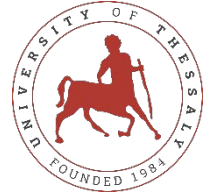
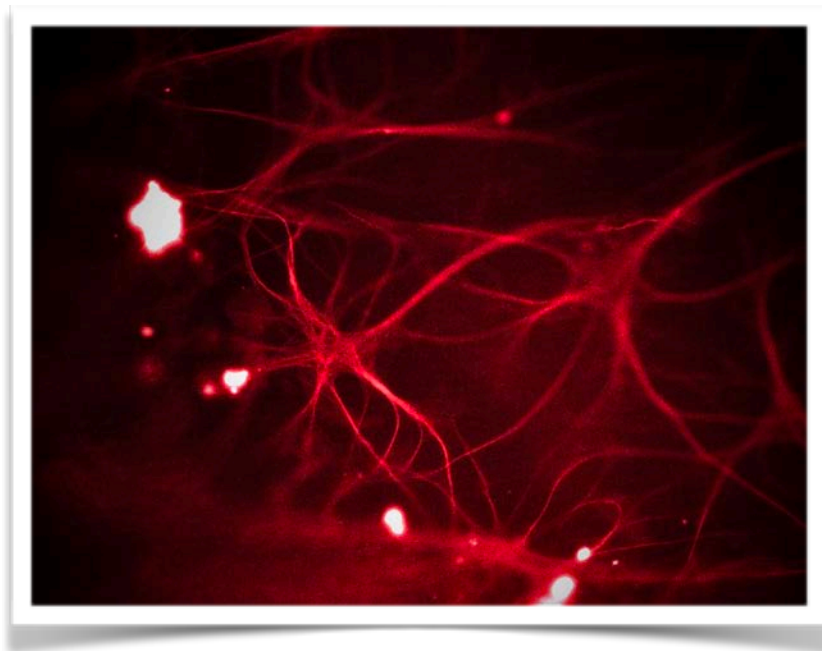




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



**Σύγκριση *ex vivo* και *in vivo* μοντέλων
αμφιβληστροειδικής βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Γκίνης Δημήτριος του Παντελεήμωνος

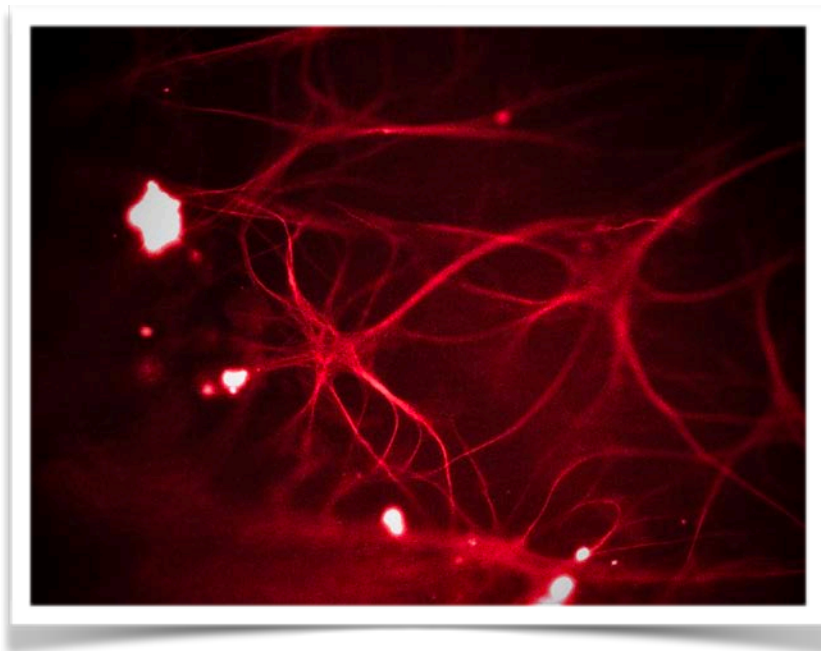
Λάρισα, 2024



UNIVERSITY OF THESSALY
DEPARTMENT OF
BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY



Comparison of *ex vivo* and *in vivo* retinal ischemia/reperfusion injury models



BACHELOR'S THESIS

Dimitrios Gkinis

Larissa, 2024

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Άννα Βασιλάκη, Επίκουρος Καθηγήτρια Φαρμακολογίας (Επιβλέπουσα)

Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ζίφα Αιμιλία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας - Νευρολογίας (Συνεπιβλέπουσα)

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Χατζηευθυμίου Αποστολία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας (Μέλος)

Εργαστήριο Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2023 - 2024. Ευχαριστώ πραγματικά μέσα από την καρδιά μου όλους όσους συνέβαλαν με τον δικό του μοναδικό τρόπο ο καθένας στην επιτυχή ολοκλήρωση της.

Βέβαια, ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην Επίκουρο Καθηγήτρια Φαρμακολογίας κυρία Βασιλάκη Άννα, την επιβλέπουσα μου, για την πολύτιμη καθοδήγησή της, την εμπιστοσύνη της, αλλά και την συνεχή στήριξή της καθ' όλη την διάρκεια διεξαγωγής της διπλωματικής μου εργασίας. Παρ' όλες τις δυσκολίες που μου επιφύλασσε αυτό το ταξίδι, η κυρία Βασιλάκη ήταν πάντοτε στο πλευρό μου να με καθοδηγεί, να με υποστηρίζει, να προσφέρει την ανεκτίμητη βοήθεια της, καθώς και τις άρτιες επιστημονικές της γνώσεις.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, την συνεπιβλέπουσά μου, κυρία Ζίφα Αιμιλία, Επίκουρο Καθηγήτρια Βιολογίας - Νευρολογίας, καθώς και την κυρία Χατζηευθυμίου Αποστολία, Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας. Ευχαριστώ ακόμη τον κύριο Μπέγα Ηλία, ΕΤΕΠ στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας, που ήταν κάθε στιγμή στο πλευρό μου για ό,τι χρειαζόμουν.

Φυσικά θα αποτελούσε παράβλεψη εκ μέρους μου, να μην ευχαριστήσω τον συμφοιτητή μου, πλέον απόφοιτο του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Γρήγορη Αγραφιώτη. Τον ευχαριστώ ολόψυχα για την πολύτιμη βοήθεια και τον χρόνο που μου προσέφερε, ώστε να ολοκληρωθεί η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία. Επίσης ευχαριστώ και τα υπόλοιπα παιδιά, που πραγματοποίησαν την πτυχιακή τους εργασία υπό την επίβλεψη της κυρίας Βασιλάκη, την Νικολακοπούλου Δήμητρα, που με συνέστησε στο συγκεκριμένο εργαστήριο, αλλά και την Σταμέλου Παναγιώτα.

Περιεχόμενα

Περίληψη	1
Abstract.....	2
Εισαγωγή	3
1. Αμφιβληστροειδής	3
1.1 Νευρικά κύτταρα.....	5
Φωτοϋποδοχείς.....	5
Γαγγλιακά κύτταρα	6
Βραχύινα κύτταρα	6
Δίπολα κύτταρα.....	7
Οριζόντια κύτταρα	7
1.2 Κύτταρα της γλοίας	8
Αστροκύτταρα	8
Κύτταρα Müller	11
Μικρογλοιακά κύτταρα	12
2. Ισχαιμία.....	13
2.1 Αντίσταση του αμφιβληστροειδούς στην ισχαιμία	15
2.2 Επαναιμάτωση.....	15
2.3 Βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης	16
2.4 Αύξηση ενδοφθάλμιας πίεσης	19
Σκοπός.....	21
Μεθοδολογία.....	22
1 Πειραματόζωα	22
2 In vivo μοντέλο ισχαιμίας/επαναιμάτωσης.....	22
3 Ανοσοϊστοχημεία	22
4 Ex vivo μοντέλο ισχαιμίας/επαναιμάτωσης.....	23

5	Ανάλυση εικόνας	23
6	Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.....	24
	Αποτελέσματα.....	25
1.	Σύγκριση της επίδρασης της <i>ex vivo</i> και <i>in vivo</i> βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης στη μορφολογία των αστροκυττάρων	25
1.1	Αριθμός αποφύσεων.....	26
1.2	Αριθμός διακλαδώσεων.....	27
1.3	Συσχέτιση αριθμού αποφύσεων & διακλαδώσεων	28
	Συζήτηση	29
	Βιβλιογραφία	32

Περίληψη

Ο αμφιβληστροειδής αποτελεί το τμήμα εκείνου του κεντρικού συστήματος που διεγείρεται άμεσα από το φως. Τα αστροκύτταρα είναι κύτταρα της γλοίας και όσον αφορά τον αμφιβληστροειδή τα κύτταρα αυτά περικλείουν τις δεσμίδες των αξόνων των γαγγλιακών κυττάρων, αλλά και τα αιμοφόρα αγγεία που διαπερνούν την στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων του ιστού. Η ισχαιμία προκύπτει εξαιτίας της διαταραχής της παροχής αίματος σε έναν ιστό ή όργανο, με αποτέλεσμα να διακόπτεται η παροχή οξυγόνου και γλυκόζης, πυροδοτώντας έτσι έναν καταρράκτη γεγονότων που οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο. Η επαναιμάτωση, η αποκατάσταση δηλαδή της ροής του αίματος μετά την ισχαιμία είναι απαραίτητη για τη διάσωση των ισχαιμικών ιστών. Σκοπός της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας ήταν η σύγκριση ενός *in vivo* μοντέλου αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας/επαναιμάτωσης η οποία προκλήθηκε σε επίμυες με αύξηση της ενδοφθάλμιας πίεσης για μια ώρα και επαναιμάτωση για 4 ώρες, με ένα *ex vivo* μοντέλο στο οποίο οι ιστοί επωάστηκαν για μια ώρα σε διάλυμα το οποίο περιείχε σουκρόζη αντί για γλυκόζη και άζωτο αντί για οξυγόνο και στη συνέχεια επέστρεψαν σε φυσιολογικές συνθήκες για 4 ώρες. Οι ιστοί χρώσθηκαν ανοσοϊστοχημικά με αντίσωμα έναντι του δείκτη των αστροκυττάρων GFAP, και οι μορφολογικές αλλαγές των αστροκυττάρων εξακριβώθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος ImageJ. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, (1) και στα δύο μοντέλα 4 ώρες επαναιμάτωσης οδήγησαν στην αύξηση του αριθμού των αποφύσεων και τον διακλαδώσεων των αστροκυττάρων (2) τα δύο πρωτόκολλα έχουν διαφορετική επίδραση στον αριθμό των διακλαδώσεων με το *in vivo* μοντέλο να προκαλεί μεγαλύτερη αύξηση ενώ (3) υπάρχει, όπως ήταν αναμενόμενο, θετική γραμμική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των αποφύσεων και των διακλαδώσεων των αστροκυττάρων. Συμπερασματικά, τέσσερις ώρες επαναιμάτωσης μετά από μία ώρα αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας προκαλούν φαινοτυπική αλλαγή στα αστροκύτταρα (*αστρογλοίωση*) τόσο στο *ex vivo* όσο και στο *in vivo* μοντέλα της βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης του αμφιβληστροειδούς που δοκιμάστηκαν, γεγονός που υποδηλώνει τη χρησιμότητα της στη μελέτη πιθανών φαρμακευτικών στόχων. Ενώ το *ex vivo* μοντέλο εξακολουθεί να απαιτεί ζώα, ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια της επαναιμάτωσης, προσφέρει μια πολύτιμη προσέγγιση για τις αρχικές μελέτες ανακάλυψης φαρμάκων, εξαλείφοντας τη χειρουργική διαδικασία που χρησιμοποιείται στο *in vivo* μοντέλο και κατά συνέπεια μειώνοντας τον συνολικό πόνο και την αγωνία που πιθανά βιώνουν τα ζώα. Αυτό ευθυγραμμίζεται με τις αρχές της βελτίωσης στο πλαίσιο 3R για ηθική έρευνα σε ζώα.

Abstract

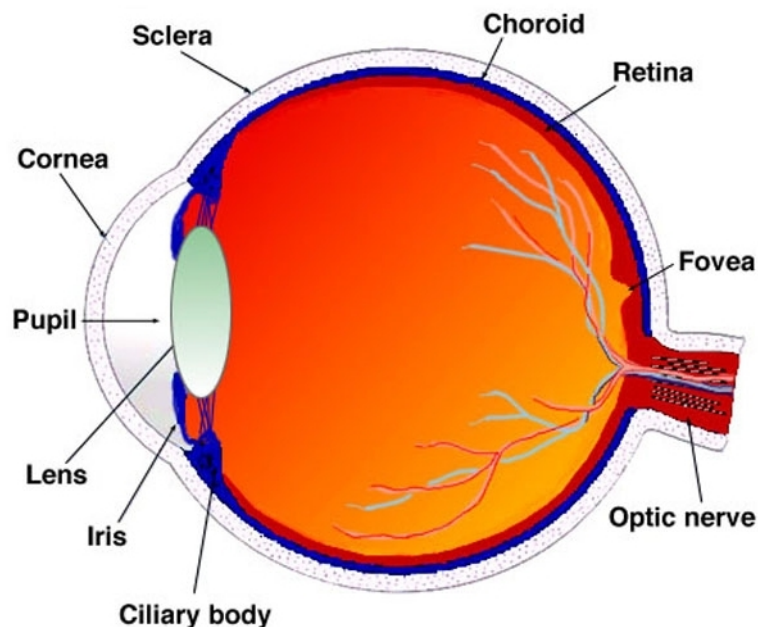
The retina, a part of the central nervous system, is directly stimulated by light. Astrocytes, a type of glial cell, surround the ganglion cell axon bundles and the blood vessels penetrating the ganglion cell layer within the retina. Ischemia occurs when the blood supply to a tissue or organ is disrupted, cutting off oxygen and glucose delivery. This triggers a cascade of events leading to cell death. Restoration of blood flow after ischemia, known as reperfusion, is crucial for salvaging the affected tissue. This study compared two models of retinal ischemia/reperfusion injury: (1) an *in vivo* model where rats underwent a one-hour increase in intraocular pressure followed by four hours of reperfusion and (2) an *ex vivo* model where retinal tissue was perfused in a solution lacking glucose and oxygen for one hour and then returned to normal conditions for four hours. Both models employed immunohistochemical staining with an antibody against GFAP, an astrocyte marker, followed by analysis of astrocyte morphology using ImageJ software. Our results revealed that four hours of reperfusion in both models caused an increase in the number of astrocyte branches and junctions, with the *in vivo* model inducing a greater increase in the number of junctions. As expected, a positive linear correlation exists between the number of astrocyte branches and junctions. In conclusion, four hours of reperfusion following retinal ischemia induces a phenotypic change in astrocytes (astrogliosis) in both the *ex vivo* and *in vivo* models of retinal ischemia/reperfusion injury tested. This can serve as an indicator of potential drug treatments. While the *ex vivo* model still requires animals, particularly in the early stages of reperfusion, it offers a valuable approach for initial drug discovery studies by eliminating the surgical procedure used in the *in vivo* model and consequently reducing the overall pain and distress experienced by the animals. This aligns with the principles of refinement within the 3Rs framework for ethical animal research.

Εισαγωγή

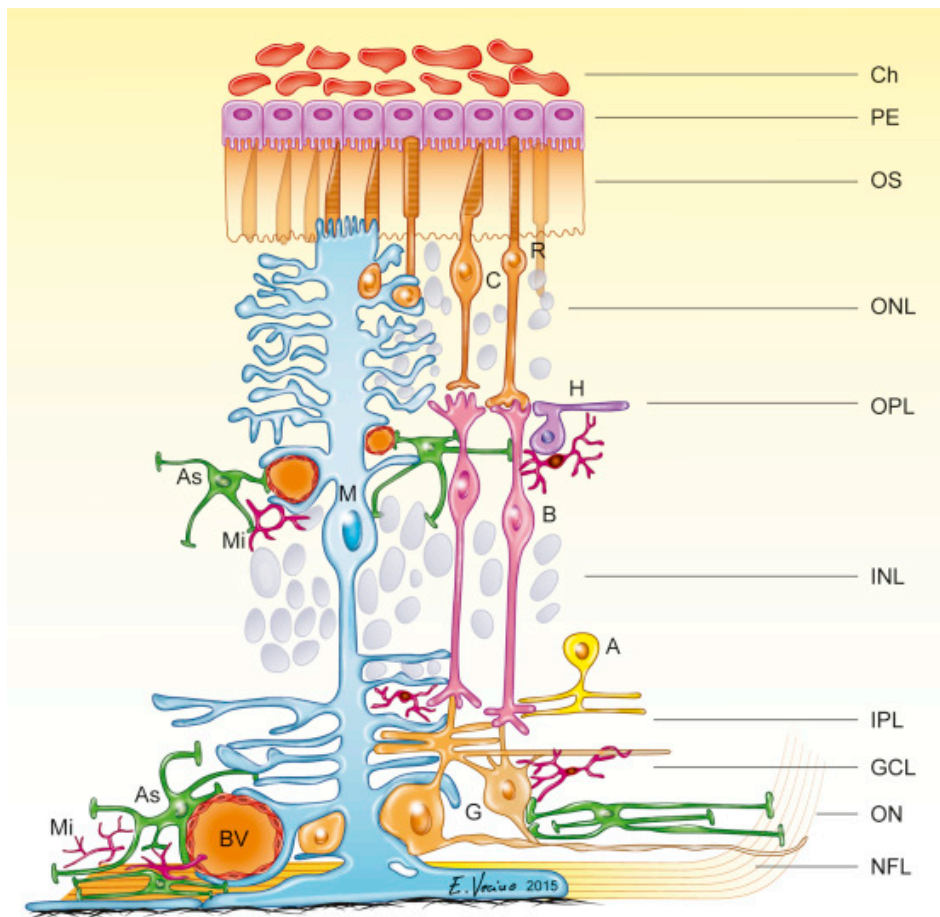
1. Αμφιβληστροειδής

Δικαίως το ανθρώπινο μάτι (Εικόνα 1) χαρακτηρίζεται από πολλούς ως ένα θαυμάσιο αισθητήριο όργανο που μας επιτρέπει να εκτιμήσουμε την ωραιότητα του κόσμου, να διαβάσουμε, να αποκτήσουμε γνώση και να γνωστοποιήσουμε τις σκέψεις και τις επιθυμίες μέσω της οπτικής έκφρασης και των εικαστικών τεχνών. Ως γνωστόν η όραση αποτελεί την πιο θεμελιώδη αίσθηση του ανθρώπου, η απώλεια της οποίας άλλωστε είναι ένα τραγικό γεγονός. Μπορεί όλα τα μέρη του ματιού να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αντίληψη μιας εικόνας, αλλά αναμφισβήτητα το πλέον απαραίτητο είναι ο **αμφιβληστροειδής** (Εικόνα 1).

Αν δίνουμε μια απλή, συνοπτική ερμηνεία για το τι ακριβώς είναι ο αμφιβληστροειδής, θα λέγαμε ότι αποτελεί ουσιαστικά ένα κομμάτι εγκεφαλικού ιστού που λαμβάνει άμεση διέγερση από τα φώτα και τις εικόνες του περιβάλλοντος. Το πάχος του αμφιβληστροειδή είναι περίπου 0,5 mm και καλύπτει το πίσω μέρος του ματιού. Στο κέντρο του υπάρχει το οπτικό νεύρο, μια κυκλική, λευκή περιοχή, από το κέντρο της οποίας εκτείνονται τα κύρια αιμοφόρα αγγεία του ιστού. Το οπτικό νεύρο περιέχει τους νευράξονες των γαγγλιακών κυττάρων που κατευθύνονται προς τον εγκέφαλο (Kolb, 2001).



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



Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση των κυτταρικών σειρών του αμφιβληστροειδούς: γλοία και νευρώνες. Οι διαφορετικοί τύποι κυττάρων βρίσκονται σε έναν τυπικό μεγάλο αμφιβληστροειδή θηλαστικού. Βραχύνια κύτταρα (A), αστροκύτταρα σε πράσινο (AS), δίπολα κύτταρα (B), κωνιοφόρα κύτταρα (C), γαγγλιακά κύτταρα (G), οριζόντια κύτταρα (H), κύτταρα Müller σε μπλε (M), μικρογλοία σε κόκκινο (Mi), ραβδιοφόρα κύτταρα (R). Θέση των διαφορετικών στρωμάτων του αμφιβληστροειδούς (από τα πιο εσωτερικά έως τα εξωτερικά στρώματα): οπτικό νεύρο (ON), στιβάδα νευρικών ινών (NFL), στιβάδα γαγγλιακών κυττάρων (GCL), εσωτερική δικτυωτή στιβάδα (IPL), εσωτερική κοκκώδης στιβάδα (INL), εξωτερική δικτυωτή στιβάδα (OPL), εξωτερική κοκκώδης στιβάδα (ONL), στρώμα εξωτερικού τμήματος (OS), μελάγχροον επιθήλιο (PE), χοριοειδές πλέγμα (Ch). Vecino και συν., 2016, license number: 5738430705934).

Τα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς (Εικόνα 2) εντοπίζονται σε οργανωμένες στιβάδες καθ' όλο το πάχος του. Οι στιβάδες αυτές με κατεύθυνση από έξω προς τον εγκέφαλο είναι κατά σειρά:

1. Στιβάδα νευρικών ινών (NFL: Nerve Fiber Layer)
2. Στιβάδα γαγγλιακών κυττάρων (GCL: Ganglion Cell Layer)
3. Εσωτερική δικτυωτή στιβάδα (IPL: Inner Plexiform Layer)
4. Εσωτερική κοκκώδης στιβάδα (INL: Inner Nuclear Layer)
5. Εξωτερική δικτυωτή στιβάδα (OPL: Outer plexiform layer)
6. Εξωτερική κοκκώδης στιβάδα (ONL: Outer Nuclear Layer)

7. Στιβάδα φωτοϋποδοχέων (αποφύσεων των φωτοϋποδοχέων: ραβδία και κωνία)

8. Μελάγχρουν επιθήλιο (RPE: Retinal Pigment Epithelium Kolb, 2001).

Στα παραπάνω στρώματα του αμφιβληστροειδούς, βρίσκουμε πολλούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων με συγκεκριμένες εργασίες ο καθένας, που συμβάλλουν στη μετατροπή των εισερχόμενων φωτονίων σε δυναμικά δράσης (φωτοϋποδοχείς), τη λήψη της οπτικής πληροφορίας (*ένταση σήματος, σημείο στο χώρο, κίνηση, χρώμα*) και τη μεταφορά της προς των εγκεφαλικό φλοιό όπου γίνεται η ανάλυση της. Στους έξι διαφορετικούς τύπους νευρικών κυττάρων στον αμφιβληστροειδή περιλαμβάνονται:

- Ραβδιοφόρα κύτταρα (αποφύσεις: στιβάδα φωτοϋποδοχέων & σώματα: εξωτερική κοκκώδη στιβάδα)
- Κωνιοφόρα κύτταρα (αποφύσεις: στιβάδα φωτοϋποδοχέων & σώματα: εξωτερική κοκκώδη στιβάδα)
- Γαγγλιακά κύτταρα αμφιβληστροειδούς (στιβάδα γαγγλιακών κυττάρων)
- Δίπολα κύτταρα (εσωτερική κοκκώδη στιβάδα)
- Οριζόντια κύτταρα (εσωτερική κοκκώδη στιβάδα)
- Βραχύνια κύτταρα (εσωτερική κοκκώδη στιβάδα & στιβάδα γαγγλιακών κυττάρων Kolb, 2001)

1.1 Νευρικά κύτταρα

Φωτοϋποδοχείς

Στους ανθρώπους το 95% των φωτοϋποδοχέων στον αμφιβληστροειδή αποτελούνται από **ραβδιοφόρα κύτταρα**, τα οποία εξειδικεύονται στην καταγραφή επιπέδων χαμηλού φωτισμού, συμβάλλοντας έτσι στη δημιουργία μιας ασπρόμαυρης όρασης, γνωστής ως σκοτοπική όραση. Τα ραβδιοφόρα κύτταρα συγκεντρώνονται στην περιφέρεια του αμφιβληστροειδή, μια και η πυκνότητά τους αυξάνεται καθώς κινούμαστε προς την περιφέρεια. Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιούν γλουταμινικό οξύ ως νευροδιαβιβαστή και συνάπτονται σε δίπολα κύτταρα δεύτερης τάξης στο εξωτερικό πλεγματοειδές στρώμα (Mahabadi & Khalili, 2023 και Kolb, 2005).

Τα **κωνιοφόρα κύτταρα** αποτελούν αντίστοιχα μόνο το 5% του συνολικού αριθμού των φωτοϋποδοχέων του ανθρώπινου αμφιβληστροειδούς και βρίσκονται στο κέντρο του αμφιβληστροειδούς, στο κεντρικό βοθρίο της ωχράς κηλίδας. Σε αντίθεση με τα ραβδιοφόρα, τα

κωνιοφόρα κύτταρα είναι λιγότερο ευαίσθητα στα φωτόνια γενικά. Βοηθούν τον εγκέφαλο να επεξεργάζεται τη φωτοπική όραση, που περιλαμβάνει την έγχρωμη όραση σε διαφορετικά επίπεδα φωτός. Σημειώνεται πως τα κωνιοφόρα και τα ραβδιοφόρα κύτταρα παρουσιάζουν αρκετές διάφορες μεταξύ τους. Για παράδειγμα, τα κωνιοφόρα κύτταρα δύνανται να προσαρμοστούν στο φως γρήγορα και δεν υπόκεινται σε κορεσμό υπό σταθερό φως όπως κάνουν τα ραβδιοφόρα (Mahabadi & Khalili, 2023 και Kolb, 2005)

Γαγγλιακά κύτταρα

Τα **γαγγλιακά κύτταρα** (RGC) αποτελούν τους τελικούς νευρώνες εξόδου της οπτικής πληροφορίας από τον αμφιβληστροειδή. Φέρουν την ευθύνη της διάδοσης οπτικών ερεθισμάτων στον εγκέφαλο. Τα RGCs λαμβάνουν τόσο διεγερτικά όσο και ανασταλτικά σήματα από δύο τύπους ενδιάμεσων νευρώνων, τα βραχύινα και τα δίπολα κύτταρα. Υπάρχουν περίπου 20 διαφορετικά είδη RGCs με το 1 έως 2% αυτών να είναι εγγενώς φωτοευαίσθητα (ipRGCs: intrinsically photosensitive retinal ganglion cells) εξαιτίας της επιλεκτικής έκφρασης μελανοψίνης. Αυτή η πρωτεΐνη επιτρέπει στα ipRGCs να ανιχνεύουν το φως ακόμη και απουσία φωτοϋποδοχέων. Τα ipRGCs είναι υπεύθυνα για τους κirkάδιους ρυθμούς, οι οποίοι είναι ο φυσικός κύκλος ύπνου-αφύπνισης του σώματος. Εμπλέκονται επίσης στη συστολή της κόρης και σε άλλα αντανακλαστικά που προκαλούνται από το φως. Εντούτοις, η πλειοψηφία των γαγγλιακών κυττάρων κωδικοποιεί τις χωρικές πληροφορίες μιας εικόνας, στέλνοντας σήματα στον εγκέφαλο που αντιπροσωπεύουν τη θέση, την ένταση και το χρώμα των αντικειμένων στο οπτικό πεδίο.

Το οπτικό νεύρο συλλέγει όλους τους άξονες των γαγγλιακών κυττάρων και αυτή η δέσμη των ενός εκατομμυρίου περίπου ινών μεταδίδει στη συνέχεια πληροφορίες στον εγκέφαλο, για την ταξινόμηση και ενσωμάτωση σε πρόσθετα κανάλια επεξεργασίας πληροφοριών (Mead & Stanislav, 2016 και Kolb, 2005 και Mahabadi & Khalili, 2023).

Βραχύινα κύτταρα

Τα **βραχύινα κύτταρα** αποτελούν ενδιάμεσους νευρώνες που απελευθερώνουν τον ανασταλτικό νευροδιαβιβαστή γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), όπως επίσης και την γλυκίνη. Η ποικιλομορφία των γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς προκαλεί μια ακόμη πιο ποικιλόμορφη διασπορά βραχύνων κυττάρων. Μέχρι και σήμερα, οι ερευνητές έχουν ανακαλύψει 20 διαφορετικά γαγγλιακά κύτταρα με περισσότερα από 42 διαφορετικά βραχύινα κύτταρα να τα συνοδεύουν. Η ποικιλομορφία αυτή των βραχύνων κυττάρων τους επιτρέπει να σχηματίζουν ειδικά λειτουργικά

μικροκυκλώματα που δίνει τη δυνατότητα αντίστοιχα στον αμφιβληστροειδή να ανιχνεύει διαφορετικές αποχρώσεις και κινήσεις φωτός σε συγκεκριμένες κατευθύνσεις.

Όπως υποδηλώνει το όνομά τους, υπάρχουν διαφορετικά φάσματα ανταλλαγής πληροφοριών ανάλογα με το συγκεκριμένο πεδίο στο οποίο λειτουργεί κάθε βραχύινο κύτταρο. Για παράδειγμα, τα βραχύινα κύτταρα ευρέως πεδίου ειδικεύονται στην οριζόντια επικοινωνία σε ένα μόνο στρώμα του αμφιβληστροειδούς, βοηθώντας στην οριζόντια ενσωμάτωση πληροφοριών. Τα βραχύινα κύτταρα στενού πεδίου είναι στενότερα και διεισδύουν σε περισσότερα στρώματα του αμφιβληστροειδούς κάθετα, επιτρέποντας την κατακόρυφη ενσωμάτωση πληροφοριών. Σημειώνεται ακόμη ότι το τελικό αποτέλεσμα της διέγερσης των βραχύνων κυττάρων μπορεί να είναι αναστολή αλλά και διέγερση των γειτονικών κυττάρων, παρά την απελευθέρωση ανασταλτικών νευροδιαβιβαστών από αυτά (Kolb 2005 και Mahabadi & Khalili, 2023).

Δίπολα κύτταρα

Τα **δίπολα κύτταρα** λαμβάνουν οπτικά σήματα από τους φωτοϋποδοχείς (ραβδιοφόρα και κωνιοφόρα) και προβάλλουν τους άξονές τους σε γαγγλιακά κύτταρα αμφιβληστροειδούς. Τα δίπολα κύτταρα συνδέουν την εσωτερική και την εξωτερική στοιβάδα του αμφιβληστροειδούς σχηματίζοντας μια συναπτική σύνδεση με ραβδιοφόρα και κωνιοφόρα κύτταρα στην εξωτερική δικτυωτή στοιβάδα (OPL: outer plexiform layer). Επιπλέον, τα κύτταρα αυτά επικοινωνούν με τα βραχύινα και τα οριζόντια κύτταρα. Τα οριζόντια κύτταρα μάλιστα αναστέλλουν τα δίπολα κύτταρα, μέσω του GABA. Ακόμη σημειώνεται πως το γλουταμινικό οξύ (διεγερτικός νευροδιαβιβαστής) που απελευθερώνεται από τα ραβδιοφόρα και κωνιοφόρα κύτταρα, αναγνωρίζεται από υποδοχείς των δίπολων κυττάρων (Mahabadi & Khalili, 2023).

Οριζόντια κύτταρα

Τα **οριζόντια κύτταρα** εμπλέκονται στη ρύθμιση της μεταφοράς πληροφοριών μεταξύ των δίπολων κυττάρων και των φωτοϋποδοχέων και βοηθούν το μάτι να προσαρμοστεί σε συνθήκες έντονου και χαμηλού φωτισμού. Υπάρχουν τρεις διαφορετικοί τύποι οριζόντιων κυττάρων στον αμφιβληστροειδή με τα κυτταρικά τους σώματα συγκεντρωμένα προς τον εξωτερικό αμφιβληστροειδή που βρίσκονται κυρίως στο εσωτερικό πυρηνικό στρώμα. Τα οριζόντια κύτταρα αναστέλλουν τα δίπολα κύτταρα μέσω του GABA. Η θέση αυτή ωστόσο χαρακτηρίζεται ως αμφιλεγόμενη από πόλους ερευνητές, διότι υποστηρίζεται πως τα οριζόντια κύτταρα δεν χρησιμοποιούν το GABA για αναστολή, αλλά αντιθέτως, αναστέλλουν τα δίπολα κύτταρα και τους φωτοϋποδοχείς ρυθμίζοντας το pH εντός της συναπτικής σχισμής (Mahabadi & Khalili, 2023).

1.2 Κύτταρα της γλοίας

Τα κύτταρα της γλοίας οφείλουν το όνομά τους στην *γλοία* την αρχαία ελληνική λέξη για την κολλώδης ουσία/κόλλα, καθώς στο παρελθόν υποστηριζόταν η θέση πως η λειτουργία τους περιοριζόταν απλώς στην συγκράτηση των νευρώνων μεταξύ τους στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Σήμερα ωστόσο γνωρίζουμε πως τα νευρογλοιακά κύτταρα διαδραματίζουν μια σειρά από πολύπλοκες λειτουργίες πέρα από την παροχή δομικής υποστήριξης στους νευρώνες. Στον ανθρώπινο αμφιβληστροειδή υπάρχουν δυο βασικοί τύποι κυττάρων της γλοίας, τα μακρογλοιακά και τα μικρογλοιακά κύτταρα. Τα μακρογλοιακά κύτταρα είναι τα κύτταρα Müller και τα αστροκύτταρα.

Μεταξύ των διαδικασιών στις οποίες εμπλέκονται τα κύτταρα της γλοίας στον αμφιβληστροειδή συγκαταλέγονται:

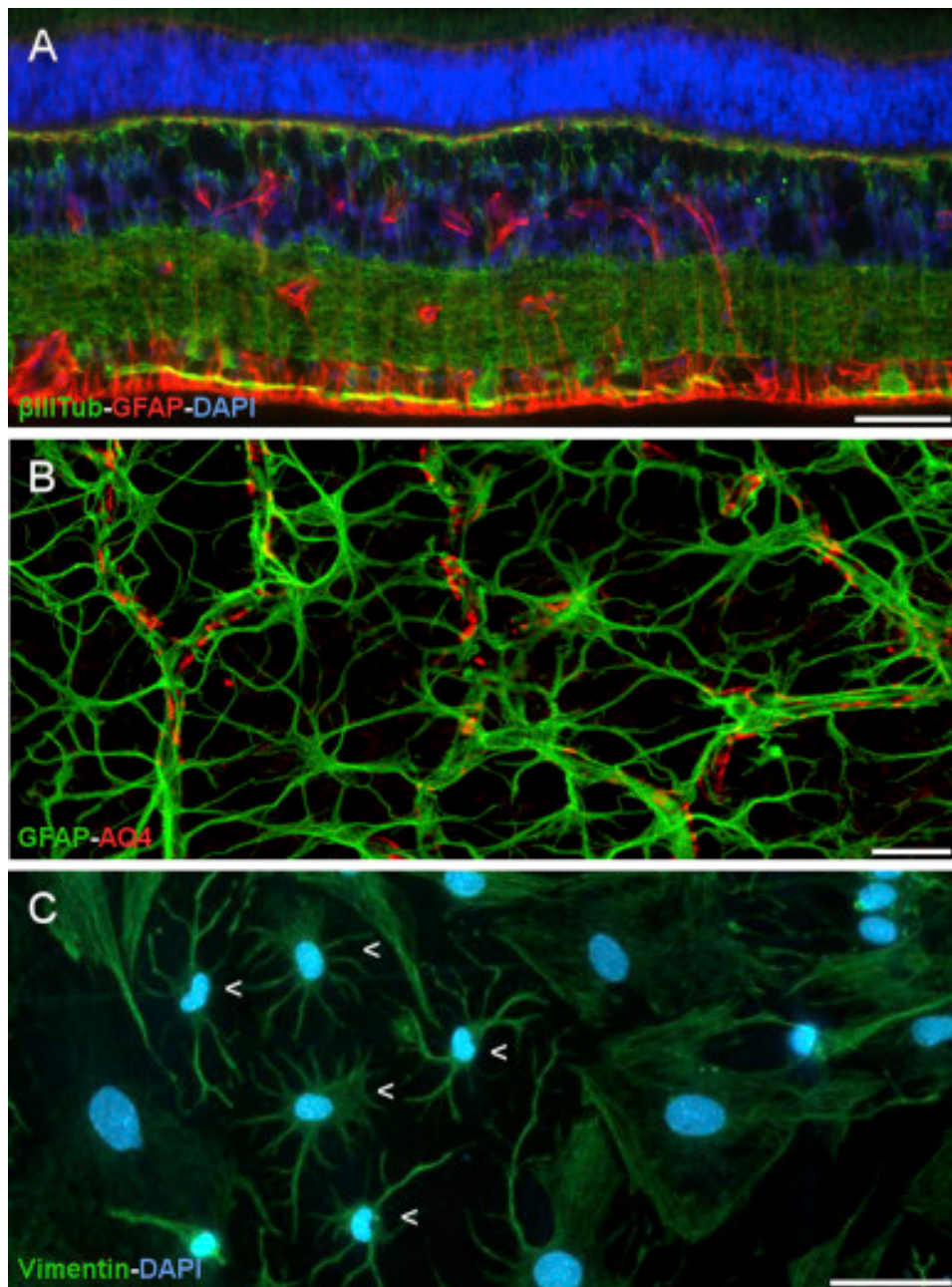
- Η διατήρηση της ομοιόστασης του ιστού
- Η ανταπόκριση σε τραυματισμό του αμφιβληστροειδούς (*μικρογλοιακά κύτταρα*)
- Η διατήρηση των νευρωνικών δικτύων (*μικρογλοιακά κύτταρα*)
- Η παροχή θρεπτικών συστατικών στους νευρώνες
- Ανακύκλωση των νευροδιαβιβαστών, κ.α. (García και συν., 2021, Kandel και συν., 2020).

Αστροκύτταρα

Τα *αστροκύτταρα* αποτελούν κύτταρα της γλοίας και έχουν σχήμα αστεριού, στο οποίο οφείλουν και το όνομα τους (Εικόνα 3). Στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) παρουσιάζουν τον μεγαλύτερο πληθυσμό κυττάρων. Αρχικά οι επιστήμονες θεωρούσαν πως τα αστροκύτταρα είναι απλώς μια «εγκεφαλική κόλλα» που υποστηρίζει και θρέφει παθητικά τους νευρώνες. Ωστόσο, πλέον είναι γνωστό πως τα αστροκύτταρα συμμετέχουν σχεδόν σε κάθε πτυχή της ανάπτυξης και λειτουργίας του ΚΝΣ. Συγκεκριμένα, οι λειτουργίες τους κυμαίνονται από τη δημιουργία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και τη διατήρηση της ιοντικής ομοιόστασης έως τους ενεργούς ρόλους στη συναπτική πλαστικότητα του εγκεφάλου αλλά και στη νευρωνική επικοινωνία (Tao & Zhang, 2014).

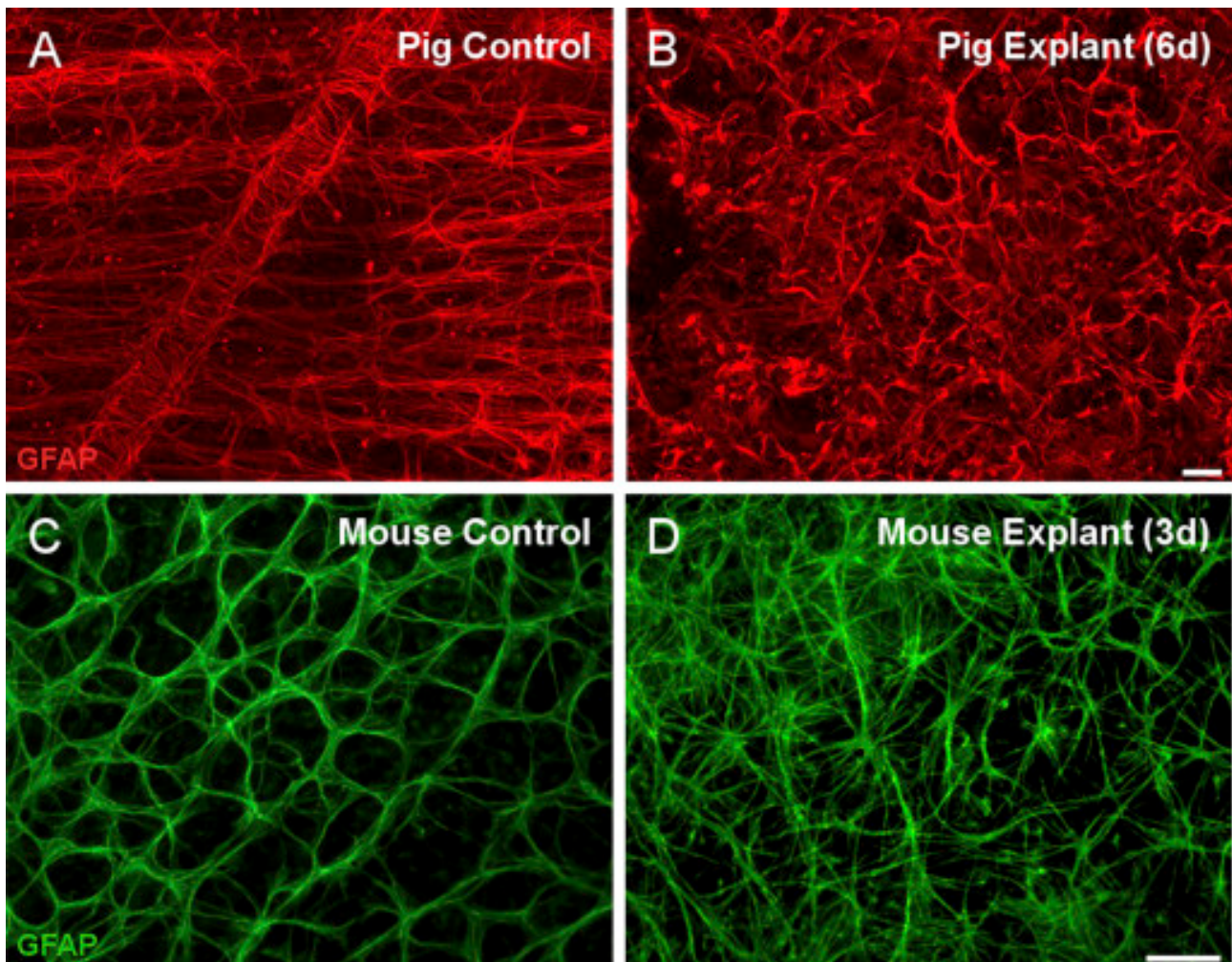
Πληροφοριακά, τα περισσότερα είδη σπονδυλωτών δεν έχουν καμία εγγενή αγγείωση του αμφιβληστροειδούς, αλλά βασίζονται σε εξωαμφιβληστροειδικά αγγεία για την παροχή οξυγόνου στον νευρικό ιστό. Η ενδογενής αγγείωση προέκυψε μόνο στη γεναλογία των θηλαστικών. Επομένως τα αστροκύτταρα παρατηρούνται αποκλειστικά στα θηλαστικά. Η συγγένεια μεταξύ αυτών των δύο τύπων κυττάρων μπορεί επίσης να διακριθεί στο βοθρίο των πρωτεύοντων, την

περιοχή του αμφιβληστροειδούς που είναι εξειδικευμένη για όραση υψηλής οξύτητας. Το βοθρίο είναι η μόνη περιοχή του αμφιβληστροειδούς των πρωτεύοντων που στερείται αγγείωσης και επίσης στερείται αστροκυττάρων (Paisley & Kay, 2021).



Εικόνα 3. Αστροκύτταρα (A) Τομή αμφιβληστροειδούς Minipig. Τα RGCs επισημαίνονται με αντισώματα έναντι της βIII Tubulin (πράσινη), τα κύτταρα Müller και τα αστροκύτταρα επισημαίνονται με αντισώματα κατά του GFAP (κόκκινο) και οι πυρήνες χρωματίζονται με DAPI. Όπως διαφαίνεται από την εικόνα τα αστροκύτταρα ακολουθούν τα αιμοφόρα αγγεία από το στρώμα των RGCs έως την εξωτερική κοκκώδης στιβάδα (ONL). (B) Συνεστιακή εικόνα αμφιβληστροειδούς αρουραίου σε ολόκληρο τον αρουραίο, όπου τα αστροκύτταρα επισημάνθηκαν με αντισώματα κατά του GFAP (πράσινο) και της ακουαπορίνης 4 (AQ4, κόκκινο) (C) Πρωτογενής καλλιέργεια γλοίας αρουραίου. Τα αστροκύτταρα υποδεικνύονται με αιχμή βέλους, ενώ τα άλλα κύτταρα είναι κύτταρα Müller με μεγαλύτερους πυρήνες: επισημάνση βιμεντίνης (πράσινη) και οι πυρήνες χρωματίζονται με DAPI. Κλίμακα = 50 μm . (Vecino και συν., 2016, license number: 5738440211050).

Όσον λοιπόν αφορά τον αμφιβληστροειδή, τα αστροκύτταρα εισέρχονται στον αναπτυσσόμενο ιστό από τον εγκέφαλο κατά μήκος του αναπτυσσόμενου οπτικού νεύρου (Εικόνα 5). Όπως αναφέρθηκε, έχουν αυτήν την χαρακτηριστική μορφολογία ενός πεπλατυσμένου κυτταρικού σώματος. Οι διεργασίες των αστροκυττάρων περιορίζονται σχεδόν εξ ολοκλήρου στο στρώμα νευρικών ινών του αμφιβληστροειδούς. Η μορφολογία τους αλλάζει από την κεφαλή του οπτικού νεύρου προς την περιφέρεια: από εξαιρετικά επιμήκη κοντά στο οπτικό νεύρο σε μια συμμετρική αστρική μορφή στον μακρινό περιφερειακό αμφιβληστροειδή (Kolb, 2001).

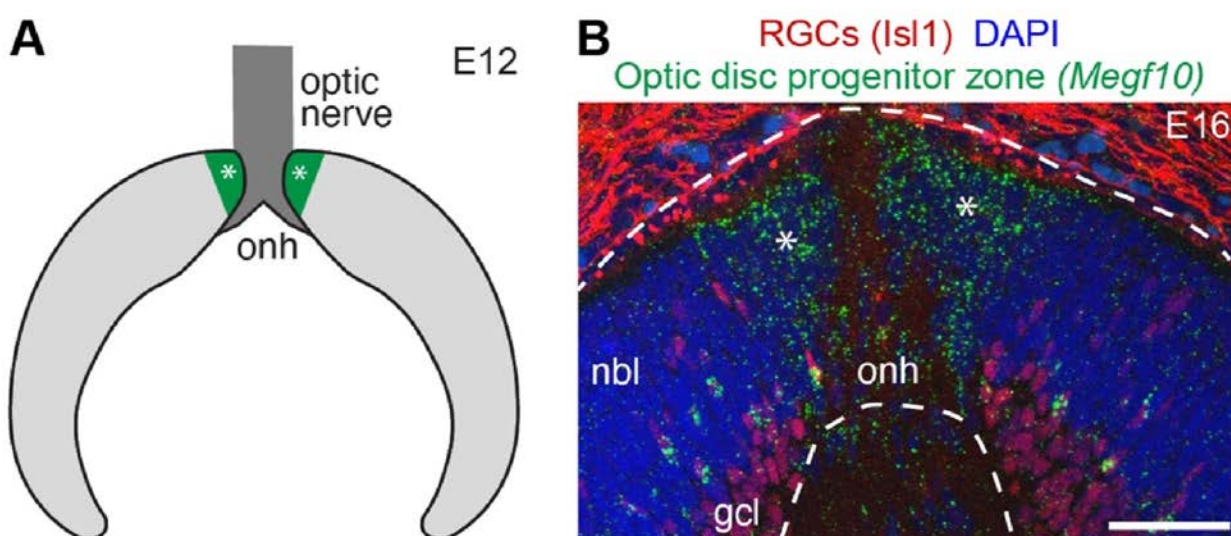


Εικόνα 4. Ολόκληρα μοσχεύματα αμφιβληστροειδούς: Τα A και Γ είναι αμφιβληστροειδείς χιτώνες ελέγχου. Το B και το Δ είναι μοσχεύματα. Οι A και B είναι αμφιβληστροειδείς χοίρων. Οι C και D είναι αμφιβληστροειδείς χιτώνες ποντικού. Τα αστροκύτταρα επισημαίνονται με αντισώματα κατά του GFAP (κόκκινο στο χοίρο, A και B, και πράσινο στον ποντικό, C και D). Στην εικόνα διαφαίνονται οι αλλαγές στη μορφολογία των αστροκυττάρων μεταξύ του αμφιβληστροειδούς ελέγχου και του εμφυτεύματος. Μπάρα κλίμακας = 50 μm . (Vecino και συν., 2016, license number: 5738440211050).

Τα «παχιά», αλλά και τα πιο λεπτά αστροκύτταρα μπορούν να διακριθούν με την χρήση χρώσης με αντισώματα κατά του GFAP (Εικόνα 4). Όπως φαίνεται από αποτελέσματα των χρώσεων τα αστροκύτταρα περικλείουν τις δεσμίδες των αξόνων των γαγγλιακών κυττάρων, αλλά και τα

αιμοφόρα αγγεία που διαπερνούν την στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων, καθώς κατευθύνονται στην κεφαλή του οπτικού νεύρου, σχηματίζοντας έναν σωλήνα μέσω του οποίου περνούν οι άξονες (Kolb, 2001).

Η λειτουργία των αστροκυττάρων που περιβάλλουν τους άξονες των γαγγλιακών κυττάρων, καθώς και η σχέση με τα αιμοφόρα αγγεία της στιβάδας των νευρικών ινών, υποδηλώνουν ότι εντέλει τα κύτταρα αυτά αποτελούν αξονικές και αγγειακές γλοιακές «θήκες» και μέρος του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Οι λειτουργίες των αστροκυττάρων αφορούν κυρίως την αποθήκευση του γλυκογόνου για την παροχή γλυκόζης στους νευρώνες, την διατήρηση της ιοντικής ομοιόστασης με την ρύθμιση των εξωκυτταρικών επιπέδων καλίου, καθώς και τον μεταβολισμό νευροδιαβιβαστών όπως το GABA (Kolb, 2001).



Εικόνα 5. Εξειδικευμένοι νευροεπιθηλιακοί πρόγονοι παράγουν τα αστροκύτταρα του αμφιβληστροειδούς. A) Απεικόνιση της διατομής εμβρυϊκού αμφιβληστροειδούς ποντικού. Η προγονική ζώνη του οπτικού δίσκου (πράσινο, αστερίσκοι) που δημιουργεί τελικώς τα αστροκύτταρα του ιστού, περικλείει την κεφαλή του οπτικού νεύρου (σκούρο γκρι). Το ανοιχτό γκρι αντιστοιχεί στους προγόνους του αμφιβληστροειδούς που προέρχονται από το οπτικό κύπελλο. Αυτοί θεωρούνται υπεύθυνοι για την δημιουργία των νευρώνων του ιστού, αλλά και των κυττάρων Müller. B) Φωτομικρογραφία διατομής αμφιβληστροειδούς ποντικού E16. Το γονίδιο *Megf10* αποτελεί έναν δείκτη αστροκυττάρων, στο οποίο έχει γίνει *in situ* υβριδισμός. Έτσι αποκαλύπτεται η θέση της προγονικής ζώνης του οπτικού δίσκου (αστερίσκοι). Οι διακεκομμένες γραμμές θέτουν τα όρια στον νευρικό αμφιβληστροειδή, ενώ η χρώση Anti-*Isl1* δείχνει τη θέση των σωμάτων των κυττάρων RGC. (Paisley, Kay και συν, 2021, License Number: 5707190956297)

Κύτταρα Müller

Τα κύτταρα Müller αποτελούν το κυρίαρχο γλοιακό στοιχείο του αμφιβληστροειδούς (90% της γλοίας του αμφιβληστροειδούς). Είναι ακτινικά κύτταρα που εκτείνονται από το εσωτερικό (υαλοειδές όριο), μέχρι το απομακρυσμένο άκρο του εξωτερικού πυρηνικού στρώματος. Από τομές

του αμφιβληστροειδούς, ο ρόλος των κυττάρων Müller είναι να περιβάλλουν τα κυτταρικά σώματα και τις διεργασίες των νευρώνων του ιστού, ειδικά μετά από βλάβη (Vecino και συν., 2015).

Παρόλο που τα κύτταρα Müller από διαφορετικά είδη ποικίλλουν ως προς το σχήμα, έχουν αρκετά καθολικά χαρακτηριστικά. Στα πυρηνικά στρώματα, τα κύτταρα Müller σχηματίζουν δομές που περιβάλλουν τα κυτταρικά σώματα των νευρωνικών κυττάρων. Επιπλέον, τα κύτταρα Müller εμπλέκονται στη δομική οργάνωση του φραγμού αίματος-αμφιβληστροειδούς. Γενικότερα τα κύτταρα Müller αποτελούν έναν ανατομικό και λειτουργικό σύνδεσμο μεταξύ των νευρώνων του αμφιβληστροειδούς και των διαμερισμάτων με τα οποία χρειάζονται να ανταλλάσσουν μόρια, όπως τα αιμοφόρα αγγεία του ιστού, τον υαλοειδές θάλαμο και τον υποαμφιβληστροειδικό χώρο (Vecino και συν., 2015, Kibat & Turgut, 2020).

Η εκλεκτική καταστροφή των κυττάρων Müller του αμφιβληστροειδούς προκαλεί την δυσπλασία του, απόπτωση φωτοϋποδοχέα και, σε τελική κατάσταση τον εκφυλισμό του ιστού. Με αυτόν τον τρόπο διαφαίνεται η σημασία των κυττάρων αυτών για τον συγκεκριμένο ιστό (Vecino και συν., 2015).

Συνοπτικά τα υγιή κύτταρα Müller του αμφιβληστροειδούς:

- Δίνουν στους νευρώνες του αμφιβληστροειδούς θρεπτικά συστατικά όπως γαλακτικό/πυροσταφυλικό για τον οξειδωτικό μεταβολισμό του
- Απομακρύνουν μεταβολικά παραπροϊόντα
- Ρυθμίζουν τη ροή του αίματος στον αμφιβληστροειδή
- Συμβάλλουν στο σχηματισμό και τη διατήρηση του αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού.
- Συμβάλλουν στην διατήρηση της ομοιόστασης ιόντων και νερού του ιστού του αμφιβληστροειδούς, συμπεριλαμβανομένου του pH (Bringmann και συν., 2006).

Μικρογλοιακά κύτταρα

Τα **κύτταρα της μικρογλοίας** έχουν εξειδικευμένα ανοσοποιητικά καθήκοντα, ανταποκρινόμενα σε συγκεκριμένα ερεθίσματα εκκρίνοντας κυτοκίνες και νευροτροφικούς παράγοντες. Επιπλέον, δημιουργούν στενή σχέση με νευρώνες και άλλα κύτταρα, έτσι ώστε να συμβάλλουν στην αναδιαμόρφωση των νευρωνικών κυκλωμάτων, καθώς και στην εξάλειψη των κυτταρικών υπολειμμάτων και των διαταραγμένων συνάψεων. Η μικρογλοία παίζει επίσης ρόλο σε παθολογικά συμβάντα που επηρεάζουν το ΚΝΣ.

Η μικρογλοία συναντάται σε δύο ξεχωριστές μορφολογικές/φυσιολογικές καταστάσεις, την «ανενεργή» και την «ενεργοποιημένη» μικρογλοία. Μία βασική απάντηση της μικρογλοίας στις τοπικές προσβολές εξαρτάται από την παρουσία του εξωκυτταρικού ATP και περιλαμβάνει την ειδική επέκταση των μικρογλοιακών κυττάρων στο τραυματισμένο σημείο. Πειραματικές μελέτες υποστηρίζουν ότι ακόμη και σε υγιείς και ομοιοστατικές συνθήκες, η μικρογλοία ανταποκρίνεται σε αλλαγές στο περιβάλλον και ότι ρυθμίζει πολυάριθμα γεγονότα εκκρίνοντας κυτοκίνες και άλλους παράγοντες και αλληλεπιδρώντας με άλλα νευρογλοιακά κύτταρα και νευρώνες (Vecino και συν., 2015, Rathnasamy και συν., 2019).

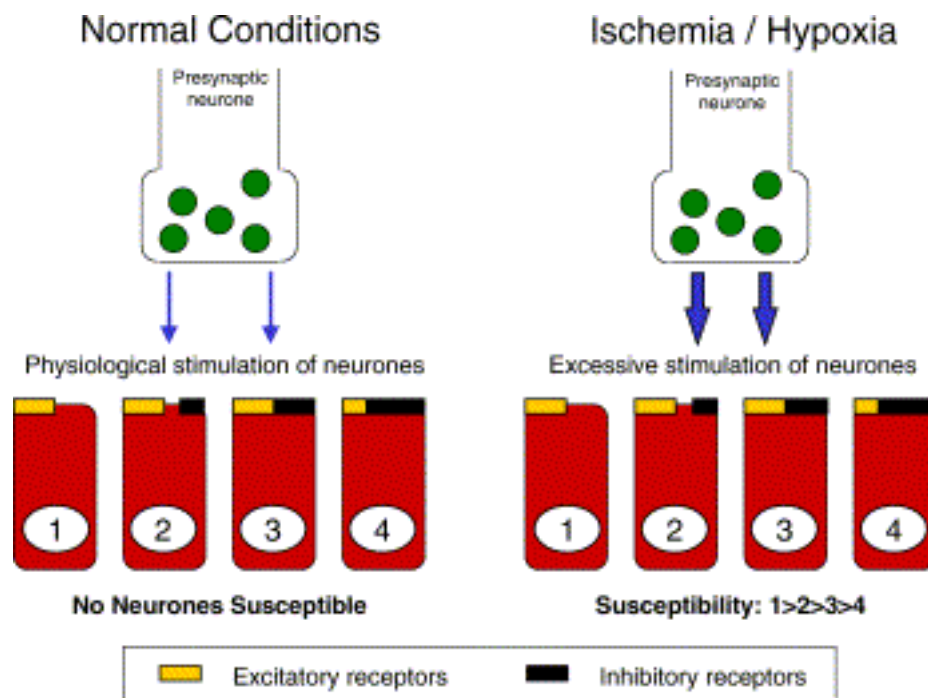
2. Ισχαιμία

Εισαγωγικά αναφέρουμε πως ο αμφιβληστροειδής παρουσιάζει το υψηλότερο ποσοστό κατανάλωσης οξυγόνου από οποιονδήποτε άλλο ιστό του ανθρώπινου σώματος και συνεπώς απαιτεί και μεγάλο όγκο οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης. Η ροή του αίματος του αμφιβληστροειδούς παραμένει σταθερή, ανεξάρτητα από την ενδοφθάλμια πίεση, τη συστηματική αρτηριακή πίεση, και είναι επίσης ανεξάρτητη από την αυτορρύθμιση του συμπαθητικού. Η ρύθμιση της ροής του αίματος γίνεται από τοπικούς παράγοντες, όπως το μονοξειδίο του αζώτου, οι προσταγλανδίνες, η ενδοθηλίνη και η αρτηριακή τάση του διοξειδίου του άνθρακα. Τα εσωτερικά στρώματα του συγκεκριμένου ιστού παρουσιάζουν υψηλότερη ευαισθησία στις υποξικές συνθήκες, ενώ αντίθετα ο εξωτερικός αμφιβληστροειδής προβάλλει μεγαλύτερη αντίσταση στο υποξικό στρες (Mahabadi & Khalili, 2023).

Η ισχαιμία προκύπτει εξαιτίας της διαταραχής της παροχής αίματος σε έναν ιστό ή όργανο, με αποτέλεσμα να διακόπτεται η παροχή οξυγόνου και γλυκόζης, πυροδοτώντας έτσι έναν καταρράκτη γεγονότων που τελικά οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο (Minhas και συν., 2016). Με άλλα λόγια η ισχαιμία ουσιαστικά στερεί από έναν ιστό τρεις βασικές απαιτήσεις του: το οξυγόνο, τα μεταβολικά υποστρώματα και την απομάκρυνση των άχρηστων προϊόντων. Η απώλεια αυτών των απαιτήσεων αρχικά θα μειώσει τις ομοιοστατικές αποκρίσεις και με τον καιρό θα προκαλέσει τραυματισμό στον ιστό ή μέχρι και θάνατο (Osborne και συν., 2004).

Όπως προαναφέρθηκε, επειδή οι απαιτήσεις του αμφιβληστροειδούς σε οξυγόνο είναι υψηλές, ο ιστός αυτός παρουσιάζει ευαισθησία σε ισχαιμική βλάβη (Εικόνα 6). Συνεπώς, ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα πως ο αμφιβληστροειδής αποτελεί ένα ιδανικό μοντέλο τόσο για την εξέταση της παθοφυσιολογίας της ισχαιμίας, όσο και για την αξιολόγηση διαφορετικών θεραπευτικών στρατηγικών σε ζωικά μοντέλα. Έχει διαπιστωθεί πως η ισχαιμία του αμφιβληστροειδούς συνδέεται με μεγάλο αριθμό ασθενειών του ιστού όπως το γλαύκωμα, η

διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και η απόφραξη της κεντρικής αρτηρίας του, που αποτελούν κύρια αίτια σοβαρών προβλημάτων όρασης ή ακόμη και τύφλωσης (Minhas και συν., 2016).



Εικόνα 6. Η σημασία της ισορροπίας μεταξύ της διεγερτικής και της ανασταλτικής εισροής των νευροδιαβιβαστών στους νευρώνες του αμφιβληστροειδούς. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η ισορροπία ανασταλτικών (GABA) και διεγερτικών (π.χ. γλουταμινικού) υποδοχέων στους νευρώνες δεν επηρεάζει άμεσα την κυτταρική λειτουργία. Στην περίπτωση όμως που ο νευρώνας υποβληθεί σε ισχαιμική ή υποξική προσβολή, η επιβίωση ευνοείται από τη αθροιστική σχετική αναλογία ανασταλτικών προς διεγερτικών υποδοχέων στα συναπτικά άκρα. Στο σχήμα, η ευαισθησία στην προσβολή έχει την σειρά 1>2>3>4, αφού η σχετική αναλογία των ανασταλτικών υποδοχέων αυξάνεται με αυτή τη σειρά. (Osbourne και συν., 2004, License Number: 5706410943891)

Ο καταρράκτης γεγονότων που ακολουθεί όταν εμφανίζεται η ισχαιμία, ξεκινά καταρχάς από τους νευρώνες του αμφιβληστροειδούς και περιλαμβάνει:

- Ταχεία εξάντληση του ATP
- Αλλαγή στον αναερόβιο μεταβολισμό
- Συσσώρευση γαλακτικού οξέος
- Αδυναμία λειτουργίας ATP εξαρτώμενης αντλίας Na^+/K^+
- Έλλειψη γλυκόζης
- Συσσώρευση μεταβολικών παραπροϊόντων (Hu και συν., 2022).

2.1 Αντίσταση του αμφιβληστροειδούς στην ισχαιμία

Παρόλο που ο αμφιβληστροειδής έχει πολλά κοινά λειτουργικά και δομικά χαρακτηριστικά με τον εγκέφαλο, οι επιστήμονες υποστηρίζουν πως ο αμφιβληστροειδής παρουσιάζει αρκετά μεγαλύτερη αντίσταση σε μια ισχαιμική προσβολή σε σχέση με τον εγκέφαλο, και συνεπώς επιβιώνει περισσότερο από αυτόν. Οι αιτίες αυτού του γεγονότος αποδίδονται:

- Στα εξωτερικά στρώματα του αμφιβληστροειδούς είναι λιγότερο ευαίσθητα από τα εσωτερικά, επομένως δεν καταστρέφονται αμέσως
- Στη νευροσφαιρίνη, μια νευροειδική αναπνευστική πρωτεΐνη που σχετίζεται εξ αποστάσεως με την αιμοσφαιρίνη και τη μουσφαιρίνη, η οποία εντοπίζεται σε πολύ πιο υψηλές ποσότητες στον αμφιβληστροειδή σε σχέση με τον εγκέφαλο
- Στην ύπαρξη τοπικών ενεργειακών υποστρωμάτων, όπως το υαλοειδές σώμα στον αμφιβληστροειδή, που εξασφαλίζουν σημαντικές ποσότητες γλυκόζης, με αποτέλεσμα να διασφαλίζεται μια αποθήκη γλυκογόνου στον ιστό
- Στην ικανότητα του αμφιβληστροειδούς να εξάγει αποτελεσματικά (ATP) από τη γλυκόλυση, εφόσον η γλυκόζη είναι άφθονη, ακόμη και σε πλήρη απουσία οξυγόνου (Obsorne και συν., 2004).

Κατά την ισχαιμία ωστόσο, κύριο αποτέλεσμα του αποκλεισμού παροχής οξυγόνου και γλυκόζης στον αμφιβληστροειδή αποτελεί η διαταραχή του κυτταρικού ενεργειακού μεταβολισμού. Συγκεκριμένα, η μείωση των ρυθμών γλυκόλυσης και οξειδωτικής φωσφορυλίωσης συνεπάγεται και τη μείωση των ενδοκυτταρικών επιπέδων του ATP, προκαλώντας επιδείνωση της λειτουργίας της μεμβράνης και της ομοιόστασης των ιόντων και πυροδοτώντας μονοπάτια που οδηγούν σε νευρωνικό θάνατο (Obsorne και συν., 2004).

2.2 Επαναιμάτωση

Η αποκατάσταση της ροής του αίματος μετά την ισχαιμία είναι απαραίτητη για τη διάσωση των ισχαιμικών ιστών. Ωστόσο, παραδόξως η ίδια η επαναιμάτωση προκαλεί επιπλέον βλάβη, απειλητική για τη λειτουργία και τη βιωσιμότητα του οργάνου. Ο τραυματισμός εξαιτίας της επαναιμάτωσης είναι μια πολυπαραγοντική διαδικασία που οδηγεί τελικώς στην καταστροφή του ιστού (Cowled & Fitridge, 2011).

Η επαναιμάτωση του ιστού μετά από ισχαιμία έχει ως συνέπεια την παραγωγή ROS (ριζών οξυγόνου) που καταστρέφουν τα βιομόρια με την ενεργοποίηση φλεγμονωδών αποκρίσεων. Σε αυτές τις πολύπλευρες κυτταρικές αποκρίσεις περιλαμβάνονται η ενεργοποίηση της μικρογλοίας

και των μακροφάγων, ο σχηματισμός φλεγμονοσωμάτων, η απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτταροκινών, η διαταραχή του αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού μέχρι και η απόπτωση (Minhas και συν., 2016).

Οι ρίζες οξυγόνου (ROS) αρχίζουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών. Με αυτόν τον τρόπο απελευθερώνεται αραχιδονικό οξύ, το κύριο υπόστρωμα για την παραγωγή προσταγλανδινών. Οι προσταγλανδίνες, που συντίθενται από το αραχιδονικό οξύ μέσω της οδού κυκλοοξυγενάσης, έχουν προστατευτική αγγειοδιασταλτική δράση κατά τον τραυματισμό ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (IRI). Ωστόσο η ταχεία εξάντληση των μορίων αυτών (οι προσταγλανδίνες είναι βραχύβια μόρια) οδηγεί σε ανεμπόδιστη αγγειοσυστολή, μειωμένη τοξική ροή αίματος και έξαρση της ισχαιμίας (Cowled & Fitridge, 2011).

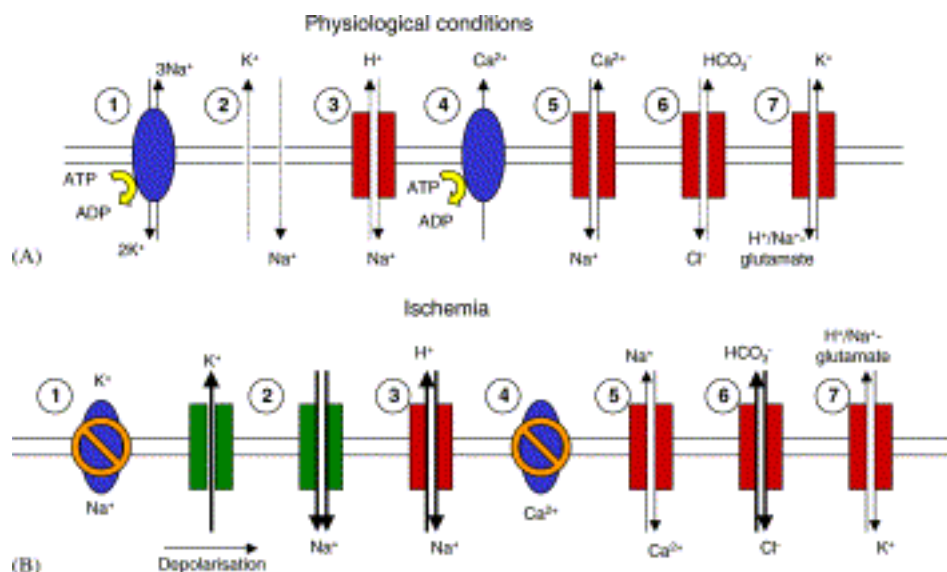
Τόσο η ισχαιμία, όσο και η επαναιμάτωση προκαλούν την έκφραση πολυάριθμων κυτοκινών, συμπεριλαμβανομένου του παράγοντα νέκρωσης όγκου-άλφα (TNF-α), ιντερλευκίνης-1 (IL-1), ιντερλευκίνης-6 (IL-6), ιντερλευκίνης-8 (IL-8) και παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF). Η συστηματική απελευθέρωση αυτών των κυτοκινών έχουν ως αποτέλεσμα την δημιουργία συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης (Cowled & Fitridge, 2011).

Οι ενδοθηλίνες αποτελούν πεπτιδικά αγγειοσυσταλτικά που παράγονται από το αγγειακό ενδοθήλιο. Η υποξία, οι αυξητικοί παράγοντες, η αγγειοτενσίνη II και η νοραδρεναλίνη διεγείρουν την παραγωγή τους με αποτέλεσμα την αγγειοσύσπαση που προκαλείται από το Ca^{2+} . Η ενδοθηλίνη-1 είναι αυξημένη μετά τον τραυματισμό ισχαιμίας/επαναιμάτωσης του σκελετικού μυός τόσο κατά τη φάση της ισχαιμίας όσο και της φάσης επαναιμάτωσης και μεσολαβεί στην τριχοειδική αγγειοσύσπαση, στη συσσώρευση ουδετερόφιλων και στις αλληλεπιδράσεις ουδετερόφιλων-ενδοθηλίου (Cowled & Fitridge, 2011).

2.3 Βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης

Κατά τη διαδικασία της βλάβης της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, η ισχαιμία και η υποξία προκαλούν ανεπαρκή παροχή κυτταρικής ενέργειας. Το χαμηλό επίπεδο του ATP μειώνει τη δραστηριότητα της ενεργειακά εξαρτώμενης Na^+/K^+ ATPάσης, οδηγώντας σε αύξηση του ενδοκυτταρικών επιπέδων Na^+ (Εικόνα 7). Η ανταλλαγή ιόντων $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{+2}$ αντισταθμίζει τη μείωση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού Na^+ . Για να διατηρηθεί το δυναμικό της μεμβράνης, η αντιστάθμιση της ανταλλαγής ιόντων οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού Ca^{+2} . Η δυσλειτουργία Ca^{+2} ATP/ Ca^{+2} - Mg^{+2} -ATPάσων επιδεινώνει αυτή την κατάσταση (Εικόνα 8). Ως αποτέλεσμα παρατηρείται υπερφόρτωση ασβεστίου, η οποία τραυματίζει τα κύτταρα, αυξάνοντας το επίπεδο των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS), ενεργοποιώντας φλεγμονώδη

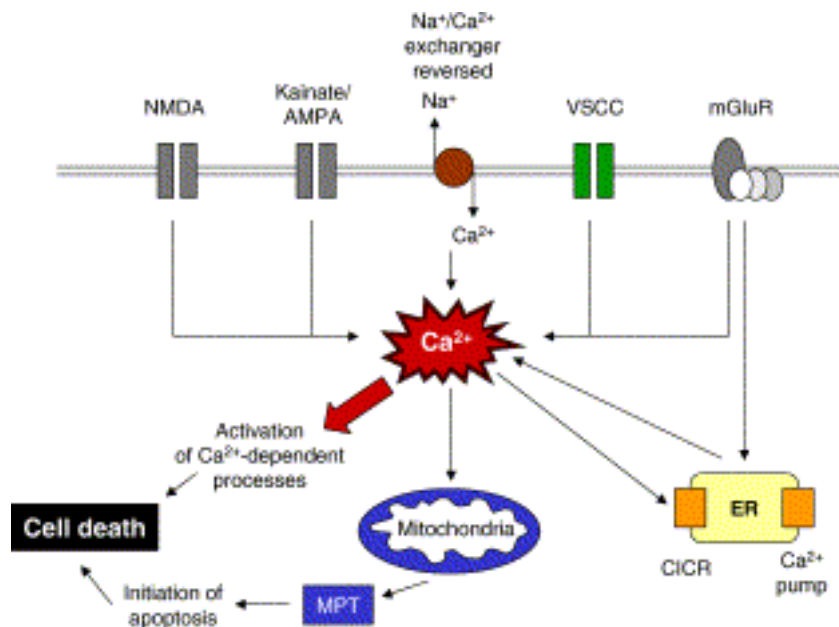
κύτταρα, επάγοντας κυτταρική απόπτωση, καταστρέφοντας τις κυτταρικές μεμβράνες και παρεμβαίνοντας στη λειτουργία των μιτοχονδρίων (Wu και συν., 2018).



Εικόνα 7. Επιλεγμένα συμβάντα νευρωνικής μεμβράνης αλλοιώθηκαν ως αποτέλεσμα απώλειας κυτταρικής ενέργειας σε υποξία/ισχαιμία αμφιβληστροειδούς. Υπάρχουν πολλές διαφορετικές αντλίες, κανάλια για ιόντα που συνδέονται με τη μεμβράνη, ενώ η λειτουργία αυτών συχνά αλληλοσυνδέεται. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η Na⁺-K⁺-ATPάση αντλεί ιόντα νατρίου σε αντάλλαγμα για ιόντα καλίου (1) τα οποία ρέουν ξανά πίσω στο πλάσμα σύμφωνα με τις βαθμίδες συγκέντρωσης τους (2). Τα ιόντα νατρίου ανταλλάσσονται επίσης με πρωτόνια με χαμηλό ρυθμό (3) για να διατηρηθούν τα επίπεδα του κυτταρικού pH. Η αντλία ασβεστίου χρησιμοποιεί ATP για να αφαιρέσει το ασβέστιο έναντι της βαθμίδας συγκέντρωσής του (4) και ο εναλλάκτης ασβεστίου-νατρίου αφαιρεί επίσης το ασβέστιο σε αντάλλαγμα για ιόντα νατρίου (5). Ο εναλλάκτης χλωρίου-διττανθρακικού αφαιρεί τα ανιόντα HCO₃⁻ με χαμηλό ρυθμό (6) σε συνδυασμό με τα πρωτόνια (3) και οι μηχανισμοί επαναπρόσληψης νευροδιαβιβαστών (7, π.χ. μεταφορέας γλουταμικού) λειτουργούν για την αφαίρεση νευροδιαβιβαστών από τη σύναψη μετά από διέγερση μετασυναπτικών υποδοχέων. Στην ισχαιμία η αντλία Na⁺-K⁺-ATPάση και η αντλία ασβεστίου (4) παύουν να λειτουργούν λόγω της έλλειψης διαθέσιμου ATP. Αυτό προκαλεί το άνοιγμα των διαύλων καλίου που κατευθύνονται προς τα έξω και των διαύλων νατρίου προς τα μέσα (2) καθώς και την αντιστροφή τόσο της ανταλλαγής ασβεστίου-νατρίου (5) όσο και της πρόσληψης νευροδιαβιβαστών (7). Τα πρωτόνια εκτοξεύονται γρήγορα (3) μαζί με τα ανιόντα HCO₃⁻ (6) για να προσπαθήσουν να διατηρήσουν ταχέως αυξανόμενο ενδοκυτταρικό pH και αυτές οι διεργασίες οδηγούν περαιτέρω στην εσωτερική κίνηση των ιόντων νατρίου (3) και ιόντων χλωρίου (6) μαζί με ωσμωτικά υποχρεωτικό νερό που μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό οίδημα. (Osbourne και συν., 2004, License Number: 5706410943891).

Η κυτταρική βλάβη που προκαλείται από παρατεταμένο τραυματισμό ισχαιμίας-επαναιμάτωσης μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση, αυτοφαγία, ή ακόμη και νέκρωση (Εικόνα 9). Η μέτρια βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης δύναται να προκαλέσει κυτταρική δυσλειτουργία με αυτοφαγία, ωστόσο υπάρχει περιθώριο ενεργοποίησης των συστημάτων ανάκτησης για επιβίωση. Μια μικρότερη διάρκεια τραυματισμού ισχαιμίας-επαναιμάτωσης μπορεί να ενεργοποιήσει προγράμματα κυτταρικής επιβίωσης για τον έλεγχο της δημιουργίας ROS, αλλά και της κυτταρικής βλάβης (Wu και συν., 2018).

Σε φυσιολογική κατάσταση, τα επίπεδα των νευροδιαβιβαστών στον εξωκυττάριο χώρο είναι πολύ χαμηλά, αφού οι νευρώνες δαπανούν την ενέργειά τους για την διατήρηση του δυναμικού της μεμβράνης. Κατά την διάρκεια της ισχαιμίας του αμφιβληστροειδούς όμως υπάρχει εξωκυτταρική συσσώρευση γλουταμικού, καθώς και απελευθέρωση του κύριου ανασταλτικού νευροδιαβιβαστή στον αμφιβληστροειδή, του GABA (Wu και συν., 2018).



Εικόνα 8. Ο ρόλος του ασβεστίου στον ισχαιμικό νευρωνικό θάνατο. Ως αποτέλεσμα της ισχαιμίας, τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ασβεστίου αυξάνονται και μάλιστα με διάφορους μηχανισμούς. Τα αυξημένα ενδοκυτταρικά επίπεδα ασβεστίου συμβάλουν στην ενεργοποίηση αρκετών ενζύμων που εξαρτώνται από αυτό το κατιόν για την πλήρη δραστηριότητά τους (π.χ. πρωτεϊνική κινάση C, συνθάση μονοξειδίου του αζώτου). Τα ένζυμα αυτά είναι υπεύθυνα για αλλαγές που οδηγούν στην διάλυση των κυτταρικών ομοιοστατικών μηχανισμών, οι οποίοι δύνανται με την σειρά τους να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο. Επιπλέον, όταν τα επίπεδα ασβεστίου αυξάνονται στο κυτταρόπλασμα, τα μιτοχόνδρια προσπαθούν να προσλάβουν αυτό το κατιόν. Αυτό οδηγεί τελικώς σε μετάβαση της μιτοχονδριακής διαπερατότητας, αλλά και σε κυτταροπλασματική απελευθέρωση παραγόντων που προάγουν την έναρξη του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου. (Osbourne και συν., 2004, License Number: 5707171339728)

Κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης, τα αυξημένα επίπεδα νευροδιαβιβαστών στον εξωκυτταρικό χώρο θα ενεργοποιήσουν τους υποδοχείς τους και θα συμβάλουν με συγκεκριμένους τρόπους στο θάνατο ή την επιβίωση καθορισμένων νευρώνων. Οι επιστήμονες πιστεύουν πως η ιδιαίτερη ευαισθησία των νευρώνων του εσωτερικού αμφιβληστροειδούς, και ειδικότερα των γαγγλιακών κυττάρων, οφείλεται στο ότι αυτά τα κύτταρα εκφράζουν υψηλά επίπεδα ιοντοτροπικών υποδοχέων γλουταμινικού. Το γλουταμικό θα υπερενεργοποιήσει αυτούς τους υποδοχείς προκαλώντας υπερβολική εκπόλωση και τελικά κυτταρικό θάνατο.

Αντιθέτως, ανασταλτικοί νευροδιαβιβαστές όπως το GABA «ακυρώνουν» την επίδραση του γλουταμικού στους νευρώνες, επειδή προκαλούν υπερπόλωση και εξουδετερώνουν την εκπόλωση

που προκαλείται από το γλουταμικό. Επιπλέον, η ενίσχυση των επιπέδων των προσδεμάτων που διεγείρουν ανασταλτικούς υποδοχείς αναμένεται να παρέχει προστασία στους νευρώνες που περιέχουν αυτούς τους υποδοχείς. Επομένως εξάγεται το συμπέρασμα ότι το GABA μπορεί να είναι νευροπροστατευτικό. Ωστόσο, μέχρι και σήμερα η συνολική επίδραση των διαφορετικών εξωκυτταρικών νευροδιαβιβαστών στη φάση της επαναιμάτωσης φαίνεται να είναι αρκετά περίπλοκη (Obsonre και συν., 2003).

Εικόνα 9. Σύνοψη των βασικών γεγονότων κατά την διαδικασία ισχαιμικού νευροεκφυλισμού του αμφιβληστροειδούς. Η διακοπή παροχής αίματος στον αμφιβληστροειδή οδηγεί σε ισχαιμία του ιστού, η οποία με την σειρά της προκαλεί ταχεία αποτυχία παραγωγής ενέργειας και επακόλουθα συμβάντα όπως αναγράφονται στο σχήμα. Τα βασικά βήματα περιλαμβάνουν την διακοπή λειτουργίας της αντλίας Na^+/K^+ -ATPάσης, την εκπόλωση της μεμβράνης, την κυτταροπλασματική συσσώρευση ιόντων νατρίου και ασβεστίου και τον σχηματισμό επιζήμιων ελεύθερων ριζών. Η αθροιστική κυτταρική απόκριση αυτών των διεργασιών οδηγεί τελικώς στον κυτταρικό θάνατο. (Osbourne και συν., 2004, License Number: 5707171339728)

Ως γνωστόν, η αυξημένη ενδοφθάλμια πίεση αποτελεί σημαντικότατο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη γλαυκωματώδους οπτικής νευροπάθειας. Η μείωσή της άλλωστε με ιατρικά ή και

χειρουργικά μέσα έχει καταστεί ως η βάση της θεραπείας για το γλαύκωμα. Ωστόσο, παρά την επιτυχή μείωση της πίεσης, ορισμένα άτομα εξακολουθούν να βιώνουν συνεχή εξέλιξη της γλαυκωματώδους οπτικής νευροπάθειας, που οδηγεί τελικώς σε απώλεια οπτικού πεδίου. Μια εύλογη υπόθεση είναι ότι οι οξείες αιχμές της ενδοφθάλμιας πίεσης καθώς και οι παροδικές αυξήσεις δεν ανιχνεύονται κατά την κλινική εξέταση συμβάλλοντας έτσι στην εξέλιξη της νόσου.

Η μεταβλητότητα της ενδοφθάλμιας πίεσης αποτελεί ερευνητικό ενδιαφέρον και έχει μελετηθεί σε μοντέλα πειραματικού γλαυκώματος, αλλά και μοντέλα ισχαιμίας-επαναιμάτωσης τόσο σε πρωτεύοντα όσο και σε τρωκτικά. Επιστήμονες μετά από επισκληρική υπερτονική ένεση φυσιολογικού ορού σε αρουραίους, παρατήρησαν ότι η πλειοψηφία των ζώων παρουσίαζε μεγάλες αυξήσεις της ενδοφθάλμιας πίεσης κατά τη νυχτερινή φάση, αλλά και τραυματισμό του οπτικού νεύρου, αποδεικνύοντας έτσι ότι οι επαναλαμβανόμενες αιχμές της ενδοφθάλμιας πίεσης μπορούν να οδηγήσουν στην βλάβη του οπτικού νεύρου.

Πολύχρονες μελέτες και πειράματα έδειξαν πως σε μοντέλα μελέτης ισχαιμίας-επαναιμάτωσης τα αυξημένα επίπεδα ενδοφθάλμιας πίεσης καταστέλλουν πλήρως την οφθαλμική ροή αίματος. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η λειτουργία του αμφιβληστροειδούς, όπως μετράται με το ηλεκτροαμφιβληστροειδογράφημα (ERG), εκμηδενίζεται κατά την περίοδο της ισχαιμίας. Ωστόσο, σε πειραματικά μοντέλα γλαυκώματος τρωκτικών, οι αυξημένες ενδοφθάλμιες πιέσεις που παρατηρήθηκαν, ακόμη και κατά τη διάρκεια οξέων αιχμών, σπάνια είναι τόσο υψηλές ώστε να αποφράξουν εντελώς τη ροή του αίματος στον αμφιβληστροειδή (Bui και συν., 2005).

Σκοπός

Σκοπό της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας αποτέλεσε η σύγκριση *ex vivo* και *in vivo* μοντέλων αμφιβληστροειδικής βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης σε επίμυες.

Συγκεκριμένα, εστιάσαμε στην σύγκριση της επίδρασης της *ex vivo* και της *in vivo* αμφιβληστροειδικής επαναιμάτωσης στη μορφολογία των αστροκυττάρων 4 ώρες μετά την εφαρμογή ισχαιμίας διάρκειας μιας ώρας με σκοπό να διευκρινιστεί εάν το *ex vivo* μοντέλο θα μπορούσε να αποτελέσει αξιόπιστο μοντέλο για τη μελέτη των πρώιμων σταδίων της βλάβης και την ανίχνευση πιθανών φαρμακολογικών χειρισμών για την αντιμετώπιση της.

Μεθοδολογία

1 Πειραματόζωα

Στην συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία έγινε χρήση ενήλικων αρσενικών επίμυων Wistar ηλικίας ενός έως ενάμιση μηνών. 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).

2 *In vivo* μοντέλο ισχαιμίας/επαναιμάτωσης

Αρχικά με μια βελόνα 30 gauge συνδεδεμένη με φιάλη 1L στείρου φυσιολογικού ορού πραγματοποιήθηκε καθετηριασμός στο πρόσθιο θάλαμο του ενός ματιού αναισθητοποιημένου ζώου μετά από ενδομυϊκή χορήγηση μείγματος 20 mg/kg τιλεταμίνης, 20 mg/kg ζολαζεπάμης (Zoletil®).

Στη συνέχεια, η ενδοφθάλμια πίεση αυξήθηκε στην τιμή των 110 mmHg με ανύψωση του ορού σε ύψος 146,7 cm πάνω από το ζώο. Η αύξηση της πίεσης διατηρήθηκε για 60 λεπτά προκειμένου να προκληθεί ισχαιμική βλάβη. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε καθετηριασμός και του άλλου ματιού του ζώου χωρίς ωστόσο να αυξηθεί η πίεση. Μετά το πέρας της μίας ώρας αφαιρέθηκαν οι βελόνες και πραγματοποιήθηκε επαναιμάτωση του ιστού για 4 ώρες.

Κατόπιν το ζώο θανατώθηκε δια αποκεφαλισμού και έγινε απομόνωση των δυο οφθαλμών και συλλογή του αμφιβληστροειδή.

Επιπλέον, συλλέχθηκαν οι αμφιβληστροειδείς ενός ακόμα ζώου (ζώο ελέγχου).

3 Ανοσοϊστοχημεία

Όπως προαναφέρθηκε μετά την απομόνωση των ιστών οι αμφιβληστροειδείς τοποθετήθηκαν σε διηθητικό χαρτί και πραγματοποιήθηκαν τέσσερις ακτινωτές τομές με νυστέρι κοντά στο οπτικό νεύρο προς την περιφέρεια, με σκοπό να γίνουν όσο το δυνατόν πιο επίπεδοι.

Στην συνέχεια οι ιστοί μονιμοποιήθηκαν με 4% παραφορμαλδεϋδης (0,1M PB) για 30 λεπτά. Ακολούθησε δυο φορές ξέπλυμα για δεκαπέντε λεπτά με διάλυμα 0,1M PBS (pH 7,4).

Με τη βοήθεια ειδικού πινέλου οι ιστοί διαχωρίστηκαν από το διηθητικό χαρτί και τοποθετήθηκαν ξανά στο πιάτο. Ακολούθησε επώαση του ιστού με αντίσωμα κατά του GFAP (1/500, mouse anti-GFAP, Sigma: MAB 360) σε διάλυμα πρώτου αντισώματος (Ab-I) για 72 ώρες, σε θερμοκρασία 4° C, υπό συνεχή ανακίνηση.

Την τέταρτη μέρα, αφότου παρήλθαν οι εβδομήντα δύο ώρες πραγματοποιήθηκε αφαίρεση του αντισώματος και τρεις πλύσεις των ιστών με PBS, επί 45min η κάθε μια, στους 4° C, υπό συνεχή ανακίνηση. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε επώαση των ιστών με το δεύτερο αντίσωμα (donkey anti-mouse) για 18 ώρες.

Την πέμπτη μέρα πραγματοποιήθηκαν τρεις πλύσεις των ιστών, επί σαράντα πέντε λεπτά η κάθε μία, στους 4° C, υπό συνεχή ανακίνηση. Έπειτα έγινε επώαση με 40μM DAPI για τριάντα λεπτά, υπό συνεχή ανακίνηση, σε θερμοκρασία δωματίου. Οι ιστοί τοποθετήθηκαν στην αντικειμενοφόρο πλάκα, η οποία σφραγίστηκε με καλυπτρίδα.

Στην συνέχεια ακολούθησε η παρατήρηση και η φωτογράφησή τους στο μικροσκόπιο φθορισμού.

4 *Ex vivo* μοντέλο ισχαιμίας/επαναιμάτωσης

Δεν πραγματοποιήθηκαν πειράματα *ex vivo* βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης αμφιβληστροειδούς αλλά χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα (φωτογραφίες) από προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου (βλ. Αγραφιώτης, 2023).

5 Ανάλυση εικόνας

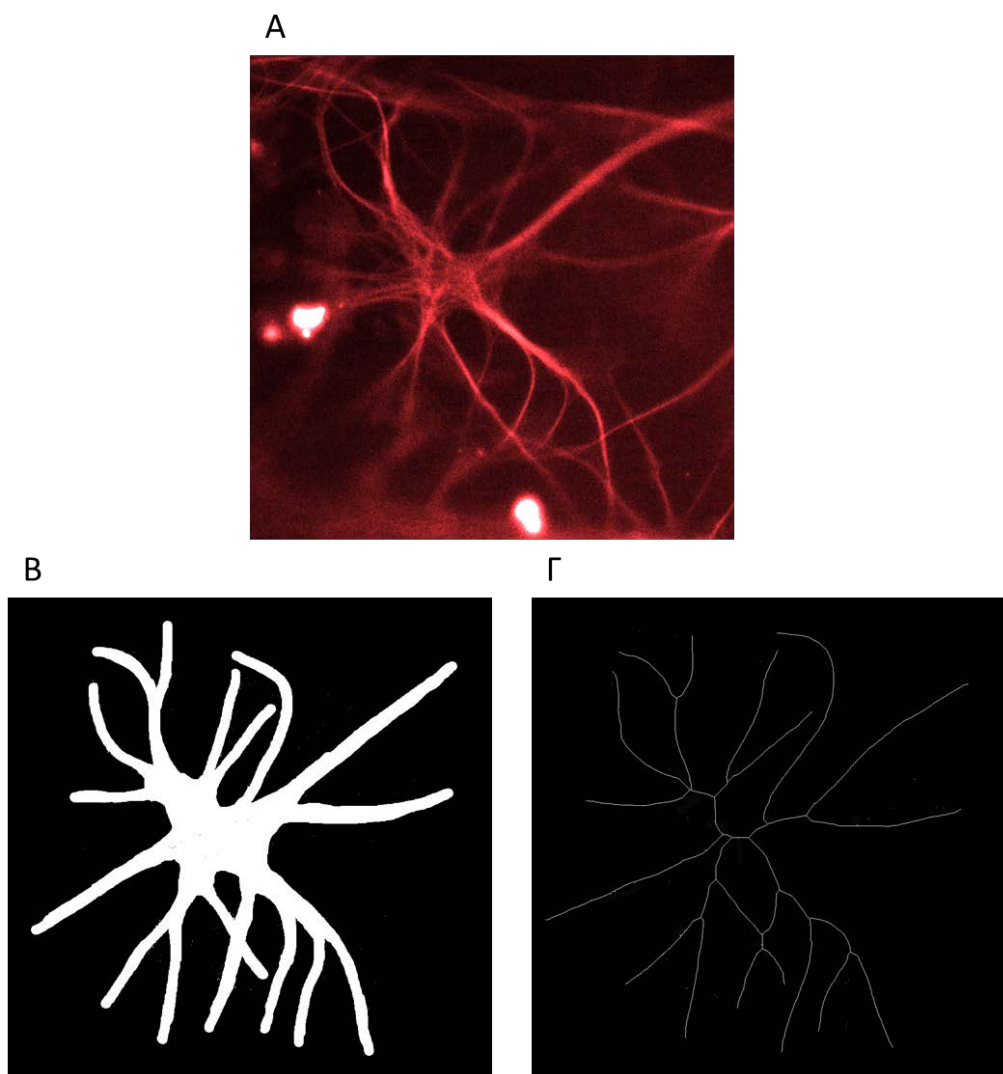
Η επεξεργασία των φωτογραφιών που ληφθήκαν έλαβε χώρα με την χρήση του προγράμματος ImageJ (<https://imagej.net/ij/>). Με την επεξεργασία των φωτογραφιών κατέστη δυνατή η μέτρηση των διακλαδώσεων και των αποφύσεων των αστροκυττάρων των ιστών.

Συγκεκριμένα, αρχικά διαχωρίστηκαν τα χρώματα της αρχικής εικόνας (Image>Color>Split channels) και επιλέχθηκε η εικόνα με το κόκκινο χρώμα (Εικόνα 10Α). Κατόπιν με τη βοήθεια του polygon selection τέθηκαν τα επιθυμητά όρια γύρω από το αστροκύτταρο. Ακολούθησε αντιγραφή της οριοθετημένης περιοχής (ctrl+C), άνοιγμα νέου παραθύρου (ctrl+N) και επικόλληση της επιλεγμένης περιοχής σε νέο παράθυρο (ctrl+V).

Έπειτα ρυθμίστηκε η φωτεινότητα της εικόνας (Image>Adjust>Brightness/Contrast) σε τιμές τέτοιες ώστε να διακρίνονται όσο το δυνατό καλύτερα οι αποφύσεις/διακλαδώσεις του αστροκυττάρου. Ακολούθησε η ρύθμιση του κατώφλιου σήματος (Image>Adjust>Threshold) και η

μετατροπή της εικόνας σε ασπρόμαυρη (Process>Binary>Make Binary, Εικόνα 10B). Σε περίπτωση που υπήρχε ασυνέχεια των αποφύσεων αυτές «συνδέθηκαν» με τη χρήση του εργαλείου μολυβιού.

Τέλος, το κάθε αστροκύτταρο μετατράπηκε σε σκελετό (Process>Binary>Skeletonize, Εικόνα 10Γ) και έγινε η ανάλυση του (Analyze>Skeleton>Analyze 3D). Συλλέχθηκαν οι πληροφορίες σχετικές με τον αριθμό και το μήκος των αποφύσεων (branches) των αστροκυττάρων καθώς και αυτές των διακλαδώσεων (junctions).



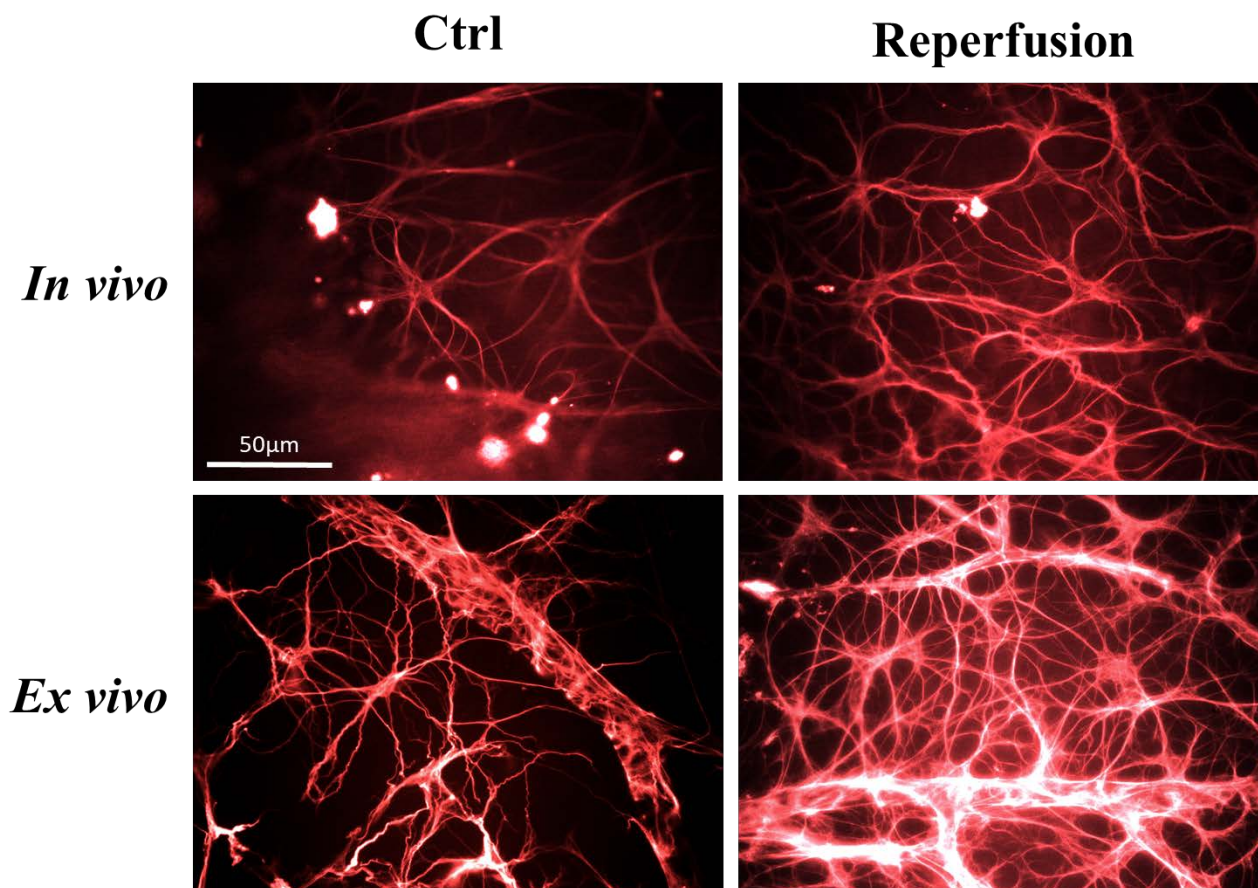
Εικόνα 10: Στάδια τροποποίησης της εικόνας των αστροκυττάρων σε σκελετό. Α. Επιλέγεται η φωτογραφία που προκύπτει από το χρωματικό κανάλι του σημασμένου δεύτερου αντισώματος μας (στην περίπτωση μας το κόκκινο) Β. ρυθμίζεται η φωτεινότητα της φωτογραφίας ώστε να είναι διακριτές οι αποφύσεις του κυττάρου που μας ενδιαφέρει και μετατρέπεται σε ασπρόμαυρη Γ. Το κάθε κύτταρο μετατρέπεται σε σκελετό κατάλληλο για την ανάλυση των αποφύσεων και διακλαδώσεων του.

6 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Jamovi 2.4.11 (<https://www.jamovi.org>) και μονόδρομη ανάλυση διακύμανσης (One-way ANOVA).

Αποτελέσματα

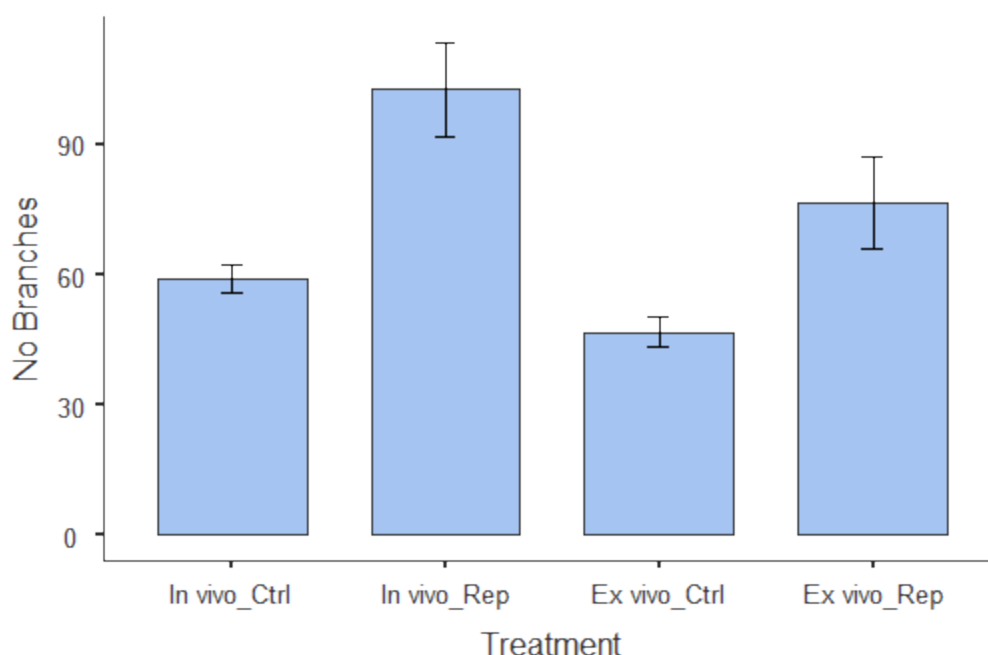
1. Σύγκριση της επίδρασης της *ex vivo* και *in vivo* βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης στη μορφολογία των αστροκυττάρων



Εικόνα 11: Σύγκριση της επίδρασης της *ex vivo* και *in vivo* βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης στη μορφολογία των αστροκυττάρων Κλίμακα 50μm

Στην παραπάνω εικόνα (Εικόνα 11) παρουσιάζονται ενδεικτικές φωτογραφίες ιστών που είχαν είτε παραμείνει σε φυσιολογικές (Ctrl) *in vivo* και *ex vivo* συνθήκες είτε ιστοί στους οποίους είχε προκληθεί ισχαιμία για μια ώρα και επαναιμάτωση (Reperfusion) διάρκειας 4 ωρών *in vivo* και *ex vivo*.

1.1 Αριθμός αποφύσεων

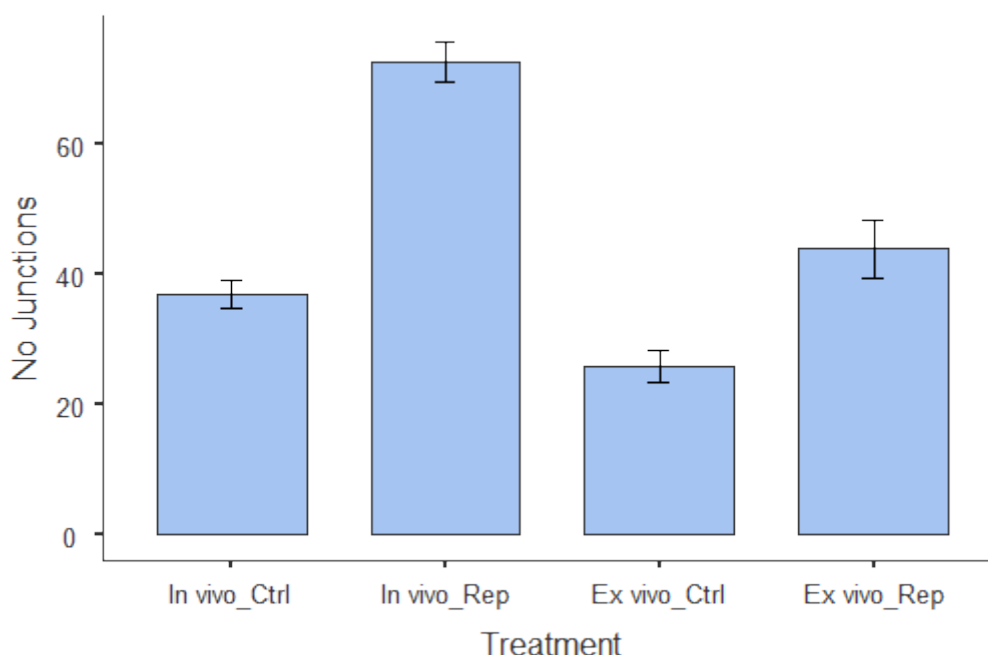


Σχήμα 1: Σύγκριση της επίδρασης της *ex vivo* και *in vivo* βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης στον αριθμό των αποφύσεων (No Branches). Συντμήσεις: Ctrl: φυσιολογικοί ιστοί Rep: (reperfusion) ιστοί μετά από τέσσερις ώρες επαναιμάτωσης η οποία ακολούθησε μία ώρα ισχαιμίας

Στο παραπάνω διάγραμμα (Σχήμα 1) γίνεται η σύγκριση του αριθμού των αποφύσεων (No Branches) των αστροκυττάρων στις διάφορες *ex vivo* και *in vivo* συνθήκες ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (Rep, 4 ώρες) σε σχέση με τις αντίστοιχες φυσιολογικές (Ctrl) συνθήκες. Ο αριθμός των αποφύσεων των αστροκυττάρων σε φυσιολογικές *in vivo* συνθήκες (In vivo_Ctrl) ήταν $59,1 \pm 12,1$ (μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση, $n=15$ κύτταρα) ενώ σε *ex vivo* συνθήκες $46,8 \pm 11,3$ ($n=10$). Τέσσερις ώρες μετά την επαναιμάτωση του ιστού ο αριθμός των αποφύσεων των αστροκυττάρων ήταν $102,7 \pm 18,9$ ($n=3$) και $76,6 \pm 24,3$ ($n=5$) σε *in vivo* και *ex vivo* συνθήκες, αντίστοιχα.

Μετά από στατιστική ανάλυση μονόδρομης διακύμανσης διαπιστώθηκε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών [$F(3, 2822) = 13.1, p < 0,001$]. Συγκεκριμένα διαπιστώθηκε μετά από *post hoc* ανάλυση κατά Tukey στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0,001$) στον αριθμό των αποφύσεων *in vivo* μεταξύ φυσιολογικών συνθηκών και συνθηκών επαναιμάτωσης. Αντίστοιχη αύξηση του αριθμού των αποφύσεων παρατηρήθηκε και στα *ex vivo* πειράματα με στατιστικώς σημαντική αύξηση του αριθμού τους μετά από 4 ώρες επαναιμάτωσης των ιστών ($p = 0,005$). Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των φυσιολογικών συνθηκών (*ex vivo* vs. *in vivo*: $p = 0.194$) ή των συνθηκών επαναιμάτωσης (*ex vivo* vs. *in vivo*: $p = 0.093$).

1.2 Αριθμός διακλαδώσεων



Σχήμα 2: Σύγκριση της επίδρασης της *ex vivo* και *in vivo* βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης στον αριθμό των διακλαδώσεων (No Junctions). Συντμήσεις: Ctrl: φυσιολογικοί ιστοί Rep: (reperfusion) ιστοί μετά από τέσσερις ώρες επαναιμάτωσης η οποία ακολούθησε μία ώρα ισχαιμίας

Στο παραπάνω διάγραμμα (Σχήμα 2) γίνεται η σύγκριση του αριθμού των διακλαδώσεων (No Junctions) των αστροκυττάρων στις διάφορες *ex vivo* και *in vivo* συνθήκες ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (Rep, 4 ώρες) σε σχέση με τις αντίστοιχες φυσιολογικές (Ctrl) συνθήκες. Ο αριθμός των διακλαδώσεων των αστροκυττάρων σε φυσιολογικές *in vivo* συνθήκες (In vivo_Ctrl) ήταν $36,9 \pm 8,35$ (n=15) ενώ σε *ex vivo* συνθήκες $26,0 \pm 7,83$ (n=10). Τέσσερις ώρες μετά την επαναιμάτωση του ιστού ο αριθμός των διακλαδώσεων των αστροκυττάρων ήταν $72,7 \pm 5,51$ (n=3) και $44,0 \pm 10,12$ (n=5) σε *in vivo* και *ex vivo* συνθήκες, αντίστοιχα.

Μετά από στατιστική ανάλυση μονόδρομης διακύμανσης διαπιστώθηκε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών [$F(3, 1747,4) = 25,3$, $p < 0,001$]. Συγκεκριμένα διαπιστώθηκε μετά από *post hoc* ανάλυση κατά Tukey στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0,001$) στον αριθμό των διακλαδώσεων *in vivo* μεταξύ φυσιολογικών συνθηκών και συνθηκών επαναιμάτωσης. Αντίστοιχη αύξηση του αριθμού των διακλαδώσεων παρατηρήθηκε και στα *ex vivo* πειράματα με στατιστικώς σημαντική αύξηση του αριθμού τους μετά από 4 ώρες επαναιμάτωσης των ιστών ($p = 0,002$). Αξίζει να σημειωθεί ότι παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των φυσιολογικών συνθηκών (*ex vivo* vs. *in vivo*: $p = 0,016$) και των συνθηκών επαναιμάτωσης (*ex vivo* vs. *in vivo*: $p < 0,001$).

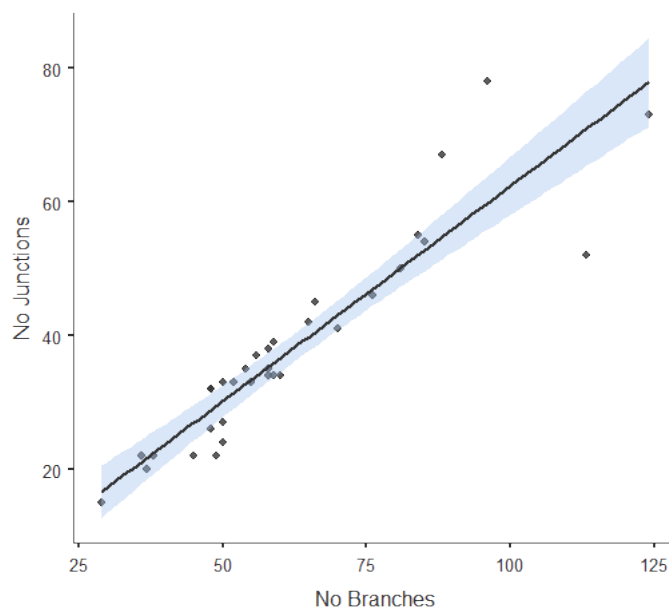
1.3 Συσχέτιση αριθμού αποφύσεων & διακλαδώσεων

Πίνακας 1: Συσχέτισης (Correlation Matrix) αριθμού αποφύσεων (No Branches) και διακλαδώσεων (No Junctions)

		No Branches	No Junctions
No Branches	Pearson's r	—	
	df	—	
	p-value	—	
No Junctions	Pearson's r	0.920 ***	—
	df	31	—
	p-value	< .001	—

Note. * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

Ο πίνακας συσχέτισης (correlation matrix, Πίνακας 1) αποτελεί μια στατιστική τεχνική που χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της σχέσης μεταξύ δύο μεταβλητών σε ένα σύνολο δεδομένων. Όπως διαφαίνεται από τον παρακάτω πίνακα ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης Pearson έχει τιμή 0,917 που προσεγγίζει την τιμή +1, άρα οι δυο μεταβλητές (αποφύσεων και διακλαδώσεις) εμφανίζουν σχεδόν πλήρη θετική γραμμική συσχέτιση. Αυτό αναδεικνύεται και στο διάγραμμα συσχέτισης (Σχήμα 3).



Σχήμα 3: Συσχέτιση αριθμού διακλαδώσεων και αριθμού αποφύσεων

Συζήτηση

Η βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης πυροδοτεί ένα καταρράκτη γεγονότων που οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο και τελικά αποτελεί αιτία διαταραχής όρασης και πιθανής τύφλωσης. Τα αστροκύτταρα αποτελούν κύτταρα της γλοίας οι λειτουργίες των οποίων σχετίζονται με την αποθήκευση του γλυκογόνου για την παροχή γλυκόζης στους νευρώνες, την διατήρηση της ιοντικής ομοιόστασης με την ρύθμιση των εξωκυττάρων επιπέδων καλίου, καθώς και τον μεταβολισμό νευροδιαβιβαστών όπως το GABA. Στην συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία εστιάσαμε στην σύγκριση της επίδρασης, *ex vivo* και *in vivo* αμφιβληστροειδικής επαναιμάτωσης στη μορφολογία των αστροκυττάρων 4 ώρες μετά την εφαρμογή ισχαιμίας διάρκειας μιας ώρας.

Συγκεκριμένα, προκειμένου να εξακριβωθούν οι φαινοτυπικές αλλαγές που χαρακτηρίζουν την ενεργοποίηση των αστροκυττάρων πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική χρώση των αστροκυττάρων με τη χρήση αντισώματος έναντι της όξινης πρωτεΐνης των ενδιάμεσων ινιδίων της γλοίας (GFAP), μια πρωτεΐνη-δείκτη των αστροκυττάρων και των κυττάρων Müller και ελέγχθηκαν: ο αριθμός των αποφύσεων και ο αριθμός και των διακλαδώσεων των αστροκυττάρων. Διαπιστώθηκε ότι, τέσσερις ώρες μετά την επαναιμάτωση του ιστού, υπήρξε φαινοτυπική αλλαγή (*ενεργοποίηση*) των αστροκυττάρων, καθώς αυξήθηκαν και οι δυο παράμετροι που εξετάστηκαν σε σχέση με τους ιστούς ελέγχου τόσο στο *in vivo* όσο και στο *ex vivo* πείραμα. Στατιστικώς μάλιστα, οι δυο αυτές μεταβλητές (αποφύσεις και διακλαδώσεις) παρουσίασαν πλήρη γραμμική συσχέτιση μεταξύ τους. Προκύπτει επομένως το συμπέρασμα ότι η βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης η οποία προκλήθηκε και στα δύο μοντέλα που εφαρμόσαμε συνεπάγεται ενεργοποίηση των αστροκυττάρων η οποία είναι ήδη ορατή μετά από λίγες μόλις ώρες επαναιμάτωσης του ιστού.

Η φαινοτυπική αλλαγή των αστροκυττάρων του αμφιβληστροειδούς ονομάζεται «αντιδραστική γλοιώση». Η αντιδραστική γλοιώση, είναι μια φλεγμονώδης απόκριση που χαρακτηρίζεται από τον πολλαπλασιασμό μικρογλοίας και αστροκυττάρων καθώς και από αστροκυτταρική υπερτροφία μετά από τραυματισμό στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ, Gao και συν., 2013). Η άμεση ενεργοποίηση των αστροκυττάρων μετά από τη βλάβη τις ισχαιμίας/επαναιμάτωσης μπορεί να σχετίζεται με τις προστατευτικές ιδιότητες των αστροκυττάρων, όπως προτείνουν οι Linnerbauer και Rothhammer (2020). Για παράδειγμα, υπάρχει το ενδεχόμενο τα συγκεκριμένα κύτταρα να ενεργοποιούνται εξαιτίας της ικανότητας τους να μεταφέρουν λειτουργικά μιτοχόνδρια στους νευρώνες, προκειμένου να συμβάλουν στην προστασία τους, αλλά και στην καθυστέρηση κυτταρικού θανάτου σε καταστάσεις βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (Hayakawa και συν., 2016).

Η φαινοτυπική αλλαγή των αστροκυττάρων, είναι μια περίπλοκη διαδικασία που παρόλο που έχει ευεργετικά αποτελέσματα στην αποκατάσταση των τραυματισμών, μπορεί να επηρεάσει και αρνητικά το ΚΝΣ. Συγκεκριμένα, τα αστροκύτταρα δύναται να απελευθερώσουν μια πληθώρα

σηματοδοτικών μορίων για να ανατροφοδοτήσουν τα ίδια ή για να επικοινωνήσουν με γειτονικά κύτταρα όπως νευρώνες, ολιγοδενδροκύτταρα και μικρογλοία. Μερικά όμως από τα μόρια που απελευθερώνονται από τα αστροκύτταρα κατά την ενεργοποίησή τους, μπορεί να συμβάλουν στην επαγωγή μιας ακόμη πιο επίμονης φλεγμονώδους απόκρισης κατά τη διάρκεια της χρόνιας φάσης τραυματισμού του ΚΝΣ (Gao και συν., 2013, Miao και συν., 2023). Πράγματι, ο Guttenplan και οι συνεργάτες του (2020) σε ένα μοντέλο γλαυκώματος ποντικού παρατήρησαν ότι η πρόληψη του σχηματισμού νευροφλεγμονωδών αντιδραστικών αστροκυττάρων αποτρέπει το θάνατο των γαγγλιακών κυττάρων που συνήθως παρατηρείται μετά την μακροχρόνια ενεργοποίηση των αστροκυττάρων (Guttenplan και συν., 2020).

Αξίζει να σημειωθεί ότι, σε ότι αφορά στις διακλαδώσεις, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερος αριθμός διακλαδώσεων στο *in vivo* πείραμα σε σχέση με το *ex vivo* τόσο υπό φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε συνθήκες επαναιμάτωσης. Αν και η στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερη αύξηση του αριθμού των διακλαδώσεων που παρατηρείται κατά την *in vivo* επαναιμάτωση σε σύγκριση με την *ex vivo* επαναιμάτωση θα μπορούσε να δικαιολογηθεί από την επιπρόσθετη (επιπλέον της ισχαιμίας) βλάβη που πιθανά προκαλεί η μηχανική πίεση του ιστού, περεταίρω μελέτες είναι απαραίτητες προκειμένου να ερμηνευθεί η αντίστοιχη διαφοροποίηση μεταξύ των δύο μοντέλων υπό φυσιολογικές συνθήκες. Ένας πιθανός λόγος αυτής της διαφοροποίησης θα μπορούσε να είναι το γεγονός ότι ως ιστούς ελέγχου στο *in vivo* πείραμα χρησιμοποιήσαμε και το δεύτερο μάτι του ζώου στο οποίο δεν είχε προκληθεί αύξηση της ενδοφθάλμιας πίεσης. Υπάρχουν μελέτες οι οποίες υποστηρίζουν ότι υπάρχει άμεση επικοινωνία μεταξύ των αμφιβληστροειδών ενήλικων αρουραίων γεγονός που σημαίνει ότι η αύξηση της πίεσης στο ένα μάτι θα μπορούσε ίσως να επηρεάσει και το άλλο. Πράγματι, ο Nadal-Nicolás και οι συνεργάτες του (2015) διαπίστωσαν ότι στον ρινικό αμφιβληστροειδή ενήλικων (2 μηνών) Sprague Dawley αρουραίων υπήρχαν, αν και σπάνια, γαγγλιακά κύτταρα που προβάλλουν από αμφιβληστροειδή σε αμφιβληστροειδή (ret-ret RGCs). Αντίστοιχες παρατηρήσεις έκανε και η Avellaneda-Chevrier και οι συνεργάτες της (2015) σε Long-Evans αρουραίους 1,5-2 μηνών και ο Tang και οι συνεργάτες του (2016) σε Brown-Norway αρουραίους 6-8 μηνών.

Η φαινοτυπική αλλαγή των αστροκυττάρων του αμφιβληστροειδούς που παρατηρήσαμε με τη χρήση των δύο μοντέλων υποδηλώνει ότι όχι μόνο και τα δύο μοντέλα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη πιθανών φαρμακολογικών στόχων για την αντιμετώπιση της αμφιβληστροειδικής βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης κατά τα πρώτα στάδια της αλλά και ότι, το *ex vivo* μοντέλο θα μπορούσε να αποτελέσει μοντέλο-επιλογής σε μελέτες που αφορούν τα αρχικά στάδια επαναιμάτωσης του ιστού μια με αυτό τον τρόπο αποφεύγεται η αγωνία ή/και ο πόνος που πιθανά βιώνουν τα ζώα με την εφαρμογή του ευρέως χρησιμοποιούμενου *in vivo* μοντέλου. Το

γεγονός αυτό ευθυγραμμίζεται με τις αρχές της βελτιστοποίησης των πειραματικών διαδικασιών που αφορούν πειραματόζωα στο πλαίσιο των 3Rs (*Replace, Refine, Reduce*).

Τέλος, σε ότι αφορά στους περιορισμούς της συγκεκριμένης μελέτης, θα ήταν σκόπιμο να αναφέρουμε ότι, το *in vivo* πείραμα μας αποτελούσε μια πιλοτική μελέτη (*εφαρμόστηκε σε μόλις ένα ζώο*). Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι οι ιστοί φωτογραφήθηκαν με συμβατικό μικροσκόπιο φθορισμού και όχι με τη βοήθεια συνεστιακής μικροσκοπίας γεγονός που περιορίσε τη δυνατότητα μας να αναλύσουμε μεγάλο αριθμό αστροκυττάρων.

Συμπερασματικά, τέσσερις ώρες επαναιμάτωσης μετά από μία ώρα αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας προκαλούν φαινοτυπική αλλαγή στα αστροκύτταρα (*αστρογλοΐωση*) τόσο στο *ex vivo* όσο και στο *in vivo* μοντέλα της βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης του αμφιβληστροειδούς που δοκιμάστηκαν, γεγονός που υποδηλώνει τη χρησιμότητα της στη μελέτη πιθανών φαρμακευτικών στόχων. Ενώ το *ex vivo* μοντέλο εξακολουθεί να απαιτεί ζώα, ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια της επαναιμάτωσης, προσφέρει μια πολύτιμη προσέγγιση για τις αρχικές μελέτες ανακάλυψης φαρμάκων, εξαλείφοντας τη χειρουργική διαδικασία που χρησιμοποιείται στο *in vivo* μοντέλο και κατά συνέπεια μειώνοντας τον συνολικό πόνο και την αγωνία που πιθανά βιώνουν τα ζώα. Αυτό ευθυγραμμίζεται με τις αρχές της βελτίωσης στο πλαίσιο 3R για ηθική έρευνα σε ζώα.

Βιβλιογραφία

- Avellaneda-Chevrier, V. K., Wang, X., Hooper, M. L., & Chauhan, B. C. (2015). The retino-retinal projection: Tracing retinal ganglion cells projecting to the contralateral retina. *Neuroscience letters*, 591, 105–109. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.02.033>
- Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S. N., Osborne, N. N., & Reichenbach, A. (2006). Müller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in retinal and eye research*, 25(4), 397–424. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2006.05.003>
- Bui, B. V., Edmunds, B., Cioffi, G. A., & Fortune, B. (2005). The gradient of retinal functional changes during acute intraocular pressure elevation. *Investigative ophthalmology & visual science*, 46(1), 202–213. <https://doi.org/10.1167/iovs.04-0421>
- Cowled P, Fitridge R. Pathophysiology of Reperfusion Injury. In: Fitridge R, Thompson M, eds. Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists. Adelaide (AU): University of Adelaide Press; 2011
- Gao, Z., Zhu, Q., Zhang, Y., Zhao, Y., Cai, L., Shields, C. B., & Cai, J. (2013). Reciprocal modulation between microglia and astrocyte in reactive gliosis following the CNS injury. *Molecular neurobiology*, 48(3), 690–701. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8460-4>
- García-Bermúdez, M. Y., Freude, K. K., Mouhammad, Z. A., van Wijngaarden, P., Martin, K. K., & Kolko, M. (2021). Glial Cells in Glaucoma: Friends, Foes, and Potential Therapeutic Targets. *Frontiers in neurology*, 12, 624983. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.624983>
- Guttenplan, K. A., Stafford, B. K., El-Danaf, R. N., Adler, D. I., Münch, A. E., Weigel, M. K., Huberman, A. D., & Liddelow, S. A. (2020). Neurotoxic Reactive Astrocytes Drive Neuronal Death after Retinal Injury. *Cell reports*, 31(12), 107776. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107776>
- Hayakawa, K., Esposito, E., Wang, X., Terasaki, Y., Liu, Y., Xing, C., Ji, X., & Lo, E. H. (2016). Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature*, 535(7613), 551–555. <https://doi.org/10.1038/nature18928>
- Hu, T., Meng, S., Zhang, Q., Song, S., Tan, C., Huang, J., & Chen, D. (2022). Astrocyte derived TSP2 contributes to synaptic alteration and visual dysfunction in retinal ischemia/reperfusion injury. *Cell & Bioscience*, 12(1), 196. <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00932-1>
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Νευροεπιστήμη και Συμπεριφορά, 2020, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Επιστημονική Επιμέλεια Ελληνικής Έκδοσης: Αζαρίας Καραμανλίδης

- Kaur, C., Foulds, W. S., & Ling, E. A. (2008). Blood-retinal barrier in hypoxic ischaemic conditions: basic concepts, clinical features and management. *Progress in retinal and eye research*, 27(6), 622–647. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2008.09.003>
- Kobat, S. G., & Turgut, B. (2020). Importance of Müller Cells. *Beyoglu eye journal*, 5(2), 59–63. <https://doi.org/10.14744/bej.2020.28290>
- Kolb H. Glial Cells of the Retina. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, eds. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; May 1, 2001.
- Kolb H. Gross Anatomy of the Eye. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, eds. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; May 1, 2005.
- Linnerbauer, M., & Rothhammer, V. (2020). Protective Functions of Reactive Astrocytes Following Central Nervous System Insult. *Frontiers in immunology*, 11, 573256. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.573256>
- Mahabadi N, Al Khalili Y. Neuroanatomy, Retina. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; August 8, 2023
- Mead, B., & Tomarev, S. (2016). *Evaluating retinal ganglion cell loss and dysfunction*. *Experimental Eye Research*, 151, 96-106. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.08.006>
- Miao, Y., Zhao, G. L., Cheng, S., Wang, Z., & Yang, X. L. (2023). Activation of retinal glial cells contributes to the degeneration of ganglion cells in experimental glaucoma. *Progress in retinal and eye research*, 93, 101169. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2023.101169>
- Minhas, G., Sharma, J., & Khan, N. (2016). Cellular Stress Response and Immune Signaling in Retinal Ischemia-Reperfusion Injury. *Frontiers in immunology*, 7, 444. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00444>
- Nadal-Nicolás, F. M., Valiente-Soriano, F. J., Salinas-Navarro, M., Jiménez-López, M., Vidal-Sanz, M., & Agudo-Barriuso, M. (2015). Retino-retinal projection in juvenile and young adult rats and mice. *Experimental eye research*, 134, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.03.015>
- Osborne, N. N., Casson, R. J., Wood, J. P., Chidlow, G., Graham, M., & Melena, J. (2004). Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Progress in retinal and eye research*, 23(1), 91–147. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2003.12.001>
- Paisley, C. E., & Kay, J. N. (2021). Seeing stars: Development and function of retinal astrocytes. *Developmental biology*, 478, 144–154. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2021.07.007>

- Rathnasamy, G., Foulds, W. S., Ling, E. A., & Kaur, C. (2019). Retinal microglia - A key player in healthy and diseased retina. *Progress in neurobiology*, 173, 18–40. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.05.006>
- Tang, X., Tzekov, R., & Passaglia, C. L. (2016). Retinal cross talk in the mammalian visual system. *Journal of neurophysiology*, 115(6), 3018–3029. <https://doi.org/10.1152/jn.01137.2015>
- Tao, C., & Zhang, X. (2014). Development of astrocytes in the vertebrate eye. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 243(12), 1501–1510. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24190>
- Trisokka P, Stamatiou R, Delkis N, Asproдини E, Hatziefthimiou, Vasilaki A Retinal ischemia/reperfusion injury: quest for early molecular biomarkers in a rat pharmacological target evaluation model. 12th Meeting of the Hellenic Society of Basic & Clinical Pharmacology. October 7-9 2022, Arta, Greece Proceedings.
- Vecino, E., Rodriguez, F. D., Ruzafa, N., Pereiro, X., & Sharma, S. C. (2016). Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Progress in retinal and eye research*, 51, 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.06.003>
- Wu, M. Y., Yiang, G. T., Liao, W. T., Tsai, A. P., Cheng, Y. L., Cheng, P. W., Li, C. Y., & Li, C. J. (2018). Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 46(4), 1650–1667. <https://doi.org/10.1159/000489241>
- Αγραφιώτης Γ. (2023). Αμφιβληστροειδική βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης – Επίδραση στα αστροκύτταρα & τα κύτταρα Müller. Πτυχιακή Εργασία, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Ζίφα Αιμιλία, Διακυτταρική Επικοινωνία – Μεταγωγή Σήματος, Τέταρτη Έκδοση, 2019, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας.