



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ
ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΥΛΙΚΩΝ

**Προσομοίωση νευρικών κυττάρων του Αμφιβληστροειδούς με
εφαρμογές στην Προσθετική Αμφιβληστροειδούς**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ιωάννης Ε. Πολυκρέτης

Επιβλέπουσα : Κωνσταντίνα Σ. Νικήτα

Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Αθήνα,

2016



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ
ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΥΛΙΚΩΝ

**Προσομοίωση νευρικών κυττάρων του Αμφιβληστροειδούς με
εφαρμογές στην Προσθετική Αμφιβληστροειδούς**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ιωάννης Ε. Πολυκρέτης

Επιβλέπουσα : Κωνσταντίνα Σ. Νικήτα

Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την

2016.

(Υπογραφή)

(Υπογραφή)

(Υπογραφή)

.....

.....

.....

Κωνσταντίνα Νικήτα

Ανδρέας Σταφυλοπάτης

Δημήτρης Κουτσούρης

Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα,

2016

(Υπογραφή)

.....

Ιωάννης Ε. Πολυκρέτης

Διπλωματούχος Ηλεκτρολόγος Μηχανικός και Μηχανικός Ηλεκτρονικών Υπολογιστών Ε.Μ.Π.

Copyright ©Polykretis Ioannis, 2016 - All rights reserved

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξολοκλήρου ή μέρους αυτής, για εμπορικό ή κερδοσκοπικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για εμπορικό-κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται αποκλειστικά στους συγγραφείς.

Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτή την εργασία εκφράζουν τους συγγραφείς και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου συμπεριλαμβανόμενων Σχολών, Τομέων και Μονάδων αυτού.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες

Περίληψη

Abstract

Πρόλογος

Παράρτημα Συντομογραφιών

Παράρτημα Εικόνων

1. **Κεφάλαιο 1^ο : Δομή του Ανθρώπινου Οφθαλμού και Αμφιβληστροειδούς**
 - 1.1. Εισαγωγή - Στόχοι
 - 1.2. Δομή του Ανθρώπινου Οφθαλμού
 - 1.3. Πολυστρωματική Δομή του Αμφιβληστροειδούς
 - 1.4. Κατευθυντικά Επιλεκτικά Γαγγλιακά Κύτταρα-Direction Selective Ganglion Cells (DSGCs)
 - 1.5. Βιβλιογραφία
2. **Κεφάλαιο 2^ο : Βραχύινα Κύτταρα : Γεωμετρία**
 - 2.1. Εισαγωγή - Στόχοι
 - 2.2. Μορφή και Λειτουργία των Βραχύνων Κυττάρων (Starburst Amacrine Cells - SACs)
 - 2.3. Γεωμετρία των Κυττάρων
 - 2.4. Διαστρωμάτωση των Βραχύνων Κυττάρων (SACs)
 - 2.5. Βιβλιογραφία
3. **Κεφάλαιο 3^ο : Βραχύινα Κύτταρα : Λειτουργία και Εξειδίκευση**
 - 3.1. Εισαγωγή - Στόχοι
 - 3.2. SACs : Τα πρώτα κατευθυντικά επιλεκτικά κύτταρα
 - 3.3. Απόκριση των κυττάρων στη φωτεινή διέγερση
 - 3.4. Ρεύματα Απόκρισης των Βραχύνων Κυττάρων (SACs) και Διέγερσης των Κατευθυντικά Επιλεκτικών Γαγγλιακών Κυττάρων (DSGCs)
 - 3.5. Σύνδεση με άλλες κατηγορίες νευρώνων
 - 3.6. Πεδίο Λήψης των κυττάρων
 - 3.7. Νευροδιαβιβαστές στα Βραχύινα Κύτταρα (SACs)
 - 3.8. Μορφή της διέγερσης των Βραχύνων Κυττάρων (SACs)
 - 3.9. Δημιουργία της Κατευθυντικής Επιλεκτικότητας από το Δίκτυο των Διπολικών-Βραχύνων-Γαγγλιακών (BCs-SACs-DSGCs) Κυττάρων
 - 3.10. Βιβλιογραφία
4. **Κεφάλαιο 4^ο : Βραχύινα Κύτταρα : Βιοφυσική και Εξειδικευμένη Δομή**
 - 4.1. Εισαγωγή - Στόχοι
 - 4.2. Μη Γραμμική Δομή των Βραχύνων Κυττάρων (SACs)
 - 4.3. Ιοντικά Κανάλια
 - 4.3.1. Ιοντικά Κανάλια στα Βραχύινα Κύτταρα (SACs)

- 4.3.2. Ιοντικά Κανάλια Νατρίου
- 4.3.3. Ιοντικά Κανάλια Καλίου
- 4.3.4. Ιοντικά Κανάλια Ασβεστίου
- 4.3.5. Ιοντικά Κανάλια Χλωρίου
- 4.4. Βιβλιογραφία
- 5. **Κεφάλαιο 5^ο : Ανάπτυξη Μοντέλου Βραχύινων Κυττάρων (SACs)**
 - 5.1. Εισαγωγή - Στόχοι
 - 5.2. Μοντέλα Βραχύινων Κυττάρων (SACs)
 - 5.2.1. Μοντέλο με έμφαση στις Γεωμετρικές Λεπτομέρειες και τα Ιοντικά Κανάλια (Velte-Miller)
 - 5.2.2. Μοντέλο με έμφαση στις συνάψεις, τα Ιοντικά Κανάλια και την Κατευθυντική Επιλεκτικότητα (Dmitriev et al)
 - 5.2.3. Ανάπτυξη Μοντέλου
 - 5.2.3.1. Γεωμετρικά Χαρακτηριστικά του Μοντέλου
 - 5.2.3.2. Βιοφυσικά Χαρακτηριστικά του Μοντέλου
 - 5.2.3.3. Σχόλια για τη Σχεδίαση του Μοντέλου
 - 5.3. Δοκιμές και Αποτελέσματα
 - 5.3.1. Πρώτος Έλεγχος Απόκρισης σε Παλμούς ρεύματος
 - 5.3.2. Δεύτερος Έλεγχος Απόκρισης σε Παλμούς ρεύματος
 - 5.3.3. Έλεγχος της Ιδιότητας της Ηλεκτρικής Απομόνωσης των Γειτονικών Δενδριτών
 - 5.3.4. Έλεγχος της Ιδιότητας της Εμφάνισης Προτιμητέας-Μη Προτιμητέας κατεύθυνσης
 - 5.4. Συζήτηση
 - 5.5. Βιβλιογραφία
- 6. **Κεφάλαιο 6^ο : Εμφυτεύματα Αμφιβληστροειδούς (Retinal Prosthesis)**
 - 6.1. Εισαγωγή - Στόχοι
 - 6.2. Εκφυλιστικές Ασθένειες του Αμφιβληστροειδούς
 - 6.3. Διατάξεις της Προσθετικής Αμφιβληστροειδούς
 - 6.4. Διέγερση
 - 6.4.1. Πλάτος Παλμού Διέγερσης
 - 6.4.2. Συχνότητα Παλμού Διέγερσης
 - 6.4.3. Χρονικό Μήκος Παλμού Διέγερσης
 - 6.4.4. Ημιτονοειδής Διέγερση
 - 6.5. Χρησιμότητα του Μοντέλου στην Προσθετική Αμφιβληστροειδούς
 - 6.6. Βιβλιογραφία
- 7. **Κεφάλαιο 7^ο : Επεκτάσεις και Προτάσεις**
 - 7.1. Εισαγωγή - Στόχοι
 - 7.2. Ερωτήματα και Προτάσεις στη Μοντελοποίηση
 - 7.3. Ερωτήματα και Προτάσεις στην Προσθετική Εμφυτευμάτων

Ευχαριστίες

Πρώτη από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια της εργασίας, κυρία Κωνσταντίνα Νικήτα για την εμπιστοσύνη, που μου έδειξε, δίνοντάς μου τη δυνατότητα να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον και σύγχρονο θέμα, για την διαρκή και άμεση ανταπόκρισή της σε όποια δυσκολία, απορία ή προβληματισμό μου δημιουργήθηκε και για την υποστήριξή της σε όσα ζητήματα δεν γνώριζα πώς να φέρω σε πέρας.

Ύστερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Κωνσταντίνο Μιχμίζο για την προθυμία και την άμεση ανταπόκρισή του να με βοηθήσει, όταν του ζητήθηκε.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω εκ βαθύων την οικογένειά μου και τους φίλους μου, καθώς γνώριζαν όλες τις δυσκολίες, που πέρασα για να ολοκληρώσω την εργασία αυτή και με υποστήριξαν με όποιο τρόπο ο καθένας μπορούσε.

Τέλος, θα ήθελα να απευθύνω ένα τεράστιο ευχαριστώ σε δύο κυρίους, που χωρίς να έχουν καμία υποχρέωση απέναντί μου, αλλά μόνο το ακαδημαϊκό και ερευνητικό χρέος απέναντι στην Επιστήμη τους, μου παρείχαν ουσιαστική γνωστική και συμβουλευτική υποστήριξη, παρά το εξαιρετικά φορτωμένο πρόγραμμά τους και την πρότερη άγνοιά τους για το πρόσωπό μου, τους κυρίους Andrey V. Dmitriev και Robert F. Miller.

Περίληψη

Το σχετικά νέο πεδίο της Προσθετικής του Αμφιβληστροειδούς (Retinal Prosthesis) έχει δώσει ελπίδες στους ασθενείς που έχουν χάσει την όρασή τους από κάποια εκφυλιστική ασθένεια των φωτοϋποδοχέων του αμφιβληστροειδούς. Η μέθοδος της Προσθετικής ενεργοποιεί κατάλληλα τα ηλεκτρόδια μιας συστοιχίας, ώστε να δημιουργήσει στον ασθενή την (ψευδ)αίσθηση της όρασης. Το εμφύτευμα διεγείρει τα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς και δεν επιδρά στην υπόλοιπη υγιή νευρική συνδεσμολογία του χιτώνα.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, το ενδιαφέρον εστιάζεται σε μια κατηγορία νευρώνων που συνδέονται με τα γαγγλιακά κύτταρα και ονομάζονται Starburst Amacrine Cells (SACs). Τα κύτταρα αυτά είναι υπεύθυνα για την κωδικοποίηση της κατεύθυνσης κίνησης του οπτικού ερεθίσματος και ίσως μπορούν να αποτελέσουν πρόσφορους στόχους διέγερσης ώστε να βελτιωθεί η ποιότητα της αντιλαμβανόμενης όρασης, υπό συνθήκες κίνησης του οπτικού ερεθίσματος. Στόχος της εργασίας είναι η δημιουργία ενός μοντέλου των SACs, το οποίο θα αποτελέσει πλατφόρμα για τον έλεγχο της παραπάνω υπόθεσης. Καταβάλλεται προσπάθεια, ώστε το μοντέλο να είναι όσο το δυνατόν πλήρες από δομικής και βιοφυσικής άποψης. Για το σκοπό αυτό, το μοντέλο ενσωματώνει πληροφορία για τη γεωμετρική και μορφολογική ιδιαιτερότητα (μέγεθος, σχήμα), αλλά και τα ιδιαίτερα βιοφυσικά χαρακτηριστικά (εξειδικευμένοι τύποι ιοντικών καναλιών) των κυττάρων, όπως έχει προκύψει από πειραματικές μελέτες. Υπολογίζεται η απόκριση του μοντέλου σε κλασικές πειραματικές συνθήκες και συγκρίνεται με την αντίστοιχη των πραγματικών κυττάρων. Επίσης, το μοντέλο ελέγχεται ως προς τη δυνατότητά του να αναπαράγει βασικές ιδιοτητές των SACs, όπως η εμφάνιση ηλεκτρικής απομόνωσης γειτονικών δενδριτών και η εμφάνιση προτιμητέας και μη προτιμητέας κατεύθυνσης. Οι παραπάνω έλεγχοι αποδεικνύουν πως η απόκριση του μοντέλου πλησιάζει την απόκριση των πραγματικών κυττάρων ποιοτικά ή/και ποσοτικά.

Το μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην έρευνα της Προσθετικής Αμφιβληστροειδούς, προσφέροντας μια υπολογιστική πλατφόρμα για τον έλεγχο του αποτελέσματος διαφορετικών σημάτων διέγερσης (ως προς το πλάτος, τη συχνότητα, το είδος της κυματομορφής) ως προς την επιλεκτικότητα διέγερσης των SACs και τη μορφή της παραγόμενης απόκρισης. Με τον τρόπο αυτό, μπορεί να εξακριβωθεί αν τα SACs μπορούν να αποτελέσουν στόχους διέγερσης σε εφαρμογές Προσθετικής του Αμφιβληστροειδούς.

Λέξεις-Κλειδιά : Αμφιβληστροειδής, Εμφυτευμάτα αμφιβληστροειδούς, Γαγγλιακά Κύτταρα, Starburst Amacrine Cells (SACs), Μοντελοποίηση, NEURON, Μορφολογικά Χαρακτηριστικά, Βιοφυσικά Χαρακτηριστικά, Κατευθυντική Επιλεκτικότητα, Ηλεκτρική Απομόνωση, Επιλεκτική Διέγερση

Abstract

The relatively new area of Retinal Prosthesis has offered new hope to patients that lost their vision due to a degenerative disease of the Photoreceptors of the Retina. The method uses a digital camera to record the receptive field of the eye, passes all the information through a wireless system to the implant electrodes that are placed in contact with the Retina ganglion cells, thus activating them in a way that the patient has an illusion of actual vision. The implant stimulates the ganglion cells of the retina and does not take advantage of the rest, still healthy neural circuitry of the Retina. Only some recently published studies have reported that also other cell types are possible targets for stimulation.

Our attention is focused on a category of neurons that are located exactly on the previous stratum and are called Starburst Amacrine Cells (SACs). These cells have been found to be responsible for the coding of the direction of movement of the visual stimulus and may be appropriate targets for stimulation, in order to improve the vision quality and acuity, under stimulus movement conditions. The main aim of this thesis is to design and develop a model for the SACs that could serve as a platform for the experimental testing of the above hypothesis. Information regarding geometrical properties, morphological peculiarities and biophysical characteristics of SACs that distinct them from other types of neurons is integrated in the developed model. The model's ability to reproduce experimental responses and fundamental properties of the SACs, like the electrical isolation of neighboring dendrites and the preferred/null direction, in accordance with experimental findings published in previous works has been evaluated. The response of the model has been found in quantitative and/or qualitative agreement with the experimentally acquired response of the actual cells. Thus, the model can serve as a platform for testing and comparison of various stimulation patterns (signal amplitude, frequency, pulse width and waveform type) used in Retinal Prosthesis.

Keywords : Retina, Retinal Prosthesis, Ganglion Cells, Starburst Amacrine Cells (SACs), Modeling, NEURON, Morphological Properties, Biophysical Properties, Directional Selectivity, Electrical Isolation, Selective Stimulation

Πρόλογος

Η όραση είναι ίσως η βασικότερη αίσθηση του ανθρώπου. Έχει παρατηρηθεί πως άνθρωποι που υπέστησαν απώλεια της όρασής τους δυσκολεύονται να πραγματοποιήσουν βασικές ενέργειες για την αυτοεξυπηρέτησή τους και αδυνατούν να διατηρήσουν την ποιότητα ζωής τους σε ικανοποιητικό επίπεδο. Το στοιχείο του ανθρώπινου οφθαλμού με τη ζωτικότερη σημασία είναι ο αμφιβληστροειδής χιτώνας, ο οποίος βρίσκεται στο οπίσθιο τμήμα του οφθαλμού, και εκεί εστιάζονται οι εικόνες του περιβάλλοντος από τα υπόλοιπα τμήματα του οφθαλμού (κερατοειδής χιτώνας, βολβός κ.λπ.). Σε αντίθεση με άλλα αισθητήρια όργανα, όμως, το αισθητήριο όργανο της όρασης δεν έχει τις ιδιότητες ενός απλού δέκτη. Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας θεωρείται το πιο εξωτερικό τμήμα του εγκεφάλου, καθώς δεν λαμβάνει απλά τα οπτικά σήματα, αλλά επιτελεί και ένα μεγάλο μέρος της επεξεργασίας τους πριν αυτά προωθηθούν για λεπτομερή επεξεργασία στον εγκέφαλο. Συγκεκριμένα, διαθέτει τα κύτταρα των φωτοϋποδοχέων, τα οποία παγιδεύουν τα προσπίπτοντα φωτόνια, καθώς και μια ολόκληρη συνδεσμολογία νευρικών κυττάρων, τα οποία με τις εξειδικευμένες ιδιότητές τους αλλά και τις μεταξύ τους συνδέσεις επεξεργάζονται το οπτικό ερέθισμα. Στη συνέχεια, προωθούν νευρικά σήματα στον εγκέφαλο μέσω του οπτικού νεύρου και δημιουργούν την αίσθηση της όρασης.

Στη σημερινή εποχή, αυξάνεται συνεχώς ο αριθμός των ανθρώπων που πάσχουν από κάποια εκφυλιστική ασθένεια του αμφιβληστροειδούς, όπως ο Σχετιζόμενος με την πάροδο της ηλικίας Εκφυλισμός της Ωχράς Κηλίδας (Age related Macular Degeneration ή AMD) και η Retinitis Pigmentosa ή RP. Οι ασθένειες αυτές σχετίζονται με την ηλικία ή με την κληρονομικότητα και καταστρέφουν τα κύτταρα των φωτοϋποδοχέων, αφήνοντας την υπόλοιπη συνδεσμολογία κυττάρων άθικτη. Νέα ελπίδα στους πάσχοντες από αυτές τις ασθένειες δίνει η εφαρμογή της Προσθετικής του Αμφιβληστροειδούς. Στη μέθοδο αυτή, ένα εμφύτευμα τοποθετείται στην επιφάνεια του αμφιβληστροειδούς και λαμβάνοντας εικόνα από εξωτερική κάμερα, διεγείρει τα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς με κατάλληλο τρόπο, ώστε να δημιουργεί στον ασθενή την (ψευδ)αίσθηση της όρασης. Η πρόοδος της μεθόδου δεν είναι ακόμα σε τέτοιο επίπεδο, που να επιτρέπει στα άτομα να κινούνται αυτόνομα στο χώρο ή να διαβάζουν ένα βιβλίο. Παρ' όλα αυτά σε χρόνια τυφλούς, η ικανότητα να δουν έστω και κουκίδες φωτός αποτελεί τεράστια ανακούφιση.

Στο πλαίσιο αυτής της διπλωματικής εργασίας, επιχειρείται η ανάπτυξη ενός μοντέλου μιας ειδικής κατηγορίας βραχύνων κυττάρων του αμφιβληστροειδούς που σχηματίζουν συνάψεις με τα γαγγλιακά κύτταρα. Τα υπό μελέτη κύτταρα ονομάζονται Starburst Amacrine Cells (SACs), δηλαδή βραχύνα κύτταρα που το σχήμα τους προσομοιάζει αστρική έκρηξη και είναι υπεύθυνα για την ανίχνευση της κίνησης του οπτικού ερεθίσματος στο οπτικό πεδίο. Στόχος είναι η διερεύνηση της υπόθεσης διέγερσης των SACs αντί των γαγγλιακών κυττάρων. Ήδη σε ερευνητικό επίπεδο υπάρχουν προσπάθειες για εύρεση καλύτερων και επιλεκτικότερων μεθόδων διέγερσης και για άλλους τύπους κυττάρων πέρα από τα γαγγλιακά.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοϊατρικών Προσομοιώσεων και Απεικονιστικής Τεχνολογίας της Σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών και Μηχανικών Ηλεκτρονικών Υπολογιστών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου από το Νοέμβριο του 2015 έως τον Σεπτέμβριο του 2016. Αποτελείται από επτά Κεφάλαια :

Στο πρώτο Κεφάλαιο περιγράφεται η δομή του ανθρώπινου οφθαλμού με ιδιαίτερη αναφορά στον αμφιβληστροειδή χιτώνα και την πολυστρωματική δομή του. Παρουσιάζονται οι κατηγορίες των κυττάρων που σχηματίζουν τα στρώματα του χιτώνα (φωτοϋποδοχείς, διπολικά, οριζόντια, βραχύινα, γαγγλιακά) με έμφαση στα κύτταρα των φωτοϋποδοχέων, τη διαφοροποίησή τους και τη διακύμανση της πυκνότητάς τους σε σχέση με τη θέση τους. Ακόμα, περιγράφεται μια υποκατηγορία των γαγγλιακών κυττάρων, τα οποία ανιχνεύουν την κίνηση οπτικών ερεθισμάτων σε συγκεκριμένες κατευθύνσεις.

Στο δεύτερο Κεφάλαιο, η μελέτη εξειδικεύεται σε μια κατηγορία κυττάρων και συγκεκριμένα στα Starburst Amacrine Cells (SACs) ή βραχύινα κύτταρα που το σχήμα τους προσομοιάζει αστρική έκρηξη. Παρουσιάζεται η εξειδικευμένη γεωμετρία και η δακτυλιοειδής μορφολογία των κυττάρων με τις τρεις ομόκεντρες δακτυλιοειδείς ζώνες (κοντινή, ενδιάμεση και απομακρυσμένη). Επίσης, παρουσιάζεται η διαστρωμάτωση των κυττάρων αυτών στον αμφιβληστροειδή και τα κύτταρα με τα οποία εμφανίζουν συνάψεις.

Το τρίτο Κεφάλαιο επικεντρώνεται στην εξειδικευμένη λειτουργία των SACs και την ικανότητά τους να εντοπίζουν την κατεύθυνση κίνησης. Εξετάζεται λεπτομερώς η μορφή της απόκρισης των κυττάρων αυτών σε κινήσεις στις διάφορες κατευθύνσεις του οπτικού πεδίου που διεγείρουν το επόμενο επιπέδο των κατευθυντικά επιλεκτικών γαγγλιακών κυττάρων. Αναλύεται διεξοδικά η σύνδεση των SACs με τις άλλες κατηγορίες νευρώνων, σχηματίζοντας έτσι το λεγόμενο πεδίο λήψης των κυττάρων, καθώς και οι εξειδικευμένοι νευροδιαβιβαστές που παίρνουν μέρος στις αλληλεπιδράσεις αυτές. Περιγράφεται η μορφή της διέγερσης που δέχονται τα κύτταρα αυτά από τα χαμηλότερα επίπεδα νευρώνων του αμφιβληστροειδούς, όπως τα διπολικά, άλλα βραχύινα αλλά και κύτταρα της ίδιας κατηγορίας. Τέλος, συνοψίζεται ο μηχανισμός, με τον οποίο κωδικοποιείται η κατευθυντική επιλεκτικότητα από το εξειδικευμένο κύκλωμα των διπολικών, βραχύνων και γαγγλιακών κυττάρων.

Το τέταρτο Κεφάλαιο αφιερώνεται στην περιγραφή των βιοφυσικών χαρακτηριστικών των SACs. Αρχικά δικαιολογείται η χρήση μη γραμμικών στοιχείων για τη μοντελοποίηση τους και στη συνέχεια περιγράφεται η λειτουργία των ιοντικών καναλιών. Ακολουθεί η λεπτομερής παρουσίαση των εξειδικευμένων ιοντικών καναλιών, που εκφράζονται στα κύτταρα αυτά, δηλαδή τα κανάλια Νατρίου (Nav1.8), τα κανάλια Καλίου (Kv3.1-Kv3.2), τα κανάλια Ασβεστίου (Cav2.1-Cav2.2) και οι Συμμεταφορείς Ιόντων Χλωρίου (Cation Chloride Cotransporters, CCCs) που ανήκουν στην κατηγορία KCC2, NKCC2. Επιπλέον, επισημαίνονται τμήματα των κυττάρων, στα οποία εκφράζονται τα ιοντικά κανάλια και συζητείται η διαφοροποίηση της έκφρασής τους ανάλογα με τη θέση τους.

Στο πέμπτο Κεφάλαιο παρουσιάζεται η ανάπτυξη ενός μοντέλου των βραχύνων κυττάρων SACs που επιχειρεί να συνθέσει δύο βασικές προσπάθειες μοντελοποίησης των κυττάρων αυτών. Η πρώτη (Velte-Miller) δίνει έμφαση στα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του κυττάρου, καθώς βασίζεται σε μετατροπή εικόνας του κυττάρου από μικροσκόπιο σε μοντέλο, και ενσωματώνει λεπτομερή μαθηματική περιγραφή των ιοντικών καναλιών που εμφανίζονται στα SACs. Το δεύτερο μοντέλο (Dmitriev et al) δίνει ιδιαίτερη έμφαση στα ιοντικά κανάλια που ενεργοποιούνται από νευροδιαβιβαστές, χωρίς λεπτομέρειες ως προς το είδος και τα κινητικά χαρακτηριστικά των καναλιών και αποσκοπεί στην κατά το δυνατόν καλύτερη μοντελοποίηση της ιδιότητας της κατευθυντικής επιλεκτικότητας που εμφανίζουν τα SACs. Ακολουθεί η ανάπτυξη του μοντέλου που σχεδιάστηκε στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Ορίζονται τα ιδιαίτερα γεωμετρικά και βιοφυσικά χαρακτηριστικά των SACs μέσω του λογισμικού NEURON. Εξετάζεται η απόκριση του μοντέλου και συγκρίνεται με πειραματικά αποτελέσματα που έχουν ληφθεί

από πραγματικά κύτταρα. Επιπλέον, εξετάζεται η δυνατότητα του μοντέλου να αναπαράγει ορισμένες χαρακτηριστικές ιδιότητες των SACs.

Στο έκτο Κεφάλαιο, παρουσιάζεται η περιοχή της Προσθετικής του Αμφιβληστροειδούς. Αναφέρονται οι εκφυλιστικές ασθένειες του αμφιβληστροειδούς και περιγράφονται συστήματα προσθετικής με έμφαση στη μορφή της κυματομορφής που χρησιμοποιείται για τη διέγερση των γαγγλιακών κυττάρων. Η διέγερση με διφασικές παλμοσειρές είναι εξαιρετικά διαδεδομένη και παρουσιάζεται η επίδραση διαφόρων παραμέτρων (πλάτους, συχνότητας, χρονικού μήκους παλμού, είδους κυματομορφής) στην επιλεκτικότητα με την οποία διεγείρονται τα γαγγλιακά κύτταρα από τα ηλεκτρόδια. Επιπλέον, περιγράφεται μια νέα μεθοδος διέγερσης με ημιτονοειδή κυματομορφή που παρέχει ικανοποιητικά αποτελέσματα ως προς την επιλεκτικότητα διέγερσης ξεχωριστών κατηγοριών νευρώνων. Τέλος, συζητείται η πιθανή συμβολή του μοντέλου που αναπτύχθηκε στην Προσθετική του Αμφιβληστροειδούς, ως πλατφόρμας πειραματισμού πριν τις κλινικές μελέτες.

Το έβδομο Κεφάλαιο περιλαμβάνει τη συγκέντρωση παρατηρήσεων και ερωτημάτων που αναμένεται να οδηγήσουν σε νέα ερευνητικά εγχειρήματα. Προτείνονται κατευθύνσεις έρευνας για τη βελτιστοποίηση του μοντέλου και πιθανές κατευθύνσεις έρευνας για την αξιοποίηση του μοντέλου στην Προσθετική του Αμφιβληστροειδούς.

Παράρτημα Συντομογραφιών

ACs : Amacrine Cells - Βραχύινα Κύτταρα

Aga4A : Agatoxin 4A

AMD : Age Related Macular Degeneration - Σχετιζόμενος με την πάροδο της ηλικίας Εκφυλισμός της Ωχράς Κηλίδας

AMPA : alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

BCs : Bipolar Cells - Διπολικά Κύτταρα

BMN : Bumetanide

CCC : Cation Chloride Cotransporters - Συμμεταφορείς Ιόντων Χλωρίου

c6GA : Omega Conotoxin c6GA

DSGCs : Direction Selective Ganglion Cells - Κατευθυντικά Επιλεκτικά Γαγγλιακά Κύτταρα

FUR : Furosemide

GABA : Gamma Aminobutyric Acid - γ-Αμινοβουτυρικό Οξύ

GCL : Ganglion Cell Layer - Στρώμα Γαγγλιακών Κυττάρων

Glu : Glutamate - Γλουταμινικό Οξύ

Gly : Glycine - Γλυκίνη

INL : Inner Nuclear Layer - Έσω πυρηνικό στρώμα

IPL : Inner Plexiform Layer - Έσω συναπτικό στρώμα

LGC Ligand Gated Channel - Κανάλι Ελεγχόμενο από Συνδέτη

MOD : MOD Programming Language

ONL : Outer Nuclear Layer - Έξω πυρηνικό στρώμα

OPL : Outer Plexiform Layer - Έξω συναπτικό στρώμα

PSA : Pentanesulfonic Acid

RGCs : Retinal Ganglion Cells - Γαγγλιακά Κύτταρα του Αμφιβληστροειδούς

RP : Retinitis Pigmentosa

SACs : Starburst Amacrine Cells - Βραχύινα Κύτταρα του Αμφιβληστροειδούς, που το σχήμα τους προσομοιάζει αστρική έκρηξη

TEA : Tetraethylammonium -Τετρααιθυλαμόνιο

Th : Threshold - Κατώφλι

TTX : Tetrodotoxin - Τετραδοτοξίνη

vAChT : vesicular Acetylcholine Transporter - Κυστώδης Διαβιβαστής Ακετυλοχολίνης

VGC : Voltage Gated Channel - Κανάλι Ελεγχόμενο από Τάση

Παράρτημα Εικόνων

Κεφάλαιο 1^ο

- Εικόνα 1 : Δομή του ανθρώπινου οφθαλμού, J. C. Martins and L. A. Sousa, *Bioelectronic Vision*, World Scientific, Series on Bioengineering and Biomedical Engineering, Vol.3 Singapore, 2009.
- Εικόνα 2 : Σχηματική αναπαράσταση των κυττάρων του αμφιβληστροειδούς, J. C. Martins and L. A. Sousa, *Bioelectronic Vision*, World Scientific, Series on Bioengineering and Biomedical Engineering, Vol.3 Singapore, 2009.
- Εικόνα 3 : Πολυστρωματική δομή του αμφιβληστροειδούς σε εικόνα από μικροσκόπιο, J. C. Martins and L. A. Sousa, *Bioelectronic Vision*, World Scientific, Series on Bioengineering and Biomedical Engineering, Vol.3 Singapore, 2009.
- Εικόνα 4 : Πληθυσμιακή πυκνότητα φωτοϋποδοχέων στον αμφιβληστροειδή, J. C. Martins and L. A. Sousa, *Bioelectronic Vision*, World Scientific, Series on Bioengineering and Biomedical Engineering, Vol.3 Singapore, 2009.
- Εικόνα 5 : Φωτοϋποδοχείς εκτός βοθρίου και στο βοθρίο, J. C. Martins and L. A. Sousa, *Bioelectronic Vision*, World Scientific, Series on Bioengineering and Biomedical Engineering, Vol.3 Singapore, 2009.
- Εικόνα 6 : Απόκριση κατευθυντικά επιλεκτικών γαγγλιακών κυττάρων (DSGCs) ανάλογα με την κατεύθυνση κίνησης, W. R. Taylor and D. Vaney, *Diverse synaptic mechanisms generate direction selectivity in the rabbit retina*, , Journal of Neuroscience , 22(17) pp. 7712-7720, 2002.

Κεφάλαιο 2^ο

- Εικόνα 1 : Φωτογραφία επισημασμένου με χρωμοφόρο SAC από μικροσκόπιο, S. E. Hausselt, T. Euler, P. B. Detwiler and W. Denk, *A Dendrite-Autonomous Mechanism for Direction Selectivity in Retinal Starburst Amacrine Cells*, PLoS, Vol.5, Issue 5, ed.185, pp.1474-1493, 2014.
- Εικόνα 2 : Μορφολογία ενός τυπικού νευρώνα
- Εικόνα 3 : Δακτυλιοειδείς ζώνες των διακλαδώσεων του κυττάρου και περιοχές των συνάψεων εισόδου και εξόδου, T. Euler, P. B. Detwiler and W. Denk, *Directionally selective calcium signals in dendrites of starburst amacrine cells*, Nature, 418, pp.845-852, 2002.
- Εικόνα 4 : Θέσεις των σωμάτων των On-SACs και Off-SACs, D. I. Vaney, B. Sivyer and W. R. Taylor *Direction Selectivity in the retina : Symmetry and Asymmetry in structure and function*, Letters to Nature, Vol.13, pp.194-208, 2012.

- Εικόνα 5 : Θέσεις των γειτονικών SACs και η ανάλογη αλληλεπίδρασή τους, S. Lee and Z. J. Zhou, *The synaptic mechanism of Direction Selectivity in distal processes of starburst amacrine cells*, Neuron Journal, Vol.51, pp.787-799, 2006.

Κεφάλαιο 3^ο

- Εικόνα 1 : Προτιμητέα κατεύθυνση η φυγόκεντρος, σε σχέση με την κεντρομόλο, S. I. Fried and R. H. Masland, *Image Processing : How the retina detects the direction of image motion*, Current Biology, Vol.17, No.2, pp.63-66, 2006.
- Εικόνα 2 : Απόκριση ενός SAC σε μια μπάρα φωτός, που κινείται κατά μήκος του οπτικού του πεδίου, A. V. Dmitriev, K. E. Gavrikov and S. C. Mangel, *GABA-mediated spatial and temporal asymmetries that contribute to the directionally selective light responses of starburst amacrine cells*, Journal of Physiology, 590.7, pp.1699-1720, 2012.
- Εικόνα 3 : Ρεύματα διέγερσης ενός DSGC, κατά την κίνηση φωτεινής μπάρας στην προτιμητέα και μη προτιμητέα κατεύθυνση, S. I. Fried, T. A. Münch and F. S. Werblin *Mechanisms and circuitry underlying directional selectivity in the retina*, Nature, Vol.420, pp.411-414, 2002.
- Εικόνα 4 : Σχηματική αναπαράσταση των συνάψεων μεταξύ διπολικών(BCs), βραχύνων(SACs) και γαγγλιακών(DSGCs) κυττάρων στο εσωτερικό συναπτικό στρώμα, P. R. Poznanski, *Cellular inhibitory behavior underlying the formation of retinal direction selectivity in the starburst network*, Journal of Integrative Neuroscience, Vol.9, No.10, pp.299-335, 2010.
- Εικόνα 5 : Σχηματική αναπαράσταση των συνάψεων μεταξύ διπολικών(BCs), βραχύνων(SACs) και γαγγλιακών(DSGCs) κυττάρων στο εσωτερικό συναπτικό στρώμα και οι ειδικοί νευροδιαβιβαστές, K. E. Gavrikov, A. V. Dmitriev, K. T. Keyser and S. C. Mangel, *Cation-Chloride cotransporters mediate neural computation in the retina*, PNAS, Vol.100, No.26, pp.16047-16052, 2003.
- Εικόνα 6 : Σχηματική αναπαράσταση του οπτικού πεδίου ενός SAC, S. I. Fried and R. H. Masland, *Image Processing : How the retina detects the direction of image motion*, Current Biology, Vol.17, No.2, pp.63-66, 2006.
- Εικόνα 7 : Σχηματική αναπαράσταση του ειδικού υποδοχέα του γ-αμινοβουτυρικού οξέος, *GABA Receptor*, Wikipedia, the free encyclopedia
- Εικόνα 8 : Σχηματική αναπαράσταση του ειδικού υποδοχέα του Γλουταμινικού οξέος, *Glutamate Receptor*, Wikipedia, the free encyclopedia
- Εικόνα 9 : Ρεύματα διέγερσης του SAC ανάλογα με την αλληλουχία των σημείων διέγερσης, S. I. Fried and R. H. Masland, *Image Processing : How the retina detects the direction of image motion*, Current Biology, Vol.17, No.2, pp.63-66, 2006.

- Εικόνα 10 : Προτάσεις για μοντέλα, που εξηγούν την χρονική αλληλουχία των ρευμάτων εισόδου των SACs, J. S. Kim, M. J. Green, A. Zlateski, K. Lee, M. Richardson, S. C. Turaga, M. Purcaro, M. Balkam, A. Robinson, B. F. Behabadi, M. Campos, W. Denk, H. S. Seung, *Space-time wiring specificity supports direction selectivity in the retina*, Letters to Nature, Research Article, 2014.
- Εικόνα 11 : Μοντέλο της δημιουργίας της κατευθυντικής επιλεκτικότητας στον αμφιβληστροειδή, A. V. Dmitriev, K. E. Gavrikov and S. C. Mangel, *GABA-mediated spatial and temporal asymmetries that contribute to the directionally selective light responses of starburst amacrine cells*, Journal of Physiology, 590.7, pp.1699-1720, 2012.

Κεφάλαιο 4^ο

- Εικόνα 1 : Διέγερση ενός βραχύνου κυττάρου με ομόκεντρους δακτυλίους, των οποίων η φωτεινότητα εναλλάσσεται με ημιτονοειδή ρυθμό, S. E. Hausselt, T. Euler, P. B. Detwiler and W. Denk, *A Dendrite-Autonomous Mechanism for Direction Selectivity in Retinal Starburst Amacrine Cells*, PLoS, Vol.5, Issue 5, ed.185, pp.1474-1493, 2014.
- Εικόνα 2 : Απεικόνιση ενός συστήματος
- Εικόνα 3 : Απόκριση του κυττάρου σε διέγερση με ομόκεντρους δακτυλίους, των οποίων η φωτεινότητα μεταβάλλεται ημιτονοειδώς, S. E. Hausselt, T. Euler, P. B. Detwiler and W. Denk, *A Dendrite-Autonomous Mechanism for Direction Selectivity in Retinal Starburst Amacrine Cells*, PLoS, Vol.5, Issue 5, ed.185, pp.1474-1493, 2014.
- Εικόνα 4 : Απόκριση των κυττάρων σε διέγερση με δακτυλίους, των οποίων το πλάτος μεταβάλλεται ημιτονοειδώς και το εύρος της δακτυλιοειδούς ζώνης μεταβάλλεται, S. E. Hausselt, T. Euler, P. B. Detwiler and W. Denk, *A Dendrite-Autonomous Mechanism for Direction Selectivity in Retinal Starburst Amacrine Cells*, PLoS, Vol.5, Issue 5, ed.185, pp.1474-1493, 2014.
- Εικόνα 5 : Σχηματική απεικόνιση της μορφής ενός ιοντικού καναλιού, *Ion Channel*, Wikipedia, the free encyclopedia
- Εικόνα 6 : Σχηματική απεικόνιση της μορφής ενός ελεγχόμενου από τάση ιοντικού καναλιού, *Voltage Gated Ion Channel*, Wikipedia, the free encyclopedia
- Εικόνα 7 : Σχηματική απεικόνιση της μορφής ενός ελεγχόμενου από συνδέτη ιοντικού καναλιού, *Ligand Gated Ion Channel*, Wikipedia, the free encyclopedia
- Εικόνα 8 : Παρουσίαση των ιοντικών καναλιών και των γενικότερων μέσων μεταφοράς ιόντων κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης στα SACs, P. R. Poznanski, *Cellular inhibitory behavior underlying the formation of retinal direction selectivity in the starburst network*, Journal of Integrative Neuroscience, Vol.9, No.10, pp.299-335, 2010.

- Εικόνα 9 : Ρεύματα, που παρατηρήθηκαν κατά την οδήγηση των κυττάρων σε διάφορες τιμές δυναμικού, E. D. Cohen, *Voltage-gated calcium and sodium currents of starburst amacrine cells in the rabbit retina*, Journal of Visual Neuroscience, Vol.18, pp.799-809, 2001.
- Εικόνα 10 : Α. Κύτταρα χρωματισμένα με χρωμοφόρο, που εντοπίζει τα ρεύματα, που οφείλονται στο γονίδιο $Na_v1.8$ Β. Κύτταρα χρωματισμένα με χρωμοφόρο, που εντοπίζει τη GABA C. Όρια των στρωμάτων του αμφιβληστροειδούς D. Κύτταρα χρωματισμένα με χρωμοφόρο, που εντοπίζει το γονίδιο $Na_v1.8$ Ε. Κύτταρα χρωματισμένα με χρωμοφόρο, που εντοπίζει την Ακετυλοχολίνη, B. J. O' Brien, J. H. Caldwell, G. R. Ehring, K. M. Bumsted O' Brien, Sonjiang Luo and S. Rock Levinson, *Tetrodotoxin-Resistant Voltage-Gated Sodium Channels $Na_v1.8$ and $Na_v1.9$ Are Expressed in the Retina*, Journal of Comparative Neurology, Vol.508, pp.940-951, 2008.
- Εικόνα 11 : Μετρήσεις του δυναμικού μεμβράνης ενός SAC (Α) και ενός γαγγλιακού κυττάρου (Β) στα οποία εγχέονται ρεύματα διαφόρων επιπέδων, A. Ozaita, J. Petit-Jacques, B. Volgyi, Chi Shun Ho, R. H. Joho, S. A. Bloomfield and B. Rudy, *A Unique Role for $Kv3$ Voltage-Gated Potassium Channels in Starburst Amacrine Signalling in Mouse Retina*, Journal of Neuroscience, 24(33), pp.7335-7343, 2004.
- Εικόνα 12 : Μετρήσεις των ρευμάτων του SAC κατά την οδήγησή του σε διάφορες τιμές τάσης, A. Ozaita, J. Petit-Jacques, B. Volgyi, Chi Shun Ho, R. H. Joho, S. A. Bloomfield and B. Rudy, *A Unique Role for $Kv3$ Voltage-Gated Potassium Channels in Starburst Amacrine Signalling in Mouse Retina*, Journal of Neuroscience, 24(33), pp.7335-7343, 2004.
- Εικόνα 13 : Υψηλότερη πυκνότητα στην έκφραση της πρωτεΐνης K_v3 στο σώμα και τους κοντινούς δένδριτες σε σχέση με τους ενδιάμεσους και τους απομακρυσμένους, A. Ozaita, J. Petit-Jacques, B. Volgyi, Chi Shun Ho, R. H. Joho, S. A. Bloomfield and B. Rudy, *A Unique Role for $Kv3$ Voltage-Gated Potassium Channels in Starburst Amacrine Signalling in Mouse Retina*, Journal of Neuroscience, 24(33), pp.7335-7343, 2004.
- Εικόνα 14 : Ρεύματα Ασβεστίου στα SACs κατά την οδήγηση των κυττάρων σε διάφορες τιμές δυναμικού, E. D. Cohen, *Voltage-gated calcium and sodium currents of starburst amacrine cells in the rabbit retina*, Journal of Visual Neuroscience, Vol.18, pp.799-809, 2001.
- Εικόνα 15 : Ρεύματα Ασβεστίου στα SACs κατά την παρουσία της ουσίας BAY K8644 και κατά την απουσία της, E. D. Cohen, *Voltage-gated calcium and sodium currents of starburst amacrine cells in the rabbit retina*, Journal of Visual Neuroscience, Vol.18, pp.799-809, 2001.
- Εικόνα 16 : Ρεύματα Ασβεστίου στα SACs κατά την παρουσία της ουσίας Ω-κονοτοξίνη cG6A, κατά την απουσία της και η διαφορά τους, E. D. Cohen, *Voltage-gated calcium and sodium currents of starburst amacrine cells in the rabbit retina*, Journal of Visual Neuroscience, Vol.18, pp.799-809, 2001.
- Εικόνα 19 : Αποκρίσεις γαγγλιακών κυττάρων κατά την παρουσία Bumetanide, Furosemide, Pentanesulfonic Acid και κατά την απουσία τους, K. E. Gavrikov, A. V. Dmitriev, K. T. Keyser and S. C. Mangel, *Cation chloride cotransporters mediate neural computation in the retina*, Proc. of the National Academy of Science, USA, Vol.100, pp.16047-16052, 2003.

Κεφάλαιο 5^ο

- Εικόνα 1 : Ανακατασκευασμένη εικόνα ενός SAC, από την επισημασμένη με χρωμοφόρο φωτογραφία του από μικροσκόπιο και σχηματικές απεικονίσεις των γεωμετρικών χαρακτηριστικών των μοντέλων των Velte-Miller, T. J. Velte and R. F. Miller, *Spiking and Nonspiking models of starburst amacrine cells in the rabbit retina*, Visual Neuroscience, Vol.14, pp.1073-1088, 1997
- Εικόνα 2 : Σχηματική απεικόνιση του μοντέλου των Dmitriev et al, A. V. Dmitriev, K. E. Gavrikov and S. C. Mangel, *GABA mediated spatial and temporal asymmetries that contribute to the directionally selective light responses of starburst amacrine cells in retina*, Journal of Physiology, 590.7, pp.1699-1720, 2012.
- Εικόνα 3 : Κυκλωματικό διάγραμμα του μοντέλου των Dmitriev et al για την περιγραφή των δενδριτών του κυττάρου, A. V. Dmitriev, K. E. Gavrikov and S. C. Mangel, *GABA mediated spatial and temporal asymmetries that contribute to the directionally selective light responses of starburst amacrine cells in retina*, Journal of Physiology, 590.7, pp.1699-1720, 2012.
- Εικόνα 4 : Πεδία λήψης κατασταλτικής και διεγερτικής εισόδου στα SACs. όπως μοντελοποιήθηκε στη μελέτη των Dmitriev et al, A. V. Dmitriev, K. E. Gavrikov and S. C. Mangel, *GABA mediated spatial and temporal asymmetries that contribute to the directionally selective light responses of starburst amacrine cells in retina*, Journal of Physiology, 590.7, pp.1699-1720, 2012.
- Εικόνα 5 : Δομή του μοντέλου, που αποτελείται από τις τρεις ομόκεντρες περιοχές δενδριτών
- Εικόνα 6 : Απόκριση σε διέγερση ενός βραχύνιου κυττάρου με παλμούς ρεύματος πλάτους -100,-50, 0,+50,+200,+300, και +400, A. Ozaita, J. Petit-Jacques, B. Volgyi, Chi Shun Ho, R. H. Joho, S. A. Bloomfield and B. Rudy, *A Unique Role for Kv3 Voltage-Gated Potassium Channels in Starburst Amacrine Signalling in Mouse Retina*, Journal of Neuroscience, 24(33), pp.7335-7343, 2004.
- Εικόνα 7 : Απόκριση του μοντέλου σε διέγερση με παλμούς ρεύματος πλάτους -100,-50, 0,+50,+200,+300, και +400 pA
- Εικόνα 8 : Απόκριση του μοντέλου μας σε διέγερση με παλμούς ρεύματος πλάτους 100-250pA και διάρκειας 50-70ms ανάλογα με την ηλικία σε εβδομάδες μετά τη γέννηση, J. Z. Zhou and G. L. Fain, *Starburst Amacrine Cells change from Spiking to Non-spiking neurons during retinal Development*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol.93, No.15, pp.8057-8062, 1996
- Εικόνα 9 : Απόκριση του μοντέλου σε διέγερση με παλμούς ρεύματος πλάτους 100-600pA και διάρκειας 70ms
- Εικόνα 10 : Μελέτη της επιρροής της διέγερσης ενός απόμακρου τμήματος κάποιου δενδρίτη στην απόκριση του γειτονικού του, για να εξετάσουμε το φαινόμενο της ηλεκτρικής απομόνωσης των δενδριτών

- Εικόνα 11 : Ηλεκτρική δραστηριότητα και διάδοσή της σε γειτονικό δενδρίτη από αυτόν, που διεγείρουμε.
- Εικόνα 12 : Μελέτη της επιρροής της διέγερσης ενός απόμακρου τμήματος κάποιου δενδρίτη στην απόκριση του απέναντί του, για να εξετάσουμε το φαινόμενο της ηλεκτρικής απομόνωσης των δενδριτών
- Εικόνα 13 : Ηλεκτρική δραστηριότητα και διάδοσή της στον απέναντι δενδρίτη από αυτόν, που διεγείρουμε, για να εξετάσουμε την ιδιότητα της προτιμητέας κατεύθυνσης κίνησης. Παρατηρούνται οι επιδράσεις της κεντρομόλου και της φυγόκεντρου διάδοσης στο ηλεκτρικό σήμα
- Εικόνα 14 : Εστίαση στην επίδραση της κεντρομόλου διάδοσης στο ηλεκτρικό σήμα
- Εικόνα 15 : Εστιάζουμε στην επίδραση της φυγόκεντρου διάδοσης στο ηλεκτρικό σήμα

Κεφάλαιο 6^ο

- Εικόνα 1 : Διάταξη Προσθετικής Αμφιβληστροειδούς, J. D. Weiland, W. Liu, M. S. Humayun, *Retinal Prosthesis*, Annual Review of Biomedical Engineering, Vol. 7, pp.361-401, 2005
- Εικόνα 2 : Φωτογραφίες πραγματικού εξοπλισμού του συστήματος Argus II, J. D. Weiland, W. Liu, M. S. Humayun, *Retinal Prosthesis*, Annual Review of Biomedical Engineering, Vol. 7, pp.361-401, 2005
- Εικόνα 3 : Σχηματική απεικόνιση του διαφασικού παλμού, με τον οποίο ως τώρα γίνεται η διέγερση των νευρικών κυττάρων στα εμφυτεύματα του αμφιβληστροειδούς, *Biphasic Pulse*, Wikipedia, the free Encyclopedia
- Εικόνα 4 : Επίδραση της αύξησης του πλάτους της κυματομορφής στο μέγεθος και τη φωτεινότητα των αντιλαμβανόμενων φωσφονίων, D. Nanduri, I. Fine, A. Horsager, G. Boynton, M. Humayun, R. Greenberg and J. Weiland, *Frequency and Amplitude Modulation Have Different Effects on the Percepts Elicited by Retinal Stimulation*, Investigative Ophthalmology and Visual Science, Vol.53(1), pp. 205-214, 2012
- Εικόνα 5 : Επίδραση της αύξησης της συχνότητας στο μέγεθος και τη φωτεινότητα των αντιλαμβανόμενων φωτονίων, D. Nanduri, I. Fine, A. Horsager, G. Boynton, M. Humayun, R. Greenberg and J. Weiland, *Frequency and Amplitude Modulation Have Different Effects on the Percepts Elicited by Retinal Stimulation*, Investigative Ophthalmology and Visual Science, Vol.53(1), pp. 205-214, 2012
- Εικόνα 6 : Γραμμική παραμόρφωση του αντιλαμβανόμενου φωσφονίου, λόγω διέγερσης των νευροαξόνων γειτονικών κυττάρων, A. Weitz, D. Nanduri, M. Behrend, Al. Gonzalez-Calle, R. Greenberg, M. Humayun, R. Chow and J. Weiland, *Improving the spatial resolution of epiretinal implants by increasing stimulus pulse duration*, Science Translational Medicine, Vol.7, Issue 318, pp.318, 2015

- Εικόνα 7 : Κύτταρα που διεγείρονται από ένα ηλεκτρόδιο και τα αντίστοιχα κατώφλια τους ανάλογα με το χρονικό μήκος του χρησιμοποιούμενου παλμού, A. Weitz, D. Nanduri, M. Behrend, Al. Gonzalez-Calle, R. Greenberg, M. Humayun, R. Chow and J. Weiland, *Improving the spatial resolution of epiretinal implants by increasing stimulus pulse duration*, Science Translational Medicine, Vol.7, Issue 318, pp.318, 2015
- Εικόνα 8 : Κύτταρα που διεγείρονται από ηλεκτρόδια διαφορετικών μεγεθών και τα αντίστοιχα κατώφλια τους ανάλογα με το χρονικό μήκος του χρησιμοποιούμενου παλμού, A. Weitz, D. Nanduri, M. Behrend, Al. Gonzalez-Calle, R. Greenberg, M. Humayun, R. Chow and J. Weiland, *Improving the spatial resolution of epiretinal implants by increasing stimulus pulse duration*, Science Translational Medicine, Vol.7, Issue 318, pp.318, 2015
- Εικόνα 9 : Κατώφλι διέγερσης κυττάρων ως συνάρτηση της απόστασής τους από το κέντρο του ηλεκτροδίου, A. Weitz, D. Nanduri, M. Behrend, Al. Gonzalez-Calle, R. Greenberg, M. Humayun, R. Chow and J. Weiland, *Improving the spatial resolution of epiretinal implants by increasing stimulus pulse duration*, Science Translational Medicine, Vol.7, Issue 318, pp.318, 2015
- Εικόνα 10 : Αναπαράσταση γραμμάτων και λέξεων με ταυτόχρονη διέγερση γειτονικών ηλεκτροδίων, που διεγείρουν τοπικά τα νευρικά κύτταρα, A. Weitz, D. Nanduri, M. Behrend, Al. Gonzalez-Calle, R. Greenberg, M. Humayun, R. Chow and J. Weiland, *Improving the spatial resolution of epiretinal implants by increasing stimulus pulse duration*, Science Translational Medicine, Vol.7, Issue 318, pp.318, 2015
- Εικόνα 11 : Αριθμός εκπεμπόμενων παλμών από ημιτονοειδώς διεγερόμενα γαγγλιακά κύτταρα ανάλογα με τη συχνότητα και το πλάτος της κυματομορφής καθώς και τη θέση της διέγερσης, D. Freeman, D. Eddington, J. Rizzo and S. Fried, *Selective Activation of Neuronal Targets with Sinusoidal Electric Stimulation*, Journal of Neurophysiology, Vol.104(5), pp. 2778-2791, 2010

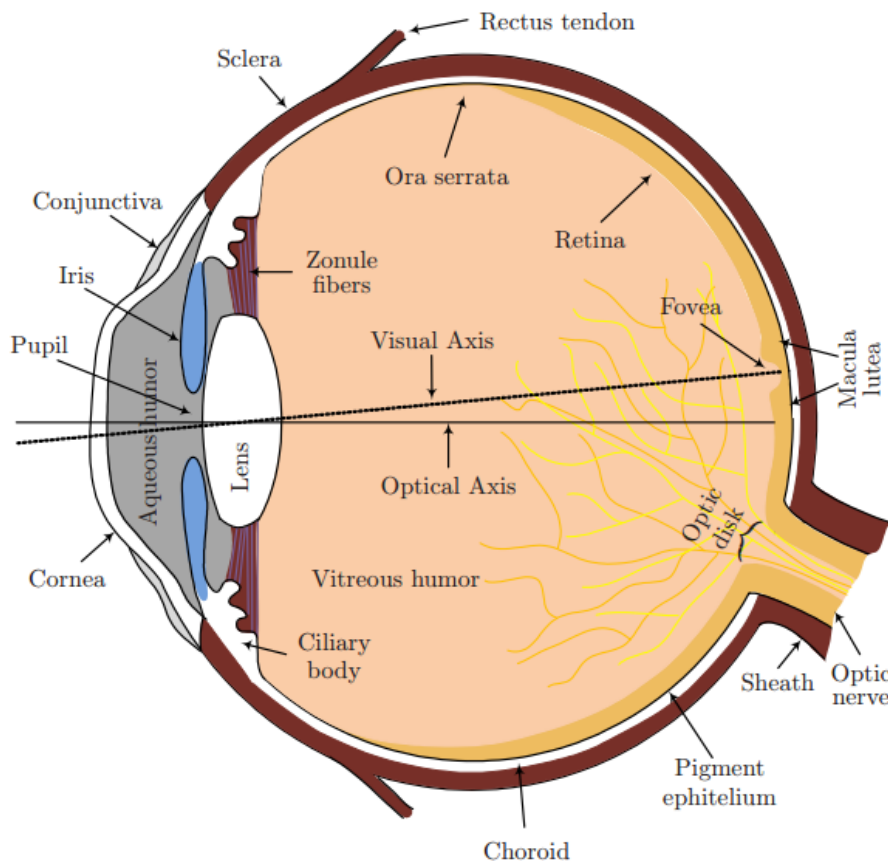
Κεφάλαιο 1^ο : Δομή Οφθαλμού και Αμφιβληστροειδούς

1.1 Εισαγωγή - Στόχοι

Στο Κεφάλαιο αυτό δίνεται μια περιγραφή της δομής του ανθρώπινου οφθαλμού και του βασικότερου χιτώνα του, που είναι ο αμφιβληστροειδής. Σκοπός του Κεφαλαίου είναι να αποκτήσει ο αναγνώστης μια γενική εικόνα για το πώς είναι φτιαγμένος ο δέκτης του ανθρώπινου οργανισμού για τις οπτικές διεγέρσεις από τον έξω κόσμο. Με τον τρόπο αυτό, γίνεται πιο κατανοητό το σημείο, στο οποίο θα γίνει η εμβάθυνσή στα επόμενα Κεφάλαια. Επίσης γίνεται αναφορά σε ορισμένες από τις βασικές κατηγορίες κυττάρων, που εμφανίζονται στον αμφιβληστροειδή και στα οποία θα αναλυθούν στα επόμενα Κεφάλαια.

1.2 Δομή του Ανθρώπινου Οφθαλμού

Η δομή του ανθρώπινου οφθαλμού απεικονίζεται στην Εικόνα 1 :



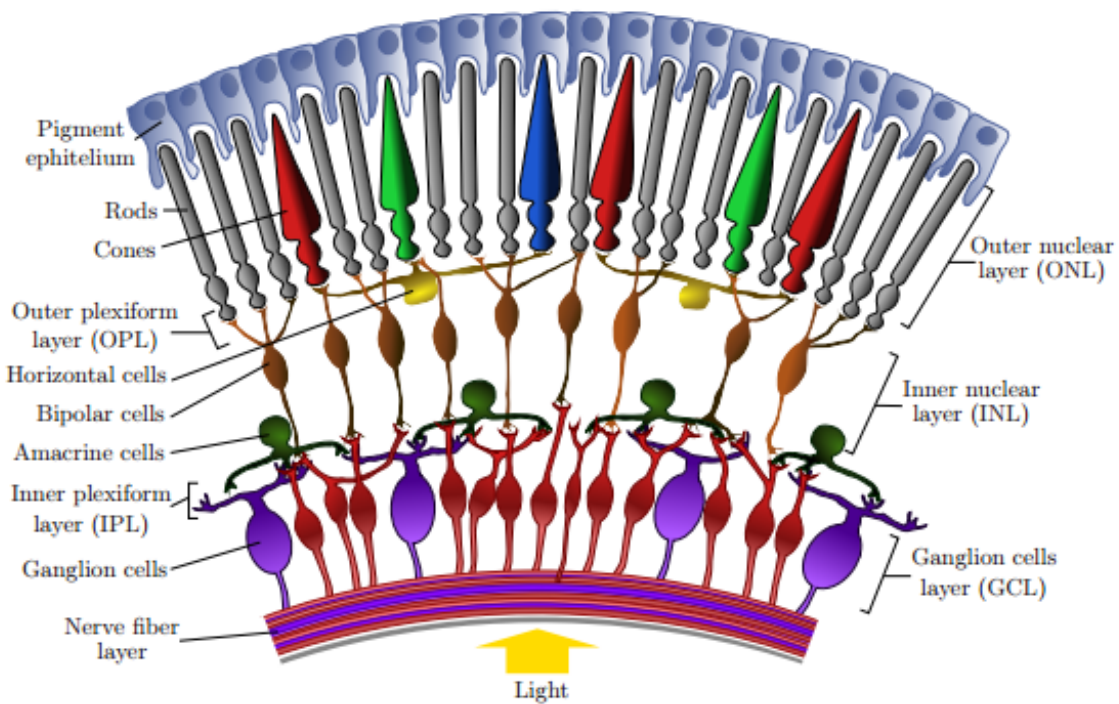
Εικόνα 1 : Δομή του ανθρώπινου οφθαλμού [1]

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1, οι ακτίνες του φωτός περνούν από τον κερατοειδή χιτώνα (cornea) και το φακό του ματιού (lens). Μέσα από τα δύο αυτά στοιχεία του ματιού γίνεται η εστίαση των φωτεινών ακτίνων στον αμφιβληστροειδή χιτώνα του ματιού (Retina). Συγκεκριμένα, η εστίαση γίνεται κατά κύριο λόγο μέσω του κερατοειδούς χιτώνα (cornea), παρότι ο χιτώνας αυτός έχει πολύ μικρότερο μήκος (διάδοσης του φωτός) σε σχέση με τον φακό (Lens) και με το υγρό του ματιού. Αυτό οφείλεται

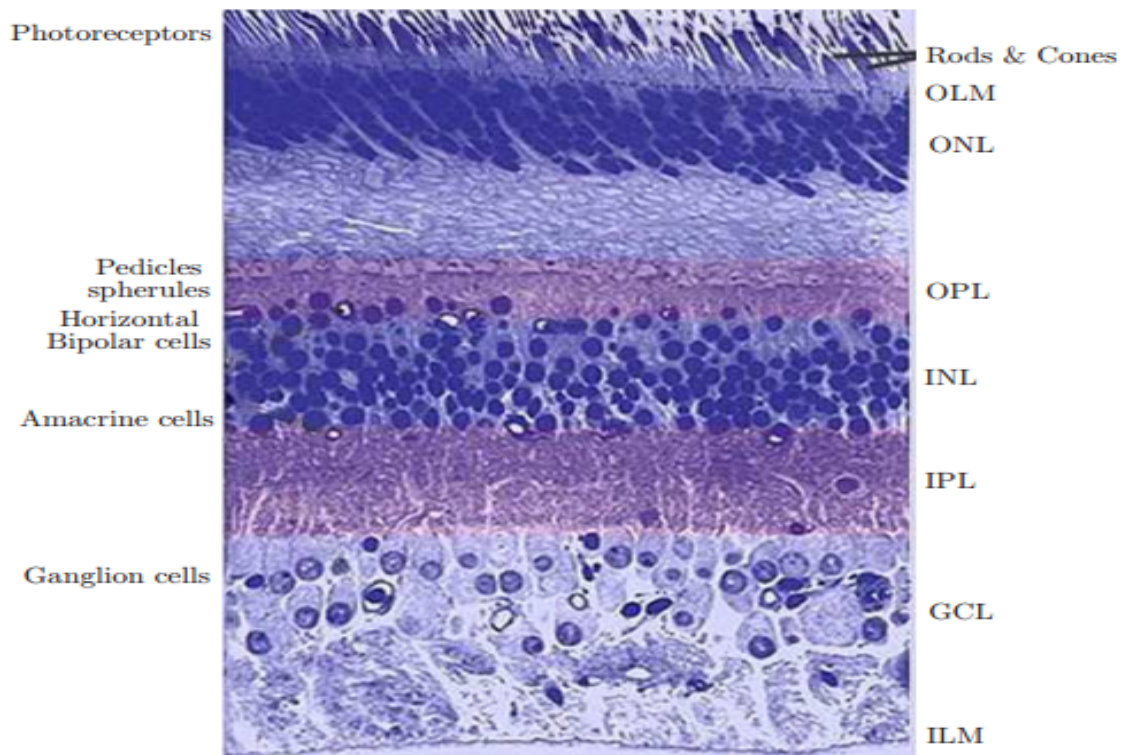
στο ότι η διαφορά του δείκτη διάθλασης από τον αέρα του περιβάλλοντος στον κερατοειδή είναι πολύ μεγαλύτερη από τη διαφορά των δεικτών διάθλασης του κερατοειδούς και του υγρού του ματιού ή του υγρού του ματιού και του φακού.

Το σημείο εστίασης των φωτεινών ακτίνων πάνω στον αμφιβληστροειδή λέγεται βοθρείο (Fovea) και έχει την μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα σε σχέση με όλο τον υπόλοιπο αμφιβληστροειδή χιτώνα, λόγω μεγαλύτερης πυκνότητας φωτοευαίσθητων κυττάρων (photoreceptors). Τα υπόλοιπα σημεία του αμφιβληστροειδούς, στα οποία γίνεται προβολή των φωτεινών ακτίνων συμβάλλουν στην περιφερική όραση. Η περιοχή του αμφιβληστροειδούς, που περιβάλλει το βοθρείο λέγεται ωχρά κηλίδα (macula lutea). Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας αποτελείται από πολλά στρώματα νευρικών κυττάρων με εξειδικευμένη δομή, μορφή και λειτουργία. Οι απολήξεις του τελευταίου στρώματος συμπλέκονται και συγχροτούν το οπτικό νεύρο. Στο σημείο, όπου τα στρώματα νευρικών κυττάρων συγχροτούν το οπτικό νεύρο και εγκαταλείπουν το μάτι προς τον εγκέφαλο δεν υπάρχουν προφανώς ούτε φωτοευαίσθητα κύτταρα, αλλά ούτε νευρικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς. Ως αποτέλεσμα, το σημείο αυτό χαρακτηρίζεται ως τυφλό σημείο. Η ύπαρξη αυτού του σημείου και στα δύο μάτια είναι όμως μη αισθητή, καθώς το οπτικό πεδίο, που καταλήγει στο τυφλό σημείο του ενός οφθαλμού προβάλλεται ικανοποιητικά από τον άλλο οφθαλμό.

1.3 Πολυστρωματική Δομή του Αμφιβληστροειδούς



Εικόνα 2 : Σχηματική αναπαράσταση των κυττάρων του αμφιβληστροειδούς[1]



Εικόνα 3 : Πολυστρωματική δομή του αμφιβληστροειδούς σε εικόνα από μικροσκόπιο.[1]

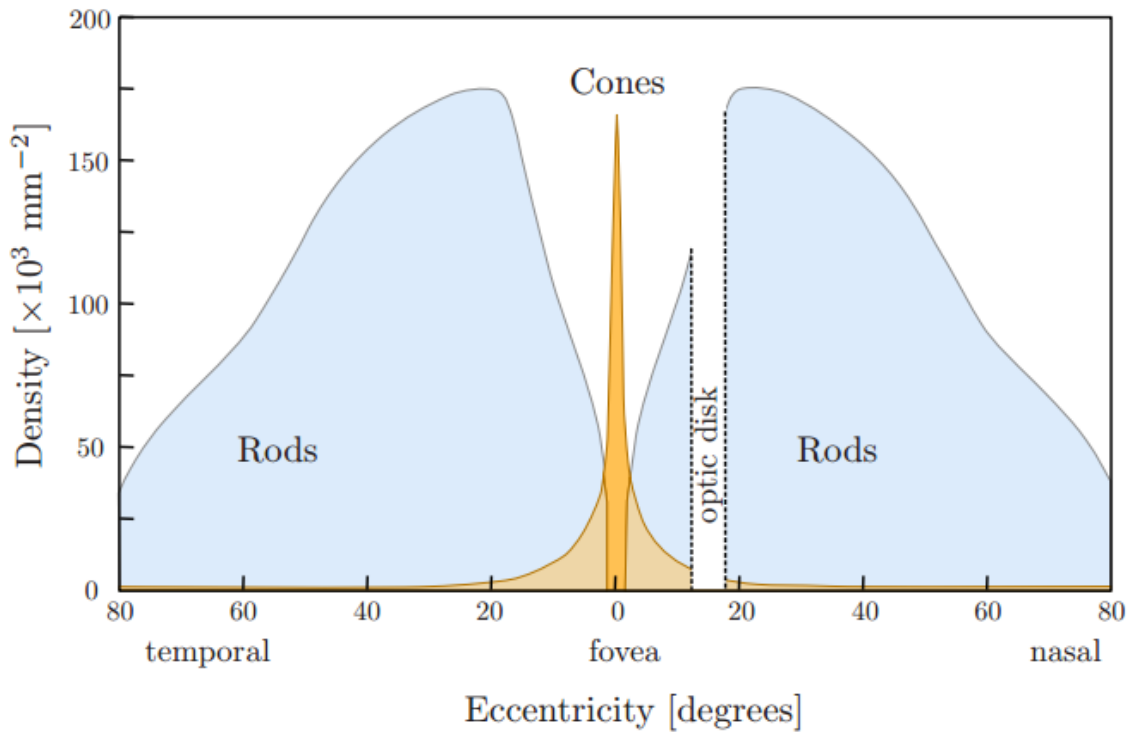
Στην Εικόνα 3 φαίνεται μια πραγματική εικόνα του ανθρώπινου αμφιβληστροειδούς από μικροσκόπιο. Στην εικόνα αυτή γίνεται εμφανής η πολυστρωματική φύση του χιτώνα αυτού. Μια πιο επεξηγηματική και απλουστευτική αναπαράσταση του αμφιβληστροειδούς φαίνεται στην Εικόνα 2. Στην εικόνα αυτή παρουσιάζεται η δομή του αμφιβληστροειδούς καθώς και τα είδη και τα σχήματα των κυττάρων, που τον αποτελούν. Όπως φαίνεται, ο χιτώνας διαθέτει ένα στρώμα φωτοευαίσθητων κυττάρων, που είναι στερεωμένα πάνω στο χρωμοφόρο επιθήλιο. Οι φωτοϋποδοχείς αυτοί χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τα ραβδία και τα κωνία, που παίρνουν τα ονόματά τους από τα χαρακτηριστικά σχήματά τους:

- Ραβδία

Τα ραβδία(rods) είναι επιμήκη και λεπτά και είναι περίπου 120 εκατομμύρια σε πλήθος, περίπου το 94,5% όλων των φωτοϋποδοχέων. Είναι πολύ ευαίσθητα στο φως, καθώς μπορούν να εντοπίσουν ακόμα και ένα μοναδικό φωτόνιο και συνεπώς είναι υπεύθυνα για τη σκοτοπική όραση, δηλαδή την όραση σε χαμηλά επίπεδα φωτισμού. Τα ραβδία βρίσκονται σε ολόκληρο τον αμφιβληστροειδή, εκτός από το βοθρίο, όπου η επιφανειακή πυκνότητά τους σχεδόν μηδενίζεται.

- Κωνία

Τα κωνία(cones) είναι πιο κοντά και παχύτερα σε σχήμα κώνου και είναι πολύ λιγότερα σε αριθμό (περίπου 7 εκατομμύρια). Τα κωνία βρίσκονται σε πολύ μεγάλη επιφανειακή πυκνότητα στο βοθρίο του αμφιβληστροειδούς, ενώ η πυκνότητά τους ελεττώνεται ραγδαία όσο απομακρυνόμαστε από εκεί. Είναι ευαίσθητα σε 7 διαφορετικά επίπεδα φωτεινότητας και συνεπώς είναι υπεύθυνα για την φωτοπική όραση του ανθρώπου και την αντίληψη των χρωμάτων. Υπάρχουν τρία είδη κωνίων στον αμφιβληστροειδή : Τα μπλε, τα πράσινα και τα κόκκινα, ανάλογα με το μήκος κύματος της ακτινοβολίας στην οποία ενεργοποιούνται.

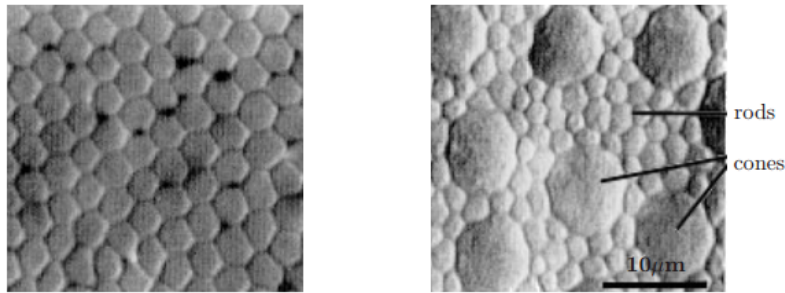


Εικόνα 4 : Πληθυσμιακή πυκνότητα φωτοϋποδοχέων στον αμφιβληστροειδή

Οι φωτοϋποδοχείς του αμφιβληστροειδούς συνδέονται με δύο τύπους νευρικών κυττάρων τώρα, τα οποία είναι τα οριζόντια (horizontal) και τα διπολικά (bipolar). Στη συνέχεια τα κύτταρα αυτά με τη σειρά τους συνδέονται σε άλλο στρώμα νευρικών κυττάρων, που περιέχει τα βραχύινα (amacrine) και τα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς (Retinal Ganglion Cells ή RGCs για συντομία).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η δομή του αμφιβληστροειδούς φαίνεται λίγο παράλογη, υπό την έννοια ότι το φως πρέπει να διασχίσει όλα τα στρώματα των νευρικών κυττάρων μέχρι να φτάσει στο στρώμα των φωτοϋποδοχέων. Αυτό γίνεται όμως, γιατί οι φωτοϋποδοχείς πρέπει να βρίσκονται σε επαφή με το χρωμοφόρο επιθήλιο. Η εξαίρεση σε αυτόν τον κανόνα εμφανίζεται στο βοθρείο, όπου τα νευρικά κύτταρα εξωθούνται, ώστε να είναι τα κωνία απευθείας εκτεθειμένα στο φως, γεγονός που μαζί με την πολύ μεγάλη πυκνότητα φωτοϋποδοχέων στο βοθρείο δικαιολογούν την πολύ υψηλή διακριτική ικανότητα του σημείου.

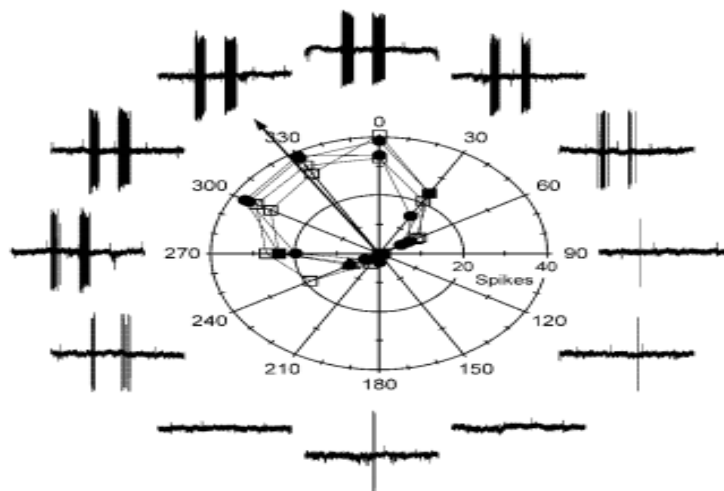
Τα κύτταρα των φωτοϋποδοχέων είναι αυτά, που ανιχνεύουν την δραστηριότητα στο οπτικό πεδίο, μέσω των αλλαγών στα επίπεδα του φωτός αλλά και στα χρώματά του. Η απόκρισή τους λειτουργεί ως διέγερση για τα διπολικά και τα οριζόντια κύτταρα. Ακριβέστερα, τα πρώτα μεταφέρουν την πληροφορία για το ποιοι φωτοϋποδοχείς διεγείρονται ανά πάσα στιγμή και τα δεύτερα κάνουν ένα είδος διαμόρφωσης, καθώς μόνο με τα διπολικά η τελική εικόνα θα είχε πολλά παράσιτα (blurring, artifacts). Στη συνέχεια η απόκριση αυτών των κυττάρων δρα ως διέγερση για τα βραχύινα και τα γαγγλιακά. Η συνεργασία αυτών των κυττάρων δημιουργεί την τελική απόκριση του αμφιβληστροειδούς, που οδηγείται στον εγκέφαλο. Εδώ πρέπει να επισημανθεί, ότι όλες οι κατηγορίες νευρικών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς εκτός από τα γαγγλιακά, δεν έχουν την συνηθισμένη απόκριση των περισσότερων νευρώνων μέσω δυναμικού δράσης, αλλά δίνουν βαθμιδωτές αποκρίσεις.



Εικόνα 5 : Φωτοϋποδοχείς εκτός βοθρίου(αριστερά, μόνο ραβδία) και στο βοθρίο(δεξιά, ραβδία και κωνία).[1]

1.4 Κατευθυντικά Επιλεκτικά Γαγγλιακά Κύτταρα

Ιδιαίτερη αναφορά στο σημείο αυτό θα γίνει σε μια συγκεκριμένη κατηγορία γαγγλιακών κυττάρων, τα λεγόμενα Direction Selective Ganglion Cells (DSGCs). Η ονομασία τους υποδεικνύει και την εξειδικευμένη λειτουργία τους. Τα κύτταρα αυτά ανιχνεύθηκαν και μελετήθηκαν για πρώτη φορά από τους Barlow & Levick [2] και παρατηρήθηκε ότι διαθέτουν δύο κατευθύνσεις στις οποίες αποκρίνονται, μία προτιμητέα και μία μη προτιμητέα. Όταν ανιχνεύεται κίνηση στο οπτικό πεδίο κατά μήκος της προτιμητέας κατεύθυνσης, τα συγκεκριμένα κύτταρα επιδεικνύουν υψηλή παλμική απόκριση και ως προς το πλάτος και ως προς τη συχνότητα. Αντίθετα, η απόκριση σε κίνηση στην μη προτιμητέα κατεύθυνση είναι μηδαμινή. Με τον τρόπο αυτό κωδικοποιείται άμεσα από το επίπεδο του αμφιβληστροειδούς η κίνηση σε συγκεκριμένη κατεύθυνση, δικαιολογώντας έτσι το χαρακτηρισμό του χιτώνα αυτού ως η μόνη εκτεθειμένη στον έξω κόσμο προέκταση του εγκεφάλου. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες έχουν ανιχνευθεί και άλλες κατηγορίες γαγγλιακών κυττάρων, όπως τα PV-5 γαγγλιακά κύτταρα [3] τα οποία είναι ευαίσθητα σε κινήσεις αντικειμένων, που πλησιάζουν προς το άτομο και εικάζεται ότι αναπτύχθηκαν εξελικτικά για την προστασία από θηρευτές, που πλησιάζουν απειλητικά, αλλά και τα λεγόμενα J γαγγλιακά κύτταρα [4], που είναι ευαίσθητα μόνο στην κίνηση προς το πάνω μέρος του οπτικού πεδίου.



Εικόνα 6 : Απόκριση κατευθυντικά επιλεκτικών γαγγλιακών κυττάρων (DSGCs) ανάλογα με την κατεύθυνση κίνησης [5]

1.5 Βιβλιογραφία

- [1] J. C. Martins and L. A. Sousa, *Bioelectronic Vision*, World Scientific, Series on Bioengineering and Biomedical Engineering, Vol.3 Singapore, 2009.
- [2] H. B. Barlow and W. R. Levick, *The mechanism of Directionally Selective units in rabbit's retina*, Journal of Physiology, pp. 477-504, 1965.
- [3] D. Alexandru, M. Georgescu, B. Catalin, D. Georgescu, M. Iancau *Morpho-functional novelty-concerning the retina and visual prosthesis*, Current Health Sciences Journal, Vol.37, No.2, pp. 62-69, 2011.
- [4] I. J. Kim, Y. Zhang, M. Yamagata, M. Meister, J. R. Sanes *Molecular identification of a retinal cell type that responds to upward motion*, Letters to Nature, Vol.452, pp. 478-482, 2008.
- [5] W. R. Taylor and D. Vaney, *Diverse synaptic mechanisms generate direction selectivity in the rabbit retina*, , Journal of Neuroscience , 22(17) pp. 7712-7720, 2002.

Κεφάλαιο 2^ο : Βραχύινα Κύτταρα : Γεωμετρία

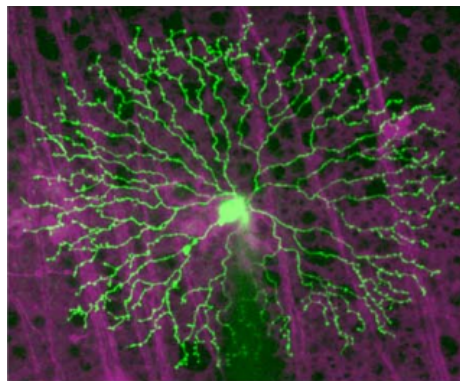
2.1 Εισαγωγή - Στόχοι

Τα DSGCs δεν είναι τα πρώτα κύτταρα, που επιδεικνύουν κατευθυντική επιλεκτικότητα. Συγκεκριμένα, όπως έχουν δείξει πάρα πολλές μελέτες, είναι μια ειδική κατηγορία ενδιάμεσων νευρώνων του αμφιβληστροειδούς, η οποία είναι υπεύθυνη για την κωδικοποίηση των διαφορετικών κατευθύνσεων κίνησης. Τα κύτταρα αυτά είναι μια από τις περίπου 40 μέχρι σήμερα αναγνωρισμένες[9, 10] και από τις σχετικά πολυπληθέστερες υποκατηγορίες των βραχύινων κυττάρων. Ονομάζονται Starburst Amacrine Cells ή σε ελεύθερη μετάφραση στα ελληνικά βραχύινα κύτταρα με σχήμα, που προσομοιάζει αστρική έκρηξη. Στην Εικόνα 1 φαίνεται ένα επισημασμένο με χρωμοφόρο κύτταρο αυτής της κατηγορίας. Ο σκοπός του Κεφαλαίου αυτού είναι να παρουσιαστούν αναλυτικά οι βασικές γεωμετρικές και μορφολογικές ιδιότητες αυτής της εξειδικευμένης κατηγορίας νευρώνων. Η χαρακτηριστική και πολύ ιδιάζουσα γεωμετρία των κυττάρων αυτών θεωρείται πως διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην εξειδικευμένη λειτουργία τους. Για αυτό το λόγο μια μοντελοποίηση των κυττάρων πρέπει να μην αγνοεί μια τόσο βασική τους παράμετρο όπως η γεωμετρία και η μορφολογία.

2.2 Μορφή και Λειτουργία των Βραχύινων Κυττάρων

Starburst Amacrine Cells (SACs)

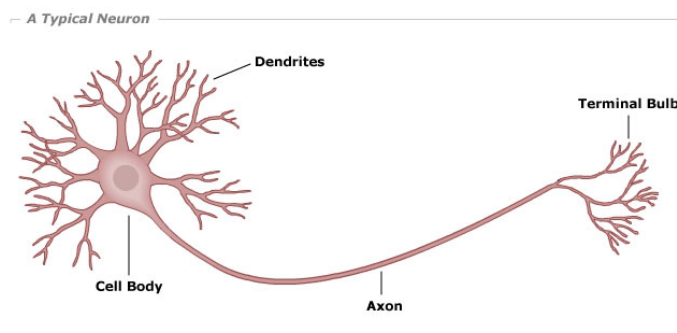
Η χαρακτηριστική γεωμετρία, που τους προσέδωσε και το όνομά τους φαίνεται στην Εικόνα 1. Η συμμετρία είναι έκδηλη στο σχήμα τους, αλλά οι συνάψεις, που σχηματίζουν και συνεπώς και η λειτουργία τους χαρακτηρίζονται από ασυμμετρία[8], γεγονός που είναι απαραίτητο για την επιτέλεση της εξειδικευμένης λειτουργίας τους. Πιο συγκεκριμένα, οι Wei et al σε μελέτη τους[8] βρήκαν ότι στην πρώτη εβδομάδα μετά την γέννηση γενετικά τροποποιημένων ποντικών, οι συνάψεις μεταξύ SACs και DSGCs είχαν την ίδια ισχύ, ανεξάρτητα αν το SAC βρισκόταν από την προτιμητέα ή τη μη προτιμητέα πλευρά του DSGC. Με το τέλος της δεύτερης εβδομάδας όμως μετά τη γέννηση, παρατηρήθηκε ότι οι συνάψεις από την μια πλευρά του DSGC (συγκεκριμένα από την μη προτιμητέα) είχαν αποκτήσει μεγαλύτερη ισχύ από τις άλλες. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα αναπτύσσουν μια λειτουργική ασυμμετρία μετά την γέννηση και το άνοιγμα των ματιών, που διαμορφώνει την επιλεκτικότητά τους στις διαφορετικές κατευθύνσεις. Σε μια πολύ πρόσφατη μελέτη τους[12], Kim et al έδειξαν βέβαια, ότι τα SACs δεν έχουν μία και μόνο προτιμητέα και μία μη προτιμητέα κατεύθυνση, όπως τα DSGCs. Μάλιστα υποστήριξαν, ότι ο κάθε δενδρίτης του κυττάρου έχει ξεχωριστή προτιμητέα κατεύθυνση, την φυγόκεντρο, και μη προτιμητέα, την κεντρομόλο.



Εικόνα 1 : Φωτογραφία επισημασμένου με χρωμοφόρο SAC από μικροσκόπιο[11]

2.3 Γεωμετρία των Κυττάρων

Τα κύτταρα αυτά, αντίθετα από τους συνηθισμένους νευρώνες, δεν έχουν την χαρακτηριστική δομή με το σώμα του κυττάρου, τους δενδρίτες, τον άξονα και τις απολήξεις αυτού, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2. Αντίθετα διαθέτουν μια συμμετρική δομή, χωρίς κύριο άξονα, αλλά με πολλούς δενδρίτες μεγάλου μήκους, που εκτείνονται και διακλαδίζονται με μια σχετική κανονικότητα. Οι διακλαδώσεις των δενδριτών τους παρουσιάζουν μια κυκλική συμμετρία. Πιο συγκεκριμένα μπορεί να γίνει μια διάκριση των δενδριτών σε τρεις ομόκεντρες δακτυλιοειδείς περιοχές[1, 2] ανάλογα με την απόστασή τους από το σώμα των κυττάρων. Οι περιοχές αυτές φαίνονται στην Εικόνα 3 και χαρακτηρίζονται ως proximate ή κοντινή, intermediate ή ενδιάμεση και distal ή απομακρυσμένη.

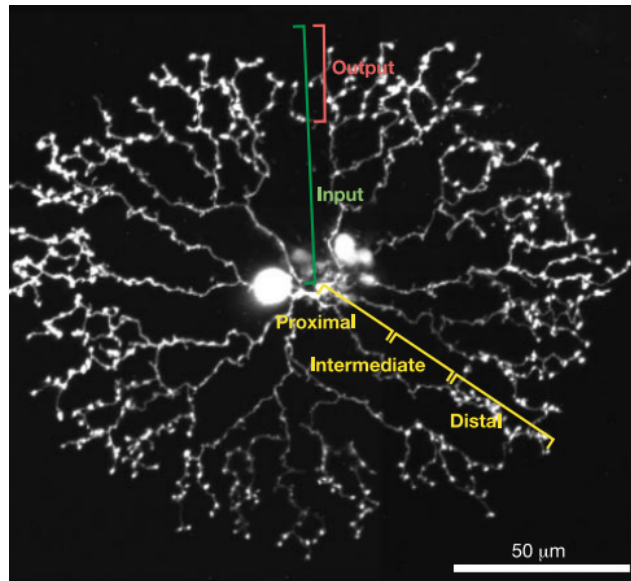


Εικόνα 2 : Μορφολογία ενός τυπικού νευρώνα

- Η κοντινή ζώνη των δενδριτών χαρακτηρίζεται από σχετικά μικρές διαμέτρους, οι οποίοι εμφανίζουν μια σταδιακή λέπτυνση κατά τη διακλάδωση μέχρι να φτάσουν στην ενδιάμεση ζώνη. Συνήθως, από το σώμα ξεκινούν 4 με 5 δενδρίτες, οι οποίοι αρχίζουν να διακλαδίζονται σε πολλούς μικρότερους. Τυπικές τιμές διαμέτρων για την περιοχή αυτή είναι τα 0,6-0,7μm στο ξεκίνημα του δενδρίτη από το σώμα, που μπορεί να φτάνει στα 0,2-0,3μm στην ένωση με την ενδιάμεση ζώνη[1, 2]. Η κοντινή ζώνη των δενδριτών δεν καταλαμβάνει μεγάλο μέρος του συνολικού μήκους των δενδριτών, καθώς εκτείνεται για περίπου 30μm, πριν διακλαδιστεί στην ενδιάμεση περιοχή[3, 4, 5].
- Η ενδιάμεση ζώνη των δενδριτών χαρακτηρίζεται από από μια ξαφνική και απότομη λέπτυνση των δενδριτών, οι οποίοι φτάνουν σε διαμέτρους έως και μικρότερες των 0,1μm στην περιοχή αυτή[1, 2]. Στην ενδιάμεση περιοχή των δενδριτών δεν εμφανίζεται σταδιακή λέπτυνση και έχουν σταθερή διάμετρο καθ' όλο το μήκος τους. Η περιοχή αυτή καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μήκος του δενδρίτη, καθώς φτάνει σε μήκος ακόμα και τα 90μm[3, 4, 5].
- Η απομακρυσμένη ζώνη των δενδριτών χαρακτηρίζεται από μικρές διαμέτρους δενδριτών, αλλά ταυτόχρονα μεγαλύτερες από το ενδιάμεσο τμήμα. Πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό της περιοχής αυτής είναι η εμφάνιση ενός είδους κισσοτήτων, κύστεων δηλαδή με μεγαλύτερη διάμετρο από τους δενδρίτες. Αυτά ακριβώς τα σημεία είναι, που δημιουργεί το κύτταρο τις συνάψεις του προς το μετασυναπτικό επίπεδο [6]. Σε αντιδιαστολή, οι συνάψεις εισόδου των κυττάρων αυτών από διπολικά αλλά και άλλα βραχύινα κύτταρα εμφανίζονται σε όλο το μήκος των δενδριτών[7]. Τυπικές τιμές διαμέτρων για την περιοχή αυτή των δενδριτών είναι περίπου στα 0,4-0,5μm[1, 2]. Η περιοχή αυτή καταλαμβάνει συνήθως τα τελευταία 25-35μm του κάθε δενδρίτη.[3, 4, 5]

Η διάμετρος του κυττάρου κυμαίνεται από 350 έως 500μm [1, 3] και η τιμή της εξαρτάται από την εκκεντρότητα της θέσης του κυττάρου σε σχέση με το βοθρείο. Πιο συγκεκριμένα, κύτταρα που βρίσκονται κοντά στο βοθρείο έχουν μικρή διάμετρο, ενώ όσο απομακρυνόμαστε από το βοθρείο η διάμετρος αυξάνει. Αυτό συμβαίνει και στα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, καθώς η

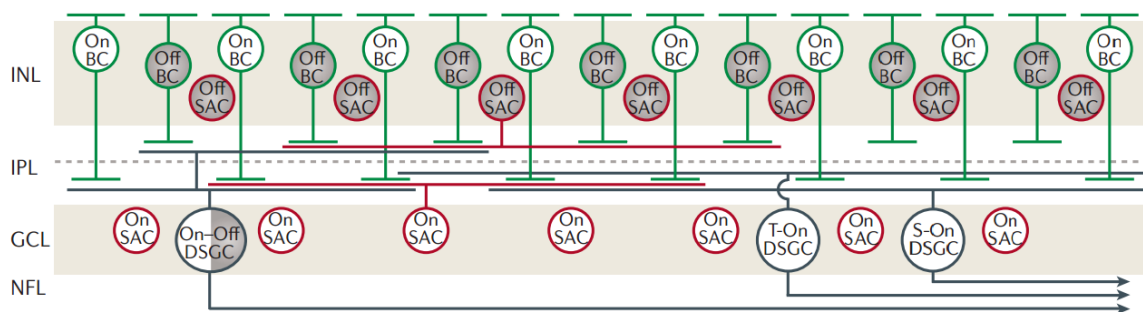
μεγάλη διακριτική ικανότητα, που επιτυγχάνεται στο βοθρείο απαιτεί κύτταρα με μικρό πεδίο και μεγάλη πυκνότητα.



Εικόνα 3 : Δακτυλιοειδείς ζώνες των διακλαδώσεων του κυττάρου και περιοχές των συνάψεων εισόδου και εξόδου [6]

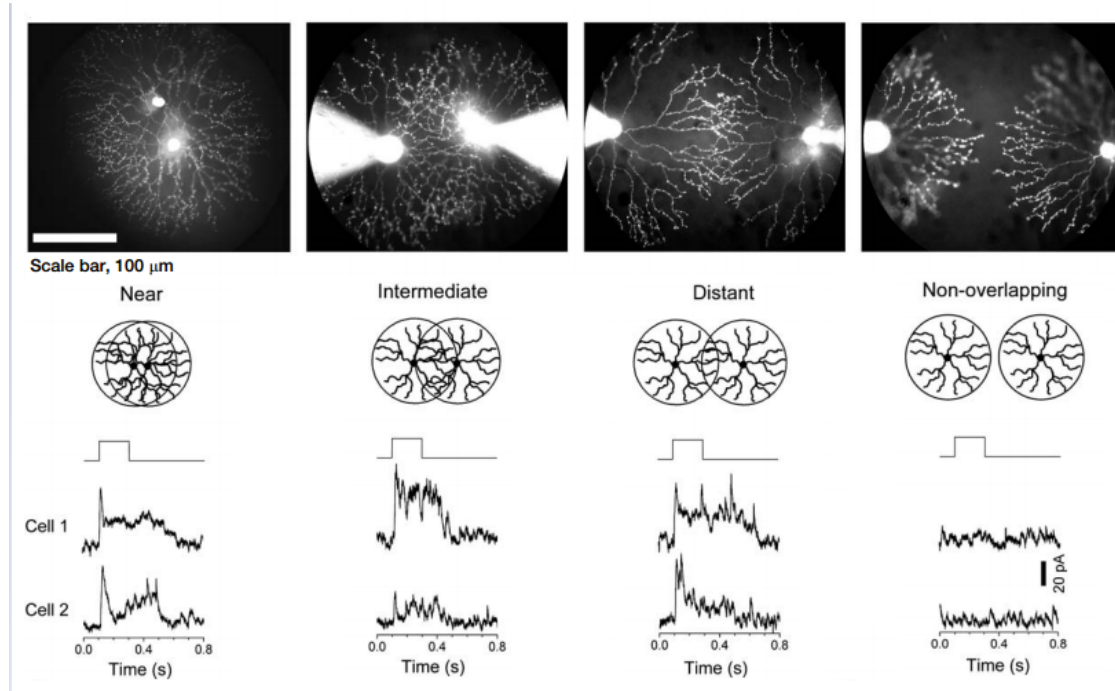
2.4 Διαστρωμάτωση των SACs

Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 2 του πρώτου κεφαλαίου, τα SACs βρίσκονται στο εσωτερικό πυρηνικό στρώμα (Inner Nuclear Layer, INL). Στην πραγματικότητα εδώ υπάρχει μια ανακρίβεια, καθώς δεν βρίσκονται τα σώματα όλων των SACs στο εσωτερικό πυρηνικό στρώμα. Συγκεκριμένα τα SACs χωρίζονται σε δύο κατηγορίες : τα On-SACs και τα Off-SACs. Τα μεν On-SACs είναι ευαίσθητα στην μετάβαση της έντασης του φωτός από «σκοτεινό»σε «φωτεινό», ενώ τα Off-SACs το αντίθετο. Η θέση τώρα των σωμάτων των On-SACs στο στρώμα των γαγγλιακών κυττάρων, ενώ των Off-SACs είναι, όπως έχει προαναφερθεί, στο εσωτερικό πυρηνικό στρώμα[13]. Επειδή τα σώματα των On-SACs βρίσκονται στο στρώμα των γαγγλιακών κυττάρων, ονομάζονται και μετατοπισμένα SACs. Τα παραπάνω φαίνονται στην σχηματική αναπαράσταση, που παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.



Εικόνα 4 : Θέσεις των σωμάτων των On-SACs και Off-SACs[13]

Οι δενδρίτες και των δύο κατηγοριών των SACs τώρα διακλαδίζονται στο εσωτερικό συναπτικό στρώμα (Inner Plexiform Layer, IPL). Όπως έχει αναγνωρισθεί σε πολλές μελέτες[1, 13], τα SACs σχηματίζουν συνάψεις και με γειτονικά SACs αλλά φυσικά και με τα DSGCs. Οι συνάψεις, που σχηματίζουν με τα άλλα SACs είναι κατασταλτικές [1, 2, 11, 14], ενώ οι συνάψεις, που σχηματίζει με τα DSGCs είναι και κατασταλτικές και διεγερτικές, ανάλογα με την πλευρά του DSGC, στην οποία βρίσκονται[2, 14].



Εικόνα 5 : Θέσεις των γειτονικών SACs και η ανάλογη αλληλεπίδρασή τους[15]

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 5, τα SACs σχηματίζουν συνάψεις με τα άλλα SACs, με τα οποία επικαλύπτονται και για αυτό επηρεάζονται από τη διέγερση των γειτονικών τους κυττάρων. Αντίθετα, τα κύτταρα με τα οποία δεν επικαλύπτονται δεν εμφανίζουν ούτε έμμεση επιρροή. Δηλαδή, διεγείροντας ένα SAC που δεν επικαλύπτεται με ένα άλλο, δεν διεγείρεται το τελευταίο μέσω της έμμεσης διέγερσης του ενδιάμεσού τους SAC, που επικαλύπτεται και με τα δύο[15]. Συνεπώς, διεγείροντας μια περιοχή με SACs, επιτυγχάνεται άμεσα μια μερική απομόνωση του διεγερόμενου σημείου, καθώς η διέγερση δεν μεταφέρεται και στα μη επικαλυπτόμενα γειτονικά κύτταρα. Η απόσταση των γειτονικών μη επικαλυπτόμενων φαίνεται από την κλίμακα περίπου στα 300μm, όση περίπου είναι και στην πραγματικότητα.

2.5 Βιβλιογραφία

- [1] E. Famiglietti Jr, *On and Off Pathways through amacrine cells in mammalian retina : The synaptic connections of starburst amacrine cells*, Vision Research, Vol.23, No.11, pp.1265-1279,1983.
- [2] E. V. Famiglietti , *Synaptic organization of Starburst Amacrine Cells in Rabbit retina : Analysis of serial thin sections by Electron Microscopy and graphic reconstruotion*, The Journal of Comparative Neurology, Vol.309, pp.40-70,1991.

- [3] R. Poznanski, *Modeling the Electrotonic structure of Starburst Amacrine Cells in the rabbit retina : A functional interpretation of dendritic morphology*, Bulletin of Mathematical Biology, Vol.56, No.4, pp. 905-928, 1992.
- [4] T. J. Velte and R. F. Miller, *Spiking and non-Spiking models of Starburst Amacrine Cells in the rabbit retina*, Visual Neuroscience, Vol.14, pp. 1073-1088, 1997.
- [5] J. J. Tucker, W. R. Taylor and R. G. Smith, *Direction Selectivity in a model of the Starburst Amacrine Cell*, Visual Neuroscience, Vol.21, pp. 611-625, 2004.
- [6] T. Euler, P. B. Detwiler and W. Denk, *Directionally selective calcium signals in dendrites of starburst amacrine cells*, Nature, 418, pp.845-852, 2002.
- [7] T. A. Münch and F. Werblin, *Symmetric Interactions Within a Homogeneous Starburst Cell Network Can Lead to Robust Asymmetries in Dendrites of Starburst Amacrine Cells*, , Journal of Neurophysiology , Vol.96 pp. 471-477, 2006.
- [8] W. Wei, A. M. Hamby, k. Zhou and M. B. Feller, *Development of asymmetric inhibition underlying direction selectivity in the retina*, , Letters to Nature , Vol.469 pp.402-407, 2011.
- [9] D. M. Dacey, *Primate retina : Cell types, Circuits and Color Opponency*, Progress in Retinal and Eye Research, Vol.18, No.6, pp.737-763, 1999.
- [10] M. Hoon, H. Okawa, L. Della Santina and R. O. L. Wong, *Functional Architecture of the retina : Development and disease*, Progress in Retinal and Eye Research, Vol.42 pp.44-84, 2014.
- [11] S. E. Hausselt, T. Euler, P. B. Detwiler and W. Denk, *A Dendrite-Autonomous Mechanism for Direction Selectivity in Retinal Starburst Amacrine Cells*, PLoS, Vol.5, Issue 5, ed.185, pp.1474-1493, 2014.
- [12] J. S. Kim, M. J. Green, A. Zlateski, K. Lee, M. Richardson, S. C. Turaga, M. Purcaro, M. Balkam, A. Robinson, B. F. Behabadi, M. Campos, W. Denk, H. S. Seung, *Space-time wiring specificity supports direction selectivity in the retina*, Letters to Nature, Research Article, 2014.
- [13] D. I. Vaney, B. Sivyer and W. R. Taylor *Direction Selectivity in the retina : Symmetry and Asymmetry in structure and function*, Letters to Nature, Vol.13, pp.194-208, 2012.
- [14] S. I. Fried and R. H. Masland, *Image Processing : How the retina detects the direction of image motion*, Current Biology, Vol.17, No.2 pp.63-66, 2012.
- [15] S. Lee and Z. J. Zhou, *The synaptic mechanism of Direction Selectivity in distal processes of starburst amacrine cells*, Neuron Journal, Vol.51, pp.787-799, 2006.

Κεφάλαιο 3^ο : Βραχύινα Κύτταρα : Λειτουργία και Εξειδικευμένη Εφαρμογή

3.1 Εισαγωγή - Στόχοι

Στο Κεφάλαιο αυτό στόχος είναι να εξεταστεί λεπτομερώς ο τρόπος με τον οποίο τα SACs ανταποκρίνονται στην φωτεινή διέγερση του οπτικού τους πεδίου. Επίσης παρουσιάζεται ο τρόπος, με τον οποίο τα κύτταρα αυτά σχηματίζουν συνάψεις με άλλες κατηγορίες νευρώνων, οι οποίες τα καθιστούν ικανά να επωμίζονται το κρίσιμο έργο της ανίχνευσης των κατευθύνσεων κίνησης. Επεξηγείται ο τύπος των συνάψεων αυτών και ο τρόπος με τον οποίο διεγείρουν άλλα κύτταρα και διεγείρονται από αυτά. Με τα παραπάνω ξεκαθαρίζεται η διαδικασία μέσω της οποίας τα κύτταρα αυτά δημιουργούν τη βάση για την κατευθυντική επιλεκτικότητα του ματιού.

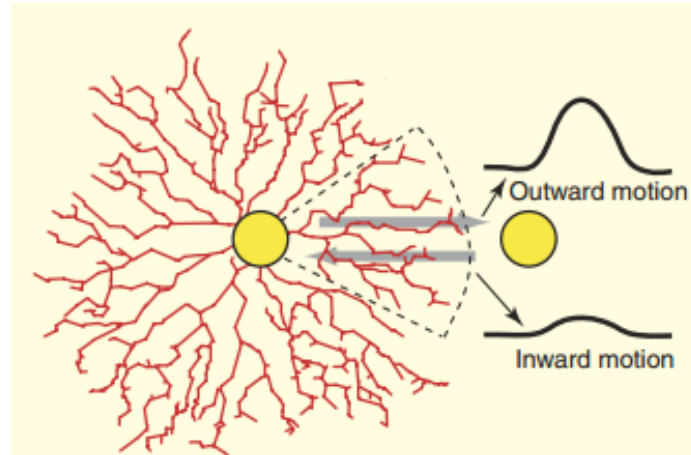
3.2 SACs : Τα πρώτα κατευθυντικά επιλεκτικά κύτταρα

Τα κατευθυντικά επιλεκτικά γαγγλιακά κύτταρα (Direction Selective Ganglion Cells-DSGCs) έχουν την ικανότητα να ανιχνεύουν την κίνηση σε μία κατεύθυνση και να αποκρίνονται με υψηλής συχνότητας παλμοσειρές. Η κατεύθυνση αυτή χαρακτηρίζεται ως προτιμητέα. Αντίθετα οι κινήσεις σε όλες τις άλλες κατευθύνσεις έχουν ως αποτέλεσμα πολύ μικρή παλμική δραστηριότητα από τα κύτταρα αυτά και χαρακτηρίζονται ως μη προτιμητέες. Τα κύτταρα αυτά μεταφέρουν την κωδικοποίηση της κατευθυντικής επιλεκτικότητας στον εγκέφαλο, καθώς τα άκρα τους αποτελούν το οπτικό νεύρο. Όμως, δεν είναι αυτά τα πρώτα κύτταρα, στα οποία εμφανίζεται η κατευθυντική επιλεκτικότητα. Η υποκατηγορία νευρώνων των SACs είναι αυτή, στην οποία βρέθηκε να εμφανίζεται σε πρώτο επίπεδο η κατευθυντική επιλεκτικότητα [3]. Μάλιστα, όπως έχει επιβεβαιωθεί από μελέτες[4], η επιλεκτική καταστροφή των συγκεκριμένων κυττάρων εξαφανίζει την κατευθυντική επιλεκτικότητα του ματιού. Συγκεκριμένα, έγιναν δοκιμές με αφαίρεση των εν λόγω κυττάρων με λέιζερ από τον αμφιβληστροειδή, για να εξεταστεί η επίδραση της απομάκρυνσής τους. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι απομακρύνοντας τα κύτταρα αυτά χάνεται η ικανότητα του ματιού να είναι κατευθυντικά επιλεκτικό. Επειδή όμως η μέθοδος του λέιζερ δεν ήταν απόλυτα ακριβής, τα πειραματικά αποτελέσματα τέθηκαν υπό αμφισβήτηση. Έτσι, για να μην υπάρχουν αμφιβολίες, δημιουργήθηκαν γενετικά τροποποιημένα ποντίκια, στα οποία είχαν καταταστραφεί τα γονίδια, που ελέγχουν τη δημιουργία αυτής της κατηγορίας κυττάρων. Έτσι τα ποντίκια δεν είχαν καθόλου κύτταρα τέτοιου τύπου και τα συμπεράσματα της μελέτης θα ήταν πολύ πιο ασφαλή. Το αποτέλεσμα βέβαια ήταν το ίδιο, ότι δηλαδή απουσία των κυττάρων αυτών υπήρχε απώλεια της κατευθυντικής επιλεκτικότητας, καθώς τα DSGCs εμφάνιζαν πλέον υψηλή παλμική δραστηριότητα σε όλες τις κατευθύνσεις. Με τον τρόπο αυτό επιβεβαιώθηκε ότι τα SACs όχι μόνο είναι τα πρώτα κύτταρα, που εμφανίζουν την επιλεκτικότητα, αλλά και τα πιο βασικά, αφού χωρίς αυτά δεν εμφανίζεται καν η ιδιότητα.

3.3 Απόκριση των κυττάρων στη φωτεινή διέγερση

Σε αντίθεση τώρα με τα DSGCs, που έχουν μια προτιμητέα κατεύθυνση, οι έρευνες έχουν δείξει ότι τα SACs έχουν περισσότερες από μια προτιμητέες κατευθύνσεις. Συγκεκριμένα, σε μια παλιότερη μελέτη [6], τα DSGCs είχαν βρεθεί πως επιδεικνύουν μια επιλεκτικότητα σε μια από τις 4 κατευθύνσεις, που είναι παράλληλες με τους 4 μύες που κινούν το μάτι. Τα SACs όμως βρέθηκαν στη μελέτη των Kim et al [7] να έχουν περισσότερες από μία προτιμητέες κατευθύνσεις. Μάλιστα, υποστήριξαν στην έρευνά τους αυτή ότι κάθε ένας από τους δενδρίτες των SACs έχει τη δική του προτιμητέα κατεύθυνση, η οποία ταυτίζεται με τη διεύθυνση του ίδιου του δενδρίτη. Έτσι υπάρχει μια λειτουργική ανεξαρτησία του κάθε δενδρίτη από τους υπολοίπους. Όπως είχε βρεθεί και παλαιότερα, όλοι οι δενδρίτες των SACs επιδεικνύουν μια προτίμηση σε ερεθίσματα, που κινούνται από το σώμα του κυττάρου προς την

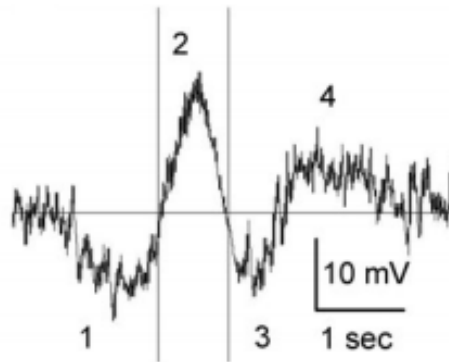
περιφέρεια του(φυγόκεντρος κατεύθυνση) και έχουν πολύ μικρότερη απόκριση σε κίνηση αντικειμένων, που κινούνται από την περιφέρεια προς το σώμα(κεντρομόλος κατεύθυνση). Λόγω της ιδιαίτερης γεωμετρίας του κυττάρου όμως η φυγόκεντρος και η κεντρομόλος διεύθυνση του κάθε δενδρίτη είναι ξεχωριστή. Η πιο μοντέρνα πρόταση βέβαια είναι ότι το κύτταρο χωρίζεται σε σφηνοειδείς περιοχές, οι οποίες έχουν τις ίδιες προτιμητέες και μη προτιμητέες κατευθύνσεις. Όλα τα παραπάνω εξηγούνται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1 : Προτιμητέα κατεύθυνση η φυγόκεντρος, που δίνει μεγαλύτερη απόκριση και μη προτιμητέα η κεντρομόλος, που δίνει σαφώς μικρότερη.[8]

Όλοι οι νευρώνες του αμφιβληστροειδούς εκτός από τα γαγγλιακά κύτταρα, δεν μοιάζουν ως προς την απόκρισή τους με τα υπόλοιπα νευρικά κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού. Οι νευρώνες του ανθρώπινου οργανισμού έχουν παλμικές αποκρίσεις με δυναμικό δράσης. Αυτή η «όλα ή τίποτα» απόκριση δεν συναντάται στους νευρώνες του αμφιβληστροειδούς, παρά μόνο στα γαγγλιακά κύτταρα. Οι υπόλοιποι νευρώνες, μαζί και τα SACs, έχουν βαθμιδωτές αποκρίσεις ανάλογες με το μέγεθος της εισόδου[3]. Το σημείο αυτό είναι πρόσφορο για να αναλυθεί η απόκριση των SACs σε διέγερση από φως στο οπτικό τους πεδίο. Στη μελέτη τους οι Dmitriev et al διέγειραν ένα τέτοιο κύτταρο με μια μπάρα φωτός στο οπτικό του πεδίο[10]. Η απόκριση του κυττάρου στη διέγερση με τη μπάρα φωτός παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.

Θα περιγραφεί τώρα λεπτομερώς η απόκριση του κυττάρου, για να γίνει κατανοητή η λειτουργία του. Όταν αρχικά η μπάρα κινείται από την περιφέρεια του οπτικού πεδίου του κυττάρου προς το σώμα, το κύτταρο αποκρίνεται με μια αργή υπερπόλωση(κύμα 1), που ακολουθείται από μια σχετικά ταχεία αποπόλωση(κύμα 2), όταν η μπάρα διεγείρει το σώμα του κυττάρου. Στη συνέχεια, καθώς η μπάρα αρχίζει να κινείται στη φυγόκεντρο διεύθυνση και να αφήνει το κέντρο του οπτικού πεδίου προς την περιφέρεια, το κύτταρο αρχικά αποκρίνεται με μια γρήγορη υπερπόλωση(κύμα 3) ακολουθούμενη από μια αργή αποπόλωση(κύμα 4).

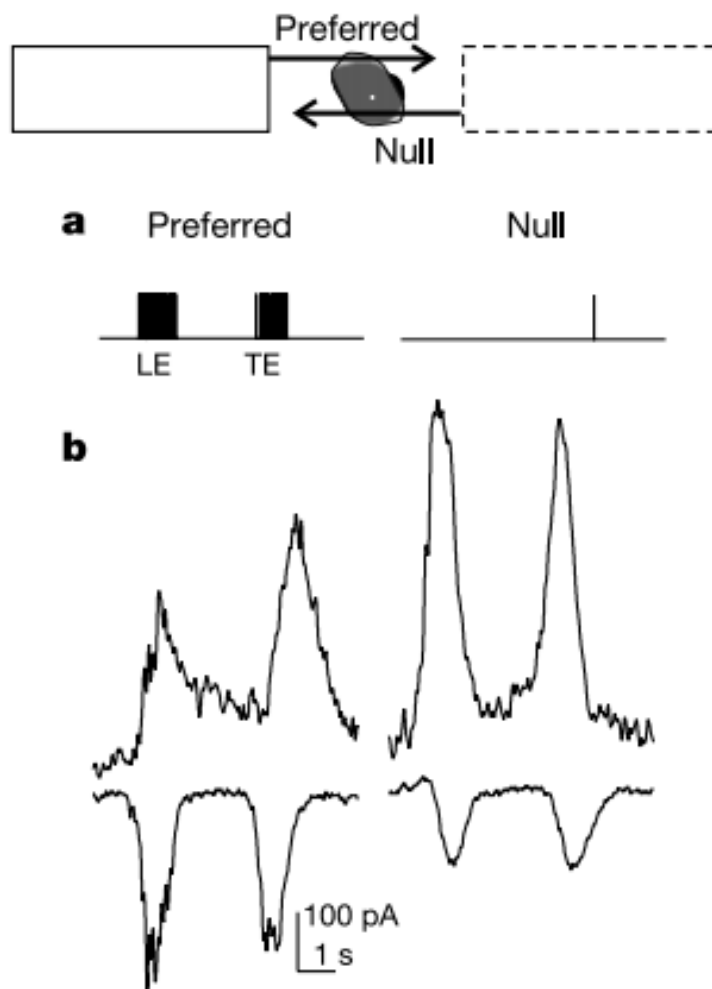


Εικόνα 2 : Απόκριση ενός SAC σε μια μπάρα φωτός, που κινείται κατά μήκος του οπτικού του πεδίου. Η οριζόντια γραμμή υποδεικνύει το δυναμικό ηρεμίας του κυττάρου(-51mV) και οι δύο κατακόρυφες γραμμές τις χρονικές στιγμές, κατά τις οποίες το μέσο της μπάρας κινούνταν κατά την κεντρομόλο(πριν την αριστερή γραμμή) και κατά την φυγόκεντρο(μετά τη δεξιά γραμμή) κατεύθυνση.[10]

3.4 Ρεύματα Απόκρισης των SACs και Διέγερσης των DSGCs

Η απόκριση του κυττάρου με ηλεκτρόδια καταγράφεται στο σώμα, το σημείο που είναι και το μόνο στο οποίο μπορεί να γίνει μέτρηση τάσης με ηλεκτρόδιο. Η ουσιώδης απόκριση του κυττάρου όμως είναι τα ρεύματα, που παράγει και διεγείρει τα DSGCs. Οι Fried et al μελέτησαν τα ρεύματα εισόδου των DSGCs για να κατανοηθεί η διέγερση, που υφίστανται τα κύτταρα αυτά από τα SACs και τα BCs, ανάλογα με το φωτεινό ερέθισμα, που διεγείρει το οπτικό πεδίο[11]. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.

Στο πάνω μέρος της Εικόνας 3 φαίνεται η μορφή της διέγερσης. Είναι προφανές, ότι πρόκειται για μια φωτεινή μπάρα, που διασχίζει το πεδίο λήψης του DSGC. Όπως δείχνει το τμήμα A, η παλμική απόκριση του DSGC είναι πολύ υψηλή, όταν η μπάρα κινείται στην προτιμητέα κατεύθυνση (από αριστερά προς τα δεξιά) ενώ είναι σχεδόν μηδαμινή όταν η κίνηση γίνεται στην αντίθετη, μη προτιμητέα κατεύθυνση (από τα αριστερά προς τα δεξιά). Ιδιαίτερη αξία εδώ όμως έχει να επεξηγηθεί η μορφή των ρευμάτων διέγερσης του DSGC, που παράγονται ως αποκρίσεις του SAC και παρουσιάζονται στο τμήμα B. Γίνεται αντιληπτό, ότι όταν η διέγερση γίνεται στην προτιμητέα κατεύθυνση, τα ρεύματα διέγερσης (κάτω κυματομορφές) είναι μεγαλύτερα σε πλάτος από τα κατασταλτικά ρεύματα (πάνω κυματομορφές). Επίσης μια όχι πολύ προφανής, αλλά πολύ καίρια παρατήρηση είναι ότι όταν τα ρεύματα διέγερσης έχουν φτάσει στη μέγιστη τιμή τους, τα κατασταλτικά ρεύματα είναι σχεδόν στο ξεκίνημα της ανόδου τους. Η επιρροή των δύο αυτών σημάτων εισόδου με τα συγκεκριμένα πλάτη και τη συγκεκριμένη χρονική αλληλουχία, έχει ως αποτέλεσμα η διέγερση στο DSGC αυτό να είναι ικανή να οδηγήσει το κύτταρο σε υψηλή παλμική δραστηριότητα. Οι δύο κορυφές και των δύο ρευμάτων οφείλονται στην είσοδο της πρώτης αιχμής της μπάρας στο πεδίο λήψης και την έξοδο της δεύτερης αιχμής από αυτό. Αντίθετα είναι τα πράγματα στη δεύτερη περίπτωση, όπου η διέγερση κινείται κατά την μη προτιμητέα κατεύθυνση. Πιο συγκεκριμένα, το διεγερτικό ρεύμα είναι πολύ μικρότερο σε πλάτος από το κατασταλτικό. Όμοια με πριν, το κατασταλτικό ρεύμα πλέον έχει φτάσει στην υψηλότερη τιμή του όταν το διεγερτικό ρεύμα βρίσκεται στο ξεκίνημα της αύξησής του. Η πολύ μεγάλη αλλά και ταχύτερη χρονικά καταστολή καθιστά το κύτταρο ανίκανο να εμφανίσει μεγάλη παλμική δραστηριότητα.



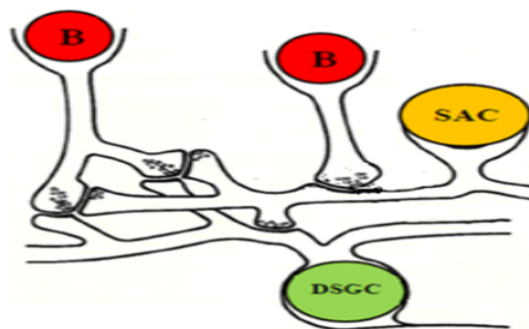
Εικόνα 3 : Ρεύματα διέγερσης ενός DSGC, καθώς το οπτικό του πεδίο διεγείρεται από μια φωτεινή μπάρα. Η μπάρα κινείται στην προτιμητέα αλλά και στην μη προτιμητέα κατεύθυνση.[11]

Η εμπλοκή των SACs στην παραπάνω διαδικασία εντοπίζεται στην δημιουργία των κατασταλτικών ρευμάτων. Όπως έχει αποδειχθεί από πολλές μελέτες [1, 2, 3, 8, 11, 12, 13], τα SACs είναι κατασταλτικοί νευρώνες. Εκτός όμως από την δυνατότητα να δημιουργούν κατασταλτικά ρεύματα ανάλογα με τη φορά της κίνησης στο οπτικό πεδίο, έχουν και την θαυμαστή ικανότητα να μειώνουν την ισχύ των διεγερτικών ρευμάτων, μέσω ενός βρόχου ανάδρασης. Αυτό φαίνεται και στην Εικόνα 3, όπου όχι μόνο το κατασταλτικό ρεύμα αυξάνεται κατά την κίνηση στην μη προτιμητέα κατεύθυνση, αλλά υπάρχει και μείωση στο πλάτος του διεγερτικού ρεύματος.

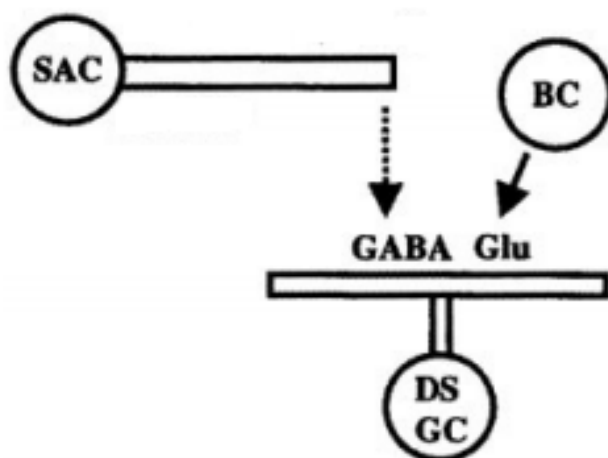
3.5 Σύνδεση με άλλες κατηγορίες νευρώνων

Στο σημείο αυτό εξετάζουμε πώς διεγείρονται τα κύτταρα αυτά από άλλες κατηγορίες νευρώνων και φτάνουν στο σημείο να δημιουργούν αυτές τις εξόδους προς το στρώμα των γαγγλιακών κυττάρων. Για το λόγο αυτό, σε αυτό το σημείο αναφερόμαστε αναλυτικά στα κύτταρα, με τα οποία συνδέονται τα SACs και τα είδη της διέγερσης, που δέχονται από τον κάθε τύπο. Με τον τρόπο αυτό, επιχειρείται να επεξηγηθεί η δημιουργία της απόκρισης τους από τις εισόδους αυτές. Στις Εικόνες 4 και 5 φαίνονται

σχηματικές αναπαραστάσεις των συνδέσεων των κυττάρων από το εσωτερικό συναπτικό στρώμα.



Εικόνα 4 : Σχηματική αναπαράσταση των συνάψεων μεταξύ διπολικών(BCs), βραχύνων(SACs) και γαγγλιακών(DSGCs) κυττάρων στο εσωτερικό συναπτικό στρώμα[14].



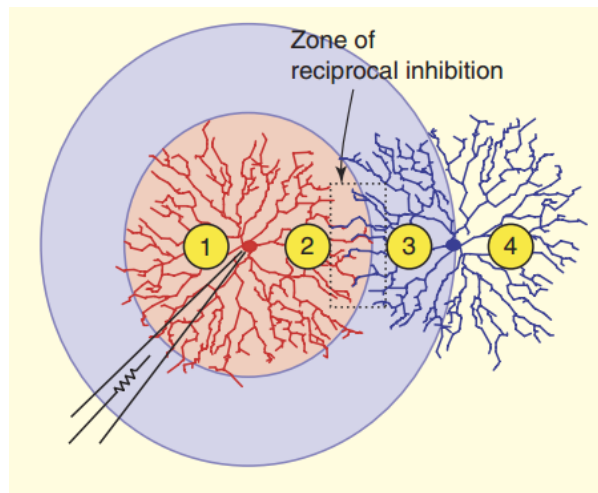
Εικόνα 5 : Σχηματική αναπαράσταση των συνάψεων μεταξύ διπολικών(BCs), βραχύνων(SACs) και γαγγλιακών(DSGCs) κυττάρων στο εσωτερικό συναπτικό στρώμα. Εδώ φαίνονται επιπλέον και οι ειδικοί νευροδιαβιβαστές, που εμπλέκονται στις συνάψεις μεταξύ SAC-SAC(GABA) και BC-SAC(Glutamate)[12].

Όπως φαίνεται και στις Εικόνες 4 και 5, τα SACs εμφανίζουν συνάψεις και με γειτονικά SACs αλλά και φυσικά και με τα διπολικά και τα γαγγλιακά κύτταρα. Όπως αναφέραμε και στο κεφάλαιο 2, τα SACs εμφανίζουν συνάψεις με τα γειτονικά SACs, με τα οποία έχουν επικάλυψη, αλλά όχι με αυτά με τα οποία δεν επικαλύπτονται τα οπτικά τους πεδία[15]. Οι συνάψεις αυτές είναι κατασταλτικές και ο νευροδιαβιβαστής, ο οποίος χρησιμοποιείται είναι το γ-αμινοβουτυρικό οξύ ή GABA. Οι συνάψεις, που σχηματίζουν τα SACs με τα διπολικά κύτταρα είναι διεγερτικές και ο νευροδιαβιβαστής, που μεσολαβεί είναι το γλουταμινικό οξύ ή Glutamate. Όπως αναφέρεται χαρακτηριστικά στην μελέτη [3], τα SACs εμφανίζουν και συνάψεις με άλλους τύπους βραχύνων κυττάρων, εκτός από βραχύνια κύτταρα του δικού τους τύπου. Οι συνάψεις αυτές διαμεσολαβούνται από έναν άλλο νευροδιαβιβαστή, ο οποίος ονομάζεται Γλυκίνη (Glycine). Οι συνάψεις με τους παραπάνω τύπους κυττάρων είναι συνάψεις εισόδου για τα

SACs και εμφανίζονται σε όλο το μήκος των δενδριτών τους [1, 2, 9]. Αντίθετα οι συνάψεις των SACs με τα γαγγλιακά κύτταρα(DSGCs) είναι συνάψεις εξόδου. Εμφανίζονται μόνο στον εξωτερικό δακτύλιο των δενδριτών και κυρίως στις περιοχές, όπου υπάρχουν οι κηρσότητες. Στις περιοχές αυτές υπάρχουν οι απαραίτητες κύστες, που απελευθερώνουν τους νευροδιαβιβαστές για να προκληθεί μετασυναπτική δραστηριότητα[1, 2, 9]. Όπως έχει βρεθεί από μελέτες όμως, τα SACs είναι από τους λίγους νευρώνες, που έχουν την δυνατότητα να απελευθερώνουν δύο τύπους νευροδιαβιβαστών. Συγκεκριμένα, εκτός από το γ-αμινοβουτυρικό οξύ, που είναι κατασταλτικό, έχουν την δυνατότητα να απελευθερώνουν και τον νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη(acetylcholine), που είναι διεγερτική.

3.6 Πεδίο Λήψης των κυττάρων

Οι παραπάνω συνάψεις εισόδου αλλά και η χωρική τοποθέτησή τους στο κύτταρο, δημιουργούν το χαρακτηριστικό center-surround πεδίο λήψης του κυττάρου [15]. Πιο συγκεκριμένα τα κύτταρα αυτής της κατηγορίας έχουν ένα πεδίο λήψης, που αποτελείται από δύο τμήματα. Το πρώτο είναι το κεντρικό τμήμα, που είναι διεγερτικό και εκτείνεται όσο και οι δενδρίτες του κυττάρου. Αυτό που εννοούμε με την έννοια πεδίο λήψης είναι ότι όταν ένα αντικείμενο κινείται στην περιοχή, που προβάλλεται πάνω στην περιοχή των δενδριτών του κυττάρου, τότε τα αντίστοιχα διπολικά κύτταρα διεγείρουν το SAC με τα κατάλληλα σήματα εισόδου. Το δεύτερο τμήμα τώρα αποτελείται από έναν δακτύλιο που περιβάλλει την περιοχή των δενδριτών του κυττάρου. Έτσι, όταν ένα αντικείμενο κινείται σε μια ευρύτερη περιοχή από την περιοχή, που προβάλλεται πάνω στην περιοχή δενδριτών του κυττάρου, το κύτταρο δέχεται τις κατάλληλες κατασταλτικές εισόδους. Οι κατασταλτικές εισόδοι αυτές προέρχονται από τα γειτονικά SACs με τα οποία όπως είπαμε [15] τα SACs εμφανίζουν συνάψεις. Με βάση όσα αναφέρθηκαν στο Κεφάλαιο 2, τα γειτονικά SACs μπορεί να απέχουν απόσταση περίπου ίση με τη διάμετρο του κυττάρου. Ως αποτέλεσμα, το κατασταλτικό πεδίο του κυττάρου μπορεί να φτάνει να είναι περίπου τετραπλάσιο από την ακτίνα του κυττάρου [8, 10], αφού κίνηση στην αντίστοιχη περιοχή ανιχνεύεται από τα γειτονικά SACs και μεταδίδεται και στο υπό μελέτη. Οι προτάσεις αυτές γίνονται αρκετά κατανοητές μέσω της Εικόνας 6.

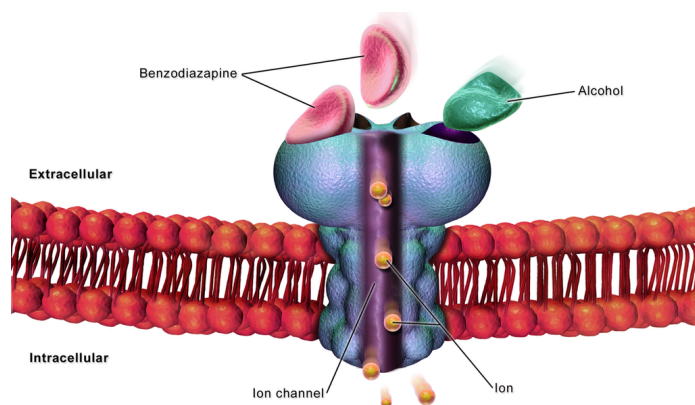


Εικόνα 6 : Σχηματική αναπαράσταση του οπτικού πεδίου ενός SAC. Ο εσωτερικός κύκλος(κόκκινο) αποτελεί το διεγερτικό πεδίο και ο εξωτερικός δακτύλιος(μπλε) την επέκταση του κατασταλτικού πεδίου.[8].

3.7 Νευροδιαβιβαστές στα SACs

Το γ-αμινοβουτυρικό οξύ, είναι ο νευροδιαβιβαστής, που μεσολαβεί στις συνάψεις μεταξύ SACs[5, 16]. Είναι συνήθως κατασταλτική η δράση του, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να δράσει και διεγερτικά. Η λειτουργία του είναι να προσδένεται σε έναν ειδικό υποδοχέα του νευροδιαβιβαστή και να ενεργοποιεί το άνοιγμα ενός ιοντικού καναλιού Χλωρίου, ρυθμίζοντας έτσι το δυναμικό εκατέρωθεν της κυτταρικής μεμβράνης. Αυτό φαίνεται στην Εικόνα 7.

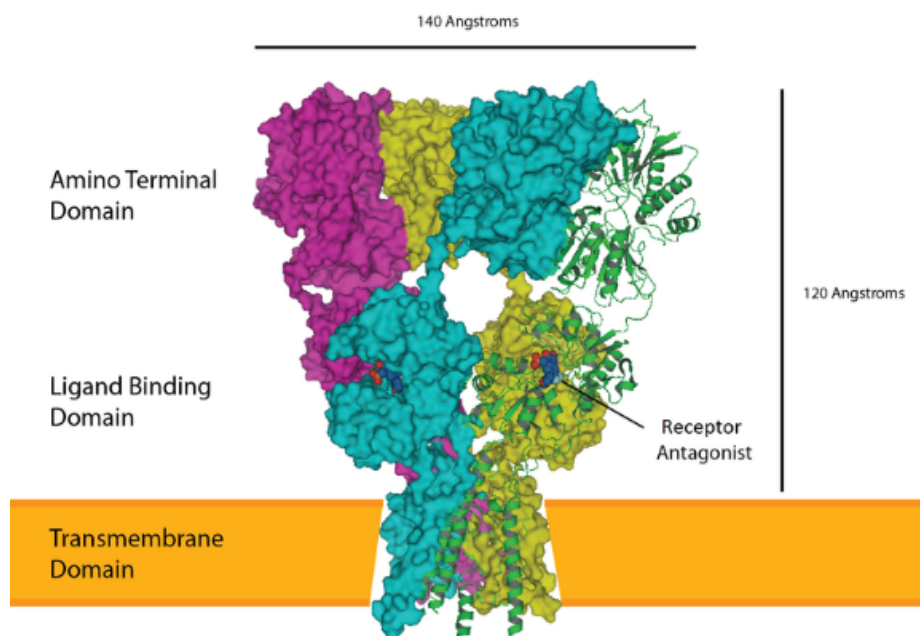
Τα ιοντικά κανάλια, που ενεργοποιούνται από πρόσδεση του γ-αμινοβουτυρικού οξέος στον ειδικό υποδοχέα ανήκουν στην κατηγορία των ligand-gated καναλιών. Για να ενεργοποιηθεί το ιοντικό κανάλι, πρέπει να προσδεθεί στον υποδοχέα ο νευροδιαβιβαστής και τότε το κανάλι αρχίζει να άγει. Η ροή των ιόντων διαμέσου του καναλιού μπορεί να είναι είτε από το κύτταρο προς το περιβάλλον είτε και αντίστροφα. Αυτή η αμφίδρομη πορεία δικαιολογεί και την δυνατότητα των συνάψεων του γ-αμινοβουτυρικού οξέος να είναι είτε διεγερτικές είτε κατασταλτικές, ανάλογα με τη συγκέντρωση του ιόντος στο εσωτερικό του κυττάρου πριν το άνοιγμα των καναλιών.



Εικόνα 7 : Σχηματική αναπαράσταση του ειδικού υποδοχέα του γ-αμινοβουτυρικού οξέος.[16].

Ο άλλος νευροδιαβιβαστής, που αναφέραμε ότι προσδένεται στα SACs είναι το Γλουταμινικό οξύ. Ο νευροδιαβιβαστής αυτός απελευθερώνεται από τα διπολικά κύτταρα και είναι διεγερτικός. Προσδένεται σε έναν εξειδικευμένο υποδοχέα, ο οποίος ονομάζεται υποδοχέας AMPA (alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid). Η μορφή του υποδοχέα φαίνεται στην Εικόνα 8.

Και σε αυτή την περίπτωση, τα κανάλια που ενεργοποιούνται από την πρόσδεση του Γλουταμινικού οξέος στον υποδοχέα ανήκουν στην οικογένεια των ligand-gated καναλιών. Όπως και προηγουμένως, ο υποδοχέας έχει ένα τμήμα έξω από την κυτταρική μεμβράνη, ένα διαμεμβρανικό και ένα εσωτερικό τμήμα. Στο εσωτερικό του υποδοχέα υπάρχει το ιοντικό κανάλι και στο τμήμα, που βρίσκεται εκτός της κυτταρικής μεμβράνης, υπάρχει και το σημείο πρόσδεσης του νευροδιαβιβαστή (Ligand Binding Domain). Με την πρόσδεση του νευροδιαβιβαστή, ενεργοποιούνται τα ιοντικά κανάλια. Ο νευροδιαβιβαστής αυτός συνήθως ελέγχει κάποιο ιοντικό κανάλι Νατρίου ή Καλίου. Τα συγκεκριμένα κανάλια, σε αντίθεση με τα κανάλια Χλωρίου δεν μπορούν να άγουν ιόντα και προς το εσωτερικό και προς το εξωτερικό, αλλά μόνο προς τη μια κατεύθυνση.

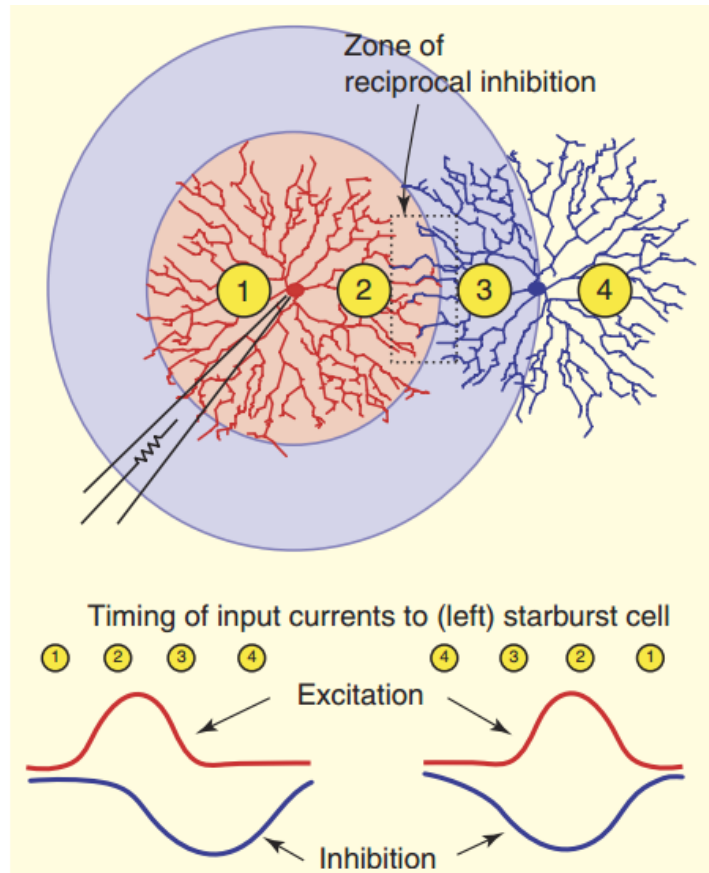


Εικόνα 8 : Σχηματική αναπαράσταση του ειδικού υποδοχέα του Γλουταμινικού οξέος.[17].

Για να γίνει κατανοητή η σημασία των νευροδιαβιβαστών αυτών και των αντίστοιχων υποδοχέων τους, αναφέρουμε ότι έρευνες έχουν δείξει πως το μπλοκάρισμα των υποδοχέων του γ-αμινοβουτυρικού οξέος συγκεκριμένα με τη χρήση κάποιου ανταγωνιστή της ουσίας, όπως η Gabazine, εξαφάνισε τελείως την ιδιότητα της κατευθυντικής επιλεκτικότητας, που αναφέραμε, όχι μόνο από τα SACs, αλλά από ολόκληρο το μάτι [18, 19, 20].

3.8 Μορφή της διέγερσης των SACs

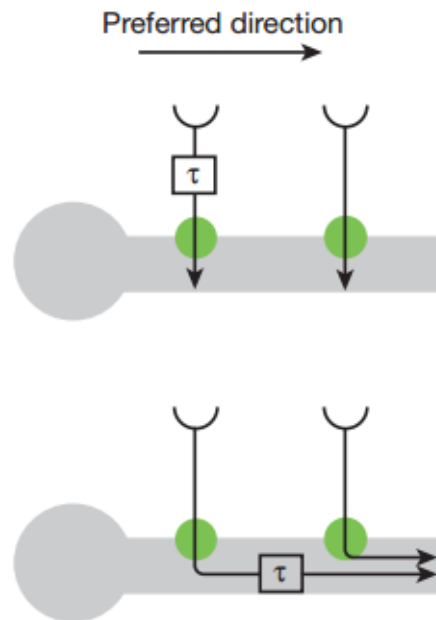
Παρουσιάζεται τώρα η μορφή των εισόδων, που δέχονται τα SACs από τα άλλα κύτταρα. Το πεδίο λήψης των SACs είναι διεγερτικό στο κέντρο και κατασταλτικό στην περιφέρεια. Δέχονται δηλαδή διεγερτικές εισόδους ρευμάτων στο κέντρο του πεδίου και κατασταλτικές στην περιφέρεια. Στη διαμόρφωση της απόκρισης των κυττάρων εξέχουσα σημασία έχει ο χρονισμός των αποκρίσεων αυτών και τα σχετικά πλάτη τους. Μια πλήρης εξήγηση δίνεται μέσω της Εικόνας 9.



Εικόνα 9 : Ρεύματα διέγερσης του SAC ανάλογα με την αλληλουχία των σημείων διέγερσης.[8].

Στην Εικόνα 9 φαίνονται τα ρεύματα, που ερεθίζουν ένα SAC κατά τη φυγόκεντρο και την κεντρομόλο κίνηση στο οπτικό πεδίο. Πιο συγκεκριμένα, στο κάτω δεξιά τμήμα, φαίνονται οι είσοδοι του κυττάρου κατά την κεντρομόλο κίνηση. Η περιοχή δενδριτών κάποιου γειτονικού SAC ερεθίζεται πρώτα κατά την κίνηση αυτή. Το SAC αυτό μεταφέρει την πληροφορία αυτή στο υπό μελέτη κύτταρο και έτσι το κατασταλτικό ρεύμα φτάνει στο κύτταρο πριν φτάσει το οπτικό ερέθισμα στους δενδρίτες του κυττάρου και συνεπώς πριν δημιουργηθεί το διεγερτικό ρεύμα. Ως αποτέλεσμα, το διεγερτικό ρεύμα φτάνει καθυστερημένα στο κύτταρο και έτσι το προπορευόμενο κατασταλτικό ρεύμα δεν αφήνει το κύτταρο να δώσει μεγάλο πλάτος απόκρισης. Επιπλέον, όταν το διεγερτικό ρεύμα αρχίσει να αυξάνεται, το κατασταλτικό έχει ήδη φτάσει σχεδόν στη μέγιστη τιμή του. Έτσι η απόκριση του κυττάρου κατά την κεντρομόλο διεύθυνση είναι πολύ μικρή. Αντίθετα είναι τα πράγματα στην φυγόκεντρο διεύθυνση. Το διεγερτικό ρεύμα είναι το πρώτο, που δημιουργείται, καθώς πρώτα ερεθίζεται το κέντρο της δενδρικής έκτασης του κυττάρου. Όταν το διεγερτικό ρεύμα έχει φτάσει στη μέγιστη τιμή του, αρχίζει να αυξάνεται και το κατασταλτικό ρεύμα (κάτω αριστερά σχήμα). Η καταστολή πλέον δεν είναι ικανή να κρατήσει χαμηλά την απόκριση του κυττάρου και έτσι το κύτταρο αποκρίνεται πολύ πιο έντονα κατά την φυγόκεντρο διεύθυνση[8].

Μέχρι πρότινος δεν ήταν ξεκάθαρο το πού οφείλεται αυτός ο διαφορετικός χρονισμός των ρευμάτων που ερεθίζουν το κύτταρο. Παλιότερα υπήρχε η άποψη η καθυστέρηση του ενός τύπου ρεύματος έναντι του άλλου οφείλεται σε ενδογενείς ιδιότητες των SACs [21].

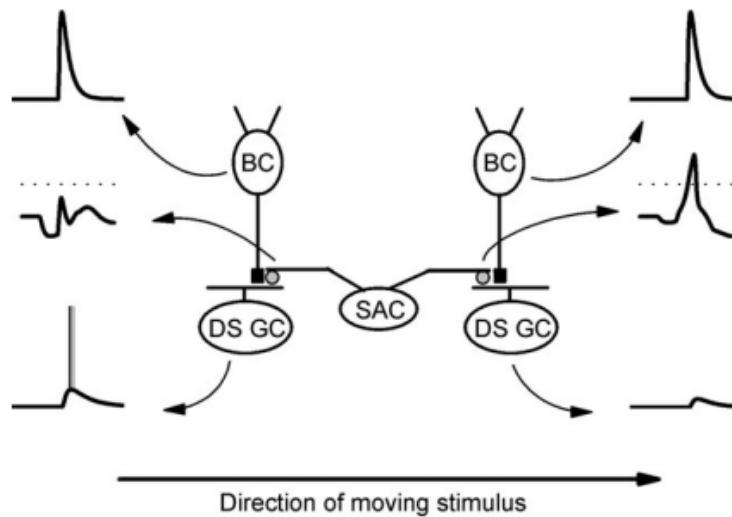


Εικόνα 10 : Προτάσεις για μοντέλα, που εξηγούν την χρονική αλληλουχία των ρευμάτων εισόδου των SACs. Κάτω βλέπουμε το παλιότερο μοντέλο, που θεωρούσε ως αιτία τα ενδογενή χαρακτηριστικά των SACs. Πάνω βλέπουμε το μοντέλο των Kim et al, που τα διπολικά κύτταρα θεωρούνται υπεύθυνα για τη δημιουργία των καθυστερήσεων[7].

Σε πρόσφατη μελέτη τους [7] όμως οι Kim et al έδειξαν ότι δεν οφείλεται στα SACs το φαινόμενο αυτό. Όπως είναι γνωστό και καθολικά αποδεκτό, τα διπολικά κύτταρα, που συνδέονται στα SACs δεν είναι όλα ίδια. Συγκεκριμένα, τα διπολικά κύτταρα, ανάλογα με τον τύπο τους, διαστρωματώνονται σε διαφορετικά βόθρη του εσωτερικού συναπτικού στρώματος (Inner Plexiform Layer, IPL) και έχουν διαφορετικά μεγέθη. Τα ευρήματά τους υποστήριξαν ότι τα διπολικά κύτταρα, που συνδέονται με τα SACs σε ένα συγκεκριμένο υποεπίπεδο του εσωτερικού συναπτικού στρώματος συνδέονται πιο κοντά στο σώμα του κυττάρου σε σχέση με διπολικά κύτταρα, που συνδέονται στα SACs σε άλλο υποεπίπεδο του εσωτερικού συναπτικού στρώματος. Ανάλογα με το σημείο του δενδρίτη στο οποίο συνδέονται, τα διπολικά κύτταρα εμφανίζουν και διαφορετικές ταχύτητες αγωγής των σημάτων τους στα SACs. Συνεπώς, οι καθυστερήσεις, που παρατηρούμε στα ρεύματα εισόδου των SACs δεν οφείλονται σε ενδογενείς ιδιότητες των SACs, που καθυστερούν τα σήματα, αφού έχουν περάσει στο κύτταρο, αλλά εμφανίζονται εξαιτίας του προηγούμενου σταδίου των διπολικών κυττάρων.

3.9 Δημιουργία της Κατευθυντικής Επιλεκτικότητας από το δίκτυο των BCs-SACs-DSGCs

Μια σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας ανίχνευσης της κατεύθυνσης κίνησης φαίνεται στην Εικόνα 11.



Εικόνα 11 : Μοντέλο της δημιουργίας της κατευθυντικής επιλεκτικότητας στον αμφιβληστροειδή. Φαίνονται τα εμπλεκόμενα κύτταρα BCs, SACs, DSGCs καθώς και οι αποκρίσεις τους[10].

Στην Εικόνα 11 φαίνονται δύο κατευθυντικά επιλεκτικά γαγγλιακά κύτταρα(DSGCs) με αντίθετες προτιμητέες κατευθύνσεις. Τα μαύρα τετράγωνα συμβολίζουν τις συνάψεις Γλουταμινικού οξέος μεταξύ των διπολικών και των γαγγλιακών, ενώ οι γκρι κύκλοι συμβολίζουν τις συνάψεις γ-αμινοβουτυρικού οξέος μεταξύ βραχύνων και γαγγλιακών. Όπως φαίνεται στο σχήμα, ο δεξιός δενδρίτης του SAC αποπολώνεται ενώ ο αριστερός όχι, καθώς η κίνηση για τον αριστερό δενδρίτη είναι στην προτιμητέα φυγόκεντρο διεύθυνση, ενώ για τον αριστερό είναι στην μη προτιμητέα κεντρομόλο. Η αποπόλωση αυτή, ξεπερνάει στον δεξιό ένα απαραίτητο κατώφλι(διακεκομμένη γραμμή). Έτσι ο δεξιός δενδρίτης απελευθερώνει ποσότητα γ-αμινοβουτυρικού οξέος στο δεξί γαγγλιακό κύτταρο, αλλά όχι στο αριστερό. Τα δύο διπολικά κύτταρα απελευθερώνουν και τα δύο Γλουταμινικό οξύ διεγείροντας τα γαγγλιακά κύτταρα. Η καταστολή όμως μέσω του γ-αμινοβουτυρικού οξέος στο δεξί γαγγλιακό κύτταρο περιορίζει την παλμική του δραστηριότητα και έτσι παλμοί εμφανίζονται μόνο στο αριστερό γαγγλιακό κύτταρο. Τα γαγγλιακά κύτταρα όπως το αριστερό έτσι, χαρακτηρίζονται επιλεκτικά στην διεύθυνση κίνησης από τα αριστερά προς τα δεξιά ενώ τα γαγγλιακά κύτταρα σαν το δεξιό έχουν κάποια άλλη προτιμητέα διεύθυνση κίνησης, η οποία θα ενεργοποιείται με έναν αντίστοιχο μηχανισμό. Με τον μηχανισμό αυτό, κωδικοποιείται στον αμφιβληστροειδή και μεταφέρεται στον εγκέφαλο η κίνηση στις διαφορετικές κατευθύνσεις. [10]

3.10 Βιβλιογραφία

- [1] E. Famiglietti Jr, *On and Off Pathways through amacrine cells in mammalian retina : The synaptic connections of starburst amacrine cells*, Vision Research, Vol.23, No.11, pp.1265-1279, 1983.
- [2] E. V. Famiglietti , *Synaptic organization of Starburst Amacrine Cells in Rabbit retina : Analysis of serial thin sections by Electron Microscopy and graphic reconstruction*, The Journal of Comparative Neurology, Vol.309, pp.40-70, 1991.
- [3] S. E. Hausselt, T. Euler, P. B. Detwiler and W. Denk, *A Dendrite-Autonomous Mechanism for Direction Selectivity in Retinal Starburst Amacrine Cells*, PLoS, Vol.5, Issue 5, ed.185, pp.1474-1493, 2014.

- [4] K. Yoshida, D. Watanabe, H. Ishikane, M. Tachibana, I. Pastan and S. Nakanishi, *A key role of Starburst amacrine cells in originating retinal direction selectivity and optokinetic eye movement*, Neuron Journal, Vol.30, pp.771-780, 2001.
- [5] G. A. Enciso, M. Rempé, A. V. Dmitriev, K. E. Gavrikov, D. Terman and S. C. Mangel, *A model of direction selectivity in the starburst amacrine cell network*, Journal of Computer Neuroscience, Vol.28, pp.567-578, 2010.
- [6] C. W. Oyster, *The analysis of image motion by the rabbit retina*, Journal of Physiology, Vol.199, pp.613-635, 1988.
- [7] J. S. Kim, M. J. Green, A. Zlateski, K. Lee, M. Richardson, S. C. Turaga, M. Purcaro, M. Balkam, A. Robinson, B. F. Behabadi, M. Campos, W. Denk, H. S. Seung *Space-time wiring specificity supports direction selectivity in the retina*, Letters to Nature, Research Article, 2014.
- [8] S. I. Fried and R. H. Masland, *Image Processing : How the retina detects the direction of image motion*, Current Biology, Vol.17, No.2, pp.63-66, 2006.
- [9] W. Wei, A. M. Hamby, k. Zhou and M. B. Feller, *Development of asymmetric inhibition underlying direction selectivity in the retina*, , Letters to Nature , Vol.469 pp.402-407, 2011.
- [10] A. V. Dmitriev, K. E. Gavrikov and S. C. Mangel, *GABA-mediated spatial and temporal asymmetries that contribute to the directionally selective light responses of starburst amacrine cells*, Journal of Physiology, 590.7, pp.1699-1720, 2012.
- [11] S. I. Fried, T. A. Münch and F. S. Werblin *Mechanisms and circuitry underlying directional selectivity in the retina*, Nature, Vol.420, pp.411-414, 2002.
- [12] K. E. Gavrikov, A. V. Dmitriev, K. T. Keyser and S. C. Mangel, *Cation-Chloride cotransporters mediate neural computation in the retina*, PNAS, Vol.100, No.26, pp.16047-16052, 2003.
- [13] T. Euler, P. B. Detwiler and W. Denk, *Directionally selective calcium signals in dendrites of starburst amacrine cells*, Nature, 418, pp.845-852, 2002.
- [14] P. R. Poznanski, *Cellular inhibitory behavior underlying the formation of retinal direction selectivity in the starburst network*, Journal of Integrative Neuroscience, Vol.9, No.10, pp.299-335, 2010.
- [15] S. Lee and Z. J. Zhou *The synaptic mechanism of Direction Selectivity in distal processes of starburst amacrine cells*, Neuron Journal, Vol.51, pp.787-799, 2006.
- [16] *GABA Receptor*, Wikipedia, the free encyclopedia
- [17] *Glutamate Receptor*, Wikipedia, the free encyclopedia
- [18] M. Ariel and N. W. Daw *Pharmacological analysis of rabbit retinal ganglion cells*, Journal of Physiology(Lond.), Vol.324, pp.161-185, 1982.
- [19] C. A. Kittila and S. C. Massey *Effect of ON pathway blockade on directional selectivity in the rabbit retina*, Journal of Neurophysiology(Lond.), Vol.73, pp.703-712, 1995.
- [20] S. Weng, W. Sun and S. He *Identification of ON-OFF direction selective ganglion cells in the mouse retina*, Journal of Physiology(Lond.), Vol.562, pp.915-923, 2005.
- [21] J. J. Tucker, W. R. Taylor and R. G. Smith, *Direction Selectivity in a model of the Starburst Amacrine Cell*, Visual Neuroscience, Vol.21, pp. 611-625, 2004.

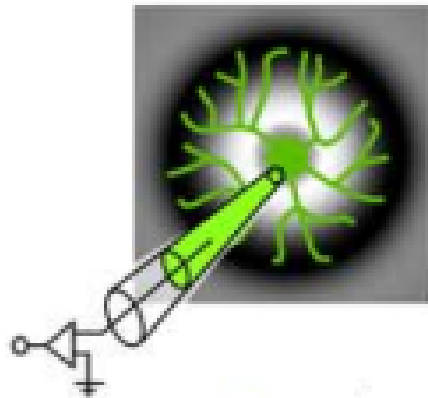
Κεφάλαιο 4^ο : Βραχύινα Κύτταρα : Βιοφυσική και Εξειδικευμένη Δομή

4.1 Εισαγωγή - Στόχοι

Το κεφάλαιο αυτό επικεντρώνεται στα βιοφυσικά χαρακτηριστικά των βραχύνων κυττάρων, και πιο συγκεκριμένα τα ιοντικά κανάλια, που εκφράζονται σε αυτά, τις ειδικές υποκατηγορίες των καναλιών καθώς και τον τρόπο με τον οποίο συνεισφέρουν στην δημιουργία των αποκρίσεων, που αναφέραμε προηγουμένως. Ο στόχος του Κεφαλαίου είναι να κάνει σαφή και εκτενή παρουσίαση των ιοντικών καναλιών συγκεκριμένων υποοικογενειών, που έχουν μέχρι σήμερα ανιχνευθεί και ταυτοποιηθεί στα SACs. Ο σκοπός της συλλογής και παρουσίασης των δεδομένων αυτών είναι η χρησιμοποίηση των εξειδικευμένων τύπων καναλιών στο μοντέλο, που θα κατασκευαστεί στη συνέχεια. Οι ιδιότητες, που διαθέτει το κάθε κανάλι και διαφέρουν ανάμεσα στα διάφορα κανάλια ενός ιόντος προσδίδουν τις χαρακτηριστικές αποκρίσεις στα SACs και συνεπώς δεν θα πρέπει να γίνει μια γενικόλογη αναφορά σε κανάλια ιόντων αλλά σε κανάλια συγκεκριμένων τύπων, που κωδικοποιούνται από ειδικά γονίδια.

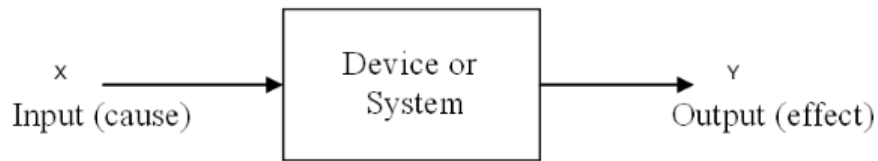
4.2 Μη Γραμμική Δομή των SACs

Σε μια πρώτη προσέγγιση περιγράφεται μια μελέτη των Hausselt et al. Η μελέτη αυτή έχει το χαρακτηριστικό, ότι βρίσκεται πολύ κοντά στο αντικείμενο αντίληψης του Ηλεκτρολόγου Μηχανικού, καθώς βασίζεται στη θεωρία Σημάτων και Συστημάτων. Πιο συγκεκριμένα οι Hausselt et al χρησιμοποίησαν στα πειράματά τους τα υπό μελέτη βραχύινα κύτταρα και διέγειραν το οπτικό τους πεδίο με ομόκεντρους φωτεινούς δακτυλίους. Οι δακτύλιοι αυτοί είχαν φωτεινότητα, που εναλλασσόταν με ημιτονοειδή ρυθμό. Η μορφή της διέγερσης φαίνεται στην Εικόνα 1.



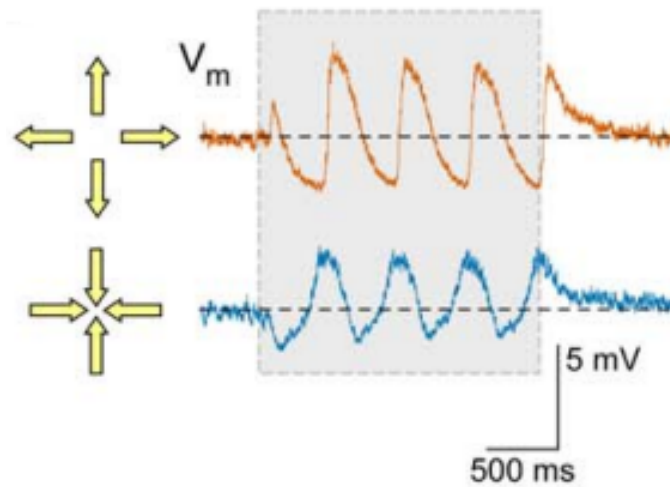
Εικόνα 1 : Διέγερση ενός βραχύνου κυττάρου με ομόκεντρους δακτυλίους, των οποίων η φωτεινότητα εναλλάσσεται με ημιτονοειδή ρυθμό.[1].

Αφού διέγειραν τα κύτταρα με το σήμα αυτό, με το ηλεκτρόδιο, που παρουσιάζεται επίσης στην Εικόνα 1, κατέγραψαν την απόκριση των κυττάρων. Στο σημείο αυτό ακριβώς εμπλέκεται η θεωρία Σημάτων και Συστημάτων. Η απεικόνιση ενός συστήματος φαίνεται στην Εικόνα 2.

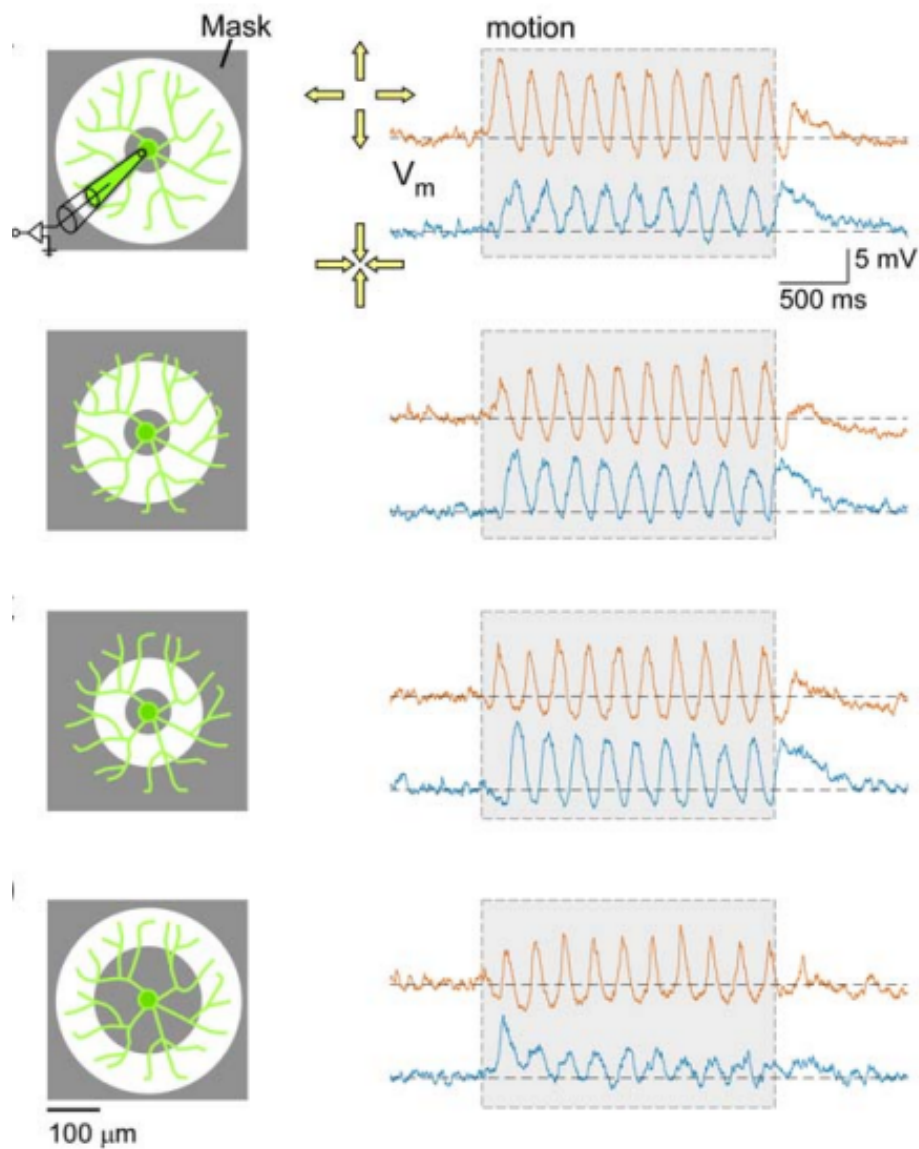


Εικόνα 2 : Απεικόνιση ενός συστήματος.

Όπως είναι γνωστό από τη θεωρία αυτή, ένα σύστημα χαρακτηρίζεται ως γραμμικό, όταν με ημιτονοειδή είσοδο συγκεκριμένης συχνότητας, παράγει εξόδους της ίδιας ακριβώς συχνότητας μετατοπισμένες κατά κάποια φάση και με κάποιες διαφοροποιήσεις στο πλάτος τους. Αν ένα σύστημα διεγείρομενο με ημιτονοειδή είσοδο, παράγει έξοδο, που εμπεριέχει και άλλες συχνότητες πέραν της εισόδου, χαρακτηρίζεται ως μη γραμμικό. Στη μελέτη τους οι Hausselt et al χρησιμοποίησαν την ημιτονοειδή είσοδο, που προαναφέρθηκε και η έξοδος, που μέτρησαν έχει τη μορφή, που φαίνεται στις Εικόνες 3 και 4.



Εικόνα 3 : Απόκριση του κυττάρου σε διέγερση με ομόκεντρος δακτυλίους, των οποίων η φωτεινότητα μεταβάλλεται ημιτονοειδώς. Στο σχήμα παρουσιάζεται η απόκριση όταν οι δακτύλιοι κινούνται κατά την φυγόκεντρο(πάνω) και κατά την κεντρομόλο(κάτω) διεύθυνση.[1]



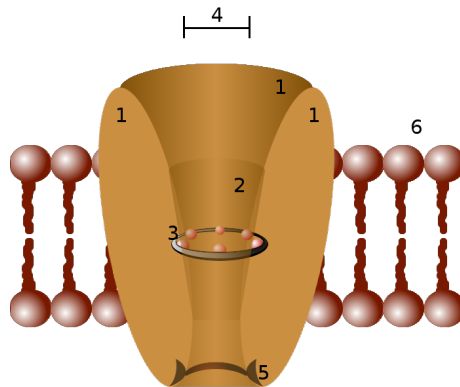
Εικόνα 4 : Αποκρίση των κυττάρων σε διέγερση με δακτυλίους, των οποίων το πλάτος μεταβάλλεται ημιτονοειδώς και το εύρος της δακτυλιοειδούς ζώνης μεταβάλλεται. Στη δεξιά στήλη, από κάθε ζεύγος διαγραμμάτων, τα πάνω αντιστοιχούν στην φυγόκεντρο και τα κάτω στην κεντρομόλο κατεύθυνση κίνησης.

Στην Εικόνα 4 παρουσιάζεται η απόκριση των βραχύνων κυττάρων σε διέγερση της μορφής, που περιγράφηκε παραπάνω. Μόνο που κάθε φορά υπάρχει διαφοροποίηση στο εύρος των δακτυλίων και έτσι λαμβάνονται διαφορετικές αποκρίσεις. Και στις δύο Εικόνες είναι προφανές ότι οι αποκρίσεις των κυττάρων, δηλαδή οι έξοδοι του συστήματος, αν ιδωθεί συστηματικά το κύτταρο, εμπεριέχουν και συνιστώσες σε υψηλότερες αρμονικές, δηλαδή συχνότητες πολλαπλάσιες της θεμελιώδους συχνότητας της εισόδου. Αυτό φαίνεται από την παραμόρφωση του ημιτονοειδούς σήματος και την απόκλισή του από την μονοσυχνοτική μορφή. Ως αποτέλεσμα οι Hausselt et al επιβεβαίωσαν ότι τα κύτταρα αυτά δεν μπορούν να περιγραφούν από απλά παθητικά στοιχεία, όπως αντιστάσεις και χωρητικότητες, που

δίνουν γραμμικές αποκρίσεις. Για την ορθή προσέγγισή τους απαιτούνται μη γραμμικά στοιχεία. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιων στοιχείων είναι τα ενεργά ιοντικά κανάλια, που έχουν αποκρίσεις ελεγχόμενες από τάση και πρόσδεση σωματιδίων. Η ύπαρξη τέτοιων καναλιών στα κύτταρα αυτά έχει αναγνωριστεί από πολλές μελέτες, αλλά παρ' όλα αυτά ορισμένες πρώτες προσεγγίσεις μοντελοποίησης των κυττάρων εμπεριείχαν μόνο παθητικά γραμμικά στοιχεία. Πιο συγκεκριμένα οι Poznanski [2] αλλά και Tucker et al [3] έκαναν κάποιες αρχικές προσεγγίσεις των κυττάρων με μοντέλα, που εμπεριείχαν μόνο παθητικά στοιχεία. Τα αποτελέσματα των μοντέλων αυτών απείχαν αρκετά από την πραγματικότητα, καθώς οι αποκρίσεις των κυττάρων στο σώμα σε διέγερση κατά την φυγόκεντρο και την κεντρομόλο διεύθυνση όπως προβλέπονταν από τα μοντέλα είχαν πολύ μικρές διαφοροποιήσεις, σε πλήρη αντίθεση με τα όσα έχουν βρεθεί πειραματικά. Επίσης οι διαφοροποιήσεις έδειχναν να εξαρτώνται με μεγάλη ευαισθησία από τις εξειδικευμένες παραμέτρους της διέγερσης. Οι μικρές διαφοροποιήσεις και η ευαισθησία τους αυτή δεν αντικατοπτρίζουν την ικανότητα των κυττάρων αυτών να παράγουν κατευθυντικά επιλεκτικές αποκρίσεις σε μεγάλο εύρος συνθηκών αντίθεσης φωτός [4] και ταχύτητας κίνησης [5]. Μια ακόμη ανακρίβεια των παθητικών μοντέλων ήταν ότι προέβλεπαν μικρότερες αποκρίσεις στο σώμα του κυττάρου για την φυγόκεντρο παρά για την κεντρομόλο διεύθυνση [3, 6], σε αντίθεση με τα πειραματικά αποτελέσματα [7, 8, 9, 10].

Όλοι οι παραπάνω λόγοι αποδεικνύουν ότι για να προσεγγισθεί με ορθότητα η μοντελοποίηση των βραχύνων κυττάρων, εκτός από τη χρησιμοποίηση των στοιχειδών παθητικών χαρακτηριστικών (κυτταροπλασματικές και διαμεμβρανικές αντιστάσεις, χωρητικότητες κλπ) οι τύποι των ιοντικών καναλιών, που εκφράζονται στα κύτταρα αυτά χρίζουν ενδελεχούς διερεύνησης. Οι μελέτες, που έχουν γίνει μέχρι σήμερα για τα ιοντικά κανάλια στα SACs είναι πολλές και ακριβείς, ώστε να έχουν προσδιορισθεί οι υποκατηγορίες των καναλιών, που εκφράζονται στη συγκεκριμένη κατηγορία κυττάρων. Πριν αρχίσει η περιγραφή ξεχωριστά των ιοντικών καναλιών, που εμφανίζονται περιγράφονται τα ιοντικά κανάλια από την σκοπιά της δομής και της λειτουργίας τους γενικότερα και όχι εξειδικευμένα.

4.3 Ιοντικά Κανάλια

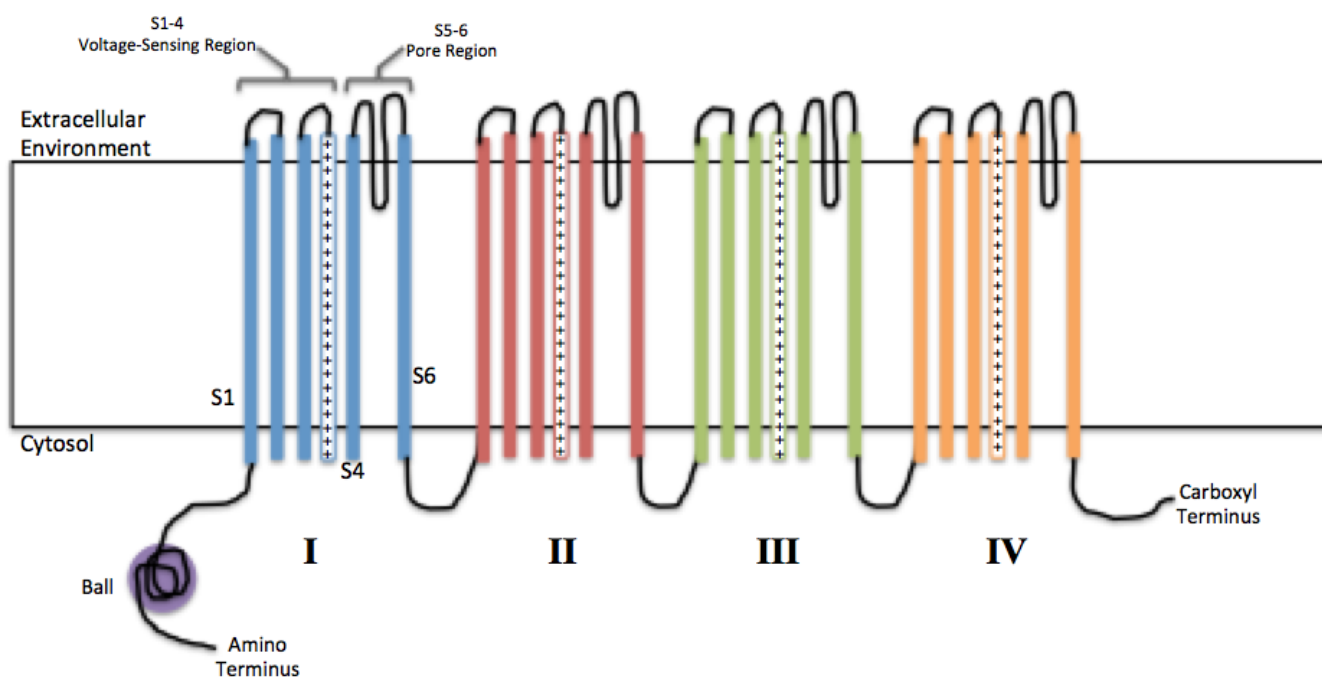


Εικόνα 5 : Σχηματική απεικόνιση της μορφής ενός ιοντικού καναλιού. Στο σχήμα φαίνονται τα τμήματα από τα οποία αποτελείται το κανάλι. 1) Πεδία του καναλιού, συνήθως 4 ανά κανάλι. 2) Εξωτερικός προθάλαμος. 3) Φίλτρο Επιλεκτικότητας. 4) Διάμετρος της Επιλεκτικότητας 5) Περιοχή φωσφορυλίωσης 6) Λιπιδική διπλοστιβάδα-Κυτταρική μεμβράνη [11]

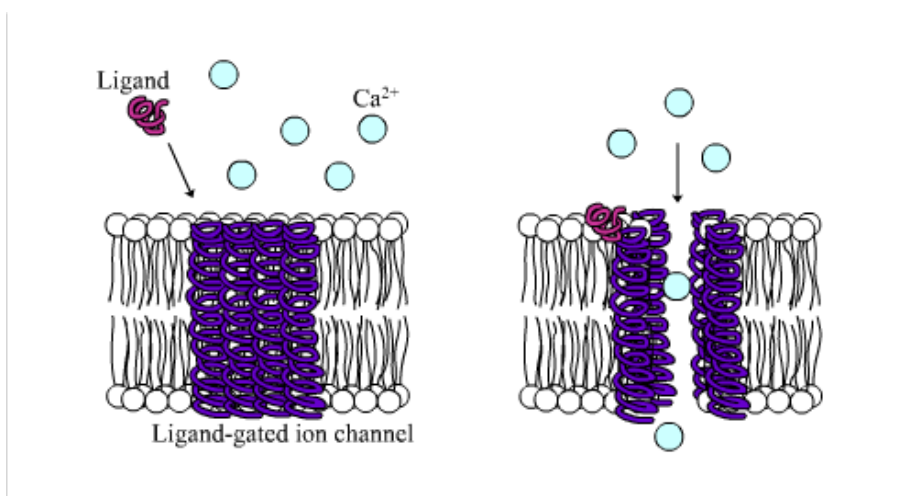
Τα ιοντικά κανάλια είναι μια υποκατηγορία πρωτεϊνών, που διασχίζουν την κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου και έχουν ως κύρια λειτουργία την θεμελίωση ενός δυναμικού κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης και τη δημιουργία δυναμικών δράσης και άλλων ηλεκτρικών αποκρίσεων μέσω του ελέγχου

της ροής ενός ιόντος διαμέσου αυτών. Μια σχηματική απεικόνιση ενός ιοντικού καναλιού φαίνεται στην Εικόνα 5. Χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες, τα ελεγχόμενα από τάση κανάλια (Voltage Gated Channels, VGCs) και τα ελεγχόμενα από συνδέτη κανάλια (Ligand Gated Channels, LGCs).

Τα ελεγχόμενα από τάση κανάλια (Voltage Gated Channels, VGCs) ενεργοποιούνται και ανοίγουν ή κλείνουν ανάλογα με τη διαφορά δυναμικού, που εμφανίζεται εκατέρωθεν της κυτταρικής μεμβράνης. Αντιθέτως, στα ελεγχόμενα από συνδέτη κανάλια (Ligand Gated Channels, LGCs) το άνοιγμα ή το κλείσιμό τους ελέγχεται από τη σύνδεση σε ειδικό σημείο της πρωτεΐνης ενός χημικού διαβιβαστή. Τα κανάλια, όπως φαίνεται στην Εικόνα 5, έχουν ένα φίλτρο επιλεκτικότητας. Με αυτό μπορούν να επιτρέπουν επιλεκτικά τη διέλευση ενός συγκεκριμένου τύπου ιόντων και για αυτό υπάρχουν διαφορετικά κανάλια για τις βασικές κατηγορίες ιόντων, όπως Νάτριο, Ασβέστιο, Κάλιο, Χλώριο κλπ. Παρ' όλα αυτά, για το ίδιο ιόν υπάρχουν διαφορετικές οικογένειες καναλιών, που κωδικοποιούνται σε διαφορετικά γονίδια και εμφανίζουν διαφορετικές ιδιότητες αγωγής.



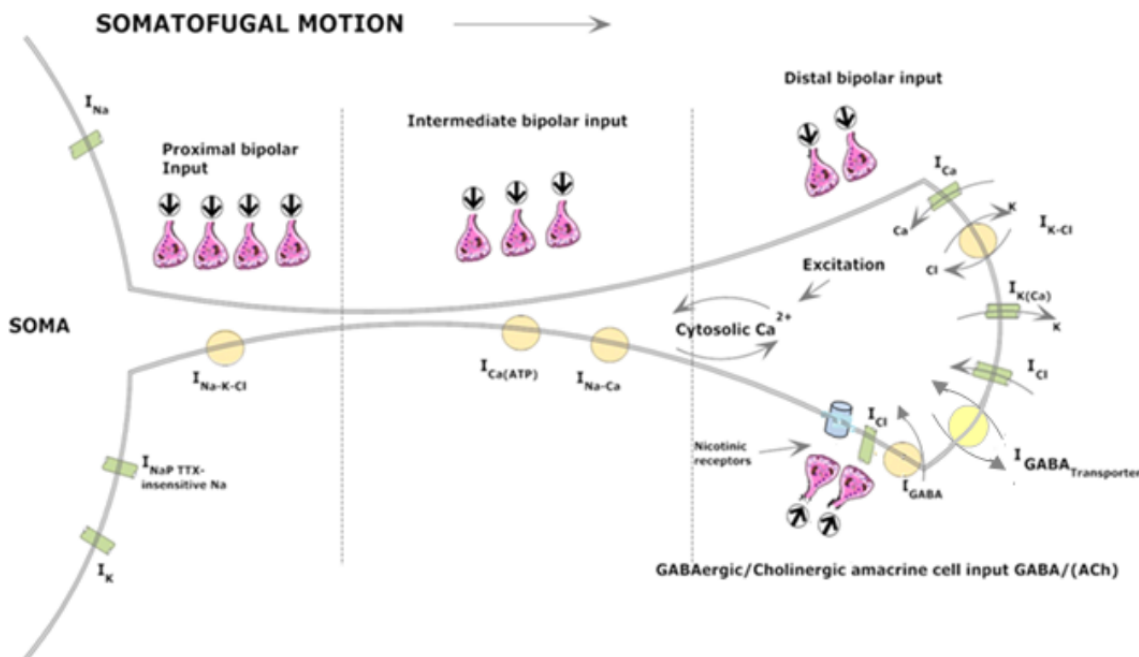
Εικόνα 6 : Σχηματική απεικόνιση της μορφής ενός ελεγχόμενου από τάση ιοντικού καναλιού. Στο σχήμα φαίνονται τα τέσσερα πεδία από τα οποία αποτελείται το κανάλι [12].



Εικόνα 7 : Σχηματική απεικόνιση της μορφής ενός ελεγχόμενου από συνδέτη ιοντικού καναλιού. Στο σχήμα φαίνεται η περιοχή, στην οποία συνδέεται ο ειδικός χημικός διαβιβαστής [13].

4.3.1 Ιοντικά Κανάλια στα SACs

Στα SACs έχουν εντοπιστεί να εκφράζονται αρκετοί τύποι ιοντικών καναλιών. Πιο συγκεκριμένα ο Roznanski σε μια εργασία του έκανε μια πλήρη συμπερίληψη των καναλιών αυτών [14]. Τα κανάλια, που έχουν αναγνωριστεί μέχρι σήμερα στα SACs φαίνονται στην Εικόνα 8.



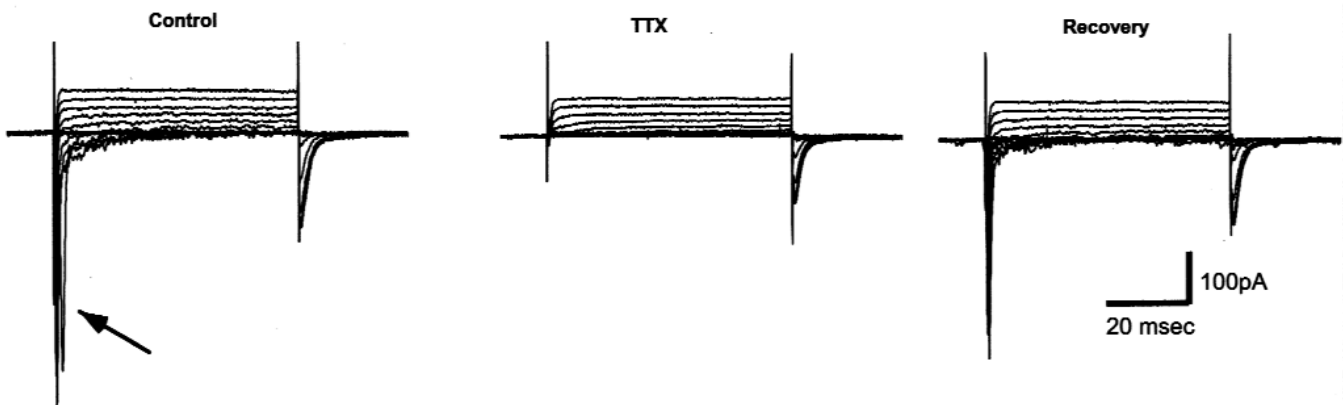
Εικόνα 8 : Παρουσίαση των ιοντικών καναλιών και των γενικότερων μέσων μεταφοράς ιόντων κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης στα SACs [14].

Στη συνέχεια γίνεται διεξοδική παρουσίαση των επιλεκτικών για κάθε ιόν καναλιών, που εκφράζονται

στα SACs, δίνοντας περισσότερες λεπτομέρειες από όσες φαίνονται στην Εικόνα 8.

4.3.2 Ιοντικά Κανάλια Νατρίου(Na)

Μια από τις βασικές κατηγορίες ιοντικών καναλιών, που έχουν εντοπιστεί ότι εκφράζονται στα SACs είναι τα κανάλια Νατρίου. Ο Cohen στην εργασία του [15] έδειξε ότι στα SACs εμφανίζεται ένα ταχύ ρεύμα προς το εσωτερικό του κυττάρου. Στο πείραμά του οδηγούσε τα κύτταρα σε δυναμικά θετικότερα των -50mV και παρατηρούσε τα ρεύματα του κυττάρου. Το ρεύμα, που ανίχνευσε είχε μια πολύ γρήγορη ενεργοποίηση και μια επίσης γρήγορη απενεργοποίηση με την πάροδο του χρόνου. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 9. Το κύτταρο συγχρατούνταν σε ένα δυναμικό ηρεμίας στα -70mV και οδηγούνταν παλμικά σε δυναμικά, που ξεκινούσαν από τα -100mV και αυξάνονταν σταδιακά κατά 10mV τη φορά. Από τα -50mV και έπειτα, τα κύτταρα φαίνονταν να έχουν ένα ρεύμα προς το εσωτερικό (εκεί, που δείχνει το βέλος) που αυξανόταν πολύ έντονα με μορφή αιχμής. Στη συνέχεια, ο Cohen χρησιμοποίησε ένα διάλυμα Τετραδοτοξίνης(TTX) και επανέλαβε τη διαδικασία. Τα αποτελέσματα φαίνονται στα μεσαία διαγράμματα της Εικόνας 9. Εκεί γίνεται προφανές, ότι το πλάτος των ρευμάτων μειώνεται δραστικά και η μορφή της αιχμής στην αρχή εξαφανίζεται πλήρως. Συνεπώς ο Cohen συμέρανε ότι τα ρεύματα Νατρίου, που παρατήρησε ότι εμφανίζονται στα SACs ήταν ευαίσθητα στην TTX. Πρέπει να σημειώσουμε όμως ότι τα ρεύματα Νατρίου, που παρατηρήθηκαν δεν εξαλείφονται τελείως κατά την παρουσία της TTX, αλλά περιορίζονται σε χαμηλότερες τιμές και χάνουν την αιχμή, που παρουσιαζόταν αρχικά. Υπάρχει όμως και μια μερίδα ρευμάτων Νατρίου, που δεν είναι ευαίσθητα στην TTX. Η παρατήρηση των χαρακτηριστικών των ρευμάτων, δηλαδή η ταχύτητα ενεργοποίησης και απενεργοποίησής τους και η ιδιαίτερη μορφολογία τους οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ανήκουν στην οικογένεια των ρευμάτων, που κωδικοποιούνται από το γονίδιο $Na_v1.8$.



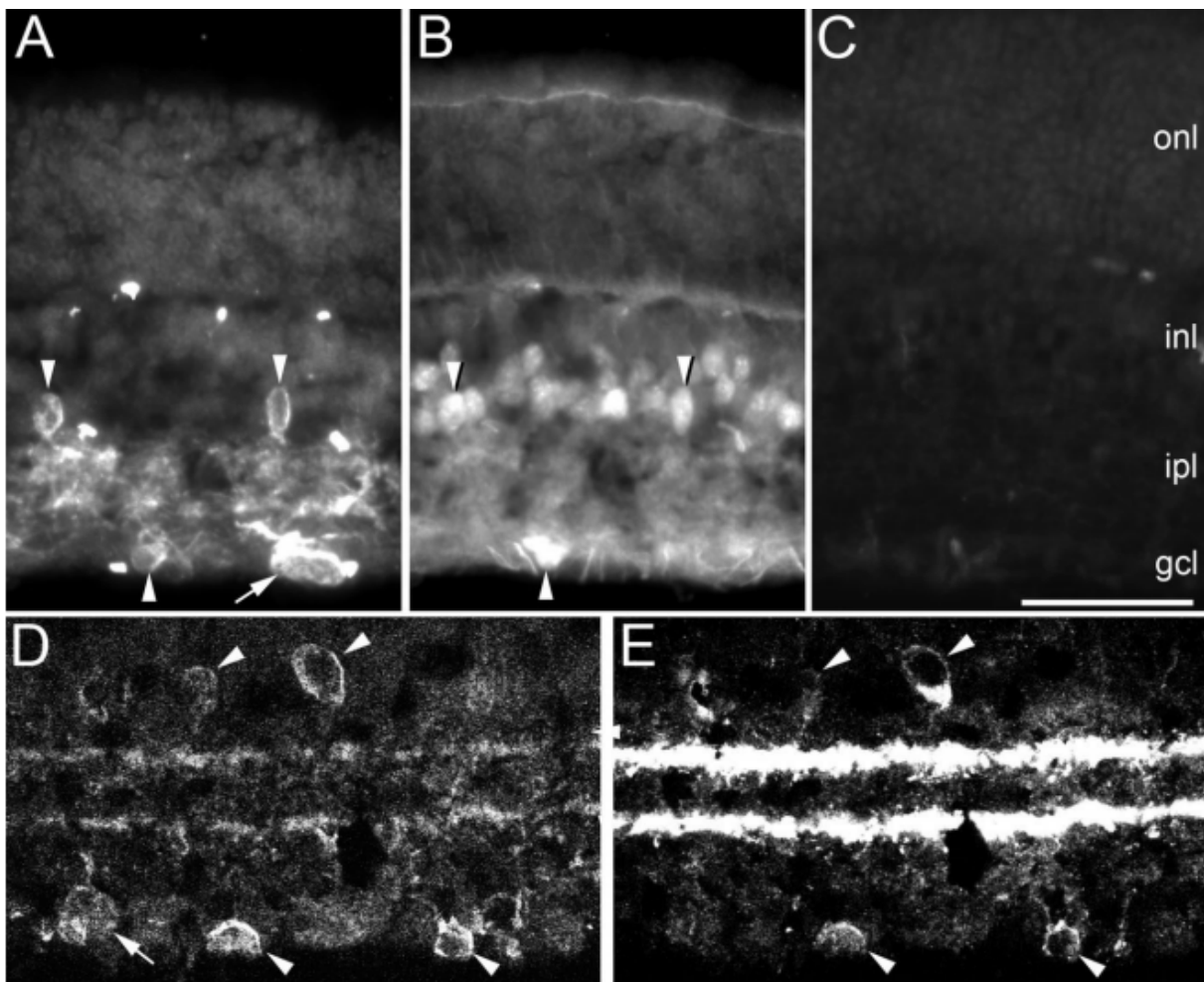
Εικόνα 9 : Ρεύματα, που παρατηρήθηκαν κατά την οδήγηση των κυττάρων σε διάφορες τιμές δυναμικού [15].

Εκεί έρχεται να δώσει ένα σημαντικό εύρημα η μελέτη των Oesch και Taylor [16]. Εκείνοι έδειξαν, ότι τα ρεύματα Νατρίου των SACs, που είναι ευαίσθητα στην TTX δεν είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία των κατευθυντικά επιλεκτικών αποκρίσεων των SACs. Τα δεδομένα τους όμως έδειξαν επίσης ότι τα υπόλοιπα ρεύματα, που δεν είναι ευαίσθητα στην TTX, παίζουν σημαίνοντα ρόλο στην ενίσχυση των κατευθυντικά επιλεκτικών σημάτων. Συνοψίζοντας δηλαδή, τα ρεύματα Νατρίου στα SACs διαχωρίζονται σε ευαίσθητα στην TTX, τα οποία δεν παίζουν ρόλο στη δημιουργία των κατευθυντικά επιλεκτικών αποκρίσεων και σε μη ευαίσθητα στην TTX, τα οποία όμως ενισχύουν τις κατευθυντικά επιλεκτικές αποκρίσεις.

Τα συγκεκριμένα γονίδια, που εκφράζουν τα ιοντικά κανάλια Νατρίου στα SACs ανιχνεύθηκαν σε

μια μελέτη των O' Brien et al [17]. Αρχικά έδειξαν ότι τα ρεύματα, που οφείλονται στο γονίδιο $Na_v1.8$ απενεργοποιούνται πολύ αργά (μέχρι και 80ms για μερική απενεργοποίηση) και ενεργοποιούνται ξανά πολύ γρήγορα (περίπου 0,7ms) σε σχέση με ρεύματα, που οφείλονται σε άλλα γονίδια όπως τα $Na_v1.1 - 1.6$ (1ms για απενεργοποίηση και 5-87ms για επανενεργοποίηση) [18, 19]. Τα χαρακτηριστικά αυτά ταιριάζουν με τα χαρακτηριστικά των ρευμάτων, που είχαν παρατηρηθεί στα SACs. Στη μελέτη τους αυτή χρησιμοποίησαν μια πρωτότυπη μέθοδο αντίθετης μεταγραφής του γενετικού υλικού και αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Τα αποτελέσματά τους πιστοποίησαν, ότι τα κανάλια που εκφράζονται στα SACs ανήκουν στην οικογένεια των $Na_v1.8$ καναλιών, που χαρακτηρίζονται έτσι από το γονίδιο, που κωδικοποιεί τη δημιουργία των συγκεκριμένων καναλιών.

Στις μελέτες τους ο Poznanski και οι O' Brien et al έδειξαν επίσης ότι τα κανάλια Νατρίου εμφανίζονται όχι στους δένδριτες των κυττάρων, αλλά κυρίως στο σώμα αυτών [14, 17]. Το γεγονός αυτό θα πρέπει να προσεχθεί και να χρησιμοποιηθεί κατά την μοντελοποίηση των κυττάρων, καθώς μπορεί να διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στη λειτουργία τους.



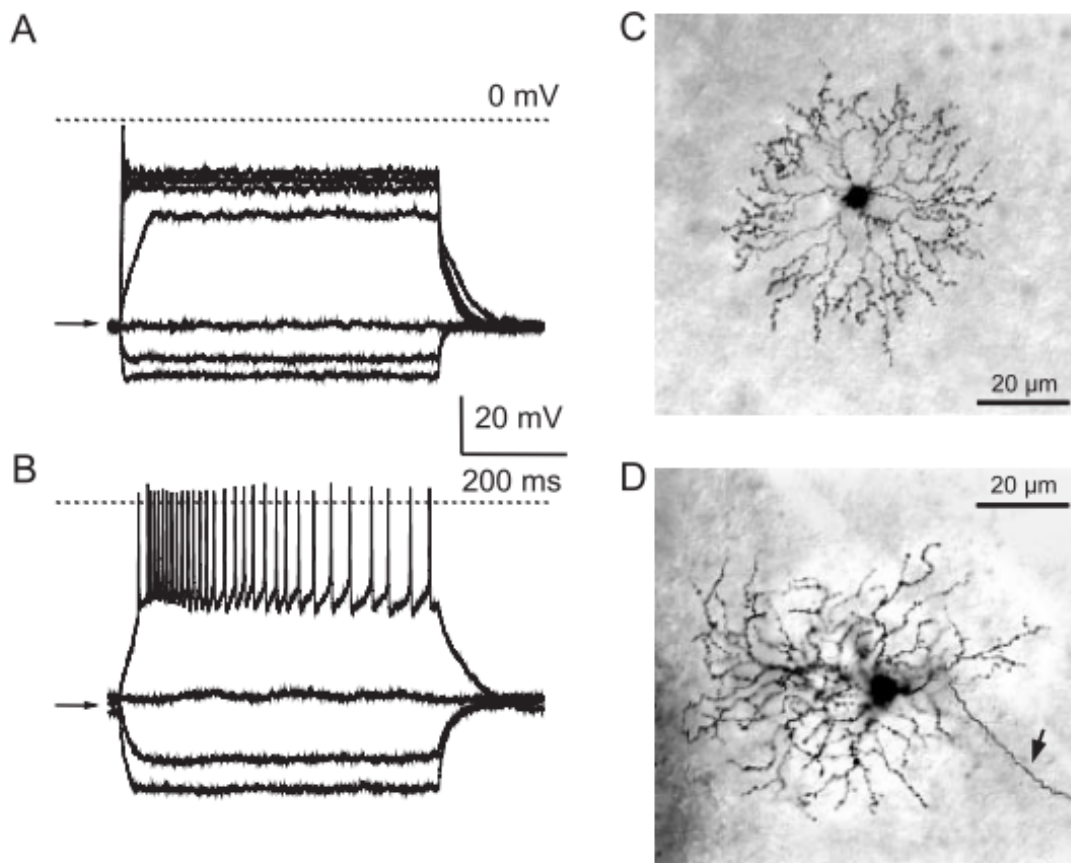
Εικόνα 10 : A. Κύτταρα χρωματισμένα με χρωμοφόρο, που εντοπίζει τα ρεύματα, που οφείλονται στο γονίδιο $Na_v1.8$ B. Κύτταρα χρωματισμένα με χρωμοφόρο, που εντοπίζει τη GABA C. Όρια των στρωμάτων του αμφιβληστροειδούς D. Κύτταρα χρωματισμένα με χρωμοφόρο, που εντοπίζει το γονίδιο $Na_v1.8$ E. Κύτταρα χρωματισμένα με χρωμοφόρο, που εντοπίζει την Ακετυλοχολίνη [17].

Οι O' Brien et al στη μελέτη τους έδωσαν άλλα δύο σπουδαία συμπεράσματα. Αρχικά χρησιμοποίησαν ένα εξειδικευμένο χρωμοφόρο για τα κύτταρα, που εμφανίζουν τα ρεύματα του γονιδίου $Na_v1.8$. Με το χρωμοφόρο αυτό εντοπίστηκαν δύο κατηγορίες κυττάρων, όπως φαίνεται στην Εικόνα 10Α. Η μία ήταν μια ομάδα μικρών κυττάρων στο εσωτερικό πυρηνικό στρώμα(κεφαλές βελών). Η άλλη ήταν μια ομάδα μικρών κυττάρων και μια άλλη ομάδα πολύ μεγάλων κυττάρων στο γαγγλιακό στρώμα(βέλη). Τα μικρά κύτταρα στα εσωτερικό πυρηνικό στρώμα λόγω θέσης και μεγέθους χαρακτηρίστηκαν ως βραχύινα και τα πολύ μεγάλα στο γαγγλιακό στρώμα ως γαγγλιακά. Τα μικρά κύτταρα όμως στο γαγγλιακό στρώμα, θα μπορούσαν είτε να είναι βραχύινα είτε κάποια από τις πολύ μικρές σε μέγεθος κατηγορίες των γαγγλιακών κυττάρων. Για να γίνει η διάκριση, οι O' Brien et al χρησιμοποίησαν ένα χρωμοφόρο, που χρωματίζει επιλεκτικά το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), που εμφανίζεται στα βραχύινα. Το χρωμοφόρο χρωμάτισε επιλεκτικά μόνο τα μικρά κύτταρα του γαγγλιακού στρώματος και έτσι βγήκε το συμπέρασμα ότι τα μικρά κύτταρα του γαγγλιακού στρώματος, που βρέθηκαν ότι εκφράζουν το γονίδιο $Na_v1.8$ ήταν βραχύινα και όχι γαγγλιακά κύτταρα. Στη συνέχεια θέλησαν να προσδιορίσουν τον τύπο των βραχύινων κυττάρων, στα οποία εκφράζεται το γονίδιο $Na_v1.8$. Έτσι χρησιμοποίησαν τον κυστώδη διαβιβαστή της Ακετυλοχολίνης (vesicular Acetylcholine Transporter, vAChT), ένα χρωμοφόρο, που χρωματίζει επιλεκτικά τα SACs, αφού τα κύτταρα αυτά, όπως έχει αναφερθεί στα προηγούμενα, έχουν τη δυνατότητα να απελευθερώνουν δύο τύπους νευροδιαβιβαστών : και GABA και Ακετυλοχολίνη. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 10D,E. Στο εσωτερικό πυρηνικό στρώμα, όλα τα κύτταρα, που βρέθηκαν να εκφράζουν το γονίδιο $Na_v1.8$ χρωματίστηκαν από την vAChT, ενώ στο γαγγλιακό στρώμα, μόνο τα μικρά κύτταρα χρωματίστηκαν. Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι τα κύτταρα, που εκφράζεται το γονίδιο $Na_v1.8$ είναι όχι οποιαδήποτε κατηγορία βραχύινων κυττάρων αλλά SACs. Δηλαδή τα ρεύματα, που οφείλονται στο γονίδιο αυτό, διαχωρίζουν τα SACs από τα υπόλοιπα βραχύινα κύτταρα.

4.3.3 Ιοντικά Κανάλια Καλίου(K)

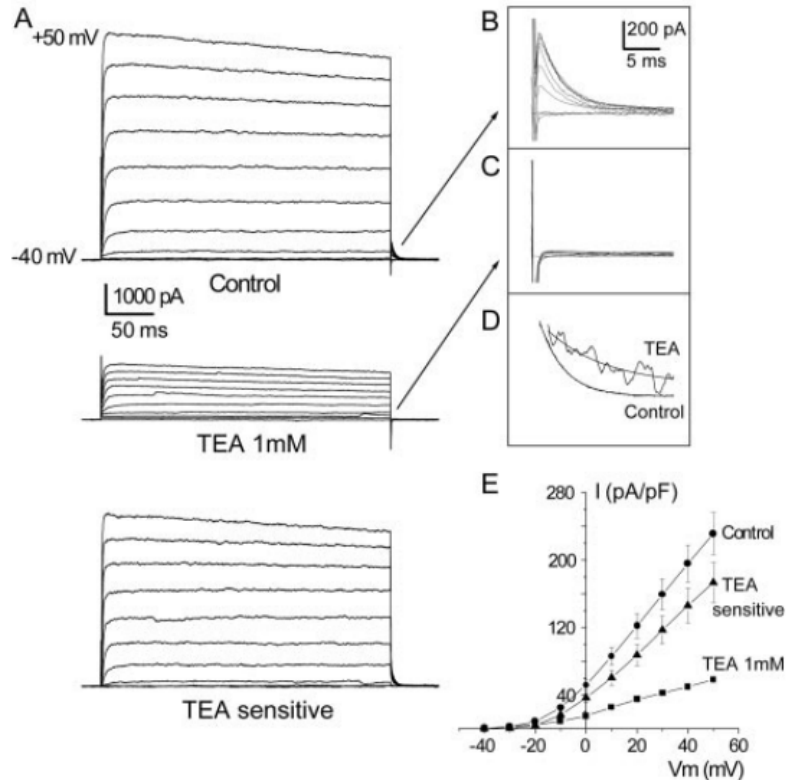
Η δεύτερη κατηγορία ιοντικών καναλιών, που εμφανίζονται στα SACs είναι τα κανάλια Καλίου. Στην εργασία τους [20] οι Ozaita et al έδειξαν ότι τα SACs εμφανίζουν αρκετά μεγάλα εξαρτώμενα από τάση ρεύματα Καλίου, τα οποία διαμεσολαβούνται από κανάλια Καλίου, που περιέχουν πεδία της K_v3 υποοικογένειας γονιδίων.

Στην εργασία τους οι Ozaita et al έκαναν μετρήσεις σε γαγγλιακά και SACs, εγγέροντας ρεύματα και μετρώντας τις αλλαγές στο δυναμικό της μεμβράνης των κυττάρων(Current Clamp Recordings). Οι ερευνητές παρατήρησαν ότι η ταχεία ενεργοποίηση των καναλιών της οικογένειας K_v3 παρείχε στα κύτταρα τη δυνατότητα να περιορίζουν την αποπόλωσή τους σε δυναμικά, που ξεπερνούν τα -20mV. Το χαρακτηριστικό αυτό θεωρείται, πως μπορεί να έχει σπουδαίο ρόλο στο φαινόμενο της ηλεκτρικής απομόνωσης των δενδριτών ή και τομέων από δενδρίτες στα SACs. Η ιδιότητα αυτή είναι μία πό τις απαραίτητες για την κατευθυντική επιλεκτικότητα των SACs, όπως είχαμε αναφέρει σε προηγούμενο κεφάλαιο. Η λειτουργία αυτή των K_v3 καναλιών διαφέρει από τη συνήθη λειτουργία τους σε άλλους τύπους κυττάρων, όπου χρησιμεύουν στην υψηλής συχνότητας υψηλή παλμική δραστηριότητα των κυττάρων. Ένα επιπλέον σπουδαίο εύρημα της ομάδας ήταν ότι το χρωμοφόρο, που ανίχνευε την έκφραση του γονιδίου $K_v3.1b$ εμφάνιζε μια κλίση προς τα κοντινότερα τμήματα των δενδριτών σε σχέση με τα πιο απομακρυσμένα. Το γεγονός αυτό θεωρείται πως μπορεί να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην προτίμηση των SACs στην κίνηση κατά την φυγόκεντρο διεύθυνση. Τα αποτελέσματα των Current Clamp Recordings των Ozaita et al φαίνονται στην Εικόνα 11.



Εικόνα 11 : Μετρήσεις του δυναμικού μεμβράνης ενός SAC (A) και ενός γαγγλιακού κυττάρου (B) στα οποία εγχέονται ρεύματα διαφόρων επιπέδων. Παρατηρείται ο κορεσμός του δυναμικού του SAC περίπου στα -20mV , σε αντίθεση με το γαγγλιακό κύτταρο, όπου το υψηλό επίπεδο εγχεόμενου ρεύματος οδήγησε σε υψηλής συχνότητας παλμική δραστηριότητα [20].

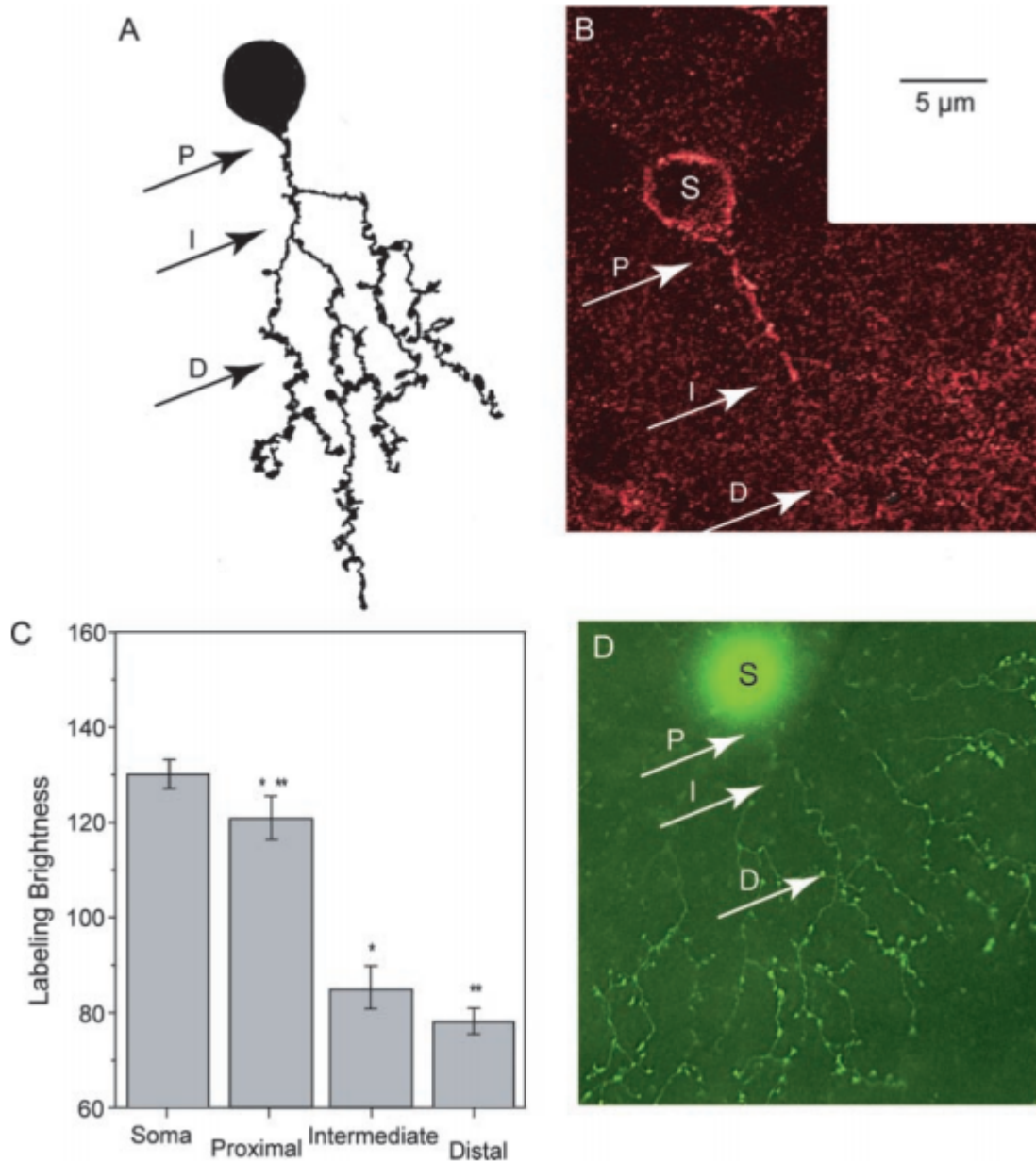
Στην Εικόνα αυτή παρουσιάζονται δύο κύτταρα, ένα γαγγλιακό και ένα SAC, τα οποία υποβλήθηκαν στις ίδιες εγχύσεις ρεύματος. Τα κύτταρα διατηρούνταν σε σταθερή τάση -70mV και τους εγχέονταν παλμοί -100 , -50 , 0 , $+50$, $+200$, $+300$ και $+400$ pA. Όπως παρατηρεί κανείς εύκολα, στο SAC, τα επίπεδα της αποπόλωσης περιορίστηκαν σε μια τιμή κορεσμού κάτω από τα -20mV όσο κι αν αυξανόταν η τιμή του εγχεόμενου ρεύματος, σε αντίθεση με το γαγγλιακό κύτταρο, όπου η αύξηση από ένα σημείο και πέρα οδήγησε στην υψηλής συχνότητας παλμική δραστηριότητα. Το εύρημα αυτό έδειχνε ότι με την έγχυση ενεργοποιούνταν κάποια ισχυρά ανορθωτικά ρεύματα προς το εξωτερικό του κυττάρου. Για να ταυτοποιήσουν τα ρεύματα αυτά, έκαναν κάποιες Voltage Clamp μετρήσεις, δηλαδή άλλαξαν το δυναμικό της μεμβράνης του κυττάρου και μετρούσαν τα ρεύματα, που εμφανίζονταν. Τα αποτελέσματα των Voltage Clamp μετρήσεων φαίνονται στην Εικόνα 12. Τα ρεύματα, που μετρήθηκαν, ενεργοποιούνταν ταχύτατα σε δυναμικά μεμβράνης υψηλότερα των -20mV . Επίσης χαρακτηρίζονταν από πολύ μικρό χρόνο απενεργοποίησης(περίπου 3ms). Τα χαρακτηριστικά αυτά ταιριάζουν με τα ρεύματα της υποοικογένειας K_v3 γονιδίων, καθώς τα κανάλια Καλίου, που περιέχουν πορώδη υποπεδία αυτής της υποοικογένειας έχουν πολύ γρήγορη ενεργοποίηση σε δυναμικά υψηλότερα των -20mV και πολύ ταχεία απενεργοποίηση.



Εικόνα 12 : Μετρήσεις των ρευμάτων του SAC κατά την οδήγησή του σε διάφορες τιμές τάσης. Σημειώνεται η απουσία των ουρών απενεργοποίησης, που χαρακτηρίζουν την υποοικογένεια K_v3 όταν υπάρχει τετρααιθυλαμόνιο(TEA) στο διάλυμα [20].

Για να προσδιορίσουν με μεγαλύτερη ακρίβεια την οικογένεια των γονιδίων, που κωδικοποιούν τα ρεύματα οι ερευνητές, χρησιμοποίησαν μια ουσία, που καταστέλλει επιλεκτικά τα ρεύματα αυτής της υποοικογένειας. Η ουσία αυτή ήταν το Τετρααιθυλαμόνιο(TEA). Παρουσία του TEA, τα ρεύματα όχι μόνο μειώθηκαν, όπως φαίνεται στην Εικόνα 12, αλλά έχασαν και τις χαρακτηριστικές της οικογενείας ουρές της απενεργοποίησης(μεγέθυνση). Τα ρεύματα, που συνέχισαν να εμφανίζονται και κατά την παρουσία του TEA, απενεργοποιούνταν πολύ πιο αργά και συνεπώς θεωρήθηκε ότι δεν ανήκουν σε αυτή την υποοικογένεια ρευμάτων.

Ένα επιπλέον εύρημα των ερευνητών ήταν ότι τα ρεύματα Καλίου στα βραχύινα κύτταρα εμφάνιζαν πολύ μικρή μη-ενεργοποιησιμότητα. Το γεγονός αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα κανάλια, που εμπλέκονται στη δημιουργία των ρευμάτων περιέχουν $K_v3.1$ ή/και $K_v3.2$ πρωτεΐνες.



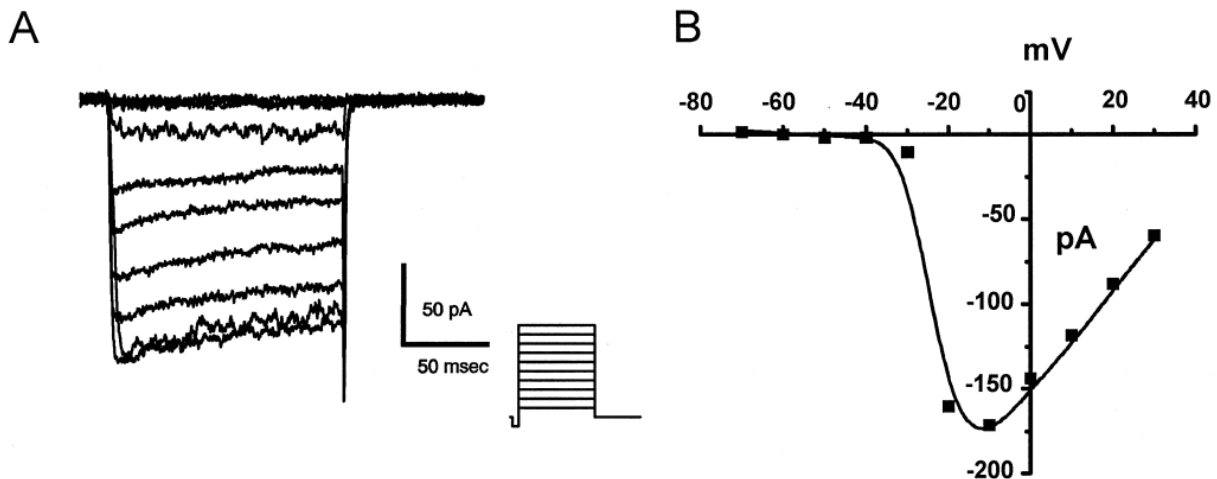
Εικόνα 13 : Υψηλότερη πυκνότητα στην έκφραση της πρωτεΐνης K_v3 στο σώμα και τους κοντινούς δενδρίτες σε σχέση με τους ενδιάμεσους και τους απομακρυσμένους [20].

Στη συνέχεια της έρευνας η ομάδα εξέτασε την διαφοροποίηση στην εμφάνιση των καναλιών Καλίου αυτής της υποοικογένειας κατά μήκος των δενδριτών των SACs. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες [21, 22, 23, 24, 25] οι πρωτεΐνες $K_v3.1$ και $K_v3.2$ εντοπίζονται στο σώμα και στον πρωτεύοντα άξονα και ελάχιστα στους δενδρίτες, όπου εμφανίζονται μόνο λίγο στα αρχικά τους τμήματα. Στην έρευνα αυτή οι πρωτεΐνες αυτές βρέθηκαν να εκφράζονται καθ' όλο το μήκος της δενδριτικής διακλάδωσης των SACs. Με το χαρακτηριστικό αυτό, τα SACs προσομοιάζουν με τα μιτροειδή κύτταρα του συστήματος της όσφρησης (olfactory bulb mitral cells), στα οποία επίσης οι πρωτεΐνες $K_v3.1$ εκφράζονται καθ' όλο το μήκος της δενδριτικής τους διακλάδωσης. Στην Εικόνα 13 παρουσιάζεται η επισήμανση των δενδριτών

του κυττάρου, όπου εμφανίζονται οι πρωτείνες K_v3 . Στο ραβδόγραμμα απεικονίζεται η μεγαλύτερη επισήμανση των κοντινών δενδριτών και του σώματος σε σχέση με τους ενδιάμεσους και τους πιο μακρινούς. Οι τιμές της φωτεινότητας φαίνονται περίπου ίδιες, αλλά θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν και η διαφορά στην επιφάνεια των δενδριτών.

Με βάση όλα τα παραπάνω ευρήματά τους, οι Ozaita et al κατάφεραν να δώσουν μια λογική εξήγηση στην εμφάνιση των καναλιών της οικογένειας K_v3 και στην χρησιμότητά τους για την εξυπηρέτηση της εξειδικευμένης λειτουργίας των SACs. Τα κανάλια της κατηγορίας αυτής δεν υποστηρίζουν την υψηλής συχνότητας παλμική δραστηριότητα, όπως στους άλλους τύπους κυττάρων, στα οποία εμφανίζονται. Η χρησιμότητά τους όμως στα SACs είναι αδιαμφισβήτητη, καθότι τα ρεύματα Καλίου αυτής της υποοικογένειας αποτελούν τα πιο κυρίαρχα ρεύματα προς το εξωτερικό του κυττάρου. Αρχικά το φαινόμενο της υψηλής εξασθένισης των σημάτων, που κινούνται κατά την κεντρομόλο διεύθυνση συμβάλλει στην ηλεκτρική απομόνωση των γειτονικών δενδριτών. Η ιδιότητα αυτή, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποτελεί βάση για τον τοπικό, ανεξάρτητο και ταυτόχρονο υπολογισμό κατευθυντικά επιλεκτικών αποκρίσεων [7, 26]. Επιπλέον, έχουμε ήδη δει ότι οι δενδρίτες ξεχωριστά, αναταποκρίνονται καλύτερα στην φυγόκεντρο κίνηση παρά στην κεντρομόλο. Οι ερευνητές θεωρούν ότι οι ιδιότητες εξυπηρετούνται καλά από την συγκεκριμένη κατηγορία καναλιών. Ακόμα και η διαφοροποίηση στην έκφραση των καναλιών ανάμεσα στο σώμα και τους πλησιέστερους δενδρίτες σε σχέση με τους ενδιάμεσους και τους πιο απομακρυσμένους θεωρείται πως έχει ιδιαίτερη σημασία. Πιο συγκεκριμένα, θεωρείται πως η μεγαλύτερη έκφραση των καναλιών στο σώμα και τους πλησιέστερους δενδρίτες εμποδίζει την άθροιση των ρευμάτων κατά την κεντρομόλο διεύθυνση, ενώ δεν το κάνει κατά την φυγόκεντρο. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται το υπόβαθρο για την προτίμηση των SACs στην φυγόκεντρο διεύθυνση σε σχέση με την κεντρομόλο.

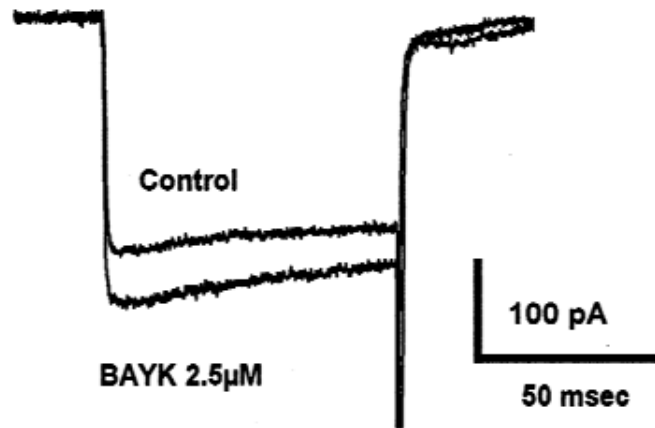
4.3.4 Ιοντικά Κανάλια Ασβεστίου(Ca)



Εικόνα 14 : Ρεύματα Ασβεστίου στα SACs κατά την οδήγηση των κυττάρων σε διάφορες τιμές δυναμικού. Στο δεξιό τμήμα της Εικόνας φαίνεται η σχέση μέγιστης τιμής του ρεύματος Ασβεστίου σε σχέση με το πλάτος του παλμού τάσης, με το οποίο διεγείρεται το κύτταρο[15].

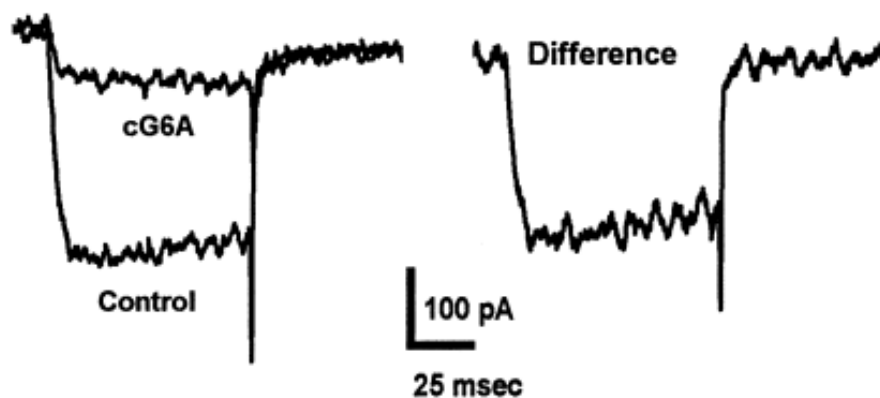
Τα κανάλια Ασβεστίου χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τα συνεχή και τα προσωρινά. Έχουν γίνει προσπάθειες από διάφορες ερευνητικές ομάδες για την κατηγοριοποίηση των ρευμάτων αυτών. Ο Cohen στη μελέτη του αρχικά οδήγησε τα κύτταρα με παλμούς σε διάφορα ύψη δυναμικών και μέτρησε τα ρεύματα Ασβεστίου[15]. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 14.

Στη συνέχεια, για να γίνει ο διαχωρισμός των ρευμάτων χρησιμοποίησε αρχικά ιόντα Νικελίου. Τα ιόντα αυτά κλείνουν επιλεκτικά την υποκατηγορία T-type(transient) της κατηγορίας των προσωρινού τύπου καναλιών. Παρ' όλα αυτά, με την προσθήκη των ιόντων Νικελίου, τα ρεύματα δεν περιορίστηκαν στο ελάχιστο, με αποτέλεσμα να εξάγεται με ασφάλεια το συμπέρασμα ότι τα ρεύματα Ασβεστίου, που εμφανίζονται στα SACs δεν ανήκουν σε αυτή την κατηγορία. Στη συνέχεια εξετάστηκαν ουσίες, που μπλοκάρουν επιλεκτικά τα κανάλια της υποκατηγορίας L-type. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε η ουσία BAY K8644 και στη συνέχεια η ουσία Νιφεδιπίνη(Nifedipine). Η πρώτη ουσία είχε ελαφρά κατασταλτική δράση στα ρεύματα των 2 κυττάρων από τα 6, που μελετήθηκαν ενώ στα άλλα 4 είχε διεγερτική δράση. Η δεύτερη ουσία δεν είχε απολύτως καμία επίδραση μείωσης στα ρεύματα των κυττάρων. Έτσι, εξήχθη το συμπέρασμα ότι τα ρεύματα Ασβεστίου στα SACs δεν ανήκουν ούτε στην κατηγορία των L-type. Τα αποτελέσματα της BAY K8644 φαίνονται στην Εικόνα 15.



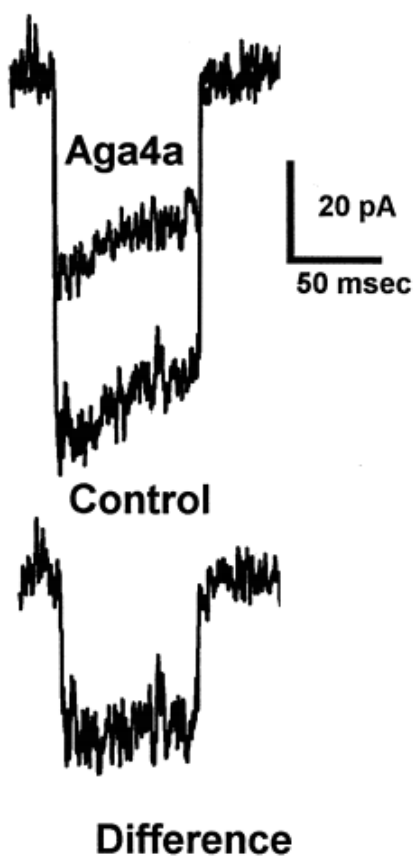
Εικόνα 15 : Ρεύματα Ασβεστίου στα SACs κατά την παρουσία της ουσίας BAY K8644 και κατά την απουσία της [15].

Κατόπιν, χρησιμοποιήθηκε η ουσία Ω-κονοτοξίνη G6A. Η ουσία αυτή μπλοκάρει επιλεκτικά μια άλλη κατηγορία καναλιών Ασβεστίου, αυτή των N-type. Υπό την παρουσία της Ω-κονοτοξίνης G6A το μεγαλύτερο κομμάτι των ρευμάτων Ασβεστίου συμπιέστηκε. Έτσι εξήχθη το συμπέρασμα ότι τα ρεύματα Ασβεστίου στα SACs οφείλονται κατά ένα μεγάλο μέρος σε κανάλια της N-type υποοικογένειας. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 16. Μάλιστα, η χρήση της συγκεκριμένης ουσίας αποδείχθηκε ότι είχε μη αναστρέψιμα αποτελέσματα, καθώς με την πάροδο του χρόνου μετά την εφαρμογή της, τα ρεύματα Ασβεστίου των κυττάρων δεν έφτασαν ξανά στο αρχικό τους επίπεδο, αλλά διατήρησαν τις χαμηλές τους τιμές. Παρ' όλα αυτά, όπως προαναφέραμε, η χρήση της Ω-κονοτοξίνης να μεν περιορίσει τα ρεύματα Ασβεστίου, αλλά δεν τα εξαφάνισε εντελώς. Για αυτό ο Cohen χρησιμοποίησε μια ακόμη ουσία, που μπλοκάρει επιλεκτικά μια άλλη κατηγορία καναλιών για να προσδιορίσει τον τύπο των εναπομειναντων ρευμάτων.



Εικόνα 16 : Ρεύματα Ασβεστίου στα SACs κατά την παρουσία της ουσίας Ω-κονοτοξίνη cG6A, κατά την απουσία της και η διαφορά τους [15].

Η ουσία αυτή ήταν η αγατοξίνη 4A, η οποία προέρχεται από το δηλητήριο ενός είδους αράχνης. Η ουσία αυτή μπλοκάρει επιλεκτικά τα κανάλια της κατηγορίας P/Q-type [27, 28, 29]. Τα αποτελέσματα της χρήσης της αγατοξίνης 4A παρουσιάζονται στην Εικόνα 17.



Εικόνα 17 : Ρεύματα Ασβεστίου στα SACs κατά την παρουσία της ουσίας αγατοξίνη-4A (Aga4A), κατά την απουσία της και η διαφορά τους [15].

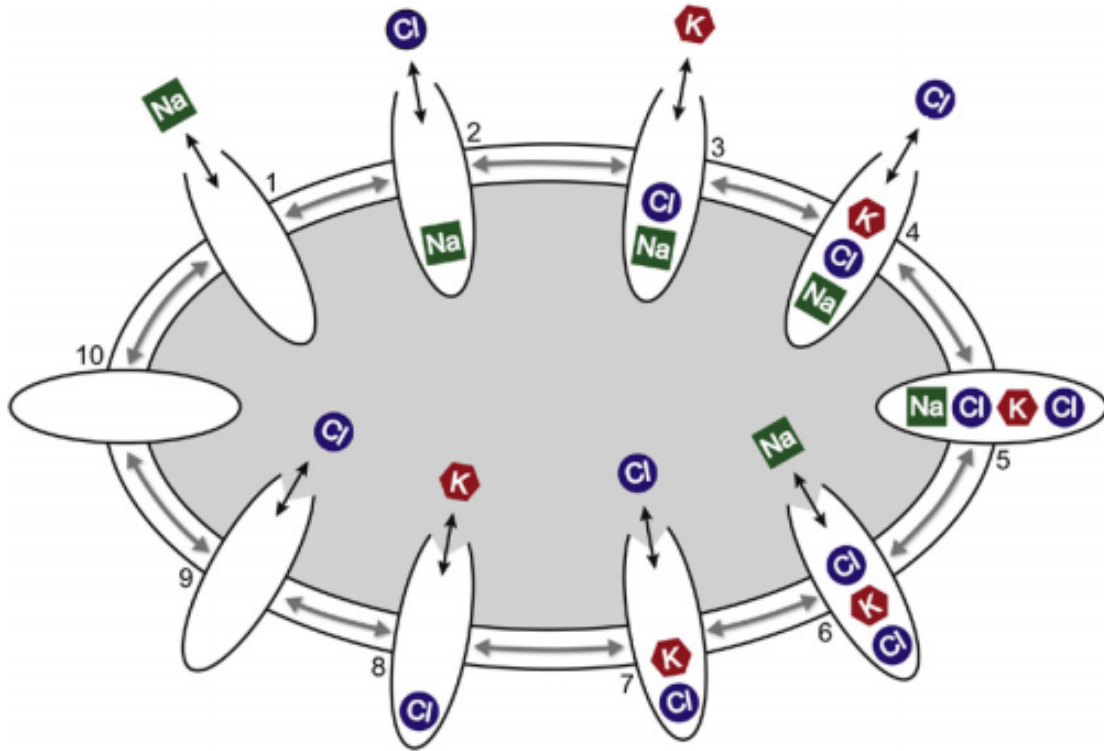
Με την παραπάνω μέθοδο ο Cohen κατηγοριοποίησε τα ρεύματα Ασβεστίου, που εμφανίζονται στα SACs και κατέληξε στα συμπεράσματα ότι οι δύο κύριες κατηγορίες ρευμάτων είναι τα N-type ή $Ca_v2.2$ και τα P/Q-type ή $Ca_v2.1$, όπως ονομάζονται από τα αντίστοιχα γονίδια, που κωδικοποιούν την έκφραση των συγκεκριμένων καναλιών.

Την χρησιμότητα και την κρισιμότητα των ρευμάτων Ασβεστίου τόνισαν ιδιαίτερα στη μελέτη τους [7] οι Euler et al. Στην έρευνά τους αυτή, έδειξαν ότι εμφανίζονται κατευθυντικά επιλεκτικά ρεύματα Ασβεστίου στους δενδρίτες των SACs, που δείχνουν προτίμηση στην φυγόκεντρο και όχι στην κεντρομόλο διεύθυνση κίνησης. Επιπλέον, σημείωσαν ότι οι συνολικές αποκρίσεις στο σώμα των κυττάρων δεν είναι κατευθυντικά επιλεκτικές, αλλά πρέπει να παρατηρηθεί ο κάθε δενδρίτης ξεχωριστά. Παρατηρώντας το σώμα των κυττάρων παρακολουθούμε την άθροιση των διαφορετικών κατευθυντικά επιλεκτικών σημάτων και συνεπώς την αλληλοακύρωσή τους. Στη μελέτη τους [1], οι Haussett et al εξέτασαν το κατά πόσον τα ιοντικά κανάλια Ασβεστίου, που εντοπίζονται στα μακρινά τμήματα των δενδριτών των SACs είναι ενεργά κοντά στο δυναμικό ισορροπίας. Τα ρεύματα Ασβεστίου, που παρατηρήθηκαν αποτελούν ενδείξεις τοπικής λειτουργίας των καναλιών. Αντίθετα οι μετρήσεις του δυναμικού στο σώμα των κυττάρων [15], που πραγματοποίησε ο Cohen, δεν εντοπίζουν το σημείο στο οποίο γίνεται η ενεργοποίηση των καναλιών. Έτσι, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η κατευθυντικά επιλεκτική απόκριση των SACs μέσω των ρευμάτων Ασβεστίου δεν δημιουργείται στο σώμα των κυττάρων αλλά σε τμήματα των απομακρυσμένων δενδριτών. Οι μετρήσεις τους έδειξαν ότι κατά την ανίχνευση κίνησης στην προτιμητέα φυγόκεντρο διεύθυνση, τα ρεύματα Ασβεστίου στα απομακρυσμένα τμήματα των δενδριτών και συγκεκριμένα στις κισότητες, που εμφανίζουν τα SACs, είχαν μεγάλες τιμές. Αντιθέτως, στην ανίχνευση κίνησης κατά την μη προτιμητέα κεντρομόλο διεύθυνση, τα ρεύματα, που μετρούνταν ήταν από πολύ μικρά έως μηδαμικά [1, 7, 16].

4.3.5 Ιοντικά Κανάλια Χλωρίου(Cl)

Σε αντίθεση με όσα αναφέραμε προηγουμένως για τα υπόλοιπα ιόντα, για το Χλώριο οι μελέτες που βρήκαμε και αφορούν την μετακίνησή του εκατέρωθεν της πλασματικής μεμβράνης, δεν εμπεριείχαν κάποια σαφή αναφορά σε κάποιο τύπο ιοντικού καναλιού, που διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο. Οι μηχανισμοί, που σύμφωνα με τα ευρήματα της επιστημονικής και ερευνητικής κοινότητας παίζουν τον βασικότερο ρόλο στην μετακίνηση των ιόντων Χλωρίου, είναι οι Μεταφορείς Ιόντων Χλωρίου (Cation Chloride Cotransporters, CCCs) [9, 10, 14]. Οι Cation Chloride Cotransporters είναι μεταφορείς ιόντων, που διαμεσολαβούν στην μεταφορά υποχρεωτικά συζευγμένων κατιόντων Νατρίου και Καλίου και ανιόντων Χλωρίου. Επειδή οι μεταφορές αυτές εμπλέκουν πάντα ίσο αριθμό θετικών και αρνητικών φορτίων, δεν συνεπάγονται καμία μεταβολή του συνολικού φορτίου εκατέρωθεν της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου. Αυτή ακριβώς η ηλεκτρικά ουδέτερη φύση των μεταφορέων αυτών δίνει τη δυνατότητα στους μηχανισμούς αυτούς να ελέγχουν ουσιώδεις ιδιότητες των κυττάρων, όπως ο όγκος και οι συγκεντρώσεις ιόντων, χωρίς να επηρεάζουν άμεσα την φυσιολογική ηλεκτρική δραστηριότητα του κυττάρου. Για αυτό και οι συγκεκριμένοι μηχανισμοί εμφανίζουν ιδιαίτερη χρησιμότητα σε διεγερσιμες κατηγορίες κυττάρων, όπως τα μυϊκά και τα νευρικά κύτταρα. Η οικογένεια των γονιδίων, που είναι υπεύθυνη για την έκφραση των συγκεκριμένων μηχανισμών λέγεται SLC12 και αποτελείται από τρεις ευρείες υποκατηγορίες. Αυτές είναι οι εξής : Ο συμμεταφορέας Νατρίου-Χλωρίου(NCC, ελεγχόμενος από το γονίδιο SLC12A3) , ο συμμεταφορέας Νατρίου-Καλίου-2 Χλωρίων(NKCC, ελεγχόμενος από τα γονίδια SLC12A1-2) και ο συμμεταφορέας Καλίου-Χλωρίου(KCC, ελεγχόμενος από τα γονίδια SLC12A4-7). Οι πρώτες μελέτες των μηχανισμών αυτών σε μεμονωμένα κύτταρα έδειξαν ότι οι μηχανισμοί NKCC και KCC είναι αντιστρόφως υπεύθυνοι για αλλαγές στον όγκο του κυττάρου και της συγκέντρωσης των ιόντων Χλωρίου στο εσωτερικό των κυττάρων. Ο μηχανισμός NKCC έχει βρεθεί πως ενεργοποιείται από την συρρίκνωση του όγκου του κυττάρου ή/και από από τη χαμηλή συγκέντρωση ιόντων Χλωρίου στο εσωτερικό του κυττάρου. Τα ακριβώς αντίθετα ισχύουν για τον μηχανισμό KCC. Οι μηχανισμοί αυτοί έχουν μνημειώδη σημασία στα νευρικά κύτταρα και στα καρδιακά μυϊκά κύτταρα, καθώς ελέγχουν τη συγκέντρωση των ιόντων Χλωρίου και συνακόλουθα υπαγορεύουν την κατεύθυνση και την ένταση

λειτουργίας των ιοντικών καναλιών Χλωρίου. Πιο συγκεκριμένα, στα νευρικά κύτταρα, το επίπεδο έκφρασης των μηχανισμών NKCC1 και KCC2 ορίζει το επίπεδο της συγκέντρωσης ιόντων Χλωρίου στα κύτταρα και συνεπώς την πολικότητα της απόκρισής (αποπόλωση ή υπερπόλωση) των τελευταίων, όταν διεγείρονται από τους υποδοχείς GABA ή γλυκίνης, που διαθέτουν [30].



Εικόνα 18 : Σχηματική απεικόνιση του συµμεταφορέα NKCC, όπως αυτός έχει παρατηρηθεί σε ένα ερυθροκύτταρο. [30].

Στην Εικόνα 18 παρουσιάζεται μια σχηματική απεικόνιση του συµμεταφορέα NKCC, όπως έχει παρατηρηθεί σε ένα ερυθροκύτταρο του αίματος. Απεικονίζεται η χαρακτηριστική λειτουργία του µηχανισµού σε στάδια. Αρχικά, συγκεντρώνονται τα ιόντα, που µεταφέρονται από τη µια πλευρά της µεµβράνης στην άλλη. Πρέπει να σηµειωθεί ότι το άθροισµα των φορτίων (2 θετικά φορτία, ένα Καλίου και ένα Νατρίου και 2 αρνητικά φορτία Χλωρίου) µεταφέρονται κάθε φορά. Ως αποτέλεσµα, το συνολικό µεταφερόµενο φορτίο δεν είναι ούτε θετικό ούτε αρνητικό, όπως αναφέραµε και προηγουµένως. Επίσης, πρέπει να σηµειώσουµε ότι για να πραγµατοποιηθεί η µεταφορά των ιόντων, πρέπει να συγκεντρωθούν και τα 4 φορτία. Μόνο τότε µεταφέρονται ακαριαία και απελευθερώνονται ξανά ένα προς ένα, όπως δεσµεύτηκαν [30].

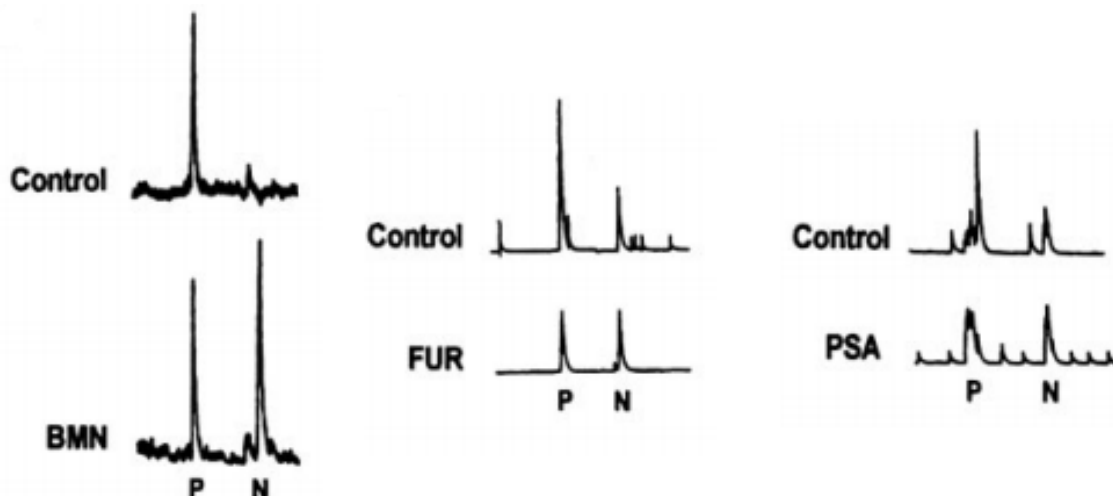
Η κρισιµότητα της ύπαρξης και της λειτουργίας των συµμεταφορέων στην κατευθυντική επιλεκτικότητα, που επιδεικνύουν τα SACs τονίστηκε από τους Gavrikov et al στις µελέτες τους [9, 10]. Οι ερευνητές στη µελέτη τους [9] ανέφεραν ότι οι κατευθυντικά επιλεκτικές αποκρίσεις των γαγγλιακών κυττάρων και των δενδριτών των SACs είναι πολύ ευαίσθητες στη διαφορά της συγκέντρωσης των ιόντων Χλωρίου στο εσωτερικό και το εξωτερικό των κυττάρων.

Αρχικά οι ερευνητές µπλόκαραν τη λειτουργία του συµμεταφορέα Καλίου-Χλωρίου, που εκφράζεται στα SACs. Για το µπλοκάρισμα του συγκεκριµένου συµμεταφορέα χρησιμοποίησαν την ουσία Bumetanide(BMN), η οποία σύµφωνα µε άλλες έρευνες [31] µπλοκάρει επιλεκτικά το συµμεταφορέα αυτό. Διεγείροντας το κύτταρο ξανά παρατήρησαν εξάλειψη της κατευθυντικής επιλεκτικότητας των

γαγγλιακών κυττάρων. Αυτό πραγματοποιήθηκε με αύξηση της απόκρισης των γαγγλιακών κυττάρων κατά την κίνηση στην μη-προτιμητέα κατεύθυνση.

Στη συνέχεια οι ερευνητές μπλόκαραν τη λειτουργία του έτερου εκφραζόμενου στα SACs συμμεταφορέα, του NKCC. Για να το πετύχουν αυτό, χρησιμοποίησαν την ουσία Furosemide(FUR), η οποία σε μικρές συγκεντρώσεις μπλοκάρει τη λειτουργία του εν λόγω συμμεταφορέα [30, 31]. Διεγείροντας ξανά τα κύτταρα παρατήρησαν και πάλι απώλεια της ικανότητας διάκρισης των κατευθύνσεων κίνησης. Αυτή τη φορά όμως η απώλεια της ικανότητας αυτής έγκειται στο γεγονός ότι μειώθηκε πολύ το πλάτος της απόκρισης κατά την ανίχνευση κίνησης στην προτιμητέα κατεύθυνση.

Τέλος, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν την ουσία Pentanesulfonic acid. Έτσι, κατάφεραν με αυτή την ουσία να μειώσουν την διαφορά των συγκεντρώσεων των ιόντων Χλωρίου στο εσωτερικό και το εξωτερικό των κυττάρων. Οι μετρήσεις, που πραγματοποίησαν, έδειξαν και πάλι απώλεια της ικανότητας ανίχνευσης της κατεύθυνσης κίνησης, μειώνοντας τις αποκρίσεις των κυττάρων κατά την ανίχνευση κίνησης στην προτιμητέα κατεύθυνση. Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής παρουσιάζονται αρκετά καθαρά στην Εικόνα 19.



Εικόνα 19 : Αποκρίσεις γαγγλιακών κυττάρων κατά την παρουσία Bumetanide, Furosemide, Pentanesulfonic Acid και κατά την απουσία τους. Παρατηρούμε την αυξημένη απόκριση των γαγγλιακών κυττάρων κατά την κίνηση στην μη προτιμητέα κατεύθυνση όταν υπήρχε στο διάλυμα η ουσία Bumetanide, που μπλοκάρει επιλεκτικά τη λειτουργία του KCC συμμεταφορέα. Παρατηρούμε την μειωμένη απόκριση των γαγγλιακών κυττάρων κατά την κίνηση στην προτιμητέα κατεύθυνση όταν υπήρχε στο διάλυμα η ουσία Furosemide, που μπλοκάρει επιλεκτικά τη λειτουργία του KCC συμμεταφορέα. Παρατηρούμε την μειωμένη απόκριση των γαγγλιακών κυττάρων κατά την κίνηση στην προτιμητέα κατεύθυνση όταν υπήρχε στο διάλυμα η ουσία Pentanesulfonic Acid, που αλλάζει το επίπεδο της διαφοράς των συγκεντρώσεων των ιόντων Χλωρίου εκατέρωθεν της κυτταρικής μεμβράνης. [9].

Σε επόμενη μελέτη τους [10], οι ερευνητές απέδειξαν ότι οι μορφές NKCC2 και KCC2 των συμμεταφορέων εκφράζονται στα SACs. Εν συνεχεία χρησιμοποίησαν χρωμοφόρα για να εντοπίσουν τα σημεία έκφρασης των συμμεταφορέων αυτών στους δενδρίτες των SACs. Τα αποτελέσματα της μελέτης τους έδειξαν ότι οι δύο συμμεταφορείς λειτουργούν σε αντιδιαστολή (ο ένας αυξάνει την εσωτερική συγκέντρωση του Χλωρίου και ο άλλος τη μειώνει) και είναι και οι δύο υψηλά λειτουργικοί στα SACs. Επίσης βρήκαν, ότι ο μηχανισμός NKCC2 εκφράζεται περισσότερο στα κοντινότερα τμήματα των δενδριτών ενώ ο μηχανισμός KCC2 εκφράζεται περισσότερο στα πιο απομακρυσμένα τμήματα. Τέλος, παρατήρησαν η ενεργοποίηση του υποδοχέα του GABA στα κοντινά τμήματα των δενδριτών παράγει μια αποπόλωση, που μεσολαβείται από το μηχανισμό NKCC2. Αντίθετα, η ενεργοποίηση του υποδοχέα

του GABA, παράγει μια υπερπόλωση, η οποία μεσολαβείται από τον μηχανισμό KCC2.

Έτσι, συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω, αναφέρουμε ότι οι κύριοι μηχανισμοί διακίνησης ιόντων Χλωρίου εκατέρωθεν της πλασματικής μεμβράνης των SACs είναι οι συμμεταφορείς NKCC2 και KCC2. Η λειτουργία τους δημιουργεί τις προϋποθέσεις για να άγουν τα ιοντικά κανάλια Χλωρίου. Η προσέγγιση της μετακίνησης των ιόντων Χλωρίου με ρεύματα εξειδικευμένων κατηγοριών δεν κρίθηκε απαραίτητη όπως με τα άλλα ιόντα και για αυτό δεν εξετάστηκε περαιτέρω.

4.4 Βιβλιογραφία

- [1] S. E. Hausselt, T. Euler, P. B. Detwiler and W. Denk, *A Dendrite-Autonomous Mechanism for Direction Selectivity in Retinal Starburst Amacrine Cells*, PLoS, Vol.5, Issue 5, ed.185, pp.1474-1493, 2014.
- [2] R. Poznanski, *Modeling the Electrotonic structure of Starburst Amacrine Cells in the rabbit retina : A functional interpretation of dendritic morphology*, Bulletin of Mathematical Biology, Vol.56, No.4, pp. 905-928, 1992.
- [3] J. J. Tucker, W. R. Taylor and R. G. Smith, *Direction Selectivity in a model of the Starburst Amacrine Cell*, Visual Neuroscience, Vol.21, pp. 611-625, 2004.
- [4] D. K. Merwine, N. M. Grzywacz, D. S. Tjepkes and F. R. Amthor, *Non-monotonic contrast behavior in directionally selective ganglion cells and evidence for its dependence on their GABAergic input*, Journal of Visual Neuroscience, Vol.15, pp. 1129-1136, 1998.
- [5] H. J. Wyatt and N. W. Daw, *Directionally sensitive ganglion cells in the rabbit retina : Specificity for stimulus direction, size and speed*, Journal of Neurophysiology, Vol.38, pp. 613-626, 1975.
- [6] W. Rall, *Theoretical significance of dendritic trees for neuronal input-output relations*, In : Reis RF, editor, Neural theory and modeling, Stanford(California), Stanford University Press, pp. 72-97 , 1964.
- [7] T. Euler, P. B. Detwiler and W. Denk, *Directionally selective calcium signals in dendrites of starburst amacrine cells*, Nature, 418, pp.845-852, 2002.
- [8] B. N. Peters and R. H. Masland, *Response to light of starburst amacrine cells*, Journal of Neurophysiology, Vol.75, pp. 469-480, 1996.
- [9] K. E. Gavrikov, A. V. Dmitriev, K. T. Keyser and S. C. Mangel, *Cation chloride cotransporters mediate neural computation in the retina*, Proc. of the National Academy of Science, USA, Vol.100, pp.16047-16052, 2003.
- [10] K. E. Gavrikov, J. E. Nilson A. V. Dmitriev, C. L. Zucker and S. C. Mangel, *Dendritic compartmentalization of chloride cotransporters underlies directional responses of starburst amacrine cells in retina*, Processings of the National Academy of Science, USA, Vol.103, pp.18793-18798, 2006.
- [11] *Ion Channel*, Wikipedia, the free encyclopedia
- [12] *Voltage Gated Ion Channel*, Wikipedia, the free encyclopedia
- [13] *Ligand Gated Ion Channel*, Wikipedia, the free encyclopedia
- [14] P. R. Poznanski, *Cellular inhibitory behavior underlying the formation of retinal direction selectivity in the starburst network*, Journal of Integrative Neuroscience, Vol.9, No.10, pp.299-335, 2010.

- [15] E. D. Cohen, *Voltage-gated calcium and sodium currents of starburst amacrine cells in the rabbit retina*, Journal of Visual Neuroscience, Vol.18, pp.799-809, 2001.
- [16] N. W. Oesch and W. R. Taylor, *Tetrodotoxin-Resistant Sodium Channels Contribute to Directional Responses in Starburst Amacrine Cells*, PLoS ONE, 5(8), 2010.
- [17] B. J. O' Brien, J. H. Caldwell, G. R. Ehring, K. M. Bumsted O' Brien, Sonjiang Luo and S. Rock Levinson, *Tetrodotoxin-Resistant Voltage-Gated Sodium Channels $Na_v1.8$ and $Na_v1.9$ Are Expressed in the Retina*, Journal of Comparative Neurology, Vol.508, pp.940-951, 2008.
- [18] M. Renganathan, T. R. Cummins, W. N. Hormuzdiar and S. G. Waxman, *Alpha-SNS produces the slow TTX-resistant sodium current in large cutaneous afferent DRG neurons*, Journal of Neurophysiology, Vol.84, pp.710-718, 2000.
- [19] T. R. Cummins, F. Aglieco, M. Renganathan, R. I. Herzog, S. D. Dib Hajj and S. G. Waxman, *$Na_v1.3$ sodium channels : rapid repriming and slow closed-state inactivation display quantitative differences after expression in a mammalian cell line and in spinal sensory neurons*, Journal of Neuroscience, Vol.21, pp.5952-5961, 2001.
- [20] A. Ozaita, J. Petit-Jacques, B. Volgyi, Chi Shun Ho, R. H. Joho, S. A. Bloomfield and B. Rudy, *A Unique Role for $Kv3$ Voltage-Gated Potassium Channels in Starburst Amacrine Signalling in Mouse Retina*, Journal of Neuroscience, 24(33), pp.7335-7343, 2004.
- [21] H. Moreno, C. Kentros, E. Bueno, M. Weiser, A. Hernandez, E. Vega Saenz de Miera, A. Ponce, W. Thornhill and B. Rudy, *Thalamocortical projections have a $K+$ that is phosphorylated and modulated by cAMP-dependent protein kinase*, Journal of Neuroscience, 15, pp.5486-5501, 1995.
- [22] M. Weiser, E. Bueno, C. Sekirnjak, M. E. Martone, H. Baker, D. Hillman, S. Chen, W. Thornhill, M. Ellisman and B. Rudy, *The potassium channel subunit $KV3.1b$ is localized to somatic and axonal membranes of specific populations of CNS neurons*, Journal of Neuroscience, 5, pp.4298-4314, 1995.
- [23] J. Du, L. Zhang, M. Weiser, B. Rudy and C. J. McBain, *Developmental expression and functional characterization of the potassium-channel $Kv3.1b$ in parvalbumin-containing interneurons of the rat hippocampus*, Journal of Neuroscience, 5, pp.4298-4314, 1995.
- [24] C. Sekirnjak, M. E. Martone, M. Weiser, T. Deerinck, E. Bueno, B. Rudy and M. Ellisman, *Subcellular localization of the $K+$ channel subunit $Kv3.1b$ in selected rat CNS neurons*, Brain Res, 766, pp.173-187, 1997.
- [25] A. Chow, A. Erisir, C. Farb, M. S. Nadal, A. Ozaita, D. Lau, E. Welker and B. Rudy, *$K+$ channel expression distinguishes subpopulations of parvalbumin and somatostatin-containing neocortical interneurons*, Journal of Neuroscience, 19, pp.9332-9345, 1999.
- [26] R. F. Miller and S. A. Bloomfield, *Electroanatomy of a unique amacrine cell in the rabbit retina*, Proceedings of the National Academy of Science, USA, Vol.80, pp.3069-3073, 1983.
- [27] M. Usowicz, M. Sugimori, B. Cherksey and R. Llinas, *P-type calcium channels in the somata and dendrites of adult cerebellar Purkinje cells*, Neuron Journal, Vol.9, pp.1185-1199, 1992.
- [28] J. Zhang, A. Randall, P. Ellinor, W. Horne, W. Sather, W. Tanabe, T. Schwarz and R. Tsien, *Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca^{2+} channels and their possible counterparts in the mammalian CNS neurons*, Neuropharmacology, Vol.32, pp.1075-1088, 1993.
- [29] B. M. Olivera, G. P. Miljanich, J. Ramachandran and M. E. Adams, *Calcium channel diversity and neurotransmitter release : The omega-conotoxins and omega-agatoxins*, Annual Review of Biochemistry, Vol.63, pp.823-867, 1994.

- [30] J. A. Payne, Chapter 6 : Molecular Operation of the Cation Chloride Cotransporters: Ion Binding and Inhibitor Interaction, Co-transport systems, Current Topics in Membranes, Vol.70, pp.215-237, 2012
- [31] J. M. Russell, Sodium-Potassium-Chloride cotransport, Physiological Reviews, Vol. 80, no.1, pp. 211-276, 2000

Κεφάλαιο 5^ο : Ανάπτυξη Μοντέλου Βραχύνων κυττάρων (SACs)

5.1 Εισαγωγή - Στόχοι

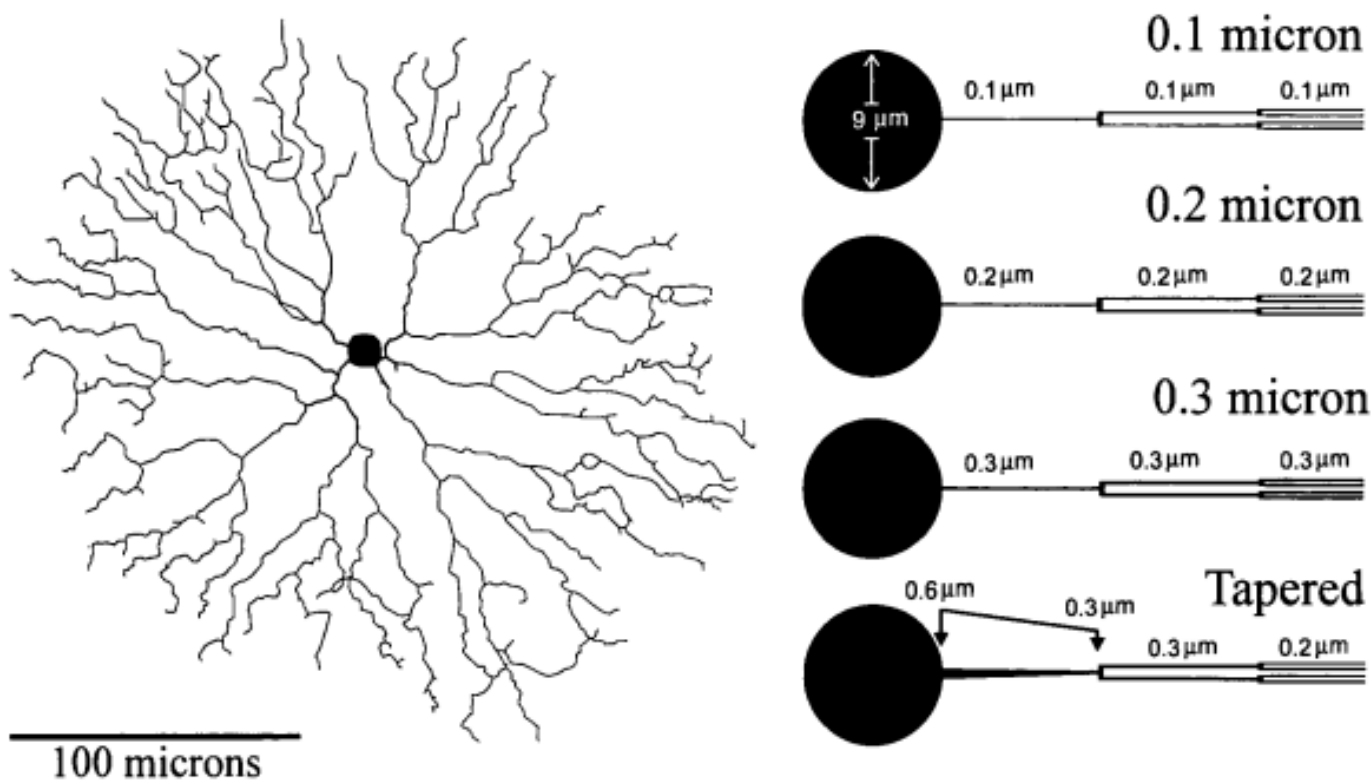
Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των προσπαθειών, που έχουν γίνει έως τώρα για την επιτυχή μοντελοποίηση των βραχύνων κυττάρων του αμφιβληστροειδούς και συγκεκριμένα των SACs. Τα στοιχεία, που έχουν αναλυθεί σε προηγούμενα κεφάλαια, για την γεωμετρική δομή και την βιοφυσική των συγκεκριμένων κυττάρων χρησιμοποιούνται σε αυτό το κεφάλαιο για την ανάπτυξη ενός πλήρους μοντέλου, που θα ανταποκρίνεται κατά το δυνατόν περισσότερο στην πραγματικότητα. Αρχικά, περιγράφονται δύο παλαιότερες προσπάθειες ερευνητών και στη συνέχεια παρουσιάζονται τα στοιχεία, με τα οποία αναπτύχθηκε το μοντέλο, επισημαίνεται η ικανότητά του να συμμορφώνεται με πειραματικές παρατηρήσεις αλλά και με τα υπόλοιπα μοντέλα και τονίζονται οι αστοχίες και οι αιτίες τους αλλά και τα επιτυχή αποτελέσματά του. Όλη η γνώση για τα SACs, που παρουσιάστηκε εκτενώς στα προηγούμενα κεφάλαια θα αναφερθεί ξανά όπου χρειάζεται και οι παραπομπές σε πληροφορίες των κεφαλαίων αυτών θα είναι συχνές, ώστε οι επιλογές των χαρακτηριστικών του μοντέλου να είναι όσο το δυνατόν πιο εμπειρισταωμένες με βάση πειραματικά αποτελέσματα. Οι λόγοι για τους οποίους επιχειρείται η μοντελοποίηση των κυττάρων της κατηγορίας αυτής είναι πολλοί και διαφορετικοί. Γενικά, η προσπάθεια για τη δημιουργία μοντέλων, που ανταποκρίνονται στην πραγματικότητα είναι μόνιμη, ώστε να υπάρχουν δυνατότητες για πειραματισμό με χαμηλό κόστος και χωρίς τις ποικίλες δυσκολίες του εργαστηριακού πειραματισμού. Εκτός από αυτό τον γενικότερο λόγο, υπάρχει και ένας πολύ βασικότερος, που οδηγεί στη δημιουργία μοντέλου για τα SACs. Αυτός δεν είναι άλλος από την σχετικά καινούρια εφαρμογή της Προσθετικής Αμφιβληστροειδούς, με σκοπό την αποκατάσταση της όρασης σε ανθρώπους, που την έχουν χάσει. Στόχος του συγκεκριμένου Κεφαλαίου είναι η παρουσίαση των προσπαθειών μοντελοποίησης των κυττάρων, η επισήμανση των ιδιαιτεροτήτων του καθενός αλλά και των επιτυχιών και των αστοχιών του.

5.2 Μοντέλα Βραχύνων Κυττάρων (SACs)

Η διαδικασία της μοντελοποίησης είναι ένα δύσκολο εγχείρημα, ειδικά από τη στιγμή, που αυτός που προσπαθεί να φτιάξει ένα μοντέλο δεν έχει έρθει σε επαφή με πειραματικά αποτελέσματα και δεν ξέρει ακριβώς τη διαδικασία συλλογής τους. Παρ' όλα αυτά, ένα μοντέλο ενός κυττάρου συνήθως θεωρείται επιτυχημένο όταν διεγερόμενο όπως ένα πραγματικό κύτταρο της εν λόγω κατηγορίας, παράγει απόκριση, που προσομοιάζει αυτήν, που καταγράφηκε από το πραγματικό κύτταρο. Το τι θα περιληφθεί στο εκάστοτε μοντέλο και πότε αυτό θα θεωρηθεί πλήρες είναι πάντα ένα πολύ καιρικό ερώτημα στη διαδικασία της μοντελοποίησης. Όπως είπε χαρακτηριστικά ο Andrey V. Dmitriev σε προσωπική επικοινωνία μαζί του, ένα μοντέλο δεν θεωρείται πλήρες όταν δεν υπάρχει η δυνατότητα να προστεθεί τίποτα παραπάνω. Θεωρείται πλήρες όταν αφαιρώντας του οποιοδήποτε από τα στοιχεία του, χάνει την ικανότητα να δίνει αποτελέσματα, που ανταποκρίνονται στην πραγματικότητα. Εδώ, θα περιγραφούν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις της μοντελοποίησης των SACs. Σημειώνεται ότι οι προσπάθειες αυτές δεν είναι οι πιο πρόσφατες και ίσως να μην έδωσαν τα ορθότερα αποτελέσματα σε σχέση με άλλες, αλλά αποτελούν προσπάθειες στις οποίες βασίστηκε καθ' όλη τη διάρκεια της η μελέτη μας, έχουν σαφώς ορισμένα τα στάδια της μοντελοποίησης και έχουν λογική συνοχή, η οποία υιοθετήθηκε και στην δική μας απόπειρα. Το πρώτο μοντέλο ανήκει στους Velte-Miller [1] και το δεύτερο στους Dmitriev et al [2].

5.2.1 Μοντέλο με έμφαση στις Γεωμετρικές Λεπτομέρειες και τα Ιοντικά Κανάλια (Velte-Miller)

Οι Velte-Miller χρησιμοποίησαν ένα πλήρες πρόγραμμα προσομοίωσης όπως το NEURON [3] για να φτιάξουν το μοντέλο τους. Στο πρόγραμμα αυτό, λαμβάνονται υπόψιν και οι γεωμετρικές και οι ηλεκτρικές αλλά και οι βιοφυσικές ιδιότητες των προσομοιωμένων κυττάρων. Χρησιμοποίησαν τιμές, που έχουν προκύψει από πειραματικές διαδικασίες για όλα αυτά τα χαρακτηριστικά. Έτσι, έφτιαξαν μια ομάδα από μοντέλα με ποικιλία χαρακτηριστικών όπως η αντίσταση της μεμβράνης, οι διαστάσεις των κυττάρων, οι διαμέτροι των δενδριτών και οι μορφολογίες τους και μελέτησαν το πώς επηρεάζεται η λειτουργία των κυττάρων με τις διακυμάνσεις των χαρακτηριστικών αυτών. Επειδή η προσέγγισή τους έγινε πριν από αρκετά χρόνια, πριν την αποδοχή της μελέτης των Zhou-Fain [4] για την αλλαγή της φύσης των SACs από παλμικής απόκρισης σε βαθμιδωτής απόκρισης ανάλογα με την ηλικία και της άποψης ότι η απόκριση των κυττάρων αυτών είναι βαθμιδωτή, τα μοντέλα τους έδωσαν μοιρασμένα αποτελέσματα. Μια πρώτη εικόνα των μοντέλων τους φαίνεται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1 : Αριστερά φαίνεται η ανακατασκευασμένη εικόνα ενός SAC, από την επισημασμένη με χρωμοφόρο φωτογραφία του από μικροσκόπιο. Δεξιά φαίνονται σχηματικές απεικονίσεις των γεωμετρικών χαρακτηριστικών των μοντέλων, που υλοποίησαν οι Velte-Miller.[1].

Όπως φαίνεται ξεκάθαρα και στην Εικόνα 1, οι Velte-Miller χρησιμοποίησαν τέσσερις διαφορετικές γεωμετρίες για τα μοντέλα τους. Οι τρεις από αυτές είχαν σταθερή διάμετρο δενδριτών και διαφορετική κάθε φορά (0,1μm, 0,2μm και 0,3μm), ενώ στην τέταρτη η διάμετρος άλλαζε. Συγκεκριμένα, έχοντας χωρίσει τους δενδρίτες του κυττάρου σε περιοχές κοντινών, ενδιάμεσων και μακρινών τμημάτων, χρησιμοποίησαν διάμετρο 0,3μm για τα ενδιάμεσα και 0,2μm για τα απομακρυσμένα. Για τα κοντινά

τμήματα χρησιμοποιήσαν μειούμενη διάμετρο όσο απομακρυνόμαστε από το σώμα, που ξεκινούσε από 0,6μm και κατέληγε σε 0,3μm στην ένωση με τα ενδιάμεσα τμήματα. Η διάμετρος του σφαιρικού σώματος, που επιλέχθηκε σε όλες τις περιπτώσεις ήταν 9μm. Έχοντας παρουσιάσει τα χαρακτηριστικά του κάθε δενδρίτη, σημειώνουμε τώρα ότι υλοποίησαν το κύτταρο με μορφολογία και αριθμό δενδριτών, που προέκυψαν από την μετατροπή της εικόνας ενός πραγματικού SAC σε μοντέλο, μέσω μιας ειδικής λειτουργίας του προγράμματος NEURON.

Επιπλέον, οι Velte-Miller χρησιμοποίησαν και ποικίλες τιμές ηλεκτρικών στοιχείων για τα μοντέλα, που υλοποίησαν. Συγκεκριμένα, η τιμή της αντίστασης του κυτταροπλάσματος ήταν σε όλα τα μοντέλα σταθερή και ίση με 70 Ωcm, όπως σταθερή ήταν και η τιμή της χωρητικότητας της πλασματικής μεμβράνης στην τιμή 1μF/cm². Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν όμως διάφορες τιμές για την αντίσταση της πλασματικής μεμβράνης, καθώς εκεί τα ερευνητικά ευρήματα δεν ήταν τόσο ξεκάθαρα. Χρησιμοποίησαν τιμές αντιστάσεων ίσες με 4, 25, 50 και 100 kΩ/cm². Παλιότερες μελέτες για την τιμή της αντίστασης της κυτταρικής μεμβράνης, που είχαν πραγματοποιηθεί με ενδοκυτταρικά ηλεκτρόδια, την είχαν προσδιορίσει στα 4kΩ/cm² σε κουνέλια [5] και 5kΩ/cm² σε σαλαμάνδρες του είδους mudpuppy [6, 7]. Για αυτό και η μικρότερη τιμή, που επιλέχθηκε στη μελέτη ήταν τα 4kΩ/cm². Νεότερες μελέτες έδειξαν, ότι η αντίσταση της πλασματικής μεμβράνης μπορεί να έχει πολύ μεγαλύτερες τιμές [8, 9]. Στα κατώτερα σπονδυλωτά έχει μετρηθεί να φτάνει έως και τα 100kΩ/cm² [6, 7].

Όσον αφορά το βιοφυσικό κομμάτι των μοντέλων, και εκεί οι Velte-Miller έκαναν αρκετές διαφορετικές δοκιμές. Αρχικά, βασίστηκαν στην έρευνα των Fohlmeister et al για τα ιοντικά κανάλια και τα αντίστοιχα ρεύματα, που συναντώνται στα γαγγλιακά κύτταρα [10, 11]. Τα ρεύματα, που παρατηρήθηκαν εκεί, μοντελοποιήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν και σε αυτή τη μελέτη. Συγκεκριμένα, συνυπολόγισαν την ύπαρξη 5 ενεργών ιοντικών καναλιών : ένα Νατρίου, ένα Καλίου, ένα Ασβεστίου, ένα Ανιόντων (απενεργοποιητικό ρεύμα Καλίου) και ένα κανάλι Καλίου εξαρτώμενο και από τάση αλλά και από τη συγκέντρωση του Ασβεστίου. Σε άλλα μοντέλα τους δεν χρησιμοποίησαν κανένα από τα ιοντικά κανάλια και σε άλλα όλα τα παραπάνω. Τα μειονεκτήματα των παθητικών μοντέλων χωρίς ενεργά κανάλια αποδείχθηκαν από τους Hausselt et al και τα παρουσιάσαμε εκτενώς, μαζί με το σχεπτικό υπέρ της εγκατάλειψής τους [12] σε προηγούμενο κεφάλαιο(4).

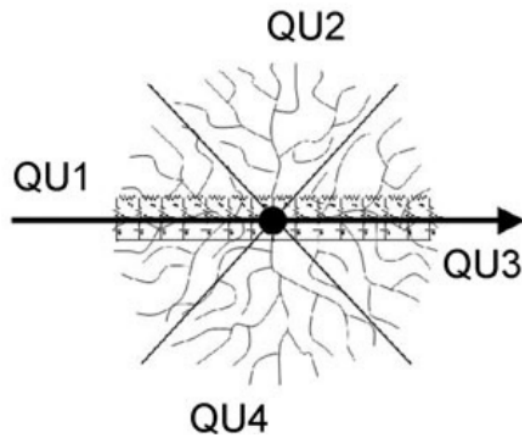
Οι διαφοροποιήσεις, που σημειώνονται σε σχέση με τη συγκεκριμένη προσέγγιση εντοπίζονται σε δύο σημεία. Πρώτον, συλλέγοντας δεδομένα από πολλαπλές μελέτες επιλέχθηκαν συγκεκριμένες τιμές ηλεκτρικών (όπως η αντίσταση της πλασματικής μεμβράνης) αλλά και βιολογικών χαρακτηριστικών (όπως τα μήκη και οι διαμέτροι των δενδριτών). Δεύτερον και πιο βασικό, με βάση τα όσα παρουσιάσαμε στο Κεφάλαιο 4, περί ιοντικών καναλιών, που εκφράζονται στα SACs, χρησιμοποίησαμε μοντέλα ρευμάτων, που έχουν εντοπιστεί σε αυτά τα κύτταρα και όχι στα γαγγλιακά.

5.2.2 Μοντέλο με Έμφαση στις συνάψεις, τα Ιοντικά

Κανάλια και την Κατευθυντική Επιλεκτικότητα

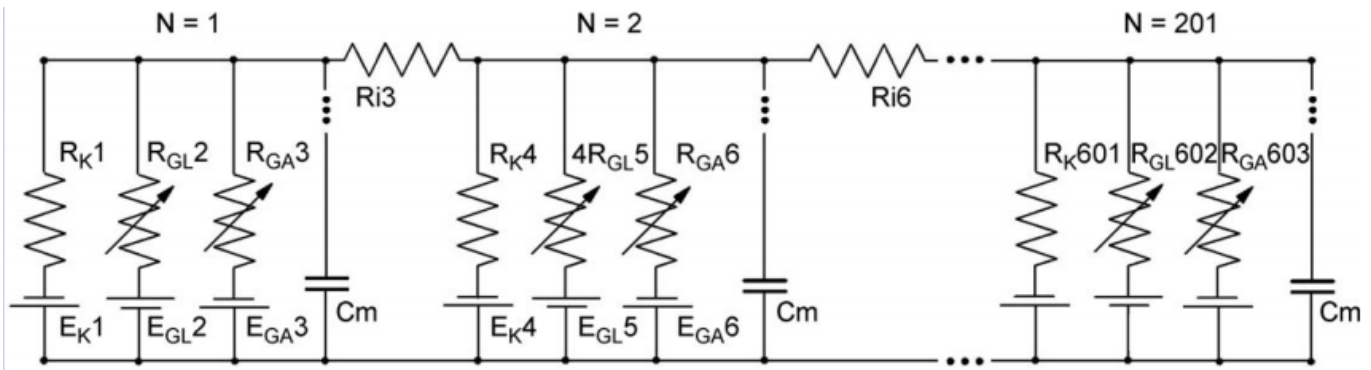
(Dmitriev et al)

Η προσέγγιση των Dmitriev et al για την μοντελοποίηση των SACs και της βασικής τους ιδιότητας, που είναι η κατευθυντική επιλεκτικότητα βασίστηκε σε ένα τελείως διαφορετικό τύπο μοντέλων. Οι Dmitriev et al δεν χρησιμοποίησαν κάποιο πρόγραμμα προσομοιώσεων υψηλού επιπέδου, όπως το NEURON. Το μοντέλο τους στηρίχθηκε σε ηλεκτρονικά στοιχεία χαμηλού επιπέδου (αντιστάσεις, χωρητικότητες, πηγές τάσης κλπ). Η γεωμετρία και η εξειδικευμένη μορφολογία του κυττάρου δεν έπαιξε τόσο σημαντικό ρόλο όσο στο μοντέλο των Velte-Miller, οι οποίοι ανακατασκεύασαν τη μορφολογία του κυττάρου από πραγματική εικόνα ρεαλιστικού κυττάρου σε μικροσκόπιο. Η προσέγγιση των Dmitriev et al παρουσιάζεται σχηματικά στην Εικόνα 2.



Εικόνα 2 : Σχηματική απεικόνιση του μοντέλου των Dmitriev et al. Παρουσιάζονται οι 6 δενδρίτες και επισημαίνονται τα 4 διαφορετικά τεταρτημόρια γύρω από το κύτταρο [2].

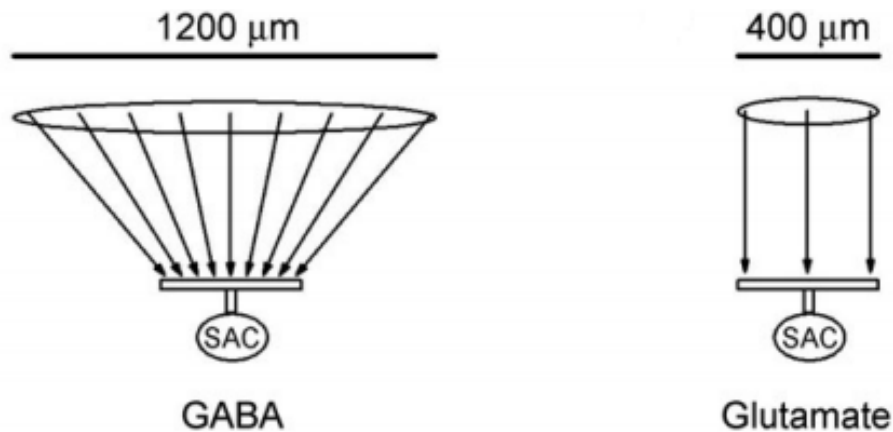
Το μοντέλο, που δείξαμε στην Εικόνα 2 αποτελείται από το σώμα του κυττάρου και 6 δενδρίτες, που ξεκινούν από αυτό και απομακρύνονται. Δεν μοντελοποιείται η διακλάδωση ως περιττή πολυπλοκότητα. Τους δύο δενδρίτες, που βρίσκονται εκατέρωθεν του σώματος μαζί με το σώμα του κυττάρου, οι Dmitriev et al τους μοντελοποίησαν ως ενιαίο κομμάτι. Το ηλεκτρονικό μοντέλο, που χρησιμοποίησαν, παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.



Εικόνα 3 : Κυκλωματικό διάγραμμα του μοντέλου των Dmitriev et al για την περιγραφή των δενδριτών του κυττάρου. [2].

Στο παραπάνω κυκλωματικό διάγραμμα παρουσιάζονται ως αντιστάσεις οι αγωγιμότητες 3 καναλιών και ως πηγές τάσης τα αντίστροφα δυναμικά των αντίστοιχων ιόντων. Τα κανάλια αυτά είναι το ιοντικό κανάλι Καλίου, του οποίου η αγωγιμότητα δεν μεταβάλλεται και τα ιοντικά κανάλια, που ενεργοποιούνται από το γ-αμινοβουτυρικό οξύ και το γλουταμινικό οξύ. Οι αγωγιμότητες των καναλιών αυτών αλλάζουν για να μοντελοποιηθεί η διάνοση των αντίστοιχων καναλιών όταν προσδεδεί στον υποδοχέα ο νευροδιαβιβαστής. Επίσης παρουσιάζεται η χωρητικότητα της πλασματικής μεμβράνης και η αντίσταση, που φαίνεται οριζόντια και χρησιμοποιείται για τη μοντελοποίηση της αντίστασης του κυτταροπλάσματος. Η αρίθμηση, που φαίνεται στο κυκλωματικό διάγραμμα υποδεικνύει την τμηματοποίηση του δενδρίτη, η οποία εδώ πρέπει να γίνει χειροκίνητα, σε αντίθεση με το μοντέλο των Velte-Miller, όπου αυτή τη διαδικασία είχε αναλάβει εξ ολοκλήρου το NEURON [13]. Όπως φαίνεται, έχουν επιλεγεί να χρησιμοποιηθούν 201 τμήματα. Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν έχουν χρησιμοποιηθεί αντιστάσεις κυτ-

ταροπλάσματος μεταξύ των καναλιών του ίδιου τμήματος, ώστε η τάση σε κάθε τμήμα να είναι σταθερή. Με ορισμένους απλούς τύπους, που εκμεταλλεύονται το μοτίβο, υπολογίζεται η συνολική αντίσταση αριστερά και δεξιά από κάθε στοιχείο και έτσι η τάση σε κάθε κόμβο καταλήγει να υπολογίζεται με απλή εφαρμογή της Αρχής της Επαλληλίας. Για τον παραπάνω λόγο, το κύκλωμα αυτό δεν υλοποιήθηκε από τους δημιουργούς σε κάποιο λογισμικό προσομοίωσης κυκλωμάτων, αλλά οι μαθηματικές σχέσεις υπολογισμού της τάσης, που προέκυψαν από την Αρχή της Επαλληλίας περάστηκαν σε ένα πρόγραμμα σε Γλώσσα προγραμματισμού (C++) και από το πρόγραμμα αυτό ελήφθησαν όλα τα αποτελέσματα. Αξίζει να σημειωθεί ότι το συγκεκριμένο μοντέλο έχει μια επιπλέον ιδιαιτερότητα σε σχέση με άλλα. Χρησιμοποιώντας την παρατηρημένη και στο παρελθόν [14] αλληλεπίδραση μεταξύ γειτονικών SACs, οι ερευνητές υλοποίησαν στο μοντέλο το πεδίο λήψης των SACs ως προς το γ-αμινοβουτυρικό οξύ να είναι τριπλάσιο από το αντίστοιχο για το γλουταμινικό. Δηλαδή, τα SACs λαμβάνουν κατασταλτική είσοδο όταν διεγείρεται το οπτικό πεδίο σε τριπλάσια απόσταση από το σώμα τους σε σχέση με την απόσταση στην οποία λαμβάνουν διεγερτική είσοδο. Αυτό παρουσιάζεται ευκρινώς στην Εικόνα 4.



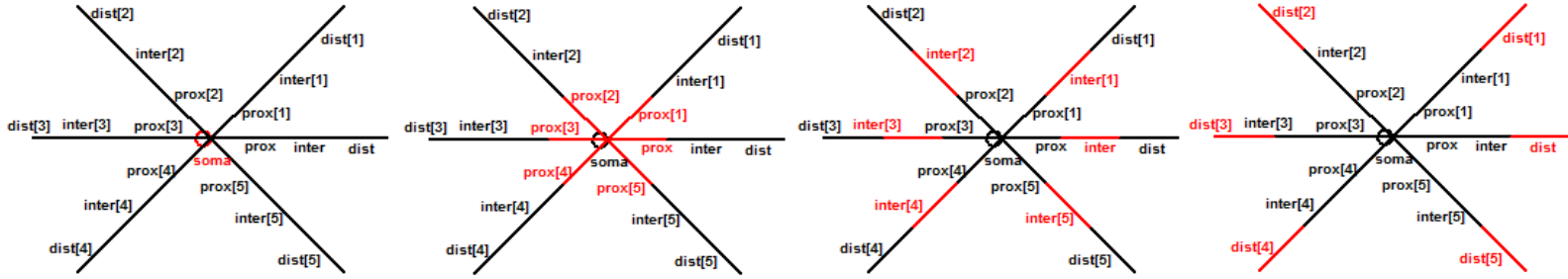
Εικόνα 4 : Πεδία λήψης κατασταλτικής και διεγερτικής εισόδου στα SACs. όπως μοντελοποιήθηκε στη μελέτη των Dmitriev et al [2].

5.2.3 Ανάπτυξη Μοντέλου

Στο σημείο αυτό, περιγράφεται το μοντέλο, που αναπτύχθηκε. Πιο αναλυτικά, περιγράφονται τα χαρακτηριστικά του μοντέλου, τα οποία συμπεριλήφθησαν, καθώς και οι λόγοι για τους οποίους επιλέχτηκαν. Τονίζεται εξ αρχής ότι το μοντέλο υλοποιήθηκε στο πρόγραμμα προσομοιώσεων NEURON [3, 13]. Η διαδικασία υλοποίησης μοντέλων στη συγκεκριμένη πλατφόρμα ακολουθεί μια συγκεκριμένη αλληλουχία ενεργειών, οι οποίες θα ακολουθηθούν και εδώ κατά την παρουσίαση του μοντέλου.

5.2.3.1 Γεωμετρικά Χαρακτηριστικά

Στο Κεφάλαιο 2 αναφερθήκαμε στις τρεις ομόκεντρες δακτυλιοειδείς περιοχές, που ανάλογα με την απόστασή τους από το σώμα του κυττάρου χαρακτηρίζονται ως κοντινή (proximal), ενδιάμεση (intermediate) και απομακρυσμένη (distal) [15, 16]. Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω υλοποιήθηκε ένα μοντέλο, που είχε διακριτά τμήματα δενδριτών ανάλογα με το σημείο του δενδρίτη. Το μοντέλο παρουσιάζεται στην Εικόνα 5.



Εικόνα 5 : Δομή του μοντέλου, που αποτελείται από τις τρεις ομόκεντρες περιοχές δένδριτών. Παρουσιάζονται από δεξιά προς τα αριστερά, το σώμα του κυττάρου, η κοντινή περιοχή δένδριτών, η ενδιάμεση και η απομακρυσμένη.

Θα περιγραφεί τώρα ξεχωριστά η κάθε δακτυλιοειδή περιοχή των δένδριτών και στα γεωμετρικά χαρακτηριστικά, τα οποία επιλέχτηκαν.

- Η κοντινή περιοχή περιλαμβάνει 4-5 δένδριτες με σχετικά μικρές διαμέτρους της τάξης των 0,6-0,7 μm , που εκκινούν από το σώμα και μετά από μια σταδιακή λέπτυνση για περίπου 30 μm φτάνουν στην ενδιάμεση ζώνη, όπου διακλαδίζονται εκ νέου [1, 17, 18]. Για τους λόγους αυτούς επιλέχθηκε να δημιουργηθούν έξι δένδριτες, με μήκος 20 μm και διάμετρο 0,6 μm . Γενικά, θα ήταν δυνατό να επιλεγούν και 4 ή 5 δένδριτες, όπως έχουν συχνά παρατηρηθεί. Ο λόγος, που σχεδιάστηκαν 6 δένδριτες ήταν για να προσεγγισθεί η κυκλική συμμετρική μορφή των SACs. Επίσης δεν μοντελοποιήθηκε η σταδιακή λέπτυνση των δένδριτών της κοντινής περιοχής μέχρι την ενδιάμεση ζώνη.
- Η ενδιάμεση περιοχή χαρακτηρίζεται από μια απότομη λέπτυνση των δένδριτών. Η διάμετρός τους μπορεί να φτάσει ακόμα και κάτω από τα 0,1 μm [15, 16]. Επίσης, οι δένδριτες αυτής της περιοχής αποτελούν το μεγαλύτερο τμήμα του συνολικού δένδριτη, με μήκος, που φτάνει ακόμα και στα 90 μm [1, 17, 18]. Για τους λόγους αυτούς, σχεδιάστηκαν δένδριτες, με μήκος 90 μm και διάμετρο 0,3 μm .
- Η απομακρυσμένη περιοχή χαρακτηρίζεται από δένδριτες με διάμετρο και πάλι σχετικά μικρή, αλλά μεγαλύτερη από ότι στο ενδιάμεσο τμήμα. Οι δένδριτες στην περιοχή αυτή εμφανίζουν ορισμένες κισρότητες, κάποιες κύστες δηλαδή, που έχουν ακόμα μεγαλύτερη διάμετρο από τους δένδριτες. Το μήκος των δένδριτών στην περιοχή αυτή είναι 25-35 μm και η διάμετρος κυμαίνεται περίπου στα 0,4-0,5 μm . Έτσι, επιλέξαμε δένδριτες με μήκος 30 μm και διάμετρο 0,5 μm . Η τιμή του μήκους επιλέχθηκε, ώστε το συνολικό μήκος του κυττάρου να είναι περίπου στα 300 μm .

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 5, κάθε δένδριτης αποτελείται από 3 διαφορετικά τμήματα, το κοντινό, το ενδιάμεσο και το απομακρυσμένο. Όλα τα αντίστοιχα τμήματα των έξι δένδριτών συναποτελούν τις τρεις ομόκεντρες περιοχές-ζώνες. Οι δένδριτες των περιοχών αυτών έχουν σε κάθε κατηγορία κοινές διαστάσεις και βιοφυσικά χαρακτηριστικά. Τα βιοφυσικά χαρακτηριστικά είναι το επόμενο θέμα, που θα θιχτεί.

5.2.3.2 Βιοφυσικά Χαρακτηριστικά

Το πιο ουσιώδες τμήμα του μοντέλου είναι τα ιδιαίτερα βιοφυσικά χαρακτηριστικά των SACs, που έχουν παρατηρηθεί σε μελέτες και έγινε προσπάθεια να ενταχθούν στην προσομοιωτική μελέτη. Στο Κεφάλαιο 4 περιγράφησαν εκτενώς τα διάφορα είδη ιοντικών καναλιών, που έχουν ανιχνευθεί στα SACs και στο σημείο αυτό ήρθε η ώρα να αξιοποιηθούν εκείνες οι γνώσεις, για να κατασκευαστεί ένα μοντέλο,

που θα ανταποκρίνεται κατά το δυνατόν περισσότερο στην πραγματικότητα. Η αναφορά στα ιδιαίτερα φυσιολογικά χαρακτηριστικά θα γίνει σταδιακά για κάθε ζώνη δενδριτών, ξεκινώντας όμως από τα χαρακτηριστικά, που αφορούν ολόκληρη την έκταση του κυττάρου και κατόπιν στα εξειδικευμένα χαρακτηριστικά της κάθε ζώνης. Τα κυτταρικά μοντέλα, που κατασκευάζονται στο πρόγραμμα προσομοίωσης NEURON ανάγονται σε ηλεκτρονικά μοντέλα με τα αντίστοιχα στοιχεία (αντιστάσεις, πυκνωτές, πηγές τάσης κλπ). Έπειτα, χρησιμοποιούνται μέθοδοι επίλυσης των ηλεκτρικών κυκλωμάτων καθώς και μαθηματικές μέθοδοι για την επίλυση των διαφορικών εξισώσεων, που περιγράφουν την διάδοση των δυναμικών σε δενδρίτες νευρώνων [19]. Για το λόγο αυτό, το μοντέλο θα οριστεί σε όρους στοιχείων ηλεκτρικών κυκλωμάτων.

- Βιοφυσικά Χαρακτηριστικά Ολόκληρου του κυττάρου :** Το πιο βασικό κοινό χαρακτηριστικό όλων των τμημάτων του κυττάρου είναι η αντίσταση κυτταροπλάσματος. Η τιμή της αντίστασης αυτής σε διάφορες αντίστοιχες μελέτες μοντελοποίησης κυμαίνεται σε τιμές 70-200 Ω [1, 5]. Έτσι, έγινε η επιλογή της τιμής στα 100 Ω ως αντιπροσωπευτική. Το πρώτο ηλεκτρονικό στοιχείο, που είναι απαραίτητο για να περιγραφεί ικανοποιητικά η πλασματική μεμβράνη του κυττάρου είναι η αντίστασή της. Οι τιμές της αντίστασης της κυτταρικής μεμβράνης (ή αντίστροφα της α-γωγιμότητάς της), που έχουν μετρηθεί ποικίλουν από είδος σε είδος. Οι Velte-Miller στη μελέτη τους [1] αναφέρουν ότι η αντίσταση της μεμβράνης σε λαγούς είναι της τάξης των $4k\Omega cm^2$, σε σαύρες του είδους *muirpurpy* είναι της τάξης των $5k\Omega cm^2$ ενώ σε κατώτερα σπονδυλωτά έχει υπολογιστεί ακόμα και πάνω από $100k\Omega cm^2$. Για αυτό η τιμή, που προκρίθηκε βρισκόταν ανάμεσα στις παραπάνω και ήταν $50k\Omega cm^2$. Το δεύτερο στοιχείο, που ήταν αναγκαίο για να περιγραφεί ηλεκτρονικά το μοντέλο ήταν φυσικά η τιμή της χωρητικότητας της μεμβράνης. Εδώ τα πράγματα ήταν πολύ πιο απλά, καθώς στις μελέτες, που βρήκαμε, η τιμή της χωρητικότητας, που επιλεγόταν, ήταν πάντα $1\mu F/cm^2$ [1, 18]. Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό με το οποίο εμπλουτίστηκαν όλα τα τμήματα του κυττάρου-μοντέλου ήταν ένα ρεύμα διαρροής της κυτταρικής μεμβράνης με αγωγιμότητα της τάξης των 0,7mS. Επίσης, υιοθετήθηκαν δύο τύποι ενεργών ιοντικών καναλιών, όπως είχαν χρησιμοποιηθεί και από τους Fohlmeister et al, Velte-Miller στις μελέτες τους για τη μοντελοποίηση των SACs [1, 10, 11]. Το πρώτο από αυτά ήταν το ιοντικό κανάλι Καλίου, ελεγχόμενο από τάση και από τη συγκέντρωση του Ασβεστίου. Τα κανάλια του τύπου αυτού έχουν μικρή αγωγιμότητα και έτσι επιλέχθηκε η τιμή των 0,5mS. Το μοντέλο του καναλιού αυτού βρέθηκε στο Model DataBase του Senselab του Yale και προέρχεται από τη μελέτη [21]. Το δεύτερο ήταν ένα ιοντικό κανάλι Καλίου, το οποίο όμως επιτελεί το ρόλο του καναλιού Ανιόντων. Το κανάλι αυτό επιδρά στην επαναπόλωση του κυττάρου, μετά την απομάκρυνση του δυναμικού του από την ισορροπία, μέσω ενός ρεύματος ιόντων προς το εξωτερικό του κυττάρου. Το μοντέλο του ρεύματος αυτού βρέθηκε στην ιστοσελίδα της Channelpedia σε μορφή MOD και προέρχεται από την εργασία [20]. Η αγωγιμότητα του καναλιού αυτού επιλέχθηκε στην τιμή των 36mS και ανήκε στην κατηγορία των καναλιών Καλίου της υποοικογένειας $K_v4.2$.
- Βιοφυσικά χαρακτηριστικά του σώματος των SACs :** Το σώμα των SACs έχει διαφορετικά βιοφυσικά χαρακτηριστικά από τα υπόλοιπα τμήματα του κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα, το κανάλι Νατρίου, που εκφράζεται στα κύτταρα αυτά, εντοπίζεται στο σώμα του κυττάρου και όχι στους δενδρίτες του [22]. Το κανάλι Νατρίου, όπως αναλύθηκε στο Κεφάλαιο 4 ανήκει στην υποοικογένεια $Na_v1.8$ των καναλιών [22, 23, 24]. Για το λόγο αυτό, έγινε χρήση ένα μοντέλο ρεύματος Νατρίου αυτού του τύπου, όπως σχεδιάστηκε από τον Baker στην εργασία του, στην οποία είχαμε πρόσβαση από το Model DataBase του Senselab του Yale [25]. Η αγωγιμότητα του συγκεκριμένου καναλιού επιλέχθηκε στην τιμή του 1mS. Το αντίστροφο δυναμικό του Νατρίου, όπως ορίζεται από το συγκεκριμένο μηχανισμό δημιουργίας του καναλιού ορίστηκε στα 79,6mV. Ένα άλλο χαρακτηριστικό, που διαφοροποιεί τις βιοφυσικές ιδιότητες του σώματος των SACs από τα υπόλοιπα τμήματα του κυττάρου, είναι το κανάλι Ασβεστίου, το οποίο διαθέτει. Πιο συγκεκριμένα, το σώμα των SACs διαθέτει κανάλια Ασβεστίου της υποοικογένειας $Ca_v2.2$ [22, 24]. Το μοντέλο του καναλιού αυτού λήφθηκε από τη μελέτη των Huang-Robinson [26] και είχε υλοποιηθεί σε γλώσσα MOD, στη μορφή, που βρέθηκε στην ιστοσελίδα της Channelpedia. Η αγωγιμότητα του

καναλιού αυτού ορίστηκε στα 2mS. Οι άλλοι μηχανισμοί ρευμάτων, με τους οποίους εμπλουτίστηκε το σώμα του κυττάρου-μοντέλου είναι τα δύο κανάλια Καλίου, που είχαν περιγραφεί στο Κεφάλαιο 4 και πιο συγκεκριμένα τα κανάλια των υποοικογενειών $K_v3.1 - K_v3.2$. Τα κανάλια αυτού του τύπου είχαν προσδιοριστεί από τους Ozaita et al στη μελέτη τους [27] ότι εντοπίζονται στα SACs και σε αντίθεση με άλλους τύπους κυττάρων, εκφράζονται καθ' όλο το μήκος των κυττάρων. Τα μοντέλα για την υλοποίηση των καναλιών $K_v3.1 - K_v3.2$, βρέθηκαν και πάλι στην ιστοσελίδα της Channelpedia σε μορφή MOD και αντλούνται από τις εργασίες [28] και [29] των Rettig et al και Hernandez-Pineda et al αντίστοιχα. Τα ιοντικά κανάλια αυτά εμφανίζονται σε όλο το μήκος του σώματος των κυττάρων, αλλά σε διαφορετικό βαθμό ανάλογα με την απόσταση από το σώμα [27]. Συγκεκριμένα, όσο απομακρυνόμαστε από το σώμα του κυττάρου, η έκφραση των καναλιών περιορίζεται. Για να μοντελοποιηθεί αυτή η διαφοροποίηση στην έκφραση, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές τιμές αγωγιμότητας σε κάθε τμήμα των δενδριτών. Έτσι στο σώμα ορίστηκε τη μέγιστη τιμή αγωγιμότητας, που ήταν ίση με 12mS.

- Βιοφυσικά χαρακτηριστικά των κοντινών δενδριτών των SACs : Οι πλησιέστεροι στο σώμα δενδρίτες των SACs, όπως και όλοι οι δενδρίτες των κυττάρων αυτών, δεν εμφανίζουν κανάλια Νατρίου [22]. Έτσι, στο συγκεκριμένο τμήμα του κυττάρου-μοντέλου δεν προσδώθηκαν τέτοιες ιδιότητες. Αντίθετα, διαθέτουν κανάλια Ασβεστίου, τα οποία μοντελοποιήθηκαν. Πρέπει να σημειωθεί όμως ότι τα κανάλια Ασβεστίου στη συγκεκριμένη δενδριτική ζώνη (όπως και στις υπόλοιπες) δεν είναι τα ίδια με αυτά, που αναφέραμε ότι εκφράζονται στο σώμα [22, 24, 30]. Τα κανάλια Ασβεστίου στους δενδρίτες των SACs υπάγονται στην υποοικογένεια των $Ca_v2.2$ καναλιών [22, 24]. Τα μοντέλα των καναλιών αυτών βρέθηκαν στην ιστοσελίδα της Channelpedia σε μορφή MOD files και προήλθαν από την εργασία [31]. Η αγωγιμότητα των καναλιών αυτών επιλέχθηκε στην τιμή των 2mS. Επιπλέον, στην κοντινή ζώνη των δενδριτών, οι υπόλοιποι μηχανισμοί, που χρησιμοποιήθηκαν υπήρχαν και στο σώμα του κυττάρου. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν και πάλι οι δύο τύποι καναλιών Καλίου ($K_v3.1 - K_v3.2$), που αναφέρθηκαν και στο σώμα των κυττάρων και μην ξεχνώντας την παρατήρηση ότι η έκφραση των καναλιών μειώνεται όσο απομακρυνόμαστε από το σώμα του κυττάρου [27], χρησιμοποιήσαμε την ίδια τιμή αγωγιμότητάς στην πλησιέστερη ζώνη των δενδριτών, δηλαδή 12mS. Αυτή η επιλογή έγινε, με το σκεπτικό ότι η έκφραση των καναλιών στο σώμα και στην κοντινή ζώνη είχε βρεθεί περίπου στα ίδια επίπεδα [27]. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε και εδώ ο μηχανισμός που υπολογίζει το δυναμικό ηρεμίας του Ασβεστίου σύμφωνα με την εξίσωση Nernst, από τις συγκεντρώσεις του Ασβεστίου στο εσωτερικό και το εξωτερικό του κυττάρου.
- Βιοφυσικά χαρακτηριστικά των ενδιάμεσων και απομακρυσμένων δενδριτών των SACs : Οι βιοφυσικές ιδιότητες των ενδιάμεσων και απομακρυσμένων ζωνών δενδριτών στα SACs δεν διαφέρουν πολύ από αυτές της κοντινής ζώνης. Έτσι, οι μηχανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν στις περιοχές αυτές είναι ίδιοι με αυτούς της κοντινής ζώνης με μια μικρή διαφοροποίηση. Συγκεκριμένα, με βάση την παρατήρηση ότι όσο απομακρυνόμαστε από το σώμα του κυττάρου, η έκφραση των καναλιών Καλίου περιορίζεται, επιλέχθηκαν διαφορετικές τιμές αγωγιμότητας για τα κανάλια αυτά στην ενδιάμεση και την απομακρυσμένη ζώνη δενδριτών. Έτσι, στην ενδιάμεση ζώνη η τιμή αγωγιμότητας, που ορίστηκαν ήταν τα 10mS και στην απομακρυσμένη ήταν τα 8mS.

Πίνακας 1 : Πίνακας Γεωμετρικών και Βιοφυσικών Χαρακτηριστικών του μοντέλου

	Σώμα	Κοντινή Ζώνη	Ενδιάμεση Ζώνη	Απομακρυσμένη Ζώνη
Μήκος	9 μ m	20 μ m	90 μ m	30 μ m
Διάμετρος	9 μ m	0,6 μ m	0,3 μ m	0,5 μ m
Αντίσταση Κυτταροπλάσματος	100 Ω	100 Ω	100 Ω	100 Ω
Αντίσταση Μembrάνης	50k Ω	50k Ω	50k Ω	50k Ω
Χωρητικότητα	1 μ F	1 μ F	1 μ F	1 μ F
$K_v4.1$	✓- 36mS	✓- 36mS	✓- 36mS	✓- 36mS
$sKCa$	✓- 0,5mS	✓- 0,5mS	✓- 0,5mS	✓- 0,5mS
Leakage	✓- 0,7mS	✓- 0,7mS	✓- 0,7mS	✓- 0,7mS
$K_v3.1$	✓- 12mS	✓- 12mS	✓- 10mS	✓- 8mS
$K_v3.2$	✓- 12mS	✓- 12mS	✓- 10mS	✓- 8mS
$Ca_v2.1$	—	✓- 2mS	✓- 2mS	✓- 2mS
$Ca_v2.2$	✓- 2mS	—	—	—
$Na_v1.8$	✓- 1mS	—	—	—

5.2.3.3 Σχόλια για τη Σχεδίαση του Μοντέλου

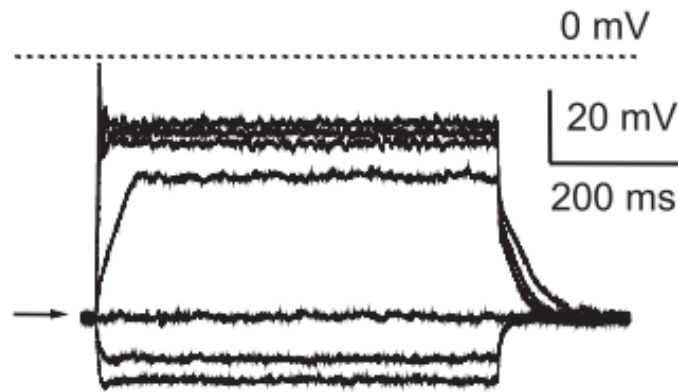
Στο σημείο αυτό θα πρέπει να επισημανθούν ορισμένα καίρια ζητήματα για το μοντέλο. Αρχικά, θα πρέπει να τονιστεί ότι όλα τα μοντέλα των ιοντικών καναλιών, που συμπεριελήφθησαν, βρέθηκαν στις ιστοσελίδες <http://channelpedia.epfl.ch/> και <https://senselab.med.yale.edu/ModelDB/>. Οι μελέτες, από τις οποίες προήλθαν δεν αναφέρονταν σε ανθρώπινα κύτταρα, αλλά και ούτε σε κύτταρα ενός είδους. Συνεπώς, είναι λογικό να υπάρξουν αποκλίσεις από την απόκριση των κυττάρων του ανθρώπινου αμφιβληστροειδούς. Ακόμα, πρέπει να σημειώσουμε ότι δεν έχουμε συμπεριλάβει στο μοντέλο καμία από τις ιδιότητες των κυττάρων, που αφορούσαν τη μεταφορά του Χλωρίου. Οι ιδιότητες αυτές, όπως προέκυψε από τις μελέτες των Gavrikov et al [32, 33] παίζουν πάρα πολύ σημαντικό ρόλο στην δημιουργία των κατευθυντικά επιλεκτικών αποκρίσεων. Οι ιδιότητες αυτές δεν ενσωματώνονται στο μοντέλο σε πρώτο στάδιο, αλλά το ενδεχόμενο αφήνεται ανοιχτό για μελλοντική προσθήκη. Ο λόγος είναι ότι το μοντέλο δεν αποσκοπεί σε αυτό το επίπεδο να μοντελοποιήσει την κατευθυντικά επιλεκτική απόκριση των κυττάρων σε οπτικά ερεθίσματα, αλλά την απόκρισή τους σε ηλεκτρικά σήματα.

5.3 Δοκιμές και Αποτελέσματα

Στο σημείο αυτό, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της προσομοίωσης ορισμένων διεγέρσεων των SACs. Οι συνθήκες των διεγέρσεων υιοθετήθηκαν να είναι ίδιες με αυτές, που έχουν πραγματοποιηθεί σε μελέτες, που χρησιμοποιούσαν πραγματικά κύτταρα. Με τον τρόπο αυτό, εξετάζεται αν το μοντέλο ανταποκρίνεται όπως και τα πραγματικά κύτταρα.

5.3.1 Πρώτος Έλεγχος Απόκρισης σε Παλμούς ρεύματος

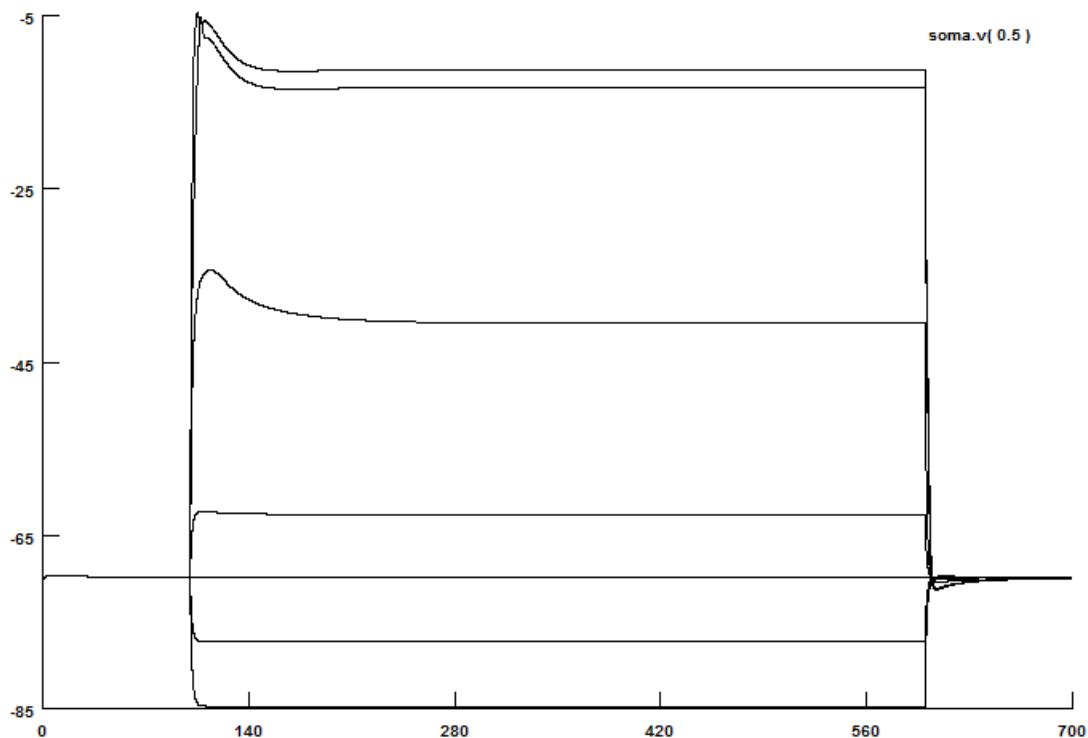
Ως πρώτο πείραμα με το μοντέλο χρησιμοποιήθηκαν οι πειραματικές συνθήκες, που παρουσιάζουν οι Ozaita et al στην εργασία τους [27]. Το κύτταρο βρίσκεται στο δυναμικό ηρεμίας των -70mV και διεγείρεται από εγχρόμους παλμούς ρεύματος διαφόρων επιπέδων. Η έγχυση αλλά και η μέτρηση του δυναμικού του κυττάρου, γίνεται στο μόνο σημείο του κυττάρου, όπου υπάρχει η δυνατότητα για εισαγωγή ηλεκτροδίων, δηλαδή στο σώμα του κυττάρου. Οι παλμοί ρεύματος, που χρησιμοποιήθηκαν, είχαν πλάτη -100,-50, 0,+50,+200,+300, και +400 pA και διάρκεια 500ms. Η απόκριση των πραγματικών κυττάρων παρουσιάζεται στην Εικόνα 6.



Εικόνα 6 : Απόκριση σε διέγερση ενός βραχύιου κυττάρου με παλμούς ρεύματος πλάτους $-100, -50, 0, +50, +200, +300,$ και $+400$ pA.

Υιοθετώντας τώρα τις πειραματικές συνθήκες, που αναφέρθηκαν πιο πάνω, πραγματοποιήθηκε μια προσομοίωση των διεγέρσεων αυτών με το μοντέλο, με σκοπό να συγκριθούν τα αποτελέσματα. Η απόκριση, που καταγράφηκε παρουσιάζεται στην Εικόνα 7.

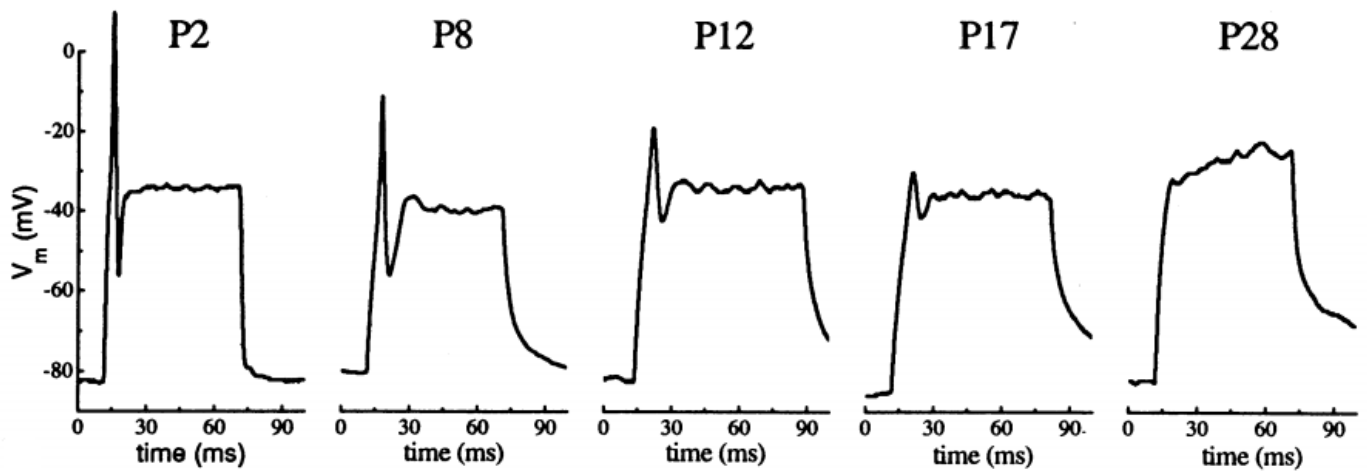
Συγκρίνοντας την απόκριση του πραγματικού κυττάρου και του μοντέλου, όπως παρουσιάζονται στην Εικόνα 6 και 7 αντίστοιχα, μπορούμε να γίνουμε κάποιες παρατηρήσεις για την επιτυχία ή όχι του μοντέλου να δίνει απόκριση, που ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα. Αρχικά, παρατηρείται ότι η μορφολογία της απόκρισης του μοντέλου και του πραγματικού κυττάρου είναι αρκετά κοντά. Η παλμική απόκριση του μοντέλου στις εγχύσεις των μεγάλων παλμών ρεύματος είναι παρόμοια με την αντίστοιχη πραγματικού κυττάρου. Η βασική διαφοροποίηση του μοντέλου από το πραγματικό κύτταρο εντοπίζεται στο γεγονός ότι οι μικρότεροι παλμοί ρεύματος, προξενούν μεγαλύτερη απόκριση στο πραγματικό κύτταρο παρά στο μοντέλο. Παρ' όλα αυτά προβλέπεται αρκετά ικανοποιητικά το επίπεδο του δυναμικού, στο οποίο σταθεροποιείται το κύτταρο κατά την έγχυση του ρεύματος. Επίσης, προβλέπεται αρκετά ικανοποιητικά και η ταχύτητα απόκρισης σε όλους τους παλμούς ρεύματος, εκτός από τον μικρότερο των 50pA. Πολύ καλή είναι και η προσέγγιση των αποκρίσεων στους αρνητικούς παλμούς ρεύματος. Η πιο βασική μάλλον επιτυχία του μοντέλου εντοπίζεται στο γεγονός, ότι τα πλάτη των αποκρίσεων εμφανίζουν τον χαρακτηριστικό για τα SACs κορεσμό. Δηλαδή, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 6 και τόνισαν ιδιαίτερος και οι Ozaita et al στην εργασία τους [27], η απόκριση των SACs περιορίζεται κάτω από τα -20 mV ανεξαρτήτως του πόσο αυξάνεται το πλάτος των παλμών διέγερσης. Το γεγονός αυτό είχε βρεθεί ότι οφείλεται στην ενεργοποίηση ορισμένων ιοντικών καναλιών Καλίου [27]. Με τον τρόπο αυτό τα SACs δεν εμπίπτουν σε παλμική δραστηριότητα, όπως συμβαίνει με την ίδια διέγερση στα γαγγλιακά κύτταρα (βλ. Εικόνα 11, Κεφάλαιο 11 και [27]). Το μοντέλο πράγματι περιορίζει τα σταθερά επίπεδα των αποκρίσεων κοντά στα -20 mV και τις μέγιστες τιμές τους κάτω από το επίπεδο των 0 mV, όπως επισημαίνει και η Εικόνα 6.



Εικόνα 7 : Απόκριση του μοντέλου σε διέγερση με παλμούς ρεύματος πλάτους -100,-50, 0,+50,+200,+300, και +400 pA.

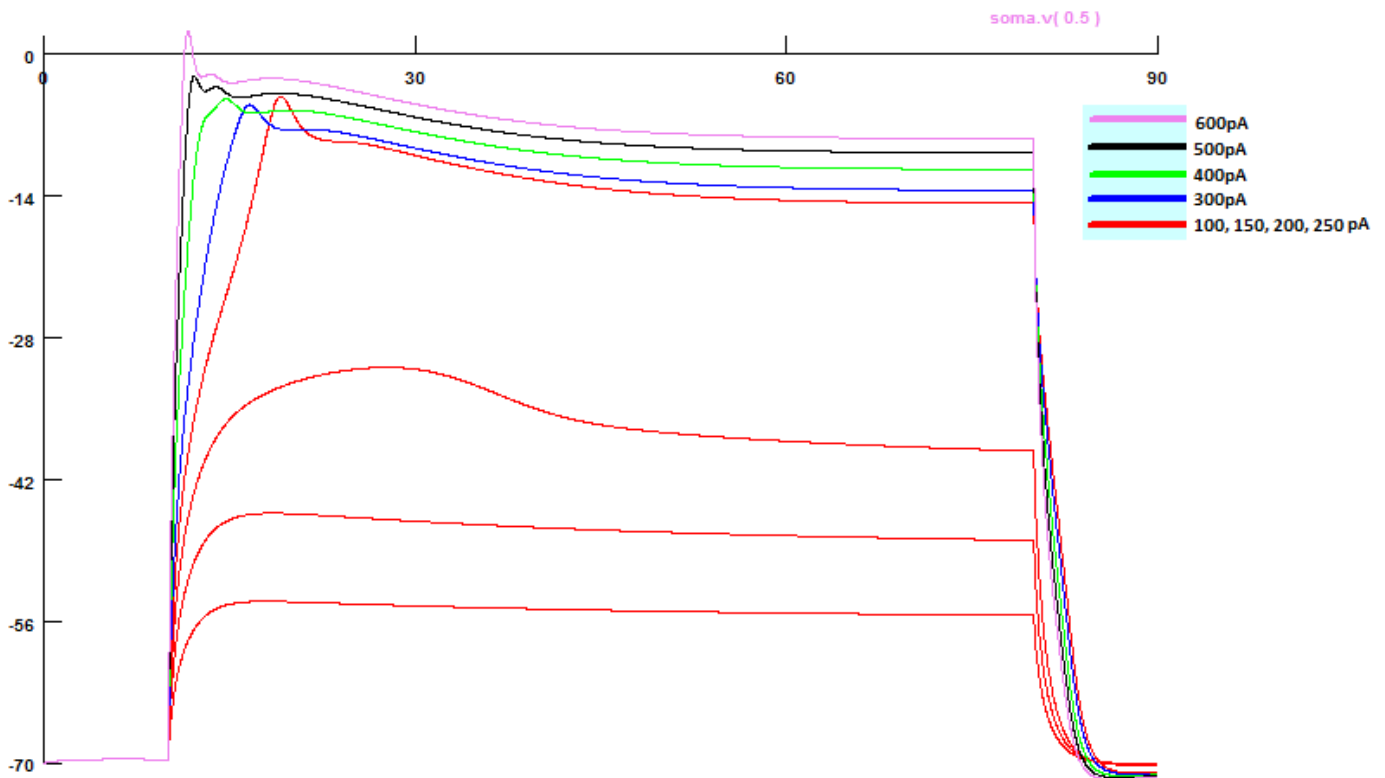
5.3.2 Δεύτερος Έλεγχος Απόκρισης σε Παλμούς ρεύματος

Για να ελεγχθεί ξανά η ποιότητα του μοντέλου, χρησιμοποιούνται οι πειραματικές διαδικασίες, που εφάρμοσαν στην μελέτη τους οι Zhou-Fain [4]. Εκεί, διέγειραν τα SACs με παλμούς ρεύματος πλάτους 100-250pA και διάρκειας 50-70ms και κατέγραψαν την απόκρισή τους. Το βασικό εύρημα της μελέτης τους ήταν, πως τα κύτταρα αυτά αλλάζουν την μορφή της απόκρισής τους κατά τη διάρκεια της ζωής τους από παλμική σε βαθμιδωτή και με αυτό έδωσαν απάντηση στις μέχρι τότε διαφωνίες για τη μορφή της απόκρισης των κυττάρων αυτών. Επιλέχθηκε η συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία να προσομοιωθεί, ώστε να διερευνηθεί αν το μοντέλο ανταποκρίνεται σε περίοδο, που τα κύτταρα έχουν διαμορφώσει την βαθμιδωτή απόκρισή τους ή είναι στη φάση της ανάπτυξης και δεν έχουν ακόμη απωλέσει πλήρως την παλμική τους απόκριση. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων των Zhou-Fain παρουσιάζονται στην Εικόνα 8.



Εικόνα 8 : Απόκριση του μοντέλου μας σε διέγερση με παλμούς ρεύματος πλάτους 100-250pA και διάρκειας 50-70ms ανάλογα με την ηλικία σε εβδομάδες μετά τη γέννηση [4].

Υιοθετώντας τώρα τις πειραματικές συνθήκες, που αναφέρθηκαν πιο πάνω, πραγματοποιήθηκε μια προσομοίωση των διεγέρσεων αυτών με το μοντέλο, με σκοπό να συγκριθούν τα αποτελέσματα. Η απόκριση, που καταγράφηκε από το μοντέλο παρουσιάζεται στην Εικόνα 9.

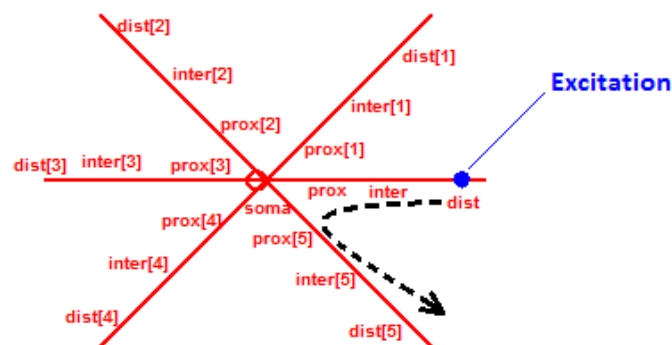


Εικόνα 9 : Απόκριση του μοντέλου μας σε διέγερση με παλμούς ρεύματος πλάτους 100-600pA και διάρκειας 70ms.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της προσομοίωσης και της πειραματικής μέτρησης, παρατηρούνται αρκετά ενδιαφέροντα γεγονότα. Αρχικά όμως πρέπει να σημειωθεί, ότι οι κόκκινες καμπύλες αντιστοιχούν σε διέγερση με παλμούς πλάτους 100, 150, 200 και 250pA, όπως έκαναν και οι Zhou-Fain. Στη συνέχεια, με χρώματα, επισημάνθηκε η απόκριση σε διέγερση με πλάτη 300, 400, 500 και 600pA. Αυτά, που παρατηρούνται είναι ότι η απόκριση του μοντέλου στους παλμούς χαμηλής έντασης δεν ανταποκρίνεται πολύ στις πειραματικές μετρήσεις. Όμως, στον παλμό των των 200pA η απόκριση σταθεροποιείται στο επίπεδο, όπου σταθεροποιείται και η απόκριση του πραγματικού κυττάρου (περίπου στα -30mV) και έχει μορφή σχετικά παρόμοια, γεγονός ενθαρρυντικό. Επίσης, στη διέγερση με παλμούς υψηλότερου πλάτους, η απόκριση του μοντέλου δεν σταθεροποιείται πλέον στο σωστό επίπεδο, αλλά η μορφή της πλησιάζει πολύ αυτή του πραγματικού κυττάρου. Αυτό φαίνεται από τον χαρακτηριστικό μικρής κλίμακας κυματισμό της απόκρισης στην εκκίνησή της, ο οποίος εμφανίζεται και στην απόκριση των πραγματικών κυττάρων με ηλικία αρκετών εβδομάδων μετά τη γέννηση. Επίσης, σε αυτή τη διαδικασία διεγέρσεων φαίνεται χαρακτηριστικά ότι το μοντέλο προβλέπει αρκετά ικανοποιητικά και τη διαδικασία επαναφοράς του κυττάρου στο δυναμικό ισορροπίας. Αυτό γίνεται χρονικά στο τέλος της εφαρμογής του παλμού ρεύματος. Από τα παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα, ότι οι αποκλίσεις των αποκρίσεων του μοντέλου από αυτές των πραγματικών κυττάρων δεν είναι αποτέλεσμα κάποιου ουσιώδους σφάλματος, αλλά μάλλον οφείλονται σε κάποια μη ιδανική επιλογή παραμέτρου (αγωγιμότητα, κάποιου καναλιού, τιμή αντίστασης κλπ). Έτσι, είναι πολύ πιθανό, το μοντέλο να προβλέπει ορθά την απόκριση των πραγματικών κυττάρων, όταν αυτά πια έχουν διαμορφώσει την βαθμιδωτή απόκρισή τους και έχουν απωλέσει σε μεγάλο βαθμό την παλμική τους δραστηριότητα, πράγμα, που σημαίνει ότι το μοντέλο προσεγγίζει τα κύτταρα σε φάση ενηλικίωσης.

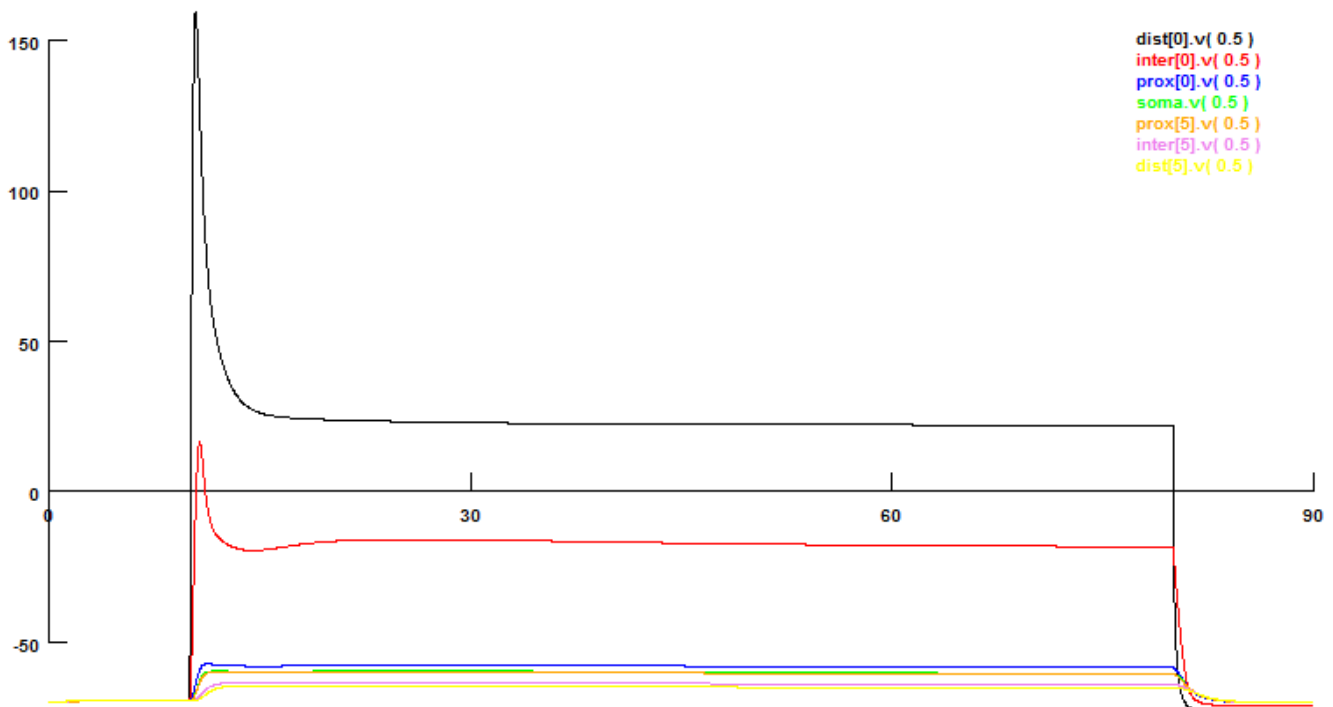
5.3.3 Έλεγχος της Ιδιότητας της Ηλεκτρικής Απομόνωσης των Γειτονικών Δενδριτών

Επιπλέον, πραγματοποιείται έλεγχος του μοντέλου, για την εμφάνιση και μιας άλλης βασικής ιδιότητας των SACs. Πιο συγκεκριμένα, οι Velte-Miller [1] αλλά και οι Hausselt et al [12], Euler et al [30] κλπ έχουν αναφέρει στις μελέτες τους ως βασική ιδιότητα των κυττάρων αυτών την ηλεκτρική απομόνωση των γειτονικών δενδριτών. Η ιδιότητα αυτή δίνει τη δυνατότητα στα SACs να παράγουν την κατευθυντικά επιλεκτική απόκρισή τους. Έτσι, πραγματοποιήθηκε διέγερση του μοντέλου με παλμούς ρεύματος σε απομακρυσμένα σημεία, όπως οι η πιο μακρινή ζώνη δενδριτών και καταγράφηκε η επιρροή της διέγερσης αυτής στην απομακρυσμένη ζώνη του διπλανού δενδρίτη. Σχηματικά αυτά παρουσιάζονται στην Εικόνα 10.



Εικόνα 10 : Μελέτη της επιρροής της διέγερσης ενός απόμακρου τμήματος κάποιου δενδρίτη στην απόκριση του γειτονικού του, για να εξετάσουμε το φαινόμενο της ηλεκτρικής απομόνωσης των δενδριτών.

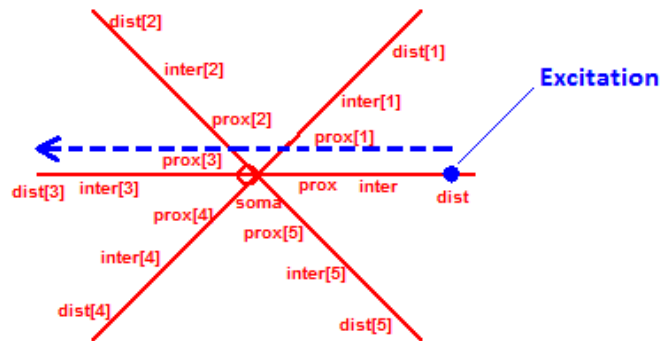
Παρουσιάζεται τώρα στο παρακάτω διάγραμμα η ηλεκτρική δραστηριότητα κατά τη διαδρομή, που δείχνει το βέλος στην Εικόνα 10. Αυτό φαίνεται στην Εικόνα 11. Όπως γίνεται άμεσα εμφανές, η μετάδοση της ηλεκτρικής δραστηριότητας από τον ένα δενδρίτη στον γειτονικό του είναι πολύ μικρή. Παρατηρείται πολύ μεγάλη εξασθένιση του σήματος διέγερσης μέχρι να φτάσει στο σώμα του κυττάρου και έτσι κατά τη διάδοσή του προς το απομακρυσμένο τμήμα του γειτονικού δενδρίτη, το σήμα, που φτάνει τελικά εκεί είναι πολύ μικρό. Ως αποτέλεσμα, μπορεί να εξαχθεί με ασφάλεια το συμπέρασμα ότι το μοντέλο περιγράφει αρκετά καλά το φαινόμενο της απομόνωσης των γειτονικών δενδριτών στη συγκεκριμένη κατηγορία κυττάρων, ιδιότητα, που θεωρείται ουσιώδης για την δημιουργία από τα κύτταρα αυτά των κατευθυντικά επιλεκτικών αποκρίσεων.



Εικόνα 11 : Ηλεκτρική δραστηριότητα και διάδοσή της σε γειτονικό δενδρίτη από αυτόν, που διεγείρουμε. Εν προκειμένω, διεγείρουμε το δενδρίτη 0 και μετράμε την απόκριση προς το σώμα και από αυτό κατά μήκος του δενδρίτη 5.

5.3.4 Έλεγχος της Ιδιότητας της Εμφάνισης Προτιμητέας - Μη Προτιμητέας Κατεύθυνσης

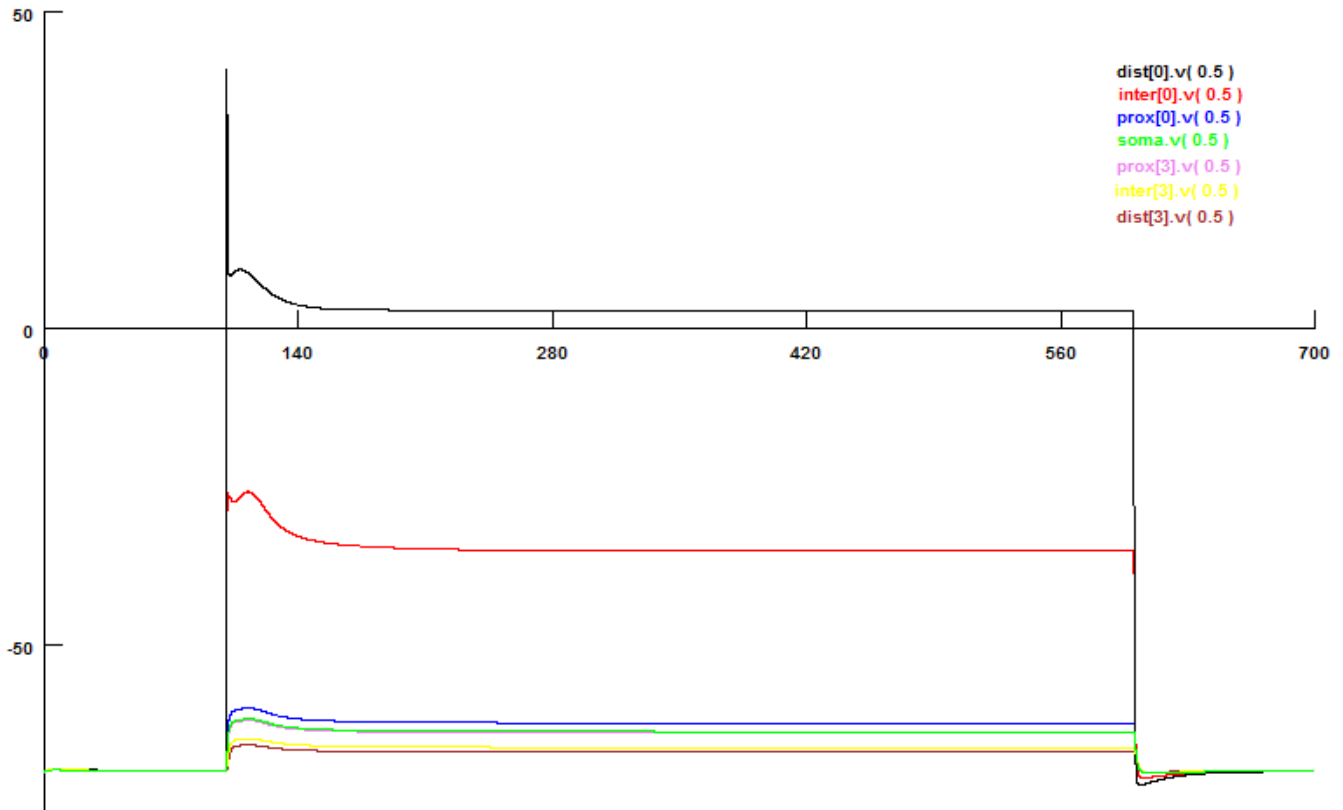
Τελευταία, παρουσιάζεται η δοκιμή του μοντέλου στην βασικότερη ιδιότητα των SACs. Αυτή δεν είναι άλλη από την εμφάνιση προτιμητέας και μη προτιμητέας κατεύθυνσης κίνησης. Για να δοκιμαστεί κατά πόσο το μοντέλο διαθέτει την ιδιότητα αυτή, γίνεται χρήση και πάλι παλμών ρεύματος για τη διέγερση σε ένα απομακρυσμένο σημείο του κυττάρου και καταγράφηκαν μετρήσεις της ηλεκτρικής δραστηριότητας του κυττάρου κατά μήκος του συγκεκριμένου δενδρίτη, στο σώμα και κατά μήκος του ακριβώς απέναντι δενδρίτη. Σχηματικά τα παραπάνω παρουσιάζονται στην Εικόνα 12.



Εικόνα 12 : Ηλεκτρική δραστηριότητα και διάδοσή της στον απέναντι δενδρίτη από αυτόν, που διεγείρουμε, για να εξετάσουμε την ιδιότητα της προτιμητέας κατεύθυνσης κίνησης. Εν προκειμένω, διεγείρεται ο δενδρίτης 0 και καταγράφεται η απόκριση προς το σώμα και από αυτό κατά μήκος του δενδρίτη 3.

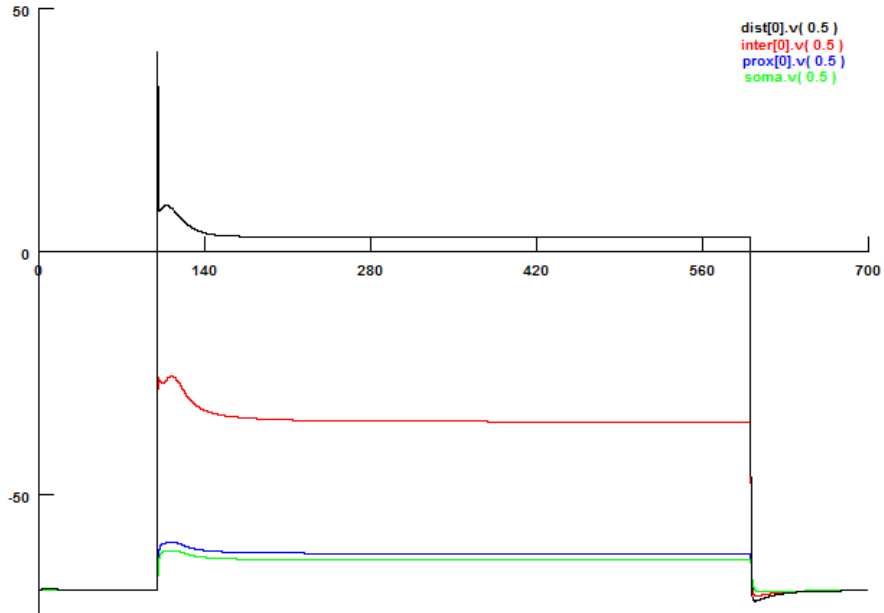
Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, η διέγερση με παλμούς ρεύματος βρίσκεται και πάλι στην απομακρυσμένη ζώνη ενός δενδρίτη και μετράται η ηλεκτρική απόκριση της ενδιάμεσης και κοντινής ζώνης του ίδιου δενδρίτη, του σώματος και της κοντινής, ενδιάμεσης και απομακρυσμένης ζώνης του ακριβώς απέναντι δενδρίτη. Με τον τρόπο αυτό μελετάται η διάδοση ηλεκτρικών σημάτων στο κύτταρο πρώτα κατά την κεντρομόλο (μέχρι το σώμα) και μετά κατά τη φυγόκεντρο (από το σώμα και μετά) διεύθυνση. Οι μετρήσεις της προσομοίωσής φαίνονται στην Εικόνα 13.

Εκ πρώτης όψεως, τα αποτελέσματα μοιάζουν αρκετά με αυτά, που παρουσιάστηκαν στην προηγούμενη γραφική παράσταση, όταν εξετάζοταν η ηλεκτρική απομόνωση των δενδριτών. Στην πραγματικότητα και στις δύο περιπτώσεις εξετάστηκε το ίδιο φαινόμενο, απλώς από διαφορετική οπτική γωνία. Δηλαδή και τις δύο φορές αυτό, που μελετήθηκε ήταν η διάδοση του ηλεκτρικού σήματος κατά την κεντρομόλο πρώτα και κατά την φυγόκεντρο μετά διεύθυνση. Παρουσιάζονται ακόμα δύο εικόνες, στις οποίες η προσοχή εστιάζεται σε δύο υποπεριοχές της Εικόνας 13, ώστε να γίνει κατανοητό κατά πόσο το μοντέλο εμφανίζει την επιθυμητή ιδιότητα της προτιμητέας κατεύθυνσης. Οι εικόνες αυτές είναι η Εικόνα 14 και 15.

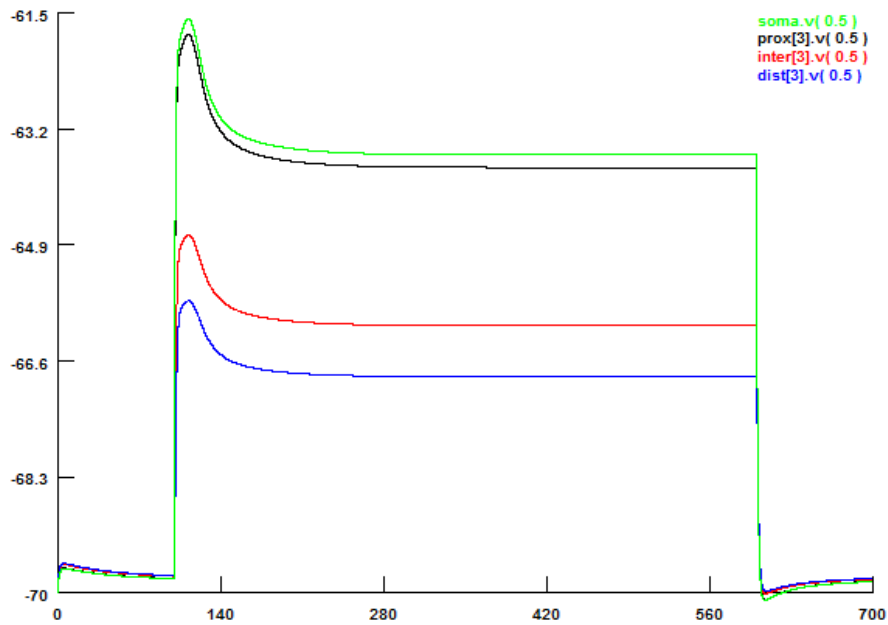


Εικόνα 13 : Ηλεκτρική δραστηριότητα και διάδοσή της στον απέναντι δενδρίτη από αυτόν, που διεγείρουμε, για να εξετάσουμε την ιδιότητα της προτιμητέας κατεύθυνσης κίνησης. Παρατηρούνται οι επιδράσεις της κεντρομόλου και της φυγόκεντρου διάδοσης στο ηλεκτρικό σήμα.

Στις Εικόνες 14 και 15 φαίνονται τα τμήματα της Εικόνας 13, που αφορούν την κεντρομόλο και τη φυγόκεντρο διεύθυνση της κίνησης σε διαφορετικές κλίμακες. Αυτό, που υποδεικνύουν οι δύο αυτές εικόνες είναι η προτίμηση, που δείχνει το μοντέλο στην διάδοση του ηλεκτρικού σήματος κατά την φυγόκεντρο διεύθυνση σε σχέση με την κεντρομόλο. Παρατηρώντας την Εικόνα 14, γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι το σήμα της διέγερσης εξασθενεί κατά τη διάδοσή του από την απομακρυσμένη στην ενδιάμεση ζώνη του διεγερόμενου δενδρίτη κατά περίπου 30mV. Αντίστοιχα, περίπου τόση είναι η εξασθένιση κατά τη διάδοσή του από την ενδιάμεση στην κοντινή ζώνη του διεγερόμενου δενδρίτη. Πολύ μικρή συγκριτικά είναι η εξασθένιση κατά τη μετάβαση του σήματος από την κοντινή ζώνη στο σώμα του κυττάρου. Δηλαδή συνολικά, κατά την διάδοση του σήματος στη κεντρομόλο διεύθυνση, η εξασθένιση του ξεπερνάει τα 60mV. Τα αντίστοιχα ισχύουν και στην Εικόνα 15, όπου παρουσιάζεται η μετάδοση του σήματος κατά την φυγόκεντρο κατεύθυνση. Η εξασθένιση κατά τη μετάβαση από το σώμα στην κοντινή ζώνη του δενδρίτη είναι πολύ μικρή και πάλι (κάτω από 1mV αυτή τη φορά). Κατά τη μετάβαση από την κοντινή στην ενδιάμεση ζώνη, υπάρχει μεγαλύτερη μεν εξασθένιση, αλλά το μέγεθός της δεν ξεπερνάει τα 3mV. Κατά τη μετάβαση από την ενδιάμεση στην απομακρυσμένη ζώνη η εξασθένιση είναι και πάλι πολύ μικρή. Συνολικά δηλαδή κατά την φυγόκεντρο διάδοση του ηλεκτρικού σήματος, η εξασθένιση δεν ξεπερνάει τα 5mV. Τα παραπάνω δείχνουν ξεκάθαρα, πως η εξασθένιση του σήματος κατά την φυγόκεντρο κατεύθυνση είναι υποδεκαπλάσια της αντίστοιχης κατά την κεντρομόλο. Οπότε, το μοντέλο εμφανίζει πράγματι την βασικότερη ιδιότητα της προτιμητέας φυγόκεντρου κατεύθυνσης σε σχέση με την μη προτιμητέα κεντρομόλο.



Εικόνα 14 : Ηλεκτρική δραστηριότητα και διάδοσή της στον απέναντι δενδρίτη από αυτόν, που διεγείρουμε, για να εξετάσουμε την ιδιότητα της προτιμητέας κατεύθυνσης κίνησης. Εστιάζουμε στην επίδραση της κεντρομόλου διάδοσης στο ηλεκτρικό σήμα.



Εικόνα 15 : Ηλεκτρική δραστηριότητα και διάδοσή της στον απέναντι δενδρίτη από αυτόν, που διεγείρουμε, για να εξετάσουμε την ιδιότητα της προτιμητέας κατεύθυνσης κίνησης. Εστιάζουμε στην επίδραση της φυγόκεντρου διάδοσης στο ηλεκτρικό σήμα.

5.4 Συζήτηση

Έχοντας δείξει όλα τα παραπάνω αποτελέσματα από τις προσομοιώσεις των πειραματικών διαδικασιών, μπορούν να εξαχθούν πλέον ασφαλή συμπεράσματα για την ποιότητα του μοντέλου. Όπως είναι προφανές, η απόκριση του μοντέλου δεν ταυτίζεται απόλυτα με αυτές του πραγματικού κυττάρου. Ακόμα και αν είχαν επιλεγεί οι παράμετροι του μοντέλου όχι από διάφορες μελέτες και συνυπολογίζοντας πολλές απόψεις αλλά με τη βοήθεια κάποιου ειδικότερου, αυτό θα ήταν και πάλι απίθανο. Ο λόγος είναι, ότι οι υλοποιήσεις των ιοντικών καναλιών, που αποτελούν και την πιο ουσιώδη αλλαγή σε σχέση με τα υπάρχοντα μοντέλα, έχουν δανειστεί από μελέτες άλλων κυττάρων, άλλων ειδών και υπό διαφορετικές συνθήκες. Συνεπώς, αν δεν γίνει μια εξειδικευμένη μοντελοποίηση των ρευμάτων των ιοντικών καναλιών, σε SACs του ανθρώπινου αμφιβληστροειδούς, δύσκολα θα προκύψουν αποτελέσματα, που θα διαφέρουν στην ουσία τους. Μια πιο ιδανική επιλογή των παραμέτρων αναμένεται να δώσει πιο ακριβή αποτελέσματα, αλλά όχι σε διαφορετική κατεύθυνση από αυτή, που έχουμε υιοθετήσει. Επιπλέον, το μοντέλο είναι ανοιχτό σε επεκτάσεις, όπως αυτή, που προαναφέρθηκε και θα ενέτασσε και τις διαδικασίες διακίνησης του Χλωρίου. Τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του μοντέλου χαρακτηρίζονται από την αφαιρετικότητα, που διέπει γενικώς τη διαδικασία της μοντελοποίησης, χωρίς όμως να αγνοεί κάποιο ουσιώδες χαρακτηριστικό. Η επιλογή για παράδειγμα μόνο 6 δενδριτών χωρίς διακλαδώσεις αποτελεί απόκλιση από την πραγματική δομή του κυττάρου, αλλά εκτός από το ότι έχει χρησιμοποιηθεί από πολλούς ερευνητές παλαιότερα, δεν φαίνεται να επιφέρει ουσιώδη διαφοροποίηση. Παρ' όλα αυτά, μια πιο ρεαλιστική δομή μπορεί εύκολα να ενσωματωθεί στο υπάρχον μοντέλο αν κρίνεται απαραίτητο από τον εκάστοτε ερευνητή.

Με όλες τις προαναφερθείσες ιδιότητες, το μοντέλο έχει καταφέρει επί του συνόλου να δώσει απόκριση, που ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα και στην πειραματικά καταγεγραμμένη απόκριση των πραγματικών κυττάρων. Όπως αναφέρθηκε και πιο πριν, το μοντέλο εμφανίζει τις βασικές ιδιότητες των SACs, όπως είναι η ηλεκτρική απομόνωση των γειτονικών δενδριτών και η εμφάνιση προτιμητέας και μη προτιμητέας κατεύθυνσης στην φυγόκεντρο και κεντρομόλο διεύθυνση αντίστοιχα. Επιπλέον, άλλοτε η μορφολογία άλλοτε τα πλάτη και ορισμένες φορές και τα δύο χαρακτηριστικά των αποκρίσεων του μοντέλου προκύπτουν πολύ κοντά στα αντίστοιχα των πραγματικών κυττάρων. Το γεγονός αυτό είναι ενθαρρυντικό για την σωστή κατεύθυνση στην οποία κινήθηκε η σχεδίαση του μοντέλου. Σε καμία περίπτωση το μοντέλο δεν μπορεί να θεωρηθεί πλήρες. Χαρακτηριστικό παραδείγμα ως προς τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά είναι η σταδιακή μείωση της διαμέτρου της ζώνης των κοντινών δενδριτών, που δεν μοντελοποιήθηκε παρότι αναφέρθηκε. Ως προς τα βιοφυσικά χαρακτηριστικά, η προσθήκη των μηχανισμών μεταφοράς του Χλωρίου αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για τη δοκιμή του μοντέλου σε συνθήκες οπτικής διέγερσης και επίσης έμεινε έξω από τη μοντελοποίηση ενώ έγινε λόγος στο αντίστοιχο Κεφάλαιο. Ακόμα και μικρότερες αλλαγές όμως, όπως η καλύτερη επιλογή των παραμέτρων του μοντέλου από τις αγωγιμότητες των ενεργών καναλιών και τις τιμές των αντιστάσεων της κυτταρικής μεμβράνης και του κυτταροπλάσματος έως τις διαμέτρους και τα μήκη των δενδριτών, μπορούν να αποτελέσουν βήματα προς τη βελτίωση του μοντέλου. Μέχρι εδώ όμως, η συμπεριφορά του μοντέλου μπορεί να θεωρηθεί ικανοποιητική.

5.5 Βιβλιογραφία

- [1] T. J. Velte and R. F. Miller, *Spiking and Nonspiking models of starburst amacrine cells in the rabbit retina*, Visual Neuroscience, Vol.14, pp.1073-1088, 1997
- [2] A. V. Dmitriev, K. E. Gavrikov and S. C. Mangel, *GABA mediated spatial and temporal asymmetries that contribute to the directionally selective light responses of starburst amacrine cells in retina*, Journal of Physiology, 590.7, pp.1699-1720, 2012.
- [3] M. Hines, *NEURON - A program for simulation of nerve equations* In : *Neural Systems : Analysis and Modeling*, ed. F. Eeckman, pp. 127-136, Norwell, Massachusetts : Kluwer Academic Publishers

- [4] J. Z. Zhou and G. L. Fain, *Starburst Amacrine Cells change from Spiking to Nonspiking neurons during retinal Development*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol.93, No.15, pp.8057-8062, 1996
- [5] R. F. Miller and S. A. Bloomfield, *Electroanatomy of a unique amacrine cell in the rabbit retina*, Proceedings of the National Academy of Science, USA, Vol.80, pp.3069-3073, 1983.
- [6] P. A. Coleman and R. F. Miller, *Measurement of passive membrane parameters with whole-cell recording from neurons in the intact amphibian retina*, European Journal of Neuroscience, Vol.7, pp.2308-2321, 1995
- [7] R. F. Miller, P. A. Coleman and M. Arkin, *Structure-function relationships of sustained on ganglion cells of the mudpuppy retina* In : *NATO ASI series, Vol. H31, Neurobiology of the Inner retina*, ed. R. Weiler and N. N. Osborne, Berlin, Springer Verlag, pp.221-234, 1989
- [8] W. R. Taylor and H. Wässle, *Receptive field properties of cholinergic amacrine cells in the rabbit retina*, European Journal of Neuroscience, Vol.7, pp.2308-2321, 1995
- [9] B. N. Peters and R. H. Masland, *Response to light of starburst amacrine cells*, Journal of Neurophysiology, Vol.61, pp.218-230, 1989
- [10] J. F. Fohlmeister and R. F. Miller, *Impulse encoding mechanisms of ganglion cells in the Tiger Salamander Retina*, The American Physiological Society, pp.1935-1947, 1997
- [11] J. F. Fohlmeister and R. F. Miller, *Mechanisms by which Cell Geometry Controls repetitive impulse firing in Retinal Ganglion Cells*, The American Physiological Society, pp.1948-1964, 1997
- [12] S. E. Hausselt, T. Euler, P. B. Detwiler and W. Denk, *A Dendrite-Autonomous Mechanism for Direction Selectivity in Retinal Starburst Amacrine Cells*, PLoS, Vol.5, Issue 5, ed.185, pp.1474-1493, 2014.
- [13] N. T. Carnevale and M. L. Hines, *The NEURON Book*, ed. Cambridge, 2004
- [14] S. Lee and Z. J. Zhou *The synaptic mechanism of Direction Selectivity in distal processes of starburst amacrine cells*, Neuron Journal, Vol.51, pp.787-799, 2006.
- [15] E. Famiglietti Jr, *On and Off Pathways through amacrine cells in mammalian retina : The synaptic connections of starburst amacrine cells*, Vision Research, Vol.23, No.11, pp.1265-1279,1983.
- [16] E. V. Famiglietti, *Synaptic organization of Starburst Amacrine Cells in Rabbit retina : Analysis of serial thin sections by Electron Microscopy and graphic reconstruction*, The Journal of Comparative Neurology, Vol.309, pp.40-70,1991.
- [17] R. Poznanski, *Modeling the Electrotonic structure of Starburst Amacrine Cells in the rabbit retina : A functional interpretation of dendritic morphology*, Bulletin of Mathematical Biology, Vol.56, No.4, pp. 905-928, 1992.
- [18] J. J. Tucker, W. R. Taylor and R. G. Smith, *Direction Selectivity in a model of the Starburst Amacrine Cell*, Visual Neuroscience, Vol.21, pp. 611-625, 2004.
- [19] W. Rall, *Theory of physiological properties of dendrites* Annual New York Academy of Science. Vol.96, pp.1071-1092, 1962.
- [20] J. M. Bekkers, *Properties of voltage-gated potassium currents in nucleated patches from large layer 5 cortical pyramidal neurons of the rat*, Journal of Physiology, 525 Pt 3, pp. 593-609, 2000

- [21] A. Gillies, D. Willshaw, *Membrane channel interactions underlying rat subthalamic projection neuron rhythmic and bursting activity*, Journal of Neurophysiology, Vol.95(4), pp.2352-2365, 2006
- [22] P. R. Poznanski, *Cellular inhibitory behavior underlying the formation of retinal direction selectivity in the starburst network*, Journal of Integrative Neuroscience, Vol.9, No.10, pp.299-335, 2010.
- [23] B. J. O' Brien, J. H. Caldwell, G. R. Ehrling, K. M. Bumsted O' Brien, Sonjiang Luo and S. Rock Levinson, *Tetrodotoxin-Resistant Voltage-Gated Sodium Channels $Na_v1.8$ and $Na_v1.9$ Are Expressed in the Retina*, Journal of Comparative Neurology, Vol.508, pp.940-951, 2008.
- [24] E. D. Cohen, *Voltage-gated calcium and sodium currents of starburst amacrine cells in the rabbit retina*, Journal of Visual Neuroscience, Vol.18, pp.799-809, 2001.
- [25] M. D. Baker, *Protein kinase C mediates up-regulation of tetrodotoxin-resistant, persistent Na^+ current in rat and mouse sensory neurons*, Journal of Physiology, Vol.567, pp.851-867, 2005
- [26] S. J. Huang, D. W. Robinson, *Activation and inactivation properties of voltage-gated calcium currents in developing cat retinal ganglion cells*, Journal of Neuroscience, Vol.85(1), pp.239-247, 1998
- [27] A. Ozaita, J. Petit-Jacques, B. Volgyi, Chi Shun Ho, R. H. Joho, S. A. Bloomfield and B. Rudy, *A Unique Role for $Kv3$ Voltage-Gated Potassium Channels in Starburst Amacrine Signalling in Mouse Retina*, Journal of Neuroscience, 24(33), pp.7335-7343, 2004.
- [28] J. Rettig, F. Wunder, M. Stocker, R. Lichtinhagen, F. Mastiaux, S. Beckh, W. Kues, P. Pedarzani, K. H. Schröter, J. P. Rüttesberg, *Characterization of a Shaw-related potassium channel family in rat brain*, EMBO Journal, Vol.11(7) pp.2473-2486, 1992.
- [29] R. Hernandez-Pineda, A. Chow, Y. Amarillo, H. Moreno, M. Saganich, E. C. Vega-Saenz de Miera, A. Hernandez-Cruz, B. Rudy, *$K_v3.1 - K_v3.2$ channels underlie a high-voltage-activating component of the delayed rectifier K^+ current in projecting neurons from the globus pallidus*, Journal of Neurophysiology, Vol.82(3), pp.1512-1528, 1999
- [30] T. Euler, P. B. Detwiler and W. Denk, *Directionally selective calcium signals in dendrites of starburst amacrine cells*, Nature, 418, pp.845-852, 2002.
- [31] T. Miyasho, H. Takagi, H. Suzuki, S. Watanabe, M. Inoue, W. Kudo and H. Miyakawa, *Low-threshold potassium channels and a low-threshold calcium channel regulate Ca^{2+} spike firing in the dendrites of cerebellar Purkinje neurons: a modeling study*, Brain Research, Vol.891(1-2), pp.106-115, 2001
- [32] K. E. Gavrikov, A. V. Dmitriev, K. T. Keyser and S. C. Mangel, *Cation chloride cotransporters mediate neural computation in the retina*, Proc. of the National Academy of Science, USA, Vol.100, pp.16047-16052, 2003.
- [33] K. E. Gavrikov, J. E. Nilson A. V. Dmitriev, C. L. Zucker and S. C. Mangel, *Dendritic compartmentalization of chloride cotransporters underlies directional responses of starburst amacrine cells in retina*, Proceedings of the National Academy of Science, USA, Vol.103, pp.18793-18798, 2006.

Κεφάλαιο 6^ο : Εμφυτεύματα Αμφιβληστροειδούς (Retinal Prosthesis)

6.1 Εισαγωγή - Στόχοι

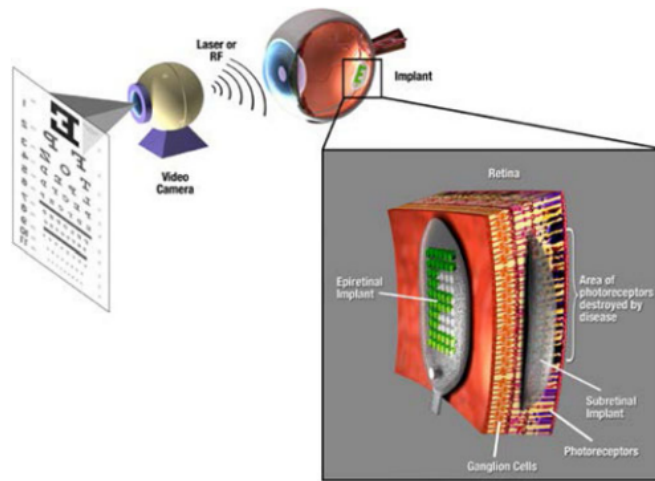
Στο Κεφάλαιο αυτό στόχος είναι να αναδειχθούν οι λόγοι, που κάνουν απαραίτητη την δημιουργία ενός μοντέλου για τα SACs. Η μοντελοποίηση είναι διαδικασία, που καταργεί πολλά από τα βασικά προβλήματα του εργαστηριακού πειραματισμού και δίνει τη δυνατότητα αναπαραγωγής πολλών πειραμάτων σε ευκολότερες και οικονομικότερες συνθήκες. Η βασική γενεσιουργός αιτία όμως, που οδηγεί προς την κατεύθυνση της μοντελοποίησης των κυττάρων του τύπου αυτού δεν είναι άλλος από την νεότευκτη εφαρμογή της προσθετικής εμφυτευμάτων στον αμφιβληστροειδή. Στις εφαρμογές αυτές, οι οποίες θα παρουσιαστούν αναλυτικά παρακάτω, το εμφύτευμα διεγείρει τα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, με τα οποία είναι σε επαφή και δημιουργεί την ψευδαίσθηση του φωτός. Το βασικό ερώτημα, που εγείρεται για την επέκταση της εφαρμογής αυτής, που οδήγησε στη μοντελοποίηση των SACs, είναι κατά πόσον υπάρχει ή όχι η δυνατότητα διέγερσης των SACs από τα εμφυτεύματα, ώστε να γίνει χρήση και του υπολοίπου υπάρχοντος υγιούς νευρικού κυκλώματος του ματιού. Η επιτυχής μοντελοποίηση των κυττάρων λογίζεται ως μια καλή βάση για πειραματισμό με τις παραμέτρους της διέγερσης.

6.2 Εκφυλιστικές Ασθένειες του Αμφιβληστροειδούς

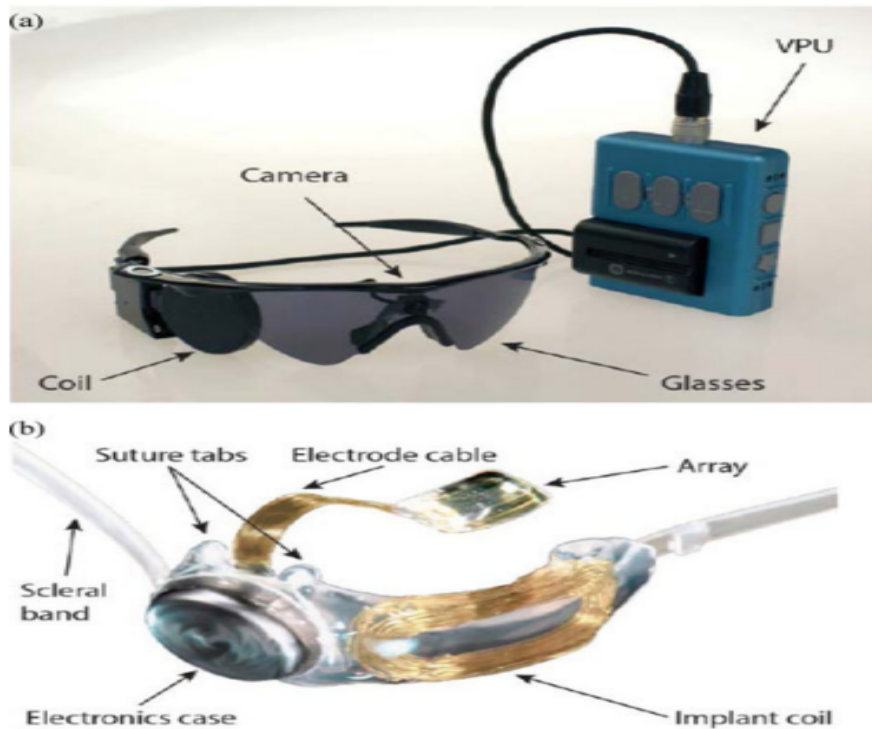
Οι ασθένειες, που προσβάλλουν τον αμφιβληστροειδή και οδηγούν σε πλήρη ή μερική τύφλωση είναι εκφυλιστικές και μπορεί να είναι είτε κληρονομικές είτε να σχετίζονται με την πάροδο της ηλικίας. Οι πιο συνηθισμένες είναι ο Σχετιζόμενος με την Πάροδο της Ηλικίας Εκφυλισμός της Ωχράς Κηλίδας (Age related Macular Degeneration ή AMD) και η Retinitis Pigmentosa ή RP, που μπορεί να είναι επίκτητη με την ηλικία, αλλά μπορεί να σχετίζεται και με την κληρονομικότητα. Οι δύο ασθένειες αυτές προκαλούν τύφλωση, μερική ή πλήρη, καταστρέφοντας τα στρώματα των φωτοϋποδοχέων. Μέχρι πρόσφατα, οι ασθένειες αυτές δεν είχαν κανένα τρόπο αντιμετώπισης. Κάποιες λύσεις και πολλές υποσχέσεις έχει δώσει πάνω σε αυτό το ζήτημα η Προσθετική εμφυτευμάτων στον αμφιβληστροειδή.

Το φιλόδοξο αυτό εγχείρημα έρχεται να αντικαταστήσει τη λειτουργία των εκφυλισμένων φωτοϋποδοχέων, διεγείροντας απευθείας τα νευρικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, ώστε να περνάει στο οπτικό νεύρο και συνεπώς στον εγκέφαλο η ψευδαίσθηση της αντίληψης του φωτός. Υπάρχουν και άλλες ιδέες προσθετικών εμφυτευμάτων, τα οποία τοποθετούνται απευθείας στο οπτικό νεύρο ή στον εγκεφαλικό φλοιό και με κατάλληλη διέγερση των νευρικών κυττάρων δημιουργούν την ψευδαίσθηση του φωτός.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα εμφυτευμάτων παρουσιάζονται στις Εικόνες 1 και 2. Στην Εικόνα 1 παρουσιάζεται πλήρως μια απεικόνιση του συστήματος, που λαμβάνει εικόνα μέσω μιας ψηφιακής κάμερας, μεταδίδει την πληροφορία στο εμφύτευμα με ασύρματη ζεύξη και η συστοιχία ηλεκτροδίων, που βρίσκεται σε επαφή με τον αμφιβληστροειδή ενεργοποιεί τα κατάλληλα ηλεκτρόδια, για να σχηματιστεί η αντίστοιχη εικόνα, που θα σχηματιζόταν από την φωτεινή διέγερση. Επιπλέον στην Εικόνα 1 παρουσιάζονται και οι εκφυλισμένοι φωτοϋποδοχείς.



Εικόνα 1 : Μια πλήρης απεικόνιση του συστήματος, που λαμβάνει εικόνα μέσω μιας ψηφιακής κάμερας, μεταδίδει την πληροφορία στο εμφύτευμα με ασύρματη ζεύξη και η συστοιχία ηλεκτροδίων, που βρίσκεται σε επαφή με τον αμφιβληστροειδή ενεργοποιεί τα κατάλληλα ηλεκτρόδια, για να σχηματιστεί η αντίστοιχη εικόνα, που θα σχηματιζόταν από την φωτεινή διέγερση [1].



Εικόνα 2 : Φωτογραφίες του πραγματικού εξοπλισμού, που χρησιμοποιεί το εμφύτευμα Argus II [1].

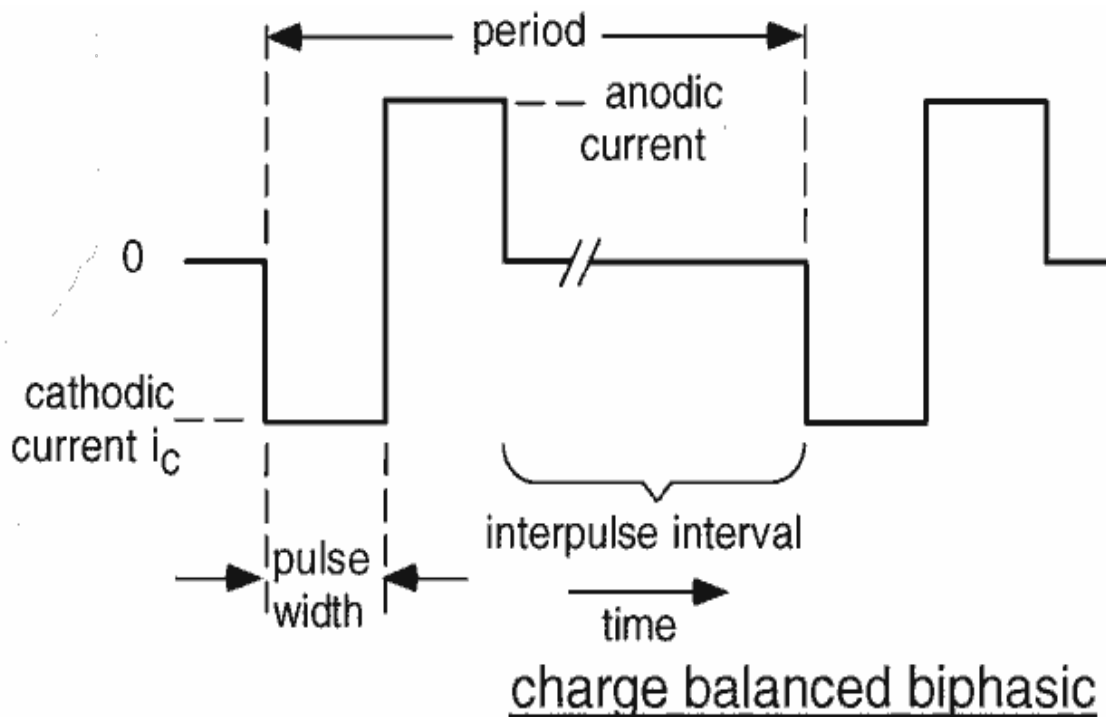
6.3 Διατάξεις Προσθετικής Αμφιβληστροειδούς

Στο σημείο αυτό, παρέχονται μερικές παραπάνω λεπτομέρειες για κάθε ένα από τα στοιχεία του συστήματος των εμφυτευμάτων στον αμφιβληστροειδή.

- **Microelectrode Array** : Η συστοιχία των μικροηλεκτροδίων χρησιμοποιείται για τη διέγερση του αμφιβληστροειδούς. Το οπτικό σήμα, που καταγράφεται από κάποια κάμερα, μετατρέπεται σε ηλεκτρικό σήμα, που θα διεγείρει συγκεκριμένα σημεία του αμφιβληστροειδούς. Με ενεργοποίηση συγκεκριμένων ηλεκτροδίων, είναι δυνατόν να δοθεί στον εξεταζόμενο η «εικόνα» διαφόρων χωρικών μοτίβων, όπως γραμμές, τετράγωνα, γράμματα κ.λ.π. Οι μέχρι σήμερα χρησιμοποιούμενες συστοιχίες μικροηλεκτροδίων διέθεταν πολύ μικρή ανάλυση, καθώς είχαν μικρό αριθμό ηλεκτροδίων (4X4, 6X6) με σχετικά μεγάλο μέγεθος (>100μm). Υπάρχει απαίτηση και για μεγάλο μέγεθος, ώστε να μπορούν τα ηλεκτρόδια να δίνουν τα απαιτούμενα φορτία για τη διέγερση των κυττάρων, αλλά και για μικρό μέγεθος, ώστε να αποκτήσει η μέθοδος ικανοποιητική ακρίβεια. Μάλιστα προσομοιώσεις του οπτικού πεδίου, όπως προκύπτει από τη μέθοδο έχουν οδηγήσει στην εκτίμηση ότι για ικανοποιητική όραση, ώστε ο εξεταζόμενος να μπορεί να διαβάσει ένα βιβλίο, να πλοηγηθεί στο χώρο χωρίς βοήθεια και να αναγνωρίσει πρόσωπα, θα απαιτούσε από 600 έως 1000 ηλεκτρόδια σε απόσταση μικρότερη από 400μm μεταξύ τους [3].
- **Digital Image Processing Unit** : Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας αποτελεί μια προέκταση του εγκεφάλου και μάλιστα την πιο εξωτερική πλευρά του εγκεφάλου προς τον έξω κόσμο. Τα στρώματα των νευρικών κυττάρων, που περιέχει είναι το σημείο, στο οποίο γίνεται η πρώτη επεξεργασία του οπτικού σήματος. Για να βοηθηθεί η διαδικασία της επεξεργασίας, μπορεί να ενσωματωθεί στο σύστημα μια εξωτερική μονάδα ψηφιακής επεξεργασίας εικόνας [5], που θα εκτελεί βασικές λειτουργίες του χιτώνα, όπως για παράδειγμα ανίχνευση ακμών και θα διεγείρει τα νευρικά κύτταρα απευθείας με τα κατάλληλα σήματα, που θα έχουν συμπυκνωμένη τη χρήσιμη πληροφορία και θα αγνοούν άχρηστη, πλεονάζουσα πληροφορία για το χρήστη, διευκολύνοντας έτσι το έργο του.
- **Substrate** : Το υπόστρωμα της συστοιχίας μικροηλεκτροδίων είναι πολύ κρίσιμος παράγοντας για την ανάπτυξη και τη βελτίωση της μεθόδου. Πρέπει να αναπτυχθούν νέοι τύποι υποστρωμάτων, που θα είναι ταυτόχρονα εύκαμπτα αλλά και φυσικά βιοσυμβατά. Τα υποστρώματα πρέπει να είναι εύκαμπτα, γιατί μόνο τότε τα ηλεκτρόδια βρίσκονται όλα στην ίδια σωστή απόσταση από τον αμφιβληστροειδή και μπορούν να διεγείρουν τα κύτταρα, χωρίς να απαιτούν πολύ υψηλά κατώφλια φορτίου για τη διέγερση. Για παράδειγμα, όπως αναφέρεται στο [6] στο μοντέλο Argus II πολλά ηλεκτρόδια απέχουν αρκετά μm από τον αμφιβληστροειδή, με αποτέλεσμα τα κατώφλια που απαιτούν να είναι αρκετά υψηλά. Επίσης στο [7] αναφέρεται πως το 80,9% των ηλεκτροδίων του μοντέλου Argus II, που βρίσκονταν σε επαφή με την ωχρά κηλίδα είχαν πολύ χαμηλά κατώφλια διέγερσης (<0,35mC/cm²)

6.4 Διέγερση

Σύμφωνα με τις πιο πρόσφατες ερευνητικές μελέτες, το κομμάτι της διέγερσης είναι αυτό, που μπορεί να δώσει νέα διάσταση στη μέθοδο της προσθετικής εμφυτευμάτων στον αμφιβληστροειδή. Λόγω της αρχικής επιτυχίας των τετραγωνικών παλμοσειρών σε κοχλιακά εμφυτεύματα στο αυτί, αυτή η μορφή διέγερσης είναι και αυτή, που έχει χρησιμοποιηθεί περισσότερο μέχρι σήμερα και έχει τραβήξει το περισσότερο ερευνητικό ενδιαφέρον. Η μορφή της διέγερσης αυτής παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.



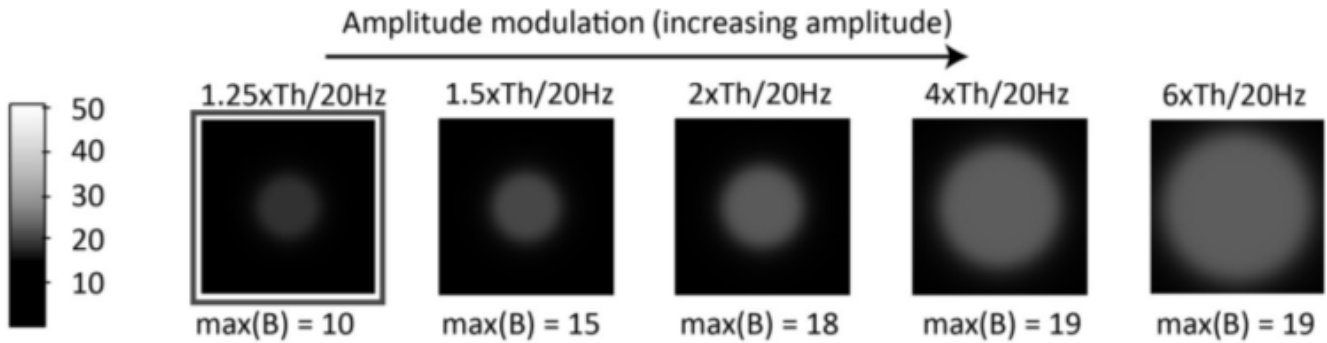
Εικόνα 3 : Σχηματική απεικόνιση του διαφασικού παλμού, με τον οποίο ως τώρα γίνεται η διέγερση των νευρικών κυττάρων στα εμφυτεύματα του αμφιβληστροειδούς [11].

Όπως φαίνεται στην Εικόνα, οι παράμετροι της συγκεκριμένης μορφής διέγερσης είναι το χρονικό μήκος του παλμού (pulse width), το πλάτος του (amplitude) καθώς και η περιόδός του. Η μορφή της διέγερσης αποτελείται από έναν αρνητικό και ένα θετικό παλμό, που εμφανίζονται κατά σειρά. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι πρέπει να υπάρχει εξισορρόπηση του φορτίου, που μεταφέρεται από το σύστημα διέγερσης στον ιστό, ώστε να μην εμφανίζεται συσσώρευση φορτίου στον διεγερόμενο ιστό.

6.4.1 Πλάτος Παλμού Διέγερσης

Όπως αναφέρεται στο [8], το πλάτος του παλμού (amplitude) είναι ένας από τους παράγοντες, που επηρεάζουν τη μορφή του αντιλαμβανόμενου φωσφονίου. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε [8] ότι με αύξηση του πλάτους του παλμού διέγερσης, αυξήθηκε όχι μόνο η φωτεινότητα του φωσφονίου, αλλά και η επιφάνεια του, δηλαδή το μέγεθός του. Το αποτέλεσμα αυτό φαίνεται στην Εικόνα 4.

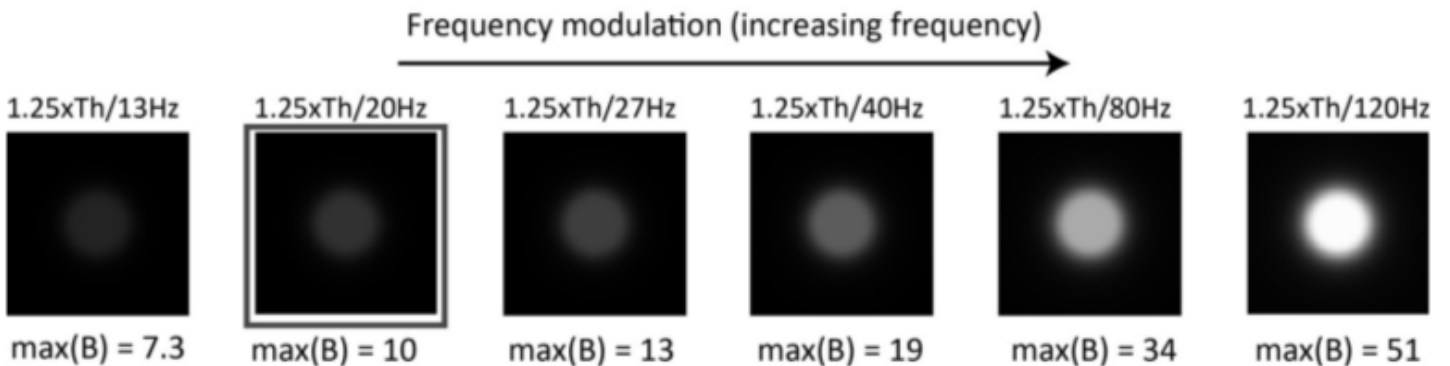
Η επιλογή του πλάτους των παλμών διέγερσης εξαρτάται από πολλές παραμέτρους. Συγκεκριμένα, το πλάτος του παλμού πρέπει να έχει τιμές από ένα κατώφλι και πάνω, ώστε να καταφέρνει να διεγείρει τα νευρικά κύτταρα. Η τιμή του κατώφλιου επηρεάζεται από την απόσταση του ηλεκτροδίου από τον αμφιβληστροειδή (ηλεκτρόδια, που δεν έχουν καλή επαφή με τον αμφιβληστροειδή και βρίσκονται σε απόσταση από αυτόν απαιτούν μεγαλύτερη τιμή ρεύματος για να επιτύχουν τη διέγερση [6]). Επιπλέον είχε παρατηρηθεί [1] ότι σε πιο προχωρημένα στάδια εκφυλισμού των φωτούποδοχών του αμφιβληστροειδούς, τα κατώφλια διέγερσης των κυττάρων αυξάνονται σε σχέση με τα πιο πρώιμα στάδια της ασθένειας. Πιο πρόσφατες μελέτες [6] έχουν δείξει ότι ενώ τα κατώφλια διέγερσης των διπολικών κυττάρων αυξάνονται με την πρόοδο της ασθένειας, τα κατώφλια διέγερσης των γαγγλιακών κυττάρων (RGCs) παραμένουν σταθερά.



Εικόνα 4 : Επίδραση της αύξησης του πλάτους της κυματομορφής στο μέγεθος και τη φωτεινότητα των αντιλαμβανόμενων φωσφονίων [8].

6.4.2 Συχνότητα Παλμού Διέγερσης

Ένας άλλος παράγοντας της παλμοσειράς διέγερσης, που επηρεάζει τη μορφή των αντιλαμβανόμενων φωσφονίων είναι η συχνότητα της κυματομορφής. Συγκεκριμένα, όπως παρατηρήθηκε στο [8], η αύξηση της συχνότητας της χρησιμοποιούμενης παλμοσειράς οδήγησε στην αύξηση της φωτεινότητας του αντιλαμβανόμενου φωσφονίου, χωρίς να επηρεάζει το μέγεθός του. Το αποτέλεσμα αυτό φαίνεται στην Εικόνα 5.



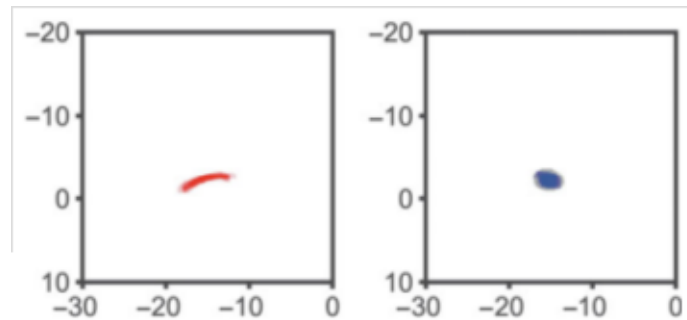
Εικόνα 5 : Επίδραση της αύξησης της συχνότητας στο μέγεθος και τη φωτεινότητα των αντιλαμβανόμενων φωτονίων [8].

Βέβαια, όπως αναφέρεται στο [10] η συχνότητα διέγερσης των γαγγλιακών κυττάρων παρουσιάζει άνω φράγμα, καθώς σε συχνότητες πάνω από τα 60 Hz περίπου, τα γαγγλιακά κύτταρα δεν ανταποκρίνονται σωστά στη διέγερση.

6.4.3 Χρονικό Μήκος Παλμού Διέγερσης

Ίσως ο πιο σημαντικός παράγοντας της κυματομορφής της διέγερσης είναι το χρονικό μήκος του παλμού της διέγερσης (pulse width). Οι αρχικές επιτυχίες των πολύ μικρών σε διάρκεια παλμών διέγερσης σε εφαρμογές κοχλιακών εμφυτευμάτων, οδήγησαν στη χρησιμοποίησή τους και σε εφαρμογές προσθετικής εμφυτευμάτων στον αμφιβληστροειδή. Οι παλμοί αυτοί αρχικά φάνηκαν να δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα και στην περίπτωση των εμφυτευμάτων στον αμφιβληστροειδή.

Συγκεκριμένα χρησιμοποιούνταν παλμοί με χρονικό μήκος κάτω από 1 μs, οι οποίοι δημιουργούσαν τοπική διέγερση των νευρικών κυττάρων γύρω από το ηλεκτρόδιο για τιμές ρεύματος διέγερσης κοντά στο κατώφλι. Η αύξηση των ρευμάτων διέγερσης σε τιμές μεγαλύτερες από 2 φορές την τιμή κατωφλίου όμως, οδηγούσαν στην εμφάνιση διεγέρσεων και σε γειτονικές περιοχές νευρικών κυττάρων αντί για τις επιθυμητές σημειακές διεγέρσεις, με αποτέλεσμα να υπάρχει απώλεια της ευκρίνειας της δημιουργούμενης όρασης, αφού ο εγκέφαλος μετέφραζε την παρασιτική αυτή διέγερση των γειτονικών κυττάρων σε πραγματική εικόνα. Αυτά φαίνονται στην εικόνα 12 :

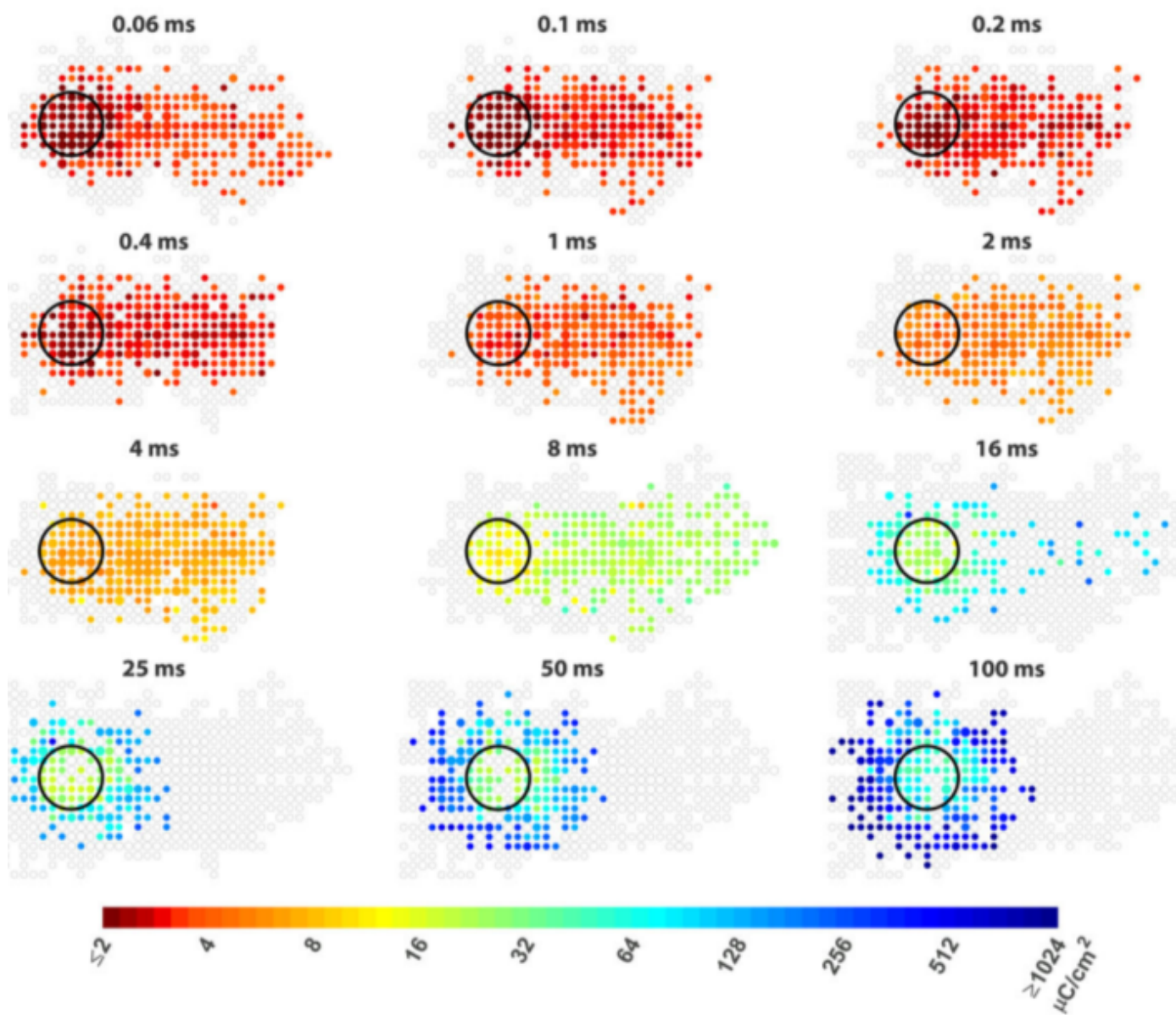


Εικόνα 6 : Γραμμική παραμόρφωση του αντιλαμβανόμενου φωσφονίου, λόγω διέγερσης των νευροαξόνων γειτονικών κυττάρων [6].

Η εμφάνιση του συγκεκριμένου προβλήματος, όπως εξηγείται στο [6] οφείλεται στο γεγονός ότι στην προσπάθεια διέγερσης συγκεκριμένων γαγγλιακών κυττάρων με παλμούς μικρού χρονικού μήκους και πλάτους μεγαλύτερο από δύο φορές το κατώφλι, εκτός από τα σώματα γαγγλιακών κυττάρων που διεγείρονται, εμφανίζεται παρασιτική διέγερση και σε νευροάξονες γειτονικών κυττάρων, που λόγω της δομή του αμφιβληστροειδούς περνούν από το συγκεκριμένο σημείο, κατευθυνόμενοι προς το οπτικό νεύρο.

Στην Εικόνα 7 φαίνεται η ανεπιθύμητη διέγερση των γειτονικών κυττάρων, λόγω διέγερσης των διερχόμενων νευροαξόνων τους από το σημείο διέγερσης, όταν χρησιμοποιούνται παλμοί πολύ μικρού χρονικού πλάτους (<2ms). Σημειώνουμε ότι το πλάτος του παλμού που απαιτείται για να γίνει η διέγερση των γειτονικών κυττάρων μπορεί να είναι και λιγότερο από 2 φορές την τιμή κατωφλίου διέγερσης.

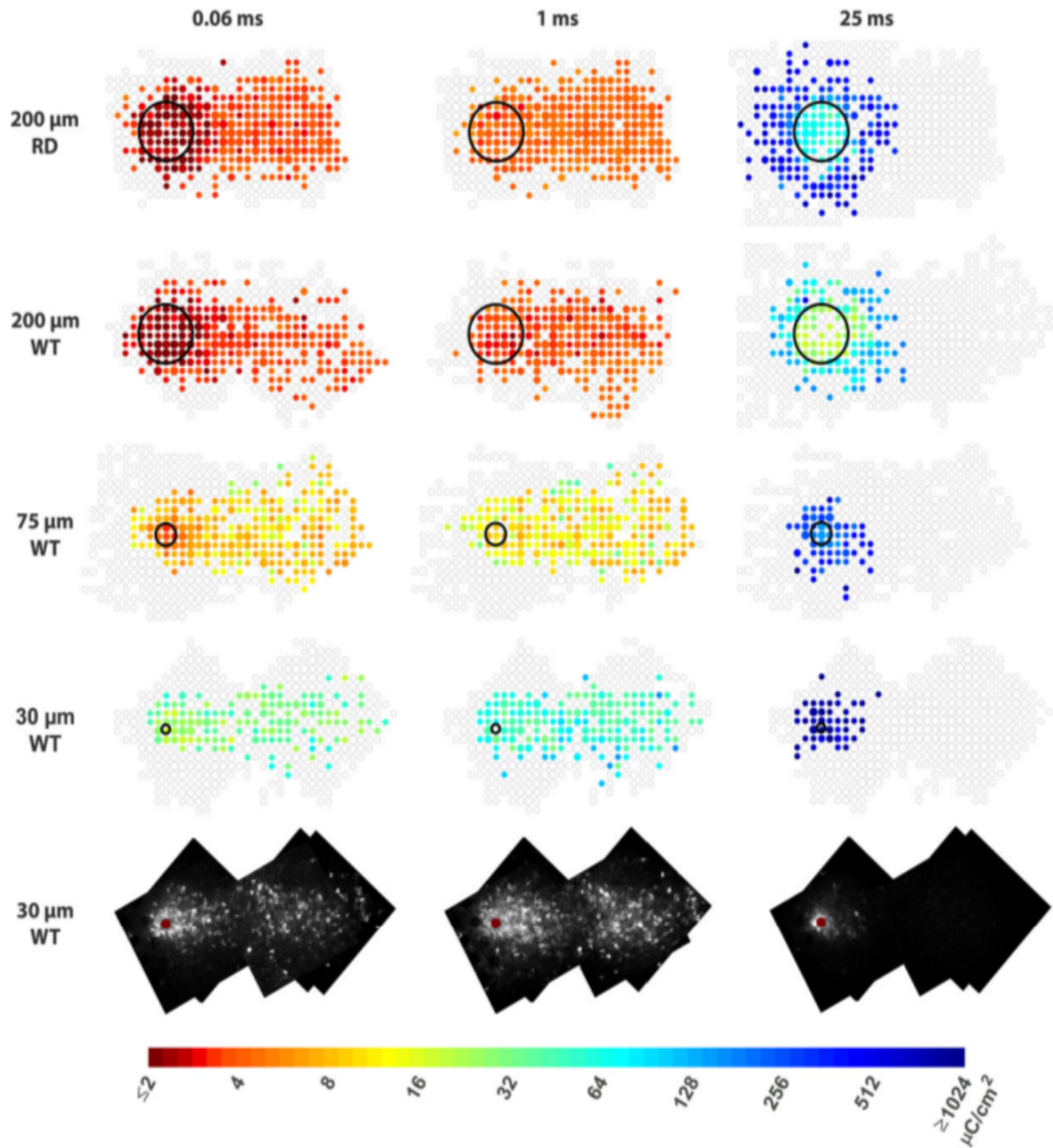
Παρατηρώντας τις επόμενες γραμμές της Εικόνας 7 εξάγεται το συμπέρασμα ότι με αύξηση του χρονικού μήκους του παλμού εμφανίζεται ένα αξιοθαύμαστο αποτέλεσμα. Η διέγερση των νευρικών κυττάρων γίνεται πολύ πιο στοχευμένη, καθώς η διασπορά των κυττάρων, που διεγείρονται είναι πολύ μικρότερη. Ακόμα πιο σημαντικό είναι ότι τα εμφανώς λιγότερα γειτονικά κύτταρα, που διεγείρονται, έχουν τιμές κατωφλίου που μπορεί να φτάνουν σε τιμές ακόμα και 7 φορές μεγαλύτερες από το κατώφλι των επιθυμητά διεγερμένων. Συνεπώς, γίνεται κατανοητό ότι πλέον η διέγερση των νευρικών κυττάρων με παλμούς μεγάλου χρονικού μήκους (>15ms) μπορεί να δώσει λύση στην απώλεια ευκρίνειας της αντιλαμβανόμενης όρασης.



Εικόνα 7 : Κύτταρα που διεγείρονται από ένα ηλεκτρόδιο και τα αντίστοιχα κατώφλια τους ανάλογα με το χρονικό μήκος του χρησιμοποιούμενου παλμού. Είναι προφανές ότι αυξάνοντας το χρονικό μήκος του παλμού πετυχαίνουμε πιο σημειακή. Επιπλέον τα γειτονικά κύτταρα, που δεν επιθυμούμε να διεγείρουμε έχουν πλέον πολύ μεγαλύτερα κατώφλια σε σχέση με τη διέγερση με παλμούς μικρού χρονικού μήκους [6].

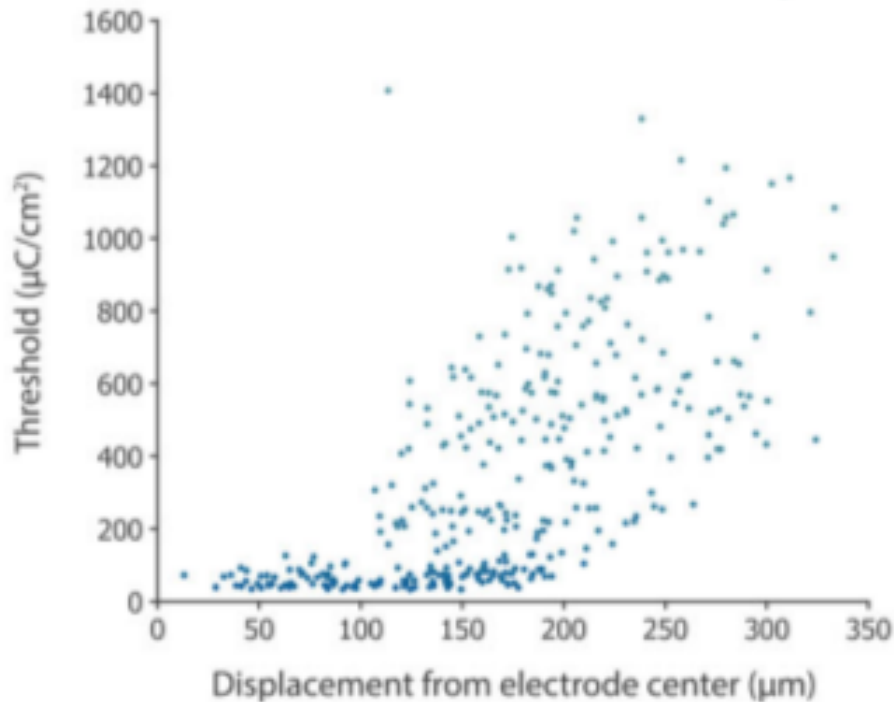
Πρέπει να σημειωθεί εδώ ότι οι τιμές κατωφλίων, που εμφανίζονται στις περιπτώσεις παλμών με μεγάλο χρονικό μήκος είναι αρκετά μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες για παλμούς μικρού χρονικού μήκους. Αυτό είναι ανεκτό όμως, αφού πλέον η διέγερση έχει πολύ μεγαλύτερο χρονικό διάστημα επίδρασης και μπορεί να μεταφέρει μεγαλύτερο φορτίο. Επίσης, λόγω μεγαλύτερου χρόνου διέγερσης, τα όρια ασφαλείας για το εισαγόμενο φορτίο για την μέθοδο με τους μεγαλύτερους παλμούς θα είναι μεγαλύτερα, αφού πλέον οι ιστοί έχουν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα επαναφοράς.

Καλύτερα αποτελέσματα εμφανίζονται με τη χρήση παλμού μεγαλύτερου χρονικού μήκους αν χρησιμοποιηθούν επιπλέον ηλεκτρόδια μικρότερης διαμέτρου. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στην Εικόνα 8:



Εικόνα 8 : Κύτταρα που διεγείρονται από ηλεκτρόδια διαφορετικών μεγεθών και τα αντίστοιχα κατώφλια τους ανάλογα με το χρονικό μήκος του χρησιμοποιούμενου παλμού. Είναι προφανές ότι αυξάνοντας το χρονικό μήκος του παλμού πετυχαίνουμε ξανά πιο σημειακή διέγερση. Επιπλέον τα γειτονικά κύτταρα, που δεν επιθυμούμε να διεγείρουμε έχουν πλέον πολύ μεγαλύτερα κατώφλια σε σχέση με τη διέγερση με παλμούς μικρού χρονικού μήκους. Εμφανής είναι επίσης ο περιορισμός της επιλεκτικότητας, όταν το μέγεθος του ηλεκτροδίου μειώνεται από 75 μm σε 30 μm [6].

Σημειωτέο είναι βέβαια, ότι από ένα σημείο και πέρα δεν υπάρχει κάποια βελτίωση στο αποτέλεσμα με τη μείωση του μεγέθους των ηλεκτροδίων, γεγονός που αποδεικνύει ότι το μέγεθος των ηλεκτροδίων δεν είναι ο κύριος παράγοντας που περιορίζει την ευκρίνεια της όρασης μέσω της μεθόδου [12].

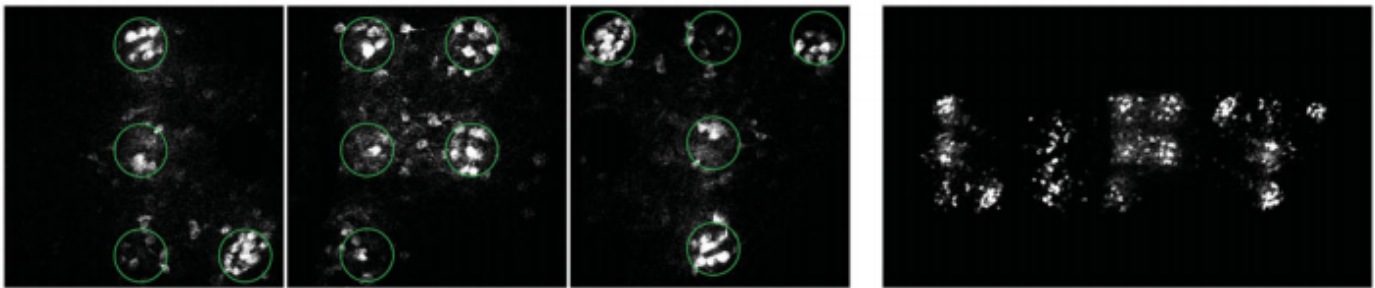


Εικόνα 9 : Κατώφλι διέγερσης κυττάρων ως συνάρτηση της απόστασής τους από το κέντρο του ηλεκτροδίου. Παρατηρείται αξιοσημείωτη ομοιογένεια του κατωφλίου σε μια απόσταση μέχρι 100μm από το κέντρο [6].

Στην Εικόνα 9 φαίνεται ένα επίσης σημαντικό αποτέλεσμα. Χρησιμοποιώντας παλμούς σχετικά μεγάλου χρονικού μήκους επιτυγχάνεται μεγάλη ομοιογένεια στα κατώφλια διέγερσης των κυττάρων σε μια αρκετά ευρεία περιοχή γύρω από τα ηλεκτρόδια διέγερσης (~100μm). Συνεπώς χρησιμοποιώντας μια τιμή μέσα σε αυτή την περιοχή, αναμένεται να διεγείρουμε στοχευμένα τα κύτταρα της συγκεκριμένης περιοχής.

Βέβαια πρέπει να σημειωθεί, ότι ναι μεν η διέγερση με παλμούς εναλλασσόμενης φάσης είναι η πιο συνηθισμένη, αλλά τελευταίες μελέτες δείχνουν ότι πιθανότατα άλλες μορφές διέγερσης μπορούν να επιφέρουν καλύτερα αποτελέσματα.

Με την επιλεκτικότερη διέγερση, που επιτυγχάνεται με τους παλμούς μεγαλύτερης χρονικής διάρκειας, έχουν παρατηρηθεί πλέον [6] ικανοποιητικές απεικονίσεις σύνθετων μοτίβων, όπως γράμματα ή και ολόκληρες λέξεις με ταυτόχρονη διέγερση κατάλληλων ηλεκτροδίων. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 10.



Εικόνα 10 : Αναπαράσταση γραμμάτων και λέξεων με ταυτόχρονη διέγερση γειτονικών ηλεκτροδίων, που διεγείρουν τοπικά τα νευρικά κύτταρα [6].

6.4.4 Ημιτονοειδής Διέγερση

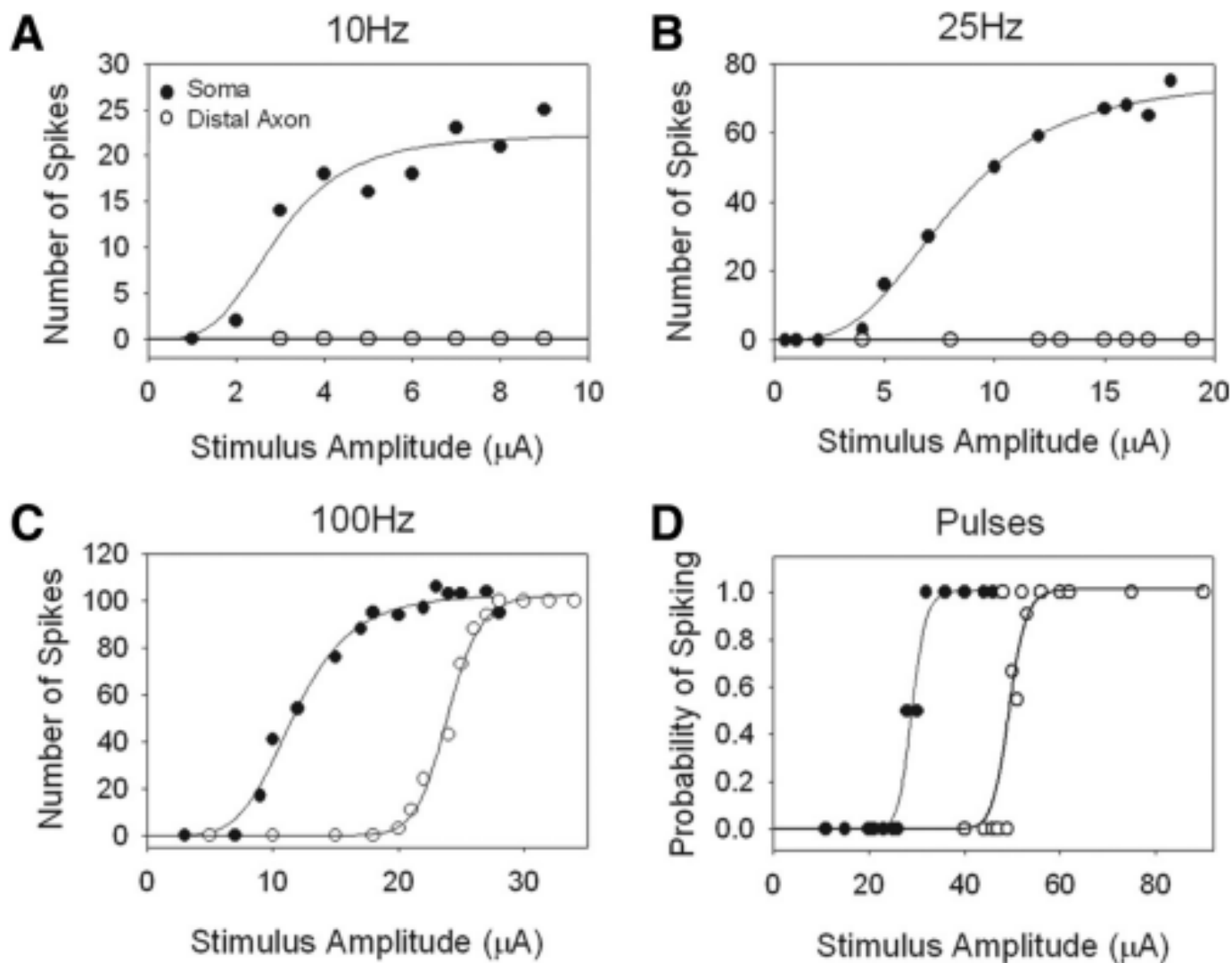
Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες [9] η διέγερση με τετραγωνική παλμοσειρά εναλλασσόμενης φάσης δεν αποτελεί και την πιο ιδανική μέθοδο διέγερσης. Μάλιστα στο [9] αναφέρεται ότι το ευρύ συχνοτικό περιεχόμενο της τετραγωνικής παλμοσειράς δεν μπορεί να διεγείρει στοχευμένα ένα είδος κυττάρων, ενώ αν χρησιμοποιηθεί ένα σήμα με περιορισμένο εύρος ζώνης, υπάρχει η δυνατότητα να επιτευχθεί επιλεκτική διέγερση συγκεκριμένων κατηγοριών κυττάρων. Συγκεκριμένα φωτοϋποδοχείς στα 5Hz, διπολικά στα 25Hz και γαγγλιακά στα 100Hz.

Τα παρασιτικά φαινόμενα, που εμφανίζονται κατά τη διέγερση με τετραγωνική παλμοσειρά, οφείλονται στο ότι η διέγερση δεν περιορίζεται μόνο στα σώματα των γαγγλιακών κυττάρων, που στοχεύουμε με το ηλεκτρόδιο, αλλά και σε νευροάξονες γειτονικών ή ακόμα και απομακρυσμένων κυττάρων που περνούν από το σημείο, πριν φτάσουν στο τυφλό σημείο και συγκροτήσουν το οπτικό νεύρο. Οι νευροάξονες αυτοί έχουν κατώφλι διέγερσης περίπου διπλάσιο σε σχέση με τα σώματα των γαγγλιακών κυττάρων, αλλά πολύ συχνά απαιτούνται και χρησιμοποιούνται κατά τη διέγερση παλμοί με πλάτη αρκετά μεγαλύτερα από το διπλάσιο του κατωφλίου.

Σύμφωνα με το [9], η τετραγωνική παλμοσειρά δεν μπορεί να κάνει διάκριση μεταξύ σωμάτων και νευροαξόνων των γαγγλιακών κυττάρων. Αντίθετα αναφέρεται ότι ένα χαμηλόσυχο ημιτονοειδές σήμα (<25Hz) μπορεί να διεγείρει τα γαγγλιακά κύτταρα, αλλά να αφήσει ανεπηρέαστους τους νευροάξονες. Πιο συγκεκριμένα βρέθηκε ότι ένα ημιτονοειδές σήμα σε συχνότητα 10Hz επέφερε μια πολύ ισχυρή απόκριση σε ένα γαγγλιακό κύτταρο όταν το ηλεκτρόδιο τοποθετούνταν κοντά στο σώμα του κυττάρου, αλλά προκαλούσε σχεδόν μηδενική απόκριση όταν το ηλεκτρόδιο απομακρυνόταν από το σώμα και βρισκόταν πιο κοντά στον νευροάξονα. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στην Εικόνα 11.

Τέλος άλλο ένα πολύ ενδιαφέρον εύρημα της μελέτης [9] ήταν ότι η απόκριση των γαγγλιακών κυττάρων στη χαμηλόσυχη ημιτονοειδή διέγερση οφείλεται σε συναπτική δραστηριότητα. Δηλαδή, το χαμηλόσυχο ημιτονοειδές σήμα δεν διεγείρει απευθείας τα γαγγλιακά κύτταρα, αλλά κάποιο προηγούμενο νευρωνικό στρώμα, που με τη σειρά του διεγείρει τα γαγγλιακά κύτταρα.

Το εύρημα αυτό έγινε με τη χρήση ουσιών, που καταστέλλουν την συναπτική διαδικασία και με εκ νέου διέγερση των γαγγλιακών κυττάρων. Έτσι, εφόσον τότε παρατηρήθηκε σχεδόν μηδενική απόκριση, βγήκε το συμπέρασμα, ότι η διέγερση οφείλεται πλήρως σε συναπτική δραστηριότητα.



Εικόνα 11 : Με γεμάτες τελείες φαίνονται οι αριθμοί των εκπεμπόμενων παλμών συναρτήσει του πλάτους της ημιτονοειδούς διέγερσης για συχνότητες 10Hz, 25Hz και 100Hz, όταν η διέγερση γίνεται κοντά στο σώμα του γαγγλιακού κυττάρου. Με ανοιχτές τελείες φαίνονται οι αντίστοιχοι αριθμοί όταν η διέγερση απομακρύνεται από το σώμα και γίνεται σε κάποιο σημείο του νευροάξονα. Παρατηρούμε ότι για 10Hz και 25Hz η διέγερση μακριά από το σώμα δεν δημιουργεί καμία απόκριση, ενώ όταν φτάνουμε στα 100Hz, υπάρχει ισχυρή απόκριση του κυττάρου είτε η διέγερση βρίσκεται κοντά στο σώμα είτε σε κάποιο σημείο του νευροάξονα, αλλά απαιτείται μεγαλύτερο πλάτος διέγερσης(περίπου διπλάσιο) όταν η διέγερση γίνεται στο νευροάξονα [9].

6.5 Χρησιμότητα του Μοντέλου για την Προσθετική

Συνδυάζοντας δεδομένα από τα παραπάνω θεωρητικά ευρήματα, υπάρχει η δυνατότητα τώρα να προσδιοριστεί σε ποιο ακριβώς σημείο της προσθετικής αμφιβληστροειδούς, αναμένεται να δώσει λύσεις το μοντέλο μας. Όπως σχολιάστηκε και πιο πάνω, η προσθετική αμφιβληστροειδούς διεγείρει τα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς με τρόπο τέτοιο, που δημιουργεί στον ασθενή την ψευδαίσθηση της όρασης. Τα γαγγλιακά όμως δεν είναι τα μόνα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, που είναι υγιή σε ασθενείς με Retinitis Pigmentosa ή Age Related Macular Degeneration. Μάλιστα, είναι το ανώτερο επίπεδο κυττάρων, από τα πολλά στρώματα κυττάρων του χιτώνα. Έτσι, αυτό που σχηματίζεται σαν λογική πρόταση είναι η δοκιμή διέγερσης και των υπολοίπων υγιών ομάδων κυττάρων του χιτώνα, όπως τα βραχύινα κύτταρα. Το εγχείρημα αυτό δεν μοιάζει πλέον τελείως αδύνατο, από τη στιγμή, που ανιχνεύθηκε ημιτονοειδής κυματομορφή, της οποίας αλλάζοντας της τη συχνότητα, μπορεί να γίνει επιλεκτικά διεγερτική για διαφορετικές κατηγορίες κυττάρων. Ειδικά σε συνθήκες ανίχνευσης κίνησης από το λογισμικό του εμφυτεύματος, η διέγερση των SACs, αν επιτευχθεί, αναμένεται να δώσει σπουδαία αποτελέσματα. Ο λόγος είναι απλός. Εφόσον τα κατευθυντικά επιλεκτικά γαγγλιακά κύτταρα δεν διεγείρονται επιλεκτικά σε σχέση με τις άλλες κατηγορίες γαγγλιακών κυττάρων από το εμφύτευμα, η κίνηση δεν μπορεί μεταδοθεί με το βέλτιστο τρόπο, αφού δεν διεγείρονται μόνο οι σωστές κατηγορίες κυττάρων. Αντίθετα, με την επίτευξη διέγερσης των SACs, υπάρχει δυνατότητα αξιοποίησης της ήδη υπάρχουσας νευρικής συνδεσμολογίας του αμφιβληστροειδούς για τη μετάδοση της κίνησης του οπτικού πεδίου στον εγκέφαλο. Αυτό, που έχει να προσφέρει κάθε επιτυχημένο μοντέλο είναι μια φθηνή, απλή και ρεαλιστική πλατφόρμα δοκιμών για τους τύπους και τις συνθήκες διέγερσης των κυττάρων αυτών. Έτσι, με αρκετές προσομοιώσεις πειραματισμού, οι ερευνητές δεν θα χρειάζεται να δοκιμάζουν πολλές μορφές διέγερσης, αλλά μόνο αυτές, που έχουν βρεθεί στις προσομοιώσεις να είναι υποσχόμενες.

6.6 Βιβλιογραφία

- [1] J. D. Weiland, W. Liu, M. S. Humayun, *Retinal Prosthesis*, Annual Review of Biomedical Engineering, Vol. 7, pp.361-401, 2005
- [2] J. C. Martins, L. A. Sousa, *Bioelectronic Vision : Retina Models, Evaluation Metrics, and System Design*, Series on Bioengineering and Biomedical Engineering, Volume 3, 2009
- [3] K. Cha, K. Horch, R. A. Normann, *Simulation of a Phosphene-Based Visual Field : Visual Acuity in a pixelized Vision system*, Annals of Biomedical Engineering, Vol.20(4), pp.439-449, 1992
- [4] B. B. Lee, *Receptive field structure in the primate retina*, Vision Research, Vol.36(5), pp.631-644, 1996
- [5] W. Liu, W. Fink, M. Tarbell, M. Sivaprakasam, *Image Processing and Interface for Retinal Visual Prostheses*, 2005 IEEE International Symposium on Circuits and Systems, 2005
- [6] A. Weitz, D. Nanduri, M. Behrend, Al. Gonzalez-Calle, R. Greenberg, M. Humayun, R. Chow and J. Weiland, *Improving the spatial resolution of epiretinal implants by increasing stimulus pulse duration*, Science Translational Medicine, Vol.7, Issue 318, pp.318, 2015
- [7] A. Ahuja, M. Behrend, *The Argus II retinal prosthesis : Factors affecting patient selection for implantation*, Progress on Retinal and Eye Research, Vol.36, pp. 1-23, 2013
- [8] D. Nanduri, I. Fine, A. Horsager, G. Boynton, M. Humayun, R. Greenberg and J. Weiland, *Frequency and Amplitude Modulation Have Different Effects on the Percepts Elicited by Retinal Stimulation*, Investigative Ophthalmology and Visual Science, Vol.53(1), pp. 205-214, 2012

- [9] D. Freeman, D. Eddington, J. Rizzo and S. Fried, *Selective Activation of Neuronal Targets with Sinusoidal Electric Stimulation*, Journal of Neurophysiology, Vol.104(5), pp. 2778-2791, 2010
- [10] R. J. Jensen, O. R. Riv, J. F. Rizzo - *Responses of rabbit retinal ganglion cells to electrical stimulation with an epiretinal electrode*, Journal of Neural Engineering, Vol.2(1), 2005
- [11] Wikipedia, the free Encyclopedia, *Biphasic Pulse*
- [12] M. R. Behrend, A. K. Ahuja, M. S. Humayun, R. H. Chow and J. D. Weiland, *Resolution of the epiretinal prosthesis is not limited by electrode size*, IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering, Vol.19(4), pp. 436-442, 2011

Κεφάλαιο 7^ο : Προτάσεις για Μελλοντική Έρευνα

7.1 Εισαγωγή - Στόχοι

Στο Κεφάλαιο αυτό επιχειρείται η συγκέντρωση όλων των ερωτημάτων και των προτάσεων, που δημιουργήθηκαν κατά την εκπόνηση της εργασίας. Η έκταση της έρευνας, που θα μπορεί να καλύψει αυτά τα ερωτήματα δεν είναι ίδια για όλα, αφού κάποια μπορούν να απαντηθούν πολύ σύντομα και με λίγες νέες γνώσεις, ενώ σε άλλα απαιτείται όχι μόνο περαιτέρω μελέτη αλλά και ορισμένες πειραματικές διαδικασίες.

7.2 Ερωτήματα και Προτάσεις στη Μοντελοποίηση

- ‡ Ένα βασικό ερώτημα, που είναι ωφέλιμο να εξεταστεί είναι το κατά πόσο οι λεπτομέρειες, που αφορούν τη γεωμετρία του μοντέλου μπορούν να προκαλέσουν ουσιώδεις αλλαγές στα αποτελέσματα της μοντελοποίησης. Το ερώτημα αν δημιουργία ενός μοντέλου, που συνδυάζει ακρίβεια στις γεωμετρικές λεπτομέρειες ενός κυττάρου και όχι αφαιρετική προσέγγιση, μαζί με πληρότητα στα βιοφυσικά χαρακτηριστικά, αναμένεται δυνατόν να δώσει ακριβέστερα αποτελέσματα είναι πολύ βάσιμο. Με τον τρόπο αυτό, αναμένεται να δοθεί απάντηση στο θεμελιώδες ερώτημα αν η συμπεριφορά των SACs οφείλεται πρώτιστα στη χαρακτηριστική τους δομή και γεωμετρία ή στα ιδιαίτερα βιοφυσικά τους χαρακτηριστικά.
- ‡ Μια προφανής επέκταση του μοντέλου είναι φυσικά η προσθήκη των μηχανισμών μεταφοράς των ιόντων Χλωρίου. Οι μηχανισμοί, όπως σχολιάστηκε εκτενώς στο Κεφάλαιο 4, έχουν βρεθεί πως αποτελούν ουσιώδες τμήμα του κυττάρου, που του προσφέρουν τις χαρακτηριστικές κατευθυντικές αποκρίσεις στα οπτικά ερεθίσματα. Με την προσθήκη των μηχανισμών αυτών, το μοντέλο δύναται να εξεταστεί και σε συνθήκες διέγερσης από οπτικά ερεθίσματα και να θεωρηθεί περισσότερο πλήρες αν μπορεί να προβλέψει ικανοποιητικά τις αποκρίσεις.
- ‡ Ένα άλλο τμήμα του μοντέλου, που χρίζει βελτιστοποίησης είναι οι μηχανισμοί ιοντικών καναλιών. Όπως αναφέρθηκε και στο αντίστοιχο σημείο, οι μηχανισμοί, που εντοπίστηκαν βιβλιογραφικά επιλέχθηκαν να ενταχθούν και στη μοντελοποίηση. Επειδή όμως, οι υλοποιήσεις των μηχανισμών προήλθαν από εργασίες άλλων ερευνητών πάνω σε διαφορετικά είδη οργανισμών και σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων, υπάρχει σοβαρό ενδεχόμενο να υπάρχουν αποκλίσεις από τους μηχανισμούς των SACs του ανθρώπινου οφθαλμού. Μια ακριβής καταγραφή των μηχανισμών ιοντικών καναλιών στα SACs του ανθρώπου και η μοντελοποίηση τους, θεωρείται πως μπορεί να προσφέρει μεγαλύτερη αξιοπιστία με την ενσωμάτωσή της στο μοντέλο.
- ‡ Εύκολα γίνεται αντιληπτό ένα ακόμα πεδίο έρευνας, στο οποίο προτρέπει η εργασία. Αυτό δεν είναι άλλο από την ακριβή μοντελοποίηση και των άλλων τύπων νευρώνων του αμφιβληστροειδούς. Η σχεδίαση ακριβών μοντέλα για τον κάθε τύπο κυττάρων, αποτελεί το πρώτο βήμα για τη δημιουργία ρεαλιστικών δικτύων κυττάρων, τα οποία θα δώσουν τη δυνατότητα για μελέτη της απόκρισης του χιτώνα σαν σύνολο και όχι σε επίπεδο κυττάρων ξεχωριστά. Παρ' όλα αυτά, η διαδικασία αυτή εμπλέκει μελέτη και καταγραφή των ιδιοτήτων των κυττάρων και στη συνέχεια

μοντελοποίησή τους, γεγονός που σημαίνει ότι απαιτεί πολύ μεγάλη προσπάθεια και χρόνο από πολλούς διαφορετικούς ερευνητές.

7.3 Ερωτήματα και Προτάσεις στην Προσθετική

Αμφιβληστροειδούς

Προκλήσεις και ερωτήματα όμως προκύπτουν και από την έρευνα στο πεδίο της Προσθετικής Εμφυτευμάτων στον Αμφιβληστροειδή.

- ‡ Παραδοσιακή πρόκληση της μεθόδου είναι η δημιουργία βιοσυμβατών και ταυτόχρονα εύκαμπτων υποστρωμάτων για τα ηλεκτρόδια του εμφυτεύματος. Τα εύκαμπτα υποστρώματα, θα επέτρεπαν σε όλα τα ηλεκτρόδια να έχουν ίσες αποστάσεις από τα κύτταρα και έτσι να υπάρχει ομοιομορφία στα κατώφλια διέγερσης τους. Έτσι η διέγερση θα μπορούσε να γίνει με μεγαλύτερη ακρίβεια και το οπτικό αποτέλεσμα στον ασθενή θα μπορούσε να είναι υψηλότερης ποιότητας. Το ερώτημα αυτό εμπίπτει περισσότερο στο πεδίο της Τεχνολογίας Υλικών.
- ‡ Μια άλλη πρόκληση για τη μέθοδο είναι ο αριθμός και το μέγεθος των ηλεκτροδίων. Μελέτες έχουν δείξει ότι για να υπάρξει ικανοποιητική διακριτική ικανότητα από τον ασθενή, ώστε να μπορεί να πλοηγηθεί μόνος του σε άγνωστο χώρο ή να διαβάσει ένα βιβλίο απαιτούνται συστοιχίες με πολύ περισσότερα ηλεκτρόδια από τα υπάρχοντα σήμερα. Επίσης, θεωρείται ότι το μέγεθος του ηλεκτροδίου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διακριτική ικανότητα, αν και αυτό πρόσφατα αμφισβητήθηκε. Γενικά πάντως, υπάρχει απαίτηση από τη μέθοδο για μεγάλη πυκνότητα ηλεκτροδίων με μικρά μεγέθη και μεταξύ τους αποστάσεις. Συνεπώς, αυτές οι ήδη ανοιχτές ερευνητικά περιοχές θα πρέπει να εξεταστούν ενδελεχώς.
- ‡ Μια άλλη εύλογη απορία αφορά την ενεργό επιφάνεια των ηλεκτροδίων. Η αυξανόμενη απαίτηση για σήματα διέγερσης, που προκύπτει από την μη ιδανική εφαρμογή των ηλεκτροδίων στον αμφιβληστροειδή ή στη χρόνια διέγερση των κυττάρων με ρεύματα, μπορεί να καλυφθεί από μεγαλύτερα σε επιφάνεια ηλεκτρόδια. Το ερώτημα είναι αν θα μπορούσαν ηλεκτρόδια με ακανόνιστη ή ακιδωτή μορφή, να δώσουν λύση στο πρόβλημα της ενεργού επιφανείας και συνεπώς του μεταφερόμενου φορτίου.
- ‡ Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί μια ακόμη ιδιότητα του εμφυτεύματος και αυτή είναι η διάταξη των ηλεκτροδίων. Όπως έχουν δείξει αρκετές μελέτες, το μωσαϊκό των γαγγλιακών κυττάρων στον αμφιβληστροειδή παρουσιάζει μια εξαγωνική διάταξη. Τα σώματα των κυττάρων δηλαδή δεν διατάσσονται σε καρτεσιανή τετραγωνική γεωμετρία, όπως τα ηλεκτρόδια, αλλά σε εξάγωνα. Το ερώτημα, που εύλογα δημιουργείται είναι κατά πόσον μια άλλη διάταξη των ηλεκτροδίων, όπως η εξαγωνική, δύναται να επιφέρει καλύτερα αποτελέσματα στην διέγερση των κυττάρων.