

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

ROBERTA VASILIAUSKAITĖ
(Mikrobiologijos studijų programa)

Magistro baigiamasis darbas

**Išeminės reperfuzijos sukeltų tinklainės funkcinių,
morfologinių ir genų raiškos pokyčių nustatymas *Brown*
Norway žiurkėse**

Darbo vadovas dr. Symantas Ragauskas

(parašas)

Studentas _____
(parašas)

Vilnius, 2023

TURINYS

SANTRUMPOS	5
ĮVADAS.....	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	8
1.1. Tinklainės sandara	8
1.1.1. Tinklainės ganglinės ląstelės	11
1.1.2. Ganglinių ląstelių apoptozę incijuojantys faktoriai.....	12
1.2. Tinklainės kraujotakos sistema.....	15
1.3. Tinklainės išeminės reperfuzijos etiologija ir patogenezė.....	16
1.3.1. Veiksniai, lemiantys laikiną kraujotakos sustabdymą.....	16
1.3.2. Laikino kraujotakos sutrikdymo sukeltos patologijos.....	18
1.4. Apoptotiniai ir anti – apoptotiniai genai.....	20
1.4.1. Kaspazė – 8	20
1.4.2. B – ląstelių limfoma 6	21
1.5. Uždegiminio atsako genai	22
1.5.1. Glialinis fibrilinis rūgštinis baltymas	22
1.5.2. Chemokino ligandas 12.....	23
1.6. Metodų charakterizavimas.....	24
1.6.1. Optinė koheretinė tomografija	24
1.6.2. Šabloninė elektroretinografija	24
2. TYRIMŲ MEDŽIAGA IR METODAI.....	26
2.1. Laboratoriniai gyvūnai, įranga, reagentai ir kitos medžiagos	26
2.1.1. Gyvūnai	26
2.1.2. Įranga, vaistiniai preparatai ir reagentai.....	26
2.1.3. Genai	26
2.2. <i>In vivo</i> tyrimai.....	27
2.2.1. Išeminės reperfuzijos modelio sukėlimas	27
2.2.2. Akispūdžio matavimas	28
2.2.3. Šabloninė elektroretinografija	28

2.2.4.	Optinė koherentinė tomografija	28
2.3.	Histologija	29
2.3.1.	Tinklainės imunohistocheminis dažymas.....	29
2.4	Molekuliniai tyrimai	30
2.4.1.	RNR išskyrimas iš audinio	30
2.4.2.	RNR koncentracijos nustatymas	31
2.4.3.	Kopijinės DNR sintezė.....	31
2.4.4.	Realaus laiko kiekybinės polimerazės grandininės reakcijos atlikimas (kPGR)	31
2.5.	Statistinė analizė	32
2.6.	Tyrimo etapai.....	32
2.6.1.	Pirmojo eksperimento eiga: tinkamo natrio chlorido slėgio nustatymas	32
2.6.2.	Antrojo eksperimento eiga: funkciniai ir struktūriniai pakitimai, sukelti išeminės reperfuzijos modelio	33
2.6.3.	Trečiojo eksperimento eiga: genų ekspresijos susiejimas su išeminės reperfuzijos sukeltais morfologiniais ir fiziologiniais pakitimais.....	35
3.	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	37
3.1.	Efektyvaus natrio chlorido spaudimo nustatymas	37
3.1.1.	Intraokuliarinio spaudimo kitimas	37
3.1.2.	Tinklainės ganglinių ląstelių išgyvenamumas.....	38
3.2.	Išeminės reperfuzijos sukelti morfologiniai ir fiziologiniai pakitimai	40
3.2.1.	Intraokuliarinio spaudimo kitimas	40
3.2.2.	Ganglinių ląstelių sluoksnio storio pokyčiai	42
3.2.3.	Visos tinklainės storio kitimas	44
3.2.4.	Tinklainės ganglinių ląstelių atsako į šabloninį stimulą kitimas.....	46
3.2.5.	Tinklainės ganglinių ląstelių išgyvenamumas.....	47
3.2.6.	Tinklainės svorio kitimas	49
3.3.	Išeminės reperfuzijos sukelti genų raiškos pokyčiai	50
3.3.1.	Efektyvumo nustatymo testas.....	50
3.3.2.	<i>GFAP</i> geno raiškos pokyčiai.....	53

3.3.3.	<i>Ccl12</i> geno raiškos pokyčiai	54
3.3.4.	<i>Casp8</i> geno raiškos pokyčiai	55
3.3.5.	<i>Bcl6</i> geno raiškos pokyčiai	56
4.	REZULATŲ APTARIMAS	58
4.1.	Tinkamo natrio chlorido slėgio nustatymas	58
4.2.	Išeminės reperfuzijos sukelti funkciniai ir struktūriniai pokyčiai	58
4.3.	Išeminės reperfuzijos sukeltų genų raiškos pokyčių susiejimas su morfologiniais ir fiziologiniais pakitimais	59
	IŠVADOS	63
	SANTRAUKA	64
	SUMMARY	65
	Literatūra	66
	1 priedas	73
	2 priedas	74
	3 priedas	76
	4 priedas	78

SANTRUMPOS

AGE (angl. *Advanced Glycation End Products*) – galutiniai glikozilino produktai

AMPA (angl. *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*) – α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiono rūgštis

Apaf-1 (angl. *Apoptotic protease activating factor 1*) – apoptotinę proteazę aktyvinantis faktorius 1

ATP (angl. *Adenosine triphosphate*) adenzino trifosfatas

Bcl6 (angl. *B-cell lymphoma 6*) – B ląstelių limfoma 6 baltymas

cAMP (angl. *Cyclic adenosine monophosphate*) – ciklinis adenzino monofosfatas

Casp8 (angl. *Caspase 8*) – kaspazė 8

Ccl12 (angl. *C-C motif chemokine ligand 12*) – C-C motyvo chemokino ligandas 2

Ccl2 (angl. *C-C motif chemokine ligand 2*) – C-C motyvo chemokino ligandas 2

Ccr2 (angl. *C-C motif chemokine receptor 2*) – C-C motyvo chemokino receptorius 2

CED-3 (angl. *Cell death protein 3*) – ląstelių mirties baltymas 3

DAPI (angl. *4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride solution*) – 4',6-diamidino 2-fenilindolio dihidrochlorido tirpalas

DNR (angl. *Deoxyribonucleic acid*) – deoksiribonukleorūgštis

DPI – Dienos po indukcijos

DR – Diabetinė retinopatija

GABA (angl. *Gamma-aminobutyric acid*) – gama-aminosviesto rūgštis

GDD – Geltonosios dėmės degeneracija

GFAP (angl. *Glial fibrillary acidic protein*) – glialinis fibrilinis rūgštinis baltymas

HIF (angl. *Hypoxia-inducible factors*) – hipoksijos sukeliama veiksniai

IL-1 β (angl. *Interleukin 1 beta*) – interleukinas-1 beta

IOP (angl. *Intraocular pressure*) – intraokuliarinis spaudimas

IR – Išeminė reperfuzija

kDNA (angl. *copy DNA*) – kopijinė deoksiribonukleorūgštis

MOMP (angl. *Mitochondrial outer membrane permeability*) – mitochondrijų išorinės membranos pralaidumas

NaCl – natrio chloridas

NGF – (angl. *Nerve growth factor*) – nervų augimo faktorius

NLRP1 / NLRP3 (angl. *Nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing proteins 1/3*) – nukleotidus surišančių domeno tipo receptoriai, pirino domeną turintys baltymai 1/3

NMDA (angl. *N-Methyl-D-aspartate*) – N–metil–D–aspartatas

OKT (angl. *Optical coherence tomography*) – optinė koherentinė tomografija

p38 MAPK (angl. *p38 mitogen-activated protein kinases*) – p38 mitogeno aktyvuotos baltymų kinazės

PCR (angl. *Polymerase chain reaction*) – polimerazės grandininė reakcija

pERG (angl. *Pattern electroretinography*) – šabloninė elektroretinografija

PKC (angl. *Protein kinase C*) – baltymų kinazė C

RBPMS (angl. *RNA-binding protein with multiple splicing*) – RNR surišantis baltymas su daugybiniu susijungimu

RNR (angl. *Ribonucleic acid*) – ribonukleino rūgštis

ROS (angl. *Reactive oxygen species*) – reaktyviosios deguonies rūšys

RPE (angl. *Retinal pigment epithelium*) – tinklainės pigmentinis epitelis

Tfh (angl. *T follicular helper cells*) – T folikulų pagalbinės ląstelės

TLR4 (angl. *toll-like receptor 4*) – toll–like receptorių 4

TNF (angl. *Tumor necrosis factor*) – naviko nekrozės faktorius

VEGF (angl. *Vascular endothelial growth factor*) – kraujagyslių endotelio augimo faktorius

ZO–1 (angl. *Zonula occludens–1*) – tvirtų jungčių baltymas 1

ĮVADAS

Tinklainės išeminė reperfuzija (IR) yra vienas pagrindinių tinklainės sutrikimų, įskaitant su amžiumi susijusios geltonosios dėmės degeneraciją, diabetinę retinopatiją, glaukomą ir tinklainės venų okliuzijas. IR procesą galima išskirti į du etapus – išemiją, kurios metu yra laikinai sutrikdoma tinklainės kraujotaka, ir po jos prasidedantis reperfuzijos laikotarpis, kurio metu atstatomas deguonies bei maistinių medžiagų kiekis. IR pažeidimas gali sukelti tinklainės morfologinius ir fiziologinius pokyčius, įskaitant ganglinių ląstelių mirtį, pakitusią tinklainės kraujotaką ir galiausiai regėjimo praradimą. Be to, įrodyta, kad šio proceso metu yra suaktyvinami ląstelių signaliniai keliai, skatinantys oksidacinį stresą, uždegimą ir apoptozę (Li ir kt., 2022).

Gyvūnų modeliai dažnai naudojami siekiant išsiaiškinti tinklainės išeminės reperfuzijos sukeltus pažeidimus. Tačiau koreliacija tarp struktūrinių ir funkcinių pokyčių, susijusių su pasikeitusia genų ekspresija skirtingose patogenezės stadijose, nėra plačiai aptarta.

Tyrimo tikslas – Indukuoti tinklainės išeminės reperfuzijos modelį žiurkėse ir įvertinti jo sukeltus funkcinius, morfologinius bei genų raiškos pakitimus.

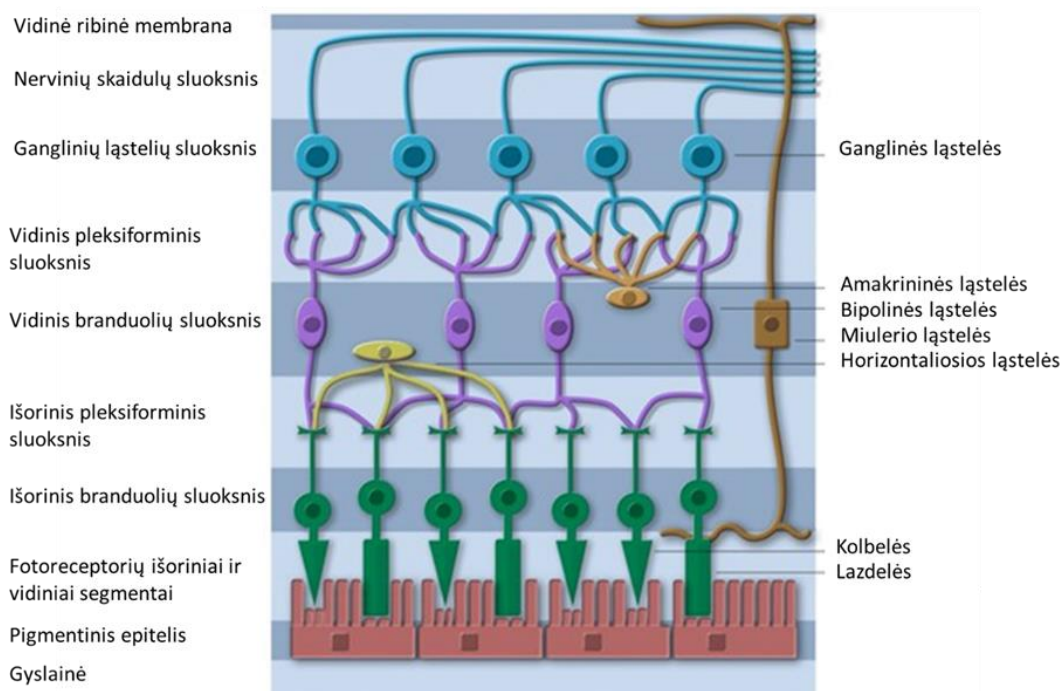
Tikslui įgyvendinti išsikelti uždaviniai:

- Nustatyti tinkamus parametrus sėkmingam tinklainės išeminės reperfuzijos modelio indukavimui žiurkėse;
- Įvertinti tinklainės struktūrinius pokyčius naudojant optinės koherentinės tomografijos vaizdinimo metodą, po indukcijos praėjus 7, 14 ir 21 dienoms;
- Įvertinti tinklainės ląstelių funkcinį atsaką į stimulą naudojant elektroretinografijos metodą, po indukcijos praėjus 7, 14 ir 21 dienoms;
- Įvertinti *casp8*, *bcl6*, *ccl12* ir *gfap* genų ekspresijos pasikeitimus po indukcijos naudojant tikro laiko PGR metodą, po indukcijos praėjus 7, 14 ir 21 dienoms.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

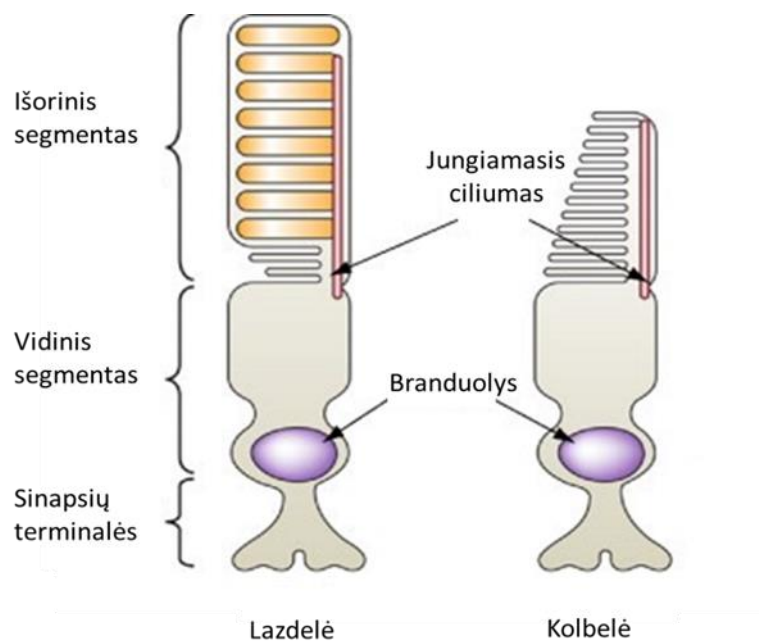
1.1. Tinklainės sandara

Tinklainė yra vidinis akies sluoksnis, atsakingas už pirminių vizualinių vaizdų apdorojimą, kurie vėliau perduodami į smegenis. Tinklainė deguonimi aprūpinama unikalia dviguba kraujo apykaita, kuri padalijama į išorinį ir vidinį sluoksnius, taip sukuriant efektyvesnę deguonies tiekimą. Tinklainę sudaro šešios skirtingos ląstelių klasės: fotoreceptoriai, horizontaliosios, Miulero, bipolinės, amakrininės ir ganglinės ląstelės, kurios yra suskirstytos į dešimt skirtingų sluoksnių, sujungtų sinapsėmis (1.1 pav.)(Mahabadi ir Al, 2022). Pirmas vidinės tinklainės sluoksnis yra vidinė ribojanti membrana, kuri atskiria tinklainę nuo stiklakūnio. Nervų skaidulų sluoksnis yra antrasis vidinis tinklainės sluoksnis, esantis šalia stiklakūnio. Trečiasis yra ganglinių ląstelių sluoksnis, kuriame yra šių ląstelių kūnai. Vidinį pleksiforminį sluoksnį sudaro tankus fibrilių tinklas, susidedantis iš susipynusių ganglinių ląstelių ir vidiniame branduolio sluoksnyje esančių ląstelių dendritų. Vidiniame branduolio sluoksnyje yra randami bipolinių, horizontalių, Miulero ir amakrininių ląstelių kūnai. Išoriniame pleksiforminiame sluoksnyje randamos neuronų sinapsės, o išoriniame branduolių sluoksnyje - kolbelių ir lazdelių kūnai. Išorinė ribinė membrana yra apsauginis barjeras, kurioje yra vidiniai ir išoriniai kolbelių ir lazdelių segmentai. Tinklainę palaiko tinklainės pigmentinis epitelis (RPE), kuris atlieka daugybę funkcijų, įskaitant vitamino A metabolizmą, kraujo ir tinklainės barjero palaikymą, fotoreceptorių išorinių segmentų fagocitozę ir aktyvų medžiagų transportavimą į RPE ir iš jo (Mahabadi ir Al, 2022).



1.1 pav. Tinklainę sudarantys sluoksniai ir nervinių ląstelių tipai (Cerveró ir kt., 2021)

Nustatyta, kad yra dviejų tipų fotoreceptoriai, lazdelės ir kolbelės, taip pat nustatytos trijų tipų horizontaliosios ląstelės. Manoma, kad yra mažiausiai 12 bipolinių ląstelių, 20 – 50 amakrininių ląstelių ir 20 – 30 ganglinių ląstelių tipų (Bertalmío, 2020). Lazdelės ir kolbelės yra šviesai jautrios ląstelės, dalyvaujančios pirmajame regėjimo proceso žingsnyje. Žmogaus tinklainėje iš viso yra 120 milijonų lazdelių ir 6 milijonai kolbelių, esančių išorinėje tinklainės dalyje prie tinklainės pigmentinio epitelio (Nguyen ir kt., 2022). Fotoreceptorių lazdelės yra jautrios šviesai ir aktyvuojamos prieblandoje, o kolbelės atsakingos už spalvų matymą ir regėjimo aštrumą. Egzistuoja trijų tipų kolbelės: S, M ir L, kurių pavadinimai yra siejami su jų funkcijomis, t.y., trumpų, vidutinių ir ilgų bangų ilgių aptikimas. Fotoreceptorių lazdelių ląstelėse yra rodopsino, šviesai jautraus pigmento, leidžiančio absorbuoti fotonus (Nguyen ir kt., 2022). Lazdelių ir kolbelių struktūros ir funkcijos yra suskirstytos į keturis segmentus: išorinis segmentas, jungiamasis ciliumas, vidinis segmentas, ir sinapsių terminalės (1.2 pav.). Išorinis segmentas yra atsakingas už šviesos pavertimą elektrocheminiu signalu fototransdukcija. Jungiamasis ciliumas sujungia išorinį ir vidinį segmentus, taip palengvindamas specifinių baltymų transportavimą. Vidiniame segmente vyksta medžiagų apykaita ir biosintezė, šiame segmente randamas branduolys, mitochondrijos, endoplazminis tinklas, Goldžio kompleksas, lizosomos bei kitos tarpląstelinės organelės (Molday ir Moritz, 2015).



1.2 pav. Fotoreceptorių – kolbelių ir lazdelių morfologija (Bibliowicz ir kt., 2011)

Tinklainės fotoreceptoriai yra atsakingi už informacijos, gautos fotonų pavidalu, pavertimą elektrinius signalus, kurie per sinapses perduodami kitiems tinklainės neuronams. Stuburinių gyvūnų fotoreceptorių fotonų absorbcija vyksta išoriniame segmente, sudarytame iš membraninių diskų, kuriuose yra didelės koncentracijos šviesai jautrių pigmentų ir kitų signalinių baltymų. Suaktyvinus

šviesai jautrų pigmentą rodopsiną lazdelėse arba opsiną kolbelėse, pradedama G baltymų tarpininkaujama fototransdukcijos kaskada, dėl kurios sumažėja cGMP ir užsidaro kalcio jonų kanalai. Dėl susidariusios hiperpolarizacijos sumažėja glutamato išsiskyrimas iš fotoreceptorių sinapsinių galų (Arshavsky ir Burns, 2012).

Signalus nuo fotoreceptorių iki bipolinių ir ganglinių ląstelių modifikuoja horizontaliosios ir amakrininės ląstelės, esančios vidinėje tinklainėje. Horizontaliosios ląstelės skirstomos į tris tipus: H1, H2 ir H3, priklausomai nuo to, ar ląstelė turi aksoną ar ne. Horizontaliosios ląstelės yra interneuronai, gaunantys informaciją iš kolbelių ir lazdelių. Kuomet kolbelės išskiria glutamatą, jis jungiasi prie posinapsinių receptorių, esančių horizontaliųjų ir bipolinių ląstelių dendrituose. Horizontaliosios ląstelės tuomet ekspresuoja jonotropinius AMPA ir kainato tipo glutamato receptorius bei suformuoja sinapses su kolbelėmis. Taip šios ląstelės moduluoja signalo stiprumą keisdamos glutamato išsiskyrimą grįžtamojo ryšio būdu. Dėl to sumažėja bipolinių ląstelių posinapsinių receptorių aktyvumas, taigi ir bendras signalo stiprumas. Manoma, kad horizontaliosios ląstelės ne tik sumažina glutamato išsiskyrimą, bet ir moduluoja bipolines ląsteles per grįžtamąjį ryšį. Pavyzdžiui, jos gali išskirti slopinamąjį neurotransmitorių GABA, kuris gali prisijungti prie bipolinių ląstelių dendritų, todėl bendras šių ląstelių aktyvumas sumažėja. Dėl šių funkcijų horizontaliosios ląstelės vaidina svarbų vaidmenį reguliuojant signalo stiprumą, sumažindamos kolbelių ir bipolinių ląstelių aktyvumą (Chapot ir kt., 2017).

Horizontaliųjų ląstelių moduluotas signalas tuomet yra perduodamas kitoms ląstelėms – bipolinėms. Šių ląstelių pavadinimas kilęs iš jų morfologijos. Bipolinės ląstelės kūnas yra tinklainės vidiniame branduolių sluoksnyje, jos dendritai tęsiasi iki išorinio pleksiforminio sluoksnio, o aksonas – iki vidinio pleksiforminio sluoksnio. Yra išskiriami du pagrindiniai šių neuronų tipai: kolbelių bipolinės ir lazdelių bipolinės ląstelės. Šis skirstymas siejamas pagal tai, su kuriomis fotoreceptorių ląstelėmis yra sudaromas ryšys (Grünert, 2009). Fotoreceptorių išskiriamas neurotransmitorius – glutamatas, sužadina bipolines ląsteles ir tuomet yra generuojamas elektrinis signalas, kuris aksonais keliauja į ganglines ląsteles. Bipolinės ląstelės veikia kaip tarpininkai tarp fotoreceptorių ir ganglinių ląstelių – neuronų, kurie perduoda vaizdinę informaciją iš tinklainės į smegenis (Feher, 2012).

Signalui keliaujant iš bipolinių ląstelių į ganglines, jis yra dar kartą moduluojamas kitų interneuronų – amakrininių ląstelių. Šių ląstelių pavadinimas, kaip manoma, yra kilęs iš to, jog jose nėra aksono. Tačiau atlikti tyrimai rodo, kad kai kurių stuburinių gyvūnų amakrininės ląstelės gali turėti ilgą aksoną panašią ataugą (Kolb, 2005). Šios ląstelės išskiria slopinančius neurotransmitorius, GABA arba gliciną. Skirtingi amakrininių ląstelių tipai specializuojasi perduodant skirtingą informaciją. Pavyzdžiui, plataus spektro amakrininės ląstelės perduoda informaciją iš vidinio

pleksiforminio sluoksnio į išorinį pleksiforminį sluoksnį. Šis procesas vaidina svarbų vaidmenį regėjime, jo dėka galima suvokti skirtingus šviesos atspalvius ir judesius tam tikromis kryptimis. Amakrininių ląstelių išskiriamos signalinės molekulės, leidžia šiems interneuronams pasižymėti ir slopinančiomis, ir sužadinančiomis savybėmis, nepaisant to, kad jos išskiria tik slopinančius neurotransmitterius. Amakrininės ląstelės taip pat gali slopinti bipolinių ląstelių terminales bei taip pat posinapsiškai slopinti ganglinių ląstelių dendritus. Be to, naujausi tyrimai atskleidė, kad amakrininės ląstelės gali atlikti gretimų ląstelių neuromoduliacijos funkciją, kai kurios išskiria neuromediatorių – dopaminą (Mahabadi ir Al, 2022).

1.1.1. Tinklainės ganglinės ląstelės

Tai yra vieninteliai neuronai, turintys aksonus, kurie tęsiasi už akies ribų. Terminas „ganglinė ląstelė“ kilęs iš jos anatomijos, kadangi šie neuronai sudaro „*ganglion nervi optici*“ arba jų somų klasterius. Iki šiol ištirtose žinduolių tinklainėse yra daugiau nei 12 skirtingų tipų ganglinių ląstelių. Kadangi šie neuronai gauna signalus iš įvairių bipolinių ir amakrininių ląstelių tipų, turi skirtingus dendritų dydžius bei išsišakojimus, jų funkcinės savybės skiriasi. Kiekvienas tipas yra pritaikytas taip, kad būtų perduodama tam tikra vaizdinė informacija, pvz.: ryškumas, spalva ar judesys. Naujausi tyrimai atskleidė, kad žinduoliai turi maždaug 15 – 20 skirtingų ganglinių ląstelių tipų, tačiau vis dar nėra nusistovėjusios klasifikacijos. Priklausomai nuo naudojamų klasifikavimo kriterijų, skirtingi mokslininkai skirtingai apibūdina tos pačios rūšies gyvūno tinklainės ganglines ląsteles (Peichl, 2009). Mažosios, skėčio formos ir mažos bistratifikautos yra trys pagrindiniai ganglinių ląstelių tipai, bendrai sudarantys apie 70 % visų ganglinių ląstelių. Kiti šių ląstelių tipai yra labai įvairūs, tačiau visi jie bendrai vadinami plataus lauko ląstelėmis, nes turi didelius dendritų išsišakojimus (Marshak, 2009). Dauguma tinklainės ganglinių ląstelių yra šalia vidinės ribojančios membranos, esančios šalia stiklakūnio, kur jų somos ir aksonai suformuoja sluoksnį. Centriniam tinklainės regione yra iki aštuonių ganglinių ląstelių sluoksnių. Ganglinių ląstelių funkcinės savybės priklauso nuo signalo, gaunamo iš bipolinių ir amakrininių ląstelių, rūšies (sužadinamasis arba slopinamasis. Dvi ganglinės ląstelės, turinčios vienodą morfologiją, gali turėti skirtingas funkcinės savybes dėl skirtingo signalo gavimo.

Mažosios tinklainės ganglinės ląstelės yra labiausiai paplitęs šių neuronų tipas. Šios ląstelės turi mažus kūnus su kompaktiškai išdėstytais dendritų laukais, kurių skersmuo svyruoja nuo 5 – 10 μm centrinėje tinklainėje ir iki 225 μm periferinėje tinklainės dalyje. Išskiriami du mažųjų ganglinių ląstelių potipiai: išorinės išjungtos mažosios ląstelės, turinčios mažesnius dendritinius laukus bei vidinės įjungtos mažosios ląstelės (Kim ir kt., 2021). Mažosios ganglinės ląstelės dėl sinapsių sužadavimo gauna signalą iš bipolinių ląstelių. Šios savo ruožtu signalą gauna iš vienos, ilgam bangos

ilgiui arba vidutiniam bangos ilgiui jautrios, kolbelės.. Mažųjų ganglinių ląstelių dendritinio lauko dydis priklauso nuo ganglinių ląstelių lokacijos tinklainėje – periferijoje mažesnis nei arčiau regos nervo. Todėl, periferinės ganglinės ląstelės gauna signalus iš kelių bipolinių ląstelių (Marshak, 2009). Naujausi tyrimai rodo, kad kai kurios išjungtosios mažosios ląstelės gauna signalus ir iš trumpiems bangos ilgiams jautrių kolbelių (Kim ir kt., 2021).

Kitas vienas ganglinių ląstelių tipų – skėčio formos ląstelės. Jos sudaro maždaug 5 % visų ganglinių ląstelių centrinėje tinklainėje ir 15 % periferinėje dalyje. Šio tipo ląstelių dendritai yra išsišakoję arčiau vidinio pleksiforminio sluoksnio centro. Vienas labiausiai išskiriamų skirtumų tarp skėčio formos ir mažųjų ląstelių yra didelis jų dendritų persidengimas su gretimomis to paties tipo ląstelėmis. Tai turi įtakos kelių ląstelių suaktyvinimui tuo pačiu metu esant net mažam stimuliui. Skėčio formos ganglinės ląstelės vaidina svarbų vaidmenį įvairiuose regėjimo aspektuose, ypač judesio suvokime. Jos pasižymi didesniu jautrumu šviesos kontrastams, palyginus su mažosiomis ganglinėmis ląstelėmis. Šios ląstelės pasižymi dideliais dendritiniais laukais, kurie leidžia priimti daugiau signalų iš lazdelių, kas lemia didelį jautrumą šviesai (Marshak, 2009).

Mažos bistratifikuotos tinklainės ganglinės ląstelės sudaro maždaug 5 – 8 % visų ganglinių ląstelių. Šie neuronai turi mažus ląstelių kūnus ir dendritinius laukus, besitęsiančius į du skirtingus vidinio pleksiforminio sluoksnio sluoksnius, kuriuose sudaro neuronų sinapsines jungtis (Kim ir kt., 2021). Šios ląstelės vaidina svarbų vaidmenį tam tikruose vizualinio apdorojimo aspektuose. Dendritinių laukų pasiskirstymas skirtinguose sluoksniuose šiems neuronams leidžia gauti signalus iš skirtingų tipų bipolinių ląstelių, kurios specializuojasi perduodant skirtingus chromatinius signalus. Mažos bistratifikuotos ląstelės apdoroja chromatinę informaciją ir prisideda prie spalvų kontrasto suvokimo (Peichl, 2009). Šios ląstelės yra sužadinamos trumpiems bangų ilgiams jautrių kolbelių ir slopinamos vidutiniams bei ilgiems bangų ilgiams jautrių kolbelių. Tai lemia signalo, kuris yra perduodamas į smegenis ir suvokiamas kaip mėlyna ir geltona spalvos, generavimą (Field ir kt., 2007).

1.1.2. Ganglinių ląstelių apoptozę incijuojantys faktoriai

Tinklainės neurodegeneracija atsiranda dėl ganglinių ląstelių užprogramuotos mirties, žinomos kaip apoptozė. Mirus šioms ląstelėms, išilgai aksono vyksta degeneraciniai pokyčiai, dėl kurių plonėja tinklainės nervinių skaidulų sluoksnis. Manoma, kad prie ganglinių ląstelių mirties prisideda keli veiksniai, tokie kaip padidėjęs akispūdis, glutamato eksitoksiškumas, laisvųjų radikalų sukeltas oksidacinis stresas, neurotrofinių faktorių nebuvimas, glijos ląstelių aktyvacija bei išemija (Mowatt ir Intosh, 2013). Ganglinių ląstelių mirtis arba disfunkcija sukelia negrįžtamą aklumą. Sutrikusios funkcijos ganglines ląstelės praranda gebėjimą regeneruoti savo aksonus, panašiai kaip

dauguma centrinės nervų sistemos neuronų (Yuan ir kt., 2021). Atlikti tyrimai su gyvūnų modeliais atskleidė, jog ganglinių ląstelių apoptozės greitis priklauso nuo pažeidimo atstumo – kuo arčiau ląstelės somos sužalojimas, tuo greitesnė degeneracija (Sánchez – Migallón ir kt., 2016).

Padidėjęs akispūdis (IOP) yra vienas pagrindinių veiksnių, galinčių sukelti tinklainės ganglinėms ląstelėms mechaninį stresą, dėl kurio inicijuojama apoptozė. Aukštas IOP sukelia ląstelių deformaciją, aksonai suspaudžiami, sutrinka aksoplazminis srautas ir suaktyvėja mechaniškai jautrūs jonų kanalai. Akispūžiui padidėjus virš sistolinio arterinio kraujospūdžio gali sukelti išemiją ir hipoksiją, skatinančią oksidacinį stresą ir uždegimą. Mechaninis stresas ir išemija padidina reaktyviųjų deguonies rūšių (ROS) gamybą ir suaktyvina uždegiminius signalizavimo kelius, dėl kurių suaktyvėja apoptoziniai keliai. Apoptozinio kelio aktyvinimas apima citochromo c išsiskyrimą iš mitochondrijų, dėl kurio suaktyvėja kaspazės, tuomet DNR yra suskaidoma. Kas lemia ganglinių ląstelių apoptozę. Be to, padidėjęs akispūdis taip pat sumažina neurotrofinių faktorių pernešimą į ląsteles, sukeldamas jų disfunkciją ir apoptozę (Yao ir kt., 2023).

Glutamato eksitotoksiškumas yra patologinis procesas, kuomet per didelis glutamato receptorių, ypač N – metil – D – aspartato (NMDA) receptorių aktyvumas, sukelia neuronų pažeidimus ir mirtį. Per didelis šių receptorių stimuliavimas gali sukelti eksitotoksiškumą, nes didelis kalcio jonų kiekis patenka į neuronus. Fosfolipazės, endonukleazės ir proteazės yra vieni iš fermentų, kuriuos aktyvuoja didelis šių jonų antplūdis ir kurie gali pakenkti ląstelių komponentams, tokiems kaip citoskeletas, ląstelės membrana ir DNR. Be to, didelis kalcio jonų kiekis gali sukelti apoptozę dėl cAMP atsako į elementą, surišančio baltymo inhibiciją. Tinklainėje ganglinės ląstelės ekspresuoja NMDA receptorių, todėl manoma, kad jų eksitoksiškumas yra šių neuronų apoptozės iniciatorius esant įvairioms akių ligoms (Christensen ir kt., 2019).

Kadangi tinklainės ganglinės ląstelės turi didelį energijos poreikį, būtina veiksminga adenosino trifosfato sintezė (ATP). Šių neuronų aksonai yra nemielinizuoti, todėl tai prisideda prie didelio ATP suvartojimo. ROS, kuris susidaro ATP sintezės metu, yra gaminamos mitochondrijose, elektronų transportavimo grandinėje. Įprastomis sąlygomis mitochondrijų baltymai ir kitos molekulės ar fermentai gali kontroliuoti ROS. Tačiau, kai pažeidžiama elektronų transportavimo grandinė arba mitochondrijų funkcija, gali būti sutrikdyta pusiausvyra tarp ROS susidarymo ir pašalinimo. Kai ši pusiausvyra sutrikdoma, gali atsirasti oksidacinis stresas, kuris pažeidžia branduolių arba mitochondrijų chromosomas, sutrikdo ląstelių funkciją ir galiausiai sukelia apoptozę (Kang ir kt., 2021).

Neurotrofiniai faktoriai yra svarbūs neuronų augimo ir išgyvenimo reguliatoriai bei vaidina svarbų vaidmenį endogeninėje tinklainės ganglinių ląstelių neuroprotekcijoje. Atlikti tyrimai su

gyvūnų modeliais atskleidė, kad neurotrofiniai veiksniai, įskaitant nervų augimo, smegenų, glijos, ciliarinį bei neurotrofiną – 3 ir neurotrofiną – 4/5, gali apsaugoti tinklainės ganglines ląsteles esant regos nervo pažeidimui. Dėl savo funkcijos, palaikant neuronų homeostazę, neurotrofiniai faktoriai buvo pasiūlyti kaip galimas įvairių neurodegeneracinių sutrikimų gydymo būdas. Neurotrofinai gali prisijungti prie kelių receptorių, taip pakeisdami skirtingus tarpląstelinius signalus. Pavyzdžiui, neurotrofinų ir p75 neurotrofino receptoriaus sąveika gali inicijuoti apoptozę, o neurotrofinų prisijungimas prie tirozino receptorių kinazės gali padidinti ląstelių išgyvenamumą (Pietrucha – Dutczak ir kt., 2018).

Glijos ląstelių aktyvacija gali atsirasti dėl daugelio nervų sistemos, įskaitant tinklainę, pažeidimų. Vidinėje tinklainėje yra trijų skirtingų tipų glijos ląstelės: astrocitai, Miulerio ląstelės ir mikroglijos. Jos aprūpina ganglines ląsteles maistinėmis medžiagomis, palaiko tarpląstelinių jonų bei neurotransmiterių pusiausvyrą ir veikia kaip fagocitinės ląstelės esant tinklainės pažeidimams. Nepaisant to, glijos ląstelių aktyvacija gali sukelti ganglinių ląstelių apoptozę, uždegimą ir neurodegeneraciją. Vienas iš priežasčių kodėl tai gali įvykti, yra priešūždegiminių citokinų ir ROS išskyrimas iš aktyvuotų glijos ląstelių. Interleukinas – 1 β (IL – 1 β) ir naviko nekrozės faktorius – alfa (TNF – α), priešūždegiminiai citokinai gali suaktyvinti įvairius signalinius kelius, kurie gali sukelti apoptozę. Pavyzdžiui, TNF – α gali suaktyvinti kaspazės kaskadą, dėl kurios miršta tinklainės ganglinės ląstelės. IL – 1 β taip pat gali sukelti apoptozę aktyvuodamas briruolinio faktoriaus kappa B (NF – kB) kelią (Qu ir kt., 2010; Rivera ir kt., 2013).

Dar vienas faktorius, inicijuojantis tinklainės ganglinių ląstelių apoptozę, yra išemija. Šio proceso metu sutrikdoma kraujotaka tinklainėje, todėl trūksta maistinių medžiagų ir deguonies, būtinų ląstelių funkcijoms palaikyti. Šis gyvybiškai svarbių išteklių trūkumas sukelia ląstelių energijos apykaitos sutrikimus ir laisvųjų radikalų kaupimąsi. Sveikoje ir nepažeistoje tinklainėje metabolinių procesų metu yra gaminami laisvieji radikalai, kurie vėliau yra neutralizuojami antioksidacinių fermentų bei kitų cheminių medžiagų. Išemijos pažeidimo atveju, susidarančių laisvųjų radikalų kiekis yra per didelis, kad antioksidantai galėtų tinkamai juos pašalinti. Dėl to išsivysto oksidacinis stresas, pažeidžiantis ląstelių komponentus, įskaitant lipidus, baltymus ir DNR. (Qu ir kt., 2010). Oksidacinis stresas, kurį sukelia ROS kaupimasis, gali suaktyvinti pro – apoptotinius kelius, įskaitant kaspazės kaskadą ir p38 mitogeno aktyvuotos baltymų kinazės (MAPK) kelią. Kaspazės kaskadą inicijuoja kaspazė – 9, kuri vėliau suaktyvina kitas kaspazes, tokias kaip kaspazė – 3, taip sukeldama apoptozę. Be to, išemija suaktyvina p38 MAPK kelią, kuris gali fosforilinti daugybę baltymų, įskaitant transkripcijos faktorius ir citoskeleto baltymus, o tai galiausiai sukelia tinklainės ganglinių ląstelių mirtį (Abu – El – Asrar ir kt., 2004).

1.2. Tinklainės kraujotakos sistema

Tinklainė pasižymi ypač dideliu medžiagų apykaitos greičiu, todėl siekiant užtikrinti tinkamą funkcionavimą, reikia nuolatinio deguonies ir maistinių medžiagų tiekimo. Tinklainė yra aprūpinama dviejų kraujotakos sistemų, taip patenkinant didelius medžiagų apykaitos poreikius. Didžiąją dalį vidinės tinklainės aprūpina tinklainės cirkuliacija, o fotoreceptorius ir tinklainės pigmentinį epitelį maitina gyslainė. Kadangi tinklainės kraujotakos sistemai trūksta autonominio nervų tiekimo, ji kontroliuojama vietiskai. Pagrindinis slėgio autoregulavimas yra arteriolės diametro pasikeitimas, taip išlaikant pastovią kraujotaką ir nepaisant arterinio kraujospūdžio pokyčių. Spaudimo autoreguliacija tinklainėje vyksta kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelių pagalba. Spaudimo autoreguliacija tinklainėje vyksta kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelių pagalba. Jos sugeba susitraukti, kai padidėja arterinis slėgis.

Vaskulogenezė ir angiogenezė – du skirtingi biologiniai procesai, kurių metu formuojamos tinklainės kraujagyslės. Vaskulogenezė yra procesas, kurio metu angioblastai ir kraujagyslių mezenchiminės ląstelės išsivysto į naujas kraujagysles. Angiogenezė yra kraujagyslių tinklo augimas iš jau esančių kraujagyslių naudojant endotelio ląsteles. Centrinė tinklainės arterija, patenkanti į optinį diską, yra tinklainės kraujagyslių šaltinis. Keturios tinklainės arterijos, kurių kiekviena aprūpina skirtingą tinklainės dalį, atsišakoja nuo centrinės tinklainės arterijos. Visas kraujas iš tinklainės arterijų ir arterolių praeina per kapiliarus, kol pasiekia venules ir venas. Arterijos tinklainėje yra suskirstytos į tris skirtingas grupes, dar žinomos kaip kaip kraujagyslių rezginiai. Pirmasis iš šių rezginių yra viršutiniame tinklainės sluoksnyje, kurį sudaro ganglinės ląstelės ir nervinių skaidulų sluoksniai. Antrasis rezginys randamas vidiniame branduolio sluoksnyje, o trečiasis yra išorinio rezginio ir vidinio branduolio sluoksnių sankirtoje. Paviršinis kraujagyslių rezginys yra apsuptas makrogljų sluoksniu ir susideda iš įvairių kraujagyslių, įskaitant venas, arterijas, kapiliarus ir pokapiliarines venules. Tuo tarpu tarpinius ir giluminius kraujagyslių rezginius daugiausia sudaro kapiliarai ir dengia Miulerio ląstelės. Geltonojoje dėmėje, tinklainės srityje, kurioje yra didžiausia fotoreceptorijų ląstelių koncentracija ir kuri yra labai svarbi centriniam regėjimui, yra tankiausias kraujagyslių tinklas (Barabas ir kt., 2020).

Kaip minėta anksčiau, tiek tinklainės, tiek gyslainės kraujotaka aprūpina tinklainę jai reikalingomis maistinėmis medžiagomis. Šių dviejų kraujotakų sąveika yra labai svarbi siekiant išsaugoti sveiką regos nervą. Tinklainės kraujotakos morfologija ir fiziologija yra panaši į esančią smegenyse, nors tinklainės kraujotakoje nėra autonominės inervacijos. Kraujo ir tinklainės barjerus sudaro sandarios endotelio jungtys. Atliktų tyrimų rezultatai atskleidė, kad kraujotakos autoreguliacija yra efektyvesnė gyslainėje nei tinklainėje (Luo ir kt., 2015). Pavyzdžiui, padidėjęs

akispūdis gali turėti įtakos tinklainės kraujotakos sistemai. Laikinas kraujo tiekimo sustabdymas, kuris dažnai pastebimas esant padidėjusiam intraokuliariniam spaudimui, atsirandana dėl sumažėjusio perfuzijos slėgio. Remiantis atliktai tyrimais, padidėjus akispūdžiui gali sumažėti tinklainės kraujotakos greitis. Padidėjusio intraokuliarinio spaudimo trukmė ir intensyvumas lemia, kaip stipriai yra sutrikdoma tinklainės kraujotaka. Be to, kraujo tiekimas gali sumažėti tose tinklainės srityse, kurios yra labiau pažeidžiamos dėl didelio akispūdžio, pvz., geltonojoje dėmėje ir regos nervo diske (Zhi ir kt., 2012).

1.3. Tinklainės išeminės reperfuzijos etiologija ir patogenezė

1.3.1. Veiksniai, lemiantys laikiną kraujotakos sustabdymą

Tinklainės išeminė reperfuzija (IR) yra patologinis procesas, atsirandantis dėl kraujotakos sutrikdymo, o vėliau jos atstatymo. Daugelis akių ligų, įskaitant glaukomą, diabetinę retinopatiją, su amžiumi susijusios geltonosios dėmės degeneraciją ir tinklainės kraujagyslių okliuzijas, yra susijusios su IR pažeidimu. Šios ligos yra pagrindinės aklumo priežastys pasaulyje (Renner ir kt., 2017).

Glaukoma yra pagrindinė negrįžtamo aklumo priežastis visame pasaulyje, kuria serga daugiau nei 70 milijonų žmonių. Glaukoma yra siejama su padidėjusiu akispūdžiu, kuris atsiranda dėl vandeninio humoralinio skysčio, užpildančio akies priekinę dalį, sutrikusios gamybos ir nutekėjimo. Krumplyne gaminamas vandeninis humoralinis skystis, patenka į priekinę akies kamerą, o paskui nuteka dviem keliais – trabekuliniu tinklu ir uveoskleraliniu. Esant atviro kampo glaukomi, dažniausiai šios ligos formai, sutrinka vandeninio humoralinio skysčio nutekėjimas per trabekulinį tinklą. Esant uždarojo kampo glaukomi, rečiau paplitusia forma, lęšiukas prisispaudžia prie rainelės ir vyzdžio, todėl sutrinka skysčio nutekėjimas per uveoskleralinį tinklą (Weinreb ir kt., 2014). Padidėjęs intraokuliarinis spaudimas suspaudžia tinklainės kraujagysles, dėl to sutrikdoma kraujotaka. Po išemijos atsirandanti reperfuzija sukelia padidėjusį oksidacinį stresą dėl deguonies antplūdžio, todėl susidaro didesnė reaktyviųjų deguonies rūšių koncentracija, sukelianti laisvųjų radikalų susidarymą. Šie laisvieji radikalai pažeidžia ląstelių struktūras ir baltymus (Renner ir kt., 2017).

Diabetinė retinopatija (DR) yra cukrinio diabeto komplikacija, kuri yra viena iš regėjimo sutrikimų bei aklumo priežasčių. DR atveju yra žinoma, kad hiperglikemija prisideda prie tinklainės mikrovaskulinių pažeidimų. Šiame procese dalyvauja įvairūs metabolizmo keliai, įskaitant poliolio kelią, pažangių glikacijos galutinių produktų (AGE) kaupimąsi, baltymų kinazės C (PKC) kelią ir heksozamino kelią. Šiuos kelius suaktyvina lėtinė hiperglikemija, o tai sukelia ląstelių disfunkciją

(Wang ir Lo, 2018). Poliolio kelyje gliukozės perteklius paverčiamas sorbitoliu, kuris kaupiasi ir sukelia osmosinį stresą, dėl kurio pažeidžiamos endotelio ląstelės ir pakinta kraujagyslių pralaidumas. AGE kelyje gliukozė reaguoja su baltymais ir lipidais gamindama labai reaktyvius AGE, kurie sukelia endotelio ląstelių pažeidimą ir uždegimą. PKC kelią suaktyvina gliukozės perteklius ir dėl to padidėja augimo faktorių, citokinų ir ekstraląstelinės matricos baltymų ekspresija, prisidedanti prie kraujagyslių disfunkcijos ir tinklainės neovaskuliarizacijos. Heksozamino kelią aktyvuoja lėtinė hiperglikemija ir dėl to ant tarpląstelinų baltymų kaupiasi O – susietas – N – acetilgliukozaminas (O – GlcNAc), o tai lemia pakitusią ląstelių signalizaciją ir genų ekspresiją (Kang ir kt., 2022). Šių kelių suaktyvinimas gali sutrikdyti tinklainės kraujotaką ir sukelti išemiją, o tai sukelia reperfuzijos pažeidimą ir reaktyviųjų deguonies rūšių susidarymą, dėl kurio atsiranda oksidacinis stresas ir uždegimas. Todėl hiperglikemijos sukeltas kraujagyslių pažeidimas vaidina lemiamą vaidmenį inicijuojant tinklainės išeminę reperfuziją, sergant diabetine retinopatija (Wang ir Lo, 2018).

Manoma, kad po diabetinės retinopatijos, tinklainės venų okliuzija yra antra dažniausia regėjimo praradimo priežastis dėl kraujagyslių pažeidimų. Tai pavojingas sutrikimas, kuris dėl tinklainės venų užsikimšimo gali sukelti negrįžtamą aklumą. Priklausomai nuo lokacijos, išskiriamos dvi kategorijos: centrinės tinklainės venos okliuzijos ir tinklainės venų šakų okliuzijos. Centrinės tinklainės venos trombozė dažniausiai įvyksta ties *lamina cribrosa* arba už jos. Vienos ar daugiau tinklainės venų šakų užsikimšimas dažniausiai pastebimas arterijų ir venų susikirtimo vietoje. Atsižvelgiant į tinklainės kapiliarų sritis, kuriose kraujagyslių funkcijos yra sutrikusios, kiekvienas iš šių tipų dar suskirstomas į išeminius ir neišeminius potipius (Khayat ir kt., 2018). Išeminei centrinei tinklainės venos okliuzijai būdinga greita venų obstrukcija, kuri siejama su tinklainės perfuzija, kapiliarų užsidarymu ir tinklainės hipoksija. Tai dažnai sukelia skysčių ar kraujo nutekėjimą iš kraujagyslių į akį, neovaskuliarizaciją ir padidėjusį akispūdį (Boyd ir kt., 2002). Kraujo krešulio susidarymas tinklainės venoje padidina intraluminalinį slėgį. Pagal Starlingo dėsnį, jei slėgis yra pakankamai aukštas, kraujo komponentai gali patekti į tinklainę padidindami intersticinio skysčio ir baltymų kiekį. Nuolatinė audinių edema, kurią sukelia padidėjęs intersticinis onkotinis slėgis, trukdo kapiliarų perfuzijai ir sukelia išemiją. Staigi išemija, kuri dažniau pasitaiko esant centrinei tinklainės venų okliuzijai, gali sukelti per didelę kraujagyslių endotelio augimo faktorių gamybą (Karia, 2010). Nors nervinis audinys gali išverti staigų deguonies ir (arba) maistinių medžiagų trūkumą tam tikrą laikotarpį, kol ląstelės nepatiria negrįžtamo pažeidimo, tačiau įvairūs audinių ląstelių tipai gali turėti skirtingą jautrumą išeminei anoksijai, pavyzdžiui, tinklainės ganglinės ląstelės (McLeod ir Beatty, 2015). Net jei po reperfuzijos padidėja deguonies lygis, priešuždegiminiai neutrofilai patenka į išeminius audinius, atsiranda reaktyviųjų deguonies rūšių gamybos šuolis ir taip padidinama pažeidimo sukelta žala (Kalogeris ir kt., 2012).

Lėtinė, degeneracinė centrinės tinklainės būklė, žinoma kaip su amžiumi susijusi geltonosios dėmės degeneracija (GDD), yra dar viena iš pagrindinių regėjimo praradimo priežasčių pasaulyje. Sausoji arba atrofinė ir šlapioji / neovaskulinė yra du pagrindiniai tipai, į kuriuos skirstoma GDD. Sausos atrofines GDD stadija, dar žinoma kaip geografinė atrofija, apima RPE ir tinklainės degeneraciją. Šlapiajai arba neovaskulinei GDD formai būdingas kraujagyslių augimas iš gyslainės, praskverbiančios pro *Bruch'o* membraną geltonojoje dėmėje (Hadziahmetovic ir Malek, 2020). GDD patofiziologija apima nenormalų kraujagyslių vystymąsi ir geltonosios dėmės degeneraciją, kurią sukelia drūzų kaupimasis. *Bruch'o* membranos sustorėjimas, drūzų kaupimasis, tinklainės ar RPE atsiskyrimas padidina atstumą tarp gyslainės kapiliarų ir tinklainės bei sumažina deguonies srautą iš gyslainės į išorinę tinklainę. Tinklainės hipoksija gali atsirasti dėl tinklainės atsiskyrimo ir gyslainės išemijos, todėl sumažėja deguonies pernešimas į išorinę tinklainę (Stefánsson ir kt., 2011). Hipoksiją indukuojantys faktoriai (HIF) skatina kraujagyslių endotelio augimo faktoriaus sintezę esant žemam deguonies kiekiui. Hipoksija užkerta kelią hidroksiliniui, dėl kurio kaupiasi HIF. Atlikti tyrimai parodė, kad HIF yra susijęs su GDD gyslainės neovaskuliarizacija. Deguonimi prisotinti laisvieji radikalai ir HIF yra komponentai, skatinantys angiogenezę. Tinklainė pasižymi dideliu medžiagų apykaitos greičiu, todėl padidėja jos pažeidžiamumas oksidaciniam stresui, kuriam būdingas disbalansas tarp deguonimi prisotintų laisvųjų radikalų susidarymo ir jų pašalinimo. Oksidacinį stresą dar labiau sustiprina protarpinė hipoksija, pvz., dėl išemijos/reperfuzijos (Desmettre, 2018).

1.3.2. Laikino kraujotakos sutrikdymo sukeltos patologijos

Išeminės reperfuzijos pažeidimas yra patofiziologinis procesas, turintis tiek vietinių, tiek sisteminių pasekmių. Šiam procesui įtakos turi ląstelių energijos išsekvojimas išemijos metu, oksidacinio bei mikrocirkuliacinio streso sąveika su uždegimu ir apoptozė po reperfuzijos. Energijos trūkumas, kalcio antplūdis, po kurio seka depoliarizacija, ir oksidacinis stresas sudaro išeminę kaskadą. Reperfuzijos metu susidaro ROS, kurios sunaikina biomolekules ir sukelia uždegimines reakcijas. Reperfuzijos pažeidimas inicijuoja CD4 + T limfocitų, cirkuliuojančių trombocitų ir neutrofilų pritraukimą į kraujagysles per chemotaksį ir endotelio adheziją, todėl susidaro ROS, TNF – α ir vietiniai uždegimo mediatoriai, kurie padidina audinių pažeidimus dėl neutrofilų stimuliacijos. Be to, endotelino – 1 ir azoto oksido gamybos disbalansas sumažina azoto oksido lygį ir sukelia vazokonstrikciją. Dėl to kartu su padidėjusia adhezijos molekulių ekspresija trombocitai ir neutrofilai lengviau patenka į kraujagysles. Reaktyviosios deguonies rūšys susidaro metabolizmo, energijos gamybos ir ląstelių atsako į infekciją, uždegimą ar hipoksiją metu. Mitochondrijos yra pagrindinis ROS susidarymo šaltinis oksidacinio fosforilavimo metu, o I ir III kompleksai pasižymi didžiausiu

aktyvumu. ROS kaupimasis sukelia oksidacinį stresą, kuris gali tiesiogiai pažeisti DNR, baltymus ir lipidų molekules, ir sukelti apoptozę arba genetines mutacijas. Tinklainės ląstelių aktyvumas yra glaudžiai susijęs su ROS homeostaze ir oksidaciniu stresu. Pažeidus regos nervą, tinklainėje padidėja cinko ir azoto oksido kiekis, kuris, kaip žinoma, yra tiesiogiai susijęs su oksidaciniu stresu. Dėl didelio energijos poreikio mitochondrijos yra labai aktyvios, ypač tinklainėje esančių nemielinizuotų ganglinių ląstelių aksonuose (Soares ir kt., 2019; Kang ir kt., 2021).

Tinklainės ganglinių ląstelių mirtis gali įvykti dėl dviejų pagrindinių mechanizmų: apoptozės ir nekrozės. Nekrozę paprastai sukelia staigūs procesai, tokie kaip išemija ar eksitotoksiškumas, dėl kurių ląstelės negauna energijos, reikalingos pagrindiniam ląstelių metabolizmui palaikyti, arba sutrikdomas ląstelių metabolizmas, tokiu būdu sutrikdomi procesai, reikalingi normaliam membranos pralaidumui ir vientisumui palaikyti. Tai sukelia ląstelių ir mitochondrijų ištinimą, ankstyvą membranų prasiskverbimą, difuzinę branduolio chromatiną kondensaciją ir gebėjimo izoliuoti tarpląstelinius komponentus iš tarpląstelinės aplinkos praradimą. Mirimo proceso metu ląstelės išskiria jonus, baltymus ir neurotransmiterius, kurie gali sukelti kaimyninių ląstelių mirtį. Nekrozės plitimas į ląsteles, kurios iš pradžių nebuvo pažeistos, sukeliančios apoptozę, gali sukelti antrinę žalą. Platus fagocitų pašalinimas, proceso pabaigoje, taip pat išskiria papildomus priešūždegiminius mediatorius ir laisvuosius radikalus. Tinklainės ląstelių mirtis, ypač dėl išemijos sukeltos nekrozės ir dėl to ištekėjusio ląstelių turinio, gali sukelti antrinę ląstelių mirtį, kurią sukelia eksitotoksiškumas. Eksitotoksiškumas atsiranda, kai glutamatas ar kiti kanalai, ypač N – metil – D – aspartatui jautrūs glutamato kanalai, yra per aktyvūs, todėl padidėja intraceliulinis kalcio kiekis ir suaktyvėja proapoptotiniai signalizacijos keliai (Faiq ir kt., 2013).

Kraujagyslių ir tinklainės barjero vaidmuo yra labai svarbus siekiant išsaugoti tinklainės mikroaplinkos homeostatinį reguliavimą. Tačiau šis barjeras gali būti pažeistas tinklainės išemijos, kuri gali atsirasti esant įvairioms akių ligoms, įskaitant tinklainės kraujagyslių (arterijų ir venų) okliuziją, ūminę glaukomą, diabetinę retinopatiją ir su amžiumi susijusios geltonosios dėmės degeneraciją. Kraujagyslių ir tinklainės barjero sutrikimas siejamas su padidėjusi kraujagyslių pralaidumu, dėl kurio sukeliamas vazogeninis edema bei pažeidžiami audiniai (Tong ir kt., 2013). Hipoksija – išemija sukelia reaktyviųjų deguonies rūšių susidarymą ir oksidacinį stresą, ir taip gali pakenkti tiek vidinių, tiek išorinių kraujagyslių ir tinklainės barjero komponentų vientisumui paveikdamas sandarių jungčių baltymus, tokius kaip okludinas ir ZO – 1. Vandenių peroksidų, gaminamų fagocitozės būdu, gali pažeisti sandarių jungčių baltymus ir sukelti kadherino internalizaciją, dėl ko pažeidžiamas barjero vientisumas. Be to, ROS gali padidinti kraujagyslių pralaidumą, padidindamas VEGF ekspresiją endotelio ląstelėse. ROS sukelti endotelio aktino citoskeleto pokyčiai taip pat gali pakenkti kraujagyslių ir tinklainės barjerui, sumažindami ZO – 1

lygi. p38 mitogenu aktyvuotos baltymų kinazės oksidacinio streso metu siejamos su ląstelių jungčių baltymų perskirstymu, dėl kurio atsiranda barjero sutrikimai. Tiek ROS, tiek tiesioginės hipoksijos sukeltas VEGF padidėjimas gali prisidėti prie padidėjusio kraujagyslių pralaidumo ir galiausiai pažeisti kraujagyslių ir tinklainės barjerą (Kaur ir kt., 2008).

1.4. Apoptotiniai ir anti – apoptotiniai genai

1.4.1. Kaspazė – 8

Kaspazės yra proteazių grupė, turinčios cisteino ir aspartato aminorūgščių liekanų. Jos atlieka svarbų vaidmenį keliuose procesuose, tokiuose kaip nereikalingų ar nenaudojamų neuronų jungčių pašalinime vystymosi metu, tinklainės ganglinių ląstelių apoptozės inicijavime bei skatina jų aksonų regeneraciją. Kaspazės gali būti suskirstytos į du pagrindinius filogenetinius pošeimius: į interleukiną– 1β arba į žinduolių CED – 3 kaspazes. Nors kaspazės daugiausia žinomos dėl savo vaidmens apoptozinėje kaskadoje, jos taip pat turi kitų, neapoptotinių funkcijų. Kaspazės gali būti aktyvuojamos keliais būdais, įskaitant artumo sukeltą dimerizaciją per grįžtamojo ryšio kilpas ir pro – enzimų skilimą baltymų kompleksuose. Kaspazės inicijuoja ir vykdo apoptozę per dvi kaspazių grupes: iniciatorines kaspazes (kaspazės – 2, – 8, – 9 ir – 10), kurios aktyvuoja vykdomąsias kaspazes (kaspazę – 3, – 6 ir – 7), katalitiškai skaidydamos jų aktyvavimo sritį. Suaktyvintos vykdomosios kaspazės hidrolizuoja arba skaido baltymus, sukeldamos ląstelių apoptozę. Kaspazių aktyvavimas išskiriamas į vidinį ir išorinį apoptotinį kelią. Išorinis kelias apima naviko nekrozės faktoriaus receptorių aktyvavimą, kuris aktyvuoja adapterinius baltymus ir pro – kaspazę – 8, ir taip inicijuojamas mirtį sukeliančio signalizacijos komplekso susidarymas. Tuomet kaspazė – 8 suskaido ir suaktyvina vykdomąsias kaspazes. Be to, fermentas kaspazė – 8, gali suskaidyti B – ląstelių limfomos – 2 baltymų šeimos nario, BH3 sąveikaujančio domeno mirties agonistą (Bid) į sutrumpintą Bid (tBid). Šis procesas sukelia išorinės mitochondrijų membranos (MOMP) pralaidumą, todėl išsiskiria faktoriai, skatinantys apoptozę, įskaitant citochromą C ir apoptotinę proteazę aktyvinantį faktorių 1 (Apaf – 1). Vidinis kelias yra priklausomas nuo mitochondrijų ir aktyvuojamas, esant intraląsteliniams pažeidimais, sukeliančiais MOMP. Iš mitochondrijų gautas citochromas C sudaro kompleksą su Apaf – 1 ir aktyvina pro – kaspazę – 9 baltymų komplekse, apoptosomoje, leidžiančia paeiliui aktyvuoti vykdomąsias kaspazes (Thomas ir kt., 2017). Atliktų tyrimų rezultatai atskleidė, kad, esant tinklainės išeminės reperfuzijos pažeidimui, padidėjęs akispūdis padidina *toll – like* receptorių 4 (TLR4) ekspresiją. Todėl padidėja kaspazės – 8 ir nukleotidus surišančių oligomerizacijos domeno tipo receptorių, pirino domeną turinčio baltymo 1, ir 3 (NLRP1 / NLRP3) bei interleukino – 1β gamyba. Kaspazė – 8 laikoma apoptozinių ląstelių mirties iniciatoriumi, kurį aktyvuoja TNF / NGF šeimos receptoriai. Šis fermentas vaidina pagrindinį vaidmenį IL – 1β

brendime, esant tinklainės išeminio pažeidimo metu. Eksperimentų metu gauti rezultatai atskleidė, kad kaspazės – 8 slopinimas sumažina NLRP1, NLRP3 ir kaspazės – 1 aktyvumą. Šie rezultatai rodo, kad kaspazė – 8 yra tarpininkas tarp TLR4 ir uždegimo bei yra atsakinga už tinklainės ganglinių ląstelių mirtį, kurią sukelia tinklainės išeminė reperfuzija (Chi ir kt., 2014).

1.4.2. B – ląstelių limfoma 6

Bcl6 taip pat žinomas kaip B – ląstelių limfoma 6, yra transkripcijos represorius, kuris vaidina lemiamą vaidmenį B ląstelių, dalyvaujančių imuninės sistemos atsake į patogenus, vystymesi ir funkcionavime. Bcl6 išskiriami keli domenai, įskaitant DNR surišantį domeną, transkripcijos represoriaus domeną ir dimerizacijos domeną (Crotty, 2014). *Bcl6* genas, koduojantis B – ląstelių limfomos baltymą 6, yra pagrindinis T folikulų pagalbininkų (Tfh) ląstelių diferenciacijos ir funkcijos reguliatorius. Taip pat šis genas, paveikdamas kitus genus, koduojančius tiek pro – , tiek anti – apoptotinius baltymus, gali reguliuoti apoptozės procesą (Basso ir Dalla – Favera, 2012). Atlikti tyrimai su gyvūnų modeliais atskleidė, kad Bcl6 svarbus gemalų centrų formavimuisi ir vaidina lemiamą vaidmenį užkertant kelią apoptozei, kurią sukelia DNR pažaidos, imunoglobulino klasės jungiklio rekombinacijos metu. Tai pasiekama slopinant p53, žinomo apoptozės reguliatoriaus, ekspresiją. Tyrimo metu embrionams buvo suleistos molekulės, kurios slopino arba aktyvavo Bcl6 gamybą, taip siekiant ištirti poveikį ląstelių mirčiai ir p53 baltymo ekspresijai. Rezultatai atskleidė, jog sumažinus Bcl6 gamybą, padidėjo ląstelių mirtis ir p53 ekspresija. Tyrimas rodo, kad Bcl6 veikia kaip apoptozės reguliatorius, kontroliuodamas p53 ekspresiją optinio kaušelio vystymosi metu, ir kad nuo Bcl6 priklausomas p53 slopinimas yra būtinas, norint užkirsti kelią apoptozei normalaus akių vystymosi metu (Lee ir kt., 2013). Taip pat buvo atliktas dar vienas tyrimas, kurio tikslas buvo ištirti Tfh ląstelių vaidmenį diabetinėje retinopatijoje ir tinklainės angiogenezėje. *Bcl6* buvo nustatytas kaip svarbus Tfh ląstelių reguliatorius ir buvo modifikuojamas panaudojant specifinį *Bcl6* inhibitorių, 79 – 6, taip inhibuojant Tfh ląstelių susidarymą. Tyrimas parodė, kad Tfh ląstelės skatina kraujagyslių ir tinklainės barjero pažeidimus esant DR, o *Bcl6* slopinimas sumažino pažaidas ir tinklainės neovaskuliarizaciją deguonimi sukeltos retinopatijos modelyje. Eksperimentas taip pat parodė, kad *Bcl6*, kartu su 79 – 6 sumažino Tfh ląstelių, interleukino – 21 gamybą ir priešuždegiminius bei pro – angiogeninius citokinus (Liu ir kt., 2020). Taip pat buvo įvertintas *Bcl6* nutildymo poveikis kardiomiocitų funkcijai hipoksinėmis sąlygomis. Nustatyta, kad Bcl6 apsaugo kardiomiocitus nuo oksidacinio streso ir apoptozės. *Bcl6* nutildymas sumažina ląstelių gyvybingumą, padidina priešuždegiminę citokinių ekspresiją, oksidacinį stresą ir apoptozę. Taip pat buvo pastebėta, jog *Bcl6* nutildymas suaktyvina p38 signalizacijos kelią. Rezultatai rodo, kad Bcl6 neigiamai reguliuoja su uždegimu susijusius baltymus ir apsaugo kardiomiocitus nuo oksidacinio streso (Gu ir kt., 2019).

1.5. Uždegiminio atsako genai

1.5.1. Glialinis fibrilinis rūgštinis baltymas

GFAP yra genas, koduojantis 54 kDa tarpinį glialinį fibrilinį rūgštinį baltymą, daugiausia randama astrocituose. *GFAP* baltymas yra astrocitu citoskeleto komponentas, atsakingas už ląstelės stabilumo ir formos palaikymą, neuronų apsaugą ir kraujo bei smegenų barjero vientisumo išsaugojimą (Lewis ir Fisher, 2003). Be savo struktūrinės funkcijos, *GFAP* dalyvauja keliuose ląstelių procesuose, tokiuose kaip ląstelių migracija, proliferacija, diferenciacija, pūslelių judėjimas ir astrocitu bei neuronų sąveika (Gallego ir kt., 2012). Baltymas *GFAP* paprastai naudojamas kaip astrogliazės proceso žymuo, o daugelyje publikacijų pateikiama informacija apie signalizacijos kelius, kurie aktyvuoja šį baltymą. Tačiau dauguma šių tyrimų daugiausia dėmesio skiria vaistų ar signalinių molekulių poveikiui astrogliazei bei patologijos rezultatams ir neatskleidžia kelio, susiejančio sužalojimo sukeltą signalą su *GFAP* ekspresija. Kai kuriais tyrimais buvo siekiama nustatyti priežastis, pavyzdžiui, ar neurotoksinai gali sukelti *GFAP* aktyvavimą gyvūnų modelyje. Tyrimai parodė, kad citokinų kiekis greitai padidėja po poveikio neurotoksinais, po to padidėja pSTAT3, o vėliau padidėja ir *GFAP* ekspresija. Tačiau citokinų slopinimas neužkirto kelio *GFAP* ekspresijos padidėjimui, todėl autoriai teigia, kad neuroūždegiminis atsakas atsiranda nepriklausomai nuo *GFAP* padidėjimo. Manoma, kad gali turėti įtakos ir kiti veiksniai, pavyzdžiui, nepakankamas citokinų lygio sumažėjimas arba galimybė, kad *GFAP* padidėjimą gali lemti keli signalizacijos keliai (Brenner ir Messing, 2021). Vis dėlto buvo pastebėta, jog *GFAP* ekspresijai mikroglijose gali turėti įtakos įvairūs citokinai ir augimo faktoriai, tokie kaip bazinis fibroblastų augimo faktorius, ciliarinis neurotrofinis faktorius, transformuojantis augimo faktorius β , interleukinas – 1, interleukinas – 6 ir interferonas γ (Wu ir kt., 2003). Priklausomai nuo sąlygų šio geno ekspresija gali kisti, pavyzdžiui, esant stresui, *GFAP* ekspresijos lygis didėja ir kaupiasi tarpinėse gijose, kuriose gali išlikti ilgą laiką. *GFAP* yra reaktyvių astrocitu požymis, o tinklainės patologijos gali pakeisti jo raišką (Lewis ir Fisher, 2003). *GFAP* laikomas ankstyvu tinklainės pažeidimo rodikliu ir dažniausiai naudojamas kaip gliozės – hipertrofijos indikatorius (Gallego ir kt., 2012). Miulero ląstelių reaktyvioji gliozė buvo pastebėta stuburinių gyvūnų tinklainėje, reaguojant į daugybę ligų, tokių kaip mechaniniai pažeidimai, tinklainės atsiskyrimas, diabetinė retinopatija, glaukoma, tinklainės išemija ir tinklainės degeneracija (Wu ir kt., 2003). Astrocitai ir Miulero ląstelės gali veikti kaip apsauginiai mechanizmai esant hipoksijai, mažindami endotelio pralaidumą ir apsaugodami kraujo ir smegenų barjerą nuo pažeidimų. *In vitro* tyrimai parodė, kad aktyvuoti astrocitai ir Miulero ląstelės gali sunaikinti ir pašalinti iš serumo chemines medžiagas, kurios pažeidžia tinklainės komponentus (Kaur ir kt., 2007).

1.5.2. Chemokino ligandas 12

Chemokinai yra nedidelės baltymų molekulės, kurios geba cheminiais signalais pritraukti ląsteles, taip prisidedant prie leukocitų įdarbinimo uždegimo metu. Chemokinai yra atsakingi už normalių audinių imuninės sistemos kontrolę ir taip pat atlieka svarbų vaidmenį imuniniame atsake uždegimo vietose (Crane ir Liversidge, 2008). Chemokinai skirstomi į kategorijas, pagal jų N – galo cisteino padėtį, kurias sudaro C (γ chemokinai), CC (β chemokinai), CXC (α chemokinai) ir CX3C (δ chemokinai) (Rutar ir kt., 2015). Chemokinai gali prisijungti prie kelių receptorių, o receptoriai gali prijungti kelis chemokinus. Receptoriai sukelia daugybės antrinių mediatorių išsiskyrimą, reaguodami į ligandų surišimą, o tai inicijuoja funkcinis atsakus, tokius kaip ląstelių migracija. Chemokinai prisideda prie adhezijos sąveikos, kurią inicijuoja adhezijos molekulės leukocitų pritraukimo iš kraujotakos metu. Chemokinai transcitozės būdu yra pernešami į endotelio luminalinį paviršių, kur prisijungia prie glikozaminoglikanų. Šis prisijungimas apsaugo chemokinus ir leidžia jiems efektyviau sąveikauti su leukocitais, o tai savo ruožtu palengvina leukocitų sukibimą ir migraciją iš kraujotakos į audinį. Kiekvienas chemokinas turi ir glikozaminoglikano surišimo vietą, ir specifinę receptorių surišimo vietą. Tikėtina, kad leukocitų judėjimui iš kraujotakos į audinį, reikia daugiau nei vieno chemokino tipo, o tam tikros chemokinų rūšys veikia skirtinguose proceso etapuose. Įdomu tai, jog manoma, kad nėra būtinas chemokinų koncentracijos gradiento formavimasis, kad leukocitai galėtų migruoti iš kraujagyslės į audinį. Vietoje to, leukocitų judėjimui palengvinti gali pakakti chemokinų, kurie yra imobilizuoti ant endotelio paviršiaus, kartu su kraujo tėkmės jėga (Crane ir Liversidge, 2008). Pelių Ccl12 pasižymi dideliu struktūriniu panašumu į žmogaus Ccl2 ligandą, turintį 66 % aminorūgščių tapatumą. Manoma, kad Ccl12 pelėse veikia kaip Ccr2 ligandas, skatinantis fibrocitų pritraukimą, ir kad Ccl12 atsakai yra analogiški žmogaus Ccl2 atsakams. Šią mintį patvirtina daugybė išvadų. Pirmiausia, Ccl12 tyrimas *in vitro* su fibrocitais atskleidė, kad geba cheminiais signalais pritraukti ląsteles. Taip pat, pastebėta, jog Ccl12 yra Ccr2 ligandas, kurio koncentracija išlieka padidėjusi viso fibrozinio atsako metu. Todėl tikėtina, kad Ccl12 tarnauja kaip ligandas fibrocitų įdarbinime (Moore ir kt., 2006). *In vitro* tyrimai trauminio smegenų pažeidimo modelyje atskleidė, jog aktyvuotos mikroglijos ląstelės gali produkuoti chemokinus. Be to, šių eksperimentų rezultatai atskleidė, kad Ccl2 ir Ccl12 gali tiesiogiai paveikti mikroglijos aktyvumą ir padidinti imuninių faktorių sekreciją. Ccl2 gali padidinti *IL – 1*, priešuždegiminio citokino ir *Iba1*, mikroglijos ląstelių aktyvacijos žymens, gamybą. Be to, nustatyta, kad Ccl2 ir Ccl12 yra komplemento kaskadų reguliatoriai. Nors Ccl12 neveikia monocitozės taip, kaip Ccl2, vis dėlto jis gali turėti stiprų priešuždegiminį poveikį, dėl sukeltos leukocitų migracijos į pažeistas centrinės nervų sistemos sritis (Popiolek – Barczyk ir kt., 2020). Padidėjusi *Ccl12* ekspersija astrocituose, esant hipoksinėmis sąlygoms, yra adaptyvus uždegiminis atsakas. Po hipoksijos ar išemijos, astrocитай

ir kiti ląstelių tipai gamina chemokinus, kurie sukuria cheminių signalų gradientą. Šis gradientas pritraukia uždegimines ląsteles, įskaitant neutrofilus, monocitus ir makrofagus, kad šie migruotų iš kraujo per hematoencefalinį barjerą į smegenis. Ccl12 yra stiprus chemokinas, selektyviai pritraukiantis monocitus ir makrofagus. Smegenų arterijų okliuzijos modelyje buvo pastebėta, kad po 18 valandų kraujo pernešami monocitai ir makrofagai patenka į išeminį audinį (Mojsilovic – Petrovic ir kt., 2007).

1.6. Metodų charakterizavimas

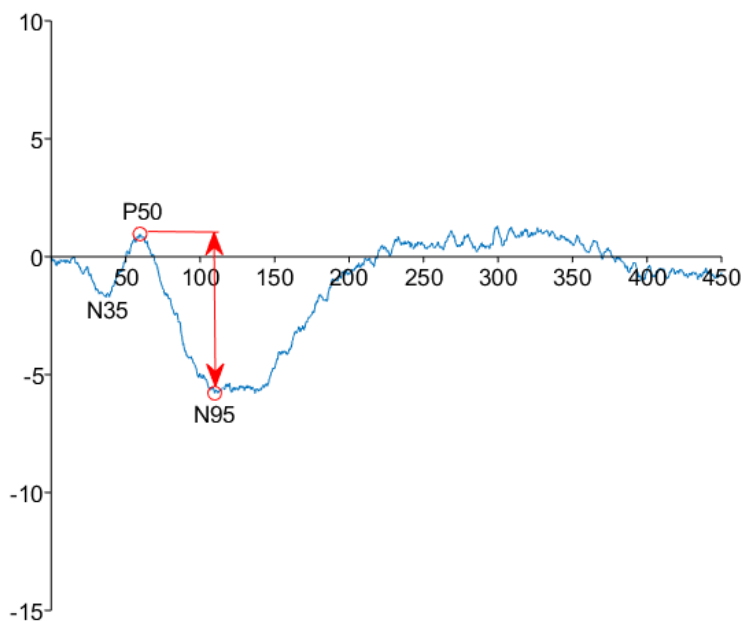
1.6.1. Optinė koherentinė tomografija

Optinė koherentinė tomografija (OKT) yra neinvazinis, didelės skiriamosios gebos vaizdinimo metodas. Vienas iš dažniausiai naudojamų metodų yra spektrinio domeno (SD) optinė koherentinė tomografija. SD – OKT metu žemos koherencijos, plataus dažnių spektro šviesa sklinda interferometru, kuri padalijama į du spindulius: referentinį ir mėginio. Tinklainės vaizdinimui dažniausiai naudojamas šviesos bangos ilgis yra 800 nm – 900 nm, kuomet vandens sugertis yra minimali. Referentinis spindulys keliauja link referentinio veidrodžio, o mėginio spindulys link mėginio ir dalinai atsispindi arba išsisklaido kirsdamas mėginį. Abu šie spinduliai grįžta atgal į spektrometrą, kuris išmatuoja šviesos intensyvumą ir bangos ilgį. Spektrometru surinkti duomenys tuomet yra apdorojami, taip sukuriant trimatį audinio vaizdą, kuriame kiekvienas pikselis atspindi skirtingą audinio gylį. OKT metu yra atliekami A ir B nuskaitymai. A nuskaitymai yra vienmatis skenavimas, suteikiantis informaciją apie audinio atspindį tam tikrame gylyje. Atliekant A nuskaitymą, šviesos šaltinis sufokusuojamas viename audinio taške, o spektrometras matuoja šviesos, kuri atsispindi tame taške, intensyvumą. Atlikus daug A-matavimų skirtinguose skersinio nuskaitymo taškuose yra gaunamas audinio skersinio pjūvio atvaizdas (B-nuskaitymas). OKT plačiai naudojamas oftalmologijos srityje. Šis metodas suteikia galimybę neinvaziškai vizualizuoti tinklainės sluoksnius ir anomalijas. Tai tapo nepakeičiama priemone leidžiančia giliau suprasti tinklainės patologijas (Podoleanu ir A. G., 2012).

1.6.2. Šabloninė elektroretinografija

Šabloninė elektroretinografija (angl. *pattern electroretinography*, pERG) yra neinvazinis metodas, naudojamas oftalmologijoje, skirtas įvertinti centrinės tinklainės funkciją. pERG matuoja tinklainės ganglinių ląstelių elektrinį aktyvumą ir gali padėti nustatyti regos sutrikimus. Atliekant PERG testą, naudojamas specifinis stimulus, pvz., šaškių lentos raštas arba sinusinės grotelės, kuris rodomas kompiuterio ekrane arba specialiame vaizdiniame stimuliatoriuje. Tyrimo metu yra

naudojami elektrodai, kurie priglaudžiami prie ragenos paviršiaus ir registruoja elektrinį aktyvumą, kurį generuoja tinklainė atsakant į stimulą. PERG metu naudojami aktyvūs, atskaitomasis ir įžeminimo elektrodai. Šabloninės elektoretinografijos metu įrašomi ganglinių ląstelių sugeneruoti elektriniai signalai, kurie yra padalinami į skirtingus bangos komponentus, tokius kaip N35 (neigiama banga apie 35 ms), P50 (teigiama banga apie 50 ms) ir N95 (didelė, neigiama banga apie 95 ms)(1.4 pav.).



1.4 pav. Žiurkės pERG signalas ir jį sudarantys bangos komponentai (N35, P50 ir N95). Raudona rodyklė žymi matuojama P50-N95 komplekso amplitudę, nuo smailės iki smailės (angl. *peak-to-peak*)(autorius nuotrauka)

N35 bangos generavimo mechanizmas nėra gerai ištirtas. P50 bangos komponentas reprezentuoja išorinės tinklainės funkciją, N95 banga atspindi ganglinių ląstelių funkciją. P50-N95 bangų kompleksas atspindi ganglinių ląstelių veiklą ir padeda įvertinti vidinės tinklainės funkcionalumą. PERG analizė yra vertingas įrankis, kuris padeda įvertinti vidinių tinklainės sluoksnių funkcionalumą ir anksti nustatyti bei stebėti įvairius regos sutrikimus (Bach ir kt., 2013).

2. TYRIMŲ MEDŽIAGA IR METODAI

2.1. Laboratoriniai gyvūnai, įranga, reagentai ir kitos medžiagos

2.1.1. Gyvūnai

Tyrimo metu buvo naudojamos *Brown Norway* 7 – 8 savaičių amžiaus žiurkės. Gyvūnai buvo laikomi po tris narvelyje, pastovioje 22 ± 1 °C temperatūroje, šviesa kontroliuojamoje aplinkoje, kur šviesa buvo įjungama nuo 7 val. iki 19 val. Gyvūnai turėjo *ad libitum* prieigą prie maisto ir vandens. Viso tyrimo metu gyvūnai buvo nuolat stebimi dėl kūno svorio pokyčių, bendros išvaizdos ir streso požymių. Šio tyrimo eksperimentai atitiko EB direktyvą 2010/63/ES dėl bandymų su gyvūnais, taip pat ARVO pareiškimą dėl gyvūnų naudojimo oftalmologijos ir regos tyrimuose. Eksperimento projektą ir vykdymą patvirtino Valstybinė maisto ir veterinarijos tarnyba bei Eksperimentinių gyvūnų naudojimo Lietuvoje etikos komitetas. Tyrimas buvo atliktas Experimentica UAB įmonėje, leidimo atlikti bandymus su laboratoriniais gyvūnais numeris: G2– 216. Pažymėjimo, leidžiančio atlikti bandymus su laboratoriniais gyvūnais numeris: 19666 (1 priedas).

2.1.2. Įranga, vaistiniai preparatai ir reagentai

Tyrimo metu naudota įranga ir jos panaudojimas eksperimento metu, pateikta 2 priede. Taip pat naudoti vaistiniai preparatai bei jų panaudojimas, pateikti 3 priede. Eksperimento metu naudotų reagentų sąrašas pateiktas 4 priede.

2.1.3. Genai

Eksperimento metu naudoti genai ir jiems parinkti TaqMan™ pradmenų rinkiniai bei jų identifikaciniai kodai pateikti 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. Tyrimo metu naudoti TaqMan™ pradmenų rinkiniai

Parinkti genai	Rūšis	Gamintojas	Identifikacinis kodas
Gialinis fibrilinis rūgštinis baltymas (<i>GFAP</i>)	Žiurkė	Thermo Fisher Scientific	Rn01253033_m1
Chemokino ligandas 12 (<i>Ccl12</i>)	Žiurkė	Thermo Fisher Scientific	Rn01464638_m1
Kaspazė 8 (<i>Casp8</i>)	Žiurkė	Thermo Fisher Scientific	Rn00574069_m1

2.1 lentelės tęsinys

B – ląstelių limfoma 6 (<i>Bcl6</i>)	Žiurkė	Thermo Fisher Scientific	Rn01404339_m1
Glicerinaldehido 3 – fosfato dehidrogenazė (<i>GAPDH</i>)	Žiurkė	Thermo Fisher Scientific	Rn99999916_s1
18S ribosominė RNR (<i>18S</i>)	Eukariotai	Thermo Fisher Scientific	Hs99999901_s1

Eksperto metu tirti glialinio fibrilinio rūgštinio baltymo, chemokino ligando 12, kaspazės 8 ir B – ląstelių limfomos 6 genų raiškos pokyčiai. Kaip endogeninės kontrolės buvo naudojami *GAPDH* ir *18S* genai.

2.2. *In vivo* tyrimai

2.2.1. Išeminės reperfuzijos modelio sukėlimas

Modelio indukavimui gyvūnai buvo anestezuojami ketamino (60 mg / kg), medetomidino (0,4 mg / kg) ir NaCl mišiniu (0,1 ml / 100 g). Dešinės akies vyzdys buvo išplėstas naudojant Mydriacyl akių lašus ir vietiskai anestezuojamas užlašinus proksimetakaino hidrochlorido akių lašų (Alcaine , Alcon – Couvreur). Drėkinamieji akių lašai (Systane Ultra, Alcon Laboratories) buvo naudojami visos indukcijos metu siekiant drėkinti akį ir išvengti ragenos išsausėjimo. Akispūdis buvo padidintas naudojant fiziologinį tirpalą, 0,9 % NaCl, prijungta prie 33 dydžio adatos, kuri buvo įvedama į priekinę akies kamerą. Tuomet buvo padidinamas natrio chlorido tirpalo spaudimas naudojant sfigmomanometrą ir jo srautas paleidžiamas į priekinę kamerą, o į akį patenkančio skysčio slėgis matuojamas manometru. Viso eksperimento metu akispūdis buvo matuojamas tonometru kas 15 minučių siekiant patvirtinti padidėjusį akispūdį. Kairios akys nebuvo indukuojamos ir naudojamos kaip kontralateralinės. Indukcijos metu gyvūnai buvo laikomi ant šildomo kilimėlio, kad būtų palaikoma pastovi kūno temperatūra. Po modelio indukavimo ant dešinių gyvūnų akių buvo užtepamas deksametazono ir chloramfenikolio (Oftan – Dexa Chlora, Santen) gelis. Praėjus savaitei po modelio indukcijos, dekspantenolio (Corneregel, Bausch Lomb) gelis buvo tepamas kelis kartus per dieną ant indukuotų gyvūnų akių siekiant sumažinti ragenos pažeidimus. Gyvūnams, kuriems po modelio indukcijos pasireiškė matoma edema, vieną savaitę kelis kartus per dieną buvo lašinami hipertoniniai (Edenorm Free, SOOFT) akių lašai siekiant sumažinti susidariusią edemą. Pirmajame eksperimente NaCl slėgis buvo padidintas iki 120 mmHg, 150 mmHg, 200 mmHg ir 250 mmHg. Antrajame ir trečiajame eksperimentuose NaCl slėgis buvo padidintas iki 200 mmHg.

2.2.2. Akispūdžio matavimas

Išmatuojant akispūdį žiurkėms, buvo taikoma dujinė anestezija panaudojant izofluraną kartu su deguonimi. Šios procedūros metu gyvūnai buvo patalpinti į indukcinę kamerą ir tam tikrą laiką veikiami dujų mišiniu. Prieš matuojant akispūdį, ant kiekvienos žiurkės dešinės akies buvo užlašinami vietinio poveikio anestetikai – proksimetakaino hidrochlorido akių lašai (Alcaine, Alcon – Couvreur). Tada akispūdis buvo matuojamas dešinėje akyje naudojant tonometrą. Iš kiekvienos žiurkės buvo atlikti penki matavimai ir nustatyta vidutinė vertė. IOP matavimai buvo registruojami prieš modelio indukciją, tiek jos metu, kas 15 minučių. Taip pat akispūdis buvo pakartotinai išmatuotas po 1 ir 5 dienų.

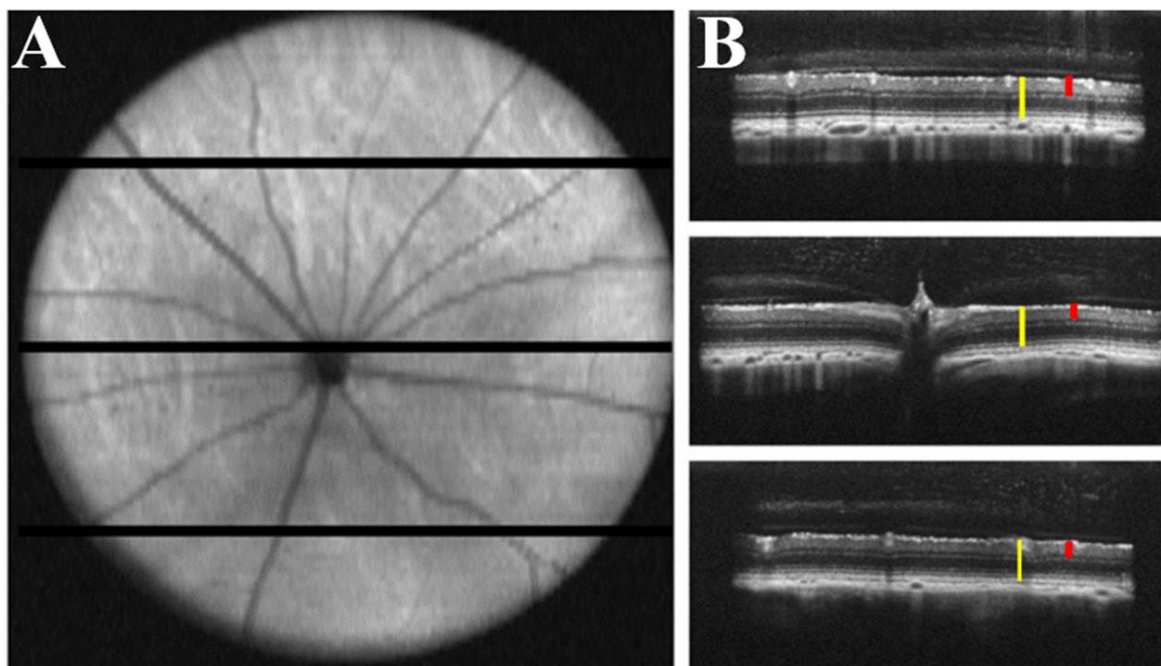
2.2.3. Šabloninė elektroretinografija

Prieš atliekant šabloninės elektroretinografijos ir optinės koheretinės tomografijos metodus, žiurkės buvo anestezuojamos ketaminas (60 mg/kg), medetomidinas (0,4 mg/kg) ir NaCl (0,1 ml/100 g) mišiniu. Gyvūnai tuomet buvo imobilizuoti ant pritaikyto stereotaksinio rėmo, esančio ant kaitinimosios pagalvėlės, taip išlaikant pastovią kūno temperatūrą. Proksimetakaino hidrochlorido (Alcaine, Alcon – Couvreur) akių lašai buvo užlašinami ant dešinės akies, taip sukuriant vietinę nejautrą. Procedūros metu akys taip pat buvo drėkinamos drėkinamuoju akių geliu (Lakripos, Ursapharm), kuris užtikrino elektrinį ragenos ir ragenos elektrodų kontaktą. Plonos (0,3 mm) sidabro vielos kontaktinį elektrodą priglaudus prie ragenos paviršiaus buvo įrašomas dešinės akies atsakas į stimulą, o kairė akis buvo mechaniškai uždengiama ir prie jos priglaudžiamas atskaitomasis elektrodas, o įžeminimo elektrodas buvo uždedamas ant uodegos. pERG stimulo generavimui buvo naudojamas monitorius, sukuriantis vertikalų sinusoidinį 0,10 ciklą per vieną regos lauko laipsnį. Vidutinis stimulo šviesumas buvo 45 liuksai, o kontrastas tarp juodos ir baltos – 75 %. Stimulo kontrastas buvo apverčiamas kas 0,5 sekundės, o per vieną įrašą buvo padaromi 600 apvertimų. Įrašas buvo atliekamas du kartus, išvedamas vidurkis ir matuojama P50-N95 komplekso amplitudė, nuo smailės iki smailės (angl. *peak-to-peak*). Šabloninė elektroretinografijos buvo atliekama prieš modelio indukciją ir po jos praėjus 7, 14 ir 21 dienoms.

2.2.4. Optinė koheretinė tomografija

Anestezuotų gyvūnų dešinės akies vyzdžiai buvo išplėsti naudojant tropikamido akių lašus (Mydriacyl, Alcon – Couvreur) ir drėkinamos drėkinamuoju akių geliu (Hypromelozā-P, Unimed Pharma) siekiant išvengti ragenos išdžiūvimo. Nuskaitoma sritis apėmė 1,8 x 1,8 mm tinklainės,

supančios regos nervą. Kiekvieną nuskaitymą sudarė 100 B nuskaitymų, iš kurių kiekvienas susideda iš 1000 A nuskaitymų (2.1 pav.).



2.1 pav. SD – OCT nuskaitymo vaizdas. A – akies dugno atvaizdas. B – audinio skersinio pjūvio atvaizdas. Raudona linija rodo matuojamą vidinį tinklainės sluoksnio storį, o geltona linija – visos tinklainės storį

Buvo išmatuojamas bendras tinklainės storis pradedant nuo nervinių skaidulų sluoksnio ir baigiant tinklainės epitelio sluoksniu. Taip pat buvo išmatuotas vidinės tinklainės storis, susidedantis iš nervinių skaidulų sluoksnių, vidinio pleksiforminio ir vidinio branduolio sluoksnių. Matavimai atlikti naudojant „InVivoVue Diver“ programinę įrangą (Bioptigen, JAV) 25 skirtinguose taškuose, kur centrinis taškas buvo nukreiptas į regos nervo galvos centrą. Spektrinės srities optinės koherencijos tomografija buvo atliekama prieš modelio indukciją ir po jos praėjus 7, 14 ir 21 dienoms. Atlikus šabloninę elektroretinografiją bei optinę koherentinę tomografiją žiurkės buvo pažadinamos į paodį suleidus atipamo (5 mg/ml) ir fiziologinio tirpalo (0.9%) mišinio (0,2ml/100g).

2.3. Histologija

2.3.1. Tinklainės imunohistocheminis dažymas

Iš surinktų audinių buvo daromos tinklainės išsklotos, kurios buvo plaunamos tris buferiniu druskos tirpalu (TBS) 4 °C temperatūroje 5 valandas, o tirpalas plovimo proceso metu buvo pakeistas keturis kartus. Tuomet audiniai buvo blokuojami TBS tirpale, kuriame yra 0,5 % Triton X-100, kartu su 10 % normalaus ožkos serumu, 30 minučių. Mėginiai buvo dar kartą praplaujami 10 minučių,

tačiau šį kartą TBS tirpale, kuriame yra 0,1 % Triton X-100, kartu su 1 % normalaus ožkos serumu. Pasibaigus šiam žingsniui tinklainės buvo inkubuojamos tirpale su triušio RBPMS pirminiu antikūnu (skiedimas 1 : 200). Mėginiai tuomet buvo laikomi per naktį prie 4 °C. Praėjus pirmajam inkubacijos periodui, audiniai buvo tris kartus praplaunami TBS tirpale, kuriame yra 0,1 % Triton X-100, kartu su 1 % normalaus ožkos serumu. Tuomet vykdomas antrasis inkubacijos periodas su antriniais antikūnais. Šiame žingsnyje buvo naudojamas ožkos anti - triušio antikūnas, konjuguotas su AF568 fluorescencine žyme. Mėginiai buvo tuomet uždengiami folija ir laikomi 4 °C 3 valandas. Vėliau audiniai buvo tris kartus praplaunami 0,1 % TBS – Triton tirpale, kartu su 1 % normalaus ožkos serumu. Tuomet mėginiai buvo inkubuojami naudojant DAPI (4',6–diamidino–2–fenilindolas, skiedimas 1 : 10 000) 30 minučių. Kitame žingsnyje mėginiai vėl buvo plaunami du kartus 0,1 % TBS – Triton tirpale, kartu su 1 % normalaus ožkos serumu. Paskutiniame etape tinklainės buvo uždedamos ant objekcinio stiklelio, ant kurio buvo priklijuojamas dengiamasis stikliukas, tam panaudojant „Fluoroshield“ klijus.

2.4 Molekuliniai tyrimai

2.4.1. RNR išskyrimas iš audinio

Prieš RNR išskyrimą kriomėgintuvėlis su užšaldytu audiniu buvo pasveriamas. Ant audinio tuomet buvo užpilama 200 µl Trizol™ reagento ir turinys perkeliamas iš kriomėgintuvėlio į mėgintuvėlį su aštriakampiais akmenukais (PowerBeads, Garnet), skirtais audinių lizei. Audinys buvo homogenizuotas maišant ant maišyklės 5 minutes arba kol suiro. Homogenatas buvo surinktas į naują švarų mėgintuvėlį. Tuomet buvo įpilama 100 µl Trizol™ reagento, kad būtų užtikrintas visiškas RNR surinkimas, ir maišoma dar 1 – 2 minutes. Homogenatai buvo surinkti į tą patį mėgintuvėlį. Chloroformas buvo pilamas ant homogenato santykiu 1 : 5, po to mišinys buvo maišomas rankose 15 sekundžių ir inkubuojamas 3 minutes kambario temperatūroje. Tada mišinys buvo centrifuguojamas 15 min. esant 4 °C temperatūrai ir 11 000 G jėgai. Po centrifugavimo supernatantas buvo surenkamas ir pridedamas toks pat tūris 70 % etanolio. Viskas buvo sumaišoma ir perkeliama ant membranos, esančios surinkimo mėgintuvėlyje, ir centrifuguojama 15 sekundžių 12 000 G jėga. Prasifiltravęs mišinys buvo išpiltas, membrana vėl įdėta į mėgintuvėlį, užpilama 700 µl pirmojo plovimo tirpalo (I plovimo buferis) ir centrifuguojama 15 sekundžių 12 000 G jėga. Prasifiltravęs mišinys buvo išpiltas, membrana vėl įdėta į mėgintuvėlį ir 500 µl užpilama antrojo plovimo tirpalo (II plovimo buferis) bei centrifuguojama 15 sekundžių 12 000 G jėga – šis žingsnis buvo pakartojamas du kartus. Nusifiltravęs mišinys buvo išpilamas, membrana vėl dedama į mėgintuvėlį ir centrifuguojama 1 min. 12 000 G jėga, siekiant išdžiovinti membraną. Tada membrana

buvo įdėta į naują mėgintuvėlį. Ant membranos centro buvo užpilama 30 µl vandens be ribonukleazių ir inkubuojama 1 min. kambario temperatūroje bei po to centrifuguojama 2 min. esant 12 000 G jėgai.

2.4.2. RNR koncentracijos nustatymas

RNR koncentracija buvo nustatyta naudojant NanoDrop One/One^C spektrofotometrą. Ant spektrofotometro skaitytuvo buvo uždedamas 1 µl RNR mėginio. Kiekvieno mėginio koncentracija buvo pamatuojama du kartus, o tarp skirtingų mėginių buvo daromi praplovimai su vandeniu be nukleazių. Absorbcijos matavimai buvo atlikti naudojant 260 nm, 280 nm ir 230 nm bangų ilgius. Likęs RNR tūris buvo laikomas – 20 ° C temperatūroje. RNR grynumas buvo nustatytas įvertinus absorbcijos santykį 260/280. RNR mėginiai buvo laikomi grynais, kuomet santykis buvo ~ 2,0.

2.4.3. Kopijinės DNR sintezė

Kopijinės DNR sintezei, RNR buvo praskiedžiama iki 0,03 µg/µl koncentracijos su ribonukleazių neturinčiu vandeniu. Tuomet buvo paruošiamas reakcijos mišinys, kuris buvo naudojamas kopijinės DNR (kDNR) sintezės reakcijai atlikti sumaišant išvardintus reagentus iš High-Capacity cDNA Reverse Transcription rinkinio (kiekiai surašyti vienam plokštelės šulinėliui užpildyti): 10X RT Buffer – 2 µl, 25X dNTP Mix (100 mM) – 0,8 µl, 10X RT Random Primers – 2 µl, MultiScribe Reverse Transcriptase – 1 µl, RNase inhibitor – 1 µl, Nuclease free water – 3,2 µl. Kaip kontrolė buvo paruošiamas reakcijos mišinys be atvirkštinės transkriptazės sumaišant išvardintus reagentus iš High-Capacity cDNA Reverse Transcription rinkinio (kiekiai surašyti vienam plokštelės šulinėliui užpildyti): 10X RT Buffer – 2 µl, 25X dNTP Mix (100 mM) – 0,8 µl, 10X RT Random Primers – 2 µl, RNase inhibitor – 1 µl, Nuclease free water – 4,2 µl. Paruošti mišiniai buvo išpilstomi po 10 µl į 8 mėgintuvėlių juosteles. Į atitinkamus šulinėlius, kuriuose buvo reakcijos mišinys, įpilama po 5 µl RNR skiedimų arba vandens be nukleazių. Mėgintuvėlių juostelės uždengiamos dangteliais, sumaišomos ant purtyklės ir centrifuguojamos 2000 G jėga 1 min. Juostelės tuomet buvo įdedamos į QuantStudio 3 (Thermo Fisher Scientific) instrumentą. Paleidžiamas protokolas, skirtas kopijinės DNR sintezei. Protokolo etapus sudarė: pradmenų prilydymas 10 min. 25 °C; kDNR sintezė 2 val. 37 °C; fermentų inaktyvacija 5 min. 85 °C; laikymas po reakcijos neribotai 4 °C. Po reakcijos lėkštelė buvo užšaldoma – 20 °C temperatūroje.

2.4.4. Realus laiko kiekybinės polimerazės grandininės reakcijos atlikimas (kPGR)

kDNR buvo praskiesta iki 1 ng/µl bei iki 10 ng/µl su vandeniu be nukleazės. Kaip endogeninė kontrolė buvo naudojami *GAPDH* ir *18S*. Reakcijos mišinys buvo paruoštas kDNR amplifikacijai sumaišant išvardytus reagentus (kiekiai nurodyti vienos plokštelės šulinėliui užpildyti): 2X TaqMan

Fast Advanced Master Mix – 7,5 µl; 20X TaqMan tiriamųjų genų pradmenų mišiniai – 0,75 µl (iki 2 skirtingų); 20X TaqMan kontrolinio geno pradmenų mišinys – 0,75 µl; vanduo be nukleazijų – 0,25 arba 1 µl. Paruoštas reakcijos mišinys buvo išpilstytas po 10 µl į 96 šulinėlių plokštelę. Į šulinėlius su mišiniu buvo įpilama 5 µl kDNR. Plokštelė buvo užklijuojama lipnia plėvele, sumaišoma ant purtyklės ir centrifuguojama 2000 G jėga 1 min. Plokštelė buvo patalpinama į realaus laiko kiekybinės polimerazės grandininės reakcijos (qPCR) aparatą (QuantStudio 3). Buvo vykdomas genų amplifikacijos protokolas. Protokolo etapai buvo tokie: inkubacija 2 min. 50 °C temperatūroje; fermento aktyvinimas 2 min. 95 °C temperatūroje; DNR denatūravimas 1 sek. 95 °C temperatūroje ir pradmenų susiliejimas/DNR amplifikacija 20 sek. 60 °C temperatūroje (40 ciklų). Po reakcijos plokštelė buvo laikoma 4 °C temperatūroje. Gauti qPCR duomenys buvo analizuojami Design ir Analysis programine įranga.

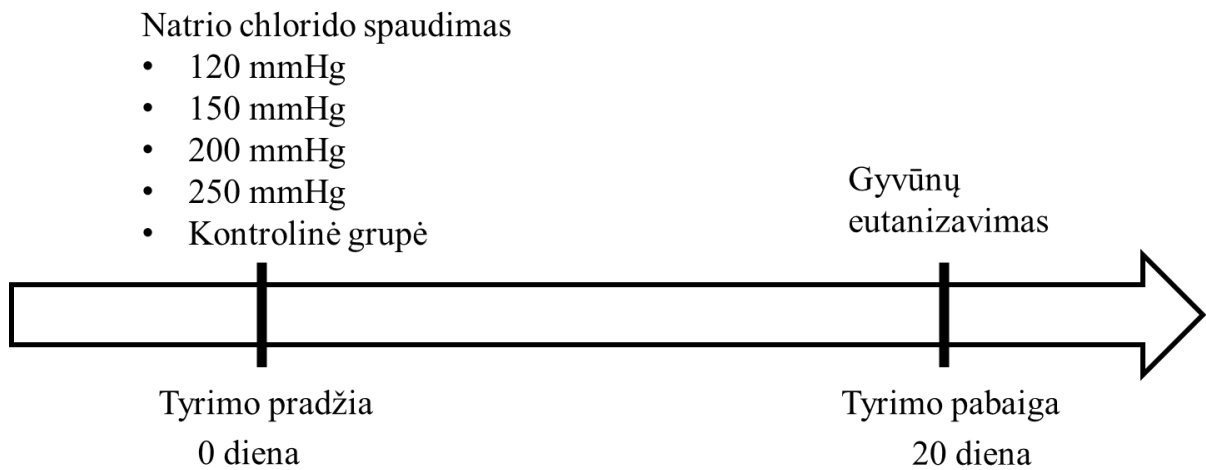
2.5. Statistinė analizė

Tyrimų rezultatų analizė buvo atlikta naudojant GraphPad Prism (versija: 9.5.1, San Diego, California, USA) programinę įrangą. Statistinei rezultatų analizei atlikti naudoti metodai: vienfaktorinė dispersinė analizė (angl. *One – way ANOVA*), dviejų krypčių vidurkių palyginimo ir dispersinė analizė (angl. *Two – way ANOVA*), Šidako daugkartinių palyginimų testas (angl. *Šidak's multiple comparisons test*), nesuporuotų imčių t testas (angl. *Unpaired t test*), *Dunnnett 'o* daugybinio palyginimo testas (angl. *Dunnnett's multiple comparisons test*), Andersono – Darlingo normalingumo testas (angl. *Anderson– Darling test*), Shapiro – Wilko normalingumo testas (angl. *Shapiro– Wilk test*). Skirtumai buvo laikomi statistiškai reikšmingi, kuomet $p < 0,05$. Duomenys pateikti kaip vidutinė vertė kartu su standartinė vidurkio paklaida (angl. *standart error of mean, SEM*).

2.6. Tyrimo etapai

2.6.1. Pirmojo eksperimento eiga: tinkamo natrio chlorido slėgio nustatymas

Pirmo tyrimo metu, buvo siekiama nustatyti tinkamą fiziologinio tirpalo spaudimą, išeminei reperfuzijai sukelti. Eksperimento eiga pateikta 2.2 paveiksle.



2.2 pav. Pirmojo tyrimo eiga

Tinklainės išemijos reperfuzijos modeliui indukuoti, buvo pasirinkti keturi skirtingi spaudimai: 120 mmHg, 150 mmHg, 200 mmHg ir 250 mmHg. Eksperimento metu, 15 *Brown Norway* žiurkių buvo suskirstytos į penkias grupes:

Pirmos grupės žiurkėms buvo sudaromosios tos pačios sąlygos, kaip ir tiriamųjų grupių gyvūnams, tačiau nebuvo atliktas modelio indukavimas ($n = 3$).

Antros grupės žiurkėms į priekinę akies kamerą buvo leidžiamas 120 mmHg spaudimo natrio chloride tirpalas ($n=3$).

Trečios grupės žiurkėms į priekinę akies kamerą buvo leidžiamas 150 mmHg spaudimo natrio chloride tirpalas ($n=3$).

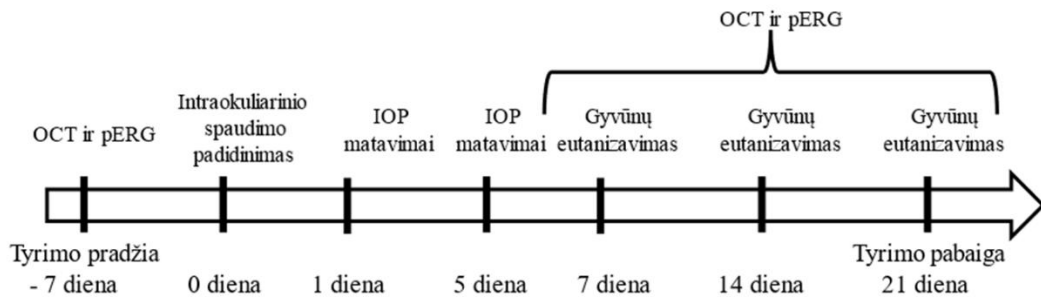
Ketvirtos grupės žiurkėms į priekinę akies kamerą buvo leidžiamas 200 mmHg spaudimo natrio chloride tirpalas ($n=3$).

Penktos grupės žiurkėms į priekinę akies kamerą buvo leidžiamas 250 mmHg spaudimo natrio chloride tirpalas ($n=3$).

Gautos vidutinės akispūdžio ir tinklainės ganglinių ląstelių reikšmės, palygintos su kontrolinėmis akimis.

2.6.2. Antrojo eksperimento eiga: funkciniai ir struktūriniai pakitimai, sukelti išeminės reperfuzijos modelio

Antro tyrimo metu siekta išsiaiškinti tinklainės išeminės reperfuzijos sukeltus morfologinius bei funkcinis pakitimus. Eksperimento eiga pateikta 2.3 paveiksle.



2.3 pav. Antrojo tyrimo eiga

Eksperimento metu, pokyčiai buvo stebimi po modelio indukavimo 7, 14 ir 21 dienoms. Tyrimo metu, 80 *Brown Norway* žiurkių buvo suskirstytos į šešias grupes:

Pirmos grupės žiurkėms, buvo sukuriamos tos pačios sąlygos kaip ir tiriamosioms grupėms, tačiau joms nebuvo atlikta modelio indukcija. Šios grupės gyvūnai eutanazuoti po modelio sukėlimo praėjus 7 dienoms ($n = 6$).

Antros grupės žiurkėms buvo sukuriamos tos pačios sąlygos kaip ir tiriamosioms grupėms, tačiau joms nebuvo atlikta modelio indukcija. Šios grupės gyvūnai eutanazuoti po modelio sukėlimo praėjus 14 dienų ($n = 6$).

Trečios grupės žiurkėms, buvo sukuriamos tos pačios sąlygos kaip ir tiriamosioms grupėms, tačiau joms nebuvo atlikta modelio indukcija. Šios grupės gyvūnai eutanazuoti po modelio sukėlimo praėjus 21 dienai ($n = 14$).

Ketvirtos grupės žiurkėms į priekinę akies kamerą buvo leidžiamas 200 mmHg spaudimo natrio chlorido tirpalas. Šios grupės gyvūnai eutanazuoti po modelio sukėlimo praėjus 7 dienoms ($n = 18$).

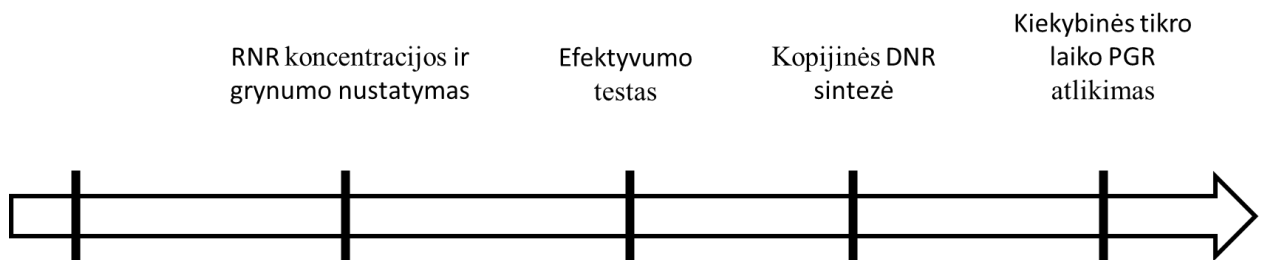
Penktos grupės žiurkėms į priekinę akies kamerą buvo leidžiamas 200 mmHg spaudimo natrio chlorido tirpalas. Šios grupės gyvūnai eutanazuoti po modelio sukėlimo praėjus 14 dienų ($n = 18$).

Šeštos grupės žiurkėms į priekinę akies kamerą buvo leidžiamas 200 mmHg natrio chlorido tirpalas. Šios grupės gyvūnai eutanazuoti po modelio sukėlimo praėjus 21 dienai (n = 18).

Tiriamų gyvūnų vidutinis akispūdis, tinklainės bei ganglinių ląstelių sluoksnių storis, lastelių atsako į stimulą reikšmės buvo palygintos su kontrolinėmis akių reikšmėmis. Ganglinių ląstelių ir astrocitų vidutinės reikšmės buvo lyginamos tiek su kontrolinėmis akimis, tiek su sveikomis akimis, kurioms nebuvo atlikta jokia procedūra.

2.6.3. Trečiojo eksperimento eiga: genų ekspresijos susiejimas su išeminės reperfuzijos sukeltais morfologiniais ir fiziologiniais pakitimais

Trečio tyrimo metu buvo siekiama išsiaiškinti išeminės reperfuzijos sukeltus genų raiškos pokyčius ir juos susieti su morfologiniais ir fiziologiniais pakitimais. Trečio eksperimento eiga pavaizduota 2.4 paveiksle.



2.4 pav. Trečiojo tyrimo eiga

Eksperimento metu, 38 *Brown Norway* žiurkių buvo suskirstytos į keturias grupes:

Pirmos grupės žiurkėms nebuvo atlikta jokia procedūra. Šiai grupei priklausantys gyvūnai buvo naudojami kaip kontrolė (n = 8).

Antros grupės žiurkėms į priekinę akies kamerą buvo leidžiamas 200 mmHg spaudimo natrio chlorido tirpalas. Šios grupės gyvūnai eutanazuoti po modelio sukėlimo praėjus 7 dienoms (n = 10).

Trečios grupės žiurkėms į priekinę akies kamerą buvo leidžiamas 200 mmHg natrio chlorido tirpalas. Šios grupės gyvūnai eutanazuoti po modelio sukėlimo praėjus 14 dienų (n = 10).

Ketvirtos grupės žiurkėms į priekinę akies kamerą buvo leidžiamas 200 mmHg natrio chlorido tirpalas. Šios grupės gyvūnai eutanazuoti po modelio sukėlimo praėjus 21 dienai (n = 10).

Tyrimo metu, kas savaitę, tinklainės buvo išpreparuojamos bei užšaldomos skystame azote. Surinkus visus audinius, atliktas RNR gryninimas, nustatyta jos koncentracija ir grynumas. Siekiant užtikrinti DNR amplifikacijos tiesiškumą atskirų genų atvejais ir optimizuoti kDNR kiekį reakcijoje, buvo atliekami amplifikacijos efektyvumo tyrimai. Tuo pačiu metu buvo optimizuojami ir geriausiai

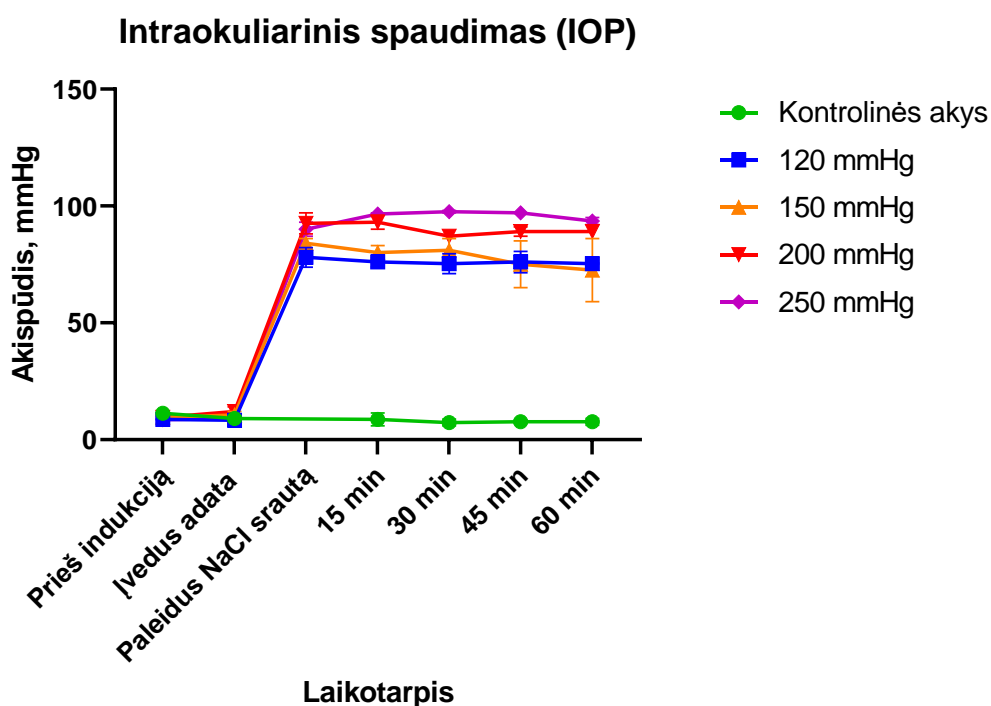
tinkančių genų porų deriniai daugybinei kPGR. Tuomet buvo atliekama visų mėginių kDNR sintezė bei kiekybinė tikro laiko PGR. kPGR duomenys buvo analizuojami naudojant $2^{\Delta\Delta CT}$ metodą santykiniam realaus laiko PGR duomenų kiekybiniam įvertinimui. Tam, kad būtų galima atlikti analizę, pasirinkta endogeninė kontrolė, kurios ekspresijos lygis buvo stabilus. Šis genas buvo naudojamas normalizuoti tiriamojo geno Ct vertes. ΔCt vertės buvo apskaičiuojamos atimant referentinio geno Ct vertę iš tiriamojo geno Ct vertės kiekviename mėginyje. Tuomet, buvo apskaičiuotos $\Delta\Delta CT$ vertės atimant kontrolinio mėginio vidutinę ΔCT vertę iš kiekvieno tiriamojo mėginio ΔCT vertės. Genų ekspresijos pokytis buvo nustatomas naudojant formulę $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Schmittgen ir Livak, 2008).

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Efektyvaus natrio chlorido spaudimo nustatymas

3.1.1. Intraokuliarinio spaudimo kitimas

Kadangi yra žinoma, kad vienas iš išeminę reperfuziją sukeliančių veiksnių yra padidėjęs akispūdis, šio tyrimo metu buvo siekiama išsiaiškinti tinkamą natrio chlorido spaudimą. Buvo pasirinkti keturi spaudimai : 120 mmHg, 150 mmHg, 200 mmHg ir 250 mmHg. Atlikus surinktų duomenų analizę, pateiktą 3.1 paveiksle, nustatytas žymus vidutinės akispūdžio reikšmės skirtumas, tarp kontrolinės ir visų tiriamųjų grupių.



3.1 pav. Vidutinio akispūdžio pokyčiai modelio indukcijos laikotarpyje, naudojant skirtingus fiziologinio tirpalo slėgius (120 mmHg, 150 mmHg, 200 mmHg, 250 mmHg), palyginimas su kontrolinėmis akimis

Atlikus duomenų statistinę analizę pastebėta, jog aukšto natrio chlorido slėgio paleidimas į priekinę akies kamerą, visose tiriamosiose grupėse lyginant su kontrole, lėmė statistiškai reikšmingą akispūdžio padidėjimą, kuris matomas visos indukcijos metu ($p < 0,001$) (žr 3.1 lentelę).

3.1 lentelė. p reikšmės (atlikta vienfaktorinė dispersinė analizė (angl. *One – way ANOVA*)) tiriamosiose grupėse, lyginant su kontroline

Tiriamosios grupės	p reikšmė
Natrio chlorido slėgis – 120 mmHg (n = 3)	< 0,001
Natrio chlorido slėgis – 150 mmHg (n = 3)	< 0,001
Natrio chlorido slėgis – 200 mmHg (n = 3)	< 0,001
Natrio chlorido slėgis – 250 mmHg (n = 3)	< 0,001

Apibendrinant galima teigti, kad natrio chlorido spaudimui esant 120 mmHg, 150 mmHg, 200 mmHg ir 250 mmHg, lėmė statistiškai reikšmingą akispūdžio padidėjimą, kuris išliko viso modelio sukėlimo metu.

3.1.2. Tinklainės ganglinių ląstelių išgyvenamumas

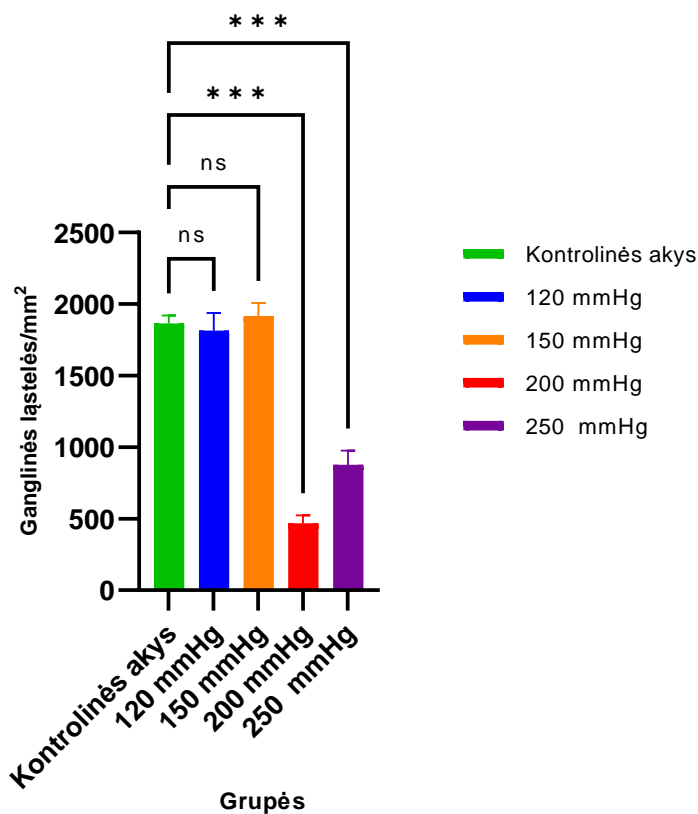
Atsižvelgiant į žinomą ryšį tarp padidėjusio akispūdžio ir tinklainės ganglinių ląstelių apoptozės, šiuo tyrimu buvo siekiama nustatyti ląstelių kiekį po tinklainės išemijos reperfuzijos modelio indukavimo, skirtingais natrio chlorido slėgiais. Atlikus duomenų analizę (žr. 3.2 lentelę) pastebėta, kad 200 mmHg ir 250 mmHg grupėse vidutinis ganglinių ląstelių kiekis, lyginant su kontrolinėmis akimis žymiai sumažėjo. Kontrolinės grupės ganglinių ląstelių vidurkis ($1864,612 \text{ mm}^2 \pm 55,511 \text{ mm}^2$) nesiskyrė nuo 120 mmHg ($1814,065 \text{ mm}^2 \pm 123,697 \text{ mm}^2$) ir 150 mmHg ($1915,627 \text{ mm}^2 \pm 92,201 \text{ mm}^2$) grupių. Tačiau, natrio chlorido slėgiui esant 200 mmHg ir 250 mmHg, ganglinių ląstelių kiekio vidurkiai buvo žymiai mažesni ($466,572 \pm 56,784 \text{ mm}^2$ ir $875,256 \pm 100,160 \text{ mm}^2$).

3.2 lentelė. Vidutinio ganglinių ląstelių tankio ($\text{mm}^2 \pm \text{SEM}$) bei p reikšmių (atlikta vienfaktorinė dispersinė analizė (angl. *One – way ANOVA*)) palyginimas tarp tiriamųjų grupių

Tiriamosios grupės	Ganglinių ląstelių vidurkis ($\text{mm}^2 \pm \text{SEM}$)	p reikšmė
Kontrolinės akys (n=3)	1864,612 \pm 55,511	–
Natrio chlorido slėgis – 120 mmHg (n=3)	1814,065 \pm 123,697	> 0,99
Natrio chlorido slėgis – 150 mmHg (n=3)	1915,627 \pm 92,201	> 0,99
Natrio chlorido slėgis – 200 mmHg (n=3)	466,572 \pm 56,784	< 0,001
Natrio chlorido slėgis – 250 mmHg (n=3)	875,256 \pm 100,160	< 0,001

Statistinė analizės rezultatai parodė, kad vidutinių ganglinių ląstelių kiekio skirtumai, tarp kontrolinių akių ir 120 mmHg bei 150 mmHg grupių nebuvo statistiškai reikšmingi ($p > 0,99$) (3.2 pav.). Tačiau, tarp kontrolinių akių ir 200 mmHg bei 250 mmHg grupių buvo pastebėti statistiškai reikšmingi skirtumai ($p < 0,001$). Taip pat indukcijos metu buvo pastebėta, kad natrio chlorido spaudimui esant 250 mmHg, matomas tirpalo nutekėjimas iš akies.

Tinklainės ganglinių ląstelių kiekis



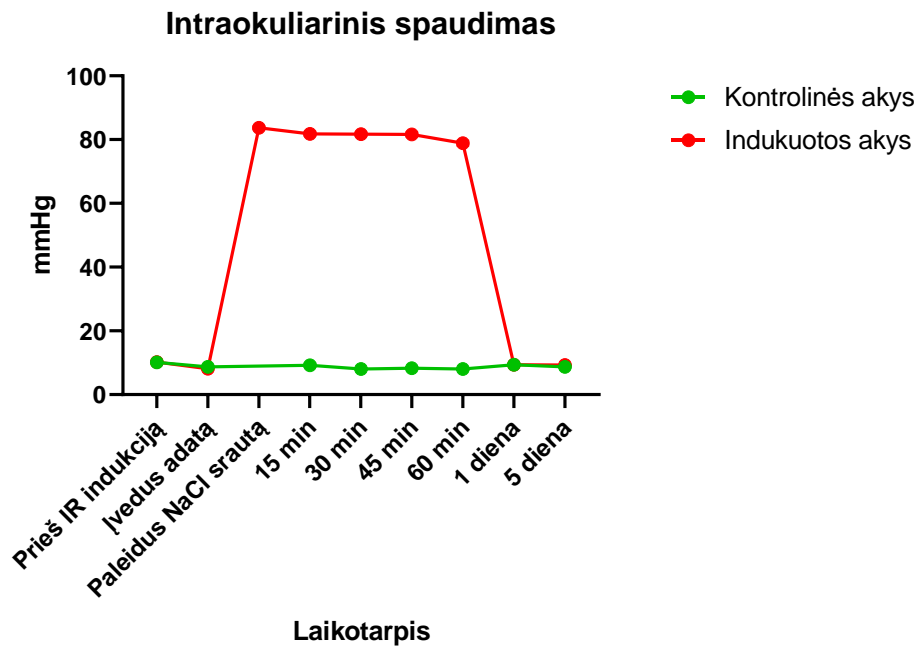
3.2 pav. Ganglinių ląstelių vidurkių palyginimas (atlikta vienfaktorinė dispersinė analizė (angl. *One – way ANOVA*)) tarp tiriamųjų grupių (ns (angl. *no statistically significant difference*) – statistiškai reikšmingo skirtumo nėra; *** < 0,001)

Apibendrinant, duomenys atskleidė, kad padidėjęs akispūdis turi įtakos ganglinių ląstelių išgyvenamumui, o didžiausias sumažėjimas pastebimas, esant 200 mmHg ir 250 mmHg natrio chlorido spaudimams. Tačiau, esant 120 mmHg ir 150 mmHg fiziologinio tirpalo slėgiams, nebuvo pastebėti reikšmingi skirtumai, lyginant su kontrolinėmis akimis. Todėl tolimesniems tyrimams buvo pasirinktas 200mmHg spaudimas į akį.

3.2. Išeminės reperfuzijos sukelti morfologiniai ir fiziologiniai pakitimai

3.2.1. Intraokuliarinio spaudimo kitimas

Paleidus NaCl srovę, akispūdis indukuotose akyse iškart padidėjo ($83,7 \pm 0,6$ mmHg). Per kitas 15– 60 minučių, lyginant su kontrolinėmis akimis, akispūdis indukuotose akyse išliko aukštas (3.3 pav.).



3.3 pav. Intraokuliarinio spaudimo vidurkių palyginimas tarp kontrolinių ir indukuotų akių modelio indukcijos metu

Tačiau pastebėta, kad praėjus 1 bei 5 paroms po indukcijos, akispūdis indukuotose akyse reikšmingai nesiskyrė nuo kontrolinių (žr. 3.3 lentelę).

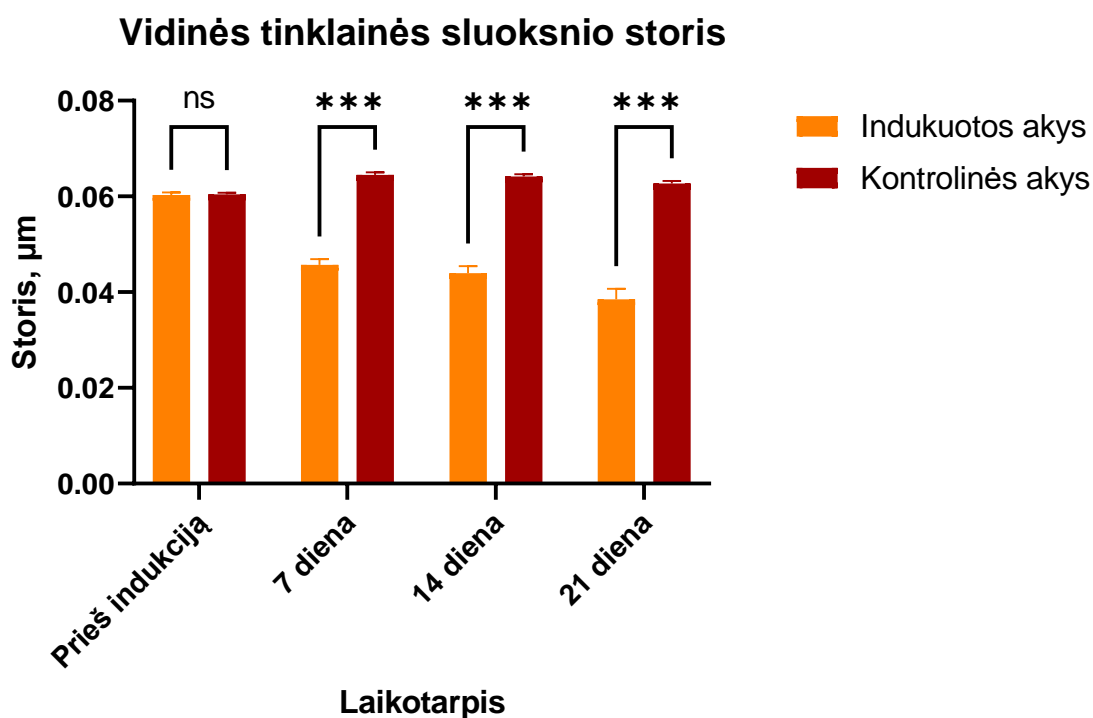
3.3 lentelė. Intraokuliarinių spaudimų vidurkių modelio indukcijos laikotarpyje, palyginimas su kontrolinėmis akimis

Laikotarpis	Intraokuliarinis spaudimas, mmHg	
	Kontrolinės akys	Indukuotos akys
Prieš indukciją, mmHg ± SEM	10,1 ± 0,3	10,2 ± 0,2
Įvedus adatą, mmHg ± SEM	8,7 ± 0,4	8,1 ± 0,3
Paleidus NaCl srautą, mmHg ± SEM	–	83,7 ± 0,6
15 min, mmHg ± SEM	9,2 ± 0,6	81,8 ± 0,7
30 min, mmHg ± SEM	8,1 ± 0,3	81,7 ± 0,7
45 min, mmHg ± SEM	8,3 ± 0,4	81,6 ± 0,7
60 min, mmHg ± SEM	8 ± 0,3	78,8 ± 0,8
1 diena, mmHg ± SEM	9,4 ± 0,3	9,4 ± 0,2
5 diena, mmHg ± SEM	8,7 ± 0,3	9,3 ± 0,1

Apibendrinant galima teigti, jog tinklainės išeminės reperfuzijos modelio sukėlimas, sąlygojo padidėjusį akispūdį, kuris išliko aukštas indukcijos. Tačiau, praėjus 1 bei 5 dienoms, intraokuliarinis spaudimas indukuotose akyse, lyginant su kontrolinėmis – nebuvo padidėjęs.

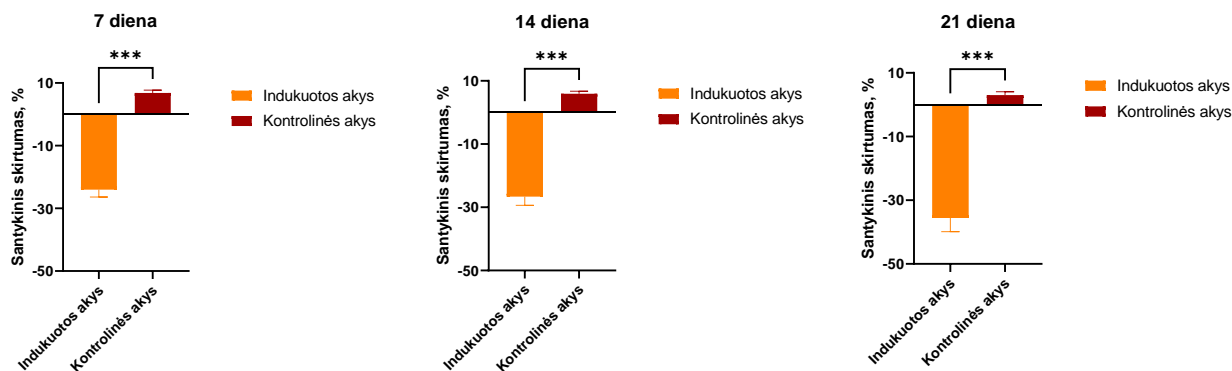
3.2.2. Ganglinių ląstelių sluoksnio storio pokyčiai

Kadangi pirmojo tyrimo metu pastebėtas sumažėjęs ganglinių ląstelių išgyvenamumas, todėl šio tyrimo metu buvo siekiama išsiaiškinti laikino kraujotakos sustabdymo ir jos atstatymo sukeltus vidinės tinklainės sluoksnio morfologinius pakitimus. Atlikus duomenų analizę pastebėta, kad po išeminės reperfuzijos modelio indukcijos praėjus 7, 14 ir 21 dienoms, indukuotose akyse vidinis tinklainės sluoksnis žymiai plonesnis, palyginti su kontrolinėmis akimis (dviejų krypčių vidurkių palyginimo ir dispersinė analizė (angl. *Two – way ANOVA*), $p < 0,001$)(3.4 pav.).



3.4 pav. Vidutinio vidinės tinklainės sluoksnio storio palyginamas (atlikta dviejų krypčių vidurkių palyginimo ir dispersinė analizė (angl. *Two – way ANOVA*)) tarp kontrolinių bei indukuotų akių, skirtingomis DPI (ns – (angl. *not significant*) – statistiškai nereikšmingas; *** < 0,001)

Palyginus vidutines tinklainės storio procentines reikšmes tarp kontrolinių bei indukuotų akių, statistinės analizės duomenys rodo, jog po modelio sukėlimo praėjus 7, 14 ir 21 dienai, skirtumai tarp grupių buvo statistiškai reikšmingi (3.5 pav.). Duomenys rodo, 7, 14 ir 21 dienoms, po laikinos tinklainės kraujotakos sustabdymo ir jos atstatymo, p reikšmė lyginant kontrolinių ir indukuotų akių vertes buvo < 0,001 (nesuporuotų imčių t testas (angl. *Unpaired t test*)).



3.5 pav. Vidinio tinklainės sluoksnio storio, santykinio skirtumo palyginamas (atliktas nesuporuotų imčių *t* testas (angl. *Unpaired t test*)) tarp kontrolinių bei indukuotų akių, skirtingomis DPI (***) ($*** < 0,001$)

Iš pateiktų duomenų lentelėje nr. 3.4, galima pastebėti, jog po modelio sukėlimo, vidinis tinklainės sluoksnis suplonėja 29 % jau 7 dieną bei 31,5 % 14 dieną. Didžiausias vidinio tinklainės sluoksnio storio sumažėjimas (38,7 %) indukuotose akyse, pastebimas praėjus 21 dienai ($0,038 \pm 0,0022 \mu\text{m}$) po modelio sukėlimo.

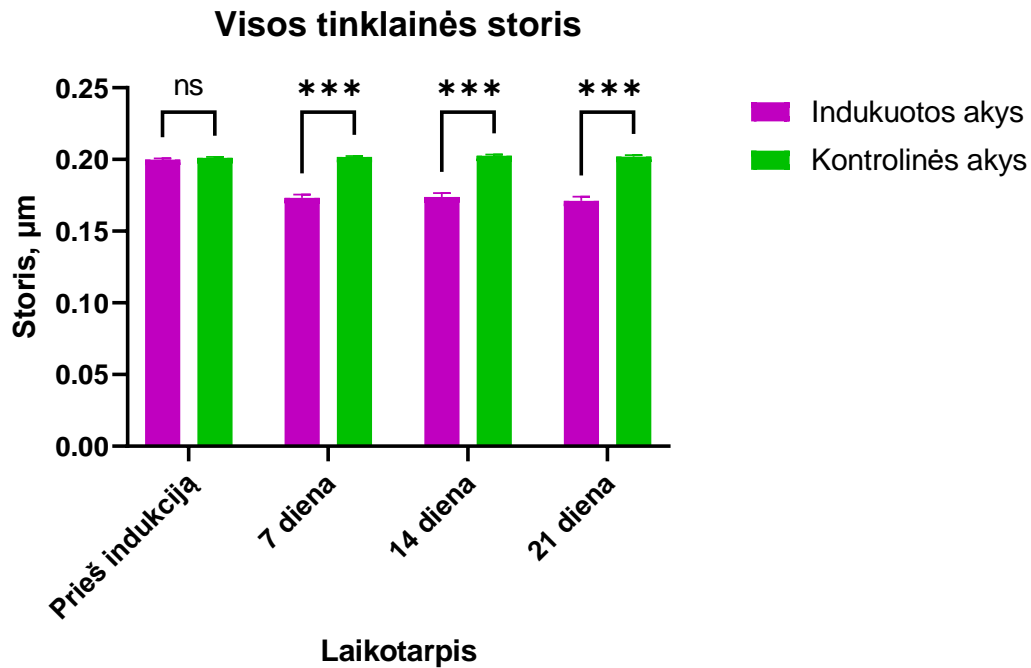
3.4 lentelė. Vidutinių ganglinių ląstelių sluoksnio reikšmių ($\mu\text{m} \pm \text{SEM}$) palyginimas tarp kontrolinių ir indukuotų akių, DPI. Kontrolinės akys 7 diena ($n = 25$), 14 diena ($n = 20$) ir 21 diena ($n = 14$). Indukuotos akys 7 diena ($n = 22$), 14 diena ($n = 19$) ir 21 diena ($n = 11$)

Tiriamosios grupės	Vidinio tinklainės sluoksnio vidutinės reikšmės ($\mu\text{m} \pm \text{SEM}$) prieš indukciją	Vidinio tinklainės sluoksnio vidutinės reikšmės ($\mu\text{m} \pm \text{SEM}$) praėjus 7 dienoms po indukcijos	Vidinio tinklainės sluoksnio vidutinės reikšmės ($\mu\text{m} \pm \text{SEM}$) praėjus 14 dienų po indukcijos	Vidinio tinklainės sluoksnio vidutinės reikšmės ($\mu\text{m} \pm \text{SEM}$) praėjus 21 dienai po indukcijos
Kontrolinės akys	$0,060 \pm 0,0003$	$0,064 \pm 0,0005$	$0,064 \pm 0,0005$	$0,063 \pm 0,0006$
Indukuotos akys	$0,060 \pm 0,0006$	$0,046 \pm 0,0013$	$0,044 \pm 0,0015$	$0,038 \pm 0,0022$

Apibendrinant visus gautus rezultatus, galima daryti išvadą, kad po išeminės reperfuzijos sukėlimo, vidinis tinklainės sluoksnis laikui bėgant plonėja.

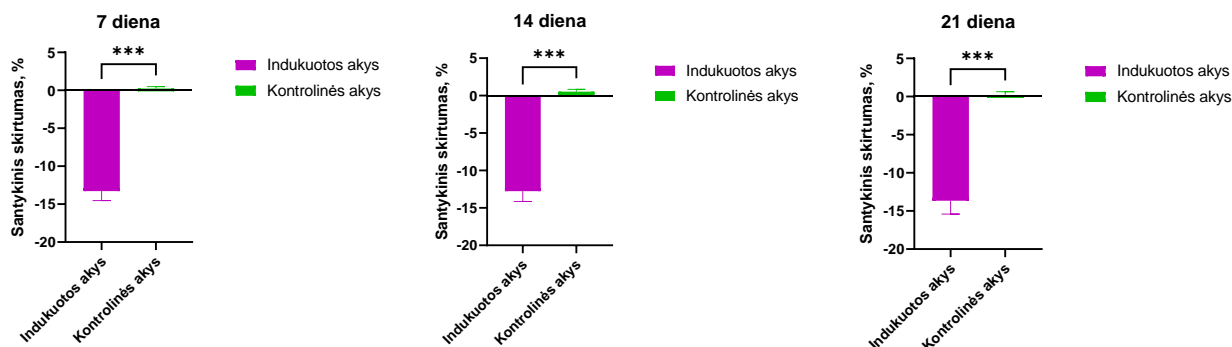
3.2.3. Visos tinklainės storio kitimas

Remiantis 3.6 paveiksle pateiktais duomenimis, galima daryti išvadą, jog po modelio sukėlimo praėjus 7, 14 ir 21 dienai, matomas reikšmingas tinklainės suplonėjimas, lyginant indukuotų ir kontrolinių akių, vidutines tinklainės storio reikšmes (dviejų krypčių vidurkių palyginimo ir dispersinė analizė (angl. *Two – way ANOVA*), $p < 0,001$).



3.6 pav. Vidutinio tinklainės storio palyginamas (atlikta dviejų krypčių vidurkių palyginimo ir dispersinė analizė (angl. *Two – way ANOVA*)) tarp kontrolinių bei indukuotų akių, skirtingomis DPI (ns – (angl. *not significant*) – statistiškai nereikšmingas; *** < 0,001)

Remiantis statistinės analizės duomenis, palyginus procentinius tinklainės storio skirtumus tarp kontrolinių ir indukuotų akių (nesuporuotų imčių t testas (angl. *Unpaired t test*)), rezultatai rodo statistiškai reikšmingą skirtumą po modelio sukėlimo praėjus 7, 14 ir 21 dienai (3.7 pav.). Po indukcijos praėjus 7 ir 14 dienomis tinklinė suplonėjo 14 %, o po 21 dienos – 15,3 %.



3.7 pav. Viso tinklainės storio santykinio skirtumo palyginamas palyginimas (atliktas nesuporuotų imčių *t* testas (angl. *Unpaired t test*)), tarp kontrolinių bei indukuotų akių, skirtingomis DPI (***) < 0,001)

Išemine reperfuzija indukuotose akyse, lyginant su kontrolinėmis, reikšmingai sumažėja vidutinis visos tinklainės storis (žr. 3.5 lentelę). Statistinė analizė (dviejų krypčių vidurkių palyginimo ir dispersinė analizė (angl. *Two – way ANOVA*)) atskleidė, kad vidutinio tinklainės storio skirtumas tarp kontrolinių ir indukuotų akių buvo statistiškai reikšmingas, po modelio sukėlimo praėjus 7, 14 ir 21 dienai. Didžiausias tinklainės suplonėjimas pastebimas indukuotose akyse, 21 dieną po indukcijos ($0,171 \pm 0,0029 \mu\text{m}$). Galima teigti, kad indukuotose akyse, kitaip nei kontrolinėse, matomas nuoseklus tinklainės storio sumažėjimas.

3.5 lentelė. Vidutinių tinklainės storio reikšmių ($\mu\text{m} \pm \text{SEM}$) palyginimas tarp kontrolinių ir indukuotų akių, DPI. Kontrolinės akys 7 diena (n = 25), 14 diena (n = 20) ir 21 diena (n = 14). Indukuotos akys 7 diena (n = 22), 14 diena (n = 19) ir 21 diena (n = 11)

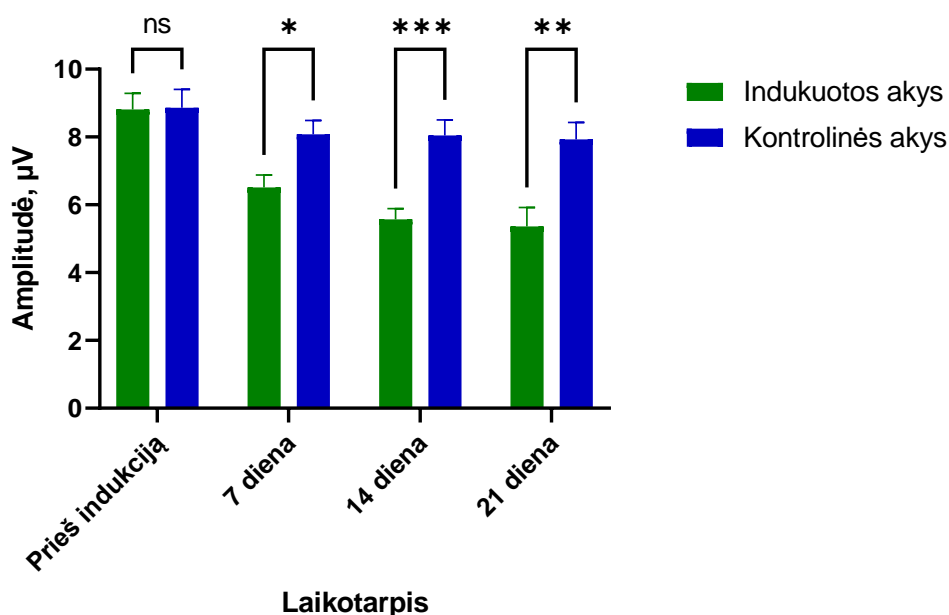
Tiriamosios grupės	Visos tinklainės storio vidutinės reikšmės ($\mu\text{m} \pm \text{SEM}$) prieš indukciją	Visos tinklainės storio vidutinės reikšmės ($\mu\text{m} \pm \text{SEM}$) praėjus 7 dienoms po indukcijos	Visos tinklainės storio vidutinės reikšmės ($\mu\text{m} \pm \text{SEM}$) praėjus 14 dienų po indukcijos	Visos tinklainės storio vidutinės reikšmės ($\mu\text{m} \pm \text{SEM}$) praėjus 21 dienai po indukcijos
Kontrolinės akys	$0,201 \pm 0,0006$	$0,202 \pm 0,0007$	$0,203 \pm 0,0008$	$0,202 \pm 0,0011$
Indukuotos akys	$0,200 \pm 0,0009$	$0,173 \pm 0,0024$	$0,174 \pm 0,0028$	$0,171 \pm 0,0029$

Apibendrinant duomenis, modelio indukcija lėmė reikšmingą visos tinklainės plonėjimą. Šis morfologinis tinklainės storio pokytis, po laikino kraujotakos sustabdymo ir atstatymo, laikui bėgant vis ryškėjo.

3.2.4. Tinklainės ganglinių ląstelių atsako į šabloninį stimulą kitimas

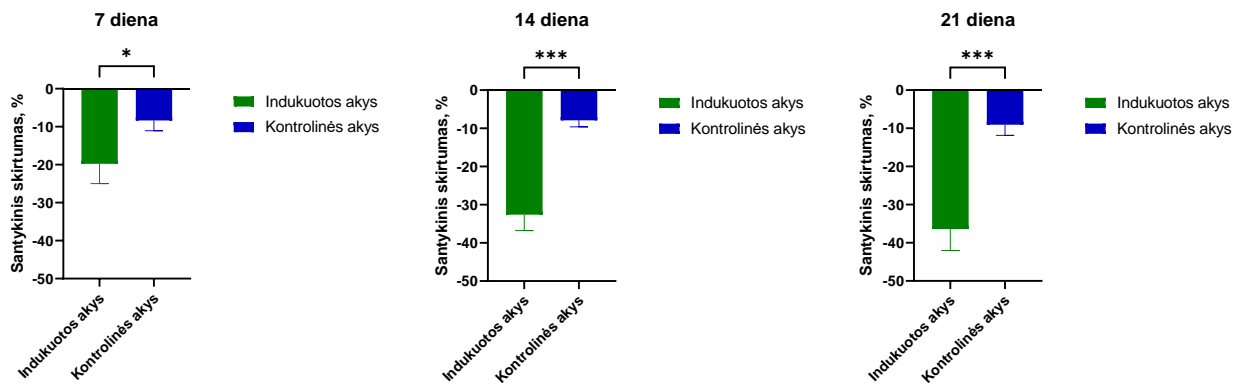
Eksperimento metu ganglinių ląstelių atsako į stimulą pokyčiai buvo stebimi 7, 14 ir 21 dienoms po indukcijos. Iš 3.8 paveiksle pateiktų rezultatų matoma, kad indukuotų akių pERG amplitudžių reikšmės buvo mažesnės nei kontrolinėse akyse. Statistinės analizės (dviejų krypčių vidurkių palyginimo ir dispersinė analizė (angl. *Two – way ANOVA*)) rezultatai parodė, kad vidutinių pERG amplitudžių skirtumas tarp kontrolinių ir indukuotų akių, matomas po modelio indukcijos praėjus 7 dienoms ($p < 0,05$). Taip pat, nustatyta, kad vidutinių pERG amplitudžių skirtumai tarp kontrolinės ir indukuotų akių buvo statistiškai reikšmingi 14 dieną ($p < 0,001$;) ir 21 dieną ($p < 0,01$).

Šabloninės elektoretinografijos (pERG) amplitudė



3.8 pav. Vidutinių pERG amplitudžių palyginimas (atlikta dviejų krypčių vidurkių palyginimo ir dispersinė analizė (angl. *Two – way ANOVA*)) tarp indukuotų ir kontrolinių akių, skirtingomis DPI (ns – (angl. not significant) statistiškai nereikšmingas; * $< 0,05$; ** $< 0,01$; *** $< 0,001$)

Atlikus nesuporuotų imčių t testą (angl. *Unpaired t test*), praėjus 7 dienoms po modelio indukcijos buvo matomas 19 % atsako į šabloninį stimulą susilpnėjimas ($p = 0,02$), praėjus 14 dienų – 31 % ($p < 0,001$), o praėjus 21 dienai 32 % ($p < 0,01$). Pastebima, kad išeminės reperfuzijos sukelta pažaida laikui bėgant progresuoja.

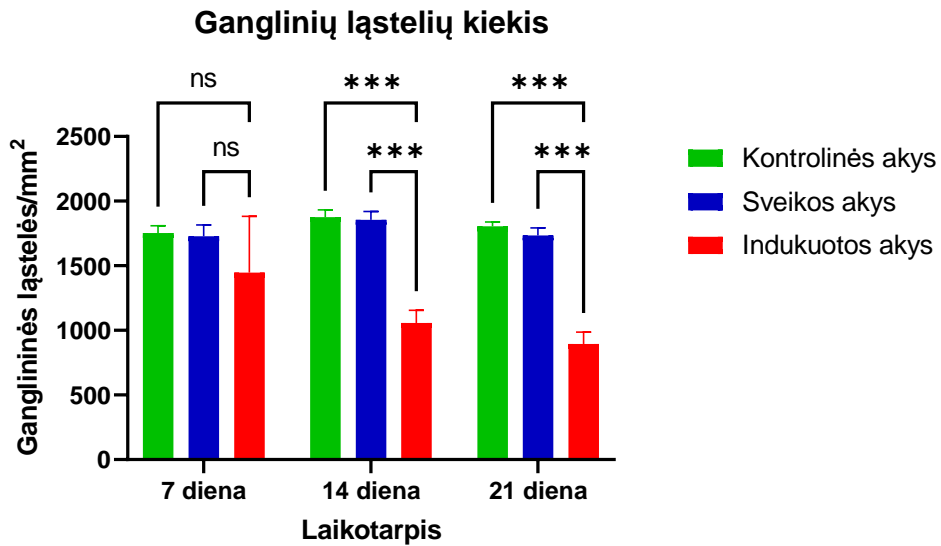


3.9 pav. pERG amplitudžių santykinio skirtumo palyginimas (atliktas nesuporuotų imčių t testą (angl. *Unpaired t test*)), tarp kontrolinių bei indukuotų akių, skirtingomis DPI (* < 0,05; *** < 0,001)

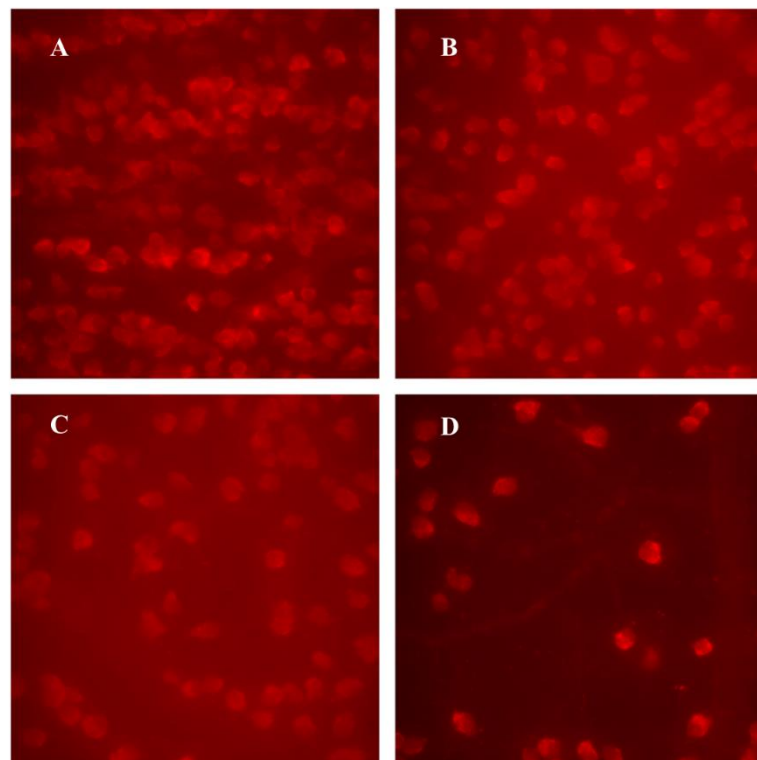
Rezultatai rodo, kad ganglinių ląstelių atsakas į stimulą po modelio sukėlimo, žymiai sumažėjo indukuotose akyse lyginant su kontrolinėmis. Didžiausias skirtumas buvo pastebėtas praėjus 21 dienai po indukcijos.

3.2.5. Tinklainės ganglinių ląstelių išgyvenamumas

Rezultatai parodė reikšmingą ganglinių ląstelių skaičiaus sumažėjimą indukuotose akyse, palyginti su kontrolinėmis ir sveikomis akimis, praėjus 14 ir 21 dienai po modelio indukcijos (dviejų krypčių vidurkių palyginimo ir dispersinė analizė (angl. *Two – way ANOVA*), $p < 0,001$) (3.10 ir 3.11 pav.).



3.10 pav. Vidutinio tinklainės ganglinių ląstelių kiekio palyginimas (atlikta dviejų krypčių vidurkių palyginimo ir dispersinė analizė (angl. *Two – way ANOVA*) sveikose, kontrolinėse bei indukuotose akyse, skirtingomis DPI (ns – (angl. *not significant*) statistiškai nereikšmingas;*** < 0,001)

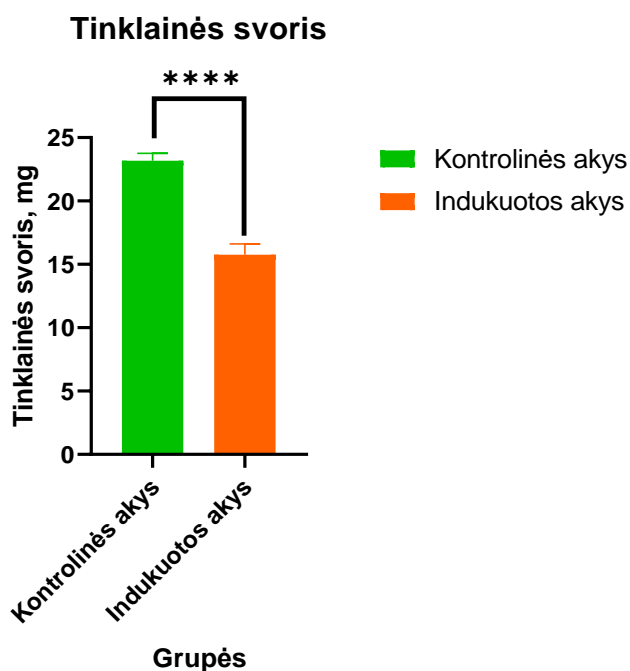


3.11 pav. Triušio RBPMS antikūniais žymėtos žiurkių tinklainių ganglinės ląstelės. A – sveikose akyse ganglinės ląstelės. B – indukuotose akys ganglinės ląstelės praėjus 7 dienoms po indukcijos. C – indukuotose akyse ganglinės ląstelės praėjus 14 dienų po indukcijos. D – indukuotose akyse ganglinės ląstelės praėjus 21 dienai po indukcijos

Statistinės analizės rezultatai rodo, kad lyginant vidutinį ganglinių ląstelių kiekį tarp kontrolinių, sveikų ir indukuotų akių 7 dieną po modelio indukcijos, skirtumų nėra. Tačiau atlikus santykinę analizę matoma, kad po 7 dienų ląstelių tankis sumažėjo 17 %. Praėjus 14 dienų ganglinių ląstelių skaičius sumažėjo 44 %, o po 21 dienos pastebėtas didžiausias ląstelių tankio sumažėjimas – 50 %.

3.2.6. Tinklainės svorio kitimas

Renkant audinius, buvo pastebėta, kad išemine reperfuzija indukuotų tinklainių svoris buvo trečdaliu mažesnis negu sveikos akies tinklainių (nesuporuotų imčių t testas (angl. *Unpaired t test*), $p < 0,001$) (3.12 pav. ir 3,17 lentelė).



3.12 pav. Tinklainės svorio palyginimas (atliktas nesuporuotų imčių t testas (angl. *Unpaired t test*) tarp kontrolinių ir indukuotų akių, **** $< 0,0001$)

3.7 lentelė. Absoliutaus ir santykinio skirtumo, vidutinio tinklainės svorio (mg ± SEM) palyginimas tarp indukuotų ir kontrolinių akių

Tiriamosios grupės	Tinklainės svoris mg ± SEM	Absoliutus skirtumas mg	Santykinis skirtumas %
Indukuotos akys	15,7548 ± 0,8552	- 7,415	- 32
Kontrolinės akys	23,17 ± 0,592	–	–

Apibendrinant visus rezultatus pastebima, kad išeminės reperfuzijos modelio indukcija lėmė tinklainės svorio sumažėjimą.

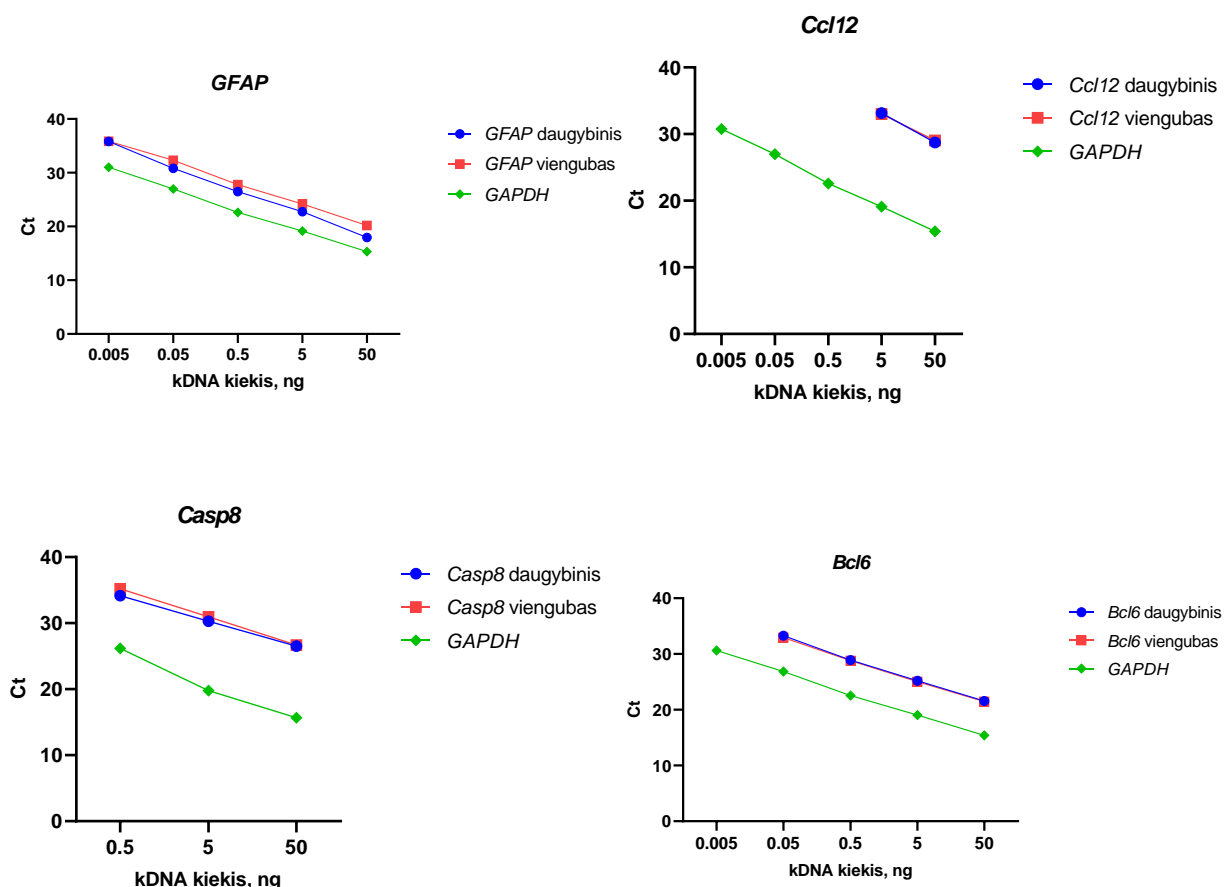
3.3. Išeminės reperfuzijos sukelti genų raiškos pokyčiai

3.3.1. Efektyvumo nustatymo testas

Siekiant užtikrinti DNR amplifikacijos tiesiškumą atskirų genų atvejais ir optimizuoti kDNR kieki reakcijoje, buvo atliekami amplifikacijos efektyvumo tyrimai. Tuo pačiu metu buvo optimizuojami ir geriausiai tinkančių genų porų deriniai daugybinei kPGR. Šiuo tikslu buvo naudojamos trejomis žymėmis žymėti TaqMan® genų ekspresijos pradmenų mišiniai – tiriamieji genai FAM (*Casp8*, *Ccl12*, *GFAP*, *Bcl6*). Endogeninė *18S* kontrolė ABY žyme, o *GAPDH* kontrolė VIC žyme. Efektyvumas buvo įvertintas, esant skirtingiems kDNR kiekiams reakcijoje: 50 ng, 5 ng, 0,5 ng, 0,05 ng, 0,005 ng. Tyrimo metu buvo išsikelti keli kriterijai. Pirmiausia, logaritminės kreivės, gautos iš PGR duomenų, nuožulnumas turėjo svyruoti nuo -3,1 iki -3,6. Nuožulnumas parodo ryšį tarp kDNR koncentracijos logaritmo ir ciklo slenksčio (Ct) verčių. Reikšmės, esančios šiame diapazone rodo amplifikacijos efektyvumą. Antra, buvo nustatomos DNR skiedimo (standartinės kreivės) koreliacinės koeficiento (R^2) reikšmės nurodančios, kaip C_q vertės koreliuoja su praskiedimais (arba kaip gerai taškai „atitinka liniją“). Patikimiems rezultatams R^2 vertė turėjo būti $\geq 0,980$. Taip pat buvo nustatytas kPGR efektyvumas, nurodantis kaip efektyviai polimerazė sintetina DNR per kiekvieną ciklą nepriklausomai nuo koncentracijos, 90 % - 110 % efektyvumas buvo laikomas siekiamybe. Be to, buvo nustatytos vidutinės Ct vertės, esant skirtingoms kDNR koncentracijoms. Ct reikšmė parodė ciklo skaičių, kada fluorescencinis signalas viršija tam tikrą slenkstį, taip nurodant tiriamojo geno buvimą. Ct vidurkio analizė, esant skirtingoms koncentracijoms, padeda nustatyti optimalią kDNR koncentraciją patikimam amplifikavimui. Taip pat buvo nustatomas Ct reikšmių skirtumas tarp daugybinės ir viengubos kPGR, kuris buvo laikomas tinkamu, esant $< 3,0$ %. Mažas Ct skirtumas rodo mažą pakartojimų kintamumą, užtikrinantį PGR rezultatų atkuriamumą ir patikimumą. Taip pat buvo įvertintas Ct verčių standartinis nuokrypis (SD), esant pasirinktam kDNR kiekiui. SD matuoja Ct verčių kintamumą pakartojimuose, esant tam tikrai koncentracijai. SD vertės, mažesnės nei 0,15, buvo laikomos tinkamomis. Šie reikalavimai buvo gairės, leidžiančios įvertinti PGR efektyvumą, nustatyti optimalią kDNR koncentraciją ir įvertinti endogeninio kontrolinio geno tinkamumą normalizavimui.

Visų tirtų genų koreliacijos koeficiento R^2 reikšmės buvo didesnės nei 0,98. Tačiau nuožulnumo vertė varijavo nuo - 3,806 iki - 4,331, o efektyvumas – nuo 70,18 iki 83,11 proc. (žr. 3.8 lentelę). Daugybinės kPGR paskutinis standartinės kreivės taškas (0,005 ng/reakcijoje) buvo

detektuojamas tik su *GFAP* pradmenimis (3.13 pav.). Iš pateikto grafiko matoma, kad *Ccl12* yra labai mažai ekspresuotas tiriamuosiuose audiniuose ir buvo detektuojamas tik dviejuose taškuose, todėl šio geno standartinės kreivės nebuvo negalima vertinti pagal nustatytus kriterijus. Šio geno atveju buvo vertinamas Ct verčių skirtumas tarp daugybinės ir viengubos reakcijos bei SD tarp šių verčių pasikartojimų. Atlikus analizę pastebima, kad Ct skirtumai tarp viengubos ir daugybinės *Ccl12* kPGR buvo nedideli (iki 1 %), tačiau esant 5 ng kDNR reakcijoje, matomas didelis išsibarstymas, kurį rodo aukštos SD vertės. Kuomet reakcijoje yra 50 ng kDNA išsibarstymas yra daug mažesnis. Lyginant *Bcl6* viengubos ir daugybinės kPGR reakcijų rezultatus pastebima, kad nors nuožulnumo vertė bei efektyvumas nepatenka į išsikeltų kriterijų diapozoną, standartinės kreivės parametrai tarp daugybinės ir viengubos reakcijos nesiskiria, o Ct skirtumas ir SD pasirinktame kDNR kiekyje reakcijoje skiriasi nedaug. Tačiau, lyginant *Casp8* ir *GFAP* viengubų ir daugybinių reakcijų rezultatus, matomas didelis Ct skirtumas, o tai rodo, kad galbūt įvyko nespecifinė amplifikacija, todėl *GAPDH* nėra tinkamas poroje su šiais genais. Siekiant užtikrinti DNR amplifikacijos tiesiškumą, *Bcl6* tolimesniems tyrimams buvo pasirinktas 5 ng kDNR kiekis reakcijoje, o *Ccl12* – 50 ng.

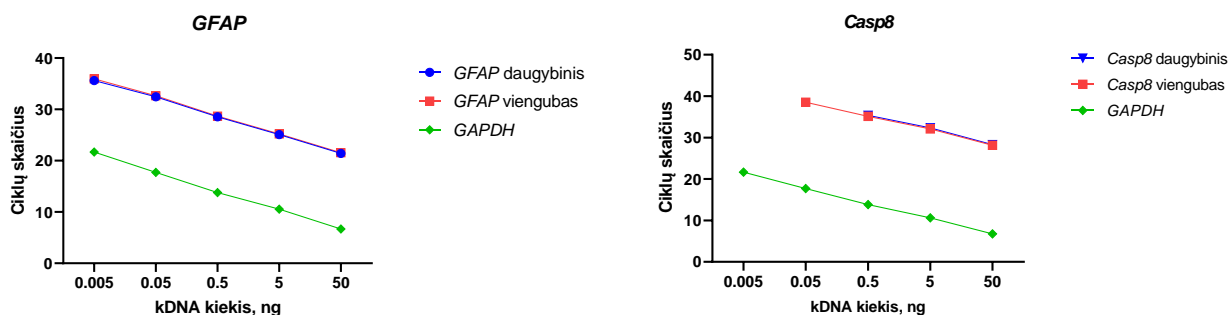


3.13 pav. Tiriamųjų genų *Casp8*, *GFAP*, *Bcl6* ir *Ccl12* standartinių kreivių rezultatai su *GAPDH* endogenine kontrole

3.8 lentelė. Tiriamųjų genų (*Bcl6*, *Casp8*, *Ccl12*, *GFAP*) standartinių kreivių parametrai kPGR su *GAPDH* endogenine kontrole

Genas	Nuožulnumo vertė	R ²	Efektyvumas, %	CT skirtumas (5 ng/reakc.), %	SD (5 ng/reakc.)	CT skirtumas (50 ng/reakc.), %	SD (50 ng/reakc.)
<i>Bcl6</i> (viengubas)	- 3,806	0,998	83,11	- 0,60	0,106	-	-
<i>Bcl6</i> (daugybiniš)	- 3,852	0,997	81,80		0,036		-
<i>Casp8</i> (viengubas)	- 4,256	0,987	71,78	2,16	0,168	-	-
<i>Casp8</i> (daugybiniš)	- 3,811	0,995	82,97		0,300		-
<i>Ccl12</i> (viengubas)	-	-	-	- 0,42	0,217	1,00	0,135
<i>Ccl12</i> (daugybiniš)	-	-	-		0,568		0,109
<i>GFAP</i> (viengubas)	- 3,974	0,997	78,51	5,93	0,030	-	-
<i>GFAP</i> (daugybiniš)	- 4,331	0,998	70,18		0,025		-

Remiantis ankstesniais rezultatais, kurie atskleidė, kad *GAPDH* kaip endogeninė kontrolė tiriant *Casp8* ir *GFAP* genų ekspresiją nėra tinkama, buvo pasirinkta alternatyvi kontrolė – *18S*. Tiriamųjų genų koreliacijos koeficiento R² reikšmės buvo didesnės nei 0,99. Nuožulnumo vertė varijavo nuo - 3,421 iki - 3,624, o efektyvumas – nuo 88,77 iki 96,03 proc. (žr. 3.9 lentelę). Taip pat pastebima, kad *Casp8* daugybiniš kPGR paskutinis standartinės kreivės taškas (0,005 ng/reakcijoje) buvo nedetektuojamas (3.14 pav.). Rezultatai rodo, kad daugybiniš *GFAP* kPGR reakcijoje efektyvumo reikšmės buvo didesnės, o SD mažesnės, lyginant su viengubo kPGR rezultatais. Abiejų tirtų genų standartinės kreivės atitiko siektinus kriterijus. Siekiant užtikrinti DNR amplifikacijos tiesiškumą, *GFAP* ir *Casp8* tolimesniems tyrimams buvo pasirinktas 5 ng kDNR kiekis reakcijoje.



3.14 pav. Standartinių *GFAP* ir *Casp8* genų amplifikacijų kreivės

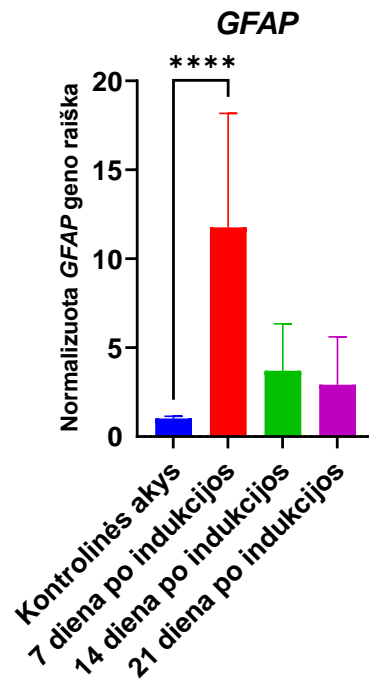
3.9 lentelė. *Casp8* ir *GFAP* standartinių kreivių parametrai kPGR

Genas	Nuožulnumo vertė	R ²	Efektyvumas, %	CT skirtumas (5 ng/reakc.), %	SD (5 ng/reakc.)
<i>GFAP</i> (viengubas)	- 3,624	0,999	88,77	0,60	0,038
<i>GFAP</i> (daugybinis)	- 3,589	0,998	89,96		0,024
<i>Casp8</i> (viengubas)	- 3,421	0,995	96,03	- 0,76	0,169
<i>Casp8</i> (daugybinis)	- 3,553	0,994	91,19		0,040

Efektyvumo testas atskleidė, kad *GAPDH* genas buvo tinkamas kaip endogeninė kontrolė *Ccl12* ir *Bcl6* genų ekspresijai normalizuoti. Tačiau, tiriant *Casp8* ir *GFAP* genų ekspresiją buvo nustatyta, kad normalizavimas naudojant *18S* kaip endogeninę kontrolę davė tikslesnius rezultatus. Be to, eksperimentu buvo siekiama nustatyti optimalų kDNR kiekį reakcijoje, reikalingą efektyviai kiekybinei realaus laiko PGR analizei. Duomenys atskleidė, kad 5 ng reakcijoje buvo optimalu tiriant *GFAP*, *Casp8* ir *Bcl6* genų ekspresiją. Tačiau, 50 ng kiekis reakcijoje buvo tinkamesnis *Ccl12* geno ekspresijos analizei.

3.3.2. *GFAP* geno raiškos pokyčiai

Atlikus duomenų statistinę analizę, pastebėta, kad jau 7 dieną po modelio indukavimo, vidutinė *GFAP* raiška, lyginant indukuotų akių (n = 6) su kontrolinėmis (n = 8), statistiškai reikšmingai padidėjo (*Dunnnett* 'o daugybinio palyginimo testas (angl. *Dunnnett's multiple comparisons test*), $p < 0,0001$) (3.15 pav.).

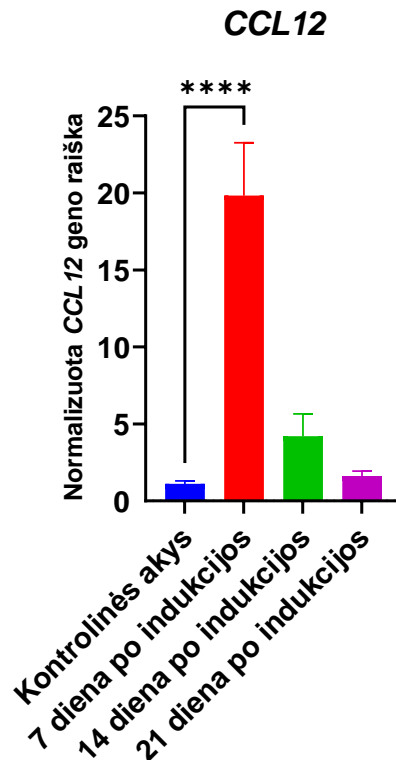


3.15 pav. Normalizuotos *GFAP* raiškos palyginimas (atliktas *Dunnnett' o* daugybinio palyginimo testas (angl. *Dunnnett's multiple comparisons test*)) su kontrolinėmis akimis, skirtingomis DPI (**** < 0,0001)

Tačiau, 14 ir 21 dieną po modelio sukėlimo, *GFAP* ekspresijos skirtumo tarp indukuotų ir kontrolinių akių, nepastebėta. Vidutinės *GFAP* ekspresijos reikšmės indukuotose akyse reikšmingai nesiskyrė, lyginant su kontrolinėmis, po išėminės reperfuzijos praėjus 14 (n = 6) ir 21 dienai (n = 7)(p = 0,36 ir p = 0,5931). Be to, iš 3.15 paveiksle pateiktų duomenų pastebima, kad atskiruose gyvūnuose geno ekspresijos lygis skyrėsi. Šie skirtumai gali būti siejami su išėminės reperfuzijos sunkumo lygiu, kuris pastebėtas atliekant optinę koherentinę tomografiją. Apibendrinant galima daryti išvadą, kad *GFAP* geno ekspresija buvo žymiai padidėjusi praėjus 7 dienoms po modelio indukcijos, o tai taip pat rodo aktyvuotų astrocitų padidėjimą – astrogliozę. Vis dėlto, 14 ir 21 dienomis, nebuvo statistiškai reikšmingų genų ekspresijos lygių skirtumų, palyginti su kontroline grupe.

3.3.3. *Ccl12* geno raiškos pokyčiai

Tyrimu siekta nustatyti *Ccl12* geno ekspresijos pokyčius, atsirandančius dėl laikinos tinklainės kraujotakos nutraukimo ir atkūrimo. Statistinės analizės rezultatai atskleidė, kad indukuotose akyse, lyginant su kontrolinėmis (*Dunnnett' o* daugybinio palyginimo testas (angl. *Dunnnett's multiple comparisons test*), p < 0,0001; n = 5), *Ccl12* ekspresija buvo reikšmingai padidėjusi, praėjus 7 dienoms po modelio sukėlimo (žr. 3.16 pav.).

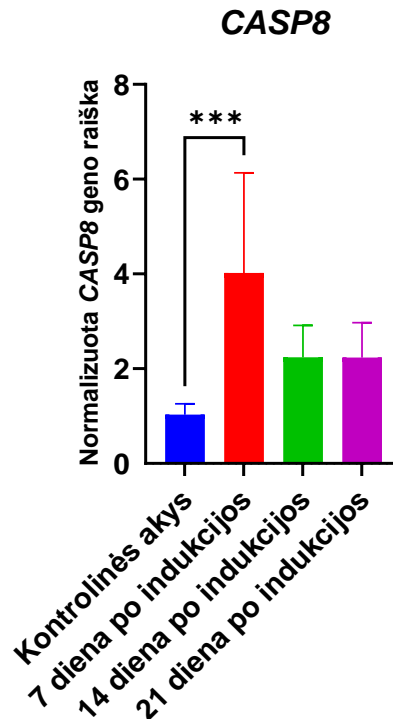


3.16 pav. Normalizuotos *Ccl12* raiškos palyginamas (atliktas *Dunnnett' o* daugybinio palyginimo testas (angl. *Dunnnett's multiple comparisons test*)) su kontrolinėmis akimis, skirtingomis DPI (**** < 0,0001)

Rezultatai taip pat parodė, kad po modelio sukėlimo praėjus 14 ir 21 dienai, *Ccl12* raiška nebuvo padidėjusi. Po išėminės reperfuzijos praėjus 14 (n = 6) ir 21 dienai (n = 6) (p = 0,3423 ir p = 0,9904), vidutinės *Ccl12* ekspresijos reikšmės indukuotose akyse, lyginant su kontrolinėmis reikšmingai nesiskyrė. Taip pat, iš 3.16 paveikslo, matoma, kad *Ccl12* raiškos lygis skyrėsi tarp gyvūnų, o tai galima susieti su pastebėtu modelio sunkumu. Iš gautų duomenų galima daryti išvadą, jog *Ccl12* ekspresija reikšmingai padidėjo praėjus 7 dienoms po išėminės reperfuzijos, o tai parodo, kad imuninės ląstelės buvo pernešamos į pažeidimo vietą. Vis dėlto, 14 ir 21 dienomis, nebuvo matomas reikšmingas geno raiškos padidėjimas.

3.3.4. *Casp8* geno raiškos pokyčiai

Atlikus statistinę duomenų analizę pastebėta, kad praėjus 7 dienoms po modelio indukcijos, *Casp8* ekspresija reikšmingai padidėjo (*Dunnnett' o* daugybinio palyginimo testas (angl. *Dunnnett's multiple comparisons test*), p = 0,0001), lyginant indukuotų (n = 6) ir kontrolinių akių reikšmes (n = 8), kaip parodyta 3.17 paveiksle.

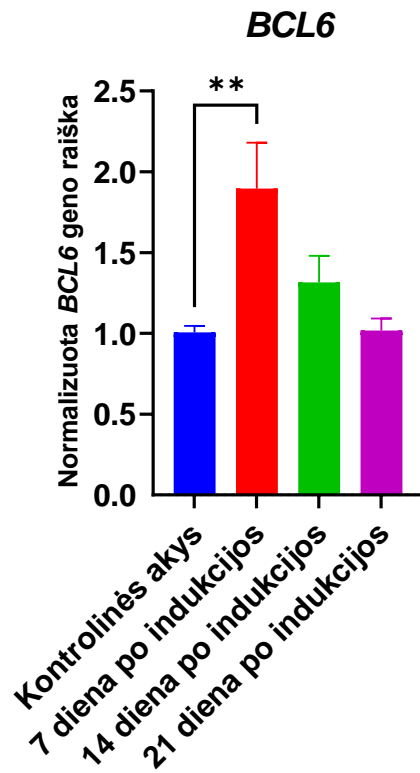


3.17 pav. Normalizuotos *Casp8* raiškos palyginamas (atliktas *Dunnnett' o* daugybinio palyginimo testas (angl. *Dunnnett's multiple comparisons test*)) su kontrolinėmis akimis, skirtingomis DPI (*** < 0,001)

Tačiau, 14 (n = 6) ir 21 (n = 7) dieną po tinklainės išeminės reperfuzijos, reikšmingo vidutinės *Casp8* ekspresijos skirtumo tarp indukuotų ir kontrolinių akių nebuvo (p = 0,1242 ir p = 0,1073). Be to, buvo nustatyta, kad *Casp8* ekspresijos lygiai tarp gyvūnų skiriasi, o tai gali būti siejama su sukkelto modelio sunkumo skirtumais (3.17 pav.). Apibendrinant galima sakyti, kad tinklainės išeminė reperfuzija lėmė statistiškai reikšmingą *Casp8* ekspresijos padidėjimą, tai rodo apoptozės kelio aktyvavimą, kuris buvo pastebėtas jau po 7 dienų. Tačiau, po 14 ir 21 dienos nebuvo pastebėta jokių reikšmingų *Casp8* ekspresijos skirtumų, tarp kontrolinių ir indukuotų akių.

3.3.5. *Bcl6* geno raiškos pokyčiai

Kaip parodyta 3.18 pav., atlikus statistinę duomenų analizę, buvo nustatyta, kad praėjus 7 dienoms po modelio indukcijos, *Bcl6* ekspresija žymiai padidėjo indukuotose akyse (n = 7), palyginti su kontrolinėmis (n = 8)(p = 0,0019).



3.18 pav. Normalizuotos *Bcl6* raiškos palyginimas (atliktas *Dunnnett*‘o daugybinio palyginimo testas (angl. *Dunnnett's multiple comparisons test*)) su kontrolinėmis akimis, skirtingomis DPI (** < 0,01)

Vidutinės *Bcl6* ekspresijos reikšmės tarp indukuotų ir kontrolinių akių reikšmingai nesiskyrė, praėjus 14 (n = 7) ir 21 (n = 7) dienai po tinklainės išeminės reperfuzijos indukavimo (p = 0,4115 ir p> 0,9999). Be to, buvo pastebėta, kad *Bcl6* raiška tarp gyvūnų skiriasi, o tai gali būti siejama su sukkelto modelio sunkumo skirtumais (3.18 pav.). Šie rezultatai rodo, kad *Bcl6* ekspresija žymiai padidėja praėjus 7 dienoms po modelio indukcijos. Tačiau, 14 ir 21 dieną po tinklainės išeminės reperfuzijos nebuvo pastebėti *Bcl6* raiškos pakitimai.

4. REZULATŲ APTARIMAS

4.1. Tinkamo natrio chlorido slėgio nustatymas

Vienas iš dažniausiai naudojamų tinklainės išeminės reperfuzijos indukcijai metodų yra akispūdžio padidinimas į priekinę akies kamerą leidžiant natrio chlorido tirpalą. Mokslinėje literatūroje aprašomi skirtingi natrio chlorido slėgiai, skirti šio modelio indukcijai, o dažniausiai naudojamas diapazonas yra nuo 110 mmHg iki 160 mmHg. Pavyzdžiui, Barakat ir kt., 2012 bei Peng ir kt., 2008 tyrimuose, naudojo 120 mmHg ir 150 mmHg slėgį išeminei reperfuzijai sukelti. Todėl, siekiant nustatyti tinkamą slėgį išeminei reperfuzijai indukuoti, buvo išbandytas įvairių slėgių diapazonas, įskaitant 120 mmHg ir 150 mmHg, kurie dažniausiai naudojami, ir 200 mmHg ir 250 mmHg, kurie nėra plačiai aprašyti literatūroje. Iš 3.1 lentelėje pateiktų duomenų matoma, kad palyginus akispūdžio reikšmes visose eksperimentinėse grupėse, pastebimas reikšmingas skirtumas, lyginant su kontroline grupe. Be to, grafinis duomenų vaizdas (kaip parodyta 3.1 pav.) rodo, kad IOP reikšmės, visose grupėse išliko didelės per visą indukcijos laikotarpį. Statistinė analizė atskleidė, kad tarp kontrolinės grupės ir 120 mmHg bei 150 mmHg grupių reikšmingų skirtumų tarp ganglinių ląstelių tankio nebuvo. Tačiau, skirtumai buvo pastebėti tarp kontrolinės grupės ir 200 mmHg bei 250 mmHg grupių. Natrio chlorido spaudimui, esant 200 mmHg ganglinių ląstelių skaičius sumažėjo 75 %, o 250 mmHg – 53 %. Manoma, kad 250 mmHg slėgis buvo per didelis, kadangi buvo matomas natrio chlorido nutekėjimas iš akies indukcijos metu. Kawai ir kt., 2001 atliko tyrimą su *Brown Norway* žiurkėmis, kuriame naudojo 90 – 110 mmHg natrio chlorido spaudimą, tačiau ilgesnį indukcijos laiką – 75 minutes. Šiame tyrimo, išeminės reperfuzijos indukcija užtruko 60 minučių, todėl manoma esant mažesniai natrio chlorido spaudimui indukcija nebuvo sėkminga. Apibendrinant tyrimo, kuris buvo naudojamas ištirti akispūdžio ir tinklainės ganglinių ląstelių išgyvenamumo ryšį rezultatus pastebėta, kad išeminės reperfuzijos modelio indukcija buvo sėkminga, esant 200 mmHg natrio chlorido tirpalo slėgiui. Todėl, šis slėgis buvo laikomas tinkamu naudoti tolesniuose tyrimuose.

4.2. Išeminės reperfuzijos sukelti funkciniai ir struktūriniai pokyčiai

Ganglinių ląstelių apoptozė, tinklainės sluoksnių degeneracija ir tinklainės funkcijos sutrikimas yra išeminės reperfuzijos sukeltos patologijos, kurios gali sąlygoti regos sutrikimus. Šiuo tyrimu buvo siekiama išsiaiškinti išeminės reperfuzijos sukeltus morfologinius ir fiziologinius tinklainės pokyčius. Ganglinės ląstelės yra atsakingos už vaizdinės informacijos perdavimą iš tinklainės į smegenis. Bipolinės ląstelės sužadina ir aktyvuoja ganglines ląsteles, kurios tuomet generuoja

veikimo potencialus kurie toliau sklinda aksonais, sudarančiais optinį regos nervą ir taip vaizdinę informacija yra perduodama į smegenis (Kim ir kt., 2021). Ganglinių ląstelių funkciją galima įvertinti pasitelkus pERG metoda. Šio tyrimo rezultatai rodo, kad išeminė reperfuzija sukelia ganglinių ląstelių funkcijos pokyčius. Reikšmingas pERG amplitudės sumažėjimas buvo pastebėtas indukuotose akyse, palyginant su kontrolinėmis akimis jau 7 dieną po indukcijos ir toliau mažėjo 14 ir 21 dienomis (3.8 pav.). Didžiausias amplitudės sumažėjimas pastebimas 21 diena – 32 %, rodantis susilpnėjusią ganglinių ląstelių funkciją tinklainėje. Tyrimo metu taip pat buvo siekiama išaiškinti išeminės reperfuzijos sukeltus morfologinius pokyčius, taikant optinės koherentinės tomografijos metoda, leidžiantį vizualizuoti tinklainę ir įvertinti jos pokyčius. Rezultatai atskleidžia reikšmingą vidinės tinklainės sluoksnio suplonėjimą indukuotose akyse, palyginant su kontrolinėmis akimis skirtingais laiko momentais (7, 14 ir 21 dieną)(3.4 pav.). Didžiausias vidinės tinklainės sluoksnio storio skirtumas buvo praėjus 21 dienai (38,75 %), o mažiausias – praėjus 7 dienoms (29 %) po indukcijos (žr. 3.4 lentelę). Be to, bendras tinklainės storis indukuotose akyse buvo žymiai plonesnis, palyginant su kontrolinėmis akimis. Praėjus 14 dienų po modelio indukcijos visa tinklainė suplonėjo 14 %, o po 21 dienos – 15,3 % (3.6 pav.). Duomenys rodo, kad išeminė reperfuzija lėmė vidinio bei visos tinklainės storių plonėjimą. Šie pokyčiai laikui bėgant progresavo. Taip pat, tyrimo metu buvo įvertinamas ganglinių ląstelių išgyvenamumas skirtingais laiko intervalais po išeminės reperfuzijos modelio indukcijos. Praėjus 7 dienoms ganglinių ląstelių tankis mm^2 sumažėjo 17 %, po 14 dienų 44 %, o praėjus 21 dienai matomas didžiausias ląstelių tankio sumažėjimas – 50 % (3.10 ir 3.11 pav.). Tinklainės išeminės reperfuzijos indukcija laikui bėgant žymiai sumažina ganglinių ląstelių išgyvenamumą ir sukelia ganglinių ląstelių apoptozę. Išeminės reperfuzijos modelio indukcija taip pat turėjo įtakos tinklainės svoriui. Indukuotų akių tinklainės svėrė 32 % mažiau nei kontrolinių. Galima teigti, kad išeminė reperfuzija sukėlė ganglinių ląstelių apoptozę, kuri lėmė funkcinis bei morfologinius tinklainės pokyčius. Gauti rezultatai yra panašūs į Kim ir kt. 2013 atliktą tyrimą su gyvūnų modeliais, kurio metu taip pat buvo matomas tinklainės plonėjimas, ganglinių ląstelių kiekio ir atsako į stimulą amplitudės mažėjimas po išemijos reperfuzijos pažeidimo praėjus 1, 2, 3 ir 4 savaitėms. Apibendrinant galima teigti, kad išeminė reperfuzijos modelis buvo sėkmingai indukuotas *Brown Norway* žiurkėse, turėjo neigiamos įtakos tiek ganglinių ląstelių išgyvenamumui, tiek tinklainės funkcijai bei morfologijai, o šie pokyčiai laikui bėgant progresavo.

4.3. Išeminės reperfuzijos sukeltų genų raiškos pokyčių susiejimas su morfologiniais ir fiziologiniais pakeitimais

Šiuo tyrimu buvo siekiama išsiaiškinti, kaip laikini kraujotakos sutrikimai paveikė *GFAP*, *Ccl12*, *Casp8* ir *Bcl6* genų ekspresiją. Tuomet, bandyta susieti pastebėtus funkcinis ir struktūrinius pokyčius, atsižvelgiant į šių genų ekspresuojamų baltymų funkcijas.

Remiantis rezultatais, atskleistas statistiškai reikšmingas *GFAP* geno ekspresijos padidėjimas indukuotose akyse, palyginti su kontroline grupe, praėjus 7 dienoms po modelio indukcijos. Tačiau, 14 ir 21 dieną po indukcijos, reikšmingų *GFAP* ekspresijos skirtumų tarp indukuotų ir kontrolinių akių nepastebėta, o tai rodo, kad jau 7 dieną galėjo susidaryti pakankamai baltymo, aktyvuojančio astrocitus (3.15 pav.). Tyrimo metu pastebėti *GFAP* geno ekspresijos pokyčiai, gali būti susiję su tinklainės sluoksnių plonėjimu, sumažėjusiu ganglinių ląstelių atsaku į dirgiklius ir sumažėjusiu ganglinių ląstelių išgyvenamumu. Astroglizė, kuriai būdinga padidėjusi *GFAP* ekspresija, yra atsakas į įvairius nervų pažeidimus, įskaitant tinklainės išeminę reperfuziją. Astroglizė apima astrocitu aktyvavimą ir dauginimąsi, dėl kurio išsiskiria uždegiminiai citokinai, chemokinai ir augimo faktoriai. Manoma, kad šiame tyrime pastebėtas *GFAP* geno ekspresijos padidėjimas atsirado dėl astrocitu aktyvacijos ir astroglizės vystymosi. Remiantis literatūra, glijos randai, atsiradę dėl traumos, gali apriboti deguonies, maistinių medžiagų ir neurotrofinių veiksnių, svarbių tinklainės ląstelių, įskaitant ganglines ląsteles, išlikimui ir funkcionavimui. Glijos randų susidarymas ir astroglizė gali sutrikdyti normalią ląstelių morfologiją ir tinklainės funkciją (de Hozir ir kt., 2016). Manoma, kad tai galėjo prisidėti prie tyrimo metu pastebėto tinklainės sluoksnių plonėjimo, kadangi yra žinoma, kad glijos randai gali deformuoti tinklainės audinį. Remiantis literatūra, pakitusi mikroaplinka, atsirandanti dėl astroglizės ir glijos randų susidarymo, gali turėti įtakos ganglinių ląstelių funkcijai (de Hoz ir kt., 2016). Pastebėtas sumažėjęs ganglinių ląstelių atsakas į dirgiklius eksperimento metu gali būti susijęs su pakitusiomis neuronų ir glijos sąveikomis ir sutrikusiu signalo perdavimu tinklainėje. Žinoma, kad aktyvuotų astrocitu išskiriami citokinai bei chemokinai gali prisidėti prie neurouždegimo, dar labiau pablogindami ganglinių ląstelių funkciją (de Hoz ir kt., 2016). Manoma, kad pastebėtas ganglinių ląstelių skaičiaus sumažėjimas yra astroglizės pasekmė, kadangi glijos rando susidarymas ir uždegiminiai procesai gali sukelti ganglinių ląstelių degeneraciją ir mirtį.

Tyrimo rezultatai rodo, kad trumpalaikis tinklainės kraujotakos sutrikdymas sukelia reikšmingą *Ccl12* geno ekspresijos pokytį indukuotose akyse, praėjus 7 dienoms po indukcijos. Tačiau, 14 ir 21 dieną reikšmingų *Ccl12* ekspresijos skirtumų tarp indukuotų ir kontrolinių akių nepastebėta, o tai rodo, kad galbūt jau 7 dieną galėjo susidaryti pakankamai baltymo, imuninėms ląstelėms pernešti (3.16 pav.). Manoma, kad pastebėti *Ccl12* geno ekspresijos pokyčiai gali būti susieti su tinklainės sluoksnių plonėjimu, mažesniu ganglinių ląstelių tankiu ir sumažėjusiu ganglinių ląstelių atsaku į dirgiklius. *Ccl12* ekspresijos padidėjimas praėjus 7 dienoms po indukcijos rodo, kad tinklainėje yra imuninių ląstelių infiltracija, kuri gali prisidėti prie pastebėtų patologinių pokyčių. Žinoma, kad tinklainės sluoksnių plonėjimas gali būti įvairių veiksnių, įskaitant neurouždegimą ir ląstelių mikroaplinkos pokyčius, pasekmė. Tyrime pastebėtas mažėjantis ganglinių ląstelių išgyvenamumas, gali būti susijęs su keliais veiksniais, kuriems įtakos turėjo *Ccl12* ekspresijos pokyčiai. Remiantis

literatūra žinoma, kad imuninių ląstelių įdarbinimas ir aktyvavimas, kai kuriais atvejais gali prisidėti prie neuronų pažeidimo ir ląstelių apoptozės. Infiltruojančios imuninės ląstelės gali išskirti citotoksines medžiagas arba sukelti uždegiminius procesus, kurie neigiamai veikia ganglinių ląstelių išgyvenamumą. Dėl uždegimo atsiradusi pakitusi mikroaplinka gali modifikuoti signalinius kelius, būtinus normaliam ląstelių funkcionavimui (Schuetz ir Thanos, 2004). Be to, sumažėjęs ganglinių ląstelių atsakas į dirgiklius gali būti susijęs su pakitusia neuronų ir glijos sąveika tinklainėje. Citokinai bei chemokinai, kuriuos išskiria imuninės ląstelės, gali sutrikdyti įprastus signalinius kelius ir sutrikdyti signalo perdavimą tinklainėje, todėl sumažėja ganglinių ląstelių atsakas į dirgiklius.

Casp8 yra pagrindinis genas, dalyvaujantis apoptoziniuose keliuose. Tyrimo rezultatai parodė reikšmingą kaspazės-8 ekspresijos padidėjimą, po tinklainės išeminės reperfuzijos indukcijos. Šis pokytis buvo pastebėtas praėjus 7 dienoms po modelio sukėlimo (3.17 pav.). Tačiau, svarbu paminėti, kad reikšmingų *Casp8* ekspresijos skirtumų tarp kontrolinių ir indukuotų akių 14 ir 21 dienomis nepastebėta. Tai rodo, kad kaspazės-8 baltymo kiekis galėjo būti pakankamas, apoptozinių kelių inicijavimui. Yra žinoma, kad tinklainės išeminė reperfuzija skatina reaktyviųjų deguonies rūšių gamybą. ROS savo ruožtu gali suaktyvinti kaspazių inicijuojamas apoptotines kaskadas tinklainės ląstelėse. Šių apoptozinių kelių aktyvacija gali sukelti įvairius ląstelių pokyčius, įskaitant DNR pažeidimus, lipidų peroksidaciją ir mitochondrijų funkcijos sutrikimus (Yang ir kt., 2019). Remiantis literatūra žinoma, kad apoptotiniai procesai gali lemti tinklainės sluoksnių plonėjimą (Kim ir kt., 2013). Eksperimento metu pastebėta padidėjusi *Casp8* ekspresija rodo, kad tinklainės ląstelėse buvo aktyvuoti apoptotiniai keliai. Tai galėtų paaiškinti pastebėtą visos tinklainės ir vidinės tinklainės sluoksnių plonėjimą. Be to, eksperimento metu pastebėtas ganglinių ląstelių tankio sumažėjimas. Šiam pokyčiui manoma, kad įtakos galėjo turėti padidėjusi kaspazės-8 ekspresija. Tyrimo metu pastebėti ganglinių ląstelių kiekio pokyčiai gali sukelti ląstelių funkcijos pakitimus. Atsižvelgiant į ganglinių ląstelių vaidmenį perduodant vaizdinę informaciją, sumažėjęs šių ląstelių tankis galėjo turėti įtakos atsakų sugeneravimui į dirgiklius, kurie buvo pastebėti atlikus šabloninės elektroretinografijos analizę.

Praėjus 7 dienoms po modelio indukcijos, rezultatai parodė reikšmingą *Bcl6* raiškos padidėjimą indukuotose akyse (3.18 pav.). Tačiau, 14 ir 21 dieną nebuvo pastebimų *Bcl6* ekspresijos pokyčių. Tai rodo, kad šis padidėjimas galėjo būti laikinas atsakas arba vėlesniais laiko momentais daugiau įtakos turėjo kiti veiksniai, tokie kaip ROS ir oksidacinis stresas. *Bcl6* yra transkripcijos represorius, kuris slopina p53, apoptozės regulatoriaus, sintezę. Tyrimo metu pastebėtas *Bcl6* ekspresijos padidėjimas indukuotose akyse, manoma yra apsauginio mechanizmo, tinklainės išemijos reperfuzijos sukeltos apoptozės, rezultatas. Remiantis literatūra žinoma kad, *Bcl6* gali reguliuoti antioksidantinius genus ir sumažinti ROS susidarymą (Kurosu ir kt., 2003). Todėl, tyrime pastebėta

padidėjusi *Bcl6* ekspresija gali būti adaptyvus atsakas, siekiant neutralizuoti aukštą ROS kiekį, susidarantį dėl tinklainės išeminės reperfuzijos. Tačiau, nepaisant padidėjusios *Bcl6* raiškos, aukštas oksidacinio streso lygis vis tiek gali sukelti ląstelių mirtį. Tai galėtų paaiškinti pastebėtą tinklainės sluoksnių plonėjimą ir ganglinių ląstelių skaičiaus sumažėjimą, kuris buvo pastebėtas po 14 ir 21 dienos. Ganglinių ląstelių funkcijos pokyčiai taip pat gali būti siejami su *Bcl6* nesugebėjimu veiksmingai susidoroti su pernelyg dideliu oksidacinio streso lygiu. Padidėjusi *Bcl6* ekspresija gali būti pradinis apsauginis atsakas, tačiau aukštas oksidacinio streso lygis gali sukelti ląstelių apoptozę ir galiausiai prisidėti prie tinklainės sluoksnio plonėjimo ir sutrikdyti ganglinių ląstelių funkciją.

Apibendrinant gautus rezultatus, pastebima, kad po modelio indukcijos praėjus 7 dienoms matomas statistiškai reikšmingas tiriamųjų genų raiškos pokytis. Tyrimas atskleidė, kad laikinas kraujotakos sutrikdymas tinklainėje lėmė *GFAP*, *Ccl12*, *Casp8* ir *Bcl6* genų ekspresijos pokyčius. Tačiau, svarbu paminėti, kad nepastebėti genų ekspresijos pokyčiai 14 ir 21 dienomis nebūtinai reiškia, kad didelio šių genų ekspresuojamų baltymų kiekio nebuvo tinklainėje. Kadangi antrojo tyrimo rezultatai rodo, kad po tinklainės išeminės reperfuzijos, laikui bėgant progresuoja ir morfologiniai, ir fiziologiniai pokyčiai. Todėl manoma, kad pastebėti genų ekspresijos pakitimai gali būti susiję su progresuojančiais struktūriniais ir funkciniais pokyčiais. Tyrime, kurį atliko Kim ir kt., 2013 m. buvo pastebėta, kad šių genų ekspresijos lygis 7 dieną padidėjo, tačiau sumažėjo 14 dieną, o tada vėl padidėjo 21 dieną. Tačiau, šiame tyrime buvo pastebėtas genų ekspresijos sumažėjimas tiek 14, tiek 21 dieną po išeminės reperfuzijos. Manoma, kad šis skirtumas yra dėl skirtingų eksperimentinių sąlygų ir gyvūnų rūšių. Apibendrinant, šie rezultatai parodo sudėtingą ryšį tarp genų ekspresijos pokyčių ir morfologinių bei fiziologinių pakitimų tinklainėje. Tolimesni šios srities tyrimai gali suteikti vertingų įžvalgų apie pagrindinius mechanizmus ir galimus terapinius tikslus.

IŠVADOS

1. Nustatyta, kad 200 mmHg natrio chlorido spaudimas yra efektyvus siekiant indukuoti tinklainės išeminę reperfuziją, padidina intraokuliarinį spaudimą bei sumažina ganglinių ląstelių kiekį.
2. Išeminė reperfuzija sukelia vidinių tinklainės sluoksnio bei visos tinklainės sluoksnio plonėjimą. Suplonėjimas yra jau pastebimas 7 dieną ir toliau progresuoja 14 ir 21 dieną po modelio indukcijos
3. Ganglinių ląstelių atsakas į stimulą sumažėja po tinklainės išeminės reperfuzijos indukavimo praėjus 7 dienoms po modelio indukcijos. Atsakas toliau silpnėjo 14 ir 21 dieną.
4. Tinklainės išeminė reperfuzija sąlygojo *GFAP*, *Ccl12*, *Casp8* ir *Bcl6* genų raiškos pakitimus, kurie matomi 7 dieną. 14 ir 21 dienomis genų ekspresijos pokyčių nepastebėta.

ROBERTA VASILIAUSKAITĖ

Magistro baigiamasis darbas

**Išeminės reperfuzijos sukeltų tinklainės funkcinių,
morfologinių ir genų raiškos pokyčių nustatymas *Brown*
Norway žiurkėse**

SANTRAUKA

Šio tyrimo tikslas buvo iširti funkcinius, morfologinius ir genų ekspresijos pokyčius, kuriuos sukelia tinklainės išeminės reperfuzija *Brown Norway* žiurkėse. Tyrimo metu buvo atlikti trys eksperimentai. Pirmo eksperimento tikslas buvo nustatyti optimalų natrio chlorido slėgį tinklainės išeminės reperfuzijos modelio indukcijai. Antro eksperimento tikslas buvo iširti funkcinius ir struktūrinius pokyčius po kraujotakos sutrikdymo ir atkūrimo. Trečio eksperimento tikslas buvo nustatyti genų ekspresijos pokyčius, kuriuos sukėlė tinklainės išeminė reperfuzija. Morfologiniai ir fiziologiniai pokyčiai buvo stebimi skirtingais laiko momentais naudojant optinę koherentinę tomografiją ir šabloninę elektroretinografiją, o kiekybinis realaus laiko polimerazės grandininės reakcijos metodas buvo naudojamas tirti genų ekspresijos pokyčius. Tyrimo rezultatai parodė, kad natrio chlorido slėgiui esant 200 mmHg, modelio indukcija buvo sėkminga, ir lėmė padidėjusį intraokuliarinį spaudimą ir sumažėjusį ganglijų ląstelių kiekį. Be to, po laikino kraujotakos sutrikdymo ir jos atkūrimo, tinklainė ir ganglinių ląstelių sluoksnis tapo plonesnis, o ganglinių ląstelių atsakas į stimulą sumažėjo. Taip pat buvo pastebėtas ganglinių ląstelių kiekio ir tinklainės svorio sumažėjimas. Šie morfologiniai ir fiziologiniai pokyčiai progresavo laikui bėgant. Atlikus kiekybinį tikro laiko PGR metodą, rezultatai rodo, kad tinklainės išeminės reperfuzija sąlygojo *GFAP*, *Ccl12*, *Casp8* ir *Bcl6* genų raiškos pokyčius.

VILNIAUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER

ROBERTA VASILIAUSKAITĖ

Master thesis

**Identification of Functional, Morphological, and Gene
Expression Changes Induced by Retinal Ischemia
Reperfusion in *Brown Norway* Rats**

SUMMARY

The objective of this study was to investigate the functional, morphological, and gene expression changes induced by retinal ischemia reperfusion in *Brown Norway* rats. This investigation comprised three experiments. The first experiment aimed to establish the optimal pressure of sodium chloride for inducing the retinal ischemia reperfusion model. The second experiment aimed to explore functional and structural changes after interruption and restoration of blood flow. Lastly, the third experiment aimed to identify changes in gene expression induced by the retinal ischemia reperfusion model. Optical coherence tomography and pattern electroretinography were used to monitor morphological and physiological changes at different time points, while quantitative real – time polymerase chain reaction was used to study gene expression changes. The findings showed that a sodium chloride pressure at 200 mmHg was successfully to induce the model, resulting in increased intraocular pressure and decreased ganglion cell count. Additionally, after the temporary interruption and subsequent restoration of blood flow, the entire retina and ganglion cell layer became thinner, and the ganglion cells' response to stimulus decreased. A decrease in ganglion cell count and a reduction in the retina's weight were also observed. These morphological and physiological changes progressed over time. After performing quantitative real-time PCR, the results demonstrate that retinal ischemic reperfusion induced changes in the expression of *GFAP*, *Ccl12*, *Casp8*, and *Bcl6* genes.

Literatūra

1. Abu-El-Asrar, A.M., Dralands, L., Missotten, L., Al-Jadaan, I.A., Geboes, K., 2004. Expression of apoptosis markers in the retinas of human subjects with diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 2760–2766. <https://doi.org/10.1167/iovs.03-1392>
2. Arshavsky, V.Y., Burns, M.E., 2012. Photoreceptor signaling: supporting vision across a wide range of light intensities. *J Biol Chem* 287, 1620–1626. <https://doi.org/10.1074/jbc.R111.305243>
3. Barabas, P., Augustine, J., Fernández, J.A., McGeown, J.G., McGahon, M.K., Curtis, T.M., 2020. Chapter Seven - Ion channels and myogenic activity in retinal arterioles, in: Jackson, W.F. (Ed.), *Ion Channels and Calcium Signaling in the Microcirculation*, Current Topics in Membranes. Academic Press, pp. 187–226. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2020.01.008>
4. Barakat, D.J., Dvorientchikova, G., Ivanov, D., Shestopalov, V.I., 2012. Astroglial NF- κ B mediates oxidative stress by regulation of NADPH oxidase in a model of retinal ischemia reperfusion injury. *J Neurochem* 120, 586–597. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07595.x>
5. Basso, K., Dalla-Favera, R., 2012. Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells. *Immunol Rev* 247, 172–183. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01112.x>
6. Bertalmío, M., 2020. Chapter 2 - The biological basis of vision: the retina, in: Bertalmío, M. (Ed.), *Vision Models for High Dynamic Range and Wide Colour Gamut Imaging*. Academic Press, pp. 11–46. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813894-6.00007-7>
7. Bibliowicz, J., Tittle, R.K., Gross, J.M., 2011. Toward a better understanding of human eye disease insights from the zebrafish, *Danio rerio*. *Prog Mol Biol Transl Sci* 100, 287–330. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384878-9.00007-8>
8. Boije, H., Shirazi Fard, S., Edqvist, P.-H., Hallböök, F., 2016. Horizontal Cells, the Odd Ones Out in the Retina, Give Insights into Development and Disease. *Front Neuroanat* 10, 77. <https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00077>
9. Boyd, S.R., Zachary, I., Chakravarthy, U., Allen, G.J., Wisdom, G.B., Cree, I.A., Martin, J.F., Hykin, P.G., 2002. Correlation of increased vascular endothelial growth factor with neovascularization and permeability in ischemic central vein occlusion. *Arch Ophthalmol* 120, 1644–1650. <https://doi.org/10.1001/archophth.120.12.1644>
10. Brenner, M., Messing, A., 2021. Regulation of GFAP expression. *ASN neuro* 13, 1759091420981206.
11. Cerveró, A., Casado, A., Riancho, J., 2021. Retinal changes in amyotrophic lateral sclerosis: looking at the disease through a new window. *J Neurol* 268, 2083–2089. <https://doi.org/10.1007/s00415-019-09654-w>

12. Chapot, C.A., Euler, T., Schubert, T., 2017. How do horizontal cells “talk” to cone photoreceptors? Different levels of complexity at the cone-horizontal cell synapse. *J Physiol* 595, 5495–5506. <https://doi.org/10.1113/JP274177>
13. Chi, W., Li, F., Chen, H., Wang, Y., Zhu, Y., Yang, X., Zhu, J., Wu, F., Ouyang, H., Ge, J., Weinreb, R.N., Zhang, K., Zhuo, Y., 2014. Caspase-8 promotes NLRP1/NLRP3 inflammasome activation and IL-1 β production in acute glaucoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 11181–11186. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402819111>
14. Christensen, I., Lu, B., Yang, N., Huang, K., Wang, P., Tian, N., 2019. The Susceptibility of Retinal Ganglion Cells to Glutamatergic Excitotoxicity Is Type-Specific. *Front Neurosci* 13, 219. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00219>
15. Crane, I.J., Liversidge, J., 2008. Mechanisms of leukocyte migration across the blood-retina barrier. *Semin Immunopathol* 30, 165–177. <https://doi.org/10.1007/s00281-008-0106-7>
16. Crotty, S., 2014. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* 41, 529–542. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.004>
17. de Hoz, R., Rojas, B., Ramírez, A.I., Salazar, J.J., Gallego, B.I., Triviño, A., Ramírez, J.M., 2016. Retinal Macroglial Responses in Health and Disease. *Biomed Res Int* 2016, 2954721. <https://doi.org/10.1155/2016/2954721>
18. Desmettre, T.J., 2018. Epigenetics in Age-related Macular Degeneration (AMD). *Journal Français d’Ophtalmologie* 41, e407–e415. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2018.09.001>
19. Faiq, M., Sharma, R., Dada, R., Mohanty, K., Saluja, D., Dada, T., 2013. Genetic, Biochemical and Clinical Insights into Primary Congenital Glaucoma. *J Curr Glaucoma Pract* 7, 66–84. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10008-1140>
20. Feher, J., 2012. 4.8 - Vision, in: Feher, J. (Ed.), *Quantitative Human Physiology*. Academic Press, Boston, pp. 386–400. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382163-8.00041-4>
21. Field, G.D., Sher, A., Gauthier, J.L., Greschner, M., Shlens, J., Litke, A.M., Chichilnisky, E.J., 2007. Spatial properties and functional organization of small bistratified ganglion cells in primate retina. *J Neurosci* 27, 13261–13272. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3437-07.2007>
22. Gallego, B.I., Salazar, J.J., de Hoz, R., Rojas, B., Ramírez, A.I., Salinas-Navarro, M., Ortín-Martínez, A., Valiente-Soriano, F.J., Avilés-Trigueros, M., Villegas-Perez, M.P., Vidal-Sanz, M., Triviño, A., Ramírez, J.M., 2012. IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma. *Journal of Neuroinflammation* 9, 92. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-92>
23. Grünert, U., 2009. Retinal Bipolar Cells, in: Binder, M.D., Hirokawa, N., Windhorst, U. (Eds.), *Encyclopedia of Neuroscience*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 3492–3497. https://doi.org/10.1007/978-3-540-29678-2_5102

24. Gu, Y., Luo, M., Li, Y., Su, Z., Wang, Y., Chen, X., Zhang, S., Sun, W., Kong, X., 2019. Bcl6 knockdown aggravates hypoxia injury in cardiomyocytes via the P38 pathway. *Cell Biol Int* 43, 108–116. <https://doi.org/10.1002/cbin.11028>
25. Hadziahmetovic, M., Malek, G., 2020. Age-Related Macular Degeneration Revisited: From Pathology and Cellular Stress to Potential Therapies. *Front Cell Dev Biol* 8, 612812. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.612812>
26. Kalogeris, T., Baines, C.P., Krenz, M., Korthuis, R.J., 2012. Chapter Six - Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury, in: Jeon, K.W. (Ed.), *International Review of Cell and Molecular Biology*. Academic Press, pp. 229–317. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7>
27. Kang, E.Y.-C., Liu, P.-K., Wen, Y.-T., Quinn, P.M.J., Levi, S.R., Wang, N.-K., Tsai, R.-K., 2021. Role of Oxidative Stress in Ocular Diseases Associated with Retinal Ganglion Cells Degeneration. *Antioxidants (Basel)* 10. <https://doi.org/10.3390/antiox10121948>
28. Kang, Q., Dai, H., Jiang, S., Yu, L., 2022. Advanced glycation end products in diabetic retinopathy and phytochemical therapy. *Front Nutr* 9, 1037186. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1037186>
29. Karia, N., 2010. Retinal vein occlusion: pathophysiology and treatment options. *Clin Ophthalmol* 4, 809–816. <https://doi.org/10.2147/oph.s7631>
30. Kaur, C., Foulds, W.S., Ling, E.A., 2008. Blood-retinal barrier in hypoxic ischaemic conditions: basic concepts, clinical features and management. *Prog Retin Eye Res* 27, 622–647. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2008.09.003>
31. Kaur, C., Sivakumar, V., Yong, Z., Lu, J., Foulds, W.S., Ling, E.A., 2007. Blood-retinal barrier disruption and ultrastructural changes in the hypoxic retina in adult rats: the beneficial effect of melatonin administration. *J Pathol* 212, 429–439. <https://doi.org/10.1002/path.2195>
32. Kawai, S.I., Vora, S., Das, S., Gachie, E., Becker, B., Neufeld, A.H., 2001. Modeling of risk factors for the degeneration of retinal ganglion cells after ischemia/reperfusion in rats: effects of age, caloric restriction, diabetes, pigmentation, and glaucoma. *FASEB J* 15, 1285–1287. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0666fje>
33. Khayat, M., Williams, M., Lois, N., 2018. Ischemic retinal vein occlusion: characterizing the more severe spectrum of retinal vein occlusion. *Surv Ophthalmol* 63, 816–850. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2018.04.005>
34. Kim, B.-J., Braun, T.A., Wordinger, R.J., Clark, A.F., 2013. Progressive morphological changes and impaired retinal function associated with temporal regulation of gene expression after retinal ischemia/reperfusion injury in mice. *Molecular Neurodegeneration* 8, 21. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-21>

35. Kim, U.S., Mahroo, O.A., Mollon, J.D., Yu-Wai-Man, P., 2021. Retinal Ganglion Cells-Diversity of Cell Types and Clinical Relevance. *Front Neurol* 12, 661938. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.661938>
36. Kolb, H., 2005. Roles of Amacrine Cells. *The Organization of the Retina and Visual System*, University of Utah Health Sciences Center.
37. Kurosu, T., Fukuda, T., Miki, T., Miura, O., 2003. BCL6 overexpression prevents increase in reactive oxygen species and inhibits apoptosis induced by chemotherapeutic reagents in B-cell lymphoma cells. *Oncogene* 22, 4459–4468. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206755>
38. Lee, J., Lee, B.-K., Gross, J.M., 2013. Bcl6a function is required during optic cup formation to prevent p53-dependent apoptosis and colobomata. *Hum Mol Genet* 22, 3568–3582. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt211>
39. Lewis, G.P., Fisher, S.K., 2003. Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. *Int Rev Cytol* 230, 263–290. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(03\)30005-1](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(03)30005-1)
40. Li, Y., Wen, Y., Liu, X., Li, Z., Lin, B., Deng, C., Yu, Z., Zhu, Y., Zhao, L., Su, W., Zhuo, Y., 2022. Single-cell RNA sequencing reveals a landscape and targeted treatment of ferroptosis in retinal ischemia/reperfusion injury. *J Neuroinflammation* 19, 261. <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02621-9>
41. Liu, Y., Yang, Z., Lai, P., Huang, Z., Sun, X., Zhou, T., He, C., Liu, X., 2020. Bcl-6-directed follicular helper T cells promote vascular inflammatory injury in diabetic retinopathy. *Theranostics* 10, 4250–4264. <https://doi.org/10.7150/thno.43731>
42. Luo, X., Shen, Y.-M., Jiang, M.-N., Lou, X.-F., Shen, Y., 2015. Ocular Blood Flow Autoregulation Mechanisms and Methods. *J Ophthalmol* 2015, 864871. <https://doi.org/10.1155/2015/864871>
43. Mahabadi, N., Al, K.Y., 2022. Neuroanatomy, Retina. StatPearls, Finland.
44. Marshak, D.W., 2009. Retinal Ganglion Cells: Anatomy, in: Squire, L.R. (Ed.), *Encyclopedia of Neuroscience*. Academic Press, Oxford, pp. 211–218. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.00897-4>
45. McLeod, D., Beatty, S., 2015. Evidence for an enduring ischaemic penumbra following central retinal artery occlusion, with implications for fibrinolytic therapy. *Progress in Retinal and Eye Research* 49, 82–119. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.06.001>
46. Mojsilovic-Petrovic, J., Callaghan, D., Cui, H., Dean, C., Stanimirovic, D.B., Zhang, W., 2007. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is involved in the regulation of hypoxia-stimulated expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) and MCP-5 (Ccl12) in astrocytes. *J Neuroinflammation* 4, 12. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-4-12>

47. Molday, R.S., Moritz, O.L., 2015. Photoreceptors at a glance. *J Cell Sci* 128, 4039–4045. <https://doi.org/10.1242/jcs.175687>
48. Moore, B.B., Murray, L., Das, A., Wilke, C.A., Herrygers, A.B., Toews, G.B., 2006. The role of CCL12 in the recruitment of fibrocytes and lung fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35, 175–181. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2005-0239OC>
49. Mowatt, L., Intosh, M., 2013. Strategies for Neuroprotection in Glaucoma. pp. 201–226. <https://doi.org/10.5772/53776>
50. Nguyen, K., Patel, B., Tadi, P., 2022. . StatPearls, Finland.
51. Peichl, L., 2009. Retinal Ganglion Cells, in: Binder, M.D., Hirokawa, N., Windhorst, U. (Eds.), *Encyclopedia of Neuroscience*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 3507–3513. https://doi.org/10.1007/978-3-540-29678-2_5106
52. Peng, P.-H., Ko, M.-L., Chen, C.-F., 2008. Epigallocatechin-3-gallate reduces retinal ischemia/reperfusion injury by attenuating neuronal nitric oxide synthase expression and activity. *Exp Eye Res* 86, 637–646. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2008.01.008>
53. Pietrucha-Dutczak, M., Amadio, M., Govoni, S., Lewin-Kowalik, J., Smedowski, A., 2018. The Role of Endogenous Neuroprotective Mechanisms in the Prevention of Retinal Ganglion Cells Degeneration. *Front Neurosci* 12, 834. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00834>
54. Popiolek-Barczyk, K., Ciechanowska, A., Ciapała, K., Pawlik, K., Oggioni, M., Mercurio, D., De Simoni, M.-G., Mika, J., 2020. The CCL2/CCL7/CCL12/CCR2 pathway is substantially and persistently upregulated in mice after traumatic brain injury, and CCL2 modulates the complement system in microglia. *Mol Cell Probes* 54, 101671. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101671>
55. Qu, J., Wang, D., Grosskreutz, C.L., 2010. Mechanisms of retinal ganglion cell injury and defense in glaucoma. *Exp Eye Res* 91, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2010.04.002>
56. Renner, M., Stute, G., Alzureiqi, M., Reinhard, J., Wiemann, S., Schmid, H., Faissner, A., Dick, H.B., Joachim, S.C., 2017. Optic Nerve Degeneration after Retinal Ischemia/Reperfusion in a Rodent Model. *Front Cell Neurosci* 11, 254. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00254>
57. Rivera, J.C., Sitaras, N., Noueihed, B., Hamel, D., Madaan, A., Zhou, T., Honoré, J.-C., Quiniou, C., Joyal, J.-S., Hardy, P., Sennlaub, F., Lubell, W., Chemtob, S., 2013. Microglia and interleukin-1 β in ischemic retinopathy elicit microvascular degeneration through neuronal semaphorin-3A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33, 1881–1891. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301331>
58. Rutar, M., Natoli, R., Chia, R., Valter, K., Provis, J.M., 2015. Chemokine-mediated inflammation in the degenerating retina is coordinated by Müller cells, activated microglia, and

- retinal pigment epithelium. *Journal of Neuroinflammation* 12, 8. <https://doi.org/10.1186/s12974-014-0224-1>
59. Sánchez-Migallón, M.C., Valiente-Soriano, F.J., Nadal-Nicolás, F.M., Vidal-Sanz, M., Agudo-Barriuso, M., 2016. Apoptotic Retinal Ganglion Cell Death After Optic Nerve Transection or Crush in Mice: Delayed RGC Loss With BDNF or a Caspase 3 Inhibitor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57, 81–93. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-17841>
 60. Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 3, 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
 61. Schuetz, E., Thanos, S., 2004. Microglia-targeted pharmacotherapy in retinal neurodegenerative diseases. *Curr Drug Targets* 5, 619–627. <https://doi.org/10.2174/1389450043345164>
 62. Soares, R.O.S., Losada, D.M., Jordani, M.C., Évora, P., Castro-E-Silva, O., 2019. Ischemia/Reperfusion Injury Revisited: An Overview of the Latest Pharmacological Strategies. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20205034>
 63. Stefánsson, E., Geirsdóttir, Á., Sigurdsson, H., 2011. Metabolic physiology in age related macular degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research* 30, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2010.09.003>
 64. Thomas, C.N., Berry, M., Logan, A., Blanch, R.J., Ahmed, Z., 2017. Caspases in retinal ganglion cell death and axon regeneration. *Cell Death Discovery* 3, 17032. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.32>
 65. Tong, N., Zhang, Z., Zhang, W., Qiu, Y., Gong, Y., Yin, L., Qiu, Q., Wu, X., 2013. Diosmin alleviates retinal edema by protecting the blood-retinal barrier and reducing retinal vascular permeability during ischemia/reperfusion injury. *PLoS One* 8, e61794. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061794>
 66. Wang, W., Lo, A.C.Y., 2018. Diabetic Retinopathy: Pathophysiology and Treatments. *Int J Mol Sci* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19061816>
 67. Weinreb, R.N., Aung, T., Medeiros, F.A., 2014. The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review. *JAMA* 311, 1901–1911. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3192>
 68. Wu, K.H.C., Madigan, M.C., Billson, F.A., Penfold, P.L., 2003. Differential expression of GFAP in early v late AMD: a quantitative analysis. *Br J Ophthalmol* 87, 1159–1166. <https://doi.org/10.1136/bjo.87.9.1159>
 69. Yang, Y., Xu, C., Chen, Y., Liang, J.-J., Xu, Y., Chen, S.-L., Huang, S., Yang, Q., Cen, L.-P., Pang, C.P., Sun, X.-H., Ng, T.K., 2019. Green Tea Extract Ameliorates Ischemia-Induced Retinal Ganglion Cell Degeneration in Rats. *Oxid Med Cell Longev* 2019, 8407206. <https://doi.org/10.1155/2019/8407206>

70. Yao, F., Peng, J., Zhang, E., Ji, D., Gao, Z., Tang, Y., Yao, X., Xia, X., 2023. Pathologically high intraocular pressure disturbs normal iron homeostasis and leads to retinal ganglion cell ferroptosis in glaucoma. *Cell Death Differ* 30, 69–81. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-01046-4>
71. Yuan, F., Wang, M., Jin, K., Xiang, M., 2021. Advances in Regeneration of Retinal Ganglion Cells and Optic Nerves. *Int J Mol Sci* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22094616>
72. Zhi, Z., Cepurna, W.O., Johnson, E.C., Morrison, J.C., Wang, R.K., 2012. Impact of intraocular pressure on changes of blood flow in the retina, choroid, and optic nerve head in rats investigated by optical microangiography. *Biomed Opt Express* 3, 2220–2233. <https://doi.org/10.1364/BOE.3.002220>

LIETUVOS RESPUBLIKA



LIETUVOS SVEIKATOS
MOKSLŲ UNIVERSITETAS

PROFESINĖS KVALIFIKACIJOS
TOBULINIMO
PAŽYMĖJIMAS

PK Nr. 19666

Roberta Vasiliauskaitė

(Vardas, pavardė)

nuo 2020-03-05

iki 2020-04-30

Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Anatomijos ir fiziologijos katedroje (LSMU VA)

(Klinikos, katedros pavadinimas)

baigė kursą „Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimai. Keeping, care and usage requirements for animals used for scientific and educational purposes“ (80val.)

(Kursų pavadinimas)

veterinarijos gydytojams, asmenims, dirbantiems su bandomaisiais ir/ar laboratoriniais gyvūnais

(pašikirtis)

2020-04-30



Veterinarijos akademijos kancleris
prof. Mindaugas Malakauskas

Klinikos (katedros) vadovas
Prof. Rasa Želvytė

2 priedas

Pavadinimas	Panaudojimas tyrimo metu
UV–VIS spektrofotometras Nanodrop One ^C , Thermo Fisher Scientific	Spektrofotometras buvo naudojamas išgrynintos RNR koncentracijai ir grynumui nustatyti analizuojant jos absorbciją bei pralaidumą 260, 230 ir 280 bangos ilgiuose.
Analitinės svarstyklės AS 60/220.X2, RADWAG	Tyrimo metu svarstyklės buvo naudojamos siekiant išmatuoti tinklainės svorį prieš jos šaldymą skystame azote.
Stereomikroskopas EZ4, Leica	Stereomikroskopas buvo naudojamas adatos įvedimui į priekinę akies kamerą.
Spektrinis domenas optinės koherencijos tomografas Envisu R2210, Bioptigen/Leica	Buvo panaudotas didelės skiriamosios gebos struktūriniais tinklainės vaizdams gauti prieš modelio indukciją ir po jos praėjus 7, 14 ir 21 dienai.
Izoflurano garintuvas Izoflurane, Ugo Basile S.R.L	Tyrimo metu izoflurano garintuvas buvo naudojamas gyvūnams anestezuoti, kad būtų galima atlikti akispūdžio matavimus naudojant tonometrą. Gyvūnai buvo patalpinami į indukcinę kamerą, kurioje jie gavo kontroliuojamą dozę izoflurano dujų, sumaišytų su deguonimi tam tikru santykiu.
Tonometeras Icare® TONOLAB, Tonovet	Tyrimo metu buvo naudojamas tonometras intraokuliariniam spaudimui matuoti skirtingais laiko momentais, įskaitant modelio indukcijos metu, taip pat po vienos ir penkių dienų.
Svarstyklės SKX2201, OHAUS	Tyrimo metu svarstyklės buvo naudojamos gyvūnų svorio pokyčiams stebėti įvairiais laiko momentais.

Leica M80 fluorescencinis ir šviesinis mikroskopas su Leica MC190HD šviesine ir fluorescencine kamera	Buvo panaudojami tinklainės išklotinių vaizdinime.
Biostiprintuvas 1700, A – M SYSTEMS	Eksperimento metu stiprintuvas buvo naudojamas tinklainės ganglinių ląstelių atsaką į stimulą įrašyme.
Maišyklė Vortex Genie2, Scientific Industries	Buvo naudojama tirpalų sumaišymui, kurie vėliau buvo panaudojami tinklainės imunofluorescencinio žymėjimo metu.
Purtyklė Titramax 101, Heidolph	Tyrimo metu purtyklė buvo naudojama tinklainės imunofluorescencinio žymėjimo metu, jog būtų užtikrinamas vienodas antikūnių pasiskirstymas.
Tikro laiko PCR sistema QuantStudio 3, ThermoFisher	Tyrimo metu sistema buvo skirta kopijinės DNR sintezei ir realaus laiko kiekybinėms polimerazės grandininės reakcijoms atlikti.
Centrifuga, Eppendorf	Naudojama RNR gryninimo iš audinio metu.
Optinis mikroskopas DM6 B, Leica	Buvo naudojamas tinklainės išklotinės paruošimo procese.
Mini centrifuga VWR Ministar Blue Line, VWR	Mini centrifuga buvo panaudojama RNR gryninimui, kopijinės DNR sintezei ir Qpcr paruošimo metu.
Kraujo spaudimo matuoklis MED–63, B.Well	Tyrimo metu buvo naudojamas sfigmomanometras, siekiant padidinti natrio chlorido tirpalo slėgį ir nuolat jį stebėti modelio indukcijos metu.

3 priedas

Pavadinimas	Panaudojimas tyrimo metu
„Systane Ultra“, Alcon Laboratories (JAV)	Tyrimo metu akių lašai buvo naudojami siekiant drėkinti akies paviršių ir apsaugoti rageną nuo išdžiūvimo modelio indukcijos ir optinės koherentinės tomografijos vaizdinimo metu.
„Alcaine“, Alcon – Couvreur, (Belgija)	Prieš įvedant adatą į priekinę akies kamerą, akių lašai buvo lašinami ant akies paviršiaus vietinei anestezijai sukelti.
„Mydriacyl“, Alcon – Couvreur, (Belgija)	Oftalmologiniai lašai buvo lašinami ant gyvūno dešinės akies paviršiaus prieš pradėdant modelio indukciją ir optinės koherencijos tomografijos vaizdavimą, kad būtų išplėstas vyzdis.
„Lakripos“, Ursapharm (Vokietija)	Lubrikanto tirpalas buvo naudojamas šabloninės elektroretinografijos metu siekiant palaikyti optimalų elektrinį kontaktą tarp ragenos ir ragenos elektrodų.
„Oftan – Dexa Chlora“, Santen (Suomija)	Po modelio indukcijos, ant dešinės gyvūno akies buvo užtepamas tepalas siekiant sušvelninti uždegimą, sumažinti skausmą ir profilaktikai nuo galimų infekcijų.
„Sodium chloride 0.9%“, B.Braun (Vokietija)	Natrio chloridas buvo naudojamas kaip anestezijos mišinio komponentas siekiant sukelti anesteziją. Taip pat modelio indukcijos metu dideliu spaudimu buvo leidžiamas į priekinę akies kamerą tinklainės išeminei reperfuzijai sukelti.
„Corneregel“, Bausch Lomb (JAV)	Oftalmologinis gelis buvo tepamas ant dešinės gyvūno akies kelis kartus per dieną savaitę laiko

	po modelio indukcijos, siekiant junginės ar ragenos pažeidimams gydyti.
„Hympromelozas – P“, Unimed Pharma (Slovakija)	Tyrimo metu akių lašai buvo naudojami drėkinti akies paviršių ir apsaugoti rageną nuo išdžiūvimo. Šie akių lašai buvo lašinami modelio indukcijos ir optinės koherencijos tomografijos vaizdinimo metu.
„Edenorm free“, SOOFT (Italija)	Gyvūnams, kuriems pasireiškė edema, po modelio indukcijos, buvo lašinami akių lašai siekiant sumažinti edemą. Šie akių lašai buvo lašinami kelis kartus per dieną savaitę laiko.
„Ketamidor“, Richter Pharma AG (Austrija)	Tirpalas buvo naudojamas kaip anestetikas siekiant sukelti anesteziją modelio indukcijos, optinės koherentinės tomografijos ir šabloninės elektroretinografijos procedūrų metu.
„Atipam“, Eurovet Animal Health B.V. (Nyderlandai)	Injekcinis tirpalas buvo naudojamas kaip anestetikas mišinyje siekiant prikelti gyvūnus po anestezijos, kuri buvo sukelta modelio indukcijos, šabloninės elektroretinografijos ir optinės koherentinės tomografijos procedūrų metu.
„ATIPAZOLE“, Labiana Life Sciences (Ispanija)	Tirpalas buvo naudojamas kaip anestetikas mišinyje gyvūnams atgaivinti po anestezijos sukėlimo.
„Sedator“, Eurovet Animal Health B.V. (Nyderlandai)	Tirpalas buvo naudojamas anestezuoti gyvūnus prieš <i>In Vivo</i> tyrimų atlikimą.
„Isoflurin“, VETPHARMA ANIMAL HEALTH (Ispanija)	Inhaliaciniai garai buvo naudojami anestezijos sukėlimui akispūdžio matavimo procedūros metu, kuri buvo atlikta praėjus vienai ir penkioms dienoms po modelio indukavimo.

4 priedas

Pavadinimas	Gamintojas	Ref. Nr.
Paraformaldehidas	Roth	8.18715.1000
Natrio hidroksido granulės	Roth	6771.1
Acto rūgštis	Roth	3738.1
Natrio divandenilio fosfato monohidratas	Merck	1.06346.1000
Dinatrio vandenilio fosfato dihidratas	Merck	1.06580.1000
Natrio chloridas	Fisher Scientific	10428420
Trizma® hidrochloridas	Roth	9090.2
Trizma® bazė	Sigma Aldrich	T1503–1KG
Glicerolis, 99,5 %	Fisher Scientific	10021083
Etilenglikolis, 99.7%	VWR	24041.320
Tritonas X – 100	Sigma Aldrich	T9284–100ML
Ožkos serumas	Biowest	S2000–500
Triušio – anti AF568	Invitrogen	A11036
DAPI (1mg/ml 4',6–diamidino 2–fenilindolio dihydrochlorido tirpalas)	Carl Roth	6843.1
Fluoroshield	Sigma Aldrich	F6937–20ML
Triušio RBPMS	Phosphosolution	1830–RBPMS
Trizolis	Invitrogen	15596026
Chloroformas	ThermoFisher	10122190

PureLink RNA Mini Kit	Thermo Fisher Scientific	12183018A
High – Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor rinkinys	Applied biosystems	4374966
TaqMan Fast Advanced Master Mix rinkinys	Applied biosystems	4444963