική έρευνα, όπως ο αρουραίος, το κουνέλι και το ινδικό χοιρίδιο, εκδηλώνουν διαφορετικά χαρακτηριστικά όσον αφορά την παροχή τους με αίμα. Σε αυτό το πλαίσιο, ο αρουραίος εμφανίζει ομοιότητες με τον ανθρώπινο οργανισμό όσον αφορά το αγγειακό του σύστημα, αντιπροσωπεύοντας μια πολύτιμη προσέγγιση για την επιστημονική έρευνα.

Συνεπώς, από τα διαθέσιμα πειραματόζωα, είναι προφανές ότι ο αρουραίος αναδεικνύεται ως το πλέον κατάλληλο και διαδεδομένο επιλογής ζώο για την πραγματοποίηση ερευνών σχετικά με την ισχαιμία του αμφιβληστροειδούς. Ωστόσο, υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ της παροχής αίματος στον αμφιβληστροειδή ανθρώπου και αρουραίου.

2.5. Αμφιβληστροειδική Ισχαιμία και νευρολογικοί μηχανισμοί

Η ισχαιμία του αμφιβληστροειδούς στα θηλαστικά έχει ως αποτέλεσμα μη αναστρέψιμες αλλαγές τόσο στη μορφολογία όσο και στη λειτουργία του αμφιβληστροειδούς. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της εξάντλησης των αποθεμάτων ATP, προκαλούμενης από την έλλειψη τόσο της γλυκόζης όσο και του οξυγόνου. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι αυτή η απώλεια των υποστρωμάτων δεν έχει αμελητέα αντίκτυπο στην επιβίωση των κυττάρων, παρότι δεν είναι αμέσως θανατηφόρα. Ο κυτταρικός θάνατος αποτελεί ένα εξαιρετικά περίπλοκο φαινόμενο, το οποίο οφείλεται σε μια αλυσίδα βιοχημικών αντιδράσεων που ξεκινούν από την έλλειψη ενέργειας. Οι ζημιές στους ιστούς και οι λειτουργικές ανωμαλίες που παρατηρούνται κατά την περίοδο παροδικής ισχαιμίας αντανακλούν το αποτέλεσμα της επίδρασης πολλών διαδεδομένων παθοφυσιολογικών παραγόντων, που συχνά συνδέονται μεταξύ τους. Αυτά τα γεγονότα οδηγούν σε σημαντικές αλλαγές στην ιονική ισορροπία, στα επίπεδα νευροδιαβιβαστών και στον μεταβολισμό.

Η αποκατάσταση της παροχής οξυγόνου σε περιοχές του ιστού που υπέστησαν ισχαιμία (έλλειψη οξυγόνου) μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις σε κύτταρα που, μέχρι εκείνη τη στιγμή, είχαν υποστεί βλάβες που θεωρούνταν αναστρέψιμες και ήταν δυνητικά διασώσιμα. Αυτή η έννοια της επαναφοράς του οξυγόνου σε περιοχές ισχαιμικού ιστού που προκλήθηκαν από έλλειψη οξυγόνου βασίζεται σε πειραματικές μελέτες σχετικά με τον μυοκαρδίο από τη δεκαετία του 1960[11]. Η διαρροή της LDH (Λακτική Δεσμευτική Ουδετεράση), ενός δείκτη κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από ισχαιμία του αμφιβληστροειδούς (μέρους του μυοκαρδίου), αυξάνεται μετά την επανεισαγωγή οξυγόνου όταν δεν υπάρχει διαθέσιμη γλυκόζη[12].

Είναι εποικοδομητικό να λάβουμε υπόψη ότι οι βλάβες που προκύπτουν από εγκεφαλικά επεισόδια μπορούν να χαρακτηριστούν ως μια πυκνά ισχαιμική περιοχή, που αναφέρεται ως ισχαιμικός πυρήνας, και αυτή η περιοχή περικλύεται από μια περιοχή με καλύτερη αιμοποίηση, γνωστή ως ισχαιμικό ημίονυφο. Τα κύτταρα που βρίσκονται στο επίκεντρο του ισχαιμικού πυρήνα συνήθως υφίστανται ανεπιστρέπτη ζημία, εκτός εάν αποκατασταθεί γρήγορα η αιμάτωση.

Κατά την τελευταία δεκαετία, έχει διεξαχθεί σημαντική ερευνητική εργασία με στόχο να διαπιστωθούν οι ακριβείς μηχανισμοί που προκαλούν νευρική βλάβη κατά την ισχαιμία. Παρόλα αυτά, εξακολουθεί να υπάρχει μεγάλη συζήτηση σχετικά με τις

βαθύτερες διαδικασίες που οδηγούν στον τραυματισμό. Ένας τομέας που έχει επιστημονικό ενδιαφέρον είναι ο ρόλος των αμινοξέων γλουταμικού και ασπαρτικού, των οποίων οι συγκεντρώσεις εκτός των κυττάρων αυξάνονται σημαντικά κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας [13]. Είναι γνωστό ότι η απελευθέρωση γλουταμικού στα πρώιμα στάδια της εγκεφαλικής ισχαιμίας ενεργοποιεί γεγονότα που οδηγούν σε μη αναστρέψιμη βλάβη. Αυτό συμβαίνει όχι μόνο σε περιοχές όπου η παροχή οξυγόνου μειώνεται σημαντικά, αλλά και σε περιοχές με φαινομενικά λιγότερη διαταραγμένο ενεργειακό μεταβολισμό. Στην παθοφυσιολογία της νευρικής ισχαιμίας, υπάρχει εξακολουθία σύγκρουσης απόψεων σχετικά με τον ακριβή ρόλο που διαδραματίζουν τα νευρωνικά σώματα (φαιά ουσία) και τα νευραξόνια (λευκή ουσία) σε αυτή τη διαδικασία [14]. Επιπλέον, είναι σημαντικό να σημειώσουμε ότι η έρευνα πάνω στην ισχαιμική ζημιά στο νευρικό σύστημα έχει διεξαχθεί κυρίως σε εκείνες τις περιοχές του εγκεφάλου που έχουν επιλεγεί ως αντικείμενο μελέτης. Ως εκ τούτου, απαιτείται προσοχή κατά τη σύγκριση των αποτελεσμάτων με τον γενικότερο αμφιβληστροειδή ιστό, καθώς οι αντιδράσεις τους εντός αυτού του πλαισίου μπορεί να διαφέρουν. Συγκεκριμένα, το πώς οι φωτοϋποδοχείς αντιδρούν στην ανεπάρκεια παροχής αίματος κατά την παρουσία ή απουσία φωτός διαφέρει σημαντικά. Επιπλέον, η ευαίσθητη φύση του αμφιβληστροειδούς, η πολύπλοκη δομή του αγγειακού συστήματος που προσφέρει αίμα σε αυτήν την περιοχή και η υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκογόνο στα κύτταρα Muller συνθέτουν ένα μοναδικό περιβάλλον ενεργειακής προμήθειας σε σύγκριση με τον εγκέφαλο. Αυτό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα την μη ομοιογενή αντίδραση των ιστών κατά την αντιμετώπιση της ανεπάρκειας παροχής αίματος.

Η αμφιβληστροειδική ισχαιμία αναδεικνύεται ως ένα υψίστης σημασίας παράγοντας που συνδέεται με την απώλεια και την εξασθένηση της όρασης, αποτελώντας κυρίαρχη αιτία παθολογιών όπως το γλαύκωμα και η διαβητική αμφιβληστροπάθεια, μεταξύ άλλων, όπως προκύπτει από εκτενείς μελέτες [15].

Κατά την ισχαιμία του νευρικού ιστού, συμβαίνει:

- Εκπόλωση των νευρώνων.
- Είσοδος ιόντων Ca^{2+} στα κύτταρα.
- Εμφάνιση οξειδωτικού στρες λόγω αυξημένης γλουταμινεργικής διέγερσης (διεγερτοτοξικότητα).
- Απουσία ενεργειακού αποθέματος.

Ο ανωτέρω "ισχαιμικός καταρράκτης" μπορεί να διαρκέσει για μερικές ώρες έως και ημέρες, ακόμη και μετά την επαναιμάτωση του ιστού. Αυτή η κατάσταση μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο νευρικών κυττάρων που βρίσκονται μακριά από την αρχική περιοχή ισχαιμικής βλάβης.

3. ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗ

Ο όρος "επαναιμάτωση" αναφέρεται στην παροχή οξυγόνου και των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών σε έναν ιστό μετά από ένα ισχαιμικό επεισόδιο. Ταυτόχρονα, συμβαίνει και η απομάκρυνση επιβλαβών μεταβολιτών. Ωστόσο, η επαναιμάτωση μπορεί να καταστεί επιζήμια και να μην οδηγήσει στην επιθυμητή αποκατάσταση της φυσιολογικής λειτουργίας ενός ιστού, με αποτέλεσμα να αυξάνονται οι πιθανότητες κυτταρικού θανάτου.

4. ΒΛΑΒΗ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ/ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗΣ

Η αποκατάσταση της αιματικής παροχής σε περιοχές που έχουν υποστεί ισχαιμία μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα μια πρόσθετη μορφή βλάβης γνωστή ως βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (Ischemia Reperfusion Injury - IRI). Κατά την αποκατάσταση της ροής του αίματος, το οξυγόνο επανεισέρχεται στους ιστούς, προκαλώντας αυξημένη παραγωγή δραστικών ελεύθερων ριζών (ROS) και φλεγμονωδών παραγόντων που μπορεί να καταστρέψουν τα κύτταρα. Επιπλέον, περισσότερα ιόντα Ca^{2+} εισέρχονται στους ιστούς, συμβάλλοντας στην καταστροφή των νευρικών κυττάρων.

Ο όρος "βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης" ή "βλάβη επανοξυγόνωσης" αναφέρεται στο φαινόμενο, σύμφωνα με το οποίο η έλλειψη οξυγόνου σε έναν ιστό (όπως συμβαίνει στην περίπτωση της ισχαιμίας) που ακολουθείται από την επανοξυγόνωση του ιστού, οδηγεί στην ενεργοποίηση φλεγμονώδων αποκρίσεων και οξειδωτικής βλάβης. Αυτό το φαινόμενο τελικά μπορεί να επιδεινώσει την αρχική ισχαιμική βλάβη και να έχει επιπτώσεις στη λειτουργία του ιστού.

Στην περίπτωση του αμφιβληστροειδούς, η βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης είναι η πιο συχνή αιτία τύφλωσης ή διαταραχής της όρασης. Η βλάβη αυτή αποτελεί σημαντική επιπλοκή στον τομέα των οφθαλμικών παθήσεων, όπως η διαβητική

αμφιβληστροειδοπάθεια, το γλαύκωμα και η απόφραξη της κεντρικής αρτηρίας του αμφιβληστροειδούς. Τα νευρικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς αντιδρούν παρόμοια με άλλους ιστούς του κεντρικού νευρικού συστήματος στην ισχαιμία, αλλά ο αμφιβληστροειδής είναι πιο ανθεκτικός σε σύγκριση με τον εγκέφαλο.

Μοριακοί μηχανισμοί ισχαιμίας στο ΚΝΣ

Παρά το γεγονός ότι ο αμφιβληστροειδής έχει μεγαλύτερες απαιτήσεις σε μεταβολική δραστηριότητα από όλους τους άλλους ιστούς του ανθρώπινου σώματος, η μειωμένη αιμάτωση του εγκεφάλου έχει ως αποτέλεσμα σοβαρή βλάβη, ενώ ο αμφιβληστροειδής, μετά από απόφραξη της κεντρικής αρτηρίας για μέχρι και 100 λεπτά, δεν υποστηρίζει μόνιμη βλάβη. Επομένως, συμπεραίνουμε ότι ο αμφιβληστροειδής είναι πιο ανθεκτικός διότι :

1. Υπάρχουν αποθηκευμένες πηγές ενέργειας και στο εσωτερικό και στο εξωτερικό. Για παράδειγμα, το υαλώδες σώμα περιέχει γλυκόζη σε υψηλές συγκεντρώσεις ενώ τα κύτταρα Müller διαθέτουν αποθηκευμένο γλυκογόνο.
2. Ο αμφιβληστροειδής μπορεί να παράγει ενέργεια σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου μέσω της διαδικασίας της γλυκόλυσης, εφόσον υπάρχει αρκετή γλυκόζη.
3. Οι νευρώνες του αμφιβληστροειδούς φαίνεται να είναι ανθεκτικότεροι στην μειωμένη αιμάτωση και έλλειψη οξυγόνου σε σύγκριση με τους νευρώνες του εγκεφάλου.

Κατά τη διάρκεια ισχαιμίας, παρατηρείται αυξημένη απελευθέρωση του γλουταμινικού οξέος και GABA. Αυτή η απελευθέρωση του γλουταμινικού οξέος στην αρχική φάση της ισχαιμίας ενεργοποιεί μονοπάτια μεταγωγής σήματος που έχουν ως αποτέλεσμα μη αναστρέψιμες βλάβες, σε περιοχές με χαμηλή περιεκτικότητα σε οξυγόνο και σε περιοχές που δεν έχουν υποστεί μεγάλες διαταραχές στο μεταβολισμό. Κατά την αντίδραση σε αυτήν την κατάσταση, ο κύριος παράγοντας που επηρεάζει τη τον θάνατο των νευρικών κυττάρων είναι το ιόν Ca^{2+} . Η αύξηση της συγκέντρωσης Ca^{2+} εντός των νευρικών κυττάρων ενεργοποιεί μονοπάτια που σχετίζονται με τη νευροτοξικότητα. Αυτά τα μονοπάτια περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση διαύλων στη

μεμβράνη των νευρικών κυττάρων, την έκκριση του Ca^{2+} από εσωτερικές αποθήκες (όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο) και άλλων κυτταρικών διεργασιών που εξαρτώνται από το Ca^{2+} . Τέλος, η υπερβολική αύξηση Ca^{2+} , που παρατηρείται κατά τη διάρκεια ισχαιμίας οδηγεί σε μείωση του pH και στην παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) που ευθύνονται για τον κυτταρικό θάνατο.

Παράλληλα, οι βλάβες που προκαλούνται στον αμφιβληστροειδή προκαλούν διαταραχή στην συγκέντρωση των ενεργειακών αποθεμάτων των κυττάρων επηρεάζοντας την ιοντική ισορροπία και την σωστή λειτουργία των διαύλων Ca^{2+} , Na^{+} , K^{+} , και Cl^{-} .

Όσον αφορά τις ελεύθερες ρίζες, συμπεριλαμβανομένων των ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) και των ελευθέρων ριζών αζώτου (RNS), αυτές δημιουργούνται κατά το πρώιμο στάδιο της βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, λόγω της επανα-οξειδωσης προϊόντων που παράγονται κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας. Αυτή η απότομη αύξηση των ελευθέρων ριζών τελικά υπερσχύει έναντι των φυσιολογικών μηχανισμών άμυνας που λειτουργούν με τη βοήθεια αντιοξειδωτικών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση οξειδωτικού στρες, βλάβη των ιστών και απόπτωση.

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν μία πηγή ελευθέρων ριζών, καθώς κατά τη μείωση του οξυγόνου στην αναπνευστική αλυσίδα, παράγεται ανιόν υπεροξειδίου (O_2^{-}). Αυτό το προϊόν είναι ασταθές και μπορεί εύκολα να μετατραπεί σε ROS ή RNS, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) ή το υπεροξυνιτρικό άλας (ONOO^{-}), αντίστοιχα.

Έχει αναδειχθεί ότι η υπερβολική απελευθέρωση γλουταμινικού, η ανεπάρκεια των μηχανισμών επαναπρόσληψης του γλουταμικού και η υπερβολική ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων του γλουταμικού αποτελούν τον κύριο μηχανισμό θανάτου των νευρώνων κατά την ισχαιμία του κεντρικού νευρικού συστήματος. Ωστόσο, παρά τις προκλινικές μελέτες που προσέφεραν ελπιδοφόρα αποτελέσματα για τη χρήση ανταγωνιστών των NMDA υποδοχέων, για τη θεραπεία τόσο της εγκεφαλικής όσο και της αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας, αυτές οι ουσίες απέτυχαν να επιδείξουν αποτελέσματα. Σύμφωνα με πιο πρόσφατες μελέτες, μία πιθανή αιτία αυτής της αποτυχίας είναι το γεγονός ότι η ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων δεν οδηγεί πάντοτε στον θάνατο των κυττάρων, αλλά μπορεί επίσης να οδηγήσει στην επιβίωσή τους.

Κυτταρικός θάνατος και ισχαιμία

Ο κυτταρικός θάνατος αναπαριστά μια φυσιολογική και απαραίτητη διαδικασία για τα κύτταρα, με στόχο τη διατήρηση της ομαλής λειτουργίας του οργανισμού. Ωστόσο, το νευρικό σύστημα αποτελεί μια εξαίρεση από αυτήν τη διαδικασία, εκτός από την περίοδο της ανάπτυξης του οργανισμού. Αυτό συμβαίνει επειδή, σε περίπτωση που παρουσιαστεί ανωμαλία στον κυτταρικό θάνατο των νευρικών κυττάρων, μπορεί να επιφέρει την εκδήλωση σοβαρών νευροεκφυλιστικών νόσων που απειλούν την επιβίωση.

Στο νευρικό σύστημα, υπάρχουν τρεις κύριοι τύποι κυτταρικού θανάτου: η απόπτωση, η νέκρωση και η αυτοφαγία. Αυτοί οι τύποι θανάτου παρατηρούνται στα νευρικά κύτταρα κατά τη διάρκεια ισχαιμίας, που είναι η έλλειψη αρκετής προσφοράς αίματος με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά. Ανάλογα με τη διάρκεια και τη σοβαρότητα της ισχαιμίας, τα κύτταρα μπορεί να εκτελέσουν προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (όπως η απόπτωση και η αυτοφαγία) ή μη προγραμματισμένο (όπως η νέκρωση).

Κατά την επαναιμάτωση μετά την ισχαιμία, μπορεί να αναπτυχθεί φλεγμονή στην περιοχή της βλάβης και να αυξηθεί η παραγωγή αντιοξειδωτικών (ROS) από τα μιτοχόνδρια, καθιστώντας πιο δυσχερή την ανάρρωση. Αν η επαναιμάτωση προκύψει γρήγορα μετά τη βλάβη, το οξυγόνο και τα μεταβολικά συστατικά μπορούν να ανακτηθούν για την παραγωγή ενέργειας (ATP), βοηθώντας τα κύτταρα να επανέλθουν στη φυσιολογική κατάσταση. Εάν η βλάβη δεν είναι πολύ σοβαρή, μπορεί να ενεργοποιηθεί η αυτοφαγία και ενδογενείς μηχανισμοί επιβίωσης. Αν όμως η βλάβη είναι πολύ σοβαρή, τότε ενδέχεται να εκδηλωθεί κυτταρικός θάνατος. Για παράδειγμα, αν η βλάβη παραμένει σε υψηλά επίπεδα και δεν αντιμετωπιστεί αποτελεσματικά, το νευρικό σύστημα μπορεί να ενεργοποιήσει τον κυτταρικό θάνατο. Αυτή η αντίδραση εξαρτάται από τη σοβαρότητα της βλάβης και την ικανότητα των κυττάρων να αντιμετωπίσουν την κατάσταση.

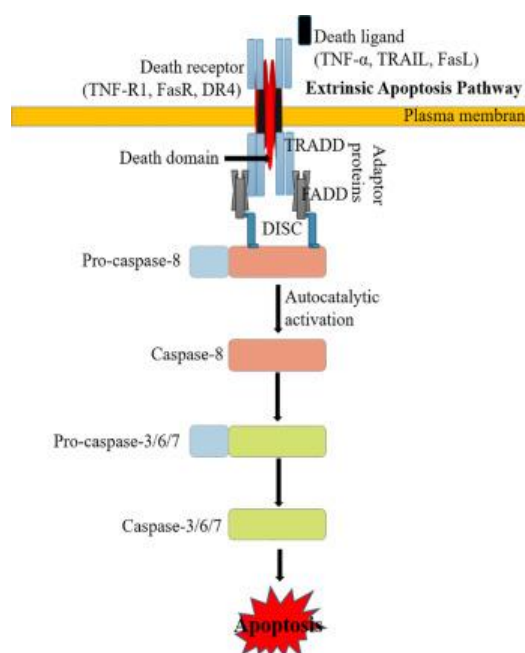
Απόπτωση

Η απόπτωση είναι μια διαδικασία κυτταρικού θανάτου που συμβαίνει μέσω ενεργοποίησης προγραμματισμένων μηχανισμών. Κατά την απόπτωση, τα κύτταρα υφίστανται μεταβολές στη μορφολογία τους και τις εσωτερικές δομές τους, και δημιουργούν αποπτωτικά κυστίδια. Αυτά τα κυστίδια στη συνέχεια απομακρύνονται από τα γειτονικά φαγοκύτταρα μέσω ενός διαδικασίας που ονομάζεται φαγοκυττάρωση. Υπάρχουν δύο μονοπάτια που μπορούν να ενεργοποιήσουν την απόπτωση, ανάλογα με τη φύση του ερεθίσματος:

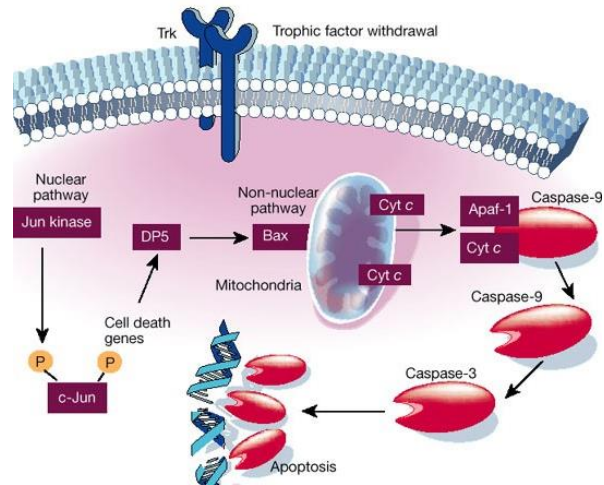
1. Το εξωγενές μονοπάτι απόπτωσης

Ξεκινά με τη σύνδεση μορίων σε υποδοχείς πάνω στην κυτταρική μεμβράνη. Δύο από τους βασικούς στόχους των υποδοχέων αυτών είναι ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF- α) και ο παράγοντας FasL (first apoptosis signal ligand). Όταν αυτοί οι παράγοντες συνδεθούν με τους υποδοχείς, ξεκινά μια αλυσίδα αντιδράσεων που οδηγεί στην ενεργοποίηση της απόπτωσης. Στο

κυτταροπλασματικό τμήμα των υποδοχέων συνδέονται οι κασπάσες 8 και 10. Οι κασπάσες αυτές ενεργοποιούνται μέσω πρωτεόλυσης και στη συνέχεια ενεργοποιούν άλλες κασπάσες, που ονομάζονται τελεστές. Συγκεκριμένα, οι κασπάσες-τελεστές διασπούν την πρωτεΐνη Beclin-1, η οποία είναι σημαντική για την αναστολή της αυτοφαγίας.



2. Το ενδογενές μονοπάτι (μιτοχονδριακό) ενεργοποιείται από ενδοκυτταρικά σήματα, όπως το οξειδωτικό στρες, η ισχαιμία και βλάβες στο DNA. Αυτά τα σήματα προκαλούν την έκφραση και ενεργοποίηση πρωτεϊνών που επηρεάζουν την απόπτωση, όπως οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-



2. Οι πρωτεΐνες Bcl-2 αλλάζουν τη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων και δημιουργούν πόρους σε αυτήν. Η μεταβολή στην δομή της κυτταρικής μεμβράνης οδηγεί στην αποδέσμευση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια, με αποτέλεσμα αυτό το κυτταρικό χρωμόσωμα να διακρίνεται στο κυτταροπλάσμα. Το κυτοχρώμα c στη συνέχεια επιδρά στον παράγοντα Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1), ο οποίος ενεργοποιεί την αποπτωτική πρωτεάση. Αυτή η διέγερση οδηγεί στην ενεργοποίηση της προκασπάσης 9. Η ενεργοποίηση αυτή ενεργοποιεί τον καταρράκτη της ενεργοποίησης των κασπασών, μιας ομάδας πρωτεάσων με κυρίαρχο ρόλο στην απόπτωση. Ο καταρράκτης επακολουθεί την ενεργοποίηση των κασπασών και, τελικά, οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο.

Νέκρωση

Ο όρος "νέκρωση" αναφέρεται στον κυτταρικό θάνατο κατά τον οποίο τα κύτταρα υποστούν ρήξη της κυτταρικής τους μεμβράνης, απελευθερώνοντας έτσι τα ενδοκυτταρικά συστατικά τους, τα οποία μπορούν να διεγείρουν φλεγμονώδεις αντιδράσεις και να προκαλούν βλάβες σε γειτονικά κύτταρα.

Υπάρχουν δύο βασικά είδη νέκρωσης:

1. Ρυθμιζόμενη νέκρωση: Αυτό το είδος της νέκρωσης σχετίζεται με γενετικά ρυθμιζόμενες διαδικασίες και μπορεί να ελεγχθεί σε κάποιο βαθμό από τον οργανισμό.

2. Μη ρυθμιζόμενη νέκρωση: Αυτό το είδος νέκρωσης συνήθως προκαλείται από τραυματισμό ή έκθεση των κυττάρων σε επιβλαβείς παράγοντες όπως τοξίνες, και δεν μπορεί να ελεγχθεί με τον ίδιο τρόπο όπως η ρυθμιζόμενη νέκρωση.

Στην ισχαιμία, παρατηρείται κυρίως η μη ρυθμιζόμενη νέκρωση λόγω της εξάντλησης των ενεργειακών αποθεμάτων ATP και της δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων. Αυτό οδηγεί σε μειωμένη λειτουργικότητα των αντλιών Na^+ και Ca^{2+} , προκαλώντας διόγκωση των κυττάρων και ενεργοποίηση πρωτεασών με αποτέλεσμα την νέκρωση των κυττάρων.

Αυτοφαγία

Η αυτοφαγία αναφέρεται σε ένα φυσιολογικό φαινόμενο που συμβαίνει σε όλα τα κύτταρα και περιλαμβάνει τη διαδικασία κατά την οποία ενδοκυτταρικά συστατικά ή οργανίδια ενθυλακώνονται μέσα σε ένα κυστίδιο, δημιουργώντας ένα αυτοφαγόσωμα. Αυτό το αυτοφαγόσωμα στη συνέχεια ενώνεται με το λυσόσωμα, και με τη βοήθεια των λυσοσωμικών ενζύμων, τα ενδοκυτταρικά συστατικά επαναχρησιμοποιούνται από το ίδιο το κύτταρο. Στο πλαίσιο των φυσιολογικών συνθηκών, η αυτοφαγία έχει ρόλο στην προστασία των κυττάρων από παθογόνα μικρόβια και στη ρύθμιση της κυτταρικής διαδικασίας του θανάτου. Ωστόσο, όταν αυτή η διαδικασία εκτελείται ανεξέλεγκτα, μπορεί να οδηγήσει στον απόπρωτο θάνατο των κυττάρων.

Στην περίπτωση της ισχαιμίας (έλλειψη αρκετής προσφοράς αίματος σε έναν ιστό ή όργανο), ο θάνατος των νευρικών κυττάρων οφείλεται κυρίως σε διεγερτοτοξικούς παράγοντες. Η αυξημένη συγκέντρωση γλουταμινικού και ενδοκυτταρικού Ca^{2+} οδηγεί στη διεγερτοτοξικότητα. Η έλλειψη οξυγόνου και γλυκόζης οδηγεί στην εξάντληση των αποθεμάτων ATP, με αποτέλεσμα την εκπόλωση των προσυναπτικών νευρώνων, την ενεργοποίηση των τασεοεξαρτώμενων διαύλων Ca^{2+} και την απελευθέρωση γλουταμινικού στη συναπτική σχισμή. Παράλληλα, η επαναπρόσληψη του νευροδιαβιβαστή από τον προσυναπτικό νευρώνα καταστέλλεται, συμβάλλοντας στη διεγερτοτοξικότητα και στην ενεργοποίηση μονοπατιών σηματοδότησης του κυτταρικού θανάτου.

Κατά την ισχαιμία του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια παίζουν κρίσιμο ρόλο στην επιβίωση των κυττάρων:

1. PI3K-Akt-mTORC1: Η ενεργοποίηση αυτού του μονοπατιού αυξάνει την κυτταρική επιβίωση και εμποδίζει την αυτοφαγία. Κατά την ισχαιμία, αυτό το μονοπάτι ανασταλεί, επιτρέποντας στα κύτταρα να χρησιμοποιήσουν την αυτοφαγία για ενέργεια.
2. AMPK-mTORC1: Η ενεργοποίηση της AMPK κατά την έλλειψη ενέργειας αναστέλλει το mTORC1, προωθώντας την αυτοφαγία και επιτρέποντας τη χρήση ενέργειας από την αυτοφαγία.
3. Beclin1-Bcl-2: Η Beclin-1 ρυθμίζει την αυτοφαγία, με την αυξημένη διαθεσιμότητα της να υποδεικνύει αυξημένη αυτοφαγία κατά την ισχαιμία.
4. p53: Η πρωτεΐνη p53 προωθεί τον κυτταρικό θάνατο κατά την ισχαιμία, συμβάλλοντας στην ελευθερία ενέργειας και ενδεχομένως στην ανακύκλωση θρεπτικών ουσιών μέσω της αυτοφαγίας.

Αυτά τα μονοπάτια είναι κρίσιμα για την προσαρμογή των κυττάρων στις συνθήκες της ισχαιμίας, εξασφαλίζοντας την ενέργεια και την επιβίωσή τους.

5. ERK1/2 (p44/42) και ισχαιμία

5.1. MAP κινάσες

Στην πεδίο της κυτταρικής βιολογίας, οι πρωτεϊνικές κινάσεις αναδεικνύονται ως κρίσιμοι ρυθμιστές σε πολλές διαδικασίες [16]. Συγκεκριμένα, η ανθρώπινη οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών περιλαμβάνει περίπου 518 γονίδια, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 1,7% του συνολικού ανθρώπινου γονιδιώματος. Αυτό καθιστά την οικογένεια αυτή μία από τις μεγαλύτερες ομάδες γονιδίων που γνωρίζουμε [17]. Βάση της χημικής δομής της φωσφορυλιωμένης ομάδας OH, οι πρωτεΐνες χωρίζονται σε διάφορες κατηγορίες κινασών [17]. Συγκεκριμένα, υπάρχουν 385 μέλη που ανήκουν στις κινάσες Ser/Thr, 90 μέλη στις κινάσες τυροσίνης, 43 μέλη στις κινάσες τύπου τυροσίνης, και επιπλέον, υπάρχουν 106 ψευδογονίδια πρωτεϊνικής κινάσης. Μια μικρή ομάδα κινασών διαθέτει διπλή εξειδίκευση και μπορεί να φωσφορυλίει τόσο τυροσίνη όσο και θρεονίνη σε πρωτεΐνες στόχους όπως η ERK1/2. Αυτές οι κινάσες διπλής ειδικότητας ανήκουν στην οικογένεια των κινασών πρωτεΐνης

Ser/Thr. Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών είναι η συνηθέστερη μετα-μεταφραστική τροποποίηση που χρησιμοποιείται για τη μεταγωγή σημάτων. Επιπλέον, υπάρχουν πρωτεϊνικές φωσφατάσες που αποφωσφορυλίζουν πρωτεΐνες [18, 19], καθιστώντας τη φωσφορυλίωση μια αναστρέψιμη διαδικασία.

Οι κινάσες MAP (Mitogen-Activated Protein Kinases) στα θηλαστικά αποτελούν μια σημαντική ομάδα κινάσεων στον κυτταρικό πλάσμα, οι οποίες έχουν ρόλο στη μεταφορά σημάτων από την επιφάνεια του κυττάρου προς το εσωτερικό του. Αυτή η ομάδα κινάσεων περιλαμβάνει τρεις βασικές οικογένειες: την οικογένεια ERK, την οικογένεια κινάσεων p38 και την οικογένεια N-τερματικών κινάσεων c-Jun (JNK). Κάθε μονάδα κινάσης MAPK αποτελείται τουλάχιστον από τρία βασικά επίπεδα ή συστατικά: μια κινάση MAPK (MAP3K), μια κινάση MAPK (MAP2K) και μια MAPK. Οι ενεργοποιημένες κινάσες MAP καταλύουν τη φωσφορυλίωση πολλών πρωτεϊνών υποστρώματος, συμπεριλαμβανομένων των παραγόντων μεταγραφής, πρωτεϊνικών κινασών, φωσφατάσας και άλλων λειτουργικών πρωτεϊνών. Αυτή η ενεργοποίηση παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής λειτουργίας και της γονιδιακής έκφρασης.

Στο πλαίσιο της κινητικής σηματοδότησης, συχνά συμμετέχουν πρωτεΐνες οι οποίες λειτουργούν ως ικριώματα, δηλαδή πλατφόρμες που επιτρέπουν την αλληλεπίδραση πολλών σημαντικών στοιχείων σε έναν βιολογικό δρόμο. Για παράδειγμα, στον δρόμο σηματοδότησης της κινάσης MAP, πρωτεΐνες όπως το KSR (καταστολέας κινάσης του Ras) και το MP1 (MEK 1 πλατφόρμα) λειτουργούν ως ικριώματα, παίζοντας καίριο ρόλο στη μεταφορά του σήματος προς τον δρόμο της κινάσης ERK1/2. Αντίστοιχα, οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τον δρόμο JNK, όπως η JIP (JNK Interacting Protein), είναι ικριώματα για τη σηματοδότηση της κινάσης JNK.

Συγκεκριμένα, το KSR1/2 αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες B-Raf, C-Raf, MEK1/2 και ERK1/2, ενώ το MP1 αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες MEK1/2 και ERK1/2. Αντίστοιχα, η JIP αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες MLK3, MKK7 και JNK, συμβάλλοντας στη σηματοδότηση της κινάσης JNK. Επιπλέον, η πρωτεΐνη Arrestin 2 λειτουργεί ως ικρίωμα για τους δρόμους ERK1/2 και JNK1-3, αλληλεπιδρώντας με τις πρωτεΐνες Raf και ERK.

Αυτές οι πρωτεΐνες-ικριώματα επιτρέπουν τη συνεργασία και την αλληλεπίδραση των στοιχείων στο εσωτερικό ενός βιολογικού δρόμου, συμβάλλοντας στην ακριβή και αποτελεσματική μεταφορά του σήματος στον κυτταρικό πυρήνα.

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που αναφέρονται ως p38 και JNK ενεργοποιούνται είτε ως αντίδραση σε φλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως τον παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF)- και την ιντερλευκίνη (IL)-1, είτε ως απόκριση σε διάφορους τύπους κυτταρικών καταπονήσεων, όπως γονοτοξική, οσμωτική, υποξική, ή οξειδωτική καταπόνηση [20]. Το μονοπάτι σηματοδότησης p38 αποτελείται από την πρωτεΐνη p38, έναν μεσολαβητή MAP2K (MKK3 ή MKK6), καθώς και έναν ενεργοποιητή MAP3K (ASK1 ή TAK1) [21]. Η οικογένεια πρωτεϊνών p38 έχει σημαντικό ρόλο σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, όπως η ανάπτυξη των αγγείων, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, η φλεγμονή, και η παραγωγή κυτοκινών. Η οδός JNK αποτελείται από JNK1–3, ένα MAP2K (MAP2K4 ή MAP2K7) και ένα MAP3K (ASK1, TAK1, MEKK1 ή MLK) [22]. Η οικογένεια JNK αναλαμβάνει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης και της ανάπτυξης διαφόρων τύπων κυττάρων που ανήκουν στο ανοσοποιητικό σύστημα.

5.2.ERK1/2

Τα ERK1 και ERK2 είναι δύο πρωτεΐνες που μοιράζονται πολλές λειτουργίες και έχουν πανομοιότυπη αλληλουχία κατά 84% [23]. Αξίζει να σημειωθεί ότι η οικογένεια ERK1/2 περιέχει μια περιοχή εισαγωγής 31 αμινοξέων εντός της περιοχής της κινάσης, που παρέχει επιπλέον εξειδίκευση. Αντίστοιχα, η οικογένεια κινασών που εξαρτώνται από κυκλίνη περιέχει επίσης μια περιοχή εισαγωγής κινάσης [24]. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι όλα τα γνωστά σήματα ενεργοποίησης της οδού ERK1/2 οδηγούν στην ταυτόχρονη ενεργοποίηση των ERK1 και ERK2 [25].

Το ERK1/2 είναι υδρόφιλες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον καταρράκτη Ras-Raf-MEK-ERK [26]. Ο προαναφερόμενος μηχανισμός είναι συνεκτικά ενεργός στην ρύθμιση και τον έλεγχο πολλών σημαντικών διεργασιών εντός του κυτταρικού περιβάλλοντος. Αυτές οι διεργασίες περιλαμβάνουν, αλλά δεν περιορίζονται σε, την ρύθμιση της κυτταρικής προσκόλλησης, την έλεγχο της εξέλιξης του κυτταρικού

κύκλου, την διέπαφη της κυτταρικής μετανάστευσης, την διασφάλιση της κυτταρικής επιβίωσης, την προώθηση της διαφοροποίησης, την ρύθμιση του μεταβολισμού, την ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, και την παρακολούθηση της διαδικασίας της μεταγραφής γονιδίων. Συνολικά, τα γονίδια RAS ενεργοποιούνται στο 30% των καρκίνων, ενώ τα RAF στο 7% όλων των καρκίνων [27,28].

Οι πρωτεΐνες H-Ras, K-Ras και N-Ras, οι οποίες έχουν μοριακό βάρος περίπου 21 kDa, λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες σε συγκεκριμένες βιολογικές διαδικασίες. Αυτές οι πρωτεΐνες αποτελούν ανενεργό Ras-GDP, το οποίο μετατρέπεται σε ενεργό Ras-GTP μέσω ενός πολύ σημαντικού βιοχημικού μηχανισμού. Αυτή η μετατροπή διαμεσολαβείται από έναν παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (GEF), που είναι επίσης γνωστός ως Sos1/2 [29]. Η διαδικασία αυτή προωθείται από τη δράση πολλών υποδοχέων κινασών Tyr [30]. Ο διμερισμός του υποδοχέα ενεργοποιεί τη διαδικασία της αυτοφωσφορυλίωσης, οδηγώντας στην ενεργοποίηση του [31]. Αυτές οι φωσφορυλιωμένες περιοχές λειτουργούν ως αναγνωριστικές θέσεις για πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν μια περιοχή ομολογίας Src 2 (SH2) ή μια περιοχή σύνδεσης φωσφορυλιωμένης Tyr (PTB) [32].

Η ενεργοποίηση της Ras πραγματοποιείται στην πλασματική μεμβράνη και συμβαίνει μέσω του Sos1/2. Επιπλέον, οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς που συνδέονται με πρωτεΐνη G και οι ενσωματωμένες στη μεμβράνη ιντεγκρίνες μπορούν να οδηγήσουν επίσης στο σχηματισμό ενεργού Ras-GTP. Το ενεργό Ras-GTP μετατρέπεται στο ανενεργό Ras-GDP καθώς η δραστηριότητα της RasGTPάσης διεγείρεται από την πρωτεΐνη ενεργοποίησης GTPase (GAP) [33].

Ο παθογενετικός μηχανισμός της ενεργοποίησης της οικογένειας των κινασών Raf (περιλαμβάνοντας τις κινάσες A-, B- και C-Raf) από το Ras-GTP είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που αποτελείται από αρκετά στάδια. Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει τον σχηματισμό ομοδιμερών και ετεροδιμερών, με το Ras-GTP να λειτουργεί ως ένας σημαντικός παράγοντας σε αυτήν τη διαδικασία [34].

Οι κινάσες Raf, περιλαμβάνοντας τις κινάσες A-, B- και C-Raf, έχουν περιορισμένη εξειδίκευση στα υποστρώματα και επιδρούν στη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των πρωτεϊνών MEK1 και MEK2. Τα MEK1/2 είναι πρωτεϊνικές κινάσες διπλής ειδικότητας που διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη φωσφορυλίωση της

τυροσίνης και της θρεονίνης στις πρωτεΐνες ERK1 και ERK2, καθώς και στην τελική ενεργοποίησή τους.

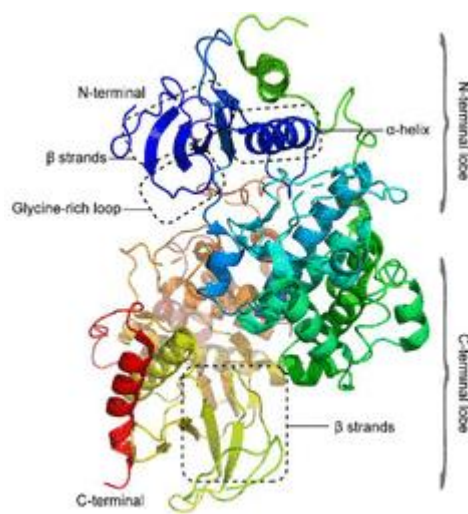
Εν αντιθέσει με τις κινάσες Raf και τα MEK1/2, οι ERK1 και ERK2 διαθέτουν πολλά περισσότερα από 175 γνωστά κυτταροπλασματικά και πυρηνικά υποστρώματα, καταδεικνύοντας την εκτεταμένη πλειονοτική λειτουργικότητά τους [35]. Παράλληλα με τις ισομορφές της πρωτεϊνικής κινάσης Raf που αποτελούν τις κύριες μορφές των MAP3K (Κινασών με Κινητική Δράση τρίτου βαθμού) στη διαδρομή σήματος ERK1/2, υπάρχουν επιπλέον πρωτεϊνικές κινάσεις MEKK1, Mos και COT (γνωστή και ως MAP3K8 ή TPL2) που χρησιμοποιούνται σε πιο περιορισμένες περιπτώσεις σχετικά με τον τύπο κυττάρου και τη διέγερση. Αυτές οι πρωτεϊνικές κινάσεις μπορούν να επιδράσουν στη φωσφορυλίωση πολλών μορίων υποστρώματος. Σε περίπτωση που το υπόστρωμα αποτελείται από μια πρωτεϊνική κινάση, αυτή μπορεί επίσης να επηρεάσει τη φωσφορυλίωση πολλών μορίων υποστρώματος και άλλων παραγόντων. Εκτός από την κλασική διαδρομή σήματος MEK1/2-ERK1/2, υπάρχουν επίσης εναλλακτικές διαδρομές σήματος που αφορούν τα MEK1b και ERK1c, οι οποίες αντιπροσωπεύουν μια ξεχωριστή διαδρομή σήματος [36]. Τα MEK1b και ERK1c αποτελούν εναλλακτικές εκδόσεις των πρωτεϊνικών κινάσεων MEK1 και ERK1, αντίστοιχα.

Ο καταρράκτης σηματοδότησης Ras-Raf-MEK-ERK συχνά εμφανίζει αποκλίσεις σε πολλές παθήσεις, όπως η εγκεφαλική βλάβη, ο καρκίνος, η καρδιακή υπερτροφία, ο διαβήτης και η φλεγμονή [37-42]. Εξαιτίας της κρίσιμης σημασίας των πρωτεϊνικών κινασών, γενικά, και ειδικά στον μηχανισμό αυτόν, οι κινάσες αποτελούν πιθανούς στόχους για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων. Ανεπίσημα στοιχεία δείχνουν ότι ίσως το 1/4 έως το 1/3 της έρευνας για την ανακάλυψη φαρμάκων που διεξάγονται από εμπορικές φαρμακευτικές εταιρείες κατευθύνεται προς τις πρωτεϊνικές κινάσες.

Δομή ERK1/2

Η πρωτεΐνη ERK1/2, όπως και πολλές άλλες πρωτεϊνικές κινάσες, διαθέτει μια πολυπλοκή δομή με δύο βασικούς λοβούς, έναν μικρό αμινοτελικό λοβό και έναν μεγάλο καρβοξυτελικό λοβό. Στον μικρό λοβό, υπάρχει ένα συγκεκριμένο

αντιπαράλληλο φύλλο που αποτελείται από πέντε βασικές αλύκες (1-5). Αξιοσημείωτη είναι και η ύπαρξη μιας σημαντικής και σταθερής C-έλικας στον μικρό λοβό, που παρατηρείται τόσο σε ενεργές όσο και σε ανενεργές καταστάσεις [43]. Ο μικρός λοβός περιέχει έναν διατηρημένο βρόχο δέσμευσης ATP πλούσιο σε γλυκίνη (GxGxxG), που μερικές φορές ονομάζεται βρόχος P, ο οποίος εμφανίζεται μεταξύ των 1- και 2- κλώνων. Ο βρόγχος γλυκίνης αποτελεί το πιο ευέλικτο τμήμα στην δομή του N-λοβού, και είναι ουσιώδης για την σωστή τοποθέτηση των μορίων του ATP προς κατάλυση. Αυτός ο βρόχος, που περιλαμβάνει υψηλή συγκέντρωση γλυκίνης, ακολουθείται από μια διατηρημένη βαλίνη (V56/V39 στην περίπτωση της ERK1/2), η οποία δημιουργεί μια υδρόφοβη αλληλεπίδραση με την αδενοσίνη του ATP. Αυτή η συνεργασία είναι καθοριστική για την επιτυχή διαδικασία κατάλυσης του ATP και αποτελεί κρίσιμο στοιχείο της δομής και λειτουργίας των μορίων που μεσολαβούν σε αυτήν τη διαδικασία.



Ο 3-κλώνος περιέχει μια αλληλουχία AxK, όπου το ATP συνδέεται στην λυσίνη (K71/54 του ERK1/2) της περιοχής της C-έλικας. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι υπάρχει ένα συντηρημένο γλουταμικό οξύ κοντά στο κέντρο της C-έλικας (E88/71 στο ERK1/2) στον χώρο των πρωτεϊνικών κινήσεων. Επιπλέον, η παρουσία μιας γέφυρας άλατος μεταξύ της 3-λυσίνης και του C-γλουταμινικού οξέος αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για τον σχηματισμό της ενεργοποιημένης κατάστασης και αντιστοιχεί στην "C-in" διαμόρφωση. Το σχήμα "C-in" είναι αναγκαίο, αλλά όχι επαρκές, για την πλήρη ενεργοποίηση της δραστηριότητας κίνησης.

Ο μεγάλος C-τερματικός λοβός του μορίου παρουσιάζει κυρίως δομή α-έλικας, με έξι διατηρημένα τμήματα από αD έως αI [43]. Επιπλέον, περιέχει τέσσερις διατηρημένους κλώνους, συγκεκριμένα τους β6 έως β9, οι οποίοι περιλαμβάνουν τα περισσότερα από τα αμινοξέα που έχουν σημασία για την καταλυτική δραστηριότητα. Η πρωταρχική δομή αυτών των β-κλώνων παρατηρείται κυρίως μεταξύ των ελικών E και F του μορίου. Επιπλέον, έχουν εντοπιστεί 12 υποτομείς (I-VIa, VIb-XI) με συντηρημένα κατάλοιπα αμινοξέων που αποτελούν τον καταλυτικό πυρήνα των

πρωτεϊνικών κινασών [44]. Τα τρία αμινοξέα, τα οποία παρουσιάζουν ένα μοτίβο K/D/D (Λυσίνη/Ασπαρτικό/Ασπαρτικό), αναδεικνύουν τις σημαντικές ιδιότητες της ενζυμικής δράσης του ERK1/2. Η λυσίνη στη θέση 3 (K88/71 στο ERK1/2) σχηματίζει στερεά άλατα με τα φωσφορικά άλατα του ATP. Το ασπαρτικό οξύ στη θέση 166/149, το οποίο βρίσκεται εντός του καταλυτικού βρόχου, διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην κατάλυση.

Το δεύτερο ασπαρτικό οξύ στην ακολουθία K/D/D, γνωστό ως Asp186/169, αποτελεί το πρώτο κατάλοιπο που συμμετέχει στη διαδικασία ενεργοποίησης. Σημαντικό να σημειωθεί ότι τα τμήματα ενεργοποίησης σε πολλές πρωτεΐνες κινασών, συμπεριλαμβανομένου του ERK1/2, ξεκινούν με την ακολουθία DFG και τελειώνουν με APE. Το Asp186/169 έχει τη δυνατότητα να συνδέεται με τα ιόντα Mg^{2+} , τα οποία, από την πλευρά τους, συντονίζουν τις χημικές αντιδράσεις με τα φωσφορικά οξέα του ATP. Το καταλυτικό κέντρο του ERK2, που βρίσκεται κοντά στις περιοχές των 6- και 7- κλώνων, περιλαμβάνει τα αμινοξέα His147, Arg148, Asp149 και Lys151 και είναι σημαντικά για τη δέσμευση και την αλληλεπίδραση με τα υποστρώματα πεπτιδίου/πρωτεΐνης. Η βασική δομή του τμήματος ενεργοποίησης εμφανίζεται μετά την καταλυτική περιοχή και πριν από την F-έλικα.

Η κατάσταση ενεργοποίησης αποτελεί τον πιο κρίσιμο παράγοντα ρύθμισης. Αυτή η κατάσταση επηρεάζει τόσο τη σύνδεση του υποστρώματος όσο και την καταλυτική απόδοση της πρωτεϊνικής κινάσης. Η περιοχή που αναφέρεται ως "βρόχος τοποθέτησης μαγνησίου" αποτελείται από πέντε κατάλοιπα και αρχίζει με την πρωτεϊνική δομή DFG της κατάστασης ενεργοποίησης.

Ο "βρόχος ενεργοποίησης" στην πρωτεΐνη ERK1/2 αναγνωρίζεται ως "χείλος ενεργοποίησης". Αυτό το "χείλος ενεργοποίησης" περιλαμβάνει μια Tyr που έχει υποστεί φωσφορυλίωση και δύο κατάλοιπα Thr που επίσης έχουν φωσφορυλιωθεί. Αυτό το "χείλος" εντοπίζεται κοντά στον "βρόχο δέσμευσης μαγνησίου," στο αμινοτελικό άκρο της περιοχής της έλικας C, και στο συντηρημένο συστατικό HRD του καταλυτικού βρόχου.

Παράλληλα, η ERK1/2 έχει έναν "σκελετό" που αποτελείται από τέσσερα μη διαδοχικά υδρόφοβα υπολείμματα, γνωστός ως ρυθμιστική R-spine, καθώς και οκτώ υδρόφοβα κατάλοιπα αμινοξέων που αποτελούν την καταλυτική C-spine. Κάθε spine

περιλαμβάνει κατάλοιπα από διάφορα μέρη της κινάσης, συμπεριλαμβανομένων του χείλους ενεργοποίησης και της C-έλικας, των οποίων οι διαμορφώσεις είναι κρίσιμες για τη διάκριση μεταξύ ενεργών και ανενεργών καταστάσεων. Η C-spine διαδραματίζει έναν καθοριστικό ρόλο στη διευκόλυνση της κατάλυσης μέσω της καθοδήγησης της δέσμησης του ATP. Οι C-spine και R-spine συνεργάζονται για να διασφαλίσουν τη σωστή τοποθέτηση του ATP (C-spine) και της πρωτεΐνης ικριώματος (R-spine) προκειμένου να πραγματοποιηθεί η κατάλυση.

Οι ρυθμιστικές spines του ERK1/2 αποτελούνται από συγκεκριμένες δομικές στοιχειώδεις μονάδες. Συγκεκριμένα, αποτελούνται από τμήματα της πρωτεΐνης που βρίσκονται στην αρχή του 4-κλώνου (πρώτα 103 αμινοξέα από το N-τελικό άκρο), στην C-έλικα (τελευταία 75 αμινοξέα από το C-τελικό άκρο), ακολουθούνται από ένα υδρόφοβο τμήμα και στη συνέχεια τον βρόχο ενεργοποίησης DFG (170 αμινοξέα από το N-τελικό άκρο), καθώς και την His (147 αμινοξέα από το N-τελικό άκρο) στον καταλυτικό βρόχο.

Η δομή H164/147 είναι στερεωμένη στην F-έλικα μέσω ενός δεσμού υδρογόνου με ένα κατάλοιπο ασπαρτικού (210 αμινοξέα από το N-τελικό άκρο). Επίσης, υπάρχει μια συνδετική πλευρά R που συνδέεται με την έλικα F μέσω υδροφοβικών δεσμών. Αυτά τα δομικά στοιχεία συνδέονται με την λειτουργία του καταλυτικού βρόχου, του χείλους ενεργοποίησης και του βρόχου H-I [45].

Οι ρυθμιστικές spines ERK1/2 αποτελούνται από υπολείμματα πρωτεϊνικών κινάσων που προέρχονται από την αρχική δομή τους. Η C-spine αυτών των πρωτεϊνικών κινάσων περιλαμβάνει υπολείμματα από τις αμινοτελικές και καρβοξυλικές άκρες, και επιπροσθέτως από το τμήμα αδενίνης του ATP [43]. Αυτή η συγκεκριμένη δομή συμβάλλει στην εντοπισμό του ATP, γεγονός που την χαρακτηρίζει ως "καταλυτική". Τέλος, υπολείμματα από το N-τερμικό άκρο των ERK1/2 σχηματίζουν συνδέσμους με την αδενοσίνη στο ενεργό ένζυμο.

Τα κατάλοιπα της D-έλικας της ERK1/2 σχηματίζουν δεσμούς με τα κατάλοιπα M125/108, I234/217 και M239/222 στη F-έλικα. Επιπλέον, το εξωκυκλικό 6-αμινο άζωτο του ATP σχηματίζει έναν δεσμό υδρογόνου με ένα κατάλοιπο της R-spine που είναι υπεύθυνο για την σύνδεση των N- και C-λοβών της πρωτεϊνικής κινάσης.

Παρόμοιοι δεσμοί υδρογόνου δημιουργούνται και από άλλους μικρομοριακούς αναστολείς πρωτεϊνικών κινάσων που ανταγωνίζονται για τη δέσμευση του ATP [46].

Δομές ενεργού και ανενεργού ERK1/2

Η καταλυτική θέση της πρωτεϊνικής κινάσης βρίσκεται στη σχισμή μεταξύ των μικρών και μεγάλων λοβών. Στην ανοιχτή και καταλυτικά ανενεργή μορφή του ενζύμου, οι λοβοί έχουν μέτρια κλίση ο ένας από τον άλλο. Στην κλειστή και καταλυτικά ενεργή μορφή του ενζύμου, οι λοβοί είναι πιο κοντά μεταξύ τους, αλλά οι δύο λοβοί των πρωτεϊνικών κινάσων μπορούν ακόμα να κινούνται ο ένας σε σχέση με τον άλλο κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου. Στην περίπλοκη δομή των πρωτεϊνικών κινάσων, η βασική καταλυτική περιοχή βρίσκεται στη σχισμή μεταξύ των μικρών και μεγάλων λοβών. Στην ανοιχτή μορφή του ενζύμου, όταν δεν εκτελείται η καταλυτική του λειτουργία, οι λοβοί έχουν μέτρια απόσταση μεταξύ τους. Ωστόσο, όταν το ενζύμο είναι σε κατάσταση ενεργότητας, οι λοβοί συγκλίνουν και πλησιάζουν ο ένας τον άλλο περισσότερο. Παρόλα αυτά, ακόμα υπάρχει δυνατότητα κίνησης μεταξύ τους κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου, κατά τη διάρκεια του οποίου πραγματοποιείται η δέσμευση του ATP και η απελευθέρωση του ADP [47].

Συγκεκριμένα, στην περίπτωση του ενζύμου ERK2 στις αρουραίους, οι λοβοί πραγματοποιούν μια περιστροφή που τους φέρνει πιο κοντά, περίπου 5,4°, κατά τη μετάβαση από τη μη φωσφορυλιωμένη ανενεργή στη φωσφορυλιωμένη ενεργή κατάσταση [49]. Μετά τη δέσμευση του Mg και του υποστρώματος, η επιπλέον κίνηση της καταλυτικής ενζυμικής μορφής φέρνει τα κατάλοιπα σε μια κατάσταση καταλυτικής ενεργότητας. Κατά τη διάρκεια αυτής της καταλυτικής φάσης, λαμβάνει χώρα η μεταφορά φωσφορικών ομάδων από το ATP στο υπόστρωμα πρωτεΐνης.

Η C-έλικα στον μικρό λοβό της πρωτεΐνης παίρνει δύο διαφορετικές διαμορφώσεις, μια ενεργή (C-helix in) και μια ανενεργή (C-helix out) [48]. Αυτή η C-έλικα μπορεί να περιστρέφεται και να μετακινείται σε σχέση με τον υπόλοιπο λοβό της πρωτεΐνης επηρεάζοντας την ενεργότητα του ενζύμου. Στην ενεργή κατάσταση, μια λυσίνη στο 3-κλώνο (ERK1/2 K71/54) αλληλεπιδρά με ένα διατηρημένο γλουταμικό οξύ στη C-έλικα (ERK1/2 E88/71). Η συγκεκριμένη δομή προσδιορίζεται ως "DFG-

aspartate out". Στην ενεργή κατάσταση, το πλευρικό αμινοξύ ασπαρτικό βρίσκεται προς την κατεύθυνση του τόπου σύνδεσης του ATP και αλληλεπιδρά με το ιόν μαγνησίου (Mg^{2+}). Αυτή η δομή αναφέρεται ως "DFG-ασπαρτικό in" (DFG-aspartate in). Σε ανενεργή κατάσταση, η Phe στη θέση DFG μπορεί να μετακινηθεί προς την ενεργή θέση, ενώ το DFG-aspartate μετακινείται προς τα έξω [48]. Είναι η ικανότητα του ασπαρτικού να δεσμεύεται (ασπαρτικό in) ή να μην δεσμεύεται (ασπαρτικό out) με το Mg^{2+} στην ενεργή θέση που είναι το κλειδί. Το ενεργό ένζυμο εμφανίζει μορφή DFG-ασπαρτικό in/C-helix in. Αντίθετα, οι μορφές DFG-aspartate out/C-helix in, DFG-aspartate out/C-helix out και DFG-aspartate out/C-helix out αντιπροσωπεύουν ανενεργές μορφές του ενζύμου.

Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης ERK1/2 από την ανενεργή της μορφή απαιτεί δύο φάσεις φωσφορυλίωσης σε συγκεκριμένα κατάλοιπα εντός της περιοχής ενεργοποίησης. Η φωσφορυλίωση αυτή εκτελείται από την πρωτεΐνη MEK1/2. Τα υπολείμματα που υποβάλλονται σε φωσφορυλίωση είναι τρία: Thr-Glu-Tyr.

Όλες οι κινάσες MAP (Mitogen-Activated Protein Kinases) περιέχουν μια αλληλουχία Thr-Xxx-Tyr στο τμήμα ενεργοποίησής τους. Για παράδειγμα, οι JNK (c-Jun N-terminal Kinases) περιέχουν την αλληλουχία Thr-Pro-Tyr, ενώ οι p38 κινάσες περιέχουν την αλληλουχία Thr-Gly-Tyr. Η πρωτεΐνη MEK1/2 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη φωσφορυλίωση του κατάλοιπου Tyr στην ενεργή μορφή της ERK1/2. Αυτή η φωσφορυλίωση επαναδιαχωρίζει την ERK1/2 από την MEK1/2 και επιτρέπει στη συνέχεια τη φωσφορυλίωση της Thr ενεργοποίησης του υπολείμματος, κατά την οποία είναι ανάγκη να απομακρυνθεί την φωσφορυλιωμένη Tyr ERK1/2.

Τέλος, η πρωτεΐνη ERK2 μπορεί να απενεργοποιηθεί είτε με τη φωσφατάση 2A, μια ειδική πρωτεϊνική φωσφατάση Ser/Thr, είτε με τη CD45, μια ειδική πρωτεϊνική φωσφατάση Tyr. Έχει επίσηςδειχθεί ότι η κινάση MAP είναι ενεργή μόνο όταν τα κατάλοιπα Tyr και Thr είναι φωσφορυλιωμένα. Αυτή η διαδικασία είναι σημαντική για την ενεργοποίηση της ERK1/2 και την επίτευξη βιολογικών αποτελεσμάτων στο πλαίσιο της επικοινωνίας μεταξύ κυττάρων.

Επιλεγμένα υποστρώματα ERK1/2

Το ενεργοποιημένο ERK1/2 καταλύει τη φωσφορυλίωση των παραγόντων μεταγραφής και ορισμένων από τους ρυθμιστές τους [50,51]. Οι στόχοι του ERK1/2 περιλαμβάνουν την οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων TCF. Αυτές οι πρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόκληση της έκφρασης των άμεσων πρώιμων γονιδίων (IEGs). Τα άμεσα πρώιμα γονιδιακά προϊόντα όπως τα c-Fos και c-Myc επάγουν γονίδια καθυστερημένης απόκρισης που προάγουν την κυτταρική επιβίωση, την κυτταρική διαίρεση και την κινητικότητα των κυττάρων [59, 52, 53]. Ο καταρράκτης ERK1/2 ρυθμίζει επίσης τη μεταγραφική καταστολή και την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης [20].

Το Elk1 είναι ένας από τους πιο διεξοδικά μελετημένους στόχους του καταρράκτη κινάσης ERK1/2 MAP [50]. Το Elk1 είναι μέλος της υπο-οικογένειας Ets (E-26). Η οικογένεια Ets είναι μία από τις μεγαλύτερες κατηγορίες μεταγραφικών παραγόντων [53]. Υπάρχουν 28 γονίδια στον άνθρωπο, 28 σε ποντίκια, 10 στο *Caenorhabditis elegans* και 9 στο *Drosophila*.

Οι Cesari et al. διαπίστωσαν ότι τα ποντίκια με έλλειψη elk1 είναι βιώσιμα, γόνιμα και δεν εμφανίζουν ανωμαλίες [54]. Παραδόξως, τα κύτταρα από αυτά τα ποντίκια εμφανίζουν ένα φυσιολογικό πρότυπο για την έκφραση των άμεσων πρώιμων γονιδίων. Αυτοί οι ερευνητές υποθέτουν ότι το στενά συνδεδεμένο Elk3 (Sap2), Elk4 (Sap1) ή και τα δύο μπορεί να αντισταθμίσουν την ανεπάρκεια Elk1. Το Elk1 περιέχει μια καρβοξυτελική περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης με πολλαπλές θέσεις φωσφορυλίωσης ERK1/2 [53,55]. Αυτά περιλαμβάνουν Ser324, Thr336, Ser383, Ser389 και Ser422. Η φωσφορυλίωση του Elk1 οδηγεί σε αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα, ενώ τα Elk1, Elk3 και Elk4 περιέχουν θέσεις σύνδεσης στις D- και F-έλικες.

Το c-Fos είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που μαζί με το c-Jun αποτελούν μια μορφή των παραγόντων μεταγραφής AP1 (ενεργοποιητική πρωτεΐνη 1) που ρυθμίζουν τις πρώιμες μεταγραφικές διαδικασίες μετά την εξωκυτταρική διέγερση των κυττάρων [56]. Χωρίς φωσφορυλίωση c-Fos, τόσο το mRNA του c-Fos όσο και η πρωτεΐνη υφίστανται ταχεία αποικοδόμηση. Η φωσφορυλίωση c-Fos που καταλύεται από το ERK1/2 στο Ser374 και αυτή που καταλύεται από την MAPKAP κινάση RSK

στην Ser362 σταθεροποιεί το c-Fos για αρκετές ώρες [57,58]. Αυτή η διπλή φωσφορυλίωση συμβαίνει εντός του πυρήνα.

Παράλληλα, οι ERK1/2 και JNK1/2 ποντικού καταλύουν τη φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα ποντικού cJun στο Ser63 και στο Ser73 σε ινοβλάστες άγριου τύπου, γεγονός που οδηγεί σε αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα [60]. Επίσης, το ERK1/2 καταλύει τη φωσφορυλίωση αυτών των δύο υπολειμμάτων σε ινοβλάστες που παρασκευάστηκαν από ποντικούς με έλλειψη JNK. Το c-Fos και το c-Jun περιέχουν μια θέση σύνδεσης F που αλληλεπιδρά με το ERK1/2.

Μονοπάτι ERK1/2

Το μονοπάτι ERK1/2 ξεκινά κυρίως από υποδοχείς μεμβράνης, όπως υποδοχείς κινάσες Tyr, GPCRs και κανάλια ιόντων. Αυτοί οι υποδοχείς μεταδίδουν το σήμα και στρατολογούν πρωτεΐνες κριώματα που προκαλούν την ενεργοποίηση Ras στις μεμβράνες. Έπειτα, το ενεργοποιημένο Ras μεταδίδει το σήμα ενεργοποιώντας τις πρωτεϊνικές κινάσες Raf-1, B-Raf και A-Raf και τις στρατολογεί στις μεμβράνες, όπου φωσφορυλιώνονται. Επομένως, τα Raf μεταδίδουν το σήμα τους με φωσφορυλίωση των MAPKK, MEK1/2. Τα MEK1/2 ενεργοποιούνται μέσω φωσφορυλίωσης Ser στον βρόχο ενεργοποίησής. Με τη σειρά τους, το MEK1/2 ενεργοποιεί την ERK1/2, και αποτελούν τις μοναδικές κινάσες που μπορούν να φωσφορυλιώσουν τόσο τις Thr όσο και τις Tyr του ERK1/2.

Οι ERK1/2 είναι κινάσες «προ-κατευθυνόμενες», που σημαίνει ότι φωσφορυλιώνουν τα υπολείμματα Ser ή Thr, γειτονικά με τα υπολείμματα Pro. Το μοτίβο Pro-Xaa-Ser/Thr-Pro είναι η πιο κοινή συναινετική ακολουθία για την αναγνώριση υποστρώματος από το ERK1/2.

Φωσφορυλιωμένη ERK1/2

Η φωσφορυλιωμένη μορφή των ERK1/2, γνωστή και ως p-ERK1/2, αναφέρεται στην κατάσταση όπου οι πρωτεΐνες ERK1 και ERK2 έχουν υποστεί φωσφορυλίωση σε συγκεκριμένα αμινοξέα. Αυτή η φωσφορυλίωση είναι μια

σημαντική βιοχημική αλλαγή που συμβαίνει στις πρωτεΐνες κινάσεις ERK1 και ERK2 και έχει σημαντικές επιπτώσεις στην κυτταρική σηματοδότηση και λειτουργία. Η φωσφορυλιασμένη κατάσταση των ERK1/2 είναι σημαντική για διάφορες κυτταρικές αντιδράσεις, συμπεριλαμβανομένου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης. Η φωσφορυλίωση ενεργοποιεί τις ERK1/2 και τις καθιστά ικανές να μεταδίδουν σήματα από την κυτταρική επιφάνεια προς τον πυρήνα του κυττάρου.

Η ERK1/2 στον αμφιβληστροειδή

Ο ρόλος της ERK1/2 στον αμφιβληστροειδή (retina) είναι πολύ σημαντικός για τη λειτουργία του αμφιβληστροειδούς, το οποίο είναι το φωτοαντιληπτικό όργανο του ματιού.

1. Φωτοανίχνευση: Η ERK1/2 συμβάλλει στη διαδικασία της φωτοανίχνευσης. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, τα φωτονία ανιχνεύονται από πρωτεΐνες στα φωτοευαίσθητικά κύτταρα. Η ERK1/2 μπορεί να ενεργοποιείται κατά την αντίδραση αυτών των πρωτεϊνών στο φως
2. Ανάπτυξη: Η ERK1/2 συμβάλλει στη διατήρηση και την ανάπτυξη των κυττάρων του αμφιβληστροειδούς
3. Κυτταρική επιβίωση: Η ERK1/2 συμβάλλει στη διασφάλιση της επιβίωσης των κυττάρων του αμφιβληστροειδούς, κρατώντας τα κύτταρα υγιή και λειτουργικά, παρά την έκθεσή τους στο φως και άλλες εξωτερικές διεγέρσεις.

ERK1/2 και Ισχαιμία

Η κινάση Erk1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) είναι σημαντική στον έλεγχο πολλών κυτταρικών διαδικασιών, συμπεριλαμβανομένης της αντίδρασης του οργανισμού στην ισχαιμία, που είναι η κατάσταση όταν ένα μέρος του σώματος δεν λαμβάνει αρκετή ποσότητα οξυγόνου λόγω περιορισμένης αιμάτωσης.

1. Κυτταρική επιβίωση: Η Erk1/2 είναι γνωστή για τον ρόλο της στην προώθηση της κυτταρικής επιβίωσης. Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας, η ανεπάρκεια οξυγόνου και θρεπτικών ουσιών μπορεί να απειλήσει την επιβίωση των

κυττάρων. Η ενεργοποίηση της Erk1/2 μπορεί να προστατεύσει τα κύτταρα από τον κυτταρικό θάνατο και να συμβάλει στη διατήρηση της κυτταρικής ζωής.

2. Φλεγμονή: Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας, μπορεί να προκληθεί φλεγμονώδης αντίδραση. Η Erk1/2 μπορεί να επηρεάσει τη φλεγμονώδη απόκριση μέσω της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης που σχετίζεται με τη φλεγμονή.
3. Κυτταρικός αποκλεισμός: Η Erk1/2 μπορεί να επηρεάσει την κυκλοφορία των κυττάρων και την απόκρισή τους στην ισχαιμία και μπορεί να προωθήσει την τη μετακίνηση των κυττάρων προς τις περιοχές με περισσότερο οξυγόνο.

ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα εργασία έχει σαν στόχο την μελέτη της επίδρασης της ισχαιμίας/επαναιμάτωσης στα κύτταρα Muller & τα αστροκύτταρα του αμφιβληστροειδούς επίμυος.

Στο εργαστήριο, προηγούμενες μελέτες ανοσοαποτύπωσης έδειξαν ότι τα επίπεδα του GFAP (γνωστού ως όξινη πρωτεΐνη των ενδιάμεσων ινιδίων της γλοίας, δείκτης των αστροκυττάρων και των κυττάρων Muller) αυξάνονται 4 ώρες μετά την επαναιμάτωση του αμφιβληστροειδούς (Trisokka και συν., 2022). Η μελέτη αυτή υπονοεί την πιθανή ενεργοποίηση των ανωτέρων γλοιακών κυττάρων από τα πρώιμα στάδια της βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης.

Δίνοντας βάση στα παραπάνω, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η περαιτέρω διερεύνηση:

- της έκφρασης της ενεργής ERK1/2 στον αμφιβληστροειδή σε τρεις διαφορετικές περιοχές του αμφιβληστροειδούς (κέντρο, μέση και περιφέρεια)
- της επίδρασης της *ex vivo* ισχαιμίας και επαναιμάτωσης του αμφιβληστροειδούς στα επίπεδα της ERK1/2
- η αξιολόγηση της έκφρασης της φωσφορυλιωμένης ERK1/2 ως βιοδείκτης για τη μελέτη των πρώιμων σταδίων της βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Στην τρέχουσα διπλωματική εργασία, χρησιμοποιήθηκαν ως αντικείμενο μελέτης ενήλικοι αρσενικοί επίμυες της φυλής Wistar, οι οποίοι είχαν ηλικία από έναν μήνα έως ενάμιση μήνα. Μεγαλώνουν στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και στεγάστηκαν τρία έως τέσσερα ζώα ανά κλουβί με ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό. Διατηρήθηκε ένας κύκλος φωτός-σκότους 12 ωρών. Οι συνθήκες στέγασης και όλες οι διαδικασίες που έγιναν στα ζώα ήταν σύμφωνα με τους Ελληνικούς Εθνικούς Νόμους και τις Ευρωπαϊκές Οδηγίες (Νόμος 2015/1992-ΦΕΚ 30/Α/27.2.1992 [116], Προεδρικό Διάταγμα 56/2013, Directive 2010/63/EU, Αριθμός άδειας: ΑΠ: 49111/09/02/21).

EX VIVO ΠΕΙΡΑΜΑ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ/ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗΣ

Όλα τα αντιδραστήρια προέρχονται από την εταιρεία SIGMA.

Για την παρασκευή όλων των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε ddH₂O.

Την ημέρα που πραγματοποιήθηκε το πείραμα, παρασκευάστηκε το διάλυμα τεχνητού εγκεφαλονωτιαίου υγρού (arti-CSF: artificial cerebrospinal fluid) με σκοπό να προσομοιώσουμε φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες ισχαιμίας (Πίνακας 1) τα οποία κορέστηκαν σε 95%O₂/5%CO₂ και 95%N₂/5%CO₂, αντίστοιχα. Κατά την διάρκεια αυτής της διαδικασίας, το pH διατηρήθηκε στα επίπεδα μεταξύ 7,3 και 7,4. Στον Πίνακα 1 φαίνεται το φυσιολογικό arti-CSF περιέχει γλυκόζη, ενώ το arti-CSF που χρησιμοποιήθηκε για την προσομοίωση της ισχαιμίας περιείχε σουκρόζη αντί για γλυκόζη. Η αλλαγή αυτή έγινε διότι ο νευρικός ιστός δεν είναι δε θέση να μεταβολίσει τη γλυκόζη κατά την διάρκεια της ισχαιμίας.

Τα ζώα υπέστησαν θυσία μέσω αποκεφαλισμού και οι οφθαλμοί τους αφερέθηκαν και τοποθετήθηκαν σε φυσιολογικό arti-CSF στον άγο όπου πραγματοποιήθηκε η αποκόλληση του αμφιβληστροειδούς.

Στην συνέχεια, διενεργήθηκε το πείραμα ex vivo βλάβης ισχαιμίας/ επαναιμάτωσης, το οποίο πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο, διατηρώντας σταθερή την θερμοκρασία στους $35,7^{\circ}\text{C} \pm 0,2$.

Σε κάθε φιαλίδιο υπερδιάχυσης, υπάρχουν δύο σωληνάκια, ένα για την ειροή και ένα για την εκροή του υγρού arti-CSF. Το υγρό ρέει με ταχύτητα 1,2 ml/min με συνολικό όγκο μέχρι 500μl.

Πίνακας 1: Σύσταση Φυσιολογικού τεχνητού εγκεφαλονωτιαίου υγρού και του αντίστοιχου της ισχαιμίας

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

Η έναρξη του πειράματος αντιστοιχεί σε 1 ώρα αρχικής περιόδους εξισορρόπησης (Presuperfusion), κατά την οποία γίνεται η προεπώαση με φυσιολογικό τεχνητό

εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Μετά την πάροδο της μίας ώρας, ξεκινά το πείραμα *ex vivo* βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, σύμφωνα με τους χρόνους που έχουν οριστεί.

Συνολικά, η διάρκεια του πειράματος ανέρχεται στις 5 ώρες και 32 λεπτά, μετά το πέρας της αρχικής περιόδου εξισορρόπησης. Για να προκληθεί ισχαιμία, πραγματοποιούνται διαδοχικές διαχύσεις, πιο συγκεκριμένα, με χρήση φυσιολογικού *arti-CSF* για 266 λεπτά, ενώ στην συνέχεια χρησιμοποιείται *art-CSF* ισχαιμίας για 66 λεπτά. Όσον αφορά την βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, η αρχική περίοδος εξισορρόπησης ακολουθείται από την διάχυση των ιστών με χρήση φυσιολογικού *arti-CSF* για 26 λεπτά, έπειτα από αυτό, γίνεται η διάχυση με *art-CSF* ισχαιμίας για 66 λεπτά και, τέλος, πραγματοποιείται η διάχυσή τους με χρήση φυσιολογικού *arti-CSF* για 240 λεπτά. Τα φιαλίδια που περιέχουν τα δείγματα ιστών ελέγχου παραμένουν υπο διάχυση με χρήση φυσιολογικού *arti-CSF* καθ'όλη την διάρκεια του πειράματος. Το πείραμα διακόπτεται με τα δείγματα να τοποθετούνται στον πάγο.

Στην συνέχεια, πάνω σε διηθητικό χαρτί απλώνονται οι ιστοί και μονιμοποιούνται με ένα διάλυμα που περιέχει 4% παραφορμαλδεΰδη [4% PFA σε 0,1M PB (NaH_2PO_4 , : 0.2M K_2HPO_4 , 1:5), pH 7,4], για ένα χρονικό διάστημα 30 λεπτών. Έπειτα, πραγματοποιούνται δύο ακόμη πλύσεις διάρκειας 15 λεπτών, χρησιμοποιώντας 0,1 PB υπό συνεχή ανάδευση. Στην συνέχεια, προστίθεται αντιψυκτικό διάλυμα και οι ιστοί αποθηκεύονται στους -20°C μέχρι την εκτέλεση του πειράματος ανοσοϊστοχημείας.

ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

1.1. Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας (immunohistochemistry) χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό και τον χαρακτηρισμό συγκεκριμένων πρωτεϊνών ή αντιγόνων σε ιστούς ή κύτταρα. Η αρχή της μεθόδου περιλαμβάνει την χρήση αντισωμάτων που συγκρούονται με τα επιθυμητά αντιγόνα και έπειτα την ανίχνευση αυτής της αντισωματικής αντίδρασης. Μια κατηγορία της ανοσοϊστοχημείας είναι η "ανοσοχημία ενέργειας" (immunoassay). Η ανοσοχημία ενέργειας είναι μια ευρεία κατηγορία

τεχνικών που χρησιμοποιούν αντισώματα ή αντιγόνα για να μετρήσουν την παρουσία ή την ποσότητα συγκεκριμένων ουσιών σε ένα δείγμα.

Ένα παράδειγμα ανοσοχημίας ενέργειας είναι η ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

1.2.Πειραματική διαδικασία

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Αρχικά, οι ιστοί υποβλήθηκαν σε 3 πλύσεις διάρκειας 10 λεπτών η κάθε μία με 0,1M PBS (137mM, 2,7 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄, pH 7,2-7,4). Στην συνέχεια, επώαστηκαν σε 0,1M PBS το οποίο περιέχει 3,3% (v/v) φυσιολογικό ορό γαϊδουριού (Normal Donkey Serum, NDS), 0,5% (v/v) Triton x-100, 0,025% NaN₃ και το αντίσωμα mouse anti-GFAP σε συγκέντρωση 1:500. Το αντίσωμα που επιλέχθηκε προερχόταν από την εταιρεία Sigma (MAB360).

Οι ιστοί, μετά από εκθέση στη θερμοκρασία των -20°C και αφού αφαιρεθεί το αντιψυκτικό διάλυμα, υποβάλλονται σε τρία διαδοχικά πλυσίματα με 0,1M PBS, κάθε ένα διάρκειας 15 λεπτών. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται επώαση των ιστών με το διάλυμα πρώτου αντισώματος για 72 ώρες, διατηρώντας τη θερμοκρασία στους 4°C και ανακινώντας συνεχώς.

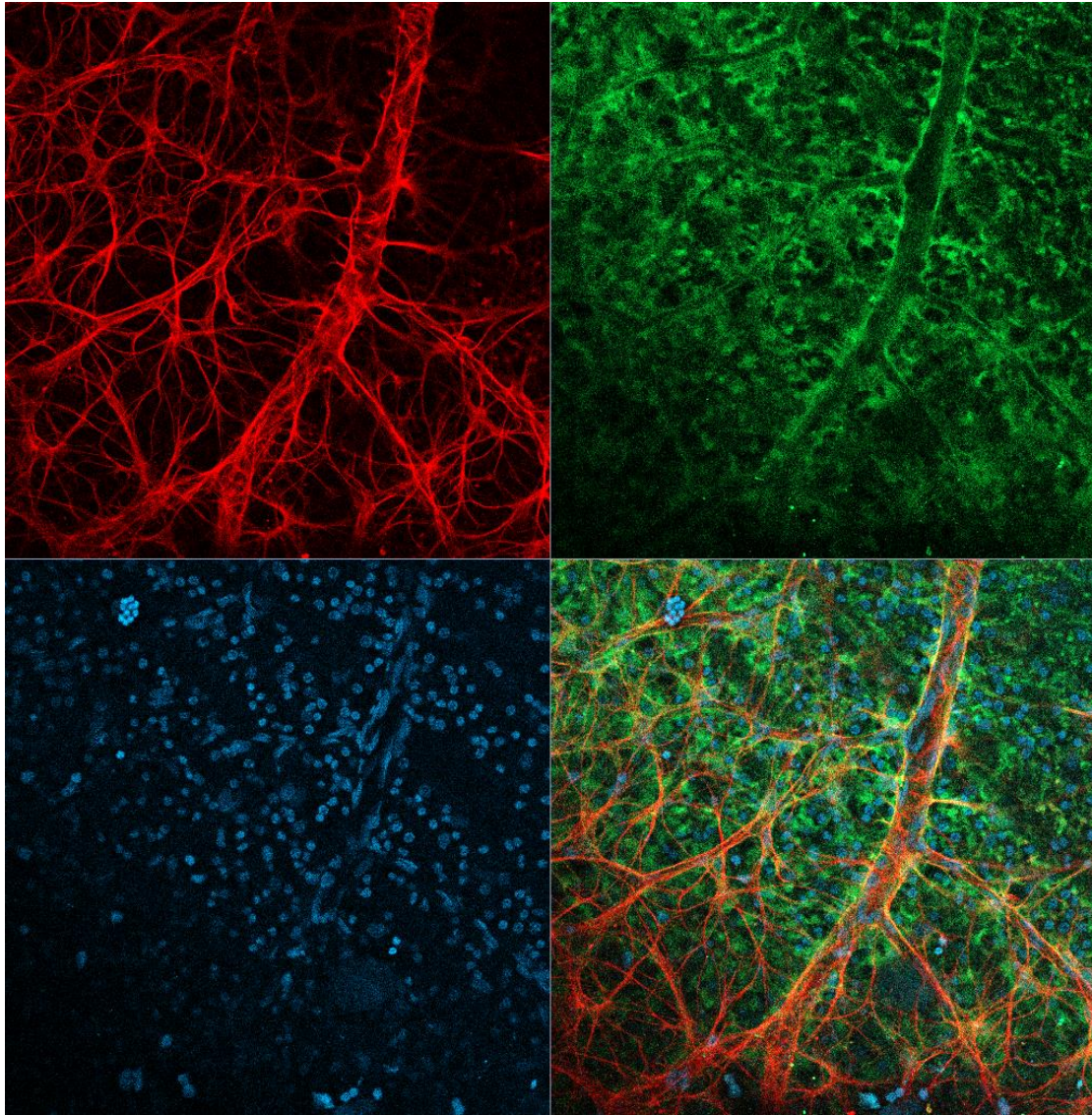
Μετά το πέρας της επώασης, αφαιρείται το διάλυμα του πρώτου αντισώματος από τους ιστούς και ακολουθούν 3 πλύσεις διάρκειας των 45 λεπτών η κάθε μία με 0,1M PBS στους 4°C, υπό συνεχή ανακίνηση. Το διάλυμα του δεύτερου αντισώματος παρασκευάζεται σε 0,1M PBS, περιλαμβάνοντας το δεύτερο αντίσωμα Donkey anti-Mouse σε συγκέντρωση 1:500. Όλες οι ενέργειες που ακολουθούν μετά την προσθήκη του δεύτερου αντισώματος πρέπει να εκτελούνται σε σκοτεινό περιβάλλον, καθώς το δεύτερο αντίσωμα είναι φωτοευαίσθητο. Τέλος, ακολουθεί επώαση των ιστών με αυτό το διάλυμα για 16-18 ώρες στους 4°C, υπό συνεχή ανάδευση.

Στη συνέχεια, με το τέλος της επώασης, αφαιρείται το διάλυμα του δεύτερου αντισώματος και πραγματοποιούνται τρεις πλύσεις διάρκειας 45 λεπτών η κάθε μία, χρησιμοποιώντας 0,1M PBS στους 4°C και διατηρώντας υπό συνεχή ανακίνηση. Έπειτα, οι ιστοί επωάζονται με 40μM DAPI (4',6-διαμιδινό2-φαινυλινδόλη) σε 0,1M PBS για 30 λεπτά, διατηρώντας τη θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, πραγματοποιούνται δύο πλύσεις διάρκειας 10 λεπτών η κάθε μία, χρησιμοποιώντας 0,1M PBS.

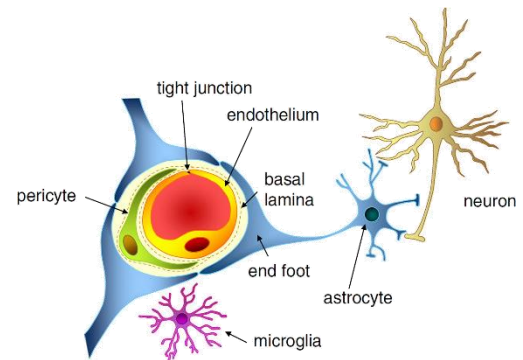
Στο τέλος, καθένας από τους ιστούς τοποθετείται επάνω σε μια αντικειμενοφόρα πλάκα, χρησιμοποιώντας ένα ειδικό πινέλο, με στόχο να τοποθετηθούν τα γαγγλιακά κύτταρα προς τα πάνω, δηλαδή να έρχονται σε επαφή με την καλυπτρίδα και όχι με το πλακάκι. Αυτό θα γίνει ευκολότερα με την προσθήκη ενός λίγου ρυθμιστικού διαλύματος, που θα βοηθήσει στη σωστή τοποθέτηση του αμφιβληστροειδούς. Τέλος, πρέπει να αφαιρεθεί όσο περισσότερο υγρό γίνεται, χρησιμοποιώντας μια πιπέτα, και να προστεθεί λίγο DAPI στον ιστό. Στη συνέχεια, κλείνουμε το πλακάκι με την καλυπτρίδα, προσέχοντας να μην προκαλέσουμε φυσαλίδες. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες διατηρούνται στους 4°C μέχρι τη στιγμή της παρατήρησής τους στο μικροσκόπιο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

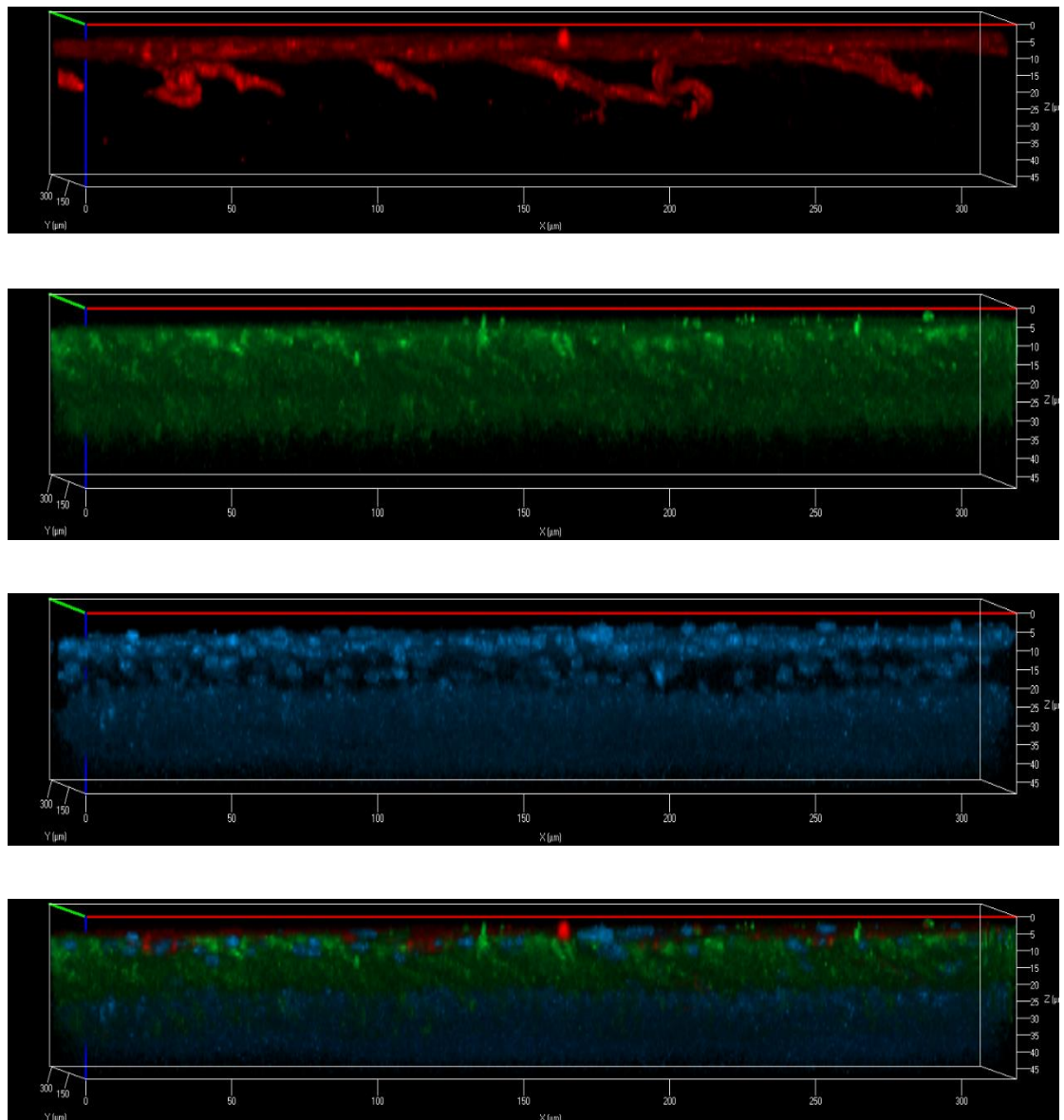
Φυσιολογικές συνθήκες



Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, υπό φυσιολογικές συνθήκες, παρατηρούμε ότι η φωσφορυλιωμένη μορφή της Erk1/2 φαίνεται να εντοπίζεται στην νευραγγειακή μονάδα και η παρουσία αυτή μπορεί να σχετίζεται με τα αστροκύτταρα.

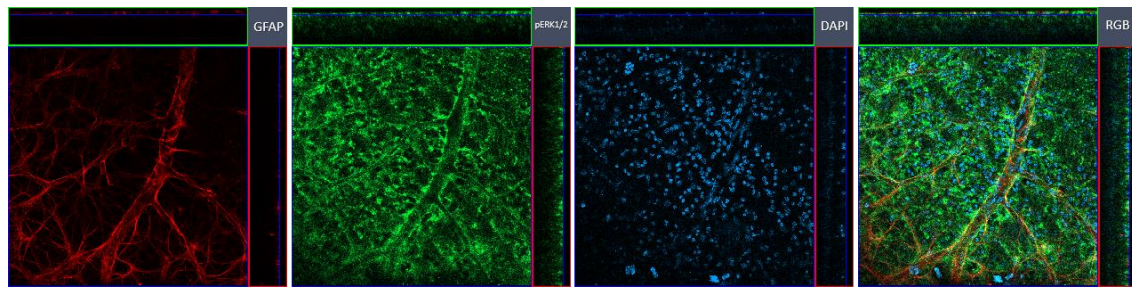


Εικόνα 9 : Νευραγγειακή μονάδα



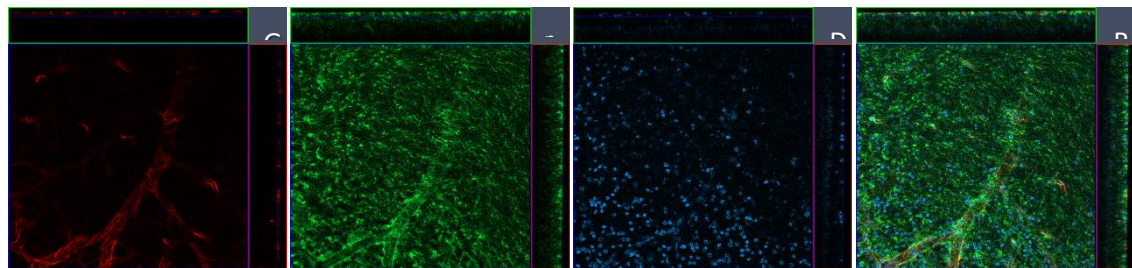
Εικόνα 10: κάθετες τομές του αμφιβληστροειδή

Στις κάθετες τομές, παρατηρήθηκε ότι δεν φαίνεται να υπάρχει συνεντοπισμός της GFAP με την ERK1/2 στην στιβάδα των νευρικών ινών όπου βρίσκονται τα αστροκύτταρα. Ωστόσο, για να επιβεβαιωθεί αυτή την παρατήρηση περαιτέρω μελετήθηκαν και διαδοχικές τομές πάχους 0.5μm.



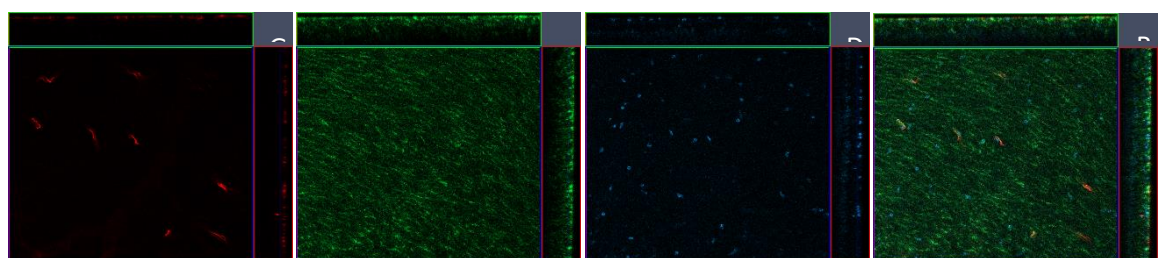
Εικόνα 9 στιβάδα των νευρικών ινών (NFL) του αμφιβληστροειδούς

Εστιάζοντας στην στιβάδα των νευρικών ινών (NFL) παρατηρούμε ότι πράγματι υπάρχει παρουσία της ERK1/2 σε σημεία που υπάρχει ανοσοδραστικότητα και της GFAP



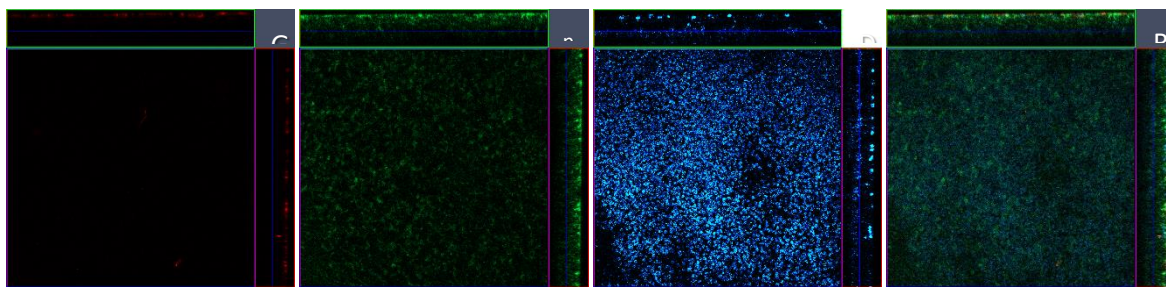
Εικόνα 10 στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων (GCL) του αμφιβληστροειδούς

Εντούτοις, παρατηρήθηκε ένα έντονο δίκτυο από Puncta τα οποία φτάνουν ως την στιβάδα των νευρικών ινών αλλά υπάρχουν και στην στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων (GCL) και τα οποία δεν εμφανίζουν διπλή ανοσοδραστικότητα με το GFAP.



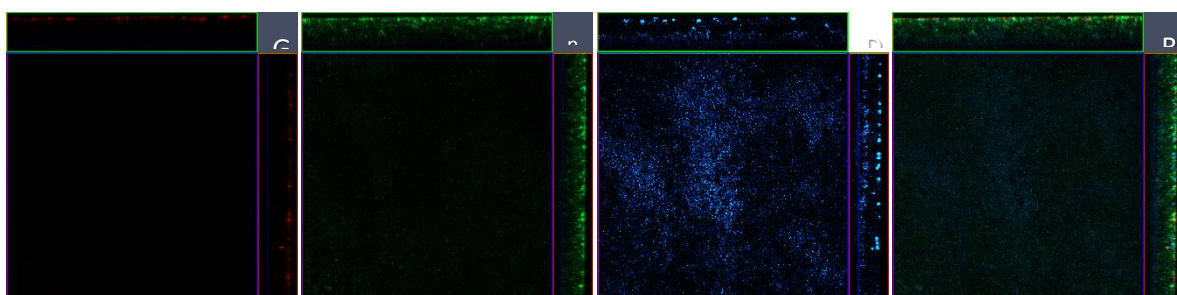
Εικόνα 11 εσωτερική δικτυωτή στιβάδα (IPL) του αμφιβληστροειδούς

Αντίστοιχα, εντοπίστηκε στην εσωτερική δικτυωτή στιβάδα (IPL) ένα έντονο δίκτυο αποφύσεων που πιθανά να αντιστοιχεί σε αυτό των αποφύσεων των βραχύνων κυττάρων, ωστόσο, δεν φαίνεται να υπάρχει κάποιος συνεντοπισμός των GFAP με τα κυττάρων Muller.



Εικόνα 12 εσωτερική πυρηνική στιβάδα (INL) του αμφιβληστροειδούς

Στην εσωτερική πυρηνική στιβάδα (INL), φαίνεται να υπάρχει λιγότερη έντονη χρώση.



Εικόνα 13 στιβάδα των φωτουποδοχέων (ONL) και στην εξωτερική δικτυωτή στιβάδα (OPL)

Τέλος, στην στιβάδα των φωτουποδοχέων και στην εξωτερική δικτυωτή στιβάδα δεν φαίνεται να εκφράζεται η pERK.

Συνοψίζοντας, οι παραπάνω εικόνες είναι από την περιφέρεια του αμφιβληστροειδούς και δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ κέντρου, μέσης και περιφέρειας του ιστού ως προς την έκφραση της ERK1/2.

Συνθήκες ισχαιμίας - Συνθήκες ισχαιμίας/επαναιμάτωσης

Δυστυχώς λόγω τεχνικού προβλήματος του συνεστιακού μικροσκοπίου δεν έγινε η λήψη των φωτογραφιών των ιστών στις συνθήκες ισχαιμίας/ επαναιμάτωσης. Βέβαια, μελέτες western blot που έχουν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο έδειξαν ότι κατά την διάρκεια ισχαιμίας τα επίπεδα της ERK1/2 μηδενίζονται.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μελέτη της έκφρασης της πρωτεϊνικής κινάσης ERK1/2 (Extracellular Signal-Regulated Kinase) στον αμφιβληστροειδή αποτελεί ένα σημαντικό πεδίο έρευνας, στο πλαίσιο της εξέτασης της βιολογίας και της ανοσολογίας του ιστού. Παρόλο που υπάρχουν πολλές μελέτες ανοσοαποτύπωσης κατά Western που έχουν επιβεβαιώσει την παρουσία της ERK1/2 στον αμφιβληστροειδή, εξακολουθούν να μην υπάρχουν ανοσοιστοχημικές μελέτες που επικεντρώνονται στην ακριβή έκφραση τόσο της φωσφορυλιωμένης όσο και της μη φωσφορυλιωμένης ERK στα διάφορα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς. Κάτι τέτοιο θα ήταν εξαιρετικά σημαντικό για την κατανόηση του ρόλου της ERK σε αυτόν στον ιστό. Ωστόσο, ο κυτταρικός εντοπισμός της ERK στον αμφιβληστροειδή αποτελεί πρόκληση μια και η χρήση τομών και οπτικού μικροσκοπίου δίνει μια διάχυτη εικόνα εντοπισμού του μορίου στον ιστό. Η συνεστιακή μικροσκοπία και η χρήση flat-mount ιστού παρέχουν μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση για την ακριβέστερη διάκριση μεταξύ διαφορετικών κυττάρων του ιστού που εκφράζουν την pERK1/2.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, η ανοσοδραστικότητα της ενεργοποιημένη μορφής της ERK1/2 εντοπίζεται υπό φυσιολογικές συνθήκες στον έσω αμφιβληστροειδή (NFL-INL) επίμυος. Διαπιστώσαμε ότι, υπό φυσιολογικές συνθήκες η pERK1/2 εντοπίζεται στα αγγεία του αμφιβληστροειδή επίμυος. Η παρουσία της pERK1/2 στα αγγεία ίσως σχετίζεται με την παρουσία της στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Σύμφωνα με τον Zhang και τους συνεργάτες του (2021) το NPY προάγει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω της οδού PI3K / AKT, της οδού RAS / RAF / MEK / ERK1 / 2 και της PKC μετά τη σύνδεση με τον υποδοχέα της, παρέχοντας ενέργεια για τα αιμοφόρα αγγεία και ρυθμίζοντας το μικροπεριβάλλον τους [61].

Η αυξημένη ανοσοδραστικότητα της pERK1/2 σε αποφύσεις της IPL που επίσης διαπιστώσαμε πιθανά συνδέεται με το γεγονός ότι η κυτταρική επιβίωση των βραχύνων κυττάρων απαιτεί την ενεργοποίηση της ERK1/2 μέσω MEK1/2 και AKT σηματοδότησης [62]. Οι συγκεκριμένοι ερευνητές διαπίστωσαν ότι, σε αντίθεση με τα γαγγλιακά, η επιβίωση των βραχύνων κυττάρων *in vitro* είναι ανεξάρτητη από την

πυκνότητα των κυττάρων και την παρουσία εξωγενών τροφικών παραγόντων, αλλά απαιτεί την ενεργοποίηση της Erk μέσω σηματοδότησης MEK1/2 και AKT.

Επιπλέον, η παρουσία της pERK1/2 σε puncta στις GCL και INL ίσως σχετίζεται με τον ρόλο της ERK1/2 στην εξωκύττωση νευροδιαβιβαστών σε πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων φλοιού μυός [63]. Σύμφωνα με αυτούς τους ερευνητές, αναστολή της Erk1/2 αυξάνει την εισροή ιόντων ασβεστίου μέσω διαύλων ασβεστίου τύπου L γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την εξωκυττάρωση συναπτικών κυστιδίων.

Τέλος, ένα στοιχείο που ενισχύει τη άποψη ότι η ERK1/2 παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία του αμφιβληστροειδούς είναι το γεγονός ότι, η έκφραση της pERK1/2 δεν διαφοροποιείται στις διάφορες περιοχές του ιστού (κέντρο, μεσαία περιοχή και περιφέρεια ως προς το οπτικό νεύρο). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την καθολική σημασία της pERK1/2 στην εύρυθμη λειτουργία του ιστού ανεξάρτητα από το εύρος της αιμάτωσης του ιστού. Εντούτοις, περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες προκειμένου να διευκρινιστεί το είδος των κυττάρων του αμφιβληστροειδή που εκφράζουν την ενεργοποιημένη μορφή της ERK1/2 υπό φυσιολογικές συνθήκες. Για το λόγο αυτό χρώσεις διπλού ανοσοφθορισμού με δείκτες κατάλληλους για την αναγνώριση των διαφόρων κυτταρικών τύπων του αμφιβληστροειδή (πέρα των αστροκυττάρων και των κυττάρων Muller που εμείς μελετήσαμε) θα ήταν απαραίτητες για τη διερεύνηση τόσο των τύπων των κυττάρων όσο και των κυτταρικών διαμερισμάτων στα οποία η pERK εντοπίζεται. Επιπλέον, η χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου θα ήταν καταλυτικής σημασίας για την πραγματοποίηση αυτών των μελετών μια λόγω του διάχυτου εντοπισμού του μορίου δεν είναι δυνατή η μελέτη αυτή με οπτικό μικροσκόπιο.

Σε ότι αφορά τη διαφορική έκφραση της pERK1/2 κατά την ισχαιμία/επαναιμάτωση του αμφιβληστροειδή, αν και τα πειράματα που πραγματοποιήσαμε (*ex vivo* βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης και διπλός ανοσοφθορισμός pERK1/2-GFAP) αφορούσαν και τη διερεύνηση της διαφορικής έκφρασης του μορίου σε αυτές τις συνθήκες σε σύγκριση με τους ιστούς ελέγχου δυστυχώς, λόγω προβλημάτων του συνεστιακού μικροσκοπίου δεν ήταν δυνατή η λήψη φωτογραφιών, ενώ με βάση τα αποτελέσματά μας η χρήση οπτικού μικροσκοπίου δεν βοηθά στη διερεύνηση της διαφορικής έκφρασης της pERK1/2 κατά

την ισχαιμία και την επαναιμάτωση του αμφιβληστροειδή γιατί δυστυχώς η οπτική μικροσκοπία υστερεί διακριτικής ικανότητας απολύτως απαραίτητης για τη μελέτη της έκφρασης της pERK1/2 στον ιστό.

Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες προκειμένου να διευκρινιστεί το είδος των κυττάρων του αμφιβληστροειδή που εκφράζουν την ενεργοποιημένη μορφή της ERK1/2 καθώς επίσης και η πιθανή διαφορική της έκφραση κατά την ισχαιμία και την επαναιμάτωση του ιστού.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] https://www.cis.rit.edu/people/faculty/montag/vandplite/pages/chap_9/ch9p1.html
- [2] Bertalmío M., 2020. The biological basis of vision: The Retina, Vision Models for High Dynamic Range and Wide Colour Gamut Imaging, p. 11–46.
- [3] Osborne, N.N., Ugarte, M., Chao, M., Chidlow, G., Bae, J.H., Wood, J.P.M., Nash, M.S., 1999c. Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. *Surv. Ophthalmol.* 43 (Suppl. 1), 102–128.
- [4] <https://chemwatch.net/el/resource-center/horizontal-cells-of-retina/>
- [5] Turner D. and Cepko C., 1987. A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development, *Nature*, 328, p.131–136.
- [6] Chan-Ling T., 1994. Glial, neuronal and vascular interactions in the mammalian retina, *Prog. Ret. Eye Res.*, 13, p.357–389.
- [7] Harada K., Kamiya T. and Tsuboi T., 2016. Gliotransmitter Release from Astrocytes: Functional, Developmental, and Pathological Implications in the Brain. *Front. Neurosci.* 9, p.499.
- [8] Siracusa R, Fusco R, Cuzzocrea S., 2019. Astrocytes: Role and Functions in Brain Pathologies. *Front Pharmacol.*, 10.
- [9] Turner D. and Cepko C., 1987. A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development, *Nature*, 328, p.131–136.
- [10] del Zoppo G. J. (2008). Virchow's triad: the vascular basis of cerebral injury. *Reviews in neurological diseases*, 5 Suppl 1(Suppl 1), S12–S21.
- [11] Jennings, R.B., Sommers, H.M., Smyth, G.A., Flack, H.A., Linn, H., 1960. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch. Pathol.* 70, 68–78.
- [12] Sims, S.R., 1992. Energy metabolism and selective neuronal vulnerability following global cerebral ischemia. *Neurochem. Res.* 17, 923–931.
- [13] Dreyer, E.B., Pan, Z.H., Storm, S., Lipton, S.A., 1994. Greater sensitivity of larger retinal ganglion cells to NMDA-mediated cell death. *Neuroreport* 5, 629–631.

- [14] Petty, M.A., Wettstein, J.G., 1999. White matter ischaemia. *Brain Res. Rev.* 31, 58–64.
- [15] Mathew, B., Ravindran, S., Liu, X., Torres, L., Chennakesavalu, M., Huang, C. C., Feng, L., Zelka, R., Lopez, J., Sharma, M., & Roth, S. (2019). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles and retinal ischemia-reperfusion. *Biomaterials*, 197, 146–160. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.01.016>
- [16] Hunter T. Signaling—2000 and beyond. *Cell* 2000;100:113–27
- [17] Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 2002;298:1912–34
- [18] Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, et al. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 2004;117:699–711.
- [19] Bononi A, Agnoletto C, De Marchi E, Marchi S, Patergnani S, Bonora M, et al. Protein kinases and phosphatases in the control of cell fate. *Enzyme Research*, <http://dx.doi.org/10.4061/2011/329098>.
- [20] Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, Seger R. The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et Biophysica Acta* 2011;1813:1619–33.
- [21] Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 2007;26:3100–12.
- [22] Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway. *Current Opinion in Cell Biology* 2007;19:142–9.
- [23] Lloyd AC. Distinct functions for ERKs? *Journal of Biology* 2006;5:13.
- [24] Hanks SK. Eukaryotic protein kinases. *Current Opinion in Structural Biology* 1991;1:369–83.
- [25] Lefloch R, Pouyssegur J, Lenormand P. Total ERK1/2 activity regulates cell proliferation. *Cell Cycle* 2009;8:705–11.
- [26] Wortzel I, Seger R. The ERK cascade: distinct functions within various subcellular organelles. *Genes Cancer* 2011;2:195–209.

- [27] Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949–54
- [28] Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* 2004;6:313–9.
- [29] Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nature Reviews Cancer* 2011;11:761–74.
- [30] Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Kempf RC, Long J, Laidler P, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging* 2011;3:192–222
- [31] Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010;141:1117–34.
- [32] Margolis B, Borg JP, Straight S, Meyer D. The function of PTB domain proteins. *Kidney International* 1999;56:1230–7.
- [33] Vigil D, Cherfils J, Rossman KL, Der CJ. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nature Reviews Cancer* 2010;10:842–57.
- [34] Roskoski Jr R. RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2010;399:313–7.
- [35] Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 2006;24:21–44.
- [36] Shaul YD, Gibor G, Plotnikov A, Seger R. Specific phosphorylation and activation of ERK1c by MEK1b: a unique route in the ERK cascade. *Genes and Development* 2009;23:1779–90.
- [37] Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010;1802:396–405
- [38] Tidyman WE, Rauen KA. The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. *Current Opinion in Genetics and Development* 2009;19:230–6

- [39] Tanti JF, Jager J. Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stressregulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Current Opinion in Pharmacology* 2009;9:753–62.
- [40] Montagut C, Settleman J. Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy. *Cancer Letters* 2009;283:125–34.
- [41] Chico LK, Van Eldik LJ, Watterson DM. Targeting protein kinases in central nervous system disorders. *Nature Reviews Drug Discovery* 2009;8:892–909.
- [42] Muslin AJ. MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Clinical Science (London, England: 1979)* 2008;115:203–18.
- [43] Taylor SS, Kornev AP. Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 2011;36:65–77.
- [44] Hanks SK, Quinn AM, Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 1988;241:42–52.
- [45] Kornev AP, Haste NM, Taylor SS, Eyck LF. Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103:17783–8.
- [46] Zhang J, Yang PL, Gray NS. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature Reviews Cancer* 2009;9:28–39.
- [47] Johnson DA, Akamine P, Radzio-Andzelm E, Madhusudan, Taylor SS. Dynamics of cAMP-dependent protein kinase. *Chemical Reviews* 2001;101:2243–70.
- [48] Seeliger MA, Ranjitkar P, Kasap C, Shan Y, Shaw DE, Shah NP, et al. Equally potent inhibition of c-Src and Abl by compounds that recognize inactive kinase conformations. *Cancer Research* 2009;69:2384–92.
- [49] Canagarajah BJ, Khokhlatchev A, Cobb MH, Goldsmith E. Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* 1997;90:859–69.
- [50] Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 2006;24:21–44.

- [51] Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: crosstalk and compensation. *Trends in Biochemical Sciences* 2011;36:320–8.
- [52] Murphy LO, Blenis J. MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends in Biochemical Sciences* 2006;31:268–75.
- [53] Hollenhorst PC, McIntosh LP, Graves BJ. Genomic and biochemical insights into the specificity of ETS transcription factors. *Annual Review of Biochemistry* 2011;80:437–71
- [54] Cesari F, Brecht S, Vintersten K, Vuong LG, Hofmann M, Klingel K, et al. Mice deficient for the ets transcription factor elk-1 show normal immune responses and mildly impaired neuronal gene activation. *Molecular and Cellular Biology* 2004;24:294–305.
- [55] Buchwalter G, Gross C, Wasylyk B. Ets ternary complex transcription factors. *Gene* 2004;324:1–14.
- [56] Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer* 2003;3:859–68.
- [57] Okazaki K, Sagata N. The Mos/MAP kinase pathway stabilizes c-Fos by phosphorylation and augments its transforming activity in NIH 3T3 cells. *EMBO Journal* 1995;14:5048–59.
- [58] Murphy LO, Smith S, Chen RH, Fingar DC, Blenis J. Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nature Cell Biology* 2002;4:556–64.
- [59] Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 2007;26:3279–90.
- [60] Morton S, Davis RJ, McLaren A, Cohen P. A reinvestigation of the multisite phosphorylation of the transcription factor c-Jun. *EMBO Journal* 2003;22:3876–86.
- [61] Zhang Y, Liu CY, Chen WC, et al. Regulation of neuropeptide Y in body microenvironments and its potential application in therapies: a review. *Cell Biosci.* 2021;11(1):151. Published 2021 Aug 3. doi:10.1186/s13578-021-00657-7
- [62] Kunzevitzky NJ, Almeida MV, Goldberg JL. Amacrine cell gene expression and survival signaling: differences from neighboring retinal ganglion cells. *Invest*

Ophthalmol Vis Sci. 2010 Jul;51(7):3800-12. doi: 10.1167/iovs.09-4540. Epub 2010 May 5. PMID: 20445109; PMCID: PMC2904021

[63] Subramanian J, Morozov A. ERK1/2 inhibit synaptic vesicle exocytosis through L-type calcium channels. J Neurosci. 2011;31(12):4755-4764. doi:10.1523/JNEUROSCI.6594-10.2011