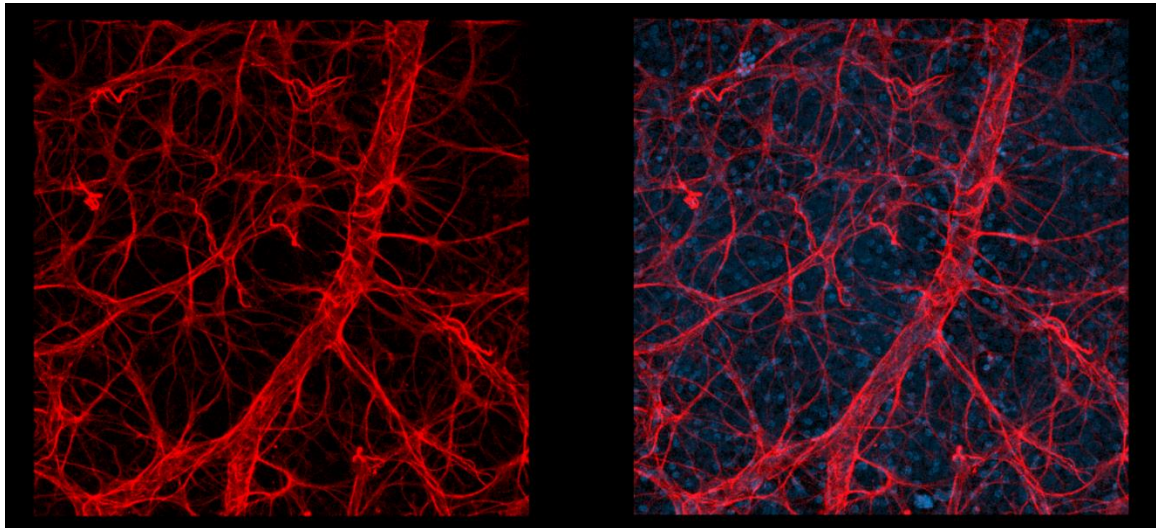


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Αμφιβληστροειδική βλάβη
ισχαιμίας/επαναιμάτωσης - Επίδραση στα
αστροκύτταρα & τα κύτταρα Müller



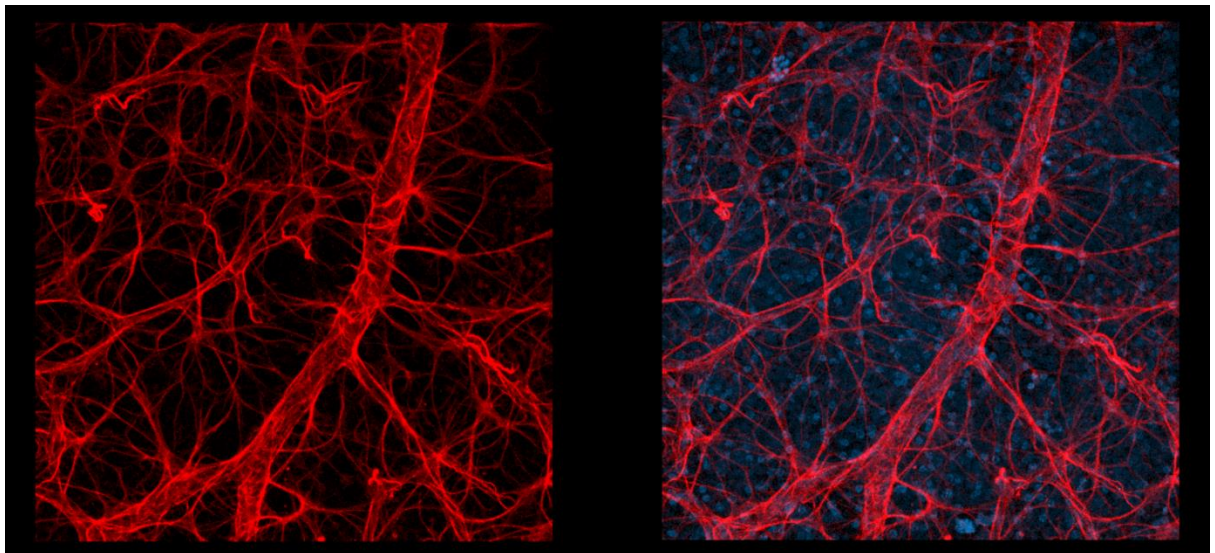
ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Γρηγόριος Αγραφιώτης του Δημητρίου

Λάρισα, 2023

UNIVERSITY OF THESSALY
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY

Retinal ischemia/reperfusion injury –
Effect on astrocytes & Müller cells



BACHELOR'S THESIS

Grigorios Agrafiotis

Larissa, 2023

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Άννα Βασιλάκη, Επίκουρος Καθηγήτρια Φαρμακολογίας (Επιβλέπουσα)

Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σταματία Παπουτσοπούλου, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Ανοσολογίας

(Συνεπιβλέπουσα)

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευτυχία Ασπροδίνη, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας (Μέλος)

Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2022 - 2023. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα όλους όσους συνέβαλλαν στην πραγματοποίηση και ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην Επίκουρο Καθηγήτρια Φαρμακολογίας κ. Βασιλάκη Άννα, για τη καθοδήγησή της και την εμπιστοσύνη της καθ' όλη την διάρκεια της διπλωματικής εργασίας, αλλά και που μοιράστηκε μαζί μου πολύτιμες επιστημονικές γνώσεις και με βοήθησε να ξεκινήσω το ερευνητικό μου ταξίδι στον κλάδο των νευροεπιστημών, μέσα από τη παρούσα διπλωματική εργασία.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου. Την Επίκουρο Καθηγήτρια Ανοσολογίας κ. Παπουτσοπούλου Σταματία, η οποία μου δίδαξε πολλές γνώσεις καθ' όλη την προπτυχιακή ακαδημαϊκή μου πορεία ως καθηγήτρια, αλλά και που δέχθηκε με χαρά να συνεπιβλέψει τη συγκεκριμένη την πτυχιακή εργασία. Τη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας κ. Ασπροδίνη Ευτυχία, για τις γνώσεις της και τη πολύτιμη βοήθειά της τόσο σε τεχνικά όσο και σε θεωρητικά ζητήματα.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τον κ. Μπέγα Ηλία, ΕΤΕΠ στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας, για τη συνεχή βοήθεια του σε ό, τι χρειάστηκα μέσα στο χώρο του εργαστηρίου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	2
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1. Αμφιβληστροειδής	3
1.1 Ανατομία.....	3
1.2 Νευρικά κύτταρα.....	5
1.2.1 Φωτοϋποδοχείς – Κωνιοφόρα και Ραβδιοφόρα Κύτταρα	5
1.2.2 Γαγγλιακά Κύτταρα	6
1.2.3 Βραχύινα κύτταρα.....	6
1.2.4 Δίπολα κύτταρα	7
1.2.5 Οριζόντια κύτταρα	8
1.3 Κύτταρα της γλοίας.....	8
1.3.1 Κύτταρα Müller	10
1.3.2 Αστροκύτταρα	13
1.3.3 Μικρογλοία	15
2. Αιμάτωση	16
2.1 Αιματο-αμφιβληστροειδικός Φραγμός.....	18
3. Ισχαιμία	19
3.1 Ορολογία	19
3.2 Αμφιβληστροειδική Ισχαιμία.....	19
4. Επαναιμάτωση – Βλάβη Ισχαιμίας/Επαναιμάτωσης.....	21
4.1 Αμφιβληστροειδική Βλάβη Ισχαιμίας/Επαναιμάτωσης	21
4.1.1 Αμφιβληστροειδική Βλάβη Ισχαιμίας/Επαναιμάτωσης & Ca ²⁺	22
4.1.2 Αμφιβληστροειδική Βλάβη Ισχαιμίας/Επαναιμάτωσης & Αιματο- αμφιβληστροειδικός φραγμός.....	23
4.1.3 Αμφιβληστροειδική Βλάβη Ισχαιμίας/Επαναιμάτωσης & Νεοαγγείωση	25
ΣΚΟΠΟΣ	26
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	27
1. Πειραματόζωα.....	27
2. <i>Ex vivo</i> πείραμα ισχαιμίας/επαναιμάτωσης	27
3. Ανοσοϊστοχημεία	29

3.1 Αρχή της μεθόδου	29
3.2 Πειραματική Διαδικασία.....	29
4. Μελέτη της επίδρασης της <i>ex vivo</i> ισχαιμίας/επαναιμάτωσης στην ενεργοποίηση των αστροκυττάρων	31
4.1. Δειγματοληψία	31
4.2. Ανάλυση εικόνας.....	31
5. Μελέτη της επίδρασης της <i>ex vivo</i> ισχαιμίας/επαναιμάτωσης στην ενεργοποίηση των κυττάρων Müller	34
6. Στατιστική ανάλυση	34
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	35
1. Επίδραση της <i>ex vivo</i> βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης στην ενεργοποίηση των αστροκυττάρων	35
2. Διαφορική επίδραση της <i>ex vivo</i> βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης στην ενεργοποίηση των αστροκυττάρων ανάλογα με την περιοχή του αμφιβληστροειδούς.....	37
3. Επίδραση της <i>ex vivo</i> βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης στην ενεργοποίηση των κυττάρων Müller	39
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	44
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	47

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο όρος ισχαιμία αναφέρεται σε μια παθολογική κατάσταση που χαρακτηρίζεται από ανεπάρκεια της ροής αίματος σε έναν ιστό. Η ισχαιμία συνήθως ακολουθείται από την επαναιμάτωση. Η βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης του αμφιβληστροειδούς, είναι η κύρια αιτία διαταραχής της όρασης και τύφλωσης, κυρίως λόγω της απουσίας αποτελεσματικών θεραπευτικών μέτρων. Τα κύτταρα της γλοίας φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στη βλάβη αυτή. Στη παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η βραχυχρόνια επίδραση της *ex vivo* βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης του αμφιβληστροειδούς στα αστροκύτταρα και τα κύτταρα Müller, τους κύριους τύπους γλοίας του αμφιβληστροειδούς των σπονδυλωτών. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση και διάχυση (ροή 1,2ml/min) του αμφιβληστροειδούς νεαρών ενήλικων αρσενικών επίμυων τύπου Wistar με τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό (arti-CSF/γλυκόζης κορεσμένο με 95%O₂/5%CO₂) και επίτευξη ισχαιμίας (66min διάχυσης με arti-CSF/σουκρόζης κορεσμένο με 95%N₂/5%CO₂) ή/και επαναιμάτωσης (66min ισχαιμίας και 4h διάχυση των ιστών με arti-CSF/γλυκόζης κορεσμένο με 95%O₂/5%CO₂). Μετά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας και τη μονιμοποίηση των ιστών έγινε ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της όξινης πρωτεΐνης των ενδιάμεσων ινιδίων της γλοίας (GFAP) με σκοπό τη μελέτη της πιθανής ενεργοποίησης (με βάση τη μορφολογία) των αστροκυττάρων και των κυττάρων Müller στα πρώιμα αυτά στάδια της βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης. Η αξιολόγηση της μορφολογίας των αστροκυττάρων έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος ImageJ και με την καταμέτρηση του αριθμού των διακλαδώσεων και του αριθμού και του συνολικού μήκους των αποφύσεων τους. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, 66 λεπτά ισχαιμίας οδήγησαν σε στατιστικώς σημαντική αύξηση του αριθμού ($p<0.05$) και του μήκους των αποφύσεων ($p<0.05$) και των διακλαδώσεων ($p<0.05$) των αστροκυττάρων του αμφιβληστροειδούς, σε σχέση με τους ιστούς ελέγχου ενώ, 4 ώρες μετά την επαναιμάτωση του ιστού το φαινόμενο αυτό εντείνεται ($p<0.001$, σε σχέση με τους ιστούς ελέγχου). Η φαινοτυπική αλλαγή των αστροκυττάρων που παρατηρείται κατά την ισχαιμία εξαρτάται από την περιοχή του ιστού που αυτά εντοπίζονται με τη μεγαλύτερη και χρονικά προγενέστερη ενεργοποίηση να παρατηρείται στο κέντρο του αμφιβληστροειδούς. Τέλος, όσον αφορά στα κύτταρα Müller, δε παρατηρείται αλλαγή στη μορφολογία τους μετά από 66min ισχαιμίας ή μετά από 4h επαναιμάτωσης του ιστού. Συμπερασματικά, αμέσως μετά την ισχαιμία παρατηρείται φαινοτυπική αλλαγή (αστρογλοίωση) των αστροκυττάρων του αμφιβληστροειδούς ενώ ήδη μετά από 4 ώρες επαναιμάτωσης του ιστού η αστρογλοίωση αυτή επεκτείνεται σε όλες τις περιοχές του ιστού. Περαιτέρω έρευνες σχετικά με τους μοριακούς και κυτταρικούς μηχανισμούς που διέπουν τα πρώιμα αυτά στάδια της αστρογλοίωσης μπορούν να παράσχουν πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με πιθανές θεραπευτικές προσεγγίσεις της αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας.

ABSTRACT

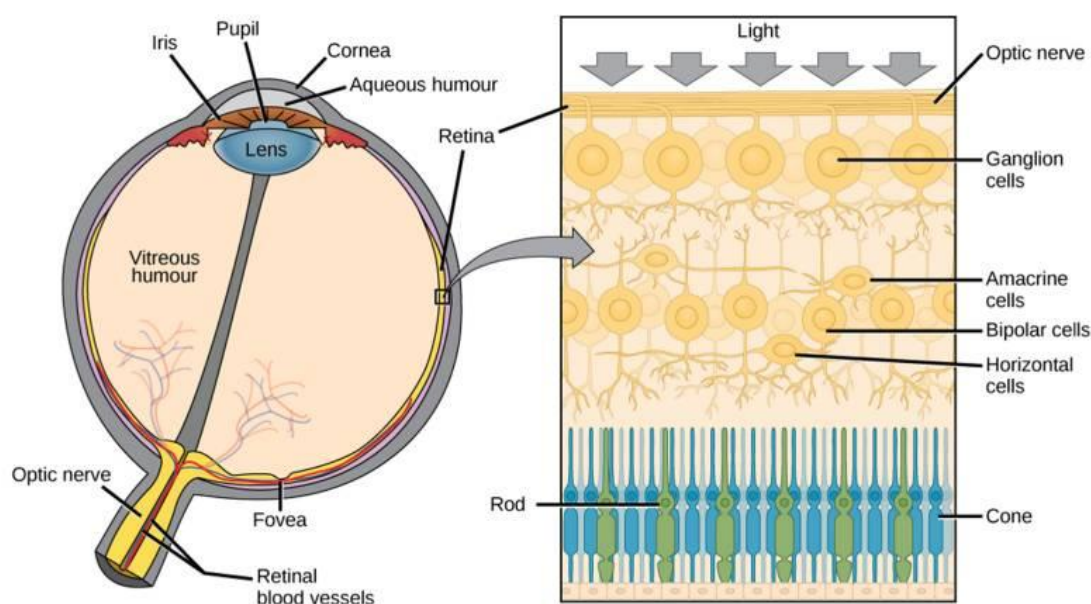
Ischemia is a medical condition characterized by reduced blood flow to a tissue. Ischemia is usually followed by reperfusion. Retinal ischemia/reperfusion injury is the leading cause of visual disorders and blindness, mainly due to the absence of effective treatments. Glial cells appear to play an important role in this injury. The aim of this study was to evaluate the short-term effects of *ex vivo* retinal ischemia/reperfusion injury on astrocytes and Müller cells; the main types of glial cells in the vertebrate retina. Retinas of young-adult male Wistar rats were isolated and perfused with physiological artificial cerebrospinal fluid (95%O₂/5%CO₂ saturated arti-CSF/glucose; flow:1.2ml/min) followed or not by an ischemic (66min perfusion with 95%N₂/5%CO₂ saturated arti-CSF/sucrose) and/or ischemia/reperfusion insult (66min of ischemia and 4h reperfusion with physiological arti-CSF). At the end of each experiment, tissues were collected, fixed, flat mounted and immunohistochemically proceeded for glial fibrillary acidic protein (GFAP) localization. The activation of astrocytes and Müller cells in these early stages of ischemia/reperfusion injury was studied using confocal and optical microscopy image acquisition and ImageJ analysis. Astrocytic reactivity was evaluated by measuring alterations in the number of branches and junctions formed, as well as changes in the total length of branches. Based on our findings, a 66-minute ischemia resulted in a statistically significant increase in the number of branches ($p<0.05$) and junctions ($p<0.05$) formed, as well as the total length of branches ($p<0.05$) in retinal astrocytes compared to control tissues. These changes indicate astrocyte activation. Furthermore, 4 hours after tissue reperfusion, these morphological changes intensified ($p<0.001$, compared to control). The phenotypic change of astrocytes observed during ischemia seems to be area specific with changes being more pronounced in the center compared to the periphery of the tissue. Regarding retinal Müller cells, no apparent morphological change was observed after 66min of ischemia or after 4h of tissue reperfusion. In conclusion, immediately after ischemia a phenotypic change (astrogliosis) of the retinal astrocytes is observed, while after 4 hours of tissue reperfusion this astrogliosis extends to all retinal areas. Further investigations into the molecular and cellular mechanisms underlying this astrogliosis response may provide valuable insights into potential therapeutic approaches for conditions involving retinal ischemia and related disorders.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

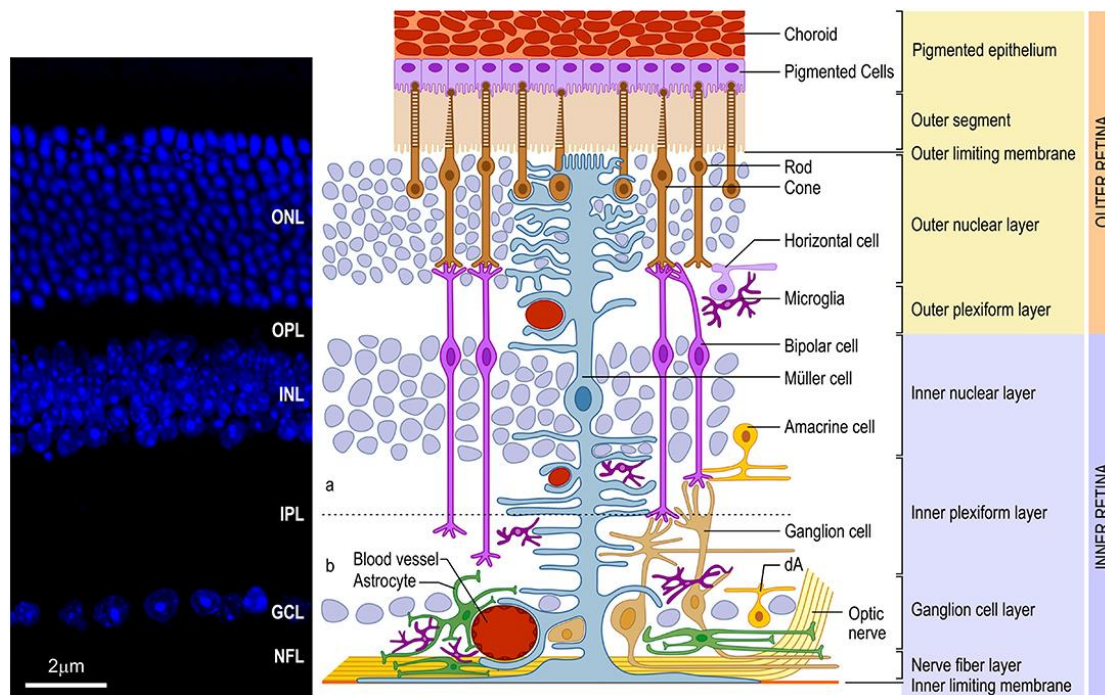
1. Αμφιβληστροειδής

1.1 Ανατομία

Ο αμφιβληστροειδής είναι το «παράθυρο» του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος στον κόσμο, καθώς μετατρέπει την οπτική εικόνα σε ένα νευρικό κώδικα (Boron, Boulpaer, 2020). Είναι ένας αισθητήριος ιστός με πολλά στρώματα, πάχους περίπου 200μm στον άνθρωπο (Boron, Boulpaer, 2020) και βρίσκεται στο πίσω μέρος του οφθαλμού (Εικόνα 1). Ο αμφιβληστροειδής είναι νευροεξωδερμικής προέλευσης, προέρχεται από τον διεγκέφαλο και η ανάπτυξή του ξεκινά τη τέταρτη εβδομάδα της εμβρυογένεσης (Behar-Cohen και συν., 2020, Mahabadi, Khalili, 2022). Ως ο πιο απαιτητικός μεταβολικά ιστός του σώματος, ο αμφιβληστροειδής καταναλώνει το οξυγόνο πιο γρήγορα από οποιονδήποτε άλλο ιστό (Mahabadi, Khalili, 2022).



Εικόνα 1 Ανατομία του οφθαλμού και του αμφιβληστροειδούς. Ο αμφιβληστροειδής βρίσκεται σε όλο το πίσω μέρος του αμφιβληστροειδή. Δεξιά φαίνεται η σύνθεση του αμφιβληστροειδή ως προς τα νευρικά του κύτταρα. Εικόνα από Marchesi και συν., 2021. Με άδεια από Annalisa Barbieri



Εικόνα 2 Σχηματική απεικόνιση των στιβάδων του αμφιβληστροειδούς. Αριστερά: Κατακόρυφη τομή αμφιβληστροειδούς ποντικού επισημασμένη με DAPI, μια φθορίζουσα χρωστική που βάφει πυρήνες. Στρώμα Νευρικών Ινών (NFL), Στρώμα γαγγλιακών κυττάρων (GCL), Εσωτερική Δικτυωτή Στιβάδα (IPL), Εσωτερική Πυρηνική Στιβάδα (INL), Εξωτερική Δικτυωτή Στιβάδα (OPL), Εξωτερική Πυρηνική Στιβάδα (ONL). **Δεξιά:** Ο αμφιβληστροειδής αποτελείται από διαφορετικούς τύπους κυττάρων που βρίσκονται σε συγκεκριμένα στρώματα. Υπάρχουν έξι τύποι νευρικών κυττάρων: τα ραδιοφόρα και τα κωνιοφόρα (φωτοϋποδοχείς), τα οριζόντια, δίπολα και βραχύινα κύτταρα, καθώς και τα γαγγλιακά κύτταρα. Το κύτταρο που φαίνεται στην εικόνα ως dA είναι ένα έκτοπο βραχύινο κύτταρο, στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων. Η διακεκομμένη γραμμή υπάρχει για να διαχωρίσει σχηματικά το είδος των συνάψεων: στη πλευρά του a υπάρχουν ανασταλτικές συνάψεις, ενώ στη πλευρά του b διεγερτικές. Επίσης, υπάρχουν τρεις κυτταρικοί τύποι γλοίας, τα κύτταρα Müller, τα αστροκύτταρα και τα ολιγοδενδροκύτταρα. Εικόνα χωρίς τροποποίηση από de Campos, 2020. Άδεια: Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

Στον αμφιβληστροειδή υπάρχουν έξι τύποι νευρικών κυττάρων, κάθε ένας από τους οποίους παίζει συγκεκριμένο ρόλο στη μετάδοση του σήματος και στην ομοίωση του αμφιβληστροειδούς. Τα κύτταρα αυτά εντοπίζονται σε στιβάδες καθ' όλο το πάχος του ιστού. Οι στιβάδες αυτές είναι από έξω (πιο κοντά στον κόσμο) προς τα μέσα (πιο κοντά στον εγκέφαλο) οι εξής:

1. Οπτικό νεύρο
2. Στιβάδα νευρικών ινών
3. Στιβάδα γαγγλιακών κυττάρων
4. Εσωτερική δικτυωτή στιβάδα
5. Εσωτερική κοκκώδης στιβάδα

6. Εξωτερική δικτυωτή στιβάδα
7. Εξωτερική κοκκώδης στοιβάδα
8. Στιβάδα φωτοϋποδοχέων
9. Μεγάχρουν επιθήλιο

Οι στιβάδες 1-8 αποτελούν τον ιδίως αμφιβληστροειδή.

Τα νευρικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς αλληλεπιδρούν στενά μεταξύ τους με σκοπό τη μετάδοση της οπτικής πληροφορίας, καθώς μετατρέπουν τα εισερχόμενα φωτεινή ενέργεια σε δυναμικά δράσεις, τα οποία φτάνουν στον εγκέφαλο και μετατρέπονται στη τρισδιάστατη εικόνα. Οι έξι τύποι νευρικών κυττάρων είναι τα **γαγγλιακά κύτταρα**, τα οποία βρίσκονται στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων, τα **κωνιοφόρα και τα ραβδιοφόρα κύτταρα**, που βρίσκονται στη στιβάδα των φωτοϋποδοχέων, τα **βραχύινα, τα δίπολα και τα οριζόντια κύτταρα**, τα σώματα των οποίων βρίσκονται στην εσωτερική κοκκώδη στοιβάδα (Εικόνα 2).

1.2 Νευρικά κύτταρα

1.2.1 Φωτοϋποδοχείς – Κωνιοφόρα και Ραβδιοφόρα Κύτταρα

Τα κύρια φωτοευαίσθητα κύτταρα – φωτοϋποδοχείς του αμφιβληστροειδούς, είναι τα κωνιοφόρα και τα ραβδιοφόρα κύτταρα που συνθέτουν το στρώμα των φωτοϋποδοχέων. Τα κύτταρα αυτά ονομάστηκαν έτσι διότι αποτελούνται από δίσκους που μοιάζουν με κωνία και ραβδία αντίστοιχα. Βρίσκονται σε επαφή με το μεγάχρουν επιθήλιο, στο οπίσθιο τμήμα του αμφιβληστροειδούς, δηλαδή μακριά από το εισερχόμενο φως, κάτι που υποδεικνύει ότι το φως πρέπει πρώτα να περάσει από όλα τα άλλα στρώματα, προτού φτάσει στους φωτοϋποδοχείς. Ωστόσο, αυτό θεωρείται πλεονέκτημα καθώς τα ραβδιοφόρα και κωνιοφόρα κύτταρα υφίστανται συνεχή ανανέωση (Baron, Bouhpaer). Τα κωνιοφόρα είναι πολύ λιγότερα σε σχέση με τα ραβδιοφόρα (περίπου 1:16, Rehman και συν., 2022). Υπάρχουν τρεις τύποι κωνιοφόρων κυττάρων, καθένας από τους οποίους αφορά την ανίχνευση μικρών, μεσαίων και μεγάλων μηκών κύματος. Τα ραβδιοφόρα κύτταρα περιέχουν ροδοψίνη, μια φωτο-ευαίσθητη χρωστική που επιτρέπει την απορρόφηση φωτονίων (Nguyen και συν., 2022). Τα ραβδιοφόρα φαίνεται να είναι ο δεύτερος σε αριθμό τύπος νευρώνων στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα, μετά τα κοκκοειδή κύτταρα της παρεγκεφαλίδας (Masland, 2012). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι τα κωνιοφόρα κύτταρα

συγκεντρώνονται κυρίως στο κέντρο του αμφιβληστροειδούς και συγκεκριμένα στο κεντρικό βοθρίο (fovea) της ωχράς κηλίδας (macula) το οποίο εμφανίζει την μεγαλύτερη οπτική οξύτητα.

1.2.2 Γαγγλιακά Κύτταρα

Η κάθετη οδός μετάδοσης της οπτικής πληροφορίας ξεκινά με τη μεταγωγή των φωτεινών σημάτων από τα κωνιοφόρα και ραβδιοφόρα κύτταρα και καταλήγει μέσω των γαγγλιακών κυττάρων στον εγκέφαλο (Pitito και συν., 2021). Οι μακριοί νευράξονες των γαγγλιακών κυττάρων (περίπου 50mm) δημιουργούν το οπτικό νεύρο, ενώ οι δενδρίτες των γαγγλιακών κυττάρων εκτείνονται στην εσωτερική δικτυωτή στοιβάδα όπου σχηματίζουν τόσο διεγερτικές όσο και ανασταλτικές συνάψεις με τα δίπολα και τα βραχύινα κύτταρα (Yu και συν., 2013, Mahabadi, Khalili, 2022). Η συνολική απόσταση που διανύουν τα γαγγλιακά κύτταρα εκτείνεται από τον αμφιβληστροειδή, ξεκινώντας από τις συνάψεις με τα δίπολα και βραχύινα κύτταρα έως τις συνάψεις με τους νευρώνες του έξω γονατώδους σώματος (lateral geniculate nucleus) στον εγκέφαλο (Yu και συν., 2013).

Περίπου το 1-2% των γαγγλιακών κυττάρων είναι εγγενώς φωτοευαίσθητα (ipRCG: intrinsically photosensitive Retinal Ganglion Cell) και αποτελούν τη τρίτη κατηγορία φωτοϋποδοχέων. Αυτά τα κύτταρα εκφράζουν μια φωτοευαίσθητη χρωστική ουσία, τη μελανοψίνη, η οποία δίνει τη δυνατότητα σε αυτόν τον σπάνιο τύπο γαγγλιακών κυττάρων να αποκρίνονται σε φωτεινά ερεθίσματα και να εμπλέκονται στις φυσιολογικές διεργασίες του κερκάδιου ρυθμού και της ρύθμισης της απελευθέρωσης μελατονίνης (Mahabadi, Khalili, 2022).

1.2.3 Βραχύινα κύτταρα

Τα βραχύινα (amacrine) κύτταρα ονομάστηκαν έτσι, διότι αρχικά πιστευόταν ότι δε διαθέτουν νευράξονα. Σήμερα, γνωρίζουμε ότι ορισμένοι τύποι βραχύνων κυττάρων μπορεί να έχουν μακριές προεξοχές που μοιάζουν με άξονες (axon-like), οι οποίες πιθανόν λειτουργούν ως άξονες, οι οποίοι περιορίζονται πάντα μέσα στον αμφιβληστροειδή (Kolb, 2005). Υπάρχουν περίπου 40 διαφορετικοί μορφολογικοί τύποι βραχύνων κυττάρων, οι οποίοι επιτρέπουν τη δημιουργία ειδικών μικροκυκλωμάτων και τα οποία δίνουν το πλεονέκτημα στον αμφιβληστροειδή να

ανιχνεύει διαφορετικές αποχρώσεις και κινήσεις του φωτός προς συγκεκριμένες κατευθύνσεις (Mahabadi, Khalili, 2022). Οι πυρήνες όλων αυτών των κυτταρικών τύπων βρίσκονται στην Εσωτερική Κοκκώδη Στοιβάδα, ενώ οι συνάψεις τους με δίπολα και γαγγλιακά κύτταρα δημιουργούνται στην Εσωτερική Δικτυωτή Στοιβάδα (Kolb, 2005). Τα κύτταρα αυτά είναι ενδιάμεσοι νευρώνες που απελευθερώνουν τους ανασταλτικούς νευροδιαβιβαστές γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) και γλυκίνη. Όμως, παρότι απελευθερώνουν μόνο ανασταλτικούς νευροδιαβιβαστές, τα κύτταρα αυτά μπορεί να έχουν διεγερτική και ανασταλτική δράση, κυρίως λόγω της ύπαρξης των χασμοσυνδέσμων με τους οποίους επικοινωνούν με τα άλλα κύτταρα, αλλά και με άλλα βραχύινα (Mahabadi, Khalili, 2022).

1.2.4 Δίπολα κύτταρα

Τα δίπολα κύτταρα είναι νευρώνες που πήραν το όνομά τους από τη μορφολογία τους, καθώς έχουν δύο «πόλους». Ο ένας χρησιμεύει για τη σύνδεση με τους φωτοϋποδοχείς και ο άλλος για τη σύνδεση με τα γαγγλιακά κύτταρα. Οι συνάψεις ανάμεσα σε δίπολα κύτταρα και φωτοϋποδοχείς εντοπίζονται στην Εξωτερική Δικτυωτή Στοιβάδα, ενώ οι συνάψεις μεταξύ δίπολων και γαγγλιακών κυττάρων στην Εσωτερική Δικτυωτή Στοιβάδα. Τα δίπολα κύτταρα συμμετέχουν μαζί με τους φωτοϋποδοχείς και τα γαγγλιακά κύτταρα στο κάθετο μονοπάτι μετάδοσης της οπτικής πληροφορίας (Εικόνα 2, Mahabadi, Khalili, 2022).

Υπάρχουν δεκατρείς διαφορετικοί τύποι δίπολων κυττάρων, που χωρίζονται ανάλογα με τον τύπο των φωτοϋποδοχέων (κωνιοφόρα ή ραβδιοφόρα κύτταρα) από τον οποίο λαμβάνουν τη πληροφορία. Επιπρόσθετα, τα δίπολα επικοινωνούν με τα βραχύινα και οριζόντια κύτταρα (Mahabadi, Khalili, 2022).

Συνοπτικά η επικοινωνία των δίπολων κυττάρων με τα υπόλοιπα νευρικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς γίνεται ως εξής:

- Τα βραχύινα κύτταρα στέλνουν ανασταλτική νευροδιαβίβαση (γ-αμινοβουτυρικό οξύ, GABA ή γλυκίνη) στα δίπολα κύτταρα, και αναστέλλουν τη διέγερση της μετασυναπτικής μεμβράνης τους και κατά συνέπεια τη μετάδοση από τα δίπολα.
- Τα οριζόντια κύτταρα δημιουργούν GABAεργικές ανασταλτικές συνάψεις με τα δίπολα κύτταρα.

- Από τους φωτοϋποδοχείς, τα δίπολα λαμβάνουν γλουταμινεργική διεγερτική νευροδιαβίβαση.
- Τα δίπολα κύτταρα χρησιμοποιούν το γλουταμινικό για τη μετάδοση διεγερτικών νευρικών σημάτων στα γαγγλιακά και σε κάποια βραχύινα κύτταρα (Mahabadi, Khalili, 2022).

1.2.5 Οριζόντια κύτταρα

Τα οριζόντια κύτταρα εμπλέκονται στη ρύθμιση της μεταφοράς των οπτικών πληροφοριών από τους φωτοϋποδοχείς στα δίπολα κύτταρα και βοηθούν τα μάτια να προσαρμοστούν σε συνθήκες έντονου ή χαμηλού φωτισμού. Εμφανίζουν μεγάλης έκτασης οριζόντιες προβολές και επικοινωνούν με τα γειτονικά τους κύτταρα μέσω χασμοσυνδέσμων. Τα κυτταρικά τους σώματα βρίσκονται κυρίως στην Εξωτερική Κοκκώδη στοιβάδα. Είναι ενδιάμεσοι GABAεργικοί νευρώνες που αναστέλλουν τη διέγερση της μετασυναπτικής μεμβράνης των δίπολων κυττάρων και την προσυναπτική μεμβράνη των φωτοϋποδοχέων. Ωστόσο, πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι η ανασταλτική αυτή δράση των οριζόντιων κυττάρων σχετίζεται με τη ρυθμιστική τους δράση στον έλεγχο του pH της συναπτικής σχισμής, και όχι με την απελευθέρωση του GABA από αυτά.

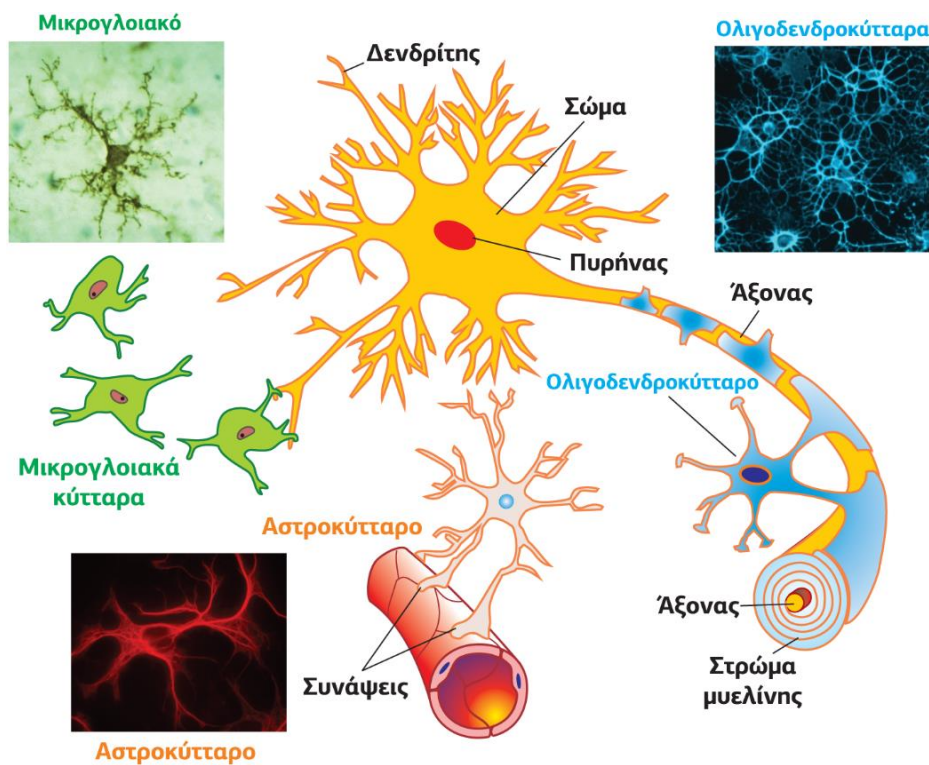
1.3 Κύτταρα της γλοίας

Το νευρικό σύστημα αποτελείται από νευρικά κύτταρα και από νευρογλοιακά κύτταρα ή κύτταρα της γλοίας (glial, από την ελληνική λέξη γλοιός = κόλλα), τα οποία είναι μη νευρικά. Τα τελευταία είναι πολύ περισσότερα από τους νευρώνες. Αρχικά, κατά τον 19^ο αιώνα πίστευαν ότι τα κύτταρα της γλοίας συγκρατούσαν του νευρικό σύστημα, γι' αυτό ονομάστηκαν έτσι. Σήμερα, γνωρίζουμε ότι δε συγκρατούν άλλα κύτταρα μεταξύ τους, ούτε είναι απαραίτητα για την επεξεργασία των πληροφοριών. Οι ρόλοι τους είναι οι εξής:

1. Προσδίδουν σταθερότητα και δομική συνοχή στον εγκέφαλο
2. Μονώνουν μεγάλους νευράξονες (τα ολιγοδενδροκύτταρα και τα κύτταρα Schwann που παράγουν μυελίνη)
3. Απομακρύνουν «απορρίμματα» μετά τη βλάβη
4. Διατηρούν το ιοντικό περιβάλλον των νευρώνων

5. Καθοδηγούν τη μετανάστευση των νευρώνων κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου (ορισμένες ομάδες νευρογλοιακών κυττάρων)
6. Βοηθούν στη δημιουργία του αιματο-εγκεφαλικού φραγμού (και του αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού στον αμφιβληστροειδή)
7. Παρέχουν θρεπτικά συστατικά στους νευρώνες (Kandel και συν., 2020)

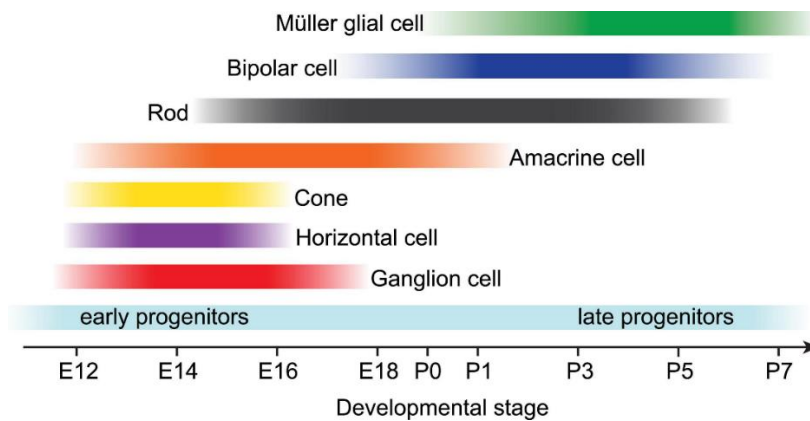
Στο ώριμο κεντρικό νευρικό σύστημα υπάρχουν κυρίως τα αστροκύτταρα, τα ολιγοδενδροκύτταρα, τα μικρογλοιακά κύτταρα και τα επενδυματικά κύτταρα. Στον αμφιβληστροειδή εντοπίζονται τα κύτταρα Müller, τα αστροκύτταρα, τα μικρογλοιακά κύτταρα, ενώ ολιγοδενδροκύτταρα μόνο σε συγκεκριμένες οικογένειες όπως η Leporidae (κουνέλια, λαγοί, Vecino και συν., 2016, Bringmann, 2006).



Εικόνα 3: Τύποι νευρογλοιακών στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα. Υπάρχουν 3 κύριες ομάδες γλοιακών κυττάρων στο νευρικό σύστημα (1) τα ολιγοδενδροκύτταρα (πάνω δεξιά), τα οποία παράγουν μυελίνη και καλύπτουν τους άξονες των νευρώνων (2) η μικρογλοία (πάνω αριστερά), τα ανοσοποιητικά κύτταρα του νευρικού συστήματος, τα οποία συμμετέχουν στη φλεγμονώδη απάντηση (3) τα αστροκύτταρα (κάτω αριστερά), τα οποία βρίσκονται παντού στον εγκέφαλο και στο νωτιαίο μυελό, είναι τα κυρίαρχα κύτταρα, ως προς τον αριθμό τους, την έκταση της επιφάνειας που καταλαμβάνουν και το όγκο τους. Επίσης, υπάρχουν και τα επενδυτικά κύτταρα (δε φαίνονται στην εικόνα), τα οποία επιστρώνουν τις κοιλότητες του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού, σχηματίζοντας ένα συνεχές επιθήλιο. Εκκρίνουν το εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Εικόνα χωρίς τροποποίηση από Ζίφα, 2019. Με άδεια από Α.Ζίφα

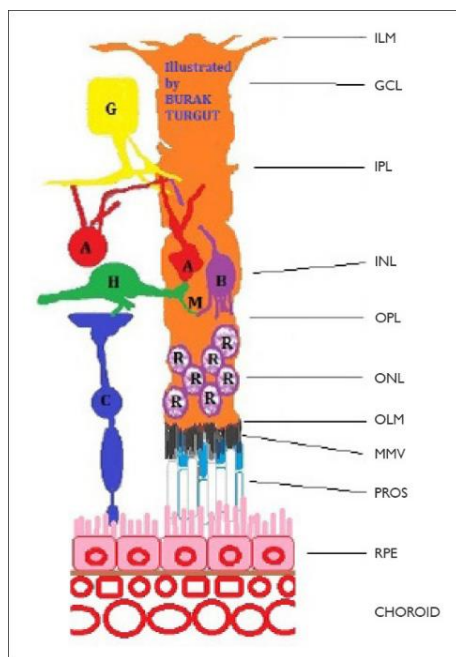
1.3.1 Κύτταρα Müller

Τα κύτταρα Müller περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1851 από τον Γερμανό ανατόμο Heinrich Müller, από τον οποίο πήραν και το όνομά τους. Είναι γνωστό, ότι τα κύτταρα Müller έχουν κοινή γενεαλογία (τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας) με τους νευρώνες του αμφιβληστροειδούς, ωστόσο ο χρόνος γέννησής τους είναι διαφορετικός. Είναι τα μόνα κύτταρα της γλοίας σε όλο το νευρικό σύστημα προέρχονται από τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας. Αρχικά, δημιουργούνται τα γαγγλιακά κύτταρα, ακολουθούμενα από τα οριζόντια, τα κωνιοφόρα και τα έκτοπα βραχύινα κύτταρα. Σε επόμενο στάδιο δημιουργούνται τα βραχύινα κύτταρα, τα δίπολα, τα ραβδιοφόρα και τα κύτταρα Müller (Vecino και συν., 2016). Έτσι, φαίνεται ότι προτού καθοριστεί η μοίρα των κυττάρων Müller, ο αμφιβληστροειδής των σπονδυλωτών έχει ήδη ολοκληρώσει το μεγαλύτερο μέρος της ανάπτυξής του (Tworig, Feller, 2022).



Εικόνα 4: Αναπτυξιακό χρονοδιάγραμμα της γέννησης κυττάρων του αμφιβληστροειδούς που προέρχονται από το νευροεπιθήλιο σε τροκτικά. Εικόνα χωρίς τροποποίηση από Tworig, Feller, 2022. Άδεια: Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

Τα κύτταρα Müller είναι τα πολυπληθέστερα κύτταρα γλοίας και υπάρχουν μόνο στον αμφιβληστροειδή όλων των σπονδυλωτών. Εκτείνονται σε όλο το πάχος του ιστού και περιβάλλουν τους νευρώνες (Bringmann, 2006). Το ανώτερο τμήμα των κυττάρων Müller σχηματίζει την Εσωτερική Περιοριστική Μεμβράνη η οποία διαχωρίζει τον αμφιβληστροειδή από το υαλώδες σώμα. Οι πυρήνες των κυττάρων βρίσκονται στην Εσωτερική Κοκκώδη Στοιβάδα. Το κορυφαίο τμήμα εκτείνεται προς τους φωτοϋποδοχείς, σχηματίζει την Εξωτερική Περιοριστική Μεμβράνη και διαχωρίζει τα εσωτερικά και εξωτερικά τμήματα των φωτοϋποδοχέων (Εικόνα 5). Όπως όλα τα νευρογλοιακά κύτταρα, τα κύτταρα Müller λειτουργούν με υποστηρικτικό τρόπο στους νευρώνες (Kobat, Turgut, 2020).

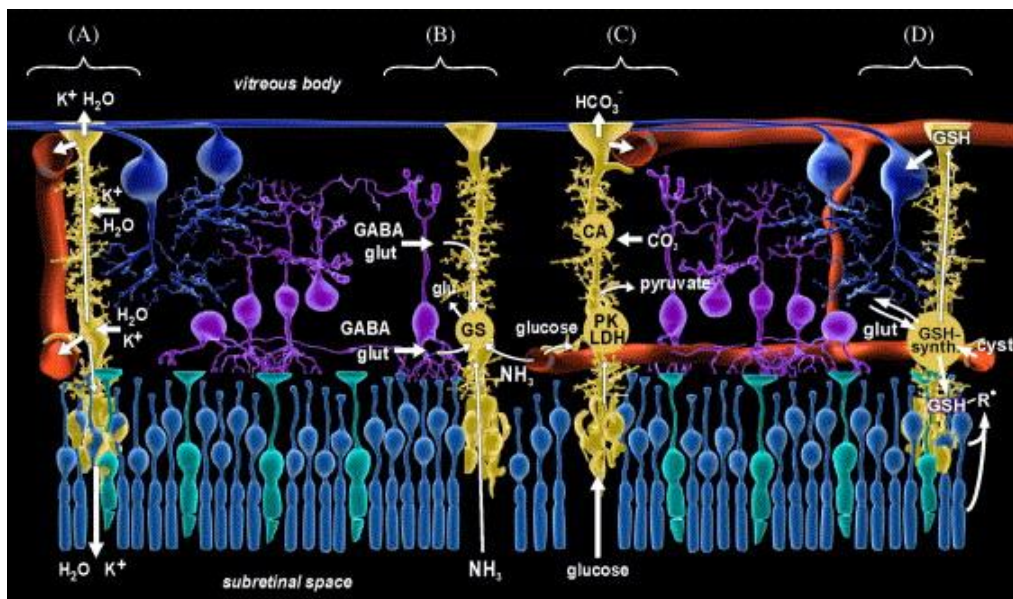


Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση της σχέσης μεταξύ ενός κυττάρου Müller και των νευρώνων του αμφιβληστροειδούς. *A: Βραχύνο κύτταρο, B: Δίπολο κύτταρο, C: Κωνιοφόρο κύτταρο, G: Γαγγλιακό κύτταρο, GCL: Στιβάδα γαγγλιακών κυττάρων, H: Οριζόντιο κύτταρο, ILM: Εσωτερική Περιοριστική Μembrάνη. INL: Εσωτερική Κοκκώδης Στοιβάδα, IPL: Εσωτερική Δικτυωτή Στοιβάδα, M: κύτταρο Müller; MMV: μικρολάχνες των κυττάρων Müller, OLM: Εξωτερική Περιοριστική Μembrάνη, ONL: Εξωτερική Κοκκώδης Στοιβάδα, OPL: Εξωτερική Δικτυωτή Στοιβάδα, PROS: Εξωτερικά τμήματα φωτοϋποδοχέων, R: Ραβδιοφόρα κύτταρα, RPE: Μελάχρον επιθήλιο αμφιβληστροειδούς. Εικόνα χωρίς τροποποίηση από Kobat, Turgut, 2020. Άδεια: Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).*

Τα κύτταρα Müller αποτελούν έναν δίαυλο επικοινωνίας των νευρώνων του αμφιβληστροειδούς με διαμερίσματα που πρέπει να ανταλλάσσουν μόρια, όπως τα αιμοφόρα αγγεία του αμφιβληστροειδούς και το υαλώδες σώμα. Έτσι, τα κύτταρα Müller εκφράζουν μια ποικιλία διαύλων, υποδοχέων, διαμεμβρανικών μεταφορέων και ενζύμων (Bringmann, 2006). Επίσης, μερικοί από τους ρόλους των κυττάρων Müller είναι οι εξής (Εικόνα 6):

- ✓ Παρέχουν στους νευρώνες του αμφιβληστροειδούς θρεπτικά συστατικά όπως γαλακτικό/πυροσταφυλικό για αερόβια αναπνοή και παραγωγή ενέργειας, καθώς εμπλέκονται στον μεταβολισμό της γλυκόζης στον αμφιβληστροειδή
- ✓ Η αποθήκευση γλυκογόνου και η γλυκογονόλυση γίνεται στα κύτταρα Müller και έτσι βοηθούν τη θρέψη των νευρώνων με μεταβολικά μόρια για παραγωγή ενέργειας.
- ✓ Απομακρύνουν μεταβολικά απόβλητα
- ✓ Ρυθμίζουν τη ροή αίματος στον αμφιβληστροειδή

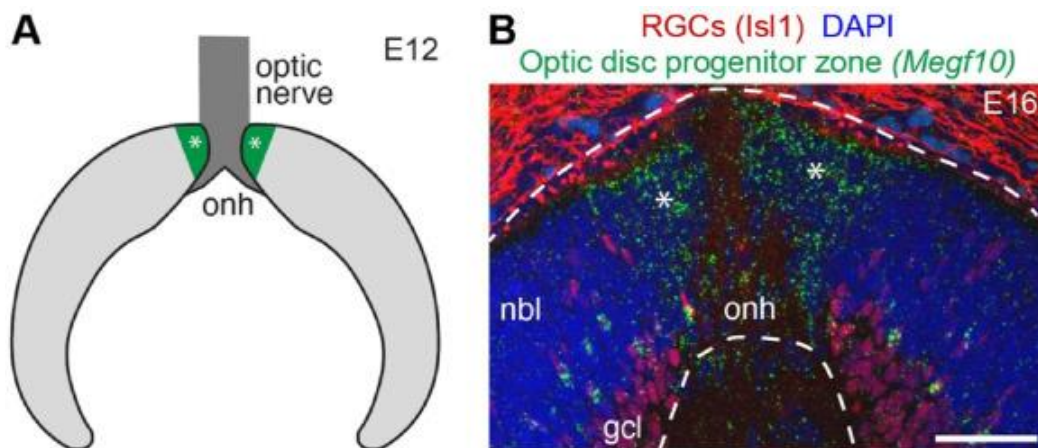
- ✓ Βοηθούν στον σχηματισμό και τη διατήρηση του αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού
- ✓ Βοηθούν στη νευρική σηματοδότηση, καθώς μπορούν να προσλαμβάνουν και να ανακυκλώνουν ταχύτατα τους νευροδιαβιβαστές, αλλά και να παρέχουν στους νευρώνες πρόδρομα μόρια για τη σύνθεση νευροδιαβιβαστών
- ✓ Διατηρούν την ομοιόσταση ιόντων και νερού. Το K^+ που απελευθερώνεται από τους νευρώνες, προσλαμβάνεται από τα κύτταρα Müller, τα οποία μέσω των διαύλων καλίου Kir4.1 το απελευθερώνουν στο αίμα. Από την άλλη μέσω της υδατοπορίνης AQP4 μεταφέρουν τη περίσσεια νερού από το εσωτερικό του αμφιβληστροειδούς στο υαλώδες σώμα.
- ✓ Προστατεύουν τους νευρώνες από το οξειδωτικό στρες, συνθέτοντας το τριπεπτίδιο γλουταθειόνη (GLU-CYS-GLY), το οποίο απελευθερώνεται στους νευρώνες και εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες (η ανηγμένη γλουταθειόνη είναι το κύριο αντιοξειδωτικό μόριο του οργανισμού, Bringmann, 2006).



Εικόνα 6: Αλληλεπιδράσεις κυττάρου Müller – νευρώνα στον φυσιολογικό ώριμο αμφιβληστροειδή. (Α) Διατήρηση της ομοιόστασης ιόντων K^+ και νερού, μέσω της απομάκρυνσής τους από το εσωτερικό του αμφιβληστροειδούς με τη μεσολάβηση των κυττάρων Müller, (Β) Πρόσληψη και ανακύκλωση νευροδιαβιβαστών, (Γ) Μεταβολική υποστήριξη και θρέψη νευρώνων, (Δ) Εξουδετέρωση ελεύθερων ριζών από τη γλουταθειόνη. CA: καρβονική ανυδράση, cyst.: κυστεΐνη, glut: γλουταμινικό οξύ, GS: συνθετάση γλουταμίνης, GSH: γλουταθειόνη, LDH: γαλακτική αφυδρογονάση, PK: κινάση του πυροσταφυλικού. Εικόνα από Bringmann, 2006. Άδεια: License Number: 5525530542053.

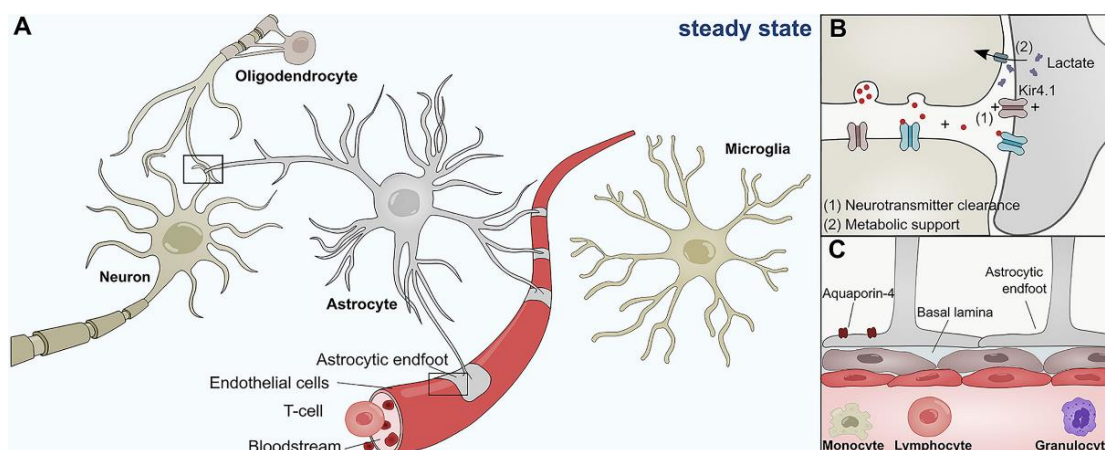
1.3.2 Αστροκύτταρα

Τα αστροκύτταρα είναι τα πολυπληθέστερα γλοιακά κύτταρα του Νευρικού Συστήματος, ωστόσο στον αμφιβληστροειδή αποτελούν μικρό μόνο μέρος των κυττάρων της γλοίας. Πήραν το όνομά τους από το σχήμα τους, από τις αρχαίες Ελληνικές λέξεις *ἄστρον* και *κύτος*. Κατά τον 19^ο αιώνα ο Cajal περιέγραψε για πρώτη φορά τα αστροκύτταρα στον αμφιβληστροειδή (Tao, Zhang, 2014). Τα αστροκύτταρα στον αμφιβληστροειδή δεν προέρχονται από το εμβρυϊκό νευροεπιθήλιο, όπως τα κύτταρα Müller, αλλά από εξειδικευμένα νευροεπιθηλιακά προγονικά κύτταρα (Paisley, Kay, 2021). Τα αστροκύτταρα βρίσκονται αποκλειστικά στο Στρώμα Νευρικών Ινών του αμφιβληστροειδούς, το οποίο περιέχει μόνο αγγεία και τους άξονες των γαγγλιακών κυττάρων. Σε αντίθεση με τα κύτταρα Müller τα οποία βρίσκονται στους αμφιβληστροειδείς όλων των σπονδυλωτών, τα αστροκύτταρα είναι παρόντα μόνο στους αμφιβληστροειδείς των θηλαστικών (Paisley, Kay, 2021, Εικόνα 7).



Εικόνα 7 Τα αστροκύτταρα του αμφιβληστροειδούς παράγονται από εξειδικευμένα νευροεπιθηλιακά προγονικά κύτταρα. *A.* Σχηματική απεικόνιση διατομής του αμφιβληστροειδούς σε έμβryo ποντικού. Τα αστροκύτταρα προέρχονται από τη πράσινη περιοχή, που αντιπροσωπεύει τα προγεννητικά κύτταρα του οπτικού δίσκου, που περιβάλλουν τη κεφαλή του οπτικού νεύρου, το οποίο έχει χρώμα σκούρο γκρι. Με ανοιχτό γκρι αναπαρίστανται τα προγεννητικά κύτταρα του οπτικού κυπέλου, τα οποία θα δώσουν γένεση στους νευρώνες του αμφιβληστροειδούς, καθώς και στα κύτταρα Müller. *B.* Εγκάρσια Τομή αμφιβληστροειδούς ποντικού την εμβρυϊκή ημέρα 16 (E16). In Situ υβριδοποίηση για το γονίδιο *Megf10*, έναν δείκτη αστροκυττάρων, αποκαλύπτει τη θέση των προγεννητικών κυττάρων του οπτικού δίσκου (φαίνονται με τους αστερίσκους). Μέσω των διακεκομμένων γραμμών οριοθετείται η περιοχή του νευρικού αμφιβληστροειδή. Η χρώση με Anti-*Isl1* δείχνει τη θέση των κυτταρικών σωμάτων των γαγγλιακών κυττάρων με κόκκινο χρώμα (είναι φανερό ότι υπάρχει και μη ειδική χρώση εκτός του νευρικού αμφιβληστροειδούς). Συντομογραφίες: *onh*: κεφαλή του οπτικού νεύρου, *nbl*: στρώμα νευροβλαστών που περιέχει προγεννητικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, *gcl*: στρώμα γαγγλιακών κυττάρων. Εικόνα από Paisley, Kay, 2021. Άδεια: License Number: 5526011224796.

Τα αστροκύτταρα είναι σημαντικά για την καθοδήγηση της ανάπτυξης των αγγείων του αμφιβληστροειδούς. Είναι χαρακτηριστικό ότι στα θηλαστικά, μόνο στους αμφιβληστροειδείς των οποίων, όπως αναφέρθηκε, βρίσκονται τα αστροκύτταρα, διαθέτουν ενδογενή αγγείωση. Τα περισσότερα είδη σπονδυλωτών (που δε διαθέτουν αστροκύτταρα στον αμφιβληστροειδή) βασίζονται σε εξω-αμφιβληστροειδικά αγγεία για τη παροχή οξυγόνου στον ιστό. Βέβαια, εντός των θηλαστικών υπάρχουν ορισμένα είδη, όπως το άλογο και το κουνέλι, στα οποία ο αμφιβληστροειδής είναι μόνο μερικώς αγγειωμένος. Σε αυτά τα ζώα, τα αστροκύτταρα εντοπίζονται αποκλειστικά στις περιοχές που περιέχουν αγγεία. Έχειδειχθεί ότι η έλλειψη αστροκυττάρων πριν από την έναρξη της αγγειογένεσης αποτρέπει πλήρως την είσοδο των αγγείων στον αμφιβληστροειδή (Paisley, Kay, 2021).



Εικόνα 8 Ο φυσιολογικός ρόλος των αστροκυττάρων στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα. *A.* Τα αστροκύτταρα αλληλεπιδρούν με νευρώνες, ολιγοδενδροκύτταρα, μικρογλοιακά κύτταρα και με κύτταρα του αιματο-εγκεφαλικού φραγμού. *B.* Ρύθμιση της συναπτικής διαβίβασης από τα αστροκύτταρα μέσω πρόσληψης και ανακύκλωσης νευροδιαβιβαστών και μεταβολικής (ενεργειακής) υποστήριξης. *Γ.* Οι απολήξεις των αστροκυττάρων αποτελούν σημαντικό κομμάτι του αιματο-εγκεφαλικού φραγμού. Στην εικόνα φαίνεται ότι οι απολήξεις των αστροκυττάρων εκφράζουν υψηλά επίπεδα της υδατοπορίνης AQP-4. Εικόνα από Linnerbauer, Rothhammer, 2020. Με τροποποίηση, καθώς λείπει το άλλο μισό της φωτογραφίας που αναφέρεται σε φλεγμονώδεις καταστάσεις. Άδεια: Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

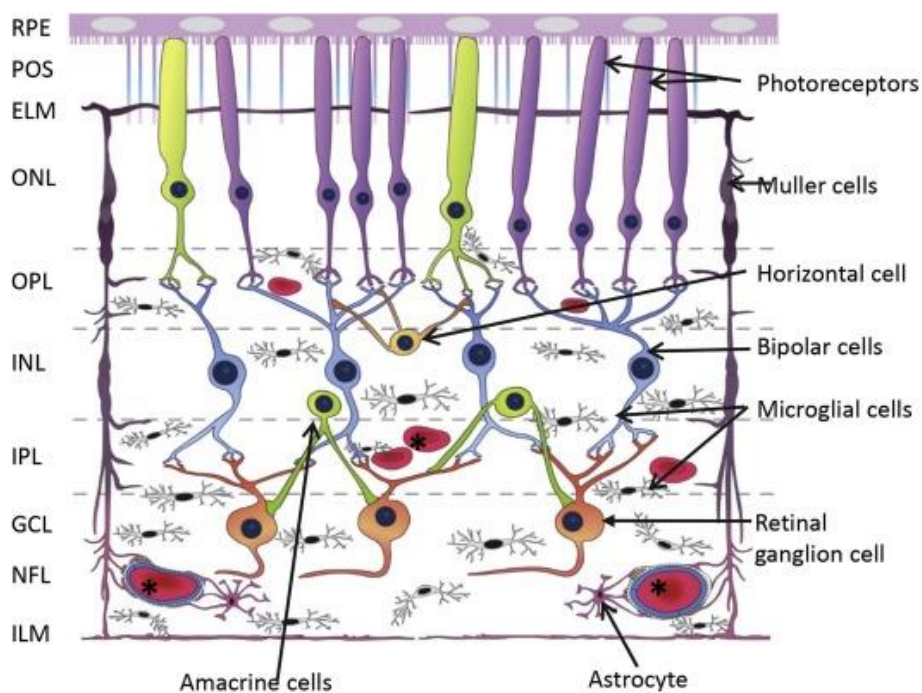
Συνοπτικά, μερικοί από τους ρόλους των αστροκυττάρων στο Κεντρικό Νευρικό σύστημα υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι οι εξής (Εικόνα 8):

- ✓ Αποθηκεύουν γλυκογόνο, το οποίο μπορούν να διασπούν και να τρέφουν τους νευρώνες με γλυκόζη για τη παραγωγή ενέργειας

- ✓ Ρύθμιση των εξωκυτταρικών επιπέδων K^+ (διατήρηση ιοντικής ομοιόστασης)
- ✓ Μεταβολισμός νευροδιαβιβαστών όπως το GABA
- ✓ Διατήρηση του αίματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού (Kolb, 2001)

1.3.3 Μικρογλοία

Η μικρογλοία περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1932, από τον Ισπανό νευροεπιστήμονα Ρίο del Ρίο Hortega. Η μικρογλοία αποτελεί τα μόνιμα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος στον εγκέφαλο και στον αμφιβληστροειδή. Πιστεύεται ότι έχουν αιμοποιητική προέλευση, με τα μονοκύτταρα να είναι τα πρόδρομά τους κύτταρα, τα οποία προέρχονται από προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών. Στον ώριμο αμφιβληστροειδή η παρουσία των μικρογλοιακών κυττάρων περιορίζεται στις εσωτερικές στοιβάδες του αμφιβληστροειδούς (Εικόνα 9, Rathnasamy και συν., 2019).



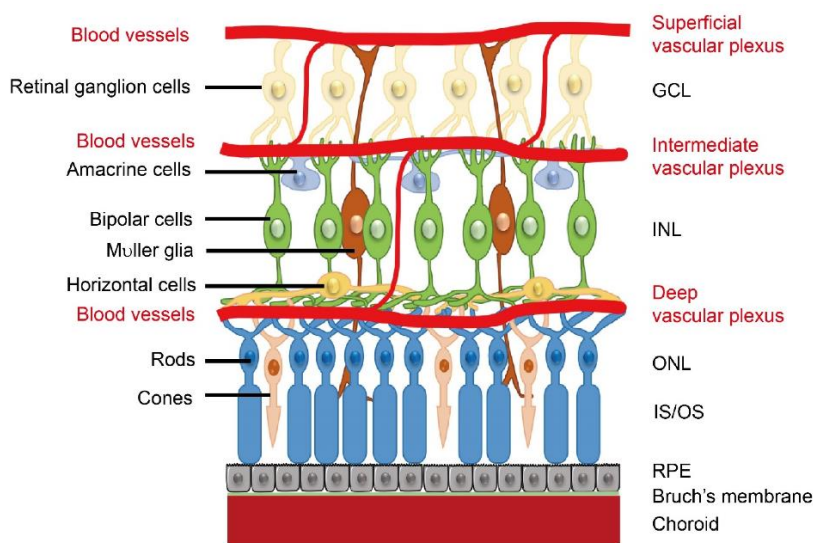
Εικόνα 9 Σχηματική αναπαράσταση των στρωμάτων του ώριμου αμφιβληστροειδούς υπό φυσιολογικές συνθήκες, όπου φαίνεται η κατανομή των μικρογλοιακών κυττάρων. RPE: Μελάγχρουν Επιθήλιο, POS: Εξωτερικά Τμήματα Φωτοϋποδοχέων, ELM: Εξωτερική Περιοριστική Μembrάνη, ONL: Εξωτερική Κοκκώδης Στιβάδα, OPL: Εξωτερική Δικτυωτή Στιβάδα, INL: Εσωτερική Κοκκώδη Στιβάδα, IPL: Εσωτερική Δικτυωτή Στιβάδα, GCL: Στιβάδα Γαγγλιακών Κυττάρων, NFL: Στρώμα Νευρικών Ινών, ILM: Εσωτερική Περιοριστική Μembrάνη, Αστερίσκοι (*): Αιμοφόρα αγγεία. Εικόνα από Rathnasamy και συν., 2019. Άδεια: License Number: 5526460920779

Μερικές από τις βασικές λειτουργίες της μικρογλοίας στον αμφιβληστροειδή είναι οι εξής:

- ✓ Ρύθμιση φλεγμονωδών αντιδράσεων
- ✓ Νευρωνική πλαστικότητα και νευρογένεση
- ✓ Παραγωγή νευροτροφικών παραγόντων
- ✓ Συμμετοχή στην αγγειογένεση (Rathnasamy και συν., 2019)

2. Αιμάτωση

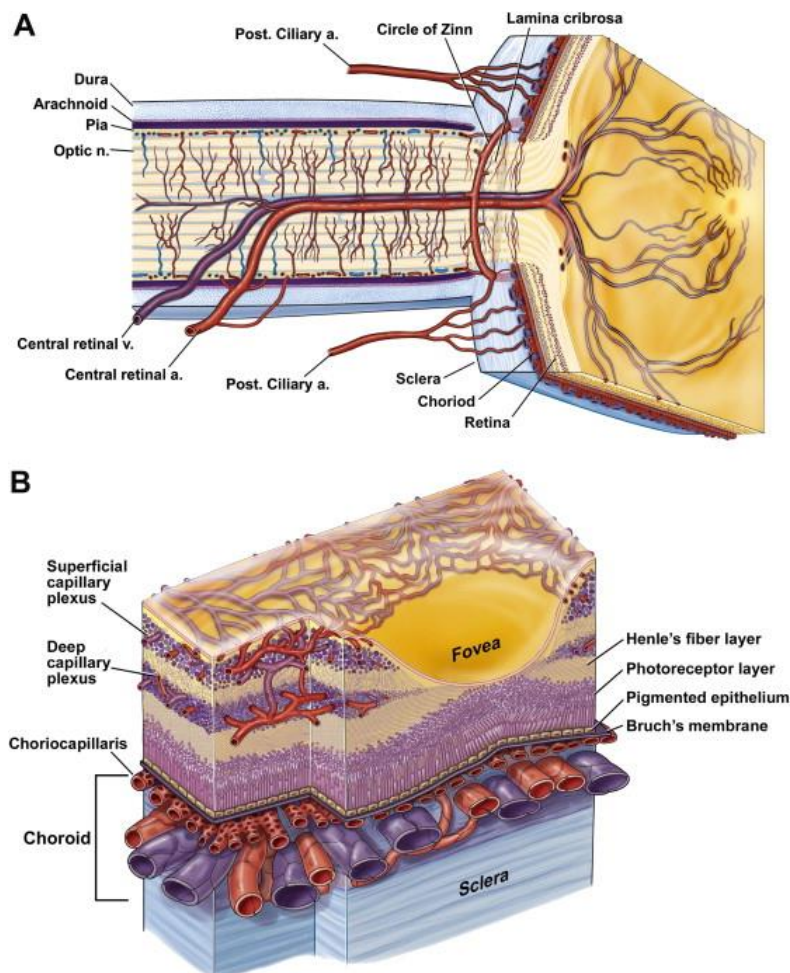
Όπως ήδη αναφέρθηκε, ο αμφιβληστροειδής είναι ένας απαιτητικός μεταβολικά ιστός και παρουσιάζει το υψηλότερο ποσοστό κατανάλωσης οξυγόνου από οποιονδήποτε άλλο ιστό. Ως εκ τούτου, χρειάζεται έναν μεγάλο όγκο οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης για να τον θρέψει. Η αιμάτωση στον αμφιβληστροειδή των θηλαστικών είναι διπλή και έτσι μπορεί να καλυφθεί η μεγάλη ανάγκη του για οξυγόνο (Mahabadi, Khalili, 2022).



Εικόνα 10 Σχηματική απεικόνιση της νευρωνικής και αγγειακής δομής του αμφιβληστροειδούς. Υπάρχουν τρία στρώματα αγγειακών πλεγμάτων στον αμφιβληστροειδή, που προκύπτουν από τις διακλαδώσεις της κεντρικής αρτηρίας του αμφιβληστροειδούς. Η στοιβάδα των φωτοϋποδοχέων αιματώνεται έμμεσα από τα τριχοειδή του χοριοειδούς πλέγματος. Εικόνα από Fu και συν., 2020. Άδεια: Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

Η αγγείωση στον αμφιβληστροειδή είναι οριζόντια και όχι κάθετη (Εικόνα 10,11). Το αίμα από τη καρδιά φτάνει στην οφθαλμική αρτηρία, η οποία δημιουργεί τόσο την κεντρική αρτηρία του αμφιβληστροειδούς όσο και τις οπίσθιες ακτινωτές αρτηρίες που τροφοδοτούν τον αμφιβληστροειδή. Η ροή του αίματος στον αμφιβληστροειδή δεν

εξαρτάται από την ενδοφθάλμια πίεση, τη συστηματική αρτηριακή πίεση, ούτε από το συμπαθητικό νευρικό σύστημα. Ωστόσο, η ρύθμιση της ροής του αίματος εξαρτάται από τοπικούς παράγοντες, όπως είναι το μονοξείδιο του αζώτου (NO), η απελευθέρωση προσταγλανδινών και το διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) που είναι και το πιο σημαντικό (Mahabadi, Khalili, 2022).



Εικόνα 11 Ανατομία της οφθαλμικής αιματικής κυκλοφορίας. *A. Σχηματικός κατακόρυφος άξονας του ανθρώπινου οφθαλμού, όπου φαίνεται η αγγειακή παροχή στον αμφιβληστροειδή και το χοριοειδές πλέγμα κατά μήκος του οπτικού νεύρου. B. Σχήμα που δείχνει την αγγείωση του αμφιβληστροειδούς και του χοριοειδούς πλέγματος. Τα τριχοειδή του χοριοειδούς πλέγματος αιματώνουν έμμεσα τη Στοιβάδα Φωτοϋποδοχέων του αμφιβληστροειδούς. Εικόνα από Kur και συν., 2012. Άδεια: License Number: 5526450225376.*

Η διπλή, λοιπόν, οριζόντια αγγείωση στον αμφιβληστροειδή χωρίζεται ως εξής:

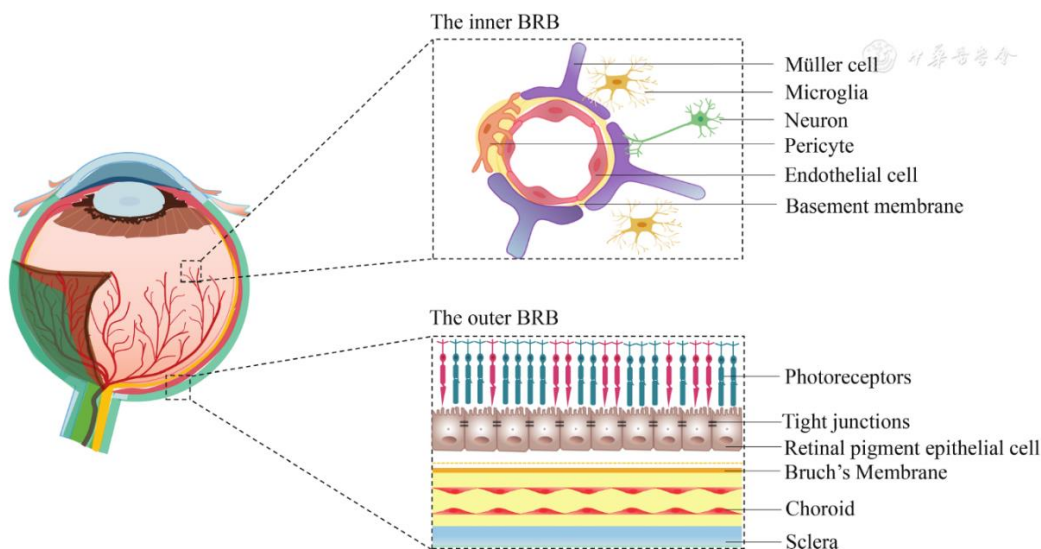
- Οι διακλαδώσεις της κεντρικής αρτηρίας του αμφιβληστροειδούς, που σχηματίζουν επιφανειακά και βαθύτερα τριχοειδή πλέγματα, αιματώνουν τις εσωτερικές στοιβάδες του ιστού

- Τα τριχοειδή του χοριοειδούς πλέγματος αιματώνουν **έμμεσα** τη στοιβάδα των φωτοϋποδοχέων καθώς και το μεγαλύτερο τμήμα της Εξωτερικής Δικτυωτής Στοιβάδας (Mahabadi, Khalili, 2022).

Η παρουσία των τριχοειδών αγγείων στον αμφιβληστροειδή εκτείνεται από το στρώμα νευρικών ιών μέχρι και την Εξωτερική Δικτυωτή Στοιβάδα, ενώ λιγότερο συχνά εμφανίζονται στην Εξωτερική Κοκκώδη Στοιβάδα (Mahabadi, Khalili, 2022).

2.1 Αιματο-αμφιβληστροειδικός Φραγμός

Η διατήρηση της ομοιόστασης στο μικροπεριβάλλον του αμφιβληστροειδούς σε μεγάλο βαθμό πραγματοποιείται από τον αιματο-αμφιβληστροειδικό φραγμό (BRB: Blood-Retinal Barrier), ο οποίος ρυθμίζει αυστηρά τη ροή των μορίων μεταξύ της συστηματικής κυκλοφορίας και του αμφιβληστροειδούς. Η ύπαρξη του αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού παρατηρήθηκε και περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1913, από τον Schnaudigel, ενώ 34 χρόνια μετά ο Palm έκανε μια λεπτομερέστερη ανάλυση του φραγμού και σύγκρινε καλύτερα τον αιματο-αμφιβληστροειδικό με τον αιματο-εγκεφαλικό φραγμό (Yemanyı και συν., 2021).



Εικόνα 12 Δομή του αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού (BRB). Εικόνα από Yang και συν., 2020. Άδεια: Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

Υπάρχουν δύο τύποι φραγμού, όπως υπάρχουν και δύο ειδών αιματώσεις στον αμφιβληστροειδή. Ο **εσωτερικός αιματο-αμφιβληστροειδικός φραγμός** (iBRB: Inner Blood-Retinal Barrier) περιλαμβάνει αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα,

περικύτταρα, νευρογλοιακά κύτταρα (Müller και αστροκύτταρα) και νευρώνες. Ο εξωτερικός αιματο-αμφιβληστροειδικός φραγμός (oBRB: Outer Blood-Retinal Barrier) σχηματίζεται από αλληλεπιδράσεις του χοριοειδούς πλέγματος, της μεμβράνης του Bruch και του μελάχρου επιθηλίου αμφιβληστροειδούς(Εικόνα 12, Yang και συν., 2020).

3. Ισχαιμία

3.1 Ορολογία

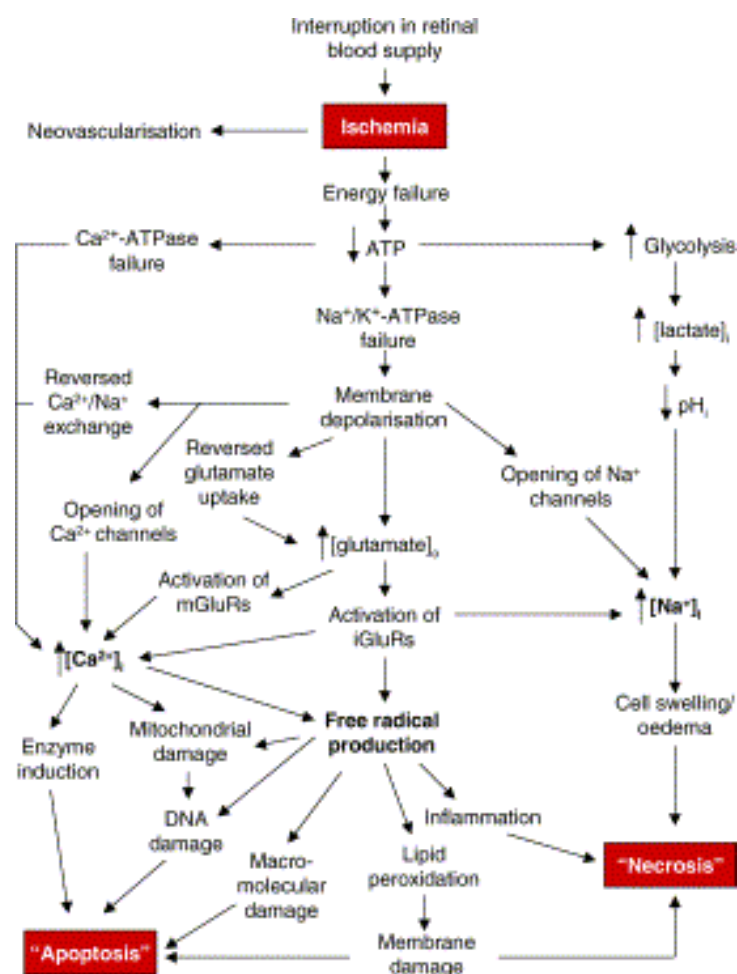
Η λέξη ισχαιμία είναι σύνθετη λέξη και προκύπτει από το αρχαίο ελληνικό *ἴσχω*, που σημαίνει κωλύω/εμποδίζω και από το *αἷμα*. Ως εκ τούτου, η ισχαιμία αναφέρεται σε μια παθολογική κατάσταση που περιλαμβάνει ανεπάρκεια της ροής αίματος σε έναν ιστό και όχι απαραίτητα πλήρη έλλειψη. Η ισχαιμία στερεί από έναν ιστό τρεις βασικές απαιτήσεις: οξυγόνο, μεταβολικά υποστρώματα και απομάκρυνση των άχρηστων προϊόντων. Εάν η ισχαιμία διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα ο ιστός θα πεθάνει (Osborne και συν., 2004).

3.2 Αμφιβληστροειδική Ισχαιμία

Η ισχαιμία του αμφιβληστροειδούς σχετίζεται με τη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, το γλαύκωμα και άλλες σχετικές αμφιβληστροειδοπάθειες που τελικά μπορεί να οδηγήσουν σε διαταραχή και απώλεια όρασης. Η παθογένεια της ισχαιμίας του αμφιβληστροειδούς οδηγεί σε έναν καταρράκτη επιβλαβών γεγονότων που περιλαμβάνει ενεργειακή ανεπάρκεια, διεγερτοτοξική βλάβη, ανισορροπία ασβεστίου, οξειδωτικό στρες και τελικά κυτταρικό θάνατο (Minhas και συν., 2016). Οι εσωτερικές στοιβάδες του αμφιβληστροειδούς είναι περισσότερο ευαίσθητες σε συνθήκες υποξίας, ενώ οι εξωτερικές στοιβάδες (εξωτερική κοκκώδης στοιβάδα - φωτοϋποδοχείς) εμφανίζουν μεγαλύτερη αντοχή στο στρες της υποξίας (Mahabadi, Khalili, 2022).

Ο αμφιβληστροειδής παρουσιάζει μια σχετική αντίσταση σε ισχαιμικές προσβολές σε σχέση με τον εγκέφαλο, καθώς επιβιώνει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε συνθήκες ισχαιμίας. Οι λόγοι που συμβαίνει αυτό μπορεί να είναι:

1. Το υαλώδες σώμα περιέχει σημαντικές ποσότητες γλυκόζης, που τροφοδοτεί τον αμφιβληστροειδή όσο χρονικό διάστημα κρατάει η ισχαιμία
2. Υπάρχουν μεγάλα αποθέματα γλυκογόνου στον αμφιβληστροειδή σε σχέση με τον εγκέφαλο (Αναφέρθηκε ήδη η μεγάλη αποθήκη γλυκογόνου στα κύτταρα Müller και στα αστροκύτταρα)
3. Ο απομονωμένος αμφιβληστροειδής μπορεί να κάνει αναερόβια γλυκόλυση και μέσω αυτής να πάρει τα απαραίτητα μόρια ATP για να επιβιώσει.
4. Οι νευρώνες του αμφιβληστροειδούς να είναι εγγενώς πιο ανθεκτικοί στην ισχαιμία από τους εγκεφαλικούς νευρώνες (Osborne και συν., 2004). Η υπόθεση αυτή δεν έχει επιβεβαιωθεί.



Εικόνα 13 Σύνοψη των βασικών γεγονότων στη διαδικασία της ισχαιμικής νευροεκφύλισης του αμφιβληστροειδούς. Εικόνα από Osborne και συν., 2004. Άδεια: License Number: 5527660143902

Η ισχαιμία του αμφιβληστροειδούς, που προκαλείται από αυξημένη ενδοφθάλμια πίεση, οδηγεί στον θάνατο των κυττάρων με απόπτωση. Οι νεκροί νευρώνες μετά από ένα επεισόδιο ισχαιμίας αμφιβληστροειδούς έχει αποδειχθεί ότι υπερεκφράζουν

κυκλίνη D1, p-JNK, κασπάση-1, κασπάση-2, κασπάση-3, p53 κ.α. Τα κύτταρα Müller υπερεκφράζουν επίσης κυκλίνη D1 ως αποτέλεσμα ισχαιμικής βλάβης (Osborne και συν., 2004).

Μια διακοπή της παροχής αίματος στον αμφιβληστροειδή προκαλεί ταχεία αποτυχία της παραγωγής ενέργειας. Ο ισχαιμικός καταρράκτης περιλαμβάνει (Osborne και συν., 2004):

1. Τη μη λειτουργική αντλία Na^+/K^+
2. Την εκπόλωση της μεμβράνης
3. Τη κυτταροπλασματική συσσώρευση ιόντων νατρίου και ασβεστίου
4. Τον σχηματισμό ROS

Η αθροιστική κυτταρική απόκριση όλων αυτών των διεργασιών, εάν αφεθεί ανεξέλεγκτη, οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο. (Εικόνα 13, Osborne και συν., 2004).

4. Επαναιμάτωση – Βλάβη Ισχαιμίας/Επαναιμάτωσης

Μετά από ένα ισχαιμικό επεισόδιο, συνήθως επανέρχεται η αιμάτωση του ιστού, ένα φαινόμενο που αποδίδεται με τον όρο επαναιμάτωση, η οποία αδιαμφισβήτητα είναι απαραίτητη για τη διάσωση των ισχαιμικών ιστών. Παρότι θα περίμενε κανείς η επαναιμάτωση να βοηθά τον ιστό να επανέλθει στις φυσιολογικές του λειτουργίες, στη πραγματικότητα αυτή επιδεινώνει τη βλάβη. Έτσι, εισάγεται η έννοια της βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, ως η παράδοση έξαρση της κυτταρικής δυσλειτουργίας και του θανάτου, μετά από αποκατάσταση της ροής του αίματος σε προηγουμένως ισχαιμικούς ιστούς (Cowled, Fitridge, 2011).

4.1 Αμφιβληστροειδική Βλάβη Ισχαιμίας/Επαναιμάτωσης

Η επαναιμάτωση των ιστών μετά από ισχαιμία προκαλεί μεγαλύτερη καταστροφή από ότι η ίδια η ισχαιμία λόγω της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive oxygen species) που βλάπτουν τα βιομόρια μέσω της ενεργοποίησης φλεγμονωδών αντιδράσεων (Minhas και συν., 2016). Μετά την αμφιβληστροειδική βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, τα κύτταρα Müller υφίστανται αντιδραστική γλοίωση, δηλαδή ανάπτυξη ουλώδους ιστού στη παθολογική περιοχή. Επιπλέον, αναστέλλεται

η απελευθέρωση νευροτροφικών παραγόντων από τα κύτταρα Müller, κάτι που πιθανόν οδηγεί στην αναστολή της ενεργοποίησης της κινάσης ERK, που οδηγεί σε αυξημένο βαθμό θανάτου γαγγλιακών κυττάρων (Bringmann και συν., 2006).

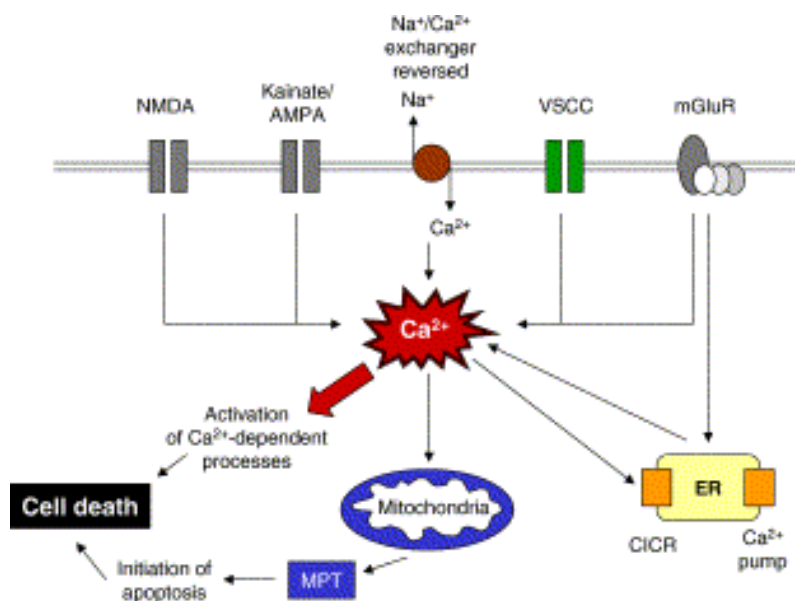
Παράλληλα, οι νευρώνες απελευθερώνουν όλο και περισσότερο γλουταμινικό και ταυτόχρονα τα κύτταρα Müller μειώνουν τη πρόσληψή του, λόγω της εκπόλωσής τους από την υψηλή συγκέντρωση εξωκυτταρικού K^+ , καθώς μειώνεται η έκφραση των διαύλων K^+ Kir και χάνεται η ικανότητα των κυττάρων Müller να συλλέγουν και να απελευθερώνουν στο αίμα το κάλιο. Έτσι, η ικανότητα ρύθμισης των συγκεντρώσεων K^+ και η πρόσληψη γλουταμινικού από τα κύτταρα Müller φαίνεται να είναι ζωτικής σημασίας στη βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης του αμφιβληστροειδούς. (Bringmann και συν., 2006) Είναι επίσης γνωστό ότι η αναλογία γλουταμικού/γλουταμίνης στα κύτταρα Müller αυξάνεται κατά πολύ στην ισχαιμία και αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει στην περαιτέρω αύξηση του γλουταμινικού στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Ένας ακόμη λόγος για την αύξηση της εξωκυτταρικής συγκέντρωσης γλουταμινικού είναι τα αστροκύτταρα, καθώς έχειδειχθεί ότι σε συνθήκες ισχαιμίας διεγείρεται η απελευθέρωση γλουταμινικού από αυτά (Osborne και συν., 2004).

4.1.1 Αμφιβληστροειδική Βλάβη Ισχαιμίας/Επαναιμάτωσης & Ca^{2+}

Ως αποτέλεσμα της βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, τα επίπεδα ενδοκυττάρου ασβεστίου μπορούν να αυξηθούν με διάφορους μηχανισμούς:

- ✓ Με διαύλους που συνδέονται με νευροδιαβιβαστές (π.χ. οι ιοντοτροπικοί υποδοχείς γλουταμινικού)
- ✓ Με αναστροφή της ανταλλαγής Na^+ - Ca^{++} , μέσω των ευαίσθητων στο ασβέστιο τασεοεξαρτώμενων διαύλων (Voltage sensitive calcium channels, VSCCs)
- ✓ Με διέγερση των μεταβοτροπικών υποδοχέων νευροδιαβιβαστών (π.χ. γλουταμινικού), οι οποίοι μπορούν να οδηγήσουν σε απελευθέρωση ασβεστίου από τις ενδοκυτταρικές αποθήκες (Osborne και συν., 2004).

Η αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ασβεστίου έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση πολλών ενζύμων που εξαρτώνται από αυτό, όπως η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) και η συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NOS). Η ενεργοποίηση αυτών των ενζύμων προκαλεί αλλαγές, που μπορεί τελικά να οδηγήσουν στον κυτταρικό θάνατο (Εικόνα 13, Osborne και συν., 2004).



Εικόνα 14 Ο κεντρικός ρόλος του ασβεστίου στις διαδικασίες ισχαιμικού νευρικού θανάτου.

Εικόνα από Osborne και συν., 2004. Άδεια: License Number: 5527660143902

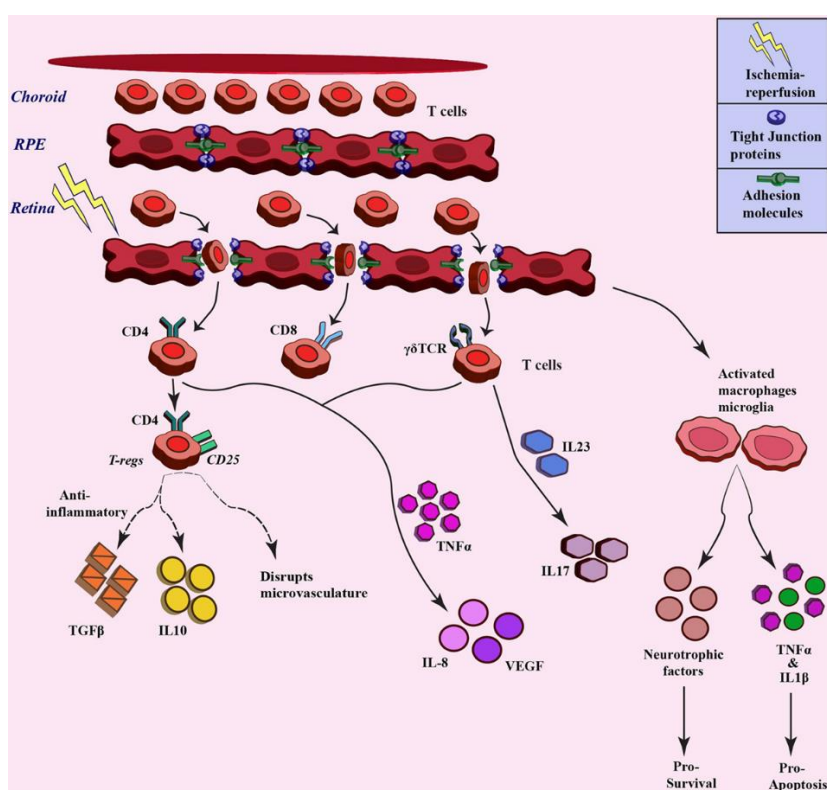
4.1.2 Αμφιβληστροειδική Βλάβη Ισχαιμίας/Επαναιμάτωσης & Αιματο-αμφιβληστροειδικός φραγμός

Η προκαλούμενη από την ισχαιμία υποξία οδηγεί σε αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα και κατά συνέπεια σε διαταραχή του εσωτερικού αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού. Τα κύτταρα Müller ενισχύουν την έκκριση του VEGF υπό υποξικές συνθήκες και βλάπτουν τη λειτουργία αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού. Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα κύτταρα Müller εκκρίνουν τον αυξητικό παράγοντα που προέρχεται από το μελάγχρον επιθήλιο PEDF (PEDF: pigment epithelium derived growth factor), ο οποίος ανταγωνίζεται τη δράση του VEGF και ως εκ τούτου μειώνει την αγγειακή διαπερατότητα. Η έκφραση του PEDF στα κύτταρα Müller μειώνεται σε ισχαιμικές συνθήκες με αποτέλεσμα αυξημένη παραγωγή VEGF και άρα αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα (Kaur και συν., 2008).

Ο VEGF προάγει τη διαρροή πρωτεϊνών του πλάσματος από τα αιμοφόρα αγγεία μέσω σύνθεσης ή απελευθέρωσης NO. Ακόμη, ο VEGF μπορεί να επηρεάσει την αγγειακή διαπερατότητα επάγοντας τη πρόκληση οπών σε ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και την αναδιάταξη πρωτεϊνών κυτταρικής προσκόλλησης που συγκρατούν τον αιματο-αμφιβληστροειδικό φραγμό. Τέλος, ο VEGF ρυθμίζει τις ανοσολογικές αποκρίσεις ως απόκριση στη βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (Kaur και συν., 2008). Αυτό θα

μπορούσε να οδηγήσει σε αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας, μέσω διήθησης λευκοκυττάρων. Συγκεκριμένα, κατά την ισχαιμία πραγματοποιείται προσκόλληση λευκοκυττάρων στο σημείο της βλάβης, ενώ η περαιτέρω βλάβη που προκαλεί η επαναιμάτωση μπορεί να οδηγήσει αυτά τα κύτταρα να διαπεράσουν τον αιματο-αμφιβληστροειδικό φραγμό (Εικόνα 15, Minhas και συν., 2016).

Έτσι, αρκετοί μηχανισμοί, συμπεριλαμβανομένης της αυξημένης παραγωγής VEGF και NO, ελεύθερων ριζών και φλεγμονωδών μεσολαβητών μπορεί να είναι υπεύθυνοι για τη διαταραχή του αιματο-αμφιβληστροειδικού σε υποξικές-ισχαιμικές καταστάσεις καθώς και σε συνθήκες επαναιμάτωσης ενός ιστού (Kaur και συν., 2008).



Εικόνα 15 Μετακίνηση T κυττάρων μετά από βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης και η επακόλουθη μεταγωγή σήματος με σκοπό τη παραγωγή φλεγμονωδών μορίων. Διαφορετικοί τύποι T-λεμφοκυττάρων εμπλέκονται στη παθογένεια της βλάβης ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, όπως τα CD4, CD8, $\gamma\delta$ TCR. Αυτά τα κύτταρα, λόγω της βλάβης, διεισδύουν και παραβιάζουν τον αιματο-αμφιβληστροειδικό φραγμό και διεγείρουν διαφορετικά μονοπάτια σηματοδότησης, με χαρακτηριστικό κοινό τους, τη μεσολάβηση κυτοκινών/χημειοκινών. Τα βέλη με τις διακεκομμένες γραμμές υποδηλώνουν παράδοξα αποτελέσματα. Φαίνεται, επίσης, η ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων, τα οποία αποτελούν τα μόνιμα μακροφάγα εντός του ΚΝΣ, μετά τη διαταραχή του αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού. Η μικρογλοία ενεργοποιείται και εκκρίνει είτε νευροτροφικούς παράγοντες με αποτέλεσμα τη κυτταρική επιβίωση, είτε φλεγμονώδη μόρια που οδηγούν στην απόπτωση. Εικόνα από Minhas και συν., 2016. Άδεια: Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

Στον εγκέφαλο, η διαταραχή του αιματο-εγκεφαλικού φραγμού πυροδοτεί την ενεργοποίηση των αστροκυττάρων, μια διαδικασία που ονομάζεται αντιδραστική γλοίωση (αστρογλοίωση) και έχει ως αποτέλεσμα τη διόγκωση των κυττάρων και την υπερέκφραση κάποιων πρωτεϊνών όπως η GFAP (όξινη πρωτεΐνης των ενδιάμεσων ινιδίων της γλοίας). Η GFAP είναι ένας ειδικός δείκτης των αστροκυττάρων και η υπερέκφρασή της είναι χαρακτηριστική στα κύτταρα αυτά όταν ενεργοποιούνται και υφίστανται αντιδραστική γλοίωση. Αντίστοιχα με τον εγκέφαλο, η GFAP υπερεκφράζεται στα αστροκύτταρα και στα κύτταρα Müller στον αμφιβληστροειδή σε κατάσταση ισχαιμίας. Τα κύτταρα Müller όταν ενεργοποιούνται ως απόκριση σε κάποια βλάβη, όπως αυτή της ισχαιμίας, υπερεκφράζουν τη πρωτεΐνη GFAP. Επίσης, τα κύτταρα Müller υφίστανται και αυτά αντιδραστική γλοίωση ως απόκριση σε συνθήκες ισχαιμίας (Kaur και συν., 2008).

Έχει προταθεί ότι τα αστροκύτταρα και τα κύτταρα Müller εμπλέκονται στον πρώιμο θάνατο των γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς μετά από αυξημένη ενδοφθάλμια πίεση, η οποία προκαλεί ισχαιμία (Bringmann και συν., 2006).

4.1.3 Αμφιβληστροειδική Βλάβη Ισχαιμίας/Επαναιμάτωσης & Νεοαγγείωση

Πριν από περίπου 70 χρόνια ο Isaac C. Michaelson πρότεινε την ιδέα ότι η ισχαιμία είναι η κινητήρια δύναμη για το σχηματισμό νέων αγγείων στον αμφιβληστροειδή. Αργότερα, το 1956, ο Wise γενίκευσε αυτή τη πρόταση και πρότεινε ότι μια άγνωστη εξωαγγειακή αλλά ενδοαμφιβληστροειδική ουσία, ο «παράγοντας x», ήταν υπεύθυνη για τη νεοαγγείωση. Σήμερα, η θεωρία αυτή έχει παγιωθεί και υπάρχουν σημαντικά στοιχεία που εμπλέκουν τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF) ως τον μυστηριώδη «παράγοντα x» (Osborne και συν., 2004). Μάλιστα, έχουν δημιουργηθεί ήδη αντι-VEGF φάρμακα, τα οποία, αν και έχουν βοηθήσει στη διατήρηση της όρασης σε εκατομμύρια ασθενείς, ορισμένοι από αυτούς συνεχίζουν να βιώνουν την εξέλιξη των δυσμενών επιπτώσεων της παθολογίας της βλάβης της ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, γεγονός που υποδηλώνει ότι μάλλον ο VEGF δε δρα μόνος του στη νεοαγγείωση (Fortmann, Grant, 2019). Έχει δειχθεί ότι η ενεργοποίηση του παράγοντα που επάγεται από την υποξία (HIF-1), διεγείρει την παραγωγή VEGF, ερυθροποιητίνης, του βασικού αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών (bFGF: Basic Fibroblast Growth Factor) και ορισμένων άλλων παραγόντων που έχουν συσχετιστεί με το σχηματισμό νέων αγγείων (Osborne και συν., 2004).

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της συγκεκριμένη εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης της βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης στα αστροκύτταρα & τα κύτταρα Müller του αμφιβληστροειδούς επίμυος.

Προηγούμενες μελέτες ανοσοαποτύπωσης στο εργαστήριο, έδειξαν ότι 4 ώρες μετά την επαναιμάτωση του αμφιβληστροειδούς τα επίπεδα του GFAP (*όξινη πρωτεΐνη των ενδιάμεσων ινιδίων της γλοίας, δείκτης των αστροκυττάρων & των κυττάρων Müller*) αυξάνουν (Trisokka και συν., 2022). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει τη πιθανή ενεργοποίηση των μακρογλοιακών αυτών κυττάρων ήδη από τα πρώιμα στάδια της βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης.

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

- της επίδρασης της *ex vivo* ισχαιμίας και επαναιμάτωσης του αμφιβληστροειδούς στα αστροκύτταρα και στα κύτταρα Müller, με έμφαση στις φαινοτυπικές αλλαγές (ενεργοποίηση) των κυττάρων αυτών καθώς επίσης και
- η αξιολόγηση της GFAP ως βιοδείκτη για τη μελέτη των πρώιμων σταδίων της βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1. Πειραματόζωα

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα πτυχιακή εργασία ήταν νεαροί ενήλικοι επίμυες Wistar, ηλικίας ενός έως ενάμιση μηνών, ($41,7 \pm 0,3$ ημερών $n=12$). Μεγαλώνουν στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και στεγάστηκαν τρία έως τέσσερα ζώα ανά κλουβί με ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό. Διατηρήθηκε ένας κύκλος φωτός-σκότους 12 ωρών. Οι συνθήκες στέγασης και όλες οι διαδικασίες που έγιναν στα ζώα ήταν σύμφωνα με τους Ελληνικούς Εθνικούς Νόμους και τις Ευρωπαϊκές Οδηγίες (Νόμος 2015/1992-ΦΕΚ 30/Α/27.2.1992 [116], Προεδρικό Διάταγμα 56/2013, Directive 2010/63/EU, Αριθμός άδειας: ΑΠ: 49111/09/02/21).

2. *Ex vivo* πείραμα ισχαιμίας/επαναιμάτωσης

Για τη παρασκευή όλων των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε ddH₂O, ενώ τα αντιδραστήρια προερχόταν από την εταιρεία SIGMA.

Την ημέρα διεξαγωγής του πειράματος παρασκευάστηκαν τα διαλύματα τεχνητού εγκεφαλονωτιαίου υγρού (arti-CSF: artificial cerebrospinal fluid) για την επίτευξη φυσιολογικών συνθηκών και συνθηκών ισχαιμίας (Πίνακας 1) τα οποία κορέστηκαν σε 95%O₂/5%CO₂ και 95%N₂/5%CO₂, αντίστοιχα. Η διαδικασία αυτή σταθεροποιεί το pH τους μεταξύ 7,3 και 7,4. Όπως φαίνεται στον πίνακα 1 το φυσιολογικό arti-CSF περιέχει γλυκόζη, ενώ το arti-CSF για την επίτευξη ισχαιμίας περιέχει αντί για γλυκόζη, σουκρόζη, διότι ο νευρικός ιστός δε μπορεί να μεταβολίσει τη τελευταία.

Τα ζώα θυσιάστηκαν δια αποκεφαλισμού ενώ οι οφθαλμοί μετά την αφαίρεση του τοποθετήθηκαν σε φυσιολογικό arti-CSF στον πάγο όπου γίνεται η αποκόλληση του αμφιβληστροειδούς.

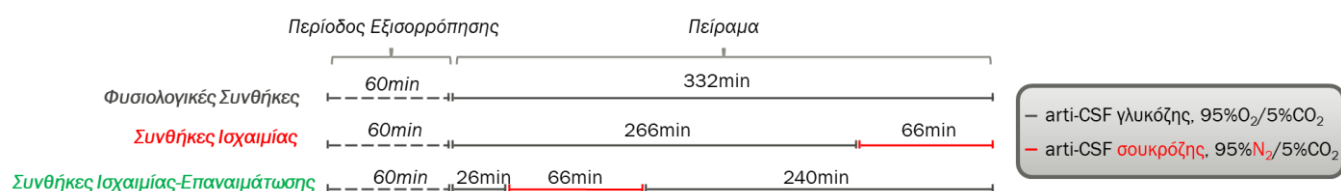
Στη συνέχεια ακολουθεί το *ex vivo* πείραμα βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης το οποίο λαμβάνει χώρα σε υδατόλουτρο, ώστε να διατηρείται σταθερή θερμοκρασία $35,7^{\circ}\text{C} \pm 0,2$.

Σε κάθε φιαλίδιο υπερδιάχυσης υπάρχει ένα σωληνάκι εισροής και ένα εκροής του εκάστοτε arti-CSF. Η εισροή και εκροή του υγρού στα φιαλίδια γίνεται με ροή 1,2 ml/min με συνολικό όγκο μέχρι 500μl.

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

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

Η εκκίνηση του πειράματος αφορά 1 ώρα αρχικής περιόδου εξισορρόπησης (Pre-superefusion), δηλαδή προεπώαση με φυσιολογικό τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Με το πέρας της 1 ώρας ξεκινά το ιδίως πείραμα *ex vivo* βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, σύμφωνα με τους χρόνους που φαίνονται στην εικόνα 16.



Εικόνα 16: Χρονοδιάγραμμα *ex vivo* πειράματος ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (Βασιλάκη Άννα¹)

Συνολικά το πείραμα διαρκεί 5 ώρες και 32 λεπτά έπειτα από την αρχική περίοδο εξισορρόπησης. Πιο συγκεκριμένα, για τη επίτευξη ισχαιμίας πραγματοποιείται

¹ Ζήτησα και έλαβα άδεια χρήσης όλων των σημμάτων που φέρουν το όνομα της επιβλέπουσας της διπλωματικής μου εργασίας κ. Άννας Βασιλάκη.

διάχυση με φυσιολογικό arti-CSF για 266 λεπτά και με art-CSF ισχαιμίας για 66 λεπτά. Για το βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, την αρχική περίοδο εξισορρόπησης ακολουθεί η διάχυση των ιστών με φυσιολογικό arti-CSF για 26 λεπτά, έπειτα η διάχυση με art-CSF ισχαιμίας για 66 λεπτά και τέλος ξανά η διάχυση τους με φυσιολογικό arti-CSF για 240 λεπτά. Τα φιαλίδια που περιέχουν τους ιστούς ελέγχου παραμένουν σε όλη τη διάρκεια του πειράματος υπό διάχυση με φυσιολογικό arti-CSF. Το πείραμα σταματάει στον πάγο.

Στη συνέχεια, οι ιστοί απλώνονται πάνω στο διηθητικό χαρτί και μονιμοποιούνται με διάλυμα 4% παραφορμαλδεΰδης [4% PFA σε 0,1M PB (NaH_2PO_4 , : 0.2M K_2HPO_4 , 1:5), pH 7,4] για 30 λεπτά. Ακολουθούν δύο πλύσεις των 15 λεπτών με 0,1M PB, υπό συνεχή ανάδευση, προσθήκη αντιψυκτικού διαλύματος και συντήρηση τους στους -20°C μέχρι τη διεξαγωγή του πειράματος ανοσοϊστοχημείας.

3. Ανοσοϊστοχημεία

3.1 Αρχή της μεθόδου

Η ανοσοϊστοχημεία είναι μια τεχνική που βασίζεται στην ειδική σύνδεση μεταξύ ενός αντισώματος και ενός αντιγόνου για την ανίχνευση και τον εντοπισμό συγκεκριμένων αντιγόνων σε ιστούς. Ο ανοσοφθορισμός είναι μια κατηγορία της ανοσοϊστοχημείας κατά την οποία το αντίσωμα που χρησιμοποιείται φέρει φθορίζουσα ουσία, ώστε να ανιχνεύεται με απλό μικροσκόπιο φθορισμού ή με συνεστιακό μικροσκόπιο και ως εκ τούτου να ανιχνεύεται και το προς μελέτη μόριο. Υπάρχουν δύο μέθοδοι ανοσοφθορισμού, η έμμεση και άμεση μέθοδος. Η διαφορά τους είναι ότι στην άμεση σημαίνεται με φθορίζουσα απευθείας το πρώτο αντίσωμα, ενώ στην έμμεση σημαίνεται το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει το πρώτο. (Magaki και συν., 2019)

3.2 Πειραματική Διαδικασία

Στη παρούσα πτυχιακή εργασία εφαρμόστηκε η μέθοδος της έμμεσης ανοσοφθορισμού. Οι ιστοί ξεπλύθηκαν 3 φορές επί 10min με 0,1M PBS (137mM, 2,7 mM KCl , 10mM Na_2HPO_4 , 1,8mM KH_2PO_4 , pH 7,2-7,4), και στη συνέχεια επωάστηκαν σε 0,1M PBS το οποίο περιέχει 3,3% (v/v) φυσιολογικό ορό γαϊδουριού (Normal Donkey Serum, NDS), 0,5% (v/v) Triton x-100, 0,025% NaN_3 και το

αντίσωμα mouse anti-GFAP σε συγκέντρωση 1:500. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε προερχόταν από την εταιρεία Sigma (MAB360).

Οι ιστοί, αφού βγουν από τους -20°C και αφαιρεθεί το αντιψυκτικό διάλυμα, ξεπλένονται με 0,1M PBS, 3 φορές από 15 λεπτά. Ακολουθεί επώαση των ιστών με το διάλυμα πρώτου αντισώματος για 72 ώρες στους 4°C και υπό συνεχή ανακίνηση.

Με το πέρας της επώασης, αφαιρείται το διάλυμα πρώτου αντισώματος από τους ιστούς και ακολουθούν 3 πλύσεις των 45 λεπτών με 0,1M PBS στους 4°C και υπό συνεχή ανακίνηση. Το διάλυμα δεύτερου αντισώματος παρασκευάζεται σε 0,1M PBS, το οποίο περιέχει το δεύτερο αντίσωμα Donkey anti-Mouse σε συγκέντρωση 1:500. Έτσι, από τη στιγμή που τοποθετηθεί το δεύτερο αντίσωμα όλοι οι χειρισμοί πρέπει να γίνονται σε σκοτάδι, διότι είναι φωτοευαίσθητο. Ακολουθεί επώαση των ιστών με αυτό για 16-18 ώρες στους 4°C και υπό συνεχή ανακίνηση.

Ακολούθως, μόλις τελειώσει η επώαση, αφαιρείται το διάλυμα δεύτερου αντισώματος και πραγματοποιούνται 3 πλύσεις των 45 λεπτών με 0,1M PBS στους 4°C και υπό συνεχή ανακίνηση. Στη συνέχεια, οι ιστοί επωάζονται με $40\mu\text{M}$ DAPI (4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη) σε 0,1M PBS για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και τέλος, ξεπλένονται 2 φορές για 10 λεπτά με 0.1M PBS.

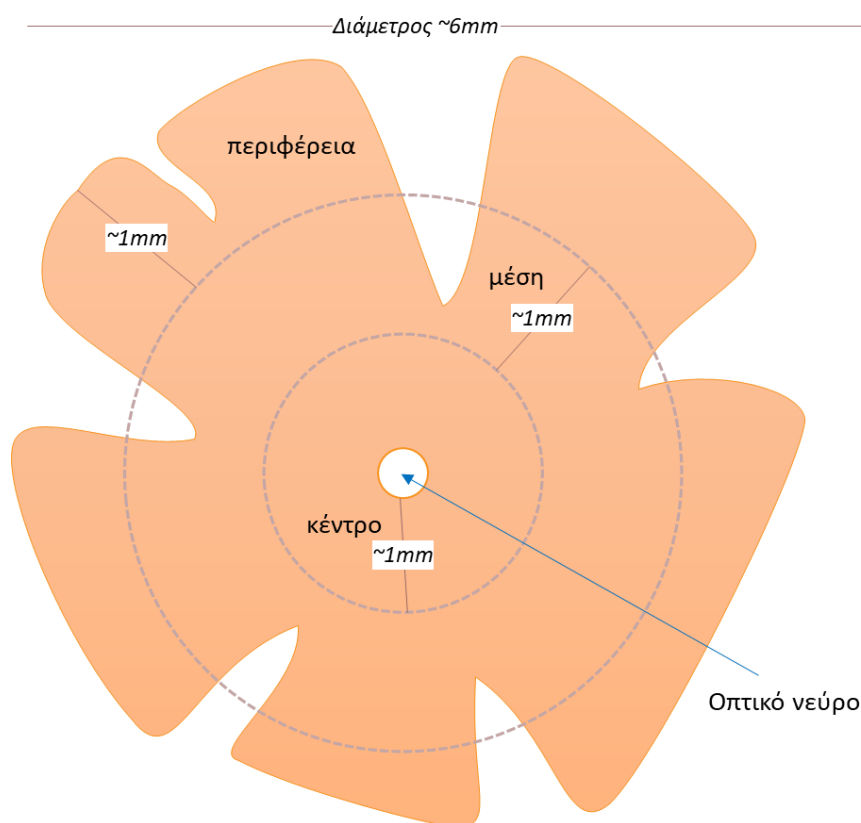
Τέλος, ο κάθε ιστός τοποθετείται πάνω σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα με τη χρήση ενός ειδικού πινέλου, προσπαθώντας να τοποθετηθούν τα γαγγλιακά κύτταρα προς τα πάνω, δηλαδή να έρχονται σε επαφή με τη καλυπτρίδα και όχι με το πλακάκι. Αυτό, θα γίνει ευκολότερο με τη προσθήκη λίγου ρυθμιστικού διαλύματος, που θα βοηθήσει τη σωστή τοποθέτηση του αμφιβληστροειδούς. Τέλος, πρέπει να αφαιρεθεί όσο περισσότερο υγρό γίνεται με τη χρήση μιας πιπέτας και να προστεθεί λίγο DAPI πάνω στον ιστό. Έστερα, κλείνει το πλακάκι με τη καλυπτρίδα, προσέχοντας να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες διατηρούνται στους 4°C μέχρι τη στιγμή της παρατήρησής τους, στο μικροσκόπιο.

4. Μελέτη της επίδρασης της *ex vivo* ισχαιμίας/επαναιμάτωσης στην ενεργοποίηση των αστροκυττάρων

Η παρατήρηση των ιστών έγινε σε μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss Axioskop 40 (Carl Zeiss Inc, New York, USA) το οποίο ήταν συνδεδεμένο με κάμερα Leica DFC 480 (Leica Cameras, Solms, Germany). Οι φωτογραφίες λήφθηκαν με μεγέθυνση 40x.

4.1. Δειγματοληψία

Λήφθηκαν φωτογραφίες από κάθε ιστό (15 αστροκύτταρα/συνθήκη, n=12 ζώα, 4 ζώα/συνθήκη) σε τρία περιοχές του αμφιβληστροειδούς, το κέντρο: 0 έως ~1mm από το οπτικό νεύρο, τη μέση: ~1-2mm από το οπτικό νεύρο και την περιφέρεια: ~2-3mm από το οπτικό νεύρο (Εικόνα 16).



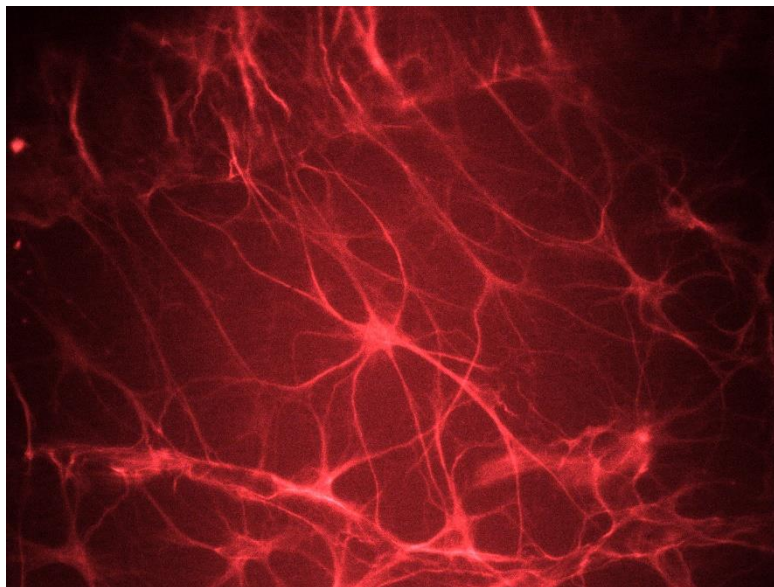
Εικόνα 16: Σχήμα των περιοχών του αμφιβληστροειδούς. Periphery= Περιφέρεια, Middle=Μέση, Center = Κέντρο, Optic nerve = Οπτικό νεύρο (Βασιλάκη Άννα)

4.2. Ανάλυση εικόνας

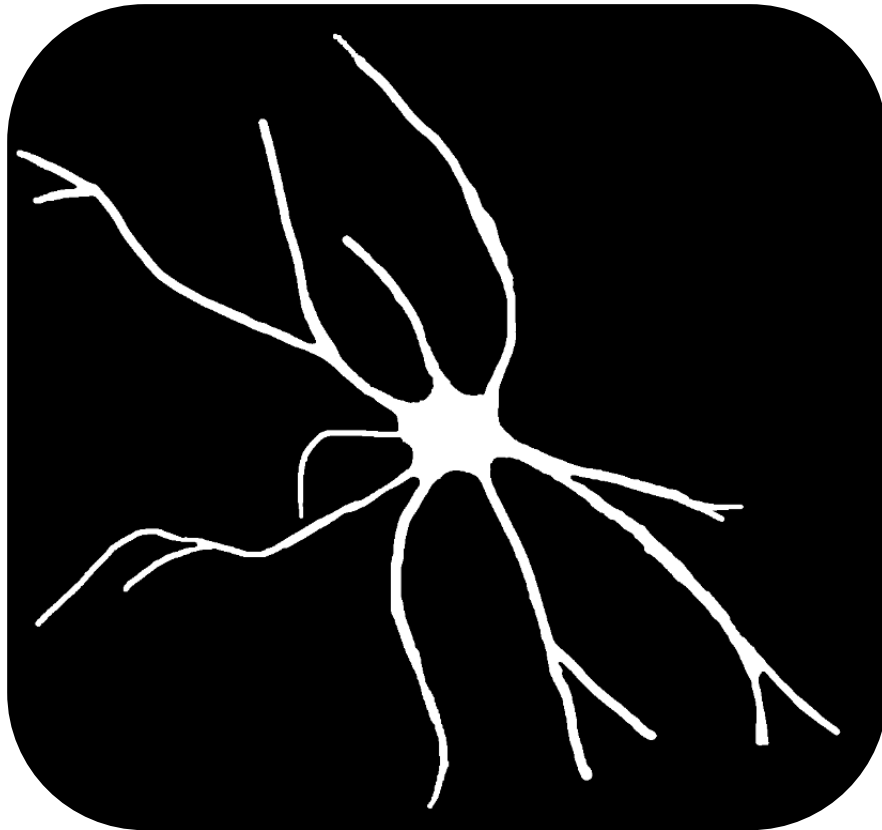
Η ανάλυση των εικόνων από το Μικροσκόπιο Φθορισμού, αφορούσε την ανάλυση των αστροκυττάρων για τη μέτρηση του αριθμού των διακλαδώσεων και των αποφύσεων τους καθώς και τη μέτρηση του συνολικού μήκους των αποφύσεων αυτών. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα ImageJ.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για τη μέτρηση του αριθμού των διακλαδώσεων και των αποφύσεων ήταν τα εξής:

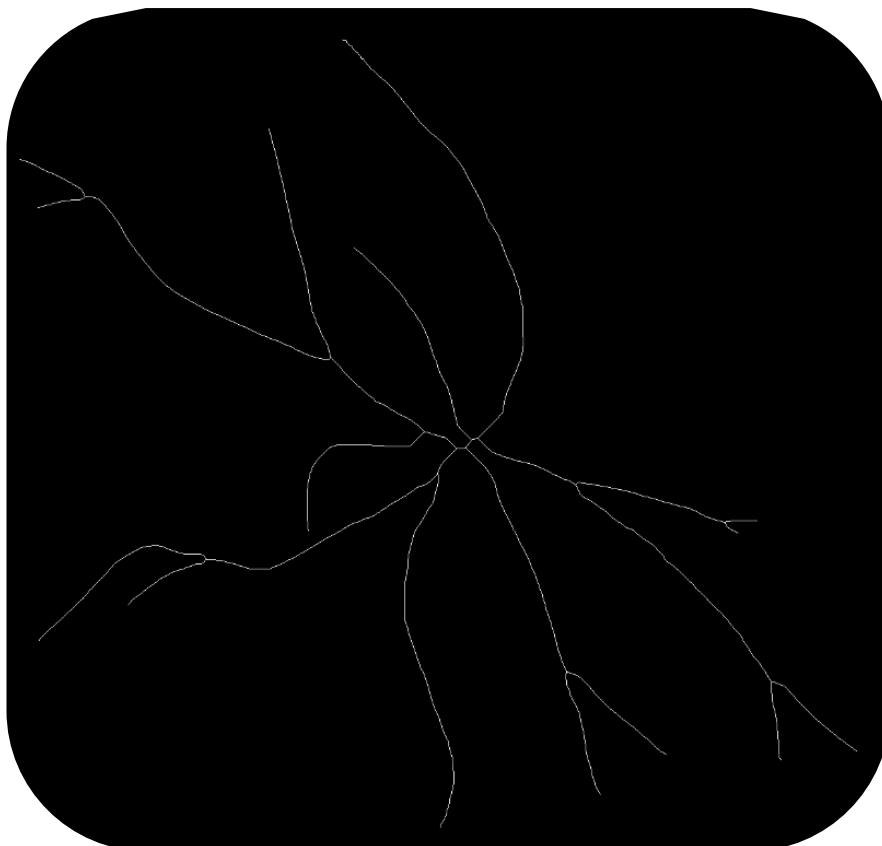
1. Άνοιγμα της φωτογραφίας ενδιαφέροντος με το πρόγραμμα και επιλογή του *polygon selection*, με το οποίο επιλέγεται το αστροκύτταρο ενδιαφέροντος.



2. Αντιγραφή (ctrl+C) της επιλεγμένης περιοχής
3. Δημιουργία νέου παραθύρου (ctrl+N)
4. Επικόλληση της αντιγραφόμενης επιλεγμένης περιοχής στο νέο παράθυρο (ctrl+V)
5. Image > Adjust > Brightness/Contrast (Επιλογή SET, OK)
6. Image > Color > Split channels (κρατάμε μόνο το κανάλι που μας ενδιαφέρει, δηλαδή αυτό με το κόκκινο χρώμα)
7. Image > Adjust > Threshold (Επιλογή SET, OK)
8. Process > Binary > Make Binary
9. Διόρθωση με τη «γόμα» και το «μολύβι». Με προσεκτική ταυτόχρονη παρατήρηση του αστροκυττάρου στην αρχική φωτογραφία και στη φωτογραφία που δημιουργήθηκε (με άσπρο και μαύρο χρώμα μόνο), προσπαθούμε να σβήσουμε τον θόρυβο και να το φέρουμε στη πραγματική του κατάσταση. Παράδειγμα φαίνεται στη παρακάτω εικόνα:



10. Process > Binary > Skeletonize. Παράδειγμα φαίνεται στη παρακάτω εικόνα:



11. Analyze > Skeleton > Analyzes 3D

12. Κρατώ και καταγράφω τις τιμές ενδιαφέροντος, δηλαδή τον αριθμό και το μήκος των αποφύσεων (branches) και τον αριθμό των διακλαδώσεων (junctions)

Οι φωτογραφίες του αστροκυττάρου που παρατέθηκαν ως παράδειγμα αφορούσαν τη συνθήκη ελέγχου και τη μέση περιοχή του αμφιβληστροειδούς.

5. Μελέτη της επίδρασης της *ex vivo* ισχαιμίας/επαναιμάτωσης στην ενεργοποίηση των κυττάρων Müller

Η παρατήρηση των πιθανών αλλαγών στην έκφραση της GFAP από τα κύτταρα Müller ως αποτέλεσμα της *ex vivo* ισχαιμίας/επαναιμάτωσης του αμφιβληστροειδούς έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss LSM800 (Zeiss Axiovert, Jenna, Germany) με μεγέθυνση 20x και λήψη των εικόνων.

6. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση για τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την ανάλυση εικόνας για τα αστροκύτταρα πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα GraphPad Prism με one-way ANOVA και two-way ANOVA.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

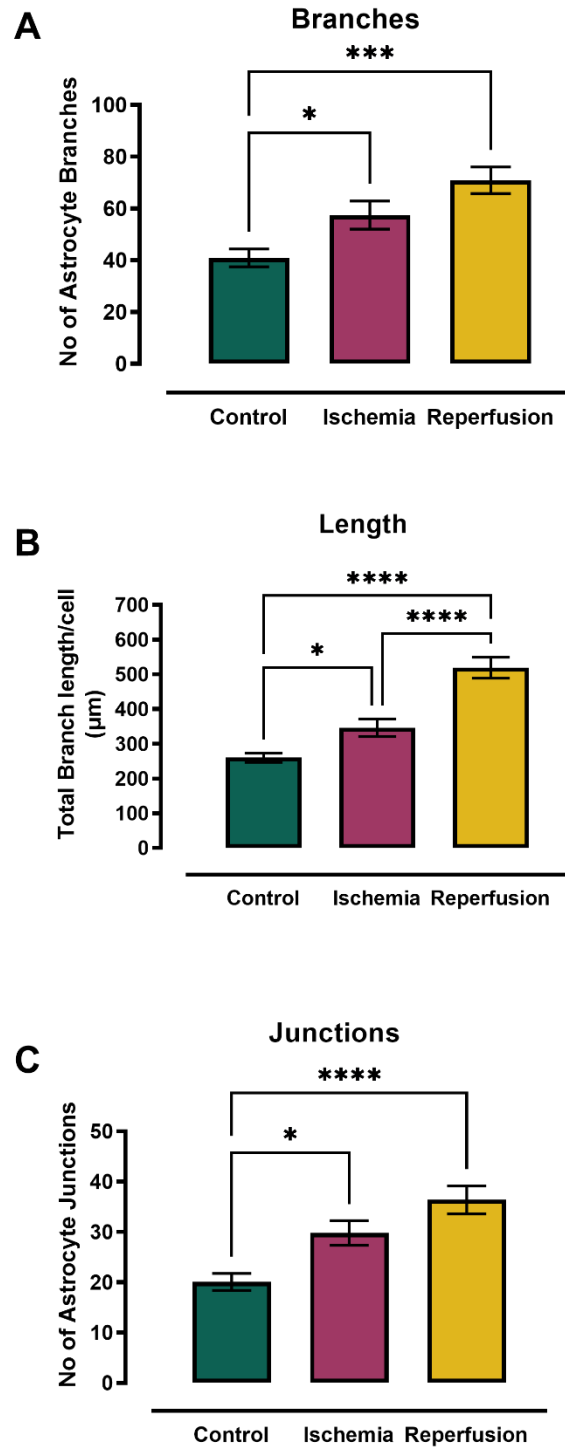
1. Επίδραση της *ex vivo* βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης στην ενεργοποίηση των αστροκυττάρων

Προκειμένου να διαπιστώσουμε εάν η μορφολογία και κατ' επέκταση η ενεργοποίηση των αστροκυττάρων ξεκινά κατά την ισχαιμία ή άμεσα με την επαναιμάτωση του ιστού, ελέγξαμε τρεις παραμέτρους που υποδηλώνουν την ενεργοποίηση των αστροκυττάρων: (1) αριθμός αποφύσεων, (2) συνολικό μήκος αποφύσεων, (3) αριθμός διακλαδώσεων των αποφύσεων αμέσως μετά την ισχαιμία και 4 ώρες μετά την *ex vivo* «επαναιμάτωση» του ιστού, καθώς και σε ιστούς ελέγχου.

Αναλύθηκαν συνολικά 15 αστροκύτταρα/συνθήκη (n=12 ζώα, 4 ζώα/συνθήκη). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, ο συνολικός αριθμός των αποφύσεων των αστροκυττάρων σε συνθήκες ελέγχου ήταν $40,9 \pm 3,5$. Ο αριθμός αυτός αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά τόσο μετά από 66min *ex vivo* ισχαιμίας ($57,5 \pm 5,3$, $p < 0,05$) όσο και 4 ώρες μετά την «επαναιμάτωση» του ιστού ($70,9 \pm 5,2$, $p < 0,01$), σε σχέση με τους ιστούς ελέγχους (Εικόνα 17A).

Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι το συνολικό μήκος των αποφύσεων των αστροκυττάρων σε συνθήκες ελέγχου ήταν $260,1\mu\text{m} \pm 13,2\mu\text{m}$ και ότι το μήκος αυτό αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά τόσο μετά από 66min *ex vivo* ισχαιμίας ($346,3 \pm 25,1$, $p < 0,05$) όσο και 4 ώρες μετά την «επαναιμάτωση» του ιστού ($519,4 \pm 30,2$, $p < 0,001$), σε σχέση με τους ιστούς ελέγχους (Εικόνα 17B). Επιπλέον, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση του συνολικού μήκους των αποφύσεων μεταξύ της ισχαιμίας και της επαναιμάτωσης ($p < 0.001$).

Τέλος, σε ότι αφορά στον αριθμό των διακλαδώσεων, διαπιστώθηκε ότι ο συνολικός αριθμός τους σε συνθήκες ελέγχου ήταν $20,1 \pm 1,7$ και ότι ο αριθμός αυτός αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά τόσο μετά από 66min *ex vivo* ισχαιμίας ($29,8 \pm 2,4$, $p < 0,05$) όσο και 4 ώρες μετά την «επαναιμάτωση» του ιστού ($36,4 \pm 2,8$, $p < 0,001$), σε σχέση με τους ελέγχους (Εικόνα 17C).



*Εικόνα 17: Επίδραση της ex vivo βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης στην ενεργοποίηση των αστροκυττάρων. Έλεγχος τριών παραμέτρων: (A) αριθμός αποφύσεων (branches), (B) συνολικό μήκος αποφύσεων (length) και (Γ) αριθμός διακλαδώσεων (junctions) που σχηματίζουν οι αποφύσεις των αστροκυττάρων του αμφιβληστροειδή. Control: συνθήκες ελέγχου, Ischemia: μετά από 66min ισχαιμίας, Reperfusion: μετά από 66min ισχαιμίας και 4h «επαναιμάτωσης» του ιστού, n=15 κύτταρα/συνθήκη, * p<0.05, *** p<0.001, **** p<0.0001*

2. Διαφορική επίδραση της *ex vivo* βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης στην ενεργοποίηση των αστροκυττάρων ανάλογα με την περιοχή του αμφιβληστροειδούς

Με σκοπό να διαπιστωθεί εάν υπάρχει διαφορά ως προς την ενεργοποίηση των αστροκυττάρων κατά την *ex vivo* βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, ανάλογα με την περιοχή του αμφιβληστροειδούς στην οποία βρίσκονται, συγκρίναμε τον αριθμό και το συνολικό μήκος των αποφύσεων καθώς και τον αριθμό των διακλαδώσεων, που οι αποφύσεις αυτές σχηματίζουν, στις τρεις κύριες περιοχές του αμφιβληστροειδούς (κεντρική, μεσαία και περιφέρεια).

Αρχικά ελέγξαμε αν υπάρχει διαφοροποίηση στην εκάστοτε συνθήκη μεταξύ των περιοχών. Διαπιστώσαμε ότι, στους ιστούς ελέγχου και σε αυτούς που εξετάστηκαν 4 ώρες μετά την «επαναιμάτωση» τους δεν παρατηρείται καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των περιοχών του αμφιβληστροειδούς και για τις 3 παραμέτρους που ελέγχθηκαν (Πίνακας 3). Σε ότι αφορά στην ισχαιμία, παρατηρήθηκε ότι τα αστροκύτταρα που βρίσκονται στη περιφέρεια του αμφιβληστροειδούς αναπτύσσουν στατιστικώς σημαντικά μικρότερο αριθμό αποφύσεων και διακλαδώσεων τόσο σε σχέση με την κεντρική περιοχή του ιστού ($p < 0,01$ και $p < 0,001$, αντίστοιχα) όσο και με τη μεσαία περιοχή ($p < 0,05$ και $p < 0,001$, αντίστοιχα), ενώ αντίθετα το συνολικό μήκος των αποφύσεων των αστροκυττάρων δεν φαίνεται να διαφέρει (Πίνακας 3).

Διαπιστώθηκε επίσης ότι, σε ότι αφορά στη κεντρική περιοχή του αμφιβληστροειδούς, 4 ώρες μετά την «επαναιμάτωση» των ιστών αυξήθηκαν ο αριθμός και το συνολικό μήκος των αποφύσεων καθώς και ο αριθμός των διακλαδώσεων που οι αποφύσεις αυτές σχηματίζουν, σε σχέση με τους ιστούς ελέγχου ($p < 0,05$). Ενώ, 66min ισχαιμίας δεν φαίνεται να προκαλεί κάποια στατιστικώς σημαντική αλλαγή στο φαινότυπο των κυττάρων αυτών σχέση με τους ιστούς ελέγχου (Πίνακας 3, Εικόνα 18).

Στην μεσαία περιοχή του αμφιβληστροειδούς παρατηρήθηκε ότι 4 ώρες μετά την «επαναιμάτωση» των ιστών αυξήθηκαν ο αριθμός ($p < 0,05$) και το συνολικό μήκος των αποφύσεων ($p < 0,01$) καθώς και ο αριθμός των διακλαδώσεων που οι αποφύσεις αυτές σχηματίζουν ($p < 0,05$) σε σχέση με τους ιστούς ελέγχου (Πίνακας 3, Εικόνα 18). Σε ότι αφορά την ισχαιμία, διαπιστώθηκε ότι προκαλεί στατιστικώς σημαντική αύξηση του αριθμού των διακλαδώσεων ($p < 0,05$) και του συνολικού μήκους ($p < 0,05$) των αποφύσεων αλλά όχι του αριθμού των αποφύσεων των αστροκυττάρων (εντούτοις,

υπάρχει η τάση να αυξηθεί ο αριθμός αυτός, test for linear trend: $p < 0,05$) σε σχέση με τους ιστούς ελέγχου (Πίνακας 3, Εικόνα 18).

Πίνακας 3: Διαφορική επίδραση της ex vivo βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης στην ενεργοποίηση των αστροκυττάρων ανάλογα με την περιοχή του αμφιβληστροειδούς.

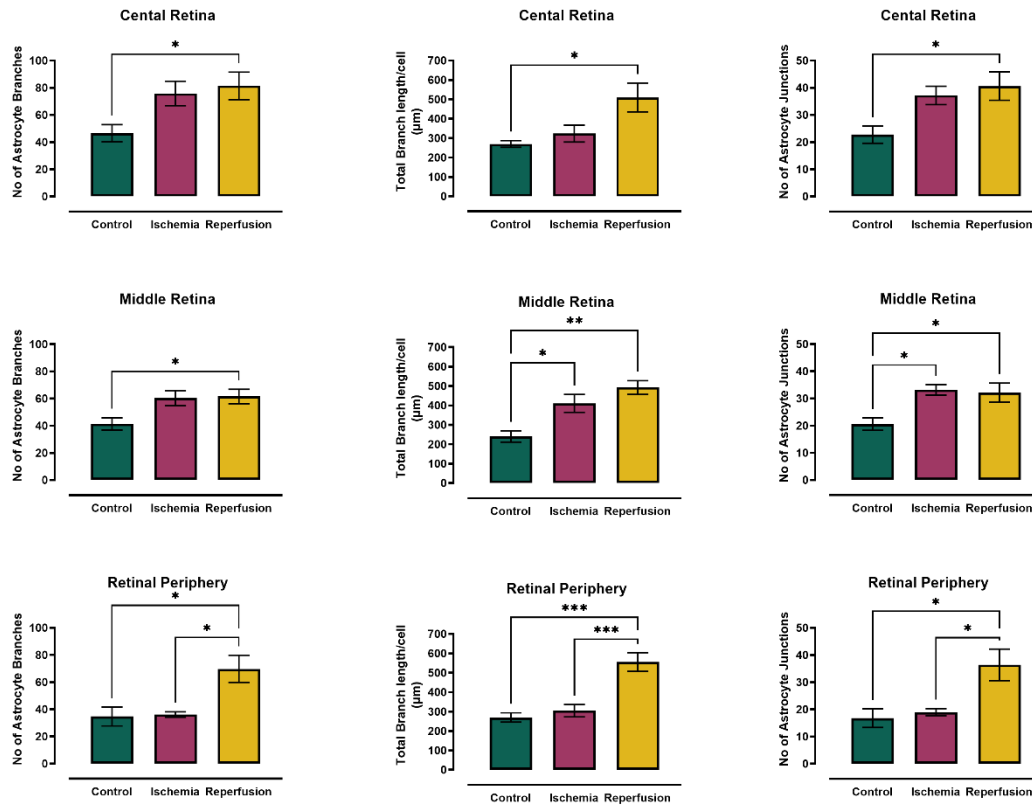
	Περιοχή Αμφιβληστροειδούς		
	Κεντρική	Μεσαία	Περιφέρεια
Ιστοί ελέγχου			
<i>Αριθμός Αποφύσεων</i>	46,6 ± 6,3	41,4 ± 4,5	34,8 ± 6,9
<i>Συνολικός μήκος αποφύσεων (μm)</i>	269,9 ± 17	240,2 ± 28,8	270,2 ± 24,1
<i>Αριθμός διακλαδώσεων</i>	22,8 ± 3,2	20,6 ± 2,2	16,8 ± 3,4
Ισχαιμία			
<i>Αριθμός Αποφύσεων</i>	74,6 ± 8,7	60,4 ± 5,5	36,2 ± 2 ^{**, #}
<i>Συνολικός μήκος αποφύσεων (μm)</i>	323,5 ± 43,5	410,6 ± 45,9	304,65 ± 31,85
<i>Αριθμός διακλαδώσεων</i>	39 ± 3,2	33,2 ± 2	19 ± 1,3 ^{***, ##}
Επαναιμάτωση			
<i>Αριθμός Αποφύσεων</i>	81,4 ± 10,1	61,6 ± 5,3	69,8 ± 10
<i>Συνολικός μήκος αποφύσεων (μm)</i>	509,7 ± 74,4	493 ± 35,3	555,6 ± 47,9
<i>Αριθμός διακλαδώσεων</i>	40,6 ± 5,2	32,2 ± 3,5	36,4 ± 5,8

(*): στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με την κεντρική περιοχή του αμφιβληστροειδή για την εκάστοτε συνθήκη.

(#): στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με την μεσαία περιοχή του αμφιβληστροειδή για την εκάστοτε συνθήκη.

Αριθμός συμβόλων: 1 = $p < 0,05$, 2 = $p < 0,01$, 3 = $p < 0,001$

Τέλος, στην περιφέρεια του αμφιβληστροειδούς παρατηρήθηκε ότι 4 ώρες μετά την «επαναιμάτωση» των ιστών αυξήθηκαν ο αριθμός ($p < 0,001$) και το συνολικό μήκος των αποφύσεων ($p < 0,001$) καθώς και ο αριθμός των διακλαδώσεων που οι αποφύσεις αυτές σχηματίζουν ($p < 0,05$) σε σχέση με τους ιστούς ελέγχου (Πίνακας 3, Εικόνα 18). Σε ότι αφορά στην ισχαιμία, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση του αριθμού των αποφύσεων σε σχέση με τους ιστούς ελέγχου ($p < 0,05$, Πίνακας 3, Εικόνα 18) καθώς και στατιστικώς σημαντική διαφορά του συνολικού μήκους των αποφύσεων ($p < 0,001$) και του αριθμού των διακλαδώσεων που οι αποφύσεις αυτές σχηματίζουν ($p < 0,05$), σε σχέση με την «επαναιμάτωση» (Πίνακας 3, Εικόνα 18).

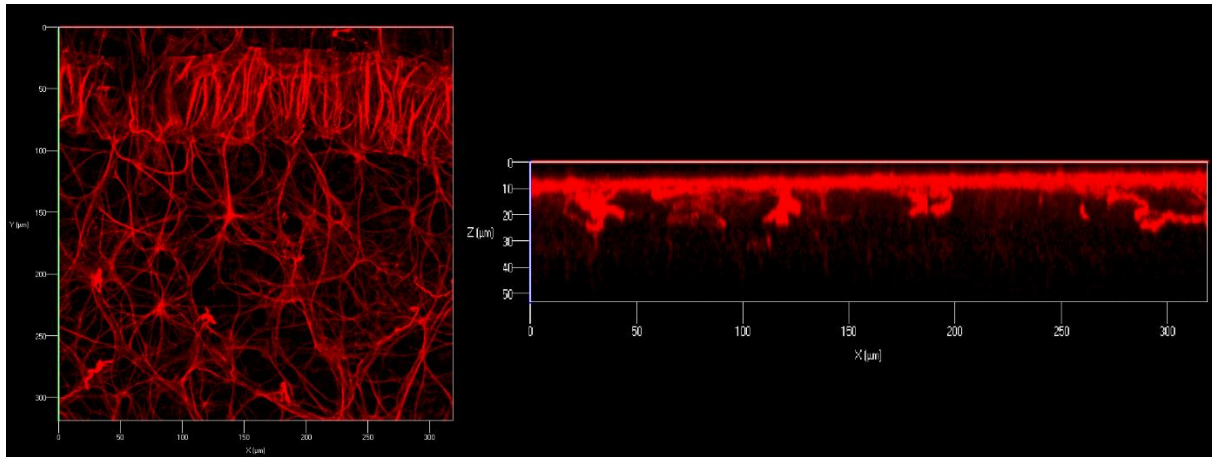


Εικόνα 18: Διαφορική επίδραση της *ex vivo* βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης στην ενεργοποίηση των αστροκυττάρων ανάλογα με την περιοχή του αμφιβληστροειδή. Έλεγχος τριών παραμέτρων: αριθμός αποφύσεων (*branches*, αριστερή στήλη), συνολικό μήκος αποφύσεων (*length*, μεσαία στήλη) και αριθμός διακλαδώσεων (*junctions*, δεξιά στήλη) που σχηματίζουν οι αποφύσεις των αστροκυττάρων του αμφιβληστροειδή. *Central Retina*: κεντρική περιοχή, *Middle Retina*: μεσαία περιοχή και *Periphery*: περιφέρεια αμφιβληστροειδούς, *Control*: συνθήκες ελέγχου, *Ischemia*: μετά από 66min ισχαιμίας, *Reperfusion*: μετά από 66min ισχαιμίας και 4h «επαναιμάτωσης» του ιστού, $n=5$ κύτταρα/συνθήκη, *: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$

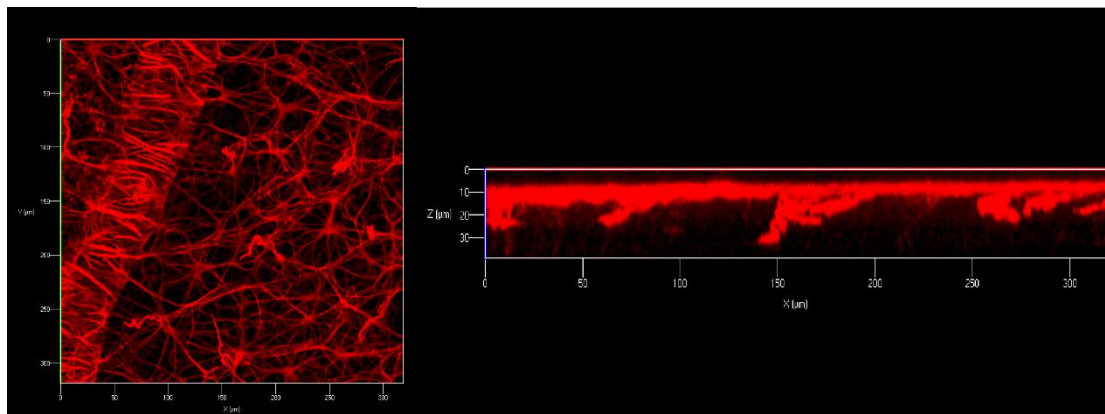
3. Επίδραση της *ex vivo* βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης στην ενεργοποίηση των κυττάρων Müller

Για την ανάλυση των κυττάρων Müller χρησιμοποιήθηκαν οι τρισδιάστατες εικόνες που λήφθηκαν με τη βοήθεια συνεστιακού μικροσκοπίου.

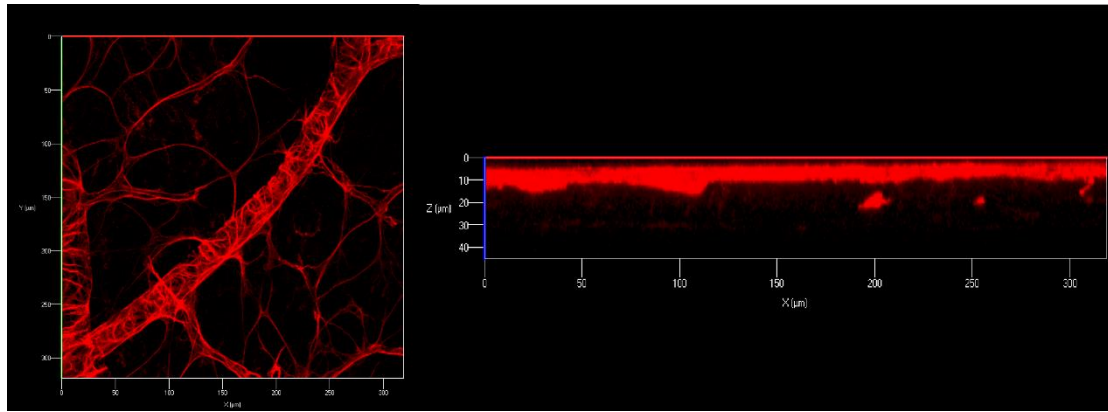
Όπως μπορούμε να δούμε στις φωτογραφίες που παρατίθενται παρακάτω, φαίνεται εκ πρώτης όψεως ότι κατά την ισχαιμία, καθώς και 4 ώρες μετά την επαναιμάτωση του αμφιβληστροειδούς, μειώνεται το πάχος που καταλαμβάνουν οι αποφύσεις των κυττάρων Müller, που εκφράζουν τη πρωτεΐνη GFAP σε σχέση με τους ιστούς ελέγχου.



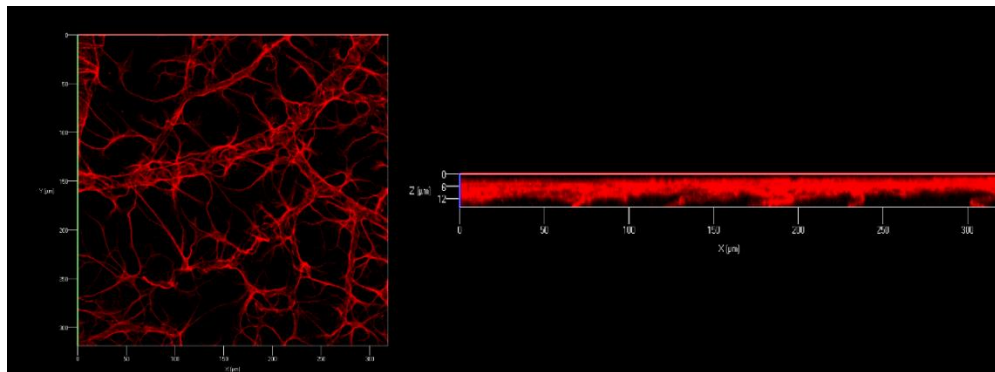
Εικόνα 19: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της GFAP σε συνθήκες ελέγχου, στο κεντρικό τμήμα του αμφιβληστροειδούς. Τρισδιάστατες εικόνες (3D) «τομών» στους άξονες x/y (αριστερά) και x/z (δεξιά) άξονες. Μεγέθυνση: x20



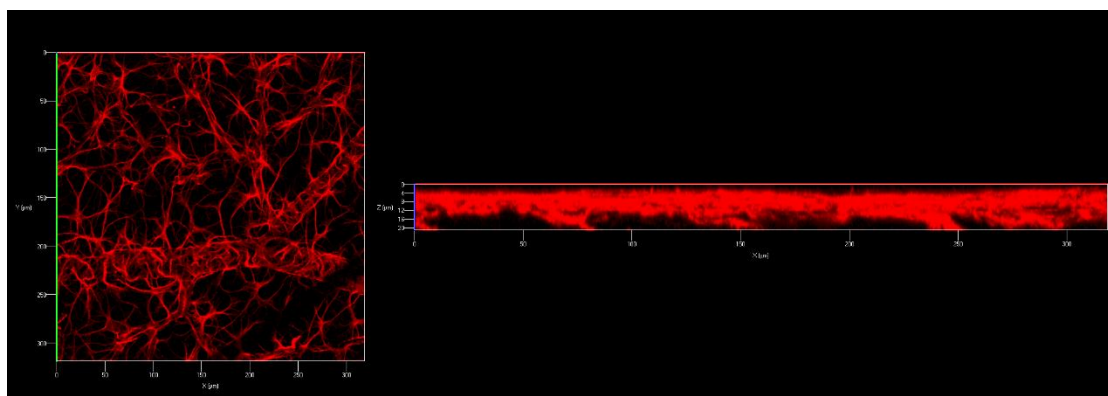
Εικόνα 20: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της GFAP σε συνθήκες ελέγχου, στη μεσαία περιοχή του αμφιβληστροειδούς. Τρισδιάστατες εικόνες (3D) «τομών» στους άξονες x/y (αριστερά) και x/z (δεξιά) άξονες. Μεγέθυνση: x20



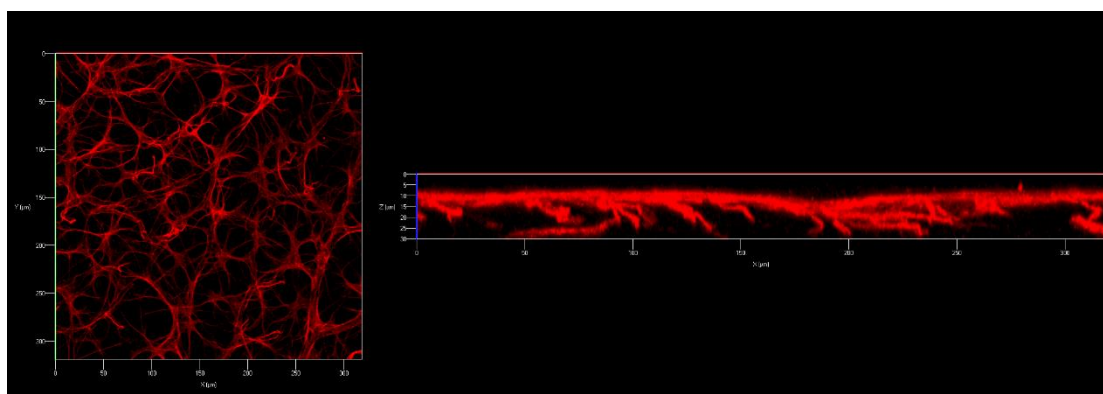
Εικόνα 21: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της GFAP σε συνθήκες ελέγχου, στην περιφέρεια αμφιβληστροειδούς. Τρισδιάστατες εικόνες (3D) «τομών» στους άξονες x/y (αριστερά) και x/z (δεξιά) άξονες. Μεγέθυνση: x20



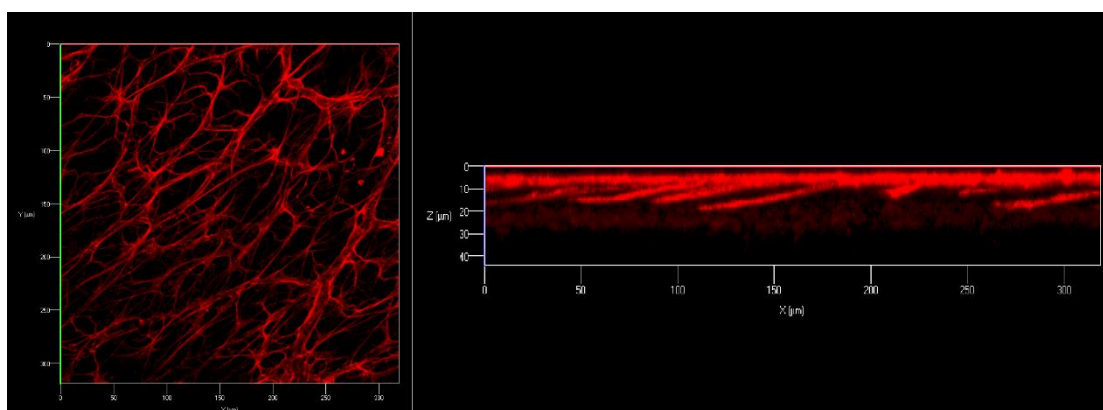
Εικόνα 22: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της GFAP μετά από 66 min *ex vivo* ισχαιμίας στο κέντρο του αμφιβληστροειδούς. Τρισδιάστατες εικόνες (3D) «τομών» στους άξονες x/y (αριστερά) και x/z (δεξιά) άξονες. Μεγέθυνση: x20



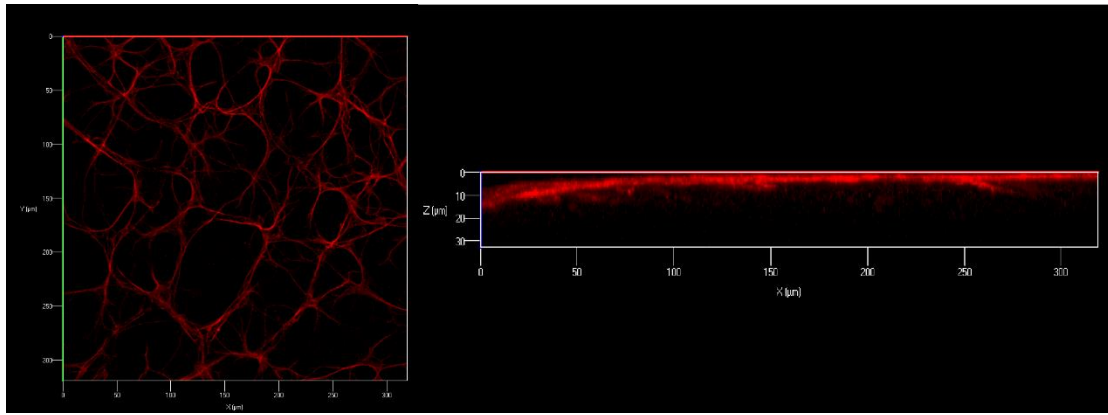
Εικόνα 23: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της GFAP μετά από 66 min *ex vivo* ισχαιμίας στη μεσαία περιοχή του αμφιβληστροειδούς. Τρισδιάστατες εικόνες (3D) «τομών» στους άξονες x/y (αριστερά) και x/z (δεξιά) άξονες. Μεγέθυνση: x20



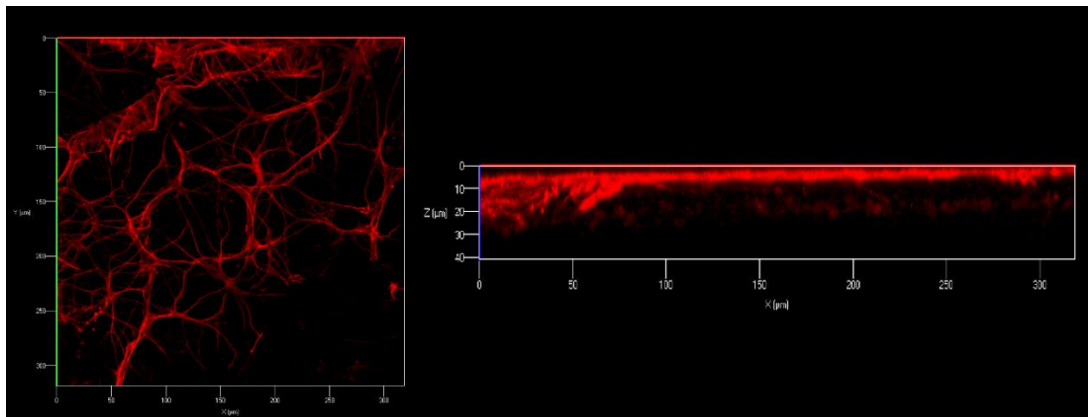
Εικόνα 24: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της GFAP μετά από 66 min *ex vivo* ισχαιμίας στην περιφέρεια αμφιβληστροειδούς. Τρισδιάστατες εικόνες (3D) «τομών» στους άξονες x/y (αριστερά) και x/z (δεξιά) άξονες. Μεγέθυνση: x20



Εικόνα 25: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της GFAP μετά από *ex vivo* επαναιμάτωση (66 min ισχαιμίας, 240min «επαναιμάτωσης») στο κεντρικό τμήμα του αμφιβληστροειδούς. Τρισδιάστατες εικόνες (3D) «τομών» στους άξονες x/y (αριστερά) και x/z (δεξιά) άξονες. Μεγέθυνση: x20



Εικόνα 26: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της GFAP μετά από *ex vivo* επαναϊμάτωση (66 min ισχαιμίας, 240min «επαναϊμάτωσης») στη μεσαία περιοχή του αμφιβληστροειδούς. Τρισδιάστατες εικόνες (3D) «τομών» στους άξονες x/y (αριστερά) και x/z (δεξιά) άξονες. Μεγέθυνση: x20



Εικόνα 27: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της GFAP μετά από *ex vivo* επαναϊμάτωση (66 min ισχαιμίας, 240min «επαναϊμάτωσης») στη συνθήκη ισχαιμίας/επαναϊμάτωσης, στην περιφέρεια αμφιβληστροειδούς. Τρισδιάστατες εικόνες (3D) «τομών» στους άξονες x/y (αριστερά) και x/z (δεξιά) άξονες. Μεγέθυνση: x20

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης του αμφιβληστροειδούς, παραμένει η κύρια αιτία διαταραχής της όρασης και τύφλωσης, με τον γερασμένο πληθυσμό να πλήττεται περισσότερο, κυρίως λόγω της απουσίας αποτελεσματικών θεραπευτικών μέτρων. Είναι ήδη γνωστό ότι τα κύτταρα της γλοίας παίζουν βασικό και ρυθμιστικό ρόλο σε πληθώρα παθολογικών καταστάσεων στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα. Έτσι, στη παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η επίδραση που έχει η βλάβη της ισχαιμίας/επαναιμάτωσης του αμφιβληστροειδούς στα αστροκύτταρα και στα κύτταρα Müller, που αποτελούν τους κυρίαρχους τύπους γλοίας στον αμφιβληστροειδή των σπονδυλωτών στα πρώιμα στάδια αυτού του φαινομένου.

Η φαινοτυπική αλλαγή (ενεργοποίηση) των αστροκυττάρων και των κυττάρων Müller του αμφιβληστροειδούς μελετήθηκε με αντίσωμα έναντι της όξινης πρωτεΐνης των ενδιάμεσων ινιδίων της γλοίας (GFAP), η αύξηση της οποίας αποτελεί αξιόπιστο δείκτη αυτής της ενεργοποίησης (Escartin και συν., 2021) και καταμέτρηση του αριθμού των διακλαδώσεων, καθώς και του αριθμού και του συνολικού μήκους των αποφύσεων που αυτές σχηματίζουν. Η ενεργοποίηση τόσο των αστροκυττάρων όσο και των κυττάρων Müller, που αναφέρεται ως «αντιδραστική γλοίωση», έχει ήδη δείχθει σε μια ποικιλία βλαβών στον εγκέφαλο για τα αστροκύτταρα και για τους δύο τύπους μακρογλοιακών κυττάρων στον αμφιβληστροειδή (Liu και συν., 2006, Graca και συν., 2018).

Η επαναιμάτωση αυξάνει την ενεργοποίηση των αστροκυττάρων που προκαλεί η ισχαιμία

Προκειμένου να διερευνήσουμε τις φαινοτυπικές αλλαγές που χαρακτηρίζουν την ενεργοποίηση των αστροκυττάρων ελέγξαμε τρεις φαινοτυπικές παραμέτρους: (1) τον αριθμό και (2) το συνολικό μήκος των αποφύσεων των αστροκυττάρων και (3) τον αριθμό των διακλαδώσεων που αποφύσεις αυτές σχηματίζουν. Διαπιστώσαμε ότι, 66 λεπτά ισχαιμίας οδηγούν σε φαινοτυπική αλλαγή (ενεργοποίηση) των αστροκυττάρων, καθώς αυξάνονται και οι τρεις παράμετροι που εξετάσαμε, σε σχέση με τους ιστούς ελέγχου. Αυτή η αύξηση των τριών παραμέτρων φαίνεται να εντείνεται 4 ώρες μετά την επαναιμάτωση του αμφιβληστροειδούς σε σχέση με τους ιστούς ελέγχου.

Απ' όσο γνωρίζουμε είναι η πρώτη φορά που διαπιστώνεται στη βιβλιογραφία η φαινοτυπική αλλαγή των αστροκυττάρων (ενεργοποίηση) αμέσως μετά την ισχαιμία, ενώ τα αποτελέσματα μας, όσον αφορά την επαναιμάτωση, συνάδουν τόσο με *ex vivo* μελέτες ισχαιμίας/επαναιμάτωσης του αμφιβληστροειδούς του εργαστηρίου όσο και με *in vivo* μελέτες που αφορούν την εγκεφαλική ισχαιμία και επαναιμάτωση, όπου τα αστροκύτταρα γίνονται αντιδραστικά και αυξάνουν την έκφραση της όξινης πρωτεΐνης των ενδιάμεσων ινιδίων της γλοίας (Trissoka και συν., 2022, Garcia και συν., 1993).

Η άμεση ενεργοποίηση των αστροκυττάρων μετά από τη βλάβη της ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, η οποία δεν έχει δειχθεί παρά μόνο αρκετές ώρες ή και μέρες μετά την επαναιμάτωση του αμφιβληστροειδούς, μπορεί να οφείλεται στις προστατευτικές ιδιότητες των αστροκυττάρων, όπως συνόψισαν οι Linnerbauer και Rothhammer (Linnerbauer & Rothhammer, 2020).

Ακόμη η ενεργοποίηση των αστροκυττάρων μπορεί να οφείλεται στην ικανότητα των αστροκυττάρων να μεταφέρουν λειτουργικά μιτοχόνδρια στους νευρώνες, προκειμένου να τους προστατεύσουν και να καθυστερήσουν τον κυτταρικό θάνατο σε ισχαιμικές καταστάσεις, όπως πρότεινε η έρευνα του Hayakawa (Hayakawa και συν., 2016).

Τα αστροκύτταρα της περιφέρειας του αμφιβληστροειδούς καθυστερούν να ενεργοποιηθούν

Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν υπάρχει διαφορά ως προς την ενεργοποίηση των αστροκυττάρων κατά την *ex vivo* βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, ανάλογα με την περιοχή του αμφιβληστροειδούς στην οποία βρίσκονται, συγκρίναμε τον αριθμό και το συνολικό μήκος των αποφύσεων καθώς και τον αριθμό των διακλαδώσεων, που οι αποφύσεις αυτές σχηματίζουν, στις τρεις κύριες περιοχές του αμφιβληστροειδούς (κεντρική, μεσαία και περιφέρεια).

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι και για τις 3 παραμέτρους υπάρχει τάση αύξησή τους άμεσα κατά την ισχαιμία στη κεντρική και μεσαία περιοχή του αμφιβληστροειδούς, ενώ 4 ώρες μετά την επαναιμάτωση των ιστών, η αύξηση αυτή γίνεται στατιστικώς σημαντική. Ωστόσο, σε ότι αφορά τα αστροκύτταρα που προέρχονται από τη περιφέρεια δε φαίνεται να υπάρχει κάποια διαφορά ανάμεσα στη

συνθήκη ελέγχου και τη συνθήκη ισχαιμίας, ενώ υπάρχει στατιστικώς σημαντική αύξηση και των τριών παραμέτρων 4 ώρες μετά την επαναιμάτωση, σε σχέση με τους ιστούς ελέγχου. Έτσι, φαίνεται να καθυστερεί η ενεργοποίηση των αστροκυττάρων της περιφέρειας του αμφιβληστροειδούς σε σχέση με αυτά της κεντρικής και μεσαίας περιοχής.

Αυτό, πιθανά οφείλεται στο ότι η περιφέρεια του αμφιβληστροειδούς βρίσκεται μακριά από το οπτικό νεύρο και ενδεχομένως τα αστροκύτταρά της δεν είναι χρειάζεται να ενεργοποιηθούν άμεσα. Επίσης, ένας λόγος της καθυστέρησης ενεργοποίησης των αστροκυττάρων της περιφέρειας πιθανά να είναι η διαφορετική γονιδιακή έκφραση που έχει διαπιστωθεί μεταξύ των αστροκυττάρων της κεντρικής περιοχής και της περιφέρειας του αμφιβληστροειδούς (Yan και συν., 2020).

Τα κύτταρα Müller δεν φαίνεται να ενεργοποιούνται κατά την ex vivo πρόκληση ισχαιμίας/επαναιμάτωσης

Η ανοσοαντιδραστικότητα για την όξινη πρωτεΐνη της ινιδιακής γλοίας GFAP στους αμφιβληστροειδείς της συνθήκης ελέγχου βρέθηκε κυρίως στη στοιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων, όπου βρίσκονται τα αστροκύτταρα του αμφιβληστροειδούς (εκτός των άκρων των κυττάρων Müller). Η ανοσοαντιδραστικότητα της πρωτεΐνης GFAP τόσο μετά από ex vivo πρόκληση 66 λεπτών ισχαιμίας όσο και 4 ώρες μετά την επαναιμάτωση φαίνεται, εκ πρώτης όψεως να μειώνεται.

Τα αποτελέσματα αυτά αν και φαίνεται να έρχονται σε αντίθεση με την έρευνα του Wurm και των συνεργατών του (Wurm και συν., 2011), οι οποίοι παρατήρησαν διόγκωση και κατά συνέπεια ενεργοποίηση των κυττάρων Müller, με αύξηση της ανοσοδραστικότητας της πρωτεΐνης GFAP στο πάχος του αμφιβληστροειδούς, σε in vivo πείραμα ισχαιμίας/επαναιμάτωσης σε πειραματόζωα χοίρων ή και του Kim και των συνεργατών του (Kim και συν., 2017), οι οποίοι βρήκαν σημαντική αύξηση της ανοσοαντιδραστικότητας της πρωτεΐνης GFAP στις αποφύσεις των κυττάρων Müller. Η διαφορά στα αποτελέσματά έγκειται στο ότι εμείς εξετάσαμε την άμεση επίδραση της βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (66 λεπτά ισχαιμίας και 4 ώρες μετά την επαναιμάτωση). Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες προκειμένου να διευκρινιστεί η αν πραγματικά η ισχαιμία και τα πρώτα στάδια επαναιμάτωσης έχουν άμεση επίδραση στη μορφολογία των κυττάρων Müller.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Antonetti DA, Barber AJ, Bronson SK, Freeman WM, Gardner TW, Jefferson LS, Kester M, Kimball SR, Krady JK, LaNoue KF, Norbury CC, Quinn PG, Sandirasegarane L, Simpson IA; JDRF Diabetic Retinopathy Center Group. Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease. *Diabetes*. 2006 Sep;55(9):2401-11. doi: 10.2337/db05-1635. PMID: 16936187.
- Becker JB, Prendergast BJ, Liang JW. Female rats are not more variable than male rats: a meta-analysis of neuroscience studies. *Biol Sex Differ*. 2016 Jul 26;7:34. doi: 10.1186/s13293-016-0087-5. PMID: 27468347; PMCID: PMC4962440.
- Behar-Cohen F, Gelizé E, Jonet L, Lassiáz P. Anatomie de la rétine [Anatomy of the retina]. *Med Sci (Paris)*. 2020 Jun-Jul;36(6-7):594-599. French. doi: 10.1051/medsci/2020094. Epub 2020 Jul 2. PMID: 32614310.
- Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res*. 2006 Jul;25(4):397-424. doi: 10.1016/j.preteyeres.2006.05.003. Epub 2006 Jul 12. PMID: 16839797.
- Cowled P, Fitridge R. Pathophysiology of Reperfusion Injury. In: Fitridge R, Thompson M, editors. *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists* [Internet]. Adelaide (AU): University of Adelaide Press; 2011. 18. PMID: 30485021.
- D'Amico DJ. Diseases of the retina. *N Engl J Med*. 1994 Jul 14;331(2):95-106. doi: 10.1056/NEJM199407143310207. PMID: 8208273.
- de Campos VS, Calaza KC, Adesse D. Implications of TORCH Diseases in Retinal Development-Special Focus on Congenital Toxoplasmosis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 10:585727. doi: 10.3389/fcimb.2020.585727. PMID: 33194824; PMCID: PMC7649341.
- Escartin C, Galea E, Lakatos A, O'Callaghan JP, Petzold GC, Serrano-Pozo A, Steinhäuser C, Volterra A, Carmignoto G, Agarwal A, Allen NJ, Araque A, Barbeito L, Barzilai A, Bergles DE, Bonvento G, Butt AM, Chen WT, Cohen-Salmon M, Cunningham C, Deneen B, De Strooper B, Díaz-Castro B, Farina C, Freeman M, Gallo V, Goldman JE, Goldman SA, Götz M, Gutiérrez A, Haydon PG, Heiland DH, Hol EM, Holt MG, Iino M, Kastanenka KV, Kettenmann H, Khakh BS, Koizumi S, Lee CJ, Liddelow SA, MacVicar BA, Magistretti P,

- Messing A, Mishra A, Molofsky AV, Murai KK, Norris CM, Okada S, Oliet SHR, Oliveira JF, Panatier A, Parpura V, Pekna M, Pekny M, Pellerin L, Perea G, Pérez-Nievas BG, Pfrieger FW, Poskanzer KE, Quintana FJ, Ransohoff RM, Riquelme-Perez M, Robel S, Rose CR, Rothstein JD, Rouach N, Rowitch DH, Semyanov A, Sirko S, Sontheimer H, Swanson RA, Vitorica J, Wanner IB, Wood LB, Wu J, Zheng B, Zimmer ER, Zorec R, Sofroniew MV, Verkhratsky A. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci.* 2021 Mar;24(3):312-325. doi: 10.1038/s41593-020-00783-4. Epub 2021 Feb 15. PMID: 33589835; PMCID: PMC8007081.
- Ferrara M, Lugano G, Sandinha MT, Kearns VR, Geraghty B, Steel DHW. Biomechanical properties of retina and choroid: a comprehensive review of techniques and translational relevance. *Eye (Lond).* 2021 Jul;35(7):1818-1832. doi: 10.1038/s41433-021-01437-w. Epub 2021 Mar 1. PMID: 33649576; PMCID: PMC8225810.
- Fortmann SD, Grant MB. Molecular mechanisms of retinal ischemia. *Curr Opin Physiol.* 2019 Feb;7:41-48. doi: 10.1016/j.cophys.2018.12.008. Epub 2018 Dec 28. PMID: 34322649; PMCID: PMC8315104.
- Fu Z, Sun Y, Cakir B, Tomita Y, Huang S, Wang Z, Liu CH, S Cho S, Britton W, S Kern T, Antonetti DA, Hellström A, E H Smith L. Targeting Neurovascular Interaction in Retinal Disorders. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb 22;21(4):1503. doi: 10.3390/ijms21041503. PMID: 32098361; PMCID: PMC7073081.
- Garcia J. H., Yoshida Y., Chen H., Li Y., Zhang Z. G., Lian J., Chen S. και Chopp M., 1993. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat, *Am J Pathol*, 142(2), p.623–635.
- Graca AB, Hippert C, Pearson RA. Müller Glia Reactivity and Development of Gliosis in Response to Pathological Conditions. *Adv Exp Med Biol.* 2018; 1074:303-308. doi: 10.1007/978-3-319-75402-4_37. PMID: 29721957.
- Hayakawa K, Esposito E, Wang X, Terasaki Y, Liu Y, Xing C, Ji X, Lo EH. Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature.* 2016 Jul 28;535(7613):551-5. doi: 10.1038/nature18928. Erratum in: *Nature.* 2016 Sep 14;539(7627):123. PMID: 27466127; PMCID: PMC4968589.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Νευροεπιστήμη και Συμπεριφορά*, 2020, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Επιστημονική Επιμέλεια Ελληνικής Έκδοσης: Αζαρία Καραμανλίδης

- Kaur C, Foulds WS, Ling EA. Blood-retinal barrier in hypoxic ischaemic conditions: basic concepts, clinical features and management. *Prog Retin Eye Res.* 2008 Nov;27(6):622-47. doi: 10.1016/j.preteyeres.2008.09.003. Epub 2008 Oct 4. PMID: 18940262.
- Kim CR, Kim JH, Park HL, Park CK. Ischemia Reperfusion Injury Triggers TNF α Induced-Necroptosis in Rat Retina. *Curr Eye Res.* 2017 May;42(5):771-779. doi: 10.1080/02713683.2016.1227449. Epub 2016 Oct 12. PMID: 27732109.
- Kobat SG, Turgut B. Importance of Müller Cells. *Beyoglu Eye J.* 2020 Jul 29;5(2):59-63. doi: 10.14744/bej.2020.28290. PMID: 35098065; PMCID: PMC8784480.
- Kolb H. Glial Cells of the Retina. 2001 May 1 [updated 2007 Apr 17]. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, editors. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System* [Internet]. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; 1995-. PMID: 21413380.
- Kolb H. Roles of Amacrine Cells. 2005 May 1 [updated 2007 Apr 30]. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, editors. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System* [Internet]. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; 1995-. PMID: 21413397.
- Kur J, Newman EA, Chan-Ling T. Cellular and physiological mechanisms underlying blood flow regulation in the retina and choroid in health and disease. *Prog Retin Eye Res.* 2012 Sep;31(5):377-406. doi: 10.1016/j.preteyeres.2012.04.004. Epub 2012 May 3. PMID: 22580107; PMCID: PMC3418965.
- Linnerbauer M, Rothhammer V. Protective Functions of Reactive Astrocytes Following Central Nervous System Insult. *Front Immunol.* 2020; 11:573256. doi: 10.3389/fimmu.2020.573256. PMID: 33117368; PMCID: PMC7561408.
- Linnerbauer M, Rothhammer V. Protective Functions of Reactive Astrocytes Following Central Nervous System Insult. *Front Immunol.* 2020;11:573256. doi: 10.3389/fimmu.2020.573256. PMID: 33117368; PMCID: PMC7561408.
- Liu B, Chen H, Johns TG, Neufeld AH. Epidermal growth factor receptor activation: an upstream signal for transition of quiescent astrocytes into reactive astrocytes after neural injury. *J Neurosci.* 2006 Jul 12;26(28):7532-40. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1004-06.2006. PMID: 16837601; PMCID: PMC6674203.
- Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol.* 2019; 1897:28

- 9-298. doi: 10.1007/978-1-4939-8935-5_25. PMID: 30539453; PMCID: PMC6749998.
- Mahabadi N, Al Khalili Y. Neuroanatomy, Retina. 2022 Aug 8. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. PMID: 31424894.
- Marchesi N, Fahmideh F, Boschi F, Pascale A, Barbieri A. Ocular Neurodegenerative Diseases: Interconnection between Retina and Cortical Areas. *Cells*. 2021 Sep 12;10(9):2394. doi: 10.3390/cells10092394. PMID: 34572041; PMCID: PMC8469605.
- Masland RH. The neuronal organization of the retina. *Neuron*. 2012 Oct 18;76(2):266-80. doi: 10.1016/j.neuron.2012.10.002. Epub 2012 Oct 17. PMID: 23083731; PMCID: PMC3714606.
- Minhas G, Sharma J, Khan N. Cellular Stress Response and Immune Signaling in Retinal Ischemia-Reperfusion Injury. *Front Immunol*. 2016 Oct 24;7:444. doi: 10.3389/fimmu.2016.00444. PMID: 27822213; PMCID: PMC5075763.
- Nguyen KH, Patel BC, Tadi P. Anatomy, Head and Neck: Eye Retina. 2022 Aug 8. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. PMID: 31194472.
- Osborne NN, Casson RJ, Wood JP, Chidlow G, Graham M, Melena J. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res*. 2004 Jan;23(1):91-147. doi: 10.1016/j.preteyeres.2003.12.001. PMID: 14766318.
- Paisley CE, Kay JN. Seeing stars: Development and function of retinal astrocytes. *Dev Biol*. 2021; 478:144-154. doi: 10.1016/j.ydbio.2021.07.007. Epub 2021 Jul 11. PMID: 34260962; PMCID: PMC8542354.
- Panickar KS, Norenberg MD. Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations. *Glia*. 2005; 50(4):287-298. doi: 10.1002/glia.20181. PMID: 15846806.
- Ptito M, Bleau M, Bouskila J. The Retina: A Window into the Brain. *Cells*. 2021; 10(12):3269. doi: 10.3390/cells10123269. PMID: 34943777; PMCID: PMC8699497.
- Rathnasamy G, Foulds WS, Ling EA, Kaur C. Retinal microglia - A key player in healthy and diseased retina. *Prog Neurobiol*. 2019; 173:18-40. doi: 10.1016/j.pneurobio.2018.05.006. Epub 2018 Jun 1. PMID: 29864456.

- Rehman I, Hazhirkarzar B, Patel BC. Anatomy, Head and Neck, Eye. 2022 Jul 25. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 29494035.
- Ruzafa N, Pereiro X, Vecino E. Immunohistochemical Characterisation of the Whale Retina. *Front Neuroanat.* 2022; 16:813369. doi: 10.3389/fnana.2022.813369. PMID: 35185483; PMCID: PMC8856181.
- Tao C, Zhang X. Development of astrocytes in the vertebrate eye. *Dev Dyn.* 2014 Dec;243(12):1501-10. doi: 10.1002/dvdy.24190. Epub 2014 Oct 13. PMID: 25236977; PMCID: PMC4237691.
- Trisokka P, Stamatiou R, Delkis N, Asproдини E, Hatziefthimiou, Vasilaki A Retinal ischemia/reperfusion injury: quest for early molecular biomarkers in a rat pharmacological target evaluation model. 12th Meeting of the Hellenic Society of Basic & Clinical Pharmacology. October 7-9 2022, Arta, Greece Proceedings; p53.
- Tworig JM, Feller MB. Müller Glia in Retinal Development: From Specification to Circuit Integration. *Front Neural Circuits.* 2022; 15:815923. doi: 10.3389/fncir.2021.815923. PMID: 35185477; PMCID: PMC8856507.
- Vecino E, Rodriguez FD, Ruzafa N, Pereiro X, Sharma SC. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res.* 2016; 51:1-40. doi: 10.1016/j.preteyeres.2015.06.003. Epub 2015 Jun 23. PMID: 26113209.
- Walter F. Boron, Emile L. Boulpaep, Ιατρική Φυσιολογία, 2η Ελληνική έκδοση, Εκδόσεις Broken Hill, Γεν. Επιμέλεια Ελληνικής Έκδοσης: Γεώργιος Α. Κόλλιας, Μιχαήλ Ν. Κουτσιλιέρης. 2020 Κεφάλαιο 15, Σελ.380-389
- Wurm A, Iandiev I, Uhlmann S, Wiedemann P, Reichenbach A, Bringmann A, Pannicke T. Effects of ischemia-reperfusion on physiological properties of Müller glial cells in the porcine retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011; 52(6):3360-7. doi: 10.1167/iovs.10-6901. PMID: 21345997.
- Yan W, Peng YR, van Zyl T, Regev A, Shekhar K, Juric D, Sanes JR. Cell Atlas of The Human Fovea and Peripheral Retina. *Sci Rep.* 2020 Jun 17;10(1):9802. doi: 10.1038/s41598-020-66092-9. PMID: 32555229; PMCID: PMC7299956.
- Yang X, Yu XW, Zhang DD, Fan ZG. Blood-retinal barrier as a converging pivot in understanding the initiation and development of retinal diseases. *Chin Med J (Engl).* 2020; 133(21):2586-2594. doi: 10.1097/CM9.0000000000001015. PMID: 32852382; PMCID: PMC7722606.

- Yemanyi F, Bora K, Blomfield AK, Wang Z, Chen J. Wnt Signaling in Inner Blood-Retinal Barrier Maintenance. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(21):11877. doi: 10.3390/ijms222111877. PMID: 34769308; PMCID: PMC8584977.
- Yu DY, Cringle SJ, Balaratnasingam C, Morgan WH, Yu PK, Su EN. Retinal ganglion cells: Energetics, compartmentation, axonal transport, cytoskeletons and vulnerability. *Prog Retin Eye Res.* 2013; 36:217-46. doi: 10.1016/j.preteyeres.2013.07.001. Epub 2013 Jul 23. PMID: 23891817.
- Ζίφα Αιμιλία, Διακυτταρική Επικοινωνία – Μεταγωγή Σήματος, Τέταρτη Έκδοση, 2019, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας.