

**Α' ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΑΘΗΝΩΝ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟ ΓΝΑ

Διευθυντής: κ. Γ. Ζωγράφος

ΨΥΧΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΑΙΓΙΝΗΤΕΙΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ

Διευθυντής: κ. Γ. Παπαδημητρίου

***Διερεύνηση της επίδρασης των κυττάρων του
Κεντρικού Νευρικού Συστήματος επί
καλλιιεργειών λεμφοκυττάρων υπό συνθήκες
έλλειψης μονοαμινών***

Διδακτορική Διατριβή

της

Αναστασίας Αποστόλου του Ευαγγέλου

Ψυχιάτρου

ΑΘΗΝΑ 2013

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΑΘΗΝΩΝ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΣ ΣΤΕΦΑΝΑΔΗΣ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Καθηγητής Ψυχιατρικής **Γεώργιος Παπαδημητρίου**
Αναπληρωτής Καθηγητής **Μανούσος Κωνσταντουλάκης**
Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας **Κωνσταντίνος Κυλιντηρέας**

Επιβλέπων Διατριβής: **Μανούσος Κωνσταντουλάκης**

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Καθηγητής **Γεώργιος Παπαδημητρίου**
Καθηγητής **Γεώργιος Ζωγράφος**
Αναπληρωτής Καθηγητής **Μανούσος Κωνσταντουλάκης**
Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας **Κωνσταντίνος Κυλιντηρέας**
Επίκουρη Καθηγήτρια **Κορνηλία Πουλοπούλου**
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια **Μαρία Λυμπέρη**
Καθηγητής **Ευστάθιος Μποβιάτσης**

Ημερομηνία Κατάθεσης Αίτησης: 15/2/2000

Ημερομηνία Ορισμού Συμβουλευτικής Τριμελούς Επιτροπής: 31/1/2001

Καθορισμός Θέματος από Τριμελή Επιτροπή: 29/8/2001 – Αρ. Πρωτ. 7985

Ημερομηνία κατάθεσης Διδακτορικής Διατριβής: 11/1/2013

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ
ΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΟΥΜΕΝΟΣ , ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ
ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ. ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ
ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ
ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΑΥΤΟΥ ΑΔΕΛΦΕΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ
ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΣ.
ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ
ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ ΚΙΑ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ
ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΩΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΩ ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ. ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ
ΧΡΗΖΟΜΑΙ ΕΠ'ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ
ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ ΕΙΡΞΕΙΝ.ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕ
ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝ ΔΕ ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ.
ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ
ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΩΝΤΑΣ , ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΔΡΑΣΙΝ ΠΡΗΞΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ
ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ, ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ
ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ
ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΕΙΩΝ , ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ'ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ Η ΙΔΩ Η
ΑΚΟΥΣΩ , Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ , Α ΜΗ ΧΡΗΠΙΟΤΕ ΕΓΚΑΛΕΣΘΑΙ
ΕΞΩ , ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ
ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ,
ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ, ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ
ΕΠΙΟΡΚΕΟΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

*Turning and turning in the widening gyre
The falcon cannot hear the falconer
Things fall apart; the centre cannot hold;
Mere anarchy is loosed upon the world,
The blood-dimmed tide is loosed, and everywhere
The ceremony of innocence is drowned;
The best lack all conviction, while the worst
Are full of passionate intensity.*

*Surely some revelation is at hand;
Surely the Second Coming is at hand.
The Second Coming! Hardly are those words out
When a vast image out of Spiritus Mundi
Troubles my sight; somewhere in the sands of the desert
A shape with a lion body and the head of a man,
A gaze blank and pitiless like the sun
Is moving its slow thighs, while all about it
Reel shadows of the indignant desert birds.
The darkness drops again; but now I know
That twenty centuries of stony sleep
Were vexed to nightmare by a rocking cradle,
And what rough beast, its hour come round at last,
Slouches towards Bethlehem to be born?*

*“Slouching Towards Bethlehem”
W.B. Yeats*

Στη μνήμη του πατέρα μου

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

	Σελ.
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	1
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
I. Το Νευρικό Σύστημα.....	3
1. Οργάνωση Νευρικού Συστήματος	3
2. Αγγείωση ΚΝΣ και αιματοεγκεφαλικός φραγμός	3
3. Κυτταρικοί πληθυσμοί του ΚΝΣ.....	4
4. Η σύναψη και άλλοι τύποι κυτταρικής επικοινωνίας στο ΚΝΣ.....	9
5. Καλλιέργειες νευρικών κυττάρων.....	12
II. Το Ανοσολογικό Σύστημα	
1. Γενικά - Φυσική και επίκτητη ανοσία.....	13
2. Ιδιότητες και ενεργοποίηση T και B λεμφοκυττάρων.....	14
3. Η ανοσολογική απόκριση.....	18
4. Μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας.....	18
5. Κυτοκίνες.....	19
III. ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΑΙ ΝΕΚΡΩΣΗ.....	20
1. Γενικά.....	20
2. Πρωτεΐνη 14-3-3.....	21
IV. ΣΧΕΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ.....	22
V. ΨΥΧΟΝΕΥΡΟΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ.....	26
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	32
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 1 - ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ	
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	34
1. Υλικά.....	34
2. Καλλιέργειες κυττάρων από ανθρώπινους ιστούς.....	34
2.1 Καλλιέργειες κυττάρων του ΚΝΣ.....	34
2.1.1 Λήψη δειγμάτων ΚΝΣ.....	34
2.1.2 Πρωτογενείς καλλιέργειες νευρικών κυττάρων.....	35
2.1.3 Μορφολογικές και κυτταροσκελετικές μελέτες των νευρικών κυττάρων με χρώση ανοσοφθορισμού.....	36

2.1.4 Μελέτες έκφρασης του mRNA της N-cadherin.....	37
2.1.5 Προσδιορισμός ποσοστού νευρώνων και αστροκυττάρων με κυτταρομετρία ροής...	38
2.1.6 Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής της βιωσιμότητας, απόπτωσης και νέκρωσης στις καλλιέργειες νευρώνων και αστροκυττάρων.....	39
2.2 Καλλιέργειες κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος.....	39
2.2.1 Λήψη δειγμάτων αίματος.....	39
2.2.2 Πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος.....	40
2.2.3 Κυτταρομετρία ροής των κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος.....	40
3. Πρωτογενείς συγκαλλιέργειες ανθρώπινων νευρικών και αυτόλογων ανοσοκυττάρων....	41
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
1. Καλλιέργειες κυττάρων του ΚΝΣ.....	42
1.1 Κυτταρική μορφολογία.....	42
1.2 Μορφολογικές και κυτταροσκελετικές μελέτες των νευρικών κυττάρων με χρώση ανοσοφθορισμού.....	44
1.3 Προσδιορισμός ποσοστού νευρώνων και αστροκυττάρων με κυτταρομετρία ροής.....	46
1.4 Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής της βιωσιμότητας, απόπτωσης και νέκρωσης στις καλλιέργειες νευρώνων και αστροκυττάρων.....	47
1.5 Μελέτες έκφρασης του mRNA της N-cadherin.....	47
2. Καλλιέργειες κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος.....	48
3. Συγκαλλιέργειες νευρικών και αυτόλογων ανοσοκυττάρων.....	49
3.1 Κυτταρική μορφολογία.....	49
3.2. Επιβίωση νευρώνων στις συγκαλλιέργειες.....	50
3.3. Επιδράσεις της συγκαλλιέργειας στα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα.....	51
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ II - ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΑΠΟ ΙΣΤΟΥΣ ΕΠΙΜΥΩΝ.....	
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	57
1. Υλικά.....	57
2. Πειραματόζωα.....	58
3. Λήψη και καλλιέργεια κυττάρων του ΚΝΣ.....	58
4. Λήψη και καλλιέργεια ανοσοκυττάρων.....	59
5. Μελέτη των πληθυσμών των νευρώνων και των αστροκυττάρων και λεμφοκυττάρων με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής.....	59

6. Μελέτη της βιωσιμότητας των νευρικών κυτταρικών πληθυσμών και μελέτη των πρωτεϊνών pERK και p14-3-3.....	60
7. Συγκαλλιέργεια νευρικών κυττάρων και ανοσοκυττάρων και προσθήκη ρεζερπίνης.....	61
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
1. Επίδραση ρεζερπίνης στην απόπτωση και νέκρωση των καλλιιεργειών νευρώνων και αστροκυττάρων.....	62
2. Καλλιέργειες λεμφοκυττάρων.....	66
3. Αποτελέσματα συγκαλλιιεργειών.....	67
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	69
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	71
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	79
ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ	80
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	81

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η κατάθλιψη αποτελεί ένα μείζων ιατρικό πρόβλημα με κοινωνικοοικονομικές επιπτώσεις στα συστήματα υγείας παγκοσμίως. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για τα φαινόμενα σε κυτταρικό επίπεδο, καθώς και για τις αλληλεπιδράσεις του νευρικού με το ανοσολογικό σύστημα στην κατάθλιψη. Η χρήση κυτταρικών μοντέλων που αναπαριστούν αυτές τις επικοινωνίες είναι σημαντική στη διερεύνησή τους. Στα πλαίσια αυτά η παρούσα διδακτορική διατριβή ασχολείται με τη δημιουργία ενός κυτταρικού συστήματος στο οποίο μελετούνται αυτές οι αλληλεπιδράσεις.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χειρουργικής Έρευνας της Α' Προπαιδευτικής Χειρουργικής Κλινικής του Τμήματος Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών σε συνεργασία με την Ψυχιατρική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών. Ο Καθηγητής Ψυχιατρικής κ. Γεώργιος Χριστοδούλου πίστεψε σε αυτή τη συνεργασία η οποία συνεχίστηκε και ευοδώθηκε κατά το διάστημα που τη διεύθυνση της Κλινικής είχε ο κ. Γεώργιος Παπαδημητρίου, ο οποίος με ενθάρρυνε και ως μέλος της τριμελούς επιτροπής μου. Οφείλω ευχαριστίες και στους δύο.

Η σχέση μου με το Εργαστήριο Χειρουργικής Έρευνας στο Ιπποκράτειο από την αρχή της σύστασής του το 1996 ήταν μακροχρόνια και καθοριστική για μένα. Ο Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής κ. Μανούσος Κωνσταντουλάκης υπήρξε ο εμπνευστής αυτής της διατριβής. Μου μετέδωσε ενθουσιασμό για την έρευνα, μου έδειξε εμπιστοσύνη, με ενθάρρυνε και με οδήγησε διαμέσου των σκοπέλων και υφάλων αυτού του ταξιδιού. Το προσωπικό του Εργαστηρίου Χειρουργικής Έρευνας με στήριξε και με βοήθησε όλα αυτά τα χρόνια. Η βιολόγος κ. Αναστασία Δερβεντζή υποστήριξε την προσπάθεια και συνεισέφερε με την επιστημονική αρτιότητά της, ενώ η βοήθεια της βιολόγου κ. Μαριλένας Νικολοπούλου, η συνέπεια και η επιμέλειά της ήταν για μένα προσωπική τύχη. Η βιολόγος κ. Αγάπη Κατάκη με την αδιάλειπτη και θερμή συμπαράστασή της και την υποστήριξή της όλα αυτά τα χρόνια με δίδαξε τον πολύ ανθρώπινο επαγγελματισμό της. Γι' αυτό της οφείλω ευγνωμοσύνη.

Τίποτα όμως δεν θα είχε γίνει χωρίς την αμέριστη συμπαράσταση των γονιών μου Βαγγέλη και Αλκμήνης καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της προσπάθειας. Η πνευματική και πρακτική βοήθειά τους ήταν ουσιώδης για μένα. Μου δίδαξαν με το παράδειγμά τους της σκληρής δουλειάς, της αφοσίωσης, της ταπεινότητας, της καθαρότητας του βλέμματος αλλά και της αγάπης τους που συνεχίζει να φωτίζει το δρόμο μου.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΤΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

1. Οργάνωση Νευρικού Συστήματος

Το νευρικό σύστημα διακρίνεται σε κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα. Στον εγκέφαλο (ΚΝΣ) γίνεται η διαπλοκή, συσχέτιση και ολοκλήρωση των νευρικών πληροφοριών. Το περιφερικό νευρικό σύστημα (ΠΝΣ) αποτελείται από τα κρανιακά και τα νωτιαία νεύρα που νευρώνουν κινήσεις που εξαρτώνται από τη βούληση και μεταφέρουν αισθητικές νευρικές ώσεις από την περιφέρεια προς το κέντρο. Η νεύρωση των οργάνων των οποίων η λειτουργία δεν εξαρτάται από την βούληση ρυθμίζεται από το αυτόνομο νευρικό σύστημα. Ο εγκέφαλος αποτελείται από τον τελικό, διάμεσο, μέσο, οπίσθιο και έσχατο εγκέφαλο και περιβάλλεται από τις μήνιγγες οι οποίες από έξω προς τα μέσα είναι η σκληρή, η αραχνοειδής και η χοριοειδής. Ο χώρος μεταξύ της αραχνοειδούς και της χοριοειδούς μήνιγγας διατρέχεται από δοκίδες και διαφραγμάτια, σχηματίζοντας το υπαραχνοειδή χώρο που περιέχει εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ) (Zigmond και συν. 1999).

2. Αγγείωση ΚΝΣ και αιματοεγκεφαλικός φραγμός

Τα αιμοφόρα αγγεία σχηματίζουν ένα πλούσιο δίκτυο στο ΚΝΣ (Duvernoy και συν. 1981). Κατά την είσοδό τους περιβάλλονται συνήθως από ένα σχισμοειδή χώρο, το χώρο του Virchow-Robin. Ο εγκεφαλικός ιστός χωρίζεται από το υπόλοιπο σώμα με τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (ΑΕΦ), ο οποίος ρυθμίζει την είσοδο ουσιών από το αίμα στον εγκεφαλικό ιστό, διατηρώντας σταθερό το μικροπεριβάλλον των νευρώνων. Η διαπερατότητά του είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους των μορίων και σχετίζεται με τη διαλυτότητά τους στα λιπίδια. Αποτελείται από ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών αγγείων, αποφυάδες των αστροκυττάρων και περικύτταρα. Ο ΑΕΦ δεν υπάρχει σε ορισμένες περιοχές (κωνάριο, οπίσθιος λοβός της υπόφυσης, φαιό φύμα κ.α.). Οι τοπικοί νευρώνες εκκρίνουν ορμόνες και άλλους παράγοντες που απαιτούν ταχεία και άμεση πρόσβαση στη συστηματική κυκλοφορία (Bradbury 1979). Εκεί το αγγειακό ενδοθήλιο περιέχει θυρίδες διαμέσου των οποίων οι πρωτεΐνες και τα μικρά οργανικά μόρια μπορούν να περάσουν από το αίμα στο νευρικό ιστό ανάλογα με τις τοπικές μεταβολικές απαιτήσεις.

3. Κυτταρικοί πληθυσμοί του ΚΝΣ

i. *Οι νευρώνες*

Ο νευρικός ιστός αποτελείται από τους νευρώνες και από τα νευρογλοιακά κύτταρα. Οι **νευρώνες**, τα διεγέρσιμα κύτταρα του ΚΝΣ είναι η βασική ανατομική, γενετική, τροφική και λειτουργική μονάδα του νευρικού συστήματος (Peters και συν. 1991). Αποτελούνται από το κυτταρικό σώμα ή περικάρυο που περιέχει τον πυρήνα και τα κυτταροπλασματικά οργανίδια, από μία επιμήκη αποφυάδα, τον νευράξονα, άξονα ή νευρίτη και από τους δενδρίτες. Οι δενδρίτες είναι πολυάριθμες και πολυκλαδείς βραχείες αποφυάδες και μεταφέρουν τη διέγερση-πληροφορία προς το κυτταρικό σώμα, ενώ ο άξονας απάγει τις ώσεις από το σώμα σε άλλα κύτταρα μέσω των νευρικών συνάψεων. Στους δενδρίτες και στο περικάρυο καταλήγουν αποφυάδες από έναν ή περισσότερους νευρώνες (Lasek και Brady 1982) . Οι περισσότεροι άξονες αποκτούν μυελώδες έλυτρο μυελίνης η οποία στο ΚΝΣ παράγεται από τα ολιγοδενδροκύτταρα. Κατά τη διαδρομή του ο άξονας χορηγεί παράπλευρους κλάδους και τελικά αποσχίζεται στα τελικά δενδρύλλια. Στα τελικά κομβία γίνεται η μεταβίβαση του ερεθίσματος σε άλλα κύτταρα με το σχηματισμό συνάψεων (Snell 1992, Kahle και συν. 1993).

Το περικάρυο αποτελείται από κυτταρόπλασμα και περικλείει τον πυρήνα με ένα μεγάλο πυρήνιο που περιέχει πρωτεΐνες και ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA). Ο πυρήνας περιβάλλεται από διπλή μεμβράνη με πόρους και περιέχει καρυόπλασμα με λεπτά κοκκία χρωματίνης (DNA). Το κυτταρόπλασμα είναι πλούσιο σε κοκκώδες και άκοκκο ενδοπλασματικό δίκτυο, την ουσία του Nissl, που είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση του μεγαλύτερου ποσοστού πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες που παράγονται από την ουσία του Nissl μεταφέρονται στο σύστημα Golgi και προωθούνται στο εξωτερικό του κυττάρου με εξωκύτωση. Με παρόμοιο τρόπο μεταφέρονται πρωτεΐνες κατά μήκος του άξονα (Pelham 1995). Το σύστημα Golgi συμμετέχει στην παραγωγή νευροπεπτιδίων και λυσοσωμάτων και συντελεί στην παραγωγή μεμβρανών και το σχηματισμό των συναπτικών κυστιδίων στα τελικά κομβία. Στα λυσοσώματα γίνεται η τελική διάσπαση λιπιδίων και πρωτεϊνών. Τα κεντροσώματα συμμετέχουν στη διατήρηση των μικροσωληνίσκων (de Duve 1983).

Ο κυτταροσκελετός είναι μία σύμπλοκη κατασκευή κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών (μικροσωληνίσκοι μικροϊνίδια και ενδιάμεσα ινίδια). Τα στοιχεία του αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με άλλες κυτταρικές δομές, καθορίζοντας την κυτταρική μορφολογία (Hyams και Loyd 1994). Βρίσκονται διάσπαρτα μεταξύ των μικροϊνιδίων και διατάσσονται κατά μήκος του άξονα σε επιμήκεις παράλληλες δέσμες. Τα τοιχώματα σχηματίζονται από τη γραμμική

κατανομή σφαιρικών υπομονάδων, των ετεροδιμερών α- και β- τουμπουλίνης. Στην επιφάνειά τους προσδένονται οι πρωτεΐνες MAP (microtubule associated proteins). Η ανίχνευσή τους διευκολύνει τον καθορισμό συγκεκριμένων νευρωνικών δομών. Για παράδειγμα η MAP2 φαίνεται να περιορίζεται στις δενδριτικές περιοχές του νευρώνα, ενώ οι Tau πρωτεΐνες βρίσκονται στον άξονα (Zigmond και συν. 1999). Τα μικροϊνίδια ακτίνη και μυοσίνη βρίσκονται σε αφθονία στο νευρικό ιστό.

Ανάλογα με τον αριθμό των αποφυάδων οι νευρώνες διακρίνονται σε μονόπολους, δίπολους και πολύπολους (Snell 1992). Οι πυραμιδικοί νευρώνες του φλοιού είναι διεγερτικοί και από αυτούς προέρχεται το σύνολο των εξερχόμενων ώσεων του φλοιού. Το κυτταρικό σώμα και οι δενδριτικοί κλάδοι μπορεί να περιορίζονται σε λίγες στιβάδες ή να καταλαμβάνουν όλο το πάχος του φλοιού και το γλουταμικό οξύ είναι συχνά νευροδιαβιβαστής τους (Jones 1984, Feldman 1984, Hof και συν. 1995). Η θέση, η μορφολογία, και ο νευροχημικός φαινότυπος είναι χαρακτηριστικά σύμφωνα με τα οποία οι νευρώνες κατανέμονται σε υποτύπους.

Τα αστεροειδή κύτταρα είναι ενδιάμεσοι νευρώνες που μεταφέρουν διεγερτικά ερεθίσματα στους πυραμιδικούς νευρώνες (Peters και Jones 1984). Η δραστηριότητα των πυραμιδικών κυττάρων ρυθμίζεται από ανασταλτικούς νευρώνες όπως τα καλαθοειδή κύτταρα που είναι πολύπολα κύτταρα με σχετικά μεγάλα σώματα των οποίων οι δενδρίτες εκτείνονται σε περισσότερες από μία στιβάδες. Εκκρίνουν γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) και χολεκυστοκινίνη και περιβάλλουν τους πυραμιδικούς νευρώνες με τα άκρα των αξόνων τους (Cobb και συν. 1995, Somogyi και συν. 1983). Ένα καλαθοειδές κύτταρο μπορεί να εφάπτεται με περισσότερα από ένα πυραμιδικά κύτταρα και αντιστοίχως, ένα πυραμιδικό κύτταρο μπορεί περιβάλλεται από περισσότερα από ένα καλαθοειδή κύτταρα. Τα κύτταρα Chandelier είναι πιθανό ότι συμμετέχουν στη ρύθμιση του φλοιο-φλοιικού δικτύου (Somogyi 1982). Μπορούν να αναστείλουν πλήρως την νευρική ώση του πυραμιδικού νευρώνα. Ένα τέτοιο κύτταρο μπορεί να συνάπτεται με περισσότερα από ένα πυραμιδικά κύτταρα και αντιστοίχως, ένα πυραμιδικό κύτταρο μπορεί δέχεται συνάψεις από περισσότερα από ένα chandelier κύτταρο (Hof και συν. 1995, Somogyi και συν. 1983, Freund και συν. 1983). Τα Double bouquet κύτταρα έχουν κάθετο και διχασμένο δενδριτικό δέντρο και οριζόντιους αξονικούς παραπλεύρους που διασχίζουν τις στιβάδες II ως V (Somogyi και Cowey 1981).

ii. Νευρογλοιακά κύτταρα

Τα νευρογλοιακά κύτταρα είναι υπεύθυνα για αυτή τη σταθερότητα του μικροπεριβάλλοντός των νευρώνων παρέχοντας ηλεκτρική μόνωση, τροφή, προφύλαξη των εγκεφαλικών

νευρώνων και σχηματισμό ουλών σε παθολογικές καταστάσεις. Υπάρχουν τέσσερα είδη νευρογλοιακών κυττάρων: τα αστροκύτταρα, τα ολιγοδενδροκύτταρα, τα μικρογλοιακά κύτταρα και τα επενδυματικά κύτταρα.

Τα **αστροκύτταρα** αποτελούν το 20 ως 50% των κυττάρων στις διάφορες περιοχές του εγκεφάλου (Snell 1992, Kahle 1993). Έχουν μεγάλο ωχρο πυρήνα και πολλές αποφυάδες με αστεροειδή διάταξη γύρω από το κύτταρο. Αρχικά διακρίθηκαν σε δύο τύπους, τα πρωτοπλασματικά (συχνότερη παρουσία στη φαιά ουσία, με λιγότερες παχύτερες, βραχύτερες και πιο διακλαδισμένες αποφυάδες) και τα ινώδη (κυρίως στη λευκή ουσία, με μακριές, λεπτές, λείες και όχι πολύ διακλαδισμένες αποφυάδες). Πιο πρόσφατες εξελίξεις έδειξαν ότι τα αστροκύτταρα είναι ένας ποικιλόμορφος πληθυσμός με λειτουργίες που αφορούν τόσο την ομοιοστασία του εγκεφάλου όσο και την άμυνα (ανοσολογικές) (Kimelberg 2010). Ενδεικτικοί αυτής της ποικιλομορφίας είναι οι διάφοροι αστροκυτταρικοί δείκτες όπως οι GLAST, S100B και Aldh1L1 (Mayo και συν. 2010), χαρακτηριστικός όμως ανοσοϊστοχημικός τους δείκτης είναι η πρωτεΐνη GFAP που ανήκει στον τύπο III των ενδιάμεσων ινιδίων.

Τα αστροκύτταρα θεωρούνται τα κυρίως στηρικτικά κύτταρα που σχηματίζουν τρισδιάστατο σκελετό. Πολλές από τις προεκβολές των αστροκυττάρων καταλήγουν σε διογκώσεις που εφάπτονται στα αιμοφόρα αγγεία (περιαγγειακά ψευδοπόδια) όπου καλύπτουν σχεδόν πλήρως την εξωτερική επιφάνεια των αγγείων. Δημιουργούν και διατηρούν τις tight junctions στα ενδοθηλιακά κύτταρα συμβάλλοντας στο σχηματισμό του ΑΕΦ (Goldstein 1988). Οι αστροκυτταρικές προεκβολές βρίσκονται επίσης περί το αρχικό και τελικό τμήμα των περισσότερων αξόνων και στα γυμνά τμήματα των αξόνων στους κόμβους του Ranvier. Στην εξωτερική επιφάνεια του εγκεφάλου σχηματίζεται ο νευρογλοιακός αφοριστικός υμένας, ο οποίος συνορεύει με τη λεπτή μήνιγγα. Αντίστοιχο πλέγμα σχηματίζεται κάτω από τα επενδυματικά κύτταρα που καλύπτουν τις κοιλίες του εγκεφάλου και τον κεντρικό σωλήνα του νωτιαίου μυελού (Raub 1992). Από αυτά εξαρτάται η είσοδος άλλων κυττάρων στο ΚΝΣ μέσω του ΑΕΦ αφού ρυθμίζουν την έκφραση των μορίων προσκόλλησης, συγκεκριμένα των ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) και VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) (Gimenez και συν. 2004, Sobel και συν. 1990). Μπορούν να εμποδίσουν την είσοδο άλλων κυττάρων με πρόκληση απόπτωσης (Mayo και συν. 2012) και να προκαλέσουν απόπτωση T-λεμφοκυττάρων (Bechmann και συν. 2002).

Τα αστροκύτταρα, με την κάλυψη των συναπτικών επαφών μεταξύ των νευρώνων, δρουν σαν ηλεκτρικοί μονωτές. Εμποδίζουν έτσι τις απολήξεις του νευράξονα να επηρεάσουν γειτονικούς και μη σχετιζόμενους νευρώνες (Zigmond και συν. 1999, Snell

1992). Σχηματίζουν φράγματα για την διάχυση νευροδιαβιβαστών που εκλύονται στις συνάψεις. Τα αστροκύτταρα απορροφούν το GABA και το γλουταμικό οξύ που εκκρίνονται από τις νευρικές απολήξεις, περιορίζοντας έτσι την επίδρασή τους και μειώνοντας την τοξικότητα αυτών των νευροδιαβιβαστών (Nair και συν. 2008). Προσλαμβάνουν τη γλουταμίνη και τη μετατρέπουν σε γλουταμικό και GABA (διεγερτικός και ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής αντίστοιχα) (Ketterman και Ransom 1995). Έχουν ιοντικούς διαύλους για K^+ , Na^+ , Cl^- , HCO_3^- , και Ca^{++} και πολλούς υποδοχείς νευροδιαβιβαστών ενώ διαπιστώθηκε πως υπάρχουν ηλεκτρικές συναπτικές μεταβιβάσεις (gap junctions) μεταξύ νευρώνων και αστροκυττάρων. Ενδοκυττάρια κύματα Ca^{++} δημιουργούνται σαν απάντηση σε ερεθίσματα, διαδίδονται κατά μήκος του σώματος του κυττάρου και μεταφέρονται από το ένα στο άλλο. Προσλαμβάνουν την περίσσεια ιόντων K^+ από τον εξωκυττάριο χώρο και αποθηκεύουν γλυκογόνο στο κυτταρόπλασμα τους που διασπάται σε γλυκόζη και εκλύεται στους περιβάλλοντες νευρώνες μετά από έκκριση νοραδρεναλίνης. Μετά το θάνατο των νευρώνων από ασθένεια ή κάκωση, τα αστροκύτταρα φαγοκυτταρώνουν τις νευρικές απολήξεις, πολλαπλασιάζονται και γεμίζουν τα διαστήματα που καταλαμβάνονταν προηγουμένως από νευρώνες, δημιουργώντας νευρογλοιακές ουλές (Liberto και συν. 2004).

Τα αστροκύτταρα λειτουργούν σαν οδός μεταφοράς των μεταβολιτών ή άλλων ουσιών από τα αιμοφόρα αγγεία στους νευρώνες μέσω των περιαγγειακών ψευδοποδίων τους. Το γεγονός πως τα αστροκύτταρα συνδέονται μεταξύ τους με ηλεκτρικές συναπτικές μεταβιβάσεις επιτρέπει στα ιόντα να περάσουν απ' ευθείας από το ένα κύτταρο στο άλλο χωρίς να διέλθουν από τον εξωκυττάριο χώρο. Τα αστροκύτταρα παράγουν νευροτροφικούς παράγοντες *in vivo* και *in vitro*, ρυθμίζοντας έτσι τη μορφολογία, τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση διακριτών νευρωνικών υποπληθυσμών. Η παραγωγή αυξητικών παραγόντων και κυττοκινών από τα αστροκύτταρα και η ανταπόκρισή τους σ' αυτούς τους παράγοντες είναι μείζων μηχανισμός ανάπτυξης και της αναγεννητικής δυνατότητας του ΚΝΣ (Zigmond και συν. 1999). Σε ενήλικα κύτταρα νωτιαίου μυελού αρουραίων τα αστροκύτταρα παράγουν BDNF και NT-3, μία ένδειξη ότι τα αστροκύτταρα ενισχύουν την επιβίωση των νευρώνων απουσία τραύματος (Dreyfus και συν. 1999). Σε πολλές διαταραχές του ΚΝΣ (νευροτοξικότητα, HIV λοιμώξεις, νευροεκφυλιστικές παθήσεις, άνοια) τα αστροκύτταρα γίνονται υπερτροφικά ή και υπερπλαστικά (αστρογλοίωση). Ο σχηματισμός αντιδραστικών αστροκυττάρων μπορεί να επεκτείνεται πολύ πέρα από το σημείο έναρξης, για παράδειγμα, εντοπισμένο τραύμα μπορεί να ενεργοποιήσει κύτταρα της αντίθετης πλευράς. Γνωστοί παράγοντες αστρογλοίωσης είναι ο νεκρωτικός παράγοντας των όγκων α (TNFa) και ο ciliary neurotrophic factor. Η έκκριση

όμως στο τραύμα παραγόντων όπως ο BDNF και NGF είναι ένδειξη προώθησης της επιβίωσης και της νευρογένεσης (Nakayama και συν. 2003). Κατά τη διάρκεια φλεγμονής εκκρίνουν ιντερλευκίνη 6, TNF-α και ιντερλευκίνη 1β, οι οποίες αυξάνουν την διαπερατότητα του ΑΕΦ (Kim και συν. 2006).

Ο ρόλος του ανοσολογικού συστήματος στο ΚΝΣ έχει δραστικά αναθεωρηθεί, και τώρα θεωρείται ότι είναι η έδρα σημαντικών ανοσολογικών δράσεων. Ένας σημαντικός όλος των αστροκυττάρων είναι ο ανοσολογικός. Είναι πλέον γνωστό τόσο ότι ανοσοκύτταρα από την περιφέρεια εισέρχονται στο ΚΝΣ όσο και ότι κύτταρα του ΚΝΣ έχουν ανοσολογικές δράσεις (Kleine και Bennes 2006). Αυτός είναι ένας σημαντικός ρόλος των αστροκυττάρων. Τα κύτταρα αυτά είναι μέρος τόσο της φυσικής όσο και της επίκτητης ανοσίας του οργανισμού. Στις απομυελινωτικές νόσους τα αστροκύτταρα εκκρίνουν κυττοκίνες που προσελκύουν τόσο περιφερικά ανοσοκύτταρα στο ΚΝΣ (T-κύτταρα, μονοκύτταρα), αλλά και κύτταρα του ίδιου του ΚΝΣ (μικρογλιακά, NG2) στα σημεία των βλαβών (Izikhon και συν. 2000). Εκτός της κινητοποίησης άλλων κυττάρων τα αστροκύτταρα ρυθμίζουν την έκφραση μορίων προσκόλλησης και τη διαπερατότητα του ΑΕΦ και την έκφραση επιφανειακών υποδοχέων και επάγουν την απόπτωση (Calderon και συν. 2006). Παίζουν ρόλο στη λειτουργικότητα των νευρώνων και των ολιγοδενδροκυττάρων αφού καθορίζουν την κυτταροτοξικότητα ή την επιβίωση, ρυθμίζουν την ανάπτυξη των αξόνων και πιθανώς τη φαγοκύτωση της μυελίνης (Mayo και συν. 2012). Εκφράζουν το Μείζον Σύστημα Ιστοσυμβατότητας I και II υπό παθολογικές συνθήκες (Zeinstre και συν. 2000, Nair και συν. 2008) και παρουσιάζουν αντιγόνα σχετικά με τη μυελίνη (Kort και συν. 2006), έχουν δηλαδή κάποιες από τις ιδιότητες των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Σε πειράματα που έχουν γίνει *in vitro* τα αστροκύτταρα φάνηκαν να περιβάλλουν αποπτωτικά T κύτταρα που συμμετείχαν σε εγκεφαλίτιδα και να παρουσιάζουν πεπτίδια μυελίνης σε T-κύτταρα (Magnus και συν. 2002). Λειτουργικές μελέτες έχουν δείξει πως αστροκύτταρα υπό την επίδραση ιντερφερόνης-γ σε *in vitro* συνθήκες μπορούν να ενεργοποιήσουν τόσο τα CD4+ όσο και τα CD8+ κύτταρα (Nikcevic και συν. 1997, Tan και συν. 1998). Οι Barcia και συν. (2006) απέδειξαν ότι τα αστροκύτταρα δημιουργούν ανοσολογικές συνάψεις με τα T-λεμφοκύτταρα *in vivo*. Συγχρόνως τα αστροκύτταρα δημιουργούν ένα κατάλληλο περιβάλλον για την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων. Κατά τη διάρκεια φλεγμονής τα αστροκύτταρα παράγουν κυτοκίνες όπως οι ιντερλευκίνες 1, 6, 10, 12, 15, 23 και 27 ο TNF-α και ο TGF-β (Dong και Benveniste 2001). Τα αστροκύτταρα προσελκύουν T-λεμφοκύτταρα μέσα στο ΚΝΣ μέσω έκλυσης κυττοκινών οι οποίες επιδρούν στη διεύθυνση των T-κυττάρων διαμέσου του ΑΕΦ και συμμετέχουν στην εκκίνηση της διαδικασίας ενεργοποίησης των T-κυττάρων

και τα οδηγούν στην έκφραση προ-φλεγμονωδών και ρυθμιστικών φαινοτύπων (Miljkovic και συν. 2011, Trajkovic V και συν. 2004). Συγχρόνως μεταβάλουν τη διαπερατότητα του ΑΕΦ μέσω επίδρασης σε άλλα κύτταρα και στα tight junctions (Abbott και συν. 2006). Τέλος παράγουν τον B-cell-activating factor (BAFF) που ανήκει στην οικογένεια TNF και η έκφραση του οποίου παίζει ρόλο στην επιβίωση και ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων (Mayo και συν. 2012).

Τα **ολιγοδενδροκύτταρα** σχηματίζουν το μυελώδες έλυτρο των αξόνων μέσα στο ΚΝΣ επηρεάζοντας το βιοχημικό περιβάλλον των νευρώνων (Robertson 1981). Έχουν μικρότερο και πιο σκοτεινό πυρήνα και δεν έχουν ενδιάμεσα ινίδια στο κυτταρόπλασμά τους. Οι αποφυάδες τους σχηματίζουν έλυτρα μυελίνης σε πολλούς άξονες. Στη φαιά ουσία συνοδεύουν τους νευρώνες ως δορυφόρα κύτταρα. Τα **μικρογλοιακά κύτταρα** έχουν ωοειδή πυρήνα και παχιές, βραχείες και πολύκλαδες αποφύσεις και μετακινούνται με αμοιβαδοειδείς κινήσεις. Είναι πιθανό πως παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη του ΚΝΣ και στην παθογένεση των νόσων του ΚΝΣ (Imamoto 1981). Σε φλεγμονώδεις και εκφυλιστικές βλάβες του ΚΝΣ μεταναστεύουν στην περιοχή της βλάβης όπου ενεργοποιούνται, πολλαπλασιάζονται και φαγοκυττα-ρώνουν αποπτωτικά κύτταρα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και εκκρίνουν κυττοκίνες και αυξητικούς παράγοντες και συμμετέχουν στη γλοιογένεση και στην αγγειογένεση (Altman 1994). Το σύνολο των μικρογλοιακών κυττάρων σχηματίζουν ένα δίκτυο που καλύπτει το νευρικό παρέγχυμα. Είναι πιθανό πως παίζουν κάποιο ρόλο στην κυτταρική ομοιοστασία καθώς αντιδρούν ταχέως και έντονα στις αλλαγές του μικροπεριβάλλοντος του ΚΝΣ. Δεν ανταποκρίνονται μόνο σε παθολογικές καταστάσεις όπου υπάρχει ανοσολογική ενεργοποίηση αλλά και σε νευροεκφυλιστικές διαταραχές στις οποίες δεν θεωρείται πως υπάρχει ανοσολογική διαμεσολάβηση (Banati και Graeber 1994). Τα **επενδυματικά κύτταρα** επενδύουν τις κοιλίες του εγκεφάλου και τον κεντρικό σωλήνα του νωτιαίου μυελού και συμβάλουν στην παραγωγή, έκκριση, κίνηση και την απορρόφηση του ΕΝΥ από τα χοριοειδή πλέγματα. Σχηματίζουν μία μονή στοιβάδα κυττάρων με κροσσούς και μικρολάχνες, οι κινήσεις των οποίων συμβάλλουν στη ροή του ΕΝΥ. Μεταφέρουν χημικές ουσίες από το ΕΝΥ στο υποφυσιακό πυλαίο σύστημα επηρεάζοντας τον έλεγχο της παραγωγής ορμονών από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης (Snell 1992).

4. Η σύναψη και άλλοι τύποι κυτταρικής επικοινωνίας στο ΚΝΣ

Η πληροφορία από τον ένα νευρώνα στον άλλο μεταδίδεται μέσω των νευρικών συνάψεων. Η σύναψη είναι η ειδική δομή για τη μεταφορά του δυναμικού ενεργείας. Από τις συνάψεις

εκλύονται νευροδιαβιβαστές, ουσίες που προκαλούν μεταβολές της συναπτικής δραστηριότητας και του δυναμικού του άξονα του νευρικού κυττάρου. Η εκπόλωση ή η υπερπόλωση της συναπτικής μεμβράνης εξαρτάται από το αθροιστικό αποτέλεσμα των διεγερτικών ή ανασταλτικών παραγόντων σε ένα κύτταρο. Οι δύο κύριοι τύποι συνάψεων είναι οι ασύμμετρες συνάψεις, υπεύθυνες για τη μεταβίβαση διεγερτικών ερεθισμάτων και οι συμμετρικές συνάψεις, που μεταβιβάζουν ανασταλτικά ερεθίσματα (Kahle και συν. 1993).

Για να χαρακτηριστεί μια ουσία ως νευροδιαβιβαστής, θα πρέπει: 1) να συντίθεται από νευρώνες, 2) να εντοπίζεται στην προσυναπτική απόληξη του νευρώνα, 3) να εκλύεται σε ποσότητα αρκετή προκειμένου να προκαλέσει τα ειδικά γεγονότα που συμβαίνουν κατά την ενεργοποίηση του προσυναπτικού νευρώνα, σε παρόμοιες συγκεντρώσεις. 4) Όταν η ουσία χορηγείται εξωγενώς σε παρόμοιες συγκεντρώσεις θα πρέπει να έχει δράση όμοια με αυτή που έχει όταν εκλύεται ενδογενώς. 5) Η δράση αυτή θα πρέπει να αναστέλλεται από ένα γνωστό ανταγωνιστή με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. 6) Θα πρέπει να υπάρχουν κατάλληλοι μηχανισμοί ολοκλήρωσης της δράσης, όπως ενζυματική αποσύνθεση, επαναπρόσληψη στο νευρώνα, πρόσληψη από γλοιακά κύτταρα (Levite 2008).

Άλλοι τρόποι επικοινωνίας των κυττάρων του ΚΝΣ είναι η ηλεκτρική συναπτική μεταβίβαση, οι εφαστικές ηλεκτρικές αλληλεπιδράσεις, η αυτοκρινική και η παρακρινική οδός. Ο μη συναπτικός τρόπος κυτταρικής επικοινωνίας με το μεγαλύτερο εύρος (απόσταση) δράσης είναι ο ορμονικός ή χυμικός. Περιφερικές ορμόνες εισέρχονται στο ΚΝΣ για να οδηγήσουν, να αναστείλουν ή να ρυθμίσουν τη νευρική δραστηριότητα. Οι νευρωνικοί στόχοι των ορμονών έχουν ειδικούς υποδοχείς υψηλής ή χαμηλής συγγένειας για αυτές τις ορμόνες, οι δε δράσεις τους είναι τόσο βραχυπρόθεσμες (μεταβάλλοντας ταχέως τη νευρωνική δραστηριότητα) όσο και μακροπρόθεσμες (μεταβάλλοντας τη γονιδιακή έκφραση). Στην ενδοκυτταρική επικοινωνία του ΚΝΣ συμμετέχουν επίσης μόρια που παράγονται ενδογενώς και που δεν απαιτούν συναπτική εξειδίκευση, όπως νευροπεπτίδια, τα νευροστεροειδή, το νιτρικό οξύ (NO) και το μονοξείδιο του άνθρακα (CO). Δρουν είτε σαν αυτοκρινικοί μηχανισμοί, ενεργοποιώντας υποδοχείς του κυττάρου που τα παράγει ή μέσω παρακρινικών οδών στα γειτονικά κύτταρα. Αυτά τα μόρια ρυθμίζουν τη νευρική δραστηριότητα, προσφέρουν τροφική υποστήριξη στους νευρώνες κατά τη διαδικασία της ανάπτυξης και συμμετέχουν στη δημιουργία και διατήρηση των συναπτικών επαφών (Kandel και συν. 2000).

Η πρωτεΐνη ERK (extracellular signal-regulated kinase) ή MAPK (microtubule-associated protein kinase) είναι μία από τις πρώτες πρωτεΐνες που διαπιστώθηκε ότι φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη MAP (microtubule-associated protein). Έχει ποικίλες δράσεις

μεταξύ των οποίων και η ενίσχυση των κυτταρικών μηνυμάτων και η ρύθμιση της ανατροφοδότησης (feedback regulation). Η οδός (pathway) MAPK/ERK είναι μία αλυσίδα πρωτεϊνών στο κύτταρο που μεταφέρει ένα μήνυμα από έναν υποδοχέα στην επιφάνεια του κυττάρου στο DNA του πυρήνα. Η διαδικασία αυτή αρχίζει όταν ένας αυξητικός παράγοντας συνδέεται με έναν υποδοχέα στην επιφάνεια του κυττάρου και καταλήγει στην παραγωγή μιας πρωτεΐνης που προκαλεί κάποια μεταβολή στο κύτταρο, όπως ο διπλασιασμός του κυττάρου. Η οδός αυτή συμπεριλαμβάνει πολλές πρωτεΐνες όπως την MAPK που επικοινωνούν φωσφορυλιώνοντας (adding phosphate groups) μία γειτονική πρωτεΐνη η οποία δρα ως «διακόπτης» (Orton et al. 2005). Το εξωκυττάριο μιτογόνο συνδέεται με το μεμβρανικό υποδοχέα (ligand) και μέσω μίας ακολουθίας (cascade) αντιδράσεων που συμπεριλαμβάνουν τα Ras (μία GTPάση), MAP3K, MAP2K και MEK ενεργοποιείται η MAPK, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί έναν παράγοντα μεταγραφής (transcription factor) (Schulze και συν. 2005, Zarich και συν. 2005, Avruch και συν. 2001). Ένα αποτέλεσμα της ενεργοποίησης της MAPK είναι να επιδρά στη μετάφραση του mRNA σε πρωτεΐνες. Μεταβάλλοντας τα επίπεδα και τις δράσεις των παραγόντων μεταγραφής η MAPK οδηγεί σε μεταβολή των γονιδίων μεταγραφής που είναι σημαντικά για τον κυτταρικό κύκλο. Τα γονίδια 22q11, 1q42, και 19p13 σχετίζονται με τη σχιζοφρένεια, τη σχιζοσυναισθηματική διαταραχή, τη διπολική διαταραχή και την ημικρανία, μέσω δράσης στην οδό του ERK (Pende και συν. 2004).

Τα κύτταρα επίσης στέλνουν μηνύματα μεταξύ τους μέσω δομικών στοιχείων και μορίων προσκόλλησης (cellular adhesion molecules, CAMs). Τα μόρια προσκόλλησης είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Έχουν εξωκυττάρια τμήματα που διαμεσολαβούν προσκολλητικές αλληλεπιδράσεις και κυτταροπλασματικές δομές που επικοινωνούν με δομικά στοιχεία τα οποία διαμεσολαβούν στις οδούς μετάδοσης των μηνυμάτων και/ή τον κυτταροσκελετό. Τα τμήματα των CAMs που βρίσκονται μεταξύ των κυττάρων μπορούν να «ενεργοποιηθούν» με την σύνδεση του εξωκυτταρικού τμήματος με ένα πρόσδεμα που εντοπίζεται στη μεμβράνη ενός άλλου κυττάρου. Υπό αυτή την έννοια τα CAMs συμπεριφέρονται σαν υποδοχείς αυξητικών παραγόντων που ερεθίζονται από την πρόσδεση συγκεκριμένων ουσιών. Μία τέτοια ουσία είναι η N-cadherin. Η N cadherin ανήκει σε μία ομάδα διαμεμβρανικών πρωτεϊνών του νευρικού συστήματος που παίζουν σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση των κυττάρων και διασφαλίζουν ότι τα κύτταρα των ιστών παραμένουν συνδεδεμένα μεταξύ τους. Η προσκολλητική δράση της εξαρτάται από τα ιόντα ασβεστίου (Hulpiau και συν. 2009, Angst και συν. 2001). Τα κύτταρα που περιέχουν N-cadherin έχουν την τάση να προσκολλώνται σε άλλα κύτταρα που την εκφράζουν (Duguay και συν. 2003).

Τόσο στους ανθρώπινους νευρώνες όσο και στα αστροκύτταρα μία περιοχή της πρωτεΐνης βρίσκεται στους συναπτικούς συνδέσμους ενώ μία άλλη εντοπίζεται στην περιοχή που συνδέεται με τη μεταβίβαση μηνυμάτων. Τέλος, οι νευροτροφικοί παράγοντες είναι ουσίες που ρυθμίζουν τον κυτταρικό θάνατο και δρουν σαν χημικοί αγγελιοφόροι. Οι βιολογικές τους λειτουργίες αφορούν στην ανάπτυξη, την πλαστικότητα και τη λειτουργικότητα του ΚΝΣ. Όπως οι νευροδιαβιβαστές, μπορούν να προκαλέσουν παροδικές συναπτικές, αλλά και πιο παρατεταμένες μεταβολές στο νευρώνα και ρυθμίζουν τον κυτταρικό θάνατο έχοντας συνήθως ανασταλτικές λειτουργίες (Zigmond και συν. 1999).

5. Καλλιέργειες νευρικών κυττάρων

Οι ανθρώπινες καλλιέργειες νευρώνων είναι ένα σημαντικό επιστημονικό εργαλείο των νευροεπιστημών. Η πρώτη καλλιέργεια νευρώνων που προέρχονταν από ανθρώπινο ιστό αναφέρεται το 1972 (Gosheva και Buravlev). Μελέτες έχουν γίνει σε πεδία που αφορούν στη νευροπροστασία, τη νευροτοξικότητα και στα νευροεκφυλιστικά σύνδρομα (Brandt και συν. 2005; Dinkel και συν. 2004; Ren και Miller, 2003). Πολλές μελέτες ασχολήθηκαν με τη μακροπρόθεσμη διατήρηση νευρωνικών κυττάρων *in vitro* ως μοντέλων ενδο- και μεσο-κυτταρικής επικοινωνίας και μεταφοράς μηνυμάτων. Έχουν περιγραφεί καλλιέργειες νευρώνων που προέρχονται από εμβρυϊκό και νεογνικό ιστό διαφόρων ζώων (Corner και συν. 2005; Maslov και συν. 2004; Caldwell και συν. 2001). Η έρευνα σε καλλιέργειες ανθρώπινων νευρώνων εστιάστηκε στη χρήση είτε πολυδύναμων εμβρυονικών και νεογνικών βλαστικών κυττάρων (stem cells) που στη συνέχεια διαφοροποιούνταν *in vitro* (Nakanishi και Furuno 2008, Hammond και συν. 2002; Song και συν. 2002) ή σε post-mortem εγκεφαλικό ιστό (Verwer και συν. 2002; Brewer 2001; DeGroot και συν. 2000). Τα κύρια μειονεκτήματα που εμποδίζουν την εφαρμογή των επιτευγμάτων από τις καλλιέργειες ζώων στον άνθρωπο είναι η βιωσιμότητά τους και η αποδιαφοροποίηση ενήλικων νευρώνων *in vitro*. Η μακροπρόθεσμη διατήρηση ενήλικων ανθρώπινων νευρικών κυττάρων σε καλλιέργεια έχει σημαντικές δυσκολίες, καθώς η προσπάθεια δημιουργίας και διατήρησης πρωτογενών καλλιιεργειών από ιστούς του ΚΝΣ εμποδίζεται συχνά από υποκείμενες παθολογίες του ιστού και τις μεθόδους καλλιέργειας που χρησιμοποιούνται.

II. ΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

1. Γενικά - Φυσική και επίκτητη ανοσία

Το ανοσολογικό σύστημα είναι η άμυνα του οργανισμού απέναντι στα εξωτερικά παθογόνα. Αποτελείται από ειδικά κύτταρα και από ιστούς. Οι ιστοί είναι τα κεντρικά και περιφερικά λεμφικά όργανα και συμμετέχουν στην παραγωγή και κυκλοφορία των λεμφοκυττάρων. Εάν κάποιο παθογόνο καταφέρει να διαπεράσει τα εξωτερικά όρια του οργανισμού, βρίσκεται αντιμέτωπο με μία σειρά αμυντικών παραγόντων που φυλάσσουν τους εσωτερικούς ιστούς, όπως εξειδικευμένα κύτταρα, πρωτεΐνες ή άλλα διαλυτά μακρομόρια. Οι παράγοντες αυτοί διαχωρίζονται σε δύο διαφορετικά συστήματα: τη φυσική και την επίκτητη ανοσία. Τα συστήματα αυτά έχουν ξεχωριστούς ρόλους αλλά παράλληλα δρουν ταυτόχρονα και αλληλοεπιδρούν (Stites και συν. 1997).

Η *φυσική ανοσία* είναι η πρώτη ανοσία και αναφέρεται σε κάθε έμφυτη αντίσταση που είναι παρούσα την πρώτη φορά που ο οργανισμός έρχεται σε επαφή με ένα αντιγόνο και ενεργοποιείται πλήρως εντός ωρών. Η αρχικές γνώσεις για το ΑΣ προήλθαν από μελέτες λεμφαδένων αλλά είναι πλέον γνωστό ότι οι περισσότεροι μη-λεμφικοί ιστοί έχουν εξειδικευμένα κύτταρα φυσικής ανοσίας που είναι ειδικά προσαρμοσμένα σε αυτούς (Nayak και συν. 2012). Αποτελείται από κύτταρα, όπως αυτά που δημιουργούν τους επιθηλιακούς φραγμούς, τα φαγοκύτταρα όπως τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα μακροφάγα και τα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα (NK), και από πρωτεΐνες όπως οι κυτταροκίνες, οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος, η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη και άλλες πρωτεΐνες του πλάσματος (Sjöberg και συν. 2009, Hiemstra 2007). Η φυσική ανοσία έχει άμεση δράση, αντιδρά μόνο σε ουσίες που προέρχονται από μικροοργανισμούς, δεν αντιδρά έναντι του εαυτού και αναγνωρίζει δομές σχετικές με την επιβίωση και τη μολυσματικότητα των μικροοργανισμών. Διεγείρεται και από κύτταρα του οργανισμού που έχουν υποστεί βλάβες από μικροοργανισμούς, αλλά όχι από τον ίδιο το μικροοργανισμό και δεν προσαρμόζεται σε αυτόν. Επίσης βοηθά τη διέγερση της επίκτητης ανοσίας (Vinuesa και Chang 2013) και δεν έχει μνήμη, οπότε δε μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ζωής. Μέρος της φυσικής ανοσίας είναι και οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος μία ακολουθία πρωτεϊνών οι οποίες ενεργοποιούν η μία την άλλη μέσω μιας διαδοχικής ακολουθίας, διαδικασία που εκκινείται από την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης C3 (Stites και συν. 1997). Συμμετέχει επίσης στην ωρίμανση ενεργοποιημένων Β λεμφοκυττάρων (Carroll και Isenman 2012) και διαμεσολαβεί την ενεργοποίηση της επίκτητης ανοσίας (Toapanta και Ross 2006).

Η δράση της *επίκτητης ανοσίας* ξεκινά κάποιες ημέρες μετά την εμφάνιση του παθογόνου ερεθίσματος. Έχει υψηλή ειδικότητα για αντιγόνα και ανοσογόνα και διαχωρίζει αυτά που ανήκουν στον οργανισμό από τα εξωτερικά. Μέσω της ενεργοποίησής της εκκινούνται αντιδράσεις εξάλλειψης των εξωτερικών παθογόνων. Τέλος ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της επίκτητης ανοσίας είναι ότι παράγει κύτταρα με μακρό χρόνο ζωής που παραμένουν σε λανθάνουσα κατάσταση για μεγάλα χρονικά διαστήματα (Janeway και συν. 2001). Αυτά τα κύτταρα μπορούν να εκφράσουν δραστικές λειτουργίες όταν ξαναέρθουν σε επαφή με το ειδικό τους αντιγόνο. Συνεπώς η επίκτητη ανοσία έχει ανοσολογική μνήμη, η οποία της επιτρέπει να είναι πιο αποτελεσματική απέναντι σε συγκεκριμένα παθογόνα ή τοξίνες όταν απαντώνται για δεύτερη φορά, ακόμα και δεκαετίες μετά από την αρχική ευαισθητοποίηση (Chaplin 2010).

Η επίκτητη ανοσία ενισχύει τη φυσική ανοσία, και συγχρόνως χρησιμοποιεί κύτταρα της φυσικής ανοσίας (Stites και συν. 1997). Ο στόχος της επίκτητης ανοσίας είναι η αναγνώριση του αντιγόνου (μέσω των αντιγονικών υποδοχέων των λεμφοκυττάρων), η πρόσληψη του αντιγόνου και η παρουσίασή του στα λεμφοκύτταρα (Janeway και συν. 2001). Οι δύο τύποι της επίκτητης ανοσίας είναι η χυμική και η κυτταρική και οι δύο βασικοί τύποι κυττάρων είναι τα T και B λεμφοκύτταρα. Η κυτταρική ανοσία σχετίζεται με την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων από ενδοκυττάριους μικροοργανισμούς οδηγεί στην εξάλειψή τους. Η χυμική ανοσία αφορά στην ενεργοποίηση των B λεμφοκυττάρων τα οποία παράγουν αντισώματα έναντι εξωκυττάριων αντιγόνων και τοξινών (Dörner και συν. 2009).

2. Ιδιότητες και ενεργοποίηση T και B λεμφοκυττάρων

Ένας φυσιολογικός οργανισμός έχει περίπου 10^{12} λεμφοκύτταρα, το 2% των οποίων κυκλοφορούν στο αίμα. Τα υπόλοιπα βρίσκονται μέσα σε ιστούς (Alberts και συν. 2002). Ένα τυπικό λεμφοκύτταρο έχει διάμετρο 5-12μm, είναι σφαιρικό ή ωοειδή με σφαιρικό πυρήνα. Το κυτταρόσωμα έχει μιτοχόνδρια και ελεύθερα ριβοσώματα, αλλά όχι άλλα οργανίδια. Τα λεμφοκύτταρα διαχωρίζονται μεταξύ τους μέσω των λειτουργικών τους ιδιοτήτων και των πρωτεϊνών που εκφράζουν. Ο σημαντικότερος διαχωρισμός είναι αυτός μεταξύ T- και B- λεμφοκυττάρων. Οι συγκεντρώσεις των λεμφοκυττάρων στους διαφορετικούς ιστούς ποικίλουν. Στο περιφερικό αίμα είναι περίπου 75 και 10% αντίστοιχα. Το υπόλοιπο 15% είναι κύτταρα φυσικοί φονείς ή φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα, που έχουν ιδιότητες διαφορετικές από τα υπόλοιπα λεμφοκύτταρα.

Τα προγονικά κύτταρα από τα οποία προέρχονται τα λεμφοκύτταρα προέρχονται από το μυελό των οστών ή από το εμβρυϊκό ήπαρ. Η ανάπτυξη των Β-κυττάρων λαμβάνει χώρα εξ' ολοκλήρου στο μυελό των οστών, ενώ τα Τ-κύτταρα αναπτύσσονται από προγονικά κύτταρα που φεύγουν από το μυελό και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος φτάνουν στο θύμο αδέν, όπου πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε ώριμα Τ λεμφοκύτταρα (Janeway και συν. 2005). Ο μυελός των οστών και ο θύμος αδέν αποτελούν τα κεντρικά λεμφικά όργανα όπου γίνεται η παραγωγή και η ωρίμανση των Τ και Β λεμφοκυττάρων. Τα δύο αυτά όργανα παράγουν και εκκρίνουν λεμφοκύτταρα ανεξαρτήτως του αν τα κύτταρα είναι απαραίτητα για κάποια ανοσολογική απόκριση τη συγκεκριμένη στιγμή. Η παραγωγή Τ λεμφοκυττάρων στο θύμο συνεχίζεται μέχρι την εφηβεία, οπότε το όργανο αυτό φυσιολογικά υποστρέφει. Ο μυελός των οστών συνεχίζει να παράγει Β λεμφοκύτταρα καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του ανθρώπου (Sims και συν. 2005).

Τα ώριμα κύτταρα που εξέρχονται από το θύμο ή το μυελό των οστών είναι σε φάση ηρεμίας του κυτταρικού κύκλου (φάση G₀). Μόλις εκλυθούν στην κυκλοφορία του αίματος αυτά τα λεμφοκύτταρα μεταναστεύουν στα περιφερικά λεμφικά όργανα όπως ο σπλήνας, οι λεμφαδένες ή οι αμυγδαλές [επίσης οι λεμφικοί ιστοί των βλεννογόνων (MALT) του αναπνευστικού, πεπτικού, ουρογεννητικού και του δέρματος]. Εκεί γίνεται η εκκίνηση των ανοσολογικών απαντήσεων φέρνοντας σε επαφή αντιγόνα και λεμφοκύτταρα. Τότε παρατηρείται το φαινόμενο της ενεργοποίησης, κατά τη διάρκεια του οποίου το κύτταρο εισέρχεται σε διαδοχικές φάσεις της κυτταρικής διαίρεσης. Μερικά από τα κύτταρα που προκύπτουν επανέρχονται σε κατάσταση ηρεμίας και μεταπίπτουν σε κύτταρα μνήμης, έχουν δε τη δυνατότητα να επιβιώσουν για πολλά χρόνια και αποτελούν μεγάλο ποσοστό των κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος του ενήλικα. Τα υπόλοιπα ενεργοποιημένα κύτταρα πλάσματος διαφοροποιούνται σε δραστικά κύτταρα που ζουν για λίγες μέρες κατά τη διάρκεια των οποίων δρουν εναντίον του εισβολέα (Dörner και συν. 2009). Συνεπώς τα λεμφοκύτταρα βρίσκονται σε τρία στάδια διαφοροποίησης: κύτταρα ηρεμίας (naïve cells), δραστικά κύτταρα (effector cells) και κύτταρα μνήμης (memory cells).

Β λεμφοκύτταρα: Το κύριο χαρακτηριστικό αυτών των κυττάρων είναι η σύνθεση και παραγωγή πρωτεϊνών που λέγονται ανοσοσφαιρίνες. Κάθε ανοσοσφαιρίνη αποτελείται από πολυπεπτίδια που δημιουργούν τις βαριές και τις ελαφριές αλυσίδες, και συνδέεται ειδικά με συγκεκριμένα μόρια-συνδέτες που μπορεί να βρίσκονται σε πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπίδια και άλλα μακρομόρια και αποκαλούνται αντισώματα ή ανοσοσφαιρίνες. Είναι γνωστοί πέντε τύποι ανοσοσφαιρινών: IgA, IgD, IgE, IgG και IgM. Τα Β-κύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία και τα κύτταρα μνήμης εκφράζουν τις ανοσοσφαιρίνες μόνο στην

επιφάνειά τους. Αντιθέτως τα δραστικά κύτταρα (κύτταρα πλάσματος) εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες ανοσοσφαιρινών, οι οποίες διατηρούν τη δυνατότητα να αναγνωρίζουν και να συνδέονται με τους συγκεκριμένους συνδέτες τους, που αποκαλούνται αντιγόνα. Η σύνδεση του αντισώματος με το αντιγόνο οδηγεί στην εξουδετέρωση του αντιγόνου, όπως π.χ. στην απενεργοποίηση μιας τοξικής πρωτεΐνης ή η προώθηση της φαγοκυττάρωσης ενός βακτηριδίου. Τα Β κύτταρα αναγνωρίζουν τα αντιγόνα τους στη φυσική τους μορφή, αντίθετα με τα Τ λεμφοκύτταρα τα οποία προκειμένου να αναγνωρίσουν ένα αντιγόνο θα πρέπει αυτό, αφού υποστεί επεξεργασία, να είναι σε μορφή πεπτιδίου.

Όταν ένα ενεργοποιημένο Β-κύτταρο διαιρείται κάποια από τα κύτταρα που προκύπτουν γίνονται κύτταρα μνήμης, ενώ τα υπόλοιπα διαφοροποιούνται σε κύτταρα πλάσματος, τα οποία συνήθως δεν έχουν στην επιφάνειά τους ανοσοσφαιρίνες, αλλά παράγονται σε μεγάλες ποσότητες στο κυτταρόπλασμα και εκκρίνονται στον εξωκυττάριο χώρο. Τα κύτταρα πλάσματος ζουν από μερικές μέρες ως εβδομάδες. Η σημαντικότερη λειτουργία των Β-λεμφοκυττάρων είναι η έκκριση αντισωμάτων στο αίμα και σε άλλα σωματικά υγρά, δημιουργώντας ένα περιβάλλον εχθρικό προς τους ξένους εισβολείς. Είναι ο κύριος τύπος κυττάρου που συμμετέχει στην χυμική ανοσία, λειτουργούν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα μέσω της επεξεργασίας και της παρουσίασης των ξένων ουσιών με έναν τρόπο που μπορεί να αναγνωριστεί από τα Τ λεμφοκύτταρα και τέλος εκκρίνουν λεμφοκίνες και άλλους παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη και τις δραστηριότητες των άλλων ανοσολογικών κυττάρων. Υπό φυσιολογικές συνθήκες ηρεμίας τα Β κύτταρα ακολουθούν έναν αυστηρά ρυθμισμένο κυτταρικό κύκλο προκειμένου να αποφευχθεί η ανάπτυξη αυτοανοσίας (Goodnow και συν. 2005).

Τ λεμφοκύτταρα: Τα Τ κύτταρα δεν εκκρίνουν ανοσοσφαιρίνες, αλλά ανιχνεύουν τις ξένες ουσίες μέσω πρωτεϊνών της επιφάνειας που λέγονται Τ λεμφοκυτταρικοί υποδοχείς (TCR). Οι TCR είναι μια ετερογενής ομάδα μεμβρανικών πρωτεϊνών οι οποίες στα περισσότερα Τ κύτταρα αποτελούνται από διαμεμβρανικά πολυπεπίδια, τις α και β αλυσίδες. Παρομοίως με τις ανοσοσφαιρίνες, μπορούν να ανιχνεύσουν αντιγόνα αλλά αντίθετα με αυτές δεν εκκρίνονται, συνεπώς τα Τ λεμφοκύτταρα δεν έχουν τη δυνατότητα να δράσουν σε απομακρυσμένους στόχους. Αντιθέτως ασκούν την δράση τους είτε μέσω άμεσης επαφής με το στόχο, είτε επηρεάζοντας τη δραστηριότητα άλλων ανοσολογικών κυττάρων. Μία άλλη διαφορά ανάμεσα στα Τ και Β κύτταρα είναι ότι τα Τ λεμφοκύτταρα μπορούν να αναγνωρίσουν μία ξένη πρωτεΐνη όταν έχει τεμαχιστεί σε μικρά πεπτίδια, τα οποία στη συνέχεια παρουσιάζονται στην επιφάνεια ενός κυττάρου-ξενιστή, που λέγεται αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο (ΑΠΚ). Σχεδόν κάθε κύτταρο του οργανισμού μπορεί να

παρουσιάσει αντιγόνα υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Παρ' όλ' αυτά κάποιοι τύποι κυττάρων είναι ειδικά προσαρμοσμένοι γι' αυτό το σκοπό και είναι πολύ σημαντικοί για τον έλεγχο της δραστηριότητας των Τ κυττάρων. Η αντιγονοπαρουσίαση εξαρτάται εν μέρει από από ειδικές πρωτεΐνες που λέγονται Μείζον Σύστημα Ιστοσυμβατότητας (ΜΣΙ) που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων αυτών και ο TCR αναγνωρίζει το συνδυασμό του πεπτιδίου με την πρωτεΐνη του ΜΣΙ. Συνεπώς τα Τ κύτταρα πρέπει να έρθουν σε άμεση επαφή με την επιφάνεια άλλων κυττάρων προκειμένου να ανιχνεύσουν αντιγόνα και να αναπτύξουν την ανοσολογική τους δράση.

Το σύμπλεγμα πρωτεϊνών CD3 που σχετίζεται με τους TCR είναι απαραίτητο προκειμένου να μεταφερθούν οι υποδοχείς στην επιφάνεια του κυττάρου και μεταφέρουν μηνύματα από τους υποδοχείς στο κυτταρόπλασμα. Καθώς βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στα Τ κύτταρα, η ανίχνευσή τους βοηθάει στο χαρακτηρισμό ενός κυττάρου ως Τ κυττάρου. Η πρωτεΐνη CD2 εντοπίζεται σε πιο πρώιμο στάδιο της εξέλιξης των λεμφοκυττάρων, οπότε μέσω αυτής χαρακτηρίζονται όλα τα κύτταρα αυτής της προέλευσης. Σχεδόν όλα τα ώριμα Τ κύτταρα που βρίσκονται στα λεμφικά όργανα και το περιφερικό αίμα είναι CD2+CD3+. Αυτά πάλι στη συνέχεια διαχωρίζονται σε υποπληθυσμούς με διαφορετικές ανοσολογικές δράσεις που εκφράζουν τους δικούς τους δείκτες. Δύο σημαντικές υποκατηγορίες Τ κυττάρων είναι αυτά που εκφράζουν τους δείκτες CD4 και CD8 και σχεδόν όλα τα ώριμα λειτουργικά λεμφοκύτταρα εκφράζουν μία από τις δύο πρωτεΐνες. Τα περισσότερα CD8+ κύτταρα έχουν κυτταροτοξική δράση, σκοτώνοντας τα κύτταρα που φέρουν ξένα μακρομόρια στην επιφάνειά τους. Αντιθέτως τα CD4+ λεμφοκύτταρα είναι συνήθως βοηθητικά, προωθώντας τον πολλαπλασιασμό, την ωρίμανση και την ανοσολογική δράση άλλων κυτταρικών τύπων. Για παράδειγμα ειδικές λεμφοκίνες που εκκρίνονται από τα βοηθητικά Τ κύτταρα ρυθμίζουν τις δράσεις των Β κυττάρων, των μακροφάγων και των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων. Περίπου το 70% των Τ κυττάρων του αίματος και των λεμφικών ιστών είναι CD4+CD8- (CD4 κύτταρα), το 25% είναι CD4-CD8+ (CD8 κύτταρα), το 4% είναι CD4-CD8- και το 1% είναι CD4+CD8+ κύτταρα. Η συσχέτιση της παρουσίας των CD4 και CD8 πρωτεϊνών με την βοηθητική ή την κυτταροτοξική λειτουργία είναι ισχυρή αλλά όχι απόλυτη. Κάποια CD4 είναι κυτταροτοξικά και κάποια CD8 βοηθητικά. Μετά από ενεργοποίηση με αντιγόνο, τα CD8+ κύτταρα είτε γίνονται δραστικά κύτταρα, είτε μετατρέπονται σε κύτταρα μνήμης (Amsen και συν. 2013) Μετά την ενεργοποίηση και διαδοχικούς κύκλους μίτωσης, κάποια από τα κύτταρα επιστρέφουν στην κατάσταση ηρεμίας σαν κύτταρα μνήμης και κάποια άλλα μετατρέπονται σε δραστικά κύτταρα που έχουν βοηθητική ή κυτταροτοξική δράση. Η λεμφοκυτταρική ενεργοποίηση αποτελεί μία

ακολουθία γεγονότων κατά την οποία ένα κύτταρο περνάει από διαδοχικούς κύκλους μίτωσης οπότε πολλαπλασιάζεται και εκφράζει τις ανοσολογικές του δράσεις. Αυτό συμβαίνει όταν ειδικοί συνδέτες συνδέονται με τους υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων.

3. Η ανοσολογική απόκριση

Κάθε ανοσολογική απόκριση είναι περίπλοκη ακολουθία γεγονότων που εμπλέκει διάφορους τύπους κυττάρων. Υπό φυσιολογικές συνθήκες ενεργοποιείται όταν ένα αντιγόνο εισέρχεται στον οργανισμό και συναντά ένα ΑΠΚ. Τα ΑΠΚ συνδέονται με μία μικρή ποσότητα του αντιγόνου και το παρουσιάζουν κατά τέτοιο τρόπο ώστε να αναγνωρίζεται από ειδικά για το αντιγόνο βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα. Τα βοηθητικά Τ κύτταρα ενεργοποιούνται και στη συνέχεια προάγουν την ενεργοποίηση άλλων τύπων λεμφοκυττάρων όπως Β και κυτταροτοξικά Τ κύτταρα. Στη συνέχεια τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα πολλαπλασιάζονται και εκτελούν τις ειδικές για το καθένα δράσεις, οι οποίες, στις περισσότερες περιπτώσεις, απενεργοποιούν ή εξαλείφουν το αντιγόνο. Σε κάθε στάδιο αυτής της διαδικασίας τα λεμφοκύτταρα και τα ΑΠΚ επικοινωνούν μεταξύ τους είτε με άμεση επικοινωνία είτε μέσω έκκρισης ρυθμιστικών κυτταροκινών. Ταυτόχρονα μπορεί να αλληλεπιδρούν με άλλους τύπους κυττάρων, με στοιχεία του συμπληρώματος ή με ινδοδολυτικούς παράγοντες με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων, την πήξη του αίματος ή τη επούλωση της πληγής. Οι ανοσολογικές αποκρίσεις μπορούν να είναι τοπικές ή συστηματικές αλλά σχεδόν πάντα είναι εξειδικευμένες έναντι του αντιγόνου, προκαλώντας περιορισμένη βλάβη ή χωρίς να επηρεάσουν καθόλου τους φυσιολογικούς ιστούς. Οι απαντήσεις ελέγχονται με ακρίβεια και υπό φυσιολογικές συνθήκες λήγουν σύντομα μετά από την εξαφάνιση του αντιγόνου (Chaplin 2010).

4. Μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας

Η απάντηση του οργανισμού στα πρωτεϊνικά αντιγόνα αρχίζει μετά τον εντοπισμό, την επεξεργασία και την παρουσίαση από ένα ΑΠΚ. Αυτό συμβαίνει διότι τα Τ κύτταρα αναγνωρίζουν μόνο αντιγόνα συνδεδεμένα με το μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας (ΜΣΙ), το οποίο αποτελείται από πρωτεΐνες στην επιφάνεια άλλων κυττάρων (Stites και συν. 1997, Janeway και συν. 2005). Οι πρωτεΐνες αυτές διαχωρίζονται σε τρεις υποκατηγορίες, τους τύπους I, II και III. Οι πρωτεΐνες του ΜΣΙ-I εκφράζονται από σχεδόν όλα τα τα εμπύρρινα κύτταρα του οργανισμού (όχι στα ερυθρά αιμοσφαίρια) και συνήθως παρουσιάζουν αντιγόνα

στα CD8 λεμφοκύτταρα. Συνεπώς κάθε κύτταρο έχει τη δυνατότητα εάν π.χ. μολυνθεί από κάποιον ιό να αντιγονοπαρουσιάσει στα T κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα. Οι πρωτεΐνες του ΜΣΙ-II εμφανίζονται συνήθως στα ΑΠΚ: εκφράζονται από τα μονοκύτταρα, μακροφάγα, τα B λεμφοκύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα και είναι απαραίτητες για την παρουσίαση αντιγόνων στα CD4+ T λεμφοκύτταρα. Τα ΑΠΚ δεσμεύουν και εκθέτουν ενδογενή κυτταρικά πεπτίδια στην επιφάνεια της μεμβράνης. Η σύνδεση με τις πρωτεΐνες του ΜΣΙ-II μεσολαβεί την αντιγονοπαρουσίαση, και συνεπώς διευκολύνει την αναγνώριση ίδιων και εξωτερικών αντιγόνων και οδηγεί σε ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων (Yirmiya και Goshen 2011). Η έκφραση των πρωτεϊνών HLA-DR στην επιφάνεια των μονοκυττάρων αντανakλά το στάδιο ενεργοποίησης αυτών των κυττάρων (Kanakoudi-Tsakalidou και συν. 2001). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το ΜΣΙ όπως και οι ανοσολογικοί υποδοχείς του παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, και ότι ίσως συμμετέχουν στη φυσιολογική εξουδετέρωση ακατάλληλων προσεκβολών, με τρόπο παρόμοιο με τον ανοσολογικό τους ρόλο. Επιπλέον, μόρια του ΜΣΙ των νευρώνων ρυθμίζουν τη βασική συναπτική λειτουργία (Boulanger, 2009).

5. Κυτοκίνες

Οι κυτοκίνες και οι υποδοχείς τους παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και στην ομοίωση, καθώς και στην παθογένεση όγκων και στις αυτοάνοσες νόσους (Raman και συν. 2011). Παίζουν επίσης ρόλο στην ανάπτυξη και τη διατήρηση της φυσικής και επίκτητης ανοσίας, στην επούλωση πληγών και στην αγγειογένεση. Οι κυτοκίνες είναι μια ομάδα πρωτεϊνικών διαβιβαστών, που περιλαμβάνει τις ιντερλευκίνες, τις ιντερφερόνες και τους παράγοντες ανάπτυξης αποικιών κυττάρων. Έχουν ποικίλες δράσεις όπως η επαγωγή της δημιουργίας αποικιών κυττάρων, όπως ο GM-CSF (colony stimulating factor) και της ανάπτυξης ειδικών τύπων κυττάρων όπως ο παράγοντας ανάπτυξης αιμοπεταλίων PDGF (Stites και συν. 1997). Σημαντικός ρόλος είναι ο ανοσορυθμιστικός: ορισμένες κυτοκίνες παράγονται μετά από αντιγονικό ερεθισμό λεμφοκυττάρων, όπως οι IL-4, IL-10, IL-5, IFN γ . Τέλος κάποιες από αυτές επάγουν τη φυσική ανοσία όπως η IFN α .

Οι κυτοκίνες και οι υποδοχείς τους εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα στον υγιή εγκέφαλο (Yirmiya και Goshen 2011). Παράγονται από νευρώνες και γλοιακά κύτταρα και επηρεάζουν τη δράση αυτών των κυττάρων, ενώ η δράση των νευρώνων ρυθμίζει την παραγωγή και έκκριση των κυτοκινών. Υπάρχει η άποψη ότι οι κυτοκίνες έχουν νευρορυθμιστική δράση στον υγιή εγκέφαλο (Vitcovic και συν. 2000). Αυτή η άποψη

υποστηρίζεται επίσης από μελέτες που αποδεικνύουν τη συμμετοχή των κυττοκινών σε συγκεκριμένες φυσιολογικές λειτουργίες όπως ο ύπνος, ο πόνος και η απάντηση σε διάφορους ψυχολογικά στρεσογόνους παράγοντες. Επίσης παίζουν σημαντικό ρόλο στη νευρωνική πλαστικότητα (Kueger και συν. 2001, Opp 2005, Wolf και συν. 2003, Goshen and Yirmiya, 2009).

III. ΑΠΟΠΤΩΣΗ / ΝΕΚΡΩΣΗ

1. Γενικά

Η απόπτωση είναι η διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που παρατηρείται σε πολυκύτταρους οργανισμούς. Διάφορα βιοχημικά γεγονότα οδηγούν σε χαρακτηριστικές κυτταρικές μεταβολές και στον κυτταρικό θάνατο (Green and Douglas 2011). Παρατηρείται συρρίκνωση των κυττάρων, διάσπαση του πυρήνα, συμπύκνωση της χρωματίνης και κατακερματισμός του DNA. Σε αντίθεση με τη νέκρωση μέσω της απόπτωσης τα κύτταρα διασπώνται σε μικρότερα τμήματα που λέγονται αποπτωτικά σωματίδια, τα οποία απομακρύνονται γρήγορα από τα φαγοκύτταρα, πριν από την έκχυση των περιεχομένων του κυττάρου στο περιβάλλον η οποία μπορεί να προκαλέσει βλάβη (Alberts και συν. 2008). Μία άλλη διαφορά από τη νέκρωση είναι πως η απόπτωση σε γενικές γραμμές είναι χρήσιμη στον κύκλο της ζωής του οργανισμού. Η νέκρωση είναι ένα είδος τραυματικού κυτταρικού θανάτου που προκαλείται λόγω οξείας κυτταρικής βλάβης (Karam 2009). Διαταραχές στη λειτουργία της απόπτωσης έχουν παρατηρηθεί σε διάφορες νόσους, π.χ. μη φυσιολογική αύξησή της προκαλεί ατροφία ενώ ο ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός σχετίζεται με τον καρκίνο.

Η διαδικασία της απόπτωσης ελέγχεται από διάφορα κυτταρικά μηνύματα τα οποία μπορεί να είναι είτε εξωκυττάρια όπως τοξίνες, ορμόνες, αυξητικοί παράγοντες, NO και κυτοκίνες οπότε επιδρούν στην απόπτωση θετικά ή αρνητικά, είτε ενδοκυττάρια (Poron και συν. 2002) Η απόπτωση μπορεί να ενεργοποιηθεί ως απάντηση στο stress. Για παράδειγμα η πρόσδεση γλυκοκορτικοειδών σε πυρηνικούς υποδοχείς, η ζέστη, η ακτινοβολία, η έλλειψη θρεπτικού υλικού, η μόλυνση με ιό, η υποξία και η αυξημένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση Ca^{++} μπορούν, μέσω βλάβης στη μεμβράνη, να ενεργοποιήσουν την έκλυση ενδοκυττάρων αποπτωτικών σημάτων από ένα κύτταρο που έχει υποστεί βλάβη (Cotran και συν. 1998, Mattson και Chan 2003). Τα κύτταρα που βρίσκονται σε πρόιμη απόπτωση χάνουν τη μεμβρανική τους ασυμμετρία πριν παρουσιαστεί η βλάβη της μεμβράνης (Schutte et al., 1998). Πριν τα ένζυμα επισπεύσουν τη διαδικασία του κυτταρικού θανάτου τα αποπτωτικά

μηνύματα πρέπει να ενεργοποιήσουν τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες που θα ξεκινήσουν την αποπτωτική οδό. Στη συνέχεια είτε ξεκινάει η διαδικασία του κυτταρικού θανάτου ή η διαδικασία σταματάει εάν το κύτταρο δεν χρειάζεται πλέον να πεθάνει.

2. Πρωτεΐνη 14-3-3

Η ομάδα πρωτεϊνών 14-3-3 είναι κομβικοί ρυθμιστές πολλαπλών βασικών κυτταρικών λειτουργιών και φαίνονται να παίζουν εξέχοντα ρόλο στην καλή λειτουργία των ευκαρυωτικών κυττάρων. Έχουν τη δυνατότητα να συνδέονται με ποικίλες πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στην αποστολή μηνυμάτων, όπως οι κινάσες, οι φωσφατάσες και οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς (Fu και συν. 2000). Εμπλέκονται στη διαβίβαση ενδοκυττάρων σημάτων (Brummer και συν. 2008, Mackintosh 2004, Peters και Smithgall 1999) στον κυτταρικό κύκλο (Hermeking και Benzinger 2006), την απόπτωση (Porter και συν. 2006), στη μεταφορά πρωτεϊνών (Lin και συν. 2009), σε κυτταρικό στρες και σε κακοήγη εξαλλαγή (Tzivion και συν. 2006). Στα θηλαστικά αποτελούνται από 7 ισομορφές (β, γ, ε, σ, ζ, τ, και η) κάθε μια από τις οποίες εκφράζονται από ξεχωριστό γονίδιο. Τα μόρια 14-3-3 σχηματίζουν ομο-/ετερο- διμερή που αλληλεπιδρούν με πλείστα ενδοκυττάρια μόρια με διαφορετικές λειτουργίες. Στις κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις ανιχνεύονται στο ENY και σχετίζονται με τη βαρύτητα της βλάβης

Οι πρωτεΐνες 14-3-3 έχουν εμπλακεί στην παθοφυσιολογία αρκετών νόσων τόσο του ΚΝΣ όσο και άλλων συστημάτων και έχει βρεθεί ότι αυξάνουν την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Tau (Sluchanko και συν. 2009). Η υπερφωσφορυλίωση αυτής της πρωτεΐνης αναστέλλει την φυσιολογική της λειτουργία προκαλώντας μοριακή αστάθεια και υπερελίκωση που καταλήγει στον νευροεκφυλισμό και στην δημιουργία των νευροεκφυλιστικών πλακών της νόσου Alzheimer (Sugimori και συν. 2007). Επιπλέον οι 14-3-3 πρωτεΐνες προστατεύουν την πρωτεΐνη Tau από την διορθωτική φωσφορυλίωση αλλά και αποκαλύπτουν νέες περιοχές για εκ νέου φωσφορυλίωση (Agarwal-Mawal και συν. 2003). Εκτός από τις νευροεκφυλιστικές και γενετικά κληρονομούμενες νόσους οι 14-3-3 πρωτεΐνες έχουν βρεθεί και σε οξεία συμβάντα του εγκεφάλου. Έτσι σε *in vitro* καλλιέργειες νευρώνων και αστροκυττάρων βρέθηκε ότι μετά από ισχαιμία τα επίπεδα της 14-3-3 αυξήθηκαν από την πρώτη ώρα και μέγιστο την 4^η ώρα μετά την ισχαιμία (Chen και συν. 2003). Επιπλέον σε *in vivo* μοντέλο ισχαιμικής νέκρωσης και κρανιοεγκεφαλικής κάκωσης σε επίμυες βρέθηκε ότι οι ισομορφές 14-3-3β και 14-3-3ζ αποτελούν δείκτες κυτταρικής

νέκρωσης και η παρουσία τους στο ENY σχετίζεται αναλογικά με τον βαθμό της βλάβης στον εγκέφαλο (Siman και συν. 2004).

Οι 14-3-3 πρωτεΐνες εμπλέκονται στα διάφορα βιοχημικά μονοπάτια της απόπτωσης. Η ενεργοποιημένη κασπάση 3 αποκόπτει την N-τελική περιοχή της μιτωτικά-ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης (mitogen-activated protein kinase MAPK) και την κινάση της εξωκυττάρια-ενεργοποιημένης κινάσης (MEKK1) γεγονός που οδηγεί σε απόπτωση. Έχει βρεθεί ότι οι 14-3-3 εμπλέκονται στον ανώτερο μηχανισμό και δεσμεύονται με την MEKK1 (Beyaert και συν. 2000).

IV. ΣΧΕΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Αναφέρθηκε και προηγουμένως η εκτενής αναθεώρηση της άποψης πως ο ΑΕΦ υπό φυσιολογικές συνθήκες αποκλείει πλήρως το ΚΝΣ από τον υπόλοιπο οργανισμό, αποτελώντας έτσι ένα φυσικό και μεταβολικό φράγμα που απομονώνει το ΚΝΣ από τη συστηματική κυκλοφορία προκειμένου να διασφαλίσει το απαραίτητο σταθερό περιβάλλον για την βέλτιστη λειτουργικότητα των νευρώνων (Cotterale και συν. 2007). Η εικόνα του νευρικού και του ανοσολογικού συστήματος ως δύο πλήρως διακριτών συστημάτων έχει αλλάξει σημαντικά τις δύο τελευταίες δεκαετίες καθώς υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι τα δύο συστήματα αλληλορυθμίζονται. Έτσι αναπτύχθηκε η έννοια της νευροανοσολογίας, κατά την οποία ξεκάθαρα ανοσολογικές ή νευρολογικές δράσεις είναι τα άκρα ενός βιολογικού συνεχούς.

Το νευροανοσολογικό σύστημα αναγνωρίζεται ως ένα ενοποιημένο σύστημα με κοινά μόρια-αγγελιοφόρους, υποδοχείς και μόρια προσκόλλησης που επιτρέπουν την αμφίδρομη επικοινωνία (Nakanishi και Furuno 2008). Για παράδειγμα η ενεργοποίηση του ΚΝΣ με ένεση λιποπολυσακχαριδίου το οποίο είναι ερέθισμα για το ΑΣ ή με προφλεγμονώδεις κυττοκίνες (IL-1β, IL6 ή TNF) οδηγεί σε ταχεία αύξηση του ρυθμού των νευρικών ώσεων του σπλήνα από το συμπαθητικό σύστημα (Felten και συν. 1993). Τα ανοσοκύτταρα μεταναστεύουν στο ΚΝΣ και οι αμφίδρομες νευροανοσολογικές αλληλεπιδράσεις είναι ουσιώδεις, τόσο κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής εποπτείας του ΚΝΣ όσο και σε συνθήκες φλεγμονής (Greenwood και συν. 2011). Η συνομιλία μεταξύ των ανοσοκυττάρων και του ΚΝΣ καθορίζεται από πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις και τα ανοσοκύτταρα εκκρίνουν νευροπροστατευτικά αλλά και νευροτοξικά μόρια (Amor και συν. 2010, Teeling και Perry 2009). Η ανοσολογική ενεργοποίηση μέσα στο ΚΝΣ σχετίζεται με

νευρωνική βλάβη και χαρακτηρίζει την ισχαιμία, τις νευροεκφυλιστικές βλάβες, τις φλεγμονές, το τραύμα και την ενδεγκεφαλική αιμορραγία (Amor και συν. 2010).

Το νευρικό σύστημα μπορεί να ενεργοποιήσει ή να αναστείλει τη δραστηριότητα τόσο της φυσικής όσο και της επίκτητης ανοσίας μέσω ορμονικής ή νευρικής δράσης, ενώ το ανοσολογικό μπορεί να επιδράσει στη δραστηριότητα του νευρικού μέσω της έκκρισης κυττοκινών. Αυτό ισχύει τόσο για το κεντρικό όσο και για το περιφερικό νευρικό σύστημα (Engelhardt και Ransohoff 2005, Brogden και συν. 2005, Eskandari και Sternberg 2002). Συγκεκριμένα η ενεργοποίηση του συμπαθητικού συστήματος προκαλεί λευκοκυττάρωση, λεμφοπενία και αναστολή των κυττάρων φυσικών φονέων του ανοσολογικού συστήματος. Παράλληλα, τα κύρια ανοσορυθμιστικά όργανα (λεμφαδένες, θύμος, σπλήνας, πλάκες του Payer) νευρώνονται από μεγάλο αριθμό αυτόνομων ινών, υποδηλώνοντας έτσι την άμεση εξάρτηση του ανοσολογικού συστήματος από το αυτόνομο νευρικό σύστημα (Stites και συν. 1997). Νευρώνες του συμπαθητικού ΝΣ μπορούν να ενεργοποιήσουν Β κύτταρα και T_H1-βοηθητικά κύτταρα (T_H1) μέσω της ενεργοποίησης β-αδρενεργικών υποδοχέων και υποστηρίζουν την ανοσολογική απόκριση των T_H2 (Kohm και Sanders 2000, Elenkov και συν. 2000). Στα περιφερικά λεμφικά όργανα οι νευρικές απολήξεις είναι σε άμεση συνάφεια με τα T και τα μαστικά κύτταρα και εκεί φαίνονται να δημιουργούνται δομές που μοιάζουν με συνάψεις, όπως πάχυνση της προσυναπτικής μεμβράνης και συγκέντρωση τοπικά κυστιδίων που περιέχουν νευροδιαβιβαστές. Αυτό το σημείο επαφής μεταξύ των νευρών και των ανοσολογικών κυττάρων λέγεται νευρο-ανοσολογική σύναψη (Tournier και συν. 2003).

Ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα εισέρχονται στο παρέγχυμα του ΚΝΣ ανεξαρτήτως της αντιγονικής τους ειδικότητας αλλά μόνο τα T-κύτταρα που αντιδρούν σε αντιγόνο του ΚΝΣ φαίνεται να παραμένουν (Hickey και συν. 1991). Τα T κύτταρα που αντιδρούν σε αντιγόνα του ΚΝΣ όπως η βασική πρωτεΐνη της μυελίνης (MBP) μπορούν να προκαλέσουν σε ποντίκια την Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα (ΠΑΕ), που χρησιμοποιείται σαν μοντέλο μελέτης της Σκλήρυνσης κατά Πλάκας (ΣκΠ). Έχει βρεθεί ότι αντί-MBP T κύτταρα συμμετέχουν στη ΣκΠ (Ota και συν. 1990, Martin 1997). Παρά το παθογενετικό τους δυναμικό αντί-MBP T κύτταρα υπάρχουν στο ανοσολογικό σύστημα φυσιολογικών ατόμων (Martin και συν. 1990). Παρατηρείται όμως ότι τα ενεργοποιημένα T κύτταρα που περιφέρονται στο φυσιολογικό ΚΝΣ συγκεντρώνονται παροδικά σε σημεία βλάβης στη λευκή ουσία (Hirschberg και συν. 1998). Μεταξύ άλλων οι Moalem και συν. το 1999 έδειξαν ότι τα αυτοάνοσα T κύτταρα μπορούν να ασκήσουν νευροπροστατευτική δράση στο τραύμα του ΚΝΣ, μέσω προστασίας από δευτερογενή εκφύλιση των αξόνων.

Ένα ακόμα στοιχείο που συνδέει τα δύο συστήματα είναι η χρήση κοινών ουσιών. Οι νευροδιαβιβαστές αρχικά θεωρήθηκαν ως μόρια εκκρινόμενα αποκλειστικά από τους νευρώνες για την ενεργοποίηση ή αναστολή της νευρικής λειτουργίας. Είναι γνωστό ότι τα T κύτταρα παράγουν αρκετούς νευροδιαβιβαστές (π.χ. ντοπαμίνη, επινεφρίνη, νορεπινεφρίνη, ακετυλοχολίνη, σεροτονίνη, σωματοστατίνη) αυτόματα, είτε μετά από επαγωγή από εξωτερικό ερέθισμα. Οι νευροδιαβιβαστές προσδένονται σε υποδοχείς των T κυττάρων (TCRs) και άμεσα ενεργοποιούν ή καταστέλουν τις δράσεις των T κυττάρων (Levitte 2008). Οι TCRs των νευροδιαβιβαστών ρυθμίζονται μέσω ενεργοποίησης από κυττοκίνες ή από τους ίδιους τους νευροδιαβιβαστές. Η τελική δράση του νευροδιαβιβαστή στο λεμφοκύτταρο εξαρτάται από πολλούς παράγοντες: από το στάδιο ηρεμίας ή ενεργοποίησης του T κυττάρου από αντιγόνο, μιτογόνο ή κυττοκίνη, από το υποείδος του κυττάρου (CD4, CD8, T_H1, T_H2 κλπ), από τη δόση του νευροδιαβιβαστή, από τους ακριβείς υποδοχείς που εκφράζει το συγκεκριμένο κύτταρο και από τις κυττοκίνες του μικροπεριβάλλοντος. Όλοι αυτοί οι παράγοντες είναι καθοριστικοί και επιδρούν στην εκτέλεση των εξειδικευμένων δράσεων των T-κυττάρων, όπως η έκκριση κυττοκινών, η προσκόλληση στο εξωκυττάριο στρώμα, η χημειοτακτική μετανάστευση και επιστροφή σε συγκεκριμένα όργανα, η κυτταροτοξικότητα, ο πολλαπλασιασμός, η έκφραση υποδοχέων κ.α. (Levitte 2000, 2001, 1998, Levitte και συν. 1998, Chen και συν. 2002, Ganor 2003). Παρόμοια δράση ασκείται από τους νευροδιαβιβαστές στα B λεμφοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα, κύτταρα φυσικούς φονείς και μαστικά κύτταρα (Levitte 2008). Η έκκριση αυτών των ουσιών μπορεί να επηρεάσει τη δράση των T κυττάρων αυτοκρινικά ή παρακρινικά και επίσης να χρησιμοποιηθεί στην επικοινωνία μεταξύ των T κυττάρων με τους νευρώνες και τα γλοιακά κύτταρα όταν εισέρχονται στον εγκέφαλο και χρειάζεται να επικοινωνήσουν και να συνεργαστούν μαζί τους, π.χ. κατά τη διάρκεια μιας λοίμωξης.

Τα T λεμφοκύτταρα εκτίθενται στη δράση των νευροδιαβιβαστών κατ' αρχήν στον εγκέφαλο, καθώς τα ενεργοποιημένα T κύτταρα και λιγότερο τα T κύτταρα ηρεμίας συχνά εισέρχονται στο ΚΝΣ μέσω του ΑΕΦ τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές συνθήκες. Στα λεμφικά όργανα (θύμος, σπλήνας, λεμφαδένες, μυελός των οστών, έντερο) τα νεύρα εκλύουν μια ποικιλία νευροδιαβιβαστών και νευροπεπτιδίων, που έρχονται σε άμεση επαφή με μεμονωμένα κύτταρα όπως T και B κύτταρα (Weihe και συν. 1991). Ένας άλλος τύπος συνάντησης είναι το αίμα, καθώς τα αιμοφόρα αγγεία έχουν επίσης εκτεταμένη εννεύρωση. Τέλος τα T κύτταρα περνάνε από όλα τα όργανα κατά τη διάρκεια ανοσολογικής επιτήρησης ρουτίνας και όλα τα όργανα νευρώνονται από το ΝΣ.

Οι νευροδιαβιβαστές του συμπαθητικού συστήματος μπορούν να καταστείλουν τον λεμφοκυτταρικό πολλαπλασιασμό που παρατηρείται σαν απάντηση στα αντιγόνα που εισέρχονται στον οργανισμό, αναστέλλοντας έμμεσα τις αντιδράσεις των βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων (Murray και συν. 1992). Η ανασταλτική δράση του συστήματος της σεροτονίνης στην έκφραση του ΜΣΙ που μεσολαβείται από την IFN- γ και στον πολλαπλασιασμό των Τ λεμφοκυττάρων μέσω μιτογόνων έχει βρεθεί σε πειραματικές μελέτες (Irwin 1995). Μελέτες έδειξαν την παρουσία IL-2, TNF α και ιντερφερόνης όπως και των υποδοχέων τους στο νευροενδοκρινικό σύστημα (Smith 1992).

Τα λεμφοκύτταρα δέχονται μηνύματα από τους συμπαθητικούς νευρώνες μέσω σύνδεσης σε αδρενεργικούς υποδοχείς νοραδρεναλίνης, αδρεναλίνης και ντοπαμίνης, ενώ αυτοί οι υποδοχείς είναι λειτουργικής σημασίας για τη ρύθμιση της κυτταρικής ανοσίας. Μελέτες έδειξαν πως σε συγκαλλιέργειες νευρώνων με μονοκύτταρα η έκφραση των ενδοκυττάρων μορίων προσκόλλησης ICAM-1 (intracellular adhesion molecules) που βρίσκονται στα νευρικά κύτταρα αυξάνεται με την εξωγενή προσθήκη του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF α), της ιντερλευκίνης-1 (IL-1) και της ιντερφερόνης- γ (IFN- γ) (Héry και συν. 1995). Υπάρχει αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ της σεροτονινεργικής συγκέντρωσης στον εγκέφαλο και της σύνθεσης αντισωμάτων (Devoino και συν. 1970). Πέραν του ανοσολογικού τους ρόλου, οι κυτοκίνες θεωρούνται σημαντικοί παράγοντες για τον έλεγχο της εγκεφαλικής λειτουργίας και πιστεύεται ότι είναι διαμεσολαβητές των αλληλεπιδράσεων εγκεφάλου και ανοσολογικού συστήματος.

Ένα σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων του νευρικού και του ανοσολογικού συστήματος είναι τα πειραματικά μοντέλα συγκαλλιέργειών νευρώνων και λεμφοκυττάρων. Η δημιουργία μοντέλων συγκαλλιέργειας νευρικών κυττάρων και αστροκυττάρων είναι σημαντική για τη μελέτη νόσων όπως η ΣκΠ, το σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας, ο καρκίνος και άλλες. Το 1969 οι Halpern και συν. έδειξαν ότι λεμφοκύτταρα ασθενών με ΣκΠ κατέστρεφαν νευρώνες με τους οποίους είχαν τοποθετηθεί σε συγκαλλιέργεια, ενώ ο Hughes το 1967 σε μελέτη νευρώνων παρεγκεφαλίδας αρουραίου σε καλλιέργεια, παρατήρησε πως ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα εισέβαλαν στα σώματα των νευρώνων. Η απομυελινωτική δράση των λεμφοκυττάρων εξετάστηκε στις καλλιέργειες νευρικών κυττάρων (Gervasieva 1973). Συγχρόνως διαπιστώθηκε και ο ρόλος των λεμφοκυττάρων στην επιβίωση των νευρώνων, όποτε παρατηρήθηκε η ευοδωτική δράση τους μέσω του nerve growth factor (NGF) σε νευρώνες του συμπαθητικού νευρικού συστήματος (Gozes και συν. 1982) (μοντέλα καλλιέργειών). Οι ποικίλες δράσεις των ανοσοκυττάρων στα νευρικά κύτταρα συνέχισαν να διερευνώνται (McLaurin και συν. 1995),

καθώς επίσης και οι τρόποι επικοινωνίας μεταξύ τους και οι παράγοντες που συμμετέχουν σε αυτή την επικοινωνία και μεσολαβούν τις διάφορες δράσεις (Héry και συν. 1995, D'Souza και συν. 1995). Ανθρώπινα εμβρυϊκά νευρικά κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν σε συγκαλλιέργειες με μονοκύτταρα (Tardieu και συν. 1992). Καθώς ο ρόλος των γλοιακών κυττάρων στην παθοφυσιολογία νόσων όπως το AIDS (Boutet και συν. 2001) και η χρόνια προοδευτική μυελοπάθεια (Akaoka και συν. 2001) έγινε περισσότερο εμφανής, η ακριβής αλληλεπίδραση των κυττάρων και οι ρόλοι τους στις νόσους διερευνήθηκαν περαιτέρω με αυτά τα μοντέλα. Αυτές οι καλλιέργειες οδήγησαν στη διαπίστωση της διαφορετικής ευαλωτότητας ανθρώπινων νευρώνων και γλοίας στα λεμφοκύτταρα (Giuliani και συν. 2003), καθώς στον εντοπισμό των ουσιών που διαμεσολαβούν αυτές τις δράσεις (Haile και συν. 2011). Η έρευνα για την αλληλεπίδραση των κυττάρων του ΚΝΣ και του ανοσολογικού συστήματος μέσω συγκαλλιέργειών έχει ήδη χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία βλαβών του νωτιαίου μυελού (Moniglia και συν. 2006).

V. ΨΥΧΟΝΕΥΡΟΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ

Όπως προειπώθηκε, η σχέση μεταξύ του ΚΝΣ και του ανοσολογικού συστήματος είναι στενή και τα ερευνητικά στοιχεία αυξάνονται διαρκώς. Σε διάφορες νευρολογικές και ψυχιατρικές νόσους παρατηρούνται διαταραχές στο μεταβολισμό και στις κυτταρικές λειτουργίες του ΚΝΣ, καθώς και διαταραχές των συστημάτων νευροδιαβιβαστών και ορμονών. Παράλληλα διαπιστώνονται αλλαγές στο μεταβολισμό των λεμφοκυττάρων, οδηγώντας στο ερώτημα εάν τα λεμφοκύτταρα αντικατοπτρίζουν το μεταβολισμό των κυττάρων του εγκεφάλου και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μελέτες ψυχιατρικών νόσων (Gladkevich και συν. 2004).

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δύο δεκαετιών έγινε εμφανές ότι το ΑΣ παίζει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της μνήμης, της μάθησης και της νευρωνικής πλαστικότητας (Yirmiya και Goshen 2011). Υπό φυσιολογικές συνθήκες ηρεμίας οι ανοσολογικοί μηχανισμοί ενεργοποιούνται από περιβαλλοντικά ή ψυχολογικά ερεθίσματα και ρυθμίζουν την αναδιαμόρφωση των νευρωνικών κυκλωμάτων. Έτσι επάγουν την παγίωση της μνήμης, τη νευρογένεση και την μακροπρόθεσμη ενδυνάμωση του ιπποκάμπου (long term potentiation). Αυτές οι ευεργετικές δράσεις του ΑΣ μεσολαβούνται από σύμπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων του εγκεφάλου με ανοσολογικές δράσεις (ειδικά μικρογλοιακά κύτταρα και αστροκύτταρα), περιφερικών ανοσοκυττάρων (ειδικά T κύτταρα και μακροφάγα), νευρώνων και πρόδρομων νευρικών κυττάρων (Luo και O'Leary 2005).

Αυτές οι αλληλεπιδράσεις συνεπάγονται την απόκριση μη νευρωνικών κυττάρων σε κλασσικούς νευροδιαβιβαστές (π.χ. γλουταμικό και μονοαμίνες) και ορμόνες (π.χ. γλυκοκορτικοειδή), καθώς και την έκκριση και την απόκριση των νευρώνων και των γλοιακών κυττάρων σε χαμηλά επίπεδα φλεγμονωδών κυττοκινών όπως οι ιντερλευκίνες 1 και 6 και ο TNFα (Besedovsky και Del Rey 2007). Άλλοι παράγοντες που συμμετέχουν είναι οι προσταγλανδίνες και οι νευροτροφίνες. Σε συνθήκες κάτω από τις οποίες το ανοσολογικό σύστημα ενεργοποιείται έντονα από λοίμωξη ή τραύμα, καθώς και σε σοβαρές ή χρόνιες συνθήκες στρες, γλοιακά και άλλα ανοσοκύτταρα του εγκεφάλου εκκρίνουν υψηλά επίπεδα προ-φλεγμονωδών κυττοκινών και προσταγλανδινών (Hein and O'Banion, 2009). Η παραγωγή αυτών των διαμεσολαβητών φλεγμονής διαταράσσει την ευαίσθητη ισορροπία που χρειάζεται για τις νευροφυσιολογικές δράσεις των ανοσολογικών διαδικασιών και έχει βλαπτική επίδραση στη μνήμη, τη νευρωνική πλαστικότητα και τη νευρογένεση. Αυτά τα αποτελέσματα μεσολαβούνται από υπερδιέγερση των νευρώνων που προκαλείται από τη φλεγμονή με ακόλουθη μειωμένη παραγωγή νευροτροφινών και άλλων μορίων που σχετίζονται με την νευροπλαστικότητα. Έτσι επάγονται διάφορες νευροπαθολογικές διαδικασίες που σχετίζονται με τη φυσιολογική γήρανση όπως και με νευροεκφυλιστικές και νευροψυχιατρικές νόσους (Yirmiya και Goshen 2011).

Τα δεδομένα που υποδεικνύουν τη συμμετοχή του ανοσολογικού συστήματος στην κατάθλιψη έχουν αυξηθεί σημαντικά τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Τα στοιχεία που προκύπτουν φαίνονται να ανήκουν σε δύο φαινομενικά αντίθετες ομάδες παρατηρήσεων (Blume και συν. 2011). Η πρώτη ομάδα δεδομένων δείχνει ανοσολογική ενεργοποίηση στην κατάθλιψη με πολλαπλασιασμό ανοσοκυττάρων και αυξημένη παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών (Dantzer και συν. 1999, Evans και συν. 2005, Miller και συν. 2009, Raison και συν. 2006). Οι έρευνες έχουν δείξει αυξημένους εργαστηριακούς δείκτες φλεγμονής σε καταθλιπτικούς ασθενείς, την επαγωγή συμπτωμάτων κατάθλιψης με την χορήγηση προφλεγμονωδών κυττοκινών σε ανθρώπους και τη συχνή συννοσηρότητα της κατάθλιψης με νόσους που είτε είναι αυτοάνοσες (π.χ. ΣκΠ, ρευματοειδής αρθρίτιδα) ή στις οποίες η «ανοσολογική ενεργοποίηση» θεωρείται ότι συνεισφέρει σημαντικά (στεφανιαία νόσος). Διαπιστώθηκε πως, όταν αυτές οι νόσοι επιπλέκονται από κατάθλιψη, έχουν αρνητική πρόγνωση (Capuron και συν. 2001, Capuron και συν. 2002a, Frasure-Smith και Lesperance 2008, Irwin και Miller 2007, Miller και συν. 2009, Raison και συν. 2006). Στην κατάθλιψη παρατηρείται αύξηση των CD4+ και αύξηση της αναλογίας των CD4+/CD8+ κυττάρων (Irwin 1995, Muller και συν. 1993). Οι σημαντικοί προφλεγμονώδεις δείκτες που βρέθηκαν αυξημένοι σε ασθενείς με μείζονα κατάθλιψη ήταν οι IL-1, IL-1R , sIL-2R , IL-6, IL-6R,

CRP, και ο TNFα (Dowlati και συν. 2010, Howren και συν. 2009, Maes και συν. 1991, Maes και συν. 1993α, Maes και συν. 1993β). Αυτές οι διαφορές παρέμειναν ακόμα και όταν συνυπολογίστηκε ο ρόλος παραγόντων όπως η ηλικία, το BMI, το φύλο, η χρήση φαρμάκων κ.α. (Blume και συν. 2011).

Μία δεύτερη ομάδα δεδομένων δείχνουν αντίθετα πως το στρες και η κατάθλιψη σχετίζονται με ανοσολογική καταστολή, με μειωμένο πολλαπλασιασμό των ανοσοκυττάρων και διαταραχή της φυσικής και της επίκτητης ανοσίας (Irwin και Miller 2007, Evans και συν. 2002, Kiecolt-Glasser και Glasser 2002, Spiegel και Giese-Davis 2003). Η μετα-ανάλυση των Zorilla και συν. (2001) έδειξε ότι σε ασθενείς με μείζονα κατάθλιψη ο πολλαπλασιασμός λεμφοκυττάρων μετά από έκθεση σε μιτογόνα είναι μειωμένος. Η χρόνια αλλά όχι η οξεία έκθεση των T-κυττάρων στον TNFα μειώνει την έκφραση και λειτουργία του υποδοχέα του T-κυττάρου CD3 και μειώνει την έκφραση της IL-2, μιας αυτοκρινικής κυτταροκίνης σημαντικής για την λεμφοκυτταρική ενεργοποίηση (Clark και συν. 2005). Δείκτες ανοσοκαταστολής (μειωμένη κυτταροτοξικότητα κυττάρων φυσικών φονέων και φλεγμονής και αύξηση IL-6, TNFα και CRP) έχουν επίσης σχετιστεί με κατάθλιψη (Blume και συν. 2011). Παρατηρείται συχνή συννοσηρότητα της κατάθλιψης με νόσους όπως καρδιοπάθειες, εγκεφαλικό, καρκίνος, AIDS), ενώ η κατάθλιψη είναι παράγοντας κινδύνου και αρνητικός προγνωστικός δείκτης για πολλές από αυτές τις νόσους. Η σχέση μεταξύ τους φαίνεται να είναι αμφίδρομη και πιθανόν να καθορίζεται από ανοσολογική δυσλειτουργία (Anishman και συν. 2008, Evans και συν. 2005). Σε ασθενείς με κίρρωση του ήπατος που είχαν καταθλιπτική και αγχώδη συμπτωματολογία διαπιστώθηκε αυξημένη αναλογία CD8+ T λεμφοκυττάρων (αλλά όχι CD4+ ή CD3+) σε σχέση με κίρρωτικούς ασθενείς χωρίς ψυχιατρική συμπτωματολογία (Ko και συν. 2013).

Τα στοιχεία που περιγράφονται ανωτέρω είναι ενδεικτικά της σχέσης μεταξύ της κατάθλιψης και δυσλειτουργίας του ανοσολογικού συστήματος. Ένα από τα ερωτήματα που προκύπτουν είναι αν οι δύο αυτές διεργασίες σχετίζονται αιτιολογικά και, εφ' όσον αυτό ισχύει, με ποιο τρόπο. Όπως είναι γνωστό, η ανεπαρκής λειτουργία των νοραδρενεργικών και σεροτονινεργικών απολήξεων από έλλειψη νοραδρεναλίνης και 5-HT έχει προταθεί σαν ένα εκ των στοιχείων παθοφυσιολογίας της νόσου, μετά την παρατήρηση ότι η χορήγηση ρεζεργπίνης σε υπερτασικούς οδήγησε σε καταθλιπτική συμπτωματολογία μέσω εκκένωσης των προσυναπτικών νευρώνων από τους νευροδιαβιβαστές αδρεναλίνη, νοραδρεναλίνη, ντοπαμίνη και σεροτονίνη (5-HT). Διαπιστώθηκε επίσης πως το αντιφυματικό ισονιαζίδη προκαλεί υπερθυμία παρεμποδίζοντας την απαμίνωση των μονοαμινών (Παράσχος 1998). Διαταραχές της σεροτονινεργικής δραστηριότητας έχουν αποδοθεί μεταξύ άλλων και στη

μειωμένη διαθεσιμότητα L-τρυπτοφάνης (πρόδρομη ουσία της 5-HT), αναστολή της σύνθεσης, έκκρισης, επαναπρόσληψης και μεταβολισμού της σεροτονίνης ή διαταραχές των υποδοχέων της σεροτονίνης (Maes και Meltzer 1995).

Οι υποδοχείς σεροτονίνης και οι αναστολείς επαναπρόσληψής της βρίσκονται σε όλα τα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος και η σεροτονίνη παίζει σημαντικό ρόλο στην επικοινωνία μεταξύ των ανοσοκυττάρων (Mossner και Lesch 1998). Οι νευροδιαβιβαστές μπορούν να καταστείλουν το λεμφοκυτταρικό πολλαπλασιασμό που παρατηρείται σαν απάντηση στα αντιγόνα που εισέρχονται στον οργανισμό, αναστέλλοντας έμμεσα τις αντιδράσεις των T_H λεμφοκυττάρων (Murray και συν. 1992). Η Levitte σε μια κριτική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας το 2008 αναφέρει αναλυτικά τις δράσεις της σεροτονίνης στα T λεμφοκύτταρα. Ένας πιθανός μηχανισμός που μπορεί να διαμεσολαβεί τη σχέση μεταξύ στρες και ανοσολογικής καταστολής είναι η χρόνια φλεγμονή, πιθανόν μέσω της δυσλειτουργίας των βοηθητικών T-κυττάρων (Kiecolt-Glaser και συν. 2003). Ορισμένες μελέτες έδειξαν πως η IL-1β και ο ανταγωνιστής του υποδοχέα της IL-1 παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της μείζονος κατάθλιψης και πως ευθύνονται για τις ψυχοσωματικές συνέπειες της κατάθλιψης (Licinio και Wong 1999). Η συσχέτιση της αυξημένης παραγωγής IL-6 *in vitro* με μειωμένα επίπεδα τρυπτοφάνης σε καταθλιπτικούς ασθενείς δίνει έμφαση στην επίδραση της IL-6 στο μεταβολισμό της σεροτονίνης. Αυτό το στοιχείο είναι ένδειξη πως η ανοσολογική λειτουργία υφίσταται συνολική βλάβη (Schlatter και συν. 2004). Σε πολλές μελέτες έγινε εμφανές πως ορισμένοι βιολογικοί δείκτες εμφανίζουν σταθερές μεταβολές στην κατάθλιψη. Αυτοί είναι: η μείωση του μεταφορέα της σεροτονίνης σε αιμοπετάλια και λεμφοκύτταρα, η υπερκορτιζολαιμία, η υποχοληστερολεμία, η μείωση του BDNF, η μείωση της CREB φωσφορυλίωσης και η αύξηση της IL-6 (Caruncho και Rivera-Baltanás 2010).

Ένας μηχανισμός που έχει προταθεί ότι συνδέει την κατάθλιψη με τη φλεγμονώδη διεργασία είναι ο ακόλουθος: η αυξημένη έκφραση του ενζύμου IDO (indoleamine 2,3 dioxygenase) οδηγεί σε καταστολή των T-κυττάρων (Blume και συν. 2011). Το IDO είναι ένα ένζυμο που συμμετέχει στο μεταβολισμό της τρυπτοφάνης. Η υπερέκφρασή του οδηγεί σε έκπλυση της τρυπτοφάνης και σε ενεργοποίηση του υποδοχέα του NMDA (Myint και συν. 2007). Δεδομένου ότι τόσο η σεροτονινεργική όσο και η γλουταματεργική δυσλειτουργία σχετίζονται με την παθοφυσιολογία της κατάθλιψης, η αυξημένη έκφραση του IDO έχει προταθεί ως σημαντικός μηχανισμός που συνδέει τις δύο διεργασίες (Capuron και συν. 2002b, Frenois και συν. 2007, Moreau και συν. 2005, Muller και Schwartz 2007, O'Connor και συν. 2009).

Ο ρόλος της σεροτονίνης έχει περαιτέρω διερευνηθεί και φαίνεται ότι η αυξημένη εξωκυττάρια 5-HT έχει ανοσοκατασταλτική δράση (Kubera και συν. 2000). Η περιφερική σεροτονίνη αποθηκεύεται σε ανοσοκύτταρα όπως τα T λεμφοκύτταρα και η μεταφορά της μέσα σε αυτά προάγεται από κυττοκίνες όπως IL-1, IFN- α , IFN- γ και TNF α (Janssen και συν. 2010). Η σύνθεση των IL-6, IL-10, IFN- γ και TNF α εξαρτάται από τα ενδοκυττάρια επίπεδα σεροτονίνης. Αρκετές προ-φλεγμονώδεις κυττοκίνες όπως οι IL-1, IFN- α , IFN- γ και TNF α αυξάνουν τη μεταφορά σεροτονίνης, μειώνοντας έτσι τα επίπεδά της στο αίμα (Wichers και Maes 2002).

Τα αντικαταθλιπτικά φάρμακα φαίνεται ότι εξομαλύνουν την ανοσολογική λειτουργία για κύτταρα και κυττοκίνες μέσω διαφόρων μηχανισμών: 1) μειώνουν την ικανότητα των ανοσοκυττάρων να παράγουν προ-φλεγμονώδεις κυττοκίνες 2) ενισχύουν την παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυττοκινών, 3) μειώνουν τα επίπεδα του μεταφορέα της σεροτονίνης τα οποία φαίνεται ότι συσχετίζονται με τα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Κάποιες έρευνες δείχνουν ότι η ανοσορρυθμιστική δράση των αντικαταθλιπτικών εξαρτάται από τη δράση τους σε T_H(1) κύτταρα (Diamond και συν. 2006, Tsao και συν. 2006).

Οι απαντήσεις των κυτταροκινών στα αντικαταθλιπτικά έχουν διερευνηθεί σε πολλές *in vitro* μελέτες. Τα σεροτονινεργικά αντικαταθλιπτικά αυξάνουν την έκλυση σεροτονίνης και αναστέλλουν την επαναπρόσληψη, προκαλώντας έκπλυση των ενδοκυττάρων και αύξηση των εξωκυττάρων επιπέδων της. Τα μειωμένα ενδοκυττάρια επίπεδα σεροτονίνης φαίνεται ότι μειώνουν τα επίπεδα κυττοκινών μέσω αναστολής της έκφρασης mRNA (Maes 2001). Οι αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SSRI) ασκούν ρυθμιστική (κυρίως ανασταλτική) δράση στην ενεργοποίηση ανοσολογικών παραμέτρων (Marazziti και συν. 2010) ενώ διαπιστώθηκε πως η θεραπεία καταθλιπτικών ασθενών με φλουοξετίνη σχετίστηκε με τη μείωση της IL-6 (Bengtsson και συν. 1992). Τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά ιμιπραμίνη και κλοπιπραμίνη και η σιταλοπράμη (SSRI) μειώνουν την παραγωγή των προφλεγμονωδών κυττοκινών IL-6, IL-1 β , TNF α , IL-2 και IFN- γ σε περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος υγιών εθελοντών (Xia και συν. 1996). Η κλομιπραμίνη, η σερτραλίνη και η τραζοδόνη είχαν παρόμοια αποτελέσματα μειώνοντας την παραγωγή των φλεγμονωδών κυττοκινών (IFN- γ) και αυξάνοντας τις αντιφλεγμονώδεις κυττοκίνες (IL-10) (Maes και συν. 1999) ενώ η μοκλοβεμίδη μείωσε κάποιες φλεγμονώδεις κυττοκίνες όπως IL-8, TNF- α και IL-10, αλλά όχι τις IL-6, IFN- γ και IL-Ra (Lin και συν. 2000).

Συνοπτικά, η κατάθλιψη χαρακτηρίζεται από διαταραχές σε έξι συνυφασμένες οδούς:

(1) Διαταραχή σε φλεγμονώδεις οδούς όπως φαίνεται από τα αυξημένα επίπεδα προφλεγμονωδών κυττοκινών π.χ. IL-1, TNF- α . (2) Ενεργοποίηση των ανοσολογικών οδών που διαμεσολαβούνται από κύτταρα, όπως υποδηλώνεται από την αυξημένη παραγωγή ιντερφερόνης γ και νεοπερίνης. (3) Αυξημένο κυτταρικό στρες με βλάβη σε DNA, πρωτεΐνες και μιτοχόνδρια. (4) Μειωμένα επίπεδα σημαντικών αντιοξειδωτικών ουσιών (5) Βλάβη στα μιτοχόνδρια και στο μιτοχονδριακό DNA και μειωμένη δραστηριότητα ενζύμων. (6) Προοδευτικός εκφυλισμός νευρώνων, απόπτωση και μειωμένη νευρογένεση και νευρωνική πλαστικότητα (Maes και συν. 2012). Οι ανωτέρω παρατηρήσεις έχουν γίνει σε μεγάλο βαθμό *in vitro*. Πολλά ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα, όπως με ποιο τρόπο τα δύο συστήματα αλληλεπιδρούν στο ΚΝΣ σε κυτταρικό επίπεδο και αν αυτή η αλληλεπίδραση παίζει ρόλο στην παθοφυσιολογία της κατάθλιψης. Η παρούσα μελέτη είναι μια προσπάθεια να δημιουργηθεί ένα μοντέλο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μελετηθεί αυτή ακριβώς η αλληλεπίδραση.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Όπως αναναφέρθηκε προηγουμένως το νευρικό και το ανοσολογικό σύστημα είναι σε διαρκή επικοινωνία. Κλινικές και πειραματικές μελέτες έχουν διερευνήσει αυτή τη σχέση, αλλά συνεχίζουν να υφίστανται ερωτήματα για τους πολλαπλούς τρόπους με τους οποίους αλληλεπιδρούν, τόσο υπό φυσιολογικές όσο και υπό παθολογικές συνθήκες. Ακολούθως, Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν:

- Η πρωτογενής καλλιέργεια νευρικών κυττάρων (νευρώνων και αστροκυττάρων) που έχουν ληφθεί από ενήλικες κατά τη διάρκεια νευροχειρουργικών επεμβάσεων καθώς και η λήψη και καλλιέργεια αυτόλογων λεμφοκυττάρων από τους ίδιους ασθενείς.
- Η συγκαλλιέργεια των νευρικών κυττάρων με αυτόλογα λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα, προκειμένου να εξεταστούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, όπως εκφράζονται από τη βιωσιμότητα, την απόπτωση, νέκρωση και την ενεργοποίηση των αυτών των κυττάρων.
- Η δημιουργία μίας συγκαλλιέργειας νευρικών κυττάρων με αυτόλογα λεμφοκύτταρα υπό συνθήκες έλλειψης μονοαμινών, προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση στα λεμφοκύτταρα.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Ι

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Υλικά

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην καλλιέργεια και στην ανοσοϊστοχημεία ήταν: εμβρυϊκός βόειος ορός (FBS), μέσο Neurobasal-A, συμπλήρωμα B27, πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (PEN/STREP) και L-Γλουταμίνη, φυσιολογικός ορός αιγός και βοός (NGS, FBS), αλβουμίνη βόειου ορού (BSA), Triton-X 100, παραφορμαλδεΰδη (PFA), μαύρο του Soudan B (SBB), phosphate buffered saline (PBS), τρυψίνη/EDTA και η πολυ-L-λυσίνη, αιθανόλη/οξικό οξύ, mouse anti-MAPa&b μονοκλωνικό αντισώματα και δευτερογενές anti-rabbit-FITC, rabbit anti-cow πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της GFAP πρωτεΐνης, rabbit anti-Tau πολυκλωνικό αντίσωμα. Χρησιμοποιήθηκαν τα δευτερογενή αντισώματα Alexa Fluor-594 mouse IgG, Alexa Fluor-488 mouse IgG₁, anti-rabbit-R-PE, χρώση πυρηνικού DNA DAPI (4', 6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride), Annexin-V/PI Apoptosis Detection Kit, αιμοσυγκολλητίνη Ulex Europeus, Η μέτρηση της μέσης έντασης φθορισμού των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε κυτταρομετρητή ροής COULTER® EPICS® XL-MCL™ που διαθέτε laser αργού 488nm. Τα δεδομένα αποδόθηκαν ως ποσοστιαίες αναλογίες, γεγονός που επέτρεψε την ποσοτική εκτίμηση της έκφρασης ανά κυτταρικό πληθυσμό καθώς και τον ταυτόχρονο χαρακτηρισμό τους σε υγιή, αποπτωτικά, και νεκρωτικά. Το ανάστροφο μικροσκόπιο ήταν DM-IL, Leica. Οι μελέτες ανοσοφθορισμού έγιναν με το Axiostar Zeiss Γερμανίας. Οι εικόνες μορφολογίας και φθορισμού των νευρικών κυττάρων που παρουσιάζονται εδώ συλλέχθηκαν σαν ψηφιακά στοιχεία, εκτός από τα στοιχεία MAP2a&b που προέκυψαν από σάρωση φωτογραφιών (scanned photographs). Η προσαρμογή των διαφορετικών εικόνων στα σχετικά πλαίσια απαιτήσε προσαρμογή των οπτικών τους χαρακτηριστικών, όπως η ένταση του φωτισμού και η αντίθεση φάσης (contrast).

2. Καλλιέργειες κυττάρων από ανθρώπινους ιστούς

2.1 Καλλιέργειες κυττάρων του ΚΝΣ

2.1.1 Λήψη δειγμάτων ΚΝΣ

Δείγματα από το ΚΝΣ ελήφθησαν από 77 νευροχειρουργικούς ασθενείς, σύμφωνα με τους κανόνες ηθικής και ασφάλειας των νοσοκομείων, κατά το χειρουργικό καθαρισμό αιματώματος, καλοήθους όγκου, ή επέμβασης για φαρμακοανθεκτική επιληψία. Όλες οι επεμβάσεις έγιναν για θεραπευτικό σκοπό και το όριο της χειρουργικής τομής (resection line)

δεν επεκτάθηκε πέρα από το σημείο που εξασφάλισε υγιή χειρουργικά όρια σε κάθε περίπτωση. Τα δείγματα προήλθαν από εγκεφαλικό φλοιό ή παρεγκεφαλίδα και δεν αφαιρέθηκε επιπλέον ιστός κατά τη διάρκεια καμίας από αυτές τις επεμβάσεις. Εξαιρέθηκαν από τη μελέτη 7 δείγματα λόγω ακόλουθης διάγνωσης κακοήθειας και 6 δείγματα λόγω έλλειψης επαρκών στοιχείων. Αναλυτικά τα στοιχεία φύλου, ηλικίας, αιτίας χειρουργείου και προέλευσης για τα 64 δείγματα που περιλήφθηκαν στη μελέτη βρίσκονται στον Πίνακα 1.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Χαρακτηριστικά νευροχειρουργικών ασθενών

	n	%
Αριθμός ασθενών	64	100
Ηλικία		
μέση	56,43 έτη	
εύρος	18-85 έτη	
Φύλο		
Γυναίκες	33	51,56%
Άνδρες	31	48,44%
Αιτία χειρουργείου		
Αφαίρεση καλοήθους όγκου	28	43,75%
Μηνιγγίωμα	21	
Νευρίνωμα	7	
Αιμορραγία	30	46,87%
Φαρμακοανθεκτική επιληψία	4	6,25%
Αδένωμα υπόφυσης	2	3,125%
Περιοχή λήψης δείγματος		
Φλοιός	51	79,68%
Παρεγκεφαλίδα/	13	20,32%
Γεφυροπαρεγκεφαλιδική γωνία		

2.1.2 Πρωτογενείς καλλιέργειες νευρικών κυττάρων

Πρωτογενείς καλλιέργειες νευρικών κυττάρων επιτεύχθηκαν από 29 (45,31%) δείγματα τα οποία προήλθαν από χειρουργικές επεμβάσεις για κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις (n=24), κατά τη διάρκεια εκτομής καλοήθους όγκου (n=4) και χειρουργικής θεραπείας επιληψίας (n=1). Ο ιστός του ΚΝΣ ζύγιζε κατά μέσο όρο 0.8 ± 0.5 g. Αμέσως μετά τη λήψη τους τα ιστοτεμάχια νευρικού ιστού τοποθετούνταν μέχρι την κατεργασία τους σε μέσο συντήρησης το οποίο διατηρούνταν στους 4°C και περιείχε αποστειρωμένο Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) με Ca^{+2} και Mg^{+2} , 1% PEN/STREP, 1% L-Γλουταμίνη, 5% FBS και 1U/ml Ηπαρίνη. Μέσα σε τέσσερις ώρες μεταφερόταν στο εργαστήριο όπου γινόταν η επεξεργασία των δειγμάτων υπό συνθήκες αποστείρωσης. Μετά την απομάκρυνση της μήνιγγας, των καυτηριασμένων περιοχών, καθώς και της λευκής ουσίας κάθε δείγματος, το δείγμα τεμαχιζόταν και καθαριζόταν με κρύο PBS χωρίς Ca^{2+} και Mg^{2+} και γινόταν επώαση με θρυψίνη (0,25% σε

PBS με EDTA) για την δημιουργία εναιωρήματος κυττάρων για 15 λεπτά στους 37°C. Η πέψη αναστελλόταν με HBSS με Ca^{2+} και Mg^{2+} που περιείχε 10% FBS. Μετά από διήθηση του εναιωρήματος μέσα από φίλτρο 100μm και φυγοκέντρηση στις 900rpm για 5 λεπτά το ίζημα των δειγμάτων επαναιωρούταν σε καλλιεργητικό μέσο Neurobasal-A με 2% συμπλήρωμα B27, 1% PEN/STREP, 1% L-Glut και 5% FBS. Η καταμέτρηση των βιώσιμων κυττάρων γινόταν με το αιμοκυτταρόμετρο κατόπιν χρώσης με μπλε του τρυπανίου. Ο μέσος όρος του αριθμού των κυττάρων από 17 δείγματα ήταν $3.1(\pm 1.4) \times 10^6$ κύτταρα ανά γραμμάριο ιστού. Στη συνέχεια τα κύτταρα επιστρώνονταν σε τρυβλία και καλυπτρίδες καλυμμένα με πολυ-L-λυσίνη (1μg/ml) σε συγκέντρωση 1000 κύτταρα ανά mm^2 και τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα με θερμοκρασία 37°C και σε ατμόσφαιρα 5% CO_2 , 95% αέρα. Οι καλλιέργειες των νευρικών κυττάρων διατηρήθηκαν σε καλλιεργητικό υλικό που είχε υψηλή συγκέντρωση σε γλυκόζη και συμπληρωμένο με αντιοξειδωτικά και χαμηλή συγκέντρωση 5% FBS χωρίς άλλα ορμονικά συμπληρώματα. Ανά τέσσερις ημέρες μετά την πρώτη επίστρωση γινόταν απομάκρυνση των εναιωρούμενων μη βιώσιμων κυττάρων και το καλλιεργητικό μέσο ανανεωνόταν κατά το ήμισυ. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων παρατηρούνταν με ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο.

2.1.3 Μορφολογικές και κυτταροσκελετικές μελέτες των νευρικών κυττάρων με χρώση ανοσοφθορισμού.

Η παρακολούθηση της κυτταρικής μορφολογίας όλων των πρωτογενών καλλιεργείων έγινε με το ανάστροφο μικροσκόπιο καθ' όλη τη διάρκεια των καλλιεργείων. Προκειμένου να ταυτοποιηθούν οι κυτταρικοί πληθυσμοί χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του ανοσοφθορισμού σε 8 πρωτογενείς καλλιέργειες σε διαδοχικά χρονικά σημεία (0-15 DIV). Οι διαφοροποιημένοι νευρώνες προσδιορίστηκαν μέσω των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών MAPa&b και Tau, οι οποίες εντοπίζονται στις σωματοδενδριτικές και αξονικές περιοχές των ώριμων νευρώνων. Τα αστροκύτταρα χαρακτηρίστηκαν μέσω της Glial fibrillary acidic protein (GFAP), μιας πρωτεΐνης που σχετίζεται με τον κυτταροσκελετό τους (Hammond et al 2002). Τα νευρικά κύτταρα καλλιεργήθηκαν πάνω σε καλυπτρίδες επιστρωμένες με πολυ-L-λυσίνη και μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα οξικού οξέος και αιθανόλης (1:9 v/v) για 15 λεπτά στους -20°C. Οι κυτταρικές μεμβράνες έγιναν διαπερατές με επώαση σε διάλυμα 0,5% Triton-X 100 για 5 λεπτά. Τα μη ειδικά σημεία πρόσδεσης ανεστάλησαν με διάλυμα 1% BSA για 1 ώρα και ακολούθησε επώαση για 24 ώρες σε υγρό περιβάλλον στους 4°C με τα πρωτογενή αντισώματα MAP2a&b (anti-microtubule associated protein 2 mouse clone HM-20, 1:100) και anti-Tau (rabbit polyclonal, 1:200) για την ταυτοποίηση των νευρώνων και

GFAP (anti-GFAP polyclonal rabbit, 1:100) για την ταυτοποίηση των αστρογλοιακών κυττάρων αντίστοιχα, με PBS που περιείχε 1%BSA. Μετά από τρεις πλύσεις με PBS ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με τα δευτερογενή αντισώματα Alexa-Fluor-594 IgG1 (1:200) για το MAP2a&b και anti-rabbit-FITC (1:40) για το GFAP και το Tau, ενώ και τα δύο είχαν διαλυθεί σε PBS που περιείχε 1%. Στις μελέτες διπλής σήμανσης ανοσοφθορισμού τα κύτταρα που προσκολλήθηκαν σε καλυπτρίδες με πολυ-L-λυσίνη μονιμοποιήθηκαν με παγωμένη μεθανόλη (10 λεπτά στους 4⁰C και έγιναν διαπερατά με 0.2%Triton-X100 (5 λεπτά). Μετά από ένα blocking step με 10%BSA για 30 λεπτά, τα κύτταρα επώαστηκαν κατά τη διάρκεια της νύχτας με mouse monoclonal anti-MAP2a&b (1:100) και μετά με δευτερογενές anti-mouse IgG-TRITC (1:100) για δύο ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα σημάνθηκαν με τα πολυκλωνικά αντισώματα rabbit anti-GFAP (1:100) και anti-rabbit IgG-FITC (1:100) για δύο ώρες. Τα πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα διαλύθηκαν σε 5%BSA που περιείχε PBS. Ακολούθησε η σήμανση των κυτταρικών πυρήνων με DAPI (2ng/μl) για 5 λεπτά. Το τελικό στάδιο ήταν η μονιμοποίηση των καλυπτρίδων. Για όλα τα πειράματα παρασκευάστηκαν δείγματα ελέγχου από τα οποία έλειπαν τα αντίστοιχα πρωτογενή αντισώματα. Μετά την ολοκλήρωση της χρώσης οι καλυπτρίδες εξετάστηκαν υπό το μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού Zeiss για να μελετηθεί η ποιότητα των κυτταρικών πληθυσμών στην καλλιέργεια. Η χρώση συναπτοφυσίνης έγινε ως εξής: οι καλλιέργειες μονιμοποιήθηκαν με 4% PFA για 20 λεπτά και παγωμένη μεθανόλη για 10 λεπτά. Η μη ειδική σύνδεση αντισωμάτων ανεστάλη με 5% NGS σε 0.1% Triton-X100 που περιείχε PBS.

2.1.4. Μελέτες έκφρασης του mRNA της N-cadherin.

Οι μελέτες έκφρασης του mRNA της N-cadherin έγιναν σε πρωτογενείς καλλιέργειες που προήλθαν από δείγματα εγκεφαλικού φλοιού 4 νευροχειρουργικών ασθενών που χειρουργήθηκαν για κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις. Γενετικό υλικό RNA απομονώθηκε από κύτταρα νευρωνικών-αστροκυτταρικών καλλιιεργειών, όπως και από εναιωρήματα κυττάρων του ΚΝΣ από τα οποία προέκυψαν οι καλλιέργειες. Τα νευρικά κύτταρα συλλέχθηκαν τόσο στην αρχή κάθε καλλιέργειας (κύτταρα που λήφθηκαν αμέσως μετά από το διαχωρισμό των δειγμάτων) και σε αντιπροσωπευτικές χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας (4, 7 και 14 μέρες σε καλλιέργεια). Για κάθε απομόνωση RNA χρησιμοποιήθηκαν 5x10⁴ κύτταρα. Η απομόνωση RNA πραγματοποιήθηκε με το GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit. Το ολικό RNA που προέκυψε από κάθε δείγμα επώαστηκε με εξανουκλεοτιδικούς εκκινητές (random hexanucleotide primers) και χρησιμοποιήθηκε σαν

μήτρα για τη σύνθεση cDNA με τη χρήση ανάστροφης μεταγραφάσης Superscript II και παρουσία ενζυμικού ρυθμιστικού διαλύματος και 2.5mM dNTPs και 100mM Dithiothreitol (θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, 42°C για 50 λεπτά και 70°C για 15 λεπτά). Το cDNA που προέκυψε χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του προϊόντος της N-cadherin με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR) και τη χρήση του ενζύμου Taq DNA πολυμεράση. Για τη μέθοδο αυτή σχεδιάστηκαν ζεύγη ειδικών εκκινητών συμπληρωματικών για την εξωκυτταρική (εξόνια 11-13) και την κυτταροπλασματική (εξόνια 15-16) περιοχή του γονιδίου της N-cadherin (σύνθεση από τη Sigma-Aldrich One Man LTD). Τα ζεύγη εκκινητών για την εξωκυτταρική περιοχή της N-cadherin ήταν 5'-CTACAATTGCTGTTTTGGACCG-3' (forward) και 5'-AATCCTGTCCACATCTGTGCAGT-3' (reverse); και για την κυτταροπλασματική περιοχή: 5'-GTTTGTGGTATGGATGAAACGC-3' (forward) και 5'-CTTGAGGAATTAAGGGAGCTCA-3' (reverse). Οι συνθήκες της PCR συμπεριλάμβαναν ένα αρχικό κύκλο μετουσίωσης του DNA (στους 95°C, για 5 λεπτά), τον οποίο ακολούθησαν 40 κύκλοι στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα, 56°C για 30 δευτερόλεπτα και 72°C για ένα λεπτό, και ένα τελικό στάδιο 10 λεπτών στους 72°C. Τα προϊόντα της PCR (349bp και 251bp για τις εξωκυτταρικές και κυτταροπλασματικές περιοχές της N-cadherin, αντίστοιχα) αναλύθηκαν σε πηκτή 2% αγαρόζης με χρώση βρωμιούχου εθιδίου. Κάθε προϊόν της PCR επιβεβαιώθηκε με ανάλυση της DNA ακολουθίας. Ως θετικό δείγμα ελέγχου της N-cadherin χρησιμοποιήθηκε το cDNA που προερχόταν από RNA καρκίνου του εντέρου, καθώς είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη αυτή εκφράζεται στον καρκίνο του εντέρου (Rosivatz και συν. 2004). Αντίστοιχα RNA από τις κυτταρικές σειρές HT29 και MCF7 χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό δείγμα ελέγχου. Τα ψευδώς θετικά σήματα αποκλείστηκαν με την παράλληλη χρήση δειγμάτων ελέγχου στα οποία παραλήφθηκε η ανάστροφη μεταγραφάση.

2.1.5 Προσδιορισμός ποσοστού νευρώνων και αστροκυττάρων με κυτταρομετρία ροής.

Για την ποσοστιαία εκτίμηση των κυτταρικών υποπληθυσμών σε *in vitro* συνθήκες χρησιμοποιήθηκε η κυτταρομετρία ροής, η οποία είναι η μέθοδος εκλογής για για το χαρακτηρισμό καλλιιεργειών νευρικών κυττάρων που προέρχονται από ετερογενείς πληθυσμούς (Sergent-Tanguy και συν. 2003, Murayama και συν. 2002, McLaren και συν. 2001). Τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από τα τρυβλία καλλιέργειας μηχανικά με 0.25% τρυψίνη/EDTA (η δυνατότητα πρόσδεσης των αντισωμάτων δεν επηρεάζεται από τη χρήση των ενζύμων Sergent-Tanguy και συν. 2003). Μετά από πλύση με PBS που περιείχε 2% FBS τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν (1000rpm για 5 λεπτά). Στη συνέχεια επαναιωρήθηκαν σε PBS

και μονιμοποιήθηκαν σε 4% PFA (15 λεπτά στους 4°C). Μετά από δύο ακόμα πλύσεις με PBS τα κύτταρα έγιναν διαπερατά με 0.1% Triton-X 100 (5 λεπτά). Τα κύτταρα επωάστηκαν με anti- mouse-MAP2a&b (1:100) που ήταν συνδεδεμένο με Zenon® Alexa-488 IgG₁ (1:4) και με anti-GFAP (1:100) συνδεδεμένο με with Zenon®-anti-Rabbit-R-PE (1:4). Μετά από 45 λεπτά τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν με PBS και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Τα κύτταρα που είχαν σημειωθεί μόνο με τα δευτερογενή αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικός έλεγχος.

2.1.6 Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής της βιωσιμότητας, απόπτωσης και νέκρωσης στις καλλιέργειες νευρώνων και αστροκυττάρων.

Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε επίσης προκειμένου να προσδιοριστεί η κυτταρική βιωσιμότητα των κυττάρων του ΚΝΣ στις 4, 7 και 14 DIV σε 5 καλλιέργειες. Γι' αυτό το σκοπό έγινε προσδιορισμός των κυττάρων που βρίσκονταν τόσο στα πρώιμα όσο και στα τελικά στάδια της απόπτωσης, καθώς και των νεκρωτικών κυττάρων. Η πρώιμη απόπτωση καθορίστηκε με μέτρηση των κυττάρων θετικών σε Ανεξίννη-V-FITC, ενώ τα κύτταρα σε προχωρημένα στάδια απόπτωσης ή νέκρωσης προσδιορίστηκαν με τη χρήση προπιδιούχου ιωδίου (PI) (Schutte και συν. 1998). Προκειμένου να διατηρηθεί η ακεραιότητα της μεμβράνης, που είναι ουσιώδης για τον καθορισμό της Ανεξίννης-V, προτιμήθηκε η μηχανική αποκόλληση των κυττάρων αντί της ενζυματικής αποκόλλησης. Το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε στις 1000rpm για 5 λεπτά. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε PBS χωρίς Ca^{2+} & Mg^{2+} και επωάστηκε για 15 λεπτά με 5μl Ανεξίννη-V-FITC και PI, αντίστοιχα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 500μl Annexin-Binding ρυθμιστικού διαλύματος με Ca^{2+} και στη συνέχεια έγινε ανάλυση κυτταρομετρίας ροής.

2.2 Καλλιέργειες κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος

2.2.1 Λήψη δειγμάτων αίματος.

Πριν από τη νευροχειρουργική επέμβαση, λήφθηκε δείγμα 10-12cc περιφερικού αίματος σε EDTA από 5 ασθενείς (3 γυναίκες και 2 άνδρες με μέσο όρο ηλικίας τα 60 έτη και εύρος ηλικίας 47-69). Δείγματα περιφερικού αίματος ελήφθησαν επίσης από υγιείς εθελοντές αντίστοιχων ηλικιών (n=8, 4 γυναίκες και 4 άνδρες μέσης ηλικίας 67 ετών, εύρος ηλικίας 41-83 έτη) τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου. Για τον καθορισμό του αριθμού των μονοκυττάρων χρησιμοποιήθηκαν οι μετρήσεις της μεθόδου ρουτίνας των διαγνωστικών αιματολογικών εξετάσεων. Οι υποπληθυσμοί των T και B λεμφοκυττάρων

υπολογίστηκαν μέσω της κυτταρομετρίας ροής με τα αντισώματα CD3 και CD19 αντίστοιχα, όπως περιγράφεται στην παράγραφο (2.2.3). Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε καλλιέργεια για 4 μέρες και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η συγκαλλιέργεια με τα νευρικά κύτταρα. Οι μετρήσεις των μονοκαλλιεργειών έγιναν τη δεύτερη μέρα μετά την έναρξη της καλλιέργειας.

2.2.2 Πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος.

Τα μονοπύρηνια ανοσοκύτταρα απομονώθηκαν από δείγματα αίματος ως ακολούθως: ίσοι όγκοι αίματος και καλλιεργητικού υλικού RPMI (Biochrome, DK) με 10% FBS επιστρώθηκαν σε Percoll (Biochrome, DK) και φυγοκεντρήθηκαν στις 900 στροφές για 40min. Δημιουργήθηκε έτσι ένα στρώμα πλούσιο σε λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα το οποίο απομονώθηκε μετά από διαδοχικούς κύκλους πλύσεων με RPMI και φυγοκεντρήσεων. Το κυτταρικό ίζημα που προέκυψε επαναωρήθηκε σε RPMI με 10% FBS και διατηρήθηκε *in vitro* στους 37°C, και σε περιβάλλον με 95% συγκέντρωση αέρα και 5%CO₂. Ο μέσος όρος του αριθμού των κυττάρων και η βιωσιμότητα καθορίστηκαν με το αιμοκυτταρόμετρο και με τη χρώση μπλε του τρυπανίου. Οι πρωτογενείς καλλιέργειες των μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος διατηρήθηκαν σε μέσο νευρωνικών καλλιεργειών όπως περιγράφεται ανωτέρω.

2.2.3 Κυτταρομετρία ροής των κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος.

Προκειμένου να μελετηθούν οι υποπληθυσμοί των ώριμων T και B λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων στις πρωτογενείς καλλιέργειες ανοσοκυττάρων και στις συγκαλλιέργειες με κύτταρα του ΚΝΣ, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της κυτταρομετρίας ροής. Η βιωσιμότητά τους μελετήθηκε σε διαδοχικές χρονικές στιγμές (24, 48 και 72 ώρες) στις πρωτογενείς καλλιέργειες και στις συγκαλλιέργειες. Οι ώριμοι υποπληθυσμοί T και B λεμφοκυττάρων και τα μονοκύτταρα ανιχνεύθηκαν με τα αντισώματα: mouse anti-human CD3-FITC (555339-clone HIT3a), anti-human CD19-PE (IM1285U-clone J3-119) και anti-human CD14-FITC (IM0645U -clone RMO52) αντίστοιχα. Τα κύτταρα που εξέφραζαν το μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας II (MHC-II) ανιχνεύθηκαν με το αντίσωμα HLA-DR. Σε δείγματα αναφοράς αίματος ο προσδιορισμός των CD3- και CD19-θετικών λεμφοκυττάρων έγινε με την επώαση 100μl πλήρους αίματος σε αντιπηκτικό με 10μl με τα αντίστοιχα αντισώματα για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2ml διαλύματος 1xFACS Lysing Solution και τα δείγματα επώαστηκαν περαιτέρω για 10 λεπτά. Μετά από φυγοκέντρωση τα κύτταρα πλύθηκαν με 1xPBS και αναλύθηκαν στο κυτταρόμετρο ροής (EPICS XL, Beckman-Coulter). Τα ανοσοκύτταρα που βρίσκονταν σε

καλλιέργεια συνελλέγησαν από τις πρωτογενείς καλλιέργειες και από τις συγκαλλιέργειες με αναρρόφηση, φυγοκεντρήθηκαν και επαναιωρήθηκαν σε 1xPBS. Φθορίζοντα αντισώματα προστέθηκαν με την ακόλουθη σειρά: CD3-FITC (10μl) με CD19-PE (10μl) και CD14-FITC (10μl) με HLA-DR-PE (10μl). Μετά από επώαση 20 λεπτών τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν ξανά, επαναιωρήθηκαν σε 100μl 1xPBS και προστέθηκαν 3μl 7AAD. Μετά από επώαση 10 λεπτών έγινε επαναιώρηση σε 1xPBS και μελετήθηκαν με τον κυτταρομετρητή ροής. Δείγματα κυττάρων τα οποία επεξεργάστηκαν μόνο με 7AAD, χωρίς τα φθορίζοντα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου της μεθόδου (τυφλά δείγματα). Τα CD14-θετικά μονοκύτταρα καθορίστηκαν ως ποσοστό του ολικού κυτταρικού πληθυσμού, ενώ τα σημασμένα με CD3-θετικά T-κύτταρα και με CD19-θετικά B-κύτταρα υπολογίστηκαν ως ποσοστό του λεμφοκυτταρικού πληθυσμού. Τα ποσοστά των κυττάρων που βρέθηκαν θετικά για κάποιο από τα αντισώματα CD3, CD19 and CD14 και αρνητικά για 7AAD θεωρήθηκαν ως βιώσιμα. Στους CD14-θετικούς πληθυσμούς, τα κύτταρα που παρουσίαζαν το ΜΣΙ-II αναγνωρίστηκαν ως HLA-DR αντιδρώντα κύτταρα. Εκτιμήθηκε επίσης η βιωσιμότητα των ενεργοποιημένων μονοκυττάρων που ήταν αρνητικά για 7AAD και θετικά για HLA-DR και CD14.

3. Πρωτογενείς συγκαλλιέργειες ανθρώπινων νευρικών κυττάρων και αυτόλογων λεμφοκυττάρων

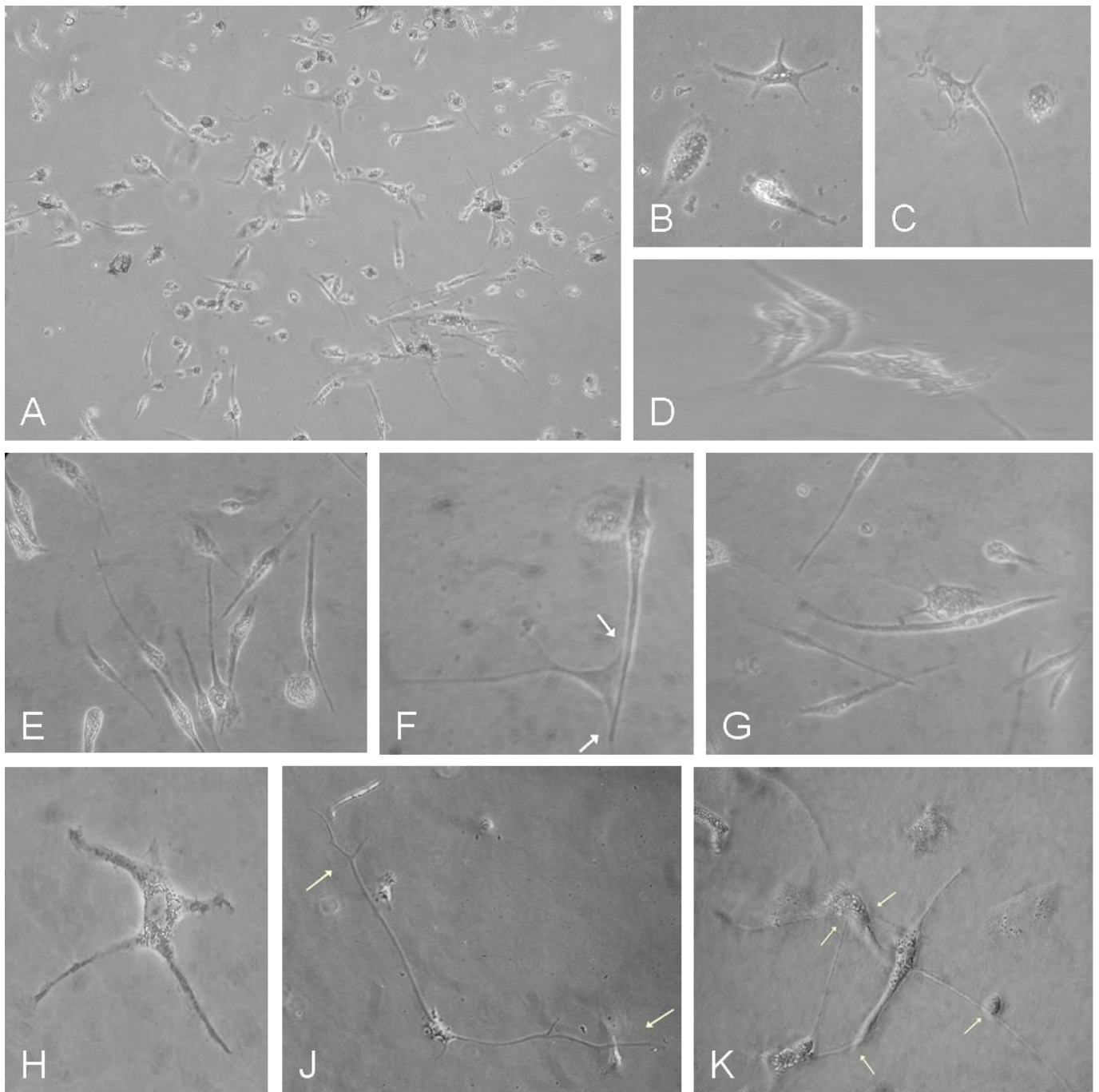
Οι πρωτογενείς νευρωνικές καλλιέργειες εγκαταστάθηκαν από δείγματα εγκεφαλικού ιστού νευροχειρουργικών ασθενών που χειρουργήθηκαν για εγκεφαλικά αιματώματα (n=5). Πριν από τη χειρουργική επέμβαση έγινε λήψη δείγματος περιφερικού αίματος από αυτούς τους ασθενείς, και στη συνέχεια οι πρωτογενείς καλλιέργειες ανοσοκυττάρων εγκαταστάθηκαν και διατηρήθηκαν *in vitro*, όπως περιγράφεται ανωτέρω. Τέσσερις μέρες μετά την έναρξη των καλλιεργειών νευρικών κυττάρων τα αυτόλογα ανοσοκύτταρα προστέθηκαν στην καλλιέργεια σε αναλογία 1:1. Οι συγκαλλιέργειες διατηρήθηκαν στις συνθήκες καλλιέργειας που είχαν επιλεγεί για τα νευρικά κύτταρα, ενώ η νευροτοξική δράση και η βιωσιμότητα και ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων και των μονοκυττάρων μελετήθηκε στις 24, 48 και 72 ώρες.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Καλλιέργειες κυττάρων του ΚΝΣ

1.1 Κυτταρική μορφολογία

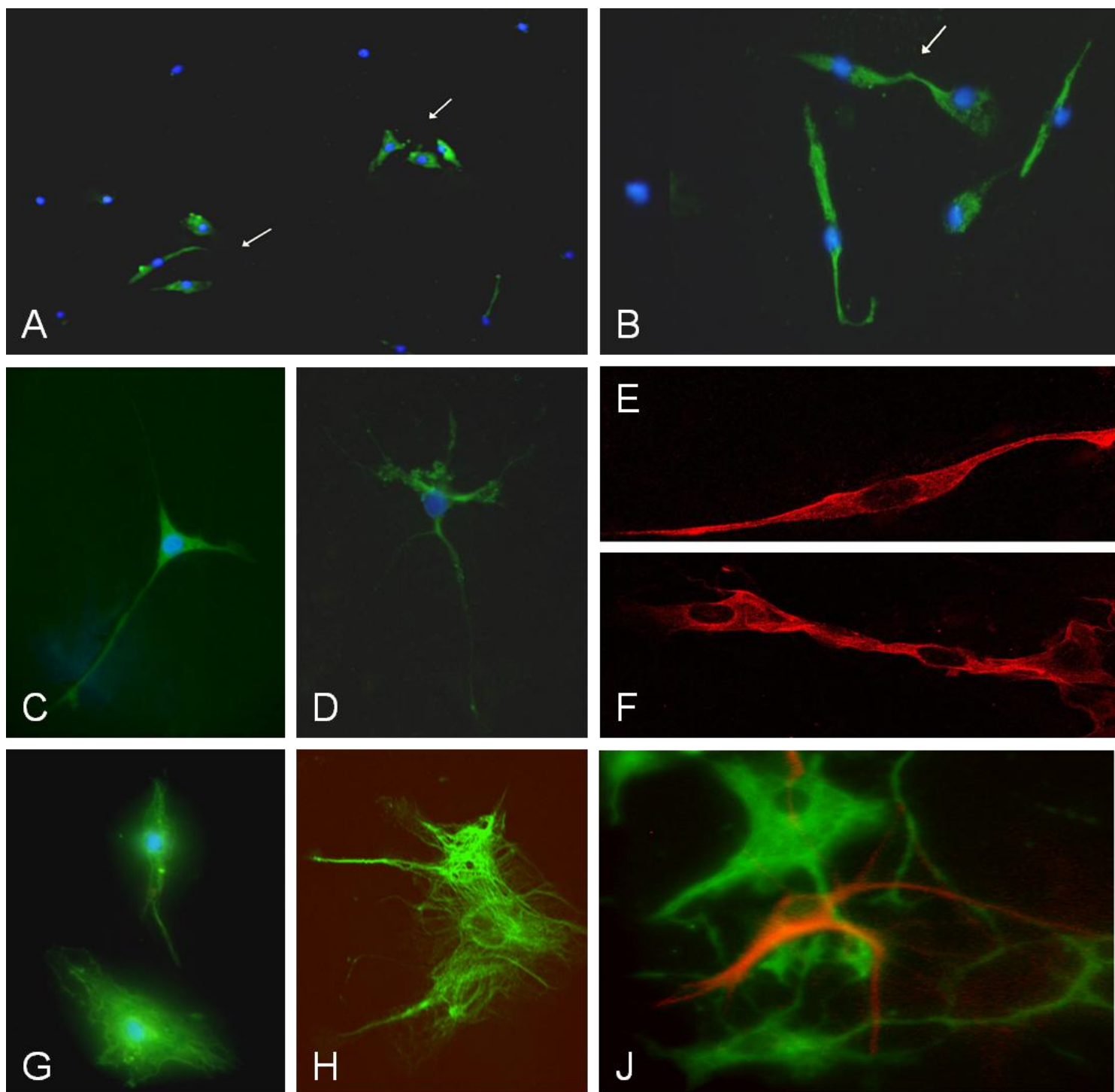
Τα νευρικά κύτταρα που προήλθαν από το κυτταρικό δείγμα μετά από τον αρχικό διαχωρισμό, ήταν μορφολογικά ετερογενή 24 ώρες μετά την αρχική επίστρωση. Η πλειοψηφία των κυττάρων που ήταν προσκολλημένα στις επιστρωμένες με πολυ-L-λυσίνη επιφάνειες ήταν ατρακτοειδείς δίπολοι νευρώνες, οι οποίοι υπό το μικροσκόπιο φαίνονταν να έχουν φωτεινό και κοκκιώδες κυτταρικό σώμα και αστροκύτταρα μεγαλύτερα σε μέγεθος από τους νευρώνες (**Εικ. 1Α**). Τα κύτταρα με μορφολογία μικρογλοίας που χαρακτηρίζονται από εκτεταμένο αμοιβαδοειδές κυτταρόπλασμα δεν εντοπίστηκαν σε αυτές τις καλλιέργειες, οπότε δεν μελετήθηκαν περαιτέρω. Στην πλειονότητα των κυττάρων που μελετήθηκαν παρατηρήθηκαν κοκκία λιποφουσκίνης, τα οποία είναι συχνά ένδειξη ανεπαρκούς μεταβολισμού των λιπιδίων και σχετίζονται με τον γηρασμό των κυττάρων. Το μέγεθος και η διάμετρος του κυτταρικού σώματος ποικίλανε και εξαρτώνταν από την περιοχή προέλευσης του εγκεφαλικού ιστού. Τα κύτταρα της παρεγκεφαλίδας είχαν μεγαλύτερη διάμετρο από τα κύτταρα του φλοιού στην παρατήρηση με το οπτικό μικροσκόπιο. Η κυτταρική διάμετρος κυμαινόταν μεταξύ 6 και 15 μm . Όλα τα κύτταρα παρουσίαζαν τη φωτεινή άλω που χαρακτηρίζει τα υγιή ζωντανά κύτταρα *in vitro*. Τα κύτταρα με μορφολογία νευρώνων χαρακτηρίζονταν από μικρό λεπτό σώμα και εκτεταμένους λεπτούς νευρίτες, ενώ τα αστροκύτταρα χαρακτηρίζονταν από μεγάλο κοκκώδες σώμα και πολλαπλές βραχείς αποφυάδες (**Εικ. 1Α-Δ**). Μετά από τέσσερις μέρες στην καλλιέργεια οι άξονες και οι νευρίτες των νευρώνων άρχισαν να αναγεννώνται. Οι άξονες των νευρώνων που ήταν εμφανείς από τα πιο πρώιμα στάδια των καλλιιεργειών, κατά την 8^η και 14^η μέρα *in vitro* είχαν περαιτέρω επεκταθεί σε ένα δίκτυο κυτταρικών επαφών μεταξύ νευρώνων και αστροκυττάρων (**Εικ. 1Α-Ε**). Κατά τις δύο εβδομάδες διάρκειας των καλλιιεργειών διαπιστώθηκε με το μικροσκόπιο ότι τα κύτταρα που ήταν μορφολογικά όμοια με νευρώνες και αστροκύτταρα διατήρησαν τις μορφολογικές ιδιότητες των διαφοροποιημένων κυττάρων (**Εικ. 1Β-Δ**). Μετά από 14 μέρες στην καλλιέργεια τα όμοια με νευρώνες κύτταρα είχαν τυπικά μορφολογικά χαρακτηριστικά μονόπολων, δίπολων και πολύπολων νευρώνων (**Εικ. 1Η-Ι**). Σε αυτό το στάδιο, οι νευρώνες είχαν λεπτές επιμήκεις αξονικές προβολές οι οποίες έμοιαζαν να είναι ενεργές, ίσως λόγω συμμετοχής σε νευρωνικά δίκτυα (**Εικ. 1Ι-Κ**).



Εικόνα 1. Κυτταρική μορφολογία των πρωτογενών καλλιιεργειών νευρικών κυττάρων. Οι ατρακτοειδείς νευρώνες και τα μεγαλύτερα σφαιροειδή αστροκύτταρα ήταν οι κύριοι τύποι κυττάρων στα πρώιμα στάδια των καλλιιεργειών (4^η ημέρα καλλιιεργειας A-C). Αστροκύτταρα και πολύπολοι νευρώνες (4^η ημέρα καλλιιεργειας B-C). Οι νευρώνες είχαν ήδη αρχίσει να δημιουργούν επαφές μεταξύ τους την 4^η ημέρα (D) και οι επαφές αυτές ήταν εμφανείς και την 8^η ημέρα σε καλλιιεργεια (E). Επικοινωνία μεταξύ νευρώνων (F, βέλη) και μεταξύ νευρώνων και αστροκυττάρων (G) είχαν σχηματιστεί την 8^η ημέρα. Ένα αστροκύτταρο απεικονίζεται στην εικόνα H. Τυπικοί πολύπολοι και μονόπολοι και μονόπολοι νευρώνες με εκτεταμένους νευρίτες (J, βέλη) μετά τις 10 ημέρες. Το δίκτυο των νευριτών που δημιουργήθηκε στην καλλιιεργεια διατηρήθηκε για 14 ήμερες.

1.2 Μορφολογικές και κυτταροσκελετικές μελέτες των νευρικών κυττάρων με χρώση ανοσοφθορισμού.

Η παρακολούθηση της κυτταρικής μορφολογίας των πρωτογενών καλλιιεργειών καθ' όλη τη διάρκειά τους έγινε με το ανάστροφο μικροσκόπιο. Προκειμένου να ταυτοποιηθούν οι κυτταρικοί πληθυσμοί χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του ανοσοφθορισμού σε $n=8$ πρωτογενείς καλλιέργειες σε χρονικά διαδοχικά σημεία (0-15 DIV). Ο προσδιορισμός των διαφοροποιημένων νευρώνων έγινε μέσω των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών MAPa&b και Tau, οι οποίες εντοπίζονται στις σωματοδενδριτικές και αξονικές περιοχές των ώριμων νευρώνων. Κατά τη διάρκεια των πρώτων τεσσάρων ημερών στην καλλιέργεια οι νευρώνες χαρακτηρίζονταν από διάχυτη πρόσληψη του MAPa&b, που ήταν πιο εμφανής στο κυτταρόλασμα και στους δενδρίτες. Η χρώση διπλού ανοσοφθορισμού με anti-Tau και DAPI έδειξαν ότι οι διαφοροποιημένοι νευρώνες διατηρήθηκαν ως σταθερό χαρακτηριστικό των καλλιιεργειών νευρώνων-αστροκυττάρων (**Εικ. 2A-D,J**). Οι Tau θετικοί νευρώνες είναι εμφανείς ανάμεσα στα υπόλοιπα κύτταρα της καλλιέργειας και ταυτοποιούνται από τους πυρήνες τους που είναι χρωσμένοι με DAPI (**Εικ. 2A-B**). Ένα άλλο χαρακτηριστικό των καλλιιεργειών ήταν η εγγύτητα των νευρώνων, οι οποίοι βαθμιαία φάνηκαν να αναπτύσσουν συνδέσεις κύτταρο με κύτταρο (**Εικ. 2A-B**). Κατά τη εξέλιξη των καλλιιεργειών ήταν εμφανή τα τυπικά χαρακτηριστικά πλήρως ανεπτυγμένων δίπολων και πολύπολων νευρώνων (**Εικ. 2C-F**). Ο χαρακτηρισμός με το αντίσωμα MAP2a&b έδειξε ομοιόμορφη κυτταροσκελετική έκφραση στα σώματα και τους νευρίτες των κυττάρων (**Εικ. 2E,F**). Κατά την 8η και 14η μέρα *in vitro* το MAP2a&b εκφραζόταν με μεγαλύτερη ομοιογένεια σε όλο το κυτταρικό σώμα και στους νευρίτες. Τα αστροκύτταρα που καλλιιεργήθηκαν από 4 ως 14 μέρες χαρακτηρίζονταν στις πρωτογενείς καλλιέργειες από ένα εκτεταμένο και σύμπλοκο κυτταροσκελετικό δίκτυο GFAP θετικών προσεκβολών, το οποίο ήταν ιδιαίτερα εμφανές την 8^η (**Εικ. 2G**) και 14^η ημέρα (**Εικ. 2H**). Την 14^η μέρα των καλλιιεργειών η ανάπτυξη δικτύων επικοινωνίας μεταξύ νευρώνων και αστροκυττάρων φάνηκε μέσω των συμπλεγμάτων Tau θετικών κυττάρων και GFAP θετικών κυττάρων (**Εικ. 2J**). Τέλος, η εμπειρική μέτρηση των Tau- και GFAP-θετικών κυττάρων που είχαν χρωσθεί με ανοσοφθορισμό σε τυχαία επιλεγμένες περιοχές, σε γενικές γραμμές επιβεβαίωσε τα ποσοστά των κυττάρων όπως αυτά μετρήθηκαν με την κυτταρομετρία ροής.

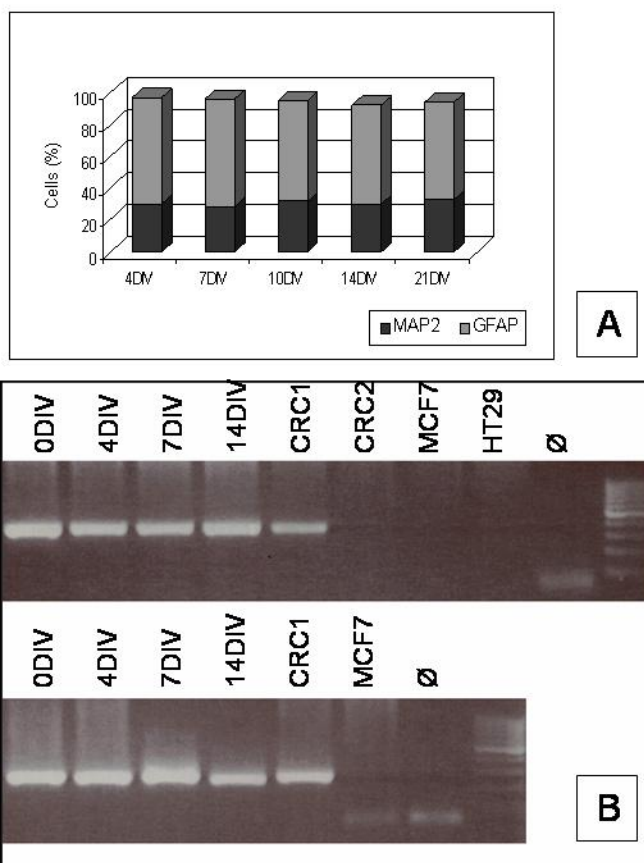


Εικόνα 2. Χαρακτηρισμός νευρώνων και αστροκυττάρων σε πρωτογενείς καλλιέργειες με ανοσοφθορισμό. Οι νευρώνες χαρακτηρίζονται από κυτταροσκελετικά Tau (πράσινο, A-D) και MAP2a&b (κόκκινο, E-F) αντισώματα. Τα αστροκύτταρα χαρακτηρίστηκαν με τη χρώση GFAP (πράσινο, G-J). Οι πυρήνες των κυττάρων χρώστηκαν με DAPI (μπλε, A-D, G). Ομάδες νευρώνων που εξέφραζαν το Tau (βέλος) περιβάλλονται από άλλα κύτταρα όπως φαίνεται από από την πυρηνική χρώση την 8^η ημέρα της καλλιέργειας (A). Διασυνδεδεμένοι νευρίτες την 14^η ημέρα (B, βέλος). Ταυ-θετικά κύτταρα με τυπικά χαρακτηριστικά πολύπολων νευρώνων τη 14^η μέρα καλλιέργειας (C-D). Παραδείγματα ενός (E) και δύο MAP2a&b επικοινωνούντων νευρώνων (F) τη 10^η μέρα καλλιέργειας. Η κατανομή των ινιδίων του GFAP στο κυτταρόπλασμα και οι κυτταροπλασματικές προσεκβολές στα προσκείμενα αστροκύτταρα (G, 8^η ημέρα) και σε ένα σύμπλεγμα αστροκυττάρων (H, 14^η ημέρα). Η εικόνα J είναι ένα δείγμα των δικτύων επαφής/επικοινωνίας μεταξύ

νευρώνων και αστροκυττάρων τη 14^η μέρα στην καλλιέργεια: ένας πλήρως σχηματισμένος νευρώνας με εκτεταμένους νευρίτες (που χαρακτηρίζεται από τη χρώση με Tau, κόκκινο) διαπλέκεται με GFAP θετικά αστροκύτταρα (πράσινο). Μεγένθυση 20X (A, B και G), 40X (C, D, H), 100X (E,F, J).

1.3 Προσδιορισμός ποσοστού νευρώνων και αστροκυττάρων με κυτταρομετρία ροής.

Οι κύριοι τύποι κυττάρων στις πρωτογενείς μεικτές καλλιέργειες ήταν νευρώνες και αστροκύτταρα. Αυτό επιβεβαιώθηκε με την κυτταρομετρία ροής και τη χρήση των δεικτών MAP2 και GFAP, επιβεβαιώνοντας τις μορφολογικές παρατηρήσεις. Μετά από τέσσερις μέρες στην καλλιέργεια τα MAP2a&b θετικά κύτταρα αντιστοιχούσαν στο $29,6 \pm 4,6\%$ του συνόλου των κυττάρων, ενώ τα θετικά για GFAP κύτταρα ήταν το $65,8 \pm 4,3\%$, αποτελώντας έτσι το $>95\%$ του συνόλου των κυττάρων της καλλιέργειας. Το ποσοστό των νευρώνων παρέμεινε κατ' ουσίαν σταθερό σε όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας, γεγονός που πιστοποιήθηκε από διαδοχικές μετρήσεις (Εικ. 3A). Μετά από 14 μέρες σε καλλιέργεια τα MAP2a&b θετικά κύτταρα αποτελούσαν το $31 \pm 5,7\%$ των κυττάρων στην καλλιέργεια και τα GFAP θετικά κύτταρα το $62,9 \pm 6,6\%$. Μετρήσεις με κυτταρομετρία ροής έγιναν σε 7 καλλιέργειες, 5 από τις οποίες προήλθαν από το φλοιό και 2 από την παρεγκεφαλίδα. Οι αναλογίες των κυττάρων ήταν παρόμοιες για καλλιέργειες που προέρχονταν από το φλοιό και την παρεγκεφαλίδα.



Εικόνα 3. (Α) Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής των κυττάρων που εξέφραζαν το MAP2a&b και το GFAP στις πρωτογενείς καλλιέργειες (n=8) στις 4, 7, 10, 14 και 21 μέρες. Τα ποσοστά των MAP2a&b θετικών νευρώνων και των GFAP θετικών αστροκυττάρων παρέμειναν σταθερά στις καλλιέργειες. (Β) Έκφραση του mRNA της N-cadherin, ενός μεσολαβητή της κυτταρικής επικοινωνίας μεταξύ των νευρώνων και των αστροκυττάρων. Εντοπίστηκαν τόσο το εξωκυττάριο τμήμα (άνω στήλη) όσο και το ενδοκυττάριο (κάτω στήλη) τμήμα της N-cadherin στην αρχή και στο τέλος της καλλιέργειας και κατά τη διάρκειά της (4,7 και 14 ημέρες). CRC1 και 2: χρησιμοποιήθηκε ιστός καρκίνου του εντέρου ως δείγμα αναφοράς. MCF 7 (Ca μαστού) και HT29 (Ca εντέρου): κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικά δείγματα ελέγχου. Ø: RT-PCR αντίδραση αρνητικού δείγματος.

1.4 Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής της βιωσιμότητας, απόπτωσης και νέκρωσης στις καλλιέργειες νευρώνων και αστροκυττάρων.

Όπως προαναφέρθηκε τα κύτταρα που βρίσκονται σε πρώιμη απόπτωση χάνουν τη μεμβρανική τους ασυμμετρία πριν παρουσιαστεί η βλάβη της μεμβράνης. Η αποκάλυψη της φωσφατιδυλσερίνης στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης, ως δείκτης της πρώιμης απόπτωσης καθορίστηκε με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής των κυττάρων που ήταν θετικά στην Αννεξίνης-V/FITC. Τα ποσοστά της προχωρημένης απόπτωσης/νέκρωσης εκτιμήθηκαν με μετρήσεις της απορρόφησης ιωδιούχου προπιδίου (PI) λόγω του κατακερματισμού του DNA. Για τον προσδιορισμό της κυτταρικής βιωσιμότητας των κυττάρων του ΚΝΣ στις 4, 7 και 14 μέρες στην καλλιέργεια σε 5 δείγματα χρησιμοποιήθηκε η κυτταρομετρία ροής. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων ήταν ως εξής: η απόπτωση των καλλιεργημένων κυττάρων στα αρχικά στάδια της καλλιέργειας (4 ημέρες) ήταν $3,8 \pm 4,7\%$, αλλά μειώθηκε κατά τη συνέχεια της καλλιέργειας ($2,4 \pm 1,9\%$ στις 7 ημέρες $1,5 \pm 1,6\%$ στις 14). Τα αντίστοιχα ποσοστά νέκρωσης ήταν $1.8 \pm 1.5\%$, $0.8 \pm 0.7\%$ και $1.2 \pm 0.7\%$. Συνεπώς τα κύτταρα στις συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας διατηρούν υψηλά ποσοστά βιωσιμότητας.

1.5 Μελέτες έκφρασης του mRNA της N-cadherin.

Οι μελέτες έκφρασης του mRNA της N-cadherin έγιναν σε πρωτογενείς καλλιέργειες που προήλθαν από δείγματα εγκεφαλικού φλοιού (n=3) νευροχειρουργικών ασθενών που χειρουργήθηκαν για κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις μέσης ηλικίας 56.7 ετών, (εύρος ηλικιών 34-79 έτη). Η έκφραση του mRNA της N-cadherin ερευνήθηκε σε αντιπροσωπευτικά χρονικά σημεία μεταξύ της έναρξης και της ολοκλήρωσης των καλλιεργειών (**Εικ. 3B**). Συγκεκριμένα, τόσο τα κυτταροπλασματικά, όσο και τα εξωκυττάρια δομικά στοιχεία της N-cadherin εντοπίστηκαν σε κύτταρα τα οποία είχαν μόλις διαχωριστεί από τον εγκεφαλικό ιστό, αλλά και στα κύτταρα που βρίσκονταν στην 4^η, 7^η και 14^η μέρα της καλλιέργειας. Οι

πρωτογενείς καλλιέργειες που προέκυψαν από τα αντίστοιχα δείγματα καλλιιεργειών χαρακτηρίστηκαν από την έκφραση της περιοχής της πρωτεΐνης που βρίσκεται στους συναπτικούς συνδέσμους αλλά και της περιοχής που συνδέεται με τη μεταβίβαση μηνυμάτων. Οι νευρώνες και τα αστροκύτταρα έδειξαν έντονη έκφραση και των δύο περιοχών της πρωτεΐνης στα αρχικά στάδια (αρχή της καλλιέργειας και 4^η ημέρα) όσο και στη συνέχεια της καλλιέργειας (7^η και 14^η ημέρα) (**Εικ. 3B**).

2. Καλλιέργειες κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος

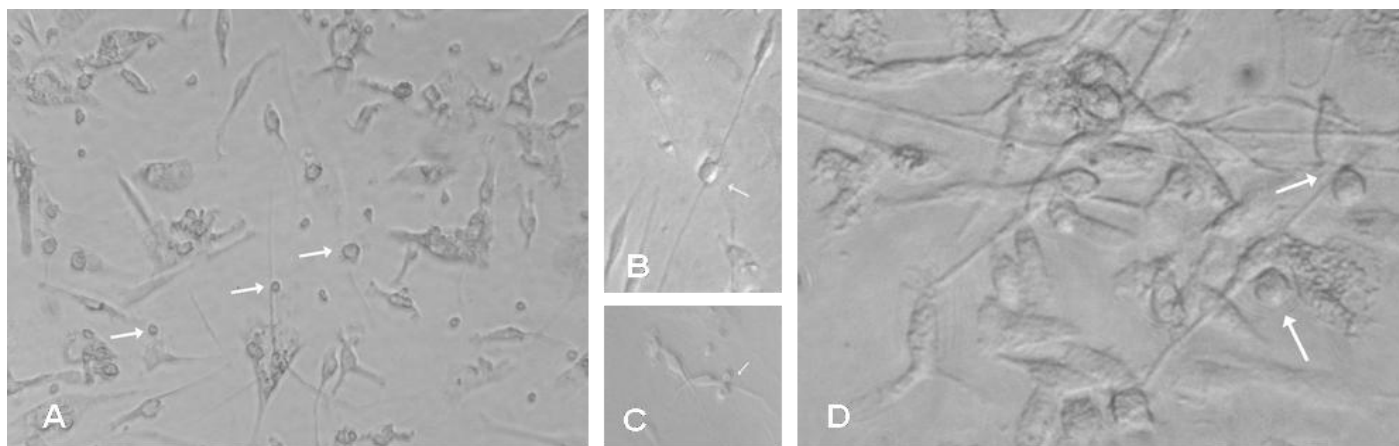
Προκειμένου να συνοπολογιστεί η πιθανή επίδραση του καλλιιεργητικού μέσου που χρησιμοποιήθηκε για τις καλλιέργειες των νευρικών κυττάρων στα λεμφοκύτταρα κατά τη διάρκεια των πειραμάτων συγκαλλιέργειας οι λεμφοκυτταρικές μονοκαλλιέργειες έγιναν στο ίδιο καλλιιεργητικό μέσο. Αυτές οι συνθήκες καλλιέργειας δεν φάνηκαν να έχουν αρνητικές δράσεις στη βιωσιμότητα και την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων. Παρ' όλ' αυτά έγινε παρακολούθηση των ανοσοκαλλιιεργειών ελέγχου σε όλα τα αντίστοιχα χρονικά σημεία (24, 48 και 72 ώρες) και υπολογίστηκαν οι επιδράσεις της συγκαλλιέργειας σε κάθε υποπληθυσμό σε σύγκριση με τις καλλιέργειες ελέγχου. Οι βιώσιμοι CD3, CD19 και CD14 πληθυσμοί μελετήθηκαν σε όλες τις καλλιέργειες και συγκαλλιέργειες, με τον περιορισμό της μελέτης στα 7ADD αρνητικά κύτταρα. Συνεπώς οι ακόλουθες παρατηρήσεις αφορούν στα βιώσιμα κύτταρα των αντίστοιχων πληθυσμών. Τα B λεμφοκύτταρα (CD19-θετικά) που απομονώθηκαν από το περιφερικό αίμα ασθενών που χειρουργήθηκαν (n=5) ήταν το 3.3-17.1% του ολικού λεμφοκυτταρικού πληθυσμού. Τα ποσοστά αυτά αντιστοιχούσαν σε εκείνα που μετρήθηκαν στα δείγματα αναφοράς των υγείων δοτών αίματος (3.7-20.1%, n=8). Η βιωσιμότητά τους στις καλλιέργειες ελέγχου παρέμεινε σε γενικές γραμμές σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της κάθε καλλιέργειας, πράγμα που σημαίνει ότι οι συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας διευκόλυναν την επιβίωσή τους. Ο πληθυσμός των T λεμφοκυττάρων (CD3 θετικά) των δειγμάτων από τους χειρουργικούς ασθενείς κυμάνθηκε ανάμεσα σε 20.1-63.3% των λεμφοκυττάρων (σε υγιή άτομα αντιπροσώπευαν το 62.5-73.9% των λεμφοκυττάρων). Τα CD3 θετικά λεμφοκύτταρα παρέμειναν βιώσιμα κατά τη διάρκεια των πρώτων 48 ωρών των λεμφοκυτταρικών καλλιιεργειών ελέγχου αλλά μειώθηκαν μετά από τις 72 ώρες. Τα ποσοστά των CD14 θετικών κυττάρων (μονοκύτταρα) στις καλλιέργειες ελέγχου των χειρουργικών ασθενών ήταν 1.4 - 37.2%. Το εύρος του ποσοστού των μονοκυττάρων ήταν μεγαλύτερο από αυτό των υγείων δοτών (2.5-10%). Οι μικρότεροι αριθμητικά πληθυσμοί μονοκυττάρων (1,4%, 2,1% και 8,5%) παρέμειναν βιώσιμοι κατά τη διάρκεια των

καλλιέργειών. Το ποσοστό των ενεργοποιημένων (HLA-DR-θετικών) κυττάρων στους CD14 θετικούς πληθυσμούς ήταν σημαντικό (42-67%) αλλά μειώθηκε κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας (23-41% στις 72 ώρες). Όλα τα CD14 θετικά κύτταρα στις καλλιέργειες των μεγαλύτερων πληθυσμών (14,9 και 37,2%) εξέφρασαν το HLA-DR και παρέμειναν ενεργά καθ' όλη τη διάρκεια των καλλιέργειών. Μετά από 72 ώρες σε καλλιέργεια τα ενεργοποιημένα CD14 κύτταρα μειώθηκαν στο 0.2-2.8%.

3. Συγκαλλιέργειες ανθρώπινων νευρικών κυττάρων και αυτόλογων ανοσοκυττάρων

3.1 Κυτταρική μορφολογία

Η έναρξη των συγκαλλιέργειών έγινε με την προσθήκη των ανοσοκυττάρων στις ήδη εγκατεστημένες καλλιέργειες των νευρικών την 4^η ημέρα της καλλιέργειας. Η μελέτη της κυτταρικής μορφολογίας με μικροσκόπιο έδειξε ότι η συνύπαρξη των νευρικών κυττάρων και των αυτόλογων λεμφοκυττάρων στις συγκαλλιέργειες ήταν συμβατή και οι συγκαλλιέργειες διατηρήθηκαν για 4 ημέρες. Ήταν εύκολο να διακριθούν οι κυτταρικοί φαινότυποι τόσο των μικρότερων λεμφοκυττάρων όσο και των μεγαλύτερων μονοκυττάρων ανάμεσα στους νευρώνες και τα αστροκύτταρα (**Εικ. 4**). Μετά από 24 ώρες σε συγκαλλιέργεια τα ανοσοκύτταρα εντοπίστηκαν κοντά στα συμπλέγματα νευρώνων αστροκυττάρων (**Εικ. 4A**). Παρατηρήθηκαν αξονικές προβολές που έρχονταν σε άμεση επαφή με τα ανοσοκύτταρα (**Εικ. 4B,C**). Κατά τη διάρκεια της συγκαλλιέργειας τα ανοσοκύτταρα εντοπίζονταν συστηματικά κοντά στα νευρικά κύτταρα και συγκεκριμένα εκεί όπου είχαν αναπτυχθεί συμπλέγματα επαφής νευρώνων (**Εικ. 4D**).



Εικόνα 4. Κυτταρική μορφολογία των ανοσοκυττάρων που συγκαλλιευγούνται με αυτόλογα νευρικά κύτταρα. Μετά τις 24 ώρες στη συγκαλλιέργεια τα ανοσοκύτταρα εντοπίζονται κοντά στα νευρικά κύτταρα (A, βέλη). Παραδείγματα ανοσοκυττάρων σε επαφή με νευρίτες (B, C βέλη). Ανοσοκύτταρα σε στενή επαφή με συμπλέγματα νευρικών κυττάρων που βρίσκονται σε επαφή μετά από 72 ώρες (D, βέλη) Μεγένθυση 20X (A και C), 40X (B, D).

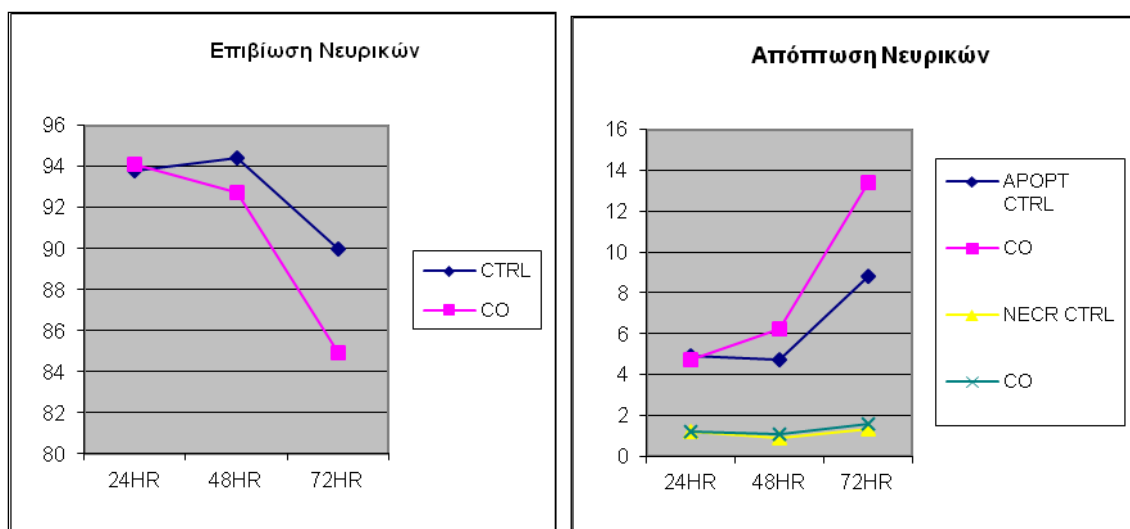
3.2. Επιβίωση νευρώνων στις συγκαλλιέργειες

Η βιωσιμότητα, η απόπτωση και η νέκρωση των νευρικών κυττάρων (νευρώνων και αστροκυττάρων) μελετήθηκαν σε πέντε καλλιέργειες και σε πέντε συγκαλλιέργειες. Αναλυτικά οι επί τοις εκατό ποσοστιαίες μετρήσεις παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1.

Δείγμα	Χρόνος μέτρησης	Βιωσιμότητα	Απόπτωση	Νέκρωση
Δ1	24HR CTRL	82,4	14	3,56
	24HR	83,9	13,6	2,52
	48HR CTRL	95,3	4,42	0,28
	48HR	98,0	1,82	0,22
	72HR CTRL	90,0	8,54	1,51
	72HR	90,4	7,68	1,93
Δ2	24HR CTRL	89,2	8,22	2,63
	24HR	88,9	8,36	2,79
	48HR CTRL	84,4	11,9	3,7
	48HR	84,8	11,7	3,48
	72HR CTRL	86,3	9,36	4,37
	72HR	85,0	9,42	5,56
Δ3	24HR CTRL	100,0	0	0
	24HR	99,2	0	0,8
	48HR CTRL	100,0	0	0
	48HR	95,5	4,46	0
	72HR CTRL	88,3	11,7	0
	72HR	73,3	26,2	0,53
Δ4	24HR CTRL	99,3	0,75	0
	24HR	99,4	0,65	0
	48HR CTRL	99,2	0,85	0
	48HR	97,4	1,73	0,87
	72HR CTRL	97,4	2,05	0,51
	72HR	92,7	7,15	0,15
Δ5	24HR CTRL	98,2	1,44	0
	24HR	99,0	0,93	0
	48HR CTRL	93,2	6,38	0,38
	48HR	88,0	11,1	0,95
	72HR CTRL	87,9	12,1	0
	72HR	83,3	16,7	0

Η απεικόνιση του μέσου όρου των αποτελεσμάτων παρουσιάζεται στα Γραφήματα 1 και 2 και ο μέσος όρος των επιπέδων της απόπτωσης και της νέκρωσης παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.



Γραφήματα 1 και 2. Εδώ παρατηρείται η επιβίωση, η απόπτωση και η νέκρωση των νευρικών κυττάρων στις καλλιέργειες ελέγχου και στις συγκαλλιέργειες με τα αυτόλογα ανοσοκύτταρα στις 24, 48 και 72 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος των επιβιώσεων των καλλιεργειών.

	Επιβίωση		Απόπτωση		Νέκρωση	
	Νευρικά	Συγκαλλιέργεια	Νευρικά	Συγκαλλιέργεια	Νευρικά	Συγκαλλιέργεια
24HR	93	91	4,9	4,7	1,2	1,2
48HR	94,4	92,7	4,7	6,2	0,9	1,1
72HR	90	84	8,8	13,4	1,3	1,6

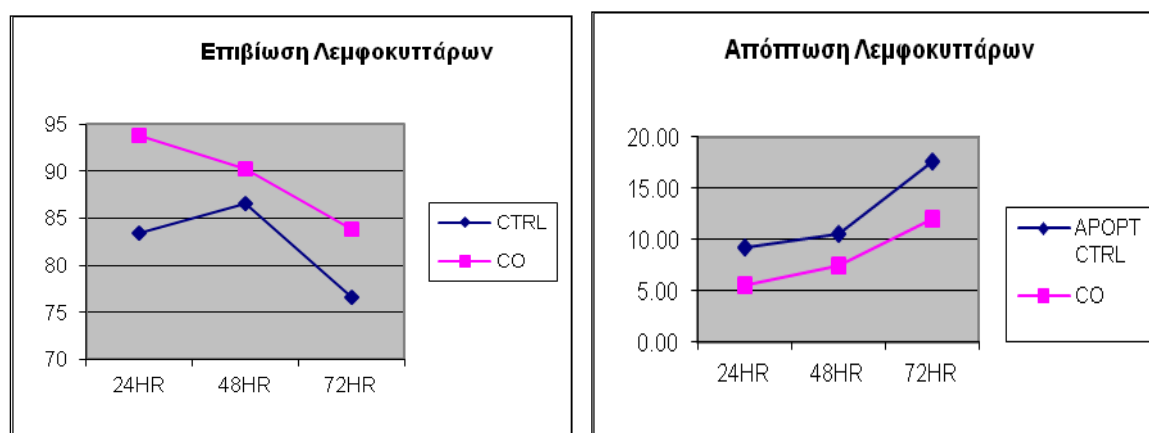
Πίνακας 2. Ποσοστά επιβίωσης, απόπτωσης και νέκρωσης των νευρικών κυττάρων σε καλλιέργειες και συγκαλλιέργειες με τα ανοσοκύτταρα.

Παρατηρείται ότι συνολικά ή βιωσιμότητα των νευρικών κυττάρων διατηρείται σε υψηλά επίπεδα τόσο στις μονοκαλλιέργειες όσο και στις συγκαλλιέργειες αλλά και πως υπάρχει σχετική πτώση της βιωσιμότητας που σχετίζεται με την παρουσία των λεμφοκυττάρων. Συγκεκριμένα όσον αφορά στα ποσοστά της απόπτωσης των νευρικών κυττάρων, αυτή διατηρήθηκε σε χαμηλά επίπεδα τις πρώτες δύο μέρες των καλλιεργειών και των συγκαλλιεργειών και αυξήθηκε στις 72 ώρες της καλλιέργειας όπου ήταν 13,4%. Η νέκρωση διατηρήθηκε σε πολύ χαμηλά επίπεδα τις τρεις μέρες των συγκαλλιεργειών με υψηλότερη τιμή 1,6% την τρίτη μέρα των συγκαλλιεργειών. Συνολικά φαίνεται πως η βιωσιμότητα των νευρικών κυττάρων στις συγκαλλιέργειες με τα ανοσοκύτταρα μειώνεται αλλά παραμένει σε σχετικά υψηλά επίπεδα.

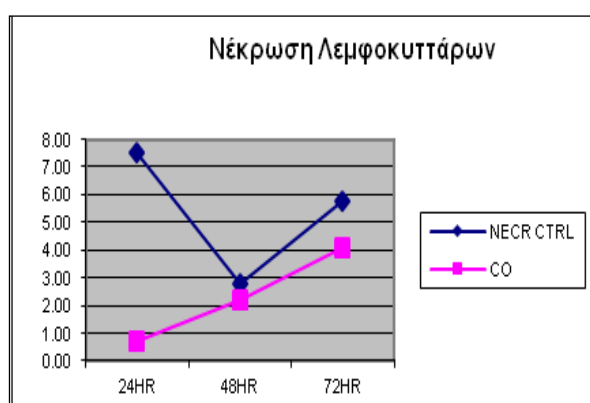
3.3. Επιδράσεις της συγκαλλιέργειας στα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα

Στα ακόλουθα γραφήματα απεικονίζονται η βιωσιμότητα, απόπτωση και νέκρωση των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών όσο και η ενεργοποίησή τους στις καλλιέργειες και στις

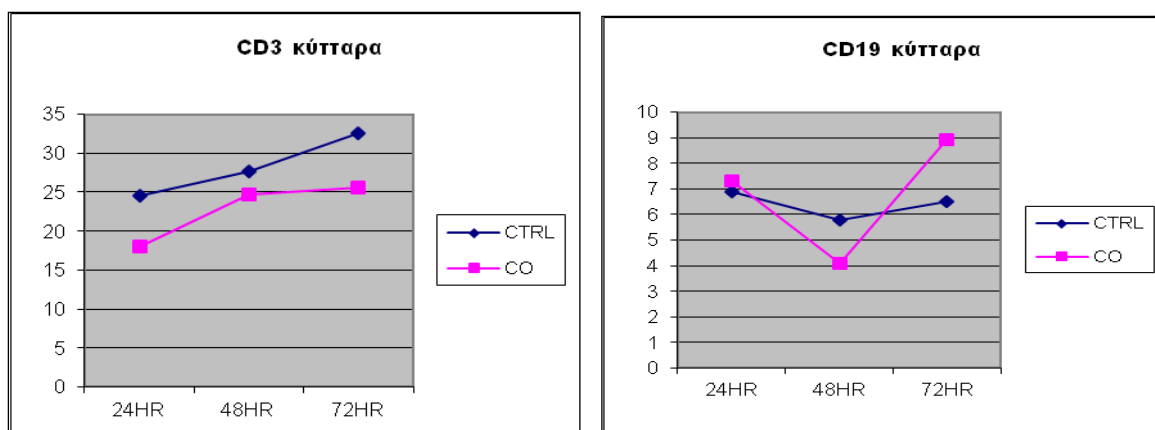
συγκαλλιέργειες με ενήλικους αυτόλογους νευρώνες και αστροκύτταρα. Φαίνεται επίσης και η διαφορετική αντίδραση των λεμφοκυτταρικών υποτύπων.



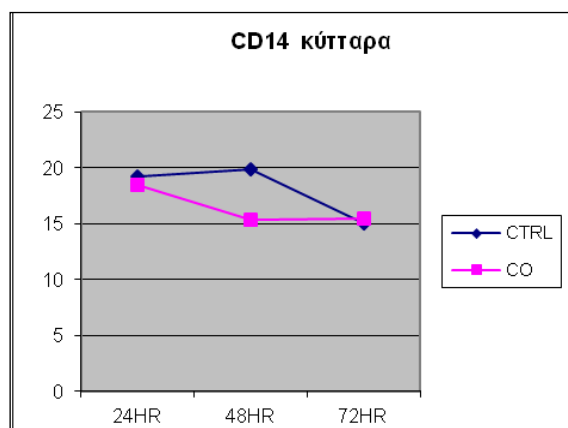
Γραφήματα 3 και 4. 24 ώρες μετά την έναρξη της συγκαλλιέργειας η βιωσιμότητα των λεμφοκυττάρων είναι υψηλότερη από αυτή στις μονοκαλλιέργειες (93,8% και 83,4% αντίστοιχα κατά μέσο όρο). Β αθμιαία μειώνεται σε όλες τις καλλιέργειες με τα νευρικά κύτταρα αλλά παραμένει σε υψηλότερα επίπεδα στις συγκαλλιέργειες σε σχέση με τις μονοκαλλιέργειες. Η απόπτωση αυξάνεται την τρίτη ημέρα των καλλιεργειών και είναι αυξημένη στις λεμφοκυτταρικές μονοκαλλιέργειες σε σχέση με τις συγκαλλιέργειες (17,6% και 12% αντίστοιχα).



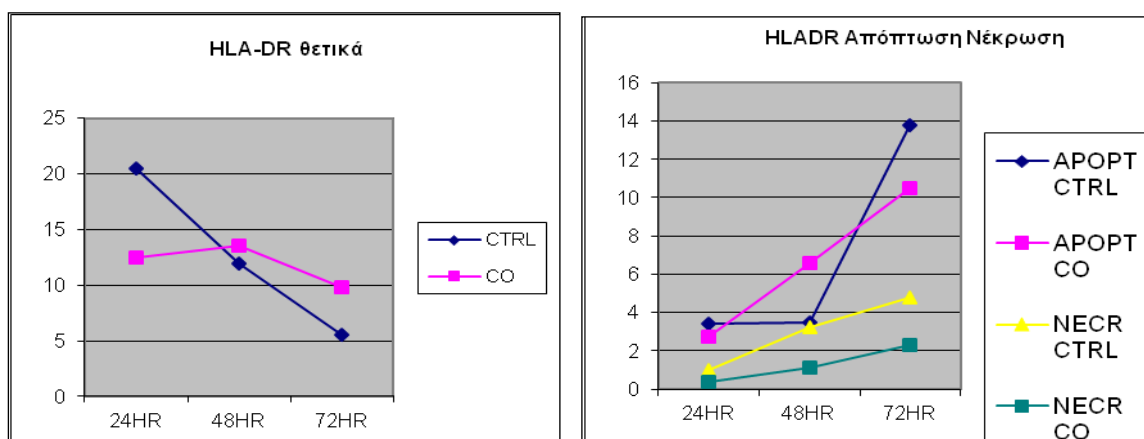
Γράφημα 5. Η νέκρωση των λεμφοκυττάρων είναι υψηλότερη 24 ώρες μετά την έναρξη της μονοκαλλιέργειας λεμφοκυττάρων (7,5%) και πολύ χαμηλή μετά την έναρξη της συγκαλλιέργειας (0,7%). Στις 72 ώρες είναι 5,8% και 4,1% αντίστοιχα



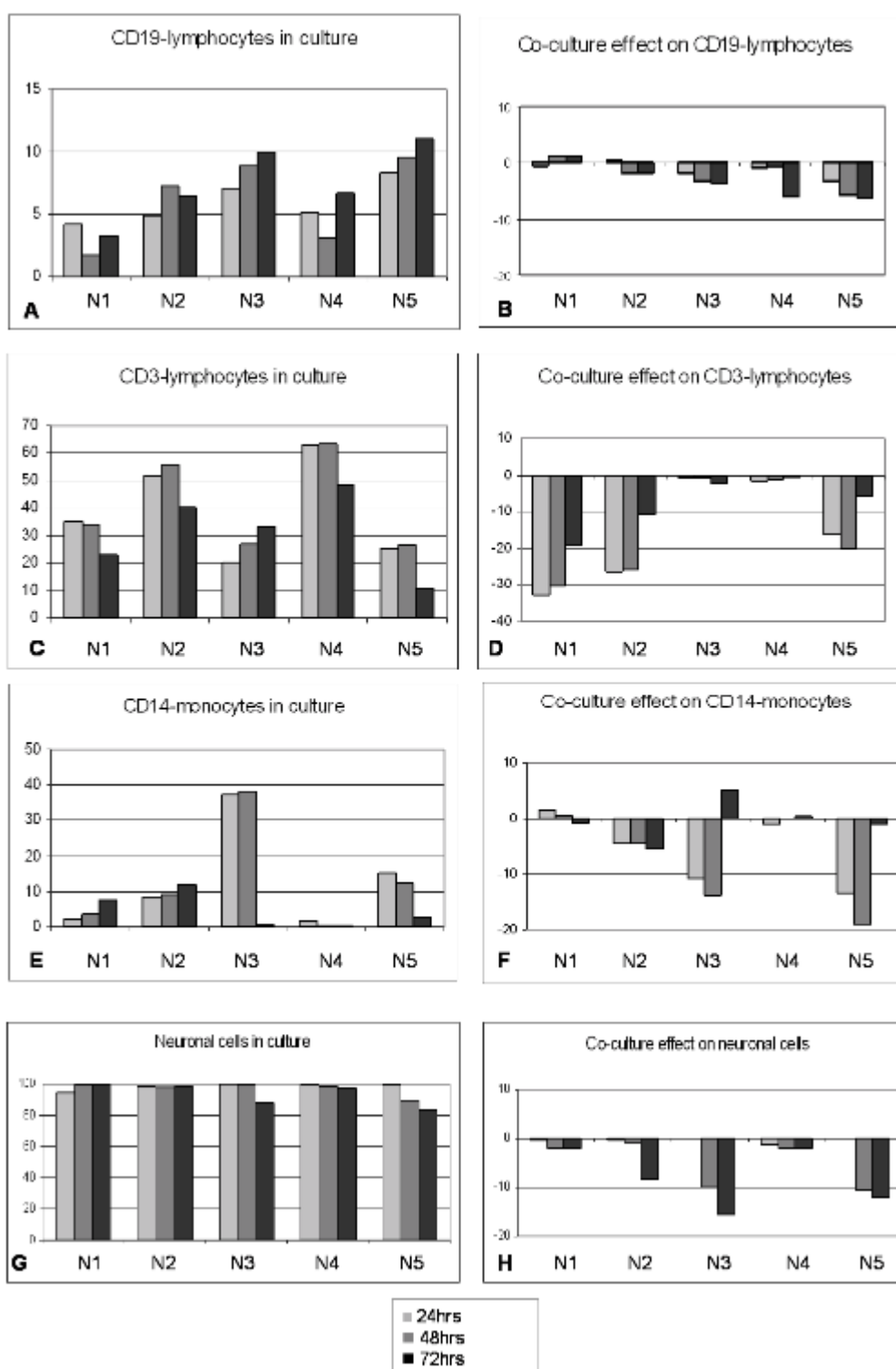
Γραφήματα 6 και 7. Διακυμάνσεις των T- και B- λεμφοκυττάρων μέσα σε 72 ώρες όταν βρίσκονται σε μονοκαλλιέργειες ή σε συγκαλλιέργειες. Στις μονοκαλλιέργειες ανοσοκυττάρων φαίνονται να είναι μεγαλύτεροι πληθυσμοί ήδη από τις 24 ώρες και μετά (24,5% των κυττάρων στις μονοκαλλιέργειες και 18% στις συγκαλλιέργειες) και η διαφορά παραμένει μέχρι τις 72 ώρες στην καλλιέργεια. (32,6% και 25,6% αντίστοιχα).



Γράφημα 8. Ποσοστά μονοκυττάρων στις καλλιέργειες και τις συγκαλλιέργειες.



Γραφήματα 9 και 10. Εδώ παρουσιάζεται η έκφραση του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας στους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς σε σχέση με την επιβίωση, την απόπτωση και τη νέκρωση των κυττάρων που το εκφράζουν στις καλλιέργειες και τις συγκαλλιέργειες.



Εικόνα 4. Οι πληθυσμοί κυττάρων αναλυτικά ανά δείγμα στις 24, 48 και 72 ώρες. Εδώ παρατηρείται η επιβίωση των νευρικών κυττάρων, των λεμφοκυττάρων και των μονοκυττάρων σε μονοκαλλιέργειες ελέγχου (A, C, E και G) και σε νευροανοσολογικές συγκαλλιέργειες (B, D, F, H). Η επιβίωση των CD19 διατηρήθηκε στις καλλιέργειες ελέγχου (A) και η συγκαλλιέργεια με τα νευρικά κύτταρα είχε μέτρια επίδραση στα CD19 θετικά κύτταρα (B). Τα CD3 θετικά κύτταρα στις μονοκαλλιέργειες μετά από σχετική αύξηση τη δεύτερη μέρα, μειώθηκαν τρίτη μέρα (C). Όταν τοποθετήθηκαν σε συγκαλλιέργεια με τα νευρικά κύτταρα οι πληθυσμοί των βιώσιμων CD3 θετικών κυττάρων είχαν σημαντική συνολική μείωση (D). Στις καλλιέργειες ελέγχου οι CD14 θετικοί

πληθυσμοί κυμάνθηκαν σε μέγεθος μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων και, ενώ κάποιοι πληθυσμοί παρέμειναν βιώσιμοι κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, οι μεγάλοι ενεργοποιημένοι πληθυσμοί μειώθηκαν στις 72 ώρες στην καλλιέργεια (E). Στις συγκαλλιέργειες παρατηρήθηκε περιορισμένη ενεργοποίηση και καλή επιβίωση στους μικρούς CD14 πληθυσμούς ενώ οι μεγάλοι και ευρέως ενεργοποιημένοι πληθυσμοί ελαττώθηκαν σύντομα (F). Η απώλεια νευρικών κυττάρων ήταν αυξημένη στις συγκαλλιέργειες που χαρακτηρίζονταν από σημαντική μονοκυτταρική ενεργοποίηση (G).

Μέσω κυτταρομετρίας ροής φαίνεται ότι, εάν λάβουμε υπ' όψιν τις εμφανείς διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, η βιωσιμότητα των B-λεμφοκυττάρων ανεστάλλη σχετικά από την παρουσία των νευρικών κυττάρων. Οι πληθυσμοί των βιώσιμων B κυττάρων μειώθηκαν μετά από 48 και 72 ώρες στις συγκαλλιέργειες (≤ 5.8 και 6.2% μέση μείωση αντίστοιχα, **Εικ. 4B**). Η επιβίωση των T λεμφοκυττάρων επηρεάζεται αρνητικά από την πρώτη μέρα στην συγκαλλιέργεια, αν και υπήρχε διαφορά μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων. Σε δύο καλλιέργειες μειώθηκαν ελαφρά ενώ στις υπόλοιπες 3 μειώθηκαν σημαντικά. Στις 3 τελευταίες η καταστολή των T λεμφοκυττάρων ήταν σαφέστερη μετά τις 72 ώρες στην καλλιέργεια (**Εικ. 4D**). Η αντίδραση των μονοκυττάρων στην παρουσία των νευρικών κυττάρων επίσης ήταν ποικίλη, και πιθανώς επηρεάστηκε από το ποσοστό των κυττάρων σε κάθε καλλιέργεια. Η βιωσιμότητα και ενεργοποίηση στις καλλιέργειες με μικρότερα συγκριτικά ποσοστά μονοκυττάρων ($1.4-2.1\%$) έμειναν κατά βάση ανεπηρρέαστες κατά τη διάρκεια της συγκαλλιέργειας (**Εικ. 4F**). Όταν όμως τα ποσοστά των μονοκυττάρων ήταν μεγαλύτερα ($\geq 8.5\%$) η μείωση των βιώσιμων κυττάρων ήταν ήδη εμφανής στις 24 ώρες της συγκαλλιέργειας. Στις 72 ώρες η βιωσιμότητα των μονοκυττάρων στις συγκαλλιέργειες μειώθηκε σημαντικά αν και η αναλογία τους ήταν υψηλότερη σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου (**Εικ. 4E,F**). Όλα τα μονοκύτταρα στους μεγαλύτερους μονοκυτταρικούς πληθυσμούς ήταν ενεργοποιημένα (θετικά για HLA-DR) καθ' όλη τη διάρκεια των συγκαλλιεργειών.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ II

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Υλικά

Χρησιμοποιήθηκε το καλλιεργητικό μέσο Neurobasal A μαζί με 10% FBS, και το ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Επίσης 0.25% trypsin EDTA, B27 supplement, γλουταμίνη 1%, διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης 1%, εμβρυϊκός βόειος ορός (Fetal Bovine Serum, FBS). Η διαβαθμιζόμενη φυγοκέντρωση έγινε με Opti-prep® και ο υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων έγινε με μέτρηση σε πλάκα Neubauer. Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε πλάκες καλλιέργειας επιστρωμένες με Ulex Europeus ενώ πλάκες καλλιέργειας επιστρωμένες με πολυ-L-λυσίνη χρησιμοποιήθηκαν για την προσκόλληση νευρικών κυττάρων. Για την σήμανση των νευρώνων χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα mouse anti-neuronal nuclei (NeuN) συνδεδεμένο με Alexa Fluor 488 Mouse. Για την σήμανση των αστροκυττάρων χρησιμοποιήθηκε το πολυκλωνικό αντίσωμα GFAP συνδεδεμένο με φλουοροσκεΐνη με τη βοήθεια του αντισώματος anti-rabbit IgG (whole molecule)-FITC antibody. Η μελέτη των δειγμάτων με κυτταρομετρία ροής έγινε με τον κυτταρομετρητή COULTER® EPICS® XL-MCL™. Για κάθε δείγμα μετρήθηκαν τουλάχιστον 10.000 κύτταρα και τα δεδομένα αποδόθηκαν ως ποσοστιαίες αναλογίες. Η ποσοτικοποίηση της απόπτωσης έγινε με τη χρήση της χρώσης DNA dye 7-aminoactinomycin D (7-AAD). Για να μετρηθεί η έκφραση της ισομορφής β της πρωτεΐνης 14-3-3 (p14-3-3β), τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το 14-3-3β(H-8) επισημασμένο με φυκοερυθρίνη με χρήση της τεχνολογίας ZENON και ειδικότερα του συστήματος Alexa Zenon® R-Phycoerythrin Rabbit IgG. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε για το pERK ήταν το Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) XP Rabbit mAb. Για την απομόνωση των μονοκυττάρων του αίματος χρησιμοποιήθηκαν το Histopaque 1077, το καλλιεργητικό υλικό RPMI και έγινε επίστρωση σε Percoll. Χρησιμοποιήθηκε επίσης ρεζερπίνη σε συγκεντρώσεις 15μM, 100μM, 200μM, 1mM και 15mM. Για τη σήμανση των υποτύπων των λεμφοκυττάρων χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα CD3: mouse anti-rat CD3/FITC, CD25: PE-anti-rat CD25 (IL-2R α chain), CD45: FOTC-labelled anti-rat CD45RA και CD80: mouse anti-rat CD80/RPE.

2. Πειραματόζωα

Για την πραγματοποίηση του πειράματος ελήφθη η νόμιμη έγκριση από την Δ/νσης Κτηνιατρικής και Αλιείας της Νομαρχιακής Αυτοδιοίκησης Ανατολικής Αττικής (Αρ. Πρωτοκόλλου Κ/1129). Για την πραγματοποίηση των *in vitro* πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν νεογέννητοι αρουραίοι Wistar 0-1 ημερών. Πριν από την έναρξη της μελέτης, όλα τα ζώα εγκλιματίστηκαν για 7 ημέρες στο χώρο του πειράματος, σε θερμοκρασία ελεγχόμενου περιβάλλοντος (22°C), με ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό και με ημερήσιο κύκλο φωτός/σκότους 12ώρου.

3. Λήψη και καλλιέργεια κυττάρων του ΚΝΣ

Οι νεογέννητοι επίμυες θανατώθηκαν με βαθιά αναισθησία σε ξηρό πάγο και παρασκευάστηκε ο εγκέφαλος. Μετά από μηχανική απομάκρυνση των μηνίγγων έγινε παρασκευή των εγκεφαλικών ημισφαιρίων. Προκειμένου να γίνει η απομόνωση νευρικών κυττάρων για να δημιουργηθεί η μεικτή καλλιέργεια νευρώνων και αστροκυττάρων, μετά τη θανάτωση των ζώων μέσα στο στείρο χώρο έγινε ομογενοποίηση του ιστού από το ένα ημισφαίριο με διαδοχικές διελεύσεις από πιπέτα. Στη συνέχεια το ομογενοποίημα πέρασε μέσα από φίλτρο διαμετρήματος 70 μm για να απομακρυνθούν τα συσσωματώματα. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 1000 στροφές, απόρριψη του υπερκείμενου υγρού και επαναδιάλυση του ιζήματος σε καλλιεργητικό μέσο Neurobasal A. Μετά από διαβαθμιζόμενη φυγοκέντρηση στα 800g για 15 λεπτά με Opti-prep® απομονώθηκε η στοιβάδα με το μεγαλύτερο ποσοστό νευρώνων ενώ συσσωματώματα και ανεπιθύμητα κύτταρα και αγγεία αποκλείστηκαν βάσει ειδικού βάρους. Ο υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων έγινε με μέτρηση σε πλάκα Neubauer. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν 70.000 κύτταρα σε πλάκες καλλιέργειας επιστρωμένες με Ulex Europeus και επώαση για 1 ώρα στους 37°C/ 5%CO₂ προκειμένου να προσκολληθούν ενδοθηλιακά κύτταρα και κύτταρα επιθηλιακής προέλευσης που θα μπορούσαν να επινείμουν την καλλιέργεια. Τα μη προσκολλημένα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πλάκες καλλιέργειας επιστρωμένες με πολυ-L-λυσίνη που διευκολύνουν την προσκόλληση νευρικών κυττάρων και επώαστηκαν στους 37°C/5%CO₂ σε καλλιεργητικό μέσο με 10% FBS για 4 ώρες. Ακολούθησε αλλαγή του καλλιεργητικού μέσου Neurobasal A/B27 supplement σε ένδεια ορού. Με βάση την βιβλιογραφία αυτό το μέσο προωθεί την ανάπτυξη των νευρώνων ενώ η έλλειψη αυξητικών παραγόντων δεν επιτρέπει την μίτωση πληθυσμών με αναγεννητικό δυναμικό όπως τα

αστροκύτταρα. Με τον τρόπο αυτό η αναλογία νευρώνων-αστροκυττάρων παραμένει σταθερή στον χρόνο. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 7 ημέρες με αλλαγή του καλλιεργητικού μέσου κάθε 2 ημέρες απορρίπτοντας το μισό και προσθέτοντας νέο αντίστοιχου όγκου. Σε ορισμένες από τις καλλιέργειες αυτές προστέθηκε ρεζερπίνη σε συγκεντρώσεις 15μM, 100μM, 200μM, 1mM και 15mM η οποία αφέθηκε να δράσει για διαφορετικά χρονικά διαστήματα, προκειμένου να εξεταστεί η δράση της στην επιβίωσή τους, και η έκφραση των πρωτεϊνών pERK και 14-3-3β.

4. Λήψη και καλλιέργεια ανοσοκυττάρων

Το αίμα απ' όπου πήραμε τα ανοσοκύτταρα προήλθε από την καρδιά νεογνών επιμύων. Προκειμένου να απομονωθούν τα κύτταρα ίσοι όγκοι αίματος και καλλιεργητικού υλικού RPMI με 10% FBS επιστρώθηκαν σε Percoll και φυγοκεντρήθηκαν στις 900 στροφές για 40min. Δημιουργήθηκε έτσι ένα στρώμα πλούσιο σε λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα το οποίο απομονώθηκε μετά από διαδοχικούς κύκλους πλύσεων με RPMI και φυγοκεντρήσεων. Το κυτταρικό ίζημα που προέκυψε επαναιωρήθηκε σε RPMI με 10% FBS και διατηρήθηκαν *in vitro* (στους 37°C, και σε περιβάλλον με 95% συγκέντρωση αέρα και 5%CO₂). Ο μέσος όρος του αριθμού των κυττάρων και η βιωσιμότητα καθορίστηκαν με το αιμοκυτταρόμετρο και με τη χρώση μπλε του τρυπανίου. Οι πρωτογενείς ανοσοκυτταρικές καλλιέργειες διατηρήθηκαν σε μέσο νευρωνικών καλλιιεργειών όπως περιγράφεται ανωτέρω.

5. Μελέτη των κυτταρικών πληθυσμών των νευρώνων, αστροκυττάρων και λεμφοκυττάρων με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής

Η μελέτη των δειγμάτων του ΚΝΣ με κυτταρομετρία ροής έγινε την 4η ημέρα αυτών των καλλιιεργειών. Για την προετοιμασία των δειγμάτων του ΚΝΣ έγινε αρχικά ομογενοποίηση του δείγματος, το κυτταρικό εναιώρημα διηθήθηκε μέσα από φίλτρο και τα κύτταρα που προήλθαν από τον ιστό αφού πλύθηκαν με PBS, φυγοκεντρήθηκαν στις 2000 στροφές για 10 λεπτά. Για την σήμανση των νευρώνων χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα mouse anti-neuronal nuclei (NeuN) (Millipore MAB 377) συνδεδεμένο με Φλουοροσκεΐνη με την τεχνολογία ZENON (Molecular Probes) και ειδικότερα με το σύστημα Alexa Fluor 488 Mouse IgG1 (Z25002). Ενώ για την επισήμανση των αστροκυττάρων χρησιμοποιήθηκε το πολυκλωνικό αντίσωμα Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) (DAKO ZO334) συνδεδεμένο με φλουοροσκεΐνη με τη βοήθεια του αντισώματος anti-rabbit IgG (whole

molecule)-FITC antibody (Sigma FO382). Για το GFAP (1μl αντίσωμα/10⁶ κύτταρα) τα κύτταρα επώαστηκαν για 60' σε θερμοκρασία δωματίου, πλήθθηκαν με PBS και στη συνέχεια προστέθηκε το δευτερογενές αντίσωμα. Μετά από 90' λεπτά επώαση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου τα κύτταρα πλύθηκαν με PBS και μελετήθηκαν με τον κυτταρομετρητή ροής. Για τους νευρώνες (anti-NeuN 1μg/10⁶ κύτταρα) ακολουθήθηκε παρόμοια διαδικασία, με τελική επώαση 20 λεπτών.

Ο προσδιορισμός των ανοσοκυτταρικών πληθυσμών με την κυτταρομετρία ροής έγινε με τον επωασμό 100μl πλήρους αίματος σε αντιπηκτικό με 10μl με τα αντίστοιχα αντισώματα για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2ml διαλύματος 1xFACS Lysing Solution και τα δείγματα επώαστηκαν περαιτέρω για 10 λεπτά. Μετά από φυγοκέντρηση τα κύτταρα πλύθηκαν με 1xPBS και μέρος τους εξετάστηκε με το κυτταρόμετρο ροής ενώ τα υπόλοιπα μπήκαν σε καλλιέργεια. Προκειμένου να γίνει η σήμανση με τα αντισώματα CD3, CD25, CD45 και CD80 τα ανοσοκύτταρα που βρίσκονταν σε καλλιέργεια συνελλέγησαν από τις πρωτογενείς καλλιέργειες και από τις συγκαλλιέργειες με αναρρόφηση. Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στις 3500 rpm για 10 λεπτά και έγινε η επώαση με τα αντισώματα για 45 λεπτά στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου. Οι συνδυασμοί των αντισωμάτων ήταν οι ακόλουθοι: CD45-FITC με 5μl CD80-PE και 5μl CD3-FITC με 5μl CD80-PE. Στη συνέχεια έγινε πλύση με PBS, φυγοκέντρηση στις 3500rpm και επαναιώρηση σε PBS. Μετά έγινε μέτρηση με κυτταρομετρία ροής. Η σήμανση των λεμφοκυττάρων γινόταν στις χρονικές στιγμές ενδιαφέροντος ανάλογα με το πείραμα - τα λεμφοκύτταρα παρέμεναν σε μονοκαλλιέργεια για τουλάχιστον 4 ημέρες, όσες απαιτούνταν για να ξεκινήσουν οι καλλιέργειες των νευρικών. Οι μετρήσεις της έντασης φθορισμού πραγματοποιήθηκαν σε κυτταρομετρητή ροής COULTER® EPICS® XL-MCL™ Για κάθε δείγμα μετρήθηκαν τουλάχιστον 10.000 κύτταρα. Τα δεδομένα εκφράζονται ως ποσοστιαία αναλογία που επιτρέπει την ποσοτική εκτίμηση της έκφρασης ανά κυτταρικό πληθυσμό.

6. Μελέτη της βιωσιμότητας των νευρικών κυτταρικών πληθυσμών και μελέτη των πρωτεϊνών pERK και p14-3-3

Η ποσοτικοποίηση της απόπτωσης των πληθυσμών των νευρικών κυττάρων έγινε με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής 7-aminoactinomycin D (7-AAD). Η μέτρηση των αποπτωτικών κυττάρων με την 7-AAD που συνδέεται με το DNA βασίζεται στη διάχυσή της μέσα από τις μεμβράνες των αποπτωτικών κυττάρων και την ακόλουθη παρένθεσή της μεταξύ της κυττοσίνης και της γουανίνης (Schmid και συν. 1994). Τα αποπτωτικά κύτταρα

προσλαμβάνουν εν μέρει την 7-AAD και χρωματίζονται ελαφρά, σε αντίθεση με τα ζωντανά κύτταρα που παραμένουν 7-AAD αρνητικά και με τα κύτταρα που βρίσκονται σε προχωρημένη απόπτωση ή νέκρωση. Αυτά έχουν χάσει την ακεραιότητα της μεμβράνης τους και προσλαμβάνουν έντονα την 7-AAD. Τα κύτταρα της καλλιέργειας, μετά από μηχανική αποκόλληση και φυγοκέντρηση, πλύθηκαν δύο φορές με 5 ml PBS. Συνολικά 3 μ l 7-AAD προστέθηκαν σε 100 μ l κυτταρικού εναιωρήματος και μετά από καλή ανάδευση επωάστηκαν για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Τα χρωσμένα κύτταρα πλύθηκαν στη συνέχεια με 5 ml PBS και φυγοκεντρήθηκαν. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και έγιναν διαπερατά με τη χρήση παραφορμαλδεύδης 1%, σαπονίνης 1% σε PBS για 20 λεπτά στους 4°C. Κλάσματα του κυτταρικού εναιωρήματος χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για να μετρηθεί η έκφραση της ισομορφής β της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης p14-3-3, με τη χρήση του αντισώματος 14-3-3 β -PE σεσημασμένο με PE και η έκφραση της πρωτεΐνης pERK [phospho p44/42-MAPK(ERK1/2) antirabbit mAb polyclonal] μαζί με FITC anti-rabbit IgG με τη χρήση της τεχνολογίας Zenon.

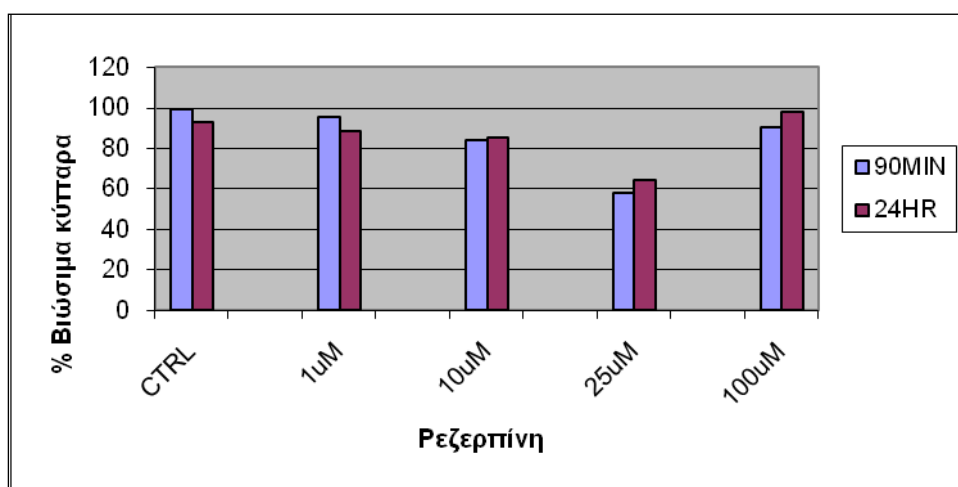
7. Συγκαλλιέργεια νευρικών κυττάρων και ανοσοκυττάρων και προσθήκη ρεζερπίνης

Την 4η μέρα από την έναρξη των μονοκαλλιιεργειών έγινε η συγκαλλιέργεια των ανοσοκυττάρων με τα νευρικά κύτταρα σε αναλογία 1:1. Σε ορισμένες από αυτές τις συγκαλλιέργειες προστέθηκε ρεζερπίνη. Αυτό έγινε ως εξής: στις καλλιέργειες του νευρικού συστήματος προστέθηκε ρεζερπίνη 1mM για 90 λεπτά και στη συνέχεια προστέθηκαν τα ανοσοκύτταρα. Μετά την παρέλευση τριών ωρών, συλλέχθηκαν τα λεμφοκύτταρα μέσω αφαίρεσης του μέσου, φυγοκέντρησης στις 3500rpm για 10 λεπτά και επαναιώρησης σε PBS.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Επίδραση ρεζερπίνης στην απόπτωση και νέκρωση των καλλιιεργειών νευρώνων και αστροκυττάρων

Ο διαχωρισμός και η επεξεργασία των δειγμάτων έγινε όπως περιγράφεται ανωτέρω. Για τα ακόλουθα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν οι εγκεφαλοι από πέντε νεογέννητους αρουραίους. Την 4η μέρα η καλλιέργεια αποτελούνταν από 50-60% αστροκύτταρα και από 30-40% νευρώνες όπως διαπιστώθηκε με κυτταρομετρία ροής. Προκειμένου να προσδιοριστεί η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων της ρεζερπίνης στις καλλιέργειες των νευρικών κυττάρων που λήφθηκαν από τους επίμυες, τα πειράματα έγιναν αρχικά με τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις: 1μM, 10μM, 25μM, 100μM. Ένα άλλο ερώτημα ήταν αυτό του κατάλληλου χρόνου δράσης της ουσίας. Μελετήθηκε η βιωσιμότητα των πληθυσμών αυτών που φαίνεται στο Γράφημα 1.



Γράφημα 1. Βιωσιμότητα καλλιιεργειών νευρικών κυττάρων με διαφορετικές συγκεντρώσεις ρεζερπίνης, 90 λεπτά μετά την έναρξη της δράσης της ρεζερπίνης και 24 ώρες αργότερα.

Εδώ παρουσιάζεται ο μέσος όρος της βιωσιμότητας των κυτταροκαλλιιεργειών όταν η ρεζερπίνη στις ανωτέρω συγκεντρώσεις παρέμεινε για 90 λεπτά και για 24 ώρες. Δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές βιωσιμότητας μεταξύ των 90 λεπτών και των 24 ωρών. Παρομοίως τα ποσοστά επιβίωσης στις καλλιέργειες που δέχθηκαν την επίδραση 100μM δεν διέφεραν σημαντικά από αυτά της ομάδας ελέγχου. Έγινε επίσης η μέτρηση της απόπτωσης και της νέκρωσης που παρατηρούνται στον Πίνακα 1. Η απόπτωση κυμάνθηκε μεταξύ 0,6% (ομάδα ελέγχου) και 33,7% (25μM) στα 90 λεπτά και μεταξύ 1,1% (100μM) και 29%

(25μM) στις 24 ώρες, αλλά η αυξημένη συγκέντρωση ρεζερπίνης δεν αντιστοιχούσε σε αυξημένη απόπτωση. Η νέκρωση των κυττάρων σε όλες τις συγκεντρώσεις φαίνεται να διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα με μέγιστη νέκρωση 8,6% στα 25μM. Συνολικά φαίνεται πως η βιωσιμότητα των νευρικών κυττάρων για συγκεντρώσεις ρεζερπίνης μεταξύ 1-100μM δεν επηρεάζεται σημαντικά.

Καλλιέργειες	Απόπτωση %		Νέκρωση %	
	90 λεπτά	24 ώρες	90 λεπτά	24 ώρες
CNTRL	0,6	5,5	0,1	1,6
1uM	4,5	8,9	0,4	2,7
10uM	15,5	8,1	0,6	6,8
25uM	33,7	29	8,6	7
100uM	9,9	1,1	0	0,9

Πίνακας 1. Ποσοστά απόπτωσης και νέκρωσης των καλλιιεργειών των νευρικών κυττάρων μετά από 90 λεπτά παραμονής της ρεζερπίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στις καλλιέργειες και μετά από 24 ώρες.

Συνεπώς παρατηρείται πως η προσθήκη ρεζερπίνης στις καλλιέργειες νευρώνων σε συγκεντρώσεις μέχρι 100μM δεν μετέβαλε τη σημαντικά τη βιωσιμότητα την νευρωνικών καλλιιεργειών. Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ρεζερπίνης σε αυτές τις καλλιέργειες μετέβαλαν τα ποιοτικά τους χαρακτηριστικά, έγινε μέτρηση των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών pERK και p14-3-3 ισομορφής β στις καλλιέργειες των νευρώνων με συγκεντρώσεις ρεζερπίνης 200μM, 1mM και 15mM. Στους Πίνακες 2 και 3 παρατηρούνται οι μεταβολές των επιπέδων της έκφρασης του pERK και του 14-3-3β όταν διαφορετικές συγκεντρώσεις ρεζερπίνης τοποθετήθηκαν στις καλλιέργειες.

Συγκεντρώσεις ρεζερπίνης	pERK	
	Ρεζερπίνη για 60 λεπτά	P/60' + Ανάπαυση 60 λεπτά
CTRL	62,7	
15μM	61,3	66,0
100μM	24,5	40,1
200μM	27,1	35,5
1mM	42,8	31,7
15mM	43,2	39,9

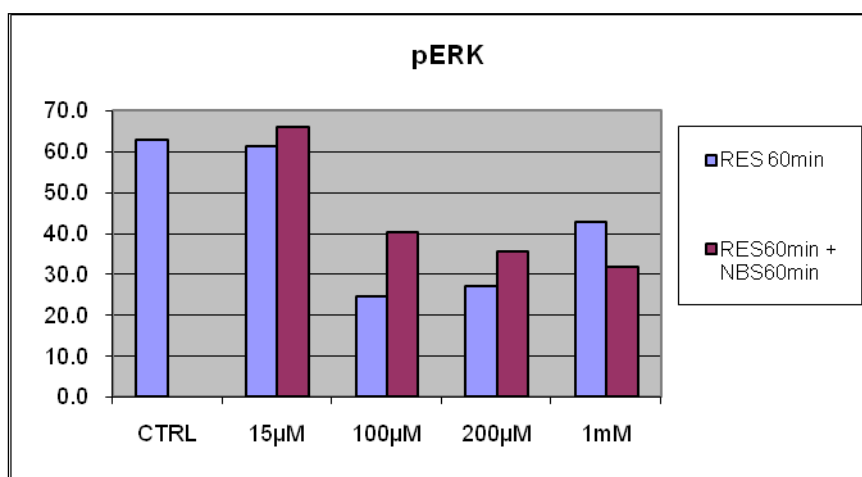
Πίνακας 2. Μεταβολές του pERK ως αποτελέσματα διαφορετικών συγκεντρώσεων ρεζερπίνης για 60 λεπτά σε καλλιέργειες νευρικών κυττάρων επιμύων.

Συγκεντρώσεις ρεζερπίνης	14-3-3β	
	Ρεζερπίνη για 60 λεπτά	P/60' + Ανάπαυση 60 λεπτά
CNTRL	51,8	
15μM	48,6	56,7

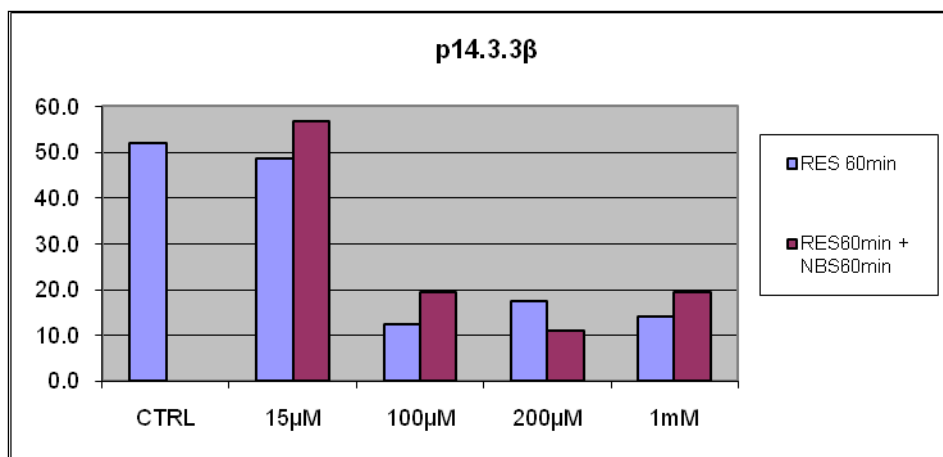
100μM	12,4	19,4
200μM	17,3	10,9
1mM	13,9	19,4
15mM	37,9	32,5

Πίνακας 3. Μεταβολές του p14-3-3β ως αποτελέσματα διαφορετικών συγκεντρώσεων ρεζερπίνης για 60 λεπτά σε καλλιέργειες νευρικών κυττάρων.

Η προσθήκη ρεζερπίνης στις καλλιέργειες των νευρικών κυττάρων επιμύων μετά από προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων ρεζερπίνης (15μM-15mM) φαίνεται πως επιδρά στα επίπεδα του pERK σε συγκεντρώσεις από 100μM και άνω (Πίνακας 2) όταν γίνεται σύγκριση με την ομάδα ελέγχου στην οποία δεν έχει γίνει προσθήκη της ουσίας. Μίας ώρας ανάπαυση της καλλιέργειας (η οποία ακολουθούσε μία ώρα έκθεση της καλλιέργειας στην ουσία) επαναφέρει σε κάποιο βαθμό την έκφραση του pERK όταν η συγκέντρωση της ουσίας είναι μέχρι 200μM, όταν όμως αυτή η συγκέντρωση είναι μεγαλύτερη ή ίση με 1mM η δράση της ρεζερπίνης φαίνεται να συνεχίζεται κατά τη διάρκεια της ανάπαυσης και τα επίπεδα της έκφρασης του pERK εξακολουθούν να μειώνονται. Όσον αφορά στην έκφραση της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης 14-3-3β σε όμοιες συνθήκες και συγκεντρώσεις παρατηρείται συνολικά μείωση των επιπέδων έκφρασής της σε σχέση με την ομάδα ελέγχου σε όλες τις συγκεντρώσεις ρεζερπίνης. Όμως η αύξηση της συγκέντρωσής της δεν οδηγεί σε αντίστοιχη μείωση των επιπέδων της 14-3-3β, ενώ η μεταβολές τους μετά την ανάπαυση των καλλιεργειών ποικίλλουν. Τα ανωτέρω αποτελέσματα απεικονίζονται και στα Γραφήματα 2 και 3.

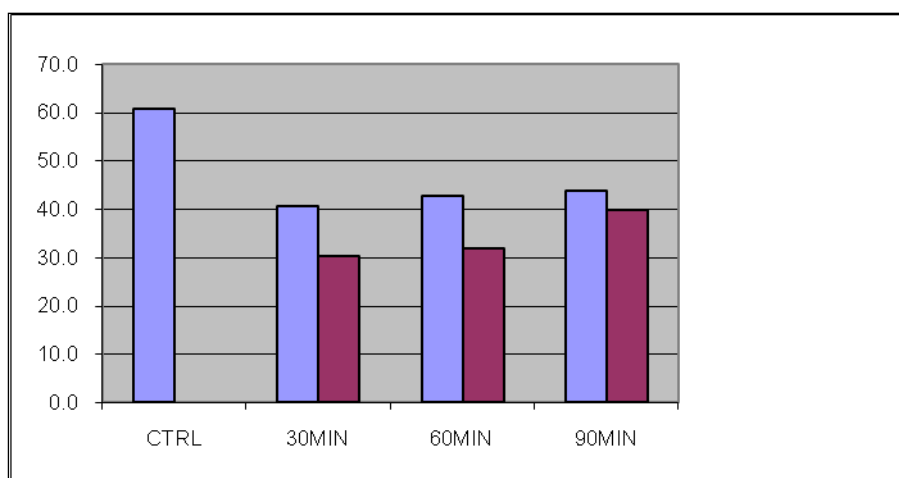


Γράφημα 2. Γράφημα των μεταβολών του pERK ως αποτελέσματα διαφορετικών συγκεντρώσεων ρεζερπίνης για 60 λεπτά σε καλλιέργειες νευρικών κυττάρων και μετά από ανάπαυση της καλλιέργειας και αλλαγής του καλλιεργητικού μέσου για 60 λεπτά.



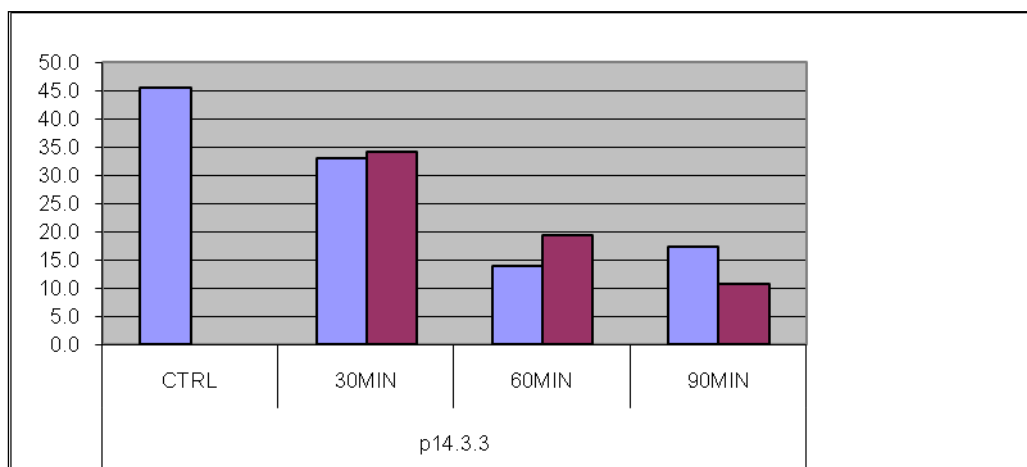
Γράφημα 3. Παρουσιάζονται οι μεταβολές του p14-3-3β ως αποτελέσματα διαφορετικών συγκεντρώσεων ρεζεργίνης για 60 λεπτά σε καλλιέργειες νευρικών κυττάρων και μετά από ανάπαυση της καλλιέργειας με αλλαγή του καλλιεργητικού μέσου για 60 λεπτά.

Μετά τα ανωτέρω περιγραφόμενα πειράματα ο επόμενος στόχος ήταν να προσδιοριστεί ο χρόνος δράσης που απαιτείται προκειμένου να παρατηρηθούν μεταβολές στις καλλιέργειες αυτές. 1mM ρεζεργίνης προστέθηκε για χρονικά διαστήματα 30, 60 και 90 λεπτών στις καλλιέργειες και σε κάθε περίπτωση ακολούθησε περίοδος ανάπαυσης μίας ώρας. Ήδη από τα πρώτα 30 λεπτά η δράση της ρεζεργίνης οδήγησε σε μείωση της έκφρασης του pERK ενώ παραμονή της ρεζεργίνης για 60 και 90 λεπτά στις καλλιέργειες δεν φαίνεται να επηρεάζει περαιτέρω την έκφραση του pERK. Όπως όμως φαίνεται στο γράφημα 4 κατά τη διάρκεια της ανάπαυσης των καλλιεργειών για μία ώρα η δράση της ουσίας φαίνεται να συνεχίζεται καθώς η έκφραση του pERK στις καλλιέργειες εξακολουθεί να μειώνεται.



Γράφημα 4. Επίδραση 1mM ρεζεργίνης στο pERK σε χρονικά διαστήματα 30, 60 και 90 λεπτών (γαλάζιο) και μετά από περίοδο ανάπαυσης 60 λεπτών (μωβ). Τα αποτελέσματα προέρχονται από το μέσο όρο των αποτελεσμάτων 4 καλλιεργειών.

Όσον αφορά στο 14-3-3β, η παράταση της επίδρασης της ρεζερπίνης επιδρά σημαντικά στην έκφρασή του, καθώς μειώνεται. Όταν η ρεζερπίνη παραμένει μέσα στην καλλιέργεια για διάστημα μίας ώρας, και ακολουθεί ανάπαυση της καλλιέργειας για μία ώρα, η έκφραση του 14-3-3β αυξάνεται, φαινόμενο που όμως δεν παρατηρείται όταν η ουσία σε συγκέντρωση 1mM παραμένει στην καλλιέργεια για 90 λεπτά (γράφημα 5).



Γράφημα 5 . Επίδραση 1mM ρεζερπίνης στην 14-3-3β σε χρονικά διαστήματα 30, 60 και 90 λεπτών (γαλάζιο) και μετά από περίοδο ανάπαυσης 60 λεπτών (μωβ). Τα αποτελέσματα προέρχονται από το μέσο όρο των αποτελεσμάτων 4 καλλιεργιών.

Το συνολικά συμπέρασμα που προκύπτουν από τα ανωτέρω αποτελέσματα είναι ότι μονιμότερες μεταβολές στην καλλιέργεια παρατηρούνται όταν 1mM ρεζερπίνης προστίθεται για 90 λεπτά στις καλλιέργειες των νευρικών κυττάρων των επιμύων.

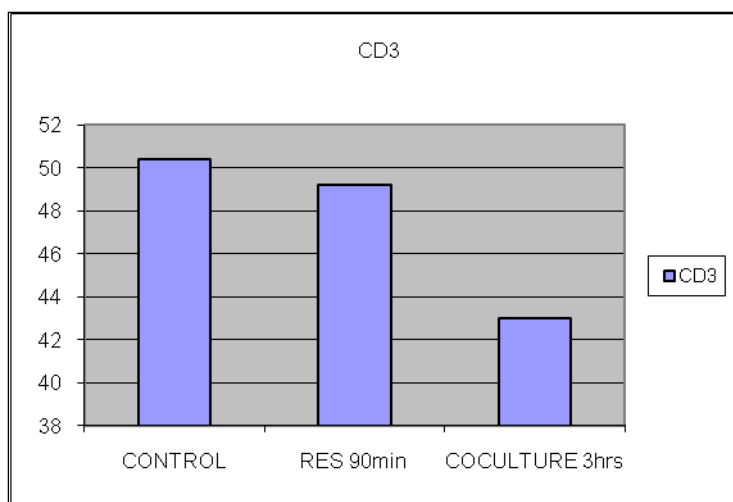
2. Καλλιέργειες λεμφοκυττάρων

Οι μονοκαλλιέργειες λεμφοκυττάρων επιμύων προήλθαν από τρία πειραματόζωα μετά από λήψη καρδιακού αίματος. Οι καλλιέργειες διατηρήθηκαν για 4 ημέρες πριν από τις συγκαλλιέργειες. Σε κάποιες από αυτές έγινε προσθήκη ρεζερπίνης για 90 λεπτά, ενώ οι υπόλοιπες ήταν καλλιέργειες ελέγχου. Σε όλες αυτές τις μονοκαλλιέργειες εξετάστηκε η βιωσιμότητα των T λεμφοκυττάρων (Γράφημα 6). Η ρεζερπίνη δεν φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά την επιβίωση των λεμφοκυττάρων αφού μεταξύ των δύο καλλιεργειών δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στο ποσοστό των T-λεμφοκυττάρων (CD3 θετικά). Στην καλλιέργεια ελέγχου το ποσοστό των T-κυττάρων ήταν 64,2% ενώ στις καλλιέργειες με τη δράση ρεζερπίνης ήταν 65,1%. Η βιωσιμότητα των T-κυττάρων ήταν 50,4% στην ομάδα

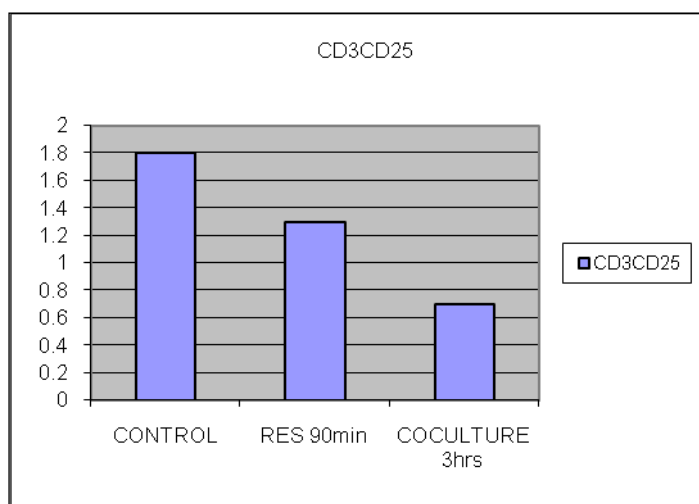
ελέγχου και 49,15% στις καλλιέργειες με ρεζερπίνη και η απόπτωση τους ήταν 21,5% και 24,5% αντίστοιχα. Το ποσοστό των ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων (CD3CD25 θετικά) ήταν παρόμοιο στις δύο ομάδες (6,23% στην ομάδα ελέγχου, 5,27% στην ομάδα της ρεζερπίνης) ενώ η απόπτωση των ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων ήταν σημαντικά αυξημένη αλλά επίσης χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων (71,6% και 75,8% αντίστοιχα). Τα βιώσιμα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα ήταν 1,77% στην ομάδα ελέγχου και 1,28% στις καλλιέργειες με ρεζερπίνη. Συνολικά η προσθήκη ρεζερπίνης στις λεμφοκυτταρικές καλλιέργειες δεν φαίνεται να τις επηρεάζει σημαντικά (γραφήματα 6 και 7).

3. Αποτελέσματα συγκαλλιιεργειών

Στο τελικό στάδιο της παρούσας διατριβής εξετάστηκε η βιωσιμότητα και η ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων όταν βρίσκονται σε συγκαλλιέργεια για 3 ώρες με αυτόλογα νευρικά κύτταρα στα οποία έχει επιδράσει ρεζερπίνη 1mM για 90 λεπτά. Η ρεζερπίνη παρέμεινε στις καλλιέργειες. Μετά από συγκαλλιέργεια τριών ωρών τα λεμφοκύτταρα αφαιρέθηκαν με αναρρόφηση και μετά από σήμανση με αντισώματα εξετάστηκαν με κυτταρομετρία ροής. Έτσι μετρήθηκε τόσο το σύνολο των λεμφοκυττάρων (CD45 θετικά κύτταρα) και των ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων (CD45CD80 θετικά) όσο και η υποομάδα των T-κυττάρων. Το συνολικό ποσοστό των λεμφοκυττάρων στις συγκαλλιέργειες ήταν κατά μέσο όρο 69,8%, εκ των οποίων 49,55% ήταν βιώσιμα και το 29,25% ήταν αποπτωτικά. Ενεργοποιημένα ήταν το 4,27% του συνόλου των λεμφοκυττάρων. Τα περισσότερα από τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα ήταν αποπτωτικά (87,85%) ενώ βιώσιμα ήταν μόλις το 0,945%. Συγκεκριμένα τα T-λεμφοκύτταρα αποτελούσαν το 58,16% των κυττάρων του υπερκειμένου των συγκαλλιιεργειών. Το 43,03% ήταν βιώσιμα και το 25,63% αποπτωτικά. Τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα αποτελούσαν το 2,9% του υπερκειμένου. Εξ αυτών το 77,33% ήταν αποπτωτικά. Στα γραφήματα 6 και 7 παρατηρείται η σύγκριση μεταξύ των τριών ομάδων T λεμφοκυττάρων: της ομάδας ελέγχου, των κυττάρων που είχαν υποβληθεί σε επίδραση ρεζερπίνης και των T λεμφοκυττάρων που προέρχονταν από τις συγκαλλιέργειες με νευρικά κύτταρα τα οποία είχαν επίσης εκτεθεί σε ρεζερπίνη. Γίνεται εμφανής η μείωση τόσο του απόλυτου αριθμού των T λεμφοκυττάρων, όσο και του ποσοστού των ενεργοποιημένων T κυττάρων υπό την επίδραση της ρεζερπίνης. Στα γραφήματα 6 και 7 αναπαρίσταται η βιωσιμότητα των καλλιιεργειών των T-λεμφοκυττάρων.



Γράφημα 6. Επίδραση σε T λεμφοκύτταρα των συγκαλλιιεργειών με αυτόλογα νευρικά νύτταρα υπό την επίδραση ρεζερπίνης 1mM για 90 λεπτά. Εδώ παρατηρείται η μείωση των βιώσιμων T λεμφοκυττάρων στη συγκαλλιέργεια.



Γράφημα 7. Επίδραση ρεζερπίνης 1mM για 90 λεπτά σε ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα που προέρχονται από συγκαλλιέργειες με αυτόλογα νευρικά κύτταρα. Παρατηρείται η μείωση των ενεργοποιημένων βιώσιμων T λεμφοκυττάρων στη συγκαλλιέργεια.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Πρωτογενείς μεικτές καλλιέργειες νευρώνων και αστροκυττάρων από ανθρώπινους ενήλικους ιστούς

Οι πρωτογενείς καλλιέργειες διατηρούνται για τουλάχιστον 14 μέρες. Οι νευρώνες και τα αστροκύτταρα παραμένουν βιώσιμοι καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας. Οι νευρώνες αναπτύσσονται και παρατηρείται προσεκβολή νευριτών και δημιουργία δικτύου με αστροκύτταρα. Το μοντέλο αυτό είναι αναπαράξιμο.

Οι αναλογίες των νευρικών κυττάρων παραμένουν σταθερές, και στις καλλιέργειες παρατηρείται χαμηλή απόπτωση και νέκρωση. Τα κύτταρα φαίνονται να διατηρούν το διαφοροποιημένο τους φαινότυπο και τις νευροφυσιολογικές ιδιότητές τους. Έχουν λειτουργικό σύστημα μετάδοσης μηνυμάτων και δυνατότητα επικοινωνίας μεταξύ τους.

Πρωτογενείς συγκαλλιέργειες νευρώνων και αστροκυττάρων προερχομένων από ανθρώπινους ιστούς με αυτόλογα λεμφοκύτταρα.

Τα νευρικά κύτταρα έχουν σχετικά μειωμένη βιωσιμότητα σε συγκαλλιέργεια με αυτόλογα ανοσοκύτταρα, με αύξηση της απόπτωσης αλλά όχι της νέκρωσης.

Παρατηρείται μείωση του συνολικού ποσοστού των λεμφοκυττάρων σε καλλιέργειες και συγκαλλιέργειες με μείωση της βιωσιμότητας και αύξηση της απόπτωσης και της νέκρωσης.

T – λεμφοκύτταρα: προοδευτική ποσοστιαία αύξηση του συνολικού αριθμού των κυττάρων σε καλλιέργειες και συγκαλλιέργειες, η οποία όμως είναι αναλογικά μικρότερη στις συγκαλλιέργειες.

B λεμφοκύτταρα: παρατηρείται είτε αύξηση του συνολικού ποσοστού στις συγκαλλιέργειες σε σχέση με τις μονοκαλλιέργειες είτε παρέμειναν σταθερά στις επιμέρους συγκαλλιέργειες με σχετική μείωση βιωσιμότητας.

Μονοκύτταρα: Διαφορές μεταξύ των δειγμάτων στο μέγεθος και την ενεργοποίηση, οι οποίες ήταν εμφανείς από την αρχή της καλλιέργειας. Είναι πιθανή η συσχέτιση με την κατάσταση

του ασθενούς, ενδεικτική της ποικιλίας των νευροανοσολογικών απαντήσεων μεταξύ ατόμων. Η ενεργοποίηση μονοκυττάρων ήταν ανάλογη του μεγέθους των CD14 πληθυσμών.

Μεγαλύτεροι μονοκυτταρικοί πληθυσμοί: μειωμένη επιβίωση τόσο των νευρικών όσο και των μονοκυτταρικών πληθυσμών.

Πρωτογενείς συγκαλλιέργειες νευρικών κυττάρων επιμύων και αυτόλογων ανοσοκυττάρων υπό την επίδραση ρεζερπίνης

Οι συνθήκες καλλιέργειας των νευρικών κυττάρων (νευρώνες και αστροκύτταρα) που ελήφθησαν από νεογνήτους επίμυες διευκόλυναν την επιβίωση τους και τη περαιτέρω χρήση τους σε ερευνητικά πειράματα.

Η επίδραση 1mM ρεζερπίνης σε μεικτές καλλιέργειες νευρικών κυττάρων για 90 λεπτά μείωσε την έκφραση των πρωτεϊνών pERK και 14-3-3β σε αυτές τις καλλιέργειες.

Η προσθήκη ρεζερπίνης 1mM σε μονοκαλλιέργειες λεμφοκυττάρων επιμύων δε φαίνεται να μεταβάλει σημαντικά τα ποσοστά των T λεμφοκυττάρων στις καλλιέργειες, την επιβίωση, απόπτωση και ενεργοποίησή τους.

Η συγκαλλιέργεια νευρικών κυττάρων επιμύων με αυτόλογα λεμφοκύτταρα όταν σε αυτές τις καλλιέργειες προστεθεί ρεζερπίνη, οδηγεί σε μείωση συνολικού ποσοστού των T-λεμφοκυττάρων στις συγκαλλιέργειες.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μακροπρόθεσμη διατήρηση σε καλλιέργεια ενήλικων ανθρώπινων νευρώνων αποτελεί μια ερευνητική πρόκληση, ενώ οι προσπάθειες να δημιουργηθούν και να διατηρηθούν πρωτογενείς καλλιέργειες από ιστούς του ΚΝΣ συχνά εμποδίζονται από την υποκείμενη παθολογία του ιστού και τις εφαρμοζόμενες μεθόδους καλλιέργειας. Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζεται ένα βελτιωμένο και αναπαράξιμο μοντέλο καλλιέργειας βιώσιμων και διαφοροποιημένων νευρώνων και αστροκυττάρων που προέρχονται από δείγματα ανθρώπινου εγκεφάλου. Οι ενήλικοι νευρώνες και τα αστροκύτταρα στις πρωτογενείς καλλιέργειες διατήρησαν το διαφοροποιημένο τους φαινότυπο και τις νευροφυσιολογικές ιδιότητές τους καθ'όλη τη διάρκεια των καλλιεργειών, γεγονός που επέτρεψε τη χρήση αυτού του *in vitro* συστήματος για τη μελέτη φλεγμονών του νευρικού συστήματος.

Στο σύστημα των μεικτών νευρωνικών/αστροκυτταρικών πρωτογενών καλλιεργειών οι νευρώνες διατηρήθηκαν παρουσία αστροκυττάρων και χωρίς ορμονικούς νευροτροφικούς παράγοντες. Τα αστροκύτταρα είναι ο επικρατέστερος κυτταρικός πληθυσμός στο φλοιό. Παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση των νευρώνων παρέχοντας νευροτροφική υποστήριξη και εξισορροπώντας το κυτταρικό περιβάλλον μέσω προστασίας από το οξειδωτικό στρες (Amor και συν. 2010, Heales και συν. 2004). Συγχρόνως, ενδείξεις ότι τα αστροκύτταρα συμμετέχουν στη μεταφορά μηνυμάτων από τους νευρώνες και στη συναπτογένεση, υποδεικνύουν τον κεντρικό τους ρόλο στη βιωσιμότητα, τη διαφοροποίηση και τη μετανάστευση των νευρώνων (Amor και συν. 2010, Hama και συν. 2004). Συνεπώς η συμμετοχή των αστροκυττάρων θεωρήθηκε ως θεμελιώδης για τη δημιουργία ενός *in vitro* κυτταρικού μοντέλου κατάλληλου για μελέτη της νευροφυσιολογίας του ενήλικου ανθρώπινου νευρικού συστήματος.

Προκειμένου να δημιουργηθεί ένα *in vitro* εργαλείο κατάλληλο για τη μελέτη ανθρώπινων νευρώνων, το περιβάλλον της καλλιέργειας τυποποιήθηκε και ήταν δυνατό να αναπαραχθεί η μέθοδος της καλλιέργειας. Στις καλλιέργειες των κυττάρων προστέθηκαν σημαντικοί μεταβολίτες όπως γλυκόζη και αντιοξειδωτικά προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η κυτταροτοξικότητα που οφείλεται στις υψηλές μεταβολικές απαιτήσεις των κυττάρων (Temburni και Jacob 2001). Η προσκόλληση των διαχωρισμένων εγκεφαλικών κυττάρων, η επιμήκυνση των νευριτών και η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων ενισχύθηκε από την προσθήκη ορού σε χαμηλή συγκέντρωση, ο οποίος είναι γνωστό ότι προάγει την κυτταρική επιβίωση χωρίς να χωρίς να επηρεάζει τη διαφοροποίηση των νευρώνων ή να ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των αστροκυττάρων (Meberg και Miller 2003, De Groot και συν. 2000).

Δεν προστέθηκαν νευροτροφικά συμπληρώματα και οι αυξητικοί παράγοντες, καθώς η προστατευτική τους δράση στους ενήλικες νευρώνες δεν έχει αποδειχθεί οριστικά, ενώ έχει αμφισβητηθεί η ικανότητά τους να προφυλάξουν τα κύτταρα από την αποδιαφοροποίηση (Logan και συν. 2006).

Στις πρωτογενείς καλλιέργειες οι νευρωνικοί φαινότυποι ήταν ήδη εμφανείς από τα αρχικά στάδια της καλλιέργειας και συνέχισαν να αναπτύσσονται κατά τη διάρκειά της. Τα κύτταρα που ήταν φαινοτυπικά όμοια με νευρώνες και με αστροκύτταρα ήταν οι επικρατέστεροι πληθυσμοί στις πρωτογενείς καλλιέργειες. Οι διαφοροποιημένοι φαινότυποι των νευρώνων στην καλλιέργεια απεικονίστηκαν με τον εντοπισμό των των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών MAPa&b που βρίσκονται κατά μήκος του σώματος, των δενδριτών και του άξονα των νευρώνων όπως και του πολύπλοκου δικτύου της GFAP πρωτεΐνης στα αστροκύτταρα. Η κυτταρική μορφολογία και η έκφραση των κυτταροσκελετικών δεικτών αντανakλούσαν στοιχεία χαρακτηριστικά κάθε καλλιέργειας (Yang και συν. 2005). Οι νευρώνες και τα αστροκύτταρα ήταν παρόντα στις πρωτογενείς καλλιέργειες σε αναλογίες αντίστοιχες εκείνων που χαρακτηρίζουν τον ανθρώπινο φλοιό *in vitro* (Raine 1999). Οι αναλογίες των νευρώνων που ήταν θετικοί για MAPa&b και των αστροκυττάρων που σημάνθηκαν με GFAP παρέμειναν σταθερές καθ' όλη τη διάρκεια των καλλιεργειών. Επίσης η ανάλυση της βιωσιμότητας έδειξε ότι, αν και η απόπτωση και η νέκρωση ποίκιλαν μεταξύ των δειγμάτων αμέσως μετά την αρχική επίστρωση, στη συνέχεια της καλλιέργειας και μετά την εγκατάσταση της καλλιέργειας παρέμειναν σε χαμηλά επίπεδα.

Οι νευρώνες που έχουν τοποθετηθεί σε καλλιέργεια και οι οποίοι είναι βιώσιμοι και ικανοί για νευρομεταβίβαση χαρακτηρίζονται από την προσεκβολή νευριτών, των μεταβολικά ενεργών προβολών που εμπλέκονται στη μεταβίβαση μηνυμάτων μέσω των συνάψεων (Hausser και συν. 2000). Οι νευρώνες και τα αστροκύτταρα στις καλλιέργειες που παρουσιάζονται διατήρησαν τα διαφοροποιημένα χαρακτηριστικά τους. Κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας ανέκτησαν την πλαστικότητά τους και το δίκτυο των νευρώνων τους αναγεννήθηκε. Οι άξονες που προέρχονταν από τους νευρώνες ήταν ήδη εμφανείς από τα αρχικά στάδια της καλλιέργειας και, κατά την εξέλιξη των καλλιεργειών, οι νευρώνες δημιούργησαν ένα δίκτυο επαφών μεταξύ τους και συνδέονταν με τα αστροκύτταρα. Οι άξονες των νευρώνων στην καλλιέργεια έχουν την τάση να επιμηκύνονται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να διασταυρώνονται μεταξύ τους (Cove και συν. 2006). Η προβολή αξόνων, η μετανάστευση και η δράση των νευρώνων ενισχύονται παρουσία αστροκυττάρων, ένα αποτέλεσμα που προκαλείται μέσω της τοπικής επαφής και της νευριτικής συναπτογένεσης

μεταξύ νευρώνων και αστροκυττάρων (Nair και συν. 2008, Hama και συν. 2004). Η έκκριση των συναπτικών κυστιδίων διευκολύνεται από την N-cadherin, μία γλυκοπρωτεΐνη της κυτταρικής επιφάνειας που εκφράζεται τόσο από κεντρικούς και περιφερικούς νευρώνες, όσο και από τα κύτταρα της γλοίας. Είναι γνωστό ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργική, συναπτική και δομική πλαστικότητα (Suzuki και συν. 2008, Tran και συν. 2008). Το τμήμα της N-cadherin που βρίσκεται εξωκυττάρια και εξαρτάται από το ασβέστιο είναι υπεύθυνο για την προσκόλληση των κυττάρων και για την αλληλεπίδραση μεταξύ τους, ενώ το ενδοκυττάριο τμήμα αλληλεπιδρά με μόρια όπως οι κατενίνες. Κατ' αυτόν τον τρόπο συνδέεται με τον κυτταροσκελετό και μεσολαβεί την μεταβίβαση μηνυμάτων (Tai και συν. 2008). Η έκφραση και των δύο τμημάτων της N-cadherin ανιχνεύθηκε στις μεικτές καλλιέργειες νευρώνων και αστροκυττάρων ήδη από τα πρώτα στάδια της καλλιέργειας και καθ' όλη τη διάρκειά τους *in vitro*, υποδεικνύοντας ότι τα κύτταρα είχαν ένα εν δυνάμει λειτουργικό σύστημα μετάδοσης μηνυμάτων και δυνατότητα επικοινωνίας μεταξύ τους.

Τα στοιχεία που έχουν παρουσιαστεί μέχρι τώρα υποδεικνύουν ότι οι πρωτογενείς μεικτές καλλιέργειες νευρώνων και αστροκυττάρων που παρουσιάζονται αποτελούν ένα χρήσιμο *in vitro* μοντέλο για τη μελέτη της παθοφυσιολογίας του ΚΝΣ σε διάφορες νόσους. Εδώ παρουσιάζεται ένα μοντέλο συγκαλλιέργειας που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη νευροανοσολογικών παθήσεων. Αποτελείται από μία πρωτογενή καλλιέργεια ανθρώπινων νευρικών κυττάρων που διατηρήθηκε *in vitro* και την προσθήκη αυτόλογων λεμφοκυττάρων που προέρχονταν από το περιφερικό αίμα του ίδιου ασθενούς. Οι αλληλεπιδράσεις των νευρικών κυττάρων και των ανοσοκυττάρων μελετήθηκαν σε αυτό το *in vitro* μοντέλο και πιθανώς παρέχουν ενδείξεις κυτταρικών γεγονότων που συνεισφέρουν στις νευροφλεγμονώδεις διεργασίες.

Έχει γίνει εμφανές ότι σε πολλές φλεγμονώδεις νόσους του ΚΝΣ όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας η εγκεφαλίτιδα και η εγκεφαλομυελίτιδα παρατηρείται σημαντική απώλεια νευρώνων και αξόνων (Amor και συν. 2010, Steinman και συν. 2001). Η συσσώρευση των φλεγμονωδών κυττάρων του ΑΣ στις περιοχές του εγκεφάλου που νοσεί θεωρείται αιτιολογικός παράγοντας για τη νευρωνική και αξονική εκφύλιση (Amor και συν. 2010, Kuhlman και συν. 2002). Παράλληλα, αρκετές εργαστηριακές και κλινικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι το στρες και η κατάθλιψη σχετίζονται με ατροφία και απώλεια νευρώνων και γλοιακών κυττάρων, που οδηγούν σε μειωμένο μέγεθος και λειτουργικότητα των περιοχών που ελέγχουν τη διάθεση και την κατάθλιψη και συμπεριλαμβάνουν τον προμετωπιαίο φλοιό και τον ιππόκαμπο (Duman και Voleti 2012). Αν και η νευροεκφυλιστική διεργασία έχει συσχετιστεί με τη φλεγμονή, δεν έχει πιστοποιηθεί άμεσα ο σύνδεσμος αιτίου-αιτιατού

μεταξύ φλεγμονωδών κυττάρων και νευροτοξικότητας, ενώ υπάρχουν και ενδείξεις ότι τα λεμφοκύτταρα έχουν και κυτταροπροστατευτικό ρόλο στο ΚΝΣ (Miller 2010, Levitte 2008). Οι άμεσες νευροανοσολογικές αλληλεπιδράσεις που μελετήθηκαν στο σύστημα αυτόλογων συγκαλλιέργειών που περιγράφεται εδώ υποδεικνύουν την απώλεια νευρικών κυττάρων σε απάντηση στα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα ανοσοκύτταρα και αλλά και καταστολή των λεμφοκυττάρων με μείωση της επιβίωσης και αύξηση της απόπτωσης και της νέκρωσής τους σε απάντηση στα αυτόλογα νευρικά κύτταρα.

Παρουσία των νευρικών κυττάρων η επιβίωση των ανοσοκυττάρων εξαρτήθηκε από το χρόνο παραμονής στην καλλιέργεια και από το συγκεκριμένο δείγμα. Μεταξύ των δειγμάτων υπήρχαν διαφορές στο μέγεθος και το ποσοστό ενεργοποίησης των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών. Αυτό μάλλον σχετίζεται με την κατάσταση του συγκεκριμένου ασθενούς και ήταν ήδη εμφανής κατά τη λήψη του δείγματος. Προκειμένου να εκτιμηθεί σε ποιο βαθμό αυτό το στοιχείο έπαιζε ρόλο, έγινε σύγκριση με υγιείς δότες. Οι Β λεμφοκυτταρικοί πληθυσμοί των ασθενών αντιστοιχούσαν στο εύρος των φυσιολογικών τιμών των υγιών δοτών ενώ τα Τ λεμφοκύτταρα στις τιμές που αντιστοιχούν σε ασθενείς που έχουν υποστεί εγκεφαλικό τραύμα. Αν και οι απαντήσεις της φυσικής ανοσίας του οργανισμού στο τραύμα θεωρούνται προστατευτικές, υπάρχει μία ευαίσθητη ισορροπία μεταξύ του φυσικού και του επίκτητου ανοσολογικού συστήματος όταν συμμετέχουν σε διορθωτικές διεργασίες υπό αυτές τις συνθήκες (Amor και συν. 2010). Η επιβίωση των λεμφοκυττάρων υποστηρίχθηκε χωρίς δυσκολίες στις καλλιέργειες ελέγχου, στοιχείο που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα αποτελέσματα που παρατηρούνται στις συγκαλλιέργειες οφείλονται στο ρόλο των νευρικών κυττάρων.

Είναι γενικά γνωστό ότι η ενεργοποίηση των Β-κυττάρων εξαρτάται από την άμεση επαφή με κύτταρα που εκφράζουν παράγοντες που τα ενεργοποιούν (Dallos και συν. 2009). Η διήθηση και συσσώρευση των ενεργοποιημένων Β-κυττάρων έχει σχετιστεί με απομυελίνωση του ΚΝΣ στη ΣκΠ και σε άλλες αυτοάνοσες νόσους, όπου η έντονη ανοσολογική ενεργοποίηση είναι κοινή και αυξάνονται οι αποδείξεις για τον παθογενετικό ρόλο των Β-κυττάρων (Franciotta και συν. 2008, Correale και συν. 2007). Στις συγκαλλιέργειες με αυτόλογα νευρικά κύτταρα που παρουσιάζονται εδώ, τα Β λεμφοκύτταρα είτε παρέμειναν σταθερά στην καλλιέργεια χωρίς να πολλαπλασιάζονται (σε αντίθεση με τα Β κύτταρα σε μονοκαλλιέργεια) είτε μειώθηκαν ελαφρά κατά τη διάρκεια των συγκαλλιεργειών. Υπενθυμίζεται εδώ ότι τα ποσοστά τους στις γενικές αίματος των ασθενών βρέθηκε ότι ήταν σε φυσιολογικά επίπεδα.

Οι πληθυσμοί των Τ λεμφοκυττάρων που προήλθαν από ασθενείς με αιμάτωμα σε σχέση με υγιείς δότες βρέθηκαν σημαντικά μειωμένοι μετά τη λήψη τους. Είναι γνωστό ότι το αιμορραγικό εγκεφαλικό τραύμα και η αιμορραγία σχετίζονται με καταστολή των Τ λεμφοκυττάρων που οδηγούν σε ανοσοκαταστολή (Hsieh και συν. 2009). Όταν οι πληθυσμοί των βιώσιμων Τ-κυττάρων τοποθετήθηκαν σε συγκαλλιέργεια με αυτόλογους νευρώνες, μειώθηκαν σημαντικά. Αν και είναι πιθανό τα αιματώματα να έχουν επηρεάσει τη βιωσιμότητα των Τ-κυττάρων, παρατηρήθηκε ότι αυτά τα φαινόμενα ήταν εντονότερα όταν τα λεμφοκύτταρα αλληλεπιδρούσαν με τα νευρικά κύτταρα.

Η παρουσία λεμφοκυτταρικών και μονοκυτταρικών πληθυσμών έχει αρνητική επίδραση στη βιωσιμότητα των νευρώνων στις νευροανοσολογικές καλλιέργειες. Οι αποκλίσεις στους πληθυσμούς των μονοκυττάρων ήταν η πιο χαρακτηριστική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων αίματος από τους ασθενείς. Τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος που εκφράζουν το HLA-DR αυξάνονται σε ασθενείς που έχουν υποστεί τόσο αιμορραγικό όσο και ισχαιμικό εγκεφαλικό αγγειακό επεισόδιο και η μείωσή τους ήταν ενδεικτική ανοσοκαταστολής και λοίμωξης (Zhang και συν. 2009). Στις καλλιέργειες που περιγράφονται εδώ η ενεργοποίηση του HLA-DR ήταν μειωμένη στους μικρούς και αυξημένη στους μεγάλους CD14 πληθυσμούς. Στις νευροανοσολογικές συγκαλλιέργειες η μειωμένη μονοκυτταρική ενεργοποίηση συνέπιπτε με τη βέλτιστη επιβίωση τόσο των νευρικών όσο και των ανοσοκυτταρικών πληθυσμών. Οι νευρώνες ήταν ευαίσθητοι στην ενεργοποίηση των μονοκυττάρων στις καλλιέργειες. Οι μεγάλοι και ενεργοποιημένοι μονοκυτταρικοί πληθυσμοί μειώθηκαν σύντομα μετά την έναρξη της καλλιέργειας. Το επίπεδο ενεργοποίησης των ανοσοκυττάρων φαίνεται να ρυθμίζει τις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις τους.

Παρόμοια αποτελέσματα έχουν οι Giuliani και συν. (2003) που δείχνουν ότι τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα προκαλούν σημαντική απώλεια νευρώνων αλλά όχι αστροκυττάρων όταν είναι σε άμεση επαφή με τα νευρικά κύτταρα. Σε ένα μοντέλο ενδοκρανιακής αιμορραγίας σε ζώα παρατηρήθηκε θάνατος των φλοιικών κυττάρων και φλεγμονή 48-72 ώρες μετά από ενδεγκεφαλική έγχυση αυτόλογου αίματος (Xue και συν. 2000). Τα κλάσματα των ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων ήταν υπεύθυνα για τη μεγαλύτερη βλάβη στα πρώιμα στάδια ενδοκρανιακής αιμορραγίας και αιματώματος (Xue και συν. 2000). Επιπρόσθετα η φυσική και επίκτητη ανοσία έχει ενοχοποιηθεί τόσο για την έναρξη όσο και για τη ρύθμιση της φλεγμονής και του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου στο ΚΝΣ μέσω διαφορετικών ανοσορυθμιστικών οδών (Griffiths και συν. 2009).

Αυτές οι επιβλαβείς δράσεις που κατευθύνονται τόσο εναντίον των κυττάρων του εγκεφάλου όσο και των αγγείων μπορεί να αντανakλούν τα δευτερογενή αιμορραγικά φαινόμενα που είναι γνωστό ότι επιβαρύνουν την πρόγνωση των ασθενών με ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο σε ασθενείς με τραύμα (Zhang και συν. 2009). Λόγω της εγγενούς διαφοράς μεταξύ των ασθενών οι πρωτογενείς ανοσοκαλλιέργειες είχαν διαφορετικά ποσοστά και βαθμό ενεργοποίησης των κυττάρων μεταξύ τους. Συνεπώς οι αιτιολογικές συσχετίσεις που παρατηρούνται θα μπορούσαν να οφείλονται στην παθοφυσιολογία του συγκεκριμένου ασθενούς. Αυτή η έλλειψη ομοιογένειας, αν και δε διευκολύνει την γενίκευση των αποτελεσμάτων παρουσιάζει ένα πλεονέκτημα του συστήματος που παρουσιάζεται εδώ καθώς δείχνει την ποικιλία των νευροανοσολογικών απαντήσεων μεταξύ διαφορετικών ατόμων.

Συνοπτικά, εδώ παρουσιάζεται ένα χρήσιμο μοντέλο καλλιέργειας όπου λειτουργικά νευρικά κύτταρα συγκαλλιεργούνται με αυτόλογα λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα. Σε αυτό το μοντέλο φαίνεται ότι η συγκαλλιέργεια ανθρώπινων νευρώνων και αστροκυττάρων με αυτόλογα μονοπύρηνια κύτταρα οδηγεί στη μείωση B και T λεμφοκυττάρων καθώς και των μονοκυττάρων. Στα πειράματα που περιγράφονται, σημαντικότερη είναι η μείωση των T λεμφοκυττάρων. Οι νευρώνες επίσης μειώνονται στην συγκαλλιέργεια, φαινόμενο που οφείλεται στην παρουσία των ανοσοκυττάρων. Η αυξημένη ενεργοποίηση των μονοκυττάρων φαίνεται να συσχετίζεται με αυξημένη απώλεια νευρώνων (Εικόνα 4).

Στε δεύτερο μέρος αυτής της έρευνας έγιναν συγκαλλιέργειες εγκεφάλων που προήλθαν από νεογέννητους αρουραίους με αυτόλογα λεμφοκύτταρα προκειμένου να εξεταστεί ο ρόλος της ρεζερπίνης. Έγινε με την προσθήκη ρεζερπίνης 1mM για 90 λεπτά. Στις καλλιέργειες αυτές έγιναν επίσης μετρήσεις των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης ERK (extracellular signal-regulated kinase) πρωτεΐνης και της φωσφορυλιωμένης 14-3-3β πρωτεΐνης. Η ERK είναι μέλος της ομάδας πρωτεϊνών MAPK (mitogen activated protein kinase). Το αυξημένο ενδιαφέρον για τη δράση της ERK οφείλεται στην ενεργοποίησή της από αυξητικούς παράγοντες και ουσίες που προωθούν τη μιτωτική δραστηριότητα και το γεγονός ότι είναι σημαντικός μηχανισμός μεταφοράς μηνυμάτων στο κύτταρο. Σχετίζεται με τη μνήμη και την μάθηση και υπάρχουν ενδείξεις για το ρόλο της στη συναπτική πλαστικότητα. Η ενεργοποίηση των ERK1/ ERK2 ρυθμίζει συναπτικές πρωτεΐνες και προωθεί το σχηματισμό νέων δενδριτών (Peng και συν. 2010, Di Christo και συν. 2001, Gooney και συν. 2004).

Είναι γνωστό ότι οι μονοαμίνες σχετίζονται με βραχυπρόθεσμες οδούς σηματοδότησης (signalling pathways) των νευρώνων, ενώ οι νευροτροφίνες με πιο

μακροπρόθεσμες οδούς, μέσω ενεργοποίησης της ERK. Ορισμένοι υπότυποι σεροτονινεργικών (5-HT) υποδοχέων συνδέονται με την ενεργοποίηση ERK οδών και πιθανολογείται ένας μηχανισμός που να εξηγεί τις μακροπρόθεσμες δράσεις των αντικαταθλιπτικών (Cowen 2007). Στην μελέτη που παρουσιάζεται εδώ μετά από τη δράση 1mM ρεζερπίνης παρατηρείται η μειωμένη έκφραση της φωσφορυλιωμένης ERK, η οποία μετά από δράση 90 λεπτών και ανάπαυση 30 λεπτών δεν επανέρχεται στα αρχικά της επίπεδα. Είναι πιθανό ότι η έλλειψη μονοαμινών οδηγεί τα νευρικά κύτταρα της καλλιέργειας σε μια μείωση της μεταφοράς μηνυμάτων μέσα στα κύτταρα και σε αντίστοιχη μείωση της επικοινωνίας με άλλα κύτταρα.

Μία άλλη σημαντική ομάδα πρωτεϊνών είναι οι 14-3-3 πρωτεΐνες. Παίζουν σημαντικό ρόλο για τα κύτταρα μέσω της σχετικής με την απόπτωση δράσης τους (Memos και συν. 2011). Ρυθμίζονται μέσω φωσφορυλίωσης και ασκούν τη δράση τους μέσω σύνδεσης με προαποπτωτικές πρωτεΐνες (Yaffe 2002). Εντοπίζονται στο φλοιό, την παρεγκεφαλίδα, το θάλαμο, τον ιππόκαμπο και στην οδοντωτή έλικα (Watanabe και συν. 1994, Baxter και συν. 2002). Στις καλλιέργειες εγκεφάλων νεογέννητων αρουραίων που πραγματοποιήθηκαν για το σκοπό αυτής της μελέτης, μετά από δράση 1mM ρεζερπίνης για 90 λεπτά βρέθηκε μείωση του επιπέδου της φωσφορυλιωμένης 14-3-3β. Η πρωτεΐνη 14-3-3 εμπλέκεται στη βιοχημεία της θεραπείας της κατάθλιψης, καθώς ενεργοποιεί την υδροξυλάση της τρυπτοφάνης (TPH) που ρυθμίζει τη βιοσύνθεση της σεροτονίνης (Choi και συν. 2012). Η φλουοξετίνη είναι γνωστό ότι επάγει τη δράση της TPH. Όταν σε αρουραίους Sprague-Dawley δόθηκε φλουοξετίνη αυξήθηκε η ανοσοδραστικότητα της 14-3-3 στον ιππόκαμπο. Στα πειράματα που παρουσιάζονται εδώ η έκπλυση των μονοαμινών με ρεζερπίνη οδηγεί στη μειωμένη ανίχνευση της ισομορφής 14-3-3β στις καλλιέργειες.

Στη μελέτη που παρουσιάζεται εδώ, μετά από τη δράση της ρεζερπίνης και τις κυτταρικές μεταβολές που ακολούθησαν, έγινε συγκαλλιέργεια των νευρικών κυττάρων των αρουραίων με αυτόλογα λεμφοκύτταρα και εξετάστηκε η επίδραση των νευρώνων που είχαν έλλειψη μονοαμινών στα αυτόλογα T λεμφοκύτταρα. Εκεί παρατηρήθηκε μείωση τόσο των T λεμφοκυττάρων όσο και των ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων, παρατήρηση που έγινε και στις καλλιέργειες των ανθρώπινων κυττάρων.

Το ερώτημα του ρόλου του ανοσολογικού συστήματος στην κατάθλιψη είναι ανοιχτό και πολλές μελέτες ασχολούνται με αυτό. Η αρχική άποψη ότι η είσοδος λεμφοκυττάρων στον εγκέφαλο έχει μόνο νοσογόνο επίδραση έχει αναθεωρηθεί. Ο τομέας της ψυχονευροανοσολογίας καθημερινά εμπλουτίζεται με νέες μελέτες, και ο ρόλος τόσο της φυσικής όσο και της επίκτητης ανοσίας αποκαλύπτεται ότι είναι πολλαπλός. Για παράδειγμα

παράλληλα με την αρχική αντίληψη ότι ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα τα οποία είναι ευαισθητοποιημένα έναντι αυτόλογων πρωτεϊνών προκαλούν βλάβη στις δομές του ΚΝΣ (Giuliani και συν. 2003) πολλές μελέτες έχουν αποδείξει το νευροπροστατευτικό ρόλο των T και B λεμφοκυττάρων (Miller και συν. 2010, Janssen και συν. 2010).

Επίσης είναι γνωστό ότι το στρες και η κατάθλιψη επηρεάζουν σημαντικά τις αντιδράσεις των T κυττάρων. Οι πρώτες μελέτες που ασχολήθηκαν με αυτή την επίδραση έδειξαν ότι ο πολλαπλασιασμός των T κυττάρων μετά από ενεργοποίηση με μιτογόνα, PHA (phytohemagglutinin) και κονκαναβαλίνη A ήταν σημαντικά μειωμένη σε ασθενείς με κατάθλιψη (Bartrop και συν. 1997, Kronfol και συν. 1983, Schleifer και συν. 1983, Stein και συν. 1991). Οι μετααναλύσεις έδειξαν στατιστικά ασφαλείς μειώσεις της απόκρισης των T κυττάρων σε ασθενείς με στρες και κατάθλιψη (Irwin και Miller 2007, Zorilla και συν. 2001). Επιπλέον *in vivo* μετρήσεις της κυτταρικής ανοσολογικής απόκρισης υπέδειξαν τη μειωμένη T λεμφοκυτταρική απάντηση σε καταθλιπτικούς ασθενείς (Sephron και συν. 2009, Hickie και συν. 1993). Άλλες μετααναλύσεις έδειξαν την ποσοστιαία μείωση τόσο του συνολικού αριθμού των λεμφοκυττάρων όσο και ειδικά των T λεμφοκυττάρων στην κατάθλιψη (Zorilla και συν. 2001). Ένα επιπλέον ενδιαφέρον στοιχείο είναι η αυξημένη απόπτωση των CD4⁺ κυττάρων καταθλιπτικών ασθενών όπως και η αυξημένη έκφραση του υποδοχέα για το Fas ligand που μεσολαβεί την αποπτωτική σηματοδότηση μέσω του Fas ligand (Szuster-Ciesielska και συν. 2008, Ivanova και συν. 2007, Eilat και συν. 1999). Ένας μηχανισμός που θα μπορούσε να εξηγήσει την αυξημένη απόπτωση των T κυττάρων στην κατάθλιψη είναι η έλλειψη τρυπτοφάνης, η οποία είναι αποτέλεσμα της δράσης πολλών κυττοκινών (Dantzer και συν. 2008, Bonaccorso και συν. 2002, Capuron και συν. 2002). Η τρυπτοφάνη είναι σημαντικός παράγοντας πολλαπλασιασμού για τα T λεμφοκύτταρα και σε ένα περιβάλλον με έλλειψη τρυπτοφάνης τα T κύτταρα αποπίπτουν (Beissert και συν. 2006, Mellor και συν. 2003). Αυτό το φαινόμενο είναι αντίστοιχο με το αποτέλεσμα της συγκαλλιέργειας των λεμφοκυττάρων με νευρικά κύτταρα υπό συνθήκες έλλειψης μονοαμινών που περιγράφονται στην παρούσα μελέτη.

Παράλληλα διάφορα ερευνητικά δεδομένα οδηγούν στο ερώτημα εάν οι διαταραχές των T συμμετέχουν αιτιολογικά στην εμφάνισή της μείζονος κατάθλιψης, και δεν αντιπροσωπεύουν απλά μία συνέπεια της νόσου (Miller 2010). Οι Blume και συν. (2011) περιγράφουν έναν πιθανό μηχανισμό: πιθανολογείται ότι η φλεγμονή, μία διαδικασία που παραδοσιακά θεωρείται ότι ενισχύει το ανοσολογικό σύστημα, όταν είναι χρόνια το καταστέλλει. Ενώ η οξεία φλεγμονή είναι μία προσαρμοστική απάντηση στη βλάβη των ιστών και αυτοπεριορίζεται, η χρόνια φλεγμονή δεν επιλύεται και συχνά είναι αποτέλεσμα

προβληματικής προσαρμογής του οργανισμού. Σχετίζεται με νόσους όπως η παχυσαρκία, ο διαβήτης και η κατάθλιψη, ενώ δεν φαίνεται να υπάρχει οργανικός λόγος διατήρησής της (Medzhitov 2008). Οδηγεί εν τέλει στην καταστολή της δράσης των T λεμφοκυττάρων. Η έλλειψη τρυπτοφάνης που αναφέρεται ανωτέρω περιγράφεται από τον Blume ως ο μηχανισμός που συνδέει την κατάθλιψη με τη χρόνια φλεγμονή.

Συγχρόνως στις καλλιέργειες ανθρώπινων νευρώνων και αυτόλογων λεμφοκυττάρων που περιγράφονται εδώ παρατηρείται μείωση των νευρικών κυττάρων στην συγκαλλιέργεια. Αυτή η εργαστηριακή παρατήρηση αντιστοιχεί σε κλινικές παρατηρήσεις που έχουν γίνει σε καταθλιπτικούς ασθενείς. Στις πιο σοβαρές και ανθεκτικές μορφές των διαταραχών του συναισθήματος παρατηρείται απώλεια φαιάς ουσίας τόσο στους μετωπιαίους όσο και σε ορισμένες δομές των κροταφικών λοβών (Lagopoulos και συν. 2012, Duman και Voleti 2012). Έχουν γίνει εκτεταμένες μελέτες για τη νευρογένεση που παρατηρείται στον ενήλικο ιππόκαμπο, τόσο στον άνθρωπο όσο και σε άλλα θηλαστικά (Ming και Song 2011, Kriegstein και Alvarez-Buylla 2009, Kempermann 2008, Alvarez-Buylla και συν. 2001) και το γεγονός ότι συνδέεται με γνωσιακές και συναισθηματικές λειτουργίες (Aimone και συν. 2011, Couillard-Despres και συν. 2011, Sahay και συν. 2011, Deng και συν. 2010). Η νευρογένεση φαίνεται ότι μειώνεται σε συνθήκες στρες, συμπεριλαμβανομένων αυτών που προκαλούν καταθλιπτικές συμπεριφορές στα ζώα, και ότι αυξάνεται με την αντικαταθλιπτική αγωγή. Έτσι προέκυψε η υπόθεση ότι η νευρογένεση μπορεί να συμμετέχει στην παθοφυσιολογία της μείζονος κατάθλιψης και στη θεραπεία της (Valente και συν. 2012). Ένα ερώτημα που προκύπτει είναι ποια διαδικασία οδηγεί σε αυτό το αποτέλεσμα.

Αν και μεγάλος αριθμός μελετών έχει εστιάσει στον αρνητικό ρόλο των T λεμφοκυττάρων στην κατάθλιψη, οι Lewitus και Schwartz (2009) έδειξαν ότι T λεμφοκύτταρα ενεργοποιημένα εναντίον αυτόλογων στόχων του ΚΝΣ μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία του νευρικού συστήματος και στην ανθεκτικότητα ενάντια σε νευροψυχιατρικές νόσους. Οι Rook και συν. (2011) σε μία βιβλιογραφική μελέτη προτείνουν ότι effector T κύτταρα ειδικά για αντιγόνα του ΚΝΣ μπορούν να βοηθήσουν στην ανάρρωση από διάφορες περιβαλλοντικές προσβολές το οργανισμού (από βλάβη νεύρου μέχρι ψυχολογικό στρες) ενώ αντιθέτως τα regulatory T κύτταρα (Treg) αντιτίθενται στην ανάρρωση. Συνεπώς υποδεικνύεται ότι ο βαθμός και το είδος της ανοσολογικής απόκρισης εξαρτάται από την θεραπευτική ή παθογόνο αλληλεπίδραση του νευρικού με το ανοσολογικό σύστημα. Τα ερωτήματα που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση του νευρικού και του ανοσολογικού συστήματος και τις μεταβολές της μεταξύ τους σχέσης στην κατάθλιψη

παραμένουν. Με αυτή τη μελέτη έγινε μία απόπειρα κατανόησης των αλληλεπιδράσεων αυτών σε κυτταρικό επίπεδο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πρωτογενείς καλλιέργειες βιώσιμων και διαφοροποιημένων νευρώνων και αστροκυττάρων εγκαταστάθηκαν από ανθρώπινους ιστούς (n=29) μετά από νευροχειρουργικές επεμβάσεις. Κατά τη διάρκεια των καλλιεργειών (14-21 days-*in-vitro*), κύτταρα όμοια με νευρώνες και αστοκύτταρα διατήρησαν τους διαφοροποιημένους τους φαινότυπους και τις νευροφυσιολογικές ικανότητές τους και δημιουργήθηκε ένα δίκτυο κυτταρικών επαφών. Έγιναν επίσης συγκαλλιέργειες νευρικών κυττάρων με αυτόλογα λεμφοκύτταρα που λήφθηκαν από το περιφερικό αίμα αυτών των ασθενών και μελετήθηκαν σε αυτές οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο αυτών πληθυσμών. Σε αυτές τις συγκαλλιέργειες τα B λεμφοκύτταρα έμειναν σχετικά ανεπηρέαστα ενώ οι T λεμφοκυτταρικοί πληθυσμοί βαθμιαία μειώθηκαν. Η ενεργοποίηση των μονοκυττάρων σχετιζόταν με αυξημένη νευροτοξικότητα. Το φαινόμενο αυτό ήταν ανάλογο του μεγέθους και της ενεργοποίησης των μονοκυτταρικών πληθυσμών. Τα στοιχεία αυτά υποδεικνύουν ότι υπάρχει αιτιολογική συσχέτιση ανάμεσα στα αποτελέσματα των αλληλεπιδράσεων αυτών που ποικίλουν μεταξύ ατόμων και που είναι ενδεικτικά τόσο νευροεκφυλιστικών όσο και ανοσοκατασταλτικών διαδικασιών.

Στη συνέχεια έγιναν πειράματα συγκαλλιιεργειών νευρικών κυττάρων και λεμφοκυττάρων επιμύων με και χωρίς προσθήκη ρεξερπίνης. Ενώ η προσθήκη ρεξερπίνης 1mM σε μονοκαλλιέργειες λεμφοκυττάρων επιμύων δε φαίνεται να μεταβάλλει σημαντικά τα ποσοστά των T λεμφοκυττάρων στις καλλιέργειες, την επιβίωση, απόπτωση και ενεργοποίησή τους, στις συγκαλλιέργειες οδηγεί σε μείωση συνολικού ποσοστού των T-λεμφοκυττάρων.

ABSTRACT

Primary cultures of viable and differentiated neuronal and astrocytic cells were established from human adult brain tissues (n=29) following neurosurgical operations. During culture (14-21 days-*in-vitro*), neuron-like cells and astrocytes retained their differentiated phenotypes and neurophysiological competence and regenerated an inter-cellular communication network. Neuro-immune cellular interactions were studied in co-cultures of neuronal-astrocytic primary cultures and their autologous immune cells, obtained from the patients' peripheral blood. In the presence of their autologous neuronal-astrocytic cells, B-cells remained largely unaffected while T-lymphocyte populations gradually declined. The inherent activation status of monocyte populations was associated with neurotoxicity responses in a sample-dependent fashion. Our evidence portrays cause-and-effect responses between autologous neuronal-astrocytic and inflammatory populations that diverge between individuals and are suggestive of both neurodegenerative and immunosuppressive processes. Following that, we created co-cultures of neurons and lymphocytes coming from newborn Wistar rats with and without the addition of reserpine. Whilst adding reserpine to lymphocytic cultures did not seem to affect the cells' viability, apoptosis and activation, in co-cultures it leads to a decrease in the T-cell population.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*. 7:41–53, 2006.
- Agarwal-Mawal A, Qureshi HY, Cafferty PW. 14-3-3 connects glycogen synthase kinase-3 beta to tau within a brain microtubule-associated tau phosphorylation complex. *Journal of Biological Chemistry* 278(15): 12722-12728, 2003.
- Aimone JB, Deng W, and Gage FH. Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. *Neuron* 70: 589-596, 2001.
- Akaoka H, Szymocha R, Beurton-Marduel P, Bernard A, Belin MF, Giraudon P. Functional changes in astrocytes by human T-lymphotropic virus type-1 T-lymphocytes. *Virus Research* 2001 Oct 30;78(1-2):57-66.
- Alberts K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts WP. "Chapter 18 Apoptosis: Programmed Cell Death Eliminates Unwanted Cells". *Molecular Biology of the Cell (textbook)* (5th ed.). Garland Science, 2008.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walters, P. *Molecular Biology of the Cell* (4th ed.). New York and London: Garland Science, 2002.
- Altman J. Microglia emerge from the fog. *Trends in Neuroscience*. 17: 47-49, 1994.
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verduno JM, and Tramontin AD (2001) A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *National Review of Neuroscience*. 2: 28, 2001.
- Amor S, Puentes F, Baker D, van der Valk P. Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology* 129(2):154-69, 2010.
- Amsen D, Backer RA, Helbig C. Decisions on the road to memory. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 785:107-20, 2013.
- Angst B, Marcozzi C, Magee A. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *Journal of Cellular Science* 114 (Pt 4): 629–641, 2001.
- Anishman H, Merali Z, Hayley S. Neurotransmitter, peptide and cytokine processes in relation to depressive disorder: comorbidity between depression and neurodegenerative disorders. *Progress in Neurobiology*. 85:1-74, 2008.
- Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, Zhang XF. Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Progress in Hormone Research* 56 (1): 127–55, 2001.
- Banati RB, Graeber MB. Surveillance, intervention and cytotoxicity: is there a protective role of microglia? *Developmental Neuroscience*, 16: 114-127, 1994.
- Barcia C, Thomas CE, Curtin JF, King GD, Wawrowsky K, Candolfi M, Xiong WD, Liu C, Kroeger K, Boyer O, Kupiec-Weglinski J, Klatzmann D, Castro MG, Lowenstein PR. In vivo mature immunological synapses forming SMACs mediate clearance of virally infected astrocytes from the brain. *Journal of Experimental Medicine*. 203(9):2095-107, 2006.
- Bartrop RW, Luckhurst E, Lazarus L, Kiloh LG, Penny R. Depressed lymphocyte function after bereavement. *Lancet*. 1(8016):834-6, 1977.
- Baxter HC, Liu WG, Forster JL, Aitken A, Fraser JR. Immunolocalisation of 14-3-3 isoforms in normal and scrapie-infected murine brain. *Neuroscience*. 109: 5–14, 2002.
- Bechmann I, et al. Astrocyte-induced T cell elimination is CD95 ligand dependent. *Journal of Neuroimmunology*. 132:60–65, 2002.
- Beissert S, Schwarz A, Schwarz T. Regulatory T cells. *The Journal of Investigative Dermatology*. 126(1):15-24, 2006.
- Beyaert R, Heyninck K and Van Huffel S. A20 and A20-binding proteins as cellular inhibitors of nuclear factor-kB-dependent gene expression and apoptosis. *Biochemical Pharmacology* 60: 1143-1151, 2000.

- Bengtsson BO, Zhu J, Thorell LH, Olsson T, Link H, Wålinder J. Effects of zimeldine and its metabolites, clomipramine, imipramine and maprotiline in experimental allergic neuritis in Lewis rats. *Journal of Neuroimmunology*. 39(1-2):109-22, 1992.
- Besedovsky HO, Del Rey AD. Physiology of psychoneuroimmunology: a personal view. *Brain Behaviour and Immunology*. 21, 34-44, 2007.
- Blume J, Douglas SD, Evans DL. Immune suppression and immune activation in depression. *Brain, Behaviour and Immunity* 25(2): 221-229, 2011.
- Bonaccorso S, Marino V, Puzella A, Pasquini M, Biondi M, Artini M, Almerighi C, Verkerk R, Meltzer H, Maes M. Increased depressive ratings in patients with hepatitis C receiving interferon-alpha-based immunotherapy are related to interferon-alpha-induced changes in the serotonergic system. *Journal of Clinical Psychopharmacology*. 22(1):86-90, 2002.
- Boutet A, Salim H, Taoufik Y, Lledo PM, Vincent JD, Delfraissy JF, Tardieu M. Isolates human astrocytes are not susceptible to infection by M- and T-tropic HIV-1 strains despite functional expression of the chemokine receptors CCR5 and CXCR4. *Glia*. 2001 May;34(3):165-77.
- Bradbury M.W.B. The concept of a blood-brain barrier pp. 381-407. Wiley Chichester, 1979.
- Brogden KA, Guthmiller JM, Salzet M, Zasloff M. The nervous system and innate immunity: the neuropeptide connection. *Nature Immunology* 6:558-564, 2005.
- Brummer T, Larance M, Herrera Abreu MT et al. Phosphorylation-dependent binding of 14-3-3 terminates signalling by the Gab2 docking protein. *EMBO J* 27(17): 2305-2316, 2008.
- Calderon TM, Eugenin EA, Lopez L, Kumar SS, Hesselgesser J, Raine CS, Berman JW. A role for CXCL12 (SDF-1alpha) in the pathogenesis of multiple sclerosis: regulation of CXCL12 expression in astrocytes by soluble myelin basic protein. *Journal of Neuroimmunol*. 177(1-2):27-39, 2006.
- Capuron L, Gummnick JF, Musselman DL, Lawson DH, Reemsnyder A, Nemeroff CB, Miller AH. Neurobehavioral effects of interferon-alpha in cancer patients: phenomenology and paroxetine responsiveness of symptom dimensions. *Neuropsychopharmacology*. 26(5):643-52, 2002a.
- Capuron L, Ravaut A, Neveu PJ, Miller AH, Maes M, Dantzer R. Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy. *Molecular Psychiatry*. 7(5):468-73, 2002b.
- Capuron L, Bluthé RM, Dantzer R. Cytokines in clinical psychiatry. *American Journal of Psychiatry*. 158(7):1163-4, 2001.
- Carroll MC, Isenman DE. Regulation of humoral immunity by complement. *Immunity*. 37(2):199-207, 2012.
- Caruncho HJ, Rivera-Baltanás T. Biomarkers of depression. *Revista de Neurologia*. 50(8):470-6, 2010.
- Chaplin DD. Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 125(2 Suppl 2), 2010.
- Chen XQ, Chen JG, Zhang Y, Hsiao WW, Yu AC. 14-3-3gamma is upregulated by *in vitro* ischemia and binds to protein kinase Raf in primary cultures of astrocytes. *Glia* 42(4): 315-324, 2003.
- Chen A, Ganor Y, Rahimipour S, Ben-Aroya N, Koch Y, Levite M: The neuropeptides GnRH-II and GnRH-I are produced by human T cells and trigger laminin receptor gene expression, adhesion, chemotaxis and homing to specific organs. *Nature Medicine* 8:1421-1426, 2002.

- Choi MR, Hwang S, Park GM, Jung KH, Kim SH, Das ND, Chai YG. Effect of fluoxetine on the expression of tryptophan hydroxylase and 14-3-3 protein in the dorsal raphe nucleus and hippocampus of rat. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 43(2):96-102, 2012.
- Clark J, Vagenas P, Panesar M, Cope AP. What does tumour necrosis factor excess do to the immune system long term? *Annals of the Rheumatic Diseases*. 64 Suppl 4:iv70-6, 2005.
- Cobb SR, Buhl EH, Halasy K, Paulsen O, Somogyi P. Synchronisation of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature (London)*. 378: 76, 1995.
- Correale J, Villa A. The blood-brain-barrier in multiple sclerosis: functional roles and therapeutic targeting. *Autoimmunity* 40(2):148-60, 2007.
- Cotran; Kumar, Collins. Robbins Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: W.B Saunders Company, 1998
- Couillard-Despres S, Iglseider B, and Aigner . Neurogenesis, a cellular plasticity and cognition: the impact of stem cells in the adult and aging brain. *Gerontology* 57: 559-564, 2011.
- Cowen DS. Serotonin and neuronal growth factors - a convergence of signalling pathways. *Journal of Neurochemistry*. 101(5):1161-71, 2007.
- D'Souza S, Alinauskas K, McCrea E, Goodyer C, Antel JP. Differential susceptibility of human CNS-derived cell populations to TNF-dependent and independent immune-mediated injury. *Journal of Neurosciences* 15(11):7293-300, 1995.
- Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Review of Neuroscience*. 9(1):46-56, 2008.
- Dantzer R, Wollman E, Vitkovic L, Yirmiya R. Cytokines and depression: fortuitous or causative association? *Molecular Psychiatry*. 4(4):328-32, 1999.
- De Duve C. Lysosomes revisited. *European. Journal of Biochemistry* 137: 391, 1983.
- Deng W, Aimone JB, and Gage FH. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *National Review of Neuroscience* 11: 339-350, 2010.
- Devoino VL, Evemina OFM, Ilyutchenok RI. The role of the hypothalamopituitary system in the mechanism of action of reserpine and 5-hydroxytryptophan on antibody production. *Neuropharmacology* 9:67, 1970.
- Diamond M, Kelly JP, Connor TJ. Antidepressants suppress production of the Th1 cytokine interferon-gamma, independent of monoamine transporter blockade. *European Neuropsychopharmacology*. 16(7):481-90, 2006.
- Di Cristo G, Berardi N, Cancedda L, Pizzorusso T, Putignano E, Ratto GM, Maffei L. Requirement of ERK activation for visual cortical plasticity. *Science*. 22:292(5525):2337-40, 2001.
- Dong Y, Benveniste EN. Immune function of astrocytes. *Glia*. 36(2):180-90, 2001.
- Dörner T, Jacobi AM, Lipsky PE. B cells in autoimmunity. *Arthritis Research and Therapy*. 11(5):247, 2009.
- Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, Lanctôt KL. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biological Psychiatry*. 67(5):446-57, 2010
- Dreyfus CF, Dai X, Lercher LD, Racey BR, Friedman WJ, Black IB. Expression of neurotrophins in the adult spinal cord in vivo. *Journal of Neuroscience Research*. 56(1):1-7, 1999.
- Duguay D, A. Foty RA, Steinberg MS. "Cadherin-mediated cell adhesion and tissue segregation: qualitative and quantitative determinants". *Developmental. Biology* 253 (2): 309–323, 2003.

- Duman RS, Voleti B. Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. *Trends in Neuroscience*. Jan;35(1):47-56. 2012
- Duvenroy H.M., Delon, S. and Vannson, J.L. Cortical blood vessels of the human brain. *Brain Research. Bulletin*. 7: 519-579, 1981.
- Eilat E, Mendlovic S, Doron A, Zakuth V, Spirer Z. Increased apoptosis in patients with major depression: A preliminary study. *Journal of Immunology*. 163(1):533-4, 1999.
- Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve – an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacological Reviews*. 52:595-638, 2000.
- Engelhardt B, Ransohoff RM. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends in Immunology* 26:485-495, 2005.
- Eskandari F, Sternberg EM. Neural immune interactions in health and disease. *Annals of the National Academy of Sciences* 966:20-27, 2002
- Evans DL, Ten Have TR, Douglas SD, Gettes DR, Morrison M, Chiappini MS, Brinker-Spence P, Job C, Mercer DE, Wang YL, Cruess D, Dube B, Dalen EA, Brown T, Bauer R, Petitto JM. Association of depression with viral load, CD8 T lymphocytes, and natural killer cells in women with HIV infection. *American Journal of Psychiatry*. 159(10):1752-9, 2002.
- Evans DL, Charney DS, Lewis L, Golden RN, Gorman JM, Krishnan KR, Nemeroff CB, Bremner JD, Carney RM, Coyne JC, Delong MR, Frasure-Smith N, Glassman AH, Gold PW, Grant I, Gwyther L, Ironson G, Johnson RL, Kanner AM, Katon WJ, Kaufmann PG, Keefe FJ, Ketter T, Laughren TP, Leserman J, Lyketsos CG, McDonald WM, McEwen BS, Miller AH, Musselman D, O'Connor C, Petitto JM, Pollock BG, Robinson RG, Roose SP, Rowland J, Sheline Y, Sheps DS, Simon G, Spiegel D, Stunkard A, Sunderland T, Tibbits P Jr, Valvo WJ. Mood disorders in the medically ill: scientific review and recommendations. *Biological Psychiatry*. 58(3):175-89, 2005.
- Feldman M. L. Morphology of the neocortical pyramidal neuron. In *Cellular Components of the Cerebral Cortex*. A. Peters and E. Jones Eds., Vol. 1, pp123-200, 1984.
- Felten DL, Felten SY, Bellinger DL et al. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. *Immunological Reviews* 100:225-260, 1987.
- Frasure-Smith N, Lespérance F. Depression and anxiety as predictors of 2-year cardiac events in patients with stable coronary artery disease. *Archives of General Psychiatry*. 65(1):62-71, 2008
- Frenois F, Moreau M, O'Connor J, Lawson M, Micon C, Lestage J, Kelley KW, Dantzer R, Castanon N. Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. *Psychoneuroendocrinology*. 32(5):516-31, 2007.
- Freund T.F., Martin K.A., Smith A.D., Somogyi P. Glutamate decarboxylase-immunoreactive terminals of Golgi-impregnated axoaxonic cells and of presumed basket cells in synaptic contact with pyramidal neurons of the cat's visual cortex. *J. Comp. Neurol*. 221: 263-278, 1983.
- Fu H, Subramanian RR, Masters SC. 14-3-3 Proteins: Structure, Function, and Regulation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* Vol. 40: 617-647, 2000.
- Ganor Y, Besser M, Ben-Zakay N, Unger T, Levite M: Human T cells express a functional ionotropic glutamate receptor GluR3, and glutamate by itself triggers integrin-mediated adhesion to laminin and fibronectin and chemotactic migration. *Journal of Immunology* 170:4362-4372, 2003.

- Gervazieva VB. The demyelinating effect of immune lymphocytes in nerve tissue cultures. *Biull Eksp Biol Med.* 74(2):55-8, 1973.
- Gimenez MA, Sim JE, Russell JH. TNFR1-dependent VCAM-1 expression by astrocytes exposes the CNS to destructive inflammation. *Journal of Neuroimmunology.* 151(1-2):116-25, 2004.
- Giuliani F, Goodyer CG, Antel JP, Yong VW. Vulnerability of human neurons to T cell-mediated cytotoxicity. *Journal of Immunology* 171(1):368-79, 2003.
- Gladkevich A, Kauffman HF, Korf J. Lymphocytes as a neural probe: potential for studying psychiatric disorders. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry.* 28(3):559-76, 2004.
- Goldstein G.W. Endothelial cell-astrocyte interactions: A cellular model of the blood-brain barrier. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 529: 31-39, 1988.
- Goodnow CC, Sprent J, Fazekas de St Groth B, Vinuesa CG. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature.* 435(7042):590-7, 2005.
- Gooney M, Messaoudi E, Maher FO, Bramham CR, Lynch MA. BDNF-induced LTP in dentate gyrus is impaired with age: analysis of changes in cell signalling events. *Neurobiology of Aging.* 2004 Nov-Dec;25(10):1323-31.
- Goshen I, Yirmiya R. Interleukin-1 (IL-1): a central regulator of stress responses. *Frontiers in Neuroendocrinology.* 30, 30-45, 2009.
- Gosheva AE, Buravlev VM. Culture of human and animal nerve tissue and its use for the study of central nervous system diseases]. *Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova.* 72(7):1091-7, 1972
- Gozes Y, Moskowitz MA, Strom TB, Gozes I. Conditioned media from activated lymphocytes maintain sympathetic neurons in culture. *Brain Research* 282(1):93-7, 1982.
- Green, Douglas. Means To An End. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2011
- Greenwood J, Heasman SJ, Alvarez JI, Prat A, Lyck R, Engelhardt B. Review: leucocyte-endothelial cell crosstalk at the blood-brain barrier: a prerequisite for successful immune cell entry to the brain. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 37(1):24-39, 2011.
- Haile Y, Simmen KC, Pasichnyk D, Touret N, Simmen T, Lu JQ, Bleackley RC, Giuliani F. Granule-derived granzyme B mediates the vulnerability of human neurons to T cell-induced neurotoxicity. *Journal of Immunology* 187(9):4861-72, 2011.
- Halpern B, Bakouche P, Martial-Lasfargues C. Destruction of nerve cells cultured "in vitro" by lymphocytes from patients with multiple sclerosis. Auto-immune pathogenesis of multiple sclerosis. *Presse Med.* 25;77(55):2103-6, 1969.
- Hansen J. & Koeppen B., "Φυσιολογία του ανθρώπου - Netter", εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2004.
- Hein AM, O'Banion MK. Neuroinflammation and memory: the role of prostaglandins. *Molecular Neurobiology.* 40, 15-32, 2009.
- Hermeking H, Benzinger A. 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. *Seminars in Cancer Biology* 16(3):183-192, 2006.
- Héry C, Sébire G, Peudener S, Tardieu M. Adhesion to human neurons and astrocytes of monocytes: the role of interaction of CR3 and ICAM-1 and modulation by cytokines. *Journal of Neuroimmunology.* 1995 Mar;57(1-2):101-9.
- Hickey, W.F., Hsu, B.L. & Kimura, H. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *Journal of Neuroscience Research* 28, 254-260, 1991.
- Hickie I, Hickie C, Lloyd A, Silove D, Wakefield D. Impaired in vivo immune responses in patients with melancholia. *British Journal of Psychiatry.* 162:651-7, 1993.

- Hiemstra PS. The role of epithelial beta-defensins and cathelicidins in host defense of the lung. *Experimental Lung Research*. 33(10):537-42, 2007.
- Hirschberg, D.L. Moalem G, He J, Mor F, Cohen IR, Schwartz M. Accumulation of passively transferred primed T cells independently of their antigen specificity following central nervous system trauma. *Journal of Neuroimmunology* 89:88–96, 1998.
- Hof E. R., Mufson E.J., Morrison J.H. The human orbitofrontal cortex: cytoarchitecture and quantitative immunohistochemical parcellation. *J. Comp. Neurol.* 359: 48-68, 1995.
- Hogue M, McAllister R, Greene A, Coriel L. The effect of poliomyelitis virus on human brain cells in tissue culture. *The Journal of Experimental Medicine*. 1;102(1):29-36, 1955.
- Howren MB, Lamkin DM, Suls J. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. *Psychosomatic Medicine*. 71(2):171-86, 2009.
- Hsieh CH, Hsu JT, Hsieh YC, Frink M, Raju R, Hubbard WJ, Bland KI, Chaudry IH. Suppression of activation and costimulatory signaling in splenic CD4+ T cells after trauma-hemorrhage reduces T-cell function: a mechanism of post-traumatic immune suppression. *The American Journal of Pathology*. 2009 175(4):1504-14 2009.
- Hughes D. Invasion of neurones in vitro by non-immune lymphocytes. *British Journal of Experimental Pathology*, 48(4):386-9, 1967.
- Hulpiau P, van Roy F. "Molecular evolution of the cadherin superfamily". *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 41 (2): 349–69, 2009.
- Hyams J.S., Loyd C.W. Microtubules. In *Modern cell biology*. (J.B. Hrford Ed.) p. 439. Wiley-Liss, New York, 1994.
- Imamoto V. Origin of microglia: cell transformation from blood monocytes into macrophagic ameboid cells and microglia. In *Glial and Neuronal Cell Biology*. New York: Liss, p. 125, 1981.
- Irwin M. Psychoneuroimmunology of depression. In Bloom FE. Kupfer DJ (eds). *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. Raven Press, Ltd, New York, 1995.
- Irwin MR, Miller AH. Depressive disorders and immunity: 20 years of progress and discovery. *Brain, Behaviour and Immunity*. 21(4):374-83, 2007.
- Ivanova SA, Semke VY, Vetlugina TP, Rakitina NM, Kudyakova TA, Simutkin GG. Signs of apoptosis of immunocompetent cells in patients with depression. *Neuroscience and Behavioural Physiology*. 37(5):527-30, 2007.
- Izikson L, Klein RS, Charo IF, Weiner HL, Luster AD. Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor (CCR)2. *Journal of Experimental Medicine*. 192:1075–1080, 2000.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology* (6th ed.). New York and London: Garland Science. 2005.
- Janssen DG, Caniato RN, Verster JC, Baune BT. A psychoneuroimmunological review on cytokines involved in antidepressant treatment response. *Human psychopharmacology* 25:201-215, 2010.
- Jones E.G. Laminar distribution of cortical efferent cells. In *Cellular Components of the cerebral Cortex* (A. Peters and E. Jones Eds.), Vol. 1, pp. 521-553. Plenum, New York, 1984.
- Jones E.G. Varieties and distribution of non-pyramidal cells in the somatic sensory cortex of the squirrel monkey. *J. Comp. Neurol.* 160: 412-423, 1975.
- Kahle W., Leonhardt H., Platzer W. Nervous System and Sensory Organs. From *Color Atlas/Text of Human anatomy Vol. 3*, 1993.
- Kanakoudi-Tsakalidou F, Debonera, Drossou-Agakidou V, Sarafidis K, Tzimouli V, Taparkou A, and Kremenopoulos G. Flow cytometric measurement of HLA-DR

- expression on circulating monocytes in healthy and sick neonates using monocyte negative selection. *Clinical and Experimental Immunology*. 123(3): 402–407, 2001.
- Kandel, ER; Schwartz, JH; Jessell, TM. *Principles of Neural Science* 4th ed. New York McGraw Hill 2000.
- Karam, JA. Apoptosis in Carcinogenesis and Chemotherapy. Netherlands: Springer 2009
- Kempermann G, Krebs J and Fabel K. The contribution of failing adult hippocampal neurogenesis to psychiatric disorders. *Current Opinion in Psychiatry* 21: 290-295, 2008.
- Kettermann H., Ransom B.R. Eds. *Neuroglia*. Oxford University Press, Oxford 1995.
- Kiecolt-Glaser JK, Glaser R. Depression and immune function: central pathways to morbidity and mortality. *Journal of Psychosomatic Research*. 53(4):873-6, 2002.
- Kim JH, Kim JH, Park JA, Lee SW, Kim WJ, Yu YS, Kim KW. Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 9(4):339-45, 2006.
- Kimelberg HK. Functions of mature mammalian astrocytes: a current view. *Neuroscientist*. 16(1):79-106, 2010
- Kleine TO, Benes L. Immune surveillance of the human central nervous system (CNS): different migration pathways of immune cells through the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier in healthy persons. *Cytometry*. 69(3):147-51. 2006
- Ko FY, Tsai SJ, Yang AC, Zhou Y, Xu LM. Association of CD8 T cells with depression and anxiety in patients with liver cirrhosis. *International Journal of Psychiatry in Medicine*. 45(1):15-29, 2013.
- Kohm AP, Sanders VM. Norepinephrine: a messenger from the brain to the immune system. *Immunology Today* 21:539-542, 2000.
- Kohm AP, Sanders VM. Norepinephrine and β 2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4⁺ T and B lymphocyte function in vivo and in vitro. *Pharmacological Reviews* 53:487-525, 2001.
- Kort JJ, Kawamura K, Fugger L, Weissert R, Forsthuber TG. Efficient presentation of myelin oligodendrocyte glycoprotein peptides but not protein by astrocytes from HLA-DR2 and HLA-DR4 transgenic mice. *Journal Neuroimmunology*. 173(1-2):23-34, 2006.
- Kriegstein A and Alvarez-Buylla A (2009) The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual Review of Neuroscience* 32: 149-184, 2009.
- Kronfol Z, Silva J Jr, Greden J, Dembinski S, Gardner R, Carroll B. Impaired lymphocyte function in depressive illness. *Life Sciences*. 33(3):241-7, 1983.
- Krueger JM, Obal FJ, Fang J, Kubota T, Taishi P. The role of cytokines in physiological sleep regulation. *Annual NY Academy of Sciences*. 933, 211–221, 2001.
- Kubera M, Kenis G, Bosmans E, Scharpe S, Maes M. Effects of serotonin and Serotonergic agonists and antagonists on the production of IFN- γ and IL-10. *Neuropsychopharmacology* 23:89-98, 2000.
- Lagopoulos J, Hermens DF, Naismith SL, Scott EM, Hickie IB. Frontal lobe changes occur early in the course of affective disorders in young people. *BMC Psychiatry*. 20;12:4, 2012.
- Levite M. Neurotransmitters activate T-cells and elicit crucial functions via neurotransmitter receptors. *Current Opinion in Pharmacology* 8:460–471, 2008.
- Levite M. Nerve-driven immunity. The direct effects of neurotransmitters on T-cell function. *Annals of the NY Academy of Sciences* 917:307-321, 2000.
- Levite M: Nervous immunity: neurotransmitters, extracellular K⁺ and T-cell function. *Trends in Immunology* 22:2-5, 2001.

- Levite M: Neuropeptides, by direct interaction with T cells, induce cytokine secretion and break the commitment to a distinct T helper phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95:12544-12549, 1998.
- Levite M, Cahalon L, HersHKoviz R, Steinman L, Lider O: Neuropeptides, via specific receptors, regulate T cell adhesion to fibronectin. *Journal of Immunology* 160:993-1000, 1998.
- Lewitus GM, Schwartz M. Behavioral immunization: immunity to self-antigens contributes to psychological stress resilience. *Molecular Psychiatry*. 14(5):532-6., 2009.
- Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW, Levison SW. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *Journal of Neurochemistry*. 89(5):1092-100, 2004.
- Licinio J, Wong ML. The role of inflammatory mediators in the biology of major depression: central nervous system cytokines modulate the biological substrate of depressive symptoms, regulate stress-responsive systems and contribute the neurotoxicity and neuroprotection. *Molecular Psychiatry* 4(4):317, 1999.
- Lin A, Song C, Kenis G, Bosmans E, De Jongh R, Scharpé S, Maes M. The in vitro immunosuppressive effects of moclobemide in healthy volunteers. *Journal of Affective Disorders*. 58(1):69-74, 2000.
- Lin HK, Wang G, Chen Z, et al. Phosphorylation-dependent regulation of cytosolic localization and oncogenic function of Skp2 by Akt/PKB. *Nature Cell Biology* 11(4): 420-432, 2009.
- Liss L, Wolter JR. Human retinal neurons in tissue culture. *American Journal of Ophthalmology*. 52:834-41, 1961.
- Luo L, O'Leary DD.. Axon retraction and degeneration in development and disease. *Annual Review of Neuroscience*. 28, 127–156, 2005.
- Mackintosh C. Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes. *Biochemical Journal* 381(Pt 2): 329-342, 2004
- Maes M, Fišar Z, Medina M, Scapagnini G, Nowak G, Berk M. New drug targets in depression: inflammatory, cell-mediated immune, oxidative and nitrosative stress, mitochondrial, antioxidant, and neuroprogressive pathways. And new drug candidates--Nrf2 activators and GSK-3 inhibitors. *Inflammopharmacology*.20(3):127-50, 2012.
- Maes M. The immunoregulatory effects of antidepressants. *Human Psychopharmacology*. 16(1):95-103, 2001.
- Maes M, Song C, Lin AH, Bonaccorso S, Kenis G, De Jongh R, Bosmans E, Scharpé S. Negative immunoregulatory effects of antidepressants: inhibition of interferon-gamma and stimulation of interleukin-10 secretion. *Neuropsychopharmacology*. 20(4):370-9, 1999.
- Maes M, Meltzer HY. The serotonin hypothesis of major depression. In Bloom FE, Kupfer DJ (eds). *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. Raven Press, Ltd, New York, 1995.
- Maes M, Bosmans E, Suy E, Vandervorst C, Dejonckheer A, Minner B, Raus J. Depression-related disturbances in mitogen induced lymphocyte responses, interleukin 1 α and soluble interleukin 2 receptor production. *Psychiatr Scand* 84:379, 1991.
- Maes M, Meltzer HY, Scharpe S, Bosmans E, Suy E, De Meester L, Calabrese J, Cosyns P. Relationships between interleukin-6 activity, acute phase proteins and function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in severe depression. *Psychiatry Res*. 49:11, 1993.
- Maes M, Scharpe S, Meltzer HY, Bosmans E, Suy E, Calabrese J, Cosyns P. Relationships between lower plasma L-tryptophan levels and immune-inflammatory variables in depression. *Psychiatry Res*. 49:151, 1993.
- Magnus T, Chan A, Linker RA, Toyka KV, Gold R. Astrocytes are less efficient in the removal of apoptotic lymphocytes than microglia cells: implications for the role of glial

- cells in the inflamed central nervous system. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 61(9):760-6, 2002.
- Marazziti D, Consoli G, Masala I, Catena Dell'Osso M, Baroni S. Latest advancements on serotonin and dopamine transporters in lymphocytes. *Mini Review Medical Chemistry*. 10(1):32-40, 2010.
- Martin, R. Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis and their application for new therapeutic strategies. *Journal of Neural Transmission*. Suppl. 49, 53–67, 1997.
- Martin, R. et al. Fine specificity and HLA restriction of myelin basic protein-specific cytotoxic T cell lines from multiple sclerosis patients and healthy individuals. *Journal of Immunology* 145:540–548, 1990.
- Mattson MP, Chan SL. Calcium orchestrates apoptosis. *Nature Cell Biology* 5, 1041 – 1043, 2003.
- Mayo L, Quintana FJ, and Weiner HL. The Innate Immune System in Demyelinating Disease. *Immunological Review*. 248(1): 170–187, 2012.
- McLaren FH, Svendsen CN, Van der Meide P, Joly E. Analysis of neural stem cells by flow cytometry: cellular differentiation modifies patterns of MHC expression. *Journal of Neuroimmunology*. 112(1-2):35-46, 2001.
- McLaurin J, D'Souza S, Stewart J, Blain M, Beaudet A, Nalbantoglu J, Antel JP. Effect of tumor necrosis factor alpha and beta on human oligodendrocytes and neurons in culture. *International Journal of Developmental Neurosciences* 13(3-4):369-81, 1995.
- Mellor AL, Munn D, Chandler P, Keskin D, Johnson T, Marshall B, Jhaver K, Baban B. Tryptophan catabolism and T cell responses. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 527:27-35, 2003.
- Memos N, Kataki A, Chatziganni E, Nikolopoulou M, Skoulakis E, Consoulas C, Zografos G, Konstadoulakis M. Alternations of 14-3-3 θ and β protein levels in brain during experimental sepsis. *Journal of Neuroscience Research*. 89(9):1409-18, 2011.
- Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 24;454(7203):428-35, 2008.
- Miljković D, Timotijević G, Mostarica Stojković M. Astrocytes in the tempest of multiple sclerosis. *FEBS Lett*. 585(23):3781-8, 2011.
- Miller AH. Depression and immunity: A role for T cells? *Brain, behaviour and immunity*. 24(1): 1-8, 2010.
- Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biological Psychiatry*. 65(9):732-41, 2009
- Ming GL and Song H. Adult neurogenesis in the Mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70: 687-702, 2011.
- Moreau M, Lestage J, Verrier D, Mormede C, Kelley KW, Dantzer R, Castanon N. Bacille Calmette-Guérin inoculation induces chronic activation of peripheral and brain indoleamine 2,3-dioxygenase in mice. *Journal of Infectious Diseases*. 192(3):537-44, 2005.
- Moviglia GA, Fernandez Viña R, Brizuela JA, Saslavsky J, Vrsalovic F, Varela G, Bastos F, Farina P, Etchegaray G, Barbieri M, Martinez G, Picasso F, Schmidt Y, Brizuela P, Gaeta CA, Costanzo H, Moviglia Brandolino MT, Merino S, Pes ME, Veloso MJ, Rugilo C, Tamer I, Shuster GS. Combined protocol of cell therapy for chronic spinal cord injury. Report on the electrical and functional recovery of two patients. *Cytotherapy* 8(3):202-9, 2006.
- Müller N, Schwarz MJ. The immune mediated alteration of serotonin and glutamate: towards an integrated view of depression. *Molecular Psychiatry*. 12(11):988-1000, 2007.

- Muller N, Ackenheil M, Hofschuster E, Mempel W, Ecks J. Investigations of cellular immunity during depression and the free evidence for an immune activation in affective psychosis. *Progress Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 17:713, 1993.
- Murayama A, Matsuzaki Y, Kawaguchi A, Shimazaki T, Okano H. Flow cytometric analysis of neural stem cells in the developing and adult mouse brain. *Journal of Neuroscience Research*. 69(6):837-47, 2002.
- Murray DR, Irwin M, Rearden CA, Ziegler M, Matulsky H, Maise AS. Sympathetic and immune interactions during dynamic exercise mediation via an α 2-adrenergic dependent mechanism. *Circulation* 80:203, 1992.
- Myint AM, Kim YK, Verkerk R, Scharpé S, Steinbusch H, Leonard B. Kynurenine pathway in major depression: evidence of impaired neuroprotection. *Journal of Affective Disorders*. 98(1-2):143-51. 2007.
- Nair A, Frederick TJ, Miller SD. Astrocytes in multiple sclerosis: a product of their environment. *Cell Mol Life Sci*. 65(17):2702-20, 2008.
- Nakanishi M, Furuno T. Molecular basis of neuroimmune interaction in an in vitro coculture approach. *Cellular and Molecular Immunology*. 5(4):249-59, 2008.
- Nakanishi M, Furuno T. Molecular basis of Neuroimmune interaction in an in vitro coculture Lasek R.J., Brady S.T. The axon: a prototype for studying expressional cytoplasm. In *Organisation of the cytoplasm*, pp 113-124. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, NY, 1982.
- Nakayama T, Momiki-Soga T, Inoue N. Astrocyte-derived factors instruct differentiation of embryonic stem cells into neurons. *Neuroscience Research*. 46(2):241-9, 2003.
- Nayak D, Zinselmeyer BH, Corps KN, McGavern DB. In vivo dynamics of innate immune sentinels in the CNS. *Intravital*. 1(2):95-106, 2012.
- Nikceovich NK, Gordon KB, Tan L, Hurst SD, Kroepfl JF, Gardinier M, Barrett TA, Miller SD. IFN-gamma-activated primary murine astrocytes express B7 costimulatory molecules and prime naive antigen-specific T cells. *Journal of immunology*. 158(2):614-21, 1997.
- O'Connor JC, Lawson MA, André C, Moreau M, Lestage J, Castanon N, Kelley KW, Dantzer R. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Molecular Psychiatry*. 4(5):511-22, 2009.
- Opp MR. Cytokines and sleep. *Sleep Medicine*. Rev. 9, 355–364, 2005.
- Orton RJ, Sturm OE, Vyshemirsky V, Calder M, Gilbert DR, Kolch W. "Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway". *The Biochemical journal* 392 (Pt 2): 249–261, 2005.
- Ota, K. et al. T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature* 346, 183–187, 1990.
- Pelham H.R.B. Sorting and retrieval between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 7: 530, 1995.
- Pende M, Um SH, Mieulet V, et al. "S6K1,^(-/-)/S6K2^(-/-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway". *Molecular and cellular biology* 24 (8): 3112–24, 2004
- Peng S, Zhang Y, Zhang J, Wang H, Ren B. ERK in learning and memory: A review of recent research. *International Journal of Molecular Sciences*. 11(1):222-32, 2010.
- Peters A., Palay S.L. and Webster H.D. The fine structure of the nervous system: Neurons and their supporting cells, 3rd Ed. Oxford University Press, New York, 1991.

- Peters A and Jones E. Eds. *Cellular Components of the cerebral Cortex*. Plenum, Vol. 1 New York, 1984.
- Peters KL, Smithgall TE. Tyrosine phosphorylation enhances the SH2 domain-binding activity of Bcr and inhibits Bcr interaction with 14-3-3 proteins. *Cell Signal* 11(7): 507-514, 1999.
- Popov SG, Villasmil R, Bernardi J. "Lethal toxin of *Bacillus anthracis* causes apoptosis of macrophages". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293 (1): 349–55, 2002.
- Porter GW, Khuri FR, Fu H. Dynamic 14-3-3/client protein interactions integrate survival and apoptotic pathways. *Seminars in Cancer Biology* 16(3): 193-202, 2006.
- Raison CL, Capuron L, Millar AH. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends in Immunology*. 27(1):24-31, 2006
- Raman D, Sobolik-Delmaire T, Richmond A. Chemokines in health and disease. *Experimental Cell Research*. 10;317(5):575-89, 2011.
- Raub T.J., Kuentzel S., Sawada G.A. Permeability of bovine brain microvessel endothelial cells in vitro: Barrier tightening by a factor released from astrogloma cells. *Exp. Cell Res.* 199: 330-340, 1992.
- Robertson M. Nerves, myelin and multiple sclerosis. *Nature (Lond.)* 290: 357, 1981.
- Rook GA, Lowry CA, Raison CL. Lymphocytes in neuroprotection, cognition and emotion: is intolerance really the answer? *Brain, Behaviour and Immunity*. 25(4):591-601, 2011.
- Rosivatz E, Becker I, Bamba M, Schott C, Diebold J, Mayr D, Höfler H, Becker KF. Neoexpression of N-cadherin in E-cadherin positive colon cancers. *Int J Cancer*. 111(5):711-9, 2004.
- Sahay A, Wilson DA, and Hen R. Pattern separation: a common function for new neurons in hippocampus and olfactory bulb. *Neuron* 70: 582-588, 2011.
- Schleifer SJ, Keller SE, Camerino M, Thornton JC, Stein M. Suppression of lymphocyte stimulation following bereavement. *JAMA*, 250(3):374-7, 1983.
- Schulze WX, Deng L, Mann M (2005). "Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family". *Molecular systems biology* 1 (1): 2005.
- Schlatter J, Ortuno F, Cervera-Enguix S. Lymphocyte subsets and lymphocyte production in patients with melancholic versus non-melancholic depression. *Psychiatry Research* 128:259-265, 2004.
- Schmid I, Uittenbogaart CH, Keld B, Giorgi JV. 1994. A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 170: 145–157.
- Schutte B, Nuydens R, Geerts H, Ramaekers F. Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells. *Journal of Neuroscience Methods*. 86(1):63-9, 1998.
- Sephton SE, Dhabhar FS, Keuroghlian AS, Giese-Davis J, McEwen BS, Ionan AC, Spiegel D. Depression, cortisol, and suppressed cell-mediated immunity in metastatic breast cancer. *Brain, Behaviour and Immunity*. 23(8):1148-55, 2009.
- Sergent-Tanguy S, Chagneau C, Neveu I, Naveilhan. Fluorescent activated cell sorting (FACS): a rapid and reliable method to estimate the number of neurons in a mixed population. *Journal of Neuroscience Methods* 129:73-79, 2003.
- Sjöberg AP, Trouw LA, Blom AM. Review Complement activation and inhibition: a delicate balance. *Trends in Immunology*. 30(2):83-90, 2009.
- Silberberg DH. Phenylketonuria metabolites in cerebellum culture morphology. *Archives of Neurology*. 17(5):524-9, 1967.

- Siman R, McIntosh TK, Soltesz KM, et al. Proteins released from degenerating neurons are surrogate markers for acute brain damage. *Neurobiology of Disease* 16(2): 311-320, 2004.
- Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood*. 105(11):4390-8, 2005.
- Sluchanko NN, Seit-Nebi AS, Gusev NB. Effect of phosphorylation on interaction of human tau protein with 14-3-3zeta. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379(4): 990-994, 2009.
- Smith EM. Hormonal activities of cytokines. In *Neuroimmunology*. Karger. Basel, Switzerland. *Chemical Immunology* 52:154, 1992.
- Snell R.S. Clinical Neuroanatomy for Medical Students, Little, Brown 3rd Ed. 1992.
- Sobel RA, Mitchell ME, Fondren G. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in cellular immune reactions in the human central nervous system. *American Journal of Pathology*. 136(6):1309-16, 1990.
- Somogyi P., Cowey A. Combined Golgi and electron microscope study on the synapses formed by double bouquet cells in the visual cortex of the cat and monkey. *Journal Comp. Neurology*. 195: 547-566, 1981.
- Somogyi P., Freund T.F., Cowey A. The axo-axonic interneuron in the cerebral cortex of the rat, cat and monkey. *Neuroscience* 7:2577-2607, 1982.
- Somogyi P, Kisvarday ZF, Martin KA, Whitteridge D. Synaptic connections of morphologically identified and physiologically characterised large basket cells in the striate cortex of rat. *Neuroscience* 10: 261-294, 1983.
- Spiegel D, Giese-Davis J. Depression and cancer: mechanisms and disease progression. *Biological Psychiatry*. 54(3):269-82, 2003.
- Stein M, Miller AH, Trestman RL. Depression, the immune system, and health and illness. Findings in search of meaning. *Archives of General Psychiatry*. 48(2):171-7, 1991.
- Stites DP, Terr AI, Parslow TG. Medical Immunology, 9th ed. Appleton and Lange 1997.
- Sugimori K, Kobayashi K, Kitamura T, Sudo S, Koshino Y. 14-3-3 protein beta isoform is associated with 3-repeat tau neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 61(2): 159-167, 2007.
- Suzuki SC, Takeichi M. Cadherins in neuronal morphogenesis and function. *Development, Growth and Differentiation*. 50 Suppl 1:S119-30, 2008.
- Szuster-Ciesielska A, Słotwińska M, Stachura A, Marmurowska-Michałowska H, Dubas-Slemp H, Bojarska-Junak A, Kandefer-Szerszeń M. Accelerated apoptosis of blood leukocytes and oxidative stress in blood of patients with major depression. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*. 32(3):686-94, 2008.
- Tai CY, Kim SA, Schuman EM. Cadherins and synaptic plasticity. *Current Opinion in Cell Biology*. 20(5):567-75, 2008.
- Tai CY, Kim SA, Schuman EM. Cadherins and synaptic plasticity. *Current Opinion in Cell Biology*. 20(5):567-75, 2008.
- Tan L, Gordon KB, Mueller JP, Matis LA, Miller SD. Presentation of proteolipid protein epitopes and B7-1-dependent activation of encephalitogenic T cells by IFN-gamma-activated SJL/J astrocytes. *Journal of Immunology*. 160(9):4271-9, 1998.
- Tardieu M, Héry C, Peudenier S, Boespflug O, Montagnier L. Human immunodeficiency virus type 1-infected monocytic cells can destroy human neural cells after cell-to-cell adhesion. *Annals of Neurology* 32(1):11-7, 1992.
- Teeling JL, Perry VH. (2009) Systemic infection and inflammation in acute CNS injury and chronic neurodegeneration: underlying mechanisms. *Neuroscience* 158(3):1062-73.

- Toapanta FR, Ross TM. Complement-mediated activation of the adaptive immune responses: role of C3d in linking the innate and adaptive immunity. *Immunologic Research*. 36(1-3):197-210, 2006.
- Tournier JN, Hellmann AQ. Neuroimmune connections: evidence for a neuroimmunological synapse. *Trends in Immunology* 24:114-115, 2003
- Trajkovic V, Vuckovic O, Stosic-Grujicic S, Miljkovic D, Popadic D, Markovic M, Bumbasirevic V, Backovic A, Cvetkovic I, Harhaji L, Ramic Z, Mostarica Stojkovic M. Astrocyte-induced regulatory T cells mitigate CNS autoimmunity. *Glia*. 47(2):168-79, 2004.
- Tran MD, Wanner IB, Neary JT. Purinergic receptor signalling regulates N-cadherin expression in primary astrocyte cultures. *Journal of Neurochemistry*. 105(1):272-86, 2008.
- Tsao CW, Lin YS, Chen CC, Bai CH, Wu SR. Cytokines and serotonin transporter in patients with major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 30(5):899-90, 2006.
- Tzivion G, Gupta VS, Kaplun L, Balan V. 14-3-3 proteins as potential oncogenes. *Seminars in Cancer Biology* 16(3): 203-213, 2006.
- Valente MM, Bortolotto V, Cuccurazzu B, Ubezio F, Meneghini V, Francese MT, Canonico PL, Grilli M. Alpha2delta ligands act as positive modulators of adult hippocampal neurogenesis and prevent depressive-like behavior induced by chronic restraint stress. *Molecular Pharmacology Fast Forward*. Published on May 9, 2012
- Vinuesa CG, Chang PP. Innate B cell helpers reveal novel types of antibody responses. *Nature Immunology* 4(2):119-26, 2013
- Vitkovic L, Bockaert J, Jacque C. "Inflammatory" cytokines: neuromodulators in normal brain? *Journal of Neurochemistry* 74, 457–471, 2000.
- Watanabe M, Isobe T, Ichimura T, Kuwano R, Takahashi Y, Kondo H, Inoue Y. Molecular cloning of rat cDNAs for the zeta and θ subtypes of 14-3-3 protein and differential distributions of their mRNAs in the brain. *Brain Research and Molecular Brain Research*. 25: 113–121, 1994.
- Weihe E, Nohr D, Michel S, Muller S, Zentel HJ, Fink T, Krekel J: Molecular anatomy of the neuro-immune connection. *International Journal of Neuroscience* 59:1-23, 1991.
- Wichers M, Maes M. The psychoneuroimmuno-pathophysiology of cytokine-induced depression in humans. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*. 5(4):375-88, 2002.
- Wolf G, Yirmiya R, Goshen I, Iverfeldt K, Holmlund L, Takeda K, Shavit Y. Impairment of interleukin-1 (IL-1) signaling reduces basal pain sensitivity in mice: genetic, pharmacological and developmental aspects. *Pain*. 104, 471–480, 2003.
- Xia Z, DePierre JW, Nässberger L. Tricyclic antidepressants inhibit IL-6, IL-1 beta and TNF-alpha release in human blood monocytes and IL-2 and interferon-gamma in T cells. *Immunopharmacology*. 34(1):27-37, 1996.
- Yaffe MB. How do 14-3-3 proteins work? Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett* 513: 53–57, 2002.
- Yirmiya R, Goshen I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behaviour and Immunology*. 25(2):181-213, 2011.
- Zarich N, Oliva JL, Martínez N, et al. Grb2 is a negative modulator of the intrinsic Ras-GEF activity of hSos1". *Molecular Biology of the Cell* 17 (8): 3591–7, 2006.
- Zeinstra E, Wilczak N, Streefland C, De Keyser J. Astrocytes in chronic active multiple sclerosis plaques express MHC class II molecules. *Neuroreport*. 11(1):89-91, 2000.
- Zhang QY, Huang JH, Li HZ, Guo HT, Zhong YQ, Wang YM, Pei JM. Myelin-basic protein-reactive specific CD4+ and CD8+ NK lymphocytes induce morphological changes in

- neuronal cell bodies and myelin sheaths: implications for multiple sclerosis. *Archives of Med Research* 39(1):45-51, 2008.
- Zigmond M.J. et al. *Fundamental Neuroscience*, Ed., Academic Press, 1999.
- Zorrilla EP, Luborsky L, McKay JR, Rosenthal R, Houldin A, Tax A, McCorkle R, Seligman DA, Schmidt K. The relationship of depression and stressors to immunological assays: a meta-analytic review. *Brain, Behaviour and Immunity*. 15(3):199-226, 2001.
- Παράσχος ΑΙ. Νευροχημεία της κατάθλιψης. Από Χριστοδούλου ΓΝ. Κατάθλιψη Εκδόσεις Βήτα, Αθήνα, 1998.