



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

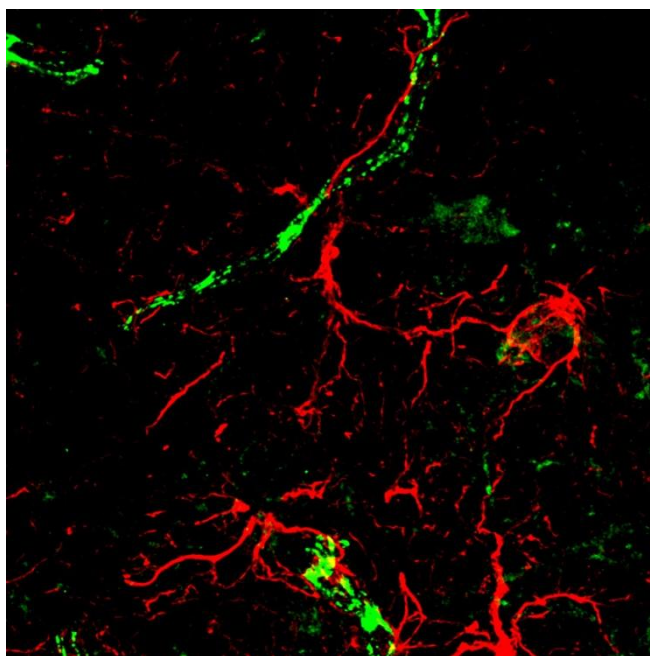
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ: «ΒΑΣΙΚΕΣ ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ (ΒΒΕ)»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ): «ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΜΗΧΑΝΙΚΗ, ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ»



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Μελέτη της λειτουργίας της Νευροαγγειακής Μονάδας μετά από επαγόμενη
νευροφλεγμονή από την τοξίνη LPS»**

Τσιώτη Ιωάννα

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : ΔΡ. ΚΟΥΚΛΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ : ΔΡ. ΘΩΜΑΙΔΟΥ ΔΗΜΗΤΡΑ, ΟΜΑΔΑ ΝΕΥΡΙΚΩΝ
ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗΣ, ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ**

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ: «ΒΑΣΙΚΕΣ ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ (ΒΒΕ)»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ): «ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΜΗΧΑΝΙΚΗ, ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Μελέτη της λειτουργίας της Νευροαγγειακής Μονάδας μετά από επαγόμενη
νευροφλεγμονή από την τοξίνη LPS»**

Τσιώτη Ιωάννα

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΔΡ. ΚΟΥΚΛΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ: ΔΡ. ΘΩΜΑΙΔΟΥ ΔΗΜΗΤΡΑ, ΟΜΑΔΑ ΝΕΥΡΙΚΩΝ
ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗΣ, ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ**

«Η έγκριση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Ονοματεπώνυμο υποψήφιου φοιτητή: Ιωάννα Τσιώτη

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης (ΜΔΕ): «Εφαρμοσμένη Γενετική Μηχανική, Γονιδιακή Θεραπεία και Βλαστικά Κύτταρα»

Ημερομηνία Παρουσίασης: 05/10/2018

Επιβλέπων Καθηγητής: Δρ. Κούκλης Παναγιώτης

Επιβλέπουσα Ερευνήτρια: Δρ. Θωμαΐδου Δήμητρα

Μέλη Τριμελούς Επιτροπής: Δρ. Κούκλης Παναγιώτης, Δρ. Βεζυράκη Πατρώνη, Δρ. Σύρρου Μαρίκα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Νευρικών Βλαστικών Κυττάρων και Νευροαπεικόνισης, του Τμήματος Νευροβιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, κατά το χρονικό διάστημα 2017-2018. Το θέμα υπέδειξε η Δρ. Θωμαΐδου Δήμητρα, Ερευνήτρια Α΄ στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ και επισκέπτρια καθηγήτρια στο τμήμα Βιολογίας του ΕΚΠΑ, την οποία και ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για την εκπόνηση της συγκεκριμένης εργασίας, για την επιστημονική της καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές της. Επίσης, ευχαριστώ τον επιστημονικό υπεύθυνο επίκουρο καθηγητή Δρ. Κούκλη Παναγιώτη, την καθηγήτρια Δρ. Βεζυράκη Πατρώνα καθώς την καθηγήτρια Δρ. Σύρρου Μαρίκα για την βοήθειά τους στο να πραγματοποιήσω τη συγκεκριμένη διπλωματική καθώς και για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Δρ. Κατερίνα Αραβαντινού- Φατώρου και στην Επιστημονική Συνεργάτη του εργαστηρίου Δρ. Παρή Κουτσουδάκη, για την πολύτιμη βοήθειά τους στη διεκπεραίωση των πειραματικών διαδικασιών, το ενδιαφέρον τους και την υπομονή τους καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές στην συγγραφή του κειμένου. Ευχαριστώ επίσης την Δρ. Ξύγγη Ευαγγελία, επιστημονική υπεύθυνη της Μονάδας Οπτικής Μικροσκοπίας του ΕΙΠ, για την πολύτιμη καθοδήγησή της στις αναλύσεις εικόνas και στον χειρισμό του συνεστιακού μικροσκοπίου και του μικροσκοπίου σάρωσης δύο φωτονίων. Θα ήθελα να ευχαριστήσω, ακόμη, όλα τα μέλη του εργαστηρίου, μεταδιδακτορικούς και διδακτορικούς ερευνητές και ιδιαίτερα την υποψήφια Διδάκτορα Ειρήνη Θάνου καθώς και την Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Δρ. Έλσα Παπαδημητρίου και όλη την ομάδα της Δρ. Μάτσα, για το πολύ ευχάριστο κλίμα στο εργαστήριο αλλά και τη μεγάλη προθυμία τους για βοήθεια ανά πάσα στιγμή.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον φίλο μου Παναγιώτη για την συμβολή του στην μορφοποίηση του κειμένου. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου Αποστόλη και Φωτεινή και στην αδερφή μου Μαρία που είναι πάντοτε δίπλα μου να με στηρίζουν και να με συμβουλεύουν, να ακούνε τους προβληματισμούς μου, να καθησυχάζουν τις ανησυχίες μου και να ενθαρρύνουν τις επιλογές μου.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	6
ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
Κεφάλαιο 1: Αγγείωση και οργάνωση της Νευροαγγειακής Μονάδας	8
1.1 Δομή και λειτουργία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού	8
1.2 Η φυσιολογία της Νευροαγγειακής Μονάδας (Neurovascular Unit, NVU).....	10
1.3 Ο ρόλος της Νευροαγγειακής Μονάδας στο κεντρικό νευρικό σύστημα	24
Κεφάλαιο 2: Συστημική Φλεγμονή, Νευροφλεγμονή και Νευροαγγειακή Μονάδα	28
2.1 Νευροφλεγμονή και Νευροαγγειακή Μονάδα.....	28
2.2 Το μοντέλο του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) στην μελέτη της νευροφλεγμονής.....	46
2.3 Η σημασία της Νευροφλεγμονής στις Νευροεκφυλιστικές νόσους.....	48
Κεφάλαιο 3: Χημικός Παράγοντας PLX-X ως καταστολέας της μικρογλοίας	51
3.1 Ο ρόλος του υποδοχέα Colony-Stimulating Factor (CSF1) στην ανάπτυξη της μικρογλοίας	51
3.2Μελλοντικές κατευθύνσεις για την χρήση της εξάλειψης της μικρογλοίας ως θεραπευτική προσέγγιση.....	58
Κεφάλαιο 4: Χρήσης της Μικροσκοπίας δύο φωτονίων για την μελέτη της Νευροαγγειακής Μονάδας	59
4.1 Μικροσκοπία Φθορισμού	59
4.2 Μικροσκοπία δύο φωτονίων	60
4.3 Χρήση της Μικροσκοπίας δύο φωτονίων για την μελέτη της Νευροαγγειακής Μονάδας	63
ΣΚΟΠΟΣ	66
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	68
Κεφάλαιο 1 : Πειραματόζωα και χειρισμός	68
1.1 Πειραματόζωα.....	68
1.2 Χειρισμός Πειραματόζωων και LPS.....	69
Κεφάλαιο 2: Θυσία των πειραματόζωων και προετοιμασία των ιστών.....	70
2.1 Θυσία των πειραματόζωων μετά την χορήγηση του LPS	70
2.2 Χορήγηση του Χημικού Παράγοντα PLX- X.....	70
2.3 Προετοιμασία των ιστών.....	71
2.4 Ανοσοϊστοχημεία	71

Κεφάλαιο 3: Μικροσκοπία Φθορισμού	73
3.1 Συνεστιακή Μικροσκοπία (Confocal Microscopy)	73
3.2 Μικροσκοπία διέγερσης δύο φωτονίων (2-Photon Laser Scanning Microscopy, 2-PLSM)	74
Κεφάλαιο 4: Προγράμματα επεξεργασίας εικόνας	79
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	80
Κεφάλαιο 1: Αποδιοργάνωση των καναλιών της Ακουαπορίνης 4 μετά την πρόκληση νευροφλεγμονής	80
1.1 Αποδιοργάνωση της έκφρασης της Ακουαπορίνης 4 στα περιαγγειακά αστροκύτταρα μετά την χορήγηση του LPS.....	80
1.2 Μειωμένη κάλυψη των αγγείων του εγκεφαλικού παρεγχύματος από την Ακουαπορίνη 4 μετά την χορήγηση του LPS.....	85
Κεφάλαιο 2: Η αλληλεπίδραση των μικρογλοιακών κυττάρων με τα αγγεία σε συνθήκες νευροφλεγμονής	89
Κεφάλαιο 3: Εξάλειψη της μικρογλοίας μέσω της χορήγησης του Χημικού Παράγοντα X PLX-X.....	90
ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	92
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	97

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

«Μελέτη της λειτουργίας της Νευροαγγειακής Μονάδας μετά από επαγόμενη νευροφλεγμονή από την τοξίνη LPS»

Ιωάννα Τσιώτη

Εισαγωγή: Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός είναι υπεύθυνος για την μεταφορά ουσιών μεταξύ της κυκλοφορίας του αίματος και του ΚΝΣ. Τα κύρια κυτταρικά δομικά στοιχεία που συνθέτουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό είναι τα ενδοθηλιακά κύτταρα, οι απολήξεις (endfeet) των αποφυάδων των αστροκυττάρων και τα περικύτταρα. Η Νευροφλεγμονή είναι μια παθολογική κατάσταση, η οποία παρατηρείται σε διάφορες νευροεκφυλιστικές νόσους, και χαρακτηρίζεται από δυσλειτουργία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, ενεργοποίηση της μικρογλοίας και αστρογλοίωση. Τα αστροκύτταρα εκφράζουν το διαμεμβρανικό κανάλι νερού Ακουαπορίνη 4, το οποίο πρόσφατες μελέτες συσχετίζουν με την νευροφλεγμονή και την αποδιοργάνωση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η παρατήρηση σε πραγματικό χρόνο των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αιμοφόρων αγγείων, της μικρογλοίας και των περιαγγειακών αστροκυττάρων κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και μετά την πρόκληση επαγομένης από το LPS νευροφλεγμονής, χρησιμοποιώντας συνεστιακή μικροσκοπία για την παρατήρηση της τοπολογίας της Ακουαπορίνης 4, αλλά και μικροσκοπία δύο φωτονίων για την μελέτη σε αναισθητοποιημένα ποντίκια της αποδιοργάνωσης του φραγμού και των δυναμικών αλληλεπιδράσεων της μικρογλοίας με τα ενδοθηλιακά αγγεία.

Υλικά Μέθοδοι: Συστημική χορήγηση δύο δόσεων 5mg/kg LPS πραγματοποιήθηκε σε διαγονιδιακά ποντίκια CX3CR1-EGFP, τα οποία εκφράζουν φθορίζουσα πρωτεΐνη για την μικρογλοία με σκοπό την παρατήρηση της αλληλεπίδρασης της με τα αγγεία των ενδοθηλιακών κυττάρων υπό νευροφλεγμονώδη συνθήκες και σε φυσιολογικές συνθήκες. Η ίδια δόση LPS χορηγήθηκε σε C57BL6 ποντίκια για την μελέτη της τοπολογίας της Ακουαπορίνης 4 στις απολήξεις των αποφυάδων των αστροκυττάρων καθώς και στα ενδοθηλιακά αγγεία σε συνθήκες νευροφλεγμονής καθώς και σε φυσιολογικές συνθήκες. Τέλος χορηγήθηκε ο Χημικός Παράγοντας PLX-X, μέσω της τροφής σε C57BL6 ποντίκια με σκοπό την εξάλειψη του πληθυσμού της μικρογλοίας και την μελέτη της τοπολογίας, της μορφολογίας και της ενεργοποίησης των αστροκυττάρων μετά την χορήγηση του συγκεκριμένου παράγοντα καθώς και μετά την έγχυση των δύο δόσεων LPS.

Αποτελέσματα: Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι το LPS επάγει την υπερτροφία των αστροκυττάρων και την πόλωση των απολήξεων των αποφυάδων τους προς τα ενδοθηλιακά αγγεία. Επίσης, η Ακουαπορίνη 4, η οποία σε φυσιολογικές συνθήκες εντοπίζεται μόνο στις απολήξεις των αποφυάδων των περιαγγειακών αστροκυττάρων, 1 και 4 ημέρες μετά την χορήγηση του LPS, εντοπίζεται σε όλο το μήκος των αποφυάδων των περιαγγειακών αστροκυττάρων. Τέλος, η χορήγηση ενός καταστολέα της μικρογλοίας, οποίος σε φυσιολογικές συνθήκες προκαλεί εξάλειψη του 90% των μικρογλοιακών κυττάρων, έπειτα από πρόκληση νευροφλεγμονής με δύο δόσεις LPS, οδήγησε σε ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού των μικρογλοιακών κυττάρων, καθώς και χρονικά

καθυστερημένη ενεργοποίηση των αστροκυττάρων και απώλεια του περιαγγειακούς τους εντοπισμού. Παρόλα αυτά τα επίπεδα ενεργοποίησης της μικρογλοίας και των αστροκυττάρων είναι μειωμένα συγκριτικά με εκείνα στα οποία είχε χορηγηθεί μόνο το LPS.

Συμπεράσματα: Η μελέτη αυτή προσθέτει νέες πληροφορίες στην χωροχρονική αλληλουχία των γεγονότων που πραγματοποιούνται στην Νευροαγγειακή Μονάδα μετά από την εμφάνιση νευροφλεγμονής, επηρεάζοντας τους μηχανισμούς επιβίωσης των νευρώνων και την νευρωνική δραστηριότητα τους.

ABSTRACT

“Study of the Neurovascular Unit (NVU) of the mouse brain after LPS-induced systemic inflammation”

Ioanna Tsioti

Introduction: The blood-brain barrier (BBB) is a highly selective barrier for the transport of substances between blood circulation and the central nervous system. Three cellular components of the brain microvasculature compose the BBB – the endothelial cells, the astrocyte end-feet and the pericytes (PCs). Neuroinflammation is a common pathological event observed in many different brain diseases, frequently associated with BBB dysfunction and also, characterized by microglia activation and extensive astrogliosis. Astrocytes express aquaporin 4 (AQP4), the water channel protein, involved in water homeostasis. Recent studies have started correlating neuroinflammation and BBB leakage with AQP4 channels dysregulation.

Aim of this study is to visualize in real time the interactions between, blood vessels, microglia and perivascular astrocytes, under physiological conditions and following LPS-systemic inflammation, using both confocal microscopy to observe the localization of AQP4 participating in BBB formation and 2-photon laser scanning microscopy (2P-LSM) intravital imaging, study in real time in whole anaesthetised mice BBB leakage and dynamic interactions of microglia with blood vessels under physiological and neuroinflammatory conditions at certain time periods upon LPS administration.

Materials and Methods: Systemic administration of two doses of 5 mg/kg LPS is performed in transgenic CX3CR1-EGFP mice expressing fluorescent protein specifically in microglia in order to follow the attachment/detachment of microglial cells to brain vasculature following LPS administration. In parallel to intravital imaging C57/BL6 mice are injected with the same doses of LPS, in order to study the localization of AQP4 in perivascular astrocytes and BBB-endothelial cells respectively in fixed brain tissue. Finally, oral administration of a Chemical Factor PLX-X is performed in C57BL6 mice, in order to eliminate microglial cells and to study the topology, morphology and activation of astrocytes upon PLX-X and LPS injection.

Results: Our first data demonstrates a translocation of AQP4 from astrocytic end-feet attached to the blood vessels to the astrocytic processes, following LPS administration. Also, our first data from *in vivo imaging* shows, that the contact of microglia with the blood vessels exhibits a 2-fold increase upon LPS administration. Finally, our first data indicates that Chemical Factor PLX-X administration induces a 90% elimination of microglia cells and also, these data shows microglia proliferation and astrocytes' delayed activation upon PLX-X/LPS administration. The microglia proliferation and the level of astrocytic activation upon PLX-X/LPS treatment are lower than LPS administration on its own.

Conclusion: This study will add new information on the spatiotemporal sequence of events occurring in the neurovascular niche following brain inflammation, which is a response occurring in every neurological disease or trauma of the CNS affecting immune response, neuronal activity and survival mechanisms.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ

- | | |
|---|--|
| 1. ALS: Amyotrophic Lateral Sclerosis | 27. MAP: Mitogen-Activated Protein |
| 2. AMPA: a-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol epropionic acid, | 28. MFG-E8: Milk Fat Globule - Epidermal Growth Factor 8 |
| 3. ANG-1: Angiopoietin-1 | 29. MMP: Matrix Metalloproteinase |
| 4. ATP: Adenosine Triphosphate | 30. NMDA: N-methyl-D-aspartate |
| 5. bFGF: Fibroblast Growth Factor- b | 31. NMO: Neuromyelitis Optica |
| 6. CBF: Cerebral Blood Flow | 32. nNOS: Neuronal NO Synthase |
| 7. CD14: Cluster of Differentiation | 33. NPY: Neuropeptide Y |
| 8. CLSM: Confocal Laser Scanning Microscopy | 34. NVU: Neurovascular Unit |
| 9. COX-2:Cyclooxygenase-2 | 35. PECAM1: Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule |
| 10. CSF1: Colony Stimulating Factor 1 | 36. PKC: Protein Kinase C |
| 11. DWI:Difussion-Weighted Magnetic Resonance Imaging | 37. PMN Cells: Polymorphonuclear Cells |
| 12. FITCH: Fluroscein Isothiocyanate | 38. SODs: Superoxide Dismutase |
| 13. GABA: Gamma-Aminobutyric Acid | 39. SPARC: Secreted Protein Acidic And Rich Cysteine |
| 14. GDNF: Glial Cell Derived Neurotrophic Factor | 40. TGFβ: Transforming Growth Factor beta |
| 15. GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein | 41. TLR4: Toll Like Receptor-4 |
| 16. GFP: Green Fluorescent Protein | 42. TNF-a: Tumor Necrosis Factor-a |
| 17. GPI: Glycosylphosphatidylinositol | 43. TRAM: TRIF-Related Adaptor Molecule |
| 18. GSH: Glutathione | 44. TRIF: TIR-Domain- Containing Adapter-Inducing Interferon-β |
| 19. HSVTK: Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase | 45. UDP: Uridine Diphosphate |
| 20. IFN: Type I Interferon | 46. VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor |
| 21. IL: Interleukin | 47. VRS: Virchow-Robin Spaces |
| 22. IRF3: Interferon Regulatory Factor 3 | 48. YFP: Yellow Fluorescent Protein |
| 23. ISF: Interstitial Fluid | 49. ZO: Zonnula Occludin |
| 24. JAMs: Junctional Adhesion Molecules | 50. TPLSM: Two Photon Laser Scanning Microscopy |
| 25. LPS:Lipopolysaccharide | |
| 26. MAGUK: Mmembrane Associated Guanylate Kinase Homologs | |

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κεφάλαιο 1: Αγγείωση και οργάνωση της Νευροαγγειακής Μονάδας

1.1 Δομή και λειτουργία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού

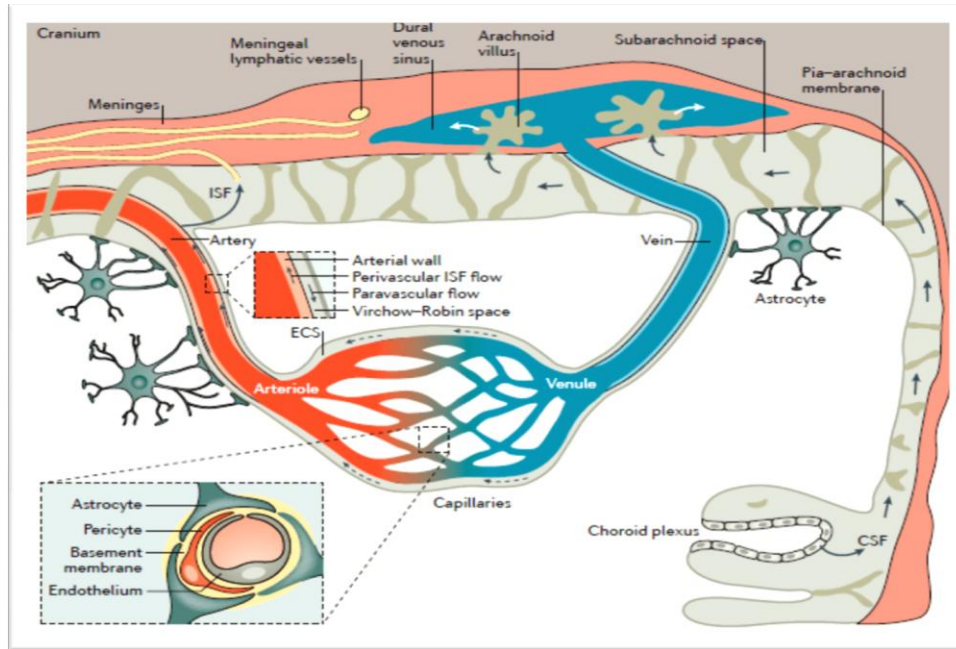
Ο ανθρώπινος εγκέφαλος είναι ένα όργανο υψηλών ενεργειακών απαιτήσεων, που καταλαμβάνει μόνο το 2% ολόκληρης της μάζας του σώματος (ή ~1.4 kg), αλλά δαπανά περίπου το 20% της συνολικής κατανάλωσης ενέργειας ενός μέσου ενήλικα κατά την ανάπαυση (ή ~20 W). Η εγκεφαλική αιματική ροή κατέχει καίριο ρόλο για την λειτουργία και την βιωσιμότητα του εγκεφάλου, καθώς είναι υπεύθυνη για την μεταφορά του οξυγόνου και των διαφόρων ενεργειακών υποστρωμάτων (κυρίως της γλυκόζης) και την απομάκρυνση των παραπροϊόντων του μεταβολισμού. Ο εγκέφαλος των θηλαστικών έχει αναπτύξει μηχανισμούς ρύθμισης της εγκεφαλικής αιματικής ροής. Οι πιο σημαντικοί μηχανισμοί είναι η νευροαγγειακή σύζευξη (neurovascular coupling) γνωστή και ως λειτουργική υπεραιμία (functional hyperaemia) και η εγκεφαλική αυτορρύθμιση (cerebral autoregulation).

Κατά την νευροαγγειακή σύζευξη εξασφαλίζεται η ταχεία αύξηση του ρυθμού ενεργοποίησης της εγκεφαλικής αιματικής ροής στις δομές του εγκεφάλου. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η ικανότητα αυξημένης παροχής εγκεφαλικής αιματικής ροής και οξυγόνου υπερβαίνει τις μεταβολικές απαιτήσεις και την κατανάλωση οξυγόνου στις ενεργές εγκεφαλικές θέσεις παρέχοντας μια μεγάλη κλίση για διάχυση του οξυγόνου σε κύτταρα του εγκεφάλου που βρίσκονται σε απομακρυσμένη θέση από τα τριχοειδή αγγεία (Fantini et al. 2016). Στην εγκεφαλική αυτορρύθμιση ο εγκέφαλος έχει την ικανότητα να διατηρεί σχετικά σταθερή την ροή αίματος παρά τις μεταβολές στην πίεση διάχυσης. Ο μηχανισμός αυτός υπάρχει σε πολλά αγγειακά συστήματα του οργανισμού, αλλά είναι ιδιαίτερα καλά ανεπτυγμένος στον εγκέφαλο, πιθανώς λόγω της ανάγκης για σταθερή παροχή αίματος και διατήρησης της ομοιόστασης του νερού.

Ο μηχανισμός της εγκεφαλικής αυτορρύθμισης δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένος και πιθανόν διαφοροποιείται κατά την αύξηση ή μείωση της πίεσης. Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της εγκεφαλικής αιματικής ροής καθώς περιέχει βασικά δομικά στοιχεία τα οποία φαίνεται να συμμετέχουν στον έλεγχο της (Cirolla et al. 2009). Πιο συγκεκριμένα, ο ανθρώπινος εγκέφαλος φαίνεται να περιέχει περίπου 644km των αιμοφόρων αγγείων τα οποία παρέχουν στα κύτταρα του εγκεφάλου οξυγόνο, ενεργούς μεταβολίτες, θρεπτικά συστατικά απομακρύνοντας το διοξείδιο του άνθρακα και άλλα άχρηστα παραπροϊόντα του μεταβολισμού από προς την συστηματική κυκλοφορία. Τα τριχοειδή αγγεία είναι τα μικρότερα αιμοφόρα αγγεία του εγκεφάλου τα οποία αποτελούν το 85% του συνολικού μήκους των εγκεφαλικών αγγείων.

Στον ενδοθηλιακό αιματοεγκεφαλικό φραγμό υπάρχουν στενές διακυτταρικές συνδέσεις, οι οποίες οδηγούν σε υψηλή δια-ενδοθηλιακή ηλεκτρική αντίσταση καθώς και χαμηλή παρακυτταρική και διακυτταρική διαπερατότητα. Η ενδοθηλιακή μονοστιβάδα αποτελείται

από περικύτταρα (pericytes), παρόντα στα τριχοειδή, και αγγειακά κύτταρα λείου μυός καθώς και από τα πόδια των αποφυάδων των αστροκυττάρων (astrocyte end-feet). Σε αντίθεση με την υψηλή ικανότητα διαπερατότητας των τριχοειδών της συστημικής κυκλοφορίας, τα εγκεφαλικά τριχοειδή, σε συνδυασμό με το στεγανές συνδέσεις (στενοδεσμούς) που υπάρχουν στο ενδοθήλιο, περιορίζουν την είσοδο των περισσότερων μορίων από το αίμα στο εγκεφαλο (Εικόνα 1). Στην επιφάνεια του ενδοθελίου του εγκεφάλου μπορεί να υπάρχουν υποδοχείς, οι οποίοι διευκολύνουν την είσοδο των μορίων αυτών μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Zenaro et al. 2017).



Εικόνα 1: Δομή Αιματοεγκεφαλικού Φραγμού (BBB). Τα τριχοειδή κατέχουν βασικό ρόλο στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Η τριχοειδική διατομή παρουσιάζει ένα στεγανό σφραγισμένο ενδοθήλιο, το οποίο μοιράζεται μια κοινή βασική μεμβράνη με τα περικύτταρα (pericytes) και τα άκρο-πόδια των αστροκυττάρων (astrocytic end-feet) γύρω από το τριχοειδές τοίχωμα. Η αρτηριακή διατομή εμφανίζει περιαγγειακή ροή του ενδιάμεσου υγρού (interstitial fluid (ISF)) μέσω του αρτηριακού τοιχώματος προς την αντίθετη κατεύθυνση της ροής αίματος. Επίσης θα μπορούσε να παρουσιαστεί και παρα-αγγειακή ροή με την ίδια κατεύθυνση με τη ροή αίματος. Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό παράγεται στο χοριοειδές πλέγμα (choroid plexus) ρέοντας από τις κοιλίες του εγκεφάλου στους υπαραχνοειδείς χώρους και έπειτα διοχετεύεται προς το μηνιγγικό λεμφικό σύστημα ή/και φλεβικό σύστημα μέσω των αραχνοειδών κοιλοτήτων. Η ανταλλαγή του ενδιάμεσου υγρού με το εγκεφαλονωτιαίο υγρό μπορεί να γίνει στις κοιλίες και στους υπαραχνοειδείς χώρους (Mcconnell et al. 2016)

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα του εγκεφάλου συνδέονται μεταξύ τους μέσω των στενοδεσμών (tight junctions) και συνδέσεων προσκόλλησης (adherens junctions). Οι στενοί σύνδεσμοι περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες: Occludin, Claudin 1, Claudin 2, Claudin 3, Claudin 5 και Claudin 12, τις μεμβρανικές γουανύλο-συσχετιζόμενες κινάσες (membrane-associated guanylate kinases), τις πρωτεΐνες των στενοσυνδέσμων (tight junctions proteins) ZO1, ZO2 and ZO3. Οι συνδέσεις προσκόλλησης αποτελούνται από καντερίνες (cadherins), από την διαμεμβρανική πρωτεΐνη CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM1))

καθώς και από τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (junctional adhesion molecules (JAMs)): JAMA, JAMB και JAMC. Λόγω των στενοσυνδέσμων ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός επιτυγχάνει χαμηλή παρακυτταρική διαπερατότητα και από υψηλή διαενδοθηλιακή ηλεκτρική αντίσταση.

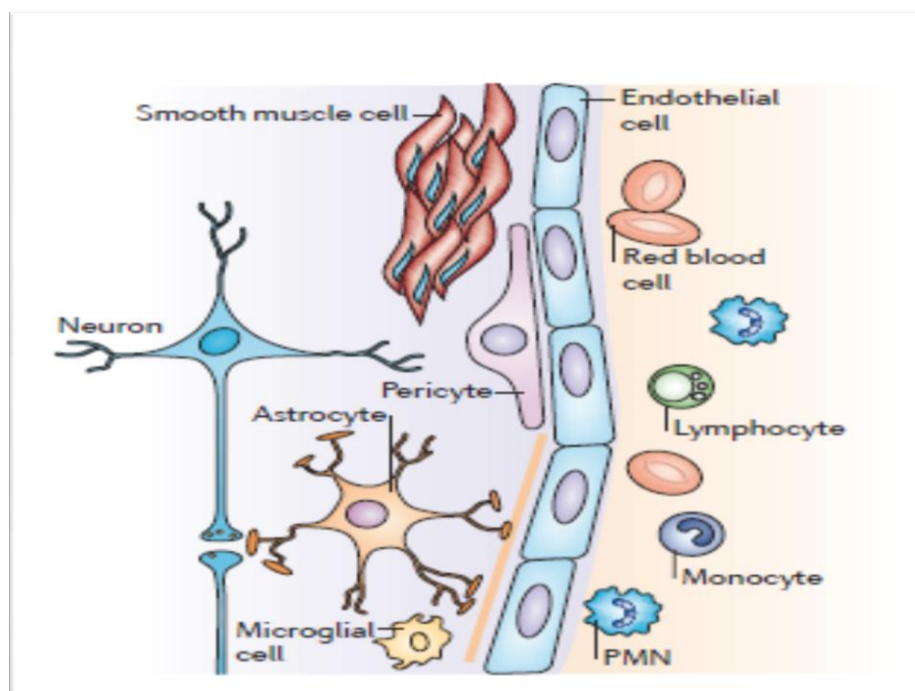
Οι μηχανισμοί με τους οποίους γίνεται η μεταφορά διαφόρων μορίων στο εγκεφαλικό ενδοθήλιο είναι οι εξής: 1) διαμεμβρανική διάχυση (transmembrane diffusion), 2) μεταφορά μέσω κάποιου φορέα κομιστή ή οδηγού (carrier-mediated transport) και 3) διακυτταρική μεταφορά μέσω κάποιου υποδοχέα (receptor-mediated transcytosis). Στην διαμεμβρανική διάχυση πραγματοποιείται παθητική μεταφορά μικρών λιποδιαλυτών μορίων με μοριακό βάρος < 400 Da ή μορίων με < 8 δεσμούς υδρογόνου, όπως είναι για παράδειγμα η αιθανόλη. Κατά την μεταφορά μέσω κάποιου φορέα κομιστή γίνεται ανταλλαγή μορίων κατά την κλίση συγκέντρωσης τους μέσω συγκεκριμένων μεμβρανικών πρωτεϊνικών φορέων. Αυτό τον τρόπο μεταφοράς χρησιμοποιούν οι υδατάνθρακες, τα λιπαρά οξέα, τα αμινοξέα, τα μονοκαρβοξυλικά οξέα, τα νουκλεοτίδια, οι ορμόνες, οι βιταμίνες καθώς και τα οργανικά ανιόντα και κατιόντα. Τέλος μέσω του μηχανισμού της διακυτταρικής μεταφοράς μέσω υποδοχέα πραγματοποιείται η μεταφορά μορίων με την χρήση μεμβρανικών υποδοχέων που συνδέονται με το συνδέτη (ligand) τους. Ο μηχανισμός αυτός επιτρέπει την διαμεμβρανική μεταφορά μορίων και προς τις δύο κατευθύνσεις: από το αίμα στον εγκέφαλο (πχ. ινσουλίνη) και το αντίστροφο (Zenaro et al. 2017).

1.2 Η φυσιολογία της Νευροαγγειακής Μονάδας (Neurovascular Unit, NVU)

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός (blood-brain barrier-BBB) συνίσταται από ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία μπορεί να είναι είτε ανοιχτά είτε κλειστά ανάλογα με την κατάσταση των πρωτεϊνών των στενοδεσμών, οι οποίες δημιουργούν έναν σταθερό φραγμό ο οποίος αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της Νευροαγγειακής Μονάδας (Neurovascular Unit) (Mcconnell et al. 2016). Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός είναι παράλληλα αρκετά δυναμικός, γεγονός που τον οδηγεί στο να έχει ένα μεγάλο εύρος διαπερατότητας, το οποίο ελέγχεται από ενδοκυτταρικά και διακυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων, των αστροκυττάρων και των νευρώνων, καθώς και από παρα-κυτταρικές αλλαγές του φραγμού.

Η Νευροαγγειακή Μονάδα αποτελείται από μια μονοστιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων (τα οποία συνδέονται μέσω των στενοδεσμών και ακουμπούν στην βασική μεμβράνη (basal lamina)), από γειτονικά κύτταρα (περικύτταρα και κύτταρα λείου μυός) και τέλος από τα πόδια των αστροκυτταρικών αποφυάδων (astrocytic end-feet), τα οποία καλύπτουν περισσότερο από το 98% του αγγειακού τοιχώματος και των τερματικών απολήξεων των νευρώνων (neuronal terminals). Ακόμη τα αστροκύτταρα επεκτείνουν αποφυάδες οι οποίες περιβάλλουν τις συνάψεις, δημιουργώντας έτσι μια γέφυρα επικοινωνίας μεταξύ της νευρωνικής δραστηριότητας και της παροχής οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών. Τέλος συστατικά της Νευροαγγειακής Μονάδας αποτελούν τα κυκλοφορόντα κύτταρα αίματος, όπως είναι τα πολυμορφοπύρρηνα (polymorphonuclear, PMN, cells), τα λεμφοκύτταρα (lymphocytes) και τα μονοκύτταρα (monocytes) τα οποία έχουν την ικανότητα της προσκόλλησης και της κύλισης στον αγγειακό αυλό (vascular lumen), ελέγχοντας με αυτόν

τον τρόπο την νευρωνική σηματοδότηση και την κυτταρική δραστηριότητα (**Εικόνα 2**) (Mcconnell et al. 2016)

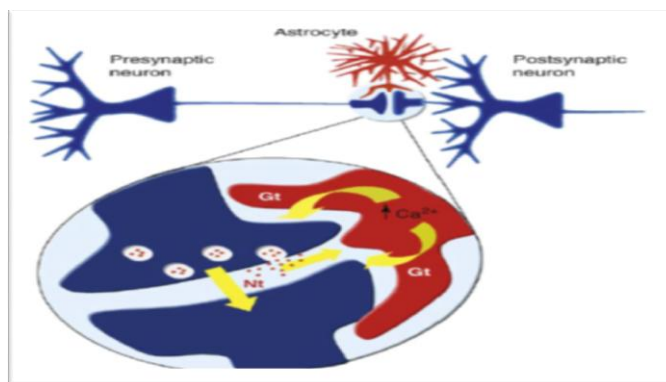


Εικόνα 2: Η Νευροαγγειακή Μονάδα (NVU). Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός είναι ένα σημαντικό κομμάτι της Νευροαγγειακής Μονάδας. Η Νευροαγγειακή Μονάδα περιλαμβάνει νευρώνες (neurons), κύτταρα γλοίας (glial cells) όπως είναι τα αστροκύτταρα (astrocytes) και τα μικρογλοιακά κύτταρα (microglial cells), τα οποία βρίσκονται κοντά στα ενδοθηλιακά κύτταρα (endothelial cells), στα περικύτταρα (pericytes) και στα λεία μυϊκά κύτταρα (smooth muscular cells)(Ballabh et al. 2004).

Τα κύτταρα του αίματος, κυρίως τα πολυμορφοπύρρηνα (PMN), τα μονοκύτταρα (monocytes) και τα λεμφοκύτταρα (lymphocytes), αλληλεπιδρούν με το αιματοεγκεφαλικό ενδοθήλιο, το οποίο αποτελεί αναπόσπαστο τμήμα της μονάδας. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των κυτταρικών συστατικών και της ενδοκυτταρικής και διακυτταρικής σηματοδότησης ρυθμίζουν την λειτουργία της Νευροαγγειακής Μονάδας για την διατήρηση της ομοιόστασης ή ως απόκριση στην φλεγμονή και στην ασθένεια. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα της Νευροαγγειακής Μονάδας εμφανίζουν υψηλή πόλωση, με διαφορετικές μεμβρανικές πρωτεΐνες στις εσωτερικές και εξωτερικές επιφάνειες του αγγείου. Οι επιφάνειες αυτές περιλαμβάνουν διάφορους υποδοχείς, ένζυμα και μεταφορείς που υποστηρίζουν τις λειτουργίες αυτού του κυτταρικού φραγμού της Νευροαγγειακής Μονάδας. Για παράδειγμα ο ενδοθηλιακός φραγμός συμμετέχει στην μεταφορά ιόντων, θρεπτικών και φαρμάκων μέσω μεταφορέων στην αιματοεγκεφαλική επιφάνεια. Ακόμη συμμετέχει σε υψηλά εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις με κύτταρα του αίματος, με συστατικά της βασικής μεμβράνης καθώς και με υποκείμενα κύτταρα (πχ. οι αποφυάδες των αστροκυττάρων, οι τερματικές απολήξεις νευρώνων), μέσω συγκεκριμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών υποδοχέων του πλάσματος. Τέλος, τα αστροκύτταρα και τα περικύτταρα κατέχουν τους δικούς τους μεταφορείς, κανάλια, υποδοχείς και μηχανισμούς σηματοδότησης, που συντονίζουν τον υποστηρικτικό ρόλο της Νευροαγγειακής Μονάδας στην λειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Τα τελευταία χρόνια στον επιστημονικό χώρο δημιουργήθηκε η ιδέα της ύπαρξης της **τριμερούς σύναψης** (tripartite synapse) η οποία οδήγησε τους επιστήμονες να συμπεριλάβουν την επίδραση της γλοίας στην συναπτική λειτουργία. Στην μικροκυκλοφορία του εγκεφάλου, οι τριμερείς συνάψεις ενορχηστρώνονται από προ- και μετα-συναπτικά τερματικά (pre- and postsynaptic endings), τα οποία μαζί με την συγγενή γλοία τους, είναι δομικά και λειτουργικά συνδεδεμένα με τον αυλό του τριχοειδούς του εγκεφάλου, σχηματίζοντας έτσι την δομή της Νευροαγγειακής Μονάδας (Mcconnell et al. 2016).

Τα αστροκύτταρα κατέχουν σημαντικό ρόλο στην τριμερή σύναψη, καθώς ρυθμίζουν την σταθερότητα, την δυναμικότητα και την ωρίμανση των δενδριτικών ακάνθων των νευρώνων. Ακόμη συμμετέχουν στην ρύθμιση της συναπτικής πλαστικότητας και μεταβίβασης. Ο όρος της τριμερούς σύναψης δόθηκε για να τονίσει την στενή εγγύτητα των διακλαδώσεων των αστροκυττάρων με τα προ- και μετά-συναπτικά νευρωνικά στοιχεία (**Εικόνα 3**) (Perea et al. 2009).



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση της τριμερούς σύναψης. Κατά την συναπτική νευροδιαβίβαση (synaptic neurotransmission) τα αστροκύτταρα απελευθερώνουν ασβέστιο ως απόκριση στην απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών κατά την συναπτική δραστηριότητα και κατ'επέκταση ελέγχουν την νευρωνική διέγερση και την συναπτική μετάδοση μέσω της Ca-εξαρτώμενης απελευθέρωσης των γλοιδιαβιβαστών (gliotransmitters) (Perea et al. 2009).

Πιο συγκεκριμένα στην τριμερή σύναψη, η ανταλλαγή ξεκινά με την απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών από την προ-συναπτική σχισμή (pre-synaptic cleft), που σηματοδοτεί την ενεργοποίηση των μεταβολοτροπικών ή ιονοτροπικών υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια του αστροκυττάρου. Οι νευροδιαβιβαστές όπως το γλουταμικό, η νοροαδρεναλίνη, η ισταμίνη και η ακετυλοχολίνη είναι ικανοί να προσδένονται στους υποδοχείς του αστροκυττάρου, οδηγώντας μ' αυτόν τον τρόπο σε παροδική αύξηση των επιπέδων ασβεστίου εντός του κυττάρου, η οποία είναι εξαρτώμενη από την ένταση της συναπτικής δραστηριότητας (Perea et al. 2009).

Τέλος νέα ευρήματα δείχνουν ότι τα αστροκύτταρα επεξεργάζονται συναπτικές πληροφορίες από γειτονικές συνάψεις, καθώς ανταποκρίνονται στην συναπτική δραστηριότητα, μέσω της αύξησης των επιπέδων του ασβεστίου, υποστηρίζοντας με αυτό τον τρόπο ότι τα αστροκύτταρα δεν περιορίζονται μόνο στο να παρέχουν τις κατάλληλες

περιβαλλοντικές συνθήκες για την νευρωνική λειτουργία και δραστηριότητα (Perea et al. 2009)

1.2.1 Εγκεφαλικά ενδοθηλιακά κύτταρα της Νευροαγγειακής Μονάδας

Όπως προαναφέρθηκε, βασικό δομικό στοιχείο της Νευροαγγειακής Μονάδας (NVU) είναι και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο ρόλος των κυττάρων αυτών είναι να προστατεύουν τον εγκέφαλο από συστηματικές επιδράσεις περιορίζοντας τους μηχανισμούς μεταφοράς του ενδοκυτταρικού και παρακυτταρικού συστήματος. Η ύπαρξη των στενοσυνδέσμων και των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων αποτελούν το φυσικό φράγμα μέσω του οποίου παρεμποδίζεται η παρακυτταρική διάχυση των ιόντων, των μακρομορίων και των πολικών διαλυτών. Οι στενοσύνδεσμοι αποτελούνται από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, τις Occludin και Claudins καθώς και από κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, οι οποίες προσδένουν τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με τον κυτταροσκελετό ακτίνης (Stamatovic et al. 2008).

Ο ενδοθηλιακός κυτταροσκελετός των ενδοθηλιακών κυττάρων του εγκεφάλου κατέχει καίριο ρόλο στην διατήρηση της ακεραιότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Τα κύρια δομικά στοιχεία του κυτταροσκελετού είναι τα ινίδια ακτίνης, τα ενδιάμεσα ινίδια και μικροσωληνίσκοι. Το σύστημα των ινιδίων ακτίνης συνδέεται με μόρια κυτταρικής προσκόλλησης όπως είναι οι Cadherin ή Occludin, γλυκοπρωτεϊνικά συστατικά καθώς και λειτουργικές ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες όπως οι Zonula Occludens (ZO).

Ένα δεύτερο στοιχείο της κυτταροσκελετικής δομής των ενδοθηλιακών κυττάρων του εγκεφάλου είναι το σύστημα των μικροσωληνίσκων. Τα πολυμερή α και β τουμπουλίνης σχηματίζουν ένα δίκτυο πλέγματος που καλύπτει τα κύτταρα από τους πυρήνες προς την περιφέρεια. Οι μικροσωληνίσκοι κατέχουν ενεργό ρόλο στην συναρμολόγηση των ινιδίων ακτίνης καθώς και στην μετανάστευση των λευκοκυττάρων.

Τέλος τα ενδιάμεσα ινίδια είναι το τρίτο στοιχείο που συμμετέχει στην δομή του κυτταροσκελετού. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν την βιμεντίνη (Vimentin), πρωτεΐνη που ανήκει στην κατηγορία των ενδιάμεσων ινιδίων. Ο πιθανός ρόλος αυτών των ινιδίων στις κυτταροσκελετικές μεταβολές παραμένει ασαφής. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν δυναμικές αλλαγές της βιμεντίνης κατά την αναδιοργάνωση των ινιδίων ακτίνης και των μικροσωληνίσκων (Stamatovic et al. 2008).

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα του εγκεφάλου εκτός από ένα φυσικό φράγμα αποτελούν και ένα φράγμα μεταφοράς μεταξύ του αίματος και του εγκεφάλου παρόμοιο μ'αυτό των κυτταρικών επιφανειών σε όλο το σώμα. Οι αυλικές και κοιλιακές (luminal και οι abluminal) μεμβράνες των εγκεφαλικών ενδοθηλιακών κυττάρων χαρακτηρίζονται από πολωμένη έκφραση μεταφορέων, ενζύμων που αποκοιδομούν μεταβολίτες, από υποδοχείς, από διαύλους ιόντων και από μεταφορείς ιόντων. Μ' αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται ότι τα θρεπτικά συστατικά όπως γλυκόζη, αμινοξέα, νουκλεοτίδια και ηλεκτρολύτες παρέχονται στον εγκέφαλο από το αίμα και ότι οι διαλυμένες ουσίες και τα παραπροϊόντα του μεταβολισμού εκρέουν από τον εγκέφαλο στο αίμα. Η εξειδίκευση αυτών των

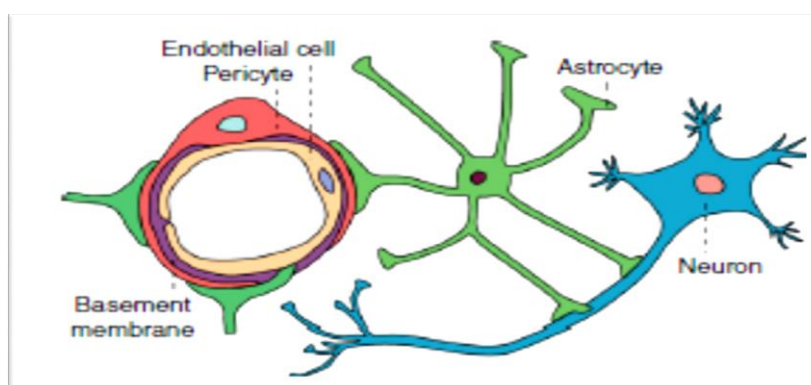
ενδοθηλιακών κυττάρων αντανακλά στις απαιτήσεις που έχει ένα όργανο το οποίο χρειάζεται ομοιοστατικά σταθερό ιονικό περιβάλλον (Mcconnell et al. 2016)

Υπό φυσιολογικές συνθήκες το ενδοθήλιο βρίσκεται στην αντιθρομβωτική του κατάσταση μέσω της δράσης της θρομβίνης στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων (Wu et al. 1996). Πιο συγκεκριμένα η θρομβίνη είναι προσδεσμένη με την θρομβοντουλίνη, διασπώντας την πρωτεΐνης C στην ενεργή της μορφή, μέσω της οποίας καταστέλλεται η ενεργοποίηση των παραγόντων πήξης Va και VIIIa (Dahlback et al. 2005). Σε συνθήκες νευροφλεγμονής και σήψης το ενδοθήλιο οδηγεί σε μειωμένη έκφραση των αντιθρομβωτικών μορίων όπως είναι η θρομβοντουλίνη, μεταβάλλοντας με αυτό τον τρόπο την δράση της θρομβίνης προς την διάσπαση του ινωδογόνου και στην δημιουργία θρόμβων, επάγοντας την προθρομβωτική κατάσταση του ενδοθηλίου (Pawlinski et al. 2004). Η χορήγηση του λιποπολυσακχαρίτη φαίνεται να επάγει άμεσα την προθρομβωτική αυτή κατάσταση μέσω της υπερέκφρασης του NFκΒ μονοπατιού στο ενδοθήλιο, συμβάλλοντας έτσι στην δημιουργία διάχυτης ενδοαγγειακής θρόμβωσης, η οποία αποτελεί χαρακτηριστικό της σηψής (Parry G. et al. 1995). Επίσης η έγχυση του λιποπολυσακχαρίτη συμβάλλει στην δυσλειτουργία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, μέσω της ενεργοποίησης των κασπασών, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την διάσπαση των πρωτεϊνών σύνδεσης, που εμπλέκονται στην ρύθμιση της μεταφοράς διαφόρων μορίων μεταξύ του αγγειακού χώρου και του ιστού (Bannerman et al. 1998). Επομένως η χρήση του λιποπολυσακχαρίτη ως πειραματικό μοντέλο για την μελέτη των δομικών στοιχείων της Νευροαγγειακής Μονάδας είναι ιδιαίτερα σημαντική.

1.2.2 Περικύτταρα και Μυοκύτταρα

Η Νευροαγγειακή Μονάδα (NVU) εκτός από ενδοθηλιακά κύτταρα αποτελείται από περικύτταρα και μυοκύτταρα. Τα περικύτταρα περιγράφηκαν για πρώτη φορά από τον Rouget το 1873 και από τότε αποκαλούνταν Rouget cells. Το 1923 τα κύτταρα αυτά μετονομάστηκαν ως περικύτταρα από τον Zimmermann, καθώς εντοπίζονται στο περιαγγειακό χώρο των αγγείων του εγκεφάλου. Ο πληθυσμός των περικυττάρων του εγκεφάλου παρουσιάζει ετερογένεια (Elali et al. 2014).

Ως ώριμα περικύτταρα καλούνται τα κύτταρα που βρίσκονται ενσωματωμένα στην βασική μεμβράνη των μικρών αιμοφόρων αγγείων συμπεριλαμβανομένων των τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων, τα προ-τριχοειδών αρτηρίδιων και των μετα-τριχοειδών φλεβίδων (**Εικόνα 4**). Τα περικύτταρα εκφράζουν πολλές κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες (πχ. A-Smooth Muscle Actin, Vimentin, Desmin, Myosin και Nestin), αντιγόνα κυτταρικής επιφανείας (πχ. transmembrane chondroitin sulfate proteoglycan NG2, platelet- derived growth factor receptor- β (PDGFR β), aminopeptidases A and N, regulator of G-protein signalling-5 RGS5 καθώς και την γλυκοπρωτεΐνη κυτταρικής επιφανείας MUC18.



Εικόνα 4: Ο λειτουργικός ρόλος των περικυττάρων στην NVU. Στην εικόνα απεικονίζεται το διαδραστικό κυτταρικό δίκτυο σε επίπεδο εγκεφαλικών αρτηριδίων το οποίο περιλαμβάνει αγγειακά κύτταρα, γλοιακά κύτταρα και νευρώνες (Elali et al. 2014).

Ο ρόλος των περικυττάρων στην λειτουργία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού είναι ιδιαίτερα σημαντικός καθώς τα κύτταρα αυτά ρυθμίζουν την διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, την αγγειογένεση, την εκκαθάριση (clearance), την αιματοεγκεφαλική ροή (cerebral blood flow, CBF), την νευροφλεγμονή και την ενεργότητα των νευρικών βλαστικών κυττάρων.

Ως προς την διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, τα περικύτταρα ελέγχουν την έκφραση των πρωτεϊνών των στενοσυνδέσμων και των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης των ενδοθηλιακών κυττάρων της Νευροαγγειακής Μονάδας. Ωστόσο, τα μοριακά μονοπάτια που είναι υπεύθυνα για το άνοιγμα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού με σκοπό την μεταφορά νευρο-φαρμακευτικών προϊόντων καθώς και για την αναστροφή

του σπασίματος του φραγμού αυτού σε διάφορες νευρολογικές διαταραχές παραμένουν σε μεγάλο βαθμό ακόμα άγνωστα.

Ακόμη τα περικύτταρα ρυθμίζουν την αγγειογένεση, την μικρο-αγγειακή σταθερότητα και την αρχιτεκτονική των αγγείων κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του κεντρικού νευρικού συστήματος καθώς και κατά την αγγειακή ανάπλαση. Επίσης τα περικύτταρα έχουν την ικανότητα να δρουν ως περιαγγειακά μακροφάγα για να απομακρύνουν υπολείμματα από ιστούς και πρωτεΐνες εισβολείς οι οποίες εισβάλουν συστηματικά ή τοπικά στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Τα περικύτταρα συμμετέχουν και στην απομάκρυνση των αμυλοειδών-β πεπτιδίων που ναι υπεύθυνα για την νόσο του Alzheimer.

Πρόσφατες μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια δείχνουν ότι τα περικύτταρα ελέγχουν την κύλιση των λευκοκυττάρων πάνω στα ενδοθηλιακά κύτταρα και την μετανάστευσή τους μέσα στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Μελέτες σε αγρίου τύπου ποντίκια δείχνουν ότι για την αύξηση της μεταφοράς των λευκοκυττάρων σε περιοχές της μικρο-κυκλοφορίας στο ΚΝΣ είναι απαραίτητη η έλλειψη της κάλυψης των κυττάρων αυτών από περικύτταρα. Άρα απ' όλα αυτά τα ευρήματα συμπεραίνεται ότι η ανοσολογική απόκριση των περικυττάρων του εγκεφάλου πιθανώς να συμβάλλει στην επικοινωνία φλεγμονωδών σημάτων με την Νευροαγγειακή Μονάδα. Τέλος μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε πρωτογενή περικύτταρα που έχουν απομονωθεί από τον εγκέφαλο μετά από ισχαιμικό τραύμα υποδηλώνουν ότι τα κύτταρα αυτά έχουν ένα δυναμικό πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε νευρικά κύτταρα και κύτταρα αγγειακής σειράς (Sweeney et al.2016).

Καίριο ρόλο στην λειτουργία της Νευροαγγειακής Μονάδας διαδραματίζουν και τα μυοκύτταρα. Τα μυοκύτταρα αναγνωρίζονται ως κύριοι τελεστές στην διάμετρο των μεγάλων αγγείων και η βασική κατάσταση της συσταλτικότητας τους, η οποία διατηρείται από την ισορροπία του ασβεστίου και του καλίου που απελευθερώνεται από τους νευρώνες, μπορεί να τροποποιηθεί γρήγορα, ανάλογα με την σηματοδότηση που δέχονται από τα αστροκύτταρα (Haydon et al. 2006).

Επιπρόσθετα, υπό φυσιολογικές συνθήκες τα περικύτταρα βρίσκονται σε επαφή με τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Κατά την χορήγηση του λιποπολυσακχαρίτη παρατηρείται αύξηση των επιπέδων των υποδοχέων της Προσταγλανδίνης E (Prostaglandin – E) στα περικύτταρα, οδηγώντας στην απελευθέρωση των μεταλλοπρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την απώλεια της επικοινωνίας των περικυττάρων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα (Alvarez et al. 2007). Ακόμη, πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η έγχυση του λιποπολυσακχαρίτη οδηγεί στην μείωση της επαφής των περικυττάρων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω της διαταραχής των σηματοδοτικών μονοπατιών Sirt3/angiopoietins/Tie-2 και HIF-2a/Notch3 (Zeng et al. 2016). Άρα το μοντέλο του LPS αποτελεί σημαντικό πειραματικό εργαλείο για την μελέτη των διαταραχών της Νευροαγγειακής Μονάδας υπό νευροφλεγμονώδη συνθήκες.

1.2.3 Βασική Μembrάνη

Η βασική μεμβράνη λειτουργεί ως ένα υποστηρικτικό υπόστρωμα για τα επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα, το οποίο αποτελείται από ένα σύμπλεγμα εξωκυτταρικών πρωτεϊνών, χωρίζοντας τα κύτταρα αυτά από τον υποκείμενο ιστό. Στο κεντρικό νευρικό σύστημα η βασική αγγειακή μεμβράνη χωρίζει τα ενδοθηλιακά κύτταρα από τους νευρώνες και τα κύτταρα γλοίας και συνάμα συμβάλλει στην ανάπτυξη των αγγείων καθώς και στον σχηματισμό και στην διατήρηση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού.

Η βασική μεμβράνη έχει πάχος 20-200nm και αποτελείται από ένα τρισδιάστατο πρωτεϊνικό δίκτυο. Το δίκτυο αυτό συντίθεται από πρωτεΐνες οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια κύριων γλυκοπρωτεϊνών όπως είναι οι λαμινίνες (laminins), ισομορφές του κολλαγόνου τύπου IV (collagen IV isoforms), θειομένες μονομερείς γλυκοπρωτεΐνες (nidogens) και πρωτεογλυκάνες (HSPG). Ακόμη ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο βρίσκεται ο οργανισμός, η βασική μεμβράνη εκφράζει διαφορετικές πρωτεΐνες πχ. Fibulin 1 και 2, Collagen Type XVIII, Thrombospondins 1 και SPARC (Secreted Protein Acidic And Rich In Cysteine).

Η βασική αγγειακή μεμβράνη, δομικά, συνίσταται από δυο διαφορετικές μεμβράνες, την ενδοθηλιακή και την παρεγχυματική κυτταρική μεμβράνη. Ο ρόλος των δύο αυτών μεμβρανών είναι στην διατήρηση της ενσωμάτωσης των εγκεφαλικών τριχοειδών των ενδοθηλιακών κυττάρων με τα περικύτταρα και τα αστροκύτταρα. Αυτοί οι τρεις κυτταρικοί τύποι προσκολλώνται στην βασική μεμβράνη με συγκεκριμένα μέλη της οικογένειας υποδοχέων ιντεγκρίνης ή δυστρογλυκάνης, διατηρώντας με αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα στην φυσική τους θέση. Η δυστρογλυκάνη αποτελείται από μια γλυκοζυλιωμένη εξωκυτταρική α-υπομονάδα και από μία διαμεμβρανική β-υπομονάδα. Η α-ισομορφή δυστρογλυκάνης είναι υπεύθυνη για την σύνδεση με τις πρωτεΐνες της βασικής μεμβράνης ενώ η β-ισομορφή συνδέει την α-ισομορφή με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Από διάφορες πειραματικές μελέτες που έχουν γίνει στον εγκέφαλο ενήλικου ποντικού η δυστρογλυκάνη εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα περιαγγειακά αστροκύτταρα καθώς και στα πόδια των αποφυάδων αυτών (Thomsen et al. 2017).

Ένας από τους βασικούς λειτουργικούς ρόλους της αγγειακής βασικής μεμβράνης είναι η ικανότητα της να συνδέεται με τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF) και με τον β αυξητικό παράγοντα ινοβλαστών (bFGF). Επίσης μέσω της αγγειακής βασικής μεμβράνης τα διάφορα μόρια και υγρά εισέρχονται ή εξέρχονται από τον εγκέφαλο. Ακόμη η παρεγχυματική βασική μεμβράνη λειτουργεί ως φυσικός φραγμός στην διήθηση των λευκοκυττάρων.

Σε διάφορες νευροπαθολογικές ασθένειες η βασική αγγειακή μεμβράνη φαίνεται να παρουσιάζει αλλαγές στο κομμάτι της μοριακής της σύνθεσης. Για παράδειγμα στην περίπτωση του τραύματος οι πρωτεΐνες της βασικής μεμβράνης κατακερματίζονται οδηγώντας σε απώλεια της ακεραιότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Οι μηχανισμοί οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τις διάφορες δομικές αλλαγές της βασικής μεμβράνης είναι ακόμη υπό διερεύνηση. Η κατανόηση των μηχανισμών αυτών κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική

καθώς μπορεί να περιοριστούν οι αιμορραγικές συνέπειες που παρατηρούνται κατά το σπάσιμο του αιματοεγκεφαλικού φραγμού σε διάφορες νευροεκφυλιστικές νόσους (Thomsen et al. 2017).

Διάφορες μελέτες στις οποίες έχει πραγματοποιηθεί έγχυση του λιποπολυσακχαρίτη παρατηρήθηκε κατακερματισμός του γλυκοκάλυκα, ο οποίος ανήκει στην οικογένεια των πρωτεογλυκανών που συνθέτουν την δομή της βασικής μεμβράνης (Wiesinger et al. 2013). Ο κατακερματισμός αυτός είναι αποτέλεσμα της έκκρισης μεταλλοπρωτεϊνών καθώς και διαφόρων προ-φλεγμονωδών μορίων (Dimova et al. 2012). Επομένως, η έγχυση του λιποπολυσακχαρίτη είναι ένα καίριο εργαλείο για την ρόλο της Νευροαγγειακής Μονάδας σε συνθήκες νευροφλεγμονής.

1.2.4 Νευρώνες και Διάμεσοι Νευρώνες

Οι νευρώνες είναι υπεύθυνοι για την έναρξη της τοπικής αγγειακής απόκρισης. Αυτό το επιτυγχάνουν ρυθμίζοντας το εγκεφαλονωτιαίο υγρό μέσω της δημιουργίας σημάτων, τα οποία δρουν τοπικά στα αιμοφόρα αγγεία με σκοπό την επαγωγή της αγγειακής απάντησης.

Η γλουταματεργική συναπτική δραστηριότητα ενεργοποιεί τους μετα-συναπτικούς υποδοχείς N-methyl-D-aspartate (NMDA) και α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA). Η ενεργοποίηση των συγκεκριμένων υποδοχέων οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων του ενδοκυτταρικού ασβεστίου Ca^{+2} και κατ' επέκταση σε ενεργοποίηση των ασβεστο-εξαρτώμενων ενζύμων neuronal NO synthase (nNOS) και cyclooxygenase 2 (COX-2) τα οποία παράγουν ισχυρά αγγειοδιασταλτικά μόρια (NO και prostanoïd, αντίστοιχα). Παράλληλα το γλουταμικό δρα ως μεταβοτροφικός υποδοχέας στα αστροκύτταρα, διεγείροντας την αύξηση των επιπέδων του Ca^{+2} στα κύτταρα αυτά καθώς και την παραγωγή αγγειοδραστικών μορίων (Iadecola C. 2017).

Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν ότι και οι διάμεσοι νευρώνες (interneurons) πιθανόν να κατέχουν καίριο ρόλο στην Νευροαγγειακή μονάδα. Οι διάμεσοι νευρώνες τροφοδοτούν την NVU με νευροδιαβιβαστές (neurotransmitters) και με νευρορρυθμιστές (neuromodulators), οι οποίοι επιδρούν στα μικροαγγεία (microvessels) του εγκεφάλου. Στον φλοιό του εγκεφάλου και στην παραγκεφαλίδα κατασταλτικοί διάμεσοι νευρώνες είναι ικανοί να τροποποιούν την διάμετρο των αγγείων σε τομές εγκεφάλου μέσω του αγγειοσυσταλτικού μορίου νευροπεπτιδίου Y (NPY) ή του αγγειοδιασταλτικού μορίου NO.

Ακόμη ένας άλλος τρόπος με τον οποίο οι νευρώνες φαίνεται να εμπλέκονται στην λειτουργία της Νευροαγγειακής Μονάδας είναι μέσω των νευροαγγειακών προβολών (neurovascular projections) οι οποίες προέρχονται από τους υποφλοιώδεις πυρήνες (subcortical nuclei). Η υπομέλανα ουσία, οι ραφές και ο πρόσθιος εγκέφαλος εκτείνουν διάχυτες αδρενεργικές, σεροτονινεργικές και χολινεργικές προβολές στον φλοιό. Οι προβολές αυτές καταλήγουν στα endfeet των περιαγγειακών αστροκυττάρων του εγκεφάλου, ρυθμίζοντας έτσι την εγκεφαλική αιμάτωση. Πιο συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση του χολινεργικού συστήματος του πρόσθιου εγκεφάλου αυξάνει την διάχυση του neocortical εγκεφαλονωτιαίου υγρού, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της

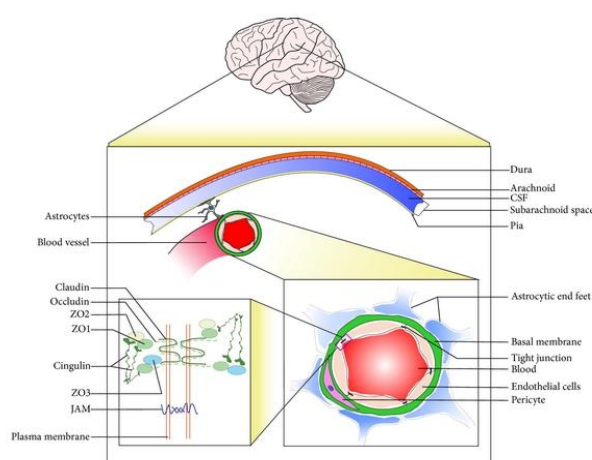
ακετυλοχολίνης και την παραγωγή ενδοθηλιακού NO καθώς και την έκφραση της COX-2 από τα pyramidal cells και τους GABAεργικούς διάμεσους νευρώνες (GABAergic interneurons). Τα επίπεδα της νορεπινεφρίνης του φλοιού εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την νοραδρενεργική νεύρωση, οδηγώντας στην αύξηση της αγγειοσυσταλτικής τάσης στον φλοιό καθώς και στην παροχή οξυγόνου στην ενεργοποιημένη περιοχή. Επομένως οι νευροαγγειακές οδοί δεν ρυθμίζουν μόνο την αγγειοδιαστολή ως απόκριση στην ενεργοποίηση αλλά συμβάλλουν στην διαμόρφωση των χωρικών και χρονικών χαρακτηριστικών της αιμοδυναμικής απάντησης (Iadecola C. 2017).

Αναφορικά με την συμμετοχή των περιαγγειακών νευρών (perivascular nerves) που προέρχονται από τα γάγγλια του κρανίου στην λειτουργία της Νευροαγγειακής Μονάδας λίγα πράγματα είναι γνωστά. Μελέτες, στις οποίες έχει γίνει απενεργοποίηση της συμπαθητικής και της παρασυμπαθητικής νεύρωσης μέσω της χορήγησης κάποιου φαρμάκου, φαίνεται ότι το μέγεθος της αρτηριακής διαστολής που προκαλείται απ' την σωματοαισθητηριακή ενεργοποίηση δεν επηρεάζεται. Ο ρόλος των νευρών αυτών είναι σημαντικός καθώς συμβάλλουν στην προστασία των αιμοφόρων αγγείων από την υποχρεωτική αγγειοδιαστολή κατά την διάρκεια των επιληπτικών κρίσεων ή της οξείας υπέρτασης. Ακόμη τα νεύρα αυτά συμμετέχουν στην ανάπτυξη και στην ακεραιότητα του αγγειακού φραγμού, παρέχοντας διαφορετικά μοριακά σήματα. Τέλος ο ρόλος των περιαγγειακών νευρών στον συγχρονισμό των αιμοδυναμικών σημάτων του εγκεφάλου είναι σημαντικός αλλά χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση για την κατανόηση της λειτουργίας του (Iadecola C. 2017).

Οι νευρώνες από διάφορες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με την χορήγηση του λιποπολυσακχαρίτη υφίστανται τροποποιήσεις. Πιο συγκεκριμένα ο λιποπολυσακχαρίτης οδηγεί στην έκφραση της εψιδίνης από τα αστροκύτταρα η οποία ρυθμίζεται από την IL-6 που εκκρίνουν τα μικρογλοιακά κύτταρα. Η απελευθέρωση της εψιδίνης από τα αστροκύτταρα είναι υπεύθυνη για την απόπτωση των νευρώνων λόγω της συσσώρευσης σιδήρου (You et al. 2017). Ακόμη σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες της περιοχής Nigra στους οποίους έγινε έγχυση του λιποπολυσακχαρίτη παρατηρήθηκε απώλεια των νευρώνων (Arai et al. 2010). Τέλος, μετά την χορήγηση του λιποπολυσακχαρίτη στην περιοχή του υποκάμπου παρατηρήθηκε δημιουργία νέων νευρώνων στον υποκάμπο (Chugh et al. 2013). Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα τονίζουν την σημαντικότητα της χρήσης του λιποπολυσακχαρίτη ως πειραματική προσέγγιση για την μελέτη της Νευροαγγειακής Μονάδας.

1.2.5 Στενοσύνδεσμοι

Οι στενοσύνδεσμοι είναι υπεύθυνοι για την επικοινωνία μεταξύ των γειτονικών επιθηλιακών κυττάρων και έχουν ως κυρίες λειτουργίες τον έλεγχο της παρακυτταρικής διέλευσης ιόντων μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς και το να εμποδίζουν την ανάμιξη των μεμβρανικών πρωτεϊνών της κορυφαίας και βασεοπλαγικής μεμβράνης. Οι στενοσύνδεσμοι συνίστανται από δύο τύπους διαμεμβρανικών πρωτεϊνών: Occludin και Claudin, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τις δύο παραπάνω βασικές λειτουργίες καθώς και τις συσχετιζόμενες με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες οι οποίες συνδέουν τους στενοσυνδέσμους με τον κυτταροσκελετό ακτίνης καθώς και με τους συνδέσμους προσκόλλησης (**Εικόνα 5**) (Hartsock et al. 2008).



Εικόνα 5: Δομή των στενοσυνδέσμων: Στην εικόνα απεικονίζονται τα πρωτεϊνικά στοιχεία που συνθέτουν τους στενοσυνδέσμους (Claudin 3, Claudin 5, Zo-1, Occludin, JAM)(Bhowmik et al. 2015).

Οι πρωτεΐνες Occludin έχουν μοριακό βάρος 65kDa και χαρακτηρίζονται από δύο εξωκυτταρικούς βρόγχους (Furuse et al. 1993). Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούνται από δύο ισομορφές οι οποίες προκύπτουν από εναλλακτικούς τρόπους ματίσματος του mRNA (Muresan et al. 2000). Επιπρόσθετα, η τοπολογία των πρωτεϊνών Occludin στους στενοσυνδέσμους ρυθμίζεται από την φωσφορυλίωση των επιθηλιακών καθώς και των ενδοθηλιακών κυττάρων (Sakakibara et al. 1997). Οι μη φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες Occludin βρίσκονται τόσο στην βασεοπλαγική μεμβράνη όσο και σε κυτταροπλασματικά κυστίδια, σε αντίθεση με τις φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες Occludin οι οποίες εντοπίζονται μόνο στους στενοσυνδέσμους. Διάφορες κινάσες και φωσφατάσες είναι υπεύθυνες για τον έλεγχο της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών Occludin και κατ' επέκταση της τοπολογίας τους και της λειτουργίας τους στους στενοσυνδέσμους (Chen et al. 2002). Για παράδειγμα η πρωτεϊνική κινάση C (Protein Kinase C, PKC) επάγει την αύξηση των επιπέδων των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών Occludin και την τοπολογία τους στους στενοσυνδέσμους (Andreeva et al. 2006). Τέλος, οι εξωκυτταρικές περιοχές των πρωτεϊνών Occludin φαίνεται να ρυθμίζουν την τοπολογία τους στους στενοσυνδέσμους και τον έλεγχο της παρακυτταρικής διαπερατότητας του φραγμού που δημιουργούν οι στενοσύνδεσμοι μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων (Wong et al. 1997).

Ακόμη οι πρωτεΐνες Claudin χαρακτηρίζονται από ένα εύρος μοριακού βάρους 20-27 kDa και έχουν και αυτές δύο εξωκυτταρικούς βρόγχους (Schneeberger et al. 2004). Ο ρόλος των πρωτεϊνών Claudin είναι η σύνδεση των πρωτεϊνών Occludin με τους στενοσυνδέσμους. Εν συνεχεία, οι πρωτεΐνες Claudin λειτουργούν ως παρακυτταρικά κανάλια των στενοσυνδέσμων τα οποία κατέχουν τις παρόμοιες βιοφυσικές ιδιότητες με αυτές των κλασικών καναλιών ιόντων, περιλαμβάνοντας την εκλεκτικότητα του φορτίου ιόντων, την εξαρτόμενη από την διαπερατότητα συγκέντρωση ιόντων καθώς και τον έλεγχο της διόδου διαπερατών μορίων στους στενοσυνδέσμους (Furuse et al. 1998). Επίσης, οι πρωτεΐνες Zonula Occludin (ZO) ανήκουν στα δομικά συστατικά των στενοσυνδέσμων. Πιο συγκεκριμένα οι πρωτεΐνες ZO-1, ZO-2 και ZO-3 είναι μέλη της οικογένειας που σχετίζεται με μεμβρανικά ομόλογα γουανυλικής κινάσης (Membrane Associated Guanylate Kinase Homologs, MAGUK), οι οποίες προσδένονται σε περιοχές στενοσυνδέσμων, συνδέσμων προσκόλλησης καθώς και με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης (Funke et al. 2005). Τέλος, σε *in vitro* μελέτες έχει παρατηρηθεί η πρόσδεση των πρωτεϊνών ZO-1 και ZO-2 στην α -κατίνη αλλά συνάμα και στις πρωτεΐνες Occludin, ενώ οι πρωτεΐνες ZO-3 προσδένονται στην p120-κατίνη (Wittchen et al. 2003). Επομένως οι στενοσύνδεσμοι κατέχουν σημαντικό ρόλο στην λειτουργία της Νευροαγγειακής Μονάδας.

Οι στενοσύνδεσμοι συμβάλλουν στην διατήρηση της ακεραιότητας της Νευροαγγειακής Μονάδας. Σε συνθήκες συστημικής φλεγμονής και νευροφλεγμονής ύστερα από χορήγηση του λιποπολυσακχαρίτη παρατηρείται αποδιοργάνωση των δομικών στοιχείων των στενοσυνδέσμων δηλαδή των πρωτεϊνών ZO-1, ZO-2, ZO-3, Occludin και Claudin (Eadon et al. 2012). Εν κατακλείδι, το πειραματικό μοντέλο του λιποπολυσακχαρίτη αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την μελέτη και την κατανόηση της λειτουργίας της Νευροαγγειακής Μονάδας.

1.2.6 Αστροκύτταρα

Τα αστροκύτταρα είναι ο πιο πολυπληθής τύπος κυττάρου στον εγκέφαλο των θηλαστικών. Τα αστροκύτταρα είναι υπεύθυνα για πολλές μεταβολικές διεργασίες στον εγκέφαλο όπως είναι η επαγωγή της νευρωνικής σύζευξης (neurovascular coupling), η προσέλκυση άλλων κυττάρων μέσω της απελευθέρωσης χημειοκινών, η ρύθμιση του K^+ , η απελευθέρωση γλοιοδιαβιβαστών καθώς και η απελευθέρωση γλουταμικού μέσω της σηματοδότησης ασβεστίου. Επίσης τα αστροκύτταρα κατέχουν βασικό ρόλο στην λειτουργία του εγκεφάλου καθώς ελέγχουν το pH του εγκεφάλου, μεταβολίζουν την ντοπαμίνη και άλλα υποστρώματα μέσω των monoamine oxidases, απομακρύνουν το γλουταμικό και το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) μέσω συγκεκριμένων μεταφορέων και τέλος παράγουν αντιοξειδωτικά μόρια όπως είναι η γλουταθειόνη (GSH) και ένζυμα όπως η δισμουτάση της σουπεροξειδίας (SODs).

Τα αστροκύτταρα χαρακτηρίζονται από την έκφραση των ενδιάμεσων νηματίων βιμεντίνης (Vimentin) και ινώδους όξινης γλοιικής πρωτεΐνης (GFAP), οι οποίες υπερεκφράζονται στο εγκέφαλο υπό φλεγμονώδεις συνθήκες, με μια διαδικασία γνωστή ως αστρογλοΐωση (astrogliosis). Ως προς την μορφολογία τα αστροκύτταρα χαρακτηρίζονται από ένα αστεροειδές σχήμα με πολλές απολήξεις και διακλαδώσεις (**Εικόνα 6**). Κατά την

ενεργοποίηση τους, σε συνθήκες εγκεφαλικού τραύματος και νευροεκφυλιστικών ασθενειών, τα αστροκύτταρα αυξάνουν σε μέγεθος το κυτταρικό σώμα τους σε σχέση με το μέγεθος των απολήξεων τους, και γίνονται υπερτροφικά.

Το κεντρικό νευρικό σύστημα παρουσιάζει υψηλή ετερογένεια ως προς τα αστροκύτταρα καθώς εμφανίζει δύο βασικούς τύπους. Ο πρώτος τύπος αστροκυττάρων είναι τα πρωτοπλασματικά αστροκύτταρα (protoplasmic astrocytes) της φαιάς ουσίας (grey matter), τα οποία περικλείουν νευρωνικά σωματίδια και συνάψεις. Ενώ ο δεύτερος τύπος αστροκυττάρων είναι τα ινώδη αστροκύτταρα (fibrous astrocytes) της λευκής ουσίας (white matter), τα οποία αλληλεπιδρούν με τα κομβία του Ranvier και την ολιγοδενδρογλοία. Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι μόνο τα πρωτοπλασματικά αστροκύτταρα εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα συσσώρευσης α -συνουκλεΐνης (α -synuclein), τονίζοντας έτσι την σημασία τους για την ανάπτυξη του Parkinson. Τα πρωτοπλασματικά αστροκύτταρα είναι διατεταγμένα σε μη επικαλυπτόμενες περιοχές, σχηματίζοντας ένα συγκυτιακό δίκτυο επικοινωνίας με περίπου 160.000 συνάψεις συνδέοντας με αυτό τον τρόπο την νευρική δραστηριότητα με το αγγειακό δίκτυο. Η αρχιτεκτονική αυτή κάτω από παθολογικές καταστάσεις όπως είναι το Alzheimer και η Επιληψία διαταράσσεται καθώς ενεργοποιείται ο μηχανισμός της αστρογλοΐωσης (Cabezas et al. 2014).



Εικόνα 6: Αστροκύτταρα του φλοιού. Στην εικόνα απεικονίζεται η μορφολογία μη ενεργοποιημένων αστροκυττάρων του φλοιού (Li et al. 2015).

Οι τερματικές απολήξεις των αστροκυττάρων, γνωστές ως πόδια αποφυάδων, επικοινωνούν με τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα περικύτταρα και τις νευρωνικές συνάψεις της Νευροαγγειακής Μονάδας, επιτρέποντας την ρύθμιση της νευρωνικής δραστηριότητας και της εγκεφαλικής αιματικής ροής μέσω της αύξησης των ενδοκυτταρικών επιπέδων του ασβεστίου στα endfeet. Στις τερματικές απολήξεις των αστροκυττάρων εκφράζονται συγκεκριμένα κανάλια όπως είναι το Kir4.1 (δίαυλος K^+) και η ακουαπορίνη 4 (aquaporin 4), τα οποία ρυθμίζουν τις συγκεντρώσεις ιόντων του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Επιπλέον τα πόδια των αποφυάδων των αστροκυττάρων εκφράζουν τον μεταφορέα-1 γλυκόζης (glucose transporter-1) και την P-γλυκοπρωτεΐνη (P-glycoprotein), καταδεικνύοντας έτσι την σημασία των τερματικών απολήξεων στην πόλωση των αστροκυττάρων. Επιπλέον τα

αστροκύτταρα φαίνεται να επικοινωνούν καλύτερα μεταξύ τους μέσω χασμοσυνδέσμων (gap junctions) δημιουργώντας ένα ικανό σε αποκρίσεις λειτουργικό δίκτυο. Διάφορες μελέτες υποστηρίζουν ότι οι μηχανισμοί των αστροκυττάρων που είναι υπεύθυνοι για την ρύθμιση της αγγειοδιαστολής και της αγγειοσυστολής μεταδίδονται μέσω των χασμοσυνδέσμων (Cabezas et al. 2014).

Επίσης τα αστροκύτταρα είναι αρκετά σημαντικά για την ανάπτυξη και την διατήρηση των ενδοθηλιακών χαρακτηριστικών του αιματοεγκεφαλικού φραγμού μέσω της απελευθέρωσης αναπτυξιακών παραγόντων όπως ο VEGF, ο GDNF, ο basic bFGF και ο ANG-1. Οι παράγοντες αυτοί είναι βασικοί για τον σχηματισμό των στενοδεσμών (tight junctions), την επαγωγή των ενζυμικών συστημάτων και την πόλωση των μεταφορέων. Τέλος καίριο ρόλο κατέχουν και οι παράγοντες που εκκρίνονται από τα ίδια τα αστροκύτταρα καθώς συμβάλλουν στην ανάπτυξη, στην διατήρηση και στην επιβίωση των νευρώνων σε νευροεκφυλιστικές συνθήκες όπως είναι η νόσος του Parkinson (Cabezas et al. 2014).

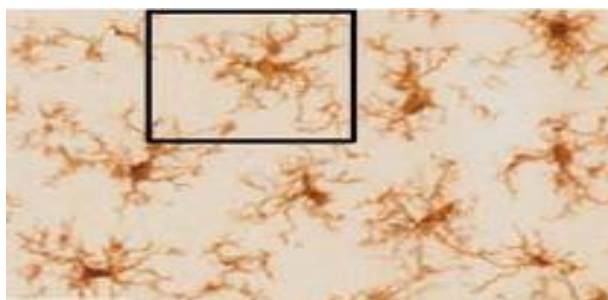
Ακόμη σε *in vivo* μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με την χρήση του λιποπολυσακχαρίτη ως πειραματικό μοντέλο για την μελέτη των αλλαγών που συμβαίνουν στην Νευροαγγειακή Μονάδα υπό συνθήκες νευροφλεγμονής, παρατηρήθηκε πολλαπλασιασμός και ενεργοποίηση των αστροκυττάρων καθώς και δομικές τροποποιήσεις στα πόδια των αποφυάδων των αστροκυττάρων (Biesmans et al. 2013) (Cardoso et al. 2015), καταδεικνύοντας την καταλληλότητα του λιποπολυσακχαρίτη ως μοντέλο για την μελέτη της Νευροαγγειακής Μονάδας.

1.2.7 Μικρογλοία

Η μικρογλοία αποτελεί τον κύριο κυτταρικό τύπο του ανοσοποιητικού συστήματος του κεντρικού νευρικού συστήματος και διαδραματίζει βασικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση, καθώς είναι σημαντικό συστατικό της Νευροαγγειακής Μονάδας. Η μικρογλοία κατά την ανάπτυξη προέρχεται από πρόδρομα μυελοειδή μόρια του λεκιθικού σάκου. Η ενεργοποίηση της μικρογλοίας πραγματοποιείται κάτω από συνθήκες εγκεφαλικού τραύματος ή από ανοσολογικά ερεθίσματα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η μικρογλοία να μεταβεί από το στάδιο της ηρεμίας (resting state) στο στάδιο της ενεργοποίησης (active state). Η ενεργοποίηση αυτή και η επακόλουθη νευροφλεγμονή εμπλέκονται στην εξέλιξη των νευροεκφυλιστικών ασθενειών και κατ' επέκταση στην διαταραχή της δομής και της λειτουργίας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Carvalho Da Fonseca et al. 2014).

Πιο συγκεκριμένα στο στάδιο ηρεμίας η μικρογλοία χαρακτηρίζεται μορφολογικά από μικρό κυτταρικό σώμα με πολυάριθμες διακλαδώσεις (**Εικόνα 7**). Σε παθολογικές καταστάσεις η μικρογλοία ενεργοποιείται αποκτώντας μια αμοιβαδοειδή μορφολογία, με αυξημένο μέγεθος κυτταρικού σώματος, και κοντύτερες και λιγότερες διακλαδώσεις. Κατά την ενεργοποίηση της παράγει κυτταροκίνες και άλλους παράγοντες οι οποίοι της προσδίδουν την ιδιότητα της φαγοκυττάρωσης. Στο στάδιο της ενεργοποίησης η μικρογλοία μπορεί να εμφανίζει δύο φαινότυπους τον M1 και τον M2. Ο M1 φαινότυπος είναι υπεύθυνος για την παραγωγή προφλεγμονώδων παραγόντων, ενώ ο M2 φαινότυπος

παράγει αντιφλεγμονώδεις παράγοντες. Πρόσφατες μελέτες αναπτύσσουν μεθόδους προκειμένου να ρυθμίσουν την πόλωση της μικρογλοίας, καταδεικνύοντας την ως πιθανό θεραπευτικό στόχο.



Εικόνα 7: Μορφολογία μικρογλοιακών κυττάρων. Στην εικόνα απεικονίζονται τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της μη ενεργοποιημένης μικρογλοίας (Fernández-Arjona et al. 2017).

Η μικρογλοία και τα μακροφάγα που βρίσκονται περιαγγειακά προέρχονται τόσο από την υπάρχουσα μικρογλοία του κεντρικού νευρικού συστήματος όσο και από τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα του μυελού των οστών τα οποία υπάρχουν στην Νευροαγγειακή Μονάδα. Στον ενήλικο εγκέφαλο τα περιαγγειακά μακροφάγα προέρχονται και ανακυκλώνονται από τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα, λειτουργώντας ως πρώτη γραμμή άμυνας έναντι των εισβολέων. Ακόμη τα περιαγγειακά μακροφάγα διατηρούν επαφή με άλλους κυτταρικούς τύπους της Νευροαγγειακής Μονάδας, συμβάλλοντας στην λειτουργία και στην δυσλειτουργία της. Πρόσφατες μελέτες με την χρήση μικροσκοπίας δύο φωτονίων δείχνουν ότι σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις η μικρογλοία μπορεί να γίνει παρεγχυματική μεταναστεύοντας περιαγγειακά οδηγώντας σε κατακερματισμό των αγγείων και σε εξέλιξη της νόσου. Σε άλλες νόσους όπως το Alzheimer τα περιαγγειακά μακροφάγα φαγοκυτταρώνουν νευροτοξικές ουσίες με σκοπό τον περιορισμό του νευροεκφυλισμού (Mcconnell et al. 2016).

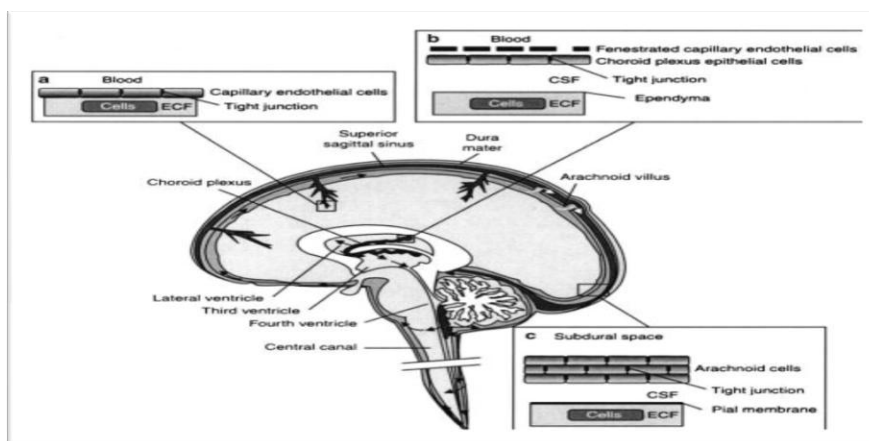
Επιπρόσθετα, στα πλαίσια διαφόρων μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό την μελέτη της απόκρισης της Νευροαγγειακής Μονάδας σε φλεγμονώδη καταστάσεις μέσω της χορήγησης του λιποπολυσακχαρίτη παρατηρήθηκε πολλαπλασιασμός και ενεργοποίηση της μικρογλοίας (Furube et al. 2018). Εν κατακλείδι, το πειραματικό μοντέλο του λιποπολυσακχαρίτη αποτελεί ένα καλό εργαλείο για την μελέτη της λειτουργίας της Νευροαγγειακής Μονάδας σε συνθήκες συστημικής φλεγμονής και νευροφλεγμονής.

1.3 Ο ρόλος της Νευροαγγειακής Μονάδας στο κεντρικό νευρικό σύστημα

Οι νευρώνες του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού χρησιμοποιούν για την μεταξύ τους επικοινωνία έναν συνδυασμό χημικών και ηλεκτρικών σημάτων (νευροδιαβιβαστές και

συναπτικά δυναμικά αντίστοιχα). Αυτά τα σήματα περιλαμβάνουν μικρές ιοντικές κινήσεις στις μεμβράνες των νευρώνων τα οποία δημιουργούν ιοντικές ροές, διατηρώντας σταθερά τα δυναμικά ηρεμίας των μεμβρανών (Abbott 2013). Η διαδικασία αυτή για να είναι αξιόπιστη και αναπαραγόμενη πρέπει να διαθέτει τους κατάλληλους ομοιοστατικούς μηχανισμούς που θα διατηρούν σταθερό το ιοντικό περιβάλλον. Οι φυσικοί φραγμοί που

υπάρχουν μεταξύ του αίματος και του κεντρικού νευρικού συστήματος κατέχουν καίριο ρόλο στον έλεγχο της ομοιόστασης. Οι φραγμοί αυτοί συναντώνται στις εξής τρεις περιοχές του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού: στο ενδοθήλιο του παρεγχύματος των μικροαγγείων, στο επιθήλιο του χοριοειδούς πλέγματος και στο αραχνοειδές επιθήλιο (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Οι φραγμοί του εγκεφάλου. Στην εικόνα απεικονίζονται οι 3 φραγμοί του εγκεφάλου: α) ο φραγμός του ενδοθηλίου του παρεγχύματος των μικροαγγείων, β) ο φραγμός του επιθηλίου του choroid plexus και γ) το αραχνοειδές επιθήλιο (Abbott et al. 2010).

Σε κάθε μια από τις τρεις περιοχές υπάρχουν στενοσύνδεσμοι, οι οποίοι μειώνουν την διείσδυση ιόντων και άλλων μικρών υδρόφιλων μορίων μέσω μιας διακυτταρικής σχισμής, σχηματίζοντας έτσι έναν φυσικό φραγμό.

Από τους τρεις φραγμούς του κεντρικού νευρικού συστήματος, ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός του ενδοθηλίου του εγκεφάλου είναι ο πιο σημαντικός φραγμός για τον ρύθμιση της μεταφοράς υγρών και μορίων μεταξύ του αίματος και των νευρώνων (Abbott 2013). Όπως προαναφέρθηκε ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός είναι αναπόσπαστο κομμάτι της Νευροαγγειακής Μονάδας (NVU). Η Νευροαγγειακή Μονάδα κατέχει διττό ρόλο στην λειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος καθώς παρέχει ένα σταθερό περιβάλλον για την νευρωνική λειτουργία αλλά ταυτόχρονα διατηρεί το ιοντικό περιβάλλον κατάλληλο για την λειτουργία της συναπτικής σηματοδότησης μέσω ενός συνδυασμού ιοντικών καναλιών και μεταφορέων.

Η Νευροαγγειακή Μονάδα κατέχει βασικό ρόλο και στην επικοινωνία του κεντρικού και του περιφερικού νευρικού συστήματος. Πιο συγκεκριμένα και τα δύο αυτά συστήματα χρησιμοποιούν αρκετούς κοινούς νευροδιαβιβαστές, η Νευροαγγειακή Μονάδα έχει την ικανότητα να διαχωρίζει την μια «δεξαμενή» νευροδιαβιβαστών του ενός συστήματος από αυτή του άλλου συστήματος, ελαχιστοποιώντας της μεταξύ τους επικοινωνίας. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί το γλουταμικό οξύ, το οποίο υπάρχει σε υψηλά επίπεδα στο πλάσμα του αίματος και η τιμή του στο αίμα εμφανίζει διακύμανση μετά την κατανάλωση κάποιου γεύματος. Η απελευθέρωση του γλουταμικού με ανεξέλεγκτο τρόπο στο ενδιάμεσο υγρό του εγκεφάλου, όπως συμβαίνει σε νευρώνες που βρίσκονται σε συνθήκες υποξίας κατά την διάρκεια ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου, είναι ικανή να οδηγήσει σε μόνιμη

νευροεκφυλιστική βλάβη. Επομένως ο ρόλος της NVU στον έλεγχο της επικοινωνίας μεταξύ των δύο αυτών συστημάτων κρίνεται ιδιαίτερα σημαντικός (Abbott et al. 2010).

Ακόμη η Νευροαγγειακή Μονάδα έχει την ικανότητα να αποτρέπει την είσοδο πολλών μακρομορίων στον εγκέφαλο. Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό χαρακτηρίζεται από χαμηλότερο περιεχόμενο σε πρωτεΐνες σε σχέση με το πλάσμα. Οι πρωτεΐνες του πλάσματος όπως είναι η αλβουμίνη και η προ-θρομβίνη μπορεί να οδηγήσουν σε βλάβη του νευρικού ιστού, προκαλώντας κυτταρική ενεργοποίηση η οποία μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση. Ο παράγοντας Χα υπάρχει στον εγκέφαλο και έχει ως ρόλο την μετατροπή της προ-θρομβίνης σε θρομβίνη μέσω του υποδοχέα της θρομβίνης PAR₁ (thrombin receptor PAR₁). Όταν η θρομβίνη είναι παρούσα στο ενδιάμεσο υγρό του εγκεφάλου είναι ικανή να προκαλέσει επιληπτικές κρίσεις, ενεργοποίηση των κυττάρων γλοίας, διαίρεση των κυττάρων γλοίας και κυτταρικό θάνατο. Για αυτό η δίοδος πρωτεϊνών ορού μεγάλου μοριακού βάρους στον εγκέφαλο μέσω ενός κατεστραμμένου αιματοεγκεφαλικού φραγμού μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές παθολογικές επιπτώσεις στον οργανισμό. Από τις λίγες πρωτεΐνες που είναι σε υψηλότερη συγκέντρωση στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό συγκριτικά με το πλάσμα είναι η Cystatin-C, η οποία συντίθεται τοπικά μέσα στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Η πρωτεΐνη αυτή είναι ένας αναστολέας πρωτεάσης σερίνης, της οποίας η υψηλή συγκέντρωση στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό μπορεί να έχει προστατευτικό ρόλο έναντι μικρο-διαρροών του αιματοεγκεφαλικού φραγμού που συμβαίνουν συνεχώς και αυθόρμητα, επιτρέποντας έτσι στα συστατικά του πλάσματος να εισβάλλουν στον εγκέφαλο (Abbott et al. 2010).

Επίσης η Νευροαγγειακή Μονάδα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παροχή θρεπτικών στον εγκέφαλο. Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός χαρακτηρίζεται από χαμηλή παθητική διαπερατότητα σε πολλά υδατοδιαλυτά θρεπτικά και μεταβολίτες που είναι απαραίτητοι για τον νευρικό ιστό. Για αυτό τον λόγο ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός διαθέτει εξειδικευμένα συστήματα μεταφοράς με απώτερο σκοπό την δίοδο μορίων απαραίτητων για την λειτουργία του εγκεφάλου. Η διαφοροποίηση του ενδοθηλίου σε φραγμό ξεκινά κατά την εμβρυική αγγειογένεση και κατά την ενήλικη ζωή διατηρείται σε μεγάλο βαθμό απ' την δράση άλλων κυτταρικών τύπων όπως είναι τα πόδια των αποφυάδων των αστροκυττάρων. Η ανάπτυξη της πόλωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων προέρχεται κυρίως από την έκφραση συγκεκριμένων πρωτεϊνικών μεταφορέων στην αυλική και κοιλιακή μεμβράνη. Τα περικύτταρα, τα μικρογλοιακά κύτταρα και τα νευρωνικά τερματικά που συνθέτουν την Νευροαγγειακή Μονάδα συσχετίζονται με το ενδοθήλιο, διακατέχοντας υποστηρικτικό ρόλο για την διατήρηση και λειτουργία του φραγμού.

Τέλος άλλος ένας βασικός ρόλος της Νευροαγγειακής Μονάδας είναι η προστασία του εγκεφάλου από την είσοδο νευροτοξικών μορίων από την κυκλοφορία του αίματος. Οι νευροτοξίνες αυτές μπορεί να είναι ενδογενείς μεταβολίτες ή πρωτεΐνες που προσλαμβάνονται μέσω της τροφής ή εισβάλλουν στον οργανισμό μέσω του περιβάλλοντος. Στον εγκέφαλο υπάρχουν αρκετοί μεταφορείς, οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι με το ATP, και έχουν την ικανότητα να απομακρύνουν αυτούς του νευροτοξικούς παράγοντες από το κεντρικό νευρικό σύστημα. Το ενήλικο κεντρικό νευρικό σύστημα σε περίπτωση που έχει εκφυλισμένους και πλήρως διαφοροποιημένους νευρώνες δεν μπορεί να τους αντικαταστήσει λόγω της μειωμένης του αναγεννητικής ικανότητας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ενός σταθερού ρυθμού νευρωνικού κυτταρικού θανάτου από

την γέννηση και καθ' όλη την διάρκεια ενός υγιούς εγκεφάλου, μειώνοντας έτσι τα επίπεδα της νευρογένεσης. Επομένως οποιαδήποτε επιτάχυνση του φυσικού ρυθμού κυτταρικού θανάτου των νευρώνων, ως αποτέλεσμα της αυξημένης εισόδου των νευροτοξινών στον εγκέφαλο είναι ικανή να οδηγήσει σε επιπλέον μείωση της νευρογένεσης (Abbott et al. 2010).

Εν κατακλείδι, η Νευροαγγειακή Μονάδα και κατ' επέκταση και ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός παρέχουν ένα σταθερό μικροπεριβάλλον, το οποίο είναι καίριο για την νευρωνική λειτουργία αλλά και την προστασία του κεντρικού νευρικού συστήματος από κάποια χημική προσβολή και βλάβη.

Κεφάλαιο 2: Συστημική Φλεγμονή, Νευροφλεγμονή και Νευροαγγειακή Μονάδα

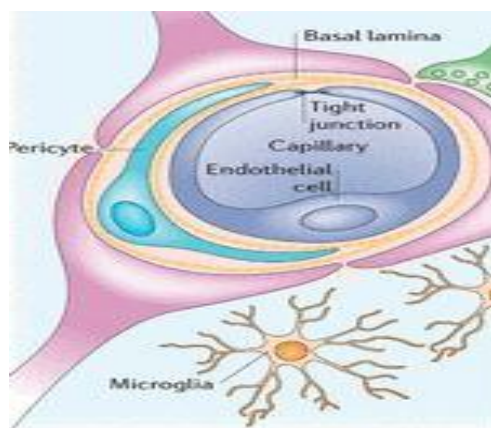
2.1 Νευροφλεγμονή και Νευροαγγειακή Μονάδα

Ο ανθρώπινος οργανισμός κάτω από την επίδραση διαφορετικών ερεθισμάτων όπως είναι λοιμώδη νοσήματα, τοξίνες και τραυματικά γεγονότα ενεργοποιεί διάφορους μηχανισμούς με σκοπό την διατήρηση της σταθερότητας του. Τα κύτταρα του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος, όπως είναι τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα και τα μακροκύτταρα αλληλεπιδρούν με τα αντιγόνα μέσω μη-εξειδικευμένων μονοπατιών, επάγοντας φλεγμονή. Κάποιοι μολυσματικοί παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν φλεγμονώδη αποκρίσεις στον ιστό, ενεργοποιώντας έτσι το σύστημα του συμπληρώματος. Το αποτέλεσμα αυτών των αποκρίσεων στους περιφερικούς ιστούς είναι η ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων, τα οποία με την σειρά τους επάγουν τους ειδικούς μηχανισμούς άμυνας. Οι ειδικοί μηχανισμοί άμυνας ενεργοποιούν και άλλους μηχανισμούς προκειμένου να αντιμετωπίσουν την φλεγμονή, όπως είναι η νέκρωση και η φαγοκυττάρωση. Το κεντρικό νευρικό σύστημα επικοινωνεί με το σύστημα ανοσίας ενισχύοντας την δράση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή μέσω διαφόρων μηχανισμών όπως: εκδήλωση πυρετού, ευαισθησία στον πόνο και υπνηλία.

Υπάρχουν βασικές διαφορές μεταξύ των φλεγμονωδών αποκρίσεων που εκδηλώνονται από το κεντρικό νευρικό σύστημα σε σχέση με τις αποκρίσεις άλλων ιστών του οργανισμού. Η κύρια διαφορά είναι η έλλειψη των T κυττάρων μνήμης στο παρέγχυμα του εγκεφάλου. Τα T-κύτταρα παρουσιάζουν ειδικά αντιγόνα από τους παθογόνους μικροοργανισμούς που έχουν εισβάλλει στον οργανισμό. Στην συνέχεια τα κύτταρα αυτά αφήνουν το κεντρικό νευρικό σύστημα, εισέρχονται στους λεμφαδένες προκαλώντας κυτταρικές ανοσολογικές αποκρίσεις στον λεμφοειδή ιστό. Στον φυσιολογικό εγκέφαλο τα T-κύτταρα του παρεγχύματος βρίσκονται στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, αλλά σε παθολογικές καταστάσεις εισέρχονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα μέσω της χοριοειδούς αύλακας και των μηνιγγικών φλεβών (Olsen et al. 2017).

Επίσης εκτός από τα T- κύτταρα υπάρχουν και τα B-κύτταρα, μια άλλη ομάδα κυττάρων της ειδικής ανοσίας, τα οποία έχουν την ικανότητα να εισέρχονται στον φυσιολογικό εγκέφαλο. Η ποσότητα και η κυκλοφορία των κυττάρων αυτών παρουσιάζει μια μικρή αύξηση μετά την εμφάνιση κάποιων παθολογικών καταστάσεων όπως είναι το AIDS. Τα B κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε B-κύτταρα μνήμης και σε πλασμακύτταρα, παράγοντας αντισώματα με διαφορετικές λειτουργίες στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Ακόμη τα B-κύτταρα έχουν την ικανότητα να παράγουν κυτοκίνες και να ενεργοποιούν τα T-κύτταρα. Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος του εγκεφαλικού παρεγχύματος αποτελούνται από μυελοειδή κύτταρα, αστροκύτταρα και μικρογλοία τα οποία εισέρχονται στον εγκέφαλο και στο παρέγχυμα του νωτιαίου μυελού κατά την εμβρυονική περίοδο. Τα μικρογλοιακά κύτταρα κατέχουν βασικό ρόλο στην ανάπτυξη του εγκεφάλου, άλλα και άλλοι κυτταρικοί πληθυσμοί του κεντρικού νευρικού συστήματος όπως είναι τα αστροκύτταρα, τα κύτταρα του μυελού και τα δενδριτικά κύτταρα και συμμετέχουν σε λειτουργικές δραστηριότητες και στην ομοιοστάση του εγκεφάλου.

Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός διαδραματίζει καίριο ρόλο στην ανάπτυξη της νευροφλεγμονής. Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός και η ενεργοποιημένη μικρογλοία αποτελούν συστατικά της Νευροαγγειακής Μονάδας και η δομική καθώς και η λειτουργική τους ακεραιότητα επηρεάζει σημαντικά την εξέλιξη της νευροφλεγμονής (**Εικόνα 9**). Η μετανάστευση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, η μετακίνηση των κυτοκινών και άλλες φλεγμονώδεις αποκρίσεις οδηγούν στην αύξηση της διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και κατ' επέκταση στην αλλαγή της λειτουργίας της Νευροαγγειακής Μονάδας. Για αυτό το λόγο κρίνεται βασικός ο συντονισμός της δραστηριότητας των κυττάρων της Νευροαγγειακής Μονάδας (τα αγγεία των ενδοθηλιακών κυττάρων του εγκεφάλου, τα περικύτταρα, τα περιαγγειακά αστροκύτταρα, τα νευρικά κύτταρα κ.α.) για την ρύθμιση της τοπικής φλεγμονής στον εγκεφαλικό ιστό. Η νευρωνική δραστηριότητα καθώς και η διέγερση των αστροκυττάρων (γνωστή ως μεταβολική σύζευξη νευρώνων και αστροκυττάρων) είναι υπεύθυνη για την συσσώρευση του εξωκυττάριου γαλακτικού οξέος και H^+ επηρεάζοντας τις τοπικές φλεγμονώδεις αποκρίσεις στον εγκέφαλο. Τα αυξημένα επίπεδα νευρωνικής δραστηριότητας προκαλούν μια φλεγμονώδη απάντηση και στους περιφερικούς ιστούς, η οποία καλείται νευρογενής φλεγμονή (neurogenic inflammation). Η νευρογενής φλεγμονή προκαλείται από το άγχος, τον πόνο και τις επιληπτικές κρίσεις, εμφανίζοντας αρκετές ομοιότητες με άλλους τύπους νευροφλεγμονής του κεντρικού νευρικού συστήματος.



Εικόνα 9: Δομή της Νευροαγγειακής Μονάδας. Στην εικόνα απεικονίζονται τα κυτταρικά δομικά συστατικά της Νευροαγγειακής Μονάδας: ενδοθηλιακά κύτταρα, περιαγγειακά αστροκύτταρα, περικύτταρα, στενοσύνδεσμοι, βασική μεμβράνη και μικρογλοιακά κύτταρα (Mcconnell et al. 2016).

Επομένως συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω, η νευροφλεγμονή είναι ένας τύπος φλεγμονώδους απάντησης μέσα στο κεντρικό νευρικό σύστημα, η οποία επηρεάζει σημαντικά την νευρωνική δραστηριότητα και την διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Οι φλεγμονώδεις αποκρίσεις μέτριας έντασης μπορούν να προστατεύσουν το κεντρικό νευρικό σύστημα. Αντίθετα οι έντονες φλεγμονώδεις απαντήσεις οδηγούν σε επιδείνωση της βλάβης του ιστού και σε διαταραχή της ομοιόστασης του εγκεφάλου (Olsen et al. 2017).

2.1.1 Ο ρόλος των αστροκυττάρων της Νευροαγγειακής Μονάδας στην Νευροφλεγμονή

Τα αστροκύτταρα κατέχουν δύο βασικούς ρόλους στο κεντρικό νευρικό σύστημα: την ενσωμάτωση σημάτων από την συστηματική κυκλοφορία στον εγκέφαλο και την διατήρηση της ομοιόστασης μεταξύ των νευρικών, ανοσοποιητικών και αγγειακών κυττάρων του εγκεφάλου. Η μορφολογία τους καθώς και η τοπολογία τους στον εγκέφαλο είναι η ιδανική για τον σηματοδοτικό τους ρόλο. Οι διακλαδώσεις των αστροκυττάρων που βρίσκονται σε επικοινωνία με κάθε σύναψη και τα πόδια των αποφυάδων των αστροκυττάρων συνθέτουν την εξωτερική περιοχή του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, η οποία τους επιτρέπει να ρυθμίζουν τις τοπικές αλλαγές της νευρωνικής δραστηριότητας καθώς και τις συστηματικές δραστηριότητες ολόκληρου του οργανισμού. Τα αστροκύτταρα παρέχουν διατροφική και λειτουργική στήριξη στους νευρώνες μέσω της μεταφοράς γλυκόζης, νευροτροφικών παραγόντων και νευροδιαβιβαστών όπως είναι το γλουταμικό. Ακόμη τα αστροκύτταρα κρατούν το ανοσοποιητικό σύστημα σταθερό ρυθμίζοντας την διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και τα στάδια της ενεργοποιημένης μικρογλοίας.

Τα αστροκύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση των νευροφλεγμονώδων καταστάσεων του εγκεφάλου χρησιμοποιώντας τους ίδιους ανοσορρυθμιστικούς και νευροπροστατευτικούς μηχανισμούς που χρησιμοποιεί για την διατήρηση της ομοιόστασης του υπό φυσιολογικές συνθήκες. Στην περίπτωση ενός τραύματος στον εγκέφαλο τα αστροκύτταρα διεγείρονται από τις μοριακές αλλαγές του εξωκυττάριου περιβάλλοντος τους και των κυττάρων που επικοινωνούν με αυτά, ή/και από τον τραυματισμό των απολήξεών τους, τροποποιώντας έτσι τα μορφολογικά και λειτουργικά τους χαρακτηριστικά τους και αποκτώντας έναν ενεργοποιημένο φαινότυπο. Στο τραύμα και σε άλλες νευρολογικές διαταραχές τα αστροκύτταρα ενεργοποιούνται από την έλλειψη γλυκόζης στο περιβάλλον τους και από την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών (πχ. ATP) από τους κατεστραμμένους ιστούς (Cekanaviciute et al. 2016). Σε συνθήκες νευροφλεγμονής, τα αστροκύτταρα ενεργοποιούνται μέσω των υποδοχέων που υπάρχουν στις μεμβράνες των παθογόνων ή από λιποπολυσακχαρίτες και άλλα συστατικά των μικροοργανισμών αυτών τα οποία συνδέονται με τους Toll υποδοχείς (Toll-like receptors) (Wilson et al. 2004), (Farina et al. 2007). Επίσης τα κύτταρα του ανοσοποιητικού όπως είναι τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα και τα λευκοκύτταρα που βρίσκονται στην περιοχή του τραύματος ή της μόλυνσης απελευθερώνουν μια πληθώρα κυτοκινών οι οποίες διεγείρουν ακόμη περισσότερο την ενεργοποίηση των αστροκυττάρων (Faulkner et al. 2004), (Spence et al. 2011). Τα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα χαρακτηρίζονται από αυξημένη ικανότητα πολλαπλασιασμού, είναι υπερτροφικά και υπερεκφράζουν πρωτεΐνες των ενδιάμεσων νηματίων καθώς και κυτοκίνες και χημειοκίνες. Ακόμη τα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα παρουσιάζουν μια πόλωση γύρω από την περιοχή του τραύματος. Τα πολωμένα αστροκύτταρα σε συνεργασία με τα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας απομονώνουν την περιοχή του τραύματος από τον γειτονικό μη κατεστραμμένο ιστό (Cekanaviciute et al. 2014).

Στο κεντρικό νευρικό σύστημα σε περίπτωση ισχαιμίας ή φυσικού τραύματος ο κατεστραμμένος ιστός μπορεί να υποστεί περαιτέρω βλάβη από την υπάρχουσα φλεγμονή.

Τα αστροκύτταρα εμφανίζονται ενεργοποιημένα σε όλη την διάρκεια της φλεγμονής. Κατά την είσοδο παθογόνων μικροοργανισμών στο κεντρικό νευρικό σύστημα τα αστροκύτταρα είναι ενεργοποιημένα στην οξεία φάση της μόλυνσης, ένα φαινόμενο το οποίο παρατηρείται και σε πειραματικά μοντέλα αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας (Voskuhl et al. 2009).

Στον εγκέφαλο τα αστροκύτταρα χρησιμοποιούν δύο μηχανισμούς με σκοπό τον περιορισμό της φλεγμονής. Ο πρώτος μηχανισμός είναι ο σχηματισμός της αστροκυτταρικής ουλής (astrocytic scar), η οποία δημιουργεί έναν φυσικό φραγμό από πολωμένα αστροκύτταρα και συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας απομονώνοντας την περιοχή του τραύματος (Voskuhl et al. 2009). Ο δεύτερος μηχανισμός είναι η δημιουργία ενός μοριακού φραγμού μέσω μορίων που συντίθενται και εκκρίνονται από τα αστροκύτταρα για την ρύθμιση της διήθησης και της ενεργοποίησης των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα μόρια αυτά είναι κυτοκίνες και χημειοκίνες οι οποίες διαχέονται μακριά από τα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα δημιουργώντας μια κλίση σηματοδότησης (signalling gradients) προς τον τραυματισμένο ιστό. Τέλος τα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα μπορούν να ρυθμίζουν έμμεσα την φλεγμονή, τροποποιώντας τις νευρωνικές αποκρίσεις των τοξικών και μεταβολικών βλαβών (Cekanaviciute et al. 2016).

Σύμφωνα με νεώτερα δεδομένα, τα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα εμφανίζουν δύο διαφορετικούς φαινοτύπους ενεργοποίησης, τον **A1** και τον **A2, οι οποίοι** κατ' αναλογία με την ενεργοποιημένη μικρογλοία παίζουν νευροτοξικό και νευροπροστατευτικό ρόλο αντίστοιχα. Έτσι τα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα μπορούν να παρέχουν την απαιτούμενη στήριξη για την αναγέννηση των αξόνων, αλλά παράλληλα έχουν και την ικανότητα να την καταστείλουν. Πιο συγκεκριμένα, τα A1 αστροκύτταρα απελευθερώνουν φλεγμονώδεις ουσίες που ενισχύουν τον συναπτικό εκφυλισμό καθώς και μια νευροτοξίνη η οποία παραμένει αταυτοποιητή, και είναι υπεύθυνη για την επαγωγή του θανάτου των νευρώνων και των ολιγοδενδροκυττάρων, τονίζοντας έτσι την σημασία των ενεργοποιημένων αστροκυττάρων στις χρόνιες νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Liddel et al. 2017). Επίσης τα A1 αστροκύτταρα συναντώνται σε αρκετές νευροεκφυλιστικές νόσους, όπως είναι η νόσος του Alzheimer, η σκλήρυνση κατά πλάκας, το ALS, η νόσος του Parkinson και η νόσος του Huntington, οδηγώντας στην επιδείνωση της παθοφυσιολογίας των νόσων αυτών. Το σηματοδοτικό μονοπάτι του NFκB είναι υπεύθυνο για την παραγωγή κυτοκινών και της κυτταρικής επιβίωσης και εμφανίζει άμεση συσχέτιση με την νευροφλεγμονή και πιο συγκεκριμένα με την ενεργοποίηση των A1 αστροκυττάρων και της μικρογλοίας (Mattson et al. 2006), (Kaltschmidt et al. 2009). Όπως προαναφέρθηκε, το μονοπάτι αυτό είναι ενεργό σε αρκετές νευροεκφυλιστικές νόσους και ενεργοποιείται από προφλεγμονώδη μόρια (πχ. κυτοκίνες), από βακτηριακά ή ιικά αντιγόνα, από αμυλοειδή, από το άγχος καθώς και από τις ελεύθερες ρίζες. Ο ρόλος του NFκB μονοπατιού στην επαγωγή της ενεργοποίησης των αστροκυττάρων στις νευροεκφυλιστικές νόσους χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Η παρουσία των A1 αστροκυττάρων στις ανθρώπινες νευροεκφυλιστικές ασθένειες υποδηλώνει ότι, πιθανόν, η νευροφλεγμονή να συμβάλλει ή και να προκαλεί τον νευροεκφυλισμό. Συγκεκριμένα στην νόσο Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) Η απελευθέρωση από τον A1 τύπο ενεργοποιημένων αστροκυττάρων μια νευροτοξίνης η οποία οδηγεί σε εκφυλισμό των α κινητικών νευρώνων, αλλά δεν είναι τοξική για άλλους

τύπους κινητικών νευρώνων. είναι βασική για την εκδήλωση της νόσου (Liddelow et al. 2017).

Σε αντίθεση με τα παραπάνω το σηματοδοτικό μονοπάτι JAK-STAT3 είναι αυτό που συμμετέχει στην ενεργοποίηση του A2 αστροκυτταρικού τύπου, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την λειτουργία του μηχανισμού δημιουργίας του αστροκυτταρικού φραγμού, ο οποίος με τη σειρά του περιορίζει την φλεγμονή σε συνθήκες τραύματος καθώς απομονώνει τον κατεστραμμένο νευρικό ιστό. Αυτό το μονοπάτι είναι υπεύθυνο για τον έλεγχο πολλών κυτταρικών λειτουργιών όπως είναι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η ανάπτυξη και άλλες φλεγμονώδη λειτουργίες. Το JAK-STAT3 μονοπάτι στα αστροκύτταρα είναι σημαντικό κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου καθώς συμβάλλει στον έλεγχο της αστρογλιόγένεσης και της ωρίμανσης τους (Ceyzeriat et al. 2016).

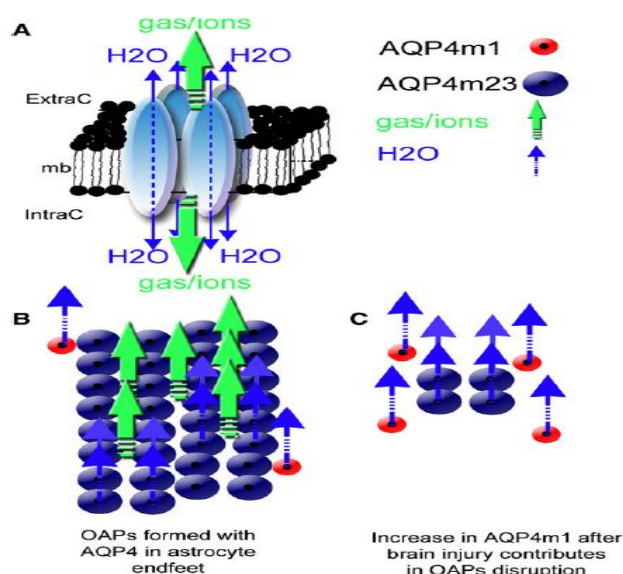
Τα A1 αστροκύτταρα, λόγω της νευροτοξικής τους δράσης, καθίστανται ως ένας πιθανός θεραπευτικός στόχος και για αυτό το λόγο έχουν χρησιμοποιηθεί αντισώματα έναντι των TNF- α και IL1 α , καθώς αυτά είναι προ-φλεγμονώδη μόρια που εκφράζονται από τα A1 αστροκύτταρα. Σε κλινικές δοκιμές βρίσκεται το φάρμακο που καταστέλλει την δράση του C1q μορίου, το οποίο είναι βασικό συστατικό του συμπληρώματος. Ακόμη η εύρεση της νευροτοξίνης που εκκρίνεται από τα A1 αστροκύτταρα μπορεί να οδηγήσει στην εύρεση νέων φαρμάκων που θα καταστείλουν την τοξίνη αυτή (Liddelow et al. 2017). Όπως προαναφέρθηκε το μονοπάτι του NF κ B είναι κρίσιμο για την εξέλιξη των νευροεκφυλιστικών νόσων καθώς είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση των A1 αστροκυττάρων. Για αυτό η καταστολή του συγκεκριμένου μονοπατιού θα μπορούσε να αποτελέσει θεραπεία των νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Όμως η καταστολή του μονοπατιού αυτού μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις στο κεντρικό νευρικό σύστημα καθώς συμμετέχει στην συναπτική δημιουργία και πλαστικότητα. Επομένως είναι απαραίτητη η πραγματοποίηση και άλλων ερευνών για κατανόηση της δράσης του NF κ B μονοπατιού στην παθοφυσιολογία του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Συμπερασματικά τα αστροκύτταρα αποτελούν σημαντικό πιθανό θεραπευτικό στόχο για την θεραπεία των νευροεκφυλιστικών νόσων καθώς η διαταραχή της ισορροπίας των δύο φαινοτύπων A1 και A2 έχει αρνητικές επιπτώσεις για το κεντρικό νευρικό σύστημα και η εύρεση των κατάλληλων θεραπευτικών μηχανισμών κρίνεται απαραίτητη (Liddelow et al. 2017).

2.1.2 Ο ρόλος της Ακουαπορίνης-4 (AQP4) στην Νευροφλεγμονή

Η ομάδα των ακουαπορινών περιλαμβάνει κανάλια νερού και εκφράζεται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους και οργανισμούς. Η οικογένεια των ακουαπορινών χαρακτηρίζεται από μια κοινή δομή έξι διαμεμβρανικών άλφα ελίκων (Gonen et al. 2006). Η περιοχή αυτή αποτελείται από ένα μοτίβο ασπαραγίνης-προλίνης-αλανίνης και έχει μοριακό βάρος 30kDa. Η Ακουαπορίνη 4 υπάρχει σε αφθονία στον εγκέφαλο των πρωτεύοντων και των τρωκτικών και εντοπίζεται σε πληθώρα στα πόδια των αποφυάδων των περιαγγειακών αστροκυττάρων, αλλά και σε άλλα κύτταρα του ΚΝΣ. Η Ακουαπορίνη 4 συνίσταται από ομο-τετραμερή, όπου κάθε μεμονωμένη Ακουαπορίνη αντιπροσωπεύει ένα κανάλι νερού (Yu et

al. 2006). Τα τετραμερή συνθέτουν έναν κεντρικό πόρο μέσω του οποίου εισέρχονται και προς τις δύο κατευθύνσεις νερό, κατιόντα και αέρια, όπως το CO₂ (**Εικόνα 10Α**).



Εικόνα 10: Δομική οργάνωση της Ακουαπορίνης 4 στην μεμβράνη των αστροκυττάρων. Α) Σχηματική απεικόνιση των ομο-τετραμερών της Ακουαπορίνης 4 τα οποία συνθέτουν έναν κεντρικό πόρο διαπερατό από ιόντα και αέρια (πράσινα βέλη). Κάθε Ακουαπορίνη παρέχει νερό και προς τις δύο κατευθύνσεις, η κίνηση του νερού εξαρτάται από την όσμωση (μπλε βέλη). **Β)** Στον φυσιολογικό εγκέφαλο, οι AQP4-m1 (κόκκινοι κύκλοι) και οι AQP4-m23 (μπλε κύκλοι) ισομορφές συνθέτουν την δομή OAPs μεγάλου μεγέθους, παρέχοντας ιόντα και αέρια (πράσινα βέλη) και νερό στην μεμβράνη των αστροκυττάρων. **Γ)** Στον εγκέφαλο που έχει υποστεί τραύμα, παρατηρείται αύξηση της AQP4-m1 ισομορφής και αποδιοργάνωση των OAPs. Αλλαγές στο μέγεθος των OAPs οδηγούν σε μείωση του αριθμού των κεντρικών πόρων, επηρεάζοντας την κίνηση του νερού και την κίνηση των ιόντων και των αερίων (Badaut et al. 2011).

Οι Ακουαπορίνες-4 αποτελούν τα κύρια συστατικά μιας δομικής διάταξης, η οποία εντοπίζεται στην περιοχή του ποδιού των αποφυάδων των αστροκυττάρων και καλείται ως ορθογώνια συστοιχία μορίων (Orthogonal Arrays of Particles, OAPs) και παρατηρήθηκε πρώτη φορά σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (**Εικόνα 10Β**). Το μέγεθος των OAPs εξαρτάται από την αναλογία μεταξύ των δύο ισομορφών της Ακουαπορίνης 4: την AQP4-m1 ισομορφή και την AQP4-m23 ισομορφή. Η ισομορφή AQP4-m23 σταθεροποιεί την δομή των OAPs. Ο λειτουργικός ρόλος των OAPs παραμένει ακόμη ασαφής. Αυτό, όμως, που έχει παρατηρηθεί πειραματικά είναι ότι η αύξηση των επιπέδων της AQP4-m1 ισομορφής οδηγεί σε αποδιοργάνωση της δομής των OAPs, το οποίο συμβαίνει σε συνθήκες τραύματος καθώς και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις στις οποίες αποδιοργανώνεται ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός (**Εικόνα 10Γ**) (Furman et al. 2003), (Rash et al. 2004). Ο ρόλος της Ακουαπορίνης 4 στην δομή του αιματοεγκεφαλικού φραγμού είναι ακόμη υπό διερεύνηση. Επιπλέον, η δομή των OAPs φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της ομοιόστασης του καλίου. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται καθώς από διάφορες πειραματικές μελέτες φαίνεται ότι η Ακουαπορίνη 4 εμφανίζει συνεντοπισμό με το κανάλι καλίου K_v4.1 (Badaut et al. 2000). Ακόμη μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε knockout ποντίκια για την Ακουαπορίνη 4 παρουσιάζουν καθυστέρηση στην απομάκρυνση του

καλίου κατά την δραστηριότητα του εγκεφάλου. Η Ακουαπορίνη 4 φαίνεται να συμμετέχει και σε άλλες διεργασίες εκτός της κίνησης του νερού, όπως είναι η κυτταρική προσκόλληση και η μετακίνηση (Saadoun et al. 2005). Όλα αυτά τα ευρήματα καταδεικνύουν την σημαντικότητα της Ακουαπορίνης 4 στην λειτουργία του εγκεφάλου και την συμμετοχή της στην εξέλιξη της νευροφλεγμονής.

Η νευροφλεγμονή χαρακτηρίζεται από μοριακές και κυτταρικές τροποποιήσεις οι οποίες είναι ως ένα βαθμό κοινές με αυτές τις περιφερικής φλεγμονής, όμως εμφανίζουν και αρκετές διαφορές, καθώς στον εγκέφαλο, κύριο ρόλο κατέχουν η μικρογλοία και τα αστροκύτταρα. Τα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα κατά την νευροφλεγμονή παρουσιάζουν αρκετές μορφολογικές αλλαγές και γίνονται υπερτροφικά μέσω της διαδικασίας της αστρογλοίωσης. Η παρουσία της Ακουαπορίνης 4 στα πόδια των αποφυάδων των αστροκυττάρων μπορεί να έχει ως στόχο την μείωση της υπερτροφικότητας των αστροκυττάρων μέσω της ελάττωσης του εισερχόμενου νερού και την μετακίνηση τους προς το σημείο της φλεγμονής (Sofroniew et al. 2010).

Ο συσχετισμός της Ακουαπορίνης 4 με την νευροφλεγμονή πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά στην νόσο της οπτικής νευρομυελίτιδας (neuromyelitis optica, NMO), όπου παρατηρήθηκε αποδιοργάνωση της Ακουαπορίνης 4 μια απομυελινωτική ασθένεια (Marignier et al. 2010). Στην οπτική νευρομυελίτιδα παρατηρούνται ανωμαλίες στον νωτιαίο μυελό και στο οπτικό νεύρο με αποτέλεσμα να δημιουργείται τύφλωση και παράλυση. Για αυτό η Ακουαπορίνη 4 έχει καταστεί πιθανός θεραπευτικός στόχος για την νόσο αυτή, καθώς κατέχει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της νευροφλεγμονής (Uzawa et al. 2009).

Η Ακουαπορίνη 4 διαδραματίζει καίριο ρόλο και στον σχηματισμό του οιδήματος καθώς τα αστροκύτταρα ενεργοποιούνται. Το οίδημα εμφανίζεται μετά από εγκεφαλικό τραύμα και συσχετίζεται με την αποδιοργάνωση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Η διαταραχή της ακεραιότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού έχει ως αποτέλεσμα την διάχυση των πρωτεϊνών του πλάσματος και στην συσσώρευση του εξωαγγειακού υγρού. Η αποδιοργάνωση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία, η οποία προκαλείται από την ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) (Rosell et al. 2006). Προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως είναι η IL-1 β και ο TNF α οδηγούν στην παραγωγή των μεταλλοπρωτεϊνών MMP-9 και MMP-3. Η MMP-9 μεταλλοπρωτεϊνάση επιδεινώνει την εξέλιξη του αγγειογενούς οιδήματος καθώς είναι υπεύθυνη για τον κατακερματισμό του βασικού υμένα μεταξύ των ποδιών των αποφυάδων των αστροκυττάρων και του ενδοθηλίου. Ενδιαφέρον υπάρχει για την σύνδεση της Ακουαπορίνης 4 με τις μεταλλοπρωτεϊνάσες, καθώς οι MMP-2 και MMP-9 κατακερματίζουν το μόριο της αγκρίνης (agrin) και η MMP-3 το μόριο της δυστρογλυκάνης, δυο πρωτεΐνες βασικές για την διατήρηση των OAPs (Fallier-Becker et al. 2011). Επομένως όταν οι μεταλλοπρωτεϊνάσες υπερεκφράζονται κατά τη νευροφλεγμονώδη απάντηση, αυξάνονται τα επίπεδα αποδιοργάνωσης της AQP4-OAPs, οδηγώντας σε αποδιοργάνωση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και στον σχηματισμό οιδήματος. Η ανάπτυξη του αγγειογενούς οιδήματος είναι ικανή να προκαλέσει περαιτέρω βλάβη στο ενδοθήλιο μέσω της αύξησης του όγκου του νερού και της υδροστατικής πίεσης. Άρα η παραγωγή των προ-φλεγμονώδη κυτοκινών, των

μεταλλοπρωτεϊνών και η εμφάνιση του οιδήματος μπορεί να περιοριστεί, ελαττώνοντας την αποδιοργάνωση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Fukuda et al. 2012).

Κατά την νευροφλεγμονή η Ακουαπορίνη 4 υπερεκφράζεται σε ολόκληρη την μεμβράνη του αστροκυττάρου κατά την φάση ανάκαμψης του οιδήματος, η οποία διαρκεί 2-14 μέρες μετά το τραύμα (Tourdias et al. 2011). Μια σειρά μελετών υποδεικνύει ότι Ακουαπορίνη 4 κατέχει νευροπροστατευτικό ρόλο στο οίδημα, καθώς ο οργανισμός αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης της με σκοπό να προωθήσει το νερό από το εγκεφαλικό παρέγχυμα στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και στα αιμοφόρα αγγεία. Ακόμη νέα πειραματικά δεδομένα συσχετίζουν την Ακουαπορίνη 4 με την ενεργοποίηση της μικρογλοίας (Auguste et al. 2007). Αλλαγές στην έκφραση της Ακουαπορίνης 4 συσχετίζονται με αλλαγές κατά την αστρογλοίωση και κατά την ενεργοποίηση της μικρογλοίας σε περιπτώσεις τραύματος στον εγκέφαλο. Η αστρογλοίωση μπορεί να χρειάζεται την παρουσία της Ακουαπορίνης 4 για να διευκολύνει την απαιτούμενη κίνηση του νερού για την μετακίνηση και την υπερτροφία των αστροκυττάρων. Κατά την ισχαιμία έχει παρατηρηθεί η ενεργοποίηση της μικρογλοίας και η απελευθέρωση κυτοκινών ως αποτέλεσμα της απόκρισης στην καταστολή της Ακουαπορίνης 4, η οποία μπορεί να οφείλεται στην παρουσία των ενεργοποιημένων διαύλων χλωρίου που εκφράζονται στα μικρογλοιακά κύτταρα. Όταν οι δίαυλοι αυτοί είναι ενεργοποιημένοι η μικρογλοία εμφανίζει μη-ενεργοποιημένο φαινότυπο (Eder et al. 1998). Επειδή η Ακουαπορίνη 4 είναι υπεύθυνη για την μετακίνηση του νερού, αποσιώπηση της προκαλεί αλλαγές στην οσμωτική πίεση οδηγώντας σε απενεργοποίηση των διαύλων χλωρίου με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η μικρογλοία. Τέλος η Ακουαπορίνη 4 πιθανόν να προωθεί την μείωση του οιδήματος καθώς εμπλέκεται στην καταστολή της ενεργοποίησης της μικρογλοίας (Liu et al. 2011).

Επομένως η Ακουαπορίνη 4 παίζει ρόλο κλειδί στην εξέλιξη του οιδήματος, χωρίς όμως να έχει διευκρινιστεί αν η παρουσία της έχει νευροπροστατευτικό ή νευροτοξικό ρόλο. Αυτό φαίνεται να σχετίζεται με τα χρονικά σημεία τα οποία επιλέγονται για την μελέτη της στα διάφορα μοντέλα τραύματος. Στην περίπτωση του αγγειογενούς οιδήματος, όπου ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός είναι αποδιοργανωμένος, η Ακουαπορίνη 4 κατέχει νευροπροστατευτικό ρόλο, καθώς περιορίζει την συσσώρευση του νερού από τον εξωκυττάριο χώρο του κεντρικού νευρικού συστήματος. Το οίδημα συσχετίζεται άμεσα με την νευροφλεγμονή και κατ' επέκταση με την ενεργοποίηση της μικρογλοίας και την αστρογλοίωση. Η υπερέκφραση της Ακουαπορίνης 4 φαίνεται να συνδέεται με την ανάκαμψη του οιδήματος συμβάλλοντας στην διαδικασία της νευροφλεγμονής μέσω της αστρογλοίωσης και της ενεργοποίησης της μικρογλοίας. Η απουσία ή η μείωση της Ακουαπορίνης 4 σχετίζεται με μείωση της αστρογλοίωσης και ενεργοποίηση της μικρογλοίας. Τέλος ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο λειτουργεί η Ακουαπορίνη 4 ως προς το κομμάτι της νευροφλεγμονής παραμένει άγνωστος, αλλά υπάρχουν πειραματικά δεδομένα τα οποία ενισχύουν την πεποίθηση ότι η Ακουαπορίνη 4 αποτελεί κοινό παρονομαστή για το οίδημα και την νευροφλεγμονή (Fukuda et al. 2012).

Επιπρόσθετα, η Ακουαπορίνη 4 κατέχει κύριο ρόλο και στην εξέλιξη της παθογένεσης στην νόσο του Alzheimer. Στην νόσο αυτή παρατηρείται συσσώρευση των διαλυμένων μορφών Αβ ολιγομερών, τα οποία δημιουργούν συσσωματώματα αδιάλυτων ολιγομερών που εναποτίθενται στον εγκέφαλο. Στην συνέχεια παρατηρείται υπερ-φωσφορλίωση και

συσσωμάτωση των tau πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα να δημιουργείται νευροεκφυλισμός (Attems et al. 2014). Η συσσώρευση των Αβ ολιγομερών οφείλεται στην έλλειψη απομάκρυνσης τους λόγω μη σωστής λειτουργίας αρκετών μηχανισμών εκκαθάρισης. Στην κατηγορία αυτών των μηχανισμών ανήκει: η λεμφική εκκαθάριση, η ενεργή μεταφορά διαμέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και ο κατακερματισμός της γλοίας. Η Ακουαπορίνη 4 φαίνεται να εμπλέκεται και στους τρεις αυτούς μηχανισμούς αλλά και στην συναπτική λειτουργία (Vardy et al. 2005).

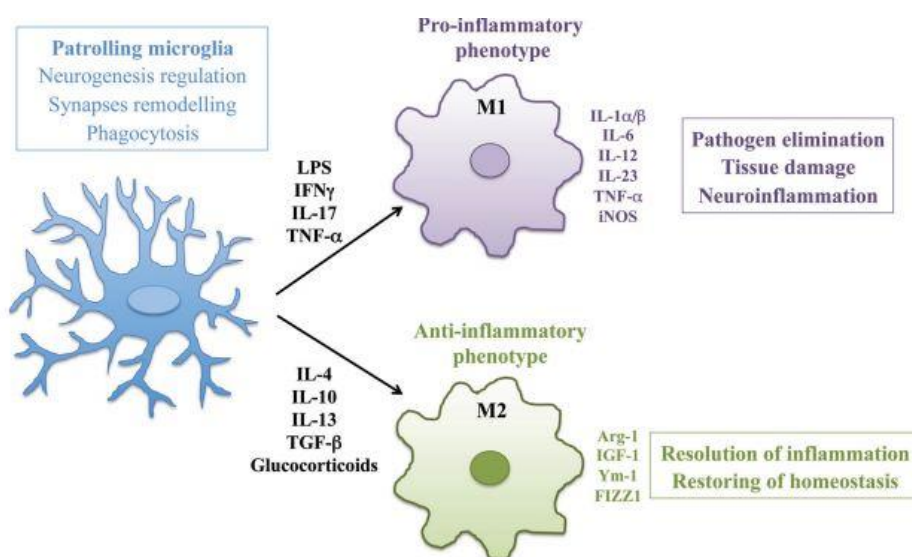
Επίσης είναι πολύ σημαντικό να επισημάνουμε ότι η Ακουαπορίνη 4 εκφράζεται σε τρεις περιοχές του εγκεφάλου, οι οποίες είναι τα όρια μεταξύ του εγκεφαλικού παρεγχύματος και των κύριων διαμερισμάτων που είναι πλούσια σε υγρά. Αυτά τα όρια περιλαμβάνουν: τα επενδυματικά κύτταρα, τις απολήξεις των αστροκυττάρων που βρίσκονται κάτω από τα επενδυματικά κύτταρα, τις απολήξεις των αστροκυττάρων που βρίσκονται κοντά στο υποχωριοειδές διαμέρισμα καθώς και τα πόδια των αποφυάδων των περιαγγειακών αστροκυττάρων. Η Ακουαπορίνη 4 φαίνεται να διαδραματίζει καίριο ρόλο στο λεμφικό σύστημα απορροής του κεντρικού νευρικού συστήματος (Aspelund et al. 2015). Το λεμφικό σύστημα απορροής του κεντρικού νευρικού συστήματος αποτελείται από τους περιαγγειακούς χώρους, γνωστοί και ως χώροι Virchow-Robin (Virchow-Robin spaces, VRS), από το περιαγγειακό μονοπάτι απορροής, από το γλυμφατικό σύστημα (glymphatic system) και από το λεμφικό αγγειακό σύστημα της σκληράς μήνιγγας. Η κυκλοφορία του εγκεφαλονωτιαίου υγρού και του VRS συστήματος παίζουν ισοδύναμο ρόλο στην συστημική λεμφική κυκλοφορία. Το VRS σύστημα είναι πλούσιο σε κανάλια γεμάτα με υγρά, τα οποία περιβάλλουν επίσης αρτηρίες τις φλέβες του παρεγχύματος. Ακόμη το σύστημα αυτό περιβάλλει επίσης τους περιαγγειακούς χώρους γύρω από μικροαγγεία του εγκεφάλου που καλύπτονται από τα πόδια των αποφυάδων των αστροκυττάρων. Επίσης, το γλυμφατικό μονοπάτι δείχνει ότι το εγκεφαλονωτιαίο υγρό εισέρχεται στον εγκέφαλο κατά μήκος του VRS συστήματος και αναμιγνύεται με το ενδιάμεσο υγρό. Το ενδιάμεσο υγρό φτάνει στο περιφερικό λεμφικό σύστημα μέσω του περιαγγειακού μονοπατιού απορροής κατά μήκος του βασικού υμένα των εγκεφαλικών τριχοειδών που βρίσκονται μέσα στην αγγειακή βασική μεμβράνη λείου μυός στις αρτηρίες. Η ροή του ενδιάμεσου υγρού διευκολύνεται από την Ακουαπορίνη 4, η οποία ελέγχει την εκκαθάριση των διαλυμένων ουσιών του ενδιάμεσου υγρού από το εγκεφαλικό παρέγχυμα. Πιο συγκεκριμένα, η Ακουαπορίνη 4 φαίνεται να διευκολύνει την είσοδο του εγκεφαλονωτιαίου υγρού από τις αρτηρίες των περιαγγειακών χώρων, αλλά και την έξοδο του ενδιάμεσου υγρού από τις φλέβες του περιαγγειακών χώρων. Από την μια πλευρά η Ακουαπορίνη 4 παρέχει χαμηλή αντίσταση για την μεταφορά του νερού από του περιαγγειακούς χώρους στο διάμεσο χώρο του εγκεφάλου. Από την άλλη πλευρά η Ακουαπορίνη 4 παρουσιάζει την υψηλότερη έκφραση γύρω από τις φλέβες με σκοπό να συμβάλλει στην διατήρηση χαμηλής αντίστασης για την απομάκρυνση του ενδιάμεσου υγρού από τις φλέβες (Iliff et al. 2012). Επομένως η Ακουαπορίνη 4 είναι σημαντική για την λειτουργία του λεμφικού συστήματος απορροής.

Τέλος αξίζει να αναφερθεί ότι για την μελέτη παθολογικών καταστάσεων στον εγκέφαλο χρησιμοποιείται η μέθοδος της μαγνητικής τομογραφίας (magnetic resonance imaging, MRI). Η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη για την ανίχνευση αλλαγών που παρατηρούνται μέσω της διέγερσης μορίων νερού. Η Ακουαπορίνη 4 είναι διάλυτος νερού οπότε μέσω της

χρήσης της μαγνητικής τομογραφίας μπορεί να μελετηθεί ο λειτουργικός ρόλος της AQP4 σε παθολογικές καταστάσεις. Επίσης η μέθοδος μαγνητικού συντονισμού diffusion-weighted magnetic resonance imaging (DWI) χρησιμοποιείται ως διαγνωστικό εργαλείο σε κλινικά και ερευνητικά εργαστήρια για την εκτίμηση βλαβών ως αποτέλεσμα διαφόρων εγκεφαλικών παθολογιών μετά από ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια που παρατηρούνται σε διάφορες νευροφλεγμονώδη ασθένειες. Μέσω της μεθόδου DWI γίνεται η αξιολόγηση των εγκεφαλικών αλλαγών σε κλινικά και πειραματικά μοντέλα. Η τεχνική DWI δίνει έναν συντελεστή μέσω του οποίου εκτιμάται η εγκεφαλική βλάβη και αρκετές μελέτες τον χρησιμοποιούν ως δείκτη για την Ακουαπορίνη 4. Η μέθοδος του μαγνητικού συντονισμού είναι ένα κρίσιμο εργαλείο για την ποσοτικοποίηση της εξέλιξης των νευροφλεγμονωδών καταστάσεων σε συνδυασμό με την Ακουαπορίνη 4 και το οίδημα (Tourdias et al. 2009).

2.1.3 Ο ρόλος της μικρογλοίας στην Νευροφλεγμονή

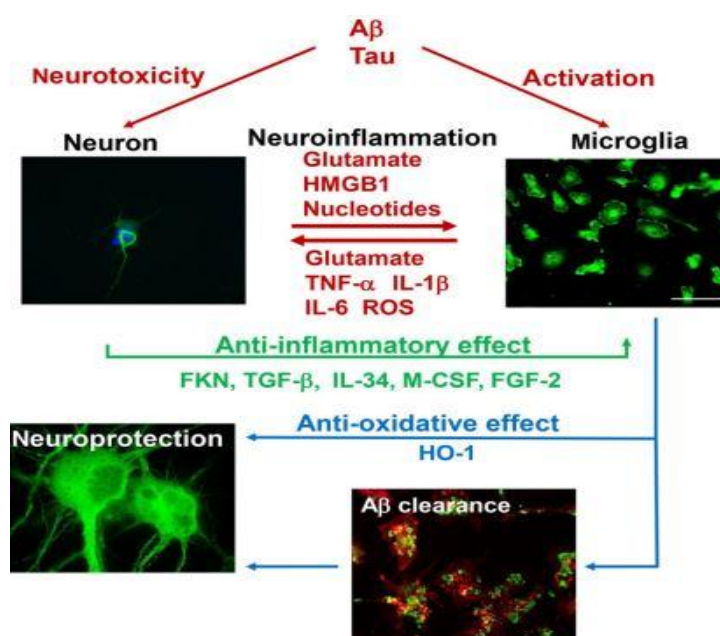
Στις ασθένειες του κεντρικού νευρικού συστήματος όπως οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες και οι ισχαιμίες, παρατηρούνται κατεστραμμένοι νευρώνες οι οποίοι διεγείρουν την ενεργοποίηση της μικρογλοίας μέσω διαφόρων σημάτων (πχ. έκκριση γλουταμικού) (**Εικόνα 11**). Η ενεργοποιημένη μικρογλοία ως απόκριση στην νευροφλεγμονή εκκρίνει διάφορα νευροτοξικά μόρια όπως είναι οι προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες, το γλουταμικό και οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Barger et al. 2001). Εν συνεχεία οι κατεστραμμένοι νευρώνες με τη σειρά τους μπορούν να καταστείλουν την ενεργοποίηση της μικρογλοίας μέσω της παραγωγής διαφόρων κυτοκινών και χημειοκινών πχ. Φρακταλκίνη, TGF- β , IL-34 και ο FGF-2 (Mizuno 2015).



Εικόνα 11: Η ενεργοποίηση και η πόλωση της μικρογλοίας σε φυσιολογικές και νευροφλεγμονώδη συνθήκες. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η μικρογλοία ρυθμίζει την ομοιόσταση του κεντρικού νευρικού συστήματος. Κατά την νευροφλεγμονή αποκτά μια αμοιβοειδή μορφολογία, εκδηλώνοντας είτε τον M1 είτε τον M2 φαινότυπο (Salvi et al. 2017).

2.1.3.1 Ο ρόλος της μικρογλοίας στις νευροεκφυλιστικές νόσους

Η Νευροφλεγμονή εμπλέκεται σε αρκετές ασθένειες του κεντρικού νευρικού συστήματος όπως είναι η νόσος του Alzheimer. Στη συγκεκριμένη νόσο, η μικρογλοία εντοπίζεται γύρω από τις πλάκες που δημιουργούνται ως αποτέλεσμα της συσσώρευσης των Αβ ολιγομερών, και κατέχει συνάμα νευροτοξικό και νευροπροστατευτικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της νόσου (**Εικόνα 12**) (Meda et al. 1995). Αναφορικά με τον νευροτοξικό της ρόλο, η ενεργοποίηση της μικρογλοίας φαίνεται να συμβάλλει στην εξέλιξη της νόσου του Alzheimer (Heneka et al. 2005). Αντίθετα, κατά την νευροπροστατευτική της δράση, η μικρογλοία καταστέλλει την νευροτοξικότητα των Αβ ολιγομερών μέσω της φαγοκυττάρωσης και του κατακερματισμού τους, παράγοντας αντι-οξειδωτικά και νευροτροφικούς παράγοντες (Yan et al. 2006).



Εικόνα 12: Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των νευρώνων και της μικρογλοίας στην νόσο του Alzheimer. Η νευροφλεγμονή επάγει την αλληλεπίδραση της μικρογλοίας και των νευρώνων, συμβάλλοντας στην παθογένεση της νόσου του Alzheimer. Οι Αβ πλάκες και οι πρωτεΐνες Tau επάγουν την νευροφλεγμονή. Αντίθετα αντι-φλεγμονώδη και αντι-οξειδωτικά μόρια καταστέλλουν την ενεργοποίηση της μικρογλοίας, ενισχύοντας τον νευροπροστατευτικό της χαρακτήρα (Mizuno 2015).

Εν συνεχεία, αρκετές μελέτες δείχνουν ότι το μικρογλοιακό μονοπάτι φαγοκυττάρωσης είναι ένας κοινός μηχανισμός που επάγει την συναπτική απώλεια και δυσλειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος στις νευροεκφυλιστικές νόσους. Πιο συγκεκριμένα μελέτες που έχουν γίνει σε ποντίκια στα οποία έχει εξαλειφθεί το γονίδιο *progranulin*, το οποίο σχετίζεται με την *frontal temporal dementia*, παρατηρήθηκαν νευροεκφυλιστικοί φαινότυποι καθώς και ενεργοποίηση του συμπληρώματος και ενίσχυση της φαγοκυττάρωσης των κατασταλτικών συνάψεων. Οι νευροεκφυλιστικές αυτές διαταραχές μπορούν να περιοριστούν μέσω της εξάλειψης της αλυσίδας Α του C1q (Lui et al. 2016).

Επίσης, στο γλαύκωμα, μια ακόμη νευροεκφυλιστική ασθένεια, στην οποία παρατηρείται επιλεκτική απώλεια των νευρωνικών γαγγλίων του αμφιβληστροειδούς και την βλάβη των συνάψεων (Stevens et al. 2007b). Σε μοντέλο DBA2J γλαυκώματος στο οποίο έχει γίνει εξάλειψη του γονιδίου C1qa, παρατηρήθηκε προστασία των γαγγλιακών κυττάρων των νευρώνων του αμφιβληστροειδούς και μείωση της συναπτικής απώλειας (Williams et al. 2016). Τα στοιχεία του συμπληρώματος και η μικρογλοία φαίνεται να συμμετέχουν στην συναπτική απώλεια σε ένα μοντέλο επαγόμενης βλάβης της μνήμης από τον ιό West Nile (Vasek et al. 2016). Επομένως η κατανόηση των σημάτων που επάγουν την ενεργοποίηση της μικρογλοίας και του συμπληρώματος, επάγοντας έτσι την φαγοκυττάρωση των συνάψεων θα μπορούσαν να δώσουν σημαντικές πληροφορίες για την χρήση τους ως πιθανούς θεραπευτικούς στόχους (Salter et al. 2017).

2.1.3.2 Μόρια-Επαγωγείς της ενεργοποίησης της μικρογλοίας

Η επαγωγή της παραγωγής νιτρικού οξέως και της IL-6 σε νευροφλεγμονώδεις καταστάσεις στον εγκέφαλο των θηλαστικών οδηγούν στην ενεργοποίηση της μικρογλοίας (Morales et al. 2013). Επιπλέον, οι Αβ πλάκες που δημιουργούνται στη νόσο του Alzheimer είναι υπεύθυνες για την καταστροφή των νευρώνων, οι οποίοι απελευθερώνουν γλουταμικό, μη-ιστονικές πρωτεΐνες συνδεδεμένες με το DNA (non-histone DNA-binding protein, HMGB1) και νουκλεοτίδια, τα οποία με τη σειρά τους ενεργοποιούν την μικρογλοία. Η μικρογλοία εκφράζει υποκατηγορίες ιονοτροπικών και μεταβολοτροπικών γλουταμικών υποδοχέων διαμέσου των οποίων προσδένεται το γλουταμικό ενισχύοντας την νευροτοξική δράση της μικρογλοίας. Ο παράγοντας HMGB1 εκκρίνεται και αυτός από νευρώνες που έχουν υποστεί βλάβη και έχει την ικανότητα της καταστολής της μικρογλοίας, οδηγώντας στην συσσώρευση των νευροτοξικών Αβ πλακών (Takata et al. 2004).

Τέλος τα νουκλεοτίδια: τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) και διφωσφορική ουριδίνη (UDP) απελευθερώνονται και αυτά από κατεστραμμένους νευρώνες. Η μικρογλοία εκφράζει τους ιονοτροπικούς (P2X4 και P2X7) και μεταβολοτροπικούς (P2Y1, P2Y2, P2Y6 και P2Y12) πουρινεργικούς υποδοχείς, οι οποίοι ενεργοποιούνται από το ATP. Όταν το ATP είναι σε χαμηλές συγκεντρώσεις επάγει την απελευθέρωση του πλασμιδογόνου, το οποίο προστατεύει τους νευρώνες. Αντίθετα όταν το ATP βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις επάγει την απελευθέρωση του TNF-α και της IL-6 (Inoue et al. 1998), (Hide et al. 2000). Το μόριο της διφωσφορικής ουριδίνης προάγει την νευροπροστατευτική δράση της μικρογλοίας. Στον εγκέφαλο το ATP επάγει την γρήγορη απόκριση της μικρογλοίας στην περιοχή όπου οι νευρώνες είναι κατακερματισμένοι (Davalos et al. 2005), (Quintas et al. 2014). Ο μεταβολοτροπικός υποδοχέας P2Y6 οδηγεί στην υπερέκφραση των κατεστραμμένων νευρώνων, ενώ η διφωσφορική ουριδίνη διεγείρει την μικρογλοιακή φαγοκυττάρωση μέσω του συγκεκριμένου υποδοχέα (Koizumi et al. 2007).

2.1.3.3 Νευροτοξικά μόρια που απελευθερώνονται από την ενεργοποιημένη μικρογλοία

Η ενεργοποιημένη μικρογλοία παράγει διάφορα νευροτοξικά μόρια, όπως είναι οι προ-φλεγμονώδη κυτοκίνες, το γλουταμικό, οι χημειοκίνες και οι ελεύθερες ρίζες. Ο TNF- α είναι μια προ-φλεγμονώδη κυτοκίνη που η οποία έχει βρεθεί σε αυξημένα επίπεδα σε ασθενείς με Alzheimer. Ο παράγοντας αυτός ενισχύει την παραγωγή του γλουταμικού από την μικρογλοία μέσω της έκφρασης της γλουταμινάσης, επάγοντας τον θάνατο των νευρώνων. Επίσης ο TNF- α είναι υπεύθυνος για την επαγωγή της έκφρασης του νευρωνικού υποδοχέα AMPA, ο οποίος επάγει τον νευρωνικό θάνατο μέσω της πρόκλησης βλάβης της μιτοχονδριακής λειτουργίας (Eugenin et al. 2001), (Doll et al. 2015).

Επιπρόσθετα, η IL-1 είναι άλλο ένα μόριο το οποίο διαδραματίζει καίριο ρόλο στην φλεγμονώδη διαδικασία. Ο υποδοχέας της μικρογλοίας NOD, όταν είναι ενεργοποιημένος οδηγεί στην διάσπαση της προ-IL1 β στην IL-1 β από την κασπάση 1 (Pétrilli et al. 2007), (Pirajuli et al. 2013).Εν συνεχεία, η IL-1 β ενεργοποιεί την έκφραση διαφόρων προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοτακτικών μορίων, επηρεάζοντας έτσι την συναπτική πλαστικότητα (Murray et al. 1998), (Vereker et al. 2000).

Επιπρόσθετα, η IL-6 είναι μια πλειοτροπική κυτοκίνη η οποία συμβάλλει στην νευροτοξικότητα ή την νευροπροστασία. Η IL-6 συμμετέχει ενεργά στα πρώιμα στάδια του σχηματισμού των Αβ πλακών. Τα αυξημένα επίπεδα της IL-6, έχουν συσχετιστεί με προβλήματα στην γνωστική λειτουργία. Ακόμη, έχει παρατηρηθεί ότι η κυτοκίνη αυτή ρυθμίζει την συναπτική μεταφορά και την συναπτική πλαστικότητα και συνάμα προωθεί την NMDA-νευροτοξικότητα (Huell et al. 1995), (Z. Liu et al. 2011).Τέλος, η ενεργοποιημένη μικρογλοία απελευθερώνει μεγάλες ποσότητες γλουταμικού μέσω της επαγωγής της έκφρασης της γλουταμινάσης. Η Νευροτοξικότητα είναι αποτέλεσμα της δendraτικής και αξονικής μεταφοράς, μέσω της σηματοδότησης του NMDA υποδοχέα (Piani et al. 1992). Η χρόνια ενεργοποίηση του υποδοχέα αυτού οδηγεί στην απελευθέρωση των Αβ πλακών (Bordji et al. 2010).

2.1.3.4 Ο ρόλος του CX3CR1 υποδοχέα στην ενεργοποίηση της μικρογλοίας και στην νευροφλεγμονή

Η ενεργοποίηση της μικρογλοίας, ρυθμίζεται από την χημειοκίνη Φρακταλκίνη (fractalkine, CX3CL1) καθώς και από τον υποδοχέα της CX3CR1 (Briones et al. 2014).Η Φρακταλκίνη αποτελεί μέλος της οικογένειας των χημειοκινών και είναι το μοναδικό μέλος της τάξης των CX3C χημειοκινών (Bazan et al. 1997). Σε αντίθεση με άλλες χημειοκίνες, η Φρακταλκίνη προσδένεται μόνο στον CX3CR1 υποδοχέα (S. Jung et al. 2000).Ο υποδοχέας αυτός ανήκει στην κατηγορία των υποδοχέων-συνδεδεμένων με G-πρωτεΐνες και εκφράζεται αποκλειστικά στην μικρογλοία (Imai et al. 1997).Το σηματοδοτικό μονοπάτι του CX3CL1/CX3CR1 φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων του ανοσοποιητικού και των νευρώνων καθώς και στην

αλληλεπίδραση των νευρώνων με την μικρογλοία και αντίστροφα, τόσο σε υγιείς συνθήκες όσο και σε συνθήκες νευροφλεγμονής (Sheridan et al. 2013).

Επομένως, διάφορες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό την διερεύνηση του ρόλου του CX3CL1/CX3CR1 σηματοδοτικού μονοπατιού σε συνθήκες ισχαιμικού τραύματος αλλά και στις νευροεκφυλιστικών νόσους. Ο ρόλος του CX3CL1/CX3CR1 φαίνεται να είναι νευροπροστατευτικός αλλά συνάμα και νευροτοξικός. Πιο συγκεκριμένα, σε ποντίκια στα οποία είχε αποσιωπηθεί η Φρακταλκίνη, παρουσίασαν μειωμένη ευαισθησία στην εμφάνιση εγκεφαλικής ισχαιμίας, συγκριτικά με τα φυσιολογικά ποντίκια (Soriano et al. 2002). Ακόμη, σε άλλη πειραματική μελέτη, η αποσιώπηση της Φρακταλκίνης οδήγησε σε μείωση της ισχαιμικής βλάβης και της φλεγμονής σε ποντίκια με εγκεφαλική ισχαιμία, καθώς και σε καταστολή της ενεργοποίησης και της νευροτοξικής δράσης της μικρογλοίας και των μακροφάγων σε μοντέλο πειραματικού ισχαιμικού τραύματος (Dénes et al. 2008), (Z. Tang et al. 2014). Σε αντιδιαστολή με όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, έρχονται κάποιες μελέτες οι οποίες υποστηρίζουν ότι η αποσιώπηση της Φρακταλκίνης, είναι ικανή για την πρόκληση προβλημάτων στην μάθηση, στην μνήμη καθώς και στην συμπεριφορά (Briones et al. 2014).

Επιπρόσθετα, άλλες πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η αποσιώπηση του CX3CR1 υποδοχέα φαίνεται να οδηγεί σε μείωση της εναπόθεσης των Αβ πλακών (Lee et al. 2010). Ακόμη ένας άλλος σημαντικός παράγοντας της νευροφλεγμονής, ο TGF-β, ο οποίος συμβάλλει στην νευρωνική διαφοροποίηση και στην συναπτική πλαστικότητα εκφράζεται από τα αστροκύτταρα και τη μικρογλοία. Ο παράγοντας αυτός ενισχύει την έκφραση του CX3CR1 υποδοχέα στην μικρογλοία. Πιο συγκεκριμένα ο TGF-β παράγεται άμεσα από την μικρογλοία αλλά και έμμεσα μέσω της επαγωγής του από την IL-34 και μπορεί να μειώνει την νευροτοξική δράση των Αβ πλακών (S. Chen et al. 2002), (Ma et al. 2012).

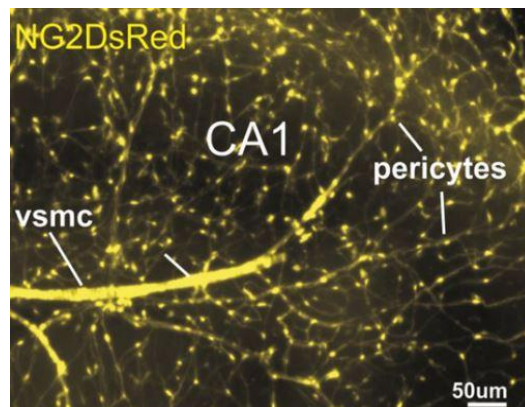
Επίσης, η Φρακταλκίνη εκφράζεται και από τους νευρώνες, προσδίδοντάς τους την ικανότητα καταστολής της ενεργοποίησης της μικρογλοίας. Η Φρακταλκίνη είναι υπεύθυνη για την υπερέκφραση του Milk Fat Globule-Epidermal Growth Factor 8 (MFG-E8) στην μικρογλοία και συνάμα για την καταστολή της παραγωγής του TNF-α και της IL-6 από την ενεργοποιημένη μικρογλοία. Τέλος στους κατακερματισμένους νευρώνες που εκφράζουν γλουταμικό, η Φρακταλκίνη προάγει την νευροπροστασία μέσω της ενίσχυσης της μικρογλοιακής φαγοκυττάρωσης των καταστρεμμένων νευρώνων μέσω της απελευθέρωσης του παράγοντα MFG-E8 (Mizuno et al. 2003), (Noda et al. 2011), (E. Li et al. 2012).

Συμπερασματικά η Νευροφλεγμονή είναι υπεύθυνη για την επαγωγή αλληλεπιδράσεων μεταξύ των νευρώνων και της μικρογλοίας οι οποίες συμβάλλουν στην ανάπτυξη πολλών νευροεκφυλιστικών νόσων. Η ενεργοποιημένη μικρογλοία παράγει διάφορα νευροτοξικά μόρια όπως είναι το γλουταμικό, ο TNF-α, IL-1β, IL-6 και οι ελεύθερες ρίζες. Αυτά τα μόρια οδηγούν στην επιτάχυνση της νευροτοξικής δράσης της μικρογλοίας. Όμως οι κατεστραμμένοι νευρώνες έχουν την ικανότητα να προάγουν αντι-φλεγμονώδη μόρια όπως είναι η Φρακταλκίνη, ο TGF-β, η IL-34 και ο FGF-2, τα οποία καταστέλλουν την ενεργοποίηση της μικρογλοίας, ενισχύοντας έτσι τον νευροπροστατευτικό της χαρακτήρα. Επομένως κρίνεται απαραίτητος ο σχεδιασμός νέων φαρμακευτικών στρατηγικών που θα

ενισχύουν τον νευροπροστατευτικό ρόλο της μικρογλοίας με απώτερο στόχο την αντιμετώπιση της νευροφλεγμονής (Mizuno 2015).

2.1.4 Ο ρόλος των περικυττάρων στην Νευροφλεγμονή

Τα περικύτταρα λαμβάνουν μέρος στους μηχανισμούς ειδικής και φυσικής ανοσίας. Αρκετές μελέτες *in vivo* υποστηρίζουν ότι τα περικύτταρα υφίστανται αρκετές τροποποιήσεις σε παθολογικές καταστάσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος, που σχετίζονται με φλεγμονώδη αλλαγές οι οποίες παρατηρούνται στο ισχαιμικό τραύμα, στην νόσο του Alzheimer και στο τραύμα (**Εικόνα 13**) (Fernández-Klett et al. 2013), (Giannoni et al. 2016). Η παρουσία των περικυττάρων είναι απαραίτητη για την κυκλοφορία των ουδετερόφιλων στο ενδοθήλιο. Λόγω της θέσης των περικυττάρων στο εξωτερικό ενδοθηλιακό τοίχωμα, μπορούν να αντιδράσουν στα ανοσοποιητικά ερεθίσματα που προέρχονται από τα κύτταρα γλοίας του εγκεφάλου ή από τα κυκλοφορούντα λευκοκύτταρα, τα οποία έχουν πρόσβαση στον περιαγγειακό χώρο κατά την διάρκεια νευροφλεγμονώδη καταστάσεων.



Εικόνα 13: Μορφολογία περικυττάρων. Στην εικόνα απεικονίζονται τα περικύτταρα(NG2DsRed) πάνω στα αρτηρίδια και στα τριχοειδή αγγεία των ενδοθηλιακών κυττάρων (Giannoni et al. 2018).

Τα περικύτταρα έχουν την ικανότητα να διεγείρονται από τον TNF- α και να απελευθερώνουν μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP-9), οι οποίες επηρεάζουν την ακεραιότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Zenaro et al. 2017). Ο TNF- α , η IL-1 β και η Ιντερφερόνη γ (Interferon γ , INF γ) προάγουν την παραγωγή της επαγόμενης συνθάσης του νιτρικού οξέος από τα περικύτταρα (Matsumoto et al. 2014). Ακόμη η αύξηση των επιπέδων της Κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2), της Ιντερλευκίνης 6 (IL-6) και της Μεταλλοπρωτεϊνάσης-2 (MMP-2) καθώς και η μείωση των επιπέδων της Ιντερλευκίνης 8 (IL-8), CXCL1, MCP1 και VCAM-1 επηρεάζεται από την παρουσία των περικυττάρων. Οι παράγοντες αυτοί είναι υπεύθυνοι για την προσέλκυση των ουδετερόφιλων, την ενεργοποίηση της μικρογλοίας καθώς και για την μετανάστευση των κυττάρων (Rustenhoven et al. 2015). Τέλος ο παράγοντας TGF- β 1 εμπλέκεται στην έκφραση των χημειοκινών και των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης στα περικύτταρα, επηρεάζοντας έτσι την κυκλοφορία των λευκοκυττάρων (Rustenhoven et al. 2016).

Ακόμη τα πόδια των αποφυάδων των αστροκυττάρων και τα περικύτταρα, λόγω της τοπολογίας τους, αλληλεπιδρούν το ένα με το άλλο, με αποτέλεσμα να επικοινωνούν κατά την ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος αλλά και σε συνθήκες φλεγμονής. Κατά την αγγειογένεση, τα αστροκύτταρα και τα περικύτταρα συμμετέχουν στην δημιουργία του βασικού υμένα των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα αστροκύτταρα και τα περικύτταρα συμμετέχουν στην έκφραση, τοπολογική διευθέτηση και στην πόλωση των μεταφορέων που συνδέονται με το ATP στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Παρόλα αυτά ο ρόλος των περικυττάρων-αστροκυττάρων υπό φυσιολογικές και υπό παθολογικές συνθήκες δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως.

Στην περίπτωση του εγκεφαλικού τραύματος παρατηρείται αποδιοργάνωση της Νευροαγγειακής Μονάδας, αύξηση των επιπέδων του γλουταμικού και δυσλειτουργία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Τα περιαγγειακά κύτταρα υφίστανται παθολογικές αλλαγές και τα περικύτταρα μεταναστεύουν από το ενδοθηλιακό τοίχωμα προς την ευρύτερη περιαγγειακή περιοχή στην οποία και φαίνεται να παραμένουν μετά από το τραύμα (Dore-Duffy et al. 2000). Οι μοριακοί μηχανισμοί που χαρακτηρίζουν την περικυτταρική-ενδοθηλιακή παθολογία σε συνθήκες τραύματος δεν είναι πλήρως κατανοητές μέχρι σήμερα. Ο παράγοντας PDGFRβ έχει προταθεί για την συμμετοχή του στην ανάπλαση του ιστού και των κυττάρων, οδηγώντας σε απώλεια των περικυττάρων (Fernández-Klett et al. 2013).

Στην νόσο του Alzheimer, για παράδειγμα παρατηρείται αποκόλληση των περικυττάρων από το αγγειακό τοίχωμα του εγκεφάλου. Η παθολογία των περικυττάρων έχει αντίκτυπο στην ακεραιότητα των αγγείων, οδηγώντας πιθανόν στην συσσώρευση τοξικών μορίων στο παρέγχυμα του εγκεφάλου και στην εμφάνιση νευροεκφυλιστικών αλλαγών. Ακόμη τροποποιήσεις ως προς τον μηχανισμό του μονοπατιού σηματοδότησης των περικυττάρων-ενδοθηλίου PDGFRβ/PDGF-BB οδηγούν στην καταστροφή του αγγείου (Sweeney et al. 2016). *In vivo* μελέτες στις οποίες η σηματοδότηση του PDGFRβ είναι μειωμένη, παρατηρείται βλάβη στα περικύτταρα και δυσλειτουργία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, με αποτέλεσμα την εκδήλωση νευροεκφυλισμού. Επομένως η αδυναμία του κεντρικού νευρικού συστήματος να απομακρύνει τις Αβ πλάκες οδηγεί στην αποδιοργάνωση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Αρκετές κλινικές και πειραματικές μελέτες υποστηρίζουν ότι η δυσλειτουργία της Νευροαγγειακής Μονάδας και η ύπαρξη φλεγμονής συμβάλλουν στην εξέλιξη της νόσου. Για αυτό το λόγο πραγματοποιούνται αρκετές μελέτες, στοχεύοντας στην δημιουργία βιοδεικτών οι οποίοι θα ανιχνεύουν τις δυσλειτουργίες του αγγειακού συστήματος του εγκεφάλου στα πρώιμα στάδια της νόσου (Sagare et al. 2013).

Παράλληλα, πολλές μελέτες δείχνουν ότι η δυσλειτουργία του νευροαγγειακού συστήματος κατέχει καίριο ρόλο στην εμφάνιση της επιληψίας. Η επιληπτική κατάσταση (status epilepticus, SE) επάγει την ενεργοποίηση των περικυττάρων και των αστροκυττάρων του ενδοθηλίου, έχει αρνητικές επιπτώσεις στην ακεραιότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, οδηγώντας στην εκδήλωση της επιληπτικής παθολογίας. Σε ένα πειραματικό μοντέλο στο οποίο είχε εκδηλωθεί επιληπτική κατάσταση παρατηρήθηκε έκτοπη κάλυψη των περικυττάρων (Milesi et al. 2014). Τέλος η λειτουργική εμπλοκή των περιαγγειακών κυττάρων, των περικυττάρων και των κυττάρων λείου μυός, πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω προκειμένου να κατανοηθεί ο ρόλος τους στην ανάπτυξη της επιληψίας.

Συμπερασματικά, ο τρόπος με τον οποίο τα περικύτταρα επικοινωνούν με τα αστροκύτταρα και τα μικρογλοιακά κύτταρα παραμένει ασαφής, όπως και το ερώτημα ποιο από αυτά τα κύτταρα διαδραματίζει τον κύριο ρόλο στην εμφάνιση και στον συντονισμό της φλεγμονώδους απόκρισης στο αγγειακό σύστημα του εγκεφάλου, το οποίο μένει ακόμη αδιευκρίνιστο. Ακόμη πρέπει να αποσαφηνιστεί κατά πόσο οι γενετικές τροποποιήσεις μπορούν να οριστούν ως κλινικά σημαντικοί παράγοντες κινδύνου για νευροπαθοφυσιολογία. Τέλος κρίνεται απαραίτητη η κατανόηση του ρόλου των κυττάρων του αγγειακού συστήματος του εγκεφάλου νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για την θεραπεία ασθενειών του κεντρικού νευρικού συστήματος (Giannoni et al. 2018).

2.1.5 Ο ρόλος των στενοσυνδέσμων στην Νευροφλεγμονή

Ένας λειτουργικός αιματοεγκεφαλικός φραγμός είναι απαραίτητος για την διατήρηση ενός μικροπεριβάλλοντος με την σωστή ισορροπία των ιόντων και των θρεπτικών στοιχείων για την αποτελεσματική νευρωνική σηματοδότηση. Αντίθετα ένας αποδιοργανωμένος αιματοεγκεφαλικός φραγμός μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση ανισορροπίας στην ροή των ιόντων και των μορίων που τον διαπερνούν, καθώς οι στενοσύνδεσμοι είναι κατεστραμμένοι, με αποτέλεσμα να αυξάνεται το φαινόμενο της εξαγγείωσης των ανοσοποιητικών κυττάρων. Οι συνέπειες της αποδιοργάνωσης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού κρίνονται σημαντικές για την εξέλιξη της νευροπαθολογίας.

Στις περισσότερες παθολογίες του εγκεφάλου η επιδιόρθωση της ακεραιότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού μπορεί να αποτελέσει πιθανή θεραπευτική προσέγγιση. Πληθώρα κυτοκινών έχει συσχετιστεί με αλλαγές στους στενοσύνδεσμούς και κατ'επέκταση και στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Για παράδειγμα το μόριο CCL2 φαίνεται να καταστέλλει την έκφραση των Occludin και ZO-1, που είναι δομικές πρωτεΐνες των στενοσυνδέσμων. Σε πειραματικές μελέτες στις οποίες είχε πραγματοποιηθεί χορήγηση σε καλλιέργειες μικροαγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων το συνθετικό πεπτίδιο Cavtratin το οποίο κωδικοποιεί την Caveolin-1, παρατηρήθηκε υπερέκφραση του μορίου CCL2, το οποίο οδήγησε σε αποδιοργάνωση των στενοσυνδέσμων (Song et al. 2007). Ακόμη άλλες μελέτες στις οποίες έχει γίνει αποσιώπηση των Μεταλλοπρωτεϊνών MMP-2 και MMP-9 σε καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων, παρατηρήθηκε αποδιοργάνωση των στενοσυνδέσμων καθώς και απώλεια της ακεραιότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Lehner et al. 2011). Επομένως οι κυτοκίνες οι οποίες φαίνεται να έχουν επίδραση στην διατήρηση της ακεραιότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανός θεραπευτικός στόχος σε αρκετές νευροφλεγμονώδη καταστάσεις (Greene et al. 2016).

Επίσης η αποδιοργάνωση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού συμβάλλει στην εξέλιξη διαφόρων νευροπαθολογικών διαταραχών όπως είναι το τραύμα και η Σκλήρυνση κατά πλάκας. Η Σκλήρυνση κατά πλάκας είναι μια ασθένεια απομυελίνωσης του κεντρικού νευρικού συστήματος, στην οποία τα ανοσοποιητικά κύτταρα διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, προκαλώντας νευροφλεγμονή, σχηματισμό οιδήματος και δυσλειτουργία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Μια σειρά μελετών ανοσοφθορισμού σε μεταθανάτιους εγκεφάλους από ασθενείς με Σκλήρυνση κατά πλάκας δείχνουν μη

φυσιολογική κατανομή των δομικών πρωτεϊνών των στενοσυνδέσμων Occludin, JAM-A και ZO-1, καταδεικνύοντας την σημαντική συμβολή των στενοσυνδέσμων στην αποδιοργάνωση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού στην νόσο αυτή (Wolburg et al. 2003), (Paul et al. 2013).

Ακόμη σε ζωικά πειραματικά μοντέλα αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας φαίνεται ότι η απώλεια των πρωτεϊνών Claudin-3 ή Claudin-5 στα ενδοθηλιακά αγγεία του εγκεφάλου οδηγεί σε αποδιοργάνωση των στενοσυνδέσμων (Wolburg et al. 2003), (Paul et al. 2013). Ένας πιθανός μοριακός μηχανισμός που οδηγεί στην εμφάνιση αυτών των αλλαγών στους στενοσυνδέσμους, είναι η απώλεια της Ιντεγκρίνης-1 στην βασική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων. Σε μοντέλα αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας η απώλεια των Claudin-5 και Occludin, συσχετίζεται με την αυξημένη έκφραση της Caveolin-1, υποστηρίζοντας ότι η ενδοκυττάρωση των Claudin-5 και Occludin επάγεται από την Caveolin, συμβάλλοντας στην αποδιοργάνωση των στενοσυνδέσμων του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Errede et al. 2012).

Ένα άλλο μόριο που είναι υπεύθυνο για την επαγωγή της αποδιοργάνωσης των στενοσυνδέσμων του αιματοεγκεφαλικού φραγμού κατά την νευροφλεγμονή είναι ο VEGF μέσω της υποέκφρασης των Claudin-5 και Occludin, οδηγώντας στην ενεργοποίηση των αστροκυττάρων στις νόσους της αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας και της πολλαπλής σκλήρυνσης (Argaw et al. 2009). Επίσης το ενδοθήλιο του αιματοεγκεφαλικού φραγμού επάγει την ενεργοποίηση του MAPK μονοπατιού ως απόκριση στον VEGF, με αποτέλεσμα την αποδιοργάνωση των στενοσυνδέσμων (Hudson et al. 2014).

Η υπερέκφραση της προφλεγμονώδους κυτοκίνης Ιντερλευκίνης-1β (IL-1β) σε συνθήκες νευροφλεγμονής συμβάλλει σημαντικά στην δυσλειτουργία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, μέσω της μεσολάβησης της στην καταστολή της μεταγραφής της Claudin-5 επάγοντας νουκλεοτιδική μετατόπιση της β-Κατίνης (β-Catenin) και του παράγοντα FoxO1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα του εγκεφάλου (Beard et al. 2014). Οι παρατηρήσεις αυτές υποστηρίζουν ότι η νευροφλεγμονή επαναφέρει κάποιες διαδικασίες που έχουν παρατηρηθεί στην ωρίμανση των στενοσυνδέσμων κατά την εμβρυική ανάπτυξη όπως είναι η επαγωγή της έκφρασης της Claudin-5. Σε άλλες μελέτες η IL-1β φαίνεται να επάγει την νουκλεοτιδική μετατόπιση της β-Κατίνης, οδηγώντας σε μείωση των επιπέδων έκφρασης των Claudin-5 και Occludin. Όμως το μονοπάτι Wnt επάγει νέα νουκλεοτιδική μετατόπιση της β-Κατίνης με αποτέλεσμα να αυξάνονται τα επίπεδα έκφρασης της Claudin-1 (Beard et al. 2014), (Tietz et al. 2015).

Επομένως, όλα τα παραπάνω δεδομένα υποστηρίζουν την σημασία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού στην ανάπτυξη της νευροφλεγμονής και την σημασία των στενοσυνδέσμων στην διατήρηση της ακεραιότητάς του. Για αυτό λόγο γίνεται μια μεγάλη προσπάθεια για την εύρεση νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων με στόχο τους στενοσυνδέσμους. Ως πιθανή θεραπευτική προσέγγιση θεωρείται η χρήση του RNAi για την τροποποίηση των στενοσυνδέσμων (Hanout et al. 2013). Όμως πρέπει να πραγματοποιηθούν περαιτέρω ερευνητικές μελέτες ως προς την κλινική και νευροπαθολογική συμμετοχή των στενοσυνδέσμων, με απώτερο στόχο την εύρεση νέων θεραπειών για την αντιμετώπιση πολλών διαταραχών του κεντρικού νευρικού συστήματος (Greene et al. 2016).

2.2 Το μοντέλο του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) στην μελέτη της νευροφλεγμονής

Η Νευροφλεγμονή κατέχει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση και στην εξέλιξη νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως είναι η νόσος του Alzheimer καθώς και η νόσος του Parkinson. Ο εγκέφαλος των ασθενών με νευροεκφυλιστικές ασθένειες χαρακτηρίζεται από αστρογλοίωση, ενεργοποίηση της μικρογλοίας και εμφάνιση αυξημένων επιπέδων των προ-φλεγμονώδη κυτοκινών. Λόγω της σημασίας της νευροφλεγμονής στην ανάπτυξη νευροεκφυλιστικών διαταραχών, χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο της επαγόμενης νευροφλεγμονής μέσω της χρήσης του λιποπολυσακχαρίτη (lipopolysaccharide, LPS) σε ποντίκια.

Ο λιποπολυσακχαρίτης είναι μια ενδοτοξίνη του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων η οποία οδηγεί στην εκδήλωση συστημικής φλεγμονής και νευροφλεγμονής. Η περιφερική χορήγηση του λιποπολυσακχαρίτη σε ποντίκια επάγει την ενεργοποίηση της μικρογλοίας και των αστροκυττάρων, καθώς και την έκφραση της Κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2), της Επαγόμενης Συνθάσης του Νιτρικού οξέος (iNOS) και των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών στον εγκέφαλο (Erickson et al. 2011). Είναι γνωστό ότι η μικρογλοία αποτελεί το κύριο κύτταρο του ανοσοποιητικού συστήματος του εγκεφάλου, το οποίο διαδραματίζει βασικό ρόλο υπό νευροφλεγμονώδη συνθήκες, αλλά και στις φυσιολογικές εγκεφαλικές λειτουργίες όπως είναι η συναπτική αναδιάρθρωση που σχετίζεται με την μνήμη και την μάθηση μέσω της απελευθέρωσης διαφόρων νευροτροφικών παραγόντων (Tremblay et al. 2011). Κατά την ανοσολογική απόκριση η μικρογλοία ενεργοποιείται, εμφανίζοντας διόγκωση του κυτταρικού της σώματος και μικρότερου μεγέθους απολήξεις, οδηγώντας σε καταστροφή των νευρώνων στην περίπτωση μιας ανεξέλεγκτης ή χρόνιας νευροφλεγμονής. Σε διάφορες μελέτες στις οποίες πραγματοποιήθηκε χορήγηση μιας ή περισσότερων δόσεων του λιποπολυσακχαρίτη, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα του αριθμού των CD11, CD45 και Iba-1 θετικών μικρογλοϊακών κυττάρων με φαινότυπο μικρογλοίωσης. Υπάρχουν και αρκετές αναφορές στις οποίες η μονή δόση LPS δεν οδήγησε σε ενεργοποίηση της μικρογλοίας και για αυτό κρίθηκε απαραίτητη η χορήγηση παραπάνω δόσεων (Catorce et al. 2016).

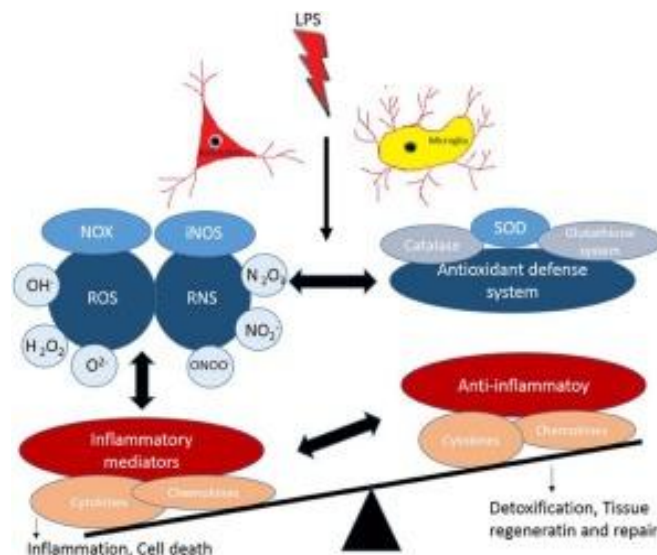
Η ενεργοποίηση της μικρογλοίας κατά την χορήγηση του LPS, πραγματοποιείται μέσω της πρόσδεσης του LPS στον υποδοχέα-4 της οικογένειας Toll (Toll-like receptor 4, TLR4) ο οποίος ενεργοποιεί το μονοπάτι του NFκβ και των MAPK κινάσων, οδηγώντας στην παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών όπως είναι: η IL-1β, η IL-6 και ο TNF-α (Noailles et al. 2018). Οι υποδοχείς της οικογένειας Toll, είναι ευαίσθητοι για τους υποδοχείς αναγνώρισης μοτίβου (Pattern Recognition Receptors, PRRs), οι οποίοι βρίσκονται στην επιφάνεια ή μέσα στο κυτταρόπλασμα αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων όπως είναι: τα δενδριτικά κύτταρα και τα μακροφάγα. Οι PRRs υποδοχείς είναι υπεύθυνοι για την επαγωγή μονοπατιών που ενεργοποιούν την φαγοκυττάρωση. Στους υποδοχείς αυτούς προσδένονται μόρια, που είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση του αντιγόνου, γνωστά ως Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (Olsen et al. 2017).

Αναφορικά με τον TLR4 υποδοχέα, είναι γνωστό ότι μετά την πρόσδεση του με το LPS ενδοκυτταρόνεται μέσω των παραγόντων TRAM και TRIF. Οι παράγοντες αυτοί με την σειρά

τους οδηγούν στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα-3 Ιντερφερόνης (Interferon Regulatory Factor-3, IRF3), ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση της Ιντερφερόνης τύπου Ι (Type I Interferon, IFN). Η ενδοκυττάρωση του υποδοχέα TLR4 κρίνεται απαραίτητη για την σηματοδότηση. Για την ρύθμιση της ενδοκυττάρωσης του υποδοχέα TLR4, είναι υπεύθυνες ορισμένες πρωτεΐνες κυτταρικής επιφανείας. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκει το μόριο CD14, το οποίο είναι μια πρωτεΐνη προσδεσμένη με GPI, που βρίσκεται στην επιφάνεια πολλών άλλο όχι όλων των κυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα TLR4. Το μόριο αυτό προσδένεται απευθείας στο LPS, κατακερματίζοντάς το, δημιουργώντας έτσι το σηματοδοτικό σύμπλοκο TLR4-MD-2. Το CD14 φαίνεται να είναι απαραίτητο για την έκφραση της Ιντερφερόνης Ι, η οποία σχετίζεται με τον παράγοντα TRIF. Τέλος ο υποδοχέας TLR4 εκφράζεται σε αστροκύτταρα και μικρογλοιακά κύτταρα, με αποτέλεσμα το LPS να προσδένεται στα κύτταρα αυτά, οδηγώντας στην ενεργοποίησή τους (Zanoni et al. 2011).

Πολλές πειραματικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με την χρήση του LPS σε μια διάφορα είδη ποντικών όπως είναι τα: CH3/He, B6C3F1, C57BL-6 και CD-1 (I. V. Yang et al. 2011). Μελέτες έχουν γίνει σε αγρίου τύπου ποντίκια διαφορετικών ηλικιών για την μελέτη διαφόρων νευροεκφυλιστικών ασθενειών, στις οποίες παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα mRNA της IL-6, IL-1 β και του TNF- α μετά από την χορήγηση μιας ή περισσότερων δόσεων LPS. Οι περισσότερες έρευνες που έχουν γίνει συνάδουν στα εξής: 1) η περιφερική χορήγηση του LPS οδηγεί σε επιδείνωση της νευροφλεγμονής σε ποντίκια ενήλικα αλλά και μεγαλύτερης ηλικίας και 2) οι υψηλές δόσεις ως αποτέλεσμα πολλαπλής χορήγησης του LPS οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα έκφρασης των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών στον εγκέφαλο. Οι μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών είναι η RT-PCR, η ELISA, το Western Blot, η Κυτταρομετρία Ροής και η Ανοσοϊστοχημεία (Kitazawa et al. 2005), (Sy et al. 2011), (Francois et al. 2014).

Επίσης αξίζει να σημειωθεί για την επιλογή του κατάλληλου μοντέλου, στο οποίο θα χορηγηθεί το LPS, διαδραματίζει καίριο ρόλο το είδος του ποντικίου. Πιο συγκεκριμένα, τα C57BL6 και τα FVB/NL ποντίκια χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία στο LPS, σε αντίθεση με τα CH3H/HeJ και 12S1/SvImJ τα οποία παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε αυτό (I. V. Yang et al. 2011). Αυτό κρίνεται και από το γεγονός ότι κατά την χορήγηση του LPS στα ποντίκια έχει παρατηρηθεί αυξημένος αριθμός των αστροκυττάρων τα οποία υπερεκφράζουν την GFAP πρωτεΐνη, ενεργοποιούνται και εμφανίζουν φαινότυπο αστρογλοίωσης. Τα γεγονότα αυτά αποτελούν ακόμη μια ένδειξη ύπαρξης νευροφλεγμονής.



Εικόνα 14: Μοντέλο του LPS για την μελέτη των νευροεκφυλιστικών νόσων. Στην εικόνα απεικονίζεται η συμμετοχή του LPS στην μελέτη της νευροφλεγμονής αλλά συνάμα και την χρήση του ως μοντέλο μελέτης της νευροπροστατευτικής δράσης της μικρογλοίας και των αστροκυττάρων (Sharma et al. 2015).

Επομένως το μοντέλο επαγομένης-LPS νευροφλεγμονής αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την κατανόηση των παθολογικών μηχανισμών που εμπλέκονται στο νευροεκφυλισμό καθώς και για τον έλεγχο πιθανών θεραπευτικών προσεγγίσεων, επιδεικνύοντας ταυτόχρονα και την κατάλληλη προσοχή στην ερμηνεία αυτών των αποτελεσμάτων για πιθανή εφαρμογή τους στον ανθρώπινο οργανισμό (**Εικόνα 14**). Εν κατακλείδι, κρίνεται απαραίτητος ο συνδυασμός διαφόρων παθολογικών μονοπατιών, με σκοπό την δημιουργία θεραπευτικών συστημάτων, τα οποία θα μπορούν να εφαρμοστούν για την αντιμετώπιση μιας πληθώρας νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως είναι το Alzheimer και το Parkinson (Catorce et al. 2016).

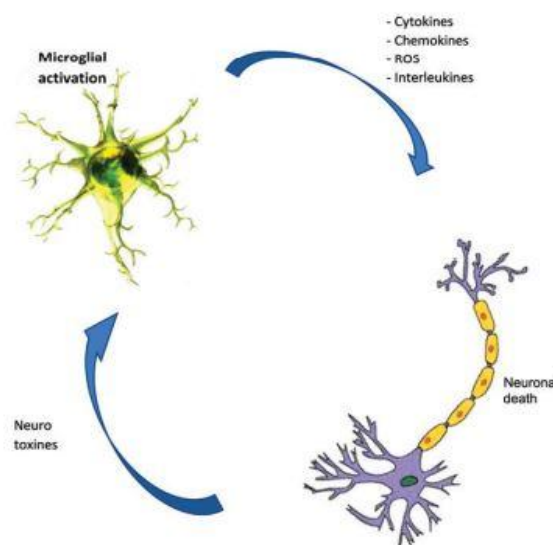
2.3 Η σημασία της Νευροφλεγμονής στις Νευροεκφυλιστικές νόσους

Ο εκφυλισμός του κεντρικού νευρικού συστήματος χαρακτηρίζεται με την πάροδο του χρόνου από απώλεια της νευρωνικής δραστηριότητας. Οι αιτίες οι οποίες οδηγούν στον εκφυλισμό των νευρώνων δεν είναι τελείως κατανοητές, η συχνότητα εμφάνισης των νευροεκφυλιστικών νόσων αυξάνεται με την ηλικία. Αυτό το φαινόμενο το οποίο επηρεάζει κυρίως άτομα μεγαλύτερης ηλικίας, εμφανίζεται σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως είναι η νόσος του Alzheimer, η Σκλήρυνση κατά πλάκας, η νόσος του Parkinson και η Αμυοτροφική Πλευρική Σκλήρυνση που προκαλείται από ιογενείς λοιμώξεις. Οι ιοί είναι ικανοί να τραυματίσουν τους νευρώνες είτε άμεσα κατακερματίζοντας τους είτε έμμεσα μέσω επαγωγής της απόπτωσης, οδηγώντας στην εκδήλωση νευροεκφυλισμού. Σε πολλές νευροεκφυλιστικές νόσους εμπλέκονται η διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, η καταστροφή των αξόνων καθώς και η παρουσία ανοσοποιητικών κυττάρων, τα εισέρχονται στον εγκέφαλο μέσω της διήθησης.

Ο νευροεκφυλισμός ο οποίος δημιουργείται από ιούς, περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση του κεντρικού νευρικού συστήματος με περιβαλλοντικούς και ιικούς παράγοντες, οδηγώντας στην ενεργοποίηση των μηχανισμών ανοσολογικής απάντησης (Czirr et al.

2012). Η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού του κεντρικού νευρικού συστήματος περιλαμβάνει την συμμετοχή των αστροκυττάρων και της μικρογλοίας, τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κατά την ανάπτυξη, την ενηλικίωση και την γήρανση. Η μικρογλοία παράγει παράγοντες μέσω των οποίων επηρεάζει τα αστροκύτταρα και τους νευρώνες ως απόκριση στους παθογόνους μικροοργανισμούς ή στους κατεστραμμένους ιστούς των νευρώνων, με σκοπό τον αυτοπεριορισμό της απόκρισης του ανοσοποιητικού συστήματος του εγκεφάλου και την επιδιόρθωση των κατεστραμμένων ιστών (Wyss-Coray et al. 2002), (Sofroniew et al. 2010). Ωστόσο η φλεγμονή στον ιστό μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή νευροτοξικών παραγόντων που ενισχύουν την παθολογία της νόσου, ενισχύοντας την διατήρηση φλεγμονωδών ερεθισμάτων. Οι φλεγμονώδη διαδικασίες έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή νευροτοξικών παραγόντων όπως είναι προ-φλεγμονώδη κυτοκίνες και Ιντερλευκίνες. Αυτοί οι νευροτοξικοί παράγοντες σχετίζονται με διάφορες νευροεκφυλιστικές νόσους, επάγοντας διάφορους ενδοκυτταρικούς μηχανισμούς όπως είναι η αποδόμηση των πρωτεϊνών, η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, η απώλεια της αξονικής μεταφοράς και η απόπτωση (Taylor et al. 2002), (Chevalier-Larsen et al. 2006), (Chen et al. 2009). Η συμμετοχή των μικρογλοιακών κυττάρων και των αστροκυττάρων στην εξέλιξη των νευροεκφυλιστικών νόσων κρίνεται σημαντική.

Το κεντρικό νευρικό σύστημα επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το περιφερικό σύστημα. Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι μια ισχυρή φλεγμονώδης απόκριση στην περιφέρεια όπως είναι η χορήγηση του LPS και η διήθηση των λευκοκυττάρων από το περιφερικό σύστημα στον εγκεφαλο, είναι ικανή να οδηγήσει στην εκδήλωση νευροφλεγμονής και νευροεκφυλισμού. Ως απόκριση στην νευροφλεγμονή, είναι η ενεργοποίηση της μικρογλοίας, η οποία επάγει την απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, ευνοώντας έτσι την διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Noh et al. 2014). Για αυτό παρατηρείται η διήθηση των λευκοκυττάρων της περιφέρειας στον κεντρικό νευρικό σύστημα, αλλά και των T λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων. Ακόμη σε συνθήκες χρόνιας φλεγμονής παρατηρείται μακροχρόνια ενεργοποίηση της μικρογλοίας που οδηγεί σε παρατεταμένη απελευθέρωση φλεγμονώδη παραγόντων, αυξάνοντας τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες, διαιωνίζοντας με αυτόν τον τρόπο τον κύκλο της φλεγμονής, η οποία επιδεινώνει την παθολογική κατάσταση διαφόρων νευροεκφυλιστικών ασθενειών (**Εικόνα 15**) (Tansey et al. 2007). Τα αστροκύτταρα συμμετέχουν και αυτά στην ανάπτυξη των νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Διάφορες μελέτες υποστηρίζουν ότι τα αστροκύτταρα βοηθούν τον ιό του HIV-1 να προσβάλλει το ανοσοποιητικό σύστημα του εγκεφάλου, ενισχύοντας την ανάγκη τους για χρήση ως πιθανών θεραπευτικών στόχων (Schnell et al. 2011).



Εικόνα 15: Η σχέση μεταξύ της ενεργοποίησης της μικρογλοίας και του θανάτου των νευρώνων. Η ενεργοποιημένη μικρογλοία μπορεί να έχει νευροτοξική ή/και νευροπροστατευτική δράση. Η αυξημένη παραγωγή νευροτοξικών παραγόντων, ευνοεί την νευροφλεγμονή ή τον νευρωνικό θάνατο, οδηγώντας στην εμφάνιση νευροφλεγμονής (Chen et al. 2016).

Στην χρόνια φλεγμονή η ενεργοποίηση της μικρογλοίας κατέχει κεντρικό ρόλο στην παθοφυσιολογία των νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Για παράδειγμα τα μικρογλοιακά κύτταρα τα οποία απελευθερώνουν IL-1, φαίνεται να συνεντοπίζονται με τις Αβ πλάκες και με τα νευροϊνιδικά συσσωματώματα στην νόσο του Alzheimer (Henkel et al. 2004). Επίσης αρκετοί ιοί οδηγούν στον μακροχρόνιο ερεθισμό του ανοσοποιητικού συστήματος του εγκεφάλου, ενισχύοντας την σημασία των ιών στην εκδήλωση νευροεκφυλιστικών διαταραχών (Graeber et al. 2011). Επιπλέον η νευροφλεγμονή μπορεί να αποτελέσει την αιτία ή την συνέπεια του χρόνιου οξειδωτικού στρες, το οποίο είναι βασικό χαρακτηριστικό των νευροεκφυλιστικών ασθενειών που οδηγούν σε δομική αλλοίωση διαφόρων λιπιδίων και πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την εμφάνιση του νευροεκφυλισμού. Τέλος τα ενεργοποιημένα μικρογλοιακά κύτταρα αποτελούν πηγή απελευθέρωσης ελευθέρων ριζών, TNF- α και γλουταμικού τα οποία όταν εκκρίνονται σε υψηλές δόσεις είναι νευροτοξικά, οδηγώντας έτσι στην ανάπτυξη νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Qian et al. 2007), (Gordon et al. 2012), (González et al. 2014).

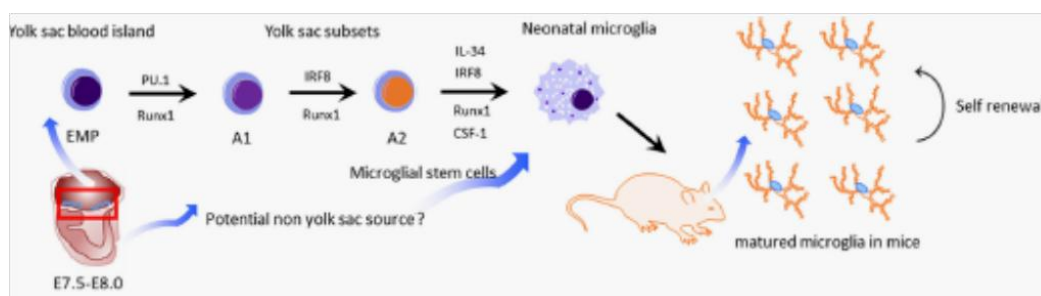
Συμπερασματικά, πρέπει να πραγματοποιηθούν συμπληρωματικές μελέτες προκειμένου να αναπτυχθούν νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις όπου θα χρησιμοποιούν τα αστροκύτταρα και τα μικρογλοιακά κύτταρα ως πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι με απώτερο σκοπό την αντιμετώπιση των νευροεκφυλιστικών νόσων (Chen et al. 2016).

Κεφάλαιο 3: Χημικός Παράγοντας PLX-X ως καταστολέας της μικρογλοίας

3.1 Ο ρόλος του υποδοχέα Colony-Stimulating Factor (CSF1) στην ανάπτυξη της μικρογλοίας

Η μικρογλοία ταυτοποιήθηκε ως οντότητα και ονομάστηκε για πρώτη φορά το 1919 από τον Pío del Río-Hortega, ο οποίος καλείται και ως «πατέρας της μικρογλοίας» από πολλούς νευροεπιστήμονες (Sierra et al. 2016). Η μικρογλοία αντιπροσωπεύει περίπου το 10% του συνολικού αριθμού των κυττάρων του ενήλικου κεντρικού νευρικού συστήματος (Masuda et al. 2016). Τα μικρογλοιακά κύτταρα κατέχουν τον ρόλο του ρυθμιστή πολλών διεργασιών του κεντρικού νευρικού συστήματος, έχοντας παθολογικό αλλά και προστατευτικό χαρακτήρα σε διάφορες νευρολογικές διαταραχές. Ακόμη η μικρογλοία φαίνεται να επηρεάζει την συναπτική ανάπτυξη και επικοινωνία και την ρύθμιση της λειτουργίας άλλων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στην συνολικά ορθή λειτουργία του εγκεφάλου (Masuda et al. 2016). Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 1, η μικρογλοία εμφανίζει δύο λειτουργικές κατηγορίες: 1) τον προ-φλεγμονώδη M1 φαινότυπο, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την παραγωγή προ-φλεγμονωδών και νευροτοξικών παραγόντων, 2) τον αντι-φλεγμονώδη φαινότυπο, ο οποίος συμμετέχει στην επιδιόρθωση του ιστού, μέσω της έκκρισης αντι-φλεγμονωδών παραγόντων (Y. Tang et al. 2016). Επομένως, η στόχευση της μικρογλοίας και η εύρεση της σωστής ισορροπίας μεταξύ των δύο φαινοτύπων αποτελεί μια θεραπευτική στρατηγική για την αντιμετώπιση των νευροφλεγμονωδών διαταραχών (Du et al. 2017).

Σημαντικός παράγοντας για την στόχευση και μελέτη της δράσης της μικρογλοίας στις διάφορες νευροεκφυλιστικές νόσους, είναι ο υποδοχέας CSF1 (Colony Stimulating Factor) (Colonna et al. 2017). Πιο συγκεκριμένα, η μικρογλοία φαίνεται να αποικίζει το κεντρικό νευρικό σύστημα κατά την ανάπτυξη προερχόμενη από τα c-Kit⁺ βλαστικά κύτταρα, τα οποία βρίσκονται στον λεκιθικό σάκο (Kierdorf et al. 2013). Η συγκεκριμένη κατηγορία κυττάρων αναπτύσσεται σε CD45⁺/c-Kit⁺/CX3CR1⁺ κύτταρα, τα οποία στην συνέχεια μεταναστεύουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα και μετατρέπονται σε μικρογλοία. Η ανάπτυξη αυτών των κυττάρων είναι εξαρτώμενη από τους παράγοντες Pu.1 και Irf8 αλλά και από τον υποδοχέα CSF1 (**Εικόνα 16**) (Kierdorf et al. 2013), (Ginhoux et al. 2010), (Erblich et al. 2011). Μετά την αποίκιση της μικρογλοίας στο κεντρικό νευρικό σύστημα, ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός διαχωρίζει αποτελεσματικά την μικρογλοία από την περιφέρεια, με αυτό τον τρόπο αποτρέπεται η είσοδος των περιφερικών μονοκυττάρων και των μακροφάγων στον εγκεφαλο υπό φυσιολογικές συνθήκες, και έτσι η μικρογλοία σχηματίζει έναν αυτόνομο πληθυσμό (Mildner et al. 2007), (Ginhoux et al. 2010).

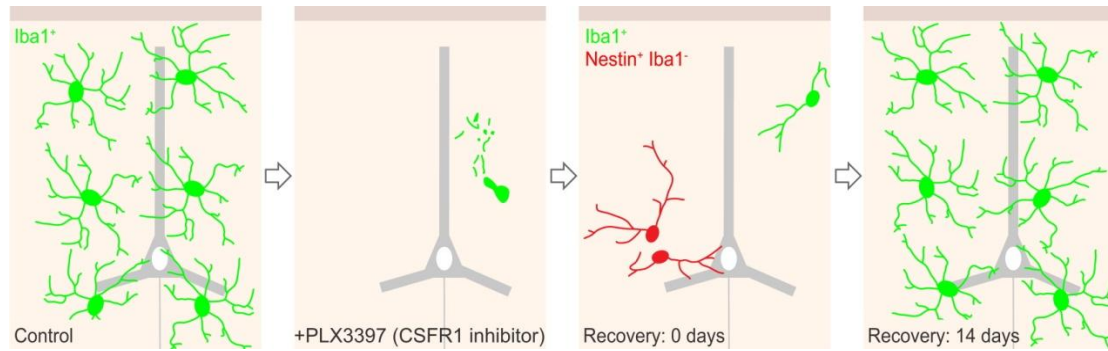


Εικόνα 16: Η ανάπτυξη της μικρογλοίας στο κεντρικό νευρικό σύστημα ποντικού. Η μικρογλοία προέρχεται από ανώριμα ερυθρομυελικά προγονικά κύτταρα, (Immature Erythromyeloid Progenitors (EMPs) τα οποία βρίσκονται στον λεκινικό σάκο κατά την 8^η εμβρυική ημέρα. Κατά την ανάπτυξη τα προγονικά αυτά κύτταρα εισέρχονται και εγκαθίστανται στον εμβρυϊκό εγκέφαλο μέσω των παραγόντων *Pu.1*, *Irf8* και *Runx1*. Για την περαιτέρω ανάπτυξη αυτών των κυττάρων ως προς τον μικρογλοϊκό φαινότυπο είναι απαραίτητη η δράση των παραγόντων *IL-34* και *CSF1*, οι οποίοι επάγουν τον πολλαπλασιασμό της μικρογλοίας. Η μικρογλοία έχει την ικανότητα να ανανεώνεται συνεχώς κατά την διάρκεια της ενήλικης ζωής (Han et al. 2017).

Ο υποδοχέας *CSF1* εκφράζεται στην μικρογλοία, στα μακροφάγα και στους οστεοκλάστες και έχει δύο μόρια συνδέτες την *IL-34* και τον *CSF1* (Lin et al. 2008), (Patel et al. 2009). Ο *CSF1* είναι υπεύθυνος για την ρύθμιση του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της επιβίωσης των μακροφάγων (Patel et al. 2009). Σε ποντίκια, στα οποία πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση του μορίου *CSF1* ή του υποδοχέα *CSF1*, παρατηρήθηκε μειωμένος αριθμός των μακροφάγων (J. Li et al. 2006). Επιπρόσθετα, σε *knockout* ποντίκια για τον *CSF1* υποδοχέα, παρατηρήθηκε εξάλειψη της μικρογλοίας και θάνατος των ποντικών πριν την ενηλικίωση (Ginhoux et al. 2010), (Erblich et al. 2011). Αξίζει να αναφερθεί ότι στον εγκέφαλο, η μικρογλοία αποτελεί τον μοναδικό κυτταρικό τύπο που εκφράζει τον υποδοχέα *CSF1* υπό φυσιολογικές συνθήκες (Erblich et al. 2011), (Nandi et al. 2012).

3.1.1 Φαρμακευτική προσέγγιση εξάλειψης της μικρογλοίας

Αρκετές φαρμακευτικές προσεγγίσεις έχουν αναπτυχθεί με σκοπό την εξάλειψη της μικρογλοίας στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Για την επιβίωση και την ανάπτυξη της μικρογλοίας, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει το μονοπάτι σηματοδότησης του *CSF1* υποδοχέα (Elmore et al. 2014), (Elmore et al. 2015). Επομένως οι πειραματικές μελέτες επικεντρώθηκαν στην χορήγηση ενός καταστολέα του υποδοχέα *CSF1*, για την εξάλειψη της μικρογλοίας, χωρίς όμως να είναι επιβλαβής για την επιβίωση των ποντικών (Rice et al. 2017). Ακόμη, η συνολική εξάλειψη της μικρογλοίας μέσω της χορήγησης του καταστολέα δεν φαίνεται να καταστρέφει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, αλλά πιθανόν να είναι ικανός για την κινητοποίηση κρυφών μικρογλοϊκών προγονικών κυττάρων (Hidden microglial progenitors), οι οποίοι εκφράζουν το μάρτυρα βλαστικών κυττάρων *Nestin* (Εικόνα 17) (Hughes et al. 2014), (Elmore et al. 2014). Ένα μόριο που χρησιμοποιείται για την εξάλειψη της μικρογλοίας και χορηγείται μέσω της τροφής στα ποντίκια είναι ο Χημικός Παράγοντας Χ, το οποίο είναι ανάλογο του μορίου *PLX*, το οποίο είναι ένα μικρό μόριο που καταστέλλει τον υποδοχέα *CSF1* της μικρογλοίας, διαπερνώντας τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό χωρίς να επηρεάζει την ακεραιότητά του.



Εικόνα 17: Η καταστολή του υποδοχέα CSF1 επάγει τον θάνατο της μικρογλοίας. Στο ενήλικο κεντρικό νευρικό σύστημα ο πληθυσμός επαναδημιουργείται λόγω της κινητοποίησης μικρογλοιακών βλαστικών κυττάρων (Hughes et al. 2014), (Elmore et al. 2014).

Επιπρόσθετα, από πειραματικές μελέτες που έχουν γίνει, έχει δειχθεί ότι η καταστολή του CSF1 υποδοχέα, έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της μικρογλοίας και όχι την υποέκφραση των μικρογλοιακών μαρτύρων (Sprangenberg et al. 2016). Επίσης μετά την διακοπή της χορήγησης του PLX, παρατηρείται ανάκαμψη της μικρογλοίας μέσα σε μικρό χρονικό διάστημα (3-7 ημερών) (Elmore et al. 2014). Δηλαδή, η εξάλειψη της μικρογλοίας επιτυγχάνεται μετά από συνεχή χορήγηση της θεραπείας στα ποντίκια. Αυτό επιβεβαιώνεται από πρόσφατες μελέτες οι οποίες υποστηρίζουν ότι το 90% των $CD11b^{+}CD45^{int}$ μικρογλοιακών κυττάρων μπορεί να εξαλειφθεί μετά από συνεχή θεραπεία χορήγησης του καταστολέα για 21 ημέρες (Szalay et al. 2016a), (M. Li et al. 2017). Ακόμη έχουν γίνει μελέτες εξάλειψης της μικρογλοίας του νωτιαίου μυελού, μέσω της χρήσης του μορίου Mac-saporin 1, το οποίο είναι μία επιλεκτική μικρογλοιακή ανοσοτοξίνη η οποία επάγει την αποδιοργάνωση του αιματικού φραγμού του νωτιαίου μυελού καθώς και την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών (Yao et al. 2016).

Πίνακας 1: Ανασκόπηση των φαρμακολογικών μελετών εξάλειψης της μικρογλοίας (Han et al. 2017)

Pharmacological intervention	Efficiency	Time window	Physiological effects
CSF-1R inhibitor (PLX3397)	99%	21 days	has no cognitive or behavioral impairments
CSF-1R inhibitor (PLX3397)	~90%	21 days	promotes brain recovery in intracerebral hemorrhage
CSF-1R inhibitor (PLX3397)	~90%	21 days	exacerbates brain recovery in brain ischemia
CSF-1R inhibitor (PLX3397)	97%	21 days	increases infarct size and brain injury after stroke
CSF-1R inhibitor (PLX5622)	~90%	2 or 6 weeks	ameliorates radiation-induced cognitive deficits
CSF-1R inhibitor (PLX5622)	~90%	7 days	ameliorates inflammation induced by neuronal lesion
CSF-1R inhibitor (PLX5622)	~80%	28 days	prevents neuronal loss and contextual memory in Alzheimer's
CSF-1R inhibitor (GW2580)	Not shown	6 weeks	attenuates depression-like behavior and kidney function
Liposomal clodronate	70%	2 weeks	decreases anxiety and despair behaviors throughout life
Liposomal clodronate	~80%	1 or 5 days	alters spatial learning performance and social behavior
Mac-1-saporin	50%	1 day	triggers bone marrow derived-cell infiltration into spinal cord

Στις διάφορες πειραματικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, τα ευρήματα αναφορικά με τις επιπτώσεις της εξάλειψης της μικρογλοίας στον κεντρικό νευρικό σύστημα είναι αντιφατικά (**Πίνακας 1**). Πιο συγκεκριμένα η εξάλειψη της μικρογλοίας μέσω της χορήγησης του PLX3397, λειτούργησε θετικά ως προς την διατήρηση των νευροπροστατευτικών λειτουργιών και της ακεραιότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, μειώνοντας την διήθηση των λευκοκυττάρων στο κεντρικό νευρικό σύστημα κατά την ενδοεγκεφαλική αιμορραγία (M. Li et al. 2017). Σε αντιδιαστολή, έρχεται το εύρημα ότι μετά την χορήγηση του PLX3397, παρατηρήθηκε επιδείνωση της νευροφλεγμονής και του εγκεφαλικού τραύματος σε συνθήκες εγκεφαλικής ισχαιμίας (Szalay et al. 2016a), (Jin et al. 2017a). Ακόμη, μια άλλη φαρμακολογική προσέγγιση που χρησιμοποιήθηκε πρόσφατα για την ειδικευμένη καταστολή της μικρογλοίας είναι η χορήγηση του PLX5662, το οποίο είναι ένα μόριο με υψηλότερη διεισδυτική ικανότητα στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, συγκριτικά με το PLX3397. Το PLX5662 είναι ικανό για την πρόκληση ταχείας και εξειδικευμένης εξάλειψης των Iba-1 και CD68 θετικών μικρογλοιακών κυττάρων του κεντρικού νευρικού συστήματος μέσα σε διάστημα τριών ημερών (Acharya, Green, et al. 2016).

Εν συνεχεία, με τα παραπάνω ευρήματα, φαίνεται ότι η οξεία εξάλειψη της μικρογλοίας μέσω του PLX5662 καθώς και η μετέπειτα ανασύσταση του πληθυσμού είναι ικανή για την αντιμετώπιση της νευροφλεγμονής και την προώθηση του της ανάκαμψης του εγκεφάλου, παρά την εκτεταμένη νευρωνική απώλεια του ιππόκαμπου (Rice et al. 2017). Πρόσφατες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει ότι ένα άλλο μόριο το GW2580, καταστολέας του υποδοχέα CSF1, εξαλείφει και την μικρογλοία και τα μακροφάγα. Το μόριο αυτό φαίνεται να εξαλείφει τα IBA⁺ μακροφάγα που υπάρχουν στο ήπαρ, συμβάλλοντας έτσι στην προστασία της λειτουργίας του ήπατος (Chalmers et al. 2017). Όπως προαναφέρθηκε στο κεφάλαιο 3.1 ο υποδοχέας CSF1 εκφράζεται από τα μακροφάγα αλλά και από την μικρογλοία, με αποτέλεσμα οι καταστολείς αυτοί να μην είναι ειδικοί μόνο για την μικρογλοία, καταστέλλοντας έτσι την ανοσολογική απόκριση (Crespo et al. 2011), (Jäkel et al. 2017). Ακόμη, ορισμένοι επιστήμονες υποστηρίζουν ότι οι μικρογλοιακοί πρόγονοι στον μυελό των οστών και στον ιστό των μακροφάγων επηρεάζονται εξίσου από τον καταστολέα του CSF1 υποδοχέα (Waisman et al. 2015), (Jäkel et al. 2017).

Τέλος άλλη μια μέθοδος εξάλειψης της μικρογλοίας είναι η χορήγηση λιποσωμικής Clodronate (Liposomal Clodronate). Μελέτες στις οποίες έχει γίνει έγχυση του μορίου αυτού στον ιππόκαμπο, παρατηρήθηκε εξάλειψη των Iba-1⁺ μικρογλοιακών κυττάρων στην περιοχή του ιππόκαμπου, οδηγώντας σε διαταραχή της εκμάθησης και της κοινωνικότητας (Torres et al. 2016). Επομένως κρίνεται απαραίτητη η πραγματοποίηση και άλλων μελετών, για να χρησιμοποιηθεί η εξάλειψη της μικρογλοίας ως μέθοδος για την αντιμετώπιση διαφόρων νευροεκφυλιστικών διαταραχών.

3.1.2 Η χρήση διαφόρων αναλόγων του Χημικού Παράγοντα PLX-Χγια την μελέτη διαφόρων νευροεκφυλιστικών ασθενειών

Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε εξάλειψη της μικρογλοίας μέσω της χορήγησης του PLX3397 σε 5xFAD ποντίκια, στα οποία η θανάτωση των μικρογλοιακών κυττάρων δεν είχε επίπτωση στην συνείδηση και την συμπεριφορά τους (Sosna et al. 2018). Το πειραματικό μοντέλο 5xFAD χαρακτηρίζεται από ισχυρή και εκτεταμένη αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος στην παρουσία ενδοεγκεφαλικών αμυλοειδών, των οποίων η εναπόθεση αρχίζει στον πρώτο 1,5 μήνα και φθάνει σε υψηλά επίπεδα στον 5^ο μήνα (Oakley et al. 2006). Επίσης, η χορήγηση του PLX3397 σε ποντίκια 5xFAD ηλικίας δύο μηνών, οδήγησε σε καταστολή του σχηματισμού των νευρωνικών πλακών και της συσσώρευσης των ενδοεγκεφαλικών αμυλοειδών (Sosna et al. 2018). Σε αντιδιαστολή έρχονται άλλες μελέτες στις οποίες η χορήγηση του PLX3397 σε ποντίκια 5xFAD ηλικίας δέκα μηνών, δεν παρατηρήθηκε κάποια επίπτωση στα επίπεδα Αβ ή στην συσσώρευση των πλακών. Επομένως από τα αντικρουόμενα συμπεράσματα των δύο αυτών μελετών, συμπεραίνεται ότι η ηλικία του ζώου καθώς και η πορεία δημιουργίας των αμυλοειδών αποθέσεων η οποία πιθανόν να είναι μην αναστρέψιμη από ένα σημείο και έπειτα επηρεάζει την δράση του καταστολέα της μικρογλοίας (Spangenberg et al. 2016).

Επιπρόσθετα, στις θεραπείες όπου χορηγούνται σε υψηλές δόσεις και για μεγάλο χρονικό διάστημα καταστολείς του CSF1 υποδοχέα, φαίνεται να μην αποτελούν την κατάλληλη επιλογή για την θεραπεία της νόσου του Alzheimer, καθώς δεν φαίνεται να συμβάλλουν στην μείωση της συσσώρευσης των αμυλοειδικών πλακών. Για το λόγο αυτό έχουν γίνει αρκετές μελέτες για την χορήγηση καταστολέων σε χαμηλότερες δόσεις (Dagher et al. 2015). Η χορήγηση χαμηλότερων δόσεων φαίνεται να τροποποιεί την λειτουργία της μικρογλοίας, χωρίς να εξαλείφει όλη την μικρογλοία από τον εγκέφαλο. Από επιπλέον πειραματικές μελέτες που έγιναν, βρέθηκε η δόση του PLX5622, η οποία έχει τις λιγότερες επιπτώσεις στον αριθμό των μικρογλοιακών κυττάρων (πάνω από το 30% συνολικής μείωσης του πληθυσμού). Η χορήγηση της δόσης αυτής, πριν την συσσώρευση των αμυλοειδικών πλακών σε 3xTg-AD ποντίκια (διαγονιδιακό μοντέλο AD), βελτίωσε την εξαρτώμενη από τον υπόκαμπο μνήμη (Olmos-Alonso et al. 2016). Τέλος σε άλλες μελέτες, υποστηρίζεται ότι η καταστολή του CSF1 υποδοχέα, επηρεάζει τον χημειοτακτισμό και τον πολλαπλασιασμό της μικρογλοίας, εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την μετανάστευση της στην περιοχή εμφάνισης των αμυλοειδικών πλακών, χωρίς όμως να επηρεάζει τον αριθμό ή τα επίπεδα των πλακών. Άρα τα αντικρουόμενα αυτά ευρήματα καταδεικνύουν την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση του τρόπου δράσης του καταστολέα του CSF1 υποδοχέα (Jay et al. 2015), (Wang et al. 2015), (Wang et al. 2016).

Ακόμη, μελέτες εξάλειψης της μικρογλοίας έχουν πραγματοποιηθεί και για την Αμυοτροφική Πλευρική Σκλήρυνση (ALS) σε SOD1^{G93A} διαγονιδιακά ποντίκια, στα οποία χορηγήθηκε το GW2580 μόριο-καταστολέας του CSF1 υποδοχέα. Σε αυτά τα ποντίκια παρατηρήθηκε μειωμένη εξέλιξη της νόσου, μείωση του θανάτου των κινητικών νευρών και αυξημένη επιβίωση των ποντικών, λόγω της εξάλειψης των μικρογλοιακών κυττάρων του νωτιαίου μυελού. Επίσης πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας, έδειξαν ότι ο καταστολέας αυτός προστατεύει τους σκελετικούς νευρώνες από το φαινόμενο της απονεύρωσης, το οποίο

συνέβαινε όταν η μικρογλοία ήταν παρούσα στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Martínez-Muriana et al. 2016).

Επίσης σε μελέτες που έχουν γίνει στην νευροεκφυλιστική νόσο Prion, μια σπάνια και θανατηφόρα πάθηση τα συμπτώματά της περιλαμβάνουν: απώλεια μνήμης, απώλεια της ισορροπίας, προβλήματα στην ομιλία, προβλήματα όρασης και τύφλωση, προοδευτική επιδείνωση και ακινησία, φαίνεται ότι ο υποδοχέας CSF1 ελέγχει την μικρογλοϊώση και συμβάλλει στον νευροεκφυλισμό (Gomez-Nicola et al. 2015). Ερευνητικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε CaM/Tet-DT_A ποντίκια, τα οποία χρησιμοποιούνται ως μοντέλο επαγόμενης νευρωνικής απώλειας (Yamasaki et al. 2007). Στο μοντέλο αυτό χορηγήθηκε PLX3397, όπου παρατηρήθηκε λειτουργική ανάκαμψη των νευρώνων μετά από πρόκληση νευρωνικής απώλειας στον ιππόκαμπο (Rice et al. 2015). Εν συνεχεία, σε μοντέλα στα οποία πραγματοποιήθηκε ακτινοβολία και χορήγηση του PLX5622, παρατηρήθηκε βελτίωση της γνωστικής λειτουργίας (Acharya et al. 2016). Σε πειραματικά μοντέλα εγκεφαλικής ισχαιμίας, η χορήγηση του PLX3397, είχε ως αποτέλεσμα την επιδείνωση της μετά-ισχαιμικής φλεγμονής και του εγκεφαλικού τραύματος (Jin et al. 2017). Τέλος η χορήγηση του PLX3397 σε μοντέλο Cx3Cr1^{GFP/+} ποντικών, στο οποίο έχει προκληθεί εγκεφαλική ισχαιμία, δεν παρατηρήθηκε κάποια τροποποίηση στην λειτουργία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού καθώς και μη στατιστικά σημαντική μείωση των μονοκυττάρων στο αίμα (Szalay et al. 2016). Επομένως όλες αυτές οι μελέτες τονίζουν την σημαντικότητα της μικρογλοίας στην εξέλιξη των νευροεκφυλιστικών ασθενειών και στην στόχευση της ως πιθανό θεραπευτικό στόχο.

3.1.3 Εξάλειψη της μικρογλοίας μέσω γενετικής τροποποίησης

Η εξάλειψη της μικρογλοίας μπορεί να επιτευχθεί και μέσω γενετικών μεθόδων, οι οποίες πολλές αποδεικνύονται πιο προσιτές και εξειδικευμένες συγκριτικά με τις φαρμακολογικές στρατηγικές (Πίνακας 2). Τα κύρια πλεονεκτήματα της εξάλειψης της μικρογλοίας μέσω γενετικών προσεγγίσεων είναι: 1) η χρήση συγκεκριμένων κυτταρικών εκκινήτων οι οποίοι είναι συζευγμένοι με γονίδια αυτοκτονίας, 2) η ύπαρξη περιορισμένων παρενεργειών στους περιφερικούς ιστούς και 3) η εμφάνιση υψηλότερης απόδοσης σε σχέση με τις φαρμακευτικές μεθόδους (Jäkel et al. 2017).

Πίνακας 2: Ανασκόπηση των γενετικών μελετών για την εξάλειψη της μικρογλοίας (Han et al. 2017)

Depletion strategy	Efficiency	Time window	Physiological effects
CD11b-HSVTK	56%	7 days	little effect on axonal degeneration in concussive brain injury
CD11b-HSVTK	>90%	7 days	represses EAE-associated neuroinflammation
CD11b-HSVTK	>90%	2 weeks	circulating monocytes occupy brain after microglia depletion
CD11b-HSVTK ^{mt-30}	51%	30 days	has no effect on motor neuron degeneration in ALS
CX3CR1 ^{CRE} DTR	80%	3 days	causes a cytokine storm and astrogliosis
CX3CR1 ^{CRE} DTR	99%	1 day	reduces synaptic structural plasticity associated with learning

Για την επίτευξη της εξάλειψης της μικρογλοίας, έχουν δημιουργηθεί διαγονιδιακά ποντίκια, τα οποία εκφράζουν το γονίδιο αυτοκτονίας της κινάσης της θυμιδίνης ιικού απλού έρπητα (Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase, HSVTK) καθώς και τον

μεταλλαγμένο τύπο του γονίδιου αυτό, τον HSVTK^{mt-30} κάτω από τον εκκινητή C11b (Gowing et al. 2006), (Bennett et al. 2014). Το γονίδιο HSVTK είναι ένα γονίδιο αυτοκτονίας το οποίο ενεργοποιείται και μετατρέπεται σε τοξικό (επάγοντας απόπτωση και αναστολή του DNA) μετά την χορήγηση του προ-φαρμάκου gancyclovir, οδηγώντας σε πάνω από 90% εξάλειψη της μικρογλοίας στα διαγονιδιακά CD11b-HSVTK ποντίκια και συνάμα επαναδημιουργία του πληθυσμού λόγω της εισόδου στον εγκέφαλο μακροφάγων από την περιφέρεια τα οποία έμοιαζαν με την μικρογλοία. Η είσοδος των μακροφάγων στο κεντρικό νευρικό σύστημα πραγματοποιήθηκε εξαιτίας της αποδιοργάνωσης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Varvel et al. 2012). Άλλες μελέτες στα συγκεκριμένα διαγονιδιακά ποντίκια υποστηρίζουν ότι η εξάλειψη της μικρογλοίας μπορεί να καταστείλει την νευροφλεγμονή σε μοντέλο πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας (Herpner et al. 2005). Επιπρόσθετα, η εξάλειψη της μικρογλοίας σε ποντίκια με τον μεταλλαγμένο τύπο του γονίδιου το HSVTK^{mt-30}, παρατηρήθηκε χαμηλή επίδραση στον εκφυλισμό του κινητικού νευρώνα σε συνθήκες αμυοτροφικής πλευρικής σκλήρυνσης (Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS), υποδηλώνοντας ότι τα μικρογλοιακά κύτταρα που εκφράζουν το μεταλλαγμένο γονίδιο δεν συμβάλλουν στην εξέλιξη του νευροεκφυλισμού στην νόσο αυτή (Gowing et al. 2008), (Wieghofer et al. 2015).

Άλλη μια εναλλακτική γενετική προσέγγιση, είναι η χρήση της τοξίνης διφθέρια (Diphtheria Toxin, DP), η οποία είναι μια ανοσοτοξίνη που εξαλείφει πολλούς κυτταρικούς τύπους (Jäkel et al. 2017). Πρόσφατες μελέτες, σε CX3CR1^{CreER} ποντίκια, στα οποία η έκφραση του υποδοχέα της ανοσοτοξίνης αυτής πραγματοποιείται υπό τον Cre-επαγόμενο ανασυνδυασμό, δείχνουν μπορεί να γίνει συγκεκριμένη εξάλειψη της μικρογλοίας μέσω της συστηματικής χορήγησης της τοξίνης (Parkhurst et al. 2013), (Bruttger et al. 2015). Η απόδοση της εξάλειψης της μικρογλοίας ανέρχεται στο 90% και τα CX3CR1⁺ κύτταρα στην περιφέρεια παραμένουν ανεπηρέαστα, με την χρήση αυτής της μεθόδου (Wieghofer et al. 2016). Ακόμη στο μοντέλο των CX3CR1^{CreER} ποντικών η εξάλειψη της μικρογλοίας φαίνεται να μειώνει τα επίπεδα συναπτικής πλαστικότητας (Parkhurst et al. 2013). Επίσης, η εξειδικευμένη και μαζική εξάλειψη της μικρογλοίας, μπορεί να προκαλέσει την επαναδημιουργία της ταχύτατα, μέσω των αποθεμάτων που υπάρχουν μέσα στον εγκέφαλο σε βλαστικά κύτταρα θετικά για τον δείκτη βλαστικότητας Nestin αλλά και μέσω του μονοπατιού σηματοδότησης της IL-1, χωρίς την συμβολή των κυκλοφορούντων κυττάρων της περιφέρειας. Τα μικρογλοιακά κύτταρα που προέρχονται από δεξαμενές βλαστικών μικρογλοιακών κυττάρων του εγκέφαλου εκφράζουν τον υποδοχέα της IL-1, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την αυτό-ανανέωση της μικρογλοίας (Bruttger et al. 2015). Τέλος σε πρόσφατες μελέτες εξάλειψης της μικρογλοίας μέσω γενετικών μεθόδων, παρατηρήθηκε επαναδημιουργία των κυττάρων, μέσα σε διάστημα 5 ημερών, όμως αυτά τα νέα κύτταρα δεν έχουν χαρακτηριστεί πλήρως ακόμα (Jäkel et al. 2017).

3.2 Μελλοντικές κατευθύνσεις για την χρήση της εξάλειψης της μικρογλοίας ως θεραπευτική προσέγγιση

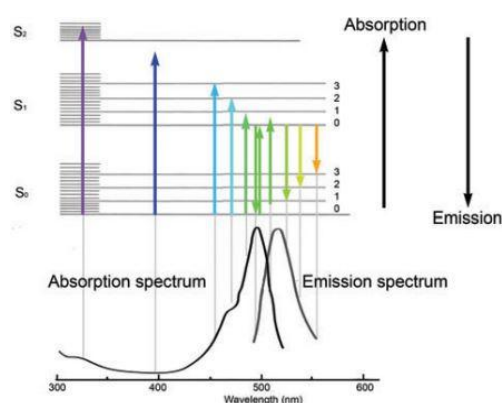
Στην επιστήμη της Νευροβιολογίας έχουν γίνει αξιοσημείωτες προσπάθειες για την κατανόηση της μικρογλοίας αναφορικά με την προέλευση, την ανάπτυξη, τους φαινοτύπους και τις λειτουργίες της. Όμως η επιστημονική κοινότητα τώρα αρχίζει να αποκρυπτογραφεί τον αιτιογενικό της χαρακτήρα ως προς τον ρόλο της στις διαταραχές του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η ανάπτυξη νέων μεθόδων και τεχνολογιών, συμβάλλουν στην διερεύνηση της δράσης της μικρογλοίας στην νευροφλεγμονή, με σκοπό την χρήση της ως πιθανό θεραπευτικό στόχο. Στο κεφάλαιο 3.1 συζητήθηκαν τα συστήματα εξάλειψης της μικρογλοίας, τα οποία αποτελούνται από θεραπείες γενετικής στόχευσης καθώς και από φαρμακευτικές προσεγγίσεις. Ανάμεσα σε αυτές τις στρατηγικές ανήκει και η χορήγηση φαρμάκων από το στόμα, τα οποία μπορεί να επηρεάζουν και άλλους τύπους κυττάρων που εκφράζουν τους στοχευόμενους υποδοχείς στο περιφερικό σύστημα, καταστέλλοντας με αυτό τον τρόπο το ανοσοποιητικό σύστημα. Για αυτό το λόγο η κλινική εφαρμογή των φαρμακευτικών στρατηγικών πρέπει να γίνεται με προσοχή.

Μελλοντικά, θα πρέπει να προταθούν νέες ερευνητικές μελέτες, στις οποίες θα πραγματοποιείται εξάλειψη της μικρογλοίας στα διάφορα στάδια των ασθενειών. Η χρήση της εξάλειψης της μικρογλοίας ως κλινική παρέμβαση για την αντιμετώπιση της νευροφλεγμονής, μπορεί να εφαρμοσθεί μόνο όταν η επιστημονική κοινότητα θα είναι επαρκώς ενημερωμένη. Για αυτό θα πρέπει να γίνει πλήρης αξιοποίηση της γνώσης που εξήγαγε ο χώρος των νευροβιολογίας από τα ειδικά σχεδιασμένα γενετικά εργαλεία για την εξάλειψη της μικρογλοίας. Επομένως, θα πρέπει να εξακριβωθεί από τις ήδη δημοσιευμένες μελέτες αν η εξάλειψη της αντιστοιχεί σε καταστολή ή σε απλή υποέκφραση του υποδοχέα CSF1 και αυτό θα πρέπει να πραγματοποιηθεί εκ νέου, μέσω της χρήσης νέων αποκλειστικών δεικτών μικρογλοίας. Εν συνεχεία, σε αυτό που θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή, είναι αν η επαναδημιουργία της μικρογλοίας μετά την εξάλειψη της στο κεντρικό νευρικό σύστημα, αποτελεί αποτέλεσμα γρήγορης ανάκαμψης της ή διήθησης των περιφερικών μονοκυττάρων. Εν κατακλείδι, με την βελτίωση και την εξέλιξη των κυτταρο-ειδικών θεραπειών στόχευσης, η μελλοντική έρευνα φέρει νέες ανακαλύψεις στον τομέα της νευροφλεγμονής (Han et al. 2017).

Κεφάλαιο 4: Χρήσης της Μικροσκοπίας δύο φωτονίων για την μελέτη της Νευροαγγειακής Μονάδας

4.1 Μικροσκοπία Φθορισμού

Η μικροσκοπία φθορισμού αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για την παρακολούθηση της φυσιολογίας των κυττάρων (Sanderson et al. 2014). Αυτή η μέθοδος συνιστά ένα σημαντικό εργαλείο για την επίλυση οπτικών προβλημάτων. Τα μόρια που χρησιμοποιούνται για τις ιδιότητες του φθορισμού τους καλούνται φθοροφόρα (**Εικόνα 18**). Οι φθορίζουσες ενώσεις στην αποκαλούμενη βασική τους κατάσταση απορροφούν, φωτεινή ενέργεια (φωτόνια). Η απορροφούμενη ενέργεια μετακινεί ένα ηλεκτρόνιο από την βασική του κατάσταση σε μια διεγερμένη κατάσταση και το φθοροφόρο επιστρέφει σε χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση μέσω της εκπομπής φθορισμού. Πολλές οργανικές ενώσεις, έχουν εγγενές φθορισμό (αυτοφθορισμό) και κάποιες από αυτές είναι χρήσιμες για την ειδική σήμανση ορισμένων μορίων σε βιολογικά συστήματα. Η μικροσκοπία φθορισμού χρησιμοποιεί ως πλεονέκτημα συνθετικές ενώσεις που έχουν συζυγείς διπλούς δεσμούς, τέτοια δομή έχουν τα αρωματικά μόρια. Παράδειγμα χρωμοφόρου μορίου αποτελεί η GFP πρωτεΐνη, η δομή της οποίας χαρακτηρίζεται από μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση τριών αμινοξέων σερίνης-θρεονίνης-γλυκίνης που βρίσκονται σε μια α-έλικα στο κέντρο του ιμιδαζολίου, σχηματίζοντας έτσι την δομή ενός δακτυλίου. Μεταλλάξεις στην δομή αυτή προσθέτουν περισσότερους συζυγείς διπλούς δεσμούς, μετατοπίζοντας την διέγερση και την εκπομπή φθορισμού σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, πχ. σε κίτρινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Yellow Fluorescent Protein, YFP). Η σύγχρονη μικροσκοπία φθορισμού δεν λειτουργεί μόνο ως μέσο απεικόνισης, αλλά το μικροσκόπιο λειτουργεί και ως ένας συμπυκνωτής ο οποίος φωτίζει το δείγμα, η προσέγγιση αυτή καλείται ως *epi-illumination* (Lichtman et al. 2005).



Εικόνα 18: Βασικές Αρχές του Φθορισμού. Στην εικόνα απεικονίζεται το φάσμα απορρόφησης (*absorption*) και εκπομπής (*emission*) του κοινού φθοροφόρου FITCH (*Fluorescein Isothiocyanate*) (Lichtman et al. 2005).

Στην μικροσκοπία φθορισμού ευρέως πεδίου, φθορίζοντα παρασκευάσματα με σημαντικό πάχος όπως είναι στρογγυλά κύτταρα ή τομές ιστών που δεν απεικονίζονται καλά διότι ανιχνεύονται ταυτόχρονα φθορίζοντα σήματα από τα μόρια που βρίσκονται εκτός αλλά και κοντά στο επίπεδο εστίασης, αυξάνοντας το θόρυβο σήματος, δίνοντας εικόνες με χαμηλή

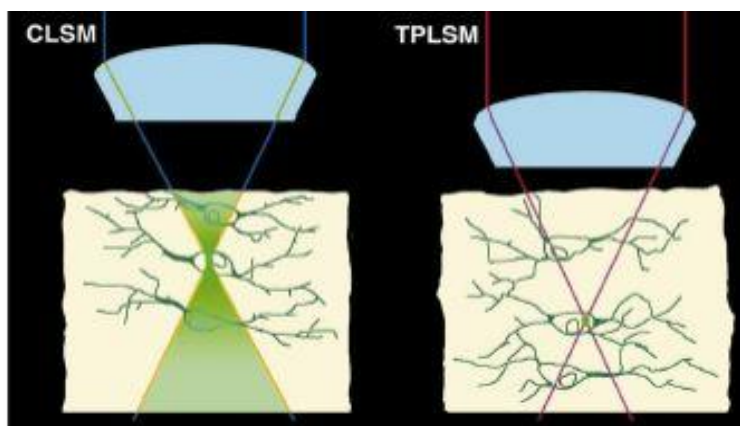
αντίθεση (contrast) (Denk et al. 1997). Για αυτό χρησιμοποιείται η συνεστιακή μικροσκοπία laser (confocal laser scanning microscopy), η οποία επιλύει το πρόβλημα χαμηλής αντίθεσης, απορρίπτοντας σήματα από κοντινά αντικείμενα πάνω ή κάτω από το επίπεδο εστίασης μέσω της οπής ανίχνευσης (pinhole) (Lichtman et al. 2005). Παρόλα αυτά, η σάρωση μίας μόνο περιοχής διεγείρει και συνεπώς προκαλεί βλάβη σε όλο το δείγμα. Επιπλέον, η οπή απορρίπτει φωτόνια σήματος που πηγάζουν από την εστίαση, τα οποία σκεδάζονται κατά την πορεία τους έξω από τον ιστό. Βαθιά μέσα στον ιστό, η συνεστιακή μικροσκοπία laser δεν είναι χρήσιμη σε ότι αφορά τα φωτόνια του σήματος.

Η αντιστάθμιση της απώλειας σήματος με την αυξημένη διέγερση φθορισμού οδηγεί σε φωτοτοξικότητα (phototoxicity) και φωτοαποχρωματισμό (photobleaching). Έτσι, η συνεστιακή μικροσκοπία laser και η μικροσκοπία ευρέως πεδίου, είναι τεχνικές οι οποίες μπορούν να έχουν καλύτερη εφαρμογή σε λεπτά δείγματα. Πειράματα σε μεγαλύτερο βάθος στον ιστό επωφελούνται από την τεχνολογία της μικροσκοπίας 2 φωτονίων, η οποία επιτρέπει τη μικροσκοπία φθορισμού μεγάλης ανάλυσης και υψηλής αντίθεσης, σε μεγάλο βάθος μέσα σε έναν ιστό, με ευρεία χρήση στον εγκέφαλο πειραματόζων (Γιαγκλήση 2016).

4.2 Μικροσκοπία δύο φωτονίων

Στην μικροσκοπία δύο φωτονίων χρησιμοποιούνται μεγαλύτερα μήκη κύματος με σκοπό την διείσδυση σε μεγαλύτερο βάθος στον ιστό και για την ανάπτυξη της ζωντανής απεικόνισης (intravital imaging) (Helmchen et al. 2005). Στην μικροσκοπία φθορισμού 2 φωτονίων (**2 Photon Excitation, 2PE**), 2 φωτόνια υπέρυθρης ακτινοβολίας (χαμηλής ενέργειας, τυπικά από το ίδιο laser), συνεργάζονται για να προκαλέσουν μια μεγαλύτερης ενέργειας ηλεκτρονική μετάβαση σε ένα φθοροφόρο μόριο. Η μικροσκοπία 2PE είναι μία μη γραμμική διαδικασία, στην οποία το ποσοστό απορρόφησης εξαρτάται από την αριθμητική τιμή του τετραγώνου της έντασης του φωτός (Svoboda et al. 2006). Πιο συγκεκριμένα, η έννοια της διέγερσης με δύο φωτόνια βασίζεται στην ιδέα ότι, δύο φωτόνια με συγκριτικά χαμηλότερη ενέργεια από αυτή που χρειάζεται για τη διέγερση ενός φωτονίου, μπορούν επίσης να διεγείρουν ένα φθοροφόρο μόριο κατά τη διάρκεια ενός κβαντικού γεγονότος. Κάθε φωτόνιο μεταφέρει περίπου το μισό της ενέργειας που απαιτείται για τη διέγερση του μορίου. Μία τέτοια διέγερση έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή ενός φωτονίου φθορισμού, τυπικά σε υψηλότερη ενέργεια από ότι οποιοδήποτε από τα δύο διεγερτικά φωτόνια. Η πιθανότητα μιας σχεδόν ταυτόχρονης απορρόφησης δύο φωτονίων είναι εξαιρετικά χαμηλή. Ως εκ τούτου, απαιτείται μια υψηλή ροή φωτονίων διέγερσης, από κατάλληλο laser. Ο σκοπός της χρησιμοποίησης της δράσης των δύο φωτονίων είναι ότι η ανάλυση κατά μήκος του άξονα z βελτιώνεται. Σε ένα εστιασμένο laser, η ροή φωτονίων είναι μεγαλύτερη στην περιοχή της εστίασης. Ως αποτέλεσμα, τα φθοροφόρα διεγείρονται σχεδόν αποκλειστικά σε ένα μικροσκοπικό, με περιορισμένη περίθλαση, εστιακό όγκο (**Εικόνα 19**) (Γιαγκλήση 2016). Ακόμη, η μικροσκοπία διέγερσης 2 φωτονίων περιλαμβάνει το παραγόμενο σήμα φθορισμού 2 φωτονίων από φθορίζοντα μόρια και την παραγωγή των δευτέρων αρμονικών (second harmonics) από τον ενδογενή

φθορισμό οργανωμένων ενδοκυτταρικών δομών όπως το κολλαγόνο, αποτελεί την πιο κοινή εφαρμογή της πολυφωτονικής μικροσκοπίας (Durand et al. 2009)



Εικόνα 19: Σύγκριση της μικροσκοπίας δύο φωτονίων (TPLSM) με την συνεστιακή μικροσκοπία (CLSM). Στην μικροσκοπία διέγερσης δύο φωτονίων ο φθορισμός περιορίζεται στο σημείο εστίασης, με αποτέλεσμα η φωτοτοξικότητα και ο φωτοαποχρωματισμός να επιδρούν στο σημείο εστίασης μόνο (Potter 1996).

Ο φωτοαποχρωματισμός και η φωτοτοξικότητα, διαδραματίζουν καίριο ρόλο στην βιολογική απεικόνιση. Επομένως είναι σημαντική η κατανόηση του φωτοαποχρωματισμού σε συνθήκες διέγερσης δύο φωτονίων. Στην διέγερση ενός φωτονίου ο ρυθμός του φωτοαποχρωματισμού είναι ανάλογος προς τον ρυθμό διέγερσης φθορισμού. Για διάφορες γνωστές φθοροφόρες πρωτεΐνες όπως είναι η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη, ο ρυθμός αποχρωματισμού αυξάνεται με γρηγορότερη ένταση από την ένταση φθορισμού (Patterson et al. 2000), (Chen et al. 2002). Αυτό δείχνει ότι οι ασταθείς διεγερμένες καταστάσεις είναι προσβάσιμες μέσω της χρήσης της μικροσκοπίας πολλαπλών φωτονίων (Eggeling et al. 2005).

Το φαινόμενο του αποχρωματισμού στην μικροσκοπία δημιουργεί συνέπειες στην μικροσκοπία δύο φωτονίων. Πρώτον, γιατί ο φωτοαποχρωματισμός του εστιακού επιπέδου είναι υψηλότερος στην μικροσκοπία δύο φωτονίων συγκριτικά με την μικροσκοπία ενός φωτονίου. Πιο συγκεκριμένα, η μικροσκοπία δύο φωτονίων μπορεί να είναι επιβλαβής για την απεικόνιση λεπτών δειγμάτων. Δεύτερον, το μέγιστο ποσοστό φθορισμού που εκπέμπεται από ένα φθοροφόρο μόριο είναι χαμηλότερο στην μικροσκοπία φθορισμού δύο φωτονίων σε σχέση με την μικροσκοπία διέγερσης ενός φωτονίου. Τρίτον, ο αριθμός των φωτονίων που δημιουργούνται πριν τον φωτοαποχρωματισμό, εξαρτάται από το επίπεδο της διέγερσης και το σχήμα του παλμού. Συνεπώς, δεν αποτελεί απαραίτητα πλεονέκτημα η ελαχιστοποίηση της διάρκειας παλμού για την μικροσκοπία διέγερσης δύο φωτονίων (Koester et al. 1999). Λιγότερα πράγματα είναι γνωστά για την φωτοτοξικότητα καθώς η ποσοτικοποίηση της απαιτεί επίπονες φυσιολογικές προσεγγίσεις. Είναι πιθανόν ότι οι διαφορετικές διεργασίες οδηγούν σε φωτοτοξικότητα κατά την χρήση διαφορετικών δειγμάτων, φθοροφόρων και μηκών κυμάτων διέγερσης. Τέλος στις περισσότερες περιπτώσεις η φωτοτοξικότητα είναι αποτέλεσμα διέγερσης εξωγενών φθοροφόρων ενώ σε άλλες περιπτώσεις μπορεί να προκληθεί και από την διέγερση ενδογενών φθοροφόρων (König et al. 1999), (Hopt et al. 2001).

Επίσης στην μικροσκοπία δύο φωτονίων η απεικόνιση μπορεί να φθάσει μέχρι 900nm βάθος στον ιστό (Beaugerpaire et al. 2001), (Theer et al. 2003). Το γεγονός αυτό είναι εντυπωσιακό συγκριτικά με άλλες τεχνικές υψηλής ανάλυσης το οποίο, όμως καλύπτει μόνο ένα μέρος του εγκέφαλου των θηλαστικών. Το βάθος της απεικόνισης καθορίζεται από την σκέδαση, καθώς με την αύξηση του βάθους ένα μικρότερος μέρος των προσπίπτοντων φωτονίων οδηγούνται προς το επίπεδο εστίασης. Δεδομένου ότι οι ακτίνες εισέρχονται από υψηλότερες γωνίες στον εγκέφαλο, έχουν μεγαλύτερες διαδρομές για να φτάσουν στο επίπεδο εστίασης, με αποτέλεσμα να είναι διάσπαρτα προκαλώντας απώλεια ανάλυσης στα μεγαλύτερα βάθη. Για παράδειγμα στο neocortex ποντικού είναι δυνατή η απεικόνιση των βασικών δενδριτών των L5 πυραμιδικών νευρώνων, ενώ οι άκανθες τους δεν μπορούν να αναλυθούν σημαντικά (Svoboda et al. 2006).

Για να αντισταθμιστεί η σκέδαση, οι υψηλότερες εντάσεις του λέιζερ πρέπει να δοθούν στο δείγμα. Οι περιορισμοί της έντασης του λέιζερ μπορούν να ξεπεραστούν χρησιμοποιώντας περισσότερους έντονους παλμούς φωτός εις βάρος του ρυθμού επανάληψης (Beaugerpaire et al. 2001), (Theer et al. 2003). Ωστόσο, το βάθος απεικόνισης περιορίζεται από τον φθορισμό που δημιουργείται στην επιφάνεια του δείγματος από το φως εστίασης το οποίο μειώνει τον εντοπισμό της διέγερσης και της αντίθεσης (Theer et al. 2003). Για βάθη απεικόνισης μεγαλύτερα του 1mm, είναι απαραίτητη η αφαίρεση των υπερκείμενων δομών (Mizrahi et al. 2004). Εναλλακτικά, μπορούν να εισαχθούν φακοειδείς φακοί στον εγκέφαλο για την απεικόνιση βαθύτερων δομών με εξαιρετική ανάλυση (Levene et al. 2004), (J. C. Jung et al. 2004), (Flusberg et al. 2005). Τέλος και στις δύο αυτές προσεγγίσεις, η πρόκληση βλαβών στις δομές ενδιαφέροντος είναι κάτι που πρέπει να αναλογιστεί κανείς.

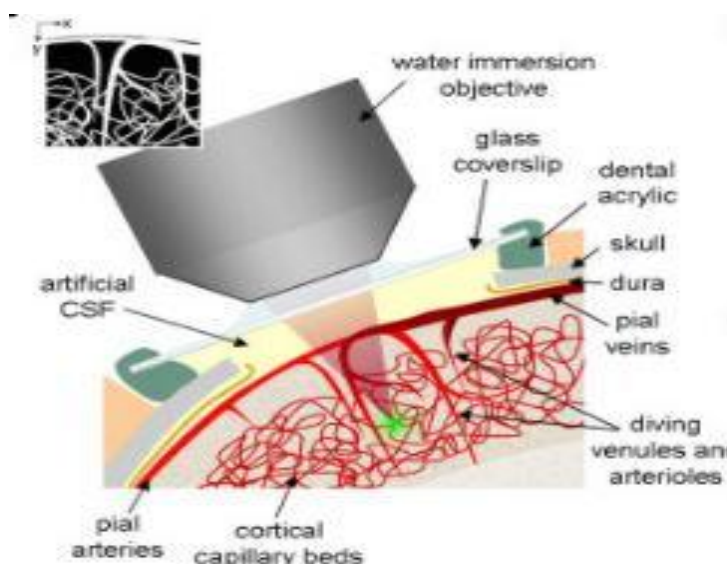
Συγκριτικά με τις τεχνικές μικροσκοπίας ενός φωτονίου, η μικροσκοπία δύο φωτονίων παρέχει τρία βασικά πλεονεκτήματα αναφορικά με την σκέδαση του δείγματος (Denk et al. 1994). Πρώτον, το μήκος κύματος διέγερσης που χρησιμοποιείται είναι το βαθύ κόκκινο και κοντά στο υπέρυθρο, καθώς η διήθηση στον ιστό είναι καλύτερη συγκριτικά με τα ορατά μήκη κύματος που χρησιμοποιούνται στην μικροσκοπία ενός φωτονίου. Η βελτιωμένη αυτή διεισδυτικότητα είναι αποτέλεσμα της μειωμένης σκέδασης καθώς και της μειωμένης απορρόφησης από τα ενδογενή χρωμοφόρα (Svoboda et al. 1994), (Oheim et al. 2001), (Yaroslavsky et al. 2002). Δεύτερον, εξαιτίας της φύσης της μη γραμμικής διέγερσης, τα σκεδασμένα φωτόνια διέγερσης είναι πολύ αραιά για την πρόκληση επαρκούς φθορισμού. Ακόμη και βαθιά στον ιστό, όπου τα περισσότερα από τα προσπίπτοντα φωτόνια σκεδάζονται, η διέγερση είναι ακόμη περιορισμένη σε έναν μικρό εστιασμένο όγκο. Τρίτον, λόγω της τοποθεσίας της διέγερσης, όλα τα φωτόνια φθορισμού αποτελούν χρήσιμο σήμα αν ανιχνευθούν (αντίθετα στην συνεστιακή μικροσκοπία ή ευρέως πεδίου, τα σκεδασμένα φωτόνια φθορισμού είτε χάνονται ή, χειρότερα, συμβάλλουν στη δημιουργία θορύβου) (Centonze et al. 1998). Στα τυπικά πειράματα σε ιστούς η πλειονότητα των φωτονίων φθορισμού σκεδάζονται, αποτελώντας με αυτόν τον τρόπο ένα τεράστιο πλεονέκτημα στη μικροσκοπία 2 φωτονίων (Svoboda et al. 2006).

Τέλος, ένα ακόμη πλεονέκτημα της μικροσκοπίας 2PE, είναι ότι έχει ευρύ οπτικό φάσμα, καθώς ένα μοναδικό laser μπορεί ταυτόχρονα να διεγείρει πολλαπλά φθορίζοντα μόρια. Τα διαφορετικά χρώματα μπορούν να διαχωριστούν με τη χρήση διχρωικών καθρεπτών στην μεριά ανίχνευσης. Ανάλογα με τις ιδιότητες του ιστού η μικροσκοπία 2PE μπορεί να

απεικονίζει σε βάθος μέχρι και 1mm μέσα στον ιστό. Αν και αυτό είναι εντυπωσιακό σε σχέση με άλλες τεχνικές υψηλής ανάλυσης, αυτό το βάθος ακόμη καλύπτει ένα μικρό ποσοστό του εγκεφάλου των θηλαστικών. Το πεδίο της βιοαπεικόνισης που βασίζεται στη συνεστιακή και πολυφωτονική μικροσκοπία έχει ενισχυθεί από τη χρήση των διαγονιδιακών φθορίζοντων πρωτεϊνικών συστημάτων σε ποντίκια, κυρίως χρησιμοποιώντας την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green Fluorescent Protein, GFP) ως αναφορά. Αυτές οι προσεγγίσεις έχουν ενισχύσει σε μεγάλο βαθμό τη γνώση μας για την κυκλοφορία των φλεγμονωδών κυττάρων κατά μήκος του BBB σε ζωικά μοντέλα εγκεφαλικής παθολογίας (πχ. ισχαιμικού επεισοδίου, αυτοάνοσης απομυελίνωσης, κα) (Γιαγκλήση 2016). Επομένως η μικροσκοπία διέγερσης δύο φωτονίων αποτελεί ένα ισχυρό, μη επεμβατικό εργαλείο απεικόνισης για την προ-κλινική και κλινική έρευνα.

4.3 Χρήση της Μικροσκοπίας δύο φωτονίων για την μελέτη της Νευροαγγειακής Μονάδας

Η ανάπτυξη της μεθόδου της μικροσκοπίας δύο φωτονίων έχει δώσει την δυνατότητα στους επιστήμονες την συνεχή καταγραφή των κυτταρικών διεργασιών την ώρα που αυτές εξελίσσονται (Denk et al. 1990). Τα δύο κύρια πλεονεκτήματα της μικροσκοπίας δύο φωτονίων είναι η απεικόνιση σε μεγαλύτερα βάθη με το μεγαλύτερο μήκος κύματος διέγερσης καθώς και η μείωση της φωτοτοξικότητας και του φωτοαποχρωματισμού των χρωστικών που προκαλείται από την διέγερση εκτός του εστιακού πεδίου (Helmchen et al. 2005), (Kobat et al. 2009). Η απεικόνιση σε επίπεδο *in vivo* πραγματοποιήθηκε στο κεντρικό νευρικό σύστημα με την δημιουργία των πρώτων διαγονιδιακών ποντικών, οι οποίοι εκφράζουν φθορίζουσες πρωτεΐνες σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους του εγκεφάλου (Misgeld et al. 2006). Το πεδίο της ζωντανής απεικόνισης έχει σημειώσει σημαντική πρόοδο λόγω της εισαγωγής νέων τεχνολογιών μικροσκοπίας καθώς και νέων χειρουργικών μεθόδων, επιτρέποντας την παρατήρηση των κυττάρων του νευρικού συστήματος τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε παθολογικές καταστάσεις (Yoder 2002). Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ζωντανή απεικόνιση των κυττάρων του εγκεφαλικού φλοιού είναι η λέπτυνση του κρανίου (thinned skull technique) καθώς και η μέθοδος δημιουργίας του χρόνιου κρανιακού παραθύρου (chronic cranial window technique) (**Εικόνα 20**) (Mostany et al. 2008), (Holtmaat et al. 2009), (Cheng et al. 2010).



Εικόνα 20: Η μικροσκοπία δύο φωτονίων ως εργαλείο για την μελέτη του εγκεφάλου. Σχηματική απεικόνιση της χειρουργικής προετοιμασίας που απαιτείται για ζωντανή απεικόνιση του εγκεφάλου. Η πράσινη κουκίδα δείχνει το σημείο φθορισμού των δύο φωτονίων (Kherlopian et al. 2008).

Το κύριο πλεονέκτημα της ζωντανής απεικόνισης *in vivo* είναι η δυνατότητα παρακολούθησης σε πραγματικό χρόνο των δυναμικών διαδικασιών των κυττάρων του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η Νευροαγγειακή Μονάδα συνίσταται από τα αγγεία των ενδοθηλιακών κυττάρων, κύτταρα γλοίας και νευρώνες, τα οποία την καθιστούν ένα κέντρο δυναμικά συντονισμένων νευρικών καθώς και αγγειακών δραστηριοτήτων και κατ' επέκταση ιδανική δομή για μελέτες ζωντανής απεικόνισης *in vivo* (Zlokovic 2010). Η μελέτη της Νευροαγγειακής Μονάδας συμβάλλει στην ταυτοποίηση των κύριων κυτταρικών συστατικών, παρέχοντας με σαφήνεια πληροφορίες για τις δομικές της λειτουργίες (Baeten et al. 2011).

Η ζωντανή απεικόνιση είναι σημαντική για την παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο των χρονο-εξαρτώμενων δραστηριοτήτων αλλά και των δυναμικών κυτταρικών αλληλεπιδράσεων, οι οποίες πραγματοποιούνται στο δίκτυο των νευρώνων, αποτελώντας με αυτό τον τρόπο την συνιστώμενη μέθοδο για την ποσοτικοποίηση των αλλαγών της Νευροαγγειακής Μονάδας υπό φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα μέσω της μεθόδου της ζωντανής απεικόνισης ανακαλύφθηκαν οι λειτουργικές επαφές των δενδριτικών ακάνθων, η κύρια θέση της διεγερτικής συναπτικής δραστηριότητας καθώς και τα πόδια των αποφυάδων των αστροκυττάρων (Barker et al. 2010). Ακόμη, η άποψη ότι η ενδοκυττάρια σηματοδότηση στον κεντρικό νευρικό σύστημα είναι ιδιότητα μόνο των νευρώνων έπαψε να ισχύει καθώς μελέτες ζωντανής απεικόνισης έδειξαν ότι και τα αστροκύτταρα διαθέτουν την ικανότητα αυτή με την μορφή κυμάτων ασβεστίου (Takano et al. 2007). Εν συνεχεία, και άλλες μελέτες ζωντανής απεικόνισης τερμάτισε την πεποίθηση ότι τα αστροκύτταρα λειτουργούν μόνο ως συνδετικά κύτταρα στον εγκέφαλο, καθώς έφεραν στο προσκήνιο ισχυρές αποδείξεις για τον ενεργό ρόλο των αστροκυττάρων στην φυσιολογική νευρική λειτουργία και σταθερότητα (Merlini et al. 2012).

Επομένως, δυσλειτουργία σε ένα από τα δομικά συστατικά της Νευροαγγειακής Μονάδας μπορεί να επηρεάσει την συνολική της λειτουργία, οδηγώντας σε γενικευμένη βλάβη του

κεντρικού νευρικού συστήματος (Merlini et al. 2012). Το εγκεφαλικό ισχαιμικό επεισόδιο, η Σκλήρυνση κατά πλάκας, η νόσος του Alzheimer καθώς και οι μολύνσεις από παθογόνα βακτήρια και ιούς οδηγούν σε νευροεκφυλιστικές διαταραχές οι οποίες επηρεάζουν την λειτουργία και την ακεραιότητα της Νευροαγγειακής Μονάδας, καταδεικνύοντας ότι η παθολογία της αποτελεί το πρώτο βήμα για την εξέλιξη των νευρολογικών παθήσεων (Zlokovic 2010), (Merlini et al. 2011). Ακόμη η μελέτη της διαπερατότητας της Νευροαγγειακής Μονάδας είναι σημαντική για την εύρεση φαρμάκων με σκοπό την αντιμετώπιση διαφόρων νευροεκφυλιστικών διαταραχών. Εν κατακλείδι, όλα αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν την σημασία της Νευροαγγειακής Μονάδας στην ανάπτυξη παθολογιών στον εγκέφαλο και στην ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση της χρήσης της ως πιθανό θεραπευτικό στόχο με απώτερο στόχο την εφαρμογή της ως προσέγγιση στην κλινική πράξη (Stanimirovic et al. 2012).

ΣΚΟΠΟΣ

Το αγγειακό σύστημα του εγκεφάλου των θηλαστικών χρησιμοποιεί τους μηχανισμούς της νευροαγγειακής σύζευξης και της εγκεφαλικής αυτορρύθμισης με σκοπό την ρύθμιση της ισορροπίας των επιπέδων οξυγόνου καθώς και των θρεπτικών ουσιών του κεντρικού νευρικού συστήματος. Στην ρύθμιση του μηχανισμού της εγκεφαλικής αυτορρύθμισης συμβάλλει ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός, ο οποίος ελέγχει την δίοδο των ιόντων και θρεπτικών ουσιών στον εγκέφαλο.

Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός αποτελεί αναπόσπαστο της Νευροαγγειακής Μονάδας, η οποία συντίθενται από τα αγγεία των ενδοθηλιακών κυττάρων, τους στενοσυνδέσμους μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων, τα περικύτταρα, τις απολήξεις των αποφυάδων των περιαγγειακών αστροκυττάρων, την μικρογλοία και τους νευρώνες. Η Νευροαγγειακή Μονάδα κατέχει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση των φυσιολογικών λειτουργιών του εγκεφάλου αλλά και σε συνθήκες νευροφλεγμονής. Η Νευροφλεγμονή είναι μια παθολογική κατάσταση η οποία παρατηρείται σε διάφορες νευροεκφυλιστικές νόσους, όπως είναι η νόσος του Alzheimer και η νόσος του Parkinson, και χαρακτηρίζεται από την δυσλειτουργία της Νευροαγγειακής Μονάδας, από την ενεργοποίηση της μικρογλοίας και από το φαινόμενο της αστρογλοίωσης. Τα αστροκύτταρα διαδραματίζουν καίριο ρόλο στην εξέλιξη της νευροφλεγμονής μέσω της έκκρισης διαφόρων προ-φλεγμονωδών ουσιών καθώς και μέσω του διαμεμβρανικού καναλιού νερού Ακουαπορίνη 4. Η Ακουαπορίνη 4 εντοπίζεται φυσιολογικά στις απολήξεις των αποφυάδων των αστροκυττάρων και συσχετίζεται από πρόσφατες μελέτες με την εξέλιξη της νευροφλεγμονής καθώς και με την αποδιοργάνωση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού.

Για την μελέτη της λειτουργίας της Νευροαγγειακής Μονάδας τόσο υπό φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε συνθήκες νευροφλεγμονής διάφορες μελέτες χρησιμοποιούν το μοντέλο του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) το οποίο προκαλεί συστηματική φλεγμονή και νευροφλεγμονή. Ακόμη για την μελέτη των δυναμικών αλληλεπιδράσεων της μικρογλοίας και των αστροκυττάρων σε πραγματικό χρόνο υπό φυσιολογικές και υπό φλεγμονώδη συνθήκες χρησιμοποιείται η μικροσκοπία σάρωσης δύο φωτονίων.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η παρατήρηση σε πραγματικό χρόνο των δυναμικών αλληλεπιδράσεων σε αναισθητοποιημένα διαγονιδιακά CX3CR1-EGFP ποντίκια των μικρογλοιακών κυττάρων με τα αγγεία των ενδοθηλιακών κυττάρων της Νευροαγγειακής Μονάδας κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και μετά από πρόκληση επαγόμενης από το LPS νευροφλεγμονής, χρησιμοποιώντας την μικροσκοπία δύο φωτονίων, αλλά και την παρατήρηση της τοπολογίας της Ακουαπορίνης 4 υπό φυσιολογικές καθώς και σε συνθήκες νευροφλεγμονής μέσω της χορήγησης του LPS σε C57BL6 ποντίκια, με την χρήση της συνεστιακής μικροσκοπίας. Τέλος στόχος μας ήταν να διερευνήσουμε την απόκριση των αστροκυττάρων και τις αλλαγές που υφίστανται, έπειτα από την απαλοιφή της μικρογλοίας σε φυσιολογικές συνθήκες καθώς και σε συνθήκες νευροφλεγμονής. Για το σκοπό αυτό στα πλαίσια της συγκεκριμένης μελέτης πραγματοποιήθηκε χορήγηση μέσω της τροφής του PLX-X σε C57BL6 ποντίκια, ο οποίος καταστέλλει τον CSF1 υποδοχέα της μικρογλοίας και κατ' επέκταση τα μικρογλοιακά κύτταρα με απώτερο σκοπό την μελέτη της τοπολογίας, της μορφολογίας και της ενεργοποίησης των αστροκυττάρων σε συνθήκες εξάλειψης της

μικρογλοίας καθώς και σε συνθήκες πρόκλησης επαγόμενης από το LPS νευροφλεγμονής, χρησιμοποιώντας συνεστιακή μικροσκοπία.

Συμπερασματικά, η μελέτη αυτή θα συμβάλλει στην **βαθύτερη κατανόηση του ρόλου της Νευροαγγειακής Μονάδας** καθώς και στον τρόπο με τον οποίο τα δομικά συστατικά της μετέχουν στην εξέλιξη της νευροφλεγμονής, τονίζοντας την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου της Ακουαπορίνης 4 αλλά και της μικρογλοίας ως πιθανών θεραπευτικών στόχων στις διάφορες νευροεκφυλιστικές διαταραχές.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Κεφάλαιο 1 : Πειραματόζωα και χειρισμός

1.1 Πειραματόζωα

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγιναν *in vivo* πειράματα, στα οποία ήταν απαραίτητη η χρήση και θυσία μυών ως πειραματόζωων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν αμιγή στελέχη ποντικών C57BL/6 καθώς και 1 σειρά διαγονιδιακών ποντικών (δες παράγραφο 1.1.1). Η μελέτη διεξήχθη σε αυστηρή συμμόρφωση με την Ευρωπαϊκή και Εθνική Νομοθεσία για τα Εργαστηριακά Ζώα (Οδηγία 2010/63/ΕΕ και του Ελληνικού Νόμου 161/91), και σύμφωνα με τις προτάσεις του FELASA για την ευθανασία και τον Οδηγό για την Φροντίδα και Χρήση των Πειραματόζωων των Εθνικών Ινστιτούτων Υγείας. Όλοι οι χειρισμοί στα πειραματόζωα διεξήχθησαν σύμφωνα με πειραματικά πρωτόκολλα που εγκρίθηκαν από την Υγειονομική υπηρεσία και την Επιτροπή Χρήσης Πειραματόζωων του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ.

C57BL6 ποντίκια και Διαγονιδιακά ποντίκια

Καθαρά στελέχη των ποντικών C57BL/6 δημιουργήθηκαν το 1921 από τον C. C. Little, στο Ινστιτούτο Bussey για Έρευνα στην Εφαρμοσμένη Βιολογία. Η θυγατρική σειρά "6" (C57BL/6) ήταν η πιο δημοφιλής από τις δέκα σειρές αυτού του στελέχους. Τα C57BL/6 ποντίκια είναι τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα αμιγή στελέχη, και είναι το δεύτερο είδος θηλαστικού, για το οποίο έχει γίνει πλήρης χαρτογράφηση του γονιδιώματος. Γενικά, τα ποντίκια C57BL/6 αναπαράγονται καλά και έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής.

Στα πειράματά μας τα ποντίκια αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοϊστοχημική μελέτη της τοπολογίας της Ακουαπορίνης 4 στις απολήξεις των αποφυάδων των αστροκυττάρων κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και σε συνθήκες επαγόμενης νευροφλεγμονής από την χορήγηση του λιποπολυσακχαρίτη (LPS).

Η εφαρμογή της μικροσκοπίας σάρωσης 2 φωτονίων απαιτεί τη χρήση μυών που εκφράζουν φθορίζουσες πρωτεΐνες στους κυτταρικούς πληθυσμούς ενδιαφέροντος. Για τα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω σειρά διαγονιδιακών ποντικών: τα CX3CR1-EGFP ποντίκια, τα οποία εκφράζουν EGFP στα μικρογλοιακά κύτταρα του εγκεφάλου, μέσω του υποκινητή του γονιδίου *Cx3cr1*, το οποίο κωδικοποιεί για τον υποδοχέα της χημειοκίνης CX3CL1. Επομένως, τα ποντίκια αυτά έχουν μικρογλοιακά κύτταρα με πράσινο χρώμα. Η συγκεκριμένη διαγονιδιακή σειρά χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της επιφάνειας επαφής των μικρογλοιακών κυττάρων με τα αγγεία των ενδοθηλιακών κυττάρων της Νευροαγγειακής Μονάδας σε φυσιολογικές συνθήκες καθώς και σε συνθήκες νευροφλεγμονής.

1.2 Χειρισμός Πειραματόζων και LPS

Τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν, τόσο τα C57BL/6 όσο και αυτά των διαγονιδιακών σειρών, ήταν ηλικίας 2-3 μηνών, αρσενικά και θηλυκά, βάρους 20-30gr. Τα ζώα διαβίωναν στη Μονάδα Ζωικών Προτύπων του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, υπό σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας περιβάλλοντος (23oC) και φωτισμού (κύκλοι φωτός-σκότους 12:12 ώρες) και είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και τροφή. Στο πλαίσιο των πειραμάτων μας, κάποια ζώα δέχτηκαν ένεση με LPS και κάποια με φυσιολογικό ορό: διάλυμα NaCl 0.9% (ζώα control).

1.2.1 Παρασκευή LPS

Το LPS που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματά μας (Αρ. Καταλόγου: L2880, Sigma, LPS προερχόμενο από *E. Coli*, οροτύπου O55:B5), ήταν σε μορφή σκόνης την οποία διαλύσαμε σε NaCl 0.9%. Κατά την παρασκευή του, χρειάζεται πολύ προσοχή γιατί το LPS είναι πολύ τοξικό. Αφού γίνει διάλυση της ολικής ποσότητας του LPS, αυτή μοιράζεται σε επιμέρους κλάσματα του 1mg/ml, τα οποία και φυλάσσονται στους -20oC μέχρι τη χρήση τους. Η δόση LPS που επιλέχθηκε για ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση, ήταν 5mg/kg που αντιστοιχεί σε 100μl (του κλάσματος του 1mg/ml) ανά 20gr βάρους σώματος του ζώου.. Η δόση, χορηγήθηκε σε δύο συνεχόμενες ημέρες σε μια κοόρτη 12 C57BL6 ζώων. Η συγκεκριμένη δόση χορηγήθηκε για δύο συνεχόμενες ημέρες καθώς από προηγούμενα πειράματα της εργαστηριακής ομάδας παρατηρήθηκε ενεργοποίηση της μικρογλοίας και των αστροκυττάρων. Τα ζώα μετά την χορήγηση των δύο συνεχόμενων δόσεων LPS εμφάνισαν χαρακτηριστικά συμπτώματα της συμπεριφοράς ασθενείας (sickness behavior), όπως διάρροια, μειωμένη όρεξη για πρόσληψη τροφής, μειωμένη κινητικότητα και ληθαργικότητα. Για αποφυγή αφυδάτωσης κατά τη διάρκεια της ασθένειας, χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά 500μl διαλύματος NaCl 0.9% ή δεξτρόζης 0.16%. Τέλος, μετά από τη χορήγηση του LPS, τα κλουβιά των ζώων σκεπάστηκαν με καπάκι εφοδιασμένο με φίλτρο.

1.2.2 Χειρισμός πειραματόζων

Η χορήγηση του LPS, PBS, NaCl 0.9% ή δεξτρόζης 0.16%, γίνεται με ενδοπεριτοναϊκή ένεση κατά την οποία:

- ❖ Το ζώο ακινητοποιείται με τη μέθοδο κρατήματος από τον αυχένα. Η κοιλιακή πλευρά του ζώου εκτίθεται γέρνοντας το κεφάλι προς τα κάτω σε μια μικρή γωνία.
- ❖ Η περιοχή που θα γίνει η ένεση αποστειρώνεται με 70% αιθανόλη.
- ❖ Η αποστειρωμένη βελόνα πρέπει να τοποθετείται λοξά προς τα επάνω, στο κάτω δεξιό ή αριστερό τεταρτημόριο της κοιλιάς του ζώου.
- ❖ Η βελόνα εισάγεται σε γωνία 30° και γίνεται έγχυση του υλικού.

Παράλληλα, για τη χρώση των αγγείων κατά τη διάρκεια της απεικόνισης 2PE, απαιτείται η ενδοφλέβια χορήγηση κατάλληλης χρωστικής (dextran dye, πχ. sulforhodamine).

- ❖ Το ζώο τοποθετείται σε μια συσκευή συγκράτησης και η ουρά σταθεροποιείται. Ακολουθεί τρίψιμο της ουράς για να προκληθεί διαστολή των φλεβών για να είναι πιο εύκολη η παρατήρησή τους.
- ❖ Η βελόνα εισάγεται περίπου παράλληλα με την φλέβα τουλάχιστον σε 3 mm βάθος.
- ❖ Η ένεση του υλικού γίνεται με αργή κίνηση.

Κεφάλαιο 2: Θυσία των πειραματόζων και προετοιμασία των ιστών

2.1 Θυσία των πειραματόζων μετά την χορήγηση του LPS

Για να μελετήσουμε την επίδραση του LPS στην τοπολογία της Ακουαπορίνης 4 στις απολήξεις των αποφυάδων των αστροκυττάρων, ήταν απαραίτητη η θυσία των πειραματόζων σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα μετά τη χορήγηση του LPS (1 ημέρα και 4 ημέρες), η απομόνωση του εγκεφάλου τους και η προετοιμασία του εγκεφαλικού ιστού για την μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας. Η θυσία των πειραματόζων πραγματοποιήθηκε 1 ημέρα και 4 ημέρες μετά την έγχυση του LPS, γιατί από προηγούμενα πειράματα της εργαστηριακής ομάδας σε αυτά τα χρονικά σημεία παρατηρήθηκε ενεργοποίηση της μικρογλοίας και των αστροκυττάρων με την μέγιστη ενεργοποίηση την 4^η ημέρα, ενώ σε πειράματα που έγιναν 8 ημέρες μετά την χορήγηση του LPS το φαινόμενο της ενεργοποίησης είχε περιοριστεί σημαντικά προσεγγίζοντας την κατάσταση των control ζώων.

Κατά τη θυσία των πειραματόζων έγινε διακαρδιακή έγχυση διαλύματος παραφορμαλδεΰδης (*in vivo* perfusion). Πιο συγκεκριμένα, τα πειραματόζα θυσιάστηκαν με χρήση αέριου ισοφλουρανίου και κατόπιν πραγματοποιήθηκε διακαρδιακή έγχυση στην αριστερή κοιλία, 20ml παγωμένου διαλύματος PBS και στη συνέχεια, 50ml κρύου διαλύματος παραφορμαλδεΰδης (4% παραφορμαλδεΰδη, PFA, σε 0.1M PBS), με ταυτόχρονη διάνοιξη του δεξιού κόλπου. Με αυτή τη διαδικασία απομακρύνεται όσον το δυνατό περισσότερο αίμα από του ιστούς και αρχίζει η μονιμοποίησή τους.

2.2 Χορήγηση του Χημικού Παράγοντα PLX- X

Παράλληλα με τα πειράματα για την μελέτη της τοπολογίας της Ακουαπορίνης 4 στις απολήξεις των αποφυάδων των αστροκυττάρων, πραγματοποιήθηκαν και πειράματα για την μελέτη της τοπολογίας, της μορφολογίας και της ενεργοποίησης των αστροκυττάρων μετά την χορήγηση ενός PLX-X, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την καταστολή του CSF1 υποδοχέα που εκφράζεται στην μικρογλοία, καθώς και μετά την έγχυση των δύο συνεχόμενων δόσεων LPS. Ο Χημικός Παράγοντας PLX- X είναι μόριο της οικογένειας PLX και διατίθεται από την φαρμακευτική εταιρεία Plexikon. Ο Χημικός Παράγοντας PLX-X χορηγήθηκε σε C57BL6 ζώα μέσω της τροφής. Στον **πίνακα 1** παρουσιάζεται το χρονικό σχεδιάγραμμα χορήγησης του Χημικού Παράγοντα PLX-X και του LPS.

Πίνακας 1: Χρονικό σχεδιάγραμμα χορήγησης του PLX-X και του LPS

	Ημέρα 1 ^η	Ημέρα 2 ^η	Ημέρα 3 ^η	Ημέρα 4 ^η	Ημέρα 5 ^η	Ημέρα 6 ^η
Τροφή με PLX-X	NAI	NAI	NAI	NAI	NAI	NAI
LPS	-	-	-	-	NAI	NAI
Control τροφή	NAI	NAI	NAI	NAI	NAI	NAI
Ορός	-	-	-	-	NAI	NAI

Σε μια κοόρτη 5 ζώων χορηγήθηκε μόνο ο Χημικός Παράγοντας PLX-X, σε μια άλλη κοόρτη 5 ζώων χορηγήθηκε ο PLX-X και το LPS (**Πίνακας 1**) και άλλη μια κοόρτη 5 ζώων ως control στα οποία χορηγήθηκε ορός και τροφή χωρίς PLX-X (**Πίνακας 1**). Μια ημέρα μετά την χορήγηση των δύο συνεχόμενων δόσεων του LPS, πραγματοποιήθηκε θυσία των πειραματόζων και ανοσοϊστοχημικά πειράματα (υποενότητα 2.4). Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε για άλλη μια κοόρτη 15 ζώων όπου πραγματοποιήθηκε θυσία όλων των πειραματόζων 4 ημέρες μετά την χορήγηση των δύο συνεχόμενων δόσεων του LPS. Τέλος η ίδια διαδικασία έγινε και για ακόμη μια κοόρτη 15 ζώων, όπου πραγματοποιήθηκε θυσία όλων των πειραματόζων 8 ημέρες μετά την χορήγηση των δύο συνεχόμενων δόσεων του LPS.

2.3 Προετοιμασία των ιστών

Αμέσως μετά τη θυσία των πειραματόζων, οι εγκέφαλοι απομονώθηκαν και τοποθετήθηκαν σε διάλυμα 4% PFA, σε θερμοκρασία 4oC για 14-18 ώρες, με σκοπό την περαιτέρω μονιμοποίησή τους. Στη συνέχεια, οι ιστοί τοποθετήθηκαν σε διάλυμα σουκρόζης 15%, μέχρι να καταβυθιστούν (συνήθως για 24 ώρες) και έπειτα τοποθετήθηκαν σε διάλυμα σουκρόζης 30% μέχρι να καταβυθιστούν (συνήθως για 24 ώρες) για κρυοπροστασία. Έπειτα, οι εγκέφαλοι καταψύχθηκαν για 10 λεπτά σε ισοπεντάνιο, στους -20oC. Οι ιστοί διατηρήθηκαν στους -80oC, έως ότου κοπούν σε ψυχόμενο κρυοτόμο στους -25oC. Οι παγωμένοι ιστοί κόπηκαν σε μετωπιαίες (coronal) τομές πάχους 20μm σε κρυοτόμο (Leica, Germany), οι οποίες συλλέχθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες καλυμμένες με σιλάνιο (2% 3-aminopropyltriethoxy-silane Sigma-Aldrich). Οι τομές φυλάχτηκαν στους -20oC έως ότου να χρησιμοποιηθούν για ανοσοϊστοχημεία.

2.4 Ανοσοϊστοχημεία

Η ανοσοϊστοχημεία, αναφέρεται στη διαδικασία ανίχνευσης αντιγόνων (πχ. πρωτεϊνών) σε κύτταρα ή τομές ιστών, αξιοποιώντας την ιδιότητα των αντισωμάτων να δεσμεύονται πολύ εκλεκτικά σε αντιγόνα, στους βιολογικούς ιστούς. Η οπτικοποίηση της αντίδρασης αντιγόνου-αντισώματος μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους, στην περίπτωσή μας, όμως, γίνεται με τον έμμεσο ανοσοφθορισμό. Ειδικότερα, ο έμμεσος ανοσοφθορισμός χρησιμοποιεί δύο αντισώματα, το πρωτογενές, μη επισημασμένο αντίσωμα, το οποίο δεσμεύεται πολύ ειδικά στο μόριο-στόχο στον ιστό και το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο είναι επισημασμένο με φθοροφόρο μόριο, αναγνωρίζει το πρωτογενές αντίσωμα και συνδέεται με αυτό.

Ανάλογα με τη μέθοδο διατήρησης του ιστού που χρησιμοποιείται, τα δείγματα μπορεί να χρειάζονται περαιτέρω επεξεργασία για να αποκαλυφθούν οι επίτοποι των αντιγόνων (antigen retrieval) στους οποίους προσδένονται τα πρωτογενή αντισώματα. Επιπλέον, για να μειωθεί το σήμα υποβάθρου, τα πλακάκια με τα δείγματα πρέπει να επωάζονται με κατάλληλο διάλυμα (blocking buffer) που εμποδίζει τις λοιπές ενεργές θέσεις στις οποίες τα πρωτογενή ή δευτερογενή αντισώματα θα μπορούσαν διαφορετικά να δεσμευθούν.

Αναλυτικά, τα στάδια της ανοσοϊστοχημείας είναι τα εξής:

Antigen retrieval (όπου χρειάζεται)

Προετοιμασία διαλύματος κιτρικού Na 10mM: 294 mg Tri-sodium Citrate προστίθενται σε 100 ml απεσταγμένου νερού. Το pH προσαρμόζεται στο 6.

Προθερμαίνουμε το διάλυμα σε κατάλληλο δοχείο για χρώσεις στους 80°C. Τοποθετούμε τις τομές στο δοχείο και επωάζουμε στους 70°C για 30 λεπτά. Στην συνέχεια το αφήνουμε να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Συνεχίζουμε στο επόμενο βήμα χωρίς να αφήσουμε τις τομές να στεγνώσουν τελείως.

Blocking της μη ειδικής σήμανσης

Οι τομές επωάζονται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε PBS που περιέχει 0,1% v/v Triton X-100, 0,02% w/v sodium azide και 5% v/v φυσιολογικό ορό κατσίκας (αν το δευτερογενές αντίσωμα προέρχεται από κατσίκια, διαφορετικά χρησιμοποιείται ο κατάλληλος ορός, πχ. από γαϊδουράκι).

Επώαση με πρωτογενή αντισώματα (primary Abs)

Το διάλυμα του blocking απομακρύνεται και ακολουθεί επώαση με το/τα πρωτογενή αντισώματα, τα οποία αραιώνονται σε διάλυμα 1% v/v φυσιολογικού ορού κατσίκας (ή γαϊδουριού) που περιέχει 0,2% w/v sodium azide και 0,2% Triton X (η αραιώση είναι ενδεικτική για το εκάστοτε πρωτογενές αντίσωμα). Η επώαση διαρκεί 1 έως 3 ημέρες, στους 40C, σε περιβάλλον με υγρασία.

Ξέπλυμα

Τα πλακάκια με τις τομές ξεπλένονται με PBS, 3 φορές για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Επώαση με δευτερογενή αντισώματα (secondary Abs)

Οι τομές επωάζονται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, με δευτερογενή αντισώματα αραιωμένα σε 1% v/v φυσιολογικού ορού κατσίκας (ή γαϊδουριού) που περιέχει 0,2% w/v sodium azide και 0,05% Triton X (αραίωση 1/500).

Πυρηνική χρώση

Παράλληλα με την επώαση με τα δευτερογενή αντισώματα, στο ίδιο διάλυμα μπορούν να προστεθούν τα πυρηνικά αντισώματα Hoechst σε αραιώση 1/500 και TOPRO3 σε αραιώση 1/1000.

Ξέπλυμα

Τα πλακάκια με τις τομές ξεπλένονται με PBS, 3 φορές για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Κάλυψη των πλακιδίων

Στα πλακάκια προστίθεται Mowiol (περίπου 90μL ανά πλακάκι), οπότε και σκεπάζονται με καλυπτρίδες. Οι τομές αφήνονται overnight σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα φυλάσσονται στους 40C, στο σκοτάδι, και είναι έτοιμες να χρησιμοποιηθούν για imaging.

Κεφάλαιο 3: Μικροσκοπία Φθορισμού

3.1 Συνεστιακή Μικροσκοπία (Confocal Microscopy)

Η συνεστιακή μικροσκοπία, σε αντίθεση με την κλασική μικροσκοπία φθορισμού, δίνει το μεγάλο πλεονέκτημα της λήψης εικόνων από διαφορετικά εστιακά επίπεδα του προς απεικόνιση αντικειμένου, δημιουργώντας πολλαπλές αξονικές τομές. Η αρχή λειτουργίας του συνεστιακού μικροσκοπίου στηρίζεται στο γεγονός ότι ο φωτισμός και η παρατήρηση είναι περιορισμένα σε ένα σημείο του παρασκευάσματος. Αυτό επιτυγχάνεται με την τοποθέτηση ενός πολύ μικρού διαφράγματος (pinhole) στους οπτικούς άξονες του αντικειμενικού και του συγκεντρωτικού φακού. Η μεγέθυνση που επιτυγχάνεται στο δείγμα είναι όμοια με του απλού μικροσκοπίου φθορισμού (10x, 20x, 40x, 63x). Η εικόνα σχηματίζεται με σάρωση όλων των σημείων του πεδίου του μικροσκοπίου. Αρχικά, το παρασκεύασμα παρατηρείται με φως ορατού μήκους κύματος ή με υπεριώδες και στη συνέχεια επιλέγεται η ακτίνα Laser αργού ή ηλίου-νέου ή και με τα δυο συγχρόνως. Οι εικόνες δεν είναι άμεσα ορατές (real time), αλλά η παρατήρηση γίνεται στην οθόνη του μικροϋπολογιστή του μικροσκοπίου. Το σημαντικότερο πλεονεκτήματα του συνεστιακού μικροσκοπίου είναι ότι σε αυτό ελαττώνονται κατά πολύ τα μηνύματα από τα μη εστιασμένα σημεία του παρασκευάσματος με αποτέλεσμα να ενισχύεται η αντίθεση (contrast) του παρασκευάσματος. Αυτό το χαρακτηριστικό επιτρέπει τη σάρωση του παρασκευάσματος όχι μόνο ως προς τους άξονες x και y αλλά και ως προς τον z (βάθος) με αποτέλεσμα να παίρνουμε καλά εστιασμένες τρισδιάστατες εικόνες που όμως δεν παρατηρούνται άμεσα, αλλά μέσω μικροϋπολογιστή με ειδικά προγράμματα (software) που κάνουν ψηφιοποίηση και ανακατασκευή της εικόνας.

Για τα πειράματά μας, η παρατήρηση και η ανάλυση των χρώσεων ανοσοφθορισμού έγινε με το ανάστροφο συνεστιακό μικροσκόπιο (Leica TCS SP8Confocal Microscope), της Μονάδας Οπτικής Μικροσκοπίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ. Το σύστημα συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης περιλαμβάνει:

- Κεφαλή σάρωσης υψηλής ανάλυσης, για σάρωση στους άξονες/διαστάσεις: xyz, xzy, xt, xyt, xyzt. Σάρωση σε διαφορετικά μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής (xλ, xγλ και xzλ), scanzoom 1x έως 64x. Ανάλυση εικόνας έως και 8192 x 8192 pixels. Ταχύτητα σάρωσης έως και 1800 Hz.
- Solid state laser, Γραμμές 405,488,514,522,638 nm.
- Δύο φωτοπολλαπλασιαστές (PMTs) για ανίχνευση σήματος, έναν ανιχνευτή HyD3 με αυξημένη ευαισθησία και απόδοση και έναν PMTtrans ανιχνευτή για αντίθεση φάσης.

- Το λογισμικό LASAF, το οποίο επιτρέπει πλήρη έλεγχο του μικροσκοπίου, των πηγών laser και της κεφαλής σάρωσης, τη λήψη και αποθήκευση εικόνων, τη 3D ανασύσταση εικόνας από οπτικές τομές, τη δημιουργία βίντεο και την επεξεργασία/ανάλυση εικόνας.
- Το σύστημα επιτρέπει εφαρμογές FRET και FRAP (FRET και FRAPwizard) και περιλαμβάνει οπτικό σύστημα για αύξηση της ισχύος του laser στην FRAP (FRAPbooster).

3.2 Μικροσκοπία διέγερσης δύο φωτονίων (2-Photon Laser Scanning Microscopy, 2-PLSM)

Όπως αναφέρθηκε και στην Εισαγωγή (δες παράγραφο 4.2), ο συνδυασμός των τεχνικών φθορισμού με τη μικροσκοπία σάρωσης 2 φωτονίων (2-PLSM), έχει αποτελέσει το εργαλείο επιλογής για την *in vivo* μελέτη του εγκεφάλου, καθώς δίνει τη δυνατότητα απόκτησης εικόνων με μεγάλη ανάλυση, σε σχετικά μεγάλο βάθος (>500μm) από την επιφάνεια του ιστού. Για το *intravital imaging* σε εγκέφαλο αναισθητοποιημένων ποντικών, χρησιμοποιήθηκε το ίδιο συνεστιακό μικροσκόπιο, Leica TCS SP5II Confocal Microscope, το οποίο είναι εξοπλισμένο με κατάλληλο laser (Mai Tai infrared laser source) για την μικροσκοπία διέγερσης 2 φωτονίων. Πρόκειται για υπέρυθρο laser με βραχείς παλμούς (80 εκατ. παλμοί διάρκειας 100 fs ανά δευτερόλεπτο) για τη διέγερση των φθοροφόρων, που προκαλεί μικρή σκέδαση του φωτός από τον εγκεφαλικό ιστό. Επιπλέον, η μη γραμμική φύση της διέγερσης του 2-PLSM εξασφαλίζει ότι τα φωτόνια που ανιχνεύονται προέρχονται από την εκπομπή του φθοροφόρου, αποκλειστικά από το εστιακό επίπεδο. Ειδικότερα, για εφαρμογές πολυφωτονικής μικροσκοπίας σε μεγάλα σε πάχος δείγματα και ζωντανά πειραματόζωα, το σύστημα περιλαμβάνει:

Spectra Physics Mai Tai DeepSee infrared laser source.

- Για τη ρύθμιση της έντασης του IRlaser, χρησιμοποιούνται δύο πολωτές, ο ηλεκτρονικός πολωτής electro-optical modulator (EOM) και ο μηχανικός πολωτής half-waveplate.
- Για την ανίχνευση του σήματος, χρησιμοποιούνται δύο εξωτερικοί ανιχνευτές [non-descanned laser detectors (NDDs)] με φίλτρα τοποθετημένα πάνω σε κύβους, για μέγιστη συλλογή σήματος. Οι διαθέσιμοι συνδυασμοί φίλτρων είναι: FITC/TRITC, DAPI/TRITC, DAPI/FITC και CFP/YFP.
- Κεραμικό καταδυόμενο σε νερό αντικειμενικό φακό 25X με υψηλό αριθμητικό άνοιγμα (NA0.9) και απόσταση εργασίας 2500μm, ειδικό για τη μετάδοση της ακτίνας του IRlaser και απαραίτητο για τα πειράματα απεικόνισης ζωντανών πειραματόζωων.
- Τράπεζα πρόσδεσης πειραματόζωου με 4 ενσωματωμένους μοχλούς για κίνηση στους άξονες x και y, και περιστρεφόμενους μοχλούς με διαβάθμιση για επαναληπτική απεικόνιση ζωντανών πειραματόζωων.

Για τα πειράματά μας επιλέχτηκε η χειρουργική τεχνική δημιουργίας κρανιακού «παραθύρου» (cranial window), κατά την οποία αφαιρείται ένα κομμάτι του κρανιακού οστού, αφήνοντας ένα τμήμα του εγκεφαλικού ιστού εκτεθειμένο. Το τμήμα αυτό

σφραγίζεται με κατάλληλο τζάμι (closed window). Το κρανιακό παράθυρο παρέχει εξαιρετική πρόσβαση για απεικόνιση, επιτρέποντας το επαναλαμβανόμενο, υψηλής ανάλυσης imaging σε θεωρητικά απεριόριστα χρονικά διαστήματα. Το παράθυρο μπορεί να παραμείνει καθαρό από μέρες μέχρι και εβδομάδες ανάλογα με την ποιότητα της εγχείρησης. Τα CX3CR1-EGFP διαγονιδιακά ζώα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματά μας, υποβλήθηκαν στη διαδικασία δημιουργίας του cranial window, την ίδια ημέρα της απεικόνισης 2PE η οποία αντιστοιχούσε στην 4^η ημέρα μετά από τις δύο συνεχόμενες δόσεις LPS.

3.2.1 Προετοιμασία του ζώου και χειρουργική διαδικασία

Η χειρουργική διαδικασία για τη δημιουργία κρανιακού παραθύρου σε ένα πειραματόζωο είναι η εξής:

1. Το ζώο αναισθητοποιείται με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση μίγματος κεταμίνης (ketamine 0,10mg/g σώματος) και ξυλαζίνης (xylazine 0,01mg/g σώματος). Πριν αρχίσουμε την επεμβατική διαδικασία, ελέγχουμε τα αντανακλαστικά στα πόδια για να βεβαιωθούμε ότι το ζώο είναι πλήρως αναισθητοποιημένο (**Εικόνα 21A**).
2. Το ζώο τοποθετείται σε θερμαινόμενη βάση προκειμένου να διατηρείται σταθερή η θερμοκρασία του κατά τη διάρκεια της επέμβασης. Παράλληλα, προκειμένου να μην ξεραθούν τα μάτια του ζώου, εφαρμόζουμε σε αυτά κατάλληλη κρέμα (πχ. bepanthol) ή βαζελίνη.
3. Χορηγούμε στο ζώο ενδοπεριτοναϊκά, διάλυμα δεξαμεθαζόνης (dexamethasone, 2μg/g σώματος). Η δεξαμεθαζόνη εμποδίζει την πρόκληση εγκεφαλικού οιδήματος κατά τη διάρκεια της επέμβασης.
4. Καθαρίζουμε την χειρουργική περιοχή με μία μπατονέτα εμποτισμένη με αιθανόλη 70%. Ακόμη, μπορούμε να καθαρίσουμε την περιοχή και με μια μπατονέτα εμποτισμένη με betadine. Με αποστειρωμένο ψαλίδι κόβουμε το δέρμα του κεφαλιού από την περιοχή ανάμεσα στα μάτια μέχρι τη βάση του κρανίου, αποκαλύπτοντας το κρανίο πάνω και από τα 2 εγκεφαλικά ημισφαίρια (**Εικόνα 21B**).
5. Το κρανίο πρέπει να καθαριστεί καλά ώστε να μην υπάρχουν υπολείμματα από τρίχες, δέρμα ή συνδετικό ιστό. Με κατάλληλη λαβίδα απομακρύνονται οι μεμβράνες του περιόστεου και ο γύρω συνδετικός ιστός, ενώ αφαιρούνται και κομμάτια λιπώδους ιστού στη βάση του κρανίου. Ο καλός καθαρισμός του κρανίου είναι απαραίτητος για την μετέπειτα εμφύτευση του «παραθύρου».
6. Εντοπίζουμε την περιοχή που μας ενδιαφέρει και με μία λαβίδα «ζωγραφίζουμε» απαλά το περίγραμμα ενός κύκλου στο σημείο που θέλουμε να δημιουργήσουμε το «παραθυρο». Στην περίπτωση μας το παράθυρο δημιουργείται περίπου στην περιοχή -1mm πίσω από το βρέγμα και 3mm πλευρικά της μέσης γραμμής.
7. Με κατάλληλο χειρουργικό τρυπάνι, κάνοντας αργές κυκλικές κινήσεις, αρχίζουμε να χαράζουμε απαλά την επιφάνεια του οστού. Όταν συμπληρώνουμε 2-3 κύκλους σταματάμε και με πλαστική πιπέττα Pasteur τοποθετούμε στο σημείο μια σταγόνα φυσιολογικό ορό για να αποφύγουμε την υπερθέρμανση του υποκείμενου ιστού, καθώς κατά τη διάρκεια της χάραξης με το τρυπάνι αναπτύσσεται υψηλή, για τον ιστό, θερμοκρασία. Σιγά σιγά, αρχίζει να γίνεται ορατή η αγγείωση της επιφάνειας του φλοιού κάτω από το λεπτό κρανίο.
8. Κάποια στιγμή, λόγω της χάραξης ενός κύκλου στο οστό, σχηματίζεται κεντρικά μία «νησίδα» οστού, με μικρό πάχος στην περιφέρεια. Αν πιέσουμε ελαφρά την νησίδα αυτή με μια λαβίδα μπορούμε να καταλάβουμε αν το οστό που έχει λεπτυνθεί είναι έτοιμο να

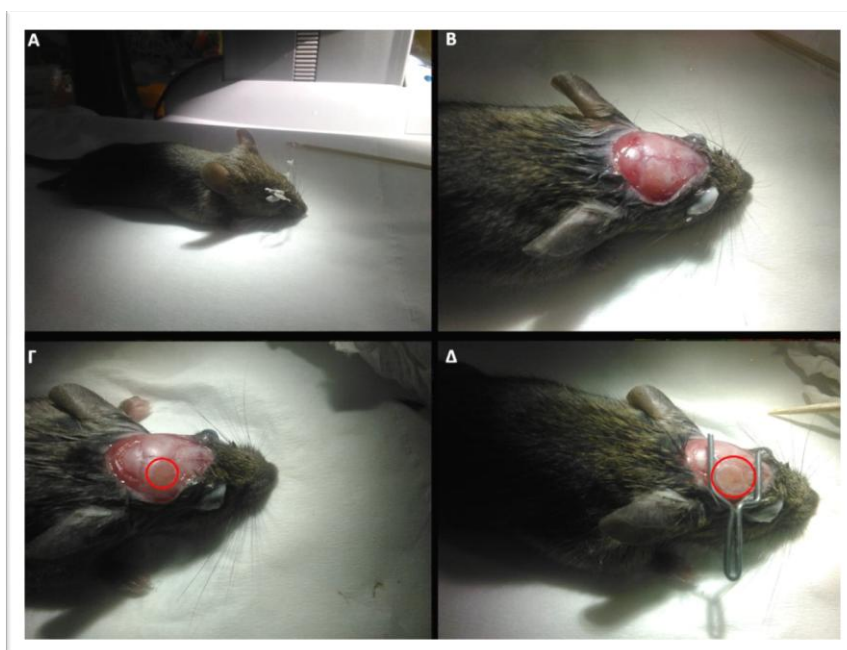
σπάσει. Τότε χρησιμοποιούμε μυτερή λαβίδα, την οποία εισάγουμε με κατεύθυνση παράλληλη προς το κρανίο, για να τραβήξουμε και να απομακρύνουμε αυτό το κυκλικό κομμάτι του κρανίου, προσέχοντας να μην τραυματίσουμε τη σκληρά μήνιγγα που βρίσκεται ακριβώς από κάτω **(Εικόνα 21Γ)**.

9. Επειδή δεν θέλουμε ο εκτεθειμένος εγκεφαλικός ιστός να στεγνώσει, μπορούμε να προσθέσουμε φυσιολογικό ορό ή διάλυμα κατάλληλης σύστασης, που προσομοιάζει το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (Cortex buffer: 119mM NaCl, 26,2mM NaHCO₃, 2,5mM KCl, 1mM NaH₂PO₄, 1,3mM MgCl₂, 10mM glucose). Αν υπάρχουν μικρο-αιμορραγίες, προσπαθούμε να τις ελέγξουμε με αιμοστατικά σφουγγαράκια εμποτισμένα με φυσιολογικό ορό ή cortex buffer.

10. Όταν είμαστε βέβαιοι ότι δεν υπάρχει πλέον αιμορραγία, απομακρύνουμε κάθε υγρό από τον εκτεθειμένο φλοιό, και χωρίς να τον αφήσουμε να στεγνώσει, εφαρμόζουμε πάνω στον ιστό μικρή ποσότητα οδοντιατρικής σιλικόνης. Η σιλικόνη χρησιμοποιείται για να κρατάει σταθερό τον ιστό μετά την τοποθέτηση του υπερκείμενου τζαμιού.

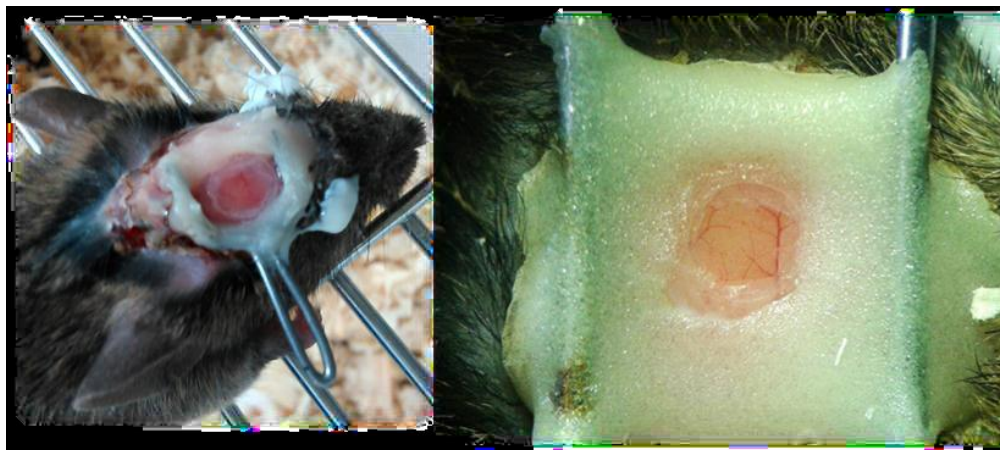
11. Ακολουθεί η κάλυψη του φλοιού με κατάλληλο τζαμάκι (ουσιαστικά μία στρογγυλή καλυπτρίδα, με διάμετρο 3-5mm και πάχος 1mm). Τα τζάμι είναι μεγαλύτερο σε διάμετρο από την κρανιοτομή και πρέπει να το πιέζουμε ώστε να έρχεται όσο το δυνατόν καλύτερα σε επαφή με την επιφάνεια του εγκεφάλου. Το τζαμάκι κολλάει στο κρανίο με κατάλληλη κόλλα που εφαρμόζεται στον περίγυρο του, γι' αυτό το οστό πρέπει να είναι απολύτως στεγνό. Διατηρούμε την πίεση για 2-5 λεπτά. Αφήνουμε να στεγνώσει για 10 λεπτά.

12. Στη συνέχεια στερεώνουμε με κόλλα στο κρανίο, κατάλληλο σιδερένιο βραχίονα, ο οποίος είναι απαραίτητος για να στερεωθεί το κεφάλι του ζώου στη βάση του μικροσκοπίου για το imaging. Αφήνουμε να στεγνώσει για 10 λεπτά **(Εικόνα 21Δ)**.



Εικόνα 21: Δημιουργία cranial window. Α) Το ζώο αναισθητοποιείται και κατάλληλη κρέμα εφαρμόζεται στα μάτια του για την ενυδάτωσή τους. Β) Το κρανίο αποκαλύπτεται και καθαρίζεται επιμελώς από μεμβράνες, τρίχες και συνδετικό ιστό. Γ) Ένα κυκλικό κομμάτι του κρανίου αφαιρείται και αποκαλύπτεται ο υποκείμενος εγκεφαλικός ιστός. Δ) Ο ιστός καλύπτεται με τζάμι, ενώ κατάλληλος σιδερένιος βραχίονας στερεώνεται με κόλλα στο κρανίο, για τη στήριξη του κεφαλιού στη μετέπειτα διαδικασία απεικόνισης (Γιαγκλήση 2016).

13. Γύρω γύρω από το κρανιακό παράθυρο που δημιουργήθηκε, εφαρμόζουμε οδοντικό τσιμέντο (dental acrylic), δημιουργώντας μία μικρή «λακκούβα», ώστε να μπορούμε να προσθέτουμε νερό στο οποίο εισέρχεται ο φακός κατά το imaging. Το τσιμέντο χρησιμεύει ακόμη στο να ακινητοποιεί πλήρως το window και να μην μπορεί το ζώο να το απομακρύνει μετά την εγχείρηση. Αφήνουμε να στεγνώσει για 10 λεπτά (**Εικόνα 22**).



Εικόνα 22: Cranial window έτοιμο για 2PE imaging (Γιαγκλήση 2016).

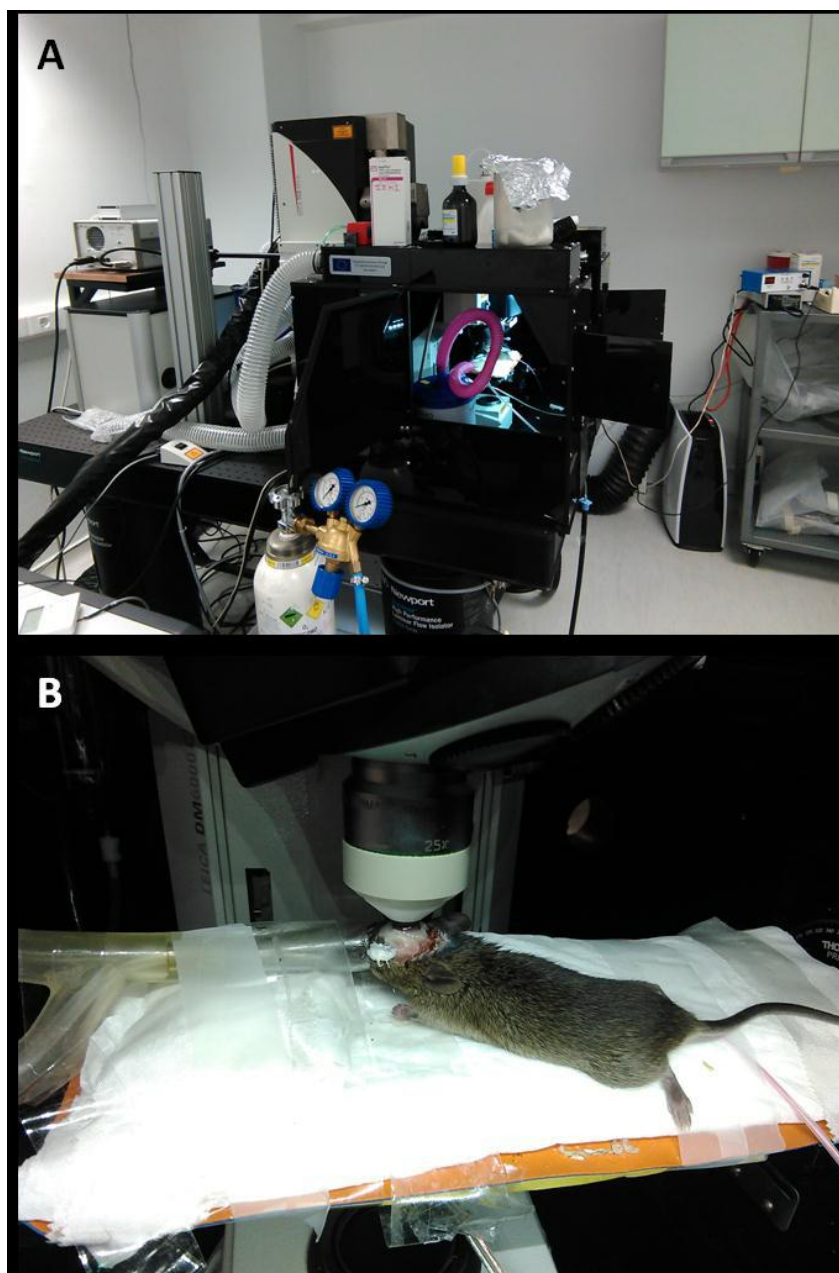
14. Μετά το τέλος της επεμβατικής διαδικασίας, χορηγείται ενδοπεριτοναϊκά στο ζώακι κατάλληλο αναλγητικό (4mg/kg καρποφένη). Το ζώο επιστρέφει στο κλουβί του, το οποίο παραμένει σε θερμαινόμενη πλάκα μέχρι να ξυπνήσει από την αναισθησία. Αναλγητικό μπορεί να χορηγηθεί και την επομένη της εγχείρησης.

3.2.2 Intravital Imaging με την χρήση του μικροσκοπίου διέγερσης 2PE

Τα ζώα είχαν λάβει ενδοπεριτοναϊκή ένεση LPS ή ορού, για 2 συνεχόμενες ημέρες, και στα ζώα που είχαν λάβει το LPS την 4^η ημέρα μετά την χορήγησή του πραγματοποιήθηκε η κρανιοτομή και στη συνέχεια ετοιμάστηκαν για imaging. Πριν από την έναρξη της απεικόνισης, πρέπει να γίνει κατάλληλη ρύθμιση του Laser. Συγκεκριμένα, αυτό ρυθμίζεται στα 900nm και πρέπει να εξασφαλίζουμε ότι είναι σε pulsing mode πριν προχωρήσουμε στο imaging.

Το ζώο που υποβάλλεται σε απεικόνιση 2PE αναισθητοποιείται με τη χρήση αέριας αναισθησίας (Sevoflurane 2-3%) (**Εικόνα 23A**), εισπνεόμενης μέσω κατάλληλης αναισθητικής συσκευής, εγκατεστημένης στη βάση του μικροσκοπίου. Το κεφάλι του ζώου στερεώνεται στη βάση του μικροσκοπίου, μέσω του σιδερένιου βραχίονα που έχει εγκατασταθεί στο κρανίο του ενώ, παράλληλα, στη βάση εφαρμόζεται και θερμαινόμενη πλάκα για τη διατήρηση και τον έλεγχο της θερμοκρασίας του κατά τη διάρκεια της απεικόνισης. Στη «λακκούβα» που έχουμε δημιουργήσει με το οδοντιατρικό τσιμέντο, προσθέτουμε φυσιολογικό ορό, καθώς ο ειδικός φακός που χρησιμοποιείται για 2PE (φακός με υψηλό αριθμητικό άνοιγμα, NA0.9), απαιτεί την εμβάπτιση του σε νερό (25X water immersion objective) (**Εικόνα 23B**). Αφού γίνει επιλογή του επιθυμητού πεδίου, αρχίζουμε το Imaging. Αρχικά εντοπίζουμε την επιφάνεια του ιστού στο πεδίο που διαλέξαμε και προχωράμε βαθύτερα στον ιστό κατά 100μm. Από το σημείο αυτό, και βαθύτερα για 100-200μm λαμβάνουμε εικόνες και video, σε σημεία που κατά προτίμηση περιλάμβαναν και την παρουσία αγγείων. Συνήθως, το imaging για κάθε ζώο δεν ξεπερνούσε τη 1.5 ώρα σε διάρκεια, προκειμένου να έχουμε μεγαλύτερο ποσοστό

επιβίωσης των πειραματόζωων. Στο τέλος της απεικόνισης, τα ζώα επέστρεφαν στο κλουβί τους και παρέμεναν σε θερμαινόμενη πλάκα μέχρι να συνέλθουν πλήρως.



Εικόνα 23: 2PE imaging σε εγκέφαλο αναισθητοποιημένου ποντικού. Α) Μικροσκόπιο 2-PLSM της Μονάδας Οπτικής Μικροσκοπίας του ΕΙΠ. **Β)** Το ζώο αναισθητοποιείται με την παροχή αέριας αναισθησίας και κατάλληλος φακός, εφαρμόζεται πάνω από το cranial window για απεικόνιση (Γιαγκλήση Ι., 2015).

Τέλος για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης, των μικρογλοιακών κυττάρων κυτταρικών με τα αγγεία των ενδοθηλιακών κυττάρων του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, πραγματοποιήθηκε χρώση των αγγείων, με κατάλληλη χρωστική. Συγκεκριμένα, πριν την έναρξη της διαδικασίας απεικόνισης, χορηγήθηκε ενδοφλέβια από την ουρά του αναισθητοποιημένου ζώου η φθορίζουσα χρωστική ροδαμίνη, συζευγμένη με δεξτράνη (Rhodamine dextran dye, η οποία δεν διαχέεται εκτός των αγγείων), οπότε και τα αγγεία βάφονται κόκκινα.

Κεφάλαιο 4: Προγράμματα επεξεργασίας εικόνας

Για την υπολογισμό της επιφάνειας επαφής των μικρογλοιακών κυττάρων αρχικά χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Imaris v.8.3.1 και συγκεκριμένα το module Surface-Surface Contact Area . Στις εικόνες αυτές έγινε μια προεργασία με το πρόγραμμα Image J με σκοπό τον διαχωρισμό των μικρογλοιακών κυττάρων από τα αγγεία. Το module Surface-Surface Contact area δημιουργεί δύο επιφάνειες 3D για το κάθε κυτταρικό πληθυσμό όπου ορίζεται ως πρωτογενή και η άλλη ως δευτερογενή επιφάνεια. Για τον υπολογισμό της επιφάνειας επαφής της Ακουαπορίνης 4 με τα ενδοθηλιακά αγγεία καθώς και με τα αστροκύτταρα χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Imaris v.8.3.1 το ίδιο module. Για τον στατιστικό έλεγχο χρησιμοποιήθηκε η % επιφάνεια επαφής της Ακουαπορίνης 4 με πρωτογενή επιφάνεια τα αγγεία και τα αστροκύτταρα αντίστοιχα και για τα πειράματα δύο φωτονίων χρησιμοποιήθηκε η % επιφάνεια επαφής των μικρογλοιακών κυττάρων με πρωτογενή επιφάνεια τα αγγεία. Τέλος στην περίπτωση που βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, χρησιμοποιήσαμε t-test για να ελέγξουμε τις διαφορετικές ομάδες μεταξύ τους (**Πίνακας 2**).

Πίνακας 2: Ερμηνεία των τιμών p-value της t-test ανάλυσης

$p > 0,05$	όχι στατιστικά σημαντικά
$0,01 < p < 0,05$	ασθενώς στατιστικά σημαντικά(*)
$0,005 < p < 0,01$	ελαφρώς στατιστικά σημαντικά (**)
$0,001 < p < 0,005$	μετρίου βαθμού στατιστικά σημαντικά (***)
$p < 0,001$	υψηλού βαθμού στατιστικά σημαντικά(****)

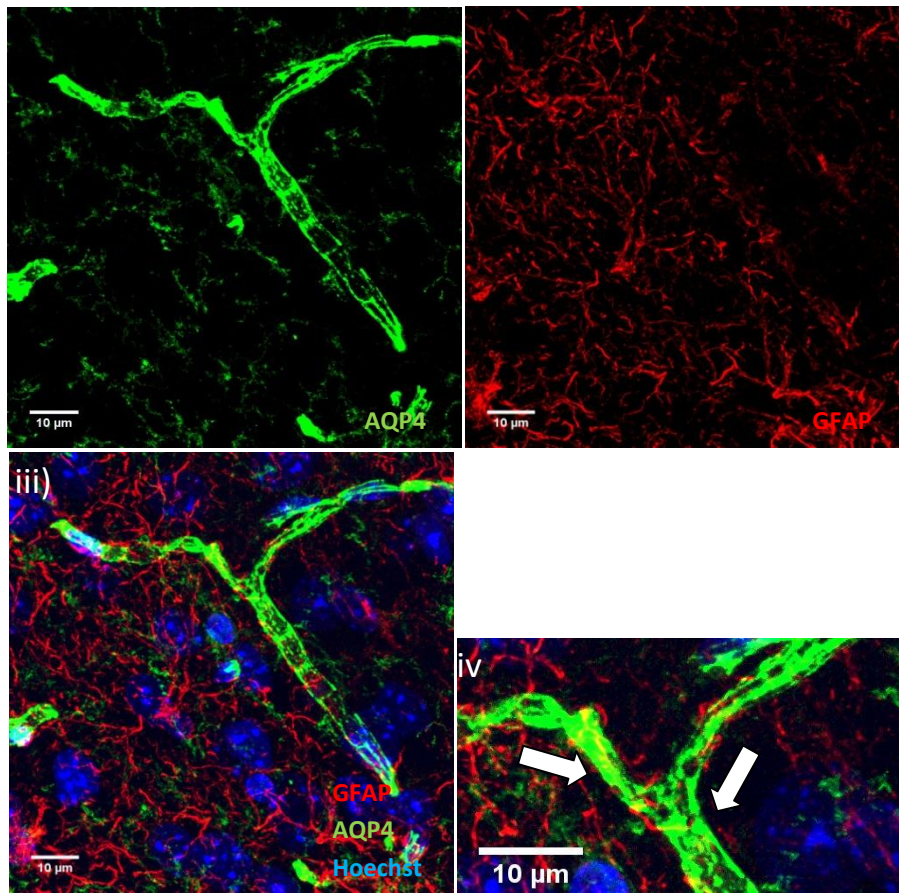
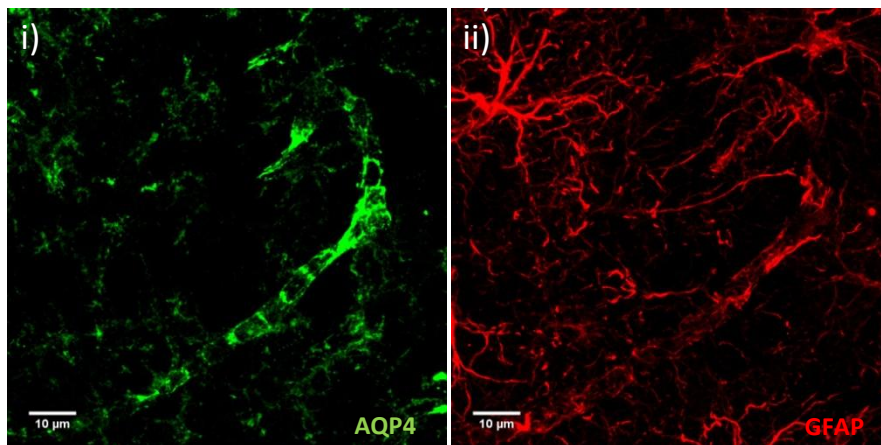
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

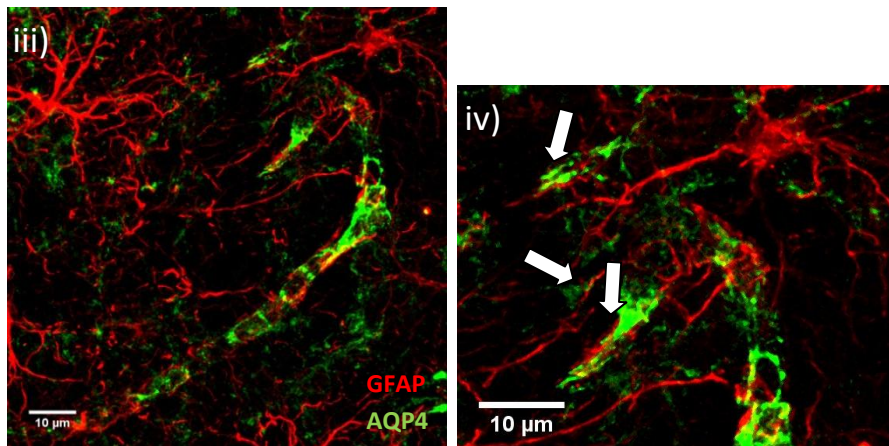
Στο παρόν κεφάλαιο θα αναλυθούν τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής με σκοπό την παρατήρηση της τοπολογίας της Ακουαπορίνης 4 στις απολήξεις των αποφυάδων περιαγγειακών αστροκυττάρων και στα ενδοθηλιακά αγγεία της Νευροαγγειακής Μονάδας μέσω της χρήσης της συνεστιακής μικροσκοπίας πριν και μετά την χορήγηση του LPS καθώς και την μελέτη των αλληλεπιδράσεων των μικρογλοιακών κυττάρων με τα ενδοθηλιακά αγγεία με την χρήση της μικροσκοπίας δύο φωτονίων πριν και μετά την έγχυση του LPS. Τέλος στο συγκεκριμένο κεφάλαιο θα συζητηθούν οι αλλαγές στην τοπολογία, την μορφολογία και στην ενεργοποίηση των αστροκυττάρων μετά την εξάλειψη της μικρογλοίας μετά της χορήγησης του Χημικού Παράγοντα PLX-X καθώς και μετά την έγχυση του LPS.

Κεφάλαιο 1: Αποδιοργάνωση των καναλιών της Ακουαπορίνης 4 μετά την πρόκληση νευροφλεγμονής

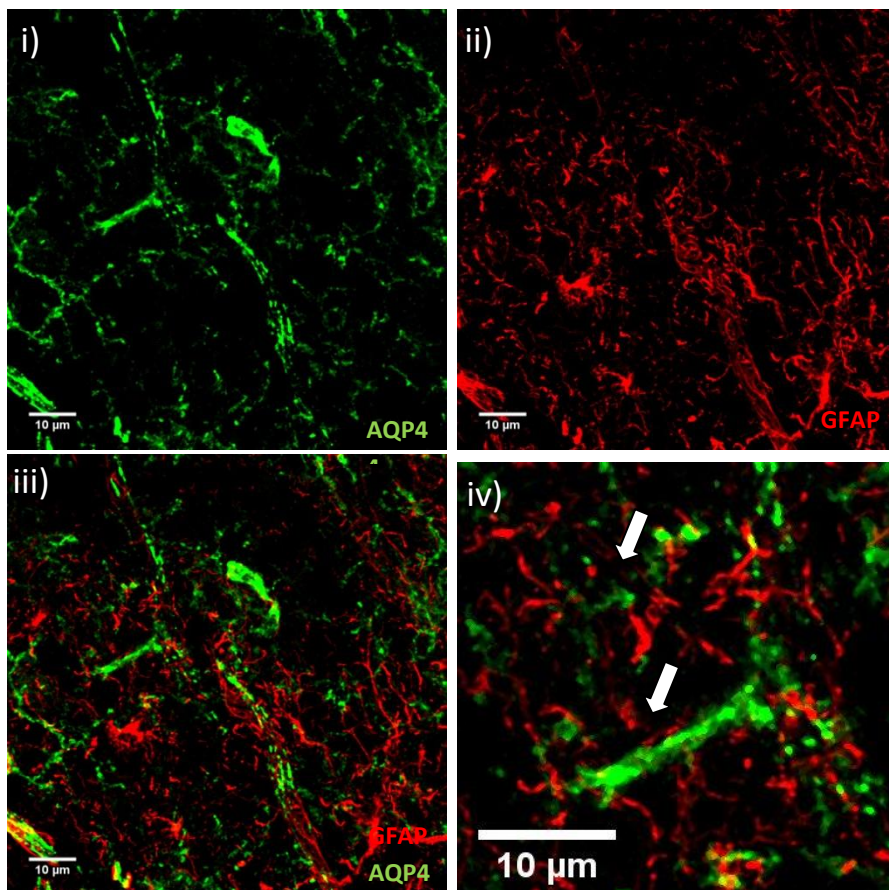
1.1 Αποδιοργάνωση της έκφρασης της Ακουαπορίνης 4 στα περιαγγειακά αστροκύτταρα μετά την χορήγηση του LPS

Μετά την χορήγηση δύο συνεχόμενων δόσεων 5mg/kg LPS, ακολούθησε θυσία των C57BL6 πειραματόζων στα εξής χρονικά διαστήματα: 1 ημέρα μετά το LPS καθώς και 4 ημέρες μετά το LPS. Σε φυσιολογικές συνθήκες, η έκφραση της Ακουαπορίνης 4 στα αστροκύτταρα εντοπίζεται στις απολήξεις των αποφυάδων που έρχονται σε στενή επαφή με τα αγγεία του παρεγχύματος. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, σε ανοσοϊστοχημικά πειράματα η Ακουαπορίνη 4 να φαίνεται ότι περιβάλλει εξωτερικά τα αιμοφόρα αγγεία, στην ουσία διαγράφοντας τα όρια των αγγείων (**Εικόνα 1Ai**). Μετά τη χορήγηση LPS, παρατηρήθηκε διάχυση της έκφρασης της Ακουαπορίνης 4 στο υπόλοιπο τμήμα των απολήξεων των περιαγγειακών ενεργοποιημένων αστροκυττάρων και ελαττωμένη έκφρασή της στις απολήξεις των αποφυάδων των ενεργοποιημένων αστροκυττάρων που περικλείουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων 1 ημέρα και 4 ημέρες μετά την έγχυση του LPS (**Εικόνα 1B-Γiii-iv**).

A) Control**B) LPS DAY 1**



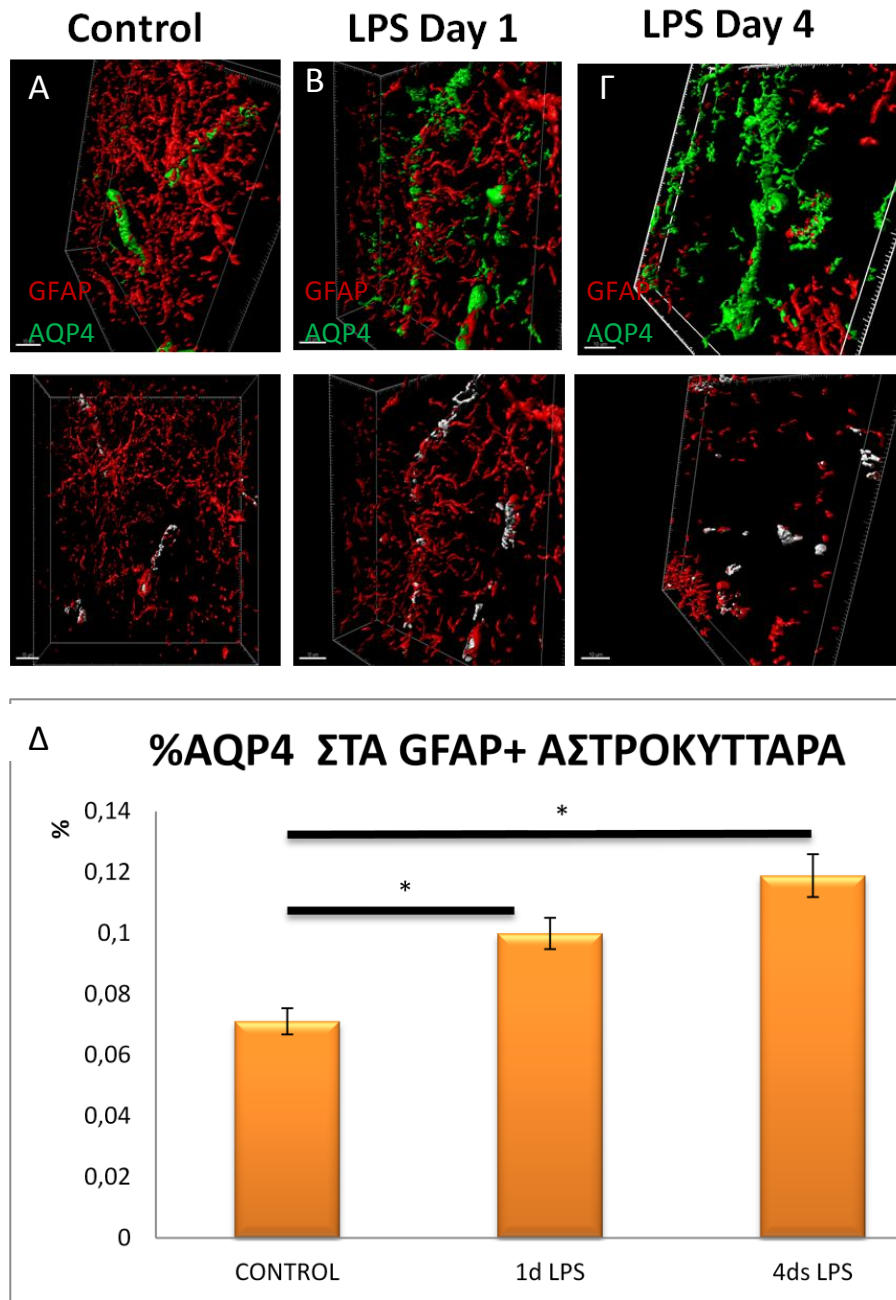
Γ) LPS DAY 4



Εικόνα 1: Απεικόνιση της τοπολογίας της Ακουαπορίνης 4 στις απολήξεις των περιαγγειακών αστροκυττάρων σε φυσιολογικές συνθήκες, καθώς και μετά την χορήγηση του LPS. Με πράσινο χρώμα απεικονίζεται η Ακουαπορίνη 4, με κόκκινο χρώμα παρουσιάζονται τα GFAP⁺αστροκύτταρα και με μπλε χρώμα απεικονίζονται οι πυρήνες των κυττάρων. **Aiii-iv)** Σε φυσιολογικές συνθήκες η Ακουαπορίνη 4 εντοπίζεται μόνο στις απολήξεις των αποφυάδων των αστροκυττάρων που είναι σε επαφή με το ενδοθήλιο των αγγείων (άσπρο βέλος). **B-Γiii-iv)** Μετά την έγχυση των δύο συνεχόμενων δόσεων 5mg/kg του LPS, παρατηρείται διάχυση της Ακουαπορίνης 4 σε όλο το μήκος των απολήξεων των περιαγγειακών αστροκυττάρων (άσπρο βέλος).

1.1.1 Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της Ακουαπορίνης 4 στα περιαγγειακά αστροκύτταρα πριν και μετά την χορήγηση του LPS

Για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης Ακουαπορίνης 4 στα αστροκύτταρα πριν και μετά την έγχυση του LPS χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα επεξεργασίας και ανάλυσης εικόνας Imaris v8.3.1 και ειδικότερα το module Surface-Surface contact area για την δημιουργία της επιφάνειας επαφής της Ακουαπορίνης 4 με τα περιαγγειακά αστροκύτταρα. Με το module αυτό δημιουργείται μια επιφάνεια για κάθε χρώση (αστροκύτταρα και Ακουαπορίνη 4), και μετά υπολογίζεται πόση από την επιφάνεια των αστροκυττάρων έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια της Ακουαπορίνης 4. Η επιφάνεια επαφής της Ακουαπορίνης 4 με τα περιαγγειακά ενεργοποιημένα αστροκύτταρα αυξάνεται την 1^η (0,1 %) και την 4^η ημέρα (0,12%) μετά την χορήγηση του LPS, όπως φαίνεται στο γράφημα, **(Εικόνα 2Δ)** συγκριτικά με τα ζώα μάρτυρες όπου η Ακουαπορίνη 4 είναι εντοπισμένη μόνο στις απολήξεις των αποφυάδων των ενεργοποιημένων αστροκυττάρων (~0,07%), που περιβάλλουν τα αγγεία. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες και των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν την 1^η ημέρα και την 4^η ημέρα μετά την χορήγηση του LPS ($p < 0,05$), ενώ η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική μεταξύ των δειγμάτων της 1^{ης} και της 4^{ης} ημέρας μετά την έγχυση του LPS ($p > 0,05$).

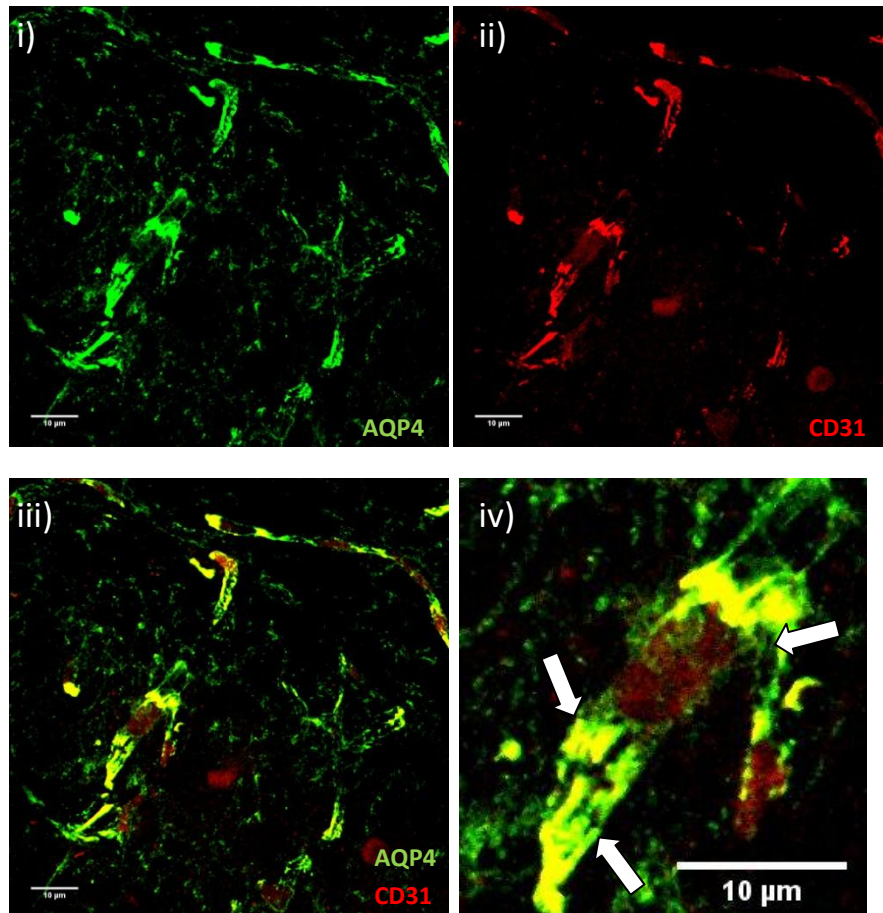


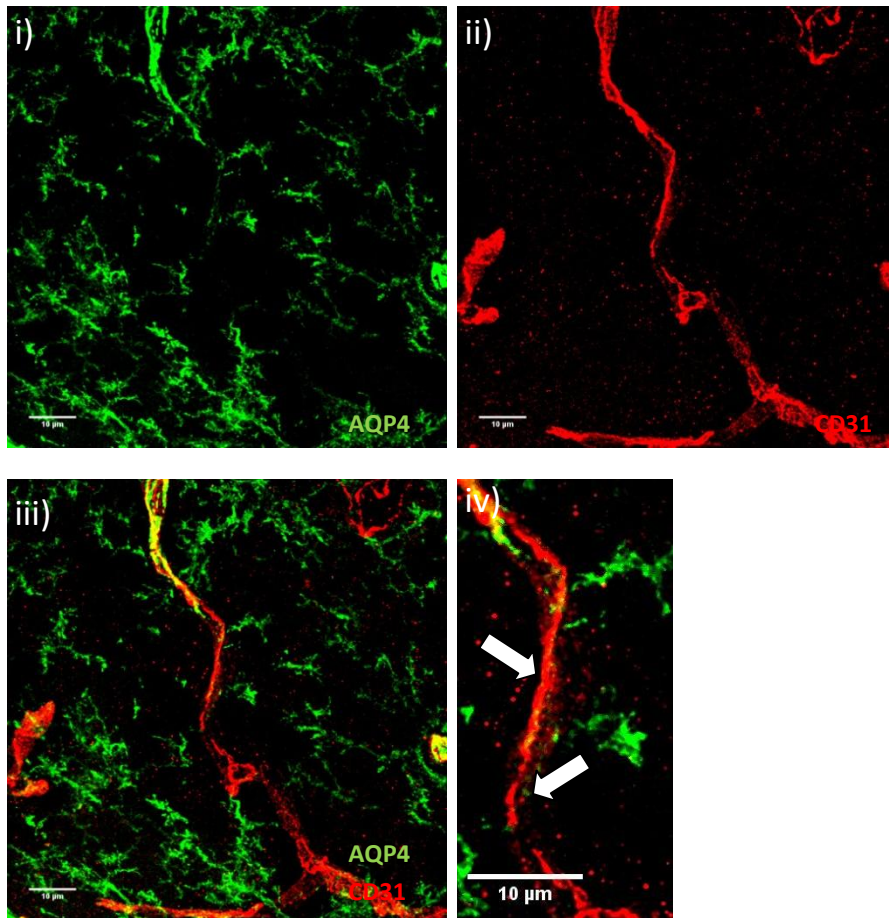
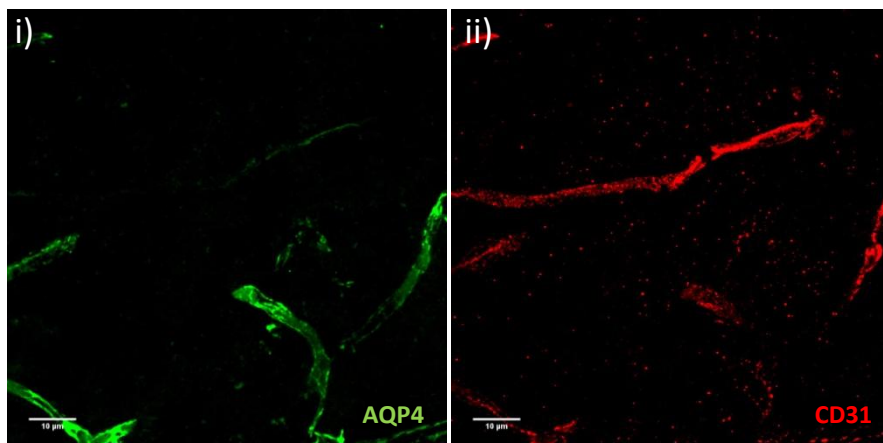
Εικόνα 2: Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της Ακουαπορίνης 4 στα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα πριν και μετά την έγχυση του LPS. Α-Γ) Για την ποσοτικοποίηση της Ακουαπορίνης 4 με τα περιαγγειακά αστροκύτταρα χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνας Imaris v8.3.1, module Surface-Surface Contact Area. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται η επιφάνεια των ενεργοποιημένων αστροκυττάρων, με πράσινο χρώμα απεικονίζεται η επιφάνεια της Ακουαπορίνης 4 και με άσπρο χρώμα φαίνεται η επιφάνειας επαφής της Ακουαπορίνης 4 με τα αστροκύτταρα (Scale bar=10μm). **Δ)** Στο γράφημα φαίνεται η αύξηση της επιφάνειας επαφής της Ακουαπορίνης 4 με τα αστροκύτταρα την 1^η και την 4^η ημέρα μετά την χορήγηση του LPS, συγκριτικά με τα ζώα μάρτυρες εκφραζόμενη ως ποσοστό της αστροκυτταρικής επιφάνειας που έρχεται σε επαφή με Ακουαπορίνη 4 (Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τους means ± S.E.M, n=3 για κάθε χρονιστική στιγμή, * p<0.05).

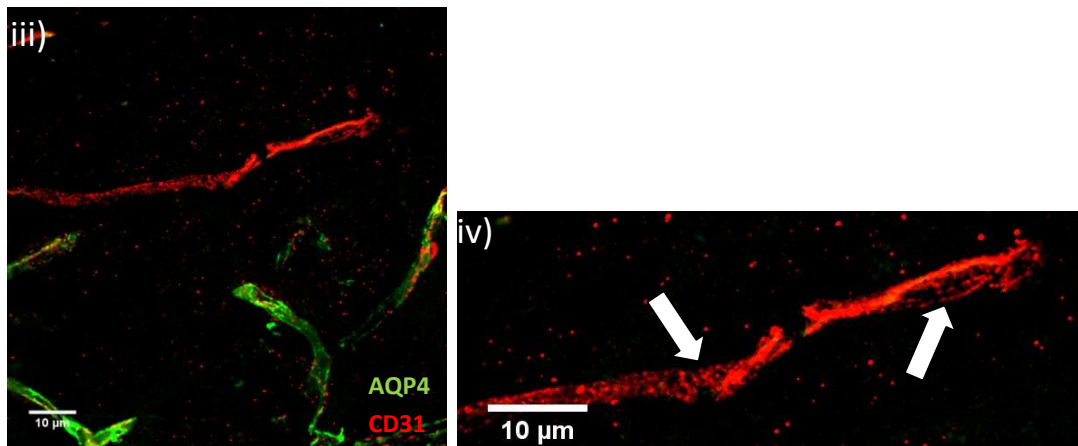
1.2 Μειωμένη κάλυψη των αγγείων του εγκεφαλικού παρεγχύματος από την Ακουαπορίνη 4 μετά την χορήγηση του LPS

Μετά την χορήγηση δύο συνεχόμενων δόσεων 5mg/kg LPS, ακολούθησε θυσία των C57BL6 πειραματόζων στα εξής χρονικά διαστήματα: 1 ημέρα μετά το LPS καθώς και 4 ημέρες μετά το LPS. Στα ανοσοϊστοχημικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με διπλή χρώση έναντι της AQP4 και της πρωτεΐνης CD31 που αποτελεί μάρτυρα των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων, παρατηρήθηκε μειωμένη κάλυψη των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων της Νευροαγγειακής Μονάδας την 1^η και την 4^η ημέρα μετά την έγχυση του LPS (**Εικόνα 3B-Γiii-iv**), σε αντίθεση με τα control ζώα όπου η Ακουαπορίνη 4 καλύπτει σε υψηλά ποσοστά στην επιφάνεια των αγγείων τα οποία αποτελούνται από ενδοθηλιακά κύτταρα και περικύτταρα και τα οποία περιβάλλονται από τις απολήξεις των αποφυάδων των αστροκυττάρων (**Εικόνα 3Aiii-iv**).

A) Control



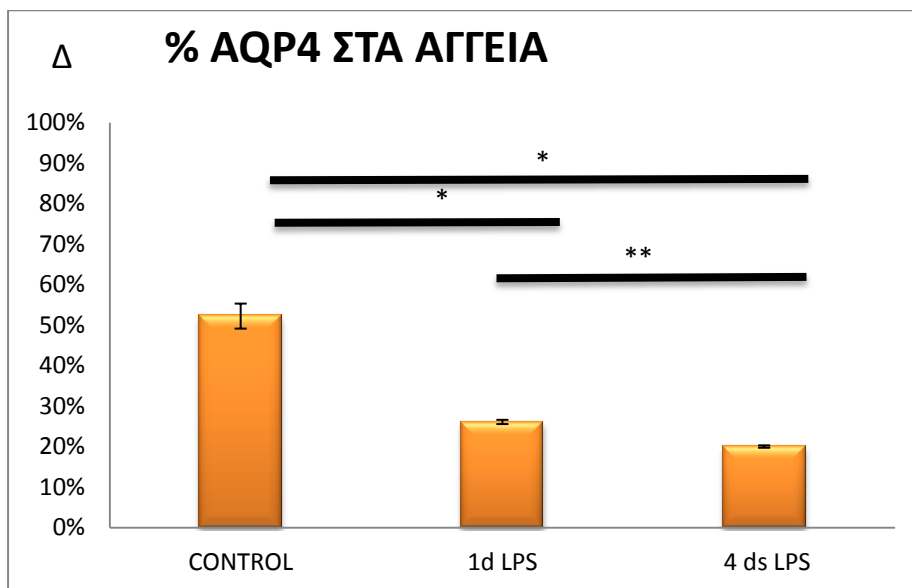
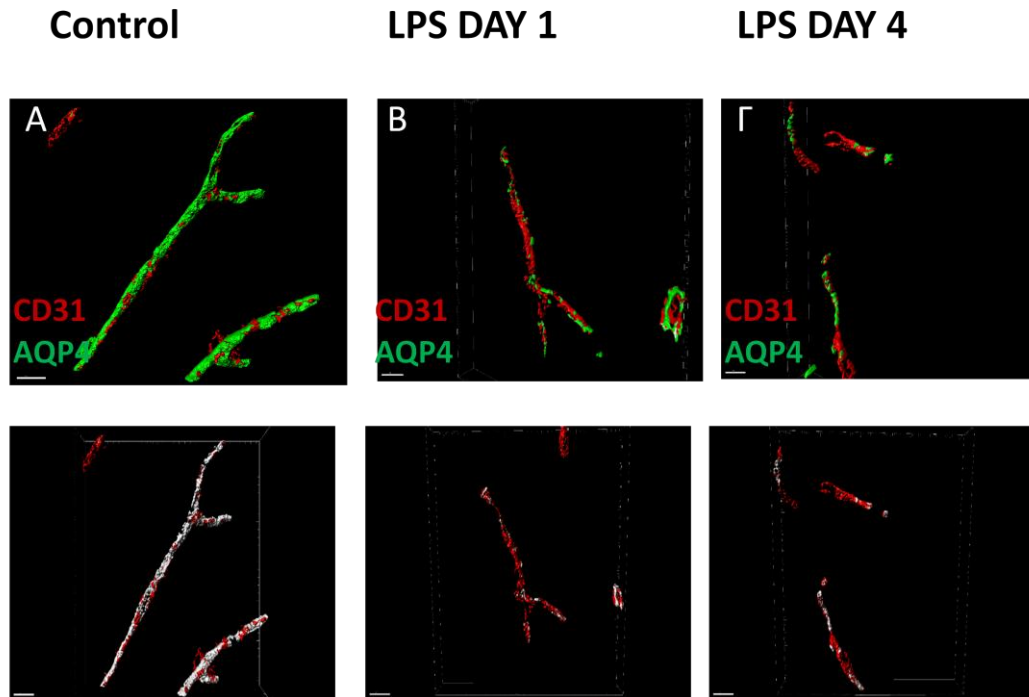
B) LPS DAY 1**Γ) LPS DAY 4**



Εικόνα 3: Απεικόνιση της έκφρασης της Ακουαπορίνης 4 σε σχέση με τα αγγεία της Νευροαγγειακής Μονάδας πριν και μετά την χορήγηση του LPS. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται τα αγγεία του ενδοθηλίου και με πράσινο χρώμα απεικονίζεται η Ακουαπορίνη 4. **Aiii-iv)** Στα ζώα μάρτυρες η έκφραση της Ακουαπορίνης 4 που εντοπίζεται στις απολήξεις των αποφυάδων των αστροκυττάρων φαίνεται να καλύπτει την επιφάνεια των αγγείων (άσπρο βέλος). **B-Giii-iv)** Η Ακουαπορίνη 4 μετά την έγχυση του LPS παρουσιάζει μειωμένη κάλυψη στην επιφάνεια των αγγείων (άσπρο βέλος).

1.2.1 Ποσοτικοποίηση της κάλυψης των αγγείων από Ακουαπορίνη 4 πριν και μετά την χορήγηση του LPS

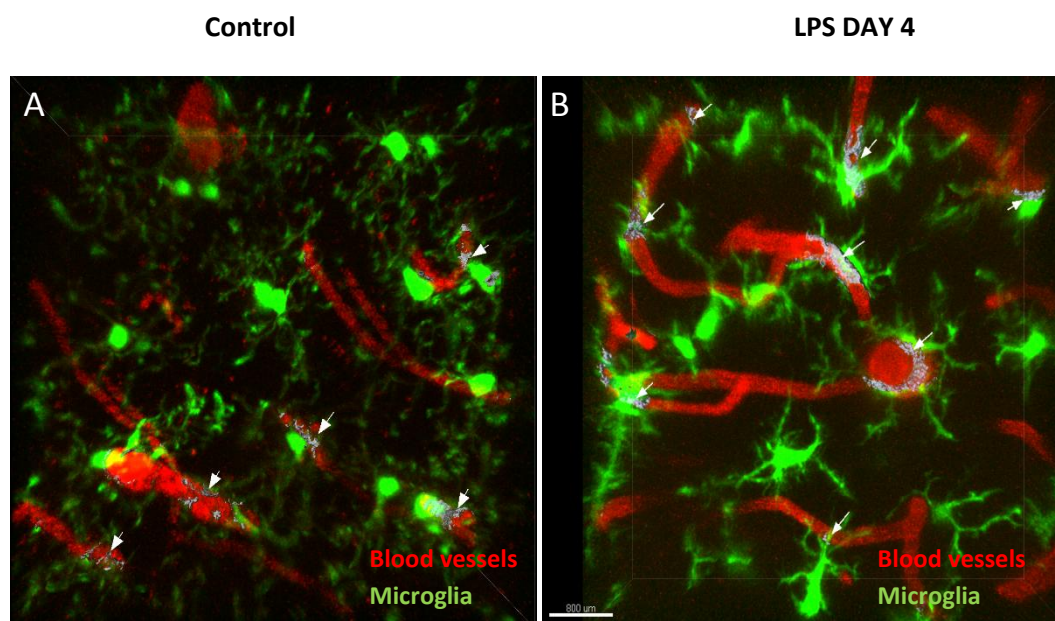
Για την ποσοτικοποίηση της επιφάνειας των αγγείων που καλύπτεται εξωτερικά από Ακουαπορίνη 4 πριν και μετά την χορήγηση του LPS χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα επεξεργασίας και ανάλυσης εικόνας Imaris v8.3.1 και συγκεκριμένα το module Surface-Surface contact area, για τον σχηματισμό της επιφάνειας επαφής της Ακουαπορίνης 4 με τα CD31+ ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων του εγκεφαλικού παρεγχύματος. Η Ακουαπορίνη 4 παρουσιάζει μειωμένη κάλυψη των ενδοθηλιακών αγγείων την 1^η (25% η επιφάνεια επαφής της Ακουαπορίνης 4 με τα ενδοθηλιακά αγγεία) και την 4^η ημέρα (20% η επιφάνεια επαφής της Ακουαπορίνης 4 με τα ενδοθηλιακά αγγεία) μετά την χορήγηση του LPS, συγκριτικά με τα ζώα μάρτυρες (~50% η επιφάνεια επαφής της Ακουαπορίνης 4 με τα ενδοθηλιακά αγγεία). όπως φαίνεται στο γράφημα (**Εικόνα 4Δ**). Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες και των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν την 1^η ημέρα και την 4^η ημέρα μετά την χορήγηση του LPS ($p < 0,05$). Τέλος παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων της 1^{ης} και της 4^{ης} ημέρας μετά την έγχυση του LPS ($p < 0,01$).



Εικόνα 4: Ποσοτικοποίηση της κάλυψης των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων από Ακουαπορίνη 4 πριν και μετά την χορήγηση του LPS. Α-Γ) Για την ποσοτικοποίηση του εντοπισμού της Ακουαπορίνης 4 εξωτερικά στα ενδοθηλιακά κύτταρα χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνας Imaris v8.3.1, module Surface-Surface Contact Area. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται η επιφάνεια των αγγείων, με πράσινο χρώμα απεικονίζεται η επιφάνεια της Ακουαπορίνης 4 και με άσπρο χρώμα φαίνεται η επιφάνειες επαφής της Ακουαπορίνης 4 με τα ενδοθηλιακά αγγεία (Scale Bar=10μm). **Δ)** Στο γράφημα φαίνεται η % μείωση της επιφάνειας επαφής της Ακουαπορίνης 4 με τα ενδοθηλιακά αγγεία την 1^η και την 4^η ημέρα μετά την χορήγηση του LPS, συγκριτικά με τα ζώα μάρτυρες (Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τους means ± S.E.M, n=2 για κάθε χρονιστική στιγμή, * p<0.05, ** p<0,01).

Κεφάλαιο 2: Η αλληλεπίδραση των μικρογλοιακών κυττάρων με τα αγγεία σε συνθήκες νευροφλεγμονής

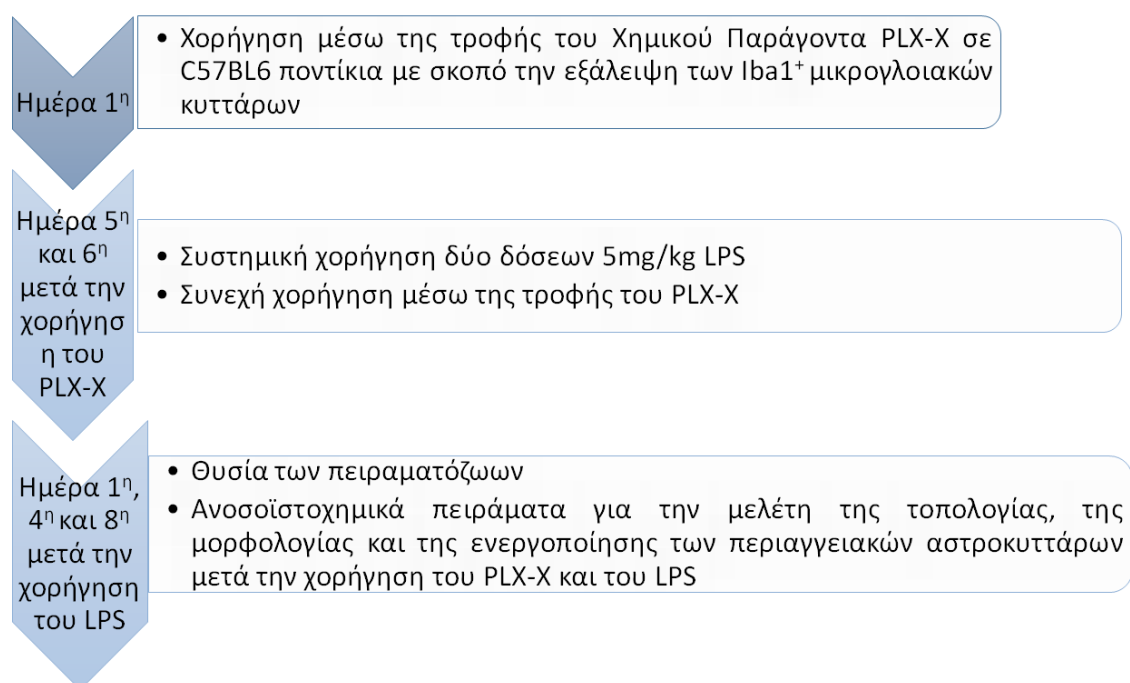
Παράλληλα με τα ανοσοϊστοχημικά πειράματα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ζωντανής απεικόνισης με σκοπό την παρατήρηση των αλληλεπιδράσεων των μικρογλοιακών κυττάρων με τα αγγεία της Νευροαγγειακής Μονάδας σε πραγματικό χρόνο πριν και μετά την χορήγηση δύο συνεχόμενων δόσεων 5mg/kg LPS σε CX3CR1-EGFP διαγονιδιακά ποντίκια των οποίων τα μικρογλοιακά κύτταρα φθορίζουν πράσινα. Για την παρατήρηση των αγγείων στο μικροσκόπιο πραγματοποιήθηκε ενδοφλέβια χορήγηση της χρωστικής ζωντανών κυττάρων (vital dye) Sulforhodamine dextran, η οποία παραμένει στα αγγεία για 2-3 ώρες. Από τα πειράματα ζωντανής απεικόνισης στο μικροσκόπιο σάρωσης δύο φωτονίων παρατηρήθηκε η προσέγγιση των ενδοθηλιακών αγγείων από τα μικρογλοιακά κύτταρα μετά την 4^η ημέρα του LPS, συγκριτικά με τα ζώα μάρτυρες (**Εικόνα 5A-B**). Τα πρώτα ποσοτικά αποτελέσματα με το πρόγραμμα Imaris v8.3.1, Surface- Surface Contact area module δείχνουν διπλασιασμό της κοινής επιφάνειας επαφής της μικρογλοίας με τα αγγεία μετά την χορήγηση του LPS, καθώς από 1% που είναι σε φυσιολογικές συνθήκες η κοινή επιφάνειας επαφής, μετά την έγχυση του LPS φτάνει το 2,6%.



Εικόνα 5: Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων των μικρογλοιακών κυττάρων με τα αγγεία πριν και μετά την χορήγηση του LPS. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα μικρογλοιακά κύτταρα και με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται τα αγγεία (Scale bar=800um). **A)** Σε φυσιολογικές συνθήκες η επιφάνεια επαφής των μικρογλοιακών κυττάρων με τα αστροκύτταρα είναι μικρή (άσπρο βέλος). **B)** Μετά την 4^η ημέρα χορήγησης των δύο δόσεων του LPS, παρατηρείται αύξηση της επιφάνειας επαφής των μικρογλοιακών κυττάρων με τα αγγεία (άσπρα βέλη).

Κεφάλαιο 3: Εξάλειψη της μικρογλοίας μέσω της χορήγησης του Χημικού Παράγοντα Χ PLX-X

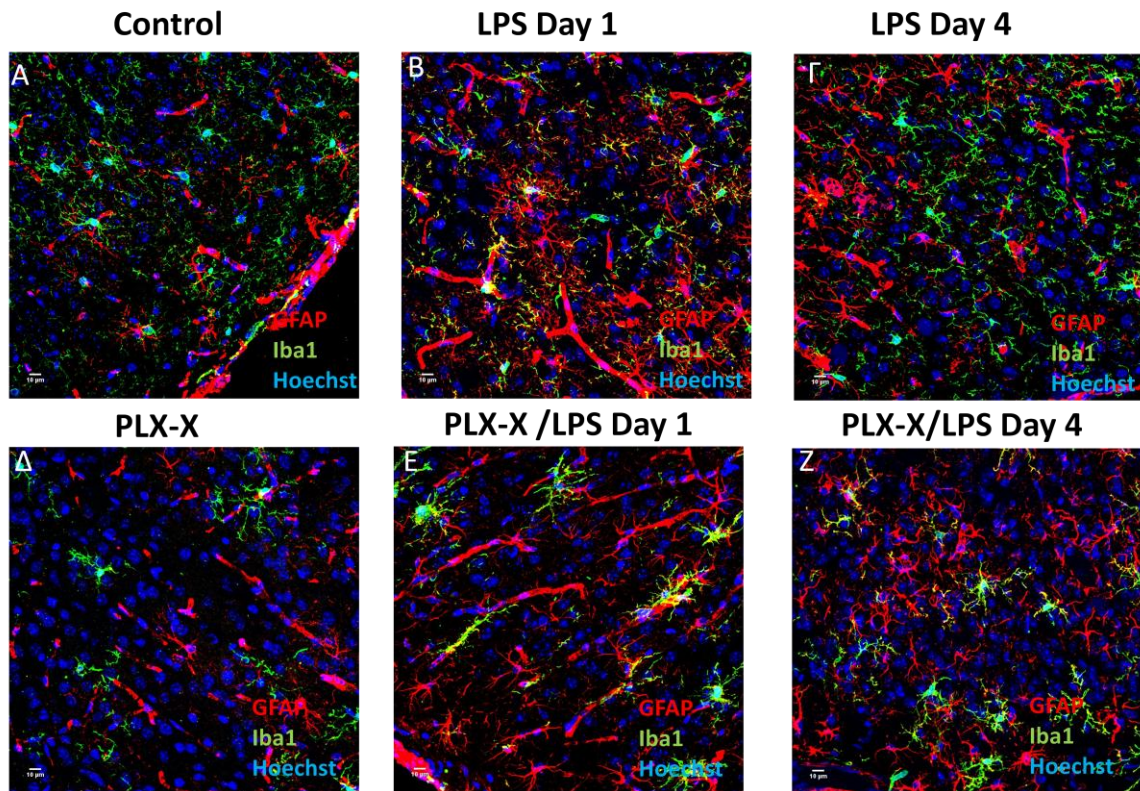
Κατά την διάρκεια των πειραμάτων δημιουργήθηκε το ερώτημα αναφορικά με τον τρόπο συμπεριφοράς των αστροκυττάρων σε συνθήκες εξάλειψης της μικρογλοίας και σε συνθήκες νευροφλεγμονής καθώς και την διερεύνηση της απώλειας του A1 νευροτοξικού φαινοτύπου των αστροκυττάρων), στις συνθήκες αυτές, όπως έχει παρατηρηθεί σε άλλα ζωικά μοντέλα νευροεκφυλισμού (Lddelow et al. 2017. Για την παρατήρηση της τοπολογίας, της μορφολογίας και της ενεργοποίησης των αστροκυττάρων μετά την εξάλειψη της μικρογλοίας, χορηγήθηκε ο Χημικός Παράγοντας PLX-X σε C57BL6 ποντίκια. Ο παράγοντας PLX-X δρα μέσω της εξάλειψης του CSF1 υποδοχέα, ο οποίος εκφράζεται ειδικά στην μικρογλοία και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και στην επιβίωση της, οδηγώντας με αυτό τον τρόπο στην εξάλειψη της (Rice et al. 2017).



Εικόνα 7: Πειραματικό πρωτόκολλο εξάλειψης της μικρογλοίας.

Παράλληλα με την χορήγηση του καταστολέα των μικρογλοιακών κυττάρων, πραγματοποιήθηκε έγχυση δύο επαναλαμβανόμενων δόσεων των 5mg/kg LPS με σκοπό την παρατήρηση της φαινοτυπικής και τοπολογικής συμπεριφοράς των αστροκυττάρων μετά την χορήγηση του PLX-X και του LPS (**Εικόνα 7**). Πράγματι, τα πρώτα αποτελέσματα μας δείχνουν 90% εξάλειψη των μικρογλοιακών κυττάρων μετά την χορήγηση του PLX-X για έξι συνεχόμενες ημέρες (**Εικόνα 8Δ**). Μετά την χορήγηση του PLX-X και την επιπλέον χορήγηση LPS, παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των μικρογλοιακών κυττάρων καθώς και καθυστερημένη ενεργοποίηση των αστροκυττάρων. Τα αστροκύτταρα φαίνεται να χάνουν την περιαγγειακή τους τοπολογία μόνο την 4^η ημέρα μετά την χορήγηση του LPS (**Εικόνα 8Ε-Ζ**). Τέλος, ο αύξηση του αριθμού των μικρογλοιακών κυττάρων και η ενεργοποίηση των αστροκυττάρων που παρατηρείται γενικά μετά την χορήγηση LPS

φαίνεται να είναι μειωμένα όταν έχει προηγηθεί χορήγηση του PLX-X (Εικόνα 8B-Γ). Τα πειράματα αυτά είναι σε εξέλιξη.



Εικόνα 8: Χρήση του Χημικού Παράγοντα PLX-X με σκοπό την εξάλειψη των μικρογλοϊκών κυττάρων πριν την χορήγηση LPS. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται τα αστροκύτταρα, με πράσινο χρώμα τα μικρογλοϊκά κύτταρα και μπλε χρώμα απεικονίζονται οι πυρήνες των κυττάρων (Scale bar=10μm). **A)** Σε φυσιολογικές συνθήκες τα αστροκύτταρα και η μικρογλοία είναι σε κατάσταση ηρεμίας. **Δ)** Μετά την χορήγηση του PLX-X παρατηρείται 90% εξάλειψη των Iba1⁺ μικρογλοϊακών κυττάρων. **Ε-Ζ)** Μετά την χορήγηση του PLX-X και του LPS παρατηρείται αύξηση του αριθμού των Iba1⁺ μικρογλοϊακών κυττάρων και καθυστερημένη ενεργοποίηση των αστροκυττάρων τα οποία χάνουν τον περιαγγειακό τους εντοπισμό μόνο την 4^η ημέρα μετά την χορήγηση του LPS. **Β-Γ)** Ο αριθμός των μικρογλοϊακών κυττάρων καθώς και η ενεργοποίηση των αστροκυττάρων μετά την χορήγηση του PLX-X και του LPS φαίνεται να είναι μειωμένα, συγκριτικά με την χορήγηση μόνο του LPS.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η Νευροαγγειακή Μονάδα κατέχει καίριο ρόλο στην ορθή λειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος καθώς συμμετέχει στην παροχή ενός σταθερού περιβάλλοντος για την νευρωνική λειτουργία, αλλά ταυτόχρονα διατηρεί το ιοντικό περιβάλλον κατάλληλο για την λειτουργία της συναπτικής σηματοδότησης μέσω ενός συνδυασμού ιοντικών καναλιών και μεταφορέων. Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 1 τα κύρια δομικά στοιχεία της Νευροαγγειακής Μονάδας είναι τα αγγεία, τα ενδοθηλιακά κύτταρα που τα περιβάλλουν τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με στενοσυνδέσμους, τα περικύτταρα, καθώς και τα πόδια των αποφυάδων των αστροκυττάρων (astrocytic end-feet). Η διαταραχή της σωστής και συντονισμένης λειτουργίας των δομικών συστατικών της Νευροαγγειακής Μονάδας έχει ως αποτέλεσμα την εκδήλωση νευροφλεγμονής η οποία λαμβάνει χώρα κατά την εξέλιξη λδιαφόρων νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως είναι η νόσος του Alzheimer και η νόσος του Parkinson. Επομένως η κατανόηση των μηχανισμών που ρυθμίζουν την λειτουργία της Νευροαγγειακής Μονάδας καθώς και ο ρόλος των δομικών στοιχείων της και οι μεταξύ τους δυναμικές αλληλεπιδράσεις κατά την εξέλιξη των νευροφλεγμονωδών καταστάσεων κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική.

Διάφορα πειραματικά ζωικά μοντέλα έχουν χρησιμοποιηθεί με σκοπό την προσομοίωση της νευροφλεγμονής που παρατηρείται στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Πιο συγκεκριμένα, η χρήση του LPS αποτελεί βασικό πειραματικό εργαλείο για την πρόκληση συστημικής φλεγμονής και νευροφλεγμονής καθώς μετά την χορήγησή του εκδηλώνονται συμπτώματα φλεγμονής στον περιφερικό αλλά και στο κεντρικό νευρικό σύστημα καθώς ενεργοποιούνται οι μηχανισμοί ανοσολογικής απόκρισης. Στο κεντρικό νευρικό σύστημα τα μικρογλοιακά κύτταρα ανταποκρίνονται άμεσα κατά την ανοσολογική απάντηση ενεργοποιώντας μέσω της έκκρισης διαφόρων προ-φλεγμονωδών μορίων και άλλα κύτταρα του εγκεφάλου όπως είναι τα αστροκύτταρα (Cardoso et al. 2015). Τα αστροκύτταρα πέρα από την έμμεση ενεργοποίησή τους από την μικρογλοία, μπορούν να ενεργοποιηθούν και από το ίδιο LPS μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών όπως είναι το NFκB, με αποτέλεσμα να απελευθερώνουν διάφορες κυτοκίνες και χημειοκίνες, οι οποίες τα οδηγούν από την κατάσταση της ηρεμίας στην ενεργή κατάσταση (Furube et al. 2018). Ως αποτέλεσμα της νευροφλεγμονής, εκτός από την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των αστροκυττάρων και των μικρογλοιακών κυττάρων, πραγματοποιείται διάρρηξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και αποδιοργάνωση των δομικών στοιχείων της Νευροαγγειακής Μονάδας.

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί συνέχεια προηγούμενων μελετών του εργαστηρίου με τη χρήση μεταξύ άλλων της τεχνολογίας intravital imaging σε CX3CR1-EGFP διαγονιδιακά ποντίκια για την παρατήρηση της μικρογλοίας καθώς και σε hGFAP-CFP διαγονιδιακά ποντίκια για την παρατήρηση των αστροκυττάρων σε πραγματικό χρόνο υπό φυσιολογικές συνθήκες καθώς και σε συνθήκες νευροφλεγμονής, μέσω της συστημικής χορήγησης της ενδοτοξίνης LPS. Πιο συγκεκριμένα, μέσω της χρήσης της μικροσκοπίας σάρωσης δύο φωτονίων, πραγματοποιήθηκε χωροχρονική παρατήρηση των αλλαγών των αστροκυττάρων και της μικρογλοίας καθώς και ποσοτικοποίηση του κυτταρικού τους όγκου, της κινητικότητας των κυτταρικών τους απολήξεων και του κυτταρικού τους

σώματος καθώς και της πόλωσης των αστροκυτταρικών απολήξεων πριν και μετά την χορήγηση του LPS. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν την πόλωση των περιαγγειακών αστροκυττάρων προς τα ενδοθηλιακά αγγεία, εκτείνοντας μία ή περισσότερες απολήξεις τους κατά την πάροδο του πρώτου 24ώρου μετά την χορήγηση του LPS. Ακόμη παρατηρήθηκε παροδική αποδιοργάνωση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού καθώς και διήθηση των κυκλοφορούντων μονοκυττάρων στο παρέγχυμα του εγκεφάλου κατά την διάρκεια των πρώτων ωρών μετά την χορήγηση του LPS. Τέλος με την χρήση του intravital imaging, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση της κινητικότητας των μικρογλοιακών απολήξεων, όπου τα αποτελέσματα μας έδειξαν αυξημένη μέση ταχύτητα κυρίως από την 1^η και 4^η ημέρα μετά την χορήγηση του LPS, συγκριτικά με την ταχύτητα των μαρτύρων (Γιαγκλήση Ιωάννα 2016).

Σε συνέχεια αυτών των πραγματοποιήθηκε χορήγηση δύο συνεχόμενων δόσεων 5mg/kg LPS σε ποντίκια C57BL6 καθώς και σε CX3CR1-EGFP διαγονιδιακά ποντίκια για την μελέτη των δομικών και φαινοτυπικών αλλαγών των κυτταρικών-δομικών συστατικών της Νευροαγγειακής Μονάδας καθώς και των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων που προκαλούνται σε συνθήκες νευροφλεγμονής *in vivo*. Με στόχο την πληρέστερη κατανόηση του λειτουργικού ρόλου που κατέχουν τα αστροκύτταρα στη λειτουργία της Νευροαγγειακής Μονάδας, διερευνήσαμε τον εντοπισμό των καναλιών της Ακουαπορίνης 4 σε συνθήκες νευροφλεγμονής. Η Ακουαπορίνη 4 εντοπίζεται σε φυσιολογικές συνθήκες στα πόδια των αποφυάδων των αστροκυττάρων (astrocytic endfeet) που είναι σε επαφή με τα ενδοθηλιακά αγγεία (Furman et al. 2013) και από διάφορες μελέτες συσχετίζεται με τη συμμετοχή της στο φαινόμενο του «swelling» των αστροκυττάρων, καθώς και στη μετατόπιση των αστροκυττάρων σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου, με σκοπό την επικοινωνία τους με άλλα κύτταρα όπως είναι η μικρογλοία κι οι νευρώνες, ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο τη σημασία του καναλιού αυτού στην εξέλιξη της νευροφλεγμονής καθώς και στην εμφάνιση διαφόρων νευροεκφυλιστικών νόσων (Saadoun et al. 2005), (Shi et al. 2017). Σε συμφωνία και με προηγούμενες πειραματικές μελέτες (Fukuda et al. 2012), τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η χορήγηση του LPS οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της Ακουαπορίνης 4 σε όλο το μήκος των απολήξεων των ενεργοποιημένων περιαγγειακών αστροκυττάρων και μείωση των επιπέδων της στην επιφάνεια των αγγείων του ενδοθελίου. Αυτή η αλλαγή στην τοπολογία της Ακουαπορίνης 4 έχει παρατηρηθεί και σε συνθήκες οίδηματος μετά από εκδήλωση εγκεφαλικού τραύματος, όπου και εκεί υπάρχει αποδιοργάνωση της Νευροαγγειακής Μονάδας (Fukuda et al. 2012).

Επιπρόσθετα, σε μια σειρά μελετών έχει δειχθεί ότι η Ακουαπορίνη 4 συσχετίζεται με την αστρογλίωση και την ενεργοποίηση της μικρογλοίας. Σε πειραματικές μελέτες στις οποίες πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση της Ακουαπορίνης 4, παρατηρήθηκε ενεργοποίηση της μικρογλοίας, μέσω πιθανών τροποποιήσεων του οσμωτικού stress, το οποίο φαίνεται να επηρεάζει το πρότυπο ενεργοποίησης των stretch-activated καναλιών χλωρίου που εκφράζονται στα μικρογλοιακά κύτταρα (Eder et al., 1998), (Schlichter et al. 2011). Ακόμη η Ακουαπορίνη 4 έχει συσχετιστεί και με την εξέλιξη νευροεκφυλιστικών νόσων όπως το Alzheimer, καθώς σε πειραματικές μελέτες αποσιώπησης του μορίου παρατηρήθηκε μειωμένη εκκαθάριση των Αβ αμυλοειδικών πλάκων (Yang et al. 2016). Επομένως, η απουσία της Ακουαπορίνης 4 φαίνεται σε πρώτη φάση να έχει επιβλαβή χαρακτήρα, καθώς η δομική της αποδιοργάνωση σε συνθήκες νευροφλεγμονής φαίνεται να συμβάλλει στην

διάρρηξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η ομαλή λειτουργία της νευροαγγειακής μονάδας και κατ' επέκταση όλου του κεντρικού νευρικού συστήματος. Όμως σε δεύτερη φάση, ο οργανισμός πιθανόν να αυξάνει τα επίπεδα της Ακουαπορίνης 4 με σκοπό την απομάκρυνση του νερού από το σημείο της φλεγμονής και την καταστολή της ενεργοποιημένης κατάστασης της μικρογλοίας, η οποία είναι υπεύθυνη για την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών. Έτσι επιτυγχάνεται η μείωση των επιπέδων των δεικτών της φλεγμονής με αποτέλεσμα την προστασία του ιστού από μία γενικευμένη βλάβη (Fukuda et al. 2012). Συμπερασματικά, η Ακουαπορίνη 4 αποδεικνύεται πολύ σημαντική για την εύρυθμη λειτουργία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πιθανός θεραπευτικός στόχος για διάφορες νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Για το λόγο αυτό πρέπει να πραγματοποιηθούν επιπλέον πειραματικές μελέτες, με σκοπό την εφαρμογή της στην κλινική πράξη.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η μικρογλοία είναι ένας σημαντικός κυτταρικός πληθυσμός του εγκεφάλου, ο οποίος αποτελεί την πρώτη γραμμή ανοσολογικής του απόκρισης και παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της νευροφλεγμονής. Με σκοπό την μελέτη των αλληλεπιδράσεων των μικρογλοιακών κυττάρων με τα ενδοθηλιακά αγγεία της Νευροαγγειακής Μονάδας σε φυσιολογικές συνθήκες καθώς και σε συνθήκες νευροφλεγμονής, χορηγήσαμε LPS ενδοπεριτοναϊκά σε διαγονιδιακά ποντίκια στα οποία η μικρογλοία φθορίζει πράσινη και με την χρήση της μικροσκοπίας σάρωσης δύο φωτονίων παρατηρήσαμε σε πραγματικό χρόνο ότι τα μικρογλοιακά κύτταρα μετά την έγχυση του LPS προσεγγίζουν σε μεγαλύτερο βαθμό τα εγκεφαλικά αγγεία συγκριτικά με τα ζώα μάρτυρες. Αυτό συμβαίνει καθώς τα μικρογλοιακά κύτταρα μέσω της ενεργοποίησής τους από το περιβαλλοντικό ερέθισμα (LPS), συμμετέχουν στην αποδιοργάνωση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, εκκρίνοντας προ-φλεγμονώδη μόρια με αποτέλεσμα να αλληλεπιδρούν περισσότερο με τα αγγεία του ενδοθηλίου, διαταράσσοντας έτσι την ακεραιότητα του φραγμού (Sumi et al. 2010). Το γεγονός ότι τα μικρογλοιακά κύτταρα είναι παρόντα κατά την εμβρυική ανάπτυξη, πριν την δημιουργία του ενδοθηλίου, και λαμβάνοντας υπόψη τη συμμετοχή τους στην ανάπτυξη του αγγειακού περιβάλλοντος του εγκεφάλου, ενισχύει την άποψη ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της μικρογλοίας και του ενδοθηλίου αποτελούν έναν πιθανό βασικό μηχανισμό στον σχηματισμό και στην ρύθμιση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Carvalho da Fonseca et al. 2014). Επομένως η μικρογλοία φαίνεται να αποτελεί πιθανό θεραπευτικό στόχο για την παρεμπόδιση της εξέλιξης της νευροφλεγμονής και για αυτό θα πρέπει να γίνουν περισσότερες μελέτες προς αυτή την κατεύθυνση.

Ακόμη στην παρούσα πειραματική εργασία επικεντρωθήκαμε στην μελέτη της τοπολογίας, της μορφολογίας και της ενεργοποίησης των αστροκυττάρων έπειτα από απώλεια της μικρογλοίας. Για το σκοπό αυτό χορήγησαμε τον χημικό παράγοντα PLX-X ο οποίος οδηγεί σε σημαντική μείωση των επιπέδων του υποδοχέα CSF1 που εκφράζεται ειδικά στη μικρογλοία συμμετέχοντας στην επιβίωση της οδηγώντας έτσι σε θάνατο τα μικρογλοιακά κύτταρα, μόνου του ή σε συνδυασμό με το LPS σε C57BL6 ποντίκια. Η χορήγηση του PLX-X οδήγησε σε εξάλειψη του 90% των μικρογλοιακών κυττάρων γεγονός που συνάδει και με άλλες πειραματικές μελέτες (Li et al. 2016), (Szalay et al. 2016). Η συγχορήγηση του PLX-X και του LPS οδήγησε σε αύξηση του αριθμού των μικρογλοιακών κυττάρων σε σύγκριση με τον αριθμό τους μετά από χορήγηση μόνο του PLX-X, γεγονός που πιθανότητα οφείλεται

στον πολλαπλασιασμό τους ή /και σε διαγοροποίηση ενός υποπληθυσμού περιαγγειακών μακροφάγων προς ένα μικρογλοιακό φαινότυπο, υποθέσεις που πρέπει να διερευνηθούν. Επιπρόσθετα η συγχρόνηση LPS/ PLX-X οδήγησε σε καθυστερημένη ενεργοποίηση των αστροκυττάρων, η οποία είναι εμφανής μέσω της μείωσης του αριθμού των αστροκυττάρων αλλά και της αλλαγής των μορφολογικών χαρακτηριστικών τους προς ένα λιγότερο ενεργοποιημένο φαινότυπο. Η χρονική καθυστέρηση στην ενεργοποίηση των αστροκυττάρων ακολουθείται από την παράλληλη απώλεια του περιαγγειακού τους εντοπισμού στο παρέγχυμα κατά την 4^η ημέρα μετά την χορήγηση του LPS,. Παρόλα αυτά και σε άλλες πειραματικές μελέτες μετά την χορήγηση του PLX-X και του LPS παρατηρήθηκε μειωμένος πολλαπλασιασμός και ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων συγκριτικά με υψηλά επίπεδα πολλαπλασιασμού και ενεργοποίησης της μικρογλοίας σε ζώα στα οποία είχε χορηγηθεί μόνο το LPS (Elmore et al. 2014). Η χρήση καταστολέων του υποδοχέα CSF1 της μικρογλοίας, αποτελεί σημαντικό πειραματικό εργαλείο για την κατανόηση του ρόλου της μικρογλοίας στην εξέλιξη της νευροφλεγμονής καθώς και της αλληλεπίδρασης της με τα αστροκύτταρα και του νευρώνες σε διάφορες νευροεκφυλιστικές νόσους. Άρα κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση, με σκοπό την εφαρμογή μορίων-καταστολέων της μικρογλοίας στην κλινική πράξη.

Επόμενα στάδια της παρούσας εργασίας τα οποία βρίσκονται σε στάδιο προγραμματισμού τους αφορούν στη μελέτη της δράσης των περικυττάρων και των στενοσυνδέσμων στην ακεραιότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, καθώς από διάφορες δημοσιευμένες μελέτες φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της νευροφλεγμονής (Elali et al. 2014), (Greene et al. 2016). Ακόμη απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου της Ακουαπορίνης 4 στην εκδήλωση και στην εξέλιξη της νευροφλεγμονής με απώτερο στόχο την κατανόηση του τρόπου συμμετοχής της σε διάφορες νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Επίσης, επιπλέον πειράματα θα πραγματοποιηθούν για την μελέτη των αλληλεπιδράσεων των μικρογλοιακών κυττάρων με το ενδοθήλιο αλλά και με τα αστροκύτταρα σε πραγματικό χρόνο. Επιπρόσθετα, θα πρέπει να μελετηθεί η συμπεριφορά των αστροκυττάρων μετά την χορήγηση του PLX-X και του LPS όχι μόνο την 1^η ημέρα, την 4^η ημέρα μετά το LPS αλλά και σε άλλα χρονικά διαστήματα όπως 3-5 ώρες μετά την χορήγηση της ενδοτοξίνης καθώς και την 8^η ημέρα μετά την έγχυση του LPS που έχει δειχθεί σε προηγούμενα πειράματα ως περίοδος ανάκαμψης της νευροφλεγμονής (Γιαγκλήση 2016). Ακόμη κρίνεται απαραίτητη η διερεύνηση της πιθανής ύπαρξης απώλειας του A1 νευροτοξικού φαινοτύπου των αστροκυττάρων, σε συνθήκες χορήγησης του PLX-X και του LPS, όπως έχει δειχθεί να συμβαίνει έπειτα από απώλεια μικρογλοίας σε πειραματικά μοντέλα ισχαιμίας (Liddelow et al. 2017). Επίσης, θα πρέπει να πραγματοποιηθεί μελέτη τυχόν αλλαγών της συμπεριφοράς των νευρώνων σε συνθήκες εξάλειψης της μικρογλοίας. Εν συνεχεία, θα γίνει χρήση της μικροσκοπίας σάρωσης δύο φωτονίων για την παρατήρηση σε πραγματικό χρόνο της συμπεριφοράς των αστροκυττάρων και παρατήρηση πιθανών αλλαγών στην διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού σε συνθήκες χορήγησης LPS καθώς και μετά από εξάλειψη του μικρογλοιακού πληθυσμού. Παράλληλα, θα μελετηθεί ο ρόλος της Ακουαπορίνης 4 στην ρύθμιση της ενεργοποίησης των μικρογλοιακών κυττάρων καθώς και στην εξέλιξη της νευροφλεγμονής, σε συνθήκες όπου έχει γίνει εξάλειψη της μικρογλοίας και χορήγηση LPS, καθώς παρατηρήθηκε καθυστερημένη ενεργοποίηση των αστροκυττάρων και απώλεια της

περιαγγειακής τοπολογίας τους την 4^η ημέρα μετά το LPS και η Ακουαπορίνη 4 όπως αναφέρθηκε παραπάνω συμμετέχει στην εξέλιξη της αστρογλοίωσης και της μετακίνησης των αστροκυττάρων.

Εν κατακλείδι, υπάρχουν αρκετές προσεγγίσεις, οι οποίες βρίσκονται σε εξέλιξη, για τη συμπλήρωση της διερεύνησης της επίδρασης της νευροφλεγμονής στη δυναμική της NVU στο μοντέλο μας και η συνεισφορά της μικροσκοπίας σάρωσης δύο φωτονίων θα συμβάλει καθοριστικά στην παραγωγή χρήσιμων δεδομένων για την κατανόηση των δυναμικών αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στην περιοχή σε πραγματικό χρόνο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Abbott N.J. (2013) Blood–brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 36:437–449.
- 2) Abbott N.J., Patabendige A.A.K., Dolman D.E.M., Yusof S.R. & Begley D.J. (2010) Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiology of Disease* 37:13–25.
- 3) Acharya M.M., Baulch J.E., Lusardi T.A., Allen B.D., Chmielewski N.N., Baddour A.A.D., *et al.* (2016a) Adenosine Kinase Inhibition Protects against Cranial Radiation-Induced Cognitive Dysfunction. *Frontiers in molecular neuroscience* 9:42.
- 4) Acharya M.M., Green K.N., Allen B.D., Najafi A.R., Syage A., Minasyan H., *et al.* (2016b) Elimination of microglia improves cognitive function following cranial irradiation. *Scientific Reports* 6:31545.
- 5) Alvarez J.I. & Teale J.M. (2007) Differential changes in junctional complex proteins suggest the ependymal lining as the main source of leukocyte infiltration into ventricles in murine neurocysticercosis. *Journal of neuroimmunology* 187:102–13.
- 6) Andreeva A.Y., Piontek J., Blasig I.E. & Utepbergenov D.I. (2006) Assembly of tight junction is regulated by the antagonism of conventional and novel protein kinase C isoforms. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38:222–233.
- 7) Arai H., Okamura N., Furukawa K. & Kudo Y. (2010) Geriatric Medicine, Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative and Biomarker Development. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 221:87–95.
- 8) Argaw A.T., Gurfein B.T., Zhang Y., Zameer A. & John G.R. (2009) VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:1977–1982.
- 9) Aspelund A., Antila S., Proulx S.T., Karlsen T.V., Karaman S., Detmar M., *et al.* (2015) A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *The Journal of Experimental Medicine* 212:991–999.
- 10) Attems J. & Jellinger K.A. (2014) The overlap between vascular disease and Alzheimer's disease - lessons from pathology. *BMC Medicine* 12:206.
- 11) Auguste K.I., Jin S., Uchida K., Yan D., Manley G.T., Papadopoulos M.C., *et al.* (2007) Greatly impaired migration of implanted aquaporin-4-deficient astroglial cells in mouse brain toward a site of injury. *The FASEB Journal* 21:108–116.
- 12) Badaut J., Ashwal S. & Obenaus A. (2011) Aquaporins in Cerebrovascular Disease: A Target for Treatment of Brain Edema. *Cerebrovasc Dis* 31:521–531.
- 13) Badaut J., Verbavatz J.M., Freund-Mercier M.J. & Lasbennes F. (2000) Presence of aquaporin-4 and muscarinic receptors in astrocytes and ependymal cells in rat brain: a clue to a common function. *Neuroscience letters* 292:75–8.
- 14) Baeten K.M. & Akassoglou K. (2011) Extracellular matrix and matrix receptors in blood-brain barrier formation and stroke. *Developmental Neurobiology* 71:1018–1039.
- 15) Ballabh P., Braun A. & Nedergaard M. (2004) The blood–brain barrier: an overview: Structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of Disease* 16:1–13.
- 16) Bannerman D.D., Fitzpatrick M.J., Anderson D.Y., Bhattacharjee A.K., Novitsky T.J., Hasday J.D., *et al.* (1998) Endotoxin-neutralizing protein protects against endotoxin-induced endothelial barrier dysfunction. *Infection and immunity* 66:1400–7.
- 17) Barger S.W. & Basile A.S. (2001) Activation of microglia by secreted amyloid precursor protein evokes release of glutamate by cystine exchange and attenuates synaptic function. *Journal of neurochemistry* 76:846–54.
- 18) Barker A.J. & Ullian E.M. (2010) Astrocytes and Synaptic Plasticity. *The Neuroscientist* 16:40–50.

- 19) Bazan J.F., Bacon K.B., Hardiman G., Wang W., Soo K., Rossi D., *et al.* (1997) A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 385:640–644.
- 20) Beard R.S., Haines R.J., Wu K.Y., Reynolds J.J., Davis S.M., Elliott J.E., *et al.* (2014) Non-muscle Mlck is required for -catenin- and FoxO1-dependent downregulation of Cldn5 in IL-1 -mediated barrier dysfunction in brain endothelial cells. *Journal of Cell Science* 127:1840–1853.
- 21) Beaurepaire E., Oheim M. & Mertz J. (2001) Ultra-deep two-photon fluorescence excitation in turbid media. *Optics Communications* 188:25–29.
- 22) Bennett R.E. & Brody D.L. (2014) Acute Reduction of Microglia Does Not Alter Axonal Injury in a Mouse Model of Repetitive Concussive Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma* 31:1647–1663.
- 23) Bhowmik A., Khan R. & Ghosh M.K. (2015) Blood Brain Barrier: A Challenge for Effectual Therapy of Brain Tumors. *BioMed Research International* 2015:1–20.
- 24) Biesmans S., Meert T.F., Bouwknecht J.A., Acton P.D., Davoodi N., De Haes P., *et al.* (2013) Systemic Immune Activation Leads to Neuroinflammation and Sickness Behavior in Mice. *Mediators of Inflammation* 2013.
- 25) Bordji K., Becerril-Ortega J., Nicole O. & Buisson A. (2010) Activation of Extrasynaptic, But Not Synaptic, NMDA Receptors Modifies Amyloid Precursor Protein Expression Pattern and Increases Amyloid- Production. *Journal of Neuroscience* 30:15927–15942.
- 26) Briones T.L., Woods J. & Wadowska M. (2014) Chronic neuroinflammation and cognitive impairment following transient global cerebral ischemia: role of fractalkine/CX3CR1 signaling. *Journal of neuroinflammation* 11:13.
- 27) Bruttger J., Karram K., Wörtge S., Regen T., Marini F., Hoppmann N., *et al.* (2015) Genetic Cell Ablation Reveals Clusters of Local Self-Renewing Microglia in the Mammalian Central Nervous System. *Immunity* 43:92–106.
- 28) Cabezas R., Ávila M., Gonzalez J., Santos El-Bachá R., Báez E., Miguel García-Segura L., *et al.* (2014) Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. *Cellular Neuroscience* 8:211.
- 29) Cardoso F.L., Herz J., Fernandes A., Rocha J., Sepodes B., Brito M.A., *et al.* (2015) Systemic inflammation in early neonatal mice induces transient and lasting neurodegenerative effects. *Journal of Neuroinflammation* 12:82.
- 30) Carvalho Da Fonseca A.C., Matias D., Garcia C., Amaral R., Geraldo H., Freitas C., *et al.* (2014) The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases. *Cellular Neuroscience* 8:362.
- 31) Catorce M.N. & Gevorkian G. (2016) LPS-induced Murine Neuroinflammation Model: Main Features and Suitability for Pre-clinical Assessment of Nutraceuticals. *Current neuropharmacology* 14:155–64.
- 32) Cekanaviciute E. & Buckwalter M.S. (2016) Astrocytes: Integrative Regulators of Neuroinflammation in Stroke and Other Neurological Diseases. *Neurotherapeutics* 13:685–701.
- 33) Cekanaviciute E., Fathali N., Doyle K., Williams A., Han J. & Buckwalter M. (2014) Astrocytic transforming growth factor-beta signaling reduces subacute neuroinflammation after stroke in mice. *Glia* 62:1227–1240.
- 34) Centonze V.E. & White J.G. (1998) Multiphoton Excitation Provides Optical Sections from Deeper within Scattering Specimens than Confocal Imaging. *Biophysical Journal* 75:2015–2024.
- 35) Ceyzeriat K., Abjean L., Carrillo-de Sauvage M.-A., Ben Haim L. & Escartin C. (2016) The complex STATes of astrocyte reactivity: How are they controlled by the JAK–STAT3 pathway. *Neuroscience* 330:205–218.
- 36) Chalmers S.A., Wen J., Shum J., Doerner J., Herlitz L. & Putterman C. (2017) CSF-1R

- inhibition attenuates renal and neuropsychiatric disease in murine lupus. *Clinical Immunology* 185:100–108.
- 37) Chen H. & Chan D.C. (2009) Mitochondrial dynamics-fusion, fission, movement, and mitophagy-in neurodegenerative diseases. *Human Molecular Genetics* 18:R169–R176.
 - 38) Chen S., Luo D., Streit W.J. & Harrison J.K. (2002a) TGF-beta1 upregulates CX3CR1 expression and inhibits fractalkine-stimulated signaling in rat microglia. *Journal of neuroimmunology* 133:46–55.
 - 39) Chen T.-S., Zeng S.-Q., Luo Q.-M., Zhang Z.-H. & Zhou W. (2002b) High-Order Photobleaching of Green Fluorescent Protein inside Live Cells in Two-Photon Excitation Microscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 291:1272–1275.
 - 40) Chen W.-W., Zhang X. & Huang W.-J. (2016) Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Molecular Medicine Reports* 13:3391–3396.
 - 41) Chen Y.-H., Lu Q., Goodenough D.A. & Jeanson B. (2002c) Nonreceptor tyrosine kinase c-Yes interacts with occludin during tight junction formation in canine kidney epithelial cells. *Molecular biology of the cell* 13:1227–37.
 - 42) Cheng L., Yang K., Zhang S., Shao M., Lee S. & Liu Z. (2010) Highly-sensitive multiplexed in vivo imaging using pegylated upconversion nanoparticles. *Nano Research* 3:722–732.
 - 43) Chevalier-Larsen E. & Holzbaur E.L.F. (2006) Axonal transport and neurodegenerative disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1762:1094–1108.
 - 44) Choi D.W., Maulucci-Gedde M. & Kriegstein A.R. (1987) Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 7:357–68.
 - 45) Chugh D., Nilsson P., Afjei S.-A., Bakochi A. & Ekdahl C.T. (2013) Brain inflammation induces post-synaptic changes during early synapse formation in adult-born hippocampal neurons. *Experimental Neurology* 250:176–188.
 - 46) Cipolla M.J. (2009) Control of Cerebral Blood Flow.
 - 47) Colonna M. & Butovsky O. (2017) Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annual Review of Immunology* 35:441–468.
 - 48) Crespo O., Kang S.C., Daneman R., Lindstrom T.M., Ho P.P., Sobel R.A., *et al.* (2011) Tyrosine Kinase Inhibitors Ameliorate Autoimmune Encephalomyelitis in a Mouse Model of Multiple Sclerosis. *Journal of Clinical Immunology* 31:1010–1020.
 - 49) Czirr E. & Wyss-Coray T. (2012) The immunology of neurodegeneration. *Journal of Clinical Investigation* 122:1156–1163.
 - 50) Dagher N.N., Najafi A.R., Kayala K.M.N., Elmore M.R.P., White T.E., Medeiros R., *et al.* (2015) Colony-stimulating factor 1 receptor inhibition prevents microglial plaque association and improves cognition in 3xTg-AD mice. *Journal of Neuroinflammation* 12:139.
 - 51) Dahlback B. (2005) Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. *Journal of Internal Medicine* 257:209–223.
 - 52) Davalos D., Grutzendler J., Yang G., Kim J. V., Zuo Y., Jung S., *et al.* (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience* 8:752–758.
 - 53) Deane R., Du Yan S., Subramanyam R.K., LaRue B., Jovanovic S., Hogg E., *et al.* (2003) RAGE mediates amyloid- β peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nature Medicine* 9:907–913.
 - 54) Dénes Á., Ferenczi S., Halász J., Környei Z. & Kovács K.J. (2008) Role of CX3CR1

- (Fractalkine Receptor) in Brain Damage and Inflammation Induced by Focal Cerebral Ischemia in Mouse. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 28:1707–1721.
- 55) Denk W., Delaney K.R., Gelperin A., Kleinfeld D., Strowbridge B.W., Tank D.W., *et al.* (1994) Anatomical and functional imaging of neurons using 2-photon laser scanning microscopy. *Journal of neuroscience methods* 54:151–162.
 - 56) Denk W., Strickler J.H. & Webb W.W. (1990) Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science (New York, N.Y.)* 248:73–76.
 - 57) Denk W. & Svoboda K. (1997) Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick. *Neuron* 18:351–7.
 - 58) Dimova R. & Lipowsky R. (2012) Lipid membranes in contact with aqueous phases of polymer solutions. *Soft Matter* 8:6409.
 - 59) Doll D.N., Rellick S.L., Barr T.L., Ren X. & Simpkins J.W. (2015) Rapid mitochondrial dysfunction mediates TNF-alpha-induced neurotoxicity. *Journal of Neurochemistry* 132:443–451.
 - 60) Du L., Zhang Y., Chen Y., Zhu J., Yang Y. & Zhang H.-L. (2017) Role of Microglia in Neurological Disorders and Their Potentials as a Therapeutic Target. *Molecular Neurobiology* 54:7567–7584.
 - 61) Durand J.-B., Peeters R., Norman J.F., Todd J.T. & Orban G.A. (2009) Parietal regions processing visual 3D shape extracted from disparity. *NeuroImage* 46:1114–1126.
 - 62) Eadon M.T., Hack B.K., Xu C., Ko B., Toback F.G. & Cunningham P.N. (2012) Endotoxemia alters tight junction gene and protein expression in the kidney. *American journal of physiology. Renal physiology* 303:F821-30.
 - 63) Eder C., Klee R. & Heinemann U. (1998) Involvement of stretch-activated Cl-channels in ramification of murine microglia. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 18:7127–37.
 - 64) Eggeling C., Volkmer A. & Seidel C.A.M. (2005) Molecular Photobleaching Kinetics of Rhodamine 6G by One- and Two-Photon Induced Confocal Fluorescence Microscopy. *ChemPhysChem* 6:791–804.
 - 65) Elali A., Thériault P. & Rivest S. (2014) The Role of Pericytes in Neurovascular Unit Remodeling in Brain Disorders. *OPEN ACCESS Int. J. Mol. Sci* 15:15.
 - 66) Elmore M.R.P., Lee R.J., West B.L. & Green K.N. (2015) Characterizing Newly Repopulated Microglia in the Adult Mouse: Impacts on Animal Behavior, Cell Morphology, and Neuroinflammation. *PLOS ONE* 10:e0122912.
 - 67) Elmore M.R.P., Najafi A.R., Koike M.A., Dagher N.N., Spangenberg E.E., Rice R.A., *et al.* (2014a) Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron* 82:380–397.
 - 68) Elmore M.R.P., Najafi A.R., Koike M.A., Dagher N.N., Spangenberg E.E., Rice R.A., *et al.* (2014b) Colony-Stimulating Factor 1 Receptor Signaling Is Necessary for Microglia Viability, Unmasking a Microglia Progenitor Cell in the Adult Brain. *Neuron* 82:380–397.
 - 69) Erblich B., Zhu L., Etgen A.M., Dobrenis K. & Pollard J.W. (2011) Absence of Colony Stimulation Factor-1 Receptor Results in Loss of Microglia, Disrupted Brain Development and Olfactory Deficits. *PLoS ONE* 6:e26317.
 - 70) Erickson M.A. & Banks W.A. (2011) Cytokine and chemokine responses in serum and brain after single and repeated injections of lipopolysaccharide: Multiplex quantification with path analysis. *Brain, Behavior, and Immunity* 25:1637–1648.
 - 71) Errede M., Girolamo F., Ferrara G., Strippoli M., Morando S., Boldrin V., *et al.* (2012) Blood-Brain Barrier Alterations in the Cerebral Cortex in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 71:840–854.

- 72) Eugenin E.A., Eckardt D., Theis M., Willecke K., Bennett M.V.L. & Saez J.C. (2001) Microglia at brain stab wounds express connexin 43 and in vitro form functional gap junctions after treatment with interferon- and tumor necrosis factor-. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:4190–4195.
- 73) Eyo U.B. & Wu L.-J. (2013) Bidirectional microglia-neuron communication in the healthy brain. *Neural plasticity* 2013:456857.
- 74) Fallier-Becker P., Sperveslage J., Wolburg H. & Noell S. (2011) The impact of agrin on the formation of orthogonal arrays of particles in cultured astrocytes from wild-type and agrin-null mice. *Brain Research* 1367:2–12.
- 75) Fantini S., Sassaroli A., Tgavalekos K.T. & Kornbluth J. (2016) noninvasive optical methods. *Neurophoton* 3:31411.
- 76) Farina C., Aloisi F. & Meinl E. (2007) Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends in Immunology* 28:138–145.
- 77) Faulkner J.R., Herrmann J.E., Woo M.J., Tansey K.E., Doan N.B. & Sofroniew M. V (2004) Reactive Astrocytes Protect Tissue and Preserve Function after Spinal Cord Injury. *Journal of Neuroscience* 24:2143–2155.
- 78) Fernández-Arjona M. del M., Grondona J.M., Granados-Durán P., Fernández-Llebrez P. & López-Ávalos M.D. (2017) Microglia Morphological Categorization in a Rat Model of Neuroinflammation by Hierarchical Cluster and Principal Components Analysis. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11:235.
- 79) Fernández-Klett F., Potas J.R., Hilpert D., Blazej K., Radke J., Huck J., *et al.* (2013) Early Loss of Pericytes and Perivascular Stromal Cell-Induced Scar Formation after Stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 33:428–439.
- 80) Flusberg B.A., Cocker E.D., Piyawattanametha W., Jung J.C., Cheung E.L.M. & Schnitzer M.J. (2005) Fiber-optic fluorescence imaging. *Nature methods* 2:941–950.
- 81) da Fonseca A.C.C., Matias D., Garcia C., Amaral R., Geraldo L.H., Freitas C., *et al.* (2014) The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases. *Frontiers in cellular neuroscience* 8:362.
- 82) Francois A., Terro F., Quellard N., Fernandez B., Chassaing D., Janet T., *et al.* (2014) Impairment of autophagy in the central nervous system during lipopolysaccharide-induced inflammatory stress in mice. *Molecular Brain* 7:56.
- 83) Fukuda A.M. & Badaut J. (2012) Aquaporin 4 in Cerebral Edema and Neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation* 9:279.
- 84) Funke M. & Niebuhr A. (2005) Regional Geographic Research and Development Spillovers and Economic Growth: Evidence from West Germany. *Regional Studies* 39:143–153.
- 85) Furman C.S., Gorelick-Feldman D.A., Davidson K.G. V, Yasumura T., Neely J.D., Agre P., *et al.* (2003) *Aquaporin-4 square array assembly: Opposing actions of M1 and M23 isoforms.*
- 86) Furube E., Kawai S., Inagaki H., Takagi S. & Miyata S. (2018) Brain Region-dependent Heterogeneity and Dose-dependent Difference in Transient Microglia Population Increase during Lipopolysaccharide-induced Inflammation. *SClenTiflC REpoRtS* | 8:2203.
- 87) Furuse M., Fujita K., Hiiragi T., Fujimoto K. & Tsukita S. (1998) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *The Journal of cell biology* 141:1539–50.
- 88) Furuse M., Hirase T., Itoh M., Nagafuchi A., Yonemura S., Tsukita S., *et al.* (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *The Journal of cell biology* 123:1777–88.
- 89) Ginhoux F., Greter M., Leboeuf M., Nandi S., See P., Gokhan S., *et al.* (2010) Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages.

- Science 330:841–845.
- 90) Gomez-Nicola D. & Perry V.H. (2015) Microglial Dynamics and Role in the Healthy and Diseased Brain. *The Neuroscientist* 21:169–184.
 - 91) Gonen T. & Walz T. (2006) The structure of aquaporins. *Quarterly Reviews of Biophysics* 39:361.
 - 92) González H., Elgueta D., Montoya A. & Pacheco R. (2014) Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *Journal of Neuroimmunology* 274:1–13.
 - 93) Gordon R., Anantharam V., Kanthasamy A.G. & Kanthasamy A. (2012) Proteolytic activation of proapoptotic kinase protein kinase C δ by tumor necrosis factor α death receptor signaling in dopaminergic neurons during neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation* 9:646.
 - 94) Gowing G., Philips T., Van Wijmeersch B., Audet J.-N., Dewil M., Van Den Bosch L., *et al.* (2008) Ablation of Proliferating Microglia Does Not Affect Motor Neuron Degeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis Caused by Mutant Superoxide Dismutase. *Journal of Neuroscience* 28:10234–10244.
 - 95) Gowing G., Vallières L. & Julien J.-P. (2006) Mouse model for ablation of proliferating microglia in acute CNS injuries. *Glia* 53:331–337.
 - 96) Graeber M.B., Li W. & Rodriguez M.L. (2011) Role of microglia in CNS inflammation. *FEBS Letters* 585:3798–3805.
 - 97) Greene C. & Campbell M. (2016) Tight junction modulation of the blood brain barrier: CNS delivery of small molecules. *Tissue Barriers* 4:1.
 - 98) Han J., Harris R.A. & Zhang X.M. (2017) An updated assessment of microglia depletion: Current concepts and future directions. *Molecular Brain* 10:1–8.
 - 99) Hanout M., Ferraz D., Ansari M., Maqsood N., Kherani S., Sepah Y.J., *et al.* (2013) Therapies for Neovascular Age-Related Macular Degeneration: Current Approaches and Pharmacologic Agents in Development. *BioMed Research International* 2013:1–8.
 - 100) Hartsock A. & Nelson W.J. (2008) Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et biophysica acta* 1778:660–9.
 - 101) Haydon P.G. & Carmignoto G. (2006) Astrocyte Control of Synaptic Transmission and Neurovascular Coupling. *Physiological Reviews* 86:1009–1031.
 - 102) Helmchen F. & Denk W. (2005) Deep tissue two-photon microscopy. *Nature Methods* 2:932–940.
 - 103) Heneka M.T., Sastre M., Dumitrescu-Ozimek L., Dewachter I., Walter J., Klockgether T., *et al.* (2005) Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice. *Journal of Neuroinflammation* 2:22.
 - 104) Henkel J.S., Engelhardt J.I., Siklós L., Simpson E.P., Kim S.H., Pan T., *et al.* (2004) Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Annals of Neurology* 55:221–235.
 - 105) Heppner F.L., Greter M., Marino D., Falsig J., Raivich G., Hövelmeyer N., *et al.* (2005) Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nature Medicine* 11:146–152.
 - 106) Hide I., Tanaka M., Inoue A., Nakajima K., Kohsaka S., Inoue K., *et al.* (2000) Extracellular ATP triggers tumor necrosis factor- α release from rat microglia. *Journal of neurochemistry* 75:965–72.
 - 107) Holtmaat A., Bonhoeffer T., Chow D.K., Chuckowree J., De Paola V., Hofer S.B., *et al.* (2009) Long-term, high-resolution imaging in the mouse neocortex through a chronic cranial window. *Nature Protocols* 4:1128–1144.

- 108) Hopt A. & Neher E. (2001) Highly Nonlinear Photodamage in Two-Photon Fluorescence Microscopy. *Biophysical Journal* 80:2029–2036.
- 109) Hudson N., Powner M.B., Sarker M.H., Burgoyne T., Campbell M., Ockrim Z.K., *et al.* (2014) Differential Apicobasal VEGF Signaling at Vascular Blood-Neural Barriers. *Developmental Cell* 30:541–552.
- 110) Huell M., Strauss S., Volk B., Berger M. & Bauer J. (1995) Interleukin-6 is present in early stages of plaque formation and is restricted to the brains of Alzheimer's disease patients. *Acta Neuropathologica* 89:544–551.
- 111) Hughes E.G. & Bergles D.E. (2014) Hidden Progenitors Replace Microglia in the Adult Brain. *Neuron* 82:253–255.
- 112) Iadecola C. (2017) The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron* 96:17–42.
- 113) Iliff J.J., Wang M., Liao Y., Plogg B.A., Peng W., Gundersen G.A., *et al.* (2012) A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow Through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid. *Science Translational Medicine* 4:147ra111.
- 114) Imai T., Hieshima K., Haskell C., Baba M., Nagira M., Nishimura M., *et al.* (1997) Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 91:521–30.
- 115) Inoue K., Nakajima K., Morimoto T., Kikuchi Y., Koizumi S., Illes P., *et al.* (1998) ATP stimulation of Ca²⁺-dependent plasminogen release from cultured microglia. *British Journal of Pharmacology* 123:1304–1310.
- 116) Jäkel S. & Dimou L. (2017) Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11:24.
- 117) Jay T.R., Miller C.M., Cheng P.J., Graham L.C., Bemiller S., Broihier M.L., *et al.* (2015) TREM2 deficiency eliminates TREM2⁺ inflammatory macrophages and ameliorates pathology in Alzheimer's disease mouse models. *The Journal of Experimental Medicine* 212:287–295.
- 118) Jin W.-N., Shi S.X.-Y., Li Z., Li M., Wood K., Gonzales R.J., *et al.* (2017a) Depletion of microglia exacerbates postischemic inflammation and brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 37:2224–2236.
- 119) Jin W.-N., Shi S.X.-Y., Li Z., Li M., Wood K., Gonzales R.J., *et al.* (2017b) Depletion of microglia exacerbates postischemic inflammation and brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 37:2224–2236.
- 120) Jullienne A., Fukuda A.M., Ichkova A., Nishiyama N., Aussudre J., Obenaus A., *et al.* (2018) Modulating the water channel AQP4 alters miRNA expression, astrocyte connectivity and water diffusion in the rodent brain. *Scientific Reports* 8:4186.
- 121) Jung J.C., Mehta A.D., Aksay E., Stepnoski R. & Schnitzer M.J. (2004) In vivo mammalian brain imaging using one- and two-photon fluorescence microendoscopy. *Journal of neurophysiology* 92:3121–3133.
- 122) Jung S., Aliberti J., Graemmel P., Sunshine M.J., Kreutzberg G.W., Sher A., *et al.* (2000) Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Molecular and cellular biology* 20:4106–14.
- 123) Kaltschmidt B. & Kaltschmidt C. (2009) NF- B in the Nervous System. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1:a001271.
- 124) Kherlopian A.R., Song T., Duan Q., Neimark M.A., Po M.J., Gohagan J.K., *et al.* (2008) A review of imaging techniques for systems biology. *BMC Systems Biology* 2:74.
- 125) Kierdorf K., Erny D., Goldmann T., Sander V., Schulz C., Perdiguero E.G., *et al.* (2013) Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nature Neuroscience* 16:273–280.

- 126) Kitazawa M., Oddo S., Yamasaki T.R., Green K.N. & LaFerla F.M. (2005) Lipopolysaccharide-Induced Inflammation Exacerbates Tau Pathology by a Cyclin-Dependent Kinase 5-Mediated Pathway in a Transgenic Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience* 25:8843–8853.
- 127) Kobat D., Durst M.E., Nishimura N., Wong A.W., Schaffer C.B. & Xu C. (2009) Deep tissue multiphoton microscopy using longer wavelength excitation. *Optics Express* 17:13354.
- 128) Koester H.J., Baur D., Uhl R. & Hell S.W. (1999) Ca²⁺ fluorescence imaging with pico- and femtosecond two-photon excitation: signal and photodamage. *Biophysical journal* 77:2226–2236.
- 129) Koizumi S., Shigemoto-Mogami Y., Nasu-Tada K., Shinozaki Y., Ohsawa K., Tsuda M., *et al.* (2007) UDP acting at P2Y₆ receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* 446:1091–1095.
- 130) König K., Becker T.W., Fischer P., Riemann I. & Halbhuter K.-J. (1999) Pulse-length dependence of cellular response to intense near-infrared laser pulses in multiphoton microscopes. *Optics Letters* 24:113.
- 131) Lee S., Varvel N.H., Konerth M.E., Xu G., Cardona A.E., Ransohoff R.M., *et al.* (2010) CX3CR1 Deficiency Alters Microglial Activation and Reduces Beta-Amyloid Deposition in Two Alzheimer's Disease Mouse Models. *The American Journal of Pathology* 177:2549–2562.
- 132) Lehner C., Gehwolf R., Tempfer H., Krizbai I., Hennig B., Bauer H.-C., *et al.* (2011) Oxidative Stress and Blood–Brain Barrier Dysfunction Under Particular Consideration of Matrix Metalloproteinases. *Antioxidants & Redox Signaling* 15:1305–1323.
- 133) Levene M.J., Dombeck D.A., Kasischke K.A., Molloy R.P. & Webb W.W. (2004) Innovative Methodology In Vivo Multiphoton Microscopy of Deep Brain Tissue. *J Neurophysiol* 91:1908–1912.
- 134) Li E., Noda M., Doi Y., Parajuli B., Kawanokuchi J., Sonobe Y., *et al.* (2012) The neuroprotective effects of milk fat globule-EGF factor 8 against oligomeric amyloid β toxicity. *Journal of Neuroinflammation* 9:636.
- 135) Li J., Chen K., Zhu L. & Pollard J.W. (2006) Conditional deletion of the colony stimulating factor-1 receptor (c-fms proto-oncogene) in mice. *genesis* 44:328–335.
- 136) Li M., Li Z., Ren H., Jin W.-N., Wood K., Liu Q., *et al.* (2017) Colony stimulating factor 1 receptor inhibition eliminates microglia and attenuates brain injury after intracerebral hemorrhage. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 37:2383–2395.
- 137) Li Y.-Q., Vickers J.C., Bouzier-Sore A.-K., Olopade J.O., Olude M.A., Mustapha O.A., *et al.* (2015) Astrocyte morphology, heterogeneity, and density in the developing African giant rat (*Cricetomys gambianus*).
- 138) Lichtman J.W. & Conchello J.-A. (2005) Fluorescence microscopy. *Nature Methods* 2:910–919.
- 139) Liddelow S.A. & Barres B.A. (2017) Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Infection and immunity* 46.
- 140) Liddelow S.A., Guttenplan K.A., Clarke L.E., Bennett F.C., Bohlen C.J., Schirmer L., *et al.* (2017) Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541:481–487.
- 141) Lin H., Lee E., Hestir K., Leo C., Huang M., Bosch E., *et al.* (2008) Discovery of a Cytokine and Its Receptor by Functional Screening of the Extracellular Proteome. *Science* 320:807–811.
- 142) Liu W., Tang Y. & Feng J. (2011a) Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. *Life Sciences* 89:141–146.

- 143) Liu Z., Qiu Y.-H., Li B., Ma S.-H. & Peng Y.-P. (2011b) Neuroprotection of Interleukin-6 Against NMDA-Induced Apoptosis and Its Signal-Transduction Mechanisms. *Neurotoxicity Research* 19:484–495.
- 144) Lui H., Zhang J., Makinson S.R., Cahill M.K., Kelley K.W., Huang H.-Y., *et al.* (2016) Progranulin Deficiency Promotes Circuit-Specific Synaptic Pruning by Microglia via Complement Activation. *Cell* 165:921–935.
- 145) Ma D., Doi Y., Jin S., Li E., Sonobe Y., Takeuchi H., *et al.* (2012) TGF- β induced by interleukin-34-stimulated microglia regulates microglial proliferation and attenuates oligomeric amyloid β neurotoxicity. *Neuroscience Letters* 529:86–91.
- 146) Marignier R., Giraudon P., Vukusic S., Confavreux C. & Honnorat J. (2010) *Anti-aquaporin-4 antibodies in Devic's neuromyelitis optica: therapeutic implications.*
- 147) Martínez-Muriana A., Mancuso R., Francos-Quijorna I., Olmos-Alonso A., Osta R., Perry V.H., *et al.* (2016) CSF1R blockade slows the progression of amyotrophic lateral sclerosis by reducing microgliosis and invasion of macrophages into peripheral nerves. *Scientific Reports* 6:25663.
- 148) Masuda T. & Prinz M. (2016) Microglia: A Unique Versatile Cell in the Central Nervous System. *ACS Chemical Neuroscience* 7:428–434.
- 149) Mattson M.P. & Meffert M.K. (2006) Roles for NF- κ B in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death and Differentiation* 13:852–860.
- 150) Mcconnell H.L., Kersch C.N., Woltjer R.L., Neuwelt E.A. & Fraser P.E. (2016) The Translational Significance of the Neurovascular Unit. *Journal of Biological Chemistry* 292:762–770.
- 151) Meda L., Cassatella M.A., Szendrei G.I., Otvos L., Baron P., Villalba M., *et al.* (1995) Activation of microglial cells by β -amyloid protein and interferon- γ . *Nature* 374:647–650.
- 152) Merlini G., Seldin D.C. & Gertz M.A. (2011) Amyloidosis: Pathogenesis and New Therapeutic Options. *Journal of Clinical Oncology* 29:1924–1933.
- 153) Merlini M., Davalos D. & Akassoglou K. (2012) In vivo imaging of the neurovascular unit in CNS disease. *Intravital* 1:87–94.
- 154) Mildner A., Schmidt H., Nitsche M., Merkler D., Hanisch U.-K., Mack M., *et al.* (2007) Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nature Neuroscience* 10:1544–1553.
- 155) Milesi S., Boussadia B., Plaud C., Catteau M., Rousset M.-C., De Bock F., *et al.* (2014) Redistribution of PDGFR β cells and NG2DsRed pericytes at the cerebrovasculature after status epilepticus. *Neurobiology of Disease* 71:151–158.
- 156) Misgeld T. & Kerschensteiner M. (2006) In vivo imaging of the diseased nervous system. *Nature Reviews Neuroscience* 7:449–463.
- 157) Mizrahi A., Crowley J.C., Shtoyerman E. & Katz L.C. (2004) High-Resolution In Vivo Imaging of Hippocampal Dendrites and Spines. *Journal of Neuroscience* 24:3147–3151.
- 158) Mizuno T. (2015) Neuron-microglia interactions in neuroinflammation. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 6:225–231.
- 159) Mizuno T., Kawanokuchi J., Numata K. & Suzumura A. (2003) Production and neuroprotective functions of fractalkine in the central nervous system. *Brain research* 979:65–70.
- 160) Morales I., Jiménez J.M., Mancilla M. & Maccioni R.B. (2013) Tau Oligomers and Fibrils Induce Activation of Microglial Cells. *Journal of Alzheimer's Disease* 37:849–856.
- 161) Mostany R. & Portera-Cailliau C. (2008) A Craniotomy Surgery Procedure for Chronic Brain Imaging. *Journal of Visualized Experiments* 12:680.
- 162) Muresan Z., Paul D.L. & Goodenough D.A. (2000) Occludin 1B, a Variant of the Tight

- Junction Protein Occludin. *Molecular Biology of the Cell* 11:627–634.
- 163) Murray C.A. & Lynch M.A. (1998) Evidence that increased hippocampal expression of the cytokine interleukin-1 beta is a common trigger for age- and stress-induced impairments in long-term potentiation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 18:2974–81.
 - 164) Nandi S., Gokhan S., Dai X.-M., Wei S., Enikolopov G., Lin H., *et al.* (2012) The CSF-1 receptor ligands IL-34 and CSF-1 exhibit distinct developmental brain expression patterns and regulate neural progenitor cell maintenance and maturation. *Developmental Biology* 367:100–113.
 - 165) Nicchia G.P., Nico B., Camassa L.M.A., Mola M.G., Loh N., Dermietzel R., *et al.* (2004) The role of aquaporin-4 in the blood–brain barrier development and integrity: Studies in animal and cell culture models. *Neuroscience* 129:935–944.
 - 166) Noailles A., Maneu V., Campello L., Lax P. & Cuenca N. (2018) Systemic inflammation induced by lipopolysaccharide aggravates inherited retinal dystrophy. *Cell Death & Disease* 9:350.
 - 167) Noda M., Doi Y., Liang J., Kawanokuchi J., Sonobe Y., Takeuchi H., *et al.* (2011) Fractalkine Attenuates Excito-neurotoxicity via Microglial Clearance of Damaged Neurons and Antioxidant Enzyme Heme Oxygenase-1 Expression. *Journal of Biological Chemistry* 286:2308–2319.
 - 168) Noh H., Jeon J. & Seo H. (2014) Systemic injection of LPS induces region-specific neuroinflammation and mitochondrial dysfunction in normal mouse brain. *Neurochemistry International* 69:35–40.
 - 169) Oakley H., Cole S.L., Logan S., Maus E., Shao P., Craft J., *et al.* (2006) Intraneuronal beta-Amyloid Aggregates, Neurodegeneration, and Neuron Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer's Disease Mutations: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation. *Journal of Neuroscience* 26:10129–10140.
 - 170) Oheim M., Beaurepaire E., Chaigneau E., Mertz J. & Charpak S. (2001) Two-photon microscopy in brain tissue: parameters influencing the imaging depth. *Journal of Neuroscience Methods* 111:29–37.
 - 171) Olmos-Alonso A., Schettters S.T.T., Sri S., Askew K., Mancuso R., Vargas-Caballero M., *et al.* (2016) Pharmacological targeting of CSF1R inhibits microglial proliferation and prevents the progression of Alzheimer's-like pathology. *Brain* 139:891–907.
 - 172) Olsen I., Miklossy J., Hudson A.P., Tohidpour A., Morgun A. V., Boitsova E.B., *et al.* (2017) Neuroinflammation and Infection: Molecular Mechanisms Associated with Dysfunction of Neurovascular Unit. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* | www.frontiersin.org 1:276.
 - 173) Parajuli B., Sonobe Y., Horiuchi H., Takeuchi H., Mizuno T. & Suzumura A. (2013) Oligomeric amyloid β induces IL-1 β processing via production of ROS: implication in Alzheimer's disease. *Cell death & disease* 4:e975.
 - 174) Parkhurst C.N., Yang G., Ninan I., Savas J.N., Yates J.R., Lafaille J.J., *et al.* (2013) Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Cell* 155:1596–1609.
 - 175) Parry G.C. & Mackman N. (1995) Transcriptional regulation of tissue factor expression in human endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 15:612–21.
 - 176) Patel S. & Player M.R. (2009) Colony-stimulating factor-1 receptor inhibitors for the treatment of cancer and inflammatory disease. *Current topics in medicinal chemistry* 9:599–610.
 - 177) Patterson G.H. & Piston D.W. (2000) Photobleaching in Two-Photon Excitation Microscopy. *Biophysical Journal* 78:2159–2162.
 - 178) Paul D., Cowan A.E., Ge S. & Pachter J.S. (2013) Novel 3D analysis of Claudin-5

- reveals significant endothelial heterogeneity among CNS microvessels. *Microvascular Research* 86:1–10.
- 179) Pawlinski R., Pedersen B., Erlich J. & Mackman N. (2004) Role of tissue factor in haemostasis, thrombosis, angiogenesis and inflammation: lessons from low tissue factor mice. *Thrombosis and Haemostasis* 92:444–50.
 - 180) Perea G., Navarrete M. & Araque A. (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in Neurosciences* 32:421–431.
 - 181) Pétrilli V., Dostert C., Muruve D.A. & Tschopp J. (2007) The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 19:615–622.
 - 182) Piani D., Spranger M., Frei K., Schaffner A. & Fontana A. (1992) Macrophage-induced cytotoxicity of N-methyl-D-aspartate receptor positive neurons involves excitatory amino acids rather than reactive oxygen intermediates and cytokines. *European Journal of Immunology* 22:2429–2436.
 - 183) Potter S.M. (1996) Intravital imaging: two photons are better than one. *Current biology* : CB 6:1595–8.
 - 184) Qian L., Tan K.S., Wei S.-J., Wu H.-M., Xu Z., Wilson B., *et al.* (2007) Microglia-mediated neurotoxicity is inhibited by morphine through an opioid receptor-independent reduction of NADPH oxidase activity. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 179:1198–209.
 - 185) Quintas C., Pinho D., Pereira C., Saraiva L., Gonçalves J. & Queiroz G. (2014) Microglia P2Y6 receptors mediate nitric oxide release and astrocyte apoptosis. *Journal of Neuroinflammation* 11:141.
 - 186) Rash J.E., Davidson K.G.V., Yasumura T. & Furman C.S. (2004) Freeze-fracture and immunogold analysis of aquaporin-4 (AQP4) square arrays, with models of AQP4 lattice assembly. *Neuroscience* 129:915–934.
 - 187) Rice R.A., Pham J., Lee R.J., Najafi A.R., West B.L. & Green K.N. (2017) Microglial repopulation resolves inflammation and promotes brain recovery after injury. *Glia* 65:931–944.
 - 188) Rice R.A., Spangenberg E.E., Yamate-Morgan H., Lee R.J., Arora R.P.S., Hernandez M.X., *et al.* (2015) Elimination of Microglia Improves Functional Outcomes Following Extensive Neuronal Loss in the Hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35:9977–89.
 - 189) Rosell A., Ortega-Aznar A., Alvarez-Sabin J., Fernandez-Cadenas I., Ribo M., Molina C.A., *et al.* (2006) Increased Brain Expression of Matrix Metalloproteinase-9 After Ischemic and Hemorrhagic Human Stroke. *Stroke* 37:1399–1406.
 - 190) Saadoun S., Papadopoulos M.C., Watanabe H., Yan D., Manley G.T. & Verkman A.S. (2005) Involvement of aquaporin-4 in astroglial cell migration and glial scar formation. *Journal of Cell Science* 118:5691–5698.
 - 191) Sagare A.P., Bell R.D., Zhao Z., Ma Q., Winkler E.A., Ramanathan A., *et al.* (2013) Pericyte loss influences Alzheimer-like neurodegeneration in mice. *Nature Communications* 4:2932.
 - 192) Sakakibara A., Furuse M., Saitou M., Ando-Akatsuka Y. & Tsukita S. (1997) Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *The Journal of cell biology* 137:1393–401.
 - 193) Salter M.W. & Stevens B. (2017) Microglia emerge as central players in brain disease. *Nature Medicine* 23:1018–1027.
 - 194) Salvi V., Sozio F., Sozzani S., Del Prete A., Ferrer I. & Thelen M. (2017) Role of Atypical Chemokine Receptors in Microglial Activation and Polarization. *Frontiers in Aging Neuroscience* 9:148.
 - 195) Sanderson M.J., Smith I., Parker I. & Bootman M.D. (2014) Fluorescence microscopy.

- Cold Spring Harbor protocols 2014:pdb.top071795.
- 196) Schneeberger E.E. & Lynch R.D. (2004) The tight junction: a multifunctional complex. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 286:C1213–C1228.
 - 197) Schnell G., Joseph S., Spudich S., Price R.W. & Swanstrom R. (2011) HIV-1 Replication in the Central Nervous System Occurs in Two Distinct Cell Types. *PLoS Pathogens* 7:e1002286.
 - 198) Sekar A., Bialas A.R., de Rivera H., Davis A., Hammond T.R., Kamitaki N., *et al.* (2016) Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature* 530:177–183.
 - 199) Sharma N. & Nehru B. (2015) Characterization of the lipopolysaccharide induced model of Parkinson's disease: Role of oxidative stress and neuroinflammation. *Neurochemistry International* 87:92–105.
 - 200) Sheridan G.K. & Murphy K.J. (2013) Neuron-glia crosstalk in health and disease: fractalkine and CX3CR1 take centre stage. *Open biology* 3:130181.
 - 201) Shi Z., Zhang W., Lu Y., Lu Y., Xu L., Fang Q., *et al.* (2017) Aquaporin 4-Mediated Glutamate-Induced Astrocyte Swelling Is Partially Mediated through Metabotropic Glutamate Receptor 5 Activation. *Frontiers in cellular neuroscience* 11:116.
 - 202) Sierra A., de Castro F., del Río-Hortega J., Rafael Iglesias-Rozas J., Garrosa M. & Kettenmann H. (2016) The “Big-Bang” for modern glial biology: Translation and comments on Pío del Río-Hortega 1919 series of papers on microglia. *Glia* 64:1801–1840.
 - 203) Sofroniew M. V. & Vinters H. V. (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica* 119:7–35.
 - 204) Soliman M.L., Puig K.L., Combs C.K. & Rosenberger T.A. (2012) Acetate reduces microglia inflammatory signaling in vitro. *Journal of Neurochemistry* 123:555–567.
 - 205) Song L., Ge S. & Pachter J.S. (2007) Caveolin-1 regulates expression of junction-associated proteins in brain microvascular endothelial cells. *Blood* 109:1515–1523.
 - 206) Soriano S.G., Amaravadi L.S., Wang Y.F., Zhou H., Yu G.X., Tonra J.R., *et al.* (2002) Mice deficient in fractalkine are less susceptible to cerebral ischemia-reperfusion injury. *Journal of neuroimmunology* 125:59–65.
 - 207) Sosna J., Philipp S., Albay R., Reyes-Ruiz J.M., Baglietto-Vargas D., LaFerla F.M., *et al.* (2018) Early long-term administration of the CSF1R inhibitor PLX3397 ablates microglia and reduces accumulation of intraneuronal amyloid, neuritic plaque deposition and pre-fibrillar oligomers in 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration* 13:11.
 - 208) Spangenberg E.E., Lee R.J., Najafi A.R., Rice R.A., Elmore M.R.P., Blurton-Jones M., *et al.* (2016) Eliminating microglia in Alzheimer's mice prevents neuronal loss without modulating amyloid- β pathology. *Brain* 139:1265–1281.
 - 209) Spence R.D., Hamby M.E., Umeda E., Itoh N., Du S., Wisdom A.J., *et al.* (2011) Neuroprotection mediated through estrogen receptor-alpha in astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:8867–72.
 - 210) Stamatovic S.M., Keep R.F. & Andjelkovic A. V (2008) *Brain Endothelial Cell-Cell Junctions: How to “Open” the Blood Brain Barrier.*
 - 211) Stanimirovic D.B. & Friedman A. (2012) Pathophysiology of the Neurovascular Unit: Disease Cause or Consequence? *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 32:1207–1221.
 - 212) Stevens B., Allen N.J., Vazquez L.E., Howell G.R., Christopherson K.S., Nouri N., *et al.* (2007) The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination. *Cell* 131:1164–1178.
 - 213) Sumi N., Nishioku T., Takata F., Matsumoto J., Watanabe T., Shuto H., *et al.* (2010)

- Lipopolysaccharide-Activated Microglia Induce Dysfunction of the Blood–Brain Barrier in Rat Microvascular Endothelial Cells Co-Cultured with Microglia. *Cellular and Molecular Neurobiology* 30:247–253.
- 214) Svoboda K. & Block S.M. (1994) Biological Applications of Optical Forces. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 23:247–285.
 - 215) Svoboda K. & Yasuda R. (2006) Principles of Two-Photon Excitation Microscopy and Its Applications to Neuroscience. *Neuron* 50:823–839.
 - 216) Sweeney M.D., Ayyadurai S. & Zlokovic B. V (2016a) Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways. *Nature Neuroscience* 19:771–783.
 - 217) Sweeney M.D., Ayyadurai S. & Zlokovic B. V (2016b) Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways. *Nature Neuroscience* 19:771–783.
 - 218) Sy M., Kitazawa M., Medeiros R., Whitman L., Cheng D., Lane T.E., *et al.* (2011) Inflammation Induced by Infection Potentiates Tau Pathological Features in Transgenic Mice. *The American Journal of Pathology* 178:2811–2822.
 - 219) Szalay G., Martinecz B., Lénárt N., Környei Z., Orsolits B., Judák L., *et al.* (2016a) Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke. *Nature Communications* 7:11499.
 - 220) Szalay G., Martinecz B., Lénárt N., Környei Z., Orsolits B., Judák L., *et al.* (2016b) Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke. *Nature Communications* 7:11499.
 - 221) Takano T., Han X., Deane R., Zlokovic B. & Nedergaard M. (2007) Two-Photon Imaging of Astrocytic Ca²⁺ Signaling and the Microvasculature in Experimental Mice Models of Alzheimer’s Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1097:40–50.
 - 222) Takata K., Kitamura Y., Tsuchiya D., Kawasaki T., Taniguchi T. & Shimohama S. (2004) High mobility group box protein-1 inhibits microglial Abeta clearance and enhances Abeta neurotoxicity. *Journal of Neuroscience Research* 78:880–891.
 - 223) Tang Y. & Le W. (2016) Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology* 53:1181–1194.
 - 224) Tang Z., Gan Y., Liu Q., Yin J.-X., Liu Q., Shi J., *et al.* (2014) CX3CR1 deficiency suppresses activation and neurotoxicity of microglia/macrophage in experimental ischemic stroke. *Journal of Neuroinflammation* 11:26.
 - 225) Tansey M.G., McCoy M.K. & Frank-Cannon T.C. (2007) Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson’s disease: Potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Experimental Neurology* 208:1–25.
 - 226) Taylor J.P., Hardy J. & Fischbeck K.H. (2002) Toxic Proteins in Neurodegenerative Disease. *Science* 296:1991–1995.
 - 227) Theer P., Hasan M.T. & Denk W. (2003) Two-photon imaging to a depth of 1000 μm in living brains by use of a TiAl₂O₃ regenerative amplifier. *Optics Letters* 28:1022.
 - 228) Thomsen M.S., Routhe L.J. & Moos T. (2017) The vascular basement membrane in the healthy and pathological brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 37:3300–3317.
 - 229) Tietz S. & Engelhardt B. (2015) Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. *The Journal of cell biology* 209:493–506.
 - 230) Torres L., Danver J., Ji K., Miyauchi J.T., Chen D., Anderson M.E., *et al.* (2016) Dynamic microglial modulation of spatial learning and social behavior. *Brain, Behavior, and Immunity* 55:6–16.
 - 231) Tourdias T., Dragonu I., Fushimi Y., Deloire M.S.A., Boiziau C., Brochet B., *et al.* (2009) Aquaporin 4 correlates with apparent diffusion coefficient and hydrocephalus severity in the rat brain: A combined MRI–histological study. *NeuroImage* 47:659–666.

- 232) Tourdias T., Mori N., Dragonu I., Cassagno N., Boiziau C., Aussudre J., *et al.* (2011) Differential aquaporin 4 expression during edema build-up and resolution phases of brain inflammation. *Journal of Neuroinflammation* 8:143.
- 233) Tremblay M.-E., Stevens B., Sierra A., Wake H., Bessis A. & Nimmerjahn A. (2011) The Role of Microglia in the Healthy Brain. *Journal of Neuroscience* 31:16064–16069.
- 234) Uzawa A., Mori M., Iwai Y., Kobayashi M., Hayakawa S., Kawaguchi N., *et al.* (2009) Association of anti-aquaporin-4 antibody-positive neuromyelitis optica with myasthenia gravis. *Journal of the Neurological Sciences* 287:105–107.
- 235) Vardy E.R.L.C., Catto A.J. & Hooper N.M. (2005) Proteolytic mechanisms in amyloid- β metabolism: therapeutic implications for Alzheimer's disease. *Trends in Molecular Medicine* 11:464–472.
- 236) Varvel N.H., Grathwohl S.A., Baumann F., Liebig C., Bosch A., Brawek B., *et al.* (2012) Microglial repopulation model reveals a robust homeostatic process for replacing CNS myeloid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:18150–18155.
- 237) Vasek M.J., Garber C., Dorsey D., Durrant D.M., Bollman B., Soung A., *et al.* (2016) A complement–microglial axis drives synapse loss during virus-induced memory impairment. *Nature* 534:538–543.
- 238) Vereker E., O'Donnell E. & Lynch M.A. (2000) The inhibitory effect of interleukin-1 β on long-term potentiation is coupled with increased activity of stress-activated protein kinases. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:6811–9.
- 239) Voskuhl R.R., Peterson R.S., Song B., Ao Y., Morales L.B.J., Tiwari-Woodruff S., *et al.* (2009) Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:11511–22.
- 240) Waisman A., Ginhoux F., Greter M. & Bruttger J. (2015) Homeostasis of Microglia in the Adult Brain: Review of Novel Microglia Depletion Systems. *Trends in Immunology* 36:625–636.
- 241) Wang Y., Cella M., Mallinson K., Ulrich J.D., Young K.L., Robinette M.L., *et al.* (2015) TREM2 Lipid Sensing Sustains the Microglial Response in an Alzheimer's Disease Model. *Cell* 160:1061–1071.
- 242) Wang Y., Ulland T.K., Ulrich J.D., Song W., Tzaferis J.A., Hole J.T., *et al.* (2016) TREM2-mediated early microglial response limits diffusion and toxicity of amyloid plaques. *The Journal of Experimental Medicine* 213:667–675.
- 243) Wieghofer P., Knobloch K.-P. & Prinz M. (2015) Genetic targeting of microglia. *Glia* 63:1–22.
- 244) Wieghofer P. & Prinz M. (2016) Genetic manipulation of microglia during brain development and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1862:299–309.
- 245) Wiesinger A., Peters W., Chappell D., Kentrup D., Reuter S., Pavenstädt H., *et al.* (2013) Nanomechanics of the Endothelial Glycocalyx in Experimental Sepsis. *PLoS ONE* 8:e80905.
- 246) Williams P.A., Tribble J.R., Pepper K.W., Cross S.D., Morgan B.P., Morgan J.E., *et al.* (2016) Inhibition of the classical pathway of the complement cascade prevents early dendritic and synaptic degeneration in glaucoma. *Molecular neurodegeneration* 11:26.
- 247) Wilson E.H. & Hunter C.A. (2004) The role of astrocytes in the immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis. *International Journal for Parasitology* 34:543–548.
- 248) Wittchen E.S., Haskins J. & Stevenson B.R. (2003) NZO-3 expression causes global changes to actin cytoskeleton in Madin-Darby canine kidney cells: linking a tight

- junction protein to Rho GTPases. *Molecular biology of the cell* 14:1757–68.
- 249) Wolburg H., Wolburg-Buchholz K., Kraus J., Rascher-Eggstein G., Liebner S., Hamm S., *et al.* (2003) Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta neuropathologica* 105:586–92.
 - 250) Wong V. & Gumbiner B.M. (1997) A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier. *The Journal of cell biology* 136:399–409.
 - 251) Wu, M.D K.K. & Thiagarajan, M.D P. (1996) ROLE OF ENDOTHELIUM IN THROMBOSIS AND HEMOSTASIS. *Annual Review of Medicine* 47:315–331.
 - 252) Wyss-Coray T. & Mucke L. (2002) Inflammation in Neurodegenerative Disease—A Double-Edged Sword. *Neuron* 35:419–432.
 - 253) Yamasaki T.R., Blurton-Jones M., Morrisette D.A., Kitazawa M., Oddo S. & LaFerla F.M. (2007) Neural Stem Cells Improve Memory in an Inducible Mouse Model of Neuronal Loss. *Journal of Neuroscience* 27:11925–11933.
 - 254) Yan P., Hu X., Song H., Yin K., Bateman R.J., Cirrito J.R., *et al.* (2006) Matrix Metalloproteinase-9 Degrades Amyloid- β Fibrils in Vitro and Compact Plaques in Situ. *Journal of Biological Chemistry* 281:24566–24574.
 - 255) Yang I. V., Alper S., Lackford B., Rutledge H., Warg L.A., Burch L.H., *et al.* (2011) Novel Regulators of the Systemic Response to Lipopolysaccharide. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 45:393–402.
 - 256) Yao Y., Echeverry S., Shi X.Q., Yang M., Yang Q.Z., Wang G.Y.F., *et al.* (2016) Dynamics of spinal microglia repopulation following an acute depletion. *Scientific Reports* 6:22839.
 - 257) Yaroslavsky A.N., Schulze P.C., Yaroslavsky I. V, Schober R., Ulrich F. & Schwarzmaier H.-J. (2002) Optical properties of selected native and coagulated human brain tissues in vitro in the visible and near infrared spectral range. *Physics in Medicine and Biology* 47:305.
 - 258) Yoder E.J. (2002) In vivo microscopy of the mouse brain using multiphoton laser scanning techniques. In: *Proceedings of SPIE--the International Society for Optical Engineering*. (Eds A. Periasamy & P.T.C. So), pp. 14–29.
 - 259) You L.-H., Yan C.-Z., Zheng B.-J., Ci Y.-Z., Chang S.-Y., Yu P., *et al.* (2017a) Astrocyte hepcidin is a key factor in LPS-induced neuronal apoptosis. *Cell death & disease* 8:e2676.
 - 260) You L.-H., Yan C.-Z., Zheng B.-J., Ci Y.-Z., Chang S.-Y., Yu P., *et al.* (2017b) Astrocyte hepcidin is a key factor in LPS-induced neuronal apoptosis. *Nature Publishing Group* 8.
 - 261) Yu J., Yool A.J., Schulten K. & Tajkhorshid E. (2006) Mechanism of Gating and Ion Conductivity of a Possible Tetrameric Pore in Aquaporin-1. *Structure* 14:1411–1423.
 - 262) Zanon I., Ostuni R., Marek L.R., Barresi S., Barbalat R., Barton G.M., *et al.* (2011) CD14 Controls the LPS-Induced Endocytosis of Toll-like Receptor 4. *Cell* 147:868–880.
 - 263) Zenaro E., Piacentino G. & Constantin G. (2017) The blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Neurobiology of disease* 107:41–56.
 - 264) Zeng H., He X., Tuo Q., Liao D., Zhang G. & Chen J. (2016) LPS causes pericyte loss and microvascular dysfunction via disruption of Sirt3/angiopoietins/Tie-2 and HIF-2 α /Notch3 pathways. *Scientific Reports* 6:20931.
 - 265) Zlokovic B. V (2010) Neurodegeneration and the neurovascular unit. *Nature Medicine* 16:1370–1371.
 - 266) Γιαγκλήση Ιωάννα (2016) *Μελέτη της επίδρασης της LPS-Επαγώμενης νευροφλεγμονής στην λειτουργία της Νευροαγγειακής Μονάδας με την χρήση της*

μικροσκοπίας 2 φωτονίων σε εγκέφαλο διαγονιδιακών μυών.