



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Διαφορική επίδραση *in vitro* ισχαιμίας στις
στοιβάδες του αμφιβληστροειδούς επίμυος»**

Μαρία Κούρτη του Κυριάκου

ΛΑΡΙΣΑ, 2022



UNIVERSITY OF THESSALY



DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

DIPLOMA PROJECT

**«In vitro differential effect of ischemia on rat
retina layers»**

Maria Kourti

LARISSA, 2022

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

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

Ευτυχία Ασπροδίνη, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Εργαστήριο Φαρμακολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αιμιλία Ζίφα, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας-Νευροβιολογίας, Τμήμα
Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κυρία Βασιλάκη Άννα, Επίκουρος Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την καθοδήγηση της και την στήριξή της καθόλη την διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω ένα σημαντικό μέλος του εργαστηρίου Φαρμακολογίας, την Παναγιώτα Τρισόκκα, μεταπτυχιακή φοιτήτρια στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, η οποία με συμβούλευε και με καθοδηγούσε από την αρχή των πειραμάτων της εργασίας μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗΣ	8
ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	8
ΑΝΑΤΟΜΙΑ	11
ΚΥΤΤΑΡΑ ΓΛΟΙΑΣ.....	15
ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΟΙΒΑΔΩΝ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗ	18
ΙΣΧΑΙΜΙΑ.....	27
ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΗ ΙΣΧΑΙΜΙΑ	27
ΔΙΑΥΛΟΙ ΙΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΥΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΙΣΧΑΙΜΙΑ	28
ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ ΝΕΥΡΟΔΙΑΒΙΒΑΣΤΩΝ ΣΤΗΝ ΙΣΧΑΙΜΙΑ.....	29
ΙΣΧΑΙΜΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ	33
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	39
Επιγραμματικά τα βήματα που έγιναν για απομόνωση αμφιβληστροειδή αρουραίου και επίτευξη ex vivo αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας:	39
ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΙΚΟΝΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΣΗΜΑΝΣΗ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ NISSL	40
ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ (IHC)	42
ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ	44
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	46
ΕΠΙΔΡΑΣΗ EX VIVO ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ ΣΤΟΝ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗ ΑΡΟΥΡΑΙΟΥ.....	46
Αριθμός Κυττάρων στις Στοιβάδες Αμφιβληστροειδή Αρουραίου Υπό Φυσιολογικές και Ισχαιμικές Συνθήκες	46
Επίδραση Μεταβολικών προσβολών στην ανοσοδραστικότητα της p44/p42 (ERK1/2) σε αμφιβληστροειδή αρουραίου υπό φυσιολογικές και ισχαιμικές συνθήκες	48
Επίδραση Μεταβολικών προσβολών στην ανοσοδραστικότητα του TSC2 σε αμφιβληστροειδή αρουραίου υπό φυσιολογικές και ισχαιμικές συνθήκες	49
Επίδραση Μεταβολικών προσβολών στην ανοσοδραστικότητα του THY1 σε αμφιβληστροειδή αρουραίου υπό φυσιολογικές και ισχαιμικές συνθήκες	50
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	51
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	53

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ισχαιμία είναι μια μεταβολική κατάσταση όπου οι ιστοί δεν αιματώνονται σωστά και έτσι δεν τους παρέχεται η απαραίτητη ποσότητα οξυγόνου και γλυκόζης. Αυτό οδηγεί σε τραυματισμό ή ακόμα και θάνατο των νευρικών κυττάρων. Σε παλαιότερες μελέτες του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, διεξάχθηκαν πειράματα προς μελέτη της μεταβολής της μορφολογίας των ιστών αμφιβληστροειδή έπειτα από πρόκληση ισχαιμικής βλάβης αλλά και έκφραση βιοχημικών δεικτών, γι αυτό και υπήρχαν διαθέσιμα πλακάκια με τομές ιστού για περαιτέρω έρευνα.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία σκοπός ήταν η μελέτη της επίδρασης της ισχαιμίας στον αμφιβληστροειδή και συγκεκριμένα στις πιθανές αλλαγές στον αριθμό των κυττάρων κάθε στοιβάδας του ιστού αλλά και στην έκφραση συγκεκριμένων βιοχημικών δεικτών (TSC2, Thy1, p44/p42). Για την μελέτη του αριθμού των κυττάρων στις στοιβάδες του αμφιβληστροειδή, αξιοποιήθηκαν φωτογραφίες από πειράματα στα οποία είχε γίνει σήμανση των σωματιδίων Nissl μέσω της χρωστικής Cresyl Violet. Η καταμέτρηση τους έγινε με την βοήθεια του προγράμματος ImageJ. Ακόμη στην παρούσα πειραματική διαδικασία αξιοποιήθηκαν παλαιότερα πλακάκια με τομές ιστού τόσο σε φυσιολογικές όσο και ισχαιμικές συνθήκες προκειμένου να διεξαχθεί η τεχνική της ανοσοιστοχημείας. Κατά την 1^η μέρα του πειράματος φτιάχτηκε το ρυθμιστικό διάλυμα TBS 0,1M, έγινε απόψυξη πλακιδίων και ξέπλυμά τους για 10 λεπτά. Έπειτα επώαστηκε με TBS και NDS 3,3%. Ακολούθως οι ιστοί ξαναπλύθηκαν με TBS και επώαστηκαν με πρώτο αντίσωμα για 16-18 ώρες. Ως πρώτα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν η ERK1/2 (p44/p42), το TSC2 και το Thy1. Την 2^η μέρα τους πειράματος οι ιστοί ξεπλύθηκαν με TBS 0,1M και επώαστηκαν με το δεύτερο αντίσωμα για 1,5 ώρα. Ως δεύτερα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν goat anti-rabbit και goat anti-mouse. Μετά το πέρας του πειράματος οι αντικειμενοφόρες πλάκες μελετήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η ισχαιμία δεν προκάλεσε καμία αλλαγή στον αριθμό των κυττάρων στις τρεις στοιβάδες του αμφιβληστροειδή που μελετήθηκαν (ONL, INL, GCL). Επιπλέον, όσον αφορά την μεταβολή έκφρασης των βιοχημικών δεικτών μετά από ισχαιμικές συνθήκες παρατηρήθηκε μια μείωση της έκφρασης της pERK1/2 στην GCL όσο και στην IPL και OPL, μείωση στην έκφραση του pTSC2 στα τριχοειδή αγγεία της OPL μόνο ενώ για το Thy1 δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στην GCL, IPL και OPL.

ABSTRACT

Ischemia is a metabolic condition where tissues are not properly perfused and thus not supplied with the necessary amount of oxygen and glucose. This leads to injury or even death of nerve cells. In previous studies of the Laboratory of Pharmacology of the Department of Medicine of the University of Thessaly, experiments were conducted to study the change in retinal tissue morphology after ischemic injury and the expression of biochemical markers, so there were available plates with tissue sections for further research.

In this thesis the aim was to study the effect of ischemia on the retina and in particular the possible changes in the number of cells in each tissue layer and in the expression of specific biochemical markers (TSC2, Thy1, p44/p42). To study the number of cells in the retinal layers, photographs from experiments in which Nissl particles had been labelled using Cresyl Violet dye were used. Their counting was done with the help of ImageJ program. Furthermore, in the present experimental procedure, older slides with tissue sections in both normal and ischemic conditions were utilized in order to carry out the immunohistochemistry technique. On day 1 of the experiment, TBS 0.1M buffer was prepared, plates were thawed and rinsed for 10 minutes. It was then incubated with TBS and 3.3% NDS. Subsequently, tissues were washed again with TBS and incubated with first antibody for 16-18 hours. ERK1/2(p44/p42), TSC2 and Thy1 were used as first antibodies. On day 2 of the experiment, tissues were rinsed with 0.1M TBS and incubated with the second antibody for 1.5 hours. Goat anti-rabbit and goat anti-mouse were used as second antibodies. After the end of the experiment the slides were studied under a fluorescence microscope.

According to the results, ischemia did not cause any change in the number of cells in the three layers of the retina studied (ONL,INL,GCL).Moreover, regarding the change in expression of biochemical markers after ischemic conditions, a decrease in the expression of ERK1/2 was observed in GCL as well as in IPL and OPL, a decrease in the expression of TSC2 in the chorion only while for Thy1 no change was observed in GCL, IPL and OPL.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗΣ

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Ο Ηρόφιλος, ήταν Έλληνας γιατρός, ένας από τους πρώτους ανατόμους και ο πρώτος επιστήμονας που έκανε συστηματικά ανατομές σε ανθρώπινα πτώματα. Το 300 π.Χ. μέσα από ανατομές πτωμάτων που έκανε, αναγνώρισε τον αμφιβληστροειδή. Αρχικά τον ονόμασε αραχνοειδές σώμα, λόγω του ότι έμοιαζε με ιστό αράχνης, όμως τελικά ο όρος αμφιβληστροειδής (*αμφίβληστρο= κυκλικό δίκτυο*, λατινικά: *retiform*) πλέον αναφέρεται στον αμφιβληστροειδή χιτώνα [26].

Section of the History of Medicine.

President—Dr. J. D. ROLLESTON.

Herophilus of Alexandria.¹

By J. F. DOBSON, M.A.

Professor of Greek in the University of Bristol.

ABOUT the end of the fourth century B.C., very shortly after the death of Aristotle, we come to two great names in the history of medicine—Herophilus, who may be called the founder of Systematic Anatomy, and Erasistratus, the first scientific physiologist. They both migrated from their homes in Asia Minor to Alexandria, attracted thither by the prospect of material advancement and the facilities for prosecuting their advanced studies which Ptolemaic Egypt offered to all eminent students. Their works are entirely lost, but some details of their teaching may be recovered from the voluminous writings of Galen, who possessed their books in entirety, and from scattered references in later writers. Of Erasistratus it must suffice for the moment to say that he came very near to discovering the circulation of the blood, and if he had started on the investigation of the arterial system with an open mind he must almost inevitably have reached the right conclusion. As it was, however, he was handicapped by the “pneumatic” theories of his predecessors and contemporaries, and could not shake off their influence. Herophilus is described by Galen as a follower of the “logical” or “dialectical” method, as opposed to mere empiricism. Galen sometimes accuses him of obscurity, but severer censure is generally reserved for his followers [3], who erred by misinterpreting their master’s opinions. In the majority of cases he is classed by the historian among the great physicians of antiquity [1, 2], and commended for the soundness of his views, especially for the combination of observation with reasoning powers.

Εικόνα 2: Απόσπασμα από την Ιστορία της Ιατρικής [26].



Εικόνα 1: Ηρόφιλος

Ο Hasan Ibn al-Haythan, ήταν Άραβας μαθηματικός, φυσικός, αστρονόμος και θεωρείται ως «ο Πατέρας της σύγχρονης οπτικής». Το 1011-1021μ.Χ. ανακάλυψε μέσα από τα πειράματά του ότι η όραση είναι συνέπεια του φωτός που αντανακλάται από τα αντικείμενα και καταλήγουν στα μάτια. Αυτή του η θεωρεία ερχόταν σε αντίθεση με την θεωρεία εκπομπής. Η θεωρία εκπομπής υποστήριζε ότι η οπτική αντίληψη επιτυγχάνεται μέσα από ακτίνες των ματιών που εκπέμπονται από τα ίδια τα μάτια και κατ’ επέκταση οι ακτίνες αυτές θα έφταναν στα αντικείμενα και έτσι θα έβλεπαν οι άνθρωποι. Αυτή η θεωρία όμως, έχει αντικατασταθεί από τη θεωρία εισαγωγής, όπου υποστηρίζει ότι οι άνθρωποι είχαν

την ικανότητα να δουν, μέσα από ακτίνες που μεταδίδονται από αντικείμενα του περιβάλλοντος [29, 30].

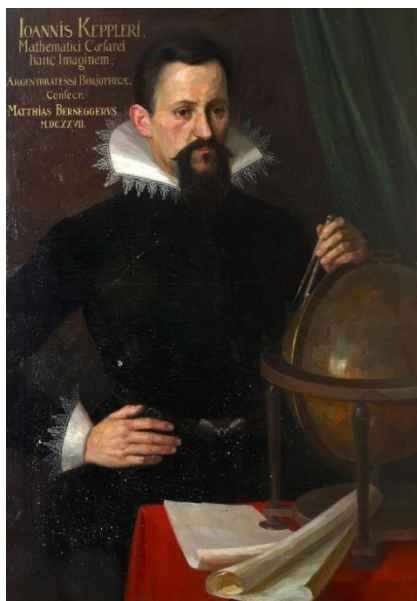


Εικόνα 3: Hasan ibn al-Haytham



Quelle: Deutsche Fotothek

Εικόνα 4: Θεωρία Εκπομπής από System der visuellen Wahrnehmung beim Menschen (1687)



Εικόνα 5: Johannes Kepler

Ο Johannes Kepler, ήταν Γερμανός αστρονόμος, μαθηματικός, αστρολόγος, φυσικός, φιλόσοφος και συγγραφέας. Αρχές του 17^{ου} αιώνα, ανέλυσε την διαδρομή του φωτός .

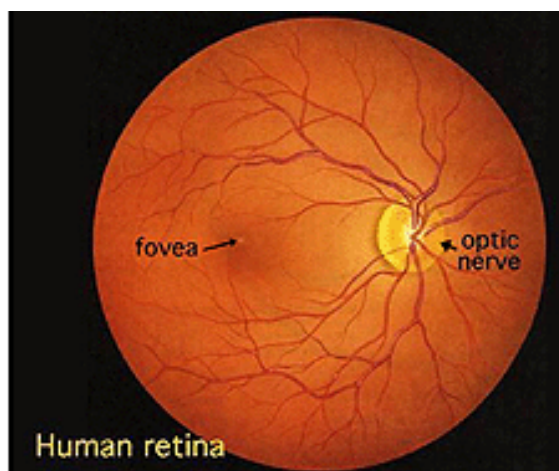
Ο Santiago Ramon y Cajal, ήταν Ισπανός παθολογανατόμος, ιστολόγος και νευροεπιστήμονας καθώς διερευνούσε την δομή του εγκεφάλου και για αυτό θεωρείται «Πατέρας της σύγχρονης νευροεπιστήμης». Το 1894 κατάφερε να χαρακτηρίσει τους νευρώνες του αμφιβληστροειδή στο “Die Retina Der Wirbelthiere” [28].



Εικόνα 6: Santiago Ramon y Cajal

ANATOMIA

Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας είναι υπεύθυνος για την οπτική επεξεργασία, δηλαδή την μετατροπή φωτεινής ενέργειας σε πραγματικές εικόνες. Βρίσκεται τοποθετημένος στο πίσω μέρος του ματιού και αποτελεί προέκταση του εγκεφάλου [13]. Στο κέντρο του βρίσκεται το οπτικό νεύρο, από το οποίο ακτινοβολούν τα κύρια αιμοφόρα αγγεία του αμφιβληστροειδή. Λίγο πιο αριστερά από το οπτικό νεύρο, βρίσκεται το βοθρίο, το οποίο δεν περιέχει αιμοφόρα αγγεία και είναι γνωστό ως ωχρά κηλίδα [14].



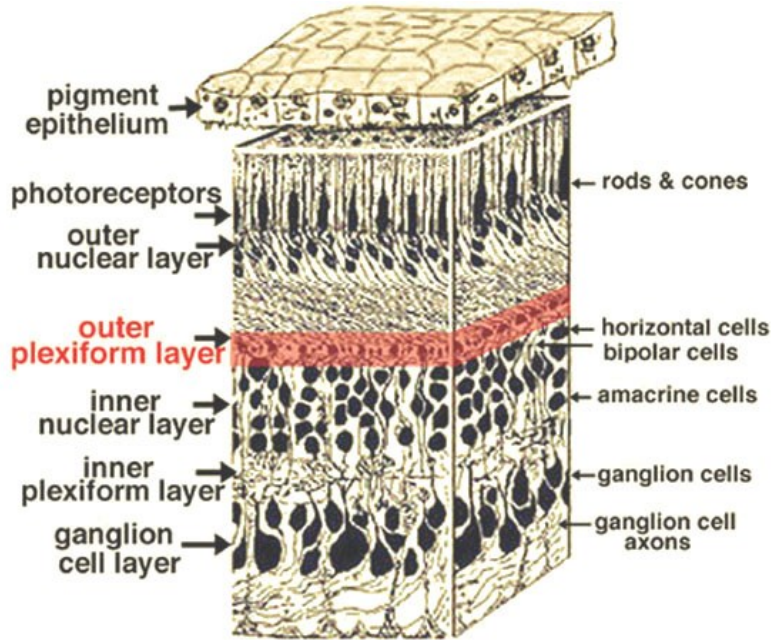
Εικόνα 7: Αμφιβληστροειδής όπως φαίνεται μέσω ενός οφθαλμοσκοπίου [14].

Ο αμφιβληστροειδής έχει μια περίπλοκη δομή και αποτελείται από πολλούς τύπους νευρικών κυττάρων. Όλοι οι ιστοί αμφιβληστροειδούς αποτελούνται από 3 στρώματα σωμάτων νευρικών κυττάρων και 2 στρώματα συνάψεων.

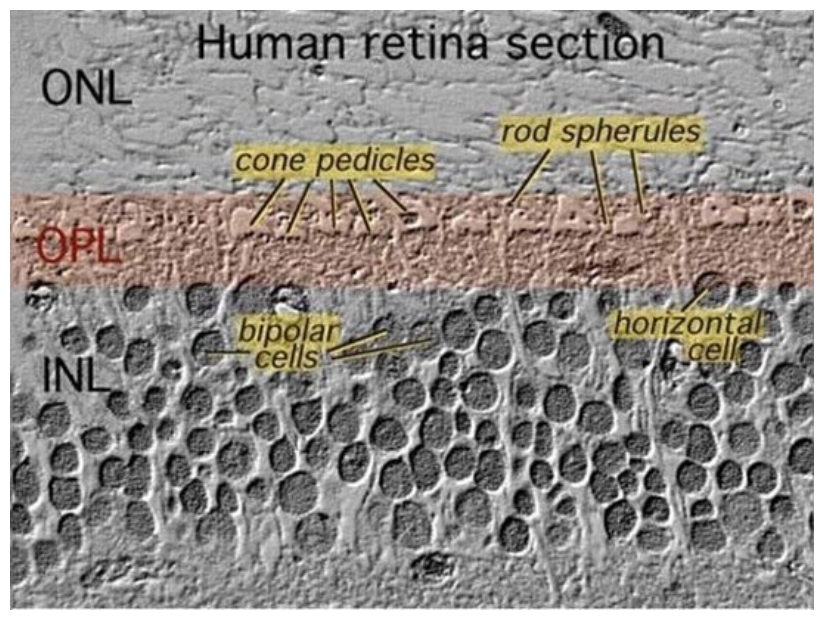
Η εξωτερική κοκκώδης στοιβάδα (ONL: outer nuclear layer) η οποία αποτελείται από κυτταρικά σώματα ράβδων και κώνων (φωτοϋποδοχείς), η εσωτερική κοκκώδης στοιβάδα (ONL: inner nuclear layer) περιέχει κυτταρικά σώματα δίπολων, οριζόντιων (11 τύποι) και βραχύνων κυττάρων (22-30 τύποι) και η τελευταία στοιβάδα με σώματα κυττάρων είναι η στοιβάδα γαγγλιακών κυττάρων (GCL: ganglion cell layer), η οποία αποτελείται από περίπου 20 τύπους γαγγλιακών κυττάρων αλλά περιέχει και έκτοπα βραχύινα κύτταρα [13, 14, 15].

Αυτά τα στρώματα κυττάρων οδηγούν στην δημιουργία 2 συναπτικών περιοχών. Η πρώτη συναπτική περιοχή που δημιουργείται είναι η εξωτερική δικτυωτή στοιβάδα

(ONL: outer plexiform layer), όπου εκεί εμφανίζονται συνάψεις μεταξύ φωτοϋποδοχέων με οριζόντια και δίπολα κύτταρα. Υπάρχει δηλαδή μια σύνδεση εξωτερικής κοκκώδης στοιβάδας.



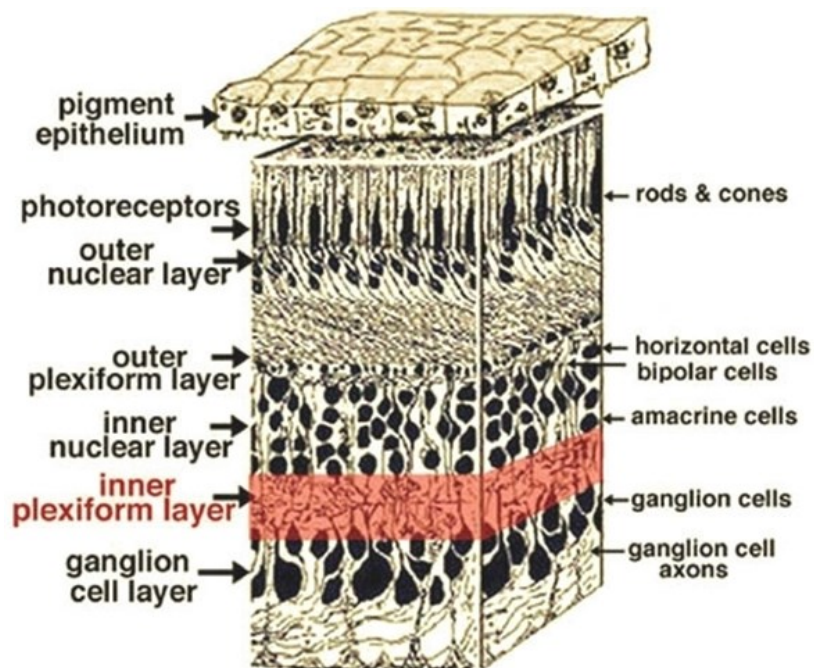
Εικόνα 8 . Τρισδιάστατη δομή αμφιβληστροειδούς και χρωματισμένο με κόκκινο η εξωτερική δικτυωτή στοιβάδα [14].



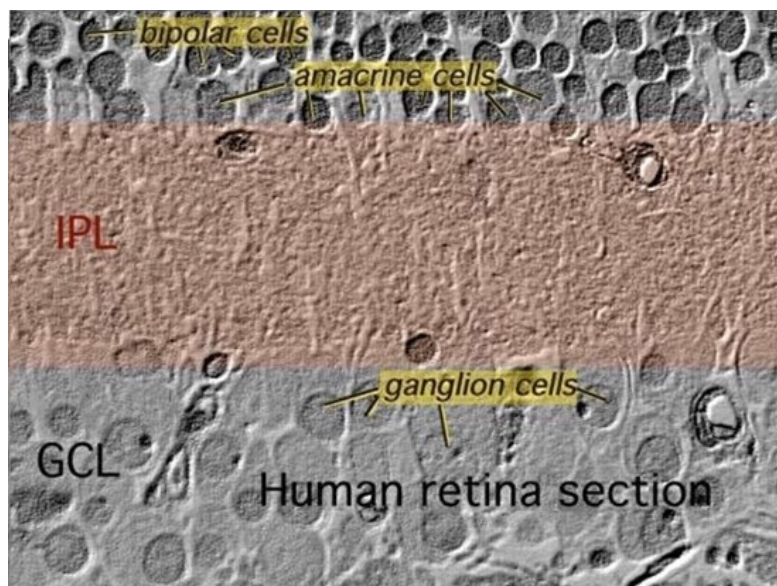
Εικόνα 9: Μικρογράφημα εξωτερικής δικτυωτής στοιβάδας (OPL). Διακρίνονται οι συνδέσεις φωτοϋποδοχέων με οριζόντια και δίπολα κύτταρα [14].

Η δεύτερη συναπτική περιοχή που δημιουργείται είναι η εσωτερική δικτυωτή στοιβάδα (inner plexiform layer), όπου εκεί εμφανίζονται συνδέσεις γαγγλιακών

κυττάρων με δίπολα και βραχύινα κύτταρα. Μέσω αυτών των συνδέσεων καταφθάνει το σήμα στον εγκέφαλο μέσω του οπτικού νεύρου [14].

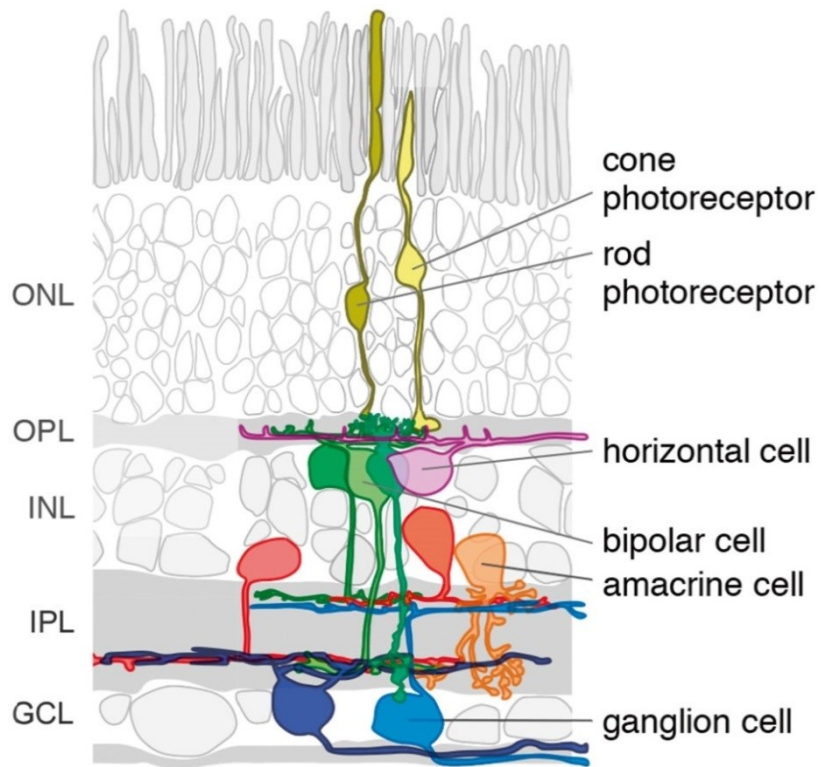


Εικόνα 10: Τρισδιάστατη δομή αμφιβληστροειδούς και χρωματισμένο με κόκκινο η εσωτερική δικτυωτή στοιβάδα [14].



Εικόνα 11: Μικρογράφημα εσωτερικής δικτυωτής στοιβάδας (IPL). Διακρίνονται οι συνδέσεις γαγγλιακών κυττάρων με βραχύινα και δίπολα κύτταρα [14].

Όλα τα είδη κυττάρων στις στοιβάδες του αμφιβληστροειδή συνδέονται με χασμοσύνδεσμους, οι οποίοι συμβάλλουν στην μετάδοση νευρικών ώσεων, ενώ ταυτόχρονα βελτιώνουν το σήμα και «μειώνουν» τον θόρυβο [31].



Εικόνα 13: Διάγραμμα οργάνωσης αμφιβληστροειδούς [16].

ΚΥΤΤΑΡΑ ΓΛΟΙΑΣ

Τα νευρογλοιακά κύτταρα (νεύρο + γλοία=κόλλα) έχουν ποικίλα σχήματα και ειδικές λειτουργίες. Τα κύτταρα αυτά λειτουργούν ως υποστηρικτικά κύτταρα του νευρικού συστήματος συμβάλλοντας στην καλή λειτουργική του κατάσταση. Τα κύτταρα γλοίας διαφέρουν από τα νευρικά κύτταρα σε κάποια χαρακτηριστικά τους, μεταξύ των οποίων :

- i. Δεν λαμβάνουν άμεσα μέρος σε συνάψεις παρόλο που βοηθούν στον καθορισμό συναπτικών επαφών μεταξύ νευρώνων.
- ii. Υπερτερούν έναντι νευρικών κυττάρων σε αναλογία 3:1.
- iii. Δεν έχουν άξονες και δενδρίτες.
- iv. Είναι μικρότερα σε μέγεθος από νευρώνες.

Οι κύριοι ρόλοι των γλοιακών κυττάρων είναι η διατήρηση του ιοντικού περιβάλλοντος των νευρικών κυττάρων, η ρύθμιση του ρυθμού διάδοσης του νευρικού σήματος, η ρύθμιση της συναπτικής δραστηριότητας μέσω της πρόσληψης νευροδιαβιβαστών και η πρόληψη ή ανάρρωση των νευρικών κυττάρων από νευρικές βλάβες.

ΤΥΠΟΙ ΓΛΟΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟ ΚΝΣ

ΑΣΤΡΟΚΥΤΤΑΡΑ

Τα αστροκύτταρα αποτελούν τον πιο πολυάριθμο τύπο γλοιακών κυττάρων και αντιπροσωπεύουν περίπου το 50% των κυττάρων του εγκεφάλου. Είναι κύτταρα σε σχήμα αστεριού και η θέση τους περιορίζεται κυρίως στον εγκέφαλο και στον νωτιαίο μυελό. Βασική τους λειτουργία είναι να διατηρούν την συναπτική σχισμή «καθαρή», δηλαδή μετά την απελευθέρωση οποιουδήποτε νευροδιαβιβαστή, να δρουν αυτά προκειμένου να είναι άδεια η περιοχή για επόμενη σύναψη. Ακόμη ένας ρόλος τους είναι ο σχηματισμός του αιματοεγκεφαλικού φραγμού έτσι ώστε να περνούν στον εγκέφαλο μη επιβλαβής ουσίες και να διατηρείται υγιής ο εγκέφαλος. Η αποθήκευση γλυκόζης από το αίμα, αποτελεί μία ακόμη σημαντική λειτουργία τους, με σκοπό την παροχή της στους νευρώνες.

ΟΛΙΓΟΔΕΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ

Τα κύτταρα αυτά, τυλίγονται γύρω από τους άξονες παρέχοντας μια προστατευτική κάλυψη που ονομάζεται στρώμα μυελίνης. Η μυελίνη είναι μια ουσία πλούσια σε λίπος και μονώνει πλήρως τους νευρώνες. Επιπρόσθετα, επιτρέπει στα ηλεκτρικά

σήματα να ταξιδέψουν πολύ πιο γρήγορα στον άξονα, με αποτέλεσμα τα σήματα να μεταδίδονται χωρίς καθυστέρηση.

ΜΙΚΡΟΓΛΟΙΑ

Η μικρογλοία είναι μικρά κύτταρα με ωειδές κυτταρικό σώμα και πολλά μικρά κλαδιά που προεξέχουν για να βοηθούν στην κίνηση. Η πιο σημαντική λειτουργία των κυττάρων αυτών, είναι να ανταποκρίνονται σε τραυματισμούς ή ασθένειες του ΚΝΣ, καθαρίζοντας νεκρά κύτταρα της περιοχής ή αφαιρώντας τοξίνες και παθογόνα. Με βάση αυτή τους την λειτουργία είναι γνωστά και ως κύτταρα ανοσοποιητικού.

ΕΠΕΝΔΥΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα επενδυματικά κύτταρα ονομάζονται έτσι γιατί δημιουργούν ένα «επένδυμα», μια λεπτή μεμβράνη που καλύπτει το νωτιαίο μυελό και τις κοιλίες του εγκεφάλου. Τα κύτταρα αυτά έχουν στην μεμβράνη τους κάποιες δομές που μοιάζουν με τρίχες και ονομάζονται βλεφαρίδες. Οι βλεφαρίδες αυτές ελέγχουν την ροή του εγκεφαλονωτιαίου υγρού και έτσι συμβάλλουν στον έλεγχο εισόδου ουσιών στον εγκεφαλο.

ΤΥΠΟΙ ΓΛΟΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟ ΠΝΣ

ΚΥΤΤΑΡΑ SCHWANN

Τα κύτταρα Schwann έχουν παρόμοια λειτουργία με τα ολιγοδενδροκύτταρα δηλαδή παρέχουν μυελίνωση στους άξονες του ΠΝΣ. Δρουν ως φαγοκύτταρα και συμβάλλουν έτσι στην ανάπτυξη νέων νευρώνων.

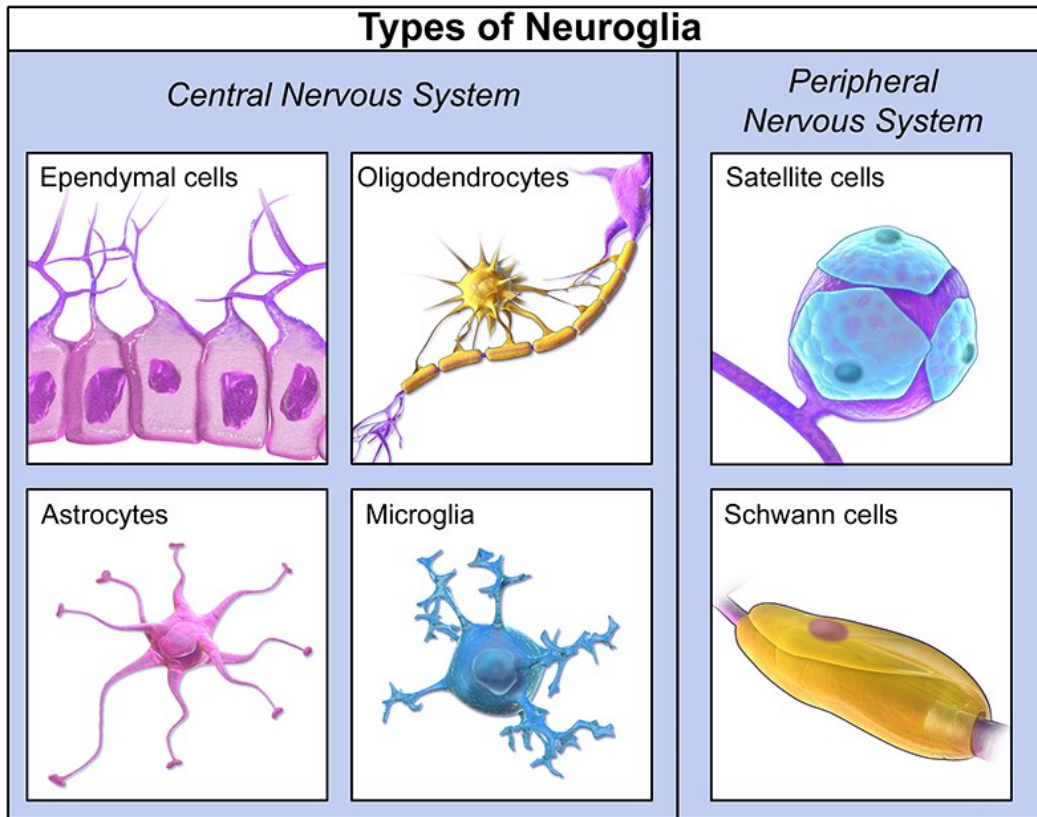
ΔΟΡΥΦΟΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα δορυφορικά κύτταρα είναι μικρά κύτταρα που περιβάλλουν τους νευρώνες, συγκεκριμένα στα αισθητήρια, συμπαθητικά και παρασυμπαθητικά γάγγλια. Ρυθμίζουν το εξωτερικό περιβάλλον και ανταποκρίνονται στο ATP, αυξάνοντας την ενδοκυτταρική συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου. Ακόμη εμφανίζουν ευαισθησία σε φλεγμονές και τραυματισμούς.[57,59,60]

ΚΥΤΤΑΡΑ MULLER

Τα κύτταρα Muller είναι ένας τύπος νευρογλοιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς. Κύρια λειτουργία τους είναι η παροχή υποστήριξης στους νευρώνες, όπως κάνουν όλα τα νευρογλοιακά κύτταρα. Ο βασικός ρόλος τους όμως είναι η διατήρηση της δομικής και λειτουργικής σταθερότητας των κυττάρων του αμφιβληστροειδή. Συγκεκριμένα ρυθμίζουν το εξωκυτταρικό περιβάλλον μέσω πρόσληψης νευροδιαβιβαστών, αφαιρούν υπολείματα και ρυθμίζουν τα επίπεδα ιόντων K⁺ στον εξωκυτταρικό χώρο.

Οι βασικοί τύποι νευρογλοιακών κυττάρων στον αμφιβληστροειδή είναι τα κύτταρα Muller, τα αστροκύτταρα και η μικρογλοία. [58,59]



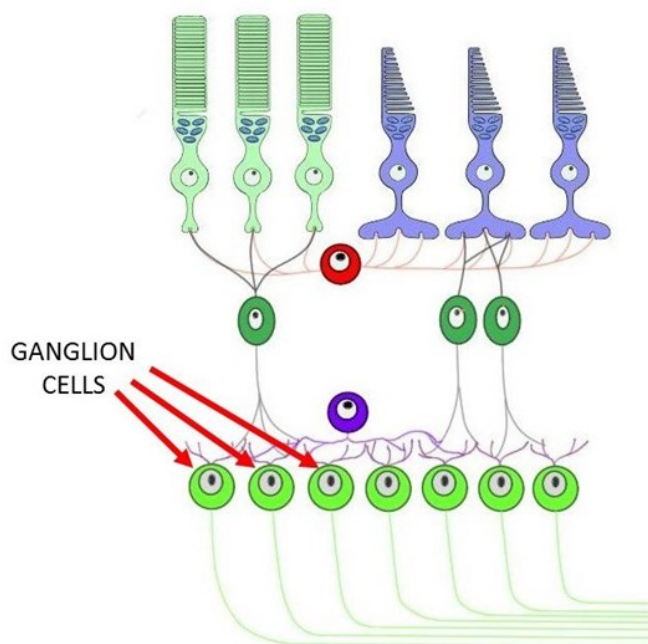
Εικόνα 14 : Τύποι νευρογλοιακών κυττάρων[60]

ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΟΙΒΑΔΩΝ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗ

ΓΑΓΓΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

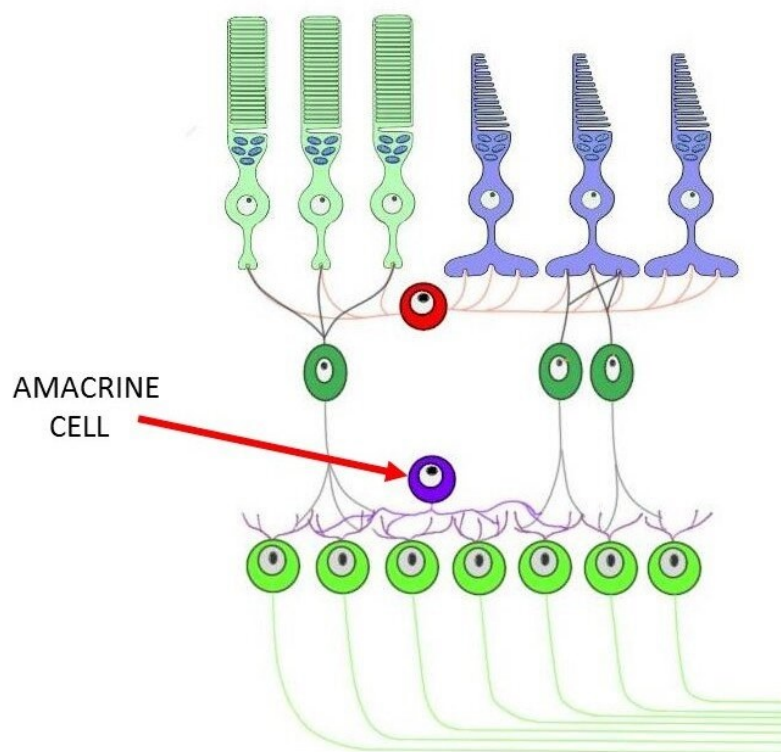
Τα γαγγλιακά κύτταρα αποτελούν την τελευταία στοιβάδα κυττάρων στον αμφιβληστροειδή και το μέσο μετάδοσης πληροφορίας από τον αμφιβληστροειδή στον εγκέφαλο. Υπάρχουν τουλάχιστον 18-20 διαφορετικού τύποι γαγγλιακών κυττάρων στον αμφιβληστροειδή, όπου διαφέρουν σε μορφολογία αλλά και σε λειτουργία [13, 17].

Κάθε υπότυπος γαγγλιακών κυττάρων στέλνει σήμα σε διαφορετικό οπτικό πυρήνα προκειμένου να πραγματοποιηθούν συγκεκριμένες οπτικές λειτουργίες. Τα RGC (retinal ganglion cells) λαμβάνουν τόσο διεγερτικά όσο και ανασταλτικά σήματα από τα βραχύινα αλλά και δίπολα κύτταρα [18, 19].



Εικόνα 15: Γαγγλιακά κύτταρα αμφιβληστροειδούς (@neurochallenged. “Ganglion Cell - Definition.” @Neurochallenged, neuroscientificallychallenged.com/glossary/ganglion-cell.)

ΒΡΑΧΥΙΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

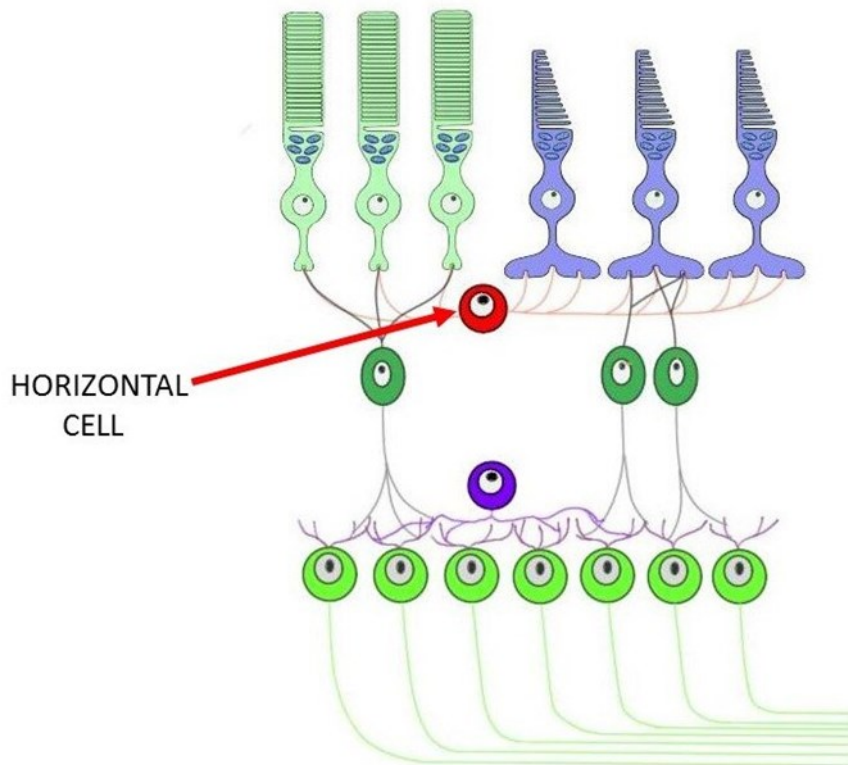


Εικόνα 16: Βραχύινα κύτταρα αμφιβληστροειδούς (@neurochallenged. "Amacrine Cell - Definition." @Neurochallenged, neuroscientificallychallenged.com/glossary/amacrine-cell. Accessed 9 Aug. 2022.)

Τα βραχύινα κύτταρα λέγονται έτσι γιατί φάνηκε πως δεν έχουν νευρίτη (α-μάκρο-ίνα) και αποτελούν μία ξεχωριστή ομάδα νευρικών κυττάρων του αμφιβληστροειδή [33]. Βρίσκονται ενεργά στην εσωτερική κοκκώδη στοιβάδα (INL) και βοηθούν στην διαμόρφωση αλλά και ολοκλήρωση της μεταφοράς σήματος στα γαγγλιακά κύτταρα. Είναι νευρώνες που απελευθερώνουν τους ανασταλτικούς νευροδιαβιβαστές GABA και γλυκίνη, παρόλα αυτά λόγω της δομής τους μπορούν και είναι και διεγερτικά και ανασταλτικά. Τα βραχύινα κύτταρα χαρακτηρίζονται από μεγάλη ποικιλομορφία με περισσότερους από 42 διαφορετικούς τύπους, οι οποίοι συμβάλλουν στην δημιουργία ειδικών κυκλωμάτων για μεταφορά και ανίχνευση κινήσεων και αποχρώσεων του φωτός [19, 20].

ΟΡΙΖΟΝΤΙΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

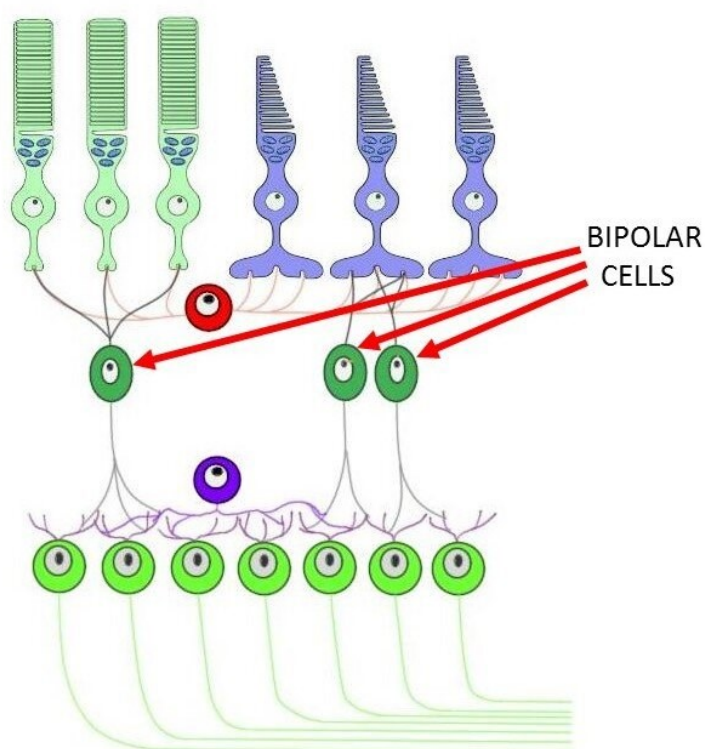
Τα οριζόντια όπως και τα βραχύινα κύτταρα είναι 2 τύποι νευρώνων που μεταφέρουν ώσεις από τους φωτοϋποδοχείς προς τα δίπολα και ακολούθως η πληροφορία μεταδίδεται από τα δίπολα κύτταρα στην στοιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων [21]. Συμβάλλουν επίσης στην προσαρμογή του ματιού τόσο στο έντονο όσο και στο χαμηλό φως. Τα οριζόντια κύτταρα όπως και τα βραχύινα είναι GABAεργικοί νευρώνες, παρέχοντας έτσι ανασταλτική σηματοδότηση σε δίπολα κύτταρα και φωτοϋποδοχείς [19]. Παρόλα αυτά μπορούν να αναστείλουν τα δίπολα κύτταρα και τους φωτοϋποδοχείς ρυθμίζοντας το pH εντός της συναπτικής περιοχής [21].



Εικόνα 17: Οριζόντια κύτταρα αμφιβληστροειδούς (@neurochallenged. "Horizontal Cell - Definition." @Neurochallenged, neuroscientificallychallenged.com/glossary/horizontal-cell. Accessed 9 Aug. 2022.)

ΔΙΠΟΛΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα δίπολα κύτταρα αποτελούν την άμεση οδό μετάδοσης σήματος από τους φωτοϋποδοχείς προς τα γαγγλιακά κύτταρα, συνδέοντας έτσι την εσωτερική με την εξωτερική στοιβάδα του αμφιβληστροειδή. Λόγω αυτής της σύνδεσης πήραν το όνομά τους καθώς αποτελούνται από «δύο πόλους», δηλαδή τα δύο σημεία σύνδεσης (φωτοϋποδοχείς και γαγγλιακά κύτταρα) [19, 23]. Ανήκουν στην τρίτη πιο ποικιλόμορφη κατηγορία κυττάρων στον αμφιβληστροειδή μαζί με τα βραχύινα και γαγγλιακά κύτταρα, καθώς αποτελούνται από 14 υπότυπους.

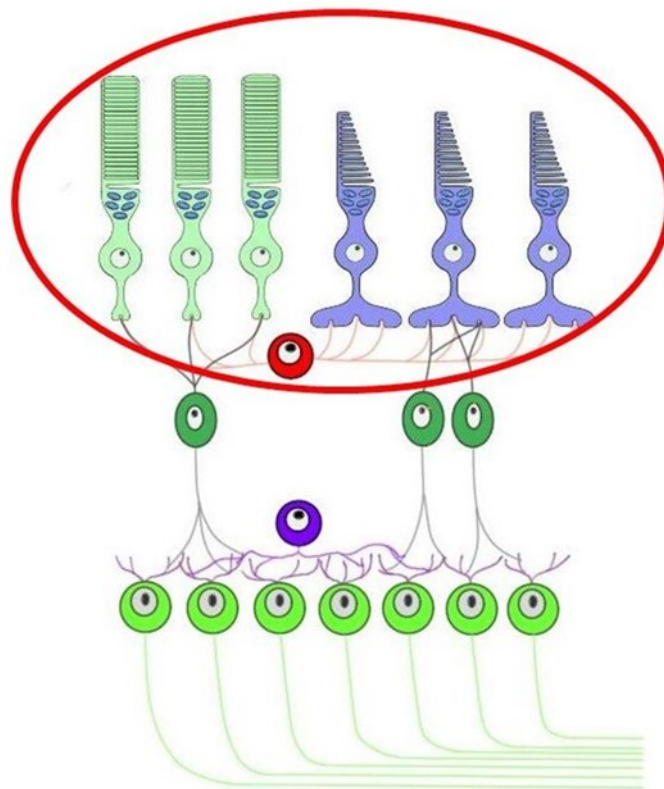


Εικόνα 18: Δίπολα κύτταρα αμφιβληστροειδούς (@neurochallenged. “Bipolar Cell - Definition.” @Neurochallenged, neuroscientificallychallenged.com/glossary/bipolar-cell. Accessed 9 Aug. 2022.)

Λαμβάνουν διεγερτική γλουταμινική νεύρωση από τους φωτοϋποδοχείς και ανασταλτική GABAεργική νεύρωση από οριζόντια κύτταρα. Εντούτοις, όσο αφορά την επίδραση του γλουταμινικού στα δίπολα κύτταρα, οι αποκρίσεις παίζουν ρόλο ανάλογα με τους υποδοχείς γλουταμινικού που βρίσκονται στα δίπολα κύτταρα (iGluR ή mGluR). Οι ιονοτροπικοί υποδοχείς γλουταμινικού οδηγούν τα δίπολα κύτταρα σε OFF κατάσταση, ενώ οι μεταβοτροπικοί υποδοχείς μαζί με μεταφορείς γλουταμινικού οδηγούν σε ON κατάσταση τα δίπολα κύτταρα [22, 23].

ΦΩΤΟΪΠΟΔΟΧΕΙΣ

Οι φωτοϋποδοχείς είναι εξειδικευμένοι νευρώνες υπεύθυνοι για φωτομεταγωγή, δηλαδή μετατροπή του φωτεινού ερεθίσματος σε νευρικές ώσεις. Αυτά τα κύτταρα βρίσκονται τοποθετημένα στο πίσω μέρος του αμφιβληστροειδή δίπλα από το μελάγχρουν επιθήλιο (RPE), ένα στρώμα κυττάρων που συμβάλλει στην θρέψη και επιβίωση του αμφιβληστροειδή. Υπάρχουν δυο τύποι φωτοϋποδοχέων στον αμφιβληστροειδή, τα ραβδία και τα κωνία [24].



Εικόνα 19: Φωτοϋποδοχείς αμφιβληστροειδούς (@neurochallenged. "Photoreceptor - Definition." @Neurochallenged, neuroscientificallychallenged.com/glossary/photoreceptor. Accessed 9 Aug. 2022.)

Τα ραβδία εμφανίζουν ευαισθησία σε αμυδρό φως και στο σκοτάδι. Ο αμφιβληστροειδής περιέχει περίπου 120 εκατομμύρια ραβδία, τα οποία βρίσκονται κυρίως στην περιφέρειά του. Οι ράβδοι εμφανίζουν 100 φορές παραπάνω ευαισθησία στο αμυδρό φως από ότι τα κωνία λόγω της περισσότερης φωτοχρωστικής που διαθέτουν, γεγονός που τα καθιστά ικανά να δεσμεύουν περισσότερο φως.

Τα κωνία λειτουργούν στο έντονο φως, βρίσκονται κυρίως τοποθετημένα στο κεντρικό βοθρίο και ο αμφιβληστροειδής περιέχει περίπου 6 εκατομμύρια. Τα κωνία πραγματοποιούν την έγχρωμη όραση και υπάρχουν 3 τύποι, όπου ο καθένας περιέχει μια οπτική χρωστική, ευαίσθητη σε διαφορετικό φάσμα. Οι χρωστικές των κωνίων, όπως και η ροδοψίνη των ραβδίων, αποτελούνται από την οψίνη και την φωτοευαίσθητη ουσία 11-cis-ρετινάλη. Κάθε μια από τις 3 χρωστικές των κωνίων αποτελείται από διαφορετική οψίνη. Η 1^η χρωστική (S-κωνία) είναι ευαίσθητη σε βραχέα μήκη κύματος (437nm-μπλε), η 2^η χρωστική (M-κωνία) σε μεσαία μήκη κύματος (533nm-πράσινο) και η 3^η (L-κωνία) σε μακρά μήκη κύματος (564nm-κόκκινο) [33].

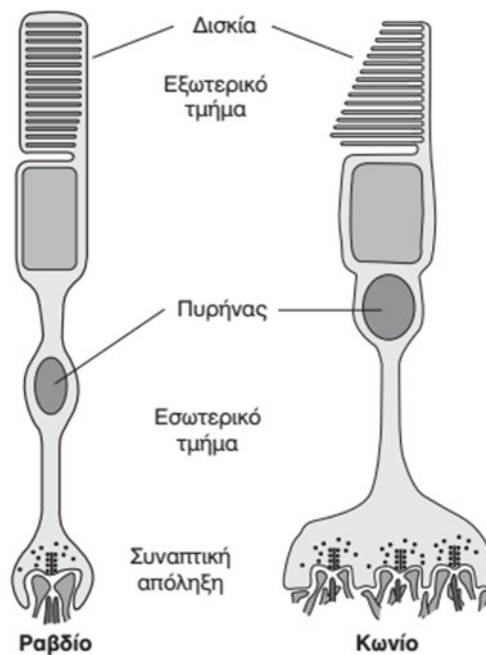
ΔΟΜΗ ΦΩΤΟΥΠΟΔΟΧΕΩΝ

Το εσωτερικό τμήμα των φωτοϋποδοχέων περιέχει τον πυρήνα του κυττάρου με τα αναγκαία μεταβολικά συστατικά του ενώ το εξωτερικό τους τμήμα αποτελείται από μεμβρανικούς δίσκους, οι οποίοι διαθέτουν φωτοχρωστικές.

Κάθε μόριο φωτοχρωστικής περιέχει μια ουσία, ευαίσθητη στο φως, την ρετινάλη, η οποία βρίσκεται προσκολλημένη σε μια πρωτεΐνη, την οψίνη. Οποιοσδήποτε αλλαγές στην δομή της πρωτεΐνης, επηρεάζουν την απόκρισή της στο φως. Οι φωτοχρωστικές υφίστανται αλλαγές μετά από ενεργοποίηση από το φως και έτσι παράγουν δυναμικά δράσης στους φωτοϋποδοχείς. Τα δυναμικά δράσης που παράγονται στους φωτοϋποδοχείς, μετατρέπονται σε δυναμικά ενέργειας στα γαγγλιακά κύτταρα και έτσι μεταδίδεται τελικά η πληροφορία στον εγκέφαλο.

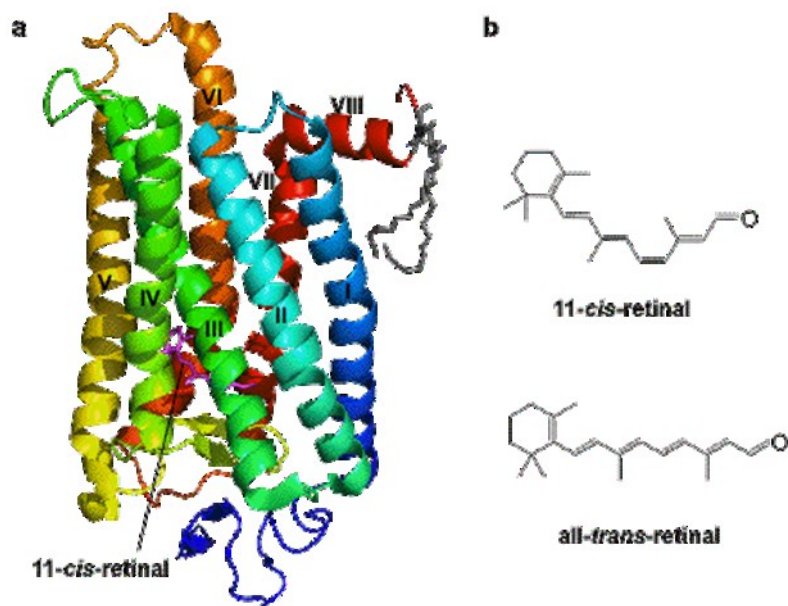
Η δομή του μορίου της ρετινάλης αλλάζει διαμόρφωση ανάλογα με τις συνθήκες φωτός ή σκοταδιού. Στο σκοτάδι βρίσκεται με την μορφή της 11-cis-ρετινάλης όπου εκεί συνδέεται σε μια συγκεκριμένη θέση πάνω στην οψίνη, σχηματίζοντας έτσι την ροδοψίνη η οποία είναι ανενεργή. Το cGMP βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις, με αποτέλεσμα οι διάλυτοι ιόντων Na^+ να παραμένουν ανοικτοί και να οδηγούν σε ένα «σκοτεινό» ρεύμα ιόντων που προκαλεί εκπόλωση στον φωτοϋποδοχέα. Ακόμη διάλυτοι ιόντων Ca^{2+} παραμένουν κι αυτοί ανοικτοί στις συναπτικές απολήξεις των

φωτοϋποδοχέων, οδηγώντας τελικά στην απελευθέρωση γλουταμινικού από τα συναπτικά κυστίδια.



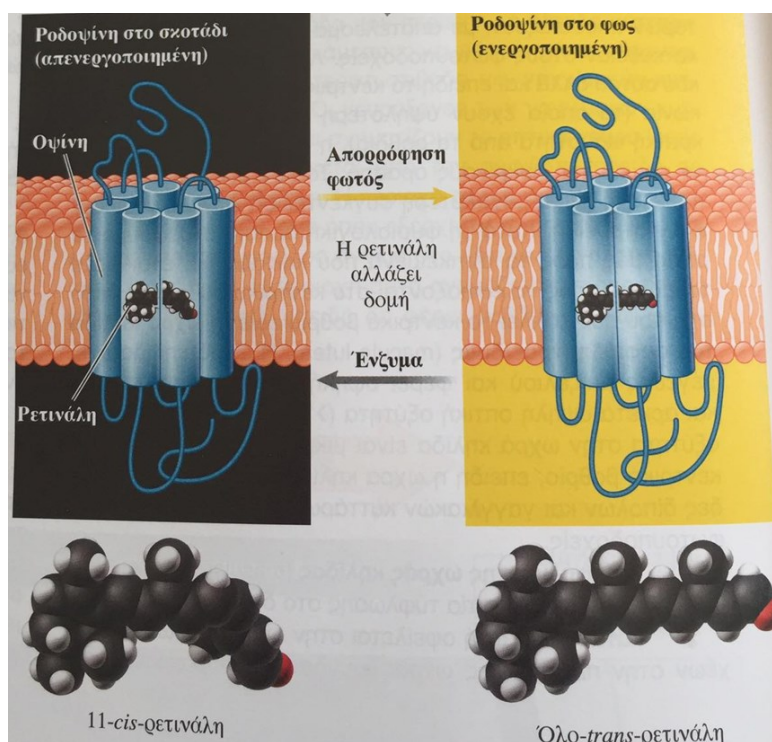
Εικόνα 20: Μορφολογικά χαρακτηριστικά ραβδίων και κωνίων [33].

Παρουσία φωτός, η 11-cis-ρετινάλη το απορρόφα και μετατρέπεται σε όλο-trans-ρετινάλη, η οποία δεν προσδένεται ειδικά στην οψίνη, με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η φωτοχρωστική. Μέσω αυτής της ενεργοποίησης, η μεταγωγίνη, μια πρωτεΐνη G, ενεργοποιείται και οδηγεί στην ενεργοποίηση μιας φωσφοδιεστεράσης προς διάσπαση του cGMP. Αυτή η διάσπαση του, οδηγεί στο κλείσιμο καναλιών $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ και έτσι οι φωτοϋποδοχείς υπερπολώνονται και μειώνεται η απελευθέρωση του γλουταμινικού.



Εικόνα 21. Η δομή της ροδοψίνης και του χρωμοφόρου αμφιβληστροειδούς. (α) Η ροδοψίνη αποτελείται από ένα πρωτεϊνικό τμήμα οψίνης και ένα χρωμοφόρο αμφιβληστροειδή. Η οψίνη έχει επτά διαμεμβρανικές άλφα έλικες. (β) Οι χημικές δομές των μορφών 11 - cis και all -trans του αμφιβληστροειδούς [32].

Άρα, οι φωτοϋποδοχείς διεγείρονται από το φως (υπερπόλωση) άρα δεν απελευθερώνεται ο κύριος νευροδιαβιβαστής (γλουταμινικό) με αποτέλεσμα να μην μεταδίδεται η ώση ενώ αναστέλλονται στο σκοτάδι (εκπόλωση), δηλαδή απελευθερώνεται το γλουταμινικό και γίνεται η μεταφορά της πληροφορίας [25].

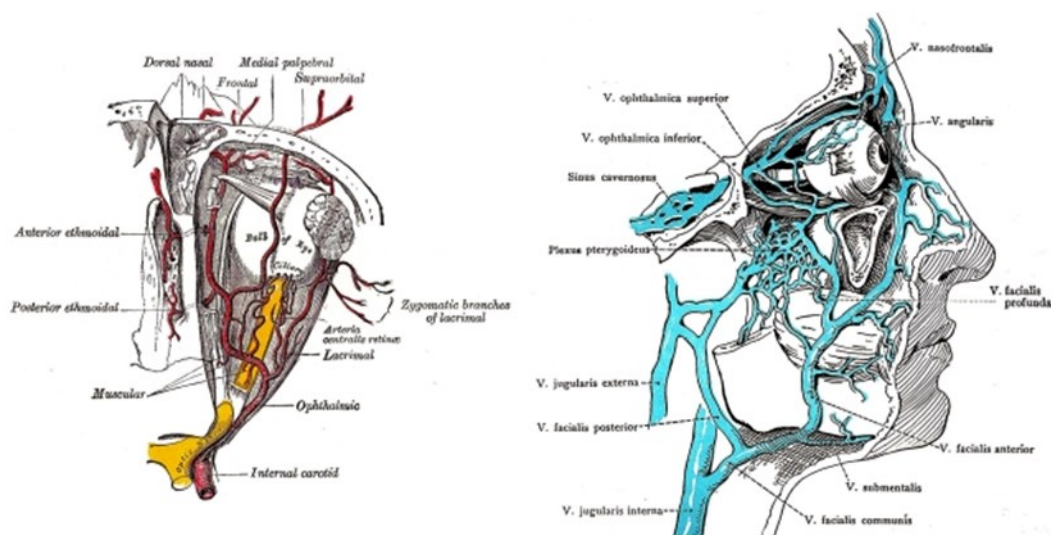


Εικόνα 22 : Η φωτοχρωστική ροδοψίνη στο φως και στο σκοτάδι [25].

ΑΙΜΑΤΩΣΗ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗ

Στο κέντρο του αμφιβληστροειδή βρίσκεται το οπτικό νεύρο, όπου από εκεί προέρχονται όλα τα αιμοφόρα αγγεία που αιματώνουν τον αμφιβληστροειδή. Η κύρια είσοδος αίματος στο μάτι, πραγματοποιείται από την οφθαλμική αρτηρία, η οποία προέρχεται από την έσω καρωτίδα.

Η αγγείωση των κυττάρων στις εσωτερικές στοιβάδες του αμφιβληστροειδή (γαγγλιακά & δίπολα κύτταρα) διεκπεραιώνεται μέσω της κεντρικής αρτηρίας, η οποία αποτελεί κλάδο της οφθαλμικής. Η κεντρική αρτηρία, διακλαδίζεται σε 4 κλάδους, τον άνω και κάτω κροταφικό και τον άνω και κάτω ρινικό. Καθώς εκτείνεται η κεντρική αρτηρία, από την οποία διακλαδίζονται αρτηρίδια και τριχοειδή, με αποτέλεσμα να μπορεί να τροφοδοτήσει και τα υπόλοιπα στρώματα του ιστού.



Εικόνα 23: Αρτηριακές και φλεβικές συνδέσεις αμφιβληστροειδή με συστηματική κυκλοφορία [34].

Οι εξωτερικές στοιβάδες του αμφιβληστροειδή (στοιβάδα ραβδίων και κωνίων) και το μελάγχρουν επιθήλιο αιματώνονται από τα τριχοειδή του χοριοειδή χιτώνα.

Το αίμα φεύγει από το μάτι μέσω της κεντρικής φλέβας του αμφιβληστροειδούς [34].

ΙΣΧΑΙΜΙΑ

Ο όρος ισχαιμία χρησιμοποιήθηκε στις αρχές του δέκατου ένατου αιώνα για να δηλώσει την ανεπαρκή παροχή αίματος και κατ' επέκταση την μειωμένη παρουσία οξυγόνου και γλυκόζης στους ιστούς. Η ισχαιμία ενός ιστού μπορεί να συμβεί είτε λόγω απόφραξης κάποιας κεντρικής αρτηρίας είτε λόγω διάρρηξης μια αρτηρίας και μπορεί να είναι συνέπεια μιας σειρά παθήσεων. Η σοβαρότητα μιας ισχαιμικής βλάβης είναι συνάρτηση της διάρκειας της ισχαιμικής διαταραχής και του μεγέθους της περιοχής που επηρεάζει, θα επηρεαστούν οι κυτταρικές λειτουργίες και άρα ο τραυματισμός ή ακόμη και ο θάνατος των κυττάρων. Η επαναιμάτωση (reperfusion), συμβάλλει στην αποκατάσταση της ροής αίματος, παροχής οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών στους ιστούς. Παρόλα αυτά η διαδικασία αυτή μπορεί να επιδεινώσει τον τραυματισμό των κυττάρων, να επάγει την παραγωγή ελευθέρων ριζών γεγονός που οδηγεί σε αυξημένες φλεγμονώδεις αποκρίσεις και επιδείνωση της κατάστασης. Μια ακόμη αρνητική συνέπεια της επαναιμάτωσης είναι η πρόκληση βλάβης σε γειτονικά όργανα με αποτέλεσμα την επέκταση της ισχαιμικής βλάβης.

Κατά την διάρκεια ισχαιμίας ο μεταβολισμός των κυττάρων γίνεται αναερόβια, γεγονός που οδηγεί σε μείωση του pH των κυττάρων (8).

ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΗ ΙΣΧΑΙΜΙΑ

Εγκεφαλική ισχαιμία μπορεί να προκληθεί μετά από ανακοπή καρδιάς, υπόταση, ασφυξία ή αναμία. Η εγκεφαλική ισχαιμία συχνά οδηγεί σε αθηροσκλήρωση εγκεφαλικών αγγείων. Ο κυτταρικός θάνατος προκαλείται από υπέρμετρη είσοδο ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) στους νευρώνες, μετά από ενεργοποίηση καναλιών ασβεστίου από το γλουταμινικό οξύ. Αυτή η αύξηση της συγκέντρωσης ασβεστίου, ενεργοποιεί ενδονουκλεάσες, οι οποίες προκαλούν βλάβη στο DNA και ενεργοποιεί επίσης ένζυμα όπως η συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NO), με αποτέλεσμα την δημιουργία τοξικών ελευθέρων ριζών [9]

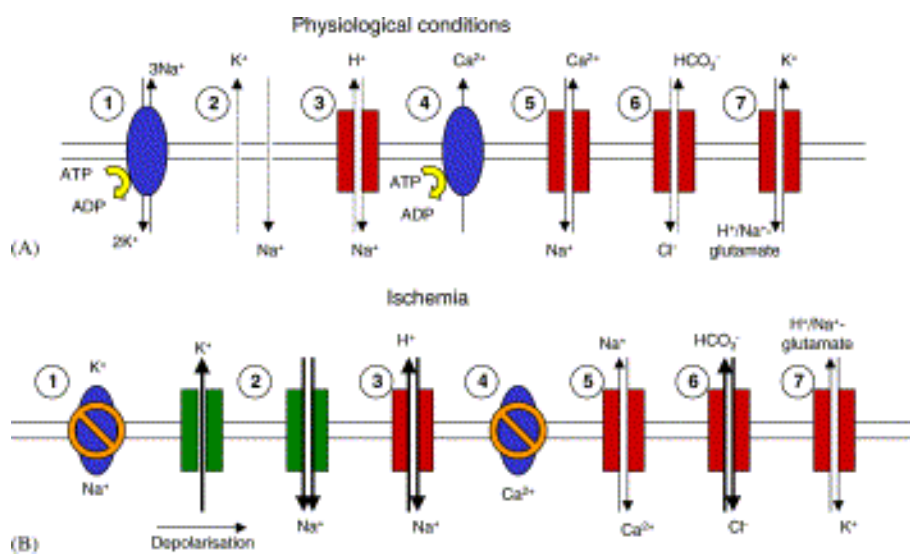
Ο ανθρώπινος εγκέφαλος είναι ένα εξαιρετικά ενεργό μεταβολικό όργανο το οποίο είναι πολύ ευαίσθητο σε διαταραχές στην ροή του αίματος. Αν προκληθεί κάποια διαταραχή, υπάρχουν αρκετοί ομοιοστατικοί μηχανισμοί οι οποίοι ενεργοποιούνται προκειμένου να διατηρήσουν την εγκεφαλική ροή σε σταθερό ρυθμό. Παρόλα αυτά, αν αυτές οι διαταραχές δεν αποκατασταθούν τότε ο εγκέφαλος οδηγείται στην ισχαιμία, η οποία με την σειρά της οδηγεί σε εγκεφαλική δυσλειτουργία και βλάβη (θρόμβωση, εγκεφαλικά επεισόδια). Ένας ισχαιμικός εγκεφαλικός ιστός σταματά να λειτουργεί σε δευτερόλεπτα και οδηγείται σε νέκρωση σε μόλις 10 λεπτά από την πλήρη έλλειψη οξυγόνου και γλυκόζης, ενώ σε άλλα όργανα του σώματος μετά από 20-40 λεπτά. Οι νευρώνες του εγκεφάλου είναι πολύ ευαίσθητοι στην ισχαιμία λόγω του ότι ο εγκέφαλος έχει ψηλό μεταβολικό ρυθμό αλλά και υψηλή κυτταρική σηματοδότηση η οποία ενεργοποιεί μονοπάτια όπως ο θάνατος νευρώνων μέσω γλουταμινικού οξέος, ενίσχυση τραυματισμού νευρώνων μέσω ντοπαμίνης, απελευθέρωση ελευθέρων ριζών, απόπτωση και νέκρωση από τοξικότητα ψευδαργύρου και ενζύμων [10].

ΔΙΑΥΛΟΙ ΙΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΥΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΙΣΧΑΙΜΙΑ

Η ισχαιμία όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως είναι μια κατάσταση στην οποία απουσιάζει το ενεργειακό νόμισμα, το ATP. Είναι δηλαδή μια κατάσταση όπου εξαντλούνται τα ενεργειακά αποθέματα των κυττάρων και μειώνεται η παροχή οξυγόνου και γλυκόζης. Για να προκληθεί όμως ο θάνατος των κυττάρων, η φάση ισχαιμίας πρέπει να διαρκέσει αρκετά και να ενεργοποιήσει ένα τεράστιο καταρράκτη μεταβολικών μονοπατιών.

Οι διάυλοι ιόντων στις μεμβράνες του αμφιβληστροειδή υπόκεινται σε μεγάλες αλλαγές. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η αντλία Na^+/K^+ ATPάση βγάζει 3 ιόντα Na^+ στον εξωτερικό χώρο και βάζει 2 ιόντα K^+ στο εσωτερικό του κυττάρου, τα ιόντα Na^+ ανταλλάσσονται με πρωτόνια και K^+ , η αντλία Ca^{2+} ATPάση βγάζει έξω από το κύτταρο ιόντα Ca^{2+} , ο ανταλλάκτης $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ βγάζει ιόντα Ca^{2+} από το κύτταρο και βάζει ιόντα Na^+ στο εσωτερικό του και ο ανταλλάκτης $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ βγάζει HCO_3^- και βάζει Cl^- .

Σε κατάσταση ισχαιμίας, οι αντλίες Na^+/K^+ και Ca^{2+} οι οποίες είναι ΑΤΡάσες, σταματούν να λειτουργούν λόγω έλλειψης του ΑΤΡ. Το κλείσιμο αυτών των αντλιών προκαλεί άνοιγμα των διαύλων Na^+ και K^+ με αποτέλεσμα να εισέρχονται Na^+ στο εσωτερικό των κυττάρων λόγω περίσσειας στον εξωκυττάριο χώρο και K^+ στο εξωκυττάριο χώρο λόγω περίσσειάς τους στο εσωτερικό του κυττάρου. Κατά την ισχαιμία αναστρέφεται η λειτουργία του ανταλλάκτη $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ και $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ με τον ανταλλάκτη $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ να βγάζει ιόντα Na^+ από το κύτταρο και να βάζει ιόντα Ca^{2+} στο εσωτερικό του, και τον ανταλλάκτη $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ να βγάζει HCO_3^- και να βάζει Cl^- για να διατηρηθεί το pH της μεμβράνης [35, 36].



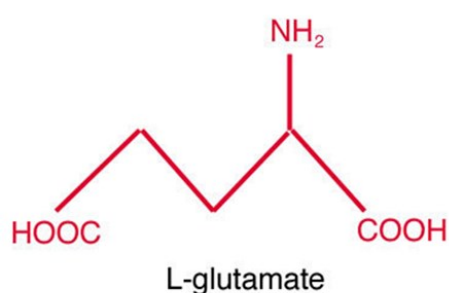
Εικόνα 25: Αλλαγές στην λειτουργία διαύλων στα κύτταρα του αμφιβληστροειδή [36].

ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ ΝΕΥΡΟΔΙΑΒΙΒΑΣΤΩΝ ΣΤΗΝ ΙΣΧΑΙΜΙΑ

Σε φυσιολογικές συνθήκες, η απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών, είναι πολύ χαμηλή, γιατί οι νευρώνες δαπανούν το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειάς τους για τη διατήρηση του δυναμικού της μεμβράνης και παράλληλα οι νευρώνες και τα γλοία απομακρύνουν αποτελεσματικά τους νευροδιαβιβαστές από τη συναπτική σχισμή μετά την απελευθέρωση τους [36].

Κατά την ισχαιμία, η εξωκυττάρια συγκέντρωση του γλουταμινικού οξέος αυξάνεται ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται και μία αύξηση στην απελευθέρωση κι άλλων νευροδιαβιβαστών, όπως το GABA, η ντοπαμίνη, η ακετυλοχολίνη, η γλυκίνη

και η αδενοσίνη [37, 38]. Η εξωκυττάρια συσσώρευση γλουταμινικού οξέος κατά την ισχαιμία υπερδιεγείρει τους υποδοχείς NMDA και AMPA υποδοχείς του, οδηγώντας στην είσοδο Na^+ και Ca^{2+} στους νευρώνες. Έτσι οι νευρώνες διογκώνονται και καταλήγουν σε νέκρωση, καθώς εισέρχονται ταυτόχρονα και ιόντα χλωρίου αλλά και νερό. Αυτή η εκτεταμένη εισροή ιόντων διαρκεί περισσότερο το χρονικό διάστημα έκθεσης στην ισχαιμία με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση κυτταροτοξικών μεταβολικών καταρρακτών [11, 36].



Εικόνα 26: Δομή μορίου γλουταμινικού [12].

Στην φάση της επαναιμάτωσης, οι νευροδιαβιβαστές που απελευθερώθηκαν προηγουμένως, θα ενεργοποιήσουν τους αντίστοιχους υποδοχείς τους, με αποτέλεσμα τον θάνατο των κυττάρων. [42].

Κατά την ισχαιμία, όπου αναστέλλεται η παροχή οξυγόνου και γλυκόζης στον αμφιβληστροειδή, ο μεταβολικός ρυθμός των κυττάρων διαταράσσεται. Αυτό οδηγεί σε μείωση των επιπέδων γλυκόλυσης και φωσφορυλίωσης, με αποτέλεσμα την μείωση του ATP και άρα την μη σωστή λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης, οδεύοντας τα κύτταρα προς τον θάνατο [43].

Καθώς το ενδοκυτταρικό ATP μειώνεται, η αντλία Na^+/K^+ επηρεάζεται αρνητικά όπως τονίστηκε και προηγουμένως. Συνέπεια αυτού είναι η συνεχής εκπόλωση της μεμβράνης εφόσον παραμένει ενδοκυτταρικά το Na^+ , η ενεργοποίηση υποδοχέων γλουταμινικού προκαλώντας περεταίρω είσοδο Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- και τελικά πρόκληση οιδήματος και λύσης κυττάρου [43].

ΑΙΤΙΑ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΙΣΧΑΙΜΙΑ

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, σε φυσιολογικές καταστάσεις, τα επίπεδα των νευροδιαβιβαστών είναι πολύ χαμηλά ενώ σε φάσεις ισχαιμίας αυξάνονται, ιδιαίτερα το γλουταμινικό [44].

Η εκπόλωση που προκαλείται λόγω της ισχαιμίας, ενεργοποιεί διαύλους Ca^{2+} , με αποτέλεσμα την είσοδο Ca^{2+} , η οποία οδηγεί στην εξωκύτωση κυστιδίων που περιέχουν νευροδιαβιβαστές, άρα και απελευθέρωσή τους. Σε ισχαιμικές καταστάσεις η έλλειψη ATP προκαλεί δυσλειτουργία της αντλίας Na^+/K^+ , με αποτέλεσμα τα K^+ να παραμένουν στον εξωκυττάριο χώρο, εκπολώνοντας τα κύτταρα σε αντίθεση με τα Na^+ που παραμένουν στο εσωτερικό του κυττάρου, τα οποία συμβάλλουν στην μειωμένη πρόσληψη του γλουταμινικού και άρα συσσώρευσή του στον εξωκυττάριο χώρο [39].

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το γλουταμινικό προσλαμβάνεται από τα νευρογλοιακά κύτταρα και μεταβολίζεται από την συνθετάση της γλουταμίνης [41]. Η μείωση του ATP λόγω ισχαιμίας στα νευρογλοιακά κύτταρα προκαλεί μείωση και της πρόσληψης του γλουταμινικού. Επιπρόσθετα μειωμένη πρόσληψη γλουταμινικού παρατηρείται και από τα κύτταρα Muller, τα οποία εξίσου δεν μπορούν να το προσλάβουν λόγω ισχαιμίας [40]. Ακόμη γλουταμινικό φαίνεται να προέρχεται και από τα αστροκύτταρα αλλά και από την αυξημένη συγκέντρωση K^+ στον εξωκυττάριο χώρο [45].

ΔΙΕΓΕΡΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

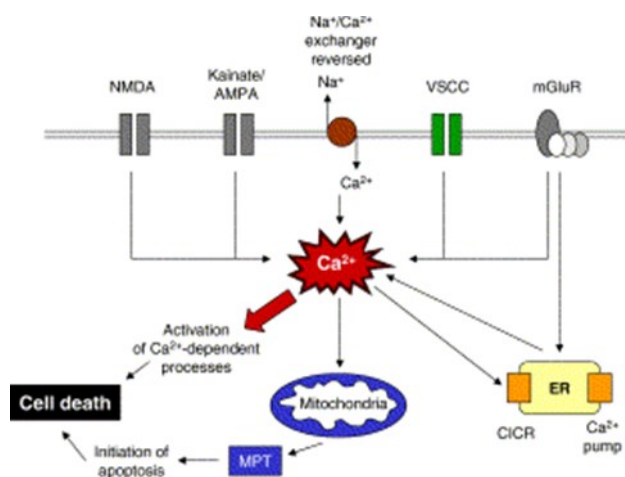
Η διεγερτοτοξικότητα αποτελεί μία κατάσταση όπου οι νευρώνες διεγείρονται υπερβολικά από διεγερτικούς νευροδιαβιβαστές, όπως το γλουταμινικό. Η υπερέκφραση υποδοχέων γλουταμινικού αλλά και η αυξημένη είσοδος Ca^{2+} στα κύτταρα αποτελούν αίτια της διεγερτοτοξικότητας [46].

Το γλουταμινικό ως διεγερτικός νευροδιαβιβαστής του αμφιβληστροειδή, απελευθερώνεται από τους φωτοϋποδοχείς, τα δίπολα και τα γαγγλιακά κύτταρα. Παρόλα αυτά σε καταστάσεις ισχαιμίας, οι συγκεντρώσεις του αυξάνονται κατά

πολύ, με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται στον εξωκυττάριο χώρο, προκαλώντας το θάνατο των κυττάρων [47].

Το γλουταμινικό δρα μέσω των υποδοχέων του, οι οποίοι είναι είτε ιοντοτροπικοί (NMDA ή μη NMDA) είτε μεταβοτροπικοί. Οι NMDA υποδοχείς είναι διαπερατοί από Ca^{2+} , άρα η ενεργοποίησή τους από γλουταμινικό οδηγεί στην είσοδο Ca^{2+} στον ενδοκυττάριο χώρο. Αυτή η περίσσεια συσσώρευση ασβεστίου είναι η βασικότερη αιτία νευρωνικού θανάτου, καθώς το ασβέστιο ενεργοποιεί ένζυμα (όπως η οξειδάση της ξανθίνης, καθώς μετατρέπει την ξανθίνη σε ουρικό οξύ με ταυτόχρονη παραγωγή O_2^-) βλαπτικά, τα οποία προκαλούν παραγωγή ελευθέρων ριζών και καταστροφή κυττάρων [48].

Τελικά, αυτή η υπέρμετρη είσοδος ασβεστίου, συνεισφέρει στην έλλειψη ενέργειας του κυττάρου. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της ενεργοποίησης συγκεκριμένων ενζύμων, όπως νουκλεάσες, πρωτεάσες και λιπάσες τα οποία είναι επιβλαβή για διάφορα συστατικά των κυττάρων καθώς δημιουργούν ελεύθερες ρίζες αλλά και μιτοχονδριακή ανεπάρκεια, συμβάν που οδηγεί σε απώλεια/εξάντληση ενέργειας.[49].



Εικόνα 27: Ρόλος Ca^{2+} στον νευρωνικό θάνατο [36].

ΙΣΧΑΙΜΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ

pTSC2

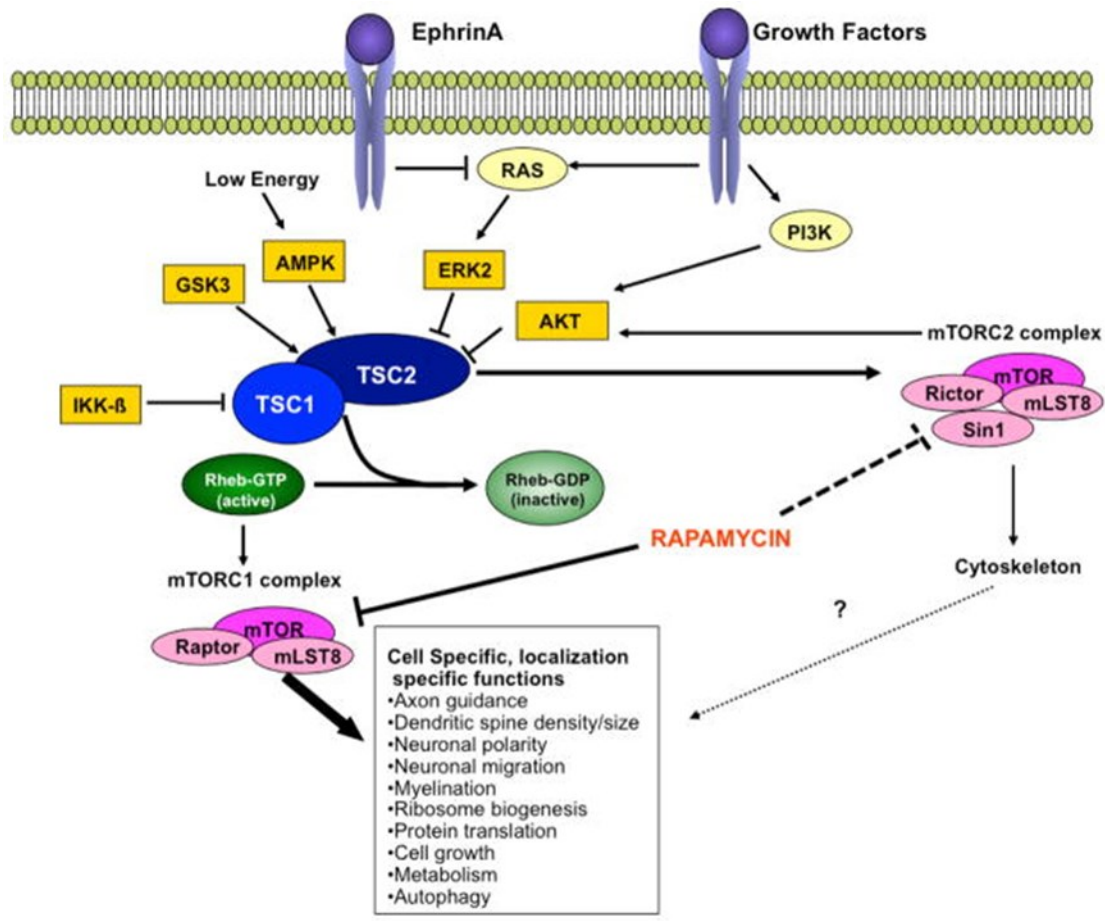
Το TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 2, Σύμπλεγμα Οζώδους Σκλήρυνσης 2) είναι μια πρωτεΐνη, γνωστή και ως τουμπερίνη (tuberin), η οποία κωδικοποιείται από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *TSC2*. Το TSC2 δημιουργεί σύμπλοκο με το TSC1, συμβάλλοντας έτσι στην μετάδοση εξοκυττάρων και ενδοκυττάρων σημάτων σχετικά με την ενεργειακή κατάσταση των κυττάρων ενώ ρυθμίζεται μεταμεταφραστικά από τις PI3K, Akt, ERK και AMPK.

Η PI3K αφού ενεργοποιηθεί από αυξητικούς παράγοντες (IGF, BDNF), στρατολογεί πρωτεϊνικές κινάσες για τη φωσφορυλίωση της Akt. Στη συνέχεια, η φωσφορυλιωμένη/ενεργοποιημένη πλέον Akt, φωσφορυλιώνει το TSC2 σε 5 θέσεις, οδηγώντας στην αναστολή του.

Η σύνδεση EphA στον υποδοχέα EphA στα γαγγλιακά κύτταρα, οδηγεί σε αναστολή της δραστηριότητας της ERK1/2, με αποτέλεσμα να παραμένει ενεργό το TSC2 και άρα να συμβάλλει στην απενεργοποίηση του mTOR.[55]

Όταν η TSC2 είναι ενεργή, αναστέλλει την GTPάση Rheb της οικογένειας Ras, μετατρέποντας την από Rheb-GTP σε Rheb-GDP. Η ενεργή μορφή της Rheb, ρυθμίζει τον mTOR (mammalian target of rapamycin, στόχος της ραπαμυκίνης στα θηλαστικά) ο οποίος αποτελεί κεντρικό ρυθμιστή της πρωτεϊνοσύνθεσης. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια του mTOR ρυθμίζουν την αυτοφαγία και αποτελούν μοριακούς αισθητήρες της ενεργειακής κατάστασης των κυττάρων. Ως γνωστόν, η αυτοφαγία είναι ένας μηχανισμός υπεύθυνος για την απομάκρυνση πρωτεϊνών μεγάλης διάρκειας ζωής και κατεστραμμένων οργανιδίων από το λυσόσωμα, ο οποίος συνεισφέρει στην προστασία των νευρώνων από απόπτωση, στην επιβίωση κυττάρων αλλά και στην παροχή ενέργειας σε φάσεις αστικής. Κάπου εδώ καλό θα ήταν να τονίσουμε και τον αρνητικό ρόλο της αυτοφαγίας καθώς μπορεί να επάγει τον μηχανισμό προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου μέσω υπερβολικών αυτοφαγοσωμάτων και να οδηγήσει σε θάνατο νευρώνων [61]. Κατά την ανάπτυξη, η σηματοδότηση μέσω mTOR είναι ενεργή, αναστέλλοντας έτσι την αυτοφαγία. Σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών ουσιών, η σηματοδότηση μέσω mTOR αναστέλλεται,

και η αυτοφαγία επάγεται. Εντούτοις, μετά από παρατεταμένη έλλειψη θρεπτικών ουσιών, η σηματοδότηση μέσω mTOR επανενεργοποιείται, και έτσι αναστέλλεται σε μεγάλο βαθμό ο μηχανισμός της αυτοφαγίας.



Εικόνα 28: Μεσολάβηση TSC2 στην σηματοδότηση mTOR [50]

Το TSC2 λειτουργεί ως βασικός ρυθμιστής της σηματοδότησης μέσω mTOR. Η AMPK (5' AMP πρωτεϊνική κινάση) ανιχνεύει την αύξηση του AMP, και κατά συνέπεια, τα μειωμένα επίπεδα ATP. Σε καταστάσεις έλλειψης θρεπτικών ουσιών, η AMPK ενεργοποιείται με αποτέλεσμα να φωσφορυλιώνει και να ενεργοποιεί το TSC2 το οποίο είναι ικανό να συνδεθεί με το TSC1 και να αποκριθεί στην έλλειψη θρεπτικών ουσιών, για αυτό και τα κύτταρα μετά την ενεργοποίηση του είναι λιγότερο επιρρεπή στον θάνατο. Αφού ενεργοποιηθεί το TSC2, έχει την ικανότητα να αναστείλει την σηματοδότηση μέσω mTOR, οδηγώντας στην αυτοφαγία και στην μειωμένη πρωτεϊνική σύνθεση προκειμένου να εξισορροπηθεί η κυτταρική ενέργεια. Η φωσφορυλίωση του TSC2 από την AMPK είναι απαραίτητο βήμα για τη ρύθμιση της μετάφρασης και τον έλεγχο του μεγέθους των κυττάρων ως απάντηση

στη στέρση ενέργειας. Το TSC2 και η φωσφορυλίωσή του από την AMPK προστατεύουν τα κύτταρα από την απόπτωση που προκαλείται από στέρση ενέργειας.

Σε φυσιολογικές συνθήκες το TSC2 εκφράζεται κυρίως σε τριχοειδή αγγεία, ενώ σε κατάσταση ισχαιμίας διαπιστώθηκε μία ελαφριά μείωση της έκφρασής του στα τριχοειδή αγγεία της εξωτερικής δικτυωτής στοιβάδας του αμφιβληστροειδή. [50, 51, 52]

THY1

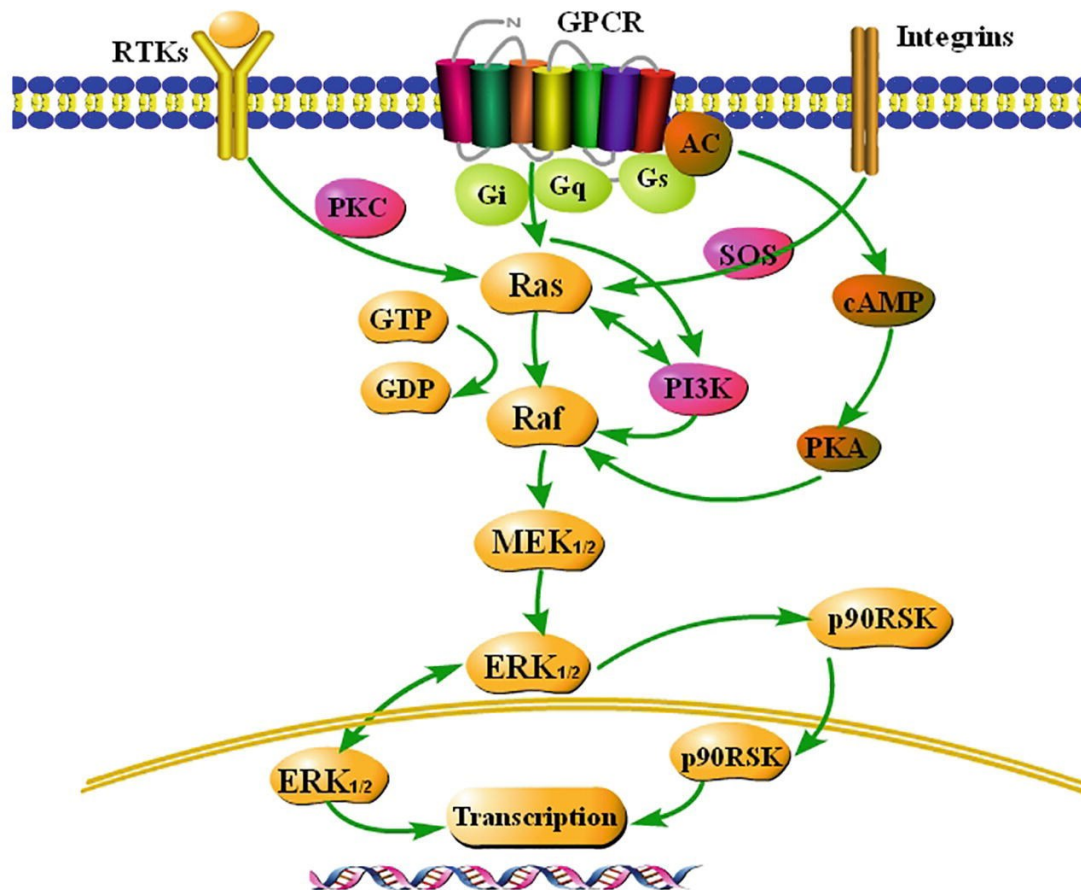
Το Thy1 (thymocyte differentiation antigen 1) γνωστό και ως CD90 (cluster of differentiation 90) ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών και παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στο ανοσοποιητικό όσο και στο νευρικό σύστημα. Αποτελεί την πιο γλυκοσυλιωμένη μεμβρανική πρωτεΐνη με έως και 40% υδατάνθρακες εφόσον συνδέεται με GPI (γλυκοφωσφατίδυλο-ινοσιτόλη). Έχει την ικανότητα να βρίσκεται συνδεδεμένο σε μεμβράνες (αδιάλυτη μορφή) αλλά εμφανίζεται και σε διαλυτή μορφή. Οι δύο μορφές είναι πανομοιότυπες σε μέγεθος.

Το Thy1 εκφράζεται σε πολλούς τύπους κυττάρων όπως θυμοκύτταρα, T-κύτταρα, γαγγλιακά κύτταρα αμφιβληστροειδούς, αιμοποιητικά και μεσεγχυματικά κύτταρα, επηρεάζοντας την κυτταρική προσκόλληση, την μετανάστευση, την διαφοροποίηση και επιβίωσή τους.

Η παρουσία του Thy1 στις μεμβράνες των νευρώνων δεν μπορεί από μόνη της να επιφέρει ανασταλτικές επιδράσεις στην ανάπτυξη των δενδριτών, αλλά θα πρέπει να εντοπιστεί στην κατάλληλη μικροπεριοχή της μεμβράνης. Άρα, το Thy1 όταν εκφράζεται στους νευρώνες και εντοπίζεται σε συγκεκριμένο σημείο της μεμβράνης, αναστέλλει την εκβλάστηση δενδριτών. Σε ότι αφορά στον αμφιβληστροειδή, το Thy1 παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του και βρίσκεται κυρίως, αν όχι αποκλειστικά, στην στοιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων. Το γεγονός αυτό, κάνει το Thy1 κατάλληλο δείκτη για τη μελέτη του θανάτου των γαγγλιακών κυττάρων κατά την ισχαιμία,. [7]

pERK1/2

Η p44/p42 ή ERK1/2 ανήκει στις MAPK δηλαδή στις πρωτεϊνικές κινάσες οι οποίες ενεργοποιούνται από μιτογόνα, με βασικό ρόλο την επιβίωση και προσαρμογή των κυττάρων. Οι MAPK ενεργοποιούνται από υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα η ERK1/2 βρίσκεται ευρέως στο νευρικό σύστημα και η φωσφορυλίωσή της επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των κυττάρων, συμβάλει στην συναπτική πλαστικότητα, την μνήμη και την αναστολή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου.



Εικόνα 29: Σηματοδοτικό μονοπάτι Ras-Raf-MEK-ERK1/2 [54]

Η ERK1/2 φυσιολογικά βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Δέχεται εξωκυτταρικά και ενδοκυτταρικά σήματα τα οποία επάγουν την φωσφορυλίωση της μέσω Ras-Raf-MEK-ERK1/2, οδηγώντας στην ενεργοποίησή της. Μερικά εξωκυτταρικά σήματα τα οποία ενεργοποιούν GPCRs είναι η ισχαιμία, η υποξία, η φλεγμονή, ορισμένοι νευροδιαβιβαστές και μερικοί αυξητικοί παράγοντες, τα οποία σήματα καταλήγουν

στην Ras. Το Ras-GTP ακολούθως συνδέεται με το Raf και μεταφέρεται από το κυτταρόπλασμα στην πλασματική μεμβράνη. Η ενεργοποιημένη πλέον Raf ενεργοποιεί την MEK, φωσφορυλιώνοντας την. Έπειτα, η MEK, φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την ERK1/2. Η ενεργοποιημένη ERK1/2 μεταφέρεται τελικά στον πυρήνα του κυττάρου με στόχο τη φωσφορυλίωση μεταγραφικών παραγόντων και κατ' επέκταση στην ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων-στόχων τους.

Μετά από ισχαιμική βλάβη και επαναιμάτωση στον αμφιβληστροειδή, παρατηρείται αύξηση των επιπέδων ERK. [53, 54]

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Η πρόκληση *ex vivo* ισχαιμίας σε ιστολογικά παρασκευάσματα αμφιβληστροειδή αρουραίου, η συλλογή, το κόψιμο, και η χρώση των ιστών με τη χρωστική Cresyl Violet καθώς και η φωτογράφιση τους δεν αποτελεί τμήμα της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Οι ιστοί αυτοί προέρχονται από πειράματα τα οποία πραγματοποίησε η κα Παναγιώτας Τρισόκκα κατά τη διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής της εργασίας στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Από τα πειράματα αυτά προέρχονται και οι τομές αμφιβληστροειδούς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για την ανοσοϊστοχημικό εντοπισμό των TSC2, p44/p42 και Thy1.

Επιγραμματικά τα βήματα που έγιναν για απομόνωση αμφιβληστροειδή αρουραίου και επίτευξη *ex vivo* αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας:



Τα πειράματα έγιναν σε αρσενικούς επίμυες Wistar ηλικίας 1-1½ μηνών. Ακολούθως φτιάχτηκε τεχνικό εγκεφαλονωτιαίο υγρό (arti-CSF) μέσω της χρήσης κορεσμένων πυκνών διαλυμάτων έτσι ώστε κατά την απομόνωση του ιστού να διατηρηθεί ένα όσο το δυνατό φυσιολογικό περιβάλλον με σκοπό να αποτραπεί η παραγωγή ανεπιθύμητων μεταβολιτών. Η συλλογή του αμφιβληστροειδούς έγινε μετά από , τη βραχεία αναισθητοποίηση του διαιθυλαιθέρα και τη θυσία του με τη βοήθεια λαμπετόμου. Οι ιστοί αφού πρώτα διαχύθηκαν (ροή 1.2ml/min) με arti-CSF γλυκόζης το οποίο είχε κορεσθεί με μίγμα 95%O₂/5%CO₂ για μία ώρα για να επιτευχθεί εξισορρόπηση στην συνέχεια για άλλα 26 λεπτά διαχύθηκαν με το ίδιο διάλυμα ενώ στη συνέχεια διαχύθηκαν είτε με arti-CSF γλυκόζης κορεσμένο με μίγμα 95%O₂/5%CO₂ (φυσιολογικές συνθήκες) είτε με arti-CSF σукρόζης κορεσμένο με μίγμα 95%O₂/5%CO₂ (συνθήκες ισχαιμίας) για 66 ακόμα λεπτά. Μετά το πέρας του πειράματος, οι ιστοί αφαιρέθηκαν από τα φιαλίδια υπερδιάχυσης και μεταφέρθηκαν σε Eppendorf τα οποία περιείχαν 4% PFA (παραφορμαλδεΰδη) σε 0.1M διάλυμα φωσφορικών (PB) για μία ώρα για τη μονιμοποίηση τους. Ακολούθησε κρυοπροστασία τους με εμβύθιση σε διάλυμα 30% σукρόζης σε 0.1M PB για 16-18 ώρες στους 4°C. Την επόμενη μέρα ακολούθησε το πάγωμα των ιστών,

με εμβύθιση σε ισοπεντάνιο (-45°C) για ένα λεπτό και αποθήκευση στους -80°C μέχρι την κοπή τους. Οι ιστοί κόπηκαν με τη βοήθεια κρουτόμου σε τομές 10μm στους -20°C. Τέλος οι τομές τοποθετήθηκαν σε ζελατινοποιημένες αντικειμενοφόρες πλάκες και αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι την περαιτέρω χρήση τους.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΙΚΟΝΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΣΗΜΑΝΣΗ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ NISSL

Για την καταμέτρηση των κυττάρων σε κάθε στοιβάδα του αμφιβληστροειδούς, χρησιμοποιήθηκαν φωτογραφίες από πειράματα στα οποία είχε γίνει σήμανση των σωματιδίων Nissl του αμφιβληστροειδούς με τη χρήση της χρωστικής Cresyl Violet. Η καταμέτρησή έγινε με την βοήθεια του προγράμματος ImageJ.

Για μέτρηση κυττάρων:

- i. Μεταφορά εικόνας στο παράθυρο του ImageJ.
- ii. Επιλογή επιθυμητής στοιβάδας (ONL, INL, GCL).
- iii. Επιλογή  → δεξί κλικ → rotated Rectangle ώστε να σχεδιαστεί το επιθυμητό πλαίσιο που θα καλύπτει την αρχή και το τέλος της στοιβάδας και θα περιέχει ευδιάκριτα κύτταρα.
- iv. Αποθήκευση πλαισίου για να μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί άλλες δυο φορές στην ίδια στοιβάδα, προκειμένου να έχουμε ίδιο πλαίσιο x3 φορές, χωρίς αλλαγή στο μήκος και πλάτος (control t → rename → more → Save).
- v. Στο κουτί που δημιουργήσα πάνω στην επιθυμητή στοιβάδα πραγματοποιώ την μέτρηση κυττάρων (Process → find maxima → preview point selection).
- vi. Κύτταρα τα οποία δεν συμπεριλήφθηκαν, μπορούν να μετρηθούν χειροκίνητα  επιλογή) και να συυπολογιστούν με τα υπόλοιπα.
- vii. Κάποιες θολές εικόνες χρειάζονται ειδική επεξεργασία για να είναι εφικτή η καταμέτρηση κυττάρων (Image → color → split channels → επιλογή green πλαισίου), με τον ίδιο τρόπο καταμέτρησης κυττάρων όπως και πριν.
- viii. Αυτή η διαδικασία γίνεται 3 φορές σε κάθε στοιβάδα και όλες οι μετρήσεις αποθηκεύονται στο ROI Manager.

- ix. Αποθήκευση των μετρήσεων, ώστε μετά να εμφανίζονται οι μετρήσεις κυττάρων στο ROI Manager (Image→overlay→from ROI Manager).
- x. Αφού ολοκληρώθηκαν όλες οι μετρήσεις σε μια εικόνα τότε μπορεί να αποθηκευτεί ως Tiff (File→Save As→name→Tiff).
- xi. Για την επανεμφάνιση των μετρήσεων σε μια εικόνα, αφού κλείσει το πρόγραμμα (άνοιγμα εικόνας στο ImageJ→image→overlay→ Το ROI Manager).

ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ (IHC)

Η αρχή της ανοσοϊστοχημείας ήταν γνωστή από την δεκαετία του 1930, αλλά το 1942 αναφέρθηκε η πρώτη μελέτη IHC, όπου ο Coons χρησιμοποίησε αντισώματα σημασμένα με FITC (fluorescein isothiocyanate – ισοθειοκυανική φλουορεσκίνη) για να αναγνωρίσει αντιγόνα πνευμονόκοκκου σε μολυσμένους ιστούς [1].

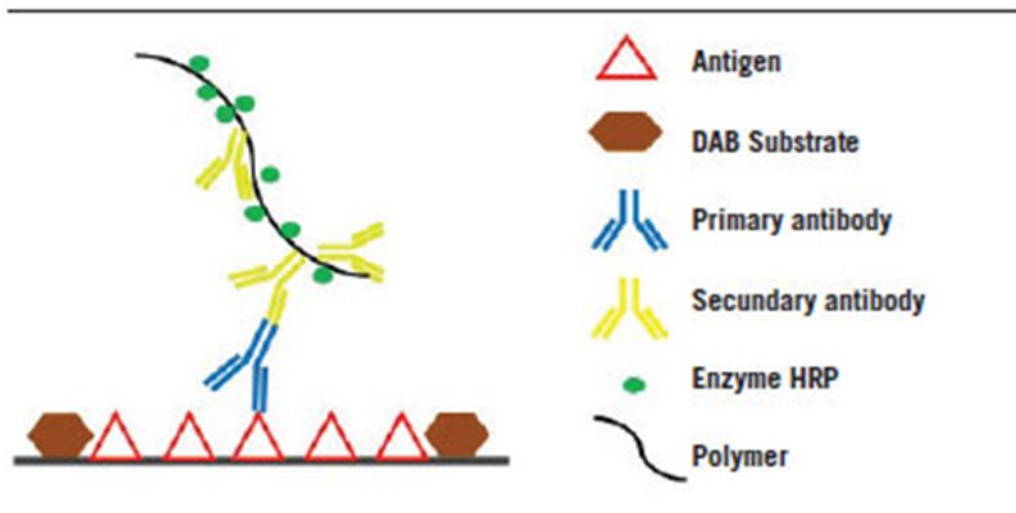
Η IHC αποτελεί μια μοριακή μέθοδο δοκιμής η οποία αξιοποιείται για τον εντοπισμό αντιγόνων σε κύτταρα-στόχους με την σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος [2]. Στην ανοσοϊστοχημεία μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο μονοκλωνικά όσο και πολυκλωνικά αντισώματα για εντοπισμό των αντιγόνων. Οι βασικές διαφορές των πολυκλωνικών έναντι των μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι : α) Τα μονοκλωνικά αντισώματα ανιχνεύουν ένα συγκεκριμένο επίτοπο, άρα μειώνουν την πιθανότητα το αντίσωμα να δεσμευτεί με άλλες πρωτεΐνες, ενώ τα πολυκλωνικά ανιχνεύουν πολλούς επιτόπους β) τα πολυκλωνικά αντισώματα μπορούν να δεσμευτούν σε αντιγόνα ακόμη και μετά από κάποιες αλλαγές στην δομή των αντιγόνων σε αντίθεση με τα μονοκλωνικά [2, 3].

Γίνεται χρήση κάποιων δεικτών, οι οποίοι προσδένονται στα αντισώματα και βοηθούν στην ανίχνευση παρουσίας ή απουσίας αντιγόνων. Οι δείκτες αυτοί μπορεί να είναι ένζυμα, φθορίζουσες ουσίες ή ραδιοϊσότοπα. Η αλληλεπίδραση έτσι αντισώματος-αντιγόνου οπτικοποιείται με την χρήση είτε μέσω έγχρωμων υποστρωμάτων των ενζύμων, με ανίχνευση φθορισμού ή αποτύπωση του ισοτόπου σε φιλμ, αντίστοιχα [2].

Υπάρχουν δύο μέθοδοι ανίχνευσης: η άμεση και η έμμεση ανίχνευση. Το αντιγόνο μπορεί να ανιχνευτεί άμεσα μέσω μιας επισήμανσης πάνω στο πρώτο αντίσωμα, ή και έμμεσα μέσω μιας επισήμανσης που γίνεται στο δεύτερο αντίσωμα, το οποίο αντίσωμα δημιουργήθηκε σε άλλον ξενιστή από αυτόν του πρώτου αντισώματος [3].

Συνοπτικά τα βήματα της ανοσοϊστοχημείας φαίνονται στην Εικόνα 1 όπου αρχικά ανιχνεύεται ένας επίτοπος μιας πρωτεΐνης-στόχου με την χρήση του πρωτογενούς αντισώματος. Ακολούθως προστίθεται το δευτερογενώς αντίσωμα αναγνωρίζει το πρωτογενές με μεγάλη ειδικότητα και φέρει ένα μόριο σήμανσης. Μετά την

σύνδεσή τους, ένα χημικό υπόστρωμα αντιδρά με το μόριο σήμανσης και φθορίζει υποδηλώνοντας έτσι την σύνδεση επιτόπου-αντισώματος [4].



Εικόνα 30: Αναπαράσταση αντίδρασης ανοσοϊστοχημείας [4].

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ

Κατά την 1^η μέρα διεξαγωγής του πειράματος φτιάχτηκε το ρυθμιστικό διάλυμα TBS 0, 1M (pH = 7, 4) το οποίο συμβάλλει στην διατήρηση του pH σε μία σταθερή τιμή και φυλάγεται στους 4°C. Έγινε απόψυξη των αντικειμενοφόρων πλακών που περιείχαν τις τομές του ιστού για περίπου 30 λεπτά και ακολούθως ξεπλύθηκαν δύο φορές με TBS για 10 λεπτά. Έπειτα πραγματοποιήθηκε επώαση 30 λεπτών με διάλυμα TBS 0,1M, το οποίο περιείχε 3,3% NDS (normal donkey serum-φυσιολογικός ορός γαϊδουριού). Ο ρόλος του NDS στην ανοσοϊστοχημεία, ήταν να αποκλείσει την πιθανότητα, το δεύτερο αντίσωμα να προσδεθεί σε άλλο αντίσωμα εκτός του πρώτου, και έτσι να μας έδινε λανθασμένα αποτελέσματα. Έπειτα οι ιστοί ξεπλύθηκαν τρεις φορές με TBS για 5 λεπτά και επώαστηκαν με το πρώτο αντίσωμα overnight, δηλαδή για 16-18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Ως πρώτο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκαν:

-[ERK1/2 \(p44/p42\)](#): μία κινάση σερίνης/θρεονίνης που συμμετέχει σε καταρράκτες μεταγωγής σήματος Ras-Raf-MEK-ERK, ρυθμίζοντας πολλές κυτταρικές διεργασίες. Είναι ένα αντίσωμα ανεπτυγμένο σε κουνέλι (συγκέντρωση 1/200) [6].

-[TSC2/THY1](#): Το TSC2 (tuberous sclerosis complex 2) ελέγχει κυτταρική ανάπτυξη, διαίρεση αλλά και μέγεθος κυττάρων και είναι ανεπτυγμένο σε κουνέλι (συγκέντρωση 1/100). Το THY1 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που συνδέεται με γλυκοφωσφατίδυλο-ινοσιτόλη και εκφράζεται στην επιφάνεια νευρώνων και λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικό σε διάφορους τύπους καρκίνου. Είναι ανεπτυγμένο σε ποντικό (συγκέντρωση 1/50) [7].

Τα πρώτα αντισώματα διαλύθηκαν σε διάλυμα 0, 1M TBS το οποίο περιείχε 0, 5%NDS και 0, 3% Triton x-100. Το Triton x-100 είναι ένα φωτοευαίσθητο απορρυπαντικό που βοηθά το αντίσωμα να περάσει μέσα από τις μεμβράνες των κυττάρων και να καταφέρει να φτάσει στο εσωτερικό τους.

Κατά την 2^η μέρα του πειράματος οι ιστοί ξεπλύθηκαν 3 φορές με 0, 1 TBS για 5 λεπτά και επώαστηκαν για 1, 5 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το δεύτερο αντίσωμα. Για το δεύτερο αντίσωμα των TSC2 και THY1 επειδή είναι διαφορετικό, οι

επώσεις πραγματοποιήθηκαν ξεχωριστά. Ακολούθησε 3 φορές ξέπλυμα με TBS και οι τομές καλύφθηκαν με DAPI. Το DAPI (4, 6-διαμίδινο-2-φαινυλινδόλη) οπτικοποιεί πυρηνικό DNA και έτσι προσδιορίζει τον αριθμό των πυρήνων. Αφού καλύφθηκαν οι αντικειμενοφόρες πλάκες, αποθηκεύτηκαν στους 4°C [5]. Σημαντικό είναι οι χειρισμοί όλοι να γίνονται στο σκοτάδι γιατί τα αντισώματα είναι φωτοευαίσθητα.

Ως δεύτερα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν goat anti-rabbit και goat anti-mouse σε συγκέντρωση 1/500.

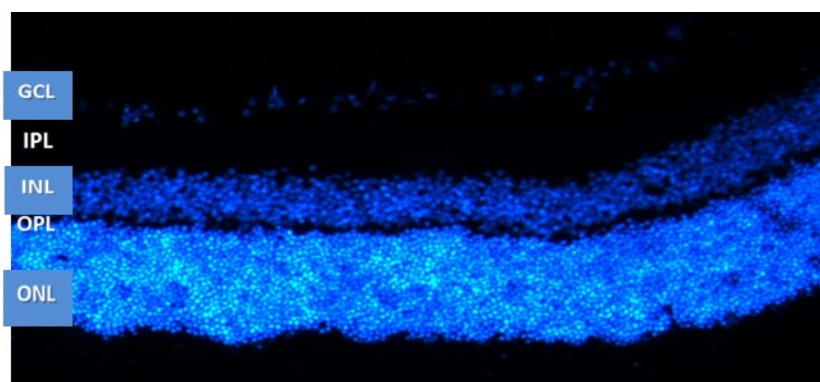
Αφού ετοιμάστηκαν οι αντικειμενοφόρες πλάκες, ακολούθησε παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο φθορισμού και λήψη φωτογραφιών, προκειμένου να εντοπίσουμε την παρουσία αντιγόνων που δεσμεύουν τα αντίστοιχα αντισώματα σε κάθε στοιβάδα του αμφιβληστροειδούς.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

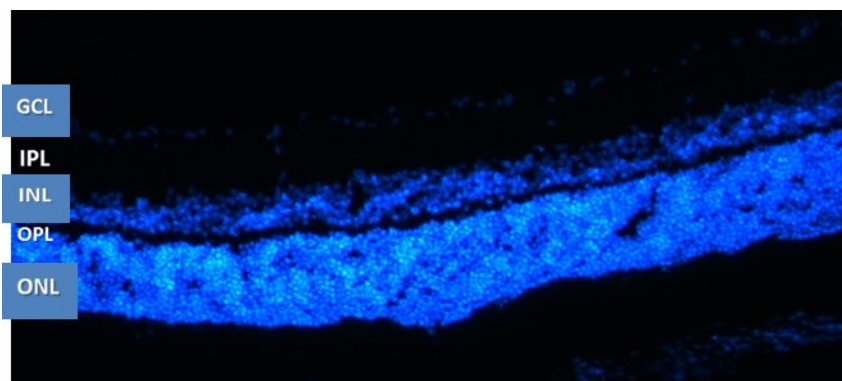
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΧ VIVO ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ ΣΤΟΝ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗ ΑΡΟΥΡΑΙΟΥ

Αριθμός Κυττάρων στις Στοιβάδες Αμφιβληστροειδή Αρouraίου Υπό Φυσιολογικές και Ισχαιμικές Συνθήκες

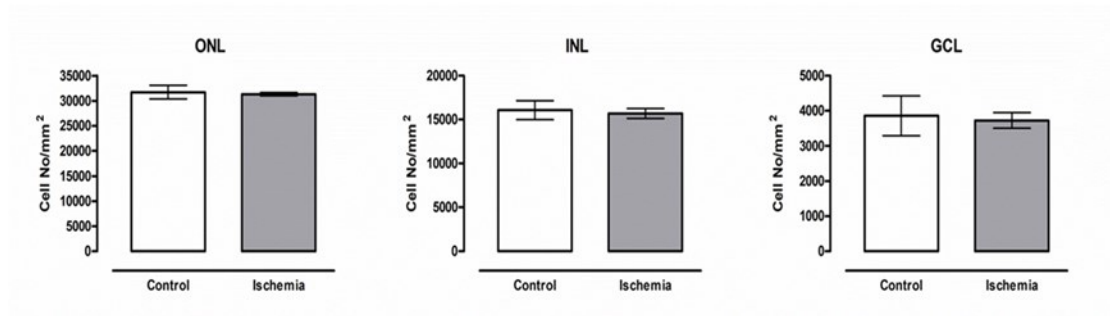
Για τον προσδιορισμό του αριθμού των κυττάρων σε κάθε στοιβάδα του αμφιβληστροειδή υπό φυσιολογικές συνθήκες (92 λεπτά σε οξυγόνο και γλυκόζη) αλλά και ισχαιμικές συνθήκες (26 λεπτά σε οξυγόνο και γλυκόζη ενώ τα υπόλοιπα 66 λεπτά σε σουκρόζη και άζωτο), χρησιμοποιήθηκαν πλακάκια με τομές ιστού, τα οποία φωτογραφήθηκαν με το μικροσκόπιο φθορισμού και πάρθηκαν οι εικόνες τους. Με την βοήθεια του προγράμματος ImageJ μετρήθηκαν τα κύτταρα σε κάθε στοιβάδα και έγινε εξαγωγή των αποτελεσμάτων μέσω του προγράμματος Prism και της στατιστικής ανάλυσης t-test. Υπό φυσιολογικές αλλά και ισχαιμικές συνθήκες, δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στον αριθμό των κυττάρων, σε καμία από τις τρεις στοιβάδες του αμφιβληστροειδή που μελετήθηκαν (ONL, INL, GCL) [Εικόνα].



Εικόνα 31:Σχηματική απεικόνιση ισχαιμικού ιστού αμφιβληστροειδή



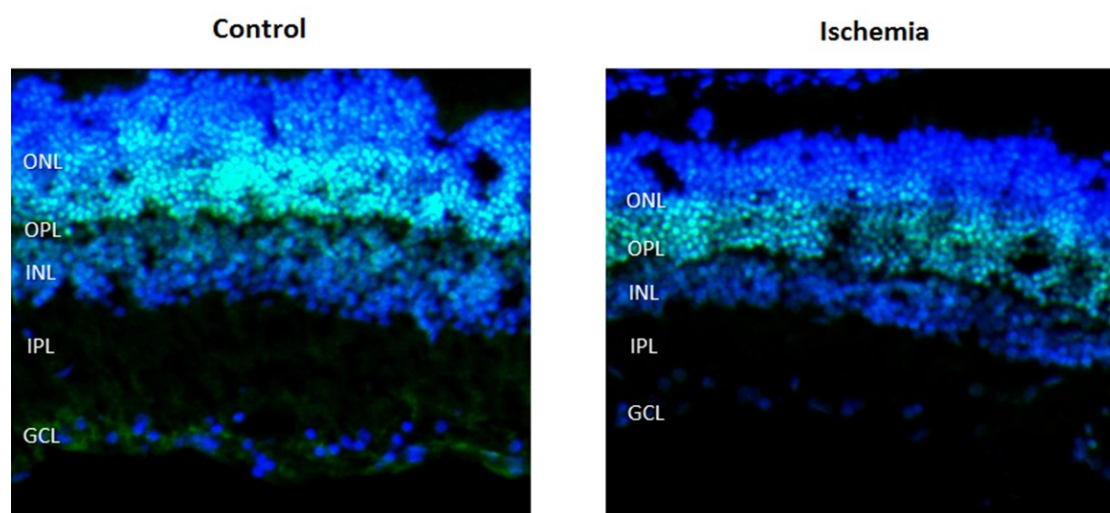
Εικόνα 32:Σχηματική απεικόνιση φυσιολογικού ιστού αμφιβληστροειδή



Εικόνα 33: Μέτρηση των κυττάρων της εξωτερικής κοκκώδης στοιβάδας, της εσωτερικής κοκκώδης στοιβάδας και της στοιβάδας των γαγγλιακών κυττάρων αμφιβληστροειδή αρουραίου υπό φυσιολογικές και ισχαιμικές συνθήκες. Συντμήσεις: *ONL*: εξωτερική κοκκώδης στοιβάδα, *INL*: εσωτερική κοκκώδης στοιβάδα, *GCL*:στοιβάδα γαγγλιακών κυττάρων.

Επίδραση Μεταβολικών προσβολών στην ανοσοδραστικότητα της p44/p42 (ERK1/2) σε αμφιβληστροειδή αρουραίου υπό φυσιολογικές και ισχαιμικές συνθήκες

Πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική ανάλυση σε αμφιβληστροειδή χρησιμοποιώντας ως πρώτο αντίσωμα την p44/p42 (ERK1/2) με σκοπό να εντοπιστεί η έκφρασή της στις στοιβάδες του ιστού, τόσο σε φυσιολογικές όσο και ισχαιμικές συνθήκες. Σε φυσιολογικές συνθήκες η p44/p42 εκφράζεται σχεδόν σε όλες τις στοιβάδες, ενώ κατά την ισχαιμία παρατηρήθηκε μια μείωση της έκφρασής της τόσο στην έσω δικτυωτή στοιβάδα (IPL) όσο και στην στοιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων (GCL). Η αύξηση στην έκφραση της p44/p42 στην στοιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων θα ήταν εμφανής μετά από επαναιμάτωση (reperfusion), καθώς στην κατάσταση αυτή δημιουργούνται παραπάνω βλάβες ενώ στην μια ώρα ισχαιμίας όχι τόσο [Εικόνα 30].

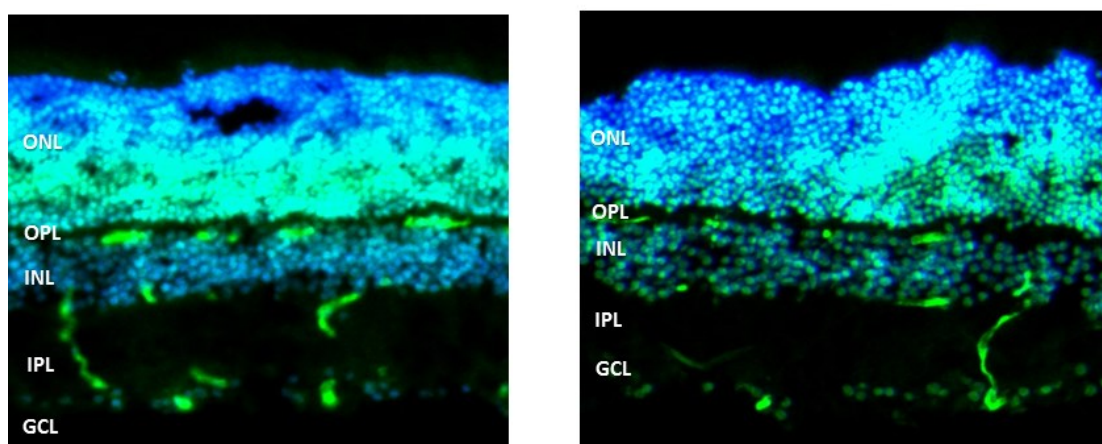


Εικόνα 34 : Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της p44/p42 σε αμφιβληστροειδή αρουραίου.

Αριστερά: Φυσιολογικές συνθήκες Δεξιά: Συνθήκες ισχαιμίας. Συντμήσεις: ONL:εξωτερική κοκκώδης στοιβάδα, OPL:εξωτερική δικτυωτή στοιβάδα, INL: εσωτερική κοκκώδης στοιβάδα, IPL:εσωτερική δικτυωτή στοιβάδα, GCL:στοιβάδα γαγγλιακών κυττάρων.

Επίδραση Μεταβολικών προσβολών στην ανοσοδραστικότητα του TSC2 σε αμφιβληστροειδή αρουραίου υπό φυσιολογικές και ισχαιμικές συνθήκες

Πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική ανάλυση σε αμφιβληστροειδή χρησιμοποιώντας ως πρώτο αντίσωμα το TSC2 (tuberous sclerosis complex 2) με σκοπό να εντοπιστεί η έκφρασή του στις στοιβάδες του ιστού, τόσο σε φυσιολογικές όσο και ισχαιμικές συνθήκες. Σε φυσιολογικές συνθήκες το TSC2 εκφράζεται κυρίως σε τριχοειδή αγγεία, ενώ σε κατάσταση ισχαιμίας διαπιστώθηκε μία ελαφριά μείωση της έκφρασής του στα τριχοειδή αγγεία κυρίως στην εξωτερική δικτυωτή στοιβάδα του αμφιβληστροειδή. Για καλύτερη απεικόνιση της έκφρασης του TSC2 θα ήταν προτιμότερη η εφαρμογή western blot, όπου έτσι θα γινόταν ποσοτικοποίηση της έκφρασης του και άρα πιο ξεκάθαρη απεικόνιση της μείωσής του [Εικόνα 31].

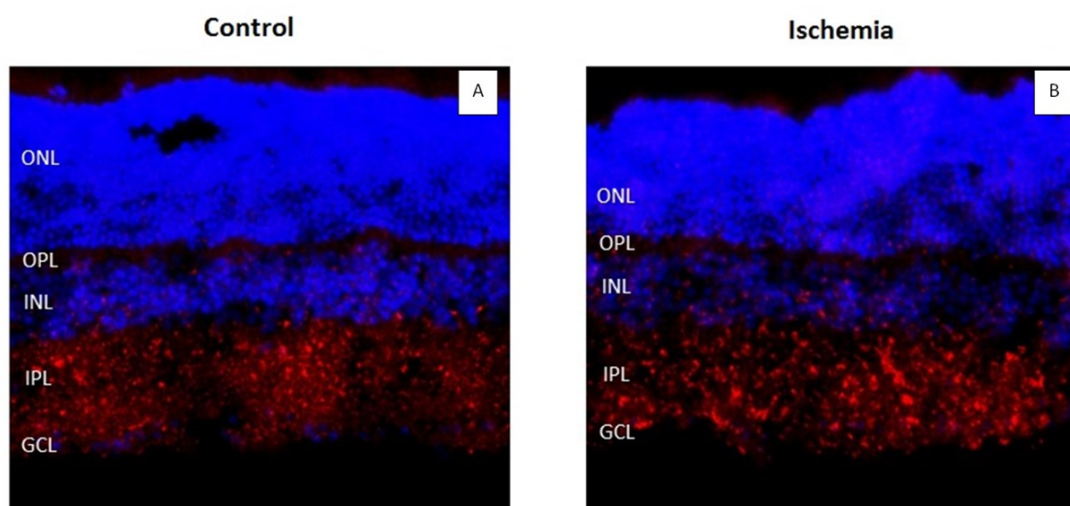


Εικόνα 35 : Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του TSC2 σε αμφιβληστροειδή αρουραίου. Αριστερά: Φυσιολογικές συνθήκες Δεξιά: Συνθήκες ισχαιμίας. Συντμήσεις: ONL:εξωτερική κοκκώδης στοιβάδα, OPL:εξωτερική δικτυωτή στοιβάδα, INL: εσωτερική κοκκώδης στοιβάδα, IPL:εσωτερική δικτυωτή στοιβάδα, GCL:στοιβάδα γαγγλιακών κυττάρων.

Επίδραση Μεταβολικών προσβολών στην ανοσοδραστικότητα του THY1 σε αμφιβληστροειδή αρουραίου υπό φυσιολογικές και ισχαιμικές συνθήκες

Πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική ανάλυση σε αμφιβληστροειδή χρησιμοποιώντας ως πρώτο αντίσωμα το THY1 με σκοπό να εντοπιστεί η έκφρασή του στις στοιβάδες του ιστού, τόσο σε φυσιολογικές όσο και ισχαιμικές συνθήκες. Σε φυσιολογικές συνθήκες το THY1 εντοπίζεται κυρίως στην στοιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων αλλά και στην έξω και έσω δικτυωτή στοιβάδα. Στην φάση ισχαιμίας, δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλαγή στο πρότυπο έκφρασης του THY1, παρόλο που ήταν αναμενόμενη μια μείωσή του. Αυτή η μείωση στην έκφρασή του θα ήταν εμφανή αν πραγματοποιείτο η φάση της επαναιμάτωσης, καθώς εκεί θα υπόκειντο σε μεγαλύτερο τραυματισμό τα γαγγλιακά κύτταρα κυρίως, θα μειωνόταν ο αριθμός τους και άρα θα μειωνόταν και η έκφραση του THY1

[Εικόνα 32].



Εικόνα 36 : Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του THY1 σε αμφιβληστροειδή αρουραίου. Αριστερά: Φυσιολογικές συνθήκες Δεξιά: Συνθήκες ισχαιμίας. *Συντμήσεις: ONL:εξωτερική κοκκώδης στοιβάδα, OPL:εξωτερική δικτυωτή στοιβάδα, INL: εσωτερική κοκκώδης στοιβάδα, IPL:εσωτερική δικτυωτή στοιβάδα, GCL:στοιβάδα γαγγλιακών κυττάρων.*

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η εγκεφαλική ισχαιμία είναι μια κατάσταση στην οποία η ροή αίματος και η παροχή θρεπτικών συστατικών στον εγκέφαλο είναι ανεπαρκής για να καλύψει αυτές τις μεταβολικές απαιτήσεις, προκαλώντας έτσι απώλεια της νευρωνικής λειτουργίας και βιωσιμότητας.

Με βάση τα αποτελέσματα περί αριθμού των κυττάρων που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη του αμφιβληστροειδούς δεν διαπιστώθηκε κάποια στατιστικά σημαντική αλλαγή μεταξύ φυσιολογικών και ισχαιμικών συνθηκών. Πιθανότατα, απώλεια κυττάρων θα ήταν εμφανής σε πολύ μεγαλύτερους χρόνους ισχαιμίας αλλά και μεγαλύτερη δράση επαναιμάτωσης.

Όσον αφορά την έκφραση βιοχημικών δεικτών και συγκεκριμένα του Thy1 (δείκτης γαγγλιακών κυττάρων), δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλαγή στο πρότυπο έκφρασης του THY1, παρόλο που ήταν αναμενόμενη μια μείωσή του. Αυτή η μείωση στην έκφρασή του θα ήταν εμφανής αν πραγματοποιείτο η φάση της επαναιμάτωσης, καθώς εκεί θα υπόκειντο σε μεγαλύτερο τραυματισμό τα γαγγλιακά κύτταρα κυρίως, θα μειωνόταν ο αριθμός τους και άρα θα μειωνόταν και η έκφραση του THY1. Με βάση την βιβλιογραφία το Thy1 χρησιμοποιήθηκε σαν δείκτης μείωσης του αριθμού των γαγγλιακών κυττάρων, καθώς μετά από μία μέρα εφαρμογής I/R παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασής του. Όσον αφορά όμως το διάστημα μίας ώρας ισχαιμίας μόνο που εφαρμόστηκε στην παρούσα πτυχιακή εργασία δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης θανάτου γαγγλιακών κυττάρων.

Επίσης το pTSC2 εκφράζεται κυρίως σε τριχοειδή αγγεία, ενώ σε κατάσταση ισχαιμίας διαπιστώθηκε μία ελαφριά μείωση της έκφρασής του στα τριχοειδή αγγεία στο χόριο και καμία αλλαγή στις στοιβάδες του αμφιβληστροειδή. Αυτό έρχεται να αντικρούσει τα αποτελέσματα από άλλες μελέτες οι οποίες παρατήρησαν αύξηση της έκφρασης του pTSC2, όπου όμως αυτό έγινε μετά από ισχαιμία-επαναιμάτωση και επιβεβαιώνεται από την Εικόνα 24, όπου μετά την δράση ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, αυξάνονται κατά πολύ οι αυξητικοί παράγοντες και έτσι η πλέον φωσφορυλιώνεται από κινάσες και ενεργοποιείται. Αυτή η μείωση που παρατηρήσαμε δεν μπορεί να εξηγηθεί πολύ καλά από την Εικόνα 24, στην οποία φαίνεται ότι μετά από εφαρμογή ισχαιμίας και κατ'επέκταση η μείωση της ATP μάλλον δεν ήταν αρκετή ώστε να ενεργοποιήσει την AMPK και άρα να φωσφορυλιωθεί/ενεργοποιηθεί η pTSC2. Αυτό πιθανώς συμβαίνει γιατί ο αμφιβληστροειδής έχει αρκετές εναλλακτικές πηγές παραγωγής ATP. Για επιβεβαίωση της μειωμένης έκφρασης του pTSC2 μετά από μία ώρα έγινε με πειράματα του εργαστηρίου φαρμακολογίας μέσω εφαρμογής western blot, όπου

ποσοτικοποιήθηκε η έκφραση του και άρα ήταν πιο ξεκάθαρη η απεικόνιση της μείωσής του .

Τέλος ,όσο αφορά το πρότυπο έκφρασης της pErk1/2 (p44/p42) κατά την ισχαιμία παρατηρήθηκε μια μείωση της έκφρασής της τόσο στην έσω δικτυωτή στοιβάδα (IPL) όσο και στην στοιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων (GCL). Αυτή η μείωση ήταν αναμενόμενη καθώς σύμφωνα με την Εικόνα 24, μπορούμε να κατανοήσουμε ότι σε καταστάσεις ισχαιμίας , οι αυξητικοί παράγοντες θα μειωθούν και αυτό θα οδηγήσει σε μείωση της φωσφορυλίωσης και άρα ενεργοποίησης της ERK1/2.

Χρειάζονται πολύ περισσότερες μελέτες όσον αφορά τα μεταβολικά μονοπάτια και τους βιοχημικούς δείκτες , αλλά αυτό που μπορεί να ειπωθεί με σιγουριά είναι ότι τόσο η ERK1/2 όσο και το TSC2 μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες ισχαιμίας ενώ το THY1 και ο αριθμός των κυττάρων στις στοιβάδες του αμφιβληστροειδή όχι.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. "Overview of Immunohistochemistry - GR." Www. thermofisher. com, www. thermofisher. com/gr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-immunohistochemistry. html.
2. "Διαφορά μεταξύ ανοσοφθορισμού και ανοσοϊστοχημείας | Συγκρίνετε τη διαφορά μεταξύ παρόμοιων όρων - Επιστήμη - 2022." Strephonsays, el. strephonsays. com/immunofluorescence-and-vs-immunohistochemistry-6384.
3. "Immunohistochemistry (IHC): The Complete Guide | Abcam." Www. abcam. com, www. abcam. com/content/immunohistochemistry-the-complete-guide.
4. Franciele F. Wolf, Giuliano S. Bublitz, Henrique R. Frigeri, Correlation and comparison of immunohistochemistry for HER2/neu, using the antibody SP3 and chromogenic in situ hybridization in breast carcinomas samples, J Bras Patol Med Lab, v. December 2015; 51, n. 6, p. 407-414.
5. Tarnowski, B. I., et al. "DAPI as a Useful Stain for Nuclear Quantitation." Biotechnic & Histochemistry: Official Publication of the Biological Stain Commission, vol. 66, no. 6, 1991, pp. 297–302, pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/1725854/.
6. Roskoski, Robert. "ERK1/2 MAP Kinases: Structure, Function, and Regulation." Pharmacological Research, vol. 66, no. 2, Aug. 2012, pp. 105–143, 10. 1016/j. phrs. 2012. 04. 005.
7. Bradley, John E., et al. "Roles and Regulation of Thy-1, a Context-Dependent Modulator of Cell Phenotype." BioFactors, vol. 35, no. 3, May 2009, pp. 258–265, www. ncbi. nlm. nih. gov/pmc/articles/PMC5675016/, 10. 1002/biof. 41. Accessed 23 July 2022.
8. Kalogeris, Theodore, et al. "Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury." International Review of Cell and Molecular Biology Volume 298, vol. 298, 2012, pp. 229–317, europepmc. org/articles/PMC3904795/, 10. 1016/b978-0-12-394309-5. 00006-7.
9. "Brain Ischemia - an Overview | ScienceDirect Topics." Www. sciencedirect. com, www. sciencedirect. com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/brain-ischemia. Accessed 4 Aug. 2022.
10. DeSai, Charisma, and Angela Hays Shapshak. "Cerebral Ischemia." PubMed, StatPearls Publishing, 2021, www. ncbi. nlm. nih. gov/books/NBK560510/.
11. Lee, Jin-Moo, et al. "Brain Tissue Responses to Ischemia." Journal of Clinical Investigation, vol. 106, no. 6, 15 Sept. 2000, pp. 723–731, www. ncbi. nlm. nih. gov/pmc/articles/PMC381398/, 10. 1172/jci11003.

12. Connaughton, Victoria. "Glutamate and Glutamate Receptors in the Vertebrate Retina." PubMed, University of Utah Health Sciences Center, 1995, [www. ncbi. nlm. nih. gov/books/NBK11526/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11526/).
13. Masland, Richard H. "The Neuronal Organization of the Retina." *Neuron*, vol. 76, no. 2, Oct. 2012, pp. 266–280, *j. neuron*. 2012. 10. 002. [www. ncbi. nlm. nih. gov/pmc/articles/PMC3714606/10.1016/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3714606/10.1016/)
14. Kolb H., Fernandez E., Nelson R., 1995, *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*, University of Utah Health Sciences Center. (simple anatomy of retina article)
15. Gupta, Mrinali Patel, et al. "Retinal Anatomy and Pathology." *Developments in Ophthalmology*, pp. 7–17, 10. 1159/000431128. Accessed 19 Apr. 2021.
16. Philipp Berens, and Thomas Euler. "Neuronal Diversity in the Retina." [https://www. degruyter. com/Document/Doi/10. 1515/Nf-2016-A055/Html](https://www.degruyter.com/Document/Doi/10.1515/Nf-2016-A055/Html), De Gruyter, 16 May 2017, [doi. org/10. 1515/nf-2016-A055](https://doi.org/10.1515/nf-2016-A055).
17. Kim, Ungsoo Samuel, et al. "Retinal Ganglion Cells—Diversity of Cell Types and Clinical Relevance." *Frontiers in Neurology*, vol. 12, 21 May 2021, 10. 3389/fneur. 2021. 661938. Accessed 2 Dec. 2021.
18. Baden, Tom, et al. "The Functional Diversity of Retinal Ganglion Cells in the Mouse." *Nature*, vol. 529, no. 7586, Jan. 2016, pp. 345–350, 10. 1038/nature16468. Accessed 21 Sept. 2020.
19. Mahabadi, Navid, and Yasir Al Khalili. "Neuroanatomy, Retina." PubMed, StatPearls Publishing, 2022, [www. ncbi. nlm. nih. gov/books/NBK545310/#](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545310/#). Accessed 6 Aug. 2022.
20. Kolb, Helga. "Roles of Amacrine Cells." *Nih. gov*, University of Utah Health Sciences Center, 30 Apr. 2007, [www. ncbi. nlm. nih. gov/books/NBK11539/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11539/).
21. Chaya, Taro, et al. "Versatile Functional Roles of Horizontal Cells in the Retinal Circuit." *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, 17 July 2017, p. 5540, [www. nature. com/articles/s41598-017-05543-2](http://www.nature.com/articles/s41598-017-05543-2), 10. 1038/s41598-017-05543-2.
22. Euler, Thomas, et al. "Retinal Bipolar Cells: Elementary Building Blocks of Vision." *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 15, no. 8, 18 July 2014, pp. 507–519, 10. 1038/nrn3783.
23. Nelson, Ralph, and Victoria Connaughton. "Bipolar Cell Pathways in the Vertebrate Retina." *Nih. gov*, University of Utah Health Sciences Center, 20 Jan. 2012, [www. ncbi. nlm. nih. gov/books/NBK11521/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11521/).
24. Molday, R. S., and O. L. Moritz. "Photoreceptors at a Glance." *Journal of Cell Science*, vol. 128, no. 22, 15 Nov. 2015, pp. 4039–4045, [jcs. biologists. org/content/128/22/4039](http://jcs.biologists.org/content/128/22/4039), 10. 1242/jcs. 175687.
25. Lauralee Sherwood, Εισαγωγή στην Φυσιολογία του Ανθρώπου, 8^η έκδοση
26. Dobson, J. F. "Herophilus of Alexandria." *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, vol. 18, no. Sect_Hist_Med, Mar. 1925, pp. 19–32, 10. 1177/003591572501801704. Accessed 10 Nov. 2020.

27. Jaeger, W. "Johannes Keplers Bedeutung Für Die Ophthalmologische Optik. " *Klinische Monatsblätter Für Augenheilkunde*, vol. 188, no. 02, Feb. 1986, pp. 163–166, 10. 1055/s-2008-1050605. Accessed 5 May 2020.
28. "The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1906. " NobelPrize. org, 2019, www. nobelprize. org/prizes/medicine/1906/cajal/biographical/.
29. Daneshfard, Babak, et al. "Ibn Al-Haytham (965–1039 AD), the Original Portrayal of the Modern Theory of Vision. " *Journal of Medical Biography*, vol. 24, no. 2, 15 Apr. 2014, pp. 227–231, journals. sagepub. com/doi/10. 1177/0967772014529050, 10. 1177/0967772014529050.
30. "The Father of Modern Optics - Ibn Al-Haytham's Book of Optics. " AZoOptics. com, 12 June 2014, www. azooptics. com/Article. aspx?ArticleID=925. Accessed 11 Aug. 2022.
31. Αιμιλία Ζίφα, 2017, Διακυτταρική επικοινωνία και μεταγωγή σήματος, 4^η έκδοση, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Θεσσαλίας.
32. "Molecular Evolution and Functional Diversity of Opsin-Based Photopigments. " *Photobiology. info*, 2010, photobiology. info/Terakita. html.
33. file:///C:/Users/AnDrEaS%20DELL%20N5050/Downloads/Documents/ophthalm ologia_visual_pathways (2007). pdf
34. Kiel, Jeffrey W. "Anatomy. " Nih. gov, Morgan & Claypool Life Sciences, 2010, www. ncbi. nlm. nih. gov/books/NBK53329/.
35. Sun, Ye, and Lois E. H. Smith. "Retinal Vasculature in Development and Diseases. " *Annual Review of Vision Science*, vol. 4, no. 1, 15 Sept. 2018, pp. 101–122, www. ncbi. nlm. nih. gov/pmc/articles/PMC6326083/#:~:text=The%20retinal%20vessels%20provide% 20blood, 10. 1146/annurev-vision-091517-034018. Accessed 9 Oct. 2021.
36. Osborne, Neville N, et al. "Retinal Ischemia: Mechanisms of Damage and Potential Therapeutic Strategies. " *Progress in Retinal and Eye Research*, vol. 23, no. 1, 1 Jan. 2004, pp. 91–147, www. sciencedirect. com/science/article/abs/pii/S1350946203000788, 10. 1016/j. preteyeres. 2003. 12. 001. Accessed 29 Nov. 2021.
37. Neal, M. J., et al. "Effects of Ischaemia on Neurotransmitter Release from the Isolated Retina. " *Journal of Neurochemistry*, vol. 62, no. 3, 1 Mar. 1994, pp. 1025–1033, pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/7906713/, 10. 1046/j. 1471-4159. 1994. 62031025. x. Accessed 19 Aug. 2022.
38. Louzada-Júnior, P., et al. "Glutamate Release in Experimental Ischaemia of the Retina: An Approach Using Microdialysis. " *Journal of Neurochemistry*, vol. 59, no. 1, 1 July 1992, pp. 358–363, pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/1351929/, 10. 1111/j. 1471-4159. 1992. tb08912. x. Accessed 19 Aug. 2022.
39. Rossi, David J., et al. "Glutamate Release in Severe Brain Ischaemia Is Mainly by Reversed Uptake. " *Nature*, vol. 403, no. 6767, Jan. 2000, pp. 316–321, 10. 1038/35002090. Accessed 4 Nov. 2019.

40. Barnett, Nigel L, et al. "Differential Perturbation of Neuronal and Glial Glutamate Transport Systems in Retinal Ischaemia." *Neurochemistry International*, vol. 39, no. 4, Oct. 2001, pp. 291–299, 10. 1016/s0197-0186 (01)00033-x. Accessed 12 Dec. 2019.
41. Thoreson, W. "Glutamate Receptors and Circuits in the Vertebrate Retina." *Progress in Retinal and Eye Research*, vol. 18, no. 6, Nov. 1999, pp. 765–810, 10. 1016/s1350-9462 (98)00031-7. Accessed 5 Sept. 2021.
42. YANG, X. "Characterization of Receptors for Glutamate and GABA in Retinal Neurons." *Progress in Neurobiology*, vol. 73, no. 2, June 2004, pp. 127–150, 10. 1016/j. pneurobio. 2004. 04. 002.
43. Lipton, Peter. "Ischemic Cell Death in Brain Neurons." *Physiological Reviews*, vol. 79, no. 4, 10 Jan. 1999, pp. 1431–1568, 10. 1152/physrev. 1999. 79. 4. 1431.
44. Nishizawa, Yukio. "Glutamate Release and Neuronal Damage in Ischemia." *Life Sciences*, vol. 69, no. 4, June 2001, pp. 369–381, 10. 1016/s0024-3205 (01)01142-0. Accessed 6 Nov. 2019.
45. Bezzi, Paola, et al. "Prostaglandins Stimulate Calcium-Dependent Glutamate Release in Astrocytes." *Nature*, vol. 391, no. 6664, 1 Jan. 1998, pp. 281–285, www.nature.com/articles/34651, 10. 1038/34651. Accessed 26 Feb. 2021.
46. Manev, H., et al. "Delayed Increase of Ca²⁺ Influx Elicited by Glutamate: Role in Neuronal Death." *Molecular Pharmacology*, vol. 36, no. 1, 1 July 1989, pp. 106–112, pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2568579/.
47. Massey, Stephen C. "Chapter 11 Cell Types Using Glutamate as a Neurotransmitter in the Vertebrate Retina." *Progress in Retinal Research*, vol. 9, Jan. 1990, pp. 399–425, 10. 1016/0278-4327 (90)90013-8. Accessed 6 Jan. 2022.
48. Sattler, Rita, and Michael Tymianski. "Molecular Mechanisms of Glutamate Receptor-Mediated Excitotoxic Neuronal Cell Death." *Molecular Neurobiology*, vol. 24, no. 1-3, 2001, pp. 107–130, 10. 1385/mn:24:1-3:107. Accessed 6 Nov. 2019.
49. Kaur, Charanjit. "Hypoxia-Ischemia and Retinal Ganglion Cell Damage." *Clinical Ophthalmology*, Aug. 2008, p. 879, 10. 2147/ophth. s3361. Accessed 6 July 2020.
50. Han, Juliette M., and Mustafa Sahin. "TSC1/TSC2 Signaling in the CNS." *FEBS Letters*, vol. 585, no. 7, 15 Feb. 2011, pp. 973–980, 10.1016/j.febslet.2011.02.001. Accessed 15 May 2020.
51. Inoki, Ken, et al. "TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival." *Cell*, vol. 115, no. 5, Nov. 2003, pp. 577–590, 10.1016/s0092-8674(03)00929-2. Accessed 10 June 2019.
52. Villa-González, Mario, et al. "Dysregulation of MTOR Signaling after Brain Ischemia." *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 5, 4 Mar. 2022, p. 2814, www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8911477/, 10.3390/ijms23052814. Accessed 27 Aug. 2022.

53. Roth, Steven, et al. "Mitogen-Activated Protein Kinases and Retinal Ischemia." *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 44, no. 12, 1 Dec. 2003, pp. 5383–5395, iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2124125, 10.1167/iovs.03-0451. Accessed 28 Aug. 2022.
54. Kong, Tingting, et al. "Role of the Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Signaling Pathway in Ischemia-Reperfusion Injury." *Frontiers in Physiology*, vol. 10, 14 Aug. 2019, www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6702336/, 10.3389/fphys.2019.01038. Accessed 11 Dec. 2019.
55. Nie, Duyu, et al. "Tsc2-Rheb Signaling Regulates EphA-Mediated Axon Guidance." *Nature Neuroscience*, vol. 13, no. 2, 10 Jan. 2010, pp. 163–172, 10.1038/nn.2477. Accessed 8 Apr. 2020.
56. Purves, Dale, et al. "Neuroglial Cells." *Nih.gov*, Sinauer Associates, 2017, www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10869/.
57. Guy-Evans, Olivia. "Glial Cells Types and Functions - Simply Psychology." *Www.simplypsychology.org*, 8 July 2021, www.simplypsychology.org/glial-cells.html.
58. Newman, Eric, and Andreas Reichenbach. "The Müller Cell: A Functional Element of the Retina." *Trends in Neurosciences*, vol. 19, no. 8, Aug. 1996, pp. 307–312, 10.1016/0166-2236(96)10040-0. Accessed 19 Aug. 2020.
59. Kolb, Helga. "Glial Cells of the Retina." *PubMed*, University of Utah Health Sciences Center, 1995, www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11516/. Accessed 24 Sept. 2022.
60. "Types of Glia." *Uq.edu.au*, 16 June 2017, qbi.uq.edu.au/brain-basics/brain/brain-physiology/types-glia/.
61. Button, Robert W., et al. "Autophagic Activity in Neuronal Cell Death." *Neuroscience Bulletin*, vol. 31, no. 4, 1 Aug. 2015, pp. 382–394, pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26077705/, 10.1007/s12264-015-1528-y. Accessed 2 Oct. 2022.