ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837

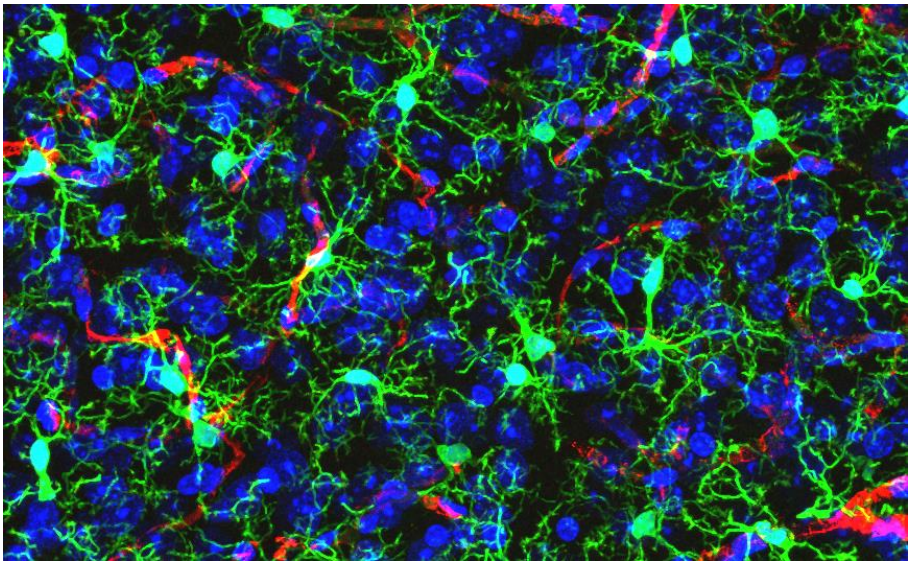
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ»

Δ Ι Π Λ Ω Μ Α Τ Ι Κ Η Ε Ρ Γ Α Σ Ι Α

«Υπολογιστική ανάλυση της δυναμικής της μικρογλοίας του εγκεφάλου σε φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες»



Ηλίας Ρουφαγάλας

Διπλωματούχος Ηλεκτρονικός Μηχανικός και Μηχανικός Ηλεκτρονικών Υπολογιστών, Πολυτεχνείο Κρήτης

ΑΘΗΝΑ 2019

HELLENIC REPUBLIC
National and Kapodistrian
University of Athens

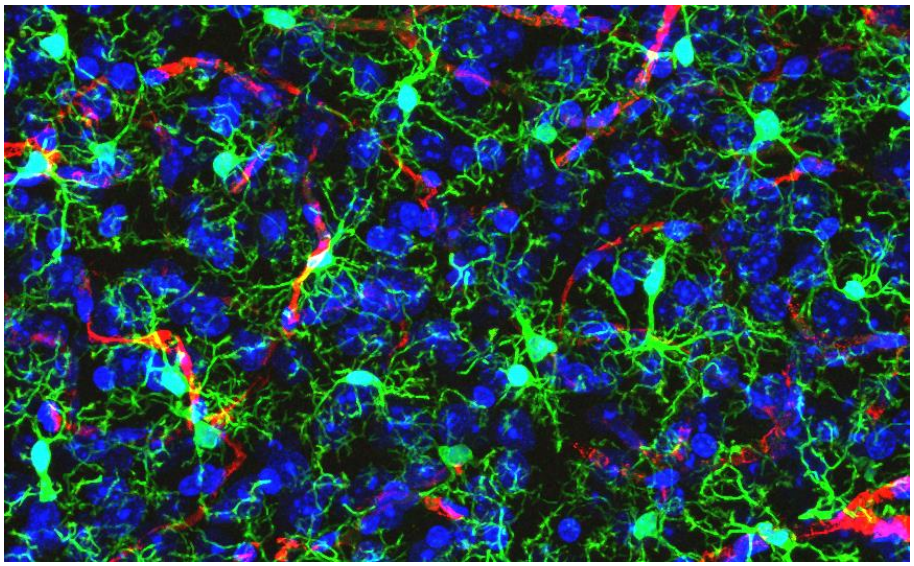
HELLENIC REPUBLIC
National and Kapodistrian
University of Athens
EST. 1837

SCHOOL OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

MASTER IN «BIOINFORMATICS»

Master Diploma Thesis

«Computational analysis of microglial dynamics in health and disease»



Ilias Roufagalas

Diploma in Electronics and Computer Engineering, Technical University of Crete

A T H E N S 2 0 1 9

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837

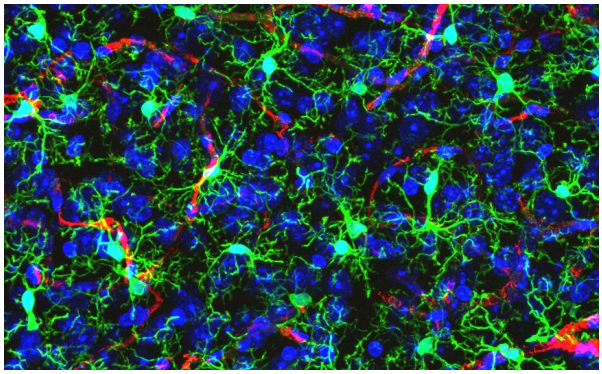
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ»

Δ Ι Π Λ Ω Μ Α Τ Ι Κ Η Ε Ρ Γ Α Σ Ι Α

«Υπολογιστική ανάλυση της δυναμικής της μικρογλοίας του εγκεφάλου σε φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες»



Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Καθηγητής Ιωάννης Τρουγκάκος (Επιβλέπων)
Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής,
Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Επίκουρη Καθηγήτρια Βασιλική Οικονομίδου
Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής,
Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Αναπληρωτής Καθηγητής Αλέξανδρος Γεωργακίλας
Τομέας Φυσικής,
Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικής, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία διεξήχθη στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος ειδίκευσης «Βιοπληροφορική και Υπολογιστική Βιολογία» του Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη της μεταδιδακτορικής ερευνήτριας Δρ.Βασιλικής Κυραργύρη σε συνεργασία με το Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής (επιστημονική υπεύθυνη εργαστηρίου: Δρ.Lesley Probert) στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ (ΕΙΠ).

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον διευθυντή του μεταπτυχιακού προγράμματος «Βιοπληροφορική-Υπολογιστική Βιολογία», Καθηγητή κ. Ιωάννη Τρουγκάκο, για την προθυμία του να αναλάβει ως επιβλέπων καθηγητής την παρούσα διπλωματική εργασία και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Βασιλική Οικονομίδου και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Αλέξανδρο Γεωργακίλα για την αποδοχή τους να συμμετάσχουν στη διπλωματική μου εργασία ως τα άλλα 2 μέλη της τριμελούς μου εξεταστικής επιτροπής.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Δρ.Βασιλική Κυραργύρη αρχικά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για να αναλάβω το θέμα της παρούσας εργασίας αλλά και για την ανεκτίμητη στήριξή της σε όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο υπό την επίβλεψή της. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα για όλες τις γνώσεις που έλαβα και συνεχίζω να λαμβάνω από τη συνεργασία μαζί της αλλά και για το μεγάλο ενδιαφέρον για τη βιολογική έρευνα που μου μετέδωσε μέσω του δικού της πάθους για αυτήν. Τέλος, την ευχαριστώ για τη μεγάλη υπομονή που έδειξε και συνεχίζει να δείχνει σε όλο το χρονικό διάστημα της συνεργασίας μας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τη Δρ. Lesley Probert αρχικά που με δέχτηκε στο εργαστήριό της για να πραγματοποιήσω τη διπλωματική μου εργασία αλλά και για την πολύτιμη βοήθειά της και τις συμβουλές της σε οτιδήποτε χρειάστηκα σε όλο αυτό το διάστημα. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην προπτυχιακή φοιτήτρια Μαρία Αυλωνίτη για την πολύτιμη βοήθειά της αλλά και στη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Αλεξάνδρα Φορτώση για τη δική της συνεισφορά στην υλοποίηση αυτής της εργασίας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Δρ. Ειρήνη Παπαζιάν και την Ελένη Τσουκαλά για τη βοήθειά τους κατά τη σύνταξη του κειμένου. Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Μοριακής Γενετικής του ΕΙΠ και

συγκεκριμένα στους Αναστασία Δαγκωνάκη, Αθηνά Μπούτου, Κωνσταντίνο Καμπά, Φώτη Μπαντούνα και Κατερίνα Παπαδημητρίου αλλά και στην υπεύθυνη της μονάδας διαγονιδιακής τεχνολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ Δρ. Σύλβα Χαραλάμπους. Τους ευχαριστώ όλους για την άριστη συνεργασία και το πολύ θετικό κλίμα που έκανε ευκολότερη την παρουσία μου στο εργαστήριο και πολύ πιο ευχάριστο όλο αυτό το διάστημα της προετοιμασίας της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και ιδιαίτερα τους γονείς μου για την ηθική και πρακτική στήριξη σε όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου στο ΜΔΕ της Βιοπληροφορικής. Η παρούσα διπλωματική εργασία είναι αφιερωμένη σε αυτούς.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ **5**

ABSTRACT **7**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ **9**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα **10**

1.1. Τα νευρικά κύτταρα **10**

1.1.1. Δομή νευρικών κυττάρων **10**

1.1.2. Νευρογλοιακά κύτταρα **12**

1.2. Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός **14**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Λειτουργίες μικρογλοιακών κυττάρων σε υγιείς και παθολογικές συνθήκες **16**

2.1. Τα μικρογλοιακά κύτταρα στον υγιή εγκέφαλο **17**

2.1.1. Τα μικρογλοιακά κύτταρα στον αναπτυσσόμενο υγιή εγκέφαλο **17**

2.1.2. Τα μικρογλοιακά κύτταρα στον ενήλικο υγιή εγκέφαλο **18**

2.2. Τα μικρογλοιακά κύτταρα στον εγκέφαλο υπό παθολογικές συνθήκες **20**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μηχανισμοί μικρογλοιακής κινητικότητας **22**

3.1. Μικρογλοιακή επιτήρηση στον υγιή εγκέφαλο **22**

3.2. Χημειοταξία **25**

3.3. Μικρογλοιακή κινητικότητα σε αλληλεπίδραση με τους νευρώνες **26**

3.4. Ανάλυση μικρογλοιακής κινητικότητας **27**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Σκλήρυνση Κατά Πλάκας **32**

4.1. Πειραματικά μοντέλα της ΣΚΠ **35**

4.1.1. Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα (ΠΑΕ) **35**

4.1.2. Απομυελίνωση επαγόμενη από την τοξίνη κουπριζόνη (CPZ) **38**

4.2. Ο ρόλος των μικρογλοιακών κυττάρων στη ΣΚΠ **39**

4.3. Ο ρόλος της παρεγκεφαλίδας στη Σκλήρυνση Κατά Πλάκας **40**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μικροσκοπία φθορισμού **43**

5.1. Μικροσκοπία φθορισμού **44**

5.1.1. Συνεστιακή μικροσκοπία **45**

5.1.2. Διφωτονική μικροσκοπία **47**

ΣΚΟΠΟΣ **50**

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ **52**

1. Πειραματική διαδικασία **52**

2. Μικροσκοπία φθορισμού **60**

3. Λογισμικά **63**

4. Ανάλυση αποτελεσμάτων **63**

5. Στατιστική ανάλυση **75**

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ **76**

1. Ανάπτυξη υπολογιστικών προγραμμάτων μακροεντολών (scripts) για την προ-επεξεργασία εικόνων μικρογλοίας από διφωτονικό και συνεστιακό μικροσκόπιο **76**

1.1. Ανάπτυξη προγράμματος μακροεντολών για την προ-επεξεργασία εικόνων μικρογλοίας από διφωτονικό μικροσκόπιο **76**

1.2. Ανάπτυξη προγράμματος μακροεντολών για την προ-επεξεργασία εικόνων μικρογλοίας από συνεστιακό μικροσκόπιο **86**

2. Ανάπτυξη υπολογιστικής εφαρμογής για την αυτοματοποιημένη ανάλυση της μορφολογίας της μικρογλοίας σε διάφορα στάδια εξέλιξης της ΠΑΕ και σε διάφορες περιοχές του ΚΝΣ **90**

3. Ανάλυση της μορφολογίας και της κινητικότητας της μικρογλοίας κατά την εξέλιξη της παθολογίας της ΠΑΕ σε διάφορες περιοχές του ΚΝΣ **97**

3.1. Η μορφολογία της μικρογλοίας μεταβάλλεται με διαφορετικό τρόπο στις διάφορες περιοχές του εγκεφάλου κατά την ΠΑΕ **97**

3.1.1. Όγκος και διάμετρος μικρογλοιακών προεκβολών **98**

3.1.2. Αριθμός μικρογλοιακών διακλαδώσεων και μικρογλοιακών προεκβολών ...**99**

3.1.3. Συνολικό μήκος μικρογλοιακών προεκβολών……..**100**

3.1.4. Συνολική πυκνότητα μικρογλοιακών κυττάρων ανά περιοχή……..**101**

3.2. Τα μικρογλοιακά κύτταρα αποκτούν λιγότερο διακλαδιζόμενη μορφολογία στην προκλινική φάση της ΠΑΕ στην παρεγκεφαλίδα και όχι σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου……**102**

3.3. Τα μικρογλοιακά κύτταρα στο φλοιό του εγκεφάλου εμφανίζονται λιγότερο διακλαδιζόμενα και με μειωμένη ικανότητα επιτήρησης στην κορύφωση της κλινικής συμπτωματολογίας της ΠΑΕ αλλά και στη χρόνια φάση της……..**105**

3.4. Τα μικρογλοιακά κύτταρα στο φλοιό του εγκεφάλου εμφανίζουν μικρότερη κινητικότητα στην κορύφωση των κλινικών συμπτωμάτων της ΠΑΕ αλλά και στη χρόνια φάση της……...**107**

3.5. Ο συνολικός αριθμός των μικρογλοιακών κυττάρων στην περιοχή του φλοιού του εγκεφάλου μειώνεται κατά την κορύφωση αλλά και τη χρόνια φάση της ΠΑΕ…….**108**

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ……**111**

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ……**116**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μικρογλοιακά κύτταρα αποτελούν τα ανοσιακά κύτταρα του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ), που επιτελούν σημαντικούς ρόλους στην ανάπτυξη των νευρικών κυκλωμάτων του αναπτυσσόμενου εγκεφαλικού ιστού αλλά και στην ομοιόσταση του ενήλικου εγκεφάλου. Στον υγιή εγκέφαλο, έχουν μια άκρως διακλαδιζόμενη μορφολογία και βρίσκονται σε διαρκή κίνηση με το να επεκτείνουν και να αποσύρουν τις προεκβολές τους, ένα είδος μικρογλοιακής κινητικότητας που όπως πρόσφατα δείχθηκε, ρυθμίζεται από την τονική δραστικότητα του διαύλου καλίου THIK-1. Υπό παθολογικές καταστάσεις, όπως ιστική βλάβη, νόσο ή μόλυνση του εγκεφαλικού ιστού, η μικρογλοία ρυθμίζει την υπερέκφραση αρκετών επιφανειακών υποδοχέων όπως οι MHCII και A_{2A} και η μορφολογία της γίνεται λιγότερο διακλαδισμένη, με βραχύτερες προεκβολές και μεγαλύτερα σώματα.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ανάπτυξη υπολογιστικών μεθόδων για την ανάλυση της μορφολογίας και της κινητικότητας της μικρογλοίας στον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό ποντικών με νευροεκφυλιστική ασθένεια. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε η δυναμική της μικρογλοίας σε διαφορετικά στάδια ενός πειραματικού μοντέλου της Σκλήρυνσης Κατά Πλάκας (ΣΚΠ), αυτό της Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας (ΠΑΕ). Η μελέτη επικεντρώθηκε σε τρεις περιοχές της φαιάς ουσίας του εγκεφάλου και πιο συγκεκριμένα στο φλοιό, τον ιππόκαμπο και την παρεγκεφαλίδα αλλά και στην οσφυϊκή περιοχή του νωτιαίου μυελού. Αρχικά, με τη χρήση C57BL/6 ποντικών και συνεστιακής μικροσκοπίας, απεικονίστηκε η μορφολογία και αναλύθηκαν τα χαρακτηριστικά των μικρογλοιακών κυττάρων σε υγιείς εγκεφαλικούς ιστούς αλλά και σε εγκεφαλικούς ιστούς ποντικών που βρίσκονται σε διάφορα στάδια εξέλιξης της ΠΑΕ. Στη συνέχεια, με τη χρήση μικροσκοπίας δύο φωτονίων και τεχνικών κρανιακού παραθύρου σε γονιδιακά σημασμένους ποντικούς αναφοράς (CX3CR1-GFP) καταγράφηκε η κινητικότητα της μικρογλοίας στον υγιή εγκέφαλο αναισθητοποιημένων ποντικών αλλά και κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της νόσου. Τα δεδομένα βιο-απεικόνισης αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας εργαλεία ανάλυσης εικόνας υψηλής απόδοσης, συμπεριλαμβανομένων των ImageJ2/Fiji και Imaris. Σχεδιάστηκαν υπολογιστικά πρωτόκολλα προ-επεξεργασίας και ανάλυσης των εικόνων, για τα οποία αναπτύχθηκαν επιπρόσθετα προγράμματα μακροεντολών (scripts) που ενσωματώθηκαν στα εργαλεία. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν οι γλώσσες

προγραμματισμού Java και Matlab για να αναπτυχθεί μια ειδική εφαρμογή (MicroApp) για την επεξεργασία των δεδομένων εικόνας του συνεστιακού μικροσκοπίου που χρησιμοποιήθηκαν για την αυτοματοποιημένη υπολογιστική ανάλυση της μικρογλοιακής μορφολογίας.

Η αυτόματη υπολογιστική μέθοδος που αναπτύχθηκε επέτρεψε την επεξεργασία πολύ μεγάλου όγκου δεδομένων, παρέχοντας έτσι για πρώτη φορά τη δυνατότητα ανάλυσης της μικρογλοιακής δυναμικής και μορφολογίας για όλα τα χρονικά στάδια της ΠΑΕ και, ταυτόχρονα, για διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου. Από τα αποτελέσματα προέκυψε αρχικά ότι η μορφολογία των μικρογλοιακών κυττάρων μεταβάλλεται με διαφορετικό τρόπο και σε διαφορετικά χρονικά σημεία για κάθε περιοχή του εγκεφάλου κατά την ΠΑΕ, δείχνοντας έτσι μια τοπολογική εξειδίκευση της απόκρισης της μικρογλοίας σε παθολογικά ερεθίσματα. Από την μορφολογική εξέταση προέκυψε επίσης ότι η περιοχή του εγκεφάλου όπου η μικρογλοία επηρεάζεται γρηγορότερα κατά την ΠΑΕ είναι η παρεγκεφαλίδα, ήδη από την προκλινική φάση της νόσου. Τα αποτελέσματα αυτά εγείρουν το ενδιαφέρον της συγκεκριμένης περιοχής ως μελλοντικό στόχο έρευνας για τον μηχανισμό λειτουργίας της ΠΑΕ, κάτι που έως τώρα δεν έχει μελετηθεί διεξοδικά. Τέλος, τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής δείχνουν μια σαφή μείωση της κινητικότητας των προεκβολών της μικρογλοίας και της επιτήρησης του εγκεφάλου που αυτή επιτελεί στο φλοιό του εγκεφάλου στην κλινική φάση της ΠΑΕ, με μελλοντικό στόχο να πραγματοποιηθεί η αντίστοιχη μελέτη και στην περιοχή της παρεγκεφαλίδας και σε προγενέστερα προ-κλινικά σημεία της νόσου.

Η μεταπτυχιακή εργασία διεξήχθη υπό την επίβλεψη της μεταδιδακτορικής ερευνήτριας Δρ. Βασιλικής Κυραργύρη στο πλαίσιο του προγράμματος του ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ. «*Microglia-driven pathology and altered surveillance in demyelination*» με κωδικό Πράξης 1156, σε συνεργασία με το Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής (επιστημονική υπεύθυνη εργαστηρίου: Δρ. Lesley Probert) στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ (ΕΙΠ).

Abstract

Microglia are the resident immune cells of the Central Nervous System (CNS), with crucial roles in both tissue development and homeostatic maintenance. In the healthy brain, microglia are highly motile ramified cells that constantly extend and retract their processes to survey the CNS parenchyma, a mode of motility that is called microglial surveillance and recently shown to be regulated by the tonic activity of the potassium channel THIK-1. Under pathological conditions, such as brain tissue damage, disease or infection, microglia upregulate several surface receptors such as MHCII and A_{2A}, and their morphology becomes less ramified, with fewer, shorter processes and larger somata.

In this project microglial dynamics were investigated in the healthy brain as well as at different stages of an experimental model of Multiple Sclerosis, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). By using C57BL/6 and genetically-labelled reporter mice (CX3CR1-GFP), confocal, two-photon microscopy and cranial window techniques, we imaged microglial morphology and recorded microglial motility and surveillance in the healthy brain of anaesthetized mice during the progression of the EAE pathology. The imaging data was analyzed by using high-throughput image analysis tools, including Imaris and ImageJ2/Fiji. For the pre-processing of the images, we developed custom programming scripts written in ImageJ2 macro-language, which were integrated in the tools as additional plugins. For the processing of the image data acquired from the confocal microscope, used for the analysis of the microglial morphology, we developed a specific application (MicroApp), written in the programming languages Java and MATLAB.

Our newly developed automated computational analysis allowed the processing of a very big volume of data, providing for the first time the circumstances for a longitudinal analysis of the microglial dynamics and their morphology in different regions of the brain and during different disease states. The initial results show that the morphological variations of the microglial cells appear in a different manner and in different timepoints during EAE, indicating a region-dependent microglial response during pathological conditions. The morphological analysis also showed that the cerebellum is the brain region which is affected earlier during the disease course, starting from the pre-onset phase. These results raise the interest for the cerebellum

region as a future target for studying the mechanism of EAE, something that hasn't been extensively studied so far. Finally, the results show a reduction of microglial motility and surveillance during the clinical phase of EAE in the cortex. As a future goal, the same study will be conducted in the cerebellum and at earlier pre-onset timepoints of the disease.

The project was held under the supervision of postdoc researcher Dr.Vasiliki Kyrargyri inder the framework of the ELIDEK project «*Microglia-driven pathology and altered surveillance in demyelination*» (Act 1156), in collaboration with the laboratory of Molecular Genetics (head of the lab: Dr.Lesley Probert) at the Hellenic Pasteur Institute.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

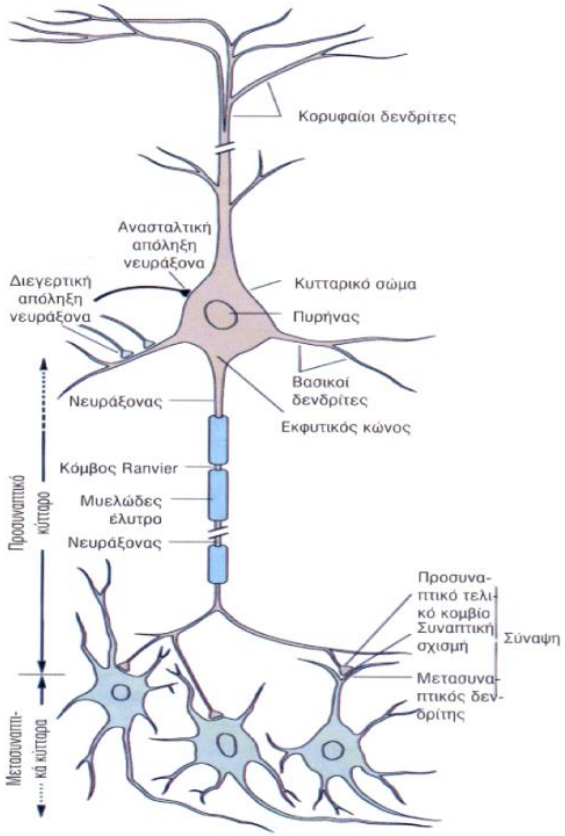
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

Είναι ένα σύστημα ελέγχου με ταχεία δράση όπου μαζί με το ενδοκρινικό ρυθμίζει τις περισσότερες εσωτερικές λειτουργίες του οργανισμού και ελέγχει τις δραστηριότητες που συνολικά γνωρίζουμε ως ανθρώπινη συμπεριφορά. Το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) αποτελείται από τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό και οι βασικές δομικές και λειτουργικές του μονάδες είναι τα νευρικά κύτταρα (ή νευρώνες) και τα νευρογλοιακά κύτταρα (ή νευρογλοία).

1.1. Τα νευρικά κύτταρα

1.1.1. Δομή νευρικών κυττάρων

Ένας συνήθης νευρώνας έχει τέσσερις μορφολογικά καθορισμένες περιοχές: το κυτταρικό σώμα, τους δενδρίτες, το νευράξονα και τα προσυναπτικά τελικά κομβία (Εικ.1.1.).



Εικ.1.1. Διαγραμματική απεικόνιση ενός πολύπολου νευρώνα (Kandel et al., Νευροεπιστήμη και Συμπεριφορά, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης).

Το κυτταρικό σώμα είναι το κέντρο μεταβολισμού του κυττάρου, περιέχει τον πυρήνα και αποτελεί την αποθήκη των γενετικών πληροφοριών. Από το κυτταρικό σώμα εκφύονται δύο είδη κυτταρικών αποφυάδων, οι δενδρίτες και ο νευράξονας. Οι περισσότεροι νευρώνες έχουν αρκετούς δενδρίτες, οι οποίοι διακλαδίζονται όπως ένα δένδρο και χρησιμεύουν ως κύρια συσκευή υποδοχής σημάτων από άλλα νευρικά κύτταρα. Μπορεί να ποικίλλουν σημαντικά ως προς το μήκος τους, με μερικούς να εκτείνονται στο σώμα σε απόσταση μεγαλύτερη από 1 μέτρο. Αντίθετα, από το κυτταρικό σώμα εκφύεται μόνο ένας νευράξονας, μια σωληνοειδής κατασκευή λεπτή σε διάμετρο (0.2 – 20 μm) σε σχέση με αυτή του κυτταρικού σώματος (50 και πλέον μm), που εκπορεύεται από μια εξειδικευμένη περιοχή του κυτταρικού σώματος, η οποία καλείται εκφυτικός κώνος. Ο εκφυτικός κώνος είναι η θέση εκκίνησης του δυναμικού ενεργείας, δηλαδή του κυτταρικού σήματος.

Πολλοί νευράξονες είναι μονωμένοι με ένα μυελώδες (λιπώδες) έλυτρο, τη μυελίνη, το οποίο διακόπτεται κατά κανονικά διαστήματα από περιοχές που είναι γνωστές ως κόμβοι Ranvier. Κλάδοι του νευράξονα ενός νευρώνα (του προσυναπτικού νευρώνα) διαβιβάζουν σήματα σε άλλον νευρώνα (τον μετασυναπτικό νευρώνα) σε μια θέση που ονομάζεται σύναψη. Οι κλάδοι ενός μόνο νευράξονα είναι δυνατόν να σχηματίζουν συνάψεις με 1000 άλλους νευρώνες. Οι δενδρίτες (κορυφαίοι και βασικοί) αποτελούν το κύριο μέρος της επιφάνειας υποδοχής του νευρώνα και μαζί με το κυτταρικό σώμα, δέχονται τα συναπτικά σήματα από τα προσυναπτικά κύτταρα.

Οι νευρώνες ταξινομούνται με βάση τη λειτουργία τους σε τρεις κύριες ομάδες: αισθητικούς, κινητικούς και διάμεσους νευρώνες. Οι διάμεσοι νευρώνες εντοπίζονται μέσα στο ΚΝΣ και συγκροτούν την σαφώς πολυπληθέστερη (90%) ομάδα, αποτελούμενη από όλα τα κύτταρα του νευρικού συστήματος που δεν είναι ειδικώς αισθητικά ή κινητικά. Οι διάμεσοι νευρώνες αναμετάδοσης ή προβολής έχουν μακρύ νευράξονα και μεταφέρουν πληροφορίες σε μεγάλες αποστάσεις, από μια περιοχή του εγκεφάλου σε μία άλλη. Οι τοπικοί διάμεσοι νευρώνες έχουν βραχύ νευράξονα και επεξεργάζονται πληροφορίες μέσα σε τοπικά δίκτυα.

1.1.2. Νευρογλοιακά κύτταρα

Τα νευρογλοιακά κύτταρα είναι η πολυπληθέστερη ομάδα κυττάρων του ΚΝΣ με ρόλο να υποστηρίζουν και να προστατεύουν μηχανικά και μεταβολικά τους νευρώνες. Διακρίνονται τρεις κύριοι τύποι γλοιακών κυττάρων: τα ολιγοδενδροκύτταρα, τα μικρογλοιακά κύτταρα (ή μικρογλοία) και τα αστροκύτταρα.

Ολιγοδενδροκύτταρα: Τα ολιγοδενδροκύτταρα είναι μικρά κύτταρα με σχετικά λίγες αποφυάδες. Τα κύτταρα αυτά επιτελούν τη σπουδαία λειτουργία της μόνωσης νευραξόνων, τυλίγοντας σφιχτά τις μεμβρανικές αποφυάδες τους ομόκεντρα γύρω από το νευράξονα και σχηματίζοντας ένα μυελώδες έλυτρο. Τα ολιγοδενδροκύτταρα εντοπίζονται στο ΚΝΣ και μπορεί να περιβάλλουν αρκετούς νευράξονες (15 κατά μέσο όρο). Στη φαιά ουσία του ΚΝΣ, τα ολιγοδενδροκύτταρα περιβάλλουν το κυτταρικό σώμα των νευρώνων, παρέχοντας έτσι την απαιτούμενη στήριξη. Η μυελίνωση μεσολαβείται από τα ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα που προέρχονται από τα πρόδρομα ολιγοδενδροκύτταρα (oligodendrocyte precursor cells, OPC), μέσω μιας αυστηρά ρυθμιζόμενης διαδικασίας που εμπλέκει διάφορες φάσεις ωρίμανσης των γλοιακών αυτών κυττάρων. Τα OPCs εντοπίζονται στο ΚΝΣ τόσο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, όπου και ρυθμίζουν την αναπτυξιακή μυελίνωση, όσο και στον ενήλικο εγκέφαλο, όπου μεσολαβούν την επιδιόρθωση της μυελίνης στις απομυελινωτικές εστίες σε ασθένειες όπως η Σκλήρυνση Κατά Πλάκας (ΣΚΠ) (Bunge R.P., 1968).

Μικρογλοιακά κύτταρα (ή μικρογλοία): Τα μικρογλοιακά κύτταρα είναι μακροφάγα του ΚΝΣ και αντιπροσωπεύουν εξειδικευμένα ανοσοκύτταρα. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι αποτελούν ένα ξεχωριστό, αυτο-διαιωνιζόμενο κυτταρικό πληθυσμό που προέρχεται από τον εμβρυϊκό λεκιθικό σάκο νωρίς κατά την ανάπτυξη, σε αντίθεση με τα περιφερικά μακροφάγα που ανανεώνονται συνεχώς από τον μυελό των οστών (Ginhoux and Williams, 2016). Έχουν σημαντικούς ρόλους στη φυσιολογία του ΚΝΣ, όπως στη ρύθμιση της συναπτικής πλαστικότητας (Paolicelli et al., 2011). Κάτω από συνθήκες οξείας βλάβης του ΚΝΣ, μόλυνσης και ασθένειας, ενεργοποιούνται για να πολλαπλασιαστούν (μικρογλοίωση) και πραγματοποιούν σημαντικές ανοσολογικές λειτουργίες συμπεριλαμβανομένων της παραγωγής προ-φλεγμονώδων κυτταροκινών, κυρίως TNF και ιντερλευκίνης-1β, παρουσίασης των αντιγόνων στα CD4 και CD8 T κύτταρα και φαγοκυττάρωσης κυτταρικών θραυσμάτων, η οποία με τη σειρά της

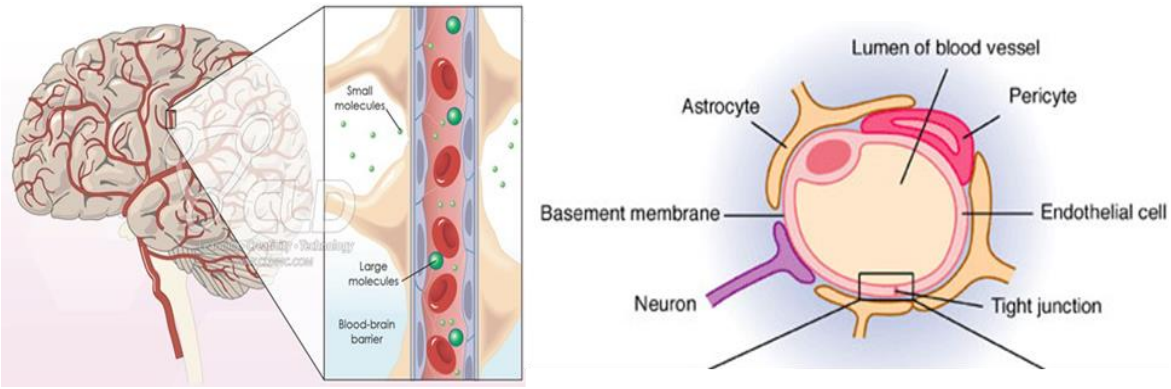
προωθεί επιδιορθωτικούς μηχανισμούς όπως η επαναμυελίνωση (Kettenmann et al., 2011). Έτσι, η μικρογλοία βρίσκεται στην πρώτη γραμμή άμυνας του ΚΝΣ. Ωστόσο, σε χρόνιες ασθένειες όπως η νόσος Alzheimer και η ΣΚΠ, η χρόνια ενεργοποιημένη μικρογλοία πιστεύεται ότι συνεισφέρει στην παθοφυσιολογία και κάτω από αυτές τις συνθήκες προτείνεται ως σημαντικός στόχος για θεραπευτικές παρεμβάσεις. Σε αυτόν τον τομέα, οι σημερινές μελέτες επικεντρώνονται στη μείωση των λειτουργιών που προάγουν την ασθένεια της προ-φλεγμονώδους μικρογλοίας και στην ενίσχυση των προ-επιδιορθωτικών ιδιοτήτων της ευεργετικής μικρογλοίας (Tang and Le, 2016).

Αστροκύτταρα: Τα αστροκύτταρα είναι τα πιο πολυάριθμα νευρογλοιακά κύτταρα και έχουν ποικίλους σημαντικούς ρόλους (Markiewicz and Lukomska, 2006). Τα αστροκύτταρα σχηματίζουν το δομικό σκελετό που βοηθάει στη μετανάστευση των νευρώνων τόσο κατά την διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης όσο και αφού ωριμάσουν, συμβάλλουν στη μεταφορά στοιχείων από τον εξωκυττάριο χώρο προς τα αιμοφόρα αγγεία (Sofroniew and Vinters, 2010) και στην ομοιόσταση K^+ και συμμετέχουν στην ηλεκτρική μετάδοση των σημάτων, μέσω της συμμετοχής τους στην τριμερή σύναψη μαζί με τον προ- και μετα-συναπτικό νευρώνα (Anderson and Swanson, 2000). Όταν οι αποφυάδες των αστροκυττάρων καταλήγουν στη βασική μεμβράνη μεταξύ του ΚΝΣ και της χοριοειδούς μήνιγγας, δημιουργούν ένα σημαντικό φραγμό, την αφοριστική γλοία. Ενώ, όταν καταλήγουν στη βασική μεμβράνη των τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων σχηματίζουν τα τελικά αγγειακά πόδια, τα οποία μαζί με το σχεδόν αδιαπέραστο ενδοθήλιο των αγγείων σχηματίζουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Εικ.1.2). Ενώ τα αστροκύτταρα είναι σημαντικά για την ανάπτυξη και λειτουργία του ΚΝΣ, ένας υπότυπος δραστικών αστροκυττάρων, (ονομαζόμενος ως «A1») μπορεί να ενεργοποιηθεί από χρόνια ενεργοποιημένη μικρογλοία κάτω από φλεγμονώδεις καταστάσεις για να γίνουν δραστικά νευροτοξικά κύτταρα (Liddelow et al., 2017). Τα προϊόντα της μικρογλοίας, ο TNF, η ιντερλευκίνη-1β και το συμπλήρωμα C1q είναι υπεύθυνα για αυτό το αποτέλεσμα. Τα A1 αστροκύτταρα χάνουν την ικανότητά τους να προωθούν την επιβίωση και την ανάπτυξη των νευρώνων, τη συναπτογένεση και τη φαγοκυττάρωση και επάγουν το θάνατο των νευρώνων και των ολιγοδενδροκυττάρων. Είναι άφθονα σε διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως στη νόσο του Alzheimer, του Huntington και του Parkinson, στην αμυοτροφική πλάγια σκλήρυνση και στη ΣΚΠ και μπορούν να συμβάλλουν στο θάνατο των ολιγοδενδροκυττάρων και των νευρώνων σε αυτές τις ασθένειες (Liddelow et al., 2017). Θεραπευτική στόχευση

της προ-φλεγμονώδους μικρογλοίας μπορεί επομένως να μειώσει και την επαγωγή των επιβλαβών A1 αστροκυττάρων στην ασθένεια.

1.2. Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός

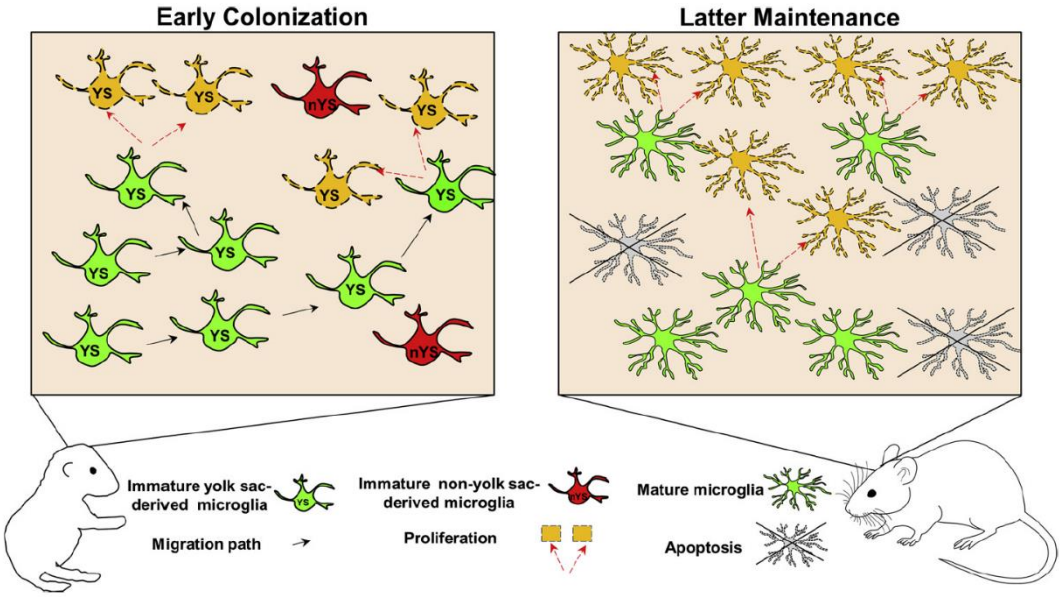
Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός, ΑΕΦ, (Blood brain barrier, BBB) είναι ένα λειτουργικό φράγμα το οποίο ρυθμίζει ενεργά τη διαπερατότητα ουσιών και κυττάρων μεταξύ του αίματος και του εγκεφάλου (Εικ.1.2). Είναι απαραίτητος για την παροχή σταθερού μεταβολικού και βιοχημικού περιβάλλοντος για τους νευρώνες, διατηρεί προστατευμένο το ΚΝΣ από ενδογενείς και εξωγενείς τοξικούς και λοιμώδεις παράγοντες, όπως είναι διάφοροι παθογόνοι μικροοργανισμοί, ρυθμίζει τη μεταφορά ουσιών μεταξύ των δύο υγρών και ρυθμίζει αυστηρά την είσοδο κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Ο ΑΕΦ επιτρέπει τη διέλευση του νερού, μερικών αερίων και λιπιδίων με παθητική διάχυση, όπως επίσης και την επιλεκτική μεταφορά μορίων όπως η γλυκόζη και τα αμινοξέα που είναι απαραίτητα για τη νευρική λειτουργία (Abbott and Friedman, 2012). Γενικά, σχηματίζει ένα διπλό φραγμό. Αυτός περιλαμβάνει το συνεχές ενδοθήλιο των αιμοφόρων τριχοειδών του ΚΝΣ, το οποίο είναι διαπερατό σε συγκεκριμένα μόρια και ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (πρώτος φραγμός-ενδοθηλιακός φραγμός). Ο δεύτερος φραγμός περιλαμβάνει τη βασική μεμβράνη και τα τελικά αγγειακά πόδια των αστροκυττάρων που περιβάλλουν τα τριχοειδή. Τα αστροκύτταρα με τις ποδικές αποφυάδες ελέγχουν τη διατήρηση του φραγμού (Engelhardt B., 2003). Στα μετα-τριχοειδή φλεβίδια υπάρχει ένας χώρος μεταξύ των δύο φραγμών, που ονομάζεται ο χώρος των Virchow-Robin. Εκεί πιστεύεται ότι είναι η θέση όπου τα εισερχόμενα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, ειδικά τα ενεργοποιημένα Τ κύτταρα, λαμβάνουν μηνύματα επανενεργοποίησης από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα όπως δενδριτικά κύτταρα ή μακροφάγα, τα οποία επιτρέπουν τη διήθησή τους στο ΚΣΝ κατά τη διάρκεια μόλυνσης ή αυτοανοσίας. Η ρήξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού είναι καθοριστικής σημασίας για την επαγωγή νευροεκφυλιστικών διαταραχών όπως είναι η ΣΚΠ (De Vries et al., 1997).



Εικ.1.2. Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός παρεμποδίζει τη διαπερατότητα ουσιών μεταξύ αίματος και εγκεφάλου. Δεξιά απεικονίζεται εγκάρσια τομή αιμοφόρου αγγείου του εγκεφάλου με τα δομικά του κύτταρα, ενδοθηλιακά, περικύτταρα και αστροκύτταρα (Vander et al., 2011).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Λειτουργίες μικρογλοιακών κυττάρων σε υγιείς και παθολογικές συνθήκες

Για μεγάλο χρονικό διάστημα κυριαρχούσε η υπόθεση ότι τα μικρογλοιακά κύτταρα προέρχονται από την εισροή μακροφάγων του Περιφερειακού Νευρικού Συστήματος (ΠΝΣ) στον εγκέφαλο κατά την ανάπτυξη και άρα έχουν κοινή προέλευση με τα μακροφάγα αλλά και με τα υπόλοιπα νευρογλοιακά κύτταρα (Rio-Hortega, 1939, Kitamura et al., 1984). Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι τα μικρογλοιακά κύτταρα παράγονται στον εμβρυϊκό λεκιθικό σάκο (yolk sac) κατά τα αρχικά στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης από πρόγονα μυελοειδή μακροφάγα (Alliot et al., 1999, Ginhoux et al., 2010). Μετά τη δημιουργία τους διασχίζουν τον υπό ανάπτυξη αιματοεγκεφαλικό φραγμό και εγκαθίστανται στον εγκέφαλο και στο νωτιαίο μυελό, όπου επεκτείνουν τον πληθυσμό τους μέσω κυτταρικών πολλαπλασιασμών που ξεκινούν από τα αρχικά στάδια της ανάπτυξης. Πρόκειται για έναν αυτό-ανανεούμενο και αυτό-συντηρούμενο κυτταρικό πληθυσμό καθώς ο αριθμός τους διατηρείται σταθερός στην ενήλικη ζωή (Ajami et al., 2011, Askew et al., 2017) μέσω διαδικασιών κυτταρικού θανάτου (απόπτωσης) και πολλαπλασιασμού που συμβαίνει σε μικρό ποσοστό κυττάρων και σε χαμηλή συχνότητα (~2-3%) (Εικ.2.1).



Εικ.2.1 Προέλευση και διατήρηση του πληθυσμού των μικρογλοιακών κυττάρων στον εγκέφαλο ποντικών. Τα πρόγονα μικρογλοιακά κύτταρα (αριστερή εικόνα) που προέρχονται από τον εμβρυϊκό λεκιθικό σάκο αποικούν σταδιακά τον εγκέφαλο (πράσινο) και πολλαπλασιάζονται διαρκώς (κίτρινο). Στον ενήλικο εγκέφαλο (δεξιά εικόνα), τα

μικρογλοιακά κύτταρα διατηρούν τον αριθμό του πληθυσμού τους σταθερό μέσω διαδικασιών κυτταρικών αποπτώσεων (γκρι) που ακολουθούνται από κυτταρικό πολλαπλασιασμό για την αναπλήρωση των χαμένων κυττάρων (κίτρινο). Αυτός ο κύκλος κυτταρικού θανάτου-πολλαπλασιασμού συμβαίνει σε σχετικά χαμηλή συχνότητα(~2-3%) (Eyo et Wu, 2019).

Σε φυσιολογικές συνθήκες στον υγιή εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό του ΚΝΣ, τα μικρογλοιακά κύτταρα κατανέμονται με τέτοιο τρόπο ώστε κάθε ένα από τα κύτταρα να καταλαμβάνει το δικό του μοναδικό χώρο. Οι διακλαδιζόμενες προεκβολές που εκφύονται από το κυτταρικό σώμα βρίσκονται σε διαρκή κίνηση που τους επιτρέπει να ελέγχουν το παρεγχυματικό τους περιβάλλον. Μέσω αυτής της διαδικασίας που ονομάζεται επιτήρηση, τα μικρογλοιακά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να εντοπίζουν εξωκυτταρικά σήματα και να αντιδρούν αναλόγως, συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση της ομοιόστασης του ιστού.

Παρακάτω παρατίθενται οι σημαντικότερες λειτουργίες των μικρογλοιακών κυττάρων στον αναπτυσσόμενο και ενήλικο υγιή εγκέφαλο καθώς και σε παθολογικές συνθήκες.

2.1 Τα μικρογλοιακά κύτταρα στον υγιή εγκέφαλο

2.1.1. Τα μικρογλοιακά κύτταρα στον αναπτυσσόμενο υγιή εγκέφαλο

Οι βασικότερες λειτουργίες των μικρογλοιακών κυττάρων στον αναπτυσσόμενο υγιή εγκέφαλο είναι α) η φαγοκυττάρωση των υπεράριθμων συνάψεων και των αποπτωτικών νευρώνων κατά την μεταγεννητική ανάπτυξη του νευρικού συστήματος και β) η αλληλεπίδρασή τους με τις συνάψεις των νευρώνων.

Κατά την αναπτυξιακή διαδικασία του νευρικού συστήματος και συγκεκριμένα για δύο εβδομάδες μετά τη γέννα, στο ΚΝΣ λαμβάνει χώρα μία έντονη περίοδος πλαστικών τροποποιήσεων των νευρικών κυκλωμάτων, με τους νευρώνες να σχηματίζουν ποικίλες συναπτικές συνδέσεις μεταξύ τους, οι οποίες διατηρούνται στη δομή του μετέπειτα ενήλικου εγκεφάλου. Η διαδικασία αυτή είναι μία έντονη ενεργο-εξαρτώμενη αναπτυξιακή διαδικασία, η οποία καλείται ‘συναπτικό κλάδεμα’, κατά την οποία πολλές από τις ‘ανώριμες’ συνάψεις περιορίζονται σε αριθμό ενώ ομάδες άλλων συνάψεων διατηρούνται και ενδυναμώνονται σε αριθμό και λειτουργία (Katz and

Shatz, 1996, Hua and Smith, 2004). Παρόλο που ο κυτταρικός και μοριακός μηχανισμός που ελέγχει αυτή τη διαδικασία δεν είναι γνωστός, πρόσφατες έρευνες υποστηρίζουν ότι τα μικρογλοιακά κύτταρα συμμετέχουν ενεργά σε αυτό.

Αρχικά, τα μικρογλοιακά κύτταρα εκκρίνουν ένα μεγάλο αριθμό προστατευτικών νευροτροφικών ουσιών όπως είναι ο νευροτροφικός παράγοντας εγκεφαλικής προέλευσης BDNF, ο αγγειακός αυξητικός παράγοντας των ενδοθηλίων VEGF, ο νευρικός αυξητικός παράγοντας IGF-1 και ο μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας TGF-β (Butovsky et al., 2014, Parkhurst et al., 2013, Shibata and Suzuki, 2017). Με αυτό τον τρόπο συμμετέχουν στη συναπτογένεση καθώς ενισχύουν τη σωστή ανάπτυξη και διατήρηση των νευρικών δικτύων αλλά επίσης συνεισφέρουν και στις διαδικασίες μνήμης και μάθησης (Molteni et al., 2017). Με ενεργοποίηση του συστήματος συμπληρώματος, η μικρογλοία βοηθάει επίσης στο συναπτικό κλάδεμα και στην απομάκρυνση πλεονάζοντων προ και μετα-συναπτικών στοιχείων κατά την ανάπτυξη (Masuda and Prinz, 2016, Sominsky et al., 2018, Um et al., 2017). Επιπλέον, η φαγοκυττάρωση των αποπτωτικών νευρώνων κατά την αναπτυξιακή διαδικασία ή των αποπτωτικών νευρικών υπολλειμάτων στον ενήλικο εγκέφαλο έχει επίσης δειχθεί να εξαρτάται από τη λειτουργία των μικρογλοιακών κυττάρων, με τα τελευταία να δρουν ως μακροφάγα του ΚΝΣ (Neumann et al., 2009).

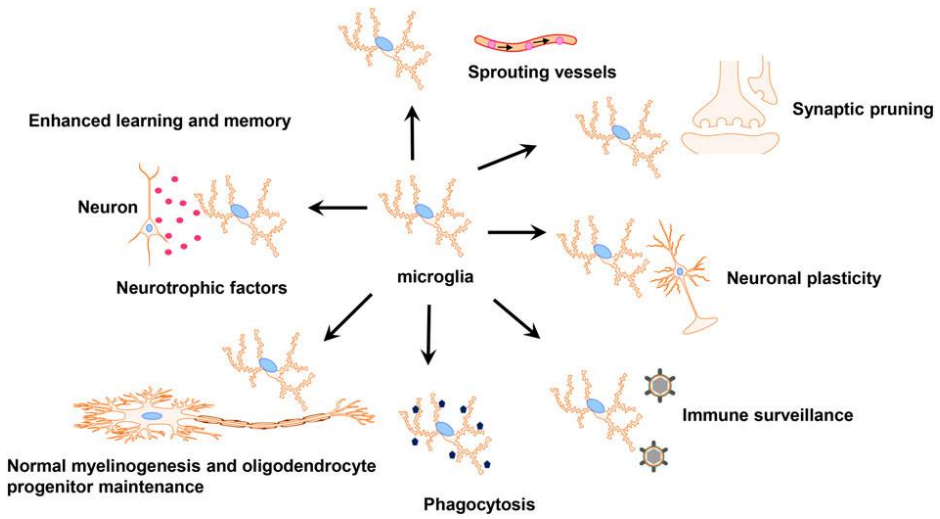
2.1.2. Τα μικρογλοιακά κύτταρα στον ενήλικο υγιή εγκέφαλο

Στον ενήλικο υγιή εγκέφαλο παρατηρείται δομική και λειτουργική αλληλεπίδραση των μικρογλοιακών προεκβολών με τις νευρικές συνάψεις με ποικίλες συνέπειες στη συναπτική λειτουργία και πλαστικότητα αλλά και στις διαγνωστικές λειτουργίες του εγκεφάλου.

Έρευνες βασιζόμενες σε *in vivo* πολυφωτονική μικροσκοπία σε ποντικούς με κυτταροειδικά φθορίζοντα μόρια έχουν δείξει ότι οι προεκβολές των μικρογλοιακών κυττάρων είναι ιδιαιτέρως κινητικές (Nimmerjahn et al., 2005; Davalos et al., 2005), δημιουργώντας συχνές επαφές με τις νευρικές συνάψεις στον οπτικό φλοιό του εγκεφάλου με ενεργο-εξαρτώμενο τρόπο (Wake et al., 2009; Tremblay et al., 2010). Η δράση των μικρογλοιακών κυττάρων έγκειται στο να ελαττώνουν την νευρική δραστηριότητα του οπτικού νεύρου στο zebrafish (Li et al., 2012) καθώς και των

νευρώνων του ιπποκάμπου στους ποντικούς (Ji et al., 2013). Συλλογικά θα λέγαμε ότι οι μικρογλοιακές προεκβολές δείχνουν φανερή προτίμηση στις ενεργές συνάψεις, γεγονός που προτείνει ότι τα μικρογλοιακά κύτταρα είναι ικανά να ελέγχουν την λειτουργική κατάσταση των συνάψεων και να συμβάλλουν στις πλαστικές τροποποιήσεις τους.

Τα μικρογλοιακά κύτταρα συμμετέχουν ενεργά και στη νευρογένεση στον ενήλικο εγκέφαλο, μέσω της ρύθμισης των λειτουργιών των συνάψεων σε νευρώνες που δημιουργούνται στα στάδια της ενήλικης ζωής (Reshef et al., 2017). Πρόσφατες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν για έναν υπο-πληθυσμό ενεργοποιημένων μικρογλοιακών κυττάρων που απαντώνται στην περιοχή της λευκής ουσίας κατά τα αρχικά μεταγεννητικά στάδια, έδειξαν ότι η φαρμακολογική μείωση του αριθμού των μικρογλοιακών κυττάρων in vivo, μέσω χορήγησης του αναστολέα BLZ945, που αναστέλλει τον παράγοντα διέγερσης αποικιών CSF-1R, είχε ως επακόλουθο και τη μείωση του αριθμού των πρόδρομων ολιγοδενδροκυττάρων (Hagemeyer et al., 2017). Αυτό αναδεικνύει την άμεση συνεισφορά των μικρογλοιακών κυττάρων στη διατήρηση του αριθμού των πρόδρομων ολιγοδενδροκυττάρων και κατά συνέπεια και στη μυελίνωση των νευραξόνων. Επιπλέον, τα μικρογλοιακά κύτταρα ρυθμίζουν ενεργά τη νευροαγγειακή ομοιόσταση καθώς λαμβάνουν μέρος στη διαδικασία σχηματισμού νέων αιμοφόρων αγγείων αλλά και στο σχηματισμό των διακλαδώσεων των αγγείων στον αμφιβληστροειδή χιτώνα και στην περιοχή του οπίσθιου εγκεφάλου (Arcuri et al., 2017, Brandenbury et al., 2016, Stankovic et al., 2016) (Εικ.2.2.).



Εικ.2.2. Οι πολλαπλοί ρόλοι των μικρογλοιακών κυττάρων στο ΚΝΣ. Τα μικρογλοιακά κύτταρα μπορούν να επιτελέσουν ποικίλες λειτουργίες για τη διατήρηση της ακεραιότητας του

ιστού υπό φυσιολογικές συνθήκες. Επιτηρούν ενεργά το περιβάλλον τους, συμμετέχουν στη μυελίνωση μέσω της συνεισφοράς τους στη διατήρηση του αριθμού των πρόδρομων ολιγοδενδροκυττάρων, ενισχύουν τη μνήμη και τη μάθηση, συμμετέχουν στην επιδιόρθωση των νευρώνων μέσω της φαγοκυττάρωσης, συνεισφέρουν στη δημιουργία νέων αγγείων και βοηθούν στην ανάπλαση των νευρικών κυκλωμάτων μέσω της συμμετοχής τους στο συναπτικό κλάδεμα και τη συναπτική πλαστικότητα (Han et al., 2018).

2.2 Τα μικρογλοιακά κύτταρα στον εγκέφαλο υπό παθολογικές καταστάσεις

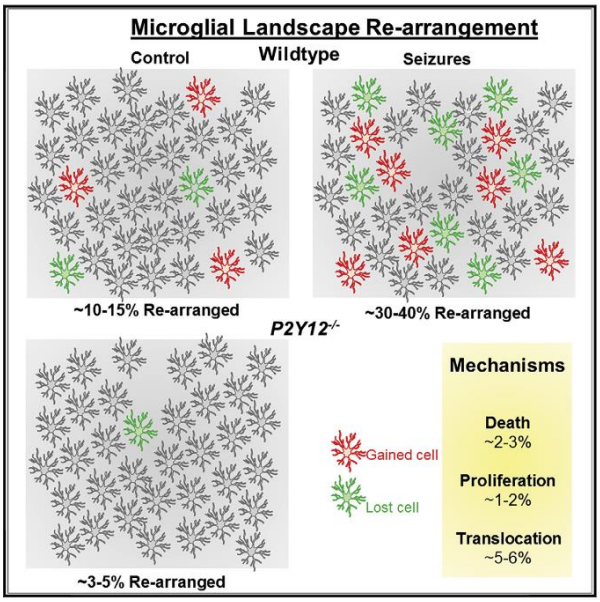
Πέρα από τον ευεργετικό τους ρόλο στην ανάπτυξη του ΚΝΣ, τα μικρογλοιακά κύτταρα σχετίζονται και με πολλές μορφές νευρολογικών διαταραχών, όπως είναι η ΣΚΠ (Bogie et al., 2014, Luo et al., 2017), η νόσος του Alzheimer (Hansen et al., 2018, Sarlus et al., 2017), το εγκεφαλικό (Gurumsawy and ElAli, 2017, Kronenberg et al., 2017), η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση-ALS (Geloso et al. 2017, Liu and Wang, 2017), η νόσος του Huntington (Yang et al., 2017), η επιληψία (Eyo et al., 2017, Zhao et al., 2018) και άλλες. Ποικίλοι διεγερτικοί παράγοντες αλλά και περιβαλλοντικές αλλαγές, μέσω διαφόρων μοριακών και κυτταρικών μηχανισμών, προκαλούν τη μετάβαση της μικρογλοίας σε μια ενεργοποιημένη κατάσταση κατά την οποία ενισχύεται η έκφραση συγκεκριμένων κυτταροπλασματικών υποδοχέων (Arcuri et al., 2017). Τα ενεργοποιημένα μικρογλοιακά κύτταρα παρουσιάζουν έναν αλλαγμένο φαινότυπο τόσο μορφολογικά, όσο και λειτουργικά. Συγκεκριμένα, τα ενεργοποιημένα κύτταρα μπορούν να παράγουν φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και χημειοκίνες οι οποίες είναι τοξικές για τους γειτονικούς νευρώνες αλλά και για τα γειτονικά γλοιακά κύτταρα (αστροκύτταρα, ολιγοδενδροκύτταρα). Τέτοιες κυτταροκίνες είναι οι ιντερλευκίνες 1,6 και 23 (IL-1, IL-6, IL-23), η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ), η χημειοκίνη υποδοχέας CCL2 και ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-α TNF-α (Natoli et al., 2017, Nicolas et al., 2017, Smith et al., 2012). Πέρα από τον επιβλαβή ρόλο που παρουσιάζει η ενεργοποιημένη μικρογλοία, επιτελεί και ανοσορυθμιστικό ρόλο μέσω της παραγωγής αντιφλεγμονώδων κυτταροκινών που βοηθούν στη ρύθμιση της επιδιόρθωσης του ιστού αλλά και στην αναγέννηση των νευρώνων. Τέτοιες κυτταροκίνες είναι οι ιντερλευκίνες 4, 10 και 13 (IL-4, IL-10, IL-13) αλλά και ο μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας β (TGF-β). (Cherry et al., 2014, Jin and Yamashita, 2016).

Μέσω ειδικών μηχανισμών (Li et al., 2017, Pang et al., 2010), η μικρογλοία έχει δειχτεί ότι παρεμποδίζει την επιδιόρθωση των νευρώνων στον εγκέφαλο αναστέλλοντας τη διαφοροποίηση των πρόγονων ολιγοδενδροκυττάρων σε ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα, που παράγουν μυελίνη. Επιπλέον, υπό παθολογικές συνθήκες, οι κατεστραμμένοι νευρώνες παράγουν τριφωσφορική αδενοσίνη(ATP), η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τα μικρογλοιακά κύτταρα μέσω των πουρινεργικών υποδοχέων (Liu and Wang, 2017). Παρόλο που η χημειοτακτική απόκριση της μικρογλοίας σε αυτό το ερέθισμα αποτελεί ομοιοστατικό μηχανισμό ελέγχου και περιορισμού της ιστικής βλάβης στον εγκέφαλο, χρόνια ενεργοποίησή της δύναται να προκαλέσει βλάβη στα μιτοχόνδρια μειώνοντας την κατανάλωση οξυγόνου, επηρεάζοντας με αυτό τον τρόπο τον ενεργειακό μεταβολισμό ολόκληρου του εγκεφάλου και επιδεινώνοντας την παθολογική κατάσταση (Ghosh et al., 2017). Τα ενεργοποιημένα μικρογλοιακά κύτταρα μπορούν επίσης να θεωρηθούν σαν μια σημαντική πηγή οξειδωτικού στρες, καθώς μέσω της έκκρισης δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου (ROS, RNS) προκαλούν οξειδωτική βλάβη στους νευρώνες και επιδεινώνουν τη φλεγμονή στη ΣΚΠ (Kettenmann et al., 2011, Davalos et al., 2012). Πρόσφατη έρευνα φανέρωσε, τέλος, τη σημασία της μικρογλοίας στον έλεγχο της λειτουργίας των αστροκυττάρων. Συγκεκριμένα, ενεργοποίησή της υπό συγκεκριμένες συνθήκες επάγει τη δημιουργία δραστικών νευροτοξικών αστροκυττάρων μέσω της παραγωγής κυτταροκινών όπως είναι η ιντερλευκίνη 1a (IL-1a), ο TNF και ο παράγοντας συμπληρώματος C1q. Αυτά τα δραστικά αστροκύτταρα, τα οποία χαρακτηρίζονται ως «A1», χάνουν τις ομοιοστατικές τους λειτουργίες και συνεπώς συνεισφέρουν στο θάνατο των νευρώνων και των διαφοροποιημένων ολιγοδενδροκυττάρων (Liddelow et al., 2017).

Συμπερασματικά, αν και τα μικρογλοιακά κύτταρα είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη και τη φυσιολογική λειτουργία του ΚΝΣ, οι επιβλαβείς λειτουργίες τους κάτω από παθολογικές συνθήκες μπορούν να συνεισφέρουν στη δριμύτητα των παθολογικών φαινομένων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. *Μηχανισμοί μικρογλοιακής κινητικότητας*

Σε αντίθεση με τα κλασικά ανοσοποιητικά κύτταρα του ΠΝΣ τα οποία μεταναστεύουν διαρκώς για να επιτηρούν τους ιστούς του, τα μικρογλοιακά κύτταρα είναι στατικά κύτταρα αλλά με δυναμικές προεκβολές, οι οποίες κινούνται συνεχώς ελέγχοντας το μικροπεριβάλλον τους στους ιστούς του ΚΝΣ (Nayak et al., 2015, Casano and Peri, 2015). Πρόσφατες έρευνες παρ'όλα αυτά έχουν οδηγήσει στην υπόθεση ότι ένα μικρό ποσοστό μικρογλοιακών κυττάρων (~10%) έχει επίσης τη δυνατότητα μετανάστευσης στον εγκέφαλο με αποτέλεσμα τη χωρική ανακατανομή του γενικότερου πληθυσμού της μικρογλοίας, διαδικασία που φαίνεται να λαμβάνει χώρα και κατά τη φυσιολογική λειτουργία του εγκεφάλου αλλά και με μεγαλύτερη συχνότητα όταν αυτή προκαλείται ως αλλαγή σε διάφορες νευρολογικές δραστηριότητες του ΚΝΣ (Eyo et al., 2018b, Hefendell et al., 2014) και που ελέγχεται από τον $P2Y_{12}$ υποδοχέα (Εικ.3.1.).

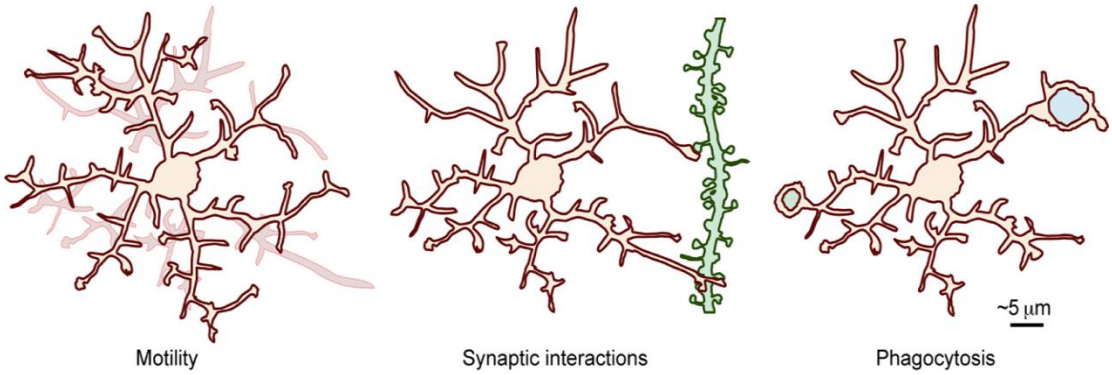


Εικ.3.1. Απεικόνιση χωρικής ανακατανομής του πληθυσμού της μικρογλοίας. Σε φυσιολογικές συνθήκες στον υγιή εγκέφαλο τα μικρογλοιακά κύτταρα φαίνεται να ανακατανέμονται σε διάφορες περιοχές του ΚΝΣ σε ποσοστό 10-15% (πάνω αριστερά), ενώ η συχνότητα αυτή πολλαπλασιάζεται σε περίπτωση νευρικής διαταραχής (πάνω δεξιά). Σε διαγονιδιακά ποντίκια με έλλειψη του υποδοχέα $P2Y_{12}$ (κάτω αριστερά) το ποσοστό αναδιαμόρφωσης της κατανομής μειώνεται αισθητά (Eyo et al., 2018b).

3.1 Μικρογλοιακή επιτήρηση στον υγιή εγκέφαλο

Σε υγιείς συνθήκες, τα διακλαδιζόμενα μικρογλοιακά κύτταρα επεκτείνουν και αποσύρουν τις προεκβολές τους επανειλημμένα ελέγχοντας το περιβάλλον τους για ερεθίσματα που μπορούν να απειλήσουν την ομοιόσταση του ΚΝΣ. Αυτή η κινητικότητα των μικρογλοιακών κυττάρων, κατά την οποία σαρώνουν διαρκώς το

κοντινό παρεγχυματικό τους περιβάλλον στο ΚΝΣ, χαρακτηρίζεται ως *μικρογλοιακή επιτήρηση* και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό των συνάψεων μεταξύ των νευρικών κυττάρων του ΚΝΣ κατά τα στάδια της ανάπτυξης (Miyamoto et al., 2016), αλλά και στη ρύθμιση της ορθής λειτουργικότητας των συνάψεων στον ενήλικο εγκέφαλο (Tremblay et al., 2010, Wake et al., 2010) (Εικ.3.2.).



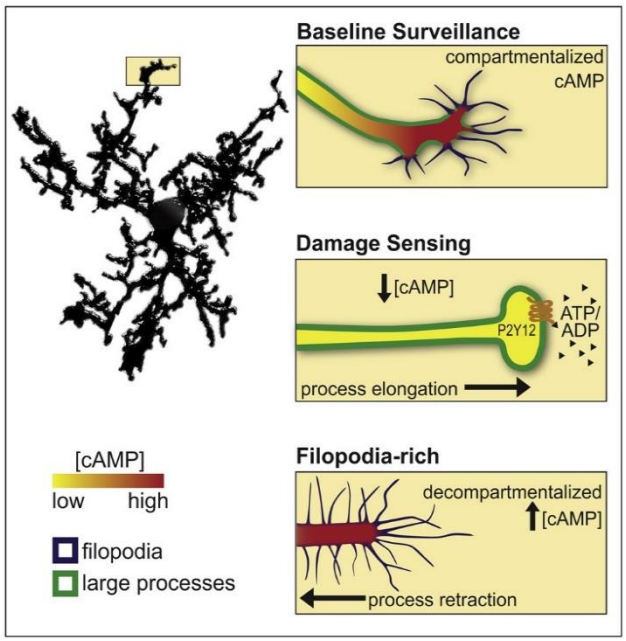
Εικόνα 3.2. Συνολική επισκόπηση της συμπεριφοράς των μικρογλοιακών κυττάρων στον υγιή εγκέφαλο. Οι ιδιαιτέρως κινητικές μικρογλοιακές προεκβολές αναδιαμορφώνουν συνεχώς το τοπικό περιβάλλον (αριστερά), και αλληλεπιδρούν δομικά και λειτουργικά με συναπτικά στοιχεία (μέση, δενδριτικές προεκβολές σε πράσινο) μέσω άμεσης επαφής και αλληλομετάδοσης μοριακών σημάτων, συμβάλλοντας στην αναδιάρθρωση των νευρικών κυκλωμάτων μέσω φαγοκυττάρωσης συναπτικών στοιχείων και νεογέννητων κυττάρων (δεξιά, κυτταρικές εγκολπώσεις σε μπλέ και πράσινο). Η συμπεριφορά και η μορφολογία των μικρογλοιακών κυττάρων ποικίλουν μεταξύ των διαφόρων περιοχών του ΚΝΣ και των σταδίων της ζωής (Tremblay et al., 2010).

Η αρχική υπόθεση για τη δυναμική κίνηση των προεκβολών των μικρογλοιακών κυττάρων ήταν πως αυτή βασίζεται σε ένα μηχανισμό που ρυθμίζεται από τη σταθερή και συνεχιζόμενη έκλυση προς το περιβάλλον τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), προερχόμενης πιθανότατα από τα γειτονικά αστροκύτταρα (Davalos et al., 2015, Wu et al., 2007).. Παρ'όλα αυτά, πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων ιόντων καλίου (K^+) έχουν σημαντικό ρόλο στην αναστολή της μικρογλοιακής κινητικότητας (Madry et al., 2018a). Συγκεκριμένα, το THIK-1 διαμεμβρανικό κανάλι ιόντων καλίου έχει αναγνωριστεί ως ρυθμιστής της μικρογλοιακής διακλάδωσης και επιτήρησης, αφού αναστέλλοντας τη λειτουργικότητά

του με φαρμακευτικό ή γενετικό τρόπο παρατηρείται σημαντική μείωση της διακλάδωσης και εν τέλει και της ικανότητας επιτήρησης των μικρογλοιακών κυττάρων, αφού λιγότερο διακλαδιζόμενο κύτταρο σημαίνει και μικρότερη δυνατότητα επιτήρησης στο παρεγχυματικό του περιβάλλον (Madry, Kyrargyri et al., 2018b).

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν επίσης ότι στις άκρες των κύριων προεκβολών των μικρογλοιακών κυττάρων εμφανίζονται μικρές ανεξάρτητες προεκβολές, μικρότερου μήκους και διαμέτρου, που είναι ταχύτερες σε σχέση με τις κύριες προεκβολές και οι οποίες φαίνεται να επιτηρούν το περιβάλλον τους σε πολύ μικρότερη κλίμακα, διαδικασία που περιγράφεται ως *μικρογλοιακή επιτήρηση σε νανοκλίμακα* (Bernier et al., 2019). Αυτές οι μικρές προεκβολές που χαρακτηρίζονται ως *φιλοπόδια* εμφανίζουν ένα διαφορετικό μηχανισμό λειτουργίας ο οποίος εξαρτάται άμεσα από τα επίπεδα συγκέντρωσης κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) στο εσωτερικό του κυττάρου (Εικ.3.3.). Τα φιλοπόδια βοηθούν στην επέκταση της περιοχής που έχουν τη δυνατότητα να επιτηρούν οι κύριες προεκβολές, ενώ λόγω της δικής τους ταχείας κίνησης αυξάνουν και την τελική ταχύτητα της ικανότητας επιτήρησης του κυττάρου. Αν και σε φυσιολογικές συνθήκες τα φιλοπόδια συναντώνται κυρίως στις άκρες των προεκβολών, αύξηση στην παρουσία cAMP έχει ως επακόλουθο την εμφάνισή τους σε όλο το μήκος των προεκβολών αλλά και κοντά ή και πάνω στο ίδιο το κυτταρικό σώμα του μικρογλοιακού κυττάρου.

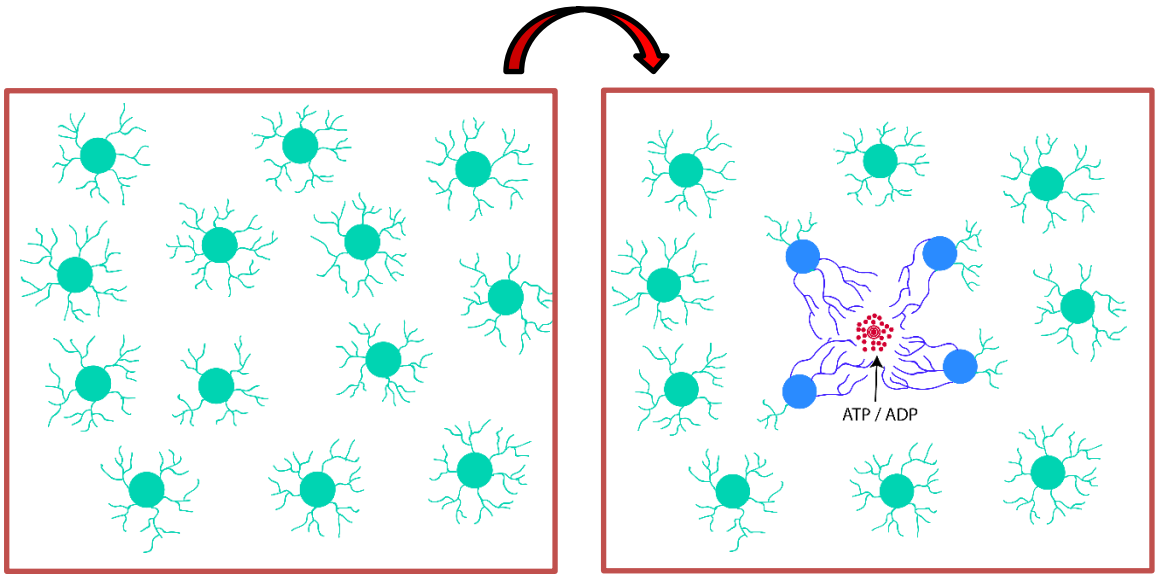
Με βάση και αυτές τις πρόσφατες μελέτες, μπορεί να καθοριστεί μια συγκεκριμένη ιεραρχία των διακλαδιζόμενων δομών των μικρογλοιακών κυττάρων που περιλαμβάνει διαδοχικά τις *κύριες μικρογλοιακές προεκβολές* που ξεκινούν από το κυτταρικό σώμα και έχουν το μεγαλύτερο μήκος, τις *δευτερεύουσες μικρογλοιακές προεκβολές* που είναι μικρότερου μήκους διακλαδώσεις των κύριων προεκβολών και τα μικρά *φιλοπόδια* τα οποία διαφοροποιούνται από τις κύριες και δευτερεύουσες προεκβολές από το μέγεθος, την ταχύτητα, την κατευθυντικότητα αλλά και το μηχανισμό κινητικότητάς τους.



Εικ.3.2. Η επίδραση του cAMP στα φιλοπόδια και τις κύριες μικρογλοιακές προεκβολές. Στα σημεία που υπάρχει υψηλότερη συγκέντρωση κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) παρατηρείται η εμφάνιση μικρών ανεξάρτητων προεκβολών που ονομάζονται φιλοπόδια. Μείωση του επιπέδου του cAMP (κίτρινο χρώμα) προκαλεί επιμήκυνση στις κύριες προεκβολές και μείωση στην παρουσία των φιλοποδίων ενώ αντιθέτως αύξηση του cAMP (κόκκινο χρώμα) προκαλεί ανάκληση των κύριων προεκβολών με ταυτόχρονη εμφάνιση πολλών φιλοποδίων στις άκρες των κύριων προεκβολών (Bernier et al., 2019).

3.2 Χημειοταξία

Σε περιπτώσεις ιστικού τραυματισμού στο ΚΝΣ, που συνοδεύεται από την έκλυση τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) στο παρέγχυμα, τα μικρογλοιακά κύτταρα υιοθετούν έναν προστατευτικό φαινότυπο κατά τον οποίο οι προεκβολές τους τείνουν να πολώνονται προς την κατεύθυνση του σημείου του τραυματισμού (Εικ.3.3.) (Davalos et al., 2005, Nimmerjahn et al., 2005). Αυτή η στοχευμένη κινητικότητα των μικρογλοιακών προεκβολών προς ένα συγκεκριμένο σημείο ενδιαφέροντος περιγράφεται ως *χημειοταξία* και είναι άμεσα εξαρτώμενη από τον $P2Y_{12}$ πουρινεργικό υποδοχέα (Haynes et al., 2006).



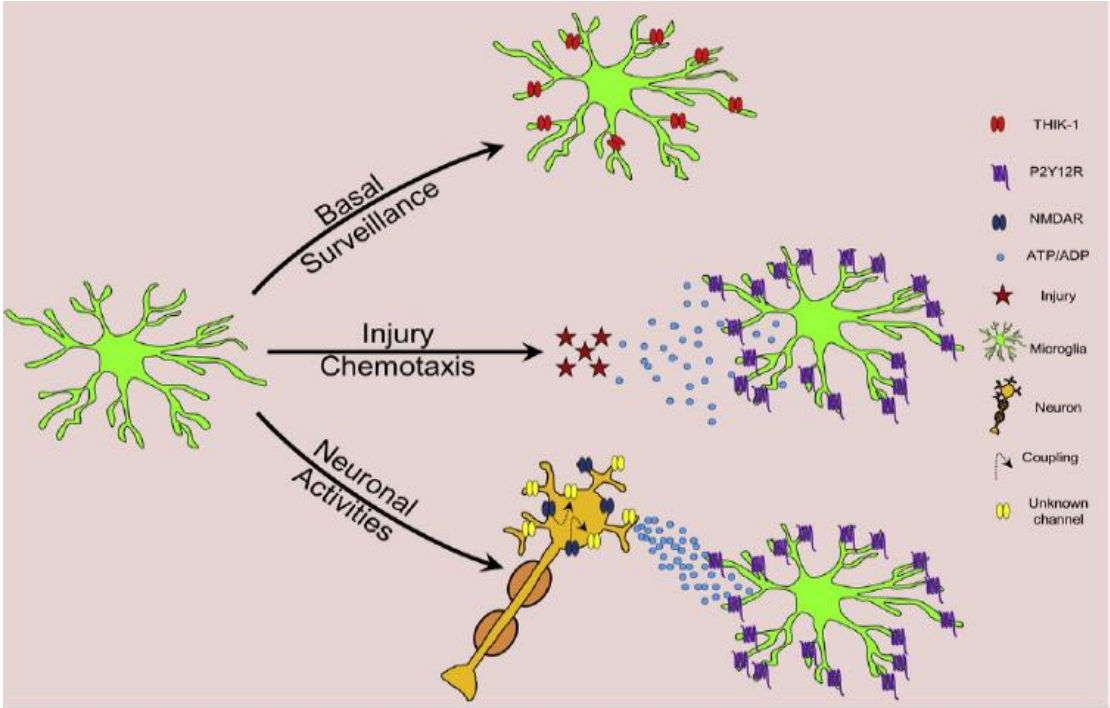
Εικ.3.3. Μικρογλοιακή χημειοταξία σε απόκριση τραυματισμού. (Αριστερά) Τα μικρογλοιακά κύτταρα βρίσκονται σε ηρεμία στον υγιή εγκέφαλο επιτελώντας την επιτήρηση του εγκεφάλου. Στην περίπτωση τραυματισμού (δεξιά), τα κοντινά μικρογλοιακά κύτταρα κατευθύνουν τις προεκβολές τους προς το σημείο τραυματισμού όπου εκλύεται τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), σε μια διαδικασία που αναφέρεται ως κατευθυνόμενη κινητικότητα ή χημειοταξία (directed motility or chemotaxis).

3.3 Μικρογλοιακή κινητικότητα σε αλληλεπίδραση με τους νευρώνες

Τα μικρογλοιακά κύτταρα παρουσιάζουν την τάση να πολώνονται κατευθύνοντας τις μικρογλοιακές τους προεκβολές προς τα νευρικά σώματα και τους δενδριτικούς άξονες των νευρώνων , ως αντίδραση σε υπερδραστήριους νευρώνες σε περιπτώσεις κρίσεων στο ΚΝΣ όπως για παράδειγμα σε επιληπτικά επεισόδια όπως αυτά έχουν παρατηρηθεί σε πειραματικούς ποντικούς αλλά και σε ανθρώπους (Li et al., 2012, Wyatt et al., 2017). Και αυτή η λειτουργικότητα των μικρογλοιακών κυττάρων δείχνει επίσης να ρυθμίζεται από τον $P2Y_{12}$ πουρινεργικό υποδοχέα (Eyo et al., 2017) αλλά και από τους NMDA υποδοχείς στους νευρώνες (Dissing-Olesen et al., 2014, Pfeiffer et al., 2016).

Συνολικά λοιπόν, η επιτήρηση του εγκεφάλου από τα μικρογλοιακά κύτταρα πραγματοποιείται μέσω 3 διαφορετικών μηχανισμών. Τα THIK-1 κανάλια που ρυθμίζουν τη θεμελιώδη κινητικότητα της μικρογλοίας, τους $P2Y_{12}$ υποδοχείς που ρυθμίζουν τη χημειοταξία των κυττάρων προς μια περιοχή τραυματισμού και τους NMDA υποδοχείς που μαζί με τους $P2Y_{12}$ υποδοχείς ρυθμίζουν την αλληλεπίδραση

των μικρογλοιακών κυττάρων με στοιχεία των νευρώνων, όπως είναι τα νευρωνικά σώματα και οι νευράξονες (Εικ.3.4.).



Εικ.3.4. Δυναμική μικρογλοιακών προεκβολών στον εγκέφαλο. Οι μικρογλοιακές προεκβολές είναι ιδιαίτερα ενεργές κατά τη θεμελιώδη επιτήρηση του εγκεφαλικού ιστού. Αυτή η επιτήρηση ελέγχεται από τα THIK-1 κανάλια ιόντων καλίου. Σε απόκριση σε ξαφνικό τραυματισμό, οι προεκβολές κινούνται προς την πηγή ATP μέσω των $P2Y_{12}$ υποδοχέων για να προστατεύσουν τον εγκέφαλο από τον τραυματισμό. Σε συνθήκες υπερδραστηριότητας των νευρώνων, οι NMDA υποδοχείς των νευρώνων ενεργοποιούνται μέσω της απελευθέρωσης ATP/ADP και προσελκύουν τα μικρογλοιακά κύτταρα μέσω του $P2Y_{12}$ υποδοχέα τους (Eyo and Wu, 2019).

3.4 Ανάλυση μικρογλοιακής κινητικότητας

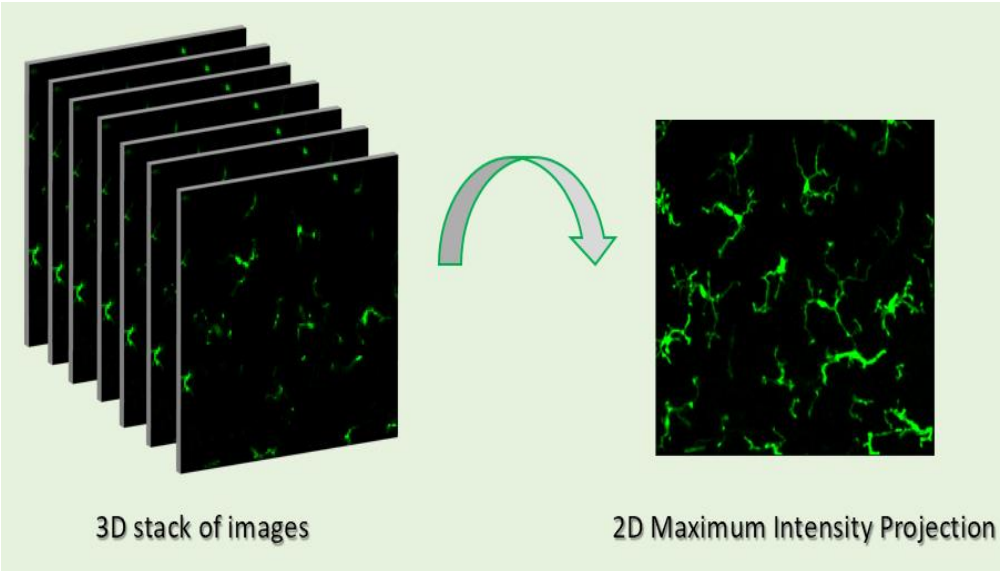
Η μελέτη των σηματοδοτικών μηχανισμών της μικρογλοιακής δυναμικής σε ποντικούς απαιτεί τη λήψη ανά τακτά χρονικά διαστήματα εικόνων που περιγράφουν την κινητικότητα και τη συμπεριφορά τους καθώς επίσης και τη χρήση φαρμάκων για την πραγματοποίηση φαρμακολογικών μελετών (Kyrargyri et al., 2019). Για αυτές τις περιπτώσεις, η διφωτονική μικροσκοπία μπορεί να εφαρμοστεί σε μικρογλοιακά

κύτταρα με φθορίζουσα σήμανση τόσο στον ακέραιο εγκέφαλο ζωντανών διαγονιδιακών ποντικών όσο και σε τομές του εγκεφάλου. Η δεύτερη περίπτωση είναι πολύ αποτελεσματική αν η έρευνα έχει σκοπό να εστιάσει στην εύρεση και μελέτη κυτταρικών μηχανισμών όπου είναι απαραίτητη η χρήση φαρμάκων σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Παρ'όλα αυτά, τα *in vivo* πειράματα σε άθικτο εγκέφαλο αναισθητοποιημένων ποντικών είναι η λιγότερο παρεμβατική μέθοδος για τη μελέτη της δυναμικής της μικρογλοίας και άρα απαραίτητη για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν με χρήση εγκεφαλικών τομών.

Η μικρογλοιακή κινητικότητα είναι ένας όρος που μπορεί να αναφέρεται στην κίνηση σε επίπεδο μεμονωμένων προεκβολών ή να περιγράφει και ολόκληρη τη μετακίνηση ενός κυττάρου, συμπεριλαμβανομένου και του κυτταρικού του σώματος. Η χρήση της διφωτονικής μικροσκοπίας είναι πλέον η καθιερωμένη τεχνική για τη μελέτη τη μικρογλοιακής κινητικότητας, παρ'όλα αυτά ο καθορισμός των κατάλληλων μεθόδων μέτρησης για την ποσοτικοποίηση της μικρογλοιακής κίνησης δεν είναι τετριμμένος και πολλές φορές η ανάλυση των δεδομένων απαιτεί τη χρήση εξειδικευμένων προγραμμάτων εντολών (scripts). Ανάλογα με το σημείο εστίασης της έρευνας, διαφορετικές επιστημονικές ομάδες χρησιμοποιούν διαφορετικούς τρόπους για την ανάκτηση και ποσοτικοποίηση των δεδομένων, γεγονός που πολύ συχνά αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα στην άμεση σύγκριση και ταυτοποίηση μεταξύ των αποτελεσμάτων διαφορετικών μελετών.

Γενικά, η κατηγοριοποίηση των τρόπων ανάλυσης της μικρογλοιακής κινητικότητας μπορεί να περιληφθεί σε 2 βασικές κατηγορίες:
α) *μετρήσεις σε επίπεδο κυττάρου*, όπως είναι η μέτρηση του όγκου του κυττάρου ή της επιφάνειας κάλυψής του, οι οποίες συνεισφέρουν στην ανάλυση αλλαγών στην κινητικότητα ολόκληρου του μικρογλοιακού κυττάρου (Madry et al.,2018b, Hines et al., 2013, Kluge et al., 2017, Gyoneva et al., 2013, Sipe et al., 2016).
β) *μετρήσεις σε επίπεδο υποπεριοχών του κυττάρου*, οι οποίες περιγράφουν κυρίως την κίνηση μεμονωμένων προεκβολών. Τέτοιες μετρήσεις μπορεί να είναι ο ρυθμός με τον οποίο τα κύτταρα επεκτείνουν και αποσύρουν τις προεκβολές τους ή τα φιλοπόδια τους, καθώς και η κίνηση ή και η εξ ολοκλήρου μετακίνηση του κυτταρικού σώματος σε διαφορετικό σημείο (Kurpius et al., 2007, Liang et al., 2009, Fontainhas et al., 2011, Avignone et al., 2015).

Για την απλοποίηση της ανάλυσης των εικόνων που ανακτώνται από το διφωτονικό μικροσκόπιο, οι περισσότερες μελέτες αναλύουν δεδομένα μετατρέποντας τις στοίβες των τρισδιάστατων (3D) εικόνων σε δισδιάστατες (2D) εικόνες. Αυτό επιτυγχάνεται προβάλλοντας την κάθε εικόνα από την τρισδιάστατη στοίβα σειριακά τη μία πάνω από την άλλη, δημιουργώντας έτσι μια δισδιάστατη εικόνα μέγιστης έντασης φωτεινότητας (Εικ.3.5.). Με αυτό τον τρόπο η πληροφορία της εικόνας μετατρέπεται από 3D σε 2D καθώς ο όγκος μετατρέπεται σε επιφάνεια και γίνεται πιο απλοποιημένη η διαδικασία ανάκτησης αποτελεσμάτων.



Εικ.3.5. Απεικόνιση μετατροπής της τρισδιάστατης στοίβας εικόνων (3D stacks) σε δισδιάστατη. Οι εικόνες της 3D στοίβας προβάλλονται η μια πάνω στην άλλη με το κριτήριο της μέγιστης έντασης φωτεινότητας και το τελικό αποτέλεσμα είναι μια εικόνα που περιέχει όλη την πληροφορία της τρισδιάστατης στοίβας εικόνων στο απλοποιημένο δισδιάστατο επίπεδο.

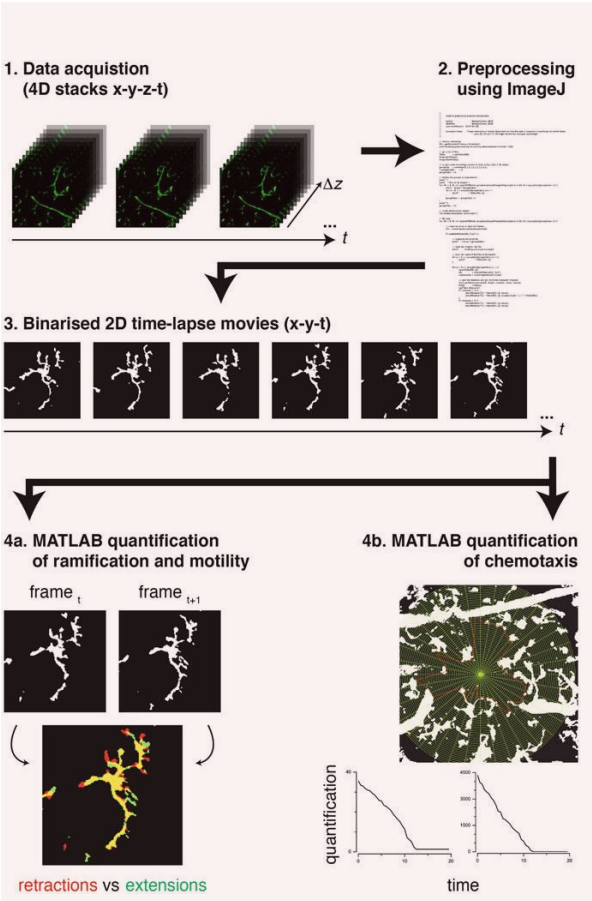
Αν και όπως αναφέρθηκε υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση στον τρόπο ανάλυσης και επεξεργασίας των δεδομένων, μια γενική διαδικασία ανάλυσης της μικρογλοιακής κινητικότητας αποτελείται από τα εξής συγκεκριμένα βήματα (Εικ.3.6., Kyrargyri et al., 2019) :

α) *Προεπεξεργασία εικόνας* : εφαρμογή των κατάλληλων φίλτρων για τη διόρθωση του ψηφιακού θορύβου ή της περίπτωσης “κουνημένων” εικόνων.

β) *Απομόνωση μεμονωμένων κυττάρων*: οι μετρήσεις της μικρογλοιακής επιτήρησης και της διακλάδωσης των κυττάρων γίνονται ευκολότερα σε κυτταρικό επίπεδο ανάλυσης (κυτταρικό σώμα και κυτταρικές προεκβολές).

γ) *Δυαδικοποίηση (binarization)*: η πληροφορία της εικόνας απλοποιείται με την απεικόνιση του σήματος από τις συνήθεις 256 σε μόνο 2 αποχρώσεις του γκρι (συνήθως άσπρο-μαύρο). Ανάλογα με την επιλογή του binarization, το σήμα της εικόνας θα απεικονίζεται είτε με την τιμή *0* είτε με την τιμή *255* στον RGB κώδικα. Αυτό απλοποιεί τη διαδικασία ανάλυσης και ελαχιστοποιεί την πιθανότητα απώλειας σήματος.

δ) *Ποσοτικοποίηση της διακλάδωσης και της επιτήρησης του εγκεφάλου από τα μικρογλοιακά κύτταρα*: ανάλογα με τις επιθυμητές μετρήσεις, το βήμα της ανάλυσης των δεδομένων περιλαμβάνει συνήθως εξειδικευμένα προγράμματα εντολών (scripts) σε διάφορες γλώσσες προγραμματισμού (MATLAB, ImageJ, Java, Python κτλ.) ή τη χρήση κατάλληλου λογισμικού για την ανάκτηση των τελικών αποτελεσμάτων.



Εικ.3.6. (Kyrargyri et al., 2019). Ροή εργασιών για την ανάκτηση και ανάλυση δεδομένων για την μικρογλοιακή επιτήρηση (εικόνα 1-4a) και την μικρογλοιακή χημειοταξία (εικόνα 4b). Τα αρχικά δεδομένα ανακτώνται σε μορφή 4D στοίβας (x-y-z-t) με τη χρήση διφωτονικού μικροσκοπίου. Η προεπεξεργασία στις αρχικές εικόνες πραγματοποιείται μέσω της χρήσης scripts γραμμένων συνήθως στο *ImageJ* ή σε άλλο κατάλληλο λογισμικό, μετατρέποντας τις 3D στοίβες σε δυαδικές δισδιάστατες εικόνες. Τα κύτταρα απομονώνονται είτε στο στάδιο της προεπεξεργασίας είτε μετά από αυτό και χρησιμοποιούνται μεμονωμένα για την ανάλυση της κινητικότητας και της διακλάδωσής τους στο χρόνο. Για την ανάλυση αυτή χρησιμοποιούνται scripts γραμμένα σε κατάλληλη γλώσσα προγραμματισμού (π.χ. *MATLAB*). Στην εικόνα 4b φαίνεται μια μέθοδος ανάλυσης της κατευθυνόμενης κινητικότητας (χημειοταξίας) των κυτταρικών προεκβολών προς κάποια χημειοελκτική ουσία (Gyoneva et al., 2014).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Σκλήρυνση Κατά Πλάκας

Η Σκλήρυνση Κατά Πλάκας (ΣΚΠ), γνωστή και ως πολλαπλή σκλήρυνση, είναι μια χρόνια αυτοάνοση ασθένεια του ΚΝΣ, της οποίας η αιτιολογία παραμένει έως σήμερα σε μεγάλο βαθμό άγνωστη. Ποικίλοι γενετικοί, περιβαλλοντικοί και επιδημιολογικοί παράγοντες έχουν αναφερθεί ότι συμμετέχουν στην εκδήλωση της νόσου, που σε γενικές γραμμές τείνει να επηρεάζει περισσότερο τις νέες γυναίκες παγκοσμίως. Η παθολογία της νόσου διακρίνεται σε 4 βασικά χαρακτηριστικά: την απομυελίνωση, τη νευροφλεγμονή, το νευροεκφυλισμό και την επαναμυελίνωση, ενώ η κλινική της εκδήλωση επίσης ποικίλει και διακρίνεται σε διάφορες μορφές, ανάλογα με τα συμπτώματα αλλά και τη χρονική εξέλιξη της νόσου (Εικ.4.1.):

1) ***Υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα*** *(Relapsing-Remitting MS, RRMS)*

Πρόκειται για την πιο συνηθισμένη μορφή της νόσου, αφού αντιστοιχεί περίπου στο 85% των ασθενών στους οποίους έχει διαγνωστεί η ΣΚΠ. Κύριο χαρακτηριστικό της είναι η εναλλαγή περιόδων με συνεχή εμφάνιση συμπτωμάτων (υποτροπές) και περιόδων όπου τα συμπτώματα βελτιώνονται ή και υποχωρούν τελείως.

2) ***Δευτεροπαθής-προϊούσα*** *(Secondary progressive, SPMS)*

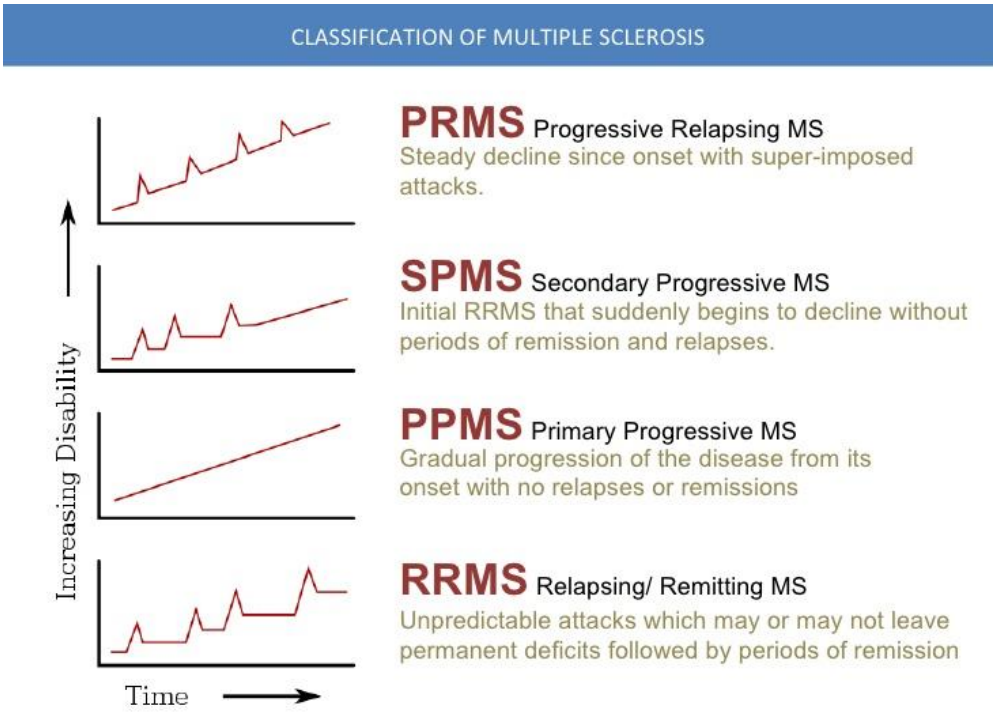
Η συγκεκριμένη μορφή παρουσιάζεται μετά από αρκετά χρόνια σε ασθενείς που είχαν αρχικά διαγνωσθεί με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα ΣΚΠ, όταν η βλάβη των αξόνων ξεπερνά την ικανότητα του ΚΝΣ να αναπληρώσει την απώλεια λειτουργικότητας και χαρακτηρίζεται από τη σταδιακή επιδείνωση της εξέλιξης της νόσου. Τα τελευταία χρόνια έχουν εμφανισθεί θεραπείες που καθυστερούν την εξέλιξη της ασθένειας από υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα σε δευτεροπαθή-προϊούσα.

3) ***Πρωτοπαθής-προϊούσα*** *(Primary progressive, PPMS)*

Εμφανίζεται περίπου στο 10% των ασθενών με ΣΚΠ και στη συγκεκριμένη μορφή τα συμπτώματα επιδεινώνονται σταδιακά από την αρχή της νόσου, χωρίς να υπάρχουν διαστήματα βελτίωσης ή υποτροπών. Η συγκεκριμένη μορφή της ασθένειας παρουσιάζει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στις θεραπείες που χρησιμοποιούνται συνήθως σε ασθενείς με ΣΚΠ.

4) ***Προϊούσα- υποτροπιάζουσα*** *(Progressive-relapsing, PRMS)*

Πρόκειται για την πιο σπάνια μορφή της ΣΚΠ και επηρεάζει ποσοστό λιγότερο από το 5% των ασθενών. Σε αυτήν οι ασθενείς παρουσιάζουν σταδιακή εξέλιξη των συμπτωμάτων από την έναρξη της ασθένειας όπου αργότερα συνοδεύεται με μία ή περισσότερες υποτροπές (Hauser et al., 2008).



Εικ.4.1. Οι 4 συνηθισμένες μορφές εμφάνισης της νόσου της ΣΚΠ (https://healthlifemedia.com/healthy/progressive-relapsing-multiple-sclerosis/)

Κοινό παθολογικό χαρακτηριστικό όλων των μορφών ΣΚΠ είναι οι εστίες απομυελίνωσης (ιστικές βλάβες) στον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό, που ανιχνεύονται με μαγνητική τομογραφία (MRI) και είναι ένας τρόπος αρχικής διάγνωσης της νόσου αλλά και παρακολούθησης της εξέλιξης της πορείας της. Οι εστίες απομυελίνωσης εντοπίζονται συνήθως κοντά σε αιμοφόρα αγγεία, σε σημεία που έχει καταστραφεί ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός. Στα σημεία αυτά επίσης επιτρέπεται η διέλευση ανοσοκυττάρων της περιφέρειας (Τ-λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, Β-λεμφοκύτταρα κτλ.) μέσα στο ΚΝΣ με επακόλουθη ανάπτυξη

νευροφλεγμονής. Ο συνδυασμός απομυελίνωσης και νευροφλεγμονής οδηγεί περαιτέρω σε αξονική καταστροφή και νευροεκφυλισμό με άμεση συνέπεια στη κλινική συμπτωματολογία των ασθενών (παραλυσία). Τέλος, αναλόγως της μορφής της ΣΚΠ, παρατηρείται το φαινόμενο αποκατάστασης του ιστού μέσω επαναμυελίνωσης, που μεσολαβείται από το συνδυασμό της φαγοκυτταρικής δράσης της μικρογλοίας και των μακροφάγων που απομακρύνουν τα υπολείμματα μυελίνης από τον ιστό, και της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού νέων ολιγοδενδροκυττάρων που παράγουν τη νέα μυελίνη.

Υπάρχουν δύο πιθανές υποθέσεις για την πρόκληση της ΣΚΠ. Μια συνηθισμένη ιδέα είναι ότι η ΣΚΠ είναι μια αυτοάνοση ασθένεια κατά την οποία τα Τ λεμφοκύτταρα εισχωρούν στο ΚΝΣ από το περιφερικό ανοσοποιητικό σύστημα στα αρχικά στάδια σχηματισμού των εστιών φλεγμονής. Αυτή η υπόθεση αναφέρεται ως «έξω-μέσα υπόθεση», καθώς η ασθένεια ξεκινά πρώτα από την περιφέρεια και μετά επεκτείνεται στο ΚΝΣ (Hohlfeld et al., 2004). Μέχρι τώρα δεν έχει αναγνωριστεί κάποια συγκεκριμένη αυτοάνοση αντίδραση. Ωστόσο, επιθετικές ανοσορυθμιστικές θεραπείες όχι μόνο μειώνουν τις υποτροπές της ασθένειας, αλλά μειώνουν τη διαρκή εξέλιξη της αναπηρίας, προτείνοντας έναν σημαντικό ρόλο για τη φλεγμονή τουλάχιστον στα αρχικά στάδια της ασθένειας (Coles A., 2013). Η εναλλακτική πιθανή υπόθεση είναι ότι η ΣΚΠ μπορεί να προκληθεί από μία αρχική μόλυνση ή διαταραχή των νευρώνων στον εγκέφαλο και η φλεγμονή μπορεί επομένως να προκληθεί σαν μια δευτερογενής απάντηση σε αυτό το αρχικό ερέθισμα η οποία ενισχύει την ασθένεια και την καταστροφή του ιστού. Η υπόθεση αυτή αναφέρεται ως «μέσα-έξω υπόθεση», που σημαίνει ότι η νόσος ξεκινά στο ΚΝΣ και στη συνέχεια ενεργοποιείται η περιφέρεια (Trapp and Nave, 2008). Παρόλο που μολυσματικοί παράγοντες και συγκεκριμένες μεταλλάξεις στο ΚΝΣ που θα μπορούσαν να ξεκινούσαν μία δευτερογενή ανοσοαπάντηση δεν έχουν ανιχνευτεί ακόμα στον εγκέφαλο ασθενών με ΣΚΠ, ατροφία του φλοιού μπορεί να προκληθεί και πριν από την ουσιαστική απομυελίνωση λευκής ουσίας και προμηνύει τη μελλοντική εξέλιξη της ασθένειας. Περαιτέρω μελέτη είναι απαραίτητη προκειμένου να διασαφηνιστεί η βασική αιτιολογία της νόσου.

4.1. Πειραματικά μοντέλα της ΣΚΠ

Τα πειραματικά μοντέλα της ΣΚΠ σε ζώα, όπως και όλα τα πειραματικά μοντέλα, μιμούνται την ανθρώπινη νόσο, ωστόσο δεν μπορούν να αποτυπώσουν πλήρως το σύνολο της παθολογίας της ανθρώπινης ασθένειας. Επομένως, κάθε μοντέλο αντιπροσωπεύει με μεγαλύτερη ακρίβεια κάποιο χαρακτηριστικό της νόσου. Η Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα αντιπροσωπεύει, κυρίως, το ανοσολογικό κομμάτι της ασθένειας με την άμεση συμμετοχή των Τ λεμφοκυττάρων της περιφέρειας, ενώ η επαγόμενη απομυελίνωση από κουπριζόνη προσομοιάζει την απομυελίνωση και την επαναμυελίνωση, και χαρακτηρίζεται από κλειστό αιματοεγκεφαλικό φραγμό όπως συμβαίνει στην προοδευτική μορφή της ΣΚΠ. Ανάλογα με την εκάστοτε μελέτη χρησιμοποιείται και το αντίστοιχο μοντέλο και φυσικά επαλήθευση τυχόν ευρημάτων σε ανθρώπινους ιστούς κρίνεται απαραίτητη.

4.1.1. Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα (ΠΑΕ)

Η ΠΑΕ (EAE: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis) επάγεται κατόπιν ανοσοποίησης των ζώων (ποντικοί, αρουραίοι και μη-ανθρώπινα πρωτεύοντα) με κατάλληλα αντιγόνα που προκαλούν φλεγμονή στο ΚΝΣ. Υπάρχουν αρκετά μοντέλα της ΠΑΕ που διαφέρουν: 1) ως προς την παθολογία (κλινική εικόνα, ιστολογική εικόνα και παθογενετικοί μηχανισμοί), που είναι συσχετισμένη με το γενετικό υπόβαθρο, την ηλικία και το φύλο των ζώων στα οποία επάγεται και 2) ως προς το αντιγόνο του ΚΝΣ που χρησιμοποιείται για την ανοσοποίηση και τον τρόπο με τον οποίο επάγεται η νόσος. Για την επαγωγή της ΠΑΕ ως αντιγόνα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ομογενοποιημένα συστατικά του ΚΝΣ ή ολόκληρες πρωτεΐνες του ΚΝΣ όπως οι MBP (Myelin Basic Protein), PLP (Myelin Proteolipid Protein) και MOG (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein) ή και πεπτίδια. Τα παραπάνω αντιγόνα αναμειγνύονται με διάφορους ανοσοενισχυτικούς παράγοντες, όπως τον ανοσοενισχυτικό παράγοντα του Freund (complete Freund's adjuvant, CFA) για το σχηματισμό γαλακτώματος ανοσοποίησης, που διευκολύνει την επαγωγή της ανοσολογικής απόκρισης (Bittner et al., 2014). Το μείγμα αυτό εμπλουτίζεται με συγκεκριμένη ποσότητα απενεργοποιημένου βακτηρίου Mycobacterium tuberculosis, το οποίο χρειάζεται για την ενεργοποίηση των μηχανισμών της μη ειδικής ανοσίας, καθώς και με τοξίνη του κοκκύτη (Pertussis toxin) η οποία συμβάλλει στη διάνοιξη του αιματοεγκεφαλικού

φραγμού αλλά και στην αύξηση της παραγωγής κυτταροκινών από τα Τ λεμφοκύτταρα (Kamradt et al., 1991). Στην ΠΑΕ τα ειδικά ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα έναντι της μυελίνης μεταναστεύουν από την περιφέρεια στο ΚΝΣ μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Αφού εισέλθουν στο ΚΝΣ, τα Τ λεμφοκύτταρα επαναενεργοποιούνται από τα τοπικά και διηθούμενα ενεργοποιημένα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC) τα οποία παρουσιάζουν πεπτίδια στο πλαίσιο των μορίων μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης ΙΙ, οδηγώντας σε επακόλουθη φλεγμονή και τελικά απομυελίνωση και αξονική καταστροφή.

Ανάλογα με το πρωτόκολλο ανοσοποίησης και το υπόβαθρο των ποντικών που χρησιμοποιούνται η ΠΑΕ μπορεί να έχει τις μορφές που περιγράφονται στον Πίνακα 1 (Miller et al., 2007). Στη συγκεκριμένη εργασία η επαγωγή ΠΑΕ πραγματοποιήθηκε σε *C57BL/6* και σε CX3CR1-GFP ποντικούς.

Η ΠΑΕ αποτελεί το πιο διαδεδομένο ζωικό πρότυπο που προσομοιάζει τη ΣΚΠ. Το μοντέλο αυτό παρουσιάζει πάρα πολλές ομοιότητες με τη ΣΚΠ, ωστόσο παρουσιάζει και αρκετές διαφορές (Πίνακας 2) (Lassmann et al., 2017).

	Αντιγόνα	**Ασθένεια**	**Βιβλιογραφία**
Αρουραίοι			
Lewis (με ενεργή ανοσοποίηση ή παθητική μεταφορά Τ κυττάρων)	Μυελίνη του ΚΝΣ πεπτίδιο MBP72-84	Οξεία μονοφασική κλινική ασθένεια με φλεγμονή, χωρίς απομυελίνωση	Panitch & Ciccone 1981, Ann. Neurol. 9(5):433-438
Brown Norway (BN) ή Dark Agouti (DA) (με ενεργή ανοσοποίηση)	Ανασυνδυασμένο MOG πεπτίδιο αρουραίου MOG1-125	Χρόνια υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα ασθένεια με φλεγμονή και απομυελίνωση στο νωτιαίο μυελό, οπτική νευρίτιδα	Storch et al., 1998, Brain Pathol. 8:681-694
Ποντικοί			

C57BL/6 (Με ενεργή ανοσοποίηση ή παθητική μεταφορά Τ κυττάρων)	Ανασυνδυασμένο MOG πεπτίδιο MOG35-55	Χρόνια προοδευτική πορεία της νόσου με απομυελίνωση και αξονική καταστροφή	Mendel et al., Eur J Immunol. 1995 Jul;25(7):1951-9.
SJL Με ενεργή ανοσοποίηση ή παθητική μεταφορά Τ κυττάρων)	CNS myelin PLP139-151 peptide PLP178-191 peptide	Υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα ασθένεια στο 50% των ζώων	Kennedy et al., J Neuroimmunol. 1987 Nov;16(3):345-64. Vanderlugt et al., J Immunol. 2000 Jan 15;164(2):670-8.
Biozzi ABH	Μυελίνη του ΚΝΣ Ανασυνδυασμένο MOG	Χρόνια προοδευτική πορεία της νόσου με απομυελίνωση, επαναμυελίνωση και αξονική και νευρική απώλεια	Hampton et al., J Neuroimmunol. 2008 Sep 15;201-202:200-11.
Διαγονιδιακοί ποντικοί	**Διαγονίδιο**		
C57BL/6	MOG35-55 υποδοχέας Τ κυττάρων	Αυθόρμητη οπτική νευρίτιδα (>30%) και ΠΑΕ (4%)	Bettelli et al., 2003, JEM 197:1073-1081
SJL	MOG92-106 υποδοχέας Τ κυττάρων	Αυθόρμητη απομυελίνωση στην παρεγκεφαλίδα και στο νωτιαίο μυελό, οπτική νευρίτιδα	Pollinger et al., 2009, J Exp Med. 2009 Jun 8;206(6):1303-16.
Μη-παχύσαρκοι διαβητικοί (Non-obese diabetic, NOD)	MOG35-55 υποδοχέας Τ κυττάρων	Αυθόρμητη υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα ασθένεια ακολουθούμενη από χρόνια ασθένεια	Anderson et al., J Immunol. 2012, 188(5):2084-92.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΕΓΚΕΦΑΛΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑ (ΠΑΕ)	ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΤΑ ΠΛΑΚΑΣ (ΣΚΠ)
Απαιτεί εξωτερική ανοσοποίηση με προσθήκη ανοσοενισχυτικών (τμήματα βακτηρίων)	Η αιτία της νόσου είναι άγνωστη
Τα αντιγόνα που επάγουν την ασθένεια είναι γνωστά	Δεν υπάρχει συγκεκριμένο αντιγόνο και η συμμετοχή των Τ κυττάρων στην εκδήλωση της ασθένειας δεν είναι γνωστή
Επάγεται από τα CD4+ Τ λεμφοκυττάρα. (IFN-γ) Th1, (IL-17) Th17 και μακροφάγα έχουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην έναρξη της νόσου	CD4+ και κυρίως CD8+ Τ λεμφοκύτταρα και μακροφάγα βρίσκονται στις αλλοιώσεις φλεγμονής
Τα Β λεμφοκύτταρα και η έκκριση αντισωμάτων παίζουν ρόλο μόνο σε κάποιες περιπτώσεις	Τα Β λεμφοκύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο
Χαρακτηρίζεται από κάποια οξειδωτική και μιτοχονδριακή βλάβη	Χαρακτηρίζεται από έντονη οξειδωτική βλάβη
Η συσσώρευση σιδήρου είναι ελάχιστη	Υπάρχει συσσώρευση σιδήρου στον εγκέφαλο με την ηλικία που επιδεινώνει τη φλεγμονή
Επαναμυελίνωση κυρίως στην ύφεση της νόσου	Επαναμυελίνωση μόνο στα αρχικά στάδια
Δεν αντιπροσωπεύει στην παθολογία μια προοδευτική κατάσταση	Χαρακτηρίζεται από μια προοδευτική κατάσταση

Πίνακας 2. **Διαφορές ΠΑΕ με ΣΚΠ**.

4.1.2. Απομυελίνωση επαγόμενη από την τοξίνη κουπριζόνη (cuprizone, CPZ)

Η κουπριζόνη αποτελεί συνθετικό ανταγωνιστή χαλκού. Χορήγηση του σε ποντικούς μέσω της τροφής προκαλεί ενδοκυττάρια ελάττωση των επιπέδων χαλκού με αποτέλεσμα τον περιορισμό της ενεργότητας των μιτοχονδριακών ενζύμων κυττοχρωμικής οξειδάσης και μονοαμινικής οξειδάσης. Το γεγονός αυτό επηρεάζει μεγάλο αριθμό κυττάρων, με τα ολιγοδενδροκύτταρα να θεωρούνται ότι υφίστανται τη μέγιστη βλάβη γιατί αποτελούν κύτταρα με υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις εξαιτίας της ανάγκης υποστήριξης μεγάλων ποσοτήτων μυελίνης. Η ανικανότητα εκπλήρωσης αυτών των μεταβολικών απαιτήσεων οδηγεί τα ολιγοδενδροκύτταρα σε απόπτωση με άμεση συνέπεια την απομυελίνωση των νευραξόνων, που εμφανίζει μεγάλη έκταση στο μεσολόβιο του εγκεφάλου. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία μεταξύ της δεύτερης και τρίτης εβδομάδας χορήγησης παρατηρείται ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμός της μικρογλοίας και των αστροκυττάρων, συνοδευόμενη από παράλληλη επιστράτευση και πολλαπλασιασμό των πρόδρομων ολιγοδενδροκυττάρων (Matsushima et al., 2001). Στη φάση αυτή λαμβάνει χώρα και η έναρξη της διαδικασίας της απομυελίνωσης η οποία φθάνει στο μέγιστο κατά την πέμπτη εβδομάδα χορήγησης της νευροτοξίνης.

Όταν απομακρυνθεί η κουπριζόνη από την τροφή ξεκινάει άμεσα ο επανασχηματισμός του μυελινικού ελύτρου μέσω της ωρίμανσης των πρόδρομων ολιγοδενδροκυττάρων.

Το πειραματικό πρωτόκολλο που έχει καθιερωθεί περιλαμβάνει χορήγηση 0.2% w/w κουπριζόνης μέσω κονιορτοποιημένης τροφής σε ενήλικους C57BL/6 αρσενικούς ποντικούς (8 - 12 εβδομάδων) για διάστημα έξι εβδομάδων. Μετά το τέλος των έξι εβδομάδων η κουπριζόνη αφαιρείται από την τροφή των ποντικών επιτρέποντας την έναρξη της διαδικασίας της επαναμυελίνωσης η οποία ολοκληρώνεται κατά 95% τέσσερις εβδομάδες μετά τη διακοπή της χορήγησης της κουπριζόνης (Matsushima et al., 2001).

4.2 Ο ρόλος των μικρογλοιακών κυττάρων στη ΣΚΠ

Στους ασθενείς με ΣΚΠ , όπως και στα ζωικά μοντέλα που προσομοιώνουν τη νόσο, στις περιοχές του ΚΝΣ όπου δημιουργούνται εστίες απομυελίνωσης απαντώνται Τ-λεμφοκύτταρα που έχουν εισέλθει από το ΠΝΣ αλλά και ενεργοποιημένη μικρογλοία. Τα μικρογλοιακά κύτταρα διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο για την προσέλκυση των περιφερειακών ανοσοποιητικών κυττάρων, λειτουργώντας ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα μέσω της έκφρασης των αντιγόνων 1 και 2 του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) ταυτόχρονα με την έκκριση και συν-διεγερτικών μορίων όπως είναι το μόριο προσκόλλησης 1 (ICAM-1) και οι πρωτεΐνες B7-1 και B7-2(Benveniste E., 1997). Τα Τ-λεμφοκύτταρα με τη σειρά τους προκαλούν διαφορετικές αντιδράσεις των μικρογλοιακών κυττάρων, οι οποίες εξαρτώνται από το είδος του Τ-λεμφοκυττάρου που επικοινωνεί με τη μικρογλοία κάθε φορά. Τα Th1 λεμφοκύτταρα προάγουν την έκκριση από τα μικρογλοιακά κύτταρα επιβλαβών φλεγμονώδων κυτταροκινών όπως η ιντερλευκίνη-1 και η ιντερλευκίνη-10 αλλά και του παράγοντα-α νέκρωσης όγκου (TNFα), ενώ τα Th2 λεμφοκύτταρα προάγουν την έκκριση ευεργετικών παραγόντων όπως είναι ο νευροτροφικός παράγοντας εγκεφαλικής προέλευσης (BDNF) αλλά και η νευροτροφίνη-3 (Ransohoff et al., 2009, Almolda et al., 2010).

Παρ’όλα αυτά η μικρογλοία έχει δειχθεί ότι έχει και ευεργετικό ρόλο στην εξέλιξη της νόσου. Κατά τη ΣΚΠ, η απομάκρυνση των υπολειμμάτων μυελίνης από την καταστροφή των νευραξόνων, ο πολλαπλασιασμός των ολιγοδενδροκυττάρων

αλλά και η διαφοροποίηση των πρόδρομων ολιγοδενδροκυττάρων σε ώριμα που παράγουν μυελίνη, είναι βασικές προϋποθέσεις για την επαναμυελίνωση (Domingues et al., 2016). Στην πλειοψηφία των ασθενών με ΣΚΠ, η διαδικασία της επαναμυελίνωσης αποτυγχάνει με επακόλουθο την αδυναμία βελτίωσης και συνεπώς και τη σταδιακή επιδείνωση της κλινικής τους εικόνας. Τα μικρογλοιακά κύτταρα αναλαμβάνουν πολύ σημαντικό ρόλο στην επαναμυελίνωση καθώς απομακρύνουν τα υπολείμματα μυελίνης μέσω της φαγοκυττάρωσης αλλά ταυτόχρονα παράγουν και κυτταροκίνες που συνεισφέρουν στον πολλαπλασιασμό των ολιγοδενδροκυττάρων, όπως είναι ο TNF-α παράγοντας, ο ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας 1 (IGF-1) και ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών(FGF-2).(Neumann et al., 2009, Kotter et al., 2005).

Συμπερασματικά, τα μικρογλοιακά κύτταρα παρουσιάζουν διττό ρόλο κάτω από τις παθολογικές συνθήκες της ΣΚΠ στο ΚΝΣ, καθώς πέρα από τον ξεκάθαρο ρόλο τους στην παθογένεση αλλά και στην εξέλιξη της ασθένειας, παρουσιάζουν και ευεργετική λειτουργικότητα. Κατά την εξέλιξη της νόσου, τα μικρογλοιακά κύτταρα προωθούν την επαναμυελίνωση μέσω της έκκρισης αντιφλεγμονώδων μορίων, της φαγοκυττάρωσης υπολειμμάτων μυελίνης και της επιδιόρθωσης των ιστών. Παράλληλα όμως, εκκρίνουν φλεγμονώδη μόρια που μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στο έλυτρο της μυελίνης ή και στα ολιγοδενδροκύτταρα, ενώ ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα συμμετέχουν στη διεπικοινωνία με άλλα ανοσοποιητικά κύτταρα του ΠΝΣ όπως τα Τ-λεμφοκύτταρα και συνεισφέρουν με αυτό τον τρόπο στις φλεγμονώδεις συνθήκες που δημιουργούνται κατά τη ΣΚΠ.

4.3 Ο ρόλος της παρεγκεφαλίδας στη Σκλήρυνση Κατά Πλάκας

Αν και η παρεγκεφαλίδα αντιπροσωπεύει μόνο το 10% του συνολικού μεγέθους του ανθρώπινου εγκεφάλου, περιλαμβάνει περίπου τον ίδιο αριθμό νευρικών κυττάρων με όλο τον υπόλοιπο εγκέφαλο (Voogd, 2003). Μέσω αυτών των πολυπληθών νευρώνων που σχηματίζουν ένα πολύπλοκο νευρικό δίκτυο, η παρεγκεφαλίδα είναι υπεύθυνη για σημαντικές νευρολογικές λειτουργίες όπως είναι οι λεπτές κινητικές δεξιότητες (Monaco et al., 2014, D’Angelo, 2014) αλλά σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, συμμετέχει και σε διάφορες ανώτερες νοητικές και συναισθηματικές λειτουργίες (Koziol et al., 2014). Λόγω της πολυπλοκότητας του

νευρικού δικτύου που την αποτελεί, η παρεγκεφαλίδα εμπλέκεται σε πολλές νευροεκφυλιστικές διαταραχές όπως είναι το Alzheimer και η ΣΚΠ (Castellazzi et al., 2014).

Οι ασθενείς με ΣΚΠ εμφανίζουν κλινικά συμπτώματα που προέρχονται από βλάβες στην παρεγκεφαλίδα και σχετίζονται τόσο με δυσλειτουργίες στην κίνηση (τρέμουλο, αταξία στη βάδιση κτλ.), όσο και με νοητικές δυσλειτουργίες, με τα συμπτώματα αυτά να δείχνουν να είναι τα κυρίαρχα αρχικά συμπτώματα της νόσου για την πλειοψηφία των ασθενών με ΣΚΠ (Weinshenker et al., 1996). Έχει επίσης δειχθεί ότι οι ασθενείς που εμφανίζουν κλινικά συμπτώματα που σχετίζονται με τις λειτουργίες της παρεγκεφαλίδας σε αρχικά στάδια της ΣΚΠ, τείνουν να αναπτύσσουν σοβαρές δυσλειτουργίες αρκετά νωρίς κατά την εξέλιξη της ασθένειας καθώς οι επιπλοκές κυρίως στις κινητικές ικανότητες επηρεάζει αισθητά και τη γενικότερη ποιότητα ζωής (Amato and Ponziani, 2000, Feinstein et al., 2015).

Κατά τη ΣΚΠ, η περιοχή της παρεγκεφαλίδας παρουσιάζεται ιδιαίτερα επιρρεπής στην ανάπτυξη εστιών απομυελίνωσης τόσο στη λευκή όσο και στη φαιά ουσία. Ειδικότερα στην προϊούσα ΣΚΠ, η απομυελίνωση εμφανίζεται πιο εκτεταμένη στην περιοχή της φαιάς ουσίας και το ποσοστό της δείχνει να σχετίζεται και με τη γενικότερη έκταση της παθολογίας της νόσου, ειδικότερα στη χρόνια φάση της (Kutzelnigg et al., 2007, Howell et al., 2015,Gilmore et al., 2009). Όπως και στις υπόλοιπες περιοχές του εγκεφάλου, οι εστίες απομυελίνωσης στην περιοχή της παρεγκεφαλίδας σχετίζονται με καταστροφή των νευρικών αξόνων και απώλεια νευρικών κυττάρων (Redondo et al., 2015). Συγκεκριμένα στη φαιά ουσία της παρεγκεφαλίδας, η απομυελίνωση συσχετίζεται με την ανάπτυξη μηνιγγικής φλεγμονής και η έκτασή της εξαρτάται από την πυκνότητα των μηνιγγικών μακροφάγων αλλά και την ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων στην περιοχή (Howell et al., 2015, Kutzelnigg et al., 2005).

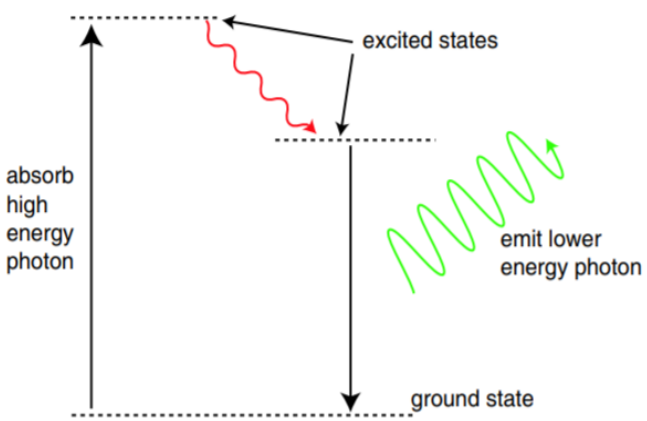
Όπως έχει δειχθεί από διάφορες μελέτες, οι εγκέφαλοι από ασθενείς με ΣΚΠ σε σύγκριση με υγιείς εγκεφάλους, παρουσιάζουν ατροφία στην περιοχή της παρεγκεφαλίδας η οποία είναι αυξημένη στις περιπτώσεις της προϊούσας μορφής της νόσου (Anderson et al., 2009, Davie et al., 1995, Ramasamy et al., 2009, Weier et al. 2012). Το φαινόμενο της ατροφίας παρατηρείται κυρίως στην περιοχή της φαιάς ουσίας (Anderson et al., 2009), γεγονός που υποδεικνύει ότι σε αντίθεση με τις περιοχές του

υπόλοιπου εγκεφάλου όπου τα κλινικά συμπτώματα δείχνουν να σχετίζονται κατά κύριο λόγο με βλάβες που εμφανίζονται στη λευκή ουσία, στην παρεγκεφαλίδα η ατροφία των περιοχών φαιάς ουσίας είναι σημαντικός δείκτης δυσλειτουργίας και προοδευτικής επιδείνωσης της κλινικής εικόνας των ασθενών. Συμπερασματικά, η κατανόηση των λειτουργικών συνεπειών της παθολογίας στην παρεγκεφαλίδα κατά τη ΣΚΠ μπορεί να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες στη μελέτη της νόσου και να αποτελέσει ένδειξη τόσο για την αρχική της διάγνωση όσο και για τη μελλοντική της εξέλιξη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μικροσκοπία φθορισμού

Φθορισμός

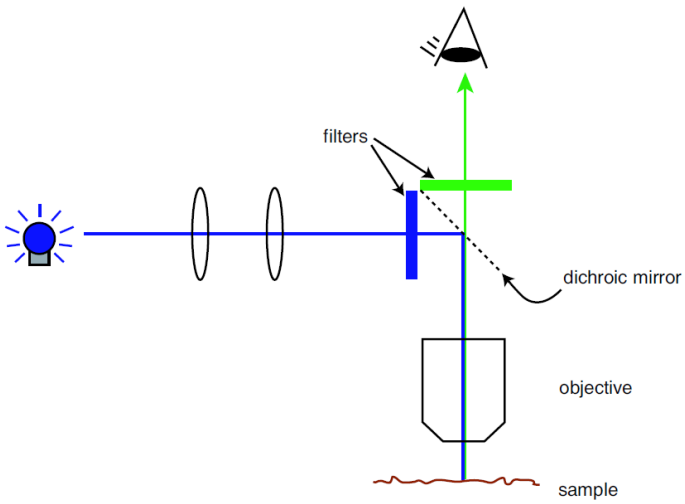
Η πρόσπτωση ακτινοβολίας σε ένα μόριο μπορεί να οδηγήσει στην απορρόφησή της και στην επακόλουθη εκπομπή της σε διαφορετικό μήκος κύματος, άρα και σε διαφορετικό χρώμα φωτός, σε μια διαδικασία γνωστή ως *φθορισμό*. Σε φυσιολογικές συνθήκες, τα μόρια βρίσκονται στη χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση (ground state). Η απορρόφηση φωτός αυξάνει την ενέργειά τους, με αποτέλεσμα τη μεταπήδηση ενός ηλεκτρονίου σε στάθμη υψηλότερης ενέργειας. Ένα ποσοστό αυτής της απορροφούμενης ενέργειας χάνεται από συγκρούσεις του μορίου με άλλα γειτονικά μόρια με αποτέλεσμα την πτώση του ηλεκτρονίου σε μια ενδιάμεση στάθμη χαμηλότερης ενέργειας. Αν οι συγκρούσεις του μορίου με τα γειτονικά μόρια δεν είναι αρκετές για να επαναφέρουν το μόριο στην αρχική του κατάσταση, τότε μπορεί να εξαναγκαστεί να αποβάλλει την πλεονάζουσα ενέργεια εκπέμποντας φως (φωτόνιο) μεγαλύτερου μήκους κύματος από την ακτινοβολία που το είχε αρχικά διεγείρει (Εικ. 5.1.). Το μήκος κύματος και το χρώμα της ακτινοβολίας που παράγεται εξαρτάται άμεσα από το υλικό. Η ενσωμάτωση φθορίζοντων μορίων πάνω σε συγκεκριμένα σημεία ενδιαφέροντος ενός βιολογικού δείγματος δίνει, με χρήση *μικροσκοπίας φθορισμού*, τη δυνατότητα παρατήρησης διαφορετικών περιοχών του δείγματος, ανάλογα με το μήκος κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης που χρησιμοποιείται.



Εικ.5.1. Μηχανισμός φθορισμού. Οι οριζόντιες γραμμές καθορίζουν κβαντικά ενεργειακά επίπεδα του μορίου. Το φθορίζον μόριο διεγείρεται σε μια διεγερμένη ενεργειακή κατάσταση μέσω απορρόφησης ενός φωτονίου υψηλής ενέργειας. Η απώλεια ενός μικρού μέρους της ενέργειας που απορροφά οδηγεί στην πτώση σε μια χαμηλότερη κατάσταση ενέργειας. Η υπόλοιπη ενέργεια απελευθερώνεται εκπέμποντας ακτινοβολία χαμηλότερης ενέργειας (Denis Semwogerere, 2007).

5.1 Μικροσκοπία φθορισμού

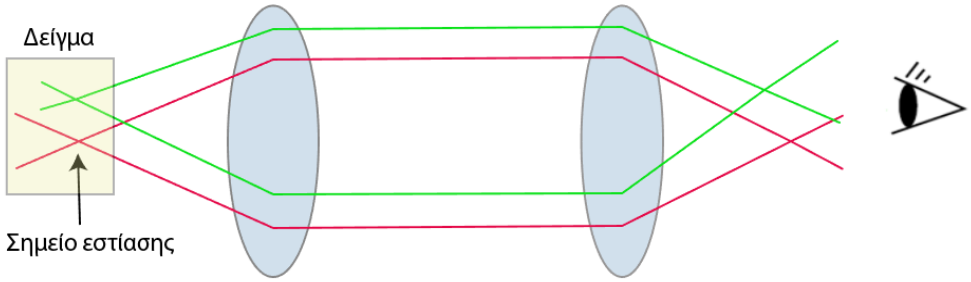
Στη μικροσκοπία φθορισμού, ένα βιολογικό δείγμα, το οποίο έχει επεξεργαστεί με συγκεκριμένη χρώση, διεγείρεται με την πρόσπτωση ακτινοβολίας κατάλληλου μήκους κύματος και μια εικόνα της περιοχής ενδιαφέροντος σχηματίζεται από τη φθορίζουσα ακτινοβολία που εκπέμπεται. Το μικροσκόπιο χρησιμοποιεί ένα διχρωϊκό καθρέπτη ο οποίος έχει την ιδιότητα να ανακλά την ακτινοβολία με μήκος κύματος μικρότερο από ένα καθορισμένο κατώφλι αλλά να επιτρέπει τη διέλευση ακτινοβολίας μεγαλύτερου μήκους κύματος. Με αυτό τον τρόπο, η ακτινοβολία διέγερσης ανακλάται από το διχρωϊκό καθρέφτη και περνάει στη συνέχεια από τον αντικειμενικό φακό για να διεγείρει το βιολογικό δείγμα, ενώ αντίστοιχα η ακτινοβολία (μεγαλύτερου μήκους κύματος) που εκπέμπεται από το φθορίζον δείγμα κατά την αποδιέγερσή του διέρχεται και από τον αντικειμενικό αλλά και από το διχρωϊκό καθρέπτη (Εικ.5.2.). Ο συγκεκριμένος τύπος μικροσκοπίας φθορισμού, στον οποίο δηλαδή ο αντικειμενικός φακός χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με έναν διχρωϊκό καθρέπτη σαν σημείο διέλευσης και για την ακτινοβολία διέλευσης αλλά και για την ακτινοβολία φθορισμού, ονομάζεται *επιφθορισμός*.



Εικ.5.2. Βασική λειτουργία μικροσκοπίου φθορισμού. Η ακτινοβολία (μπλε) από την πηγή ανακλάται από τον διχρωϊκό καθρέπτη και διεγείρει το δείγμα, ενώ η ακτινοβολία (πράσινη) που εκπέμπει το δείγμα μετά την αποδιέγερσή του διέρχεται από τον αντικειμενικό και τον διχρωϊκό καθρέπτη προς τον προσοφθάλμιο φακό (V Prasad et al., 2007).

Ένα σημαντικό πρόβλημα της μικροσκοπίας φθορισμού είναι ότι λόγω της ανάκλασης από το διχρωϊκό καθρέπτη αλλά και της σκέδασης της ακτινοβολίας που

διέρχεται από τον αντικειμενικό φακό, η διέγερση του δείγματος δεν περιορίζεται μόνο στο σημείο ενδιαφέροντος αλλά και σε γειτονικές περιοχές του δείγματος με αποτέλεσμα την εκπομπή ακτινοβολίας (*out-of-focus light*) και από διαφορετικά σημεία εκτός εστίασης του δείγματος. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το σήμα που λαμβάνεται στον προσοφθάλμιο φακό να χαρακτηρίζεται από θόρυβο που προκαλεί θόλωση στην τελική εικόνα (Εικ.5.3.). Σημαντική βελτίωση σε αυτό το πρόβλημα των συμβατικών μικροσκοπίων φθορισμού προσφέρει η χρήση των συνεστιακών μικροσκοπίων φθορισμού.

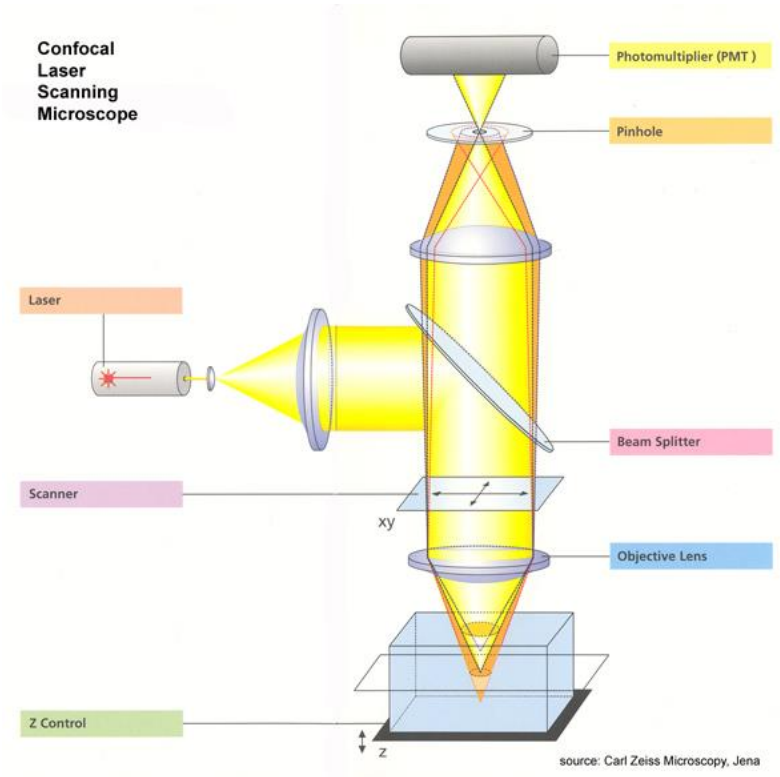


Εικ.5.3. Το πρόβλημα του out-of-focus light στη μικροσκοπία φθορισμού. Εκτός από την ακτινοβολία εκπομπής που προέρχεται από την περιοχή εστίασης (κόκκινο), στον προσοφθάλμιο φακό θα φτάσει και ακτινοβολία από γειτονικές περιοχές του δείγματος (πράσινο) προκαλώντας 'θόρυβο' στο τελικό οπτικό αποτέλεσμα.

5.1.1 Συνεστιακή μικροσκοπία

Το συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης laser (laser scanning confocal microscope - LSCM), είναι ένας τύπος μικροσκοπίου φθορισμού που έχει τη δυνατότητα να περιορίζει αισθητά το μεγάλο μειονέκτημα των συμβατικών μικροσκοπίων φθορισμού το οποίο είναι η εκτός εστίασης συλλογή φωτός κατά τη διαδικασία ανάκτησης εικόνας, οδηγώντας έτσι σε απεικονίσεις με αυξημένη οπτική ανάλυση και αντίθεση αλλά και μικρότερη παραμόρφωση. Η κύρια διαφοροποίηση στην κατασκευή του συνεστιακού μικροσκοπίου που οδηγεί σε αυτό το χαρακτηριστικό, είναι η τοποθέτηση ενός διαφράγματος φωτός (pinhole) μεταξύ του φωτοπολλαπλασιαστή (ή του συλλέκτη

φακού) και του αντικειμενικού φακού και μέσω του οποίου επιτρέπεται η διέλευση μόνο του φωτός που εκπέμπεται από το σημείο εστίασης πάνω στο δείγμα (Εικ.5.4.).



Εικ.5.4. Αναπαράσταση μηχανισμού λειτουργίας του συνεστιακού μικροσκοπίου φθορισμού. Η ακτινοβολία laser κατευθύνεται μέσω ενός διχρωϊκού καθρέπτη (ή beam splitter), σε ένα άλλο ζεύγος καθρεπτών όπου σαρώνεται στο δισδιάστατο επίπεδο (x-y scanner). Στη συνέχεια η ακτινοβολία διέρχεται από τον αντικειμενικό φακό και διεγείρει το φθορίζον δείγμα. Η φθορίζουσα ακτινοβολία που παράγεται από το δείγμα διέρχεται από τον ίδιο αντικειμενικό προς την αντίθετη κατεύθυνση από την ακτινοβολία διέγερσης ακολουθώντας το ίδιο μονοπάτι. Μετά την έξοδό της από τον διχρωϊκό καθρέπτη, προσπίπτει στο διάφραγμα (pinhole) από όπου επιτρέπεται η διέλευση μόνο των φωτονίων που προσπίπτουν υπό συγκεκριμένη γωνία και προέρχονται από το σημείο εστίασης, αγνοώντας τα φωτόνια που προέρχονται από τη διέγερση των μη εστιασμένων περιοχών. Τα φωτόνια που εξέρχονται από το διάφραγμα συλλέγονται από τον φωτοπολλαπλασιαστή όπου ενισχύεται το σήμα και κατευθύνεται στο σύστημα υπολογιστικής ανάλυσης για την τελική ανακατασκευή (V Prasad et al., 2007).

Με αυτό τον τρόπο απορρίπτεται ο εντοπισμός από το φωτοσυλλέκτη των μη εστιασμένων φωτονίων και περιορίζεται σε πολύ σημαντικό βαθμό η απεικόνιση σήματος που προέρχεται από φωτόνια που εκπέμπουν γειτονικές, από την εστιασμένη, περιοχές του δείγματος (background noise). Αυτό το χαρακτηριστικό του συνεστιακού μικροσκοπίου καθορίζει και τη βασική αρχή της λειτουργίας του, η οποία είναι η δυνατότητα παρατήρησης μόνο ενός εστιασμένου σημείου του δείγματος σε κάθε χρονική στιγμή, με επακόλουθο μειονέκτημα τη μείωση του εύρους της περιοχής που μπορεί να αναλυθεί ανά χρονική στιγμή από το μικροσκόπιο.

Πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό της λειτουργίας του συνεστιακού μικροσκοπίου είναι επίσης η δυνατότητα παραγωγής της τελικής εικόνας του δείγματος μέσω οπτικών τομών που ενεργούν σε πολλαπλά επίπεδα, επιτρέποντας έτσι την απεικόνιση με μεγάλη ευκρίνεια για δείγματα μεγάλου όγκου σε βάθος. Το τελικό αποτέλεσμα είναι μια σειρά από εικόνες του δείγματος στο δισδιάστατο επίπεδο και σε διαφορετικά επίπεδα (βάθη), οι οποίες αρχικά μέσω ψηφιοποίησης και εν συνεχεία μέσω της χρήσης κατάλληλου υπολογιστικού λογισμικού μπορούν να ενοποιηθούν και να οδηγήσουν στην τρισδιάστατη ανακατασκευή της εικόνας.

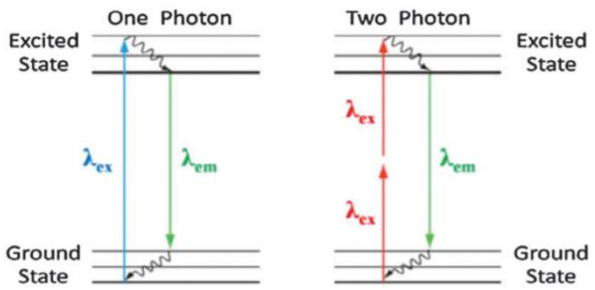
Αν και το συνεστιακό μικροσκόπιο βελτιώνει αισθητά την ευκρίνεια και την ανάλυση των εικόνων, διατηρεί το πρόβλημα της φωτοτοξικότητας και της φωτολεύκανσης λόγω της διέγερσης γειτονικών περιοχών του δείγματος μέσω της ακτινοβολίας διέγερσης. Ταυτόχρονα διατηρούνται οι περιορισμοί στο βάθος του δείγματος για το οποίο μπορούμε να ορίσουμε τις οπτικές τομές αφού η προσπίπτουσα ακτινοβολία είναι πολύ πιθανό να απορροφηθεί ή να σκεδαστεί κατά την πορεία της διαδρομής της στο εσωτερικό του ιστού και να οδηγήσει σε λανθασμένη πληροφορία από την ακτινοβολία που θα ληφθεί από το φωτοσυλλέκτη.

5.1.2 Διφωτονική μικροσκοπία

Το διφωτονικό μικροσκόπιο καλύπτει αυτά τα 2 μειονεκτήματα χρησιμοποιώντας 2 φωτόνια για τη διέγερση του δείγματος , με αποτέλεσμα να εστιάζει την ακτινοβολία μόνο στο σημείο ενδιαφέροντος ενώ ταυτόχρονα μειώνει τη μέση ένταση της ακτινοβολίας πρόσπτωσης. Η μεθοδολογία του διφωτονικού μικροσκοπίου βασίζεται στη χρήση 2 φωτονίων χαμηλότερης ενέργειας σε σχέση με το φωτόνιο υψηλής

ενέργειας που χρησιμοποιείται στη συνεστιακή μικροσκοπία (Εικ.5.5.), τα οποία από μόνα τους αδυνατούν να οδηγήσουν σε διέγερση του δείγματος και να προκαλέσουν φθορισμό. Όταν αυτά τα 2 φωτόνια φτάσουν στο φθορίζον δείγμα την ίδια περίπου χρονική στιγμή (< 10^{-16} sec), τότε μαζί ξεπερνούν το ενεργειακό κατώφλι διέγερσης του μορίου και οδηγούν σε φθορισμό.

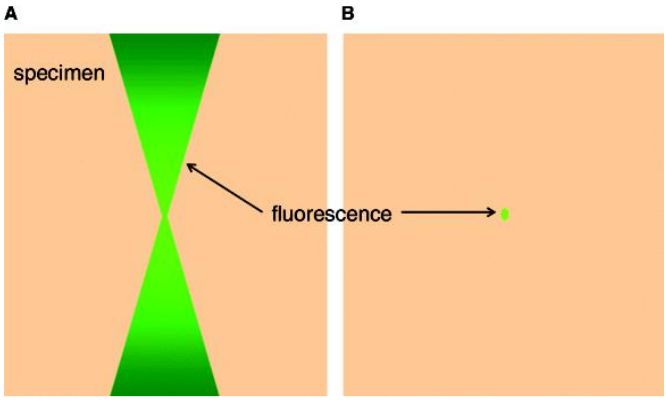
Στο διφωτονικό μικροσκόπιο η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας παλμικό laser που εκπέμπει πολύ βραχείς αλλά έντονους παλμούς ανά γρήγορα χρονικά διαστήματα. Σημαντικό πλεονέκτημα του διφωτονικού μικροσκοπίου είναι ότι το laser που χρησιμοποιείται για τη διέγερση του δείγματος έχει υποπολλαπλάσια ισχύ σε σύγκριση με το αντίστοιχο laser που χρησιμοποιείται κατά τη διέγερση στο συνεστιακό μικροσκόπιο, μειώνοντας έτσι τη φωτοτοξικότητα που προκαλείται λόγω της έντασης της ακτινοβολίας. Αυτό σημαίνει ότι η ακτινοβολία που προσπίπτει στο δείγμα θα έχει πολύ μικρότερη πιθανότητα πρόκλησης βλάβης η οποία μπορεί να επηρεάσει το τελικό αποτέλεσμα, ειδικά στην περίπτωση in vivo πειραμάτων όπου η ευαισθησία του δείγματος σε εξωγενείς παράγοντες είναι πολύ πιο έντονη.



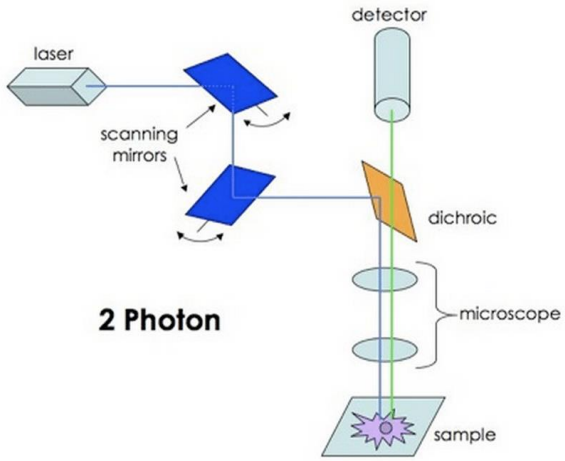
Εικ.5.5.Απλοποιημένα διαγράμματα Jablonski για φθορισμό λόγω διέγερσης με ένα φωτόνιο (αριστερά) και 2 φωτόνια (δεξιά). Το ένα φωτόνιο έχει περίπου διπλάσια ενέργεια από τα 2 μεμονωμένα φωτόνια (Helmchen et al., 2005).

Λόγω της πολύ μικρής πιθανότητας να φτάσουν στο ίδιο ακριβώς σημείο 2 φωτόνια την ίδια περίπου χρονική στιγμή, είναι σχεδόν απίθανο όταν συμβεί η διέγερση σε ένα σημείο εστίασης να συμβεί ταυτόχρονα και σε γειτονικό σημείο (Εικ.5.6.). Έτσι διορθώνεται το πρόβλημα της μη εστιασμένης διέγερσης που συναντάται στο συνεστιακό μικροσκόπιο, με αποτέλεσμα στο διφωτονικό μικροσκόπιο να έχουμε το ίδιο αποτέλεσμα χωρίς την ανάγκη για χρήση διαφράγματος (pinhole) (Εικ.5.7.). Αυτό επιτρέπει τη συλλογή πολύ μεγαλύτερης ποσότητας ακτινοβολίας από τους φωτοσυλλέκτες αφού δεν υπάρχει η ανάγκη να φιλτραριστεί η ακτινοβολία μέσω

του διαφράγματος για να αποφευχθεί ο πιθανός θόρυβος από σημεία εκτός εστίασης. Έτσι, με δεδομένο ότι όλο το σήμα που λαμβάνεται από τους φωτοσυλλέκτες στο διφωτονικό μικροσκόπιο προέρχεται από το σημείο εστίασης, η τελική ανακατασκευή της εικόνας προέρχεται από περισσότερη πληροφορία και συνεπώς προσφέρει ένα τελικό αποτέλεσμα με μεγαλύτερη αντίθεση και ευκρίνεια. Η πολύ μικρότερη ισχύς που χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την ικανότητα του διφωτονικού μικροσκοπίου να προκαλεί φθορισμό σε μεγαλύτερα βάθη χωρίς τον επακόλουθο θόρυβο λόγω γειτονικών διεγέρσεων, κάνει αυτή τη μεθοδολογία κατάλληλη και για τη μελέτη βιολογικών δειγμάτων σε *in vivo* πειράματα.



Εικ.5.6. Α) Η διέγερση με ένα φωτόνιο προκαλεί φθορισμό στο σημείο εστίασης αλλά και σε περιοχές εκτός εστίασης πάνω και κάτω από αυτό. **Β)** Η διέγερση με 2 φωτόνια περιορίζει το φθορισμό στο σημείο εστίασης, αφού λόγω της πολύ μικρής πιθανότητας να φτάσουν 2 φωτόνια στο ίδιο σημείο την ίδια περίπου χρονική στιγμή, αποφεύγεται η διέγερση γειτονικών περιοχών από το σημείο εστίασης του παλμού laser (Diaspro et al., 2002).



Εικ.5.7. Διάταξη λειτουργίας διφωτονικού μικροσκοπίου φθορισμού. Η διαφορά της διάταξης σε σχέση με το συνεστιακό μικροσκόπιο βρίσκεται μόνο στην απουσία διαφράγματος μεταξύ ανιχνευτή και διχρωϊκού καθρέπτη. Όλη η πληροφορία που φτάνει μέσω της ακτινοβολίας εκπομπής από το δείγμα στον ανιχνευτή(πράσινο χρώμα) προέρχεται από το σημείο εστίασης του δείγματος (Simsek, 2015).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας βιοπληροφορικής μεθοδολογίας για την αυτοματοποιημένη ανάλυση της μορφολογίας και της κινητικότητας των μικρογλοιακών κυττάρων κατά την εξέλιξη της Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας (ΠΑΕ) και σε διάφορες περιοχές του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) πειραματικών ποντικών.

Το μοντέλο της ΠΑΕ προσομοιάζει το αυτοάνοσο κομμάτι της ανθρώπινης νευροεκφυλιστικής ασθένειας της Σκλήρυνσης Κατά Πλάκας (ΣΚΠ), με την μικρογλοία, τα τοπικά ανοσιακά κύτταρα του ΚΝΣ, να επιτελεί διττό ρόλο, τόσο νευροπροστατευτικό όσο και προ-φλεγμονώδη. Τα μικρογλοιακά κύτταρα είναι δυναμικά κύτταρα τα οποία εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία ως προς τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά ανάλογα με την περιοχή του ΚΝΣ την οποία καταλαμβάνουν. Αν και πολλές έρευνες έχουν ασχοληθεί με το ρόλο της μικρογλοίας στη ΣΚΠ και συγκεκριμένα στο μοντέλο της ΠΑΕ, δεν έχει υλοποιηθεί μέχρι στιγμής μια αναλυτική μορφολογική εξέταση που να πραγματοποιείται για όλα τα χρονικά στάδια του μοντέλου και σε διάφορες περιοχές του ΚΝΣ ταυτόχρονα, κάτι που αποτελεί αντικείμενο ενδιαφέροντος της παρούσας μελέτης.

Χρησιμοποιώντας λοιπόν διαγονιδιακούς ποντικούς, συνεστιακή και διφωτονική μικροσκοπία αλλά και τα προγράμματα ImageJ/Fiji, Matlab, Java και Imaris η εργασία αυτή είχε σκοπό:

1. την ανάπτυξη προγραμμάτων εντολών (scripts) για την προ-επεξεργασία εικόνων μικρογλοίας από συνεστιακό και διφωτονικό μικροσκόπιο,

2. την ανάπτυξη μιας αυτοματοποιημένης ανάλυσης εικόνων μικρογλοίας μεγάλου όγκου με σκοπό τη μορφολογική συγκριση της μικρογλοίας στα διάφορα στάδια της ΠΑΕ και σε διάφορες περιοχές της φαιάς ουσίας του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού που επηρεάζονται από τη νόσο, και

3. την ανάπτυξη βιοπληροφορικών προγραμμάτων ανάλυσης της μικρογλοιακής επιτήρησης και της κινητικότητας των προεκβολών της μικρογλοίας κατά την ΠΑΕ, στο φλοιό του εγκεφάλου.

Τέλος, ένας επιπλέον σκοπός της εργασίας αυτής είναι να θέσει τη βάση για μια αναλυτική και αυτοματοποιημένη μέθοδο ανάλυσης της μικρογλοίας που να μπορεί να εφαρμοστεί και σε άλλες μελέτες που απαιτούν την επεξεργασία δεδομένων εικόνων μικροσκοπίας μεγάλου όγκου.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Πειραματική διαδικασία

Πειραματόζωα

Για τα *in vivo* πειράματα μελέτης της κινητικότητας της μικρογλοίας με τη χρήση διφωτονικού μικροσκοπίου χρησιμοποιήθηκαν γενετικά τροποποιημένοι *CX3CR1-GFP* ποντικοί, ηλικίας 1.5-3 μηνών. Σε αυτούς τους ποντικούς το δεύτερο εξόνιο του *CX3CR1* γονιδίου έχει αντικατασταθεί από το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη eGFP (enhanced- green fluorescent protein), η οποία εκπέμπει έντονο πράσινο φθορισμό όταν εκτεθεί σε ακτινοβολία στο φάσμα του υπεριώδους (Jung et al., 2000, Hirasawa et al., 2005). Στο ΚΝΣ το γονίδιο *cx3cr1* εκφράζεται μόνο στα μικρογλοιακά κύτταρα καθώς και στα περιφερειακά μακροφάγα αφού διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και εισέλθουν στο ΚΝΣ. Έτσι, η χρήση των *CX3CR1-GFP* ποντικών εξασφαλίζει την εξειδίκευση του σήματος που θα ληφθεί από την πειραματική διαδικασία μόνο για τα μικρογλοιακά κύτταρα.

Για τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την ανάλυση της μορφολογίας των μικρογλοιακών κυττάρων με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου, χρησιμοποιήθηκαν C57BL/6 ποντικοί θηλυκού γένους και ηλικίας 2-3 μηνών.

Όλοι οι πειραματικοί ποντικοί παρήχθησαν και ανατράφηκαν σε ειδικές συνθήκες απαλλαγμένες από παθογόνους παράγοντες (SPF–specific pathogen free) στη διαγονιδιακή μονάδα ζωικών προτύπων του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ. Οι πειραματικές διαδικασίες που πραγματοποιήθηκαν είναι εγκεκριμένες από τις εθνικές αρχές και ανταποκρίνονται στις κατευθυντήριες γραμμές της αναφοράς των *in vivo* πειραμάτων (Reporting of In Vivo Experiments - ARRIVE) και στις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τα πειράματα σε ζώα (2010/63/EU).

Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα (ΠΑΕ)

Επαγωγή της ΠΑΕ

Η ΠΑΕ χρησιμοποιείται ως ένα πρότυπο μοντέλο το οποίο προσομοιάζει πειραματικά το ανοσολογικό κομμάτι της Σκλήρυνσης Κατά Πλάκας (ΣΚΠ). Η ΠΑΕ επάγεται έπειτα από ανοσοποίηση των πειραματόζωων με δομικές πρωτεΐνες της μυελίνης, όπως η MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein), γαλακτωματοποιημένη σε πλήρες ανοσοενισχυτικό Freund (CFA-complete Freund's adjuvant). Συγκεκριμένα, σε θηλυκούς ποντικούς, ηλικίας 2-3 μηνών, πραγματοποιήθηκε επαγωγή ΠΑΕ με υποδόρια χορήγηση γαλακτώματος που περιείχε 37 μg MOG_{35-55} σε CFA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) και 400 μg H37Ra *Mycobacterium tuberculosis* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) την πρώτη μέρα (ημέρα 0). Στους ποντικούς χορηγήθηκαν επίσης ενδοπεριτοναϊκά 200 ng *Bordetella pertussis* toxin (PTx) (Sigma-Aldrich) την ημέρα 0 αλλά και 2 ημέρες μετά από την ανοσοποίηση για την ενίσχυση της έμφυτης ανοσίας και τη συμβολή στη διάνοιξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Τα πειραματόζωα φυλάσσονταν στο ίδιο κτίριο και κάτω από τις ίδιες συνθήκες ενώ η τροφή και το νερό ήταν διαθέσιμα κατά βούληση. Ακολούθησε καθημερινή παρακολούθηση της εξέλιξης της κλινικής πορείας των ποντικών.

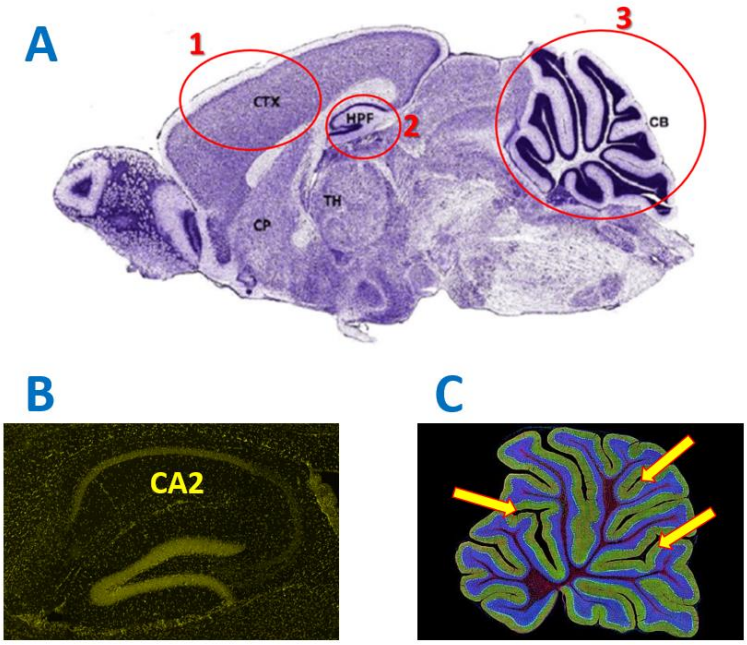
Για τη μελέτη της πορείας της νόσου χρησιμοποιήθηκε μια παγκοσμίως αποδεκτή μέθοδος αξιολόγησης των κλινικών συμπτωμάτων των πειραματόζωων με βάση τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά κατά την πορεία της νόσου. (Πίνακας 1).

ΣΚΟΡ	ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ
0	Σωματικά υγιής ποντικός
1	Παράλυση ουράς
2	Αδυναμία πίσω άκρων
3	Παράλυση πίσω άκρων
4	Αδυναμία εμπρόσθιων άκρων
5	Πλήρης σωματική παράλυση-θάνατος

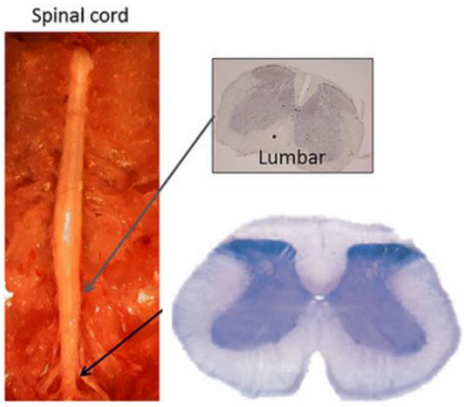
Πίνακας 1. Αξιολόγηση συμπτωμάτων της ΠΑΕ συγκριτικά με τη βαρύτητα που εμφανίζουν.

Χρονική και τοπολογική ανάλυση της μικρογλοίας κατά την ΠΑΕ

Η μελέτη της μορφολογίας και η ανάλυση της κινητικότητας των μικρογλοιακών κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε 3 περιοχές φαιάς ουσίας του εγκεφάλου και συγκεκριμένα στο φλοιό, τη μοριακή στιβάδα της παρεγκεφαλίδας και την περιοχή CA2 του ιπποκάμπου (Εικ.1.2.). Ταυτόχρονα, μελετήθηκε η μικρογλοιακή μορφολογία και στην περιοχή της οσφυϊκής χώρας του νωτιαίου μυελού (Εικ.1.3.). Η σύγκριση των αποτελεσμάτων έγινε τόσο μεταξύ διαφορετικών χρονικών σημείων στην εξέλιξη της νόσου στην ίδια περιοχή όσο και για τα ίδια χρονικά σημεία μεταξύ διαφορετικών περιοχών, κατά κύριο λόγο του εγκεφάλου.



Εικ.1.2. A) Οβελιαία τομή του εγκεφάλου πειραματικού *C57BL/6* ποντικού σε χρώση Nissl. Σε κόκκινο κύκλο φαίνονται οι περιοχές του εγκεφάλου που μελετήθηκαν σε αυτή την εργασία. 1) φλοιός 2) ιππόκαμπος 3) παρεγκεφαλίδα. **B)** Η περιοχή CA2 του ιπποκάμπου. **C)** Η μοριακή στιβάδα της παρεγκεφαλίδας του εγκεφάλου (κίτρινα βέλη).



Εικ.1.3. Νωτιαίος μυελός *C57BL/6* ποντικού. Η περιοχή που μελετήθηκε είναι η περιοχή της οσφυϊκής χώρας (lumbar).

Για τη χρονική μελέτη στο μοντέλο της ΠΑΕ χρησιμοποιήθηκαν 7 πειραματικά χρονικά σημεία όπως κατηγοριοποιούνται παρακάτω ανάλογα με τις μέρες που μεσολάβησαν από την ανοσοποίηση του ποντικού (*days post immunization-dpi*) (Εικ.1.4.).

1. **Naïve**

   Είναι το χρονικό σημείο που αντιπροσωπεύει τους υγιείς ποντικούς στους οποίους δεν έχει γίνει επαγωγή της ασθένειας και οι οποίοι χρησιμοποιούνται σαν ζώα ελέγχου (control animals).

2. **3η μέρα (dpi 3)**

   Το χρονικό σημείο που αντιπροσωπεύει την 3η μέρα μετά την ανοσοποίηση του ποντικού.

3. **6η μέρα (dpi 6)**

   Το χρονικό σημείο που αντιπροσωπεύει την 6η μέρα μετά την ανοσοποίηση του ποντικού.

4. **9η μέρα (dpi 9)**

   Το χρονικό σημείο που αντιπροσωπεύει την 9η μέρα μετά την ανοσοποίηση του ποντικού. Μαζί με τα δύο προηγούμενα σημεία αντιπροσωπεύουν τα 3 χρονικά σημεία πριν την έναρξη των συμπτωμάτων(προ-κλινικό στάδιο).

5. **Έναρξη (Onset)**

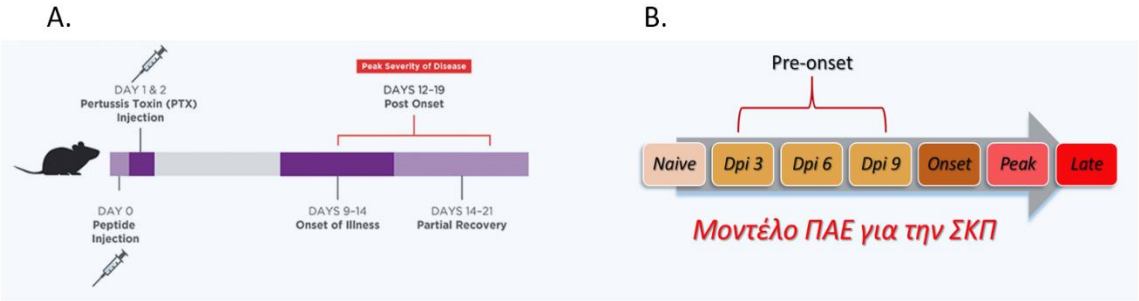
   Μέρα έναρξης των κλινικών συμπτωμάτων της νόσου. Αυτό το χρονικό σημείο μπορεί να διαφέρει από ποντικό σε ποντικό αλλά συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 9ης και 15ης μέρας μετά την ανοσοποίηση.

6. **Κορύφωση (Peak)**

   Το χρονικό σημείο που αντιπροσωπεύει την κορύφωση των κλινικών συμπτωμάτων της νόσου. Οι ποντικοί βρίσκονται συνήθως στο επίπεδο 3 ή 3,5 στην κλίμακα βαθμονόμησης του μοντέλου κλινικών συμπτωμάτων της ΠΑΕ.

7. **Χρόνιο στάδιο (Late)**

   Χρονικό σημείο αρκετές μέρες μετά από το χρονικό σημείο έναρξης της ασθένειας που αντιπροσωπεύει το χρόνιο στάδιο της ΠΑΕ. Σε αυτό το διάστημα ένα ποσοστό των ποντικών αναμένεται να παρουσιάσει αυξομειώσεις στη δριμύτητα της κλινικής του εικόνας, ακολουθώντας το μοντέλο της υποτροπιάζουσας-διαλείπουσας ΣΚΠ.



Εικ.1.4. Χρονικά στάδια του μοντέλου της ΠΑΕ. Α. Σε ποντικούς C57BL/6 τα πρώτα κλινικά συμπτώματα εμφανίζονται συνήθως μεταξύ 9^{ης} και 15^{ης} μέρας από την ανοσοποίηση. Κάποιες μέρες μετά την έναρξη της ασθένειας οι ποντικοί πιθανόν να παρουσιάσουν συμπτώματα βελτίωσης της κλινικής τους εικόνας με επακόλουθη επιδείνωση, προσομοιάζοντας έτσι την περίπτωση της υποτροπιάζουσας-διαλείπουσας ΣΚΠ. **Β.** Τα επτά χρονικά σημεία που μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία. Το τελευταίο χρονικό σημείο που αντιπροσωπεύει το χρόνιο στάδιο της ΠΑΕ (late) μελετήθηκε και αναλύθηκε μόνο ως προς τη δυναμική των μικρογλοιακών κυττάρων για την περίπτωση των CX3CR1-GFP ποντικών σε *in vivo* πειράματα με διφωτονικό μικροσκόπιο.

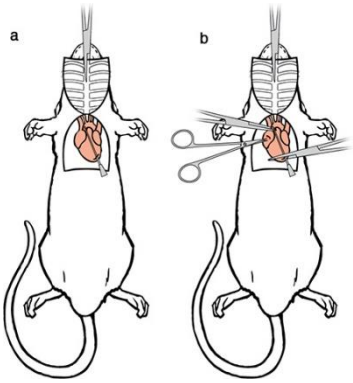
Τεχνική κρανιακού παραθύρου για in vivo διφωτονική μικροσκοπία

Για την τεχνική του κρανιακού παραθύρου και την μετέπειτα in vivo διφωτονική μικροσκοπία χρησιμοποιήθηκαν οι CX3CR1-GFP ποντικοί. Αρχικά οι ποντικοί αναισθητοποιήθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή ένεση (μείγμα κεταμίνης/ξυλαζίνης), ξυρίστηκαν στην περιοχή του φλοιού του εγκεφάλου στο σημείο της κρανιοτομής και τοποθετήθηκαν σε ειδική συσκευή σταθεροποίησης του κεφαλιού. Κατά τη διάρκεια όλης της εγχειρητικής διαδικασίας η θερμοκρασία του σώματος του ποντικού διατηρήθηκε σταθερή στους 37°C με τη χρήση ειδικής θερμαντικής πλακέτας (Labotect- Hot Plate 062). Για την προστασία των οφθαλμών από τη ξηρασία, ανά τακτά χρονικά διαστήματα εφαρμοζόταν φυσιολογικός ορός. Στη συνέχεια ο κροταφικός μυς αποχωρίστηκε προσεκτικά από το κρανίο για την έκθεση του εγκεφαλικού φλοιού και μια ειδική μεταλλική πλάκα τοποθετήθηκε πάνω στο κρανίο, με μια οπή να αφήνει ακάλυπτο το σημείο της κρανιοτομής. Η μεταλλική πλάκα σταθεροποιήθηκε με τη χρήση ειδικής κόλλας στιγμής αλλά και με την εφαρμογή ειδικού οδοντιατρικού τσιμέντου (UNIFAST), το οποίο πέρα από τη σταθεροποίηση της πλάκας χρησιμοποιήθηκε και για τη δημιουργία ενός μικρού ΄πηγαδιού΄ γύρω από την περιοχή της τομής. Στη συνέχεια με ειδικό οδοντιατρικό εργαλείο κοπής πραγματοποιήθηκε προσεκτικά μια τομή στον εγκέφαλο στην περιοχή του φλοιού ενώ αφαιρέθηκε και η σκληρή μήνιγγα του εγκεφάλου με τη βοήθεια λαβίδας. Αφού η περιοχή καθαρίστηκε από αιμορραγία που προέκυψε κατά τη διαδικασία της εγχείρησης, οι ποντικοί μεταφέρθηκαν αναισθητοποιημένοι στο διφωτονικό μικροσκόπιο για τη διαδικασία απεικόνισης. Ένεση με κεταμίνη/ξυλαζίνη επαναλαμβανόταν κάθε 20-30 λεπτά ενώ μετά το τέλος της απεικόνισης οι ποντικοί θυσιάστηκαν με αυχενική παρεκτόπιση.

Ενδοκαρδιακή αφαίμαξη/μονιμοποίηση ποντικών (Perfusion/fixation)

Για την ενδοκαρδιακή αφαίμαξη και μονιμοποίηση των ποντικών χρησιμοποιήθηκε ξηρός πάγος σαν αναισθητικό μέσο. Έπειτα από ανατομία, με τη χρήση βελόνας που συνδέεται με μια συσκευή ελεγχόμενης ροής τρυπιέται η αριστερή κοιλία της καρδιάς και εισάγεται παγωμένο διάλυμα PBS 1X με 0,1% ηπαρίνη. Χάρη στους παλμούς της καρδιάς το διάλυμα διαχέεται σε όλο το σώμα και πραγματοποιείται

αφαίμαξη. Έτσι, οι ιστοί προς μελέτη θα είναι απαλλαγμένοι από το αίμα. Δείκτης της επιτυχημένης διαδικασίας αφαίμαξης είναι η αλλαγή του χρώματος του ήπατος προς το λευκό. Σε αυτό το σημείο σταματάει η χορήγηση PBS 1X και χορηγείται με τον ίδιο τρόπο 4% παραφορμαλδεύδη (PFA). Το PFA είναι ένα μονιμοποιητικό διάλυμα το οποίο συμβάλλει στν διατήρηση της δομής των ιστών και έτσι αποφεύγονται οι αλλοιώσεις τους.



Εικ.1.1. Απεικόνιση της τεχνικής της ενδοκαρδιακής αφαίμαξης (perfusion)

Αφού απομονωθούν, ο εγκέφαλος και ο νωτιαίος μυελός φυλάσσονται για 24 και 48 ώρες αντίστοιχα στους 4ºC σε δοκιμαστικό σωλήνα με διάλυμα PFA 4% ώστε να επιτευχθεί η καλύτερη μονιμοποίηση των ιστών. Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα μεταφέρονται σε PBS στο οποίο έχει προστεθεί μικρή ποσότητα sodium azide (NaN_3) και διατηρούνται και πάλι στους 4 ºC.

Τομές κρυοστάτη

Πριν την προετοιμασία για το κόψιμο των τομών, οι ιστοί τοποθετούνται για μία νύχτα σε θερμοκρασία 4ºC σε διάλυμα PBS 1x με 15% σουκρόζη και για μία δεύτερη νύχτα σε διάλυμα PBS 1x με 30% σουκρόζη. Στη συνέχεια οι εγκέφαλοι κόβονται κάθετα στην περιοχή του μεσολοβίου για να χωριστούν σε 2 ημισφαίρια, με το ένα ημισφαίριο από κάθε εγκέφαλο να τοποθετείται σε ειδική κύστη. Ο ιστός καλύπτεται με υλικό εμπέδωσης (O.C.T. compound-Tissue Tec) και στη συνέχεια η κύστη τοποθετείται σε ισοπεντάνιο (5ml) και βυθίζεται σε δοχείο με υγροποιημένο άζωτο με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ψυκτικού μείγματος (cryoblock). Τα cryoblocks κόβονται σε εγκάρσιες τομές πάχους 50μm με τη χρήση ειδικού κρυοστάτη (Leica CM3050S). Τέλος, πραγματοποιούνται 4 εικοσάλεπτες πλύσεις με PBS 1x και οι τομές αποθηκεύονται στους 4ºC.

Ανοσοϊστοχημεία

Για κάθε ποντικό, δύο τομές επιλέγονται για ανοσοϊστοχημεία και οι υπόλοιπες τοποθετούνται σε κρυοπροστατευτικό διάλυμα (*NaH_2PO_4 0.015M, NA_2HPO_4 0.038M, Ethylene glycol 30%, Glycerol 30%*) και αποθηκεύονται στους -20°C για μελλοντική χρήση. Τα στάδια της ανοσοϊστοχημείας είναι τα παρακάτω:

- Τοποθέτηση των τομών σε blocking buffer (10% FBS, 0.5% Triton in PBS 1x), το οποίο μπλοκάρει τη μη εξειδικευμένη δέσμευση του αντισώματος και αυξάνει τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Τα δείγματα παραμένουν στο διάλυμα για όλη τη νύχτα (overnight) στους 4°C.
- Τέσσερις εικοσάλεπτες πλύσεις σε διάλυμα PBS 1x.
- Επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα (1:1000, rabbit anti-Iba1 – WACO FujiFILM) για 2 ημέρες στους 4°C.
- Τέσσερις εικοσάλεπτες πλύσεις σε διάλυμα PBS 1x.
- Επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα (1:1000, goat anti-rabbit – Alexa Fluor 568) overnight στους 4°C.
- Τέσσερις εικοσάλεπτες πλύσεις σε διάλυμα PBS 1x.
- Εφαρμογή χρώσης DAPI για 20 λεπτά.
- Τρεις εικοσάλεπτες πλύσεις σε διάλυμα PBS 1x.
- Τοποθέτηση των τομών σε αντικειμενοφόρες πλάκες, επικάλυψη με mowiol και σφράγισμα με καλυπτρίδα.

2. Μικροσκοπία φθορισμού

Για τα πειράματα της απεικόνισης χρησιμοποιήθηκε συνεστιακή και διφωτονική μικροσκοπία. Οι διαδικασίες απεικόνισης και για τις 2 περιπτώσεις πραγματοποιήθηκαν στις εγκαταστάσεις της μονάδας Οπτικής Μικροσκοπίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ.

Συνεστιακή μικροσκοπία

Η απεικόνιση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας συνεστιακό μικροσκόπιο Leica (TCS SP8, DMi 8). Η ανάλυση όλων των εικόνων που λήφθηκαν από το μικροσκόπιο ορίστηκε σε *1024x1024* pixels, με κάθε pixel να αντιστοιχεί σε 284,09 nm οδηγώντας σε ένα τελικό μέγεθος εικόνων ίσο με 290,91x290,91μm. Η ταχύτητα σάρωσης ορίζεται στο μικροσκόπιο στα 600Hz για κάθε εγγραφή. Ο αντικειμενικός φακός που χρησιμοποιήθηκε είναι ελαιοκαταδυτικός με επίπεδο μεγέθυνσης 40x. Το βήμα (step size) με το οποίο λήφθηκαν εικόνες στο επίπεδο της z στοίβας ορίστηκε στο 1.5μm.

Διφωτονική μικροσκοπία

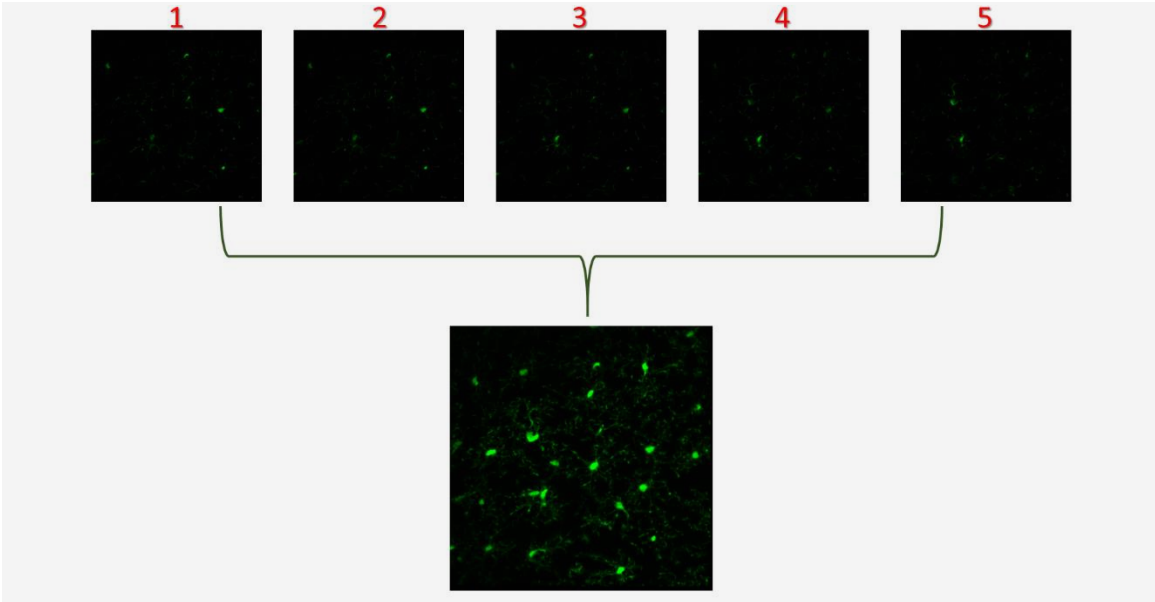
Η απεικόνιση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας διφωτονικό μικροσκόπιο Leica (TCS SP5). Η ανάλυση των εικόνων που λήφθηκαν από το διφωτονικό μικροσκόπιο ορίστηκε στα *512x512* pixels. Η ταχύτητα σάρωσης που χρησιμοποιήθηκε κατά την λήψη των εικόνων ήταν 600Hz , ενώ ο αντικειμενικός φακός που χρησιμοποιήθηκε είναι μεγέθυνσης 20x, με περαιτέρω μεγέθυνση 2.5x κατά τη διαδικασία απεικόνισης. Η ακτινοβολία διέγερσης προέρχεται από laser (*Spectra Physics, MaiTai DeepSee infrared-laser*) το οποίο ρυθμίζεται σε ισχύ 2.3mW. Λόγω περιορισμού από την ισχύ του laser που χρησιμοποιείται, το τελικό εστιακό βάθος περιορίζεται με μικρές αποκλίσεις στο επίπεδο των 200μm.

Λήψη εικόνων μέσω διφωτονικού μικροσκοπίου

Ως σημείο εστίασης του διφωτονικού μικροσκοπίου επιλέχθηκε ένα σημείο σε βάθος περίπου 200μm στο φλοιό του εγκεφάλου. Η απεικόνιση της πληροφορίας πραγματοποιήθηκε για συνολικό εύρος 50μm, το οποίο εκτείνεται 25μm πάνω και 25μm κάτω από το σημείο εστίασης. Το μικροσκόπιο ρυθμίστηκε ώστε να λαμβάνει εικόνες ανά 2μm για όλο αυτό το εύρος των 50μm, καταλήγοντας έτσι στη δημιουργία

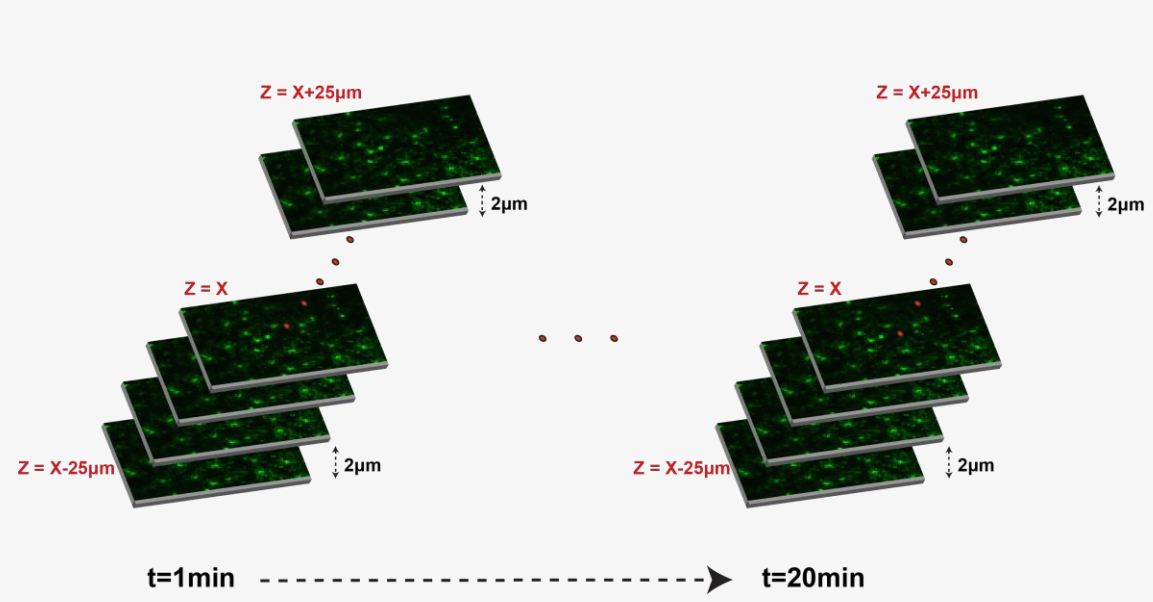
μιας τρισδιάστατης στοίβας (z stack) αποτελούμενης από 27 επιμέρους εικόνες. Η επιλογή του σημείου εστίασης έγινε με κριτήριο την ύπαρξη σωμάτων μικρογλοιακών κυττάρων κοντά σε αυτό. Με αυτό τον τρόπο, εξασφαλίζεται ότι εντός του συνολικού εύρους των 50μm της απεικόνισης, θα συμπεριλαμβάνονται μικρογλοιακά κύτταρα τα οποία θα απεικονίζονται στο σύνολό τους χωρίς την απώλεια πληροφορίας. Ανασυνδυάζοντας τις επιμέρους εικόνες της 3D στοίβας με τη μέθοδο του maximum projection, προκύπτει μια εικόνα στο δισδιάστατο επίπεδο που περιλαμβάνει ολόκληρη την πληροφορία από όλα τα επίπεδα της στοίβας (Εικ.2.1.).

Η διαδικασία λήψης εικόνας επαναλήφθηκε ανά διαστήματα του ενός λεπτού, για συνολικό χρόνο 20 λεπτών. Έτσι, στο τέλος της διαδικασίας λήφθηκε ένα σύνολο εικόνων το οποίο περιλαμβάνει 20 διαφορετικές τρισδιάστατες στοίβες (z stacks), καθεμία εκ των οποίων περιλαμβάνει με τη σειρά της 27 επιμέρους εικόνες. Από τον συνδυασμό των εικόνων προέκυψε μια εικόνα στις 4 διαστάσεις (x-y-z-t), η οποία απεικονίζει την πληροφορία της συγκεκριμένης περιοχής του φλοιού του εγκεφάλου, εύρους 50μm, κατά την εξέλιξή της για χρονικό εύρος 20 λεπτών (Εικ.2.2.). Συγκρίνοντας τις εικόνες για κάθε διαφορετική χρονική στιγμή, λήφθηκαν οι απαραίτητες πληροφορίες για τον υπολογισμό της κινητικότητας των μικρογλοιακών κυττάρων.



Εικ.2.1. Παράδειγμα ανακατασκευής εικόνας μικρογλοιακών κυττάρων από τρισδιάστατη στοίβα με τη χρήση της μεθόδου maximum projection. Παρουσιάζεται μια τρισδιάστατη στοίβα 5 επιπέδων ως προς τον z άξονα. Κάθε εικόνα τοποθετείται ως προβολή

πάνω από την προηγούμενή της δημιουργώντας μία νέα εικόνα δύο διαστάσεων που περιλαμβάνει όλη την πληροφορία του σήματος και των 2 εικόνων. Στις περιοχές που υπάρχει επικάλυψη σήματος, απεικονίζεται μόνο αυτό με τη μεγαλύτερη φωτεινότητα. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται σειριακά για όλες τις εικόνες της στοίβας έτσι ώστε στο τέλος οι επιμέρους εικόνες να συνδυάζονται και να προκύπτει η τελική εικόνα που περιέχει συγκεντρωμένη όλη την πληροφορία από κάθε επίπεδο της τρισδιάστατης στοίβας σε μία εικόνα δύο διαστάσεων. Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι το τελικό δισδιάστατο αποτέλεσμα απεικονίζει όλη την πληροφορία που βρίσκεται στο x-y επίπεδο, αλλά πιθανόν να χάνει πληροφορία που βρίσκεται στο z επίπεδο όταν υπάρχει σήμα από 2 διαφορετικά κύτταρα στο ίδιο x-y σημείο διαφορετικών καθ' ύψος z επιπέδων.



Εικ.2.2. Μεθοδολογία τελικού αποτελέσματος απεικόνισης. Το X αντιπροσωπεύει το σημείο εστίασης. Για κάθε timepoint (t=1min ... 20 min), η πληροφορία ανακτάται μέσω μιας 3D στοίβας όπου κάθε επίπεδο στον z άξονα ισαπέχει κατά 2μm. Έτσι, για κάθε χρονική στιγμή δημιουργείται μια 3D στοίβα (x-y-z) βάθους 50μm και συνολικά 27 εικόνων. Η επιλογή του σημείου εστίασης γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε το κυτταρικό σώμα να βρίσκεται σε μικρή απόσταση από το σημείο εστίασης X. Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται ότι ολόκληρη η πληροφορία των κυττάρων (κυτταρικό σώμα &κυτταρικές προεκβολές) θα βρίσκεται εντός του εύρους των 50μm που αντιστοιχεί στην κάθε στοίβα. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για 20 διαφορετικές χρονικές στιγμές, ισαπέχουσες χρονικά κατά ένα λεπτό, λαμβάνοντας έτσι σαν τελικό αποτέλεσμα μια εικόνα σε 4 διαστάσεις (x-y-z-t) που περιλαμβάνει πληροφορία τόσο για την μορφολογία των μικρογλοιακών κυττάρων σε κάθε σταθερό χρονικό σημείο όσο και

για την κινητικότητα των προεκβολών τους από χρονικό σημείο σε χρονικό σημείο της διαδικασίας απεικόνισης.

3. Λογισμικά

Για την προ-επεξεργασία και την ανάλυση των εικόνων χρησιμοποιήθηκαν τα λογισμικά ImageJ2/Fiji (Rueden et al., 2017, Schindelin et al., 2012), Vaa3D (Peng et al., 2010), Neutube (Feng et al., 2010) και Imaris (Oxford Instruments, Bitplane). Τα scripts που χρησιμοποιήθηκαν για την προ-επεξεργασία και την οργάνωση των δεδομένων αναπτύχθηκαν στο ImageJ2/Fiji, ενώ η εφαρμογή επεξεργασίας των αποτελεσμάτων αναπτύχθηκε στις γλώσσες Matlab (Mathworks, version 2018b) και Java (Eclipse Photon, v.2018).

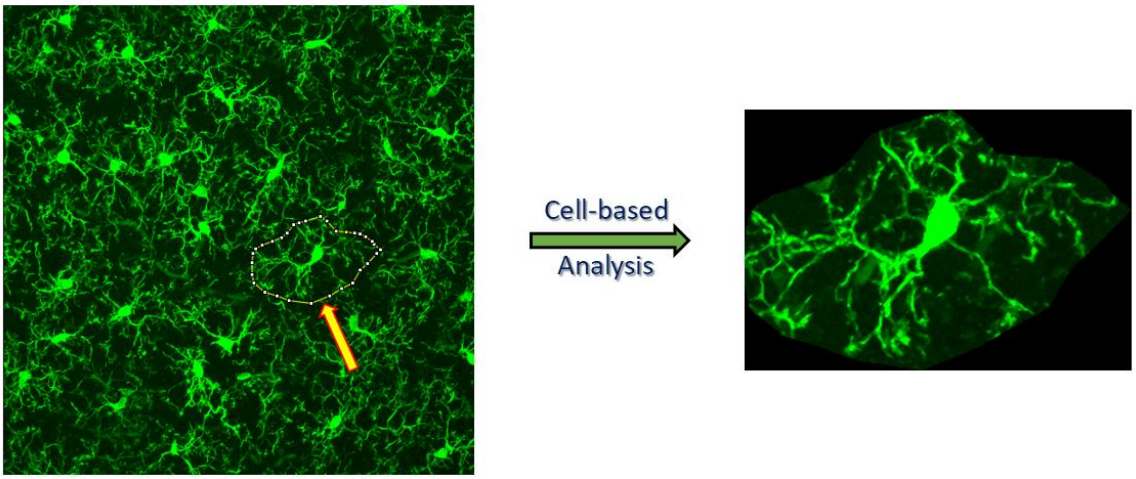
4. Ανάλυση αποτελεσμάτων

Ανάλυση σε επίπεδο απομονωμένου κυττάρου (cell based analysis)

Ο μεγάλος αριθμός κυττάρων ανά περιοχή εστίασης αλλά και η αύξηση της πολυπλοκότητας του σήματος της εικόνας λόγω της πιθανής επικάλυψης προεκβολών γειτονικών κυττάρων σε περιοχές όπου τα μικρογλοιακά κύτταρα απαντώνται σε μεγάλη πυκνότητα, δημιουργούν την ανάγκη ώστε η ανάλυση των μορφολογικών χαρακτηριστικών και της κινητικότητάς τους να πραγματοποιηθεί σε απομονωμένα κύτταρα (*cell-based analysis*). Για το σκοπό αυτό, από κάθε αποθηκευμένη εικόνα επιλέχθηκαν και απομονώθηκαν μεμονωμένα κύτταρα για τα επόμενα στάδια ανάλυσης.

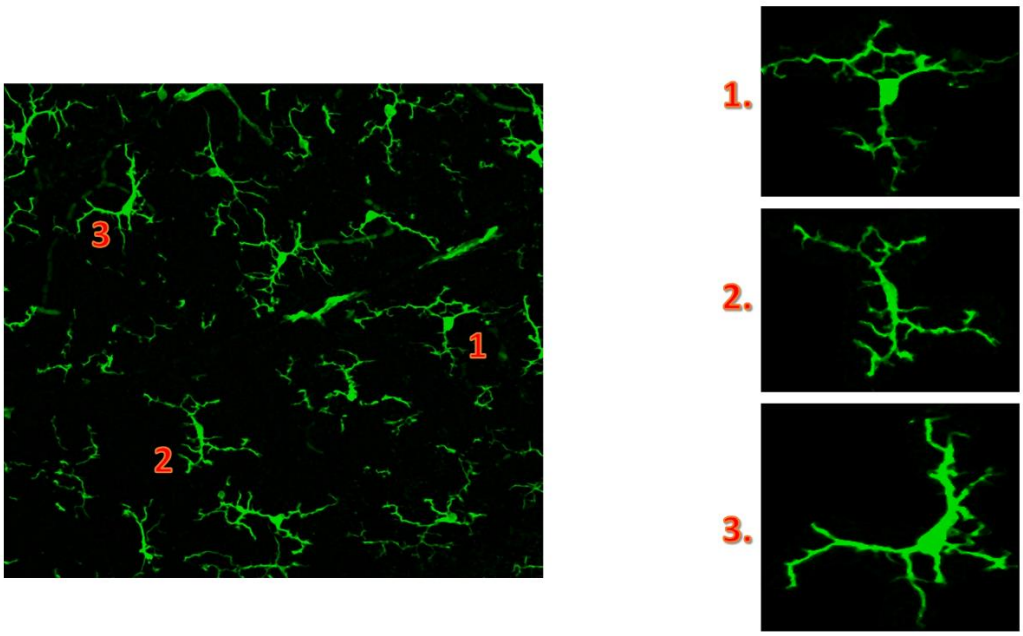
Η απομόνωση των μικρογλοιακών κυττάρων από τις εστιασμένες περιοχές πραγματοποιήθηκε χειροκίνητα χρησιμοποιώντας το λογισμικό *ImageJ2/Fiji* και το εργαλείο ROI manager (region of interest manager). Το εργαλείο αυτό επιτρέπει στο χρήστη να σχεδιάσει χειροκίνητα μια περιοχή ενδιαφέροντος γύρω από το κύτταρο που τον ενδιαφέρει, να το απομονώσει και να το αποθηκεύσει σαν ξεχωριστή εικόνα ώστε να εκτελέσει τα επόμενα στάδια της ανάλυσης. Για την ορθή υλοποίηση της διαδικασίας είναι απαραίτητο να εκτελείται το ROI manager στην τρισδιάστατη z

στοίβα, ώστε να εξασφαλίζεται ότι σε κάθε επίπεδο αυτής θα περιλαμβάνεται όλη η πληροφορία του κάθε μικρογλοιακού κυττάρου (Εικ.3.1.).



Εικ.3.1. Απομονωμένο κύτταρο από περιοχή εστίασης στον φλοιό του εγκεφάλου *C57BL/6* ποντικού. Η επιλογή της περιοχής ενδιαφέροντος (ROI – κίτρινο βέλος), πρέπει να γίνεται προσεκτικά ώστε το κύτταρο που επιλέγεται να βρίσκεται ολόκληρο μέσα στα όρια της τρισδιάστατης z στοίβας αλλά και να περιλαμβάνει κυτταρικές προεκβολές που ανήκουν μόνο στο ίδιο και όχι και σε γειτονικά κύτταρα.

Σε πολλές περιπτώσεις είναι αναγκαίο να εφαρμοστεί ένα επιπλέον βήμα χρήσης του ROI manager ώστε να απομακρυνθούν προεκβολές από γειτονικά κύτταρα που επικαλύπτονται και δεν ήταν εφικτό να αγνοηθούν στο πρώτο στάδιο απομόνωσης. Και σε αυτή την περίπτωση, η επιλογή της περιοχής ενδιαφέροντος πρέπει να πραγματοποιείται στο επίπεδο της τρισδιάστατης στοίβας (Εικ.3.2.).

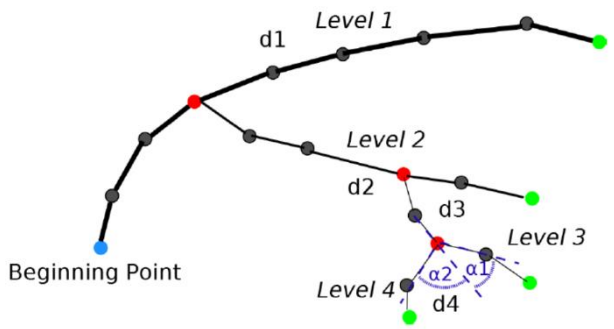


Εικ.3.2. Απομόνωση κυττάρων από εικόνα που έχει προέλθει από την περιοχή της παρεγκεφαλίδας του εγκεφάλου *C57BL/6* ποντικού. Από το σύνολο των μικρογλοιακών κυττάρων που βρίσκονται στην περιοχή εστίασης(αριστερή εικόνα), μόνο τα τρία βρίσκονται ολόκληρα μέσα στο όριο της τρισδιάστατης στοίβας εικόνων άρα είναι τα μόνα που θα απομονωθούν για το στάδιο της μορφολογικής ανάλυσης. Μετά την απομόνωση, στα τρία κύτταρα εφαρμόζεται ξανά η μεθοδολογία επιλογής περιοχής (ROI manager) για να απομακρυνθούν τυχόν γειτονικές προεκβολές ή άλλο ανεπιθύμητο σήμα από την εικόνα του απομονωμένου κυττάρου.

Ιχνηλάτηση μικρογλοιακών κυττάρων (Microglial Cell Tracing)

Για την ιχνηλάτηση των μικρογλοιακών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Imaris το οποίο χρησιμοποιεί έναν αλγόριθμο βασισμένο στον όγκο των κυτταρικών προεκβολών (volume-based algorithm). Ξεκινώντας από το κυτταρικό σώμα, ο αλγόριθμος διασχίζει όλες τις κυτταρικές προεκβολές με βάση την ένταση φωτεινότητας της εικόνας και κάθε σήμα με ένταση μεγαλύτερη από ένα συγκεκριμένο κατώφλι θεωρείται μέρος του κυττάρου. Για κάθε ξεχωριστή κυτταρική προεκβολή προκύπτει ένας αριθμός που δείχνει το επίπεδο διακλάδωσής της. Προεκβολές με επίπεδο 1 (Level 1) κατηγοριοποιούνται ως κύριες προεκβολές που ξεκινούν από το κυτταρικό σώμα, προεκβολές με επίπεδο 2 (Level 2) είναι διακλαδώσεις των κύριων προεκβολών κτλ. Με αυτό τον τρόπο γίνεται η κατηγοριοποίηση σε επίπεδα όλων των

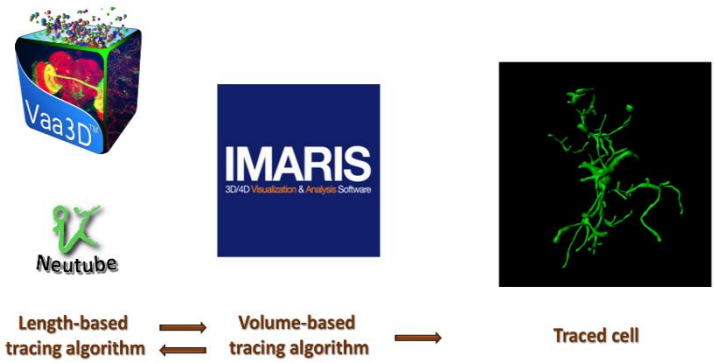
προεκβολών και η τελική ιχνηλάτηση ολόκληρου του μικρογλοιακού κυττάρου. Για κάθε σημείο διακλάδωσης, ως συνέχεια των αρχικών προεκβολών θεωρούνται αυτές με τη μεγαλύτερη συνολική διάμετρο και άρα διατηρούν το ίδιο επίπεδο με την αρχική, ενώ προεκβολές με μικρότερη διάμετρο θεωρούνται ότι βρίσκονται στο αμέσως μεγαλύτερο επίπεδο και άρα δεν είναι συνέχεια της αρχικής αλλά διακλαδώσεις της. Στην περίπτωση που δύο προεκβολές σε ένα σημείο διακλάδωσης έχουν ακριβώς την ίδια διάμετρο, ο αλγόριθμος χρησιμοποιεί ως κριτήριο απόφασης τη γωνία που σχηματίζει η κάθε προεκβολή με τη νοητή ευθεία που περνάει από το σημείο διακλάδωσης. Η προεκβολή με τη μικρότερη γωνία και άρα με τη μικρότερη απόκλιση από την αρχική προεκβολή θεωρείται ότι αποτελεί συνέχειά της ενώ αυτή με τη μεγαλύτερη γωνία θεωρείται διακλάδωση (Εικ.3.3.).



Εικ.3.3. Ο αλγόριθμος του Imaris για την ιχνηλάτηση των μικρογλοιακών προεκβολών. Στο σημείο διακλάδωσης ελέγχεται η διάμετρος(d) για κάθε νέα προεκβολή. Αυτές με τη μεγαλύτερη διάμετρο θεωρούνται συνέχεια της αρχικής ενώ οι άλλες διακλαδώσεις της . Στο πρώτο σημείο διακλάδωσης της εικόνας, η προεκβολή d1 έχει μεγαλύτερη διάμετρο από την d2. Έτσι, η προεκβολή d1 διατηρεί το επίπεδο 1 που είχε και η αρχική πριν το σημείο διακλάδωσης, ενώ η προεκβολή d2 ανεβαίνει στο επίπεδο 2 και θεωρείται διακλάδωση. Για τις προεκβολές d3 και d4 ισχύει ότι d3 = d4, άρα θα εξεταστεί το δεύτερο κριτήριο της γωνίας που σχηματίζει η προεκβολή με τη νοητή ευθεία της διακλάδωσης. Η προεκβολή με τη μικρότερη γωνία κλίσης θεωρείται συνέχεια της αρχικής και διατηρεί το ίδιο επίπεδο. Με αυτό τον τρόπο πραγματοποιείται η συνολική ιχνηλάτηση του μικρογλοιακού κυττάρου.

Για κάθε απομονωμένο κύτταρο εφαρμόστηκε ο αλγόριθμος ιχνηλάτησης στο Imaris θέτοντας συγκεκριμένο κατώφλι για την ένταση της φωτεινότητας που θα θεωρηθεί σήμα που προέρχεται από το κύτταρο και το οποίο διατηρήθηκε σταθερό για όλα τα κύτταρα που αναλύθηκαν ώστε να εξασφαλιστεί η ομοιομορφία των αποτελεσμάτων. Για τον εντοπισμό του κυτταρικού σώματος που θα θεωρηθεί η αρχή

των κυτταρικών προεκβολών, σχεδιάστηκε μια σφαίρα διαμέτρου 5μm, η οποία εφαρμόστηκε σαν κατώφλι στο σήμα της εικόνας του κυττάρου. Δομές που αποτελούν μέρος του κυττάρου με διάμετρο μικρότερη από αυτή τη σφαίρα, αγνοήθηκαν σε αυτό το πρώτο στάδιο. Με αυτό τον τρόπο, ο αλγόριθμος απορρίπτει τις μικρογλοιακές προεκβολές αλλά εντοπίζει το κυτταρικό σώμα καθώς πρόκειται για δομή μεγαλύτερη σε διάμετρο από 5 μm (συνήθως κοντά στα 10μm). Μετά τον εντοπισμό του κυτταρικού σώματος, η σφαίρα εντοπισμού επεκτάθηκε στα 10μm διάμετρο που αντιστοιχεί σε ένα μέσο κυτταρικό σώμα μικρογλοιακού κυττάρου και ξεκίνησε η εφαρμογή του αλγορίθμου με αρχή των κυτταρικών προεκβολών να θεωρούνται τα όρια της σφαίρας εντοπισμού. Το τελικό αποτέλεσμα της ιχνηλάτησης που προέκυψε με τη χρήση του Imaris είναι μια τρισδιάστατη ανακατασκευή του μικρογλοιακού κυττάρου. Με τη χρήση των ελεύθερων προγραμμάτων Vaa3D και Neutube, που βασίζονται σε διαφορετικό αλγόριθμο (υλοποιημένο με βάση το μήκος των προεκβολών και όχι τη διάμετρό τους), επιβεβαιώθηκαν ως προς την εγκυρότητά τους τα αποτελέσματα του Imaris (Εικ.3.4.).



Εικ.3.4. Τελική τρισδιάστατη ανακατασκευή μικρογλοιακού κυττάρου στο Imaris. Στα προηγούμενα στάδια, το αποτέλεσμα της ιχνηλάτησης του κυττάρου έχει ελεγχθεί με χρήση των λογισμικών Vaa3D και Neutube. Το κύτταρο που απεικονίζεται εδώ προήλθε από την περιοχή του ιπποκάμπου.

Τα αποτελέσματα του αλγορίθμου αποτυπώνονται σε αρχεία μορφής excel, τα οποία περιλαμβάνουν λεπτομερείς πληροφορίες για το μήκος, τη διάμετρο, τον αριθμό των σημείων διακλάδωσης και των τερματικών σημείων αλλά και για την ανάλυση Sholl των κυτταρικών προεκβολών για το κάθε μικρογλοιακό κύτταρο. Κάθε ένα από αυτά τα αρχεία διαθέτει μεγάλο όγκο πληροφοριών, γεγονός που καθιστά δύσκολη και πολύ χρονοβόρα την επεξεργασία τους με χειροκίνητο τρόπο. Για το σκοπό αυτό

αναπτύχθηκε η εφαρμογή MicroApp, η οποία πραγματοποιεί την τελική ανάλυση και την παραγωγή των αποτελεσμάτων σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα και με μεγάλη αξιοπιστία.

Ανάλυση μορφολογίας και κινητικότητας μικρογλοιακών κυττάρων

Τα μικρογλοιακά κύτταρα μελετήθηκαν ως προς τη μορφολογία τους αλλά και την κινητικότητα των μικρογλοιακών τους προεκβολών στα διάφορα χρονικά σημεία της νόσου της ΠΑΕ, όπως αυτά ήδη αναφέρθηκαν, αλλά και για διάφορες περιοχές του ΚΝΣ στον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό.

Ανάλυση μορφολογίας μικρογλοιακών κυττάρων από εικόνες συνεστιακού μικροσκοπίου

Για την ανάλυση της μορφολογίας των μικρογλοιακών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα που προέκυψαν από πειράματα απεικόνισης με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας σε μονιμοποιημένες τομές του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού από C57BL/6 ποντικούς. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά εξετάστηκαν σε επίπεδο κυττάρου (cell-based analysis) και περιλαμβάνουν το συνολικό μήκος των μικρογλοιακών προεκβολών, το συνολικό όγκο που καταλαμβάνει το κύτταρο, τον αριθμό των διακλαδώσεων των προεκβολών, τον αριθμό των τερματικών σημείων των προεκβολών και την ανάλυση Sholl (D.A. Sholl, 1953). Σε επίπεδο περιοχής εστίασης, μετρήθηκε επίσης η συνολική πυκνότητα των μικρογλοιακών κυττάρων ως ο αριθμός των κυτταρικών σωμάτων που περιλαμβάνονται ανά περιοχή στην τρισδιάστατη στοίβα της εικόνας.

- **Συνολικό μήκος μικρογλοιακών προεκβολών**

  Ορίζεται ως το άθροισμα του μήκους όλων των επιμέρους προεκβολών (κύριων και των διακλαδώσεών τους) σε όλα τα επίπεδα της τρισδιάστατης στοίβας (Εικ.3.5.,Α).

- **Συνολικός όγκος που καταλαμβάνει το κύτταρο**

  Ορίζεται ως ο συνολικός όγκος που καταλαμβάνει το κύτταρο στο τρισδιάστατο επίπεδο. Είναι ουσιαστικά η επιφάνεια που καταλαμβάνει το κύτταρο σε κάθε

επίπεδο της 3D εικόνας, πολλαπλασιασμένη με το βήμα της απόστασης μεταξύ των επιπέδων αλλά και τον αριθμό των επιπέδων της z στοίβας.

- **Αριθμός διακλαδώσεων των μικρογλοιακών προεκβολών**

  Ορίζοντας ως κύριες προεκβολές αυτές που έχουν ως σημείο έναρξης το κυτταρικό σώμα του μικρογλοιακού κυττάρου, ως διακλαδώσεις θεωρούνται όλες οι προεκβολές (συνήθως μικρότερου μήκους), που έχουν ως σημείο έναρξης κάποιο σημείο μιας κύριας προεκβολής ή και κάποιας άλλης διακλάδωσης. Η μέτρηση που μας ενδιαφέρει είναι το άθροισμα όλων αυτών των διακλαδώσεων (Εικ.3.5., Α).

- **Αριθμός τερματικών σημείων των μικρογλοιακών προεκβολών**

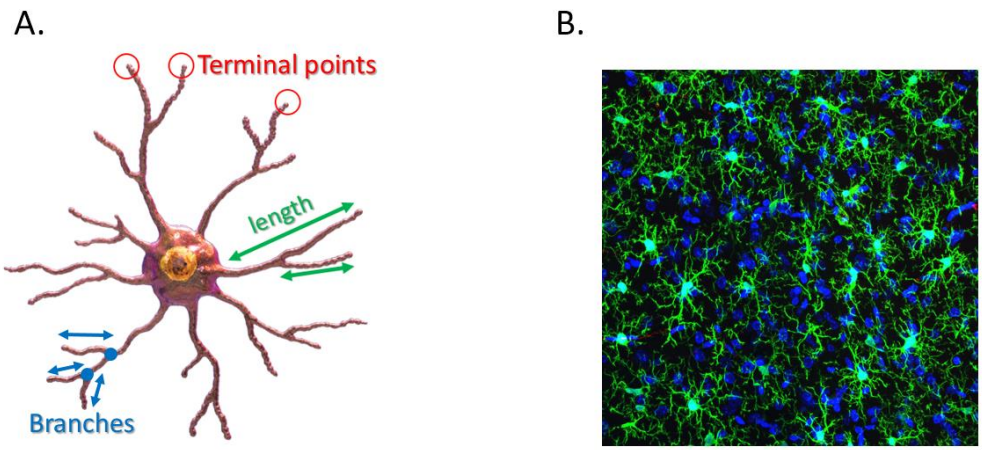
  Ορίζεται ως το άθροισμα όλων των σημείων στα οποία τελειώνουν οι διακλαδώσεις ή οι κύριες προεκβολές του κυττάρου. Η μέτρηση αυτή ταυτίζεται ουσιαστικά με το συνολικό αριθμό μικρογλοιακών προεκβολών του κυττάρου (Εικ.3.5., Α).

- **Συνολική πυκνότητα μικρογλοιακών κυττάρων**

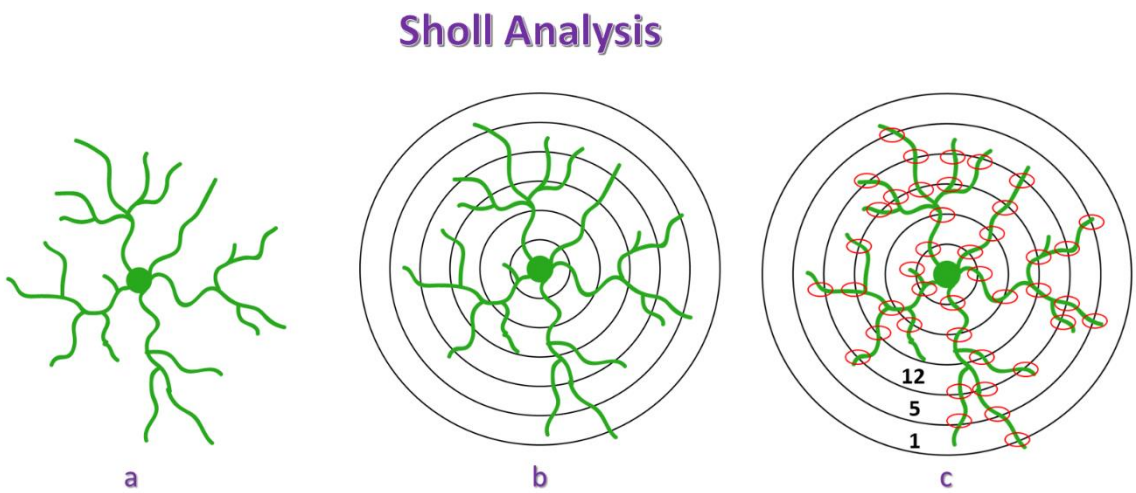
  Υπολογίζεται αρχικά ως το άθροισμα όλων των μικρογλοιακών κυτταρικών σωμάτων που περιλαμβάνονται μέσα σε κάθε εικόνα, σε επίπεδο τρισδιάστατης στοίβας. Ορίζεται σαν μέτρηση ως ένας δείκτης πυκνότητας των κυττάρων (με τον αριθμό τους αναγόμενο ως προς 10^3) ανά κυβικά χιλιοστόμετρα (mm^3) (Εικ.3.5., Β).

- **Ανάλυση Sholl (Sholl Analysis)**

  Η *ανάλυση Sholl* χρησιμοποιείται ως μια μεθοδολογία ποσοτικοποίησης της πολυπλοκότητας διακλάδωσης του μικρογλοιακού κυττάρου. Θεωρώντας το κυτταρικό σώμα σαν το κέντρο, σχεδιάζονται γύρω από αυτό ομόκεντροι κύκλοι οι οποίοι ισαπέχουν διαδοχικά κατά μία σταθερή ακτίνα *r* που ορίζεται για τις μετρήσεις της συγκεκριμένης μελέτης στο 1 μικρόμετρο (1μm). Για κάθε ακτινική απόσταση υπολογίζεται το σύνολο των διασταυρώσεων των κυτταρικών προεκβολών με τον αντίστοιχο κύκλο. Η τελική ανάλυση προσφέρει ενδείξεις τόσο για το πόσο διακλαδιζόμενο εμφανίζεται ένα μικρογλοιακό κύτταρο όσο και για το πόσο κοντά ή μακριά από το κυτταρικό σώμα εμφανίζεται το μεγαλύτερο ποσοστό διακλάδωσής του. Έτσι, η ανάλυση Sholl μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες για πιθανές μορφολογικές αλλαγές των κυττάρων στα στάδια της εξέλιξης μιας νόσου (Εικ.3.6.).



Εικ.3.5. Οι βασικές μετρήσεις για τη μορφολογική ανάλυση των μικρογλοιακών κυττάρων. **Α.Μετρήσεις μήκους, αριθμού διακλαδώσεων και αριθμού τερματικών σημείων.** Το μήκος των μικρογλοιακών προεκβολών υπολογίζεται ως το συνολικό άθροισμα όλων των προεκβολών, κύριων αλλά και των διακλαδώσεών τους (πράσινα βέλη). Ως διακλάδωση ορίζεται κάθε προεκβολή που δεν έχει ως σημείο έναρξης το κυτταρικό σώμα (με μπλε βέλη οι διακλαδώσεις, με μπλε κύκλο τα σημεία διακλάδωσης). Τα τερματικά σημεία δείχνουν το τέλος της κάθε κυτταρικής προεκβολής και ο συνολικός αριθμός τους αντιπροσωπεύει το σύνολο του αριθμού των μικρογλοιακών προεκβολών που έχει το κύτταρο(κόκκινοι κύκλοι). **Β. Μέτρηση πυκνότητας.** Για κάθε εικόνα υπολογίζεται ο συνολικός αριθμός των κυτταρικών σωμάτων(γαλάζιο χρώμα) αναγόμενος ως προς τον όγκο ολόκληρης της εικόνας. Η μέτρηση γίνεται στο επίπεδο της 3D z στοίβας. Εδώ παρουσιάζεται το maximum projection για διευκόλυνση στην απεικόνιση.



Εικ.3.6. Ανάλυση Sholl. Για κάθε μικρογλοιακό κύτταρο (**a**), θεωρώντας το κυτταρικό του σώμα σαν κέντρο, σχεδιάζονται γύρω του ομόκεντροι κύκλοι ακτίνας 1μm (**b**). Για κάθε

ακτίνα, υπολογίζεται ο αριθμός των μικρογλοιακών προεκβολών που τέμνονται με αυτή. Στο παράδειγμα της εικόνας, η τελευταία ακτίνα έχει μία προεκβολή που να την διασχίζει, η αμέσως προηγούμενη έχει 5, η προηγούμενη από αυτή 12 κτλ. (**c**). Το τελικό αποτέλεσμα της ανάλυσης Sholl δείχνει πόσο διακλαδιζόμενο είναι το μικρογλοιακό κύτταρο αλλά και πόσο κοντά στο κυτταρικό σώμα βρίσκονται οι διακλαδώσεις του και δίνει σημαντικές μορφολογικές πληροφορίες για τα κύτταρα.

Ανάλυση της κινητικότητας μικρογλοιακών κυττάρων από εικόνες διφωτονικού μικροσκοπίου

Για την ανάλυση της δυναμικής των μικρογλοιακών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα που προέκυψαν από τα *in vivo* πειράματα σε διαγονιδιακά τροποποιημένους CX3CR1-GFP ποντικούς με τη χρήση διφωτονικού μικροσκοπίου. Η κινητικότητα των μικρογλοιακών κυττάρων αναλύθηκε χρησιμοποιώντας τον δείκτη επιτήρησης (*surveillance index*) και τον δείκτη διακλάδωσης (*ramification index*) (Madry, Kyrargyri et al., 2018b). Επιπρόσθετα, με τον ίδιο τρόπο που αναφέρθηκε και στην μορφολογική ανάλυση της μικρογλοίας, υπολογίστηκε ένας δείκτης πυκνότητας για τη μέτρηση της κατανομής των κυττάρων ανά περιοχή εστίασης.

- **Δείκτης επιτήρησης (surveillance index)**

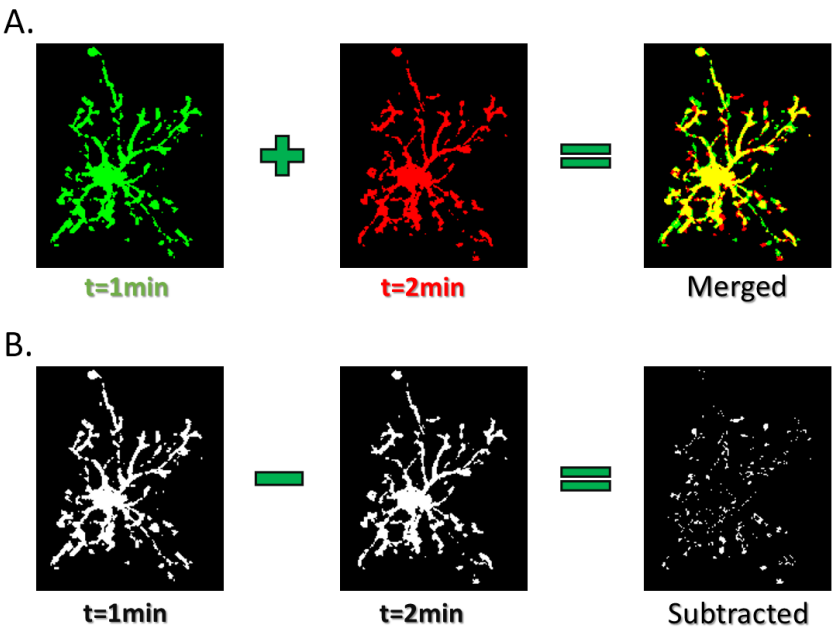
  Ο δείκτης επιτήρησης του μικρογλοιακού κυττάρου είναι ένα μέτρο της περιοχής του εγκεφάλου που επιτηρεί ένα μικρογλοιακό κύτταρο σε μια δεδομένη χρονική στιγμή. Υπολογίζεται ως ο αριθμός των εικονοστοιχείων (pixels) που επιτηρούνται από τις μικρογλοιακές προεκβολές ανά μονάδα χρόνου και εξαρτάται τόσο από τον αριθμό των κυτταρικών προεκβολών όσο και από την ταχύτητα αλλά και το εύρος της κίνησής τους. Για την ποσοτικοποίηση του δείκτη επιτήρησης, αρχικά όλες οι εικόνες δυαδικοποιούνται (binarization). Για κάθε χρονική στιγμή από τις συνολικά 20 όπως αυτές έχουν αναφερθεί νωρίτερα (t=1min…20min), ξεκινώντας από την πρώτη χρονική στιγμή (frame), η κάθε εικόνα αφαιρείται από την επόμενή της και δημιουργούνται 2 νέες εικόνες, μία που περιλαμβάνει πληροφορία που αντιστοιχεί στην επέκταση (extension) των μικρογλοιακών προεκβολών και μία που αντιστοιχεί στην απόσυρσή τους (retraction). Αυτό υλοποιείται ελέγχοντας για κάθε pixel το αποτέλεσμα της αφαίρεσης των 2 εικόνων από τα διαφορετικά χρονικά σημεία. Αν το αποτέλεσμα είναι θετικό αυτό μεταφράζεται σε κίνηση

επέκτασης της μικρογλοιακής προεκβολής, ενώ αν το αποτέλεσμα είναι αρνητικό αντιστοιχεί σε απόσυρση της προεκβολής (Εικ.3.7.).

Αν ορίσουμε σαν F_t την εικόνα σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή t, τότε F_{t+1} θα είναι η εικόνα στην επόμενη χρονική στιγμή. Επίσης, ορίζοντας τη θετική εικόνα της αφαίρεσης ως PE (process extension) και την αρνητική ως PR (process retraction), τότε ο δείκτης επιτήρησης SI (surveillance index) θα δίνεται από τον τύπο:

$$SI = \frac{\left(\sum_{pixels} PE + PR\right)}{\overline{\left(\sum_{pixels} PE + PR\right)}_{control}}$$

, όπου στον αριθμητή βρίσκεται το άθροισμα των 2 εικόνων μεταξύ δύο διαδοχικών χρονικών σημείων για τα retractions και extensions και στον παρονομαστή ο μέσος όρος για το ίδιο άθροισμα όταν αυτό εφαρμοστεί για όλα τα χρονικά σημεία των 20 λεπτών (Madry, Kyrargyri et al., 2018b).



Εικ.3.7. Τρόπος υπολογισμού δείκτη επιτήρησης. **Α.** Η ίδια εικόνα σε δύο διαδοχικά timepoints και η συνένωσή τους. Με κίτρινο χρώμα αποτυπώνονται οι σταθερές προεκβολές ενώ με πράσινο και κόκκινο οι υποχωρήσεις και επεκτάσεις. **Β.** Μετά τη δυαδικοποίηση, η πρώτη εικόνα αφαιρείται από τη δεύτερη. Στο τελικό αποτέλεσμα εμφανίζεται μόνο το σήμα που υποδεικνύει μεταβολή στην κινητικότητα μεταξύ των δύο

χρονικών σημείων (PE+PR). Το άθροισμα του σήματος της εικόνας κανονικοποιημένο ως προς το ίδιο άθροισμα για τις αντίστοιχες εικόνες που προκύπτουν για όλα τα χρονικά σημεία του πειράματος, ορίζεται ως ο δείκτης επιτήρησης (surveillance index).

- **Δείκτης διακλάδωσης (ramification index)**

  Ο δείκτης διακλάδωσης του μικρογλοιακού κυττάρου χρησιμοποιείται ως μέτρο της διακλάδωσης ενός μικρογλοιακού κυττάρου. Υπολογίζεται ως μέτρο του λόγου της περιμέτρου του κυττάρου ως προς τη συνολική επιφάνεια που αυτό καταλαμβάνει, όταν αυτός κανονικοποιείται ως προς έναν κύκλο που καλύπτει την ίδια επιφάνεια. Λόγω αυτής της κανονικοποίησης, ο δείκτης διακλάδωσης εξαρτάται από το σχήμα του κυττάρου αλλά όχι από το τελικό του μέγεθος (Madry, Kyrargyri et al., 2018b). Ορίζοντας τον δείκτη διακλάδωσης ως RI (ramification index), ο τύπος είναι:

$$\boldsymbol{RI} = \frac{\left(\frac{\boldsymbol{\pi\varepsilon\rho\acute{\iota}\mu\varepsilon\tau\rho o\varsigma}}{\boldsymbol{\varepsilon\pi\iota\varphi\acute{\alpha}\nu\varepsilon\iota\alpha}}\right)}{\left(\mathbf{2} * \sqrt{\frac{\boldsymbol{\pi}}{\boldsymbol{\varepsilon\pi\iota\varphi\acute{\alpha}\nu\varepsilon\iota\alpha}}}\right)}$$

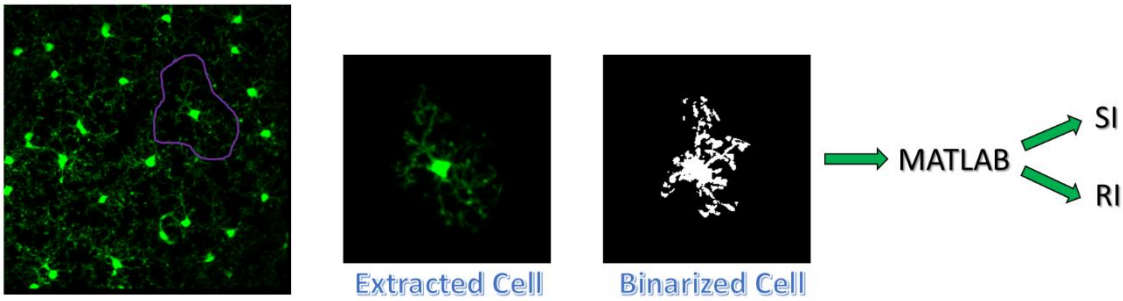
  , όπου στον αριθμητή βρίσκεται ο λόγος της περιμέτρου του κυττάρου όπως αυτή σχηματίζεται από τις μικρογλοιακές προεκβολές προς το λόγο της συνολικής επιφάνειας που αυτό καλύπτει ενώ στον παρονομαστή βρίσκεται ο ίδιος λόγος για έναν κύκλο που καλύπτει την ίδια επιφάνεια με το κύτταρο.

- **Συνολική πυκνότητα μικρογλοιακών κυττάρων**

  Υπολογίζεται ως το άθροισμα όλων των μικρογλοιακών κυτταρικών σωμάτων που περιλαμβάνονται μέσα σε κάθε εικόνα (σε επίπεδο τρισδιάστατης z στοίβας) και για όλα τα χρονικά σημεία της εγγραφής. Ορίζεται σαν μέτρηση ως ένας δείκτης πυκνότητας των κυττάρων (με τον αριθμό τους αναγόμενο ως προς 10^3) ανά κυβικά χιλιοστόμετρα(mm^3) (Εικ.3.5., Β).

Για κάθε εικόνα που αναλύθηκε για τα in vivo πειράματα σε διφωτονικό μικροσκόπιο, τα κύτταρα απομονώθηκαν με τον τρόπο που αναφέρθηκε νωρίτερα με σκοπό να πραγματοποιηθεί η ανάλυση για κάθε κύτταρο ξεχωριστά (cell-based

analysis). Πολύ σημαντικό κριτήριο για την επιλογή των κυττάρων που απομονώθηκαν από κάθε εικόνα είναι να βρίσκονται εξ ολοκλήρου εντός της τρισδιάστατης στοίβας για όλα τα χρονικά σημεία της εικοσάλεπτης εγγραφής της απεικόνισης. Τα απομονωμένα κύτταρα μετατρέπονται σε δυαδικοποιημένη εικόνα (binarized) και αναλύονται με τη βοήθεια ενός προγράμματος (script) που αναπτύχθηκε σε γλώσσα MATLAB από τους Madry, Kyrargyri et al και είναι διαθέσιμο στον ακόλουθο σύνδεσμο (*https://github.com/AttwellLab/Microglia*). Το script επεξεργάζεται διαδοχικά τις δυαδικοποιημένες εικόνες και επιστρέφει το αριθμητικό αποτέλεσμα για τον δείκτη επιτήρησης και τον δείκτη διακλάδωσης των μικρογλοιακών κυττάρων (Εικ.3.8.).



Εικ.3.8. Διαδικασία υπολογισμού του δείκτη επιτήρησης και του δείκτη διακλάδωσης απομονωμένου μικρογλοιακού κυττάρου από in vivo πειράματα διφωτονικού μικροσκοπίου. Το κύτταρο απομονώνεται στο λογισμικό ImageJ2 χρησιμοποιώντας το εργαλείο ROI manager. Εφαρμόζεται ένα επιπλέον φίλτρο προεπεξεργασίας της εικόνας (bleach correction) για τη διόρθωση του φαινομένου της φωτολεύκανσης. Τέλος, το κύτταρο δυαδικοποιείται χρησιμοποιώντας το εργαλείο Threshold του ImageJ2 και αυτή η τελική εικόνα του κυττάρου χρησιμοποιείται σαν είσοδος σε ένα πρόγραμμα MATLAB που υπολογίζει αριθμητικά τον δείκτη επιτήρησης (SI) και τον δείκτη διακλάδωσης(RI) του μικρογλοιακού κυττάρου (Madry, Kyrargyri et al., 2018b).

5. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό SigmaPlot (Systat Software Inc.) για την ανάλυση των δεδομένων των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στο διφωτονικό μικροσκόπιο ενώ για την ανάλυση των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στο συνεστιακό μικροσκόπιο χρησιμοποιήθηκε η γλώσσα προγραμματισμού Matlab (Mathworks, έκδοση R2018b). Ως κριτήριο για τη στατιστική σημαντικότητα θεωρήθηκε η κρίσιμη τιμή p (*p-value*), με όριο σημαντικότητας το 5%. Άρα στατιστικά σημαντικό θεωρείται ένα αποτέλεσμα όταν ισχύει η συνθήκη $p<0.05$. Οι στατιστικοί έλεγχοι που χρησιμοποιήθηκαν είναι ο αμφίπλευρος t-test έλεγχος 2 ανεξάρτητων δειγμάτων (two-tailed unpaired t-test) για την περίπτωση που τα δεδομένα ακολουθούν κανονική κατανομή και ο μη παραμετρικός έλεγχος *Mann-Whitney* (Mann & Whitney, 1947) όταν τα δεδομένα δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή. Για τον έλεγχο της κανονικότητας των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το τεστ κανονικότητας Shapiro-Wilk (Shapiro & Wilk, 1965), ενώ για τη στατιστική σύγκριση μεταξύ διαφορετικών κατανομών χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος κανονικότητας *Kolmogorov-Smirnov*. Για τα τελικά στατιστικά αποτελέσματα πραγματοποιείται επιπλέον ο έλεγχος πολλαπλών συγκρίσεων που ακολουθεί τη μέθοδο *Holm-Bonferroni (Holm, 1979)* για τη διόρθωση των *p-values*. Συγκεκριμένα, η μικρότερη πιο σημαντική τιμή του p-value (για p-value < 0.05) πολλαπλασιάζεται με τον αριθμό των συνολικών συγκρίσεων N, η αμέσως επόμενη μεγαλύτερη με το N-1 , η επόμενη μεγαλύτερη με το N-2 και η διαδικασία συνεχίζεται για όλα τα στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. Για τις νέες τιμές του p-value που θα προκύψουν, το κατώφλι σημαντικότητας παραμένει το 5% (p-value<0.05).

Στα διαγράμματα όπου το στατιστικό αποτέλεσμα παρουσιάζεται με αστερίσκους , ισχύει:

p-value < 0.05 → *

p-value < 0.01 → **

p-value < 0.001 → ***

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας διακρίνονται σε τρείς κατηγορίες: α) την ανάπτυξη υπολογιστικών προγραμμάτων μακροεντολών (scripts) για την προ-επεξεργασία εικόνων μικρογλοίας από διφωτονικό και συνεστιακό μικροσκόπιο, β) την ανάπτυξη υπολογιστικής εφαρμογής για την αυτοματοποιημένη ανάλυση της μορφολογίας της μικρογλοίας σε διάφορα στάδια εξέλιξης της παθολογίας της Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας (ΠΑΕ) και σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου ποντικών και γ) την ανάλυση της μικρογλοιακής επιτήρησης και της κινητικότητας των προεκβολών της στο φλοιό του εγκεφάλου ποντικών κατά την ΠΑΕ. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα και των τριών κατηγοριών που από κοινού συνέβαλλαν τελικά στην ανάπτυξη ενός αυτοματοποιημένου υπολογιστικού πρωτοκόλλου ανάλυσης της μορφολογίας και της κινητικότητας της μικρογλοίας του εγκεφάλου, που δύναται να χρησιμοποιηθεί σε γενικότερο πλαίσιο για τη μελέτη της δυναμικής των κυττάρων αυτών τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ 1:

Ανάπτυξη υπολογιστικών προγραμμάτων μακροεντολών (scripts) για την προ-επεξεργασία εικόνων μικρογλοίας από διφωτονικό και συνεστιακό μικροσκόπιο.

1.1 Ανάπτυξη προγράμματος μακροεντολών για την προ-επεξεργασία εικόνων μικρογλοίας από διφωτονικό μικροσκόπιο.

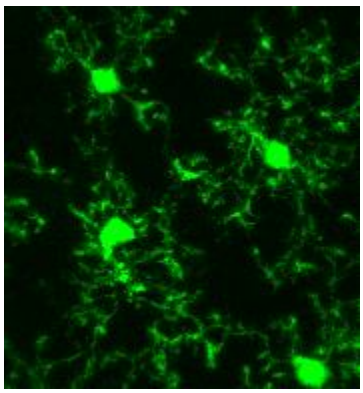
Τα πειράματα με τη χρήση διφωτονικού μικροσκοπίου υλοποιήθηκαν με σκοπό να ληφθούν εικόνες τριών διαστάσεων (3D) από το φλοιό του εγκεφάλου ποντικών σε ένα χρονικό εύρος 20 λεπτών, ώστε να γίνει εφικτή η άντληση πληροφοριών για την κινητικότητα των μικρογλοιακών κυττάρων σε διάφορα χρονικά σημεία εξέλιξης της ΠΑΕ. Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά τροποποιημένοι ποντικοί *CX3CR1-GFP,* οι οποίοι φέρουν το φθοριόχρωμα GFP σε κύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη CX3CR1, δηλαδή συγκεκριμένα στη μικρογλοία και τα μακροφάγα. Αρχικά πραγματοποιήθηκε αναισθητοποίηση των ποντικών με μείγμα κεταμίνης/ξυλαζίνης και

στη συνέχεια κρανιοτομή στην περιοχή του φλοιού του εγκεφάλου με τη μέθοδο του ανοικτού παραθύρου, όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Οι αναισθητοποιημένοι ποντικοί τοποθετήθηκαν κάτω από το διφωτονικό μικροσκόπιο και τα μικρογλοιακά κύτταρα παρατηρήθηκαν ως προς τη μορφολογία και την κινητικότητά τους σε μεγάλο βάθος από την επιφάνεια του ιστού (200μm). Αυτό συνέβη ώστε να μη συμπεριληφθούν στη μελέτη τα επιφανειακά κύτταρα που είναι ενεργοποιημένα λόγω του τραυματισμού του ιστού κοντά στο σημείο της τομής αλλά και λόγω της άμεσης επαφής τους με το περιβάλλον μέσω του ανοικτού παραθύρου.

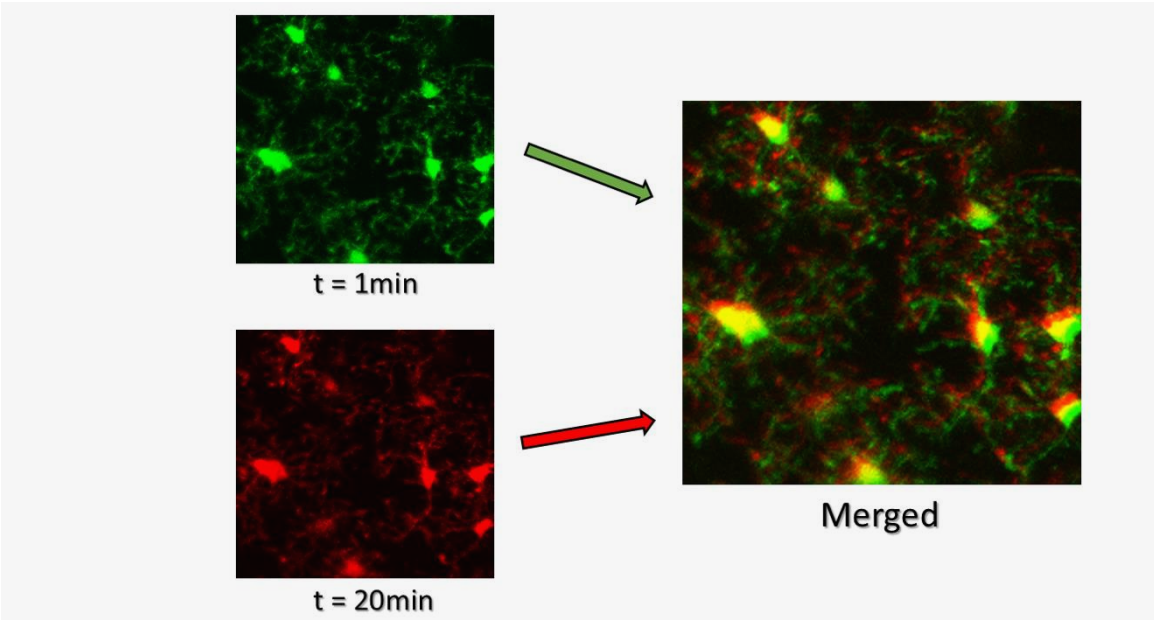
Το διφωτονικό μικροσκόπιο, λόγω των αρχών λειτουργίας του, μειώνει αισθητά τα φαινόμενα φωτοτοξικότητας και δευτερεύοντος φθορισμού που μπορούν να προκαλέσουν θόρυβο στο τελικό σήμα. Παρ'όλα αυτά, οι αρχικές εικόνες της μικρογλοίας από το διφωτονικό μικροσκόπιο στα in vivo πειράματα χαρακτηρίζονται από 2 στοιχεία που χρίζουν μεταγενέστερης επεξεργασίας:

1. Υπάρχει σχετικός θόρυβος στη συνολική εικόνα που προκύπτει από την ένταση του GFP φθοριοχρώματος και εμποδίζει τη διάκριση κοντινών μικρογλοιακών προεκβολών ως ανεξάρτητες δομές (Εικ.1.1.).

2. Υπάρχει ολική μετατόπιση της εικόνας στον xy άξονα (drifting) που προκύπτει από τη φυσική αναπνοή του αναισθητοποιημένου ποντικού και άλλες μικρές αναταράξεις του συστήματος (Εικ.1.2.).



Εικ.1.1. Εστιασμένη εικόνα πριν την προ-επεξεργασία από περιοχή του φλοιού του εγκεφάλου, στην οποία απεικονίζονται μικρογλοιακά κύτταρα μαζί με τις προεκβολές τους. Λόγω της έντασης του GFP φθοριοχρώματος, το τελικό αποτέλεσμα περιλαμβάνει θόρυβο που εμφανίζεται ως θολή παραμόρφωση λόγω της παρουσίας πλεονάζοντων εικονοστοιχείων (pixels). Το φαινόμενο παρουσιάζεται πιο έντονο στις προεκβολές του μικρογλοιακού κυττάρου.



Εικ.1.2. Το φαινόμενο της μετατόπισης της εικόνας στον xy άξονα (drifting) μεταξύ του πρώτου και του τελευταίου χρονικού σημείου. Με πράσινο χρώμα διακρίνεται η εικόνα στο πρώτο επίπεδο της 3D στοίβας και στο πρώτο χρονικό σημείο (t=1min). Με κόκκινο χρώμα η ίδια ακριβώς εικόνα στο τελευταίο χρονικό σημείο(t=20min). Δεξιά φαίνεται η συνένωση των δύο εικόνων (merged). Το επικαλυπτόμενο σήμα που προέρχεται από την επικάλυψη του κόκκινου και του πράσινου χρώματος εμφανίζεται με κίτρινο. Η παρουσία μεγάλου ποσοστού πράσινου και κόκκινου χρώματος, ειδικά σε μέρη του κυττάρου που μένουν θεωρητικά σε ακινησία όπως το κυτταρικό σώμα και που ιδανικά θα έπρεπε να παρουσιάζονται μόνο με κίτρινο χρώμα, επιδεικνύει το πρόβλημα της μετατόπισης της εικόνας κατά τα διάφορα χρονικά σημεία της απεικόνισης.

Στην εργασία αυτή αναπτύχθηκε α) μια υπολογιστική μεθοδολογία για την προ-επεξεργασία των εικόνων που να αφαιρεί τον θόρυβο του GFP σήματος και να μετατρέπει τις μικρογλοιακές προεκβολές σε πιο ευδιάκριτες δομές, β) ένα υπολογιστικό πρωτόκολλο για τη διόρθωση της μετατόπισης της εικόνας και γ) ένα συνολικό πρόγραμμα μακροεντολών που πραγματοποιεί τις παραπάνω μεθοδολογίες με αυτόματο τρόπο και συμβάλλει έτσι στην ταχεία προ-επεξεργασία μεγάλου όγκου δεδομένων διφωτονικού μικροσκοπίου. Λεπτομέρειες των διαδικασιών αυτών περιγράφονται παρακάτω:

Α) Διόρθωση θορύβου GFP σήματος

Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το ελεύθερο λογισμικό επεξεργασίας εικόνας *ImageJ2/Fiji,* το οποίο προσφέρει τη δυνατότητα στο χρήστη να εφαρμόσει διάφορα προϋπάρχοντα φίλτρα επεξεργασίας στις εικόνες του αλλά και να αναπτύξει τα δικά του προγράμματα μακροεντολών ώστε να ομαδοποιήσει την εκτέλεση όλων των βημάτων προεπεξεργασίας των εικόνων για μεγάλο όγκο δεδομένων.

Η επιλογή των φίλτρων πραγματοποιήθηκε με τέτοιο τρόπο ώστε να αφαιρεθεί σταδιακά ο θόρυβος από την εικόνα με τη λιγότερη δυνατή απώλεια πληροφορίας ιδίως στο σήμα που προέρχεται από τις μικρογλοιακές προεκβολές. Οι εικόνες λήφθηκαν από το διφωτονικό μικροσκόπιο σε μορφή Leica Image File Format (lif) αρχείου, μεταμορφώθηκαν στο λογισμικό ImageJ και στη συνέχεια ακολουθήθηκε μια συγκεκριμένη μεθοδολογία με σειριακή εφαρμογή των φίλτρων απεικόνισης όπως αυτά εμφανίζονται παρακάτω:

Βήμα 1: Φίλτρο Despeckle

Το φίλτρο *despeckle* αφαιρεί το θόρυβο από τις εικόνες χωρίς να θολώνει τις ακμές. Η λειτουργία του βασίζεται στην αναγνώριση πολύπλοκων περιοχών σήματος, τις οποίες αφήνει ανέπαφες, ενώ για τις υπόλοιπες εφαρμόζεται ένα φίλτρο διαμέσου (median filter) για την απομάκρυνση του θορύβου. Το φίλτρο που χρησιμοποιήθηκε είναι 3x3 και ελέγχει για κάθε εικονοκύτταρο (pixel) τα 8 γειτονικά του. Η τελική τιμή που εφαρμόστηκε στο pixel είναι η τιμή της διαμέσου όπως αυτή υπολογίστηκε και για τα 9 pixels που καλύπτει το φίλτρο. Στο λογισμικό ImageJ, το φίλτρο despeckle βρίσκεται στο μενού process και στο υπομενού noise.

Βήμα 2: Φίλτρο Διαμέσου

Το φίλτρο despeckle χρησιμοποιεί το δικό του φίλτρο διαμέσου για απομάκρυνση θορύβου αλλά μόνο στις περιοχές που δεν υπάρχει μεγάλη πολυπλοκότητα σήματος. Για το λόγο αυτό, η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε χρησιμοποιεί ένα ακόμα φίλτρο διαμέσου, σχεδιασμένο με ένα κατώφλι για πολύ χαμηλό επίπεδο φωτεινότητας (0.2) με σκοπό την αφαίρεση θορύβου και από πιο περίπλοκες περιοχές που πιθανόν να μην εντοπίστηκαν κατά το στάδιο της εφαρμογής του φίλτρου despeckle. Στο ImageJ η επιλογή για το φίλτρο διαμέσου βρίσκεται στο μενού process και στο υπομενού filters.

Βήμα 3: Αφαίρεση θορύβου φόντου (subtracting background filter)

Μετά τη βελτίωση της εικόνας από τα 2 πρώτα στάδια, εφαρμόστηκε ένα τρίτο φίλτρο που χρησιμοποιήθηκε για την απομάκρυνση του θορύβου φόντου (background noise). Το φίλτρο subtracting background αφαιρεί το συνεχή θόρυβο φόντου χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο *της κυλιόμενης σφαίρας* (Stanley Sternberg, 1983). Ο αλγόριθμος υποθέτει ότι η εικόνα αντιπροσωπεύει μια τρισδιάστατη επιφάνεια με τις τιμές του κάθε pixel να αντιστοιχούν στο ύψος της εικόνας και θεωρεί μια σφαίρα που κυλάει στο πάνω μέρος της επιφάνειας δημιουργώντας το φόντο. Η ακτίνα της σφαίρας επιλέχθηκε με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι τουλάχιστον ίση με την ακτίνα του μεγαλύτερου αντικειμένου στην εικόνα που αντιπροσωπεύει σήμα και όχι φόντο. Για τις εικόνες του διφωτονικού μικροσκοπίου χρησιμοποιήθηκε ακτίνα 20 pixels (περίπου 10μm), που αντιπροσωπεύει προσεγγιστικά την ακτίνα του κυτταρικού σώματος το οποίο είναι το μεγαλύτερο αντικείμενο που αναμένεται στην περιοχή απεικόνισης. Για τη δημιουργία του background το φίλτρο χρησιμοποιεί ένα συνδυασμό ενός 3x3 μάξιμουμ φίλτρου και ενός 3x3 φίλτρου μέσης τιμής για την αφαίρεση των απομακρυσμένων pixels (outliers) και την εξομάλυνση μέσω αφαίρεσης θορύβου. Στο ImageJ η επιλογή για το φίλτρο της αφαίρεσης φόντου (subtracting background) βρίσκεται στο μενού process.

Βήμα 4: Φίλτρο unsharp mask

Το φίλτρο unsharp mask δημιουργεί μια μάσκα της αρχικής εικόνας με θολές λεπτομέρειες χρησιμοποιώντας την τεχνική της θόλωσης Γκάους(Gaussian Blur). Αυτή η εικόνα αφαιρείται στη συνέχεια από την αρχική λειτουργώντας έτσι σαν υψιπερατό φίλτρο που επιτρέπει τις υψηλότερες συχνότητες ενώ κόβει τις χαμηλότερες, δημιουργώντας μια νέα εικόνα με μεγαλύτερη ευκρίνεια στις άκρες αλλά και με το μειονέκτημα της πιθανής απώλειας πληροφορίας. Οι παράμετροι του φίλτρου είναι η ακτίνα που χρησιμοποιείται κατά την εφαρμογή της Gaussian θόλωσης και η οποία καθορίζει το επίπεδο θόλωσης (μεγαλύτερη ακτίνα οδηγεί σε μεγαλύτερη θόλωση) και το επίπεδο δύναμης φιλτραρίσματος που ορίζεται σαν mask weight και καθορίζει το κατώφλι των συχνοτήτων που θα επιτρέπεται να περάσουν από το φίλτρο. Η επιλογή των 2 παραμέτρων ορίστηκε ως 1 για την ακτίνα και 0.2 για το mask weight και έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε να βελτιωθεί η ευκρίνεια στις ακμές της εικόνας με τη μικρότερη δυνατή απώλεια σήματος. Το φίλτρο unsharp mask εντοπίζεται στο μενού process και στο υπομενού filters στο ImageJ.

Βήμα 5: Φίλτρο εξομάλυνσης (smoothing filter)

Σε αυτό το βήμα εφαρμόστηκε ένα επιπλέον 3x3 φίλτρο μέσης τιμής το οποίο αντικαθιστά την τιμή για το κεντρικό pixel του φίλτρου με το μέσο όρο των τιμών όλων των γειτονικών pixels, με σκοπό την περαιτέρω εξομάλυνση των ακμών που προέκυψαν από το προηγούμενο στάδιο. Το φίλτρο smooth βρίσκεται στο μενού process του ImageJ.

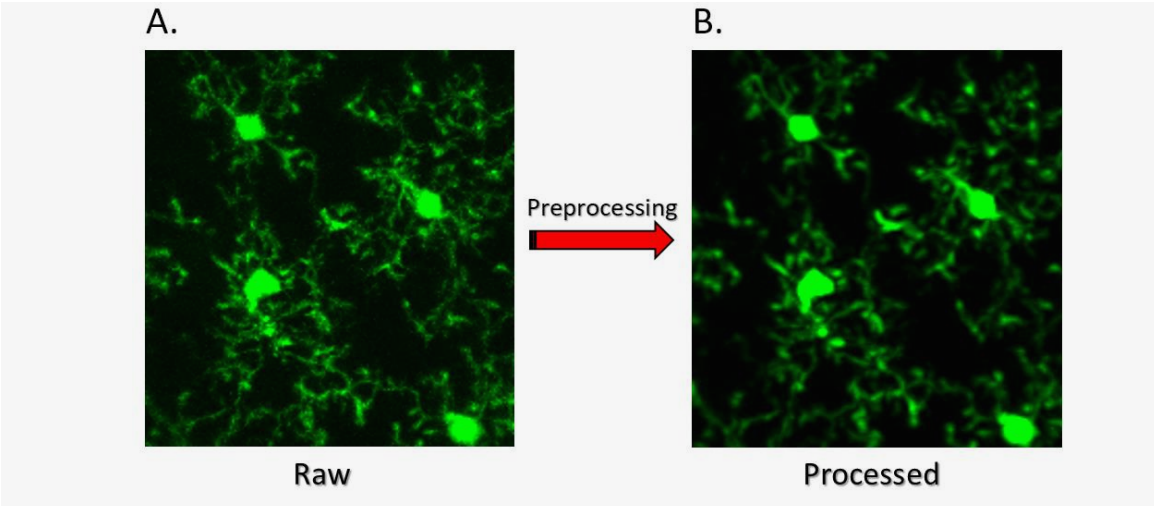
Βήμα 6: Αφαίρεση θορύβου φόντου (subtracting background filter)

Μετά τη βελτίωση της ευκρίνειας της εικόνας όπως προέκυψε από την εφαρμογή των φίλτρων όλων των προηγούμενων σταδίων, εφαρμόστηκε σαν τελικό βήμα για δεύτερη φορά το φίλτρο αφαίρεσης θορύβου φόντου χρησιμοποιώντας και πάλι τον αλγόριθμο κυλιόμενης σφαίρας με ακτίνα 20.

Βήμα 7: Bleach Correction

Το φαινόμενο του photobleaching (φωτολεύκανση) δημιουργείται όταν το δείγμα μένει για μεγάλο χρονικό διάστημα εκτεθειμένο στην ακτινοβολία, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει πρόβλημα στην ικανότητα φθορισμού του που μεταφράζεται σε χαμηλότερη ένταση φωτεινότητας κατά τη διάρκεια της απεικόνισης, ειδικότερα στα τελευταία στάδιά της. Για τη βελτίωση του προβλήματος του photobleaching χρησιμοποιήθηκε το φίλτρο *Bleach Correction* μετά τη μετατροπή της εικόνας σε maximum projection. Το φίλτρο υπολογίζει μία μέση τιμή έντασης φωτεινότητας για όλες τις επιμέρους εικόνες μιας στοίβας και κανονικοποιεί κάθε εικόνα με βάση αυτή τη μέση τιμή.

Η εφαρμογή των φίλτρων είναι απαραίτητο να πραγματοποιείται με τη συγκεκριμένη σειρά που αναφέρεται ώστε να προκύψει σταδιακή βελτίωση του αποτελέσματος της τελικής εικόνας με τη μικρότερη δυνατή απώλεια πληροφορίας (Εικ.1.3.).



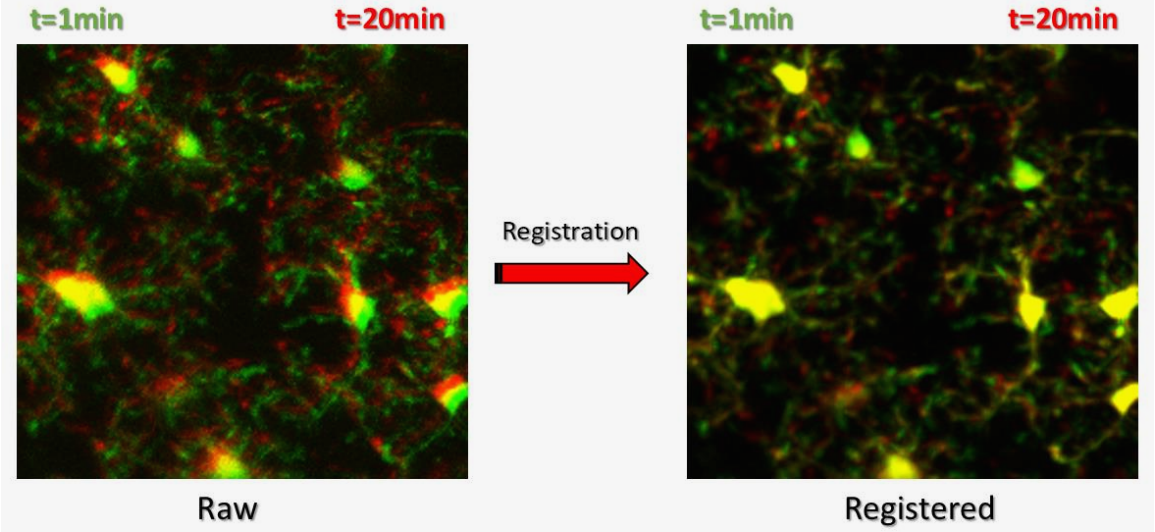
Εικ.1.3. Εικόνα μικρογλοιακών κυττάρων από διφωτονικό μικροσκόπιο στην περιοχή του φλοιού του εγκεφάλου πριν και μετά την επεξεργασία. **Α.** Ακατέργαστη εικόνα, διακρίνεται ο θόρυβος του σήματος κυρίως γύρω από τις μικρογλοιακές προεκβολές. **Β.** Μετά τα στάδια της προ-επεξεργασίας και την εφαρμογή των φίλτρων, ο θόρυβος έχει ελαχιστοποιηθεί και οι μικρογλοιακές προεκβολές είναι ευδιάκριτες.

Τα φίλτρα που χρησιμοποιήθηκαν στο στάδιο της προ-επεξεργασίας εφαρμόστηκαν στο στάδιο της τρισδιάστατης στοίβας (z stack), πριν δηλαδή την τελική εικόνα που προκύπτει μετά την εικόνα μέγιστης προβολής (maximum projection), με εξαίρεση το τελευταίο στάδιο (bleach correction) που εφαρμόζεται στη maximum projection εικόνα. Αυτό συνέβη ώστε να προκύπτει ομοιομορφία των επιμέρους εικόνων που θα συνδυαστούν για το τελικό αποτέλεσμα αλλά και για να διευκολυνθεί το στάδιο της διόρθωσης μετατόπισης των εικόνων στον xy άξονα.

Β) Διόρθωση μετατόπισης εικόνας στον xy άξονα

Για τη διόρθωση του προβλήματος της μετατόπισης της εικόνας στον άξονα xy, αρχικά πραγματοποιήθηκε πειραματική τροποποίηση για τη λήψη των δεδομένων. Συγκεκριμένα, η διαδικασία απεικόνισης υλοποιήθηκε σε 3 χρονικά στάδια ανάμεσα στα οποία γινόταν αναπροσαρμογή του σημείου εστίασης. Συγκεκριμένα, στο πρώτο στάδιο η απεικόνιση διαρκούσε πέντε λεπτά και στη συνέχεια διακοπτόταν ώστε να αναπροσαρμοστεί το σημείο εστίασης στις αρχικές του συντεταγμένες. Στο δεύτερο στάδιο η απεικόνιση διαρκούσε δέκα λεπτά , ακολουθώντας εκ νέου αναπροσαρμογή

του σημείου εστίασης και το τελικό στάδιο είχε διάρκεια 5 λεπτών ώστε να ληφθεί η τελική εικόνα στο επίπεδο των τεσσάρων διαστάσεων (x-y-z-t), διάρκειας είκοσι λεπτών συνολικά. Σε μεταγενέστερο υπολογιστικό στάδιο χρησιμοποιήθηκαν 2 plugins του λογισμικού ImageJ. Η αρχική διόρθωση πραγματοποιήθηκε στην τρισδιάστατη στοίβα, αφού πρώτα οι εικόνες αυτής υπέστησαν την κατάλληλη προ-επεξεργασία με τα φίλτρα που αναφέρθηκαν. Αυτή η αρχική διόρθωση υλοποιήθηκε μέσω του plugin *Correct 3D Drift* (Parslow et al., 2014), το οποίο βασίζεται στον αλγόριθμο συσχέτισης φάσης (phase-correlation method). Ο αλγόριθμος αυτός υπολογίζει προσεγγιστικά τη σχετική μετατόπιση παρόμοιων σημείων από εικόνα σε εικόνα. Έτσι, κάθε εικόνα που αποτελεί μέρος της τρισδιάστατης στοίβας ελέγχεται μέσω της μεθόδου συσχέτισης φάσης με τον εαυτό της από το προηγούμενο χρονικό σημείο και σε περίπτωση μετατόπισης η διόρθωση πραγματοποιείται με κριτήριο σταθερότητας κατά κύριο λόγο το κυτταρικό σώμα της πρώτης χρονικά εικόνας. Αυτή η διαδικασία εξασφαλίζει τη σταθερότητα για κάθε επίπεδο της κάθε τρισδιάστατης στοίβας σε όλα τα χρονικά σημεία της απεικόνισης. Το δεύτερο στάδιο της διόρθωσης πραγματοποιήθηκε στην εικόνα maximum projection από τις ήδη διορθωμένες, μετά από το πρώτο στάδιο, τρισδιάστατες z στοίβες. Το plugin που χρησιμοποιήθηκε για το δεύτερο βήμα διόρθωσης είναι το *MultiStackReg* που αποτελεί εξέλιξη του αλγορίθμου διόρθωσης μετατόπισης *StackReg* (ο αλγόριθμος στον οποίο βασίστηκε το plugin περιγράφεται στο *Thévenaz et al., 1998*). Το plugin MultiStackReg υλοποιήθηκε πάνω στην εικόνα του maximum projection ώστε να διορθώσει τυχόν προβλήματα ευθυγράμμισης που παρέμειναν μετά την εφαρμογή του πρώτου σταδίου, το οποίο εφαρμόστηκε αποκλειστικά στις επιμέρους τρισδιάστατες z στοίβες. Έτσι, αποθηκεύοντας την εικόνα του πρώτου χρονικού παραθύρου (t=1min) σαν εικόνα αναφοράς, ελέγχει όλα τα υπόλοιπα(έως το t=20min) σε σχέση με αυτή και ευθυγραμμίζει και τις υπόλοιπες εικόνες στις συντεταγμένες της πρώτης (Εικ.1.4.).



Εικ.1.4. Διόρθωση του προβλήματος μετατόπισης της εικόνας στο χρόνο, μετά την εφαρμογή των registration plugins στο ImageJ. Αριστερά φαίνεται η μετατοπισμένη ως προς τον xy άξονα εικόνα (από Εικ.4), με μικρό ποσοστό επικάλυψης(κίτρινο χρώμα) του σήματος της ίδιας εικόνας μεταξύ των χρονικών σημείων t=1min(πράσινο χρώμα) και t=20min(κόκκινο χρώμα).Το πρόβλημα είναι περισσότερο εμφανές στο κυτταρικό σώμα που θα αναμενόταν να εμφανίζεται αποκλειστικά ως κίτρινο λόγω ακινησίας. Δεξιά η ίδια εικόνα στα ίδια χρονικά σημεία μετά την εφαρμογή των plugins διόρθωσης. Διακρίνεται σχεδόν απόλυτο ποσοστό επικάλυψης στο κυτταρικό σώμα(κίτρινο χρώμα) που υποδεικνύει διόρθωση του προβλήματος μετατόπισης. Το κόκκινο και πράσινο χρώμα στις μικρογλοιακές προεκβολές απεικονίζει τη φυσιολογική κίνησή τους στο χρόνο.

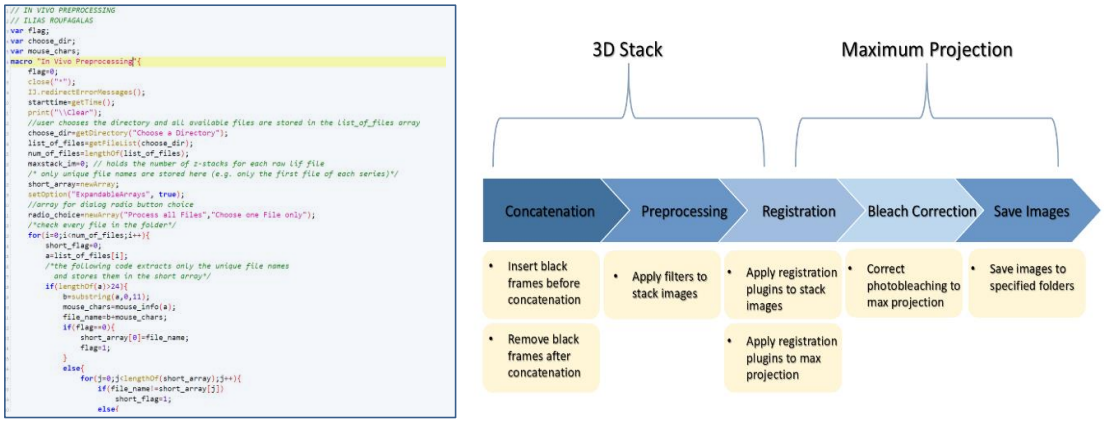
Γ) Δημιουργία προγράμματος μακροεντολών (script) για την αυτόματη προ-επεξεργασία εικόνων διφωτονικού μικροσκοπίου μεγάλου όγκου.

Η εφαρμογή όλων των σταδίων προ-επεξεργασίας των εικόνων που λήφθηκαν από το διφωτονικό μικροσκόπιο είναι χρονοβόρα διαδικασία και λόγω του μεγάλου αριθμού φίλτρων που χρησιμοποιούνται είναι επίσης επιρρεπής σε ανθρώπινα λάθη, γεγονός που είναι πιθανό να επηρεάσει την ομοιομορφία των τελικών αποτελεσμάτων. Ταυτόχρονα, από την πειραματική διαδικασία προέκυψε πολύ μεγάλος αριθμός εικόνων και όγκου δεδομένων (στην κλίμακα των terabytes) που καθιστά πολύ δύσκολη τη διαδικασία προ-επεξεργασίας με χειροκίνητο τρόπο. Για το σκοπό αυτό, αναπτύχθηκε ένα πρόγραμμα μακροεντολών (script) χρησιμοποιώντας την ενσωματωμένη γλώσσα προγραμματισμού του λογισμικού ImageJ (*ImageJ Macro Language- IJM*), το οποίο σχεδιάστηκε ώστε να αυτοματοποιεί τη διαδικασία αλλά και

να εξασφαλίζει την ομοιόμορφη εφαρμογή των φίλτρων προ-επεξεργασίας για κάθε εικόνα.

Το πρόγραμμα ζητάει από το χρήστη να επιλέξει το φάκελο στον οποίο βρίσκονται όλες οι εγγραφές που έχουν ληφθεί κατά την πειραματική διαδικασία του διφωτονικού μικροσκοπίου. Για το σκοπό αυτό, προτείνεται όλες οι εγγραφές να βρίσκονται στον ίδιο φάκελο. Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, για κάθε εικόνα από το μικροσκόπιο προκύπτουν τρεις μεμονωμένες εγγραφές διάρκειας πέντε , δέκα και πέντε λεπτών αντίστοιχα, οι οποίες συνδυαζόμενες παράγουν το τελικό αποτέλεσμα της εικοσάλεπτης εγγραφής για κάθε εικόνα. Για να γίνει η τελική συνένωση των τριών εγγραφών, είναι απαραίτητο αυτές να διαθέτουν τον ίδιο αριθμό επιμέρους εικόνων σε κάθε επίπεδο της τρισδιάστατης z στοίβας τους. Το πρόγραμμα εκτελεί αυτό τον έλεγχο και αν βρεθεί εικόνα με μεγαλύτερο αριθμό τότε προσθέτει στις υπόλοιπες δύο προσωρινά στιγμιότυπα χωρίς την παρουσία σήματος (με μαύρο φόντο), ώστε να γίνει εφικτή η συνένωση των τριών εικόνων σε μία. Επειδή τα μαύρα στιγμιότυπα στο τελικό αποτέλεσμα δημιουργούν αφύσικη στιγμιαία διακοπή στη ροή της κίνησης, το πρόγραμμα ελέγχει ξανά την τελική εικόνα μετά τη συνένωση και αφαιρεί τα πλεονάζοντα μαύρα στιγμιότυπα που προστέθηκαν στο προηγούμενο βήμα.

Στο επόμενο στάδιο το πρόγραμμα εφαρμόζει με την ακολουθία που αναφέρθηκε παραπάνω όλα τα φίλτρα προεπεξεργασίας στην εικόνα σε επίπεδο στοίβας, πριν δηλαδή την τελική της μετατροπή σε maximum projection. Στην προεπεξεργασμένη εικόνα που προκύπτει εφαρμόζεται το πρώτο στάδιο βελτίωσης μετατόπισης (Correct 3D Drift plugin) και στη συνέχεια η επεξεργασμένη εικόνα μετατρέπεται σε εικόνα σε maximum projection, όπου εφαρμόζεται το 2^{ο} στάδιο βελτίωσης χρησιμοποιώντας το MultiStackReg plugin. Στο τελικό αποτέλεσμα εφαρμόζεται επιπλέον το φίλτρο Bleach Correction για τη διόρθωση του φαινομένου της φωτολεύκανσης. Τέλος, για κάθε εικόνα δημιουργείται ένας φάκελος στον οποίο αποθηκεύονται οι ακατέργαστες εικόνες σε τρισδιάστατη στοίβα αλλά και σε maximum projection αλλά και οι τελικά επεξεργασμένες εικόνες που προκύπτουν μετά την εφαρμογή όλων των φίλτρων (Εικ.1.5.).



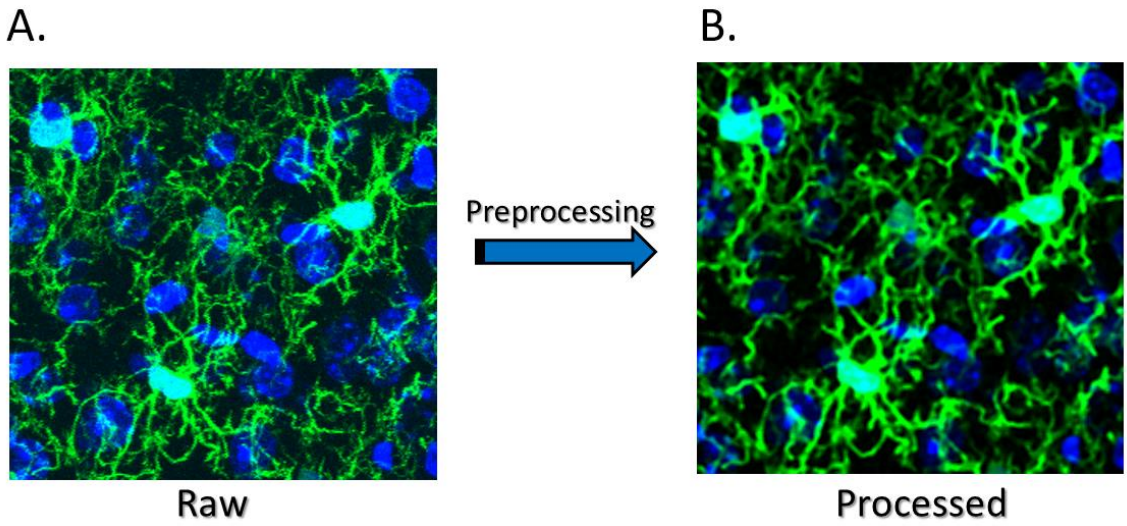
Εικ.1.5. Ένα μικρό κομμάτι του προγράμματος μακροεντολών και η διαδικασία ροής για την υλοποίηση της προεπεξεργασίας της εικόνας. Τα στάδια της συνένωσης και της προ-επεξεργασίας εφαρμόζονται στις εικόνες της τρισδιάστατης στοίβας (3D Stack), η διόρθωση της μετατόπισης πραγματοποιείται αρχικά στη στοίβα και μετά στην εικόνα του maximum projection ενώ η διόρθωση του φαινομένου της φωτολεύκανσης εφαρμόζεται μόνο στο maximum projection. Για κάθε εικόνα αποθηκεύονται σε ξεχωριστό φάκελο τόσο οι αρχικές ακατέργαστες εικόνες (z stack και max projection) όσο και οι τελικές επεξεργασμένες (z stack και max projection). Η διαδικασία γίνεται αυτοματοποιημένα σε όλα τα στάδια και περιορίζει σε πολύ μεγάλο βαθμό τον απαραίτητο χρόνο για την επεξεργασία πολύ μεγάλου όγκου δεδομένων.

1.2. Ανάπτυξη προγράμματος μακροεντολών για την προ-επεξεργασία εικόνων μικρογλοίας από συνεστιακό μικροσκόπιο.

Τα πειράματα με χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου υλοποιήθηκαν για να ληφθούν εικόνες τριών διαστάσεων που θα χρησιμοποιηθούν για τη μορφολογική ανάλυση των μικρογλοιακών κυττάρων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν C57BL/6 ποντικοί, για κάθε έναν από τους οποίους πραγματοποιήθηκε αρχικά ενδοκαρδιακή αφαίμαξη (perfusion) και στη συνέχεια μονιμοποίηση (fixation). Ο εγκέφαλος και ο νωτιαίος μυελός αφαιρέθηκαν με ανατομία και με τη χρήση κρυοστάτη (Leica CM3050 S) κόπηκαν σε τομές πάχους 50μm. Στις τομές έγινε εφαρμογή τεχνικών ανοσοϊστοχημείας κατά τις οποίες χρησιμοποιήθηκαν φθορίζουσες χρωστικές που βάφουν τους πυρήνες των κυττάρων (δείκτης DAPI) αλλά και αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης Iba1 που εκφράζεται στα κύτταρα μυελοειδούς προέλευσης, συμπεριλαμβανομένης της μικρογλοίας και των μακροφάγων. Η παρατήρηση των τομών πραγματοποιήθηκε σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica (TCS SP8 MP).

Κατά τη διαδικασία λήψης των εικόνων χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένες παράμετροι, σταθερές για κάθε τομή ώστε η σύγκριση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν να πραγματοποιηθεί κάτω από τις ίδιες προϋποθέσεις. Το εύρος της z στοίβας ορίστηκε ξεχωριστά για την κάθε εικόνα, με κριτήριο τα μικρογλοιακά κύτταρα της εστιασμένης περιοχής να βρίσκονται στο σύνολό τους εντός της στοίβας και να μη χάνεται καμία πληροφορία για τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά. Κατά μέσο όρο το βάθος της στοίβας που επιλέγεται κυμαίνεται στο εύρος 40-50μm. Οι τελικές εικόνες που λήφθηκαν από το συνεστιακό μικροσκόπιο είναι στη μορφή Tagged Image File Format (tiff) και για την προεπεξεργασία τους χρησιμοποιήθηκε όπως και στην περίπτωση των αποτελεσμάτων του διφωτονικού μικροσκοπίου το λογισμικό ImageJ/Fiji.

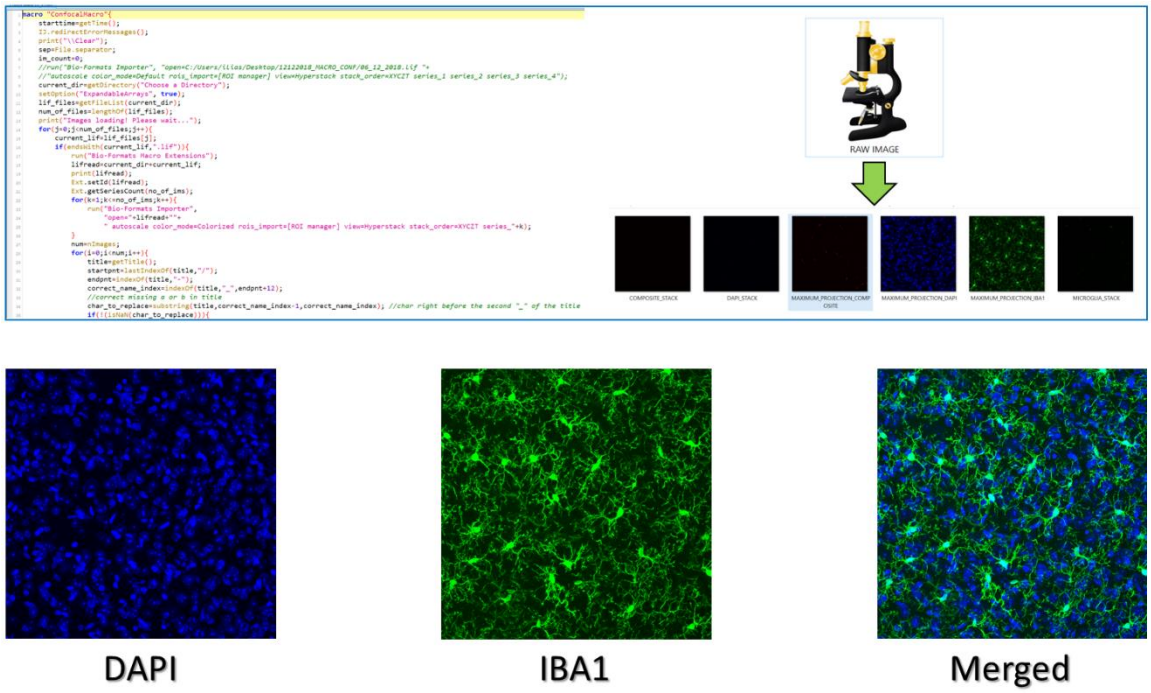
Λόγω της έκθεσης του δείγματος σε έντονη ισχύ ακτινοβολίας για μεγάλο χρονικό διάστημα, οι εικόνες που προκύπτουν χαρακτηρίζονται από θόρυβο που δυσκολεύει την ανάλυσή τους. Όπως και στην περίπτωση των εικόνων του διφωτονικού μικροσκοπίου, οι εικόνες υπόκεινται σε διάφορα βήματα προεπεξεργασίας απαραίτητα για τη βελτίωσή τους πριν το επόμενο στάδιο ανάλυσης. Η διαφορά σε σχέση με τα *in vivo* πειράματα στο διφωτονικό μικροσκόπιο είναι η έλλειψη της μετατόπισης της εικόνας στον xy άξονα που προκύπτει ως αποτέλεσμα της συνεχόμενης αναπνοής του ζωντανού δείγματος. Αυτό περιορίζει την ανάγκη χρήσης ανάλογα μεγάλου αριθμού φίλτρων προεπεξεργασίας για τις εικόνες αυτών των πειραμάτων. Έτσι, τα φίλτρα που χρησιμοποιήθηκαν για την προεπεξεργασία των εικόνων του συνεστιακού μικροσκοπίου είναι τα φίλτρα *despeckle* για την αρχική αφαίρεση του απομακρυσμένου θορύβου σε επίπεδο z στοίβας, το φίλτρο *subtracting background* για την αφαίρεση του θορύβου φόντου και στη συνέχεια εκ νέου το φίλτρο *despeckle* που οδηγεί στην τελική βελτιωμένη εικόνα (Εικ.1.6.). Και τα δύο φίλτρα περιγράφονται με μεγαλύτερη λεπτομέρεια στο προηγούμενο κεφάλαιο. Σημαντική διαφοροποίηση για τα συγκεκριμένα πειράματα είναι ότι λόγω των δύο διαφορετικών χρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν, η κάθε εικόνα αποτελείται από δύο κανάλια κάθε ένα από τα οποία απεικονίζει την ανάλογη πληροφορία (πυρήνες για το κανάλι με τη χρώση DAPI και μικρογλοιακά κύτταρα για το κανάλι με το αντίσωμα IBA1). Τα φίλτρα προεπεξεργασίας χρησιμοποιήθηκαν ξεχωριστά για την κάθε εικόνα στο επίπεδο της τρισδιάστατης στοίβας.



Εικ.1.6. Εστιασμένη εικόνα μικρογλοιακών κυττάρων στο φλοιό του εγκεφάλου, πριν και μετά την προεπεξεργασία. Με γαλάζιο χρώμα εμφανίζονται τα μικρογλοιακά κυτταρικά σώματα, με πράσινο οι μικρογλοιακές προεκβολές και με μπλε τα κυτταρικά σώματα των υπολοίπων κυττάρων του ΚΝΣ (νευρικά κύτταρα, αστροκύτταρα, ολιγοδενδροκύτταρα). **Α.** Αριστερά η ακατέργαστη εικόνα όπως λήφθηκε από το μικροσκόπιο, με θόρυβο που εμφανίζεται με τη μορφή θολής εικόνας κυρίως στις ακμές που δυσκολεύει τη διάκριση των λεπτομερειών των μικρογλοιακών προεκβολών. **Β.** Δεξιά η ίδια εικόνα μετά την εφαρμογή των φίλτρων προεπεξεργασίας. Ο θόρυβος έχει απομακρυνθεί και η αντίθεση της εικόνας έχει εξομαλυνθεί, κάνοντας ευκολότερη τη διάκριση των λεπτομερειών του μικρογλοιακού κυττάρου. Η διαδικασία προεπεξεργασίας εφαρμόστηκε αυτόματα με τον ίδιο ακριβώς τρόπο για κάθε εικόνα που λήφθηκε από το μικροσκόπιο ώστε να εξασφαλιστεί η ομοιομορφία και η συγκρισιμότητα των τελικών αποτελεσμάτων.

Όπως και στην περίπτωση του διφωτονικού μικροσκοπίου, τα τελικά αποτελέσματα απαιτούν ομοιομορφία η οποία είναι δύσκολο να εξασφαλιστεί εφαρμόζοντας ένα χειροκίνητο τρόπο προεπεξεργασίας των εικόνων. Ταυτόχρονα, ο πολύ μεγάλος όγκος δεδομένων που προέκυψε από τη λήψη των εικόνων αλλά και η απαίτηση της οργάνωσής τους με γρήγορο και αξιόπιστο τρόπο δημιούργησε την ανάγκη να χρησιμοποιηθεί ένας αυτόματος τρόπος για όλη τη διαδικασία προεπεξεργασίας. Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση, αναπτύχθηκε ένα πρόγραμμα μακροεντολών χρησιμοποιώντας την ενσωματωμένη γλώσσα προγραμματισμού του λογισμικού ImageJ (*ImageJ Macro Language- IJM*). Πέρα από την αυτόματη εφαρμογή των σταδίων προεπεξεργασίας με τη χρήση των φίλτρων που

αναφέρθηκαν, το πρόγραμμα μακροεντολών που σχεδιάστηκε για τις εικόνες του συνεστιακού μικροσκοπίου προσφέρει γρήγορη και αξιόπιστη οργάνωση των δεδομένων δημιουργώντας για κάθε εικόνα το δικό της φάκελο στον οποίο δημιουργεί και αποθηκεύει μια προεπεξεργασμένη εικόνα που αντιστοιχεί στα μικρογλοιακά κύτταρα (IBA1 staining), την αντίστοιχη που αντιστοιχεί μόνο στους πυρήνες των κυττάρων (DAPI staining) αλλά και τη συνένωσή τους (Εικ.1.7.).

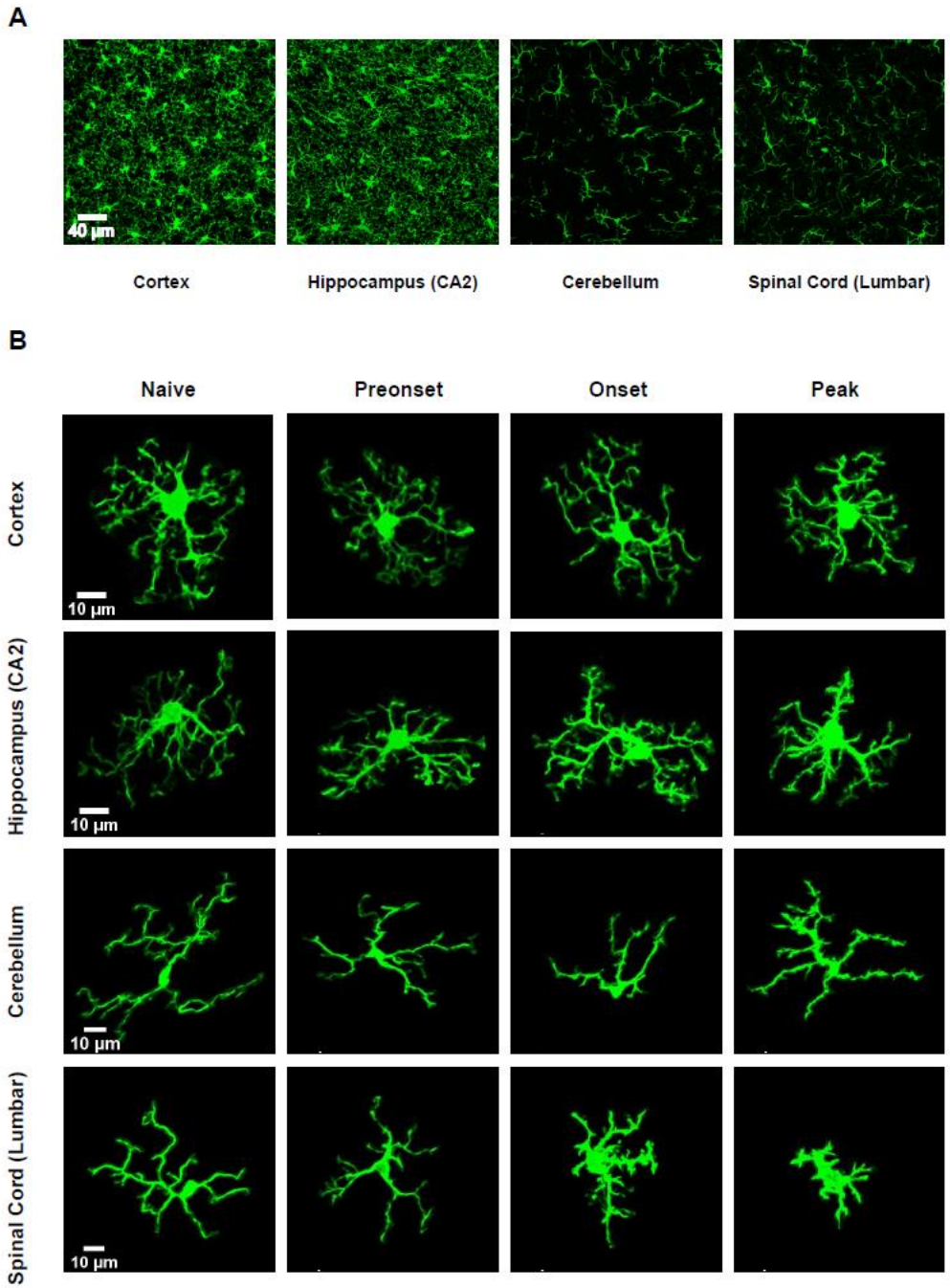


Εικ.1.7. Το πρόγραμμα μακροεντολών που αναπτύχθηκε για την προεπεξεργασία και την αποθήκευση των εικόνων και η οργάνωσή τους σε φακέλους. **Α.** Το πρόγραμμα ζητάει από το χρήστη το directory στο οποίο είναι αποθηκευμένες οι ακατέργαστες εικόνες(raw image) από το συνεστιακό μικροσκόπιο. Τις ανοίγει αυτόματα και σειριακά χρησιμοποιώντας το λογισμικό ImageJ2/Fiji, εφαρμόζει τα φίλτρα προεπεξεργασίας για τη βελτίωσή τους, δημιουργεί ένα ξεχωριστό φάκελο για κάθε μία από αυτές και αποθηκεύει ξεχωριστά τις εικόνες που αντιστοιχούν σε κάθε χρώση που χρησιμοποιήθηκε τόσο ως τρισδιάστατη στοίβα όσο και ως maximum projection, ενώ αποθηκεύει και τη συνένωσή τους. Το πρόγραμμα αναπτύχθηκε ώστε να χειρίζεται με μεγάλη ταχύτητα και οργάνωση πολύ μεγάλο όγκο δεδομένων. **Β.** Παράδειγμα εικόνων που παράγονται από το πρόγραμμα, σε maximum projection, από την περιοχή του φλοιού του εγκεφάλου. Αριστερά με μπλε οι πυρήνες όλων των κυττάρων που εντοπίζονται στην περιοχή εστίασης (χρώση DAPI), στο κέντρο με πράσινο τα μικρογλοιακά κύτταρα (χρώση IBA1) και δεξιά η συνένωση των 2 εικόνων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ 2:

Ανάπτυξη υπολογιστικής εφαρμογής για την αυτοματοποιημένη ανάλυση της μορφολογίας της μικρογλοίας σε διάφορα στάδια εξέλιξης της ΠΑΕ και σε διάφορες περιοχές του ΚΝΣ.

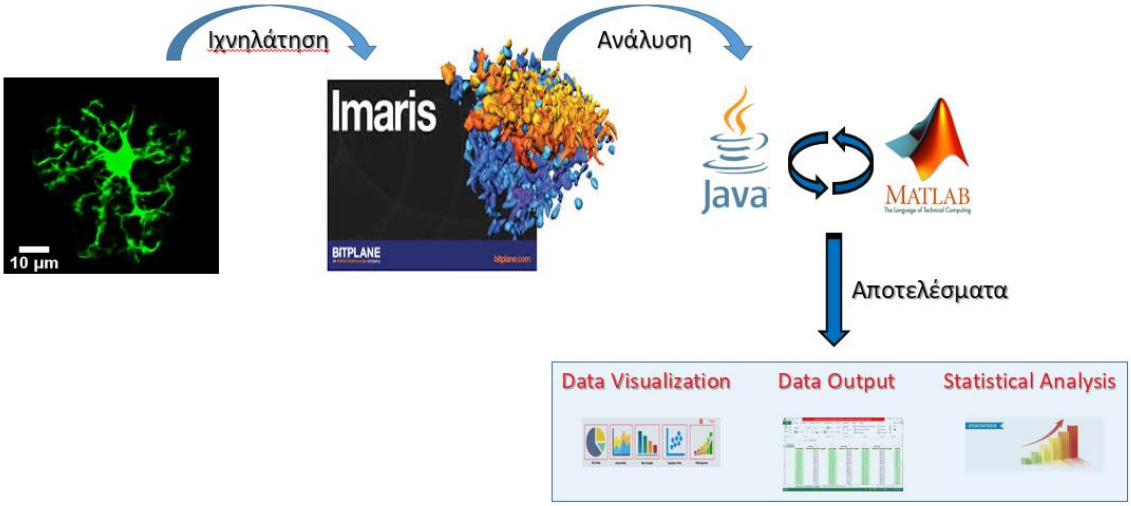
Ένας από τους σκοπούς της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας ήταν η ανάπτυξη υπολογιστικών μεθόδων για την ανάλυση της μορφολογίας της μικρογλοίας σε διάφορα στάδια εξέλιξης της Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας (ΠΑΕ) και σε διάφορες περιοχές του ΚΝΣ που επηρεάζονται από αυτή τη νόσο. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε επαγωγή της ΠΑΕ σε θηλυκούς C57BL/6 ποντικούς και απομονώθηκαν ιστοί εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού σε 3 προ-κλινικά στάδια της νόσου (dpi3, dpi6 και dpi9), στην έναρξη της νόσου (onset) καθώς και στο στάδιο κορύφωσης της κλινικής συμπτωματολογίας (peak), όπως περιγράφεται αναλυτικά στα Υλικά και Μέθοδοι. Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκαν τομές εγκεφάλου σε κρυοστάτη, ανοσοϊστοχημεία με το μικρογλοιακό δείκτη Iba1 και συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού, εστιάζοντας σε τρεις περιοχές φαιάς ουσίας του εγκεφάλου (ιππόκαμπος, φλοιός, παρεγκεφαλίδα) καθώς και στο νωτιαίο μυελό (Εικ.2.1.). Ακολούθησε προ-επεξεργασία των εικόνων συνεστιακής μικροσκοπίας, όπως περιγράφεται παραπάνω, και οι εικόνες αυτές τελικά χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό μιας αυτοματοποιημένης υπολογιστικής ανάλυσης της μορφολογίας της μικρογλοίας.



Εικ.2.1. Μικρογλοιακά κύτταρα από εικόνες συνεστιακού μικροσκοπίου σε εστιασμένες περιοχές του φλοιού του εγκεφάλου (cortex), του ιπποκάμπου (περιοχή CA2), της παρεγκεφαλίδας (cerebellum) και της οσφυϊκής περιοχής του νωτιαίου μυελού (spinal cord-lumbar). Τα μικρογλοιακά κύτταρα παρουσιάζουν μορφολογική ποικιλότητα αλλά και διαφορετική πυκνότητα κατανομής μεταξύ των διαφορετικών περιοχών. **Β. Απομονωμένα μικρογλοιακά κύτταρα από υγιείς ποντικούς και από ποντικούς στο προ-κλινικό στάδιο (6η μέρα), στο στάδιο της έναρξης και στο στάδιο της κορύφωσης για όλες τις περιοχές του ΚΝΣ που αναλύθηκαν.** Κατά την εξέλιξη της νόσου είναι εμφανείς οι μορφολογικές

διαφορές των κυττάρων στα στάδια έναρξης και κορύφωσης. Στην περίπτωση της παρεγκεφαλίδας, διακρίνονται διαφορές από το προ-κλινικό στάδιο(6η μέρα). Για την περίπτωση του νωτιαίου μυελού, η ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων από το στάδιο της έναρξης κάνει αδύνατη τη μορφολογική τους ανάλυση με τη μεθοδολογία που αναπτύχθηκε. Για το λόγο αυτό, δε συμπεριλήφθηκε η περιοχή στη συνέχεια της μελέτης.

Η ανάλυση της μορφολογίας της μικρογλοίας πραγματοποιήθηκε σε κυτταρικό επίπεδο (cell-based analysis), διαδικασία που περιγράφεται αναλυτικά στα Υλικά και Μέθοδοι. Τα απομονωμένα κύτταρα εν συνεχεία επεξεργάστηκαν ακολουθώντας συγκεκριμένη μεθοδολογία. Στο πρώτο βήμα πραγματοποιήθηκε ιχνηλάτηση των μικρογλοιακών κυττάρων χρησιμοποιώντας τα λογισμικά *Vaa3D* (Peng et al., 2010), *Neutube* (Feng et al, 2015) και *Imaris* (Oxford Intruments, Bitplane). Για την τελική ανάλυση, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Imaris για την ιχνηλάτηση ενώ τα λογισμικά ανοικτού κώδικα Neutube και Vaa3d χρησιμοποιήθηκαν για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από το λογισμικό Imaris (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Σε δεύτερο βήμα, οι πληροφορίες για το κύτταρο που προέκυψαν από το βήμα της ιχνηλάτησης αναλύθηκαν μέσω της εφαρμογής MicroApp που αναπτύχθηκε στο πλαίσιο της εργασίας αυτής χρησιμοποιώντας τις γλώσσες προγραμματισμού Java και Matlab και από αυτή προκύπτουν τα τελικά αποτελέσματα της ανάλυσης σε γραφική μορφή αλλά και σε αριθμητική μορφή αποθηκευμένη σε ένα αρχείο excel που περιέχει τις τελικές πληροφορίες για όλα τα κύτταρα. Επιπρόσθετα, η εφαρμογή εκτελεί αυτόματα όλους τους απαραίτητους στατιστικούς ελέγχους για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων (Εικ.2.2.), όπως περιγράφεται παρακάτω:

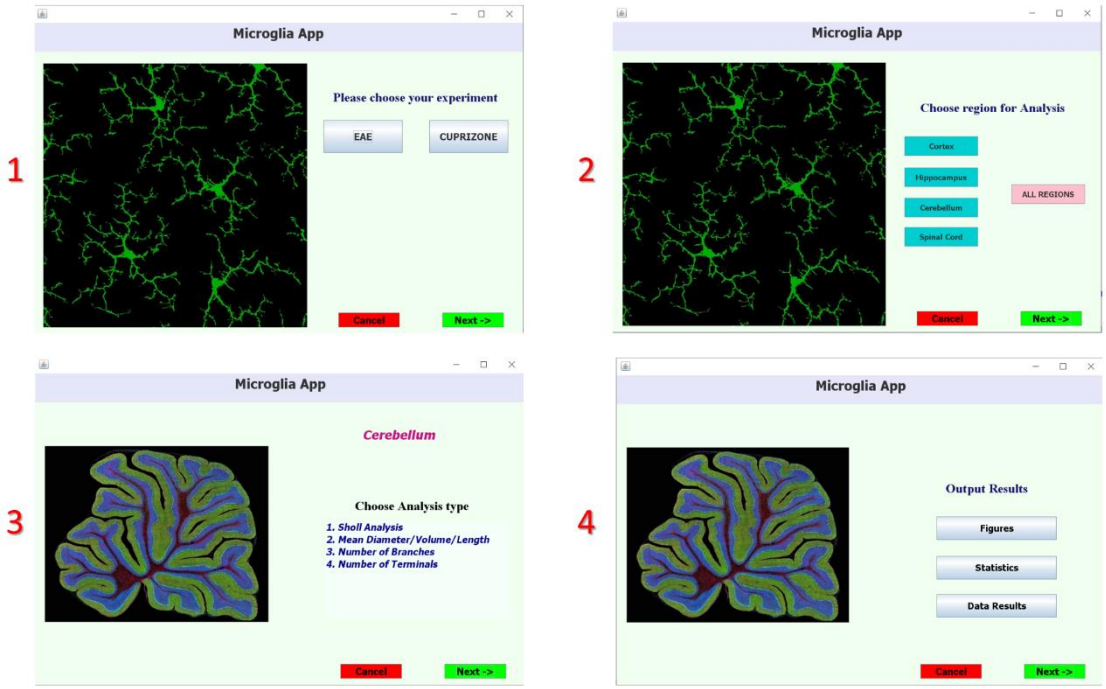


Εικ.2.2. Ροή της μεθοδολογίας ανάλυσης των απομονωμένων μικρογλοιακών κυττάρων. Κάθε κύτταρο επεξεργάζεται χρησιμοποιώντας αρχικά το λογισμικό Imaris, όπου πραγματοποιείται η ιχνηλάτησή του. Τα αποτελέσματα, σε μορφή excel αρχείου, αποτελούν είσοδο στην εφαρμογή MicroApp η οποία έχει αναπτυχθεί σε Java και Matlab. Η εφαρμογή εκτελεί αυτόματα όλους τους στατιστικούς ελέγχους (Statistical Analysis), και παράγει αποτελέσματα τόσο σε γραφική μορφή (Data Visualization) όσο και ως αριθμητικά δεδομένα (Data Output).

Εφαρμογή MicroApp

Η εφαρμογή MicroApp υλοποιήθηκε ως ένας υβριδικός κώδικας γραμμένος συνδυαστικά σε δύο προγραμματιστικές γλώσσες υψηλού επιπέδου, τη γλώσσα *Java (Oracle, Sun Microsystems)* και τη γλώσσα *Matlab (Mathworks, version R2018b).* Η γλώσσα Java επιλέχθηκε λόγω της ευελιξίας στη διαχείριση μεγάλου όγκου δεδομένων αλλά και της πολύ μεγαλύτερης ταχύτητας επεξεργασίας στις περιπτώσεις επαναλήψεων κώδικα (code iterations – loops) αλλά και λόγω της διευκόλυνσης που προσφέρει στη δημιουργία ενός γραφικού περιβάλλοντος για βελτιωμένη λειτουργικότητα ως προς τον τελικό χρήστη. Η γλώσσα Matlab επιλέχθηκε λόγω των δυνατοτήτων γραφικών απεικονίσεων που προσφέρει αλλά και λόγω των μαθηματικών συναρτήσεων που ενσωματώνει και διευκολύνουν στην εκτέλεση των στατιστικών ελέγχων που απαιτούνται για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Ο κώδικας έχει αναπτυχθεί εξ ολοκλήρου σε περιβάλλον Java χρησιμοποιώντας το λογισμικό ανοικτού κώδικα Eclipse Photon (v.2018) ενώ χρησιμοποιεί τη βιβλιοθήκη Matlab Engine για

επικοινωνία με το λογισμικό της Matlab. Η συγκεκριμένη βιβλιοθήκη προσφέρει τη δυνατότητα στον χρήστη να αναπτύξει τον κώδικα Matlab εντός του περιβάλλοντος Java σαν κομμάτι ενσωματωμένο στον Java κώδικα και να εκτελείται παράλληλα σαν μια ενιαία εφαρμογή. Για τη βελτίωση της λειτουργικότητας, το πρόγραμμα MicroApp υλοποιήθηκε σαν παραθυρική εφαρμογή (Εικ.2.3.).



Εικ.2.3. Η εφαρμογή MicroApp στην παραθυρική της μορφή. Στο πρώτο στάδιο (1) ο χρήστης επιλέγει το είδος του πειράματος που τον ενδιαφέρει ανάλογα με το μοντέλο της ΣΚΠ που έχει εφαρμοστεί. Στο δεύτερο στάδιο (2) επιλέγει την περιοχή του ΚΝΣ προς ανάλυση(απεικονίζεται η περιοχή της παρεγκεφαλίδας για αυτό το παράδειγμα), ή και συνδυασμό όλων των περιοχών. Στο τρίτο στάδιο (3) επιλέγεται ο τύπος της ανάλυσης που θα πραγματοποιηθεί. Στο τέταρτο στάδιο (4) επιλέγεται η μορφή των αποτελεσμάτων που επιθυμεί ο χρήστης σαν έξοδο, μεταξύ γραφικών διαγραμμάτων (figures), στατιστικών (statistics) και αριθμητικών δεδομένων (data results).

Η εφαρμογή δέχεται σαν είσοδο από τον χρήστη το directory του φακέλου που περιλαμβάνει τα αρχεία (σε μορφή excel) που έχουν προκύψει από το στάδιο της ιχνηλάτησης στο πρόγραμμα Imaris, ομαδοποιεί αυτόματα τα αρχεία ανάλογα με την περιοχή του εγκεφάλου που εξετάζεται αλλά και τα χρονικά στάδια του μοντέλου της

ΠΑΕ και πραγματοποιεί όλους τους υπολογισμούς τόσο σε επίπεδο κάθε κυττάρου όσο και σε επίπεδο ομαδοποιημένων αποτελεσμάτων ως προς όλα τα κύτταρα για κάθε περιοχή και για κάθε χρονικό στάδιο. Για τα τελικά αποτελέσματα ο χρήστης έχει τη δυνατότητα επιλογής τριών διαφορετικών μορφών μεταξύ της γραφικής απεικόνισης, της αριθμητικής απεικόνισης σε μορφή ενός excel αρχείου αλλά και της στατιστικής ανάλυσης.

Στατιστική Ανάλυση

Για κάθε είδος ανάλυσης, όλοι οι απαραίτητοι στατιστικοί έλεγχοι πραγματοποιούνται αυτόματα με τον τρόπο που περιγράφεται στην στατιστική ανάλυση στο κεφάλαιο των μεθόδων. Οι στατιστικοί έλεγχοι που εκτελεί η εφαρμογή περιλαμβάνουν το τεστ *Shapiro-Wilk* για τον έλεγχο κανονικότητας, τα τεστ *t-test, Mann-Whitney* και *Anova* για τον έλεγχο της στατιστικής σημαντικότητας μέσου όρου και διασποράς αντίστοιχα αλλά και το τεστ *Kolmogorov-Smirnov* για τον έλεγχο της στατιστικής σημαντικότητας της διαφοράς μεταξύ διαφορετικών κατανομών(Εικ.2.4.).

Γραφική Απεικόνιση

Όλα τα αποτελέσματα παρουσιάζονται και σε γραφική απεικόνιση σε μορφή διαγραμμάτων, μετά από επιλογή του χρήστη. Τα διαγράμματα που έχει τη δυνατότητα να επιλέξει ο χρήστης είναι διαγράμματα σύγκρισης του όγκου και της διαμέτρου των μικρογλοιακών κυττάρων, του συνολικού μήκους των μικρογλοιακών προεκβολών, του αριθμού διακλαδώσεων αλλά και των τερματικών σημείων των προεκβολών αλλά και τα διαγράμματα των κατανομών που προκύπτουν από την ανάλυση Sholl (Εικ.2.5.Α).

Αριθμητική απεικόνιση

Τα αποτελέσματα προσφέρονται και ως αριθμητικά δεδομένα σαν ένα αρχείο τύπου excel, που περιέχει συνοπτικά όλες τις απαραίτητες πληροφορίες που προέκυψαν (Εικ.2.5.Β).

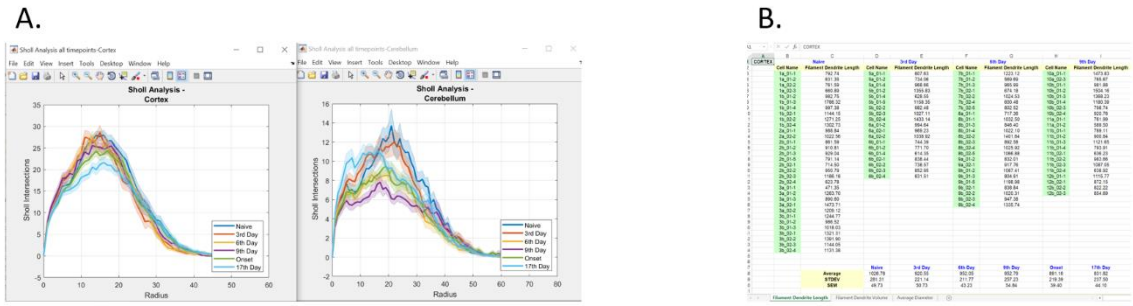
```
        FIGURES MENU
1. Sholl Analysis
2. Mean Volume, Diameter and Dendrite Length
3. Number of Branches and Terminals
4. Branches number per Distance
5. Total Length and Number of Dendrites
6. Show all figures
7. Combination Cortex/Cerebellum/Hippocampus
8. Termi/Branches All
9. Exit program

Enter choice:8
Kolmogorov-Smirnoff : Cortex
============================
Naive- 3rd Day          Pvalue = 0.464088278006797      Statistically Significant: No
Naive- 6th Day          Pvalue = 0.4506191347829693     Statistically Significant: No
Naive- 9th Day          Pvalue = 0.5952565193577724     Statistically Significant: No
Naive- Onset            Pvalue = 0.20298345660195627    Statistically Significant: No
Naive- Peak             Pvalue = 0.027378896739686492   Statistically Significant: Yes


Kolmogorov-Smirnoff : Hippocampus
============================
Naive- 3rd Day          Pvalue = 0.8349483672465845     Statistically Significant: No
Naive- 6th Day          Pvalue = 0.914669812857906      Statistically Significant: No
Naive- 9th Day          Pvalue = 0.5240001571431194     Statistically Significant: No
Naive- Onset            Pvalue = 0.7664481054619396     Statistically Significant: No
Naive- Peak             Pvalue = 0.18837758567108098    Statistically Significant: No


Kolmogorov-Smirnoff : Cerebellum
============================
Naive- 3rd Day          Pvalue = 0.42973650225142096    Statistically Significant: No
Naive- 6th Day          Pvalue = 0.00941045051531065    Statistically Significant: Yes
Naive- 9th Day          Pvalue = 1.7774273347541497E-5  Statistically Significant: Yes
Naive- Onset            Pvalue = 0.0154932913151188     Statistically Significant: Yes
Naive- Peak             Pvalue = 0.26328089923482123    Statistically Significant: No
```

Εικ.2.4. Παράδειγμα στατιστικής ανάλυσης για τον έλεγχο στατιστικής σημαντικότητας της διαφοράς μεταξύ των κατανομών για την ανάλυση Sholl στις τρεις περιοχές του εγκεφάλου (Kolmogorov-Smirnov). Η εφαρμογή πραγματοποιεί αυτόματα τους ελέγχους κανονικότητας και όλα τα στατιστικά τεστ ελέγχου και επιστρέφει σαν αποτέλεσμα την κρίσιμη τιμή του p-value για κάθε στατιστικό τεστ αλλά και το αν το αποτέλεσμα είναι στατιστικά σημαντικό ή όχι σε σύγκριση με το κατώφλι σημαντικότητας p=0.05.



Εικ.2.5. Παράδειγμα γραφικής και αριθμητικής απεικόνισης των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από την εφαρμογή MicroApp. Στην εικόνα **A** τα γραφήματα για την ανάλυση Sholl στην περιοχή του φλοιού και της παρεγκεφαλίδας. Στην εικόνα **B** το αρχείο excel που παράγεται και περιέχει τα αριθμητικά αποτελέσματα για την ανάλυση από την περιοχή του φλοιού του εγκεφάλου.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ 3

Ανάλυση της μορφολογίας και της κινητικότητας της μικρογλοίας κατά την εξέλιξη της παθολογίας της ΠΑΕ σε διάφορες περιοχές του ΚΝΣ.

Από την εφαρμογή της αυτοματοποιημένης προ-επεξεργασίας και ανάλυσης της μικρογλοίας τόσο από τις εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας όσο και από τα in vivo πειράματα με τη χρήση του διφωτονικού μικροσκοπίου που περιγράφηκαν παραπάνω, προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα:

3.1. Η μορφολογία της μικρογλοίας μεταβάλλεται με διαφορετικό τρόπο στις διάφορες περιοχές του εγκεφάλου κατά την ΠΑΕ .

Για τη μορφολογική ανάλυση των μικρογλοιακών κυττάρων απομονώθηκαν και αναλύθηκαν συνολικά *472* κύτταρα από τις εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας που προέκυψαν από τα πειράματα σε C57BL/6 ποντικούς. Από αυτά τα *159* προέρχονται από την περιοχή του φλοιού του εγκεφάλου, τα *164* από την περιοχή της παρεγκεφαλίδας, τα *90* από την περιοχή του ιπποκάμπου και τα *59* από την περιοχή του νωτιαίου μυελού. Η μικρογλοία στο νωτιαίο μυελό εμφανίζεται εκτενώς ενεργοποιημένη, με σχεδόν αμοιβαδοειδή μορφολογία που προσομοιάζει αυτή των μακροφάγων που εισρέουν στο ΚΝΣ από την έναρξη της κλινικής συμπτωματολογίας της ΠΑΕ και μετά και εκφράζουν επίσης Iba-1, και έτσι οι εικόνες από την περιοχή αυτή χρησιμοποιήθηκαν περισσότερο για ταυτοποίηση της παθολογίας παρά για ανάλυση. Ο αναλυτικός αριθμός κυττάρων που αναλύθηκαν για κάθε περιοχή ανά χρονικό στάδιο της ΠΑΕ φαίνεται στον πίνακα 2.

Timepoint/Region	Cortex	Hippocampus	Cerebellum	Spinal Cord
Naïve	32	12	22	18
3rdDay	21	15	31	12
6thDay	23	13	28	15
9thDay	23	15	26	14
Onset	31	18	29	-
Peak	29	17	28	-

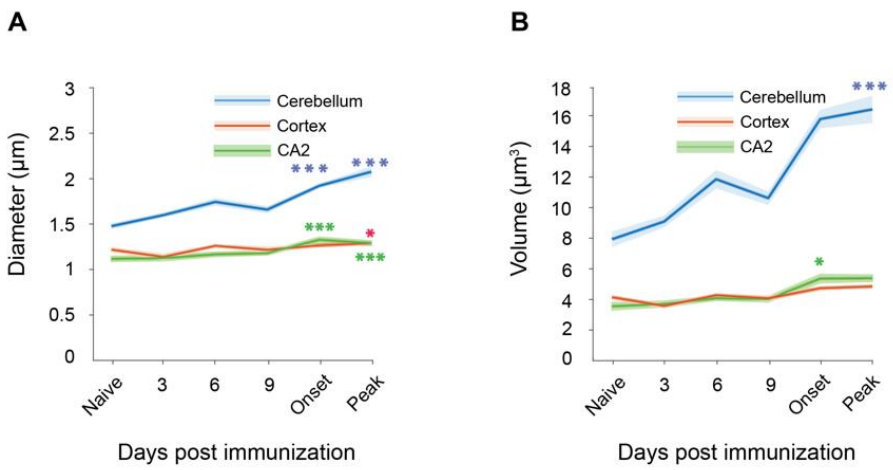
Πίνακας 2. Ο συνολικός αριθμός των μικρογλοιακών κυττάρων που αναλύθηκαν ως προς τη μορφολογία τους, ανά περιοχή και χρονικό στάδιο της εξέλιξης της ΠΑΕ.

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που εξετάστηκαν είναι ο όγκος και η διάμετρος των μικρογλοιακών προεκβολών, ο αριθμός των διακλαδώσεων και ο αριθμός τερματικών σημείων τους, το συνολικό μήκος των προεκβολών, η ανάλυση Sholl και η πυκνότητα των μικρογλοιακών κυττάρων ανά περιοχή (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Τα αποτελέσματα για όλες αυτές τις παραμέτρους φαίνονται παρακάτω:

3.1.1 Όγκος και διάμετρος μικρογλοιακών προεκβολών

Στην περίπτωση και των τριών εγκεφαλικών περιοχών (φλοιός, ιππόκαμπος και παρεγκεφαλίδα), δεν εμφανίστηκαν μεταβολές στη διάμετρο και τον όγκο των μικρογλοιακών κυττάρων κατά τα στάδια του προ-κλινικού σταδίου της ΠΑΕ. Αντιθέτως, τα αποτελέσματα φανερώνουν μορφολογικές αλλαγές και στις τρεις περιοχές τόσο στα στάδια της έναρξης όσο και της κορύφωσης της κλινικής συμπτωματολογίας της νόσου (onset/peak). Συγκεκριμένα, τα μικρογλοιακά κύτταρα εμφανίζουν αύξηση της διαμέτρου αλλά και του συνολικού όγκου των μικρογλοιακών προεκβολών, υιοθετώντας με αυτό τον τρόπο έναν πιο υπερτροφικό φαινότυπο που συμπίπτει και με την εμφάνιση και εξέλιξη των κλινικών συμπτωμάτων.

Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα για τις μετρήσεις του συνολικού όγκου και της διαμέτρου των μικρογλοιακών προεκβολών φαίνονται στην εικόνα (Εικ.3.1).



Εικ.3.1. Αποτελέσματα ανάλυσης για τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της διαμέτρου (εικόνα Α) και του όγκου (εικόνα Β) των μικρογλοιακών προεκβολών στις τρεις περιοχές

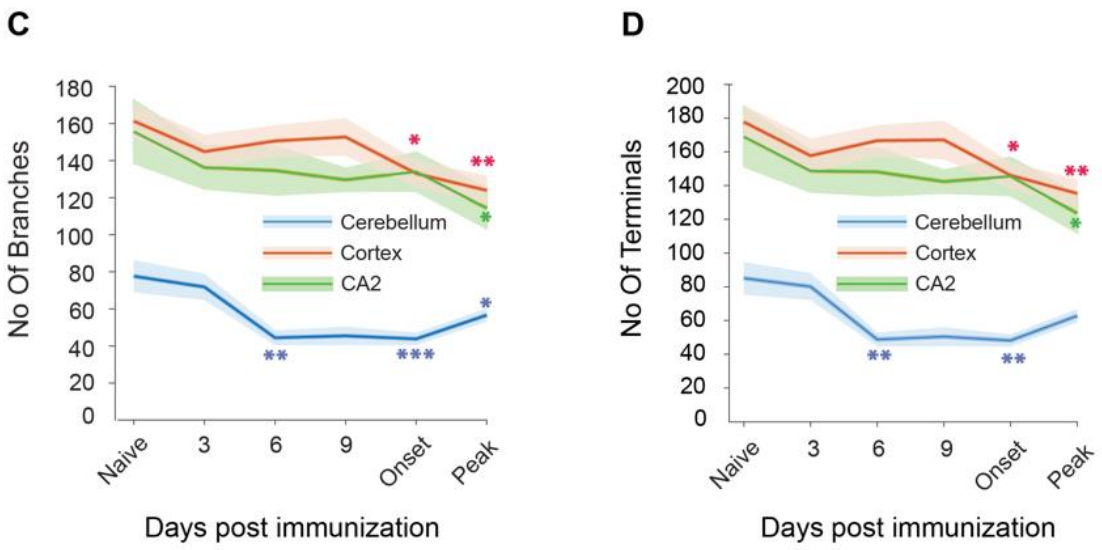
του εγκεφάλου και στα διαφορετικά στάδια της ΠΑΕ. Και για τις 3 περιοχές του εγκεφάλου που αναλύθηκαν (φλοιός-cortex, ιππόκαμπος-CA2 και παρεγκεφαλίδα-Cerebellum), δεν εμφανίστηκαν μορφολογικές αλλαγές στο προ-κλινικό στάδιο(dpi3, dpi6, dpi9) .**Α.** Στο στάδιο της έναρξης των κλινικών συμπτωμάτων (onset) παρατηρήθηκε αύξηση της διαμέτρου των προεκβολών τόσο στον ιππόκαμπο όσο και στην παρεγκεφαλίδα. Στο στάδιο της κορύφωσης (peak), αύξηση στη διάμετρο παρατηρείται και στις 3 περιοχές του εγκεφάλου. **Β**. Στο στάδιο της έναρξης (onset), παρατηρήθηκε αύξηση του όγκου των προεκβολών μόνο στην περιοχή του ιπποκάμπου. Αντίθετα, αύξηση του όγκου παρατηρήθηκε και στις 3 περιοχές στο στάδιο της κορύφωσης (peak).

3.1.2 Αριθμός μικρογλοιακών διακλαδώσεων και μικρογλοιακών προεκβολών

Στο φλοιό του εγκεφάλου και στον ιππόκαμπο ο συνολικός αριθμός μικρογλοιακών προεκβολών αλλά και ο συνολικός αριθμός διακλαδώσεων δεν παρουσίασαν κάποια μεταβολή κατά τη διάρκεια του προ-κλινικού σταδίου. Στο στάδιο της έναρξης των κλινικών συμπτωμάτων της ΠΑΕ, στο φλοιό του εγκεφάλου παρατηρήθηκε *μείωση* τόσο στο συνολικό αριθμό προεκβολών όσο και στο συνολικό αριθμό διακλαδώσεων, η οποία συνεχίζεται και κατά το στάδιο της κορύφωσης. Στον ιππόκαμπο αντιθέτως, τα μικρογλοιακά κύτταρα εμφάνισαν μειωμένο αριθμό διακλαδώσεων και συνολικών προεκβολών μόνο κατά τη φάση της κορύφωσης των κλινικών συμπτωμάτων.

Εστιάζοντας στην περιοχή της παρεγκεφαλίδας, τόσο ο αριθμός των διακλαδώσεων του κυττάρου όσο και ο συνολικός αριθμός των μικρογλοιακών τους προεκβολών παρουσίασαν μείωση που δείχνει να ξεκινάει από την προ-κλινική φάση της νόσου και συγκεκριμένα από την 6^{η} μέρα (dpi 6) και να διατηρείται μέχρι και τη φάση της έναρξης των κλινικών συμπτωμάτων. Αντιθέτως, κατά τη φάση της κορύφωσης της νόσου στην περιοχή της παρεγκεφαλίδας, παρουσιάζεται *αύξηση* και στον αριθμό των προεκβολών αλλά και στον αριθμό των διακλαδώσεων των μικρογλοιακών κυττάρων.

Τα αποτελέσματα για τις μετρήσεις του συνολικού αριθμού προεκβολών (μέσω της μέτρησης των τερματικών τους σημείων), αλλά και του συνολικού αριθμού διακλαδώσεων, παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα (Εικ.3.2.).



Εικ.3.2. Αποτελέσματα ανάλυσης για τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του αριθμού διακλαδώσεων(εικόνα C) και του αριθμού τερματικών σημείων(εικόνα D) των μικρογλοιακών κυττάρων στις τρεις περιοχές του εγκεφάλου και στα διαφορετικά στάδια της ΣΚΠ. Ο αριθμός τερματικών σημείων αντιστοιχεί στο συνολικό αριθμό των προεκβολών του μικρογλοιακού κυττάρου (κύριων προεκβολών αλλά και των διακλαδώσεών τους). Στην περιοχή του φλοιού(cortex) παρατηρήθηκε μείωση του αριθμού διακλαδώσεων αλλά και του συνολικού αριθμού των προεκβολών και κατά το στάδιο της έναρξης αλλά και κατά το στάδιο κορύφωσης της ΠΑΕ (onset και peak). Στον ιππόκαμπο, η μείωση παρατηρήθηκε στο στάδιο της κορύφωσης μόνο. Στην παρεγκεφαλίδα, η μείωση παρατηρήθηκε από την 6η μέρα μετά την ανοσοποίηση και συνεχίστηκε μέχρι το στάδιο της έναρξης, υποδεικνύοντας νωρίτερη επιρροή του μοντέλου της ΠΑΕ στην παρεγκεφαλίδα σε σχέση με τον υπόλοιπο εγκέφαλο. Στο στάδιο της κορύφωσης της νόσου στην παρεγκεφαλίδα, ο αριθμός τόσο των διακλαδώσεων όσο και του συνόλου των μικρογλοιακών προεκβολών παρουσίασε αύξηση.

3.1.3 Συνολικό μήκος μικρογλοιακών προεκβολών

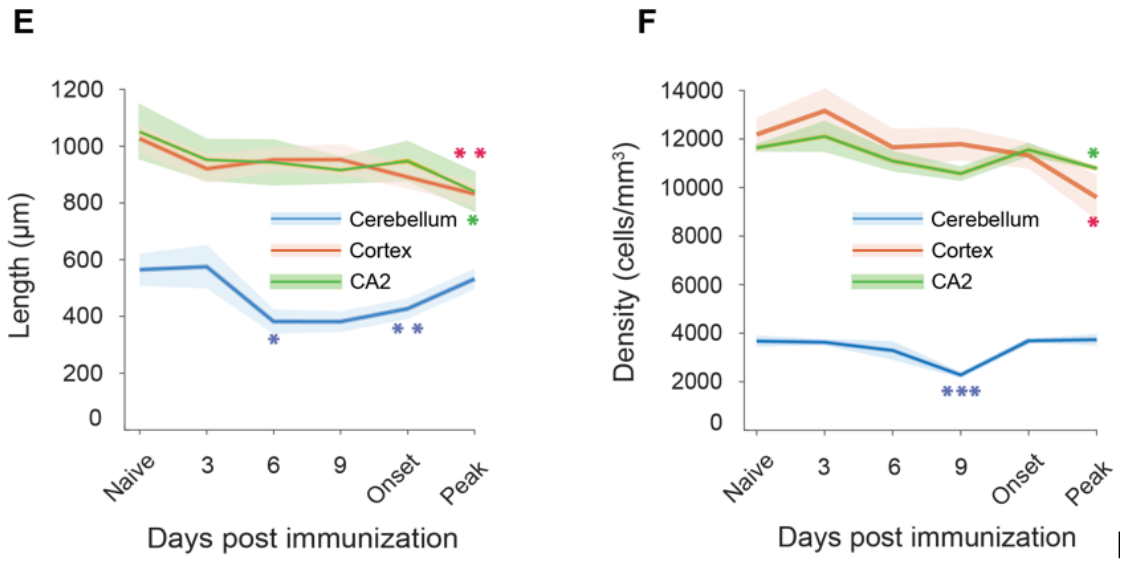
Στο φλοιό του εγκεφάλου αλλά και στον ιππόκαμπο, παρατηρείται μείωση στο συνολικό μήκος των μικρογλοιακών προεκβολών η οποία εμφανίζεται μόνο κατά το στάδιο της κορύφωσης της κλινικής συμπτωματολογίας. Αντίθετα στην παρεγκεφαλίδα, η μείωση του συνολικού μήκους των προεκβολών αρχίζει την εμφάνισή της από το προ-κλινικό στάδιο και συγκεκριμένα από την έκτη ημέρα μετά την ανοσοποίηση (dpi 6). Τα μικρογλοιακά κύτταρα συνεχίζουν να εμφανίζουν

μειωμένο μήκος των προεκβολών τους μέχρι και το στάδιο της έναρξης της κλινικής συμπτωματολογίας. Στο στάδιο της κορύφωσης αντιθέτως, το μήκος των μικρογλοιακών προεκβολών στην παρεγκεφαλίδα παρουσιάζεται αυξημένο (Εικ.3.3.Ε).

3.1.4 Συνολική πυκνότητα μικρογλοιακών κυττάρων ανά περιοχή

Η ανάλυση του συνολικού αριθμού των μικρογλοιακών κυττάρων ανά περιοχή πραγματοποιήθηκε συνολικά σε 178 εικόνες από τον εγκέφαλο εκ των οποίων 72 εικόνες από την περιοχή του φλοιού, 36 εικόνες από την περιοχή του ιπποκάμπου και 70 εικόνες από την περιοχή της παρεγκεφαλίδας. Στο φλοιό και στον ιππόκαμπο, παρατηρείται μείωση της συνολικής πυκνότητας των κυττάρων μόνο στο στάδιο της κορύφωσης της κλινικής συμπτωματολογίας ενώ αυτή δείχνει να παραμένει σταθερή σε όλα τα προγενέστερα στάδια. Στην παρεγκεφαλίδα αντιθέτως, ο αριθμός των μικρογλοιακών κυττάρων ανά περιοχή εμφανίζεται ελαττωμένος από την προ-κλινική φάση της ΠΑΕ και πιο συγκεκριμένα από την 9^{η} μέρα μετά την ανοσοποίηση (dpi 9). Κατά το στάδιο της έναρξης της κλινικής συμπτωματολογίας, η μικρογλοιακή πυκνότητα στην παρεγκεφαλίδα παρουσιάζεται αυξημένη και διατηρείται έτσι και στη φάση της κορύφωσης της νόσου.

Τα αποτελέσματα για τις μετρήσεις του συνολικού μήκους των μικρογλοιακών προεκβολών αλλά και της πυκνότητας των κυττάρων ανά περιοχή, παρουσιάζονται στην ακόλουθη εικόνα (Εικ.3.3.).



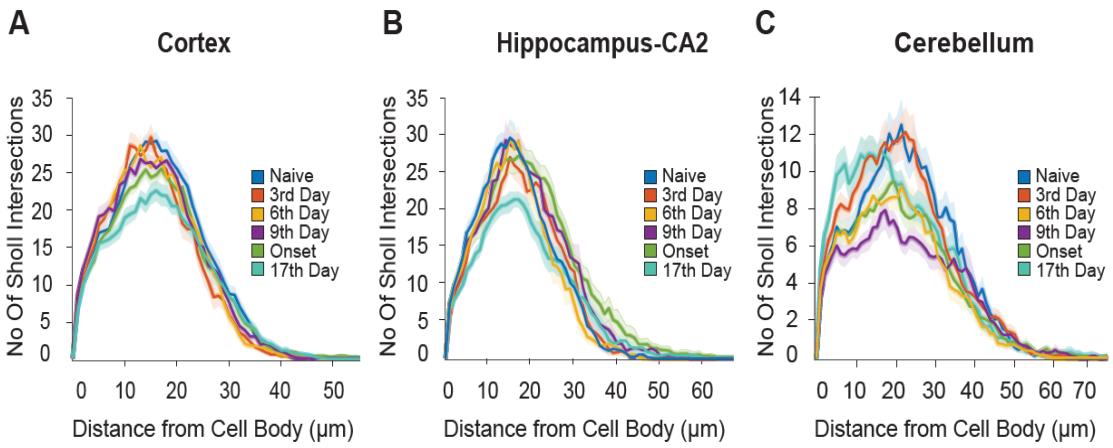
Εικ.3.3. Αποτελέσματα ανάλυσης για τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του συνολικού μήκους των μικρογλοιακών προεκβολών(εικόνα Ε) αλλά και της πυκνότητας των μικρογλοιακών κυττάρων(εικόνα F) στις τρεις περιοχές του εγκεφάλου και στα διαφορετικά στάδια της ΠΑΕ. Εικόνα Ε) Στις περιοχές του φλοιού (cortex) αλλά και του ιπποκάμπου (CA2), παρατηρείται μείωση του συνολικού μήκους των μικρογλοιακών προεκβολών μόνο στο στάδιο κορύφωσης της ΠΑΕ. Στην περιοχή της παρεγκεφαλίδας, η μείωση στο συνολικό μήκος των προεκβολών παρατηρείται ήδη από το προ-κλινικό στάδιο (6η μέρα). Μεταξύ 9ης μέρας και έναρξης των κλινικών συμπτωμάτων, το μήκος των μικρογλοιακών προεκβολών παρουσιάζει ξανά αύξηση η οποία διατηρείται και για το στάδιο κορύφωσης. Εικόνα F) Στο φλοιό και τον ιππόκαμπο, τα μικρογλοιακά κύτταρα παρουσιάζονται με μειωμένη πυκνότητα στο στάδιο κορύφωσης της ΠΑΕ. Στην παρεγκεφαλίδα η μείωση της πυκνότητας παρατηρείται από το προ-κλινικό στάδιο (9η μέρα), ενώ παρουσιάζει αύξηση κατά το στάδιο της έναρξης της κλινικής συμπτωματολογίας η οποία διατηρείται και για το στάδιο κορύφωσης της ΠΑΕ.

3.2 Τα μικρογλοιακά κύτταρα αποκτούν λιγότερο διακλαδιζόμενη μορφολογία στην προκλινική φάση της ΠΑΕ στην παρεγκεφαλίδα και όχι σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου.

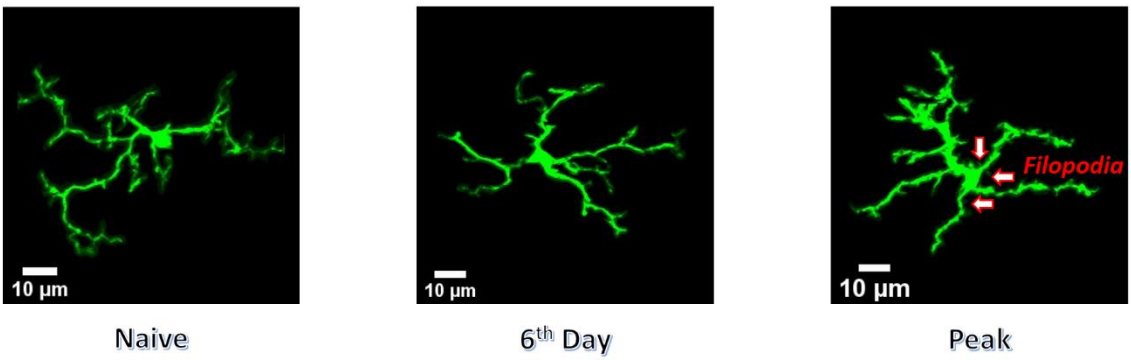
Για τα αποτελέσματα του επιπέδου διακλάδωσης των μικρογλοιακών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα της ανάλυσης Sholl (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Στην περιοχή του ιπποκάμπου παρατηρείται μείωση τη διακλάδωσης των κυττάρων στο σημείο κορύφωσης των κλινικών συμπτωμάτων της ΠΑΕ, χωρίς ωστόσο αυτή να

παρουσιάζεται με στατιστική σημαντικότητα (*p=0.18- Kolmogorov-Smirnov test*). Στην περιοχή του φλοιού του εγκεφάλου αντιθέτως παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση της διακλάδωσης των κυττάρων στη φάση της κορύφωσης (*p=0.02*). Εστιάζοντας και πάλι στην περιοχή της παρεγκεφαλίδας παρατηρείται ότι, σε αντίθεση με τις άλλες δύο περιοχές που αναλύθηκαν, η μειωμένη διακλάδωση των μικρογλοιακών κυττάρων αρχίζει να παρατηρείται από το προ-κλινικό στάδιο της ΠΑΕ ($6^{η}$ μέρα) και συνεχίζεται και για την $9^{η}$ μέρα, παρουσιάζοντας στατιστική σημαντικότητα και στις δύο περιπτώσεις ($p=0.009$ και $p=1.8*10^{-5}$ αντίστοιχα). Παράλληλα, παρατηρείται εκ νέου αύξηση του αριθμού των διακλαδώσεων των μικρογλοιακών κυττάρων από το στάδιο έναρξης των κλινικών συμπτωμάτων η οποία συνεχίζεται και στη φάση της κορύφωσής τους (Εικ.3.4.).

Στο στάδιο της κορύφωσης της κλινικής συμπτωματολογίας, στην περιοχή της παρεγκεφαλίδας, παρατηρείται επίσης ότι η κατανομή που προκύπτει από την ανάλυση Sholl παρουσιάζει μια μετατόπιση πιο κοντά προς το σημείο αρχής των αξόνων. Αυτό υποδεικνύει ότι το μικρογλοιακό κύτταρο αυξάνει τις διακλαδώσεις του σε σχέση με τα προηγούμενα χρονικά στάδια, ταυτόχρονα όμως φαίνεται ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των νέων διακλαδώσεων συναντάται κατά κύριο λόγο κοντά στο κυτταρικό του σώμα. Ελέγχοντας διάφορες εικόνες που λήφθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία της συνεστιακής μικροσκοπίας από μικρογλοιακά κύτταρα σε αυτό το χρονικό στάδιο της νόσου στην παρεγκεφαλίδα, παρατηρήθηκε και μορφολογικά η ύπαρξη πολλών μικρών κυτταρικών δομών κοντά στο κυτταρικό σώμα ή ακόμα και πάνω σε αυτό (Εικ.3.5.). Αυτές οι δομές μοιάζουν με μικρές μικρογλοιακές προεκβολές οι οποίες χαρακτηρίστηκαν ως φιλοπόδια σε πρόσφατες έρευνες (Bernier et al., 2019).



Εικ.3.4. Ανάλυση Sholl για τη διακλάδωση των μικρογλοιακών κυττάρων στις τρεις περιοχές του εγκεφάλου για όλα τα χρονικά στάδια της ΠΑΕ. Εικόνες Α,Β. Τα μικρογλοιακά κύτταρα στην περιοχή του φλοιού του εγκεφάλου αλλά και του ιπποκάμπου παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα διακλάδωσης μόνο στο στάδιο κορύφωσης της ΠΑΕ (γαλάζιο χρώμα). Εικόνα C. Στην περιοχή της παρεγκεφαλίδας, τα μικρογλοιακά κύτταρα παρουσιάζονται λιγότερο διακλαδιζόμενα από το προ-κλινικό στάδιο (6η και 9η μέρα), ενώ στο στάδιο της κορύφωσης παρουσιάζουν αύξηση των διακλαδώσεών τους που προσεγγίζει αυτή που παρατηρείται και σε φυσιολογικές συνθήκες. Ταυτόχρονα, παρατηρείται μια μετατόπιση της κατανομής προς την αρχή των αξόνων, υποδεικνύοντας ότι τα μικρογλοιακά κύτταρα στο στάδιο της κορύφωσης της ΠΑΕ εμφανίζουν περισσότερες διακλαδώσεις κοντά στο κυτταρικό σώμα.

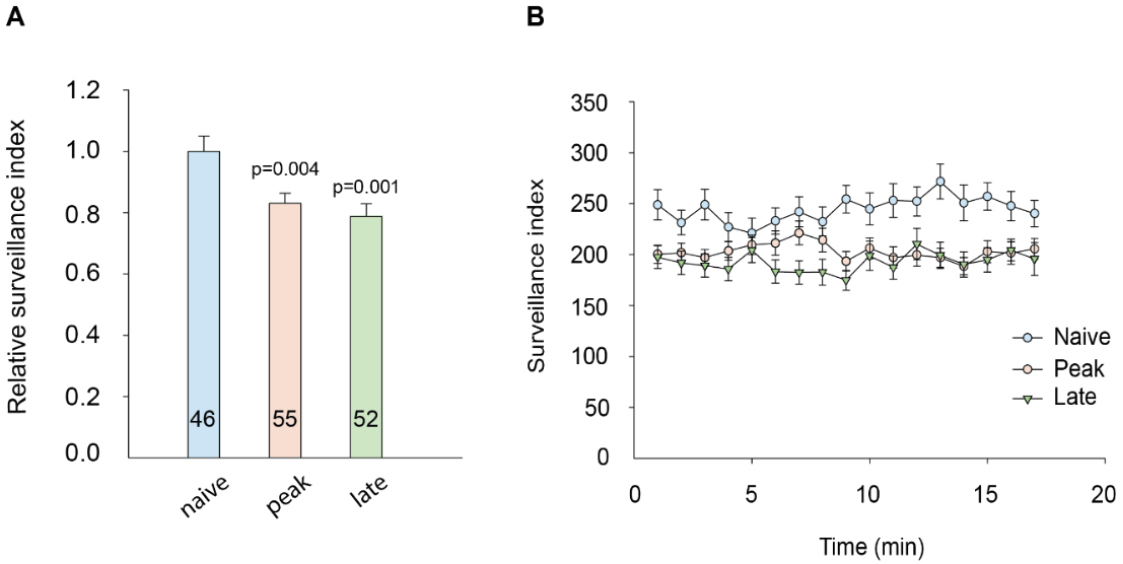


Εικ.3.5. Εικόνες μικρογλοιακών κυττάρων στο naïve, στο προ-κλινικό στάδιο(6η μέρα) και στο στάδιο κορύφωσης της ΠΑΕ στην περιοχή της παρεγκεφαλίδας. Παρατηρείται ότι το μικρογλοιακό κύτταρο στην προ-κλινική φάση παρουσιάζεται λιγότερο διακλαδιζόμενο. Αντιθέτως στη φάση κορύφωσης της ΠΑΕ δείχνει μεγαλύτερο επίπεδο διακλάδωσης,

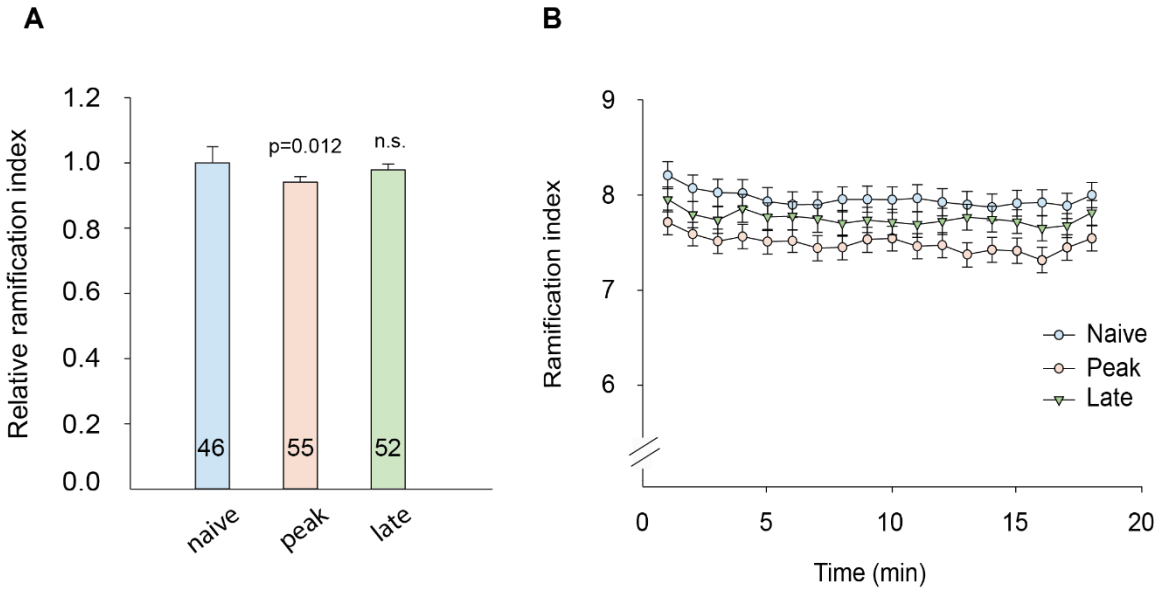
συγκρίσιμο με το διακλαδιζόμενο κύτταρο για τους υγιείς ποντικούς(naïve). Παρατηρούνται επίσης νέες μικρές μικρογλοιακές προεκβολές που εξέχουν από το κυτταρικό σώμα ή και από άλλες μικρογλοιακές προεκβολές κοντά σε αυτό, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως φιλοπόδια (Bernier et al., 2019).

3.3. Τα μικρογλοιακά κύτταρα στο φλοιό του εγκεφάλου εμφανίζονται λιγότερο διακλαδιζόμενα και με μειωμένη ικανότητα επιτήρησης στην κορύφωση της κλινικής συμπτωματολογίας της νόσου αλλά και στη χρόνια φάση της ΠΑΕ.

Για τον υπολογισμό του δείκτη επιτήρησης (SI) και του δείκτη διακλάδωσης (RI) χρησιμοποιήθηκαν οι εικόνες απομονωμένων μικρογλοιακών κυττάρων από τα πειράματα διφωτονικού μικροσκοπίου με τη χρήση των CX3CR1-GFP ποντικών. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το MATLAB script από Madry, Kyrargyri et al., Neuron (2018) (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Για τον υπολογισμό του δείκτη επιτήρησης και του δείκτη διακλάδωσης αναλύθηκαν συνολικά 153 μικρογλοιακά κύτταρα εκ των οποίων 46 κύτταρα από υγιείς ποντικούς, 55 κύτταρα από ποντικούς στο στάδιο της κορύφωσης των κλινικών συμπτωμάτων και 52 κύτταρα από ποντικούς στη χρόνια φάση της ΠΑΕ. Παρατηρήθηκε ότι ο δείκτης διακλάδωσης τόσο στο χρόνιο στάδιο όσο και στο στάδιο της κορύφωσης των κλινικών συμπτωμάτων, παρουσιάζεται μειωμένος σε σχέση με το δείκτη διακλάδωσης που υπολογίστηκε για τους υγιείς ποντικούς (Εικ.3.6.). Αυτό δείχνει ότι στα συγκεκριμένα χρονικά σημεία κατά την εξέλιξη της ΠΑΕ, μειώνεται η γενικότερη ικανότητα των μικρογλοιακών κυττάρων να επιτηρούν το παρεγχυματικό τους περιβάλλον. Αντίστοιχα για το δείκτη διακλάδωσης, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση μεταξύ του RI που υπολογίστηκε για τους υγιείς ποντικούς και του RI που υπολογίστηκε για ποντικούς στο στάδιο της κορύφωσης της νόσου, ενώ για τη χρόνια φάση της ΠΑΕ παρατηρείται μείωση αλλά όχι στατιστικά σημαντική στο δείκτη διακλάδωσης (Εικ.3.7.). Συμπερασματικά, τα μικρογλοιακά κύτταρα παρουσιάζονται λιγότερο διακλαδιζόμενα αλλά και με μικρότερη ικανότητα επιτήρησης στο στάδιο κορύφωσης (peak) των κλινικών συμπτωμάτων της ΠΑΕ, ενώ δείχνουν φυσιολογικά επίπεδα διακλάδωσης αλλά ταυτόχρονα επίσης μειωμένη ικανότητα επιτήρησης κατά τη χρόνια φάση της νόσου.



Εικ.3.6. Αποτελέσματα ανάλυσης για τον δείκτη επιτήρησης των μικρογλοιακών κυττάρων. Στη δεξιά εικόνα(B) παρουσιάζεται ο δείκτης επιτήρησης ανά δύο διαδοχικά χρονικά σημεία. Παρατηρείται για όλα τα χρονικά σημεία μειωμένος δείκτης επιτήρησης μεταξύ των μικρογλοιακών κυττάρων των υγιών ποντικών και των μικρογλοιακών κυττάρων των ποντικών που βρίσκονται στα στάδια της κορύφωσης των κλινικών συμπτωμάτων αλλά και στη χρόνια φάση της νόσου. Στην αριστερή εικόνα(A) παρουσιάζεται ο δείκτης επιτήρησης κανονικοποιημένος ως προς τους υγιείς ποντικούς (naive).



Εικ.3.7. Αποτελέσματα ανάλυσης για τον δείκτη διακλάδωσης των μικρογλοιακών κυττάρων. Στη δεξιά εικόνα παρουσιάζεται η μέση τιμή του δείκτη διακλάδωσης των μικρογλοιακών κυττάρων για κάθε χρονικό σημείο της εγγραφής. Παρατηρείται για όλα τα χρονικά σημεία μειωμένος δείκτης διακλάδωσης μεταξύ των μικρογλοιακών κυττάρων των

υγιών ποντικών και των μικρογλοιακών κυττάρων των ποντικών που βρίσκονται στα στάδια κορύφωσης και χρόνιας φάσης της νόσου. Στην αριστερή εικόνα παρουσιάζεται ο δείκτης επιτήρησης κανονικοποιημένος ως προς τους υγιείς ποντικούς (naive). Στο στάδιο κορύφωσης της ΠΑΕ, η διαφορά παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική. Αντίθετα η διαφορά μεταξύ του σταδίου των υγιών ποντικών και της χρόνιας φάσης της ΠΑΕ δεν επιβεβαιώνεται από τους στατιστικούς ελέγχους (n.s. = non significant).

3.4. Τα μικρογλοιακά κύτταρα στο φλοιό του εγκεφάλου εμφανίζουν μικρότερη κινητικότητα στην κορύφωση των κλινικών συμπτωμάτων αλλά και στη χρόνια φάση της ΠΑΕ

Για την ανάλυση της κινητικότητας χρησιμοποιήθηκε ένας επιπλέον δείκτης, ο δείκτης κινητικότητας (motility index- MI). Ο υπολογισμός του MI υλοποιείται για κάθε χρονικό σημείο της απεικόνισης του μικρογλοιακού κυττάρου στο χρόνο, μέσω του τύπου

$$\boldsymbol{MI_{frame}} = \frac{\boldsymbol{SI_{frame}}}{(\sum_{1}^{20} \boldsymbol{area})}$$

, όπου SI_{frame} είναι ο δείκτης επιτήρησης του κάθε μικρογλοιακού κυττάρου για κάθε χρονικό σημείο (frame), κανονικοποιημένος ως προς τη μέση τιμή της επιφάνειας που καλύπτει το μικρογλοιακό κύτταρο στο σύνολό του (area). Ως επιφάνεια ορίζεται το ποσοστό σήματος που απεικονίζεται σε κάθε χρονικό σημείο της εικόνας ενός κυττάρου, σε σχέση με το συνολικό μέγεθος της εικόνας (Kyrargyri et al., Glia (2019)).

Για τον υπολογισμό της επιφάνειας υλοποιήθηκε ένα πρόγραμμα μακροεντολών στο ImageJ2/Fiji, το οποίο δέχεται σαν είσοδο τον φάκελο στον οποίο βρίσκονται αποθηκευμένα τα απομονωμένα κύτταρα προς ανάλυση. Το πρόγραμμα μεταφορτώνει αυτόματα κάθε εικόνα κυττάρου, εφαρμόζει μια μέθοδο δυαδικοποίησης με συγκεκριμένο κατώφλι ώστε να εξασφαλίζεται ότι όλο το σήμα που περιέχεται στην εικόνα θα ανήκει στο κύτταρο και στη συνέχεια υπολογίζει για κάθε χρονικό σημείο της απεικόνισης την περιοχή που καλύπτει το μικρογλοιακό κύτταρο. Το αποτέλεσμα του προγράμματος είναι ένα excel αρχείο που περιέχει την πληροφορία για όλα τα κύτταρα και για κάθε χρονικό σημείο της εγγραφής (Εικ.3.8.).

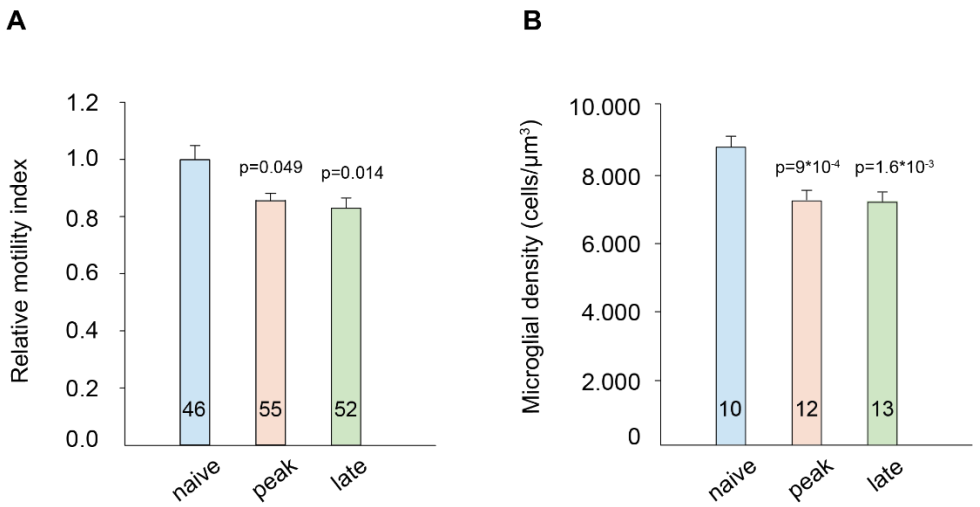
Εικ.3.8. Υπολογισμός επιφάνειας που καλύπτει το κάθε μικρογλοιακό κύτταρο σε κάθε χρονική στιγμή. Το πρόγραμμα που αναπτύχθηκε στο ImageJ2/Fiji δέχεται σαν είσοδο τον φάκελο που περιέχει όλα τα απομονωμένα και δυαδικοποιημένα κύτταρα από τα προηγούμενα στάδια της ανάλυσης(βήμα 1), εφαρμόζει για κάθε κύτταρο ένα κατώφλι έντασης σήματος ώστε να εξασφαλίσει ότι όλο το σήμα στην εικόνα θα προέρχεται από το κύτταρο, υπολογίζει σε κάθε χρονικό σημείο την επιφάνεια που καταλαμβάνει το κύτταρο και δημιουργεί ένα αρχείο σε μορφή excel (βήμα 3) που περιέχει την πληροφορία για όλα τα μικρογλοιακά κύτταρα και για κάθε χρονική στιγμή. Αυτή η πληροφορία θα χρησιμοποιηθεί (ως μέση τιμή της επιφάνειας κάλυψης για κάθε κύτταρο), στον τύπο τελικού υπολογισμού του MI.

Χρησιμοποιώντας τα αποτελέσματα του προγράμματος μακροεντολών για την επιφάνεια αλλά και τον δείκτη επιτήρησης για κάθε κύτταρο όπως προέκυψε από τα προηγούμενα στάδια ανάλυσης, παρατηρείται ότι τα μικρογλοιακά κύτταρα εμφανίζουν μειωμένο δείκτη κινητικότητας και στη φάση της κορύφωσης των κλινικών συμπτωμάτων αλλά και στη χρόνια φάση της ΠΑΕ (Εικ.3.9.Α).

3.5. Ο συνολικός αριθμός των μικρογλοιακών κυττάρων στην περιοχή του φλοιού του εγκεφάλου μειώνεται κατά την κορύφωση αλλά και κατά τη χρόνια φάση της ΠΑΕ

Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο υπολογισμού της πυκνότητας των μικρογλοιακών κυττάρων ανά περιοχή εστίασης στο φλοιό του εγκεφάλου με τον τρόπο που αναφέρθηκε (Υλικά και Μέθοδοι), υπολογίστηκε ο συνολικός αριθμός κυττάρων ανά περιοχή για κάθε εικόνα και για όλο το χρονικό εύρος της εικοσάλεπτης εγγραφής. Συνολικά αναλύθηκαν *10* εικόνες για τους υγιείς ποντικούς (naive), *12* για ποντικούς που βρίσκονται στο στάδιο κορύφωσης της νόσου (peak) και *13* εικόνες για ποντικούς που βρίσκονται στο χρόνιο στάδιο (late) της ΠΑΕ. Παρατηρείται ότι και στην κορύφωση αλλά και στη χρόνια φάση της ΠΑΕ τα μικρογλοιακά κύτταρα

εμφανίζονται με μειωμένη πυκνότητα σε σχέση με την πυκνότητα που παρουσιάζουν υπό φυσιολογικές συνθήκες στο naïve στάδιο (Εικ.3.9.Β).



Εικ.3.9. Αποτελέσματα ανάλυσης για τον δείκτη κινητικότητας (relative motility index- εικόνα Α) και την πυκνότητα των μικρογλοιακών κυττάρων ανά εικόνα (εικόνα Β). Ο δείκτης κινητικότητας (εικόνα Α) παρουσιάζεται κανονικοποιημένος ως προς το χρονικό σημείο των υγιών ποντικών (naïve)**.** Και στα 2 χρονικά σημεία του μοντέλου της ΠΑΕ (peak και late), παρατηρείται μειωμένη κινητικότητα των μικρογλοιακών κυττάρων. Ο συνολικός αριθμός των μικρογλοιακών κυττάρων ανά περιοχή (πυκνότητα – εικόνα Β), κανονικοποιημένος ως προς mm^3 , παρουσιάζεται επίσης μειωμένος και στα 2 χρονικά σημεία (peak και late) σε σχέση με τους υγιείς ποντικούς.

Συμπερασματικά, τα συνολικά αποτελέσματα δείχνουν ότι η ΠΑΕ δείχνει να επιφέρει μορφολογικές αλλαγές στα μικρογλοιακά κύτταρα και στις τρεις περιοχές του εγκεφάλου που μελετήθηκαν. Οι αλλαγές αυτές μεταφράζονται σε αύξηση του όγκου και της διαμέτρου των προεκβολών των κυττάρων, σε μείωση του συνολικού αριθμού των προεκβολών, των διακλαδώσεών τους και του συνολικού τους μήκους αλλά και σε μειωμένο γενικά αριθμό μικρογλοιακών κυττάρων ανά περιοχή. Αν και οι αλλαγές παρατηρούνται και στις τρεις περιοχές του εγκεφάλου που εξετάστηκαν, σημαντική διαφοροποίηση αποτελεί το χρονικό στάδιο της ΠΑΕ στο οποίο εμφανίζονται σε κάθε περιοχή. Συνολικά, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα μικρογλοιακά κύτταρα στην

περιοχή της παρεγκεφαλίδας επηρεάζονται νωρίτερα σε σχέση με αυτά άλλων περιοχών του εγκεφάλου από την παθολογία της ΠΑΕ, φανερώνοντας έτσι μια τοπολογική εξειδίκευση της απόκρισης της μικρογλοίας σε παθολογικά ερεθίσματα.

Από την ανάλυση της κινητικότητας των μικρογλοιακών κυττάρων στην περιοχή του φλοιού του εγκεφάλου, η ΠΑΕ δείχνει να προκαλεί μείωση στην ικανότητα επιτήρησης των μικρογλοιακών κυττάρων κατά τη φάση της κορύφωσης αλλά και κατά τη χρόνια φάση της νόσου. Αυτό σε συνδυασμό και με το μειωμένο αριθμό μικρογλοιακών κυττάρων που παρατηρείται σε αυτά τα χρονικά σημεία, οδηγεί σε μειωμένη ικανότητα επιτήρησης από τα μικρογλοιακά κύτταρα γενικά στην περιοχή του φλοιού του εγκεφάλου στα στάδια της κορύφωσης της κλινικής συμπτωματολογίας της ΠΑΕ αλλά και της χρόνιας φάσης της.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία αναπτύχθηκε μια συγκεκριμένη μεθοδολογία, χρησιμοποιώντας υπολογιστικά εργαλεία και βιοπληροφορικές μεθόδους, με σκοπό την ανάλυση των μορφολογικών χαρακτηριστικών και της δυναμικής των μικρογλοιακών κυττάρων του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) κατά την εξέλιξη της παθολογίας της Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας (ΠΑΕ), που αποτελεί πειραματικό μοντέλο της Σκλήρυνσης Κατά Πλάκας σε ποντικούς. Σε συνέπεια με πολλές προηγούμενες βιβλιογραφικές αναφορές, στις οποίες έχει καταγραφεί αλλαγή στη μορφολογία της μικρογλοίας κάτω από παθολογικές συνθήκες (Nelson et al., 2012, Jack et al., 2015, Lehnardt et al., 2010), παρατηρήσαμε μορφολογικές αλλαγές αλλά και αλλαγές στην κινητικότητα των μικρογλοιακών κυττάρων κατά τα διάφορα στάδια εξέλιξης της παθολογίας του ΕΑΕ μοντέλου. Ωστόσο, η ανάλυση της μικρογλοίας στην εργασία αυτή καλύπτει για πρώτη φορά όλο το φάσμα εξέλιξης της νόσου, συμπεριλαμβανομένης της προ-κλινικής φάσης, αλλά και σε διάφορες περιοχές της φαιάς ουσίας του εγκεφάλου με άμεσα συγκριτικά αποτελέσματα.

Αρχικά, σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η ανάπτυξη προγραμμάτων μακροεντολών (scripts) για την προ-επεξεργασία εικόνων μικρογλοίας από μικροσκόπια φθορισμού. Η διαδικασία αυτή αποτελεί το πρώτο βήμα ανάλυσης δεδομένων μεγάλου όγκου αλλά και το πιο σημαντικό δεδομένου της συνεχούς κίνησης των προεκβολών της μικρογλοίας και της ιδιαίτερης μορφολογίας της που απαιτούν τη χρήση όσο το δυνατόν αναλυτικότερης και ευκρινέστερης εικόνας για τη μετέπειτα ανάλυσή της. Από την εργασία αυτή προέκυψαν δύο προγράμματα μακροεντολών για το σκοπό αυτό, ένα για την προ-επεξεργασία εικόνων συνεστιακής μικροσκοπίας για περαιτέρω μορφολογική ανάλυση της μικρογλοίας και ένα για την προ-επεξεργασία εικόνων διφωτονικής μικροσκοπίας για περαιτέρω ανάλυση της μικρογλοιακής επιτήρησης και της κινητικότητας των προεκβολών της κατά την εξέλιξη της ΠΑΕ.

Επόμενο βήμα στον σχεδιασμό της αυτοματοποιημένης ανάλυσης των ιδιοτήτων της μικρογλοίας κατά την ΠΑΕ ήταν η υπολογιστική ιχνηλάτηση της μικρογλοίας σε κυτταρικό επίπεδο, που πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του

προγράμματος Imaris, η εγκυρότητα του οποίου επιβεβαιώθηκε επιπλέον με τη χρήση των προγραμμάτων NeuTube και Vaa3D. Η ανάλυση σε κυτταρικό επίπεδο είναι η μόνη διαδικασία στο υπολογιστικό πρωτόκολλο που πραγματοποιείται χειροκίνητα λόγω της ιδιαίτερης μορφολογίας της μικρογλοίας, που απαιτεί την εμπειρία του πειραματιστή. Τα αποτελέσματα της ιχνηλάτησης αξιοποιήθηκαν στη συνέχεια για την ανάπτυξη της εφαρμογής MicroApp, χρησιμοποιώντας τις γλώσσες προγραμματισμού Java και Matlab. Από τη συγκεκριμένη εφαρμογή προκύπτουν τα τελικά αποτελέσματα της ανάλυσης της μικρογλοίας σε γραφική αλλά και αριθμητική μορφή, αποθηκευμένη σε ένα αρχείο excel που περιέχει τις τελικές πληροφορίες για όλα τα κύτταρα. Επιπρόσθετα, η εφαρμογή εκτελεί αυτόματα όλους τους απαραίτητους στατιστικούς ελέγχους για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Η MicroApp αποτελεί μια πλήρως λειτουργική εφαρμογή για τους σκοπούς της εργασίας αυτής, αλλά δύναται να τροποποιηθεί στο μέλλον έτσι ώστε να μπορεί να εφαρμοστεί σε δεδομένα μικρογλοίας μεγάλου όγκου και για άλλες μελέτες.

Τελικά, από την εργασία αυτή προέκυψαν αποτελέσματα βιολογικού ενδιαφέροντος, κάτι που λόγω του μεγάλου όγκου δεδομένων δε θα μπορούσε να έχει επιτευχθεί διαφορετικά. Συγκεκριμένα, αναλύθηκε για πρώτη φορά η μορφολογία της μικρογλοίας σε όλο το φάσμα εξέλιξης της ΠΑΕ αλλά και σε διαφορετικές περιοχές της φαιάς ουσίας του εγκεφάλου (φλοιό, ιππόκαμπο και παρεγκεφαλίδα) και του νωτιαίου μυελού ταυτόχρονα. Τα συνολικά αποτελέσματα δείχνουν ότι η ΠΑΕ επιφέρει μορφολογικές αλλαγές στα μικρογλοιακά κύτταρα σε όλες τις περιοχές του εγκεφάλου που μελετήθηκαν. Οι αλλαγές αυτές μεταφράζονται σε αύξηση του όγκου και της διαμέτρου των προεκβολών των κυττάρων, σε μείωση του συνολικού αριθμού των προεκβολών, των διακλαδώσεών τους και του συνολικού τους μήκους αλλά και σε μειωμένο γενικά αριθμό μικρογλοιακών κυττάρων ανά περιοχή. Αν και οι αλλαγές παρατηρούνται σε όλες τις περιοχές του εγκεφάλου που εξετάστηκαν, σημαντική διαφοροποίηση αποτελεί το χρονικό στάδιο της ΠΑΕ στο οποίο εμφανίζονται σε κάθε περιοχή. Συνολικά, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα μικρογλοιακά κύτταρα συγκεκριμένα στην περιοχή της παρεγκεφαλίδας επηρεάζονται γρηγορότερα σε σχέση με αυτά άλλων περιοχών του εγκεφάλου από την παθολογία της ΠΑΕ, φανερώνοντας έτσι μια τοπολογική εξειδίκευση της απόκρισης της μικρογλοίας σε παθολογικά ερεθίσματα.

Η περιοχή της παρεγκεφαλίδας, παρόλο που αντιπροσωπεύει μόνο το 10% του συνολικού μεγέθους του ανθρώπινου εγκεφάλου, περιλαμβάνει περίπου τον ίδιο αριθμό νευρικών κυττάρων με όλο τον υπόλοιπο εγκέφαλο (Voogd, 2003). Μέσω αυτών των πολυπληθών νευρώνων που σχηματίζουν ένα πολύπλοκο νευρικό δίκτυο, η παρεγκεφαλίδα είναι υπεύθυνη για σημαντικές νευρολογικές λειτουργίες όπως είναι οι λεπτές κινητικές δεξιότητες (Monaco et al., 2014, D'Angelo, 2014) αλλά σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, συμμετέχει και σε διάφορες ανώτερες νοητικές και συναισθηματικές λειτουργίες (Koziol et al., 2014). Λόγω της πολυπλοκότητας του νευρικού δικτύου που την αποτελεί, η παρεγκεφαλίδα εμπλέκεται σε πολλές νευροεκφυλιστικές διαταραχές όπως είναι το Alzheimer και η ΣΚΠ (Castellazzi et al., 2014). Κατά τη ΣΚΠ, η περιοχή της παρεγκεφαλίδας δεν έχει έως τώρα μελετηθεί διεξοδικά, παρ'όλα αυτά παρουσιάζεται ιδιαίτερα επιρρεπής στην ανάπτυξη εστιών απομυελίνωσης τόσο στη λευκή όσο και στη φαιά ουσία. Ειδικότερα στην προϊούσα ΣΚΠ, η απομυελίνωση εμφανίζεται πιο εκτεταμένη στην περιοχή της φαιάς ουσίας και το ποσοστό της δείχνει να σχετίζεται και με τη γενικότερη έκταση της παθολογίας της νόσου, ειδικότερα στη χρόνια φάση της (Kutzelnigg et al., 2007, Howell et al., 2015,Gilmore et al., 2009). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το ότι σε ασθενείς με ΣΚΠ παρουσιάζεται επίσης ατροφία της παρεγκεφαλίδας κυρίως στη φαιά ουσία, καθιστά τη μελέτη της περιοχής αυτής ιδιαιτέρως σημαντική για τη διεξαγωγή συμπερασμάτων που έως τώρα δεν ήταν γνωστά για τη ΣΚΠ.

Η συγκεκριμένη εργασία, φανέρωσε για πρώτη φορά ότι η μορφολογία της μικρογλοίας επηρεάζεται γρηγορότερα στην παρεγκεφαλίδα ποντικών με ΠΑΕ σε σχέση με τις υπόλοιπες περιοχές του εγκεφάλου που αναλύθηκαν, και μάλιστα το φαινόμενο αυτό παρουσιάζεται ήδη από την προ-κλινική φάση της νόσου. Ο μοριακός μηχανισμός που ελέγχει τη μεταβολή αυτή δεν έχει ακόμα εξετασθεί, παρ'όλα αυτά ενδιαφέρον παρουσιάζει το αποτέλεσμα από τη Sholl ανάλυση για την περιοχή της παρεγκεφαλίδας, κατά το οποίο τα μικρογλοιακά κύτταρα φαίνεται μεν να μικραίνουν σε μέγεθος και να αποκτούν υπερτροφική μορφολογία στα προ-κλινικά στάδια της νόσου αλλά στα μετέπειτα στάδια ο βαθμός διακλάδωσής τους δείχνει να επανέρχεται και μάλιστα να παράγουν φιλοπόδια κοντά στο κυτταρικό τους σώμα. Αυτός ο ιδιαίτερος φαινότυπος παρομοιάζει το φαινότυπο της μικρογλοίας που περιγράφηκε πρόσφατα (Bernier et al., 2019), κατά τον οποίο στα άκρα των κύριων προεκβολών της μικρογλοίας εντοπίζονται μικρά φιλοπόδια των οποίων η κίνηση είναι ταχύτερη και

ελέγχεται από διαφορετικό μοριακό μηχανισμό. Ο μηχανισμός που προκαλεί αυτή τη φαινοτυπική αντίδραση των μικρογλοιακών κυττάρων και μάλιστα μόνο στην περιοχή της παρεγκεφαλίδας αλλά και ο πιθανός ρόλος που μπορεί να κατέχει στην εξέλιξη του μοντέλου της ΠΑΕ, από θετικός νευροπροστατευτικός ρόλος έως και αρνητικός που πιθανόν να σχετίζεται με παθολογικούς παράγοντες όπως η απομυελίνωση και να συνεισφέρει έτσι στην επιδείνωση της κατάστασης που προκαλεί η νόσος, παραμένει ερωτηματικό και θα αποτελέσει μελλοντικό στόχο της παρούσας μελέτης.

Η εργασία αυτή επίσης συνέβαλλε στην ανάλυση της κινητικότητας των προεκβολών της μικρογλοίας κατά την ΠΑΕ αλλά και της συνολικής επιτήρησης που επιτελεί στον εγκέφαλο. Από το συνδυασμό in vivo διφωτονικής μικροσκοπίας και της χρήσης των υπολογιστικών εργαλείων για την προ-επεξεργασία εικόνων που αναπτύχθηκαν, προέκυψε ότι η ΠΑΕ προκαλεί μείωση στην ικανότητα επιτήρησης των μικρογλοιακών κυττάρων στο φλοιό του εγκεφάλου κατά τη φάση της κορύφωσης αλλά και κατά τη χρόνια φάση της νόσου. Αυτό σε συνδυασμό και με τον μειωμένο αριθμό μικρογλοιακών κυττάρων που παρατηρείται σε αυτά τα χρονικά σημεία, οδηγεί σε μειωμένη ικανότητα επιτήρησης από τα μικρογλοιακά κύτταρα γενικά στην περιοχή του φλοιού του εγκεφάλου στα στάδια της κορύφωσης της κλινικής συμπτωματολογίας της ΠΑΕ αλλά και της χρόνιας φάσης της. Επόμενο βήμα αυτής της ανάλυσης είναι η πραγματοποίηση in vivo διφωτονικής μικροσκοπίας στην περιοχή της παρεγκεφαλίδας στην προκλινική αλλά και στη χρόνια φάση της ΠΑΕ, προκειμένου να συγκριθεί η κινητικότητά τους στα δύο αυτά χρονικά σημεία της νόσου και να εξακριβωθεί αν παρουσιάζεται και in vivo η μορφολογική μεταβολή που παρατηρήσαμε με το συνεστιακό μικροσκόπιο και τη χρήση της εφαρμογής MicroApp.

Τα βιολογικά ερωτήματα που προέκυψαν από την ανάλυση των αποτελεσμάτων της μεθοδολογίας που ακολουθήσαμε σε αυτή την εργασία οδηγούν και σε διάφορους μελλοντικούς στόχους για τη βελτίωση και επέκταση της λειτουργίας της. Εστιάζοντας στην περίπτωση των φιλοποδίων που δείχνουν να εμφανίζονται κοντά στο κυτταρικό σώμα στην παρεγκεφαλίδα, δημιουργείται η ανάγκη να αναπτυχθεί μια νέα μέθοδος βιοπληροφορικής ανάλυσης των συγκεκριμένων δομών με σκοπό αρχικά να επιβεβαιωθεί η παρουσία τους με μορφολογικά κριτήρια και κριτήρια της κινητικότητάς τους και στη συνέχεια να αναλυθεί η δική τους λειτουργία επιτήρησης σε νανοκλίμακα (nanosurveillance, Bernier et al.) αλλά και να ερευνηθεί σε βιολογικό

επίπεδο ο μηχανισμός που προκαλεί την εμφάνισή τους αλλά και ο ρόλος που αυτά αναλαμβάνουν ως δομές επιτήρησης των μικρογλοιακών κυττάρων κατά τη ΣΚΠ.

Επιπλέον, η ανάλυση της κινητικότητας των μικρογλοιακών κυττάρων έως τώρα πραγματοποιήθηκε στο δισδιάστατο επίπεδο του maximum projection. Αυτό επιλέχθηκε καθώς πέρα από την πολυπλοκότητα του αλγορίθμου που χρειάζεται για μια τέτοια ανάλυση, ανασταλτικό παράγοντα αποτελεί και η μεγάλη υπολογιστική ισχύς που θα απαιτείται καθώς ο χρόνος ανάλυσης θα αυξηθεί εκθετικά για κάθε σύνολο εικόνων. Μελλοντικός στόχος της μεθοδολογίας μας είναι να αναπτυχθεί ένας κατάλληλος αλγόριθμος ο οποίος θα επιτρέψει την ανάλυση κάθε κυττάρου στο τρισδιάστατο επίπεδο στη μεγαλύτερη δυνατή ταχύτητα, εξασφαλίζοντας έτσι πολύ μεγαλύτερη ακρίβεια στο αποτέλεσμα καθώς θα αποφευχθεί η απώλεια πληροφορίας λόγω της μετατροπής της εικόνας από 3D σε 2D.

Τέλος, το μοντέλο της ΠΑΕ που χρησιμοποιήθηκε στην εργασία αυτή προσομοιάζει κατά κύριο λόγο το ανοσολογικό κομμάτι της ΣΚΠ και την εισβολή των κυττάρων του περιφερειακού νευρικού συστήματος στο ΚΝΣ. Άμεσος στόχος αποτελεί να εφαρμοστεί η βιοπληροφορική ανάλυση της μεθοδολογίας που αναπτύχθηκε για να παρατηρήσουμε την αντίδραση της μικρογλοίας και σε διαφορετικά ζωικά μοντέλα και πιο συγκεκριμένα στο μοντέλο cuprizone που λειτουργεί ως μοντέλο απομυελίνωσης. Ταυτόχρονα, η μεθοδολογία ανάλυσης θα εμπλουτιστεί με νέες μεθόδους που θα αφορούν την ποσοτικοποίηση του ποσοστού της απομυελίνωσης και της επαναμυελίνωσης κατά την εφαρμογή του μοντέλου του cuprizone αλλά και τη συσχέτισή τους με τα μικρογλοιακά κύτταρα σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abbott, N. J., & Friedman, A. (2012). Overview and introduction: The blood-brain barrier in health and disease. Epilepsia, 53, 1–6. https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03696.x

Abiega, O., Beccari, S., Diaz-Aparicio, I., Nadjar, A., Layé, S., Leyrolle, Q., Sierra, A. (2016). Neuronal Hyperactivity Disturbs ATP Microgradients, Impairs Microglial Motility, and Reduces Phagocytic Receptor Expression Triggering Apoptosis/Microglial Phagocytosis Uncoupling. PLoS Biology, 14(5). https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002466

Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., McNagny, K. M., & Rossi, F. M. V. (2011). Infiltrating monocytes trigger EAE progrAjami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., McNagny, K. M., & Rossi, F. M. V. (2011). Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. Nature Neuroscience, 14(9), 114. Nature Neuroscience, 14(9), 1142–1149. https://doi.org/10.1038/nn.2887

Almolda, B., Gonzalez, B., & Castellano, B. (2011). Microglia and brain macrophages in health and disease. Frontiers in Biosciences, 16, 1157–1171. https://doi.org/10.1038/nri.2017.125

Almolda, B., González, B., & Castellano, B. (2010). Activated microglial cells acquire an immature dendritic cell phenotype and may terminate the immune response in an acute model of EAE. Journal of Neuroimmunology, 223(1–2), 39–54. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.03.021

Amato, M. P., & Ponziani, G. (2000). A prospective study on the prognosis of multiple sclerosis. Neurological Sciences : Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology, 21(4 Suppl 2), S831-8. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11205358

Anderson, C. M., & Swanson, R. A. (2000). Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. Glia, 32(1), 1–14. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10975906

Anderson, V. M., Fisniku, L. K., Altmann, D. R., Thompson, A. J., & Miller, D. H. (2009). MRI measures show significant cerebellar gray matter volume loss in multiple sclerosis and are associated with cerebellar dysfunction. Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England), 15(7), 811–817. https://doi.org/10.1177/1352458508101934

Askew, K., Li, K., Olmos-Alonso, A., Garcia-Moreno, F., Liang, Y., Richardson, P., Gomez-Nicola, D. (2017). Coupled Proliferation and Apoptosis Maintain the Rapid Turnover of Microglia in the Adult Brain. Cell Reports, 18(2), 391–405. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.041

Avignone, E., Lepleux, M., Angibaud, J., & Nägerl, U. V. (2015). Altered morphological dynamics of activated microglia after induction of status epilepticus. Journal of Neuroinflammation, 12, 202. https://doi.org/10.1186/s12974-015-0421-6

Benveniste, E. N. (1997). Cytokines: influence on glial cell gene expression and function. Chemical Immunology, 69, 31–75. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9353961

Bittner, S., Afzali, A. M., Wiendl, H., & Meuth, S. G. (2014). Myelin Oligodendrocyte glycoprotein (MOG<inf>35-55</inf>) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. Journal of Visualized Experiments, (86). https://doi.org/10.3791/51275

Bø, L. (2009). The histopathology of grey matter demyelination in multiple sclerosis. Acta Neurologica Scandinavica. Supplementum, (189), 51–57. https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2009.01216.x

Bö, L., Geurts, J. J. G., Mörk, S. J., & van der Valk, P. (2006). Grey matter pathology in multiple sclerosis. Acta Neurologica Scandinavica. Supplementum, 183, 48–50. https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2006.00615.x

Bogie, J. F. J., Stinissen, P., & Hendriks, J. J. A. (2014). Macrophage subsets and microglia in multiple sclerosis. Acta Neuropathologica, 128(2), 191–213. https://doi.org/10.1007/s00401-014-1310-2

Bonham, L. W., Sirkis, D. W., & Yokoyama, J. S. (2019). The Transcriptional Landscape of Microglial Genes in Aging and Neurodegenerative Disease. Frontiers in Immunology, 10, 1170. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01170

Bunge, R. P. (1968). Glial cells and the central myelin sheath. Physiological Reviews, Vol. 48, pp. 197–251. https://doi.org/10.1152/physrev.1968.48.1.197

Butovsky, O., Jedrychowski, M. P., Moore, C. S., Cialic, R., Lanser, A. J., Gabriely, G., … Weiner, H. L. (2014). Identification of a unique TGF-β-dependent molecular and functional signature in microglia. Nature Neuroscience, 17(1), 131–143. https://doi.org/10.1038/nn.3599

Cantaut-Belarif, Y., Antri, M., Pizzarelli, R., Colasse, S., Vaccari, I., Soares, S., Bessis, A. (2017). Microglia control the glycinergic but not the GABAergic synapses via prostaglandin E2 in the spinal cord. Journal of Cell Biology, 216(9), 2979–2989. https://doi.org/10.1083/jcb.201607048

Carta, I., Chen, C. H., Schott, A., Dorizan, S., & Khodakhah, K. (2019). Cerebellar Modulation of the Reward Circuitry and social behavior. Science (New York, N.Y.), 363(6424).

Castellazzi, G., Palesi, F., Casali, S., Vitali, P., Sinforiani, E., Wheeler-Kingshott, C. A. M., & D'Angelo, E. (2014). A comprehensive assessment of resting state networks: bidirectional modification of functional integrity in cerebro-cerebellar networks in dementia. Frontiers in Neuroscience, 8, 223. https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00223

Chen, S. K., Tvrdik, P., Peden, E., Cho, S., Wu, S., Spangrude, G., & Capecchi, M. R. (2010). Hematopoietic origin of pathological grooming in Hoxb8 mutant mice. Cell, 141(5), 775–785. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.055

Chen, Y., Bai, Y., Han, Z., He, W., & Guo, Z. (2015, July 21). Photoluminescence imaging of Zn2+ in living systems. Chemical Society Reviews, Vol. 44, pp. 4517–4546. https://doi.org/10.1039/c5cs00005j

Cherry, J. D., Olschowka, J. A., & O'Banion, M. K. (2014, June 3). Neuroinflammation and M2 microglia: The good, the bad, and the inflamed. Journal of Neuroinflammation, Vol. 11. https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-98

Coles, A. J. (2013). Alemtuzumab Therapy for Multiple Sclerosis. Neurotherapeutics, Vol. 10, pp. 29–33. https://doi.org/10.1007/s13311-012-0159-0

D'Angelo, E. (2014). The organization of plasticity in the cerebellar cortex: from synapses to control. Progress in Brain Research, 210, 31–58. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63356-9.00002-9

David, S., & Lacroix, S. (2003). Molecular approaches to spinal cord repair. Annual Review of Neuroscience, 26, 411–440. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.043002.094946

Davie, C. A., Barker, G. J., Webb, S., Tofts, P. S., Thompson, A. J., Harding, A. E., … Miller, D. H. (1995). Persistent functional deficit in multiple sclerosis and autosomal dominant cerebellar ataxia is associated with axon loss.[Erratum appears in Brain 1996 Aug;119(Pt 4):1415]. Brain : A Journal of Neurology. Retrieved from http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med3&AN=8595487

de Vries, H. E., Kuiper, J., de Boer, A. G., Van Berkel, T. J., & Breimer, D. D. (1997). The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases. Pharmacological Reviews, 49(2), 143–155. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9228664

Diaspro, A. (2002). Confocal and two-photon microscopy : foundations, applications, and advances. Wiley-Liss.

Dissing-Olesen, L., LeDue, J. M., Rungta, R. L., Hefendehl, J. K., Choi, H. B., & MacVicar, B. A. (2014). Activation of neuronal NMDA receptors triggers transient ATP-mediated microglial process outgrowth. The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience, 34(32), 10511–10527. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0405-14.2014

Domingues, H. S., Portugal, C. C., Socodato, R., & Relvas, J. B. (2016, June 28). Oligodendrocyte, astrocyte, and microglia crosstalk in myelin development, damage, and repair. Frontiers in Cell and Developmental Biology, Vol. 4. https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00071

Dubbelaar, M. L., Kracht, L., Eggen, B. J. L., & Boddeke, E. W. G. M. (2018). The Kaleidoscope of Microglial Phenotypes. Frontiers in Immunology, 9, 1753. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01753

Engelhardt, B. (2003). Development of the blood-brain barrier. Cell and Tissue Research, 314(1), 119–129. https://doi.org/10.1007/s00441-003-0751-z

Eyo, U. B., Murugan, M., & Wu, L. J. (2017, January 1). Microglia–Neuron Communication in Epilepsy. GLIA, Vol. 65, pp. 5–18. https://doi.org/10.1002/glia.23006

Feinstein, A., Freeman, J., & Lo, A. C. (2015). Treatment of progressive multiple sclerosis: what works, what does not, and what is needed. The Lancet. Neurology, 14(2), 194–207. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70231-5

Feng, L., Zhao, T., & Kim, J. (2015). Neutube 1.0: A new design for efficient neuron reconstruction software based on the swc format. ENeuro, 2(1). https://doi.org/10.1523/ENEURO.0049-14.2014

Fernández-Arjona, M. del M., Grondona, J. M., Granados-Durán, P., Fernández-Llebrez, P., & López-Ávalos, M. D. (2017). Microglia morphological categorization in a rat model of neuroinflammation by hierarchical cluster and principal components analysis. Frontiers in Cellular Neuroscience, 11. https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00235

Fontainhas, A. M., Wang, M., Liang, K. J., Chen, S., Mettu, P., Damani, M., … Wong, W. T. (2011). Microglial morphology and dynamic behavior is regulated by ionotropic glutamatergic and GABAergic neurotransmission. PLoS ONE, 6(1). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015973

Freire, M. A. M., Tourinho, S. C., Guimarães, J. S., Oliveira, J. L. F., Picanço-Diniz, C. W., Gomes-Leal, W., & Pereira, A. (2008). Histochemical characterization, distribution and morphometric analysis of NADPH diaphorase neurons in the spinal cord of the agouti. Frontiers in Neuroanatomy, 2, 2. https://doi.org/10.3389/neuro.05.002.2008

Garcia, J. A., Cardona, S. M., & Cardona, A. E. (2013). Analyses of microglia effector function using CX3CR1-GFP knock-in mice. Methods in Molecular Biology, 1041, 307–317. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-520-0_27

Geloso, M. C., Corvino, V., Marchese, E., Serrano, A., Michetti, F., & D'Ambrosi, N. (2017, July 25). The dual role of microglia in ALS: Mechanisms and therapeutic approaches. Frontiers in Aging Neuroscience, Vol. 9. https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00242

Geurts, J. J. G., Bö, L., Roosendaal, S. D., Hazes, T., Daniëls, R., Barkhof, F., … van der Valk, P. (2007). Extensive hippocampal demyelination in multiple sclerosis. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology, 66(9), 819–827. https://doi.org/10.1097/nen.0b013e3181461f54

Ghosh, A., Gao, L., Thakur, A., Siu, P. M., & Lai, C. W. K. (2017, July 27). Role of free fatty acids in endothelial dysfunction. Journal of Biomedical Science, Vol. 24. https://doi.org/10.1186/s12929-017-0357-5

Ghosh, S., Castillo, E., Frias, E. S., & Swanson, R. A. (2018, June 1). Bioenergetic regulation of microglia. GLIA, Vol. 66, pp. 1200–1212. https://doi.org/10.1002/glia.23271

Gilmore, C. P., Donaldson, I., Bö, L., Owens, T., Lowe, J., & Evangelou, N. (2009). Regional variations in the extent and pattern of grey matter demyelination in multiple sclerosis: a comparison between the cerebral cortex, cerebellar cortex, deep grey matter nuclei and the spinal cord. Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry, 80(2), 182–187. https://doi.org/10.1136/jnnp.2008.148767

Gilmore, C. P., Geurts, J. J. G., Evangelou, N., Bot, J. C. J., van Schijndel, R. A., Pouwels, P. J. W., … Bö, L. (2009). Spinal cord grey matter lesions in multiple sclerosis detected by post-mortem high field MR imaging. Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England), 15(2), 180–188. https://doi.org/10.1177/1352458508096876

Ginhoux, F., & Guilliams, M. (2016). Mphage_tissue-homeostasis_rev_CellImmu2016. Immunity, 44(3), 439–449. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.024

Goldenberg, M. M. (2012). Multiple sclerosis review. P & T : A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management, 37(3), 175–184. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22605909

Gossman, W., Ehsan, M., & Xixis, K. L. (2019). Multiple Sclerosis. In StatPearls. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29763024

Grabert, K., Michoel, T., Karavolos, M. H., Clohisey, S., Kenneth Baillie, J., Stevens, M. P., … McColl, B. W. (2016). Microglial brain regionâ ’dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. Nature Neuroscience, 19(3), 504–516. https://doi.org/10.1038/nn.4222

Guruswamy, R., & Elali, A. (2017, March 1). Complex roles of microglial cells in ischemic stroke pathobiology: New insights and future directions. International Journal of Molecular Sciences, Vol. 18. https://doi.org/10.3390/ijms18030496

Gyoneva, S., Davalos, D., Biswas, D., Swanger, S. A., Garnier-Amblard, E., Loth, F., … Traynelis, S. F. (2014). Systemic inflammation regulates microglial responses to tissue damage in vivo. GLIA, 62(8), 1345–1360. https://doi.org/10.1002/glia.22686

Gyoneva, S., & Traynelis, S. F. (2013). Norepinephrine modulates the motility of resting and activated microglia via different adrenergic receptors. The Journal of Biological Chemistry, 288(21), 15291–15302. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.458901

Han, J., Zhu, K., Zhang, X. M., & Harris, R. A. (2019, February 1). Enforced microglial depletion and repopulation as a promising strategy for the treatment of neurological disorders. GLIA, Vol. 67, pp. 217–231. https://doi.org/10.1002/glia.23529

Hansen, D. V., Hanson, J. E., & Sheng, M. (2018, February 1). Microglia in Alzheimer’s disease. Journal of Cell Biology, Vol. 217, pp. 459–472. https://doi.org/10.1083/jcb.201709069

Haynes, S. E., Hollopeter, G., Yang, G., Kurpius, D., Dailey, M. E., Gan, W.-B., & Julius, D. (2006). The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. Nature Neuroscience, 9(12), 1512–1519. https://doi.org/10.1038/nn1805

Healy, S., McMahon, J., & FitzGerald, U. (2018). Seeing the wood for the trees: towards improved quantification of glial cells in central nervous system tissue. Neural Regeneration Research, 13(9), 1520–1523. https://doi.org/10.4103/1673-5374.235222

Helmchen, F., & Denk, W. (2005). Deep tissue two-photon microscopy. Nature Methods, 2(12), 932–940. https://doi.org/10.1038/nmeth818

Heppner, F. L., Greter, M., Marino, D., Falsig, J., Raivich, G., Hövelmeyer, N., … Aguzzi, A. (2005). Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. Nature Medicine, 11(2), 146–152. https://doi.org/10.1038/nm1177

Hirasawa, T., Ohsawa, K., Imai, Y., Ondo, Y., Akazawa, C., Uchino, S., & Kohsaka, S. (2005). Visualization of microglia in living tissues using Iba1-EGFP transgenic mice. Journal of Neuroscience Research, 81(3), 357–362. https://doi.org/10.1002/jnr.20480

Hohlfeld, R., & Wekerle, H. (2004). Autoimmune concepts of multiple sclerosis as a basis for selective immunotherapy: From pipe dreams to (therapeutic) pipelines. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(SUPPL. 2), 14599–14606. https://doi.org/10.1073/pnas.0404874101

Honigman, J. S., DiGregorio, K. M., Dedkov, E. I., Leheste, J. R., Leng, L., Bucala, R., & Torres, G. (2012). Distribution maps of D-dopachrome tautomerase in the mouse brain. Neuroscience, 226, 382–387. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.09.009

Howell, O. W., Schulz-Trieglaff, E. K., Carassiti, D., Gentleman, S. M., Nicholas, R., Roncaroli, F., & Reynolds, R. (2015). Extensive grey matter pathology in the cerebellum in multiple sclerosis is linked to inflammation in the subarachnoid space. Neuropathology and Applied Neurobiology, 41(6), 798–813. https://doi.org/10.1111/nan.12199

Hua, J. Y., & Smith, S. J. (2004). Neural activity and the dynamics of central nervous system development. *Nature Neuroscience*, *7*(4), 327–332. https://doi.org/10.1038/nn1218

Jack, C., Ruffini, F., Bar-Or, A., & Antel, J. P. (2005). Microglia and multiple sclerosis. Journal of Neuroscience Research, 81(3), 363–373. https://doi.org/10.1002/jnr.20482

Janssen, D. A. W., Hoenderop, J. G., Heesakkers, J. P. F. A., & Schalken, J. A. (2016). TRPV4 mediates afferent pathways in the urinary bladder. A spinal c-fos study showing TRPV1 related adaptations in the TRPV4 knockout mouse. Pflugers Archiv : European Journal of Physiology, 468(10), 1741–1749. https://doi.org/10.1007/s00424-016-1859-9

Jin, X., & Yamashita, T. (2016). Microglia in central nervous system repair after injury. Journal of Biochemistry, 159(5), 491–496. https://doi.org/10.1093/jb/mvw009

Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M. J., Kreutzberg, G. W., Sher, A., & Littman, D. R. (2000). Analysis of fractalkine receptor CX3CR1 function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein. Molecular and Cellular Biology, 20(11), 4106–4114. https://doi.org/10.1128/MCB.20.11.4106-4114.2000

Kamradt, T., Soloway, P. D., Perkins, D. L., & Gefter, M. L. (1991). Pertussis toxin prevents the induction of peripheral T cell anergy and enhances the T cell response to an encephalitogenic peptide of myelin basic protein. Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950), 147(10), 3296–3302.

Katz, L. C., & Shatz, C. J. (1996). Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science (New York, N.Y.)*, *274*(5290), 1133–1138. https://doi.org/10.1126/science.274.5290.1133

Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. Physiological Reviews, 91(2), 461–553. https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010

Khan, I., Gillilan, R., Kriksunov, I., Williams, R., Zipfel, W. R., & Englich, U. (2012). Confocal microscopy on the beamline: novel three-dimensional imaging and sample positioning. Journal of Applied Crystallography, 45(Pt 5), 936–943. https://doi.org/10.1107/S002188981203470X

Kletenik, I., Alvarez, E., Honce, J. M., Valdez, B., Vollmer, T. L., & Medina, L. D. (n.d.). Subjective cognitive concern in multiple sclerosis is associated with reduced thalamic and cortical gray matter volumes. Multiple Sclerosis Journal - Experimental, Translational and Clinical, 5(1), 2055217319827618. https://doi.org/10.1177/2055217319827618

Kluge, M. G., Kracht, L., Abdolhoseini, M., Ong, L. K., Johnson, S. J., Nilsson, M., & Walker, F. R. (2017). Impaired microglia process dynamics post-stroke are specific to sites of secondary neurodegeneration. Glia, 65(12), 1885–1899. https://doi.org/10.1002/glia.23201

Koskimäki, F., Bernard, J., Yong, J., Arndt, N., Carroll, T., Lee, S.-K., … Javed, A. (2018). Gray matter atrophy in multiple sclerosis despite clinical and lesion stability during natalizumab treatment. PloS One, 13(12), e0209326. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209326

Kotter, M. R., Li, W.-W., Zhao, C., & Franklin, R. J. M. (2006). Myelin impairs CNS remyelination by inhibiting oligodendrocyte precursor cell differentiation. The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience, 26(1), 328–332. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2615-05.2006

Kotter, M. R., Zhao, C., van Rooijen, N., & Franklin, R. J. M. (2005). Macrophage-depletion induced impairment of experimental CNS remyelination is associated with a

reduced oligodendrocyte progenitor cell response and altered growth factor expression. Neurobiology of Disease, 18(1), 166–175. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.09.019

Koziol, L. F., Budding, D., Andreasen, N., D'Arrigo, S., Bulgheroni, S., Imamizu, H., … Yamazaki, T. (2014). Consensus paper: The cerebellum's role in movement and cognition. Cerebellum, Vol. 13, pp. 151–177. https://doi.org/10.1007/s12311-013-0511-x

Kronenberg, G., Schöner, J., Nolte, C., Heinz, A., Endres, M., & Gertz, K. (2017, September 1). Charting the perfect storm: emerging biological interfaces between stress and stroke. European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience, Vol. 267, pp. 487–494. https://doi.org/10.1007/s00406-017-0794-x

Kurpius, D., Nolley, E. P., & Dailey, M. E. (2007). Purines induce directed migration and rapid homing of microglia to injured pyramidal neurons in developing hippocampus. Glia, 55(8), 873–884. https://doi.org/10.1002/glia.20509

Kutzelnigg, A., Faber-Rod, J. C., Bauer, J., Lucchinetti, C. F., Sorensen, P. S., Laursen, H., … Lassmann, H. (2007). Widespread demyelination in the cerebellar cortex in multiple sclerosis. Brain Pathology (Zurich, Switzerland), 17(1), 38–44. https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2006.00041.x

Kyrargyri, V., Madry, C., Rifat, A., Arancibia-Carcamo, I. L., Jones, S. P., Chan, V. T. T., … Attwell, D. (2019). P2Y 13 receptors regulate microglial morphology, surveillance, and resting levels of interleukin 1β release. Glia, (August), glia.23719. https://doi.org/10.1002/glia.23719

Lassmann, H., & Bradl, M. (2017, February 1). Multiple sclerosis: experimental models and reality. Acta Neuropathologica, Vol. 133, pp. 223–244. https://doi.org/10.1007/s00401-016-1631-4

Lehnardt, S. (2010). Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. Glia, 58(3), 253–263. https://doi.org/10.1002/glia.20928

Li, M., Li, Z., Ren, H., Jin, W. N., Wood, K., Liu, Q., … Shi, F. D. (2017). Colony stimulating factor 1 receptor inhibition eliminates microglia and attenuates brain injury after intracerebral hemorrhage. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 37(7), 2383–2395. https://doi.org/10.1177/0271678X16666551

Li, Y., Du, X.-F., Liu, C.-S., Wen, Z.-L., & Du, J.-L. (2012). Reciprocal regulation between resting microglial dynamics and neuronal activity in vivo. Developmental Cell, 23(6), 1189–1202. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.10.027

Liang, K. J., Lee, J. E., Wang, Y. D., Ma, W., Fontainhas, A. M., Fariss, R. N., & Wong, W. T. (2009). Regulation of dynamic behavior of retinal microglia by CX3CR1 signaling. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 50(9), 4444–4451. https://doi.org/10.1167/iovs.08-3357

Liddelow, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., … Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. Nature, 541(7638), 481–487. https://doi.org/10.1038/nature21029

Liu, J., & Wang, F. (2017, August 21). Role of neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: Cellular mechanisms and therapeutic implications. Frontiers in Immunology, Vol. 8. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01005

Luo, C., Keown, C. L., Kurihara, L., Zhou, J., He, Y., Li, J., … Ecker, J. R. (2017). Single-cell methylomes identify neuronal subtypes and regulatory elements in mammalian cortex. Science, 357(6351), 600–604. https://doi.org/10.1126/science.aan3351

Luo, C., Jian, C., Liao, Y., Huang, Q., Wu, Y., Liu, X., … Wu, Y. (2017). The role of microglia in multiple sclerosis. Neuropsychiatric Disease and Treatment, 13, 1661–1667. https://doi.org/10.2147/NDT.S140634

Madry, C., Arancibia-Cárcamo, I. L., Kyrargyri, V., Chan, V. T. T., Hamilton, N. B., & Attwell, D. (2018). Effects of the ecto-ATPase apyrase on microglial ramification and surveillance reflect cell depolarization, not ATP depletion. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 115(7), E1608–E1617. https://doi.org/10.1073/pnas.1715354115

Madry, C., Kyrargyri, V., Arancibia-Cárcamo, I. L., Jolivet, R., Kohsaka, S., Bryan, R. M., & Attwell, D. (2018). Microglial Ramification, Surveillance, and Interleukin-1β Release Are Regulated by the Two-Pore Domain K+ Channel THIK-1. Neuron, 97(2), 299-312.e6. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.12.002

Mann, H. B., & Whitney, D. R. (1947). On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. The Annals of Mathematical Statistics, 18(1), 50–60. https://doi.org/10.1214/aoms/1177730491

Markiewicz, I., & Lukomska, B. (2006). The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system. Acta Neurobiologiae Experimentalis, 66(4), 343–358. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17265695

Masuda, T., & Prinz, M. (2016). Microglia: A Unique Versatile Cell in the Central Nervous System. ACS Chemical Neuroscience, 7(4), 428–434. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.5b00317

Matsumoto, Y., Ohmori, K., & Fujiwara, M. (1992). Microglial and astroglial reactions to inflammatory lesions of experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat central nervous system. Journal of Neuroimmunology, 37(1–2), 23–33. https://doi.org/10.1016/0165-5728(92)90152-b

Matsushima, G. K., & Morell, P. (2001). The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. Brain Pathology (Zurich, Switzerland), 11(1), 107–116. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11145196

Miller, S. D., Karpus, W. J., & Davidson, T. S. (2010). Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. Current Protocols in Immunology. https://doi.org/10.1002/0471142735.im1501s77

Moliné-Velázquez, V., Vila-Del Sol, V., de Castro, F., & Clemente, D. (2016). Myeloid cell distribution and activity in multiple sclerosis. Histology and Histopathology, 31(4), 357–370. https://doi.org/10.14670/HH-11-699

Molteni, M., & Rossetti, C. (2017). Neurodegenerative diseases: The immunological perspective. Journal of Neuroimmunology, 313, 109–115. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.11.002

Monaco, J., Casellato, C., Koch, G., & D'Angelo, E. (2014). Cerebellar theta burst stimulation dissociates memory components in eyeblink classical conditioning. The European Journal of Neuroscience, 40(9), 3363–3370. https://doi.org/10.1111/ejn.12700

Mount, H. T. (1973). Multiple sclerosis and other demyelinating diseases. Canadian Medical Association Journal, 108(11), 1356 passim. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4704903

National Institute for Health and Care Excellence (NICE). (2007). Atopic eczema in under 12s: diagnosis and management. NICE Guidelines, (December 2007). https://doi.org/S0891061803000802 [pii]

Natoli, R., Fernando, N., Madigan, M., Chu-Tan, J. A., Valter, K., Provis, J., & Rutar, M. (2017). Microglia-derived IL-1β promotes chemokine expression by Müller cells and RPE in focal retinal degeneration. Molecular Neurodegeneration, 12(1). https://doi.org/10.1186/s13024-017-0175-y

Nelson, P. T., Soma, L. A., & Lavi, E. (2002). Microglia in diseases of the central nervous system. Annals of Medicine, 34(7–8), 491–500. https://doi.org/10.1080/078538902321117698

Neumann, H., Kotter, M. R., & Franklin, R. J. M. (2009). Debris clearance by microglia: An essential link between degeneration and regeneration. Brain, Vol. 132, pp. 288–295. https://doi.org/10.1093/brain/awn109

Nguyen, D., & Xu, T. (n.d.). The expanding role of mouse genetics for understanding human biology and disease. Disease Models & Mechanisms, 1(1), 56–66. https://doi.org/10.1242/dmm.000232

Nicolas, S., Cazareth, J., Zarif, H., Guyon, A., Heurteaux, C., Chabry, J., & Petit-Paitel, A. (2017). Globular adiponectin limits microglia pro-inflammatory phenotype through an AdipoR1/NF-κB signaling pathway. Frontiers in Cellular Neuroscience, 11. https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00352

Ohsawa, K., Imai, Y., Sasaki, Y., & Kohsaka, S. (2004). Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. Journal of Neurochemistry, 88(4), 844–856. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02213.x

Pang, Y., Campbell, L., Zheng, B., Fan, L., Cai, Z., & Rhodes, P. (2010). Lipopolysaccharide-activated microglia induce death of oligodendrocyte progenitor cells and impede their development. Neuroscience, 166(2), 464–475. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.12.040

Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., … Gross, C. T. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. Science (New York, N.Y.), 333(6048), 1456–1458. https://doi.org/10.1126/science.1202529

Papenfuss, T. L., Rogers, C. J., Gienapp, I., Yurrita, M., McClain, M., Damico, N., … Whitacre, C. C. (2004). Sex differences in experimental autoimmune encephalomyelitis in multiple murine strains. Journal of Neuroimmunology, 150(1–2), 59–69. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.01.018

Paris, I., Savage, J. C., Escobar, L., Abiega, O., Gagnon, S., Hui, C.-W., … Valero, J. (2018). ProMoIJ: A new tool for automatic three-dimensional analysis of microglial process motility. Glia, 66(4), 828–845. https://doi.org/10.1002/glia.23287

Parkhurst, C. N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J. N., Yates, J. R., Lafaille, J. J., … Gan, W. B. (2013). Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. Cell, 155(7), 1596–1609. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.030

Parslow, A., Cardona, A., & Bryson-Richardson, R. J. (2014). Sample drift correction following 4D confocal time-lapse Imaging. Journal of Visualized Experiments, (86). https://doi.org/10.3791/51086

Pfeiffer, T., Avignone, E., & Nägerl, U. V. (2016). Induction of hippocampal long-term potentiation increases the morphological dynamics of microglial processes and prolongs their contacts with dendritic spines. Scientific Reports, 6. https://doi.org/10.1038/srep32422

Ponomarev, E. D., Shriver, L. P., Maresz, K., & Dittel, B. N. (2005). Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. Journal of Neuroscience Research, 81(3), 374–389. https://doi.org/10.1002/jnr.20488

Prasad, V., Semwogerere, D., & Weeks, E. R. (2007). Confocal microscopy of colloids. Journal of Physics Condensed Matter, 19(11). https://doi.org/10.1088/0953-8984/19/11/113102

Rajan, S., Wischmeyer, E., Karschin, C., Preisig-Müller, R., Grzeschik, K. H., Daut, J., … Derst, C. (2001). THIK-1 and THIK-2, a novel subfamily of tandem pore domain K+ channels. The Journal of Biological Chemistry, 276(10), 7302–7311. https://doi.org/10.1074/jbc.M008985200

Ramasamy, D. P., Benedict, R. H. B., Cox, J. L., Fritz, D., Abdelrahman, N., Hussein, S., … Zivadinov, R. (2009). Extent of cerebellum, subcortical and cortical atrophy in patients with MS: a case-control study. Journal of the Neurological Sciences, 282(1–2), 47–54. https://doi.org/10.1016/j.jns.2008.12.034

Ransohoff, R. M., & Perry, V. H. (2009). Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. Annual Review of Immunology, 27, 119–145. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132528

Redondo, J., Kemp, K., Hares, K., Rice, C., Scolding, N., & Wilkins, A. (2015). Purkinje Cell Pathology and Loss in Multiple Sclerosis Cerebellum. Brain Pathology, 25(6), 692–700. https://doi.org/10.1111/bpa.12230

Reshef, R., Kudryavitskaya, E., Shani-Narkiss, H., Isaacson, B., Rimmerman, N., Mizrahi, A., & Yirmiya, R. (2017). The role of microglia and their CX3CR1 signaling in adult neurogenesis in the olfactory bulb. ELife, 6. https://doi.org/10.7554/eLife.30809

Rueden, C. T., Schindelin, J., Hiner, M. C., DeZonia, B. E., Walter, A. E., Arena, E. T., & Eliceiri, K. W. (2017). ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. BMC Bioinformatics, 18(1). https://doi.org/10.1186/s12859-017-1934-z

Salierno, D. (1999). Audit Committee Institute Launched. Internal Auditor, 56(3), 16. https://doi.org/10.1007/s00401-017-1747-1

Sarlus, H., & Heneka, M. T. (2017). Microglia in Alzheimer's disease. The Journal of Clinical Investigation, 127(9), 3240–3249. https://doi.org/10.1172/JCI90606

Sarmiento, M. (2013). Use of confocal microscopy in the study of microglia in a brain metastasis model. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 1041, 337–346. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-520-0_29

Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., … Stevens, B. (2012). Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. Neuron, 74(4), 691–705. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.026

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., … Cardona, A. (2012, July). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. Nature Methods, Vol. 9, pp. 676–682. https://doi.org/10.1038/nmeth.2019

Semwogerere, D., Semwogerere, D., & Weeks, E. R. (2005). Confocal microscopy. IN ENCYCLOPEDIA OF BIOMATERIALS AND BIOMEDICAL ENGINEERING, BIOMATERIALS, BIOMEDICAL ENGINEERING. INFORMA HEALTHCARE. Retrieved from http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/summary?doi=10.1.1.474.8035

Sequentially, a S., Multiple, R., & Procedure, T. (2010). Board of the Foundation of the Scandinavian Journal of Statistics. Statistics, 6(2), 65–70. https://doi.org/10.2307/4615733

Shibata, M., & Suzuki, N. (2017). Exploring the role of microglia in cortical spreading depression in neurological disease. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, Vol. 37, pp. 1182–1191. https://doi.org/10.1177/0271678X17690537

SHOLL, D. A. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. Journal of Anatomy, 87(4), 387–406. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13117757

Singhal, T., O'Connor, K., Dubey, S., Pan, H., Chu, R., Hurwitz, S., … Bakshi, R. (2019). Gray matter microglial activation in relapsing vs progressive MS: A [F-18]PBR06-PET study. Neurology(R) Neuroimmunology & Neuroinflammation, 6(5), e587. https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000587

Sipe, G. O., Lowery, R. L., Tremblay, M.-È., Kelly, E. A., Lamantia, C. E., & Majewska, A. K. (2016). Microglial P2Y12 is necessary for synaptic plasticity in mouse visual cortex. Nature Communications, 7, 10905. https://doi.org/10.1038/ncomms10905

Smith, J. A., Das, A., Ray, S. K., & Banik, N. L. (2012). Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. Brain Research Bulletin, 87(1), 10–20. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.10.004

Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010, January). Astrocytes: Biology and pathology. Acta Neuropathologica, Vol. 119, pp. 7–35. https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8

Sominsky, L., De Luca, S., & Spencer, S. J. (2018). Microglia: Key players in neurodevelopment and neuronal plasticity. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 94, 56–60. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.11.012

Song, W. M., & Colonna, M. (2018). The Microglial Response to Neurodegenerative Disease. Advances in Immunology, 139, 1–50. https://doi.org/10.1016/bs.ai.2018.04.002

Sternberg. (1983). Biomedical Image Processing. Computer, 16(1), 22–34. https://doi.org/10.1109/MC.1983.1654163

Tang, Y., & Le, W. (2016). Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. Molecular Neurobiology, 53(2), 1181–1194. https://doi.org/10.1007/s12035-014-9070-5

Thévenaz, P., Ruttimann, U. E., & Unser, M. (1998). A pyramid approach to subpixel registration based on intensity. IEEE Transactions on Image Processing, 7(1), 27–41. https://doi.org/10.1109/83.650848

Thored, P., Heldmann, U., Gomes-Leal, W., Gisler, R., Darsalia, V., Taneera, J., … Lindvall, O. (2009). Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. Glia, 57(8), 835–849. https://doi.org/10.1002/glia.20810

Trapp, B. D., & Nave, K.-A. (2008). Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? Annual Review of Neuroscience, 31, 247–269. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.30.051606.094313

Tremblay, M. S., Colley, R. C., Saunders, T. J., Healy, G. N., & Owen, N. (2010). Physiological and health implications of a sedentary lifestyle. Applied Physiology, Nutrition and Metabolism, 35(6), 725–740. https://doi.org/10.1139/H10-079

Um, J. W. (2017, November 13). Roles of glial cells in sculpting inhibitory synapses and neural circuits. Frontiers in Molecular Neuroscience, Vol. 10. https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00381

Vandamme, T. F. (2014). Use of rodents as models of human diseases. Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences, 6(1), 2–9. https://doi.org/10.4103/0975-7406.124301

Weier, K., Beck, A., Magon, S., Amann, M., Naegelin, Y., Penner, I. K., … Sprenger, T. (2012). Evaluation of a new approach for semi-automatic segmentation of the cerebellum in patients with multiple sclerosis. Journal of Neurology, 259(12), 2673–2680. https://doi.org/10.1007/s00415-012-6569-4

Weinshenker, B. G. (1996). Epidemiology of multiple sclerosis. Neurologic Clinics, 14(2), 291–308. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8827172

Wu, L.-J., Vadakkan, K. I., & Zhuo, M. (2007). ATP-induced chemotaxis of microglial processes requires P2Y receptor-activated initiation of outward potassium currents. Glia, 55(8), 810–821. https://doi.org/10.1002/glia.20500

Wyatt, S. K., Witt, T., Barbaro, N. M., Cohen-Gadol, A. A., & Brewster, A. L. (2017). Enhanced classical complement pathway activation and altered phagocytosis signaling molecules in human epilepsy. Experimental Neurology, 295, 184–193. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.06.009

Yang, S., Chang, R., Yang, H., Zhao, T., Hong, Y., Kong, H. E., … Li, X. J. (2017). CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease. Journal of Clinical Investigation, 127(7), 2719–2724. https://doi.org/10.1172/JCI92087

Zhao, X., Liao, Y., Morgan, S., Mathur, R., Feustel, P., Mazurkiewicz, J., … Huang, Y. (2018). Noninflammatory Changes of Microglia Are Sufficient to Cause Epilepsy. Cell Reports, 22(8), 2080–2093. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.004

V3D : A Real-Time 3D Visualization System for the Quantitative Analysis of Large Bioimages and Its Applications to Neuroscience. (n.d.). 1, 6–11. https://doi.org/10.1038/nbt.1612

Confocal Microscopy - A Simple Overview. (n.d.). Retrieved September 24, 2019, from https://oni.bio/confocal-microscopy

Generating EAE Mouse Models of Multiple Sclerosis | Taconic Biosciences. (n.d.). Retrieved September 24, 2019, from https://www.taconic.com/taconic-insights/neuroscience/eae-mouse-models-of-multiple-sclerosis.html

(PDF) Applications of point process models to imaging and biology. (n.d.). Retrieved September 24, 2019, from https://www.researchgate.net/publication/326261071 Applications_of_point_process_models_to_imaging_and_biology