

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΑΚΕΡΑΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ
ΑΙΜΑΤΟΕΓΚΕΦΑΛΙΚΟΥ ΦΡΑΓΜΟΥ ΕΠΙΜΥΟΣ ΣΕ ΕΠΑΓΟΜΕΝΟ ΑΠΟ LPS
ΜΟΝΤΕΛΟ ΣΗΨΗΣ**



Μάστορα Αικατερίνη του Δημητρίου

Λάρισα, 2024

UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

BACHELOR THESIS

**EFFECT OF COLISTIN ON BLOOD-BRAIN BARRIER INTEGRITY IN AN
LPS-INDUCED SEPSIS RAT MODEL**



Mastora Aikaterini

Larissa, 2024

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- **Βασιλάκη Άννα**, Επίκουρος Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπουσα)
- **Παπουτσοπούλου Σταματία**, Επίκουρος Καθηγήτρια Ανοσοβιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Συνεπιβλέπουσα)
- **Χατζευθυμίου Αποστολία**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Μέλος)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2023 - 2024. Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλλαν στην πραγματοποίηση και ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Θα ήθελα πρωτίστως να εκφράσω τις θερμές και ειλικρινείς ευχαριστίες μου στην κα. Άννα Βασιλάκη, Επίκουρο Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και επιβλέπουσα καθηγήτρια της πτυχιακής μου εργασίας, για τις γνώσεις, την πολύτιμη καθοδήγηση και βοήθεια που προσέφερε σε οποιοδήποτε απορία παρουσιαζόταν καθώς και για την ανιδιοτελή υποστήριξή της σε όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας.

Ακόμα θέλω να ευχαριστήσω θερμά και τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής, την κα. Παπουτσοπούλου Σταματία, Επίκουρο Καθηγήτρια Ανοσοβιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και την κα. Χατζηευθυμίου Αποστολία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον μεταπτυχιακό φοιτητή και συνάδελφο Γρηγόριο Αγραφιώτη για την καθοδήγηση και την βοήθεια που προσέφερε στα αρχικά μου βήματα στον χώρο του συγκεκριμένου εργαστηρίου, αλλά και για την υπομονή του και άψογη συνεργασία που είχαμε σε όλη την διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας.

Επιπλέον, δεν θα μπορούσα να παραλείψω τις θερμές ευχαριστίες μου στον Απόφοιτο Βιοχημικό-Βιοτεχνολόγο συνάδελφο Δημήτριο Γκίνη για την πολύτιμη βοήθειά του κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας πτυχιακής και την άψογη συνεργασία μας.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω τις μεγαλύτερες ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου που με την συνεχή στήριξη αλλά και βοήθειά τους συνέβαλαν στο να ολοκληρώσω ένα πολύ σημαντικό κομμάτι της φοιτητικής μου ζωής στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

Πίνακας Περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	2
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	3
1. Αιματοεγκεφαλικός Φραγμός.....	3
1.1 Κυκλοφορία του αίματος στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα.....	3
1.2. Η Νευροαγγειακή Μονάδα.....	4
1.2.1. Κυτταρική ανατομία της νευροαγγειακής μονάδας.....	5
1.3 Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός ως συστατικό της νευροαγγειακής μονάδας	6
2. Σήψη και αιματοεγκεφαλικός φραγμός.....	7
2.1 Παθοφυσιολογία της σήψης σε επίπεδο αιματοεγκεφαλικού φραγμού	8
2.2 Προκλινικά Μοντέλα Σήψης και Αιματοεγκεφαλικός Φραγμός.....	10
2.3 Βιοδείκτες σήψης.....	11
3. Νευροφλεγμονή μέσω LPS	12
3.1 Η έννοια της νευροφλεγμονής	12
3.2 Η δομή του LPS	14
3.3 LPS-επαγόμενα κυτταρικά μονοπάτια	15
3.4 Μοντέλα LPS-επαγόμενης φλεγμονής και σήψης.....	17
4. Κολιστίνη	18
4.1 Χημικές ιδιότητες της κολιστίνης.....	19
4.2 Αντιμικροβιακές ιδιότητες της κολιστίνης.....	19
4.3 Μηχανισμός δράσης της κολιστίνης.....	20
4.4 Ανεπιθύμητες ενέργειες κολιστίνης	21
ΣΚΟΠΟΣ.....	23
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	24
1. <i>In vivo</i> μοντέλο σήψης	24
2. Ανοσοϊστοχημεία	25

3. Ανάλυση εικόνας.....	26
4. Στατιστική ανάλυση	27
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	28
1. Επίδραση της χορήγησης κολιστίνης και κολιστίνης/AVP/NA στον υπόκαμπο σηπτικών και μη ζώων.....	28
2. Επίδραση της χορήγησης κολιστίνης και κολιστίνης/AVP/NA στον αριθμό των πυραμδικών κυττάρων της CA1 περιοχής του υποκάμπου σηπτικών και μη ζώων.....	30
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	33
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	36

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κολιστίνη είναι ένα αντιβιοτικό το οποίο χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση των πολυανθεκτικών Gram-αρνητικών βακτηρίων και αποτελεί πρώτης γραμμής επιλογή για την αντιμετώπιση της σήψης στις μονάδες εντατικής θεραπείας. Ωστόσο, η χρήση της κολιστίνης έχει συνδεθεί με την εμφάνιση νευροτοξικότητας στους ασθενείς, εγείροντας ερωτήματα σχετικά με την πιθανή επίδρασή του αντιβιοτικού στον ΑΕΦ.

Σε μια προσπάθεια προσομοίωσης των φαρμακολογικών παρεμβάσεων που γίνονται στις μονάδες εντατικής θεραπείας μετά τον εντοπισμό βακτηριακής λοίμωξης σε ασθενείς, χορηγήθηκε για 10 ημέρες κολιστίνη (150.000 U/kg/ημέρα, i.p.) σε αρουραίους Wistar ηλικίας 1,5-2 μηνών παρουσία ή απουσία νορεπινεφρίνης (25 mg/kg/ημέρα, i.p.) και βαζοπρεσίνης (4 U/kg/ημέρα, i.p.) πέντε ημέρες μετά την πρόκληση σήψης με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση 250 mg/kg LPS από το βακτήριο *Escherichia coli*. Είχαμε πέντε πειραματικές ομάδες (3 ζώα/ομάδα): *Ctrl*: ομάδα ελέγχου, *Colistin*: ομάδα που έλαβε κολιστίνη, *LPS_Ctrl*: ομάδα στην οποία χορηγήθηκε LPS, *LPS_Colistin*: ομάδα που στην οποία χορηγήθηκε LPS και κολιστίνη, και *LPS_Colistin+Vasoactive*: ομάδα που έλαβε κολιστίνη και αγγειοδραστικές ουσίες μετά την επαγωγή σήψης με LPS. Η ιστοπαθολογική αξιολόγηση τομών εγκεφάλου πάχους 5μm στην περιοχή του ιπποκάμπου διεξήχθη με τη βοήθεια της χρώσης αιματοξυλίνη-ηωσίνη, η μελέτη της πιθανής ενεργοποίησης των αστροκυττάρων προσεγγίσθηκε με τον ανοσοϊστοχημικό εντοπισμό του βιοδείκτη τους όξινη πρωτεΐνη των ενδιάμεσων ινιδίων της γλοίας (GFAP) ενώ η χρώση DAPI χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των επιδράσεων των φαρμακολογικών παρεμβάσεων στον αριθμό πυραμιδικών κυττάρων της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, (1) η κολιστίνη δεν φαίνεται να έχει κάποια επίδραση στον εγκέφαλο των φυσιολογικών ζώων, (2) η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση LPS προκαλεί ρήξη ΑΕΦ καθώς διαπιστώσαμε αλλοίωση της δομής του ιπποκάμπου ιδιαίτερα στο CA3 πεδίο και μείωση του αριθμού των κυττάρων στην πυραμιδική στοιβάδα του CA1 πεδίου, (3) η χορήγηση κολιστίνης στα ζώα τα οποία είχαν εκτεθεί σε LPS φαίνεται να αναιρεί τη νευροεκφυλιστική δράση του LPS ενώ, (4) η συνδυαστική χορήγηση κολιστίνης και αγγειοσυσπαστικών στα σηπτικά ζώα δεν προκαλεί κάποια αξιοσημείωτη διαφορά σε σύγκριση με την χορήγηση μόνο κολιστίνης στα ζώα αυτά. Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε ότι η κολιστίνη παρέχει πιθανά νευροπροστατευτική δράση στον ιππόκαμπο των σηπτικών ζώων, χρειάζεται ωστόσο περαιτέρω έρευνα για την κατανόηση του μηχανισμού δράσης της.

ABSTRACT

Colistin, a first-line antibiotic for treating sepsis, is employed to combat multidrug-resistant Gram-negative bacteria. However, concerns regarding its neurotoxicity raise questions about its potential effect on the BBB, particularly under septic conditions.

In an attempt to simulate the pharmacological interventions employed in intensive care units upon identifying bacterial infection in patients, this study investigates the impact of colistin on blood-brain barrier (BBB) integrity in rats using an *in vivo* model of lipopolysaccharide (LPS)-induced sepsis. Colistin (150,000 U/kg/day, i.p.) was administered to 1.5-2 month-old Wistar rats for 10 days in the presence or absence of norepinephrine (25 mg/kg/day, i.p.) and vasopressin (4 U/kg/day, i.p.) five days after inducing sepsis by i.p. administration of 250 mg/kg LPS from *Escherichia coli*. We had five experimental groups (3 animals/group): *Ctrl*: control group receiving 0.9% NaCl, *Colistin*: group receiving colistin, *LPS_Ctrl*: group receiving LPS, *LPS_Colistin*: group receiving LPS and colistin, and *LPS_Colistin+Vasoactive*: group receiving colistin and vasoactive substances after LPS-induced sepsis. Histopathological evaluation of 5µm brain sections at the level of hippocampus was conducted using hematoxylin-eosin staining, glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactivity was employed to assess astrocyte activation and DAPI-staining was used to study the effects of the various pharmacological interventions on the CA1 pyramidal cell number. Our findings suggest that: (1) colistin has no effect on the hippocampus of normal animals, (2) intraperitoneal LPS administration causes BBB rupture, evidenced by altered hippocampal structure, particularly in the CA3 field and decreased CA1 pyramidal cell number, (3) colistin administration to LPS-septic animals seems to negate the neurodegenerative effect of LPS, and (4) the combined administration of colistin and vasoconstrictors to LPS-septic animals does not cause any significant effect compared to colistin alone. In conclusion, colistin may provide neuroprotection to the brain of septic animals. However, further research is needed to elucidate the mechanism of colistin's effects.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Αιματοεγκεφαλικός Φραγμός

1.1 Κυκλοφορία του αίματος στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

Ο εγκέφαλος, ενώ αποτελεί μόνο περίπου το 2% του βάρους του ανθρώπινου σώματος, καταναλώνει το 20% της ενέργειάς του. Αυτή η σημαντική ενεργειακή απαίτηση απαιτεί αποτελεσματική ρύθμιση της ροής του αίματος στον εγκέφαλο, διασφαλίζοντας επαρκή παροχή οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών. Διάφοροι μηχανισμοί λειτουργούν αρμονικά για την κάλυψη των σταθερών μεταβολικών απαιτήσεων του εγκεφάλου, με την εγκεφαλική αυτορρύθμιση και τη λειτουργική υπεραιμία να είναι εμφανείς (*Filosa και συν., 2015*). Η εγκεφαλική αυτορρύθμιση εξασφαλίζει σταθερή παροχή οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών, διατηρώντας σταθερή ροή αίματος ενάντια σε ένα εύρος αλλαγών στην αρτηριακή πίεση (60-150 mmHg). Αυτός ο μηχανισμός είναι ζωτικής σημασίας για την προστασία της εγκεφαλικής κυκλοφορίας τόσο κατά τη διάρκεια φυσιολογικών δραστηριοτήτων, όπως η άσκηση, όσο και παθολογικών καταστάσεων όπως το καρδιογενές στρες.

Από την άλλη πλευρά, η λειτουργική υπεραιμία προσαρμόζει τη ροή του αίματος σε τοπικό επίπεδο, ευθυγραμμίζοντας την παροχή θρεπτικών ουσιών και οξυγόνου με τις νευρωνικές απαιτήσεις σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου. Αυτή η διαδικασία είναι ενεργή κατά τις καθημερινές νοητικές εργασίες, όπως το διάβασμα, αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις όπου μια συγκεκριμένη περιοχή του εγκεφάλου απαιτεί αυξημένο οξυγόνο. Ο συγχρονισμός των αλλαγών της παροχής αίματος με τις αλλαγές στη νευρωνική δραστηριότητα ονομάζεται Νευροαγγειακή Σύζευξη (*Neurovascular Conjugation, NVC*). Περιλαμβάνει μια συντονισμένη δράση κυττάρων τόσο από αγγειακή όσο και από νευρική προέλευση, διασφαλίζοντας τη βέλτιστη λειτουργικότητα των αγγείων του εγκεφάλου και τη σωστή συντήρηση της εγκεφαλικής λειτουργίας (*Filosa και συν., 2015*).

Εκτός από αυτούς τους μηχανισμούς, που ρυθμίζουν τις αλλαγές της διαμέτρου των αγγείων (αγγειοδιαστολή ή αγγειοσυσπασση με βάση τις ανάγκες παροχής αίματος), το μικροπεριβάλλον του εγκεφάλου διέπεται σε μεγάλο βαθμό από τη διαπερατότητα των εγκεφαλικών αγγείων. Αυτά τα αγγεία παρουσιάζουν έναν μοναδικό φαινότυπο, περιορίζοντας σημαντικά την ελεύθερη διάχυση διαλυτών συστατικών και μικρο/μακρομορίων στο αγγειακό ενδοθήλιο (*Filosa και συν., 2015*). Ουσιαστικά, το ενδοθήλιο των εγκεφαλικών αγγείων είναι δομημένο να είναι εξαιρετικά επιλεκτικό στην ανταλλαγή συστατικών μεταξύ του περιφερικού αίματος και του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), διατηρώντας τα βέλτιστα επίπεδα νευροδιαβιβαστών και βασικών θρεπτικών συστατικών του εγκεφάλου (*Filosa και συν., 2015*). Συγκεκριμένα, το ενδοθήλιο των εγκεφαλικών

αγγείων σχηματίζει εξειδικευμένους φραγμούς, οι οποίοι περιορίζουν και ρυθμίζουν την ανταλλαγή μορίων μεταξύ του εγκεφαλικού παρεγχύματος και του αίματος, καθώς και σε εκείνες που διαχωρίζουν τον νευρικό ιστό από χώρους γεμάτους με εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY).

Αυτοί οι φραγμοί περιλαμβάνουν: τον ΑΕΦ, που σχηματίζεται από αγγειακά εγκεφαλικά ενδοθηλιακά κύτταρα (BECs: brain endothelial cells) που διαχωρίζουν το αίμα από το νευρικό παρέγχυμα, το επιθήλιο του χοριοειδούς πλέγματος, που βρίσκεται μεταξύ του αίματος και του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY) στις κοιλίες και το αραχνοειδές επιθήλιο, το οποίο βρίσκεται ανάμεσα στο αίμα και τον υπαραχνοειδή χώρο του ENY. Ο ΑΕΦ χρησιμεύει ως η κύρια πύλη για τη μεταφορά οξυγόνου, γλυκόζης και αμινοξέων.

Το εγκεφαλικό ενδοθήλιο, η ανατομική θέση του ΑΕΦ, σε συνδυασμό με νευρώνες και μη νευρικά κύτταρα (*περικύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα αγγείων, αστροκύτταρα, μικρογλοία κ.λπ.*), σχηματίζει μια λειτουργική οντότητα που συχνά αναφέρεται ως Νευροαγγειακή Μονάδα (NVU: neurovascular unit). Η συντονισμένη αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των διαφορετικών τύπων κυττάρων παίζει ζωτικό ρόλο στη ρύθμιση διαδικασιών που σχετίζονται με τα αγγεία όπως η αγγειογένεση, η ροή του αίματος και ο σχηματισμός/διατήρηση του ίδιου του ΑΕΦ (*Hawkins & Davis, 2005*).

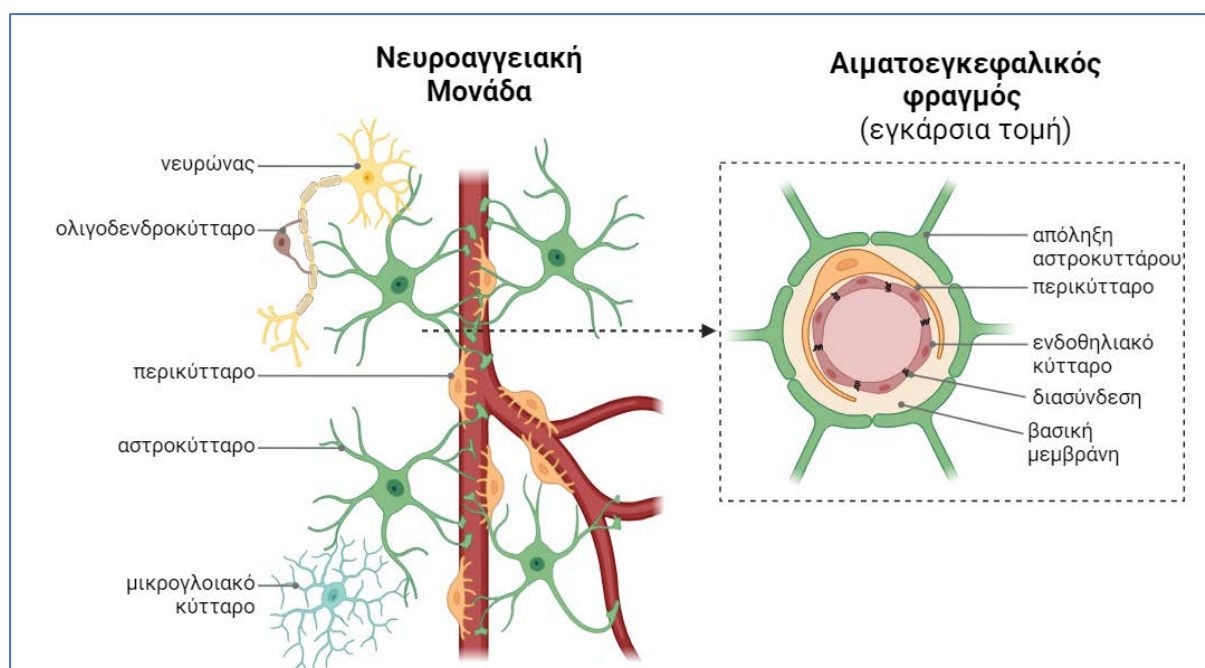
1.2. Η Νευροαγγειακή Μονάδα

Η έννοια της Νευροαγγειακής Μονάδας (Neurovascular Unit, NVU) σκιαγραφεί τη μοναδική φυσιολογική και λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ του νευρικού ιστού και των αιμοφόρων αγγείων του εγκεφάλου. Αυτή η αλληλεπίδραση είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ομοιόστασης του εγκεφάλου.

Η αρχιτεκτονική της προκύπτει από μια σειρά γενετικά προγραμματισμένων γεγονότων που διευκολύνουν την ανατομική και λειτουργική ενσωμάτωση νευρικών και αγγειακών συστατικών κατά την πρώιμη εμβρυογένεση (*Ward & Lamanna, 2004*). Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης, τα νευρικά προγονικά κύτταρα (*που προέρχονται από τον νευρικό σωλήνα*) και τα αγγειακά προγονικά κύτταρα (*που προέρχονται από τη νευρική ακρολοφία*) έρχονται σε στενή γειτνίαση. Όντας γειτονικοί και ανατομικά συνδεδεμένοι, αυτοί οι τύποι κυττάρων εκτίθενται σε κοινούς αυξητικούς παράγοντες που επηρεάζουν τόσο τα νευρικά όσο και τα αγγειακά συστατικά (*Soker και συν., 2002*). Ως εκ τούτου, τα συστατικά της NVU μοιράζονται μια κοινή εμβρυϊκή προέλευση και εκτίθενται σε πανομοιότυπους αυξητικούς παράγοντες, όπως ο αγγειακός αυξητικός παράγοντας (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) και ο νευρικός αυξητικός παράγοντας (Neural Growth Factor, NGF). Μετά την ανάπτυξη, διατηρούν στενή ανατομική και χημική σύνδεση και παρουσιάζουν πολλές δομικές και λειτουργικές ομοιότητες (*Soker και συν., 2002*).

1.2.1. Κυτταρική ανατομία της νευροαγγειακής μονάδας

Η κυτταρική δομή της NVU (Εικόνα 1) αποτελείται από το εξειδικευμένο ενδοθήλιο των εγκεφαλικών αγγείων (κυρίως τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό) που διαχωρίζεται από τα κοντινά εγκεφαλικά κύτταρα με μια συνεχή βασική μεμβράνη (Basement Membrane, BM). Αυτή η μεμβράνη, με πάχος 30-40nm, αποτελείται από κολλαγόνο τύπου IV, λαμινίνη, φιβρονεκτίνη και άλλες εξωκυτταρικές πρωτεΐνες ουσίας (Stanimirovic & Friedman, 2012).



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και των συστατικών κυτταρικών τύπων της νευροαγγειακής μονάδας (Δημιουργήθηκε μέσω Biorender).

Τα περικύτταρα συνδέονται στενά με τα εγκεφαλικά ενδοθηλιακά κύτταρα και ενσωματώνονται στη βασική μεμβράνη, με τις μακριές προεξοχές τους να περιβάλλουν τα τοιχώματα των αγγείων. Ταυτόχρονα, οι αποφύσεις των αστροκυττάρων, περιβάλλουν μεγάλο μέρος του εξωτερικού στρώματος της βασικής μεμβράνης των εγκεφαλικών αγγείων. Ταυτόχρονα, τα αστροκύτταρα δημιουργούν συνδέσεις με νευρώνες, διευκολύνοντας τη σύνδεση μεταξύ αγγειακής και νευρωνικής επικοινωνίας. Οι προβολές νευρώνων, που φέρουν αγγειοδραστικούς νευροδιαβιβαστές και πεπτίδια, εκτείνονται για να σχηματίσουν στενές συνδέσεις με τα εγκεφαλικά μικροαγγεία. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό απολήξεων περιαγγειακών νεύρων που καταλήγουν κυρίως στα άκρα των αστροκυττάρων που περιβάλλουν τα τοιχώματα των αγγείων, ενώ ένα μικρότερο τμήμα αυτών των απολήξεων έρχεται απευθείας σε επαφή με τη βασική μεμβράνη που περιβάλλει τα αγγεία.

Τα τελευταία χρόνια, η κατανόηση της κυτταρικής ανατομίας της NVU έχει διευρυνθεί ώστε να περιλαμβάνει κυκλοφορούντα φλεγμονώδη κύτταρα που παίζουν ρόλο στην ανοσολογική παρακολούθηση του ΚΝΣ. Αυτά τα κύτταρα αλληλεπιδρούν με την εσωτερική επιφάνεια του αυλού του αγγείου και επίσης με τα ανοσοκύτταρα του εγκεφάλου, δηλαδή τη μικρογλοία και τα περιαγγειακά μακροφάγα.

Φαίνεται, λοιπόν, ότι η αρχιτεκτονική της NVU έχει σχεδιαστεί με τρόπο που όλα τα στοιχεία της να συνδέονται στενά και αμοιβαία, σχηματίζοντας μια ανατομική και λειτουργική οντότητα. Αυτό οδηγεί σε έναν εξαιρετικά αποτελεσματικό μηχανισμό για τη ρύθμιση της εγκεφαλικής ροής αίματος. Αυτή η αλληλεπίδραση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από μόρια κυτταρικής προσκόλλησης όπως οι καντερίνες και οι ιντεγκρίνες (*Simard και συν., 2003*).

1.3 Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός ως συστατικό της νευροαγγειακής μονάδας

Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός αποτελεί ένα επιλεκτικό φίλτρο που αποτελείται από ένα μόνο στρώμα εγκεφαλικών ενδοθηλιακών κυττάρων. Η φυσική ακεραιότητα του φραγμού οφείλεται στην παρουσία μεσοκυτταρικών σφικτών συνδέσεων (tight junctions, TJs) και μορίων κυτταρικής προσκόλλησης που συνδέουν στενά τα κύτταρα μεταξύ τους. Οι σφικτές συνδέσεις, περιλαμβάνουν κρίσιμες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες όπως η οκλουδίνη και οι κλαδίνες (*Patel & Frey, 2015*). Αυτές οι συνδέσεις είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των ενδοθηλιακών κυττάρων του εγκεφάλου σε σύγκριση με εκείνα σε άλλα όργανα. Άλλα μοναδικά χαρακτηριστικά είναι η παρακυτταρική διάχυση υδρόφιλων ουσιών, η υψηλή περιεκτικότητα σε μιτοχόνδρια λόγω αυξημένων μεταβολικών αναγκών και η πολωμένη έκφραση μεμβρανικών υποδοχέων και μεταφορέων (*Begley & Brightman, 2003*).

Επιπλέον, τα ενδοθηλιακά κύτταρα προσθέτουν περαιτέρω λειτουργίες στο ΑΕΦ. Η παρουσία συγκεκριμένων συστημάτων μεταφοράς και στις δύο πλευρές του αυλού του αγγείου ρυθμίζει την κίνηση των μικρών υδρόφιλων μορίων, επιτρέποντας την είσοδο βασικών θρεπτικών συστατικών ενώ μπλοκάρει δυνητικά επιβλαβείς ουσίες. Αποκλειστικά συστήματα φορέων όπως ο μεταφορέας γλυκόζης 1 (GLUT1) στα ενδοθηλιακά κύτταρα του εγκεφάλου και ο μονοκαρβοξυλικός μεταφορέας 1 βοηθούν τη μεταφορά γλυκόζης και μονοκαρβοξυλικών οξέων όπως το γαλακτικό, αντίστοιχα, ως καύσιμο εγκεφάλου. Ο ΑΕΦ παίζει επίσης κεντρικό ρόλο στον έλεγχο των επιπέδων ιόντων και νευροδιαβιβαστών στο ΚΝΣ. Η νευρωνική λειτουργία και η συναπτική σηματοδότηση εξαρτώνται από ένα σταθερό περιβάλλον με ισορροπημένα επίπεδα pH και ειδικές συγκεντρώσεις ιόντων όπως το κάλιο, παράλληλα με μεγαλύτερα συστήματα ιόντων όπως το ασβέστιο και το μαγνήσιο (*Patel & Frey, 2015*). Ως εκ τούτου, ο ΑΕΦ ρυθμίζει τις κινήσεις ιόντων και υγρών μεταξύ του αίματος και του εγκεφάλου, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένους μεταφορείς ιόντων και διαύλους για να εξασφαλίσει

τη σωστή ιοντική κυκλοφορία, παράγοντας ένα διάμεσο εγκεφαλικό υγρό (interstitial fluid, ISF) που ευνοεί τη νευρωνική λειτουργία.

Επιπλέον, τα ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά συστήματα ενζύμων των ενδοθηλιακών κυττάρων καθιστούν τον ΑΕΦ μεταβολικό φραγμό. Ένζυμα όπως οι πεπτιδάσες και οι νουκλεοσιδάσες μπορούν να μεταβολίσουν πεπτίδια και ATP, αντίστοιχα, ενώ ενδοκυτταρικά ένζυμα όπως η μονοαμινοξειδάση και το κυτόχρωμα P450 μπορούν να απενεργοποιήσουν πολλά νευροτοξικά συστατικά, τοποθετώντας τον ΑΕΦ ως την πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στις νευροτοξίνες. Η συνολική περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη του ΚΝΣ είναι χαμηλότερη από τα επίπεδα στο πλάσμα λόγω της εκλεκτικότητας του ΑΕΦ. Έτσι, διάφορα μακρομόρια του πλάσματος όπως η αλβουμίνη, η προθρομβίνη και το πλασμινογόνο, που μπορεί να προκαλέσουν μη αναστρέψιμη νευρική βλάβη και να οδηγήσουν σε απόπτωση, εμποδίζονται να εισέλθουν στο ΚΝΣ μέσω του ΑΕΦ (*Patel & Frey, 2015*). Τέλος, μικρά μόρια αερίου όπως το O₂ και το CO₂, μαζί με μικρά λιπόφιλα μόρια (π.χ. ορμόνες), μπορούν να διαχέονται ελεύθερα στις λιπιδικές μεμβράνες.

Πέραν των ενδοθηλιακών κυττάρων του ΑΕΦ, η NVU αποτελείται επιπλέον από περικύτταρα και μονοκύτταρα, βασική μεμβράνη, αστροκύτταρα και μικρογλοιακά κύτταρα.

2. Σήψη και αιματοεγκεφαλικός φραγμός

Η σήψη είναι μια σύνθετη κατάσταση που μπορεί να οδηγήσει σε θανατηφόρα δυσλειτουργία των οργάνων, λόγω της δυσανάλογης ανοσολογικής αντίδρασης του οργανισμού στην προσπάθειά του να καταπολεμήσει μια λοίμωξη. Το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων των ΗΠΑ (Center for Disease Control, CDC) αναφέρει ότι σχεδόν 1,7 εκατομμύρια ενήλικες στις Ηνωμένες Πολιτείες επηρεάζονται από σήψη κάθε χρόνο, οδηγώντας σε περίπου 270.000 θανάτους οι οποίοι αντιστοιχούν στο ένα τρίτο των θανάτων στα νοσοκομεία ετησίως (*CDC, 2020*). Τα αποτελέσματα μετά την έξοδο από το νοσοκομείο είναι φτωχά, καθώς μόνο οι μισοί από όσους επιβιώνουν από τη σήψη αναρρώνουν πλήρως, ενώ άλλο ένα τρίτο υποκύπτει μέσα στον επόμενο χρόνο και οι υπόλοιποι επιζώντες υποφέρουν από μακροχρόνιες γνωσιακές διαταραχές, όπως προβλήματα μνήμης, άγχος, κατάθλιψη και μετατραυματικό στρες (*Prescott και συν., 2019*).

Η σήψη ξεκινά κυρίως από βακτηριακές λοιμώξεις, αν και μπορεί επίσης να προκληθεί από ιογενείς, παρασιτικές και μυκητιασικές λοιμώξεις. Κατά τη διάρκεια μιας λοίμωξης, το παθογόνο πολλαπλασιάζεται και αποβάλλει συστατικά γνωστά ως μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με το παθογόνο (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), τα οποία διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη συστηματική εξάπλωση της λοίμωξης (*Prescott και συν., 2016*). Τα PAMPs ανιχνεύονται από τους

υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (Pattern recognition receptors, PRRs) του ανοσοποιητικού συστήματος και άλλους μη-PRR μηχανισμούς. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των PAMPs και αυτών των υποδοχέων πυροδοτεί μια σειρά ενδοκυτταρικών σημάτων που οδηγούν στην ενεργοποίηση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων και στην απελευθέρωση προφλεγμονωδών παραγόντων με στόχο την εξουδετέρωση των παθογόνων. Ταυτόχρονα, η αλληλεπίδραση μεταξύ της ανοσολογικής απόκρισης και των παραγόντων μολυσματικότητας του παθογόνου μπορεί να προκαλέσει κυτταρική βλάβη, απελευθερώνοντας μόρια που ονομάζονται μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με βλάβες (Damage-associated molecular pattern molecules, DAMPs), τα οποία ενισχύουν περαιτέρω τη φλεγμονώδη απόκριση και αναγνωρίζονται ομοίως από τους PRRs. Στη συνέχεια, αυτή η ανοσολογική αντίδραση μπορεί να βλάψει τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, διαταράσσοντας τις πρωτεΐνες που σχηματίζουν τις στενές συνδέσεις και θέτοντας έτσι σε κίνδυνο τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (ΑΕΦ). Η παραβίαση αυτή του ΑΕΦ επιτρέπει την εισβολή περιφερικών ανοσοκυττάρων στον εγκέφαλο, επιδεινώνοντας την ενεργοποίηση των γλοιακών κυττάρων και τη νευροφλεγμονή (Annane & Sharshar, 2015).

Στο παρόν κεφάλαιο θα αναφερθούν βιοχημικά χαρακτηριστικά της σήψης που συσχετίζονται με τη βλάβη του ΑΕΦ, τόσο σε επίπεδο παθολογίας, όσο σε επίπεδο προκλινικών μοντέλων, τους βιοδείκτες που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ακεραιότητα του ΑΕΦ, και το ρόλο του ΑΕΦ στη διαμεσολάβηση της σχέσης μεταξύ συστηματικής λοίμωξης και φλεγμονής εντός του εγκεφάλου.

2.1 Παθοφυσιολογία της σήψης σε επίπεδο αιματοεγκεφαλικού φραγμού

Η σήψη έχει συσχετιστεί με μεταβολές στον ΑΕΦ, τη NVU και τα αστροκύτταρα. Μελέτες σε προκλινικά μοντέλα έχουν δείξει ότι η έκθεση σε λιποπολυσακχαρίτη (lipopolysaccharide, LPS) μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια περικυττάρων και βλάβες στη μικροαγγειακή λειτουργία. Τόσο τα αστροκύτταρα όσο και τα περικύτταρα είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της ακεραιότητας του ΑΕΦ και η δυσλειτουργία τους μπορεί να επισπεύσει τη διάσπαση αυτού του φραγμού, όπως παρατηρήθηκε σε πειραματικές έρευνες που εστιάζουν στη βλάβη των περικυττάρων (Zeng και συν., 2016).

Ενεργοποίηση των PRRs οδηγεί στην έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (Tumor Necrosis Factor, TNF-α), η ιντερλευκίνη (IL)-1β και η IL-6. Αυτό, με τη σειρά του, κλιμακώνει την απελευθέρωση φλεγμονωδών μεσολαβητών όπως η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein, CRP), η IL-6, η αμυλοειδής πρωτεΐνη ορού (Serum Amyloid Protein, SAP), το ινωδογόνο, η λεκτίνη που δεσμεύει τη μαννόζη, οι επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες A και D, καθώς και διάφοροι διαλυτοί υποδοχείς (Wu και συν., 2020). Αυτοί οι μεσολαβητές μπορεί να ασκήσουν

βλαβερές επιδράσεις στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα. Συγκεκριμένα μπορούν να προκαλέσουν αποσύνθεση των ενδοκυτταρικών συνδέσεων και βλάβη στη μονοστιβάδα των ενδοθηλιακών κυττάρων, οδηγώντας σε μικροαγγειακή διαρροή και το οίδημα των ιστών που συνήθως παρατηρείται κατά τη διάρκεια της σήψης (*Danielski και συν., 2018*).

Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος χρησιμοποιούν αντιμικροβιακούς αμυντικούς μηχανισμούς, όπως η φαγοκυττάρωση, η οποία ενισχύεται από υποδοχείς για fMet-Leu-Phe (fMLF) και C5a. Μεταξύ των πιο ισχυρών αντιμικροβιακών παραγόντων που απελευθερώνονται είναι οι δραστικές ρίζες του αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS), όπως το μονοξείδιο του αζώτου (NO[•]), και οι δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS), στις οποίες περιλαμβάνονται το ανιόν υπεροξειδίου (O₂⁻), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂), το μονήρες οξυγόνο (¹O₂⁻), τη ρίζα υδροξυλίου (OH[•]) και το υποχλωριώδες (OCl⁻) (*Barichello και συν., 2012*). Αυτά τα αντιδραστικά μόρια συμβάλλουν στη δυσλειτουργία των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων κατά τη διάρκεια της σήψης, καταστρέφοντας τα άμεσα ή διαμορφώνοντας την έμφυτη ανοσολογική απόκριση μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα πυρηνικός παράγοντας-κάπα Β (NF-κΒ), ο οποίος ενισχύει την παραγωγή κυτταροκινών όπως ο TNF-α, η IL-1β, η IL-6, η IL-8, η IL-17 και η IL-18 (*Giridharan και συν., 2020*). Μια άλλη οδός για τη βλάβη των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι μέσω της παραγωγής μεταλλοπρωτεϊνών της μήτρας (Matrix Metalloproteases, MMPs), η έκφραση των οποίων μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των αγγειακών αυξητικών παραγόντων όπως η αγγειοποιητίνη-2, της οποίας τα αυξημένα επίπεδα συνδέονται με χειρότερη πρόγνωση στη σήψη. Επιπλέον, η IFN-γ, η IL-1β, η IL-6, καθώς και οι PAMPs και DAMPs, μπορούν να διεγείρουν την έκφραση των MMP, η οποία είναι συνήθως υψηλότερη σε φλεγμονώδεις ή κατεστραμμένους ιστούς που βρίσκονται υπό επιδιόρθωση, σε σύγκριση με υγιείς ιστούς (*Zhang και συν., 2014*). Ειδικότερα, τα επίπεδα των μεταλλοπρωτεϊνών MMP-3, MMP-7, MMP-8 και MMP-9 στο πλάσμα έχουν βρεθεί υπερτριπλάσια σε ασθενείς με σοβαρή σήψη σε περιβάλλοντα εντατικής θεραπείας (*Masciantonio και συν., 2017*).

Όταν τα γλοιακά κύτταρα ενεργοποιούνται, η ισχύς της σύνδεσης μεταξύ αστροκυττάρων και νευρώνων μειώνεται, θέτοντας σε κίνδυνο τη διατήρηση των νευρωνικών συνάψεων. Τα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα μπορεί επίσης να απελευθερώσουν βλαβερές ουσίες που οδηγούν στην απογύμνωση του προστατευτικού περιβλήματος μυελίνης των νευρικών κυττάρων, στη βλάβη των αξόνων και τελικά στον θάνατο των νευρώνων (*Yazdan-Ashoori και συν., 2011*).

Ο περίπλοκος παθοφυσιολογικός καταρράκτης της σήψης περιλαμβάνει πλήθος στοιχείων, όπως κυτταροκίνες, χημειοκίνες, ένζυμα που διασπούν πρωτεΐνες, αντιδραστικά μόρια και διάφορα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως η μικρογλοία και τα αστροκύτταρα. Αυτή η

περίπλοκη αλληλεπίδραση, ενώ είναι ζωτικής σημασίας για την απόκρουση της παθογόνου εισβολής, μπορεί να προκαλέσει βλάβη στον ΑΕΦ.

2.2 Προκλινικά Μοντέλα Σήψης και Αιματοεγκεφαλικός Φραγμός

Τα προκλινικά μοντέλα σήψης έχουν προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τις επιπτώσεις της σήψης στη νευροαγγειακή μονάδα (NVU) και στον ΑΕΦ. Το πιο αναγνωρισμένο μοντέλο για την έρευνα της σήψης είναι η διαδικασία παρακέντησης του τυφλού εντέρου (cecal ligation and puncture, CLP), η οποία θεωρείται ευρέως το «χρυσό» πρότυπο (Cabezas και συν., 2014). Η χορήγηση λιποπολυσακχαρίτη (LPS) από αρνητικά κατά Gram βακτήρια χρησιμεύει ως μοντέλο ενδοτοξαμίας, προκαλώντας φλεγμονή χωρίς πραγματική λοίμωξη, αν και πρέπει να σημειωθεί ότι τα ποντίκια παρουσιάζουν μικρότερη ευαισθησία σε αυτή την ενδοτοξίνη από ό,τι ο άνθρωπος.

Έρευνες με τη χρήση του μοντέλου CLP έχουν δείξει ότι η δραστηριότητα των λευκοκυττάρων στα αγγεία του ΑΕΦ αρχίζει ήδη 6 ώρες μετά την επέμβαση (Comim και συν., 2011). Η επακόλουθη αύξηση της προσκόλλησης των λευκοκυττάρων και της δραστηριότητας της μυελοπεροξειδάσης (MPO) συσχετίζεται με τη διάσπαση του ΑΕΦ μία ημέρα μετά τη χειρουργική επέμβαση CLP. Σε αυτή την περίοδο παρατηρούνται επίσης αυξημένα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η IL-1β, ο TNF-α και η IL-6. Η χορήγηση ενός ανταγωνιστή του υποδοχέα IL-1β μετά την CLP μπορεί να διατηρήσει την ακεραιότητα του ΑΕΦ και να μετριάσει τα επίπεδα της IL-1β (Mina και συν., 2014).

Η παρουσία των μεταλλοπρωτεασών MMP-2 και MMP-9 έχει παρατηρηθεί στα μικροαγγεία του εγκεφάλου εντός 12 ωρών μετά την CLP, γεγονός που υποδηλώνει ότι η πρόωπη απελευθέρωσή τους προηγείται της διαταραχής του ΑΕΦ. Έχει επίσης διαπιστωθεί ότι, η θεραπεία με αναστολείς των MMP-2/MMP-9 προστατεύει από αυτή τη διαταραχή (Dal-Pizzol και συν., 2013). Η ακεραιότητα του ΑΕΦ και οι πρωτεΐνες της στενής σύνδεσης διακυβεύονται μετά από επτά ημέρες χορήγησης LPS, μειώνοντας τα επίπεδα της κλαουντίνης-5 και της αποκλουδίνης.

Σε μοντέλα αρουραίων που υποβλήθηκαν σε CLP, παρατηρήθηκαν βλάβες στην εγκεφαλική αιματική ροή και στη δομή του εγκεφάλου, με τις επιπτώσεις να είναι ιδιαίτερα έντονες σε περιοχές όπως ο φλοιός και το ραβδωτό σώμα (Griton και συν., 2020).

Μελέτες που χρησιμοποίησαν το μοντέλο CLP κατέδειξαν επίσης τις προστατευτικές επιδράσεις της θεραπείας με αντισώματα κατά του χημειοτακτικού παράγοντα C5a έναντι της σοβαρής δυσλειτουργίας του ΑΕΦ και της φλεγμονής (Flierl και συν., 2009).

Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι παρεμβάσεις όπως η θεραπεία με στατίνες προλαμβάνουν τη μικροαγγειακή δυσλειτουργία και μειώνουν τη νευροφλεγμονή κατά τη διάρκεια της σήψης, με

πρόσθετα οφέλη τη διατήρηση των γνωσιακών λειτουργιών και την αναστροφή των διαταραχών της αιματικής ροής (*Reis και συν., 2017*). Επιπλέον, η θεραπεία με μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα σε ποντίκια που επιβίωσαν από CLP ήταν αποτελεσματική στον μετριασμό της διαταραχής του ΑΕΦ, στη μείωση της ενεργοποίησης των αστροκυττάρων και στη βελτίωση των γνωσιακών και συμπεριφορικών διαταραχών (*Silva και συν., 2020*).

2.3 Βιοδείκτες σήψης

Η σήψη προκαλεί περιφερική φλεγμονή, οδηγώντας σε αυξημένη διαπερατότητα του ΑΕΦ, η οποία με τη σειρά της έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση αγγειακών ενδοθηλιακών δεικτών στην κυκλοφορία του αίματος. Σε μια μελέτη που χρησιμοποίησε απεικονιστικές μεθόδους για την εξέταση των εγκεφάλων εννέα σηπτικών ασθενών, σε δύο άτομα βρέθηκε φυσιολογική απεικόνιση, ενώ δύο παρουσίασαν πολλαπλά ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια. Επιπλέον, πέντε άτομα παρουσίασαν υπερπυκνώσεις της λευκής ουσίας γύρω από τα περιαγγειακά διαστήματα. Αυτές οι μεταβολές της λευκής ουσίας ενισχύθηκαν καθώς το σηπτικό σοκ παρέμενε και συνδέθηκαν με τις εκβάσεις που μετρήθηκαν με το Glasgow Outcome Score, υπογραμμίζοντας τη σύνδεση μεταξύ της σήψης, της αύξησης της διαπερατότητας του ΑΕΦ και των δυσμενών κλινικών εκβάσεων (*Annane & Sharshar., 2015*).

Βιοδείκτες όπως πρωτεΐνες ή πεπτίδια που υποδεικνύουν βλάβη των ενδοθηλιακών κυττάρων και διατάραξη του ΑΕΦ μπορεί να είναι επωφελείς για την πρόγνωση της θνησιμότητας, του συνδρόμου πολλαπλής οργάνικής δυσλειτουργίας (Multiple Organ Dysfunction, MODS), και τον εντοπισμό της εγκεφαλοπάθειας που σχετίζεται με τη σήψη (Sepsis-Associated Encephalopathy, SAE) (*Annane & Sharshar., 2015*). Σε μια μελέτη 51 σηπτικών ασθενών, αξιολογήθηκαν τα επίπεδα claudin-5 (CLDN-5) και zonula occludens-1 (ZO-1) στο πλάσμα για να διαπιστωθεί εάν μπορούσαν να προβλέψουν τη σοβαρότητα της σήψης και την κλινική έκβασή της. Αυξημένα επίπεδα ZO-1 παρατηρήθηκαν σε ασθενείς με σοβαρή σήψη και σηπτικό σοκ σε σύγκριση με εκείνους με λιγότερο σοβαρές μορφές. Τα ευρήματα υποδεικνύουν τη δυνατότητα της ZO-1 ως βιοδείκτη για την έγκαιρη πρόγνωση σε σηπτικούς ασθενείς (*Annane & Sharshar., 2015*).

Περαιτέρω έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην προγνωστική αξία των ενδοθηλιακών βιοδεικτών για την παρατεταμένη οξεία εγκεφαλική δυσλειτουργία, τη βλάβη του ΑΕΦ και τη διάρκεια του παραλήρηματος κατά τη διάρκεια κρίσιμων ασθενειών. Μια μελέτη που περιελάμβανε 134 ασθενείς, όπου το παραλήρημα αναφέρθηκε σε 94 περιπτώσεις, έδειξε ότι τα υψηλότερα επίπεδα του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου-1 (PAI-1), της Ε-σελεκτίνης και της πρωτεΐνης S100, συσχετίζονται με μειωμένο παραλήρημα. Οι αυξημένες συγκεντρώσεις των PAI-1 και S100B

συσχετίστηκαν επίσης με μεγαλύτερη διάρκεια παραληρήματος μεταξύ των επιζώντων (*Hughes και συν., 2016*).

Σε μια εκτεταμένη προοπτική μελέτη παρατήρησης συμμετείχαν 166 ασθενείς για να εξεταστεί η συσχέτιση μεταξύ της διαλυτής fms-like τυροσινικής κινάσης 1 (sFlt-1), της διαλυτής E-σελεκτίνης (sE-Selectin), του διαλυτού μορίου διακυτταρικής προσκόλλησης 1 (sICAM-1), του διαλυτού μορίου προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων-1 (sVCAM-1) και των επιπέδων PAI-1 με τη δυσλειτουργία των οργάνων και την ενδονοσοκομειακή θνησιμότητα μεταξύ σηπτικών ασθενών. Η μελέτη διαπίστωσε ότι αυτοί οι ενδοθηλιακοί βιοδείκτες σχετίζονται θετικά με τη σοβαρότητα της σήψης και τη δυσλειτουργία των οργάνων (*Skibsted και συν., 2013*).

Σε μια μελέτη 943 βαρέως πασχόντων ασθενών με σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης (SIRS), τα επίπεδα στο πλάσμα διαφόρων ενδοθηλιακών και φλεγμονωδών δεικτών αξιολογήθηκαν ως προς τη σχέση τους με τη θνησιμότητα 28 ημερών. Ειδικότερα, ενώ τα αυξημένα επίπεδα των περισσότερων βιοδεικτών συνδέθηκαν με αυξημένη θνησιμότητα, τα υψηλότερα επίπεδα αγγειοποιητίνης-1 (Ang-1) συνδέθηκαν με χαμηλότερη θνησιμότητα, περιγράφοντας τον πιθανό προστατευτικό της ρόλο (*Mikacenic και συν., 2015*).

3. Νευροφλεγμονή μέσω LPS

3.1 Η έννοια της νευροφλεγμονής

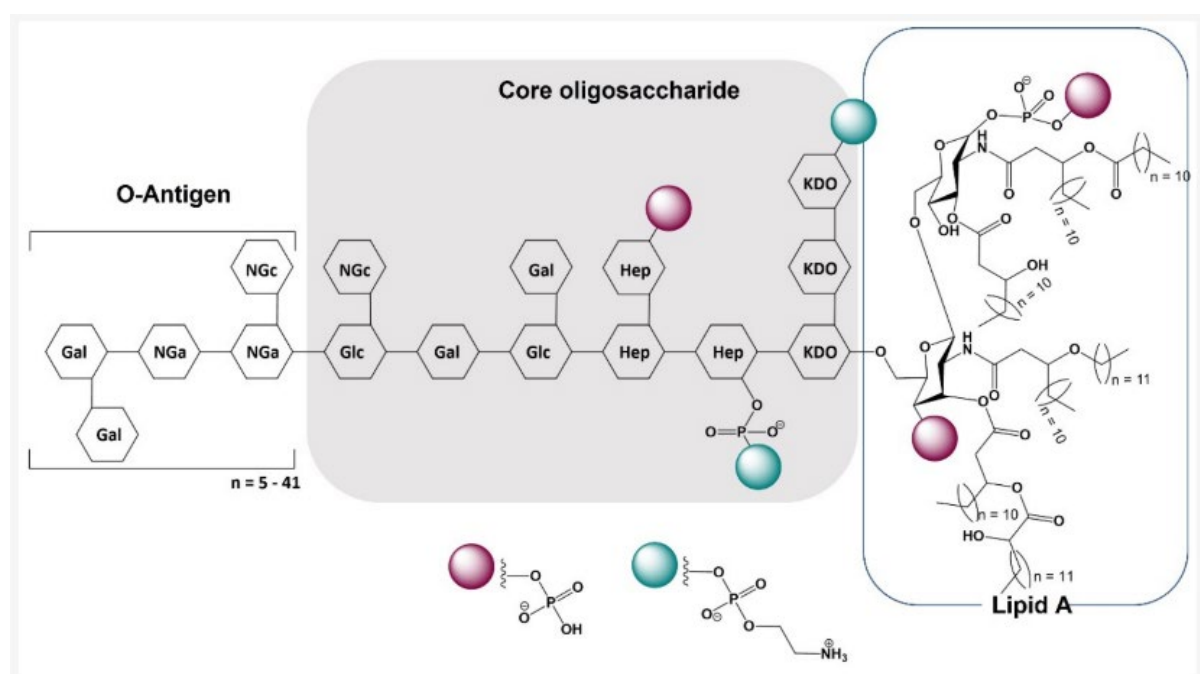
Η νευροφλεγμονή ορίζεται ως φλεγμονώδης απόκριση στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), η οποία μεσολαβείται από την παραγωγή κυτταροκινών μαζί με χημειοκίνες και φλεγμονώδη ένζυμα. Το ΚΝΣ, ως δομή που διαχωρίζεται από τον ΑΕΦ, διαθέτει μόνιμα ανοσοκατασταλτικά κύτταρα, δηλαδή μικρογλοία και αστροκύτταρα. Η μικρογλοία είναι ένας τύπος γλοιακών κυττάρων που σχετίζονται με τα μακροφάγα και αποτελούν την κύρια δεξαμενή ανοσοποιητικών κυττάρων εντός του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού (*Zhao και συν., 2019*). Η μικρογλοία διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης στον νευρικό ιστό του ΚΝΣ, ανιχνεύοντας και αποβάλλοντας τα περιττά προϊόντα του μεταβολισμού, τα ξένα υλικά και τα κυτταρικά υπολείμματα. Επίσης η μικρογλοία συμμετέχει στην ανάπτυξη του εγκεφάλου, στη συναπτική πλαστικότητα και συμβάλλει στην επεξεργασία της μάθησης και της μνήμης. Μια άλλη ομάδα κυττάρων του ΚΝΣ που διαθέτουν ανοσολογικές ιδιότητες είναι τα αστροκύτταρα. Παρόμοια με τη μικρογλοία, τα αστροκύτταρα έχουν πολλές διαφορετικές λειτουργίες. Είναι απαραίτητα τόσο για τον αναπτυσσόμενο όσο και για τον ενήλικο εγκέφαλο και ο σημαντικότερος ρόλος τους είναι η διατήρηση του ΑΕΦ (*Sudwarts και συν., 2022*). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τόσο η μικρογλοία όσο και τα αστροκύτταρα είναι

ανοσοκατασταλτικά κύτταρα και διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη νευροφλεγμονή. Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν μεμβρανικούς υποδοχείς και μόρια, όπως ο υποδοχέας των τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκοποίησης (RAGE), τα clusters of differentiation-36 (CD-36), οι υποδοχείς scavenger (Scavenger Receptors, SRs), οι υποδοχείς Fc, οι υποδοχείς συμπληρώματος (Complement Receptors, CRs) και οι υποδοχείς τύπου Toll (Toll-like Receptors, TLRs). Εστιάζοντας στην οικογένεια των TLRs, τα μικρογλοιακά κύτταρα εκφράζουν τους TLR4 και TLR2 και η ενεργοποίησή τους έχει συσχετιστεί με νευροφλεγμονή και εκτεταμένο θάνατο νευρικών κυττάρων (*Novianti και συν., 2021*).

Η λοίμωξη, το εγκεφαλικό επεισόδιο, η τραυματική εγκεφαλική βλάβη, η νευροεκφύλιση και ο καρκίνος επαναδραστηριοποιούν αυτές τις ομάδες κυττάρων, προωθώντας προφλεγμονώδεις αλλαγές στη μορφολογία τους μαζί με την παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών. Σε αυτές τις περιπτώσεις, τα μικρογλοιακά κύτταρα μετατρέπονται σε προφλεγμονώδη και αρχίζουν να παράγουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, συμπεριλαμβανομένων του παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (TNF-α), της ιντερλευκίνης (IL)-1β, της IL-6, της IL-12, της IL-1α, της συνιστώσας συμπληρώματος 1q (C1q), της προσταγλανδίνης E2 (PGE2) και των ελεύθερων ριζών, δηλαδή του μονοξειδίου του αζώτου (NO) και των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS), για να παρέχουν προστασία έναντι επιβλαβών παραγόντων (*Deng και συν., 2020*). Είναι ενδιαφέρον ότι, εκτός από τους προφλεγμονώδεις παράγοντες, τα διεγερμένα μικρογλοιακά κύτταρα παράγουν επίσης IL-10, η οποία είναι μια ισχυρή αντιφλεγμονώδης κυτταροκίνη. Κατά τα πρώιμα στάδια της νευροφλεγμονής, μόνο μικρές ποσότητες IL-10 μπορούν να ανιχνευθούν, αλλά η επίδρασή της στη διαμόρφωση πάνω στη φλεγμονώδη απόκριση σε αυτό το σημείο είναι καθοριστική. Η μικρογλοιακή παραγωγή της IL-10 αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου και παίζει ρόλο στην υποχώρηση της φλεγμονής (*Liddelow και συν., 2017*). Η παρατεταμένη δραστηριότητα της μικρογλοίας έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του οξειδωτικού στρες και της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας, η οποία οδηγεί σε νευρωνικό θάνατο και νευροεκφυλισμό, ιδίως στην περιοχή του ιπποκάμπου (*Zhao και συν., 2019*). Επιπλέον, ο Liddelow και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι τα χρόνια προφλεγμονώδη ερεθίσματα που προέρχονται από τη μικρογλοία, συμπεριλαμβανομένων των TNF-α, IL-1α και C1q, οδήγησαν στη μετατροπή των αστροκυττάρων ηρεμίας σε νευροτοξικά αντιδραστικά αστροκύτταρα, υπεύθυνα για τη θανάτωση των νευρώνων και των διαφοροποιημένων ολιγοδενδροκυττάρων. Λόγω του ισχυρού ανοσοποιητικού τους δυναμικού, η μικρογλοία και τα αστροκύτταρα διαδραματίζουν βασικό ρόλο στη νευροφλεγμονή. Η φυσιολογική τους δραστηριότητα είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της ομοιόστασης, ωστόσο, η ανεξέλεγκτη και υπερβολική δράση τους είναι νευροτοξική.

3.2 Η δομή του LPS

Ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS), κοινώς γνωστός και ως ενδοτοξίνη, είναι ένα σημαντικό συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων που προκαλεί έντονη φλεγμονώδη απόκριση. Ο LPS είναι ένα γλυκολιπίδιο, συστατικό της ασύμμετρης φωσfolιπιδικής διπλοστοιβάδας της εξωτερικής μεμβράνης, που παρέχει δομική ακεραιότητα και φραγμό διαπερατότητας σε ένα βακτηριακό κύτταρο. Το μόριο του LPS αποτελείται από το λιπίδιο Α, τον ολιγοσακχαρίτη πυρήνα και τον πολυσακχαρίτη Ο που αναφέρεται επίσης και ως Ο-αντιγόνο (Εικόνα 3). Το λιπίδιο Α είναι το πιο σταθερό συστατικό του LPS, καθώς ο Ο-ολιγοσακχαρίτης και τα τμήματα του πυρήνα μπορεί να διαφέρουν σημαντικά ακόμη και μεταξύ των ίδιων ειδών βακτηρίων. Ωστόσο, ακόμη και στο συντηρημένο λιπίδιο Α μπορεί να εμφανιστούν μικρές χημικές διαφορές, όπως η μεταβλητότητα στα επίπεδα φωσφορυλίωσης, που μπορεί να οδηγήσει στην ποικίλη ανοσογονικότητα του LPS. Η παραλλαγή του λιπιδίου Α βρίσκεται σε ισχυρά παθογόνα όπως η *Escherichia coli* και το υποείδος της *Salmonella enterica*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Παρ' όλα αυτά, ορισμένα βακτήρια έχουν αναπτύξει στρατηγικές για να αποφεύγουν την ανοσολογική αναγνώριση του λιπιδίου Α και να αυξάνουν την επιβίωσή τους στο περιβάλλον του ξενιστή. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν τροποποιήσεις του λιπιδίου Α με την προσθήκη καταλοίπων 4-αμινο-αραβινόζης (Ara4N) ή αιθανολαμίνης στις φωσφορικές ομάδες, την αφαίρεση φωσφορικών ομάδων ή, τέλος, με τη μείωση ή επιμήκυνση των ακυλικών αλυσίδων (Garcia-Vello και συν., 2022).



Εικόνα 2: Γενική δομή του LPS προερχόμενου από το *E. coli* O111:B4. Gal-galactose; Glc-glucose; Hep-L-glycerol-D-manno-heptose; KDO-2-keto-3-deoxyoctonic acid; Nga-N-acetyl-galactosamine; NGc-N-acetyl-glucosamine (Εικόνα από Skrzypczak-Wiercioch & Sałat, 2022. Άδεια: open access Creative Common CC BY license).

3.3 LPS-επαγόμενα κυτταρικά μονοπάτια

Οι TLR4s (Toll like Receptors), εκφράζονται σε πολλά κύτταρα του ανοσοποιητικού και μη ανοσοποιητικού θηλαστικού, συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων, μονοκυττάρων, λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος, κοκκιοκυττάρων, δενδριτικών κυττάρων, μικρογλοίας, αστροκυττάρων, ενδοθηλιακών κυττάρων εγκεφάλου, ενδοθηλίου δερματικών μικροαγγείων, ενδοθηλίου ομφαλικής φλέβας. Ωστόσο, στο ΚΝΣ, η μεγαλύτερη δεξαμενή TLR4 σχετίζεται κυρίως με μικρογλοιακά κύτταρα (*Gern και συν., 2021*). Προκειμένου το TLR4 να δεσμεύσει το πρόσδεμα, το LPS πρέπει να παρουσιάζεται με συγκεκριμένο τρόπο. Αρχικά, κυκλοφορούντα μόρια LPS ή άθικτα αρνητικά κατά Gram βακτήρια συλλαμβάνονται από μια ειδική πρωτεΐνη οξείας φάσης που ονομάζεται πρωτεΐνη δέσμησης λιποπολυσακχαρίτη (LBP) που ανιχνεύει το μοτίβο του λιπιδίου A. Στη συνέχεια, το LPS μεταφέρεται στο σύμπλεγμα διαφοροποίησης-14 (CD-14). Το LPS δεν δεσμεύεται άμεσα από την περιοχή LRR του TLR4, αλλά μέσω μιας υδρόφοβης σχισμής στη βοηθητική πρωτεΐνη MD-2 που σχετίζεται με το LRR του TLR4 (*Mazgheen & Gurung, 2020*). Κατά τη δέσμευση του LPS, λαμβάνει χώρα ομοδιμερισμός του TLR4, ενεργοποιώντας μια κάτωθι οδό σηματοδότησης. Ο TLR4 είναι μπορεί να σηματοδοτήσει τόσο με μονοπάτια που εξαρτώνται από το MyD88 όσο και από το TRIF. Όταν ο TLR4 εκφράζεται στην επιφάνεια του κυττάρου, εμφανίζεται σηματοδότηση που εξαρτάται από το MyD88. Μετά την εσωτερίκευση στο ενδοσώμα, το TLR4 σηματοδοτεί μέσω ενός μονοπατιού που εξαρτάται από το TRIF, ο οποίος επιπλέον μπορεί να ενισχύσει την απόκριση NF-κΒ και AP-1. Αυτή η διπλή οδός ενεργοποίησης αλληλοσυμπληρώνει και εντείνει τη δράση της, παρέχοντας ισχυρή προφλεγμονώδη αντίδραση σε βακτηριακή μόλυνση. Το τελικό αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του TLR4 είναι η παραγωγή κυτοκινών και χημειοκινών, συμπεριλαμβανομένων των IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, PGE2, ROS, NO και ιντερφερονών τύπου I (*Zhao και συν., 2019*).

Ωστόσο, μελέτες της τελευταίας δεκαετίας έχουν αποκαλύψει ότι υπάρχουν και άλλα μονοπάτια εκτός του TLR4 που συμμετέχουν στην ανίχνευση LPS. Μέχρι σήμερα, είναι γνωστά δύο συστήματα αναγνώρισης LPS ανεξάρτητα από το TLR, συμπεριλαμβανομένων των καναλιών δυναμικού παροδικού υποδοχέα (TRP) και των φλεγμονωδών κασπασών (*Qing- Qing και συν., 2022*).

Έρευνες έχουν δείξει ότι το LPS θα μπορούσε να καταστρέψει το ΑΕΦ μέσω διάφορων μηχανισμών και το κατεστραμμένο ΑΕΦ προωθεί την ανάπτυξη πολλαπλών εγκεφαλικών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένης της εγκεφαλοπάθειας που σχετίζεται με τη σήψη (SAE). Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι το LPS ενισχύει τη διαπερατότητα του ΑΕΦ εξασθενώντας τις στενές συνδέσεις (Tight Junctions, TJs) και τις συνδέσεις προσκόλλησης (Adherence Junctions, AJs), αλλάζοντας την κατανομή τους και επιτρέποντας σε επικίνδυνες χημικές ουσίες να περάσουν από το ΑΕΦ και να προκαλέσουν

δυσλειτουργία του ΚΝΣ. Οι TJs αποτελούνται κυρίως από πυκνά κατανεμημένη διαμεμβρανική πρωτεΐνη claudin (ειδικά claudin-5), απόφραξη, τρικυτταρίνες, μόρια σύνδεσης προσκόλλησης και πρωτεΐνες ενδοκυτταρικής υποστήριξης. Οπότε, το LPS ελαττώνει την ποσότητα των πρωτεϊνών ZO-1 και claudin-5 των TJs, και αλλάζει την ενδοκυτταρική τους εναπόθεση μεταφέροντάς τις από την κυτταρική μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα, ύστερα από 14 ημέρες (Peng και συν., 2021).

Σε σχέση με τα σηματοδοτικά μονοπάτια που αναφέρθηκαν νωρίτερα σε αυτή την ενότητα, οι άμεσες επιδράσεις του LPS που σχετίζονται με τον ΑΕΦ είναι οι ακόλουθες: Πρώτον, η ενεργοποίηση μέσω LPS των RHOA (Ras homolog family member A) και το NFκB, οδηγεί στην παραγωγή COX-2, η οποία καταστρέφει τις TJs. Ταυτόχρονα, το LPS παρεμποδίζει τον Nrf2, αυξάνοντας την παραγωγή NADPH και NOX-1, που καταστρέφουν τις πρωτεΐνες των TJs. Ακόμα, το LPS, αυξάνοντας την φωσφορυλίωση της MAPK ενεργοποιεί την JNK κινάση, καταλήγοντας στην παραγωγή μεταλλοπρωτεασών, οι οποίες επίσης καταστρέφουν τις πρωτεΐνες των TJs. Τέλος, το LPS προκαλεί την έκκριση της πρωτεΐνης SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine), η οποία έχει σχετίζεται με την ανάπτυξη του εγκεφάλου, αλλά και με τραυματισμούς και όγκους, και συμμετέχει στην αγγειογένεση στον ΑΕΦ. Η πρωτεΐνη SPARC ελαττώνει την έκφραση της ZO-1, γεγονός που καταλήγει σε αυξημένη διαπερατότητα του ΑΕΦ (Peng και συν., 2021).

Το LPS ενεργοποιεί τον Παράγοντα Νέκρωσης Όγκων-α (TNF-α) και την ενδοθηλίνη (ET)-1 μετά τη δέσμευση στον TLR4 και μειώνει τη δραστηριότητα της Ρ-γλυκοπρωτεΐνης (P-gr). Η Ρ-γλυκοπρωτεΐνη (P-gr), ένας σημαντικός μεταφορέας εκροής που ανήκει στα ABC. Η μειωμένη έκφραση και δραστηριότητα της Ρ-gr μπορεί να προκαλέσει συσσώρευση τοξικών μεταβολιτών στο ΚΝΣ, οδηγώντας σε αυξημένο κίνδυνο εγκεφαλικών παθήσεων. Χαρακτηριστικά, το LPS του E. coli O111:B4 μπορεί να διαταράξει τη διαπερατότητα του ΑΕΦ επηρεάζοντας τη δραστηριότητα του Ρ-gr, προκαλώντας αδυναμία αποστράγγισης διαφόρων νευροτοξινών και παθογόνων μικροοργανισμών από τον εγκέφαλο. Ταυτόχρονα, το LPS αυξάνει τη φωσφορυλίωση της cav-1, γεγονός που επίσης αυξάνει τη διαπερατότητα του ΑΕΦ. Το LPS παρεμποδίζει το eNOS και την GTPCH1 και αυξάνει την δράση των προ-αποπτοτικών κασπασών 3/7. Η απόπτωση προκαλείται επίσης από την παρεμπόδιση του KI67. Όπως αναφέρθηκε ήδη, το LPS ενεργοποιεί την πρωτεΐνη-1 (Dpr1) που σχετίζεται με τη δυναμίνη ή ενεργοποιεί τον MyD88 μετά τη δέσμευση στο TLR4 για τη μείωση του ATP που παράγεται από τα μιτοχόνδρια. Όλα τα παραπάνω, δημιουργούν ένα έντονα τοξικό περιβάλλον στην περιοχή του ΑΕΦ (Leyrolle και συν., 2019).

Η επαγόμενη από LPS νευροφλεγμονή ενεργοποιεί κύτταρα της έμφυτης ανοσίας του ΚΝΣ, όπως τα μικρογλοιακά κύτταρα, τα αστροκύτταρα και τα περικύτταρα. Λόγω της ενεργοποίησης της μικρογλοίας, η ZO-1, η claudin-5, η occludin και άλλες πρωτεΐνες των TJ στα μεσοκυττάρια όρια καταστρέφεται. Το LPS συνδέεται με τον TLR4 στα μικρογλοιακά κύτταρα και ενεργοποιεί την

παραγωγή TNF- α και ROS μέσω της οδού NOX. Όταν διεγείρονται με λιποπολυσακχαρίτη (LPS), τα αστροκύτταρα ενεργοποιούνται και εκκρίνουν διάφορες κυτοκίνες. Αυτή η έκκριση οδηγεί στην επακόλουθη ενεργοποίηση της μικρογλοίας, ενισχύοντας έτσι τη φλεγμονώδη απόκριση εντός του νευρικού περιβάλλοντος. Επιπλέον, η έκθεση στο LPS ωθεί τα αστροκύτταρα να παράγουν αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα A (VEGF-A). Η απελευθέρωση του VEGF-A, με τη σειρά του, οδηγεί στην ενεργοποίηση της συνθάσης του ενδοθηλιακού μονοξειδίου του αζώτου (eNOS), η οποία εμπλέκεται στη διάσπαση των πρωτεϊνών σφιχτής σύνδεσης (TJ) (Sofroniew, 2014). Αυτή η διαταραχή συμβάλλει στην αποδυνάμωση των κυτταρικών φραγμών, επιδεινώνοντας περαιτέρω τη φλεγμονώδη απόκριση και δυνητικά επηρεάζοντας τη νευρική λειτουργία και ακεραιότητα. Τέλος, το LPS έχει σημαντική επίδραση στα περικύτταρα, έναν τύπο κυττάρου που όπως αναφέρθηκε βρίσκεται γύρω από τα τριχοειδή του αίματος και τα αγγεία. Κατά την έκθεση στο LPS, υπάρχει μια αξιοσημείωτη μετατόπιση του NF- κ B στον πυρήνα των περικυττάρων. Αυτή η μετατόπιση είναι ένα κρίσιμο βήμα στην ενεργοποίηση της οδού NF- κ B, η οποία παίζει βασικό ρόλο στη μεσολάβηση των φλεγμονωδών αποκρίσεων. Καθώς ο NF- κ B εισέρχεται στον πυρήνα, ωθεί τα περικύτταρα να συμμετέχουν ενεργά σε φλεγμονώδεις διεργασίες, συχνά σε συνεργασία με τα ενδοθηλιακά κύτταρα (Endothelial Cells, ECs). Αυτή η αλληλεπίδραση μεταξύ περικυττάρων και ECs υπό την επίδραση του LPS μπορεί να οδηγήσει σε ενισχυμένες φλεγμονώδεις αποκρίσεις, επηρεάζοντας δυνητικά τη σταθερότητα και τη διαπερατότητα των αγγείων και συμβάλλοντας στην ευρύτερη δυναμική της φλεγμονής εντός του αγγειακού συστήματος.

3.4 Μοντέλα LPS-επαγόμενης φλεγμονής και σήψης

Η εκτεταμένη χρήση του LPS ως μοντέλου για τη μελέτη της σήψης και της φλεγμονής στα θηλαστικά οφείλεται στα ισχυρά προφλεγμονώδη χαρακτηριστικά του και στους καλά τεκμηριωμένους μηχανισμούς που περιλαμβάνουν την εξαρτώμενη από το TLR4 ανοσοενεργοποίηση. Τα μοντέλα LPS είναι ιδιαίτερα διαδεδομένα για τη μελέτη της νευροφλεγμονής που παρατηρείται σε ασθένειες όπως οι νόσοι των Alzheimer και Parkinson.

Κεντρική σημασία τόσο για τη νευροφλεγμονή όσο και για τη φλεγμονή που προκαλείται από το LPS είναι η οδός σηματοδότησης TLR4. Η χορήγηση LPS οδηγεί σε φλεγμονώδη απόκριση με τη μεσολάβηση του TLR4, επανενεργοποίηση μικρογλοίας και νευροφλεγμονή, προκαλώντας νευρωνικό εκφυλισμό, απώλεια συναπτικής λειτουργίας και τελικά νευρωνικό θάνατο. Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει την παραγωγή φλεγμονωδών μορίων όπως TNF- α , IL-6, IL-1 β , αυξημένη δραστηριότητα ενζύμων όπως iNOS, COX-2 και σεκρετάσες, μαζί με οξειδωτικό στρες. Η αμυλοειδογένεση μετά από

έκθεση σε LPS είναι εμφανής στις περιοχές του φλοιού και του υπόκαμπου. *In vivo* αυτό οδηγεί σε γνωσιακή εξασθένηση και μια σειρά από αλλαγές συμπεριφοράς.

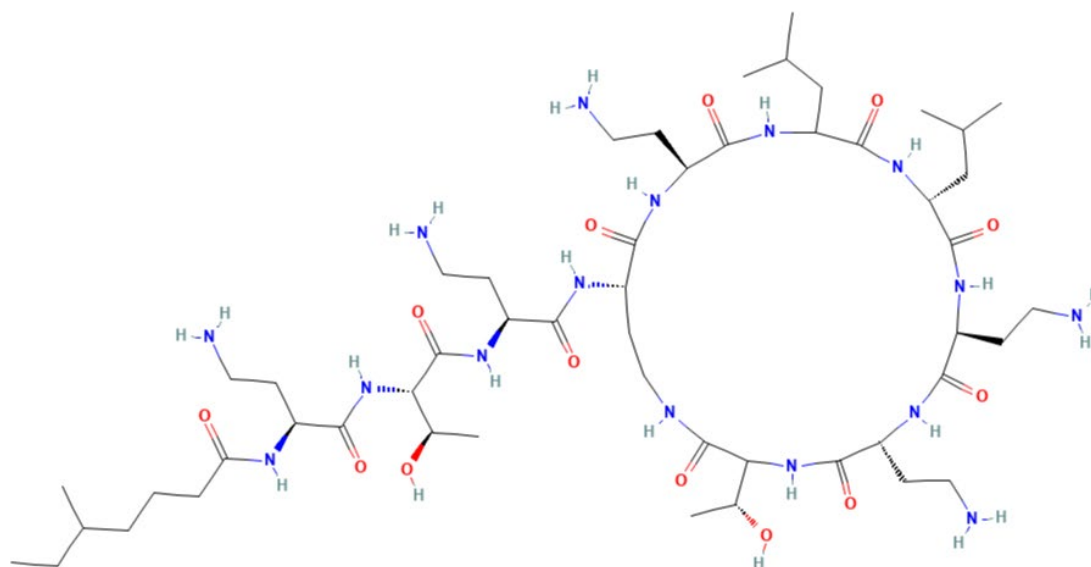
Στα νευροεκφυλιστικά νοσήματα παρατηρούνται παρόμοια παθολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά. Η χρόνια χορήγηση LPS, που οδηγεί σε αυξημένη συσσώρευση Αβ, το καθιστά κατάλληλο μοντέλο για την έρευνα της νόσου του Alzheimer. Το LPS αναπαράγει επίσης βασικές πτυχές της νόσου του Parkinson προκαλώντας νευροφλεγμονή και απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων. Η εφαρμογή του LPS στη μελέτη της μυατροφικής πλευρικής σκλήρυνσης και της νόσου του Huntington έχει μελετηθεί διεξοδικά (Batista και συν., 2019).

Παρά τη χρησιμότητά τους, οι περιορισμοί των μοντέλων LPS πρέπει να αναγνωριστούν. Οι περίπλοκοι μικρο- και μακρο-μηχανισμοί και αλληλεπιδράσεις σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες δεν μπορούν να αναπαραχθούν πλήρως σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλα που χορηγείται LPS. Επομένως, ενώ τα μοντέλα LPS είναι πολύτιμα για τη διερεύνηση αντιφλεγμονωδών και νευροπροστατευτικών αποκρίσεων, η απευθείας μετάφραση αυτών των ευρημάτων σε κλινικές εφαρμογές αποτελεί πρόκληση (Skrzypczak & Salat, 2022).

4. Κολιστίνη

Οι πολυμυξίνες αποτελούν μια ομάδα πολυπεπτιδικών αντιβιοτικών, η οποία περιλαμβάνει πέντε διαφορετικές χημικές ενώσεις (πολυμυξίνες Α-Ε). Μεταξύ αυτών, μόνο η πολυμυξίνη Β και η πολυμυξίνη Ε έχουν τύχει πρακτικής εφαρμογής στην κλινική πράξη. Η κολιστίνη ανακαλύφθηκε το 1949 και είναι ένα πολυπεπτιδικό αντιβιοτικό το οποίο παράγεται από τον αερόβιο μικροοργανισμό *Bacillus Polymyxa*. Η κολιστίνη παρουσιάζει βακτηριοκτόνο δράση έναντι της πλειονότητας των αρνητικών κατά Gram μικροοργανισμών. Ωστόσο, λόγω της εμφάνισης νεότερων αντιβιοτικών που είναι εξίσου αποτελεσματικά αλλά ασφαλέστερα από την κολιστίνη, η κλινική της χρήση έχει περιοριστεί, με εξαίρεση τη χρήση της στους ασθενείς με κυστική ίνωση, για τους οποίους η κολιστίνη ήταν συχνά η μόνη διαθέσιμη επιλογή για τη θεραπεία λοιμώξεων από πολυανθεκτική ψευδομονάδα. Ωστόσο, η κλιμακούμενη βακτηριακή αντοχή στα υπάρχοντα αντιβιοτικά και η έλλειψη νέων δραστικών αντιμικροβιακών παραγόντων έχουν οδηγήσει στην επαναχρησιμοποίηση της κολιστίνης σε σοβαρές λοιμώξεις που προκαλούνται από αρνητικά κατά Gram μικρόβια, όπως η *Pseudomonas aeruginosa*, το *Acinetobacter baumannii* και η *Klebsiella pneumoniae* με αποτέλεσμα η κολιστίνη να αποτελεί συχνά τη μόνη θεραπευτική λύση σε σοβαρές λοιμώξεις που προκαλούνται από πολυανθεκτικούς αρνητικούς κατά Gram μικροοργανισμούς.

4.1 Χημικές ιδιότητες της κολιστίνης



Εικόνα 3: Χημικός τύπος κολιστίνης, (*Pubchem Identifier: CID 44144393*)

Αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό των πολυμυξινών είναι η παρουσία τμημάτων α, γ-διαμινοβουτυρικού οξέος και του λιπόφιλου αμινοξέος D-λευκίνη. Στα εμπορικά σκευάσματα κολιστίνης, η κολιστίνη Α (πολυμυξίνη Ε1) και η κολιστίνη Β (πολυμυξίνη Ε2) είναι τα κύρια συστατικά, αποτελώντας τουλάχιστον το 85% του μείγματος. Η κολιστίνη Α φέρει 6-μεθυλοκτανοϊκό οξύ, ενώ η κολιστίνη Β φέρει 6-μεθυλοεπτανοϊκό οξύ. Η κολιστίνη διατίθεται στις μορφές της θειικής κολιστίνης για τοπική εφαρμογή και της μεθανοσουλφονικής κολιστίνης για παρεντερική και εισπνεόμενη χορήγηση (*Li και συν., 2003*). Η κολιστίνη περιλαμβάνει τόσο λιπόφιλες όσο και υδρόφιλες ομάδες στο μόριο της. Οι λιπόφιλες ιδιότητες αποδίδονται στην πλευρική αλυσίδα του λιπαρού οξέος, ενώ οι υδρόφιλες και βασικές του ιδιότητες ($pK_a = 10$) προκύπτουν από τις πέντε ελεύθερες γ-αμινομάδες των μορίων του α,γ-διαμινοβουτυρικού οξέος. Η μεθανοσουλφονική κολιστίνη λαμβάνεται μέσω αντίδρασης που περιλαμβάνει κολιστίνη και φορμαλδεΐδη, ακολουθούμενη από θειικό νάτριο (*Kempf και συν., 2016*). Συγκεκριμένα, οι πέντε ελεύθερες γ-αμινομάδες του α,γ-διαμινοβουτυρικού οξέος αντιδρούν με τη φορμαλδεΐδη.

4.2 Αντιμικροβιακές ιδιότητες της κολιστίνης

Η κολιστίνη εμφανίζει βακτηριοκτόνα αποτελέσματα έναντι ευρέος φάσματος αρνητικών κατά Gram, αερόβιων βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των *Acinetobacter*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Yersinia pseudotuberculosis*,

Morganella morganii και *Haemophilus influenzae*. Παρουσιάζει επίσης σημαντική δραστικότητα έναντι διαφόρων μυκοβακτηριακών ειδών, όπως *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium phlei* και *Mycobacterium smegmatis*. Επιπλέον, επιδεικνύει *in vitro* αποτελεσματικότητα έναντι σημαντικού ποσοστού (83%-88%) των στελεχών της *Stenotrophomonas maltophilia*. Ωστόσο, η κολιστίνη είναι αναποτελεσματική έναντι των *Pseudomonas mallei*, *Burkholderia cepacia*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia*, *Edwardsiella* και *Brucella* (Zeiler και συν., 2020).

Είναι ενδιαφέρον ότι μια μελέτη αποκάλυψε ότι η μεθανοσουλφονική κολιστίνη (CMS) λειτουργεί ως ανενεργό προφάρμακο της κολιστίνης όταν αντιμετωπίζει τον μικροοργανισμό *P. aeruginosa*. Αυτή η αδράνεια αποδίδεται στα διαφορετικά φορτία των δύο μορίων σε φυσιολογικό pH 7,4. Η κολιστίνη φέρει θετικό φορτίο, το οποίο είναι θεμελιώδες για τον μηχανισμό δράσης της, ενώ το CMS φέρει αρνητικό φορτίο, γεγονός που εξηγεί τη μειωμένη δραστικότητά του. Ωστόσο, η υδρόλυση απομακρύνει τις μεθανοσουλφονικές ομάδες και παράγει τη δραστική βάση της κολιστίνης, που διαθέτει φορτίο +5 (με τις πέντε ελεύθερες αμινομάδες πρωτονιωμένες), μαζί με μερικώς μεθανοσουλφονικά παράγωγα που παρουσιάζουν φορτία που κυμαίνονται από -3 έως +3 (-3 για τα παράγωγα με τέσσερις σουλφομεθυλομάδες και +3 για εκείνα με μία μόνο σουλφομεθυλομάδα). Αυτό υποδηλώνει ότι η έλλειψη δραστικότητας του CMS μπορεί να επεκταθεί και σε μικροοργανισμούς πέραν της *P. aeruginosa*, καθώς ο πρωταρχικός μηχανισμός δράσης είναι σε μεγάλο βαθμό φυσικοχημικός. Η υπόθεση ότι το CMS είναι προφάρμακο είχε προταθεί προηγουμένως σε άλλες μελέτες, αλλά παρέμεινε ανεπιβεβαιώτη πειραματικά.

4.3 Μηχανισμός δράσης της κολιστίνης

Η κολιστίνη λειτουργεί ως κατιονικός επιφανειοδραστικός παράγοντας και στόχος της είναι η βακτηριακή κυτταρική μεμβράνη. Αυτό οφείλεται κυρίως στις υδρόφιλες θετικά φορτισμένες γ-αμινομάδες του α-διαμινοβουτυρικού οξέος, οι οποίες παραμένουν αδέσμευτες στο υδατικό περιβάλλον, ενώ το λιπόφιλο τμήμα της κολιστίνης αλληλεπιδρά με τη μικροβιακή εξωτερική μεμβράνη. Η ευαισθησία των μικροοργανισμών στην κολιστίνη συσχετίζεται με την υψηλότερη περιεκτικότητα της μεμβράνης τους σε φωσfolιπίδια. Στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, τα γειτονικά μόρια λιποπολυσακχαριτών συνδέονται με γέφυρες μαγνησίου που εκτείνονται μεταξύ φωσφορικών ομάδων. Η κολιστίνη, με το θετικό της φορτίο, εκτοπίζει τα κατιόντα μαγνησίου και ασβεστίου και εισέρχεται μεταξύ των μορίων πολυσακχαρίτη, διαταράσσοντας τη συνοχή και τη διαπερατότητα της μεμβράνης. Αφού διεισδύσει στην εξωτερική μεμβράνη, συνδέεται με την αρνητικά φορτισμένη κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η διαδικασία αυτή οδηγεί σε αυξημένη

διαπερατότητα της μεμβράνης, απελευθέρωση βασικών ενδοκυτταρικών συστατικών και τελικά στον βακτηριακό θάνατο. Ο μηχανισμός δράσης της κολιστίνης εξηγεί και το λόγο για τον οποίο η κολιστίνη είναι αναποτελεσματική έναντι των θετικών κατά Gram μικροοργανισμών, καθώς αυτοί δεν διαθέτουν λιποπολυσακχαρίτες. Επιπλέον, η κολιστίνη παρουσιάζει αυξημένη δραστηριότητα έναντι της *P. aeruginosa* λόγω των υψηλότερων θέσεων μαγνησίου στους λιποπολυσακχαρίτες της σε σύγκριση με άλλους αρνητικούς κατά Gram μικροοργανισμούς (Zeiler και συν., 2020).

Εκτός από την άμεση βακτηριοκτόνο δράση της, η κολιστίνη έχει τη δυνατότητα να εμφανίζει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες αναστέλλοντας τον καταρράκτη φλεγμονής που προκαλείται από την ενδοτοξίνη (Avendano-Ortiz και συν., 2023). Η δράση αυτή θα μπορούσε να εξηγηθεί από την αδρανοποίηση των λιποπολυσακχαριτών και της ενδοτοξίνης (λιποειδές A των λιποπολυσακχαριτών) από την κολιστίνη, αν και η σημασία της σε συνθήκες *in vivo* παραμένει αδιευκρίνιστη.

4.4 Ανεπιθύμητες ενέργειες κολιστίνης

Οι πιο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες που παρατηρούνται κατά την ενδοφλέβια χρήση της μεθανοσουλφονικής κολιστίνης (CMS) είναι η νεφροτοξικότητα και η νευροτοξικότητα. Η νεφροτοξικότητα τυπικά εμφανίζεται ως οξεία σωληναριακή νέκρωση, που οδηγεί σε μειωμένη κάθαρση κρεατινίνης και αυξημένα επίπεδα ουρίας και κρεατινίνης στο αίμα. Η νευροτοξικότητα εκδηλώνεται ως συμπτώματα όπως ζάλη, αδυναμία, παραισθησία, ίλιγγος, οπτικές διαταραχές και σύγχυση. Συγκεκριμένα, παραισθησία αναφέρθηκαν στο 27% των περιπτώσεων μετά από ενδοφλέβια χορήγηση CMS και στο 7,3% μετά από ενδομυϊκή χορήγηση (Ajiboye, 2018).

Ο πιθανός μηχανισμός που κρύβεται πίσω από τη νευροτοξικότητα περιλαμβάνει τη δέσμευση της πολυμυξίνης σε υποδοχείς ακετυλοχολίνης, εμποδίζοντας την απελευθέρωση ακετυλοχολίνης στη συναπτική σχισμή (Dai και συν., 2020). Ωστόσο, πιο πρόσφατες μελέτες αμφισβήτησαν τα δεδομένα που αναφέρθηκαν προηγουμένως σχετικά με την τοξικότητα της κολιστίνης (Dai και συν., 2018).

Τόσο η νεφροτοξικότητα όσο και η νευροτοξικότητα πιστεύεται ότι είναι δόσοεξαρτώμενες και γενικά αναστρέψιμες. Επιπλέον, έχουν τεκμηριωθεί αντιδράσεις υπερευαισθησίας, δερματικό εξάνθημα, κνησμός, πυρετός και ήπιες γαστρεντερικές διαταραχές.

Προηγούμενες μελέτες σε ασθενείς με κυστική ίνωση έχουν επισημάνει σημαντικό βρογχόσπασμο, ιδιαίτερα σε εκείνους με συνυπάρχον άσθμα. Η προσθήκη ενός β₂-αδρενεργικού αγωνιστή πριν από τη χορήγηση κολιστίνης μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη ή στην ελαχιστοποίηση του βρογχόσπασμου (Cunningham και συν., 2001).

Δεδομένα από τη δεκαετία του 1990 και μετά υποδηλώνουν ότι ο αναφερόμενος κίνδυνος νεφροτοξικότητας μπορεί να έχει υπερεκτιμηθεί. Μια μελέτη του 1993 που αφορούσε ασθενείς με κυστική ίνωση δεν ανέφερε ούτε νεφροτοξικότητα ούτε νευροτοξικότητα. Πιο πρόσφατες μελέτες σε μονάδες εντατικής θεραπείας έχουν δείξει χαμηλότερη συχνότητα νεφροτοξικότητας (*Kasiakou και συν., 2005*).

Ο προτεινόμενος μηχανισμός μέσω του οποίου η κολιστίνη προκαλεί νεφροτοξικότητα περιλαμβάνει αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης του νεφρικού σωληναρίου, με αποτέλεσμα την ενισχυμένη εισροή κατιόντων, ανιόντων και νερού. Αυτό, με τη σειρά του, οδηγεί σε κυτταρικό οίδημα και λύση.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας ήταν ο προσδιορισμός της πιθανής δράσης της κολιστίνης στην διατήρηση της ακεραιότητας του ΑΕΦ σε επαγόμενο από τον LPS in vino μοντέλο σήψης, το οποίο προσομοιάζει τη σήψη που μπορεί να αναπτύξουν ασθενείς στην μονάδα εντατικής θεραπείας.

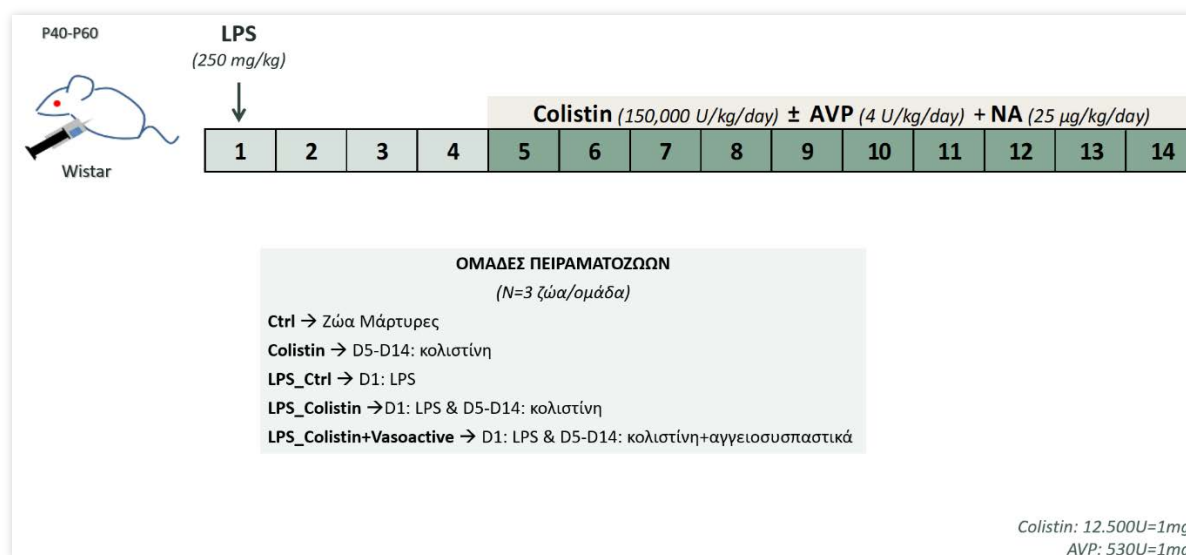
Συγκεκριμένα, έγινε ιστοπαθολογική αξιολόγηση εγκεφαλικών τομών στο επίπεδο του υποκάμπου, και μελέτη της πιθανής ενεργοποίησης των αστροκυττάρων.

Εστίασαμε στην περιοχή του υποκάμπου γιατί ο υποκάμπος είναι μια περιοχή ζωτικής σημασίας για τη μνήμη και τη μάθηση και βλάβες σε αυτήν την περιοχή μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά τις γνωσιακές ικανότητες και τη συμπεριφορά ενός ατόμου. Επιπρόσθετα, πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός στην περιοχή του υποκάμπου μπορεί να είναι πιο αδύναμος και πιο επιρρεπής σε διάφορες προσβολές έναντι άλλων εγκεφαλικών περιοχών (Davidson & Stevenson, 2024).

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1. *In vivo* μοντέλο σήψης

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα πτυχιακή εργασία ήταν 14 ενήλικες αρσενικοί επίμυες Wistar, ηλικίας 6-8 εβδομάδων. Όλες οι διαδικασίες έγιναν σύμφωνα με την Ελληνική και Ευρωπαϊκή Νομοθεσία (Αριθμός άδειας Διεύθυνση Κτηνιατρικής της Περιφέρειας Θεσσαλίας: 150511). Την πρώτη ημέρα πραγματοποιήθηκε ενδοπεριτονιακή χορήγηση 250mg/kg LPS και από την πέμπτη ημέρα και για δέκα συνεχόμενες ημέρες έγινε επίσης ενδοπεριτονιακή χορήγηση κολιστίνης με ή χωρίς αγγειοσυσπαστικά. Συνολικά είχαμε 5 ομάδες πειραματόζωων που απαρτιζόταν από 3 ζώα η κάθε μία. Την ομάδα **control** δηλαδή τα ζώα μάρτυρες, την ομάδα **colistin** δηλαδή τα ζώα που έλαβαν μόνο κολιστίνη για 10 ημέρες, την ομάδα **LPS control** δηλαδή τα ζώα που τους χορηγήθηκε μόνο LPS, την ομάδα **LPS colistin** δηλαδή τα ζώα που έλαβαν LPS την πρώτη ημέρα και κολιστίνη για 10 ημέρες, και τέλος, την ομάδα **LPS colistin + vasoactive** δηλαδή τα ζώα που έλαβαν LPS την πρώτη ημέρα και κολιστίνη μαζί με αγγειοσυσπαστικά φάρμακα από την 5^η έως την 14^η ημέρα. Τα συγκεκριμένα αγγειοσυσπαστικά φάρμακα χρησιμοποιούνται στις Μονάδες Εντατικής Θεραπείας, όχι μόνο για την αντιμετώπιση του σηπτικού σοκ, αλλά και για την αιμοδυναμική ρύθμιση των ασθενών γενικότερα. Ο χειρισμός των πειραματόζωων πραγματοποιήθηκε από τα μέλη του εργαστηρίου Φαρμακολογίας **πριν** την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης πτυχιακής.



Εικόνα 4. Πειραματικός Σχεδιασμός. (Βασιλάκη Άννα*)

* Ζήτησα και έλαβα άδεια χρήσης όλων των σχημάτων που φέρουν το όνομα της επιβλέπουσας της διπλωματικής μου εργασίας κ. Άννας Βασιλάκη

Μετά το τέλος του πειράματος, έγινε λήψη και μονιμοποίηση του εγκεφάλου, διαπότηση σε παραφίνη και συλλογή τομών πάχους 5μm. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε ιστολογική χρώση των ιστών με εωσίνη και αιματοξυλίνη καθώς επίσης και ανοσοφθορισμός με GFAP, ο οποίος αποτελεί δείκτη αστροκυττάρων και χρώση με DAPI για την παρατήρηση των πυρήνων. Η ανάλυση των φωτογραφιών πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του προγράμματος ImageJ.



Εικόνα 5. Στάδια πειραματικής διαδικασίας - Ιστολογία/Ανοσοφθορισμός. (Βασιλάκη Άννα)

2. Ανοσοϊστοχημεία

Στη παρούσα πτυχιική εργασία εφαρμόστηκε η μέθοδος του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Αρχικά πραγματοποιήθηκε αποπαραφίνωση και επανυδάτωση των ιστών. Οι ιστοί ξεπλύθηκαν 3 φορές επί 5min με διάλυμα ξυλένιου στην συνέχεια ξεπλύθηκαν 2 φορές με διάλυμα αιθανόλης 100% για 10min, 2 φορές με διάλυμα αιθανόλης 95% για 10min, 2 φορές με διάλυμα αιθανόλης 70% για 10min, 2 φορές με διάλυμα αιθανόλης 50% για 10min και τέλος 2 φορές με ddH₂O για 5min.

Ακολούθησε η ανάκτηση αντιγόνου για τον πλήρη καθαρισμό των ιστών. Για τον σκοπό αυτό οι ιστοί επώαστηκαν σε διάλυμα 10mM κιτρικού οξέος (10mM κιτρικό οξύ, 0,05% Tween 20, Ph 5.98) και έμειναν σε θερμοκρασία υποβρασμού για 10min. Στην συνέχεια οι ιστοί αφέθηκαν να κρυώσουν στον πάγκο για περίπου 30min. Τέλος, οι ιστοί πλύθηκαν με βύθιση σε ddH₂O για 5min.

Στη συνέχεια προστέθηκε περιμετρικά των ιστών ένα υδροφοβικό όριο/φράγμα και τα πλακάκια τοποθετήθηκαν στο σκοτάδι. Ακολούθως έγινε πλύση των τομών των ιστών με διάλυμα 0,1M PBS (137mM, 2,7 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄, pH 7,2-7,4) δύο φορές από 10min. Ακολουθεί επώαση των ιστών με το διάλυμα πρώτου αντισώματος για 72 ώρες στους 4°C. Ως πρώτο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα mouse anti-GFAP σε συγκέντρωση 1:500 που προερχόταν από την εταιρεία Sigma (MAB360).

Μετά το πέρας των 72 ωρών, αφαιρέθηκε το διάλυμα του 1^{ου} αντισώματος και πραγματοποιήθηκαν 3 πλύσεις των 15 λεπτών με διάλυμα 0,1M PBS μέσα στο Cold room (4°C). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε overnight (18 ώρες) επώαση των ιστών με το διάλυμα του 2^{ου} αντισώματος στο

Cold room (4°C). Το διάλυμα του 2^{ου} αντισώματος παρασκευάστηκε σε 0,1M PBS, το οποίο περιέχει το δεύτερο αντίσωμα Goat anti-Mouse σε συγκέντρωση 1:500. Έτσι, από τη στιγμή που τοποθετήθηκε το δεύτερο αντίσωμα όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν στο σκοτάδι, διότι είναι φωτοευαίσθητο.

Παράλληλα έγινε και η παρασκευή του διαλύματος **Fluorecent Mounting Medium**.

Έπειτα πήραμε 2ml από το τελικό διάλυμα, προστέθηκε dH₂O μέχρι τα 10ml και το pH ρυθμίστηκε στο 8,5. (**40 mM Phosphate buffer, pH 8,5**).

Για την κατασκευή **5ml Buffered Glycerol with Anti-fade & DAPI** χρησιμοποιήθηκαν:

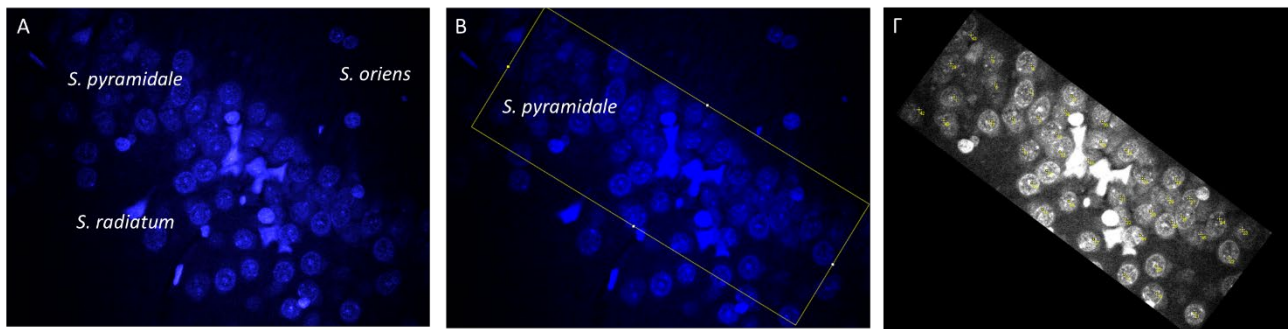
- 2,5ml 40 mM Phosphate buffer pH 8,5
- 0,005g p-Phenylenediamine HCL
- 5,55μL 10mg/ml DAPI
- 2,5ml Glycerol

Ακολούθως, μόλις τελειώσει η επώαση, αφαιρείται το διάλυμα δεύτερου αντισώματος και πραγματοποιούνται 3 πλύσεις των 15 λεπτών με 0,1M PBS στους 4°C. Στη συνέχεια, οι ιστοί επωάζονται με 40μM DAPI (4',6-διαμιδινο2-φαινυλινδόλη) και κλείνουμε το κάθε πλακάκι με καλυπτρίδα με λυγισμένη βελόνα, αφήνωντάς τη αργά και σταθερά τραβώντας τη προς τα έξω με προσοχή έτσι ώστε να μην έχουμε φυσαλίδες. Έγινε αποθήκευση των πλακακιών σε κουτάκια σε οριζόντια θέση για να απλωθεί καλά το DAPI στο Cold room (4°C). Μετά από δύο ημέρες βάζουμε διάφανο μανό για να σφραγίσουμε την καλυπτρίδα με το πλακάκι και τα αποθηκεύουμε ξανά στο Cold room (4°C) μέχρι την παρατήρηση και φωτογράφησή τους.

Η παρατήρηση των ιστών έγινε σε μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss Axioskop 40 (Carl Zeiss Inc, New York, USA) το οποίο ήταν συνδεδεμένο με κάμερα Leica DFC 480 (Leica Cameras, Solms, Germany). Οι φωτογραφίες λήφθηκαν σε μεγέθυνση 40x.

3. Ανάλυση εικόνας

Η ανάλυση των φωτογραφιών από το Μικροσκόπιο Φθορισμού, αφορούσε την ανάλυση και την μέτρηση των κυττάρων στην CA1 περιοχή του υποκάμπου. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα ImageJ.



Εικόνα 6: Ανάλυση εικόνα – Μέτρηση αριθμού κυττάρων

Συγκεκριμένα, αρχικά διαχωρίστηκαν τα χρώματα της αρχικής εικόνας (Image>Color>Split channels,) και επιλέχθηκε η εικόνα με το μπλε κανάλι (Εικόνα 6Α). Κατόπιν με τη βοήθεια του *Rotated Rectangle* έγινε επιλογή της επιθυμητής περιοχής (Εικόνα 6Β). Στη συνέχεια, πατήθηκε Ctrl+ t και έπειτα Ctrl + m. Στο παράθυρο που εμφανίζεται μας ενδιαφέρει η τιμή της Area. Ακολούθως, αφού επιλέχθηκαν οι επιθυμητές διαστάσεις, έγινε καταμέτρηση των κυττάρων με το εργαλείο πολλαπλών σημείων (Εικόνα 6Γ). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε **κύτταρα/μm²**.

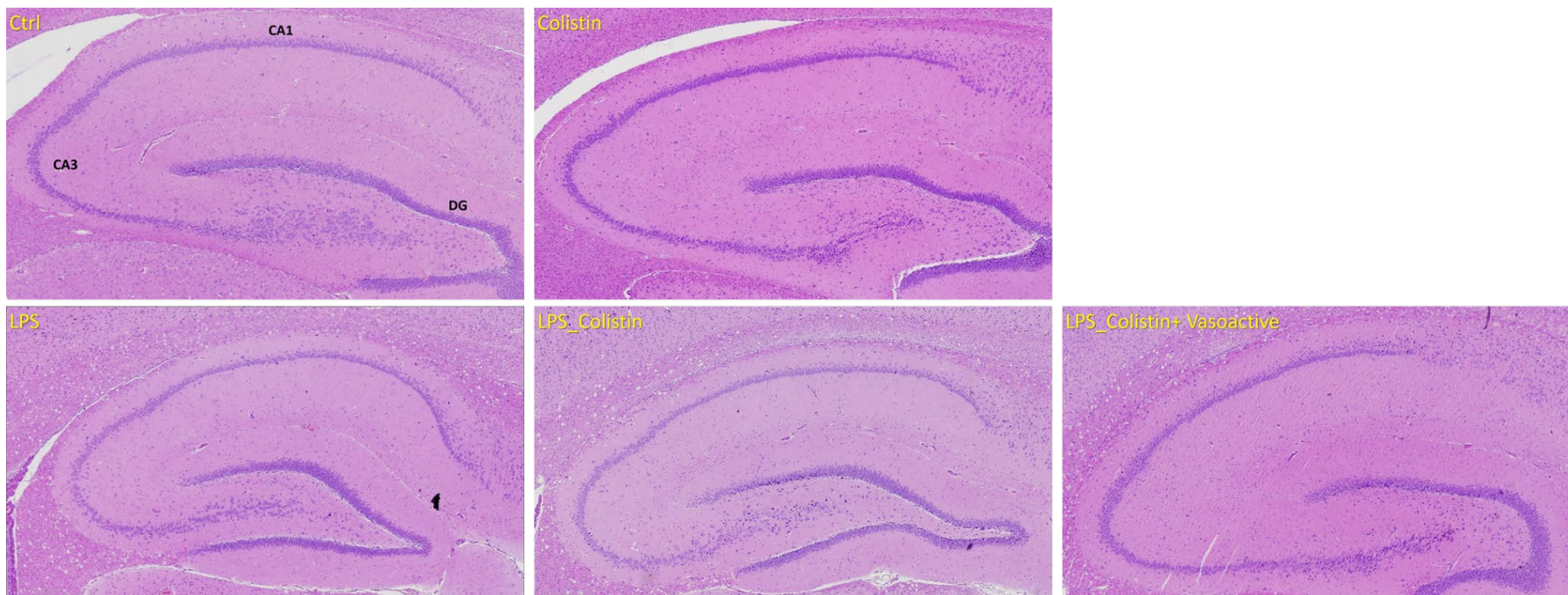
4. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με t-test με τη βοήθεια του προγράμματος Excel. Τιμές $p < 0.05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Επίδραση της χορήγησης κολιστίνης και κολιστίνης/AVP/NA στον ιππόκαμπο σηπτικών και μη ζώων

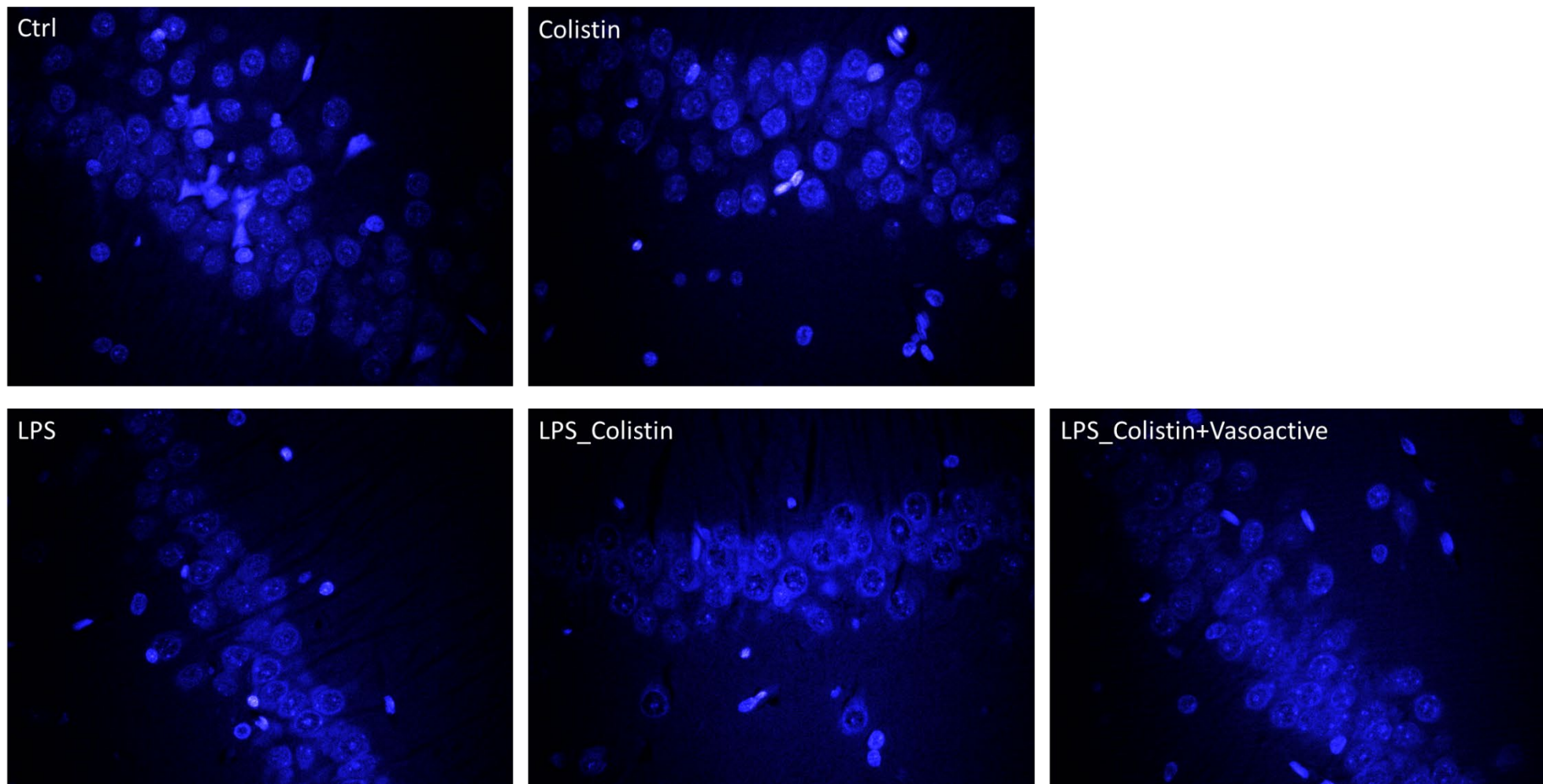
Στην παρακάτω εικόνα (*Εικόνα 7*) βλέπουμε την περιοχή του ιπποκάμπου φυσιολογικού επίμυος μετά από χρώση εωσίνης & αιματοξυλίνης, όπου διακρίνουμε τα CA1 και CA3 πεδία του αμμονίου κέρατος καθώς επίσης και την οδοντωτή έλικα (DG). Χορήγηση κολιστίνης στον εγκέφαλο των φυσιολογικών ζώων δεν φάνηκε να έχει κάποια επίδραση, σε αντίθεση με την ενδοπεριτονιακή χορήγηση LPS ο οποίος φαίνεται να επιδρά στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και συγκεκριμένα στον ιππόκαμπο καθώς παρατηρήθηκε αλλοίωση της δομής του ιστού ιδιαίτερα στο CA3 πεδίο. Επιπρόσθετα, η χορήγηση κολιστίνης στα ζώα τα οποία είχαν εκτεθεί σε LPS φαίνεται να αναιρεί την νευροεκφυλιστική δράση του LPS. Αντίστοιχα αποτελέσματα είχαμε και όταν έγινε συνδυαστική χορήγηση κολιστίνης και αγγειοσυσπαστικών φαρμάκων.



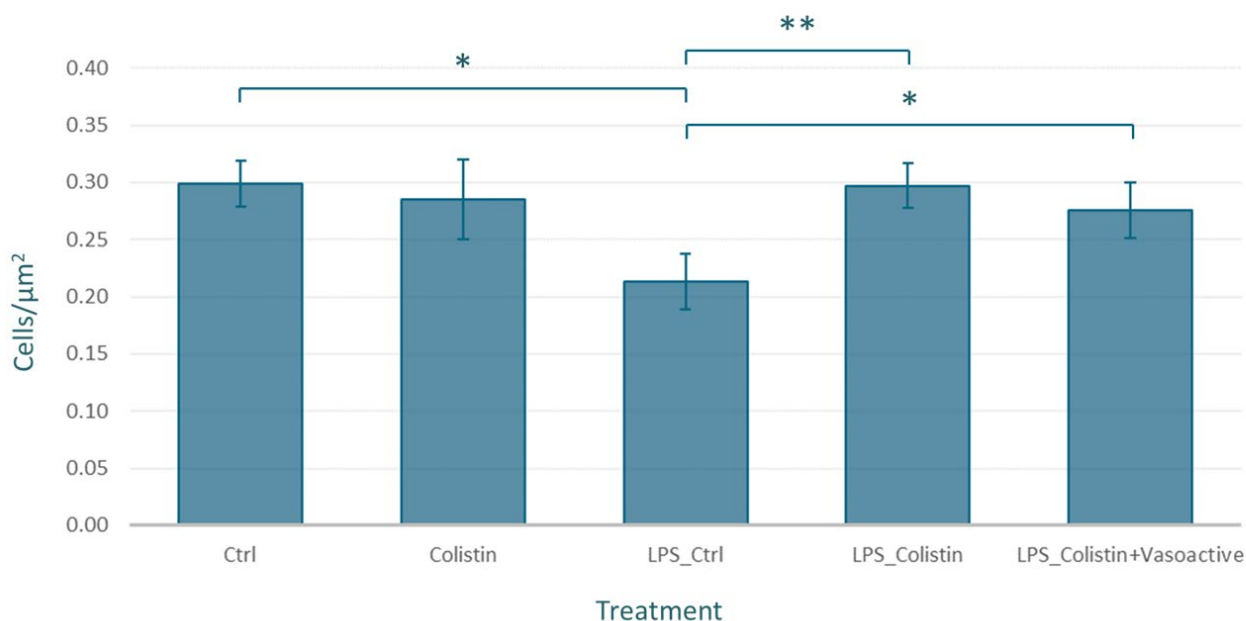
Εικόνα 7. Ιππόκαμπος σηπτικών και μη ζώων με χρώση Εωσίνης – Αιματοξυλίνης. Συντμήσεις: CA1, 3 πεδία αμμωνίου κέρατος, DG οδοντωτή έλικα, LPS: Αλλοίωση δομής στο CA3 πεδίο, Vasoactive: Παρόμοια αποτελέσματα με χορήγηση μόνο κολιστίνης

2. Επίδραση της χορήγησης κολιστίνης και κολιστίνης/AVP/NA στον αριθμό των πυραμιδικών κυττάρων της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου σπηπτικών και μη ζώων

Δυστυχώς, ενώ κάναμε ανοσοϊστοχημικές χρώσεις για την ανίχνευση της όξινης πρωτεΐνης των ενδιάμεσων ινιδίων της γλοίας (GFAP), η οποία σημάνει τα αστροκύτταρα και αποτελεί δείκτη της ενεργοποίησής τους, τα αποτελέσματα μας δεν ήταν καλά, ωστόσο είχαμε την δυνατότητα να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα των χρώσεων H&E σε ότι αφορά την πιθανή νευροπροστατευτική δράση της κολιστίνης. Για τον λόγο αυτό εστιαστήκαμε στην CA1 περιοχή του ιπποκάμπου και συγκεκριμένα στην στοιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων, η οποία αποτελείται κατά κόρον από νευρικά κύτταρα και διαπιστώσαμε πως στην ομάδα LPS τα κύτταρα είναι σημαντικά λιγότερα σε σύγκριση με τα κύτταρα στην ομάδα ελέγχου ενώ η χορήγηση κολιστίνης παρουσία LPS είχε θετικά αποτελέσματα (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Πυραμιδικά κύτταρα της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου σηπτικών και μη ζώων με χρώση DAPI



Σχήμα 1: Σύγκριση αριθμού κυττάρων στην περιοχή CA1 του υποκάμπου σε επίμυες

Στο παραπάνω διάγραμμα (Σχήμα 1) γίνεται η σύγκριση του αριθμού των κυττάρων στην περιοχή CA1 του υποκάμπου αρχικά των δειγμάτων της ομάδας ελέγχου (**Ctrl**) με την ομάδα που υπέστη σήψη με LPS (**LPS_Ctrl**), έπειτα σύγκριση της ομάδας που υπέστη σήψη με LPS (**LPS_Ctrl**) με την ομάδα που έλαβε μόνο κολιστίνη μετά την επαγωγή σήψης με LPS (**LPS_Colistin**), και τέλος, σύγκριση της ομάδας που υπέστη σήψη με LPS (**LPS_Ctrl**) με την ομάδα που έλαβε συνδυαστικά κολιστίνη και αγγειοσυσπαστικά φάρμακα μετά την επαγωγή σήψης με LPS (**LPS_Colistin+Vasoactive**). Παρατηρούμε πως υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στον αριθμό των κυττάρων μεταξύ των ομάδων ελέγχου και LPS, με τα κύτταρα στην ομάδα LPS να είναι στατιστικώς σημαντικά λιγότερα. Η χορήγηση της κολιστίνης απέτρεψε την νευροεκφυλιστική δράση του LPS, ενώ, η συνδυαστική χορήγηση κολιστίνης και αγγειοσυσπαστικών δεν έδειξε κάποια αξιοσημείωτη διαφορά σε σύγκριση με την χορήγηση μόνο κολιστίνης στα σηπτικά ζώα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η βακτηριακή μικροβιακή αντοχή έχει αναδειχθεί σε μια από τις σημαντικότερες απειλές για τη δημόσια υγεία του 21^{ου} αιώνα, όπως προκύπτει από τους 4,95 εκατομμύρια θανάτους ετησίως που συνδέονται με αυτήν. Η αντοχή αυτή, έχει καταγραφεί τόσο σε θετικά όσο και σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια, γεγονός που οδηγεί σε αυξανόμενη ανάγκη για την ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών και την αποτελεσματικότερη κατανομή των υφιστάμενων φαρμάκων. Η ανάγκη για αποτελεσματικούς συνδυασμούς φαρμάκων είναι, περισσότερο από ποτέ, επιτακτική, ώστε να αποτραπεί η εξάπλωση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά και σε άλλα βακτηριακά είδη. Η κολιστίνη, αποτελώντας ένα αντιβιοτικό της τάξης της πολυμυξίνης Β, χρησιμοποιείται επί του παρόντος ως η μόνη εναλλακτική θεραπευτική λύση σε σοβαρές λοιμώξεις που προκαλούνται από πολυανθεκτικούς Gram αρνητικούς μικροοργανισμούς στις μονάδες εντατικής θεραπείας. Ωστόσο, η χορήγηση κολιστίνης συνοδεύεται από ορισμένες παρενέργειες που μπορεί να παρουσιαστούν τόσο κατά τη βραχυπρόθεσμη όσο και κατά τη μακροπρόθεσμη χορήγησή της για αυτό τον λόγο απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την πλήρη κατανόηση του μηχανισμού δράσης της και τον προσδιορισμό των πιθανών κλινικών επιπτώσεων της χορήγησής της στους βαρέως πάσχοντες ασθενείς στις μονάδες εντατικής θεραπείας (Stamatiou και συν., 2023).

Σε μια προσπάθεια προσομοίωσης των φαρμακολογικών παρεμβάσεων που γίνονται στις μονάδες εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ) μετά τον εντοπισμό βακτηριακής λοίμωξης σε ασθενείς, χορηγήσαμε για 10 ημέρες κολιστίνη σε αρουραίους παρουσία ή απουσία αγγειοσυσπαστικών ουσιών (νορεπινεφρίνη και βαζοπρεσίνη), σε δόσεις αντίστοιχες με αυτές που χρησιμοποιούνται στις ΜΕΘ, πέντε ημέρες μετά την πρόκληση σήψης με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση LPS από το βακτήριο *Escherichia coli*. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση κολιστίνης (150.000U=12mg/kg/ημέρα) υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν έχει καμία επίδραση στην ιστοπαθολογία του υποκάμπου πιθανά γιατί είναι μία μεγάλου μοριακού βάρους ουσία η οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν περνάει τον ΑΕΦ. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες οι οποίες έχουν δείξει πως η χορήγηση κολιστίνης υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν επηρεάζει την ακεραιότητα του ΑΕΦ (Wang και συν., 2016). Συγκεκριμένα, σύμφωνα με αυτή τη μελέτη ενδοφλέβια χορήγηση 15mg/kg/ημέρα θειικής κολιστίνης σε ποντίκια δεν φάνηκε να επηρεάζει την ακεραιότητα του ΑΕΦ, όπως αυτή μετρήθηκε με την αδυναμία εισχώρησης της χρωστικής Evans blue στον εγκέφαλο και τη διατήρηση σε σταθερά επίπεδα της κλαουδίνης-5² (Wang και συν., 2016). Χορήγηση πολλαπλών δόσεων κολιστίνης από τους ίδιους ερευνητές για 7 ημέρες

² Η κλαουδίνη-5 αποτελεί βασικό συστατικό των στενών συνδέσεων των ενδοθηλιακών κυττάρων οι οποίες ως γνωστό συμβάλλουν στην διατήρηση της ακεραιότητας του ΑΕΦ.

δεν οδήγησαν στη συσσώρευση του φαρμάκου στο εγκεφαλικό παρέγχυμα (Wang J και συν., 2016) ενώ αντίστοιχες μελέτες στο εργαστήριο έχουν δείξει ότι η κολιστίνη στην συγκέντρωση των 12mg/kg/ημέρα και για το χρονικό διάστημα στο οποίο δόθηκε στο δικό μας πείραμα (10 ημέρες) δεν ανιχνεύεται σε εγκεφαλικά παρασκευάσματα (ELISA, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Επιλέξαμε να μελετήσουμε τη ρήξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού στο επίπεδο του υποκάμπου γιατί ο υποκάμπος είναι μια περιοχή ζωτικής σημασίας για τη μνήμη και τη μάθηση και βλάβες σε αυτήν την περιοχή μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά τις γνωσιακές ικανότητες και τη συμπεριφορά ενός ατόμου. Επιπρόσθετα, πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός στην περιοχή του υποκάμπου μπορεί να είναι πιο αδύναμος και πιο επιρρεπής σε διάφορες προσβολές έναντι άλλων εγκεφαλικών περιοχών (Davidson & Stevenson, 2024). Η ενδοπεριτονιακή χορήγηση λιποπολυσακχαρίτη LPS φαίνεται να έχει επίδραση στον ΑΕΦ στο επίπεδο του υποκάμπου καθώς διαπιστώσαμε αλλοίωση της δομής του ιστού ιδιαίτερα στο CA3 πεδίο και μείωση του αριθμού των κυττάρων στην πυραμιδική στοιβάδα της CA1 περιοχής. Μελέτες έχουν δείξει πως ο LPS προκαλεί μία σειρά κυτταρικών αποκρίσεων στο επίπεδο του ΑΕΦ (Peng και συν., 2021). Για παράδειγμα, στα ενδοθηλιακά κύτταρα ο LPS μειώνει την δραστηριότητα της π-γλυκοπρωτεΐνης (P-gr) με την σύνδεσή του στον υποδοχέα TLR-4. Η P-gr είναι ένας σημαντικός μεταφορέας εκροής ποικίλων ουσιών όπως ξενοβιοτικά και ενδογενής ουσίες. Η μειωμένη έκφραση και δραστηριότητα της P-gr μπορεί να προκαλέσει συσσώρευση τοξικών μεταβολιτών στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Ο LPS αυξάνει επίσης τα επίπεδα των ελεύθερων ριζών (ROS) μέσα στα κύτταρα, αναστέλλοντας την έκφραση της καταλάσης και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, προκαλεί απόπτωση αυξάνοντας την δραστηριότητα της κασπάσης 3 και ενισχύει την διαπερατότητα του ΑΕΦ είτε μειώνοντας την έκφραση των στενών συνδέσεων, επάγοντας την έκκριση για παράδειγμα της πρωτεΐνης SPARC, είτε ενεργοποιώντας τον πυρηνικό παράγοντα NF-κΒ, ο οποίος με τη σειρά του επάγει την σύνθεση πρωτεϊνών που καταστρέφουν τις στενές συνδέσεις με αποτέλεσμα να χαλαρώνει η σύνδεση μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων (Peng και συν., 2021).

Η χορήγηση κολιστίνης στα ζώα τα οποία είχαν εκτεθεί σε LPS φαίνεται να αναιρεί τη νευροεκφυλιστική δράση του LPS. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η κολιστίνη απέτρεψε την αλλοίωση της δομής του υποκάμπου ιδιαίτερα στο CA3 πεδίο και ανέρεσε τη μείωση του αριθμού των κυττάρων στην πυραμιδική στοιβάδα της CA1 περιοχής που προκαλεί η χορήγηση LPS. Τη δυνατότητα της κολιστίνης να περνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό σε περίπτωση διαταραχής του καθώς επίσης και την πιθανή ευεργετική της επίδραση σε αυτόν καταδεικνύει η μελέτη του Jin και των συνεργατών του (2013). Συγκεκριμένα, σύμφωνα με αυτή τη μελέτη η συγχορήγηση θεραπευτικών συγκεντρώσεων κολιστίνης με LPS από το βακτηρίου *Salmonella enterica* ανέστειλε την επαγόμενη από το LPS μείωση της έκφρασης της claudin-5 σε καλλιέργειες ανθρώπινων

ενδοθηλιακών κυττάρων εγκεφαλικών τριχοειδών αγγείων (hCMEC/D3) και τη διαταραχή στη λειτουργία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού σε ποντίκια (*Jin και συν., 2013*). Επιπλέον, η κολιστίνη έχει πιθανά τη δυνατότητα να εμφανίζει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες αναστέλλοντας την επαγόμενη από τον LPS παραγωγή της IL-8 σε κυτταροκαλλιέργειες ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων αεραγωγών που προέρχεται από τον πνεύμονα ενός 14χρονου ασθενούς με κυστική ίνωση (*CuFi-1 κύτταρα, Sheikh και συν., 2022*). Εντούτοις, αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ακριβώς το αντίθετο, δηλαδή ότι η κολιστίνη δρα νευροτοξικά. Άλλωστε, ο λόγος για τον οποίο πραγματοποιήθηκε η συγκεκριμένη μελέτη ήταν ακριβώς το γεγονός ότι στην κλινική πράξη είναι δυνατό να παρατηρηθεί νευροτοξικότητα μετά τη χορήγηση κολιστίνης (*Nigam και συν., 2015*).

Εκτός από τον μηχανισμό της άμεσης βακτηριοκτόνου δράσης της κολιστίνης (*Zeiler και συν., 2020*) οι μηχανισμοί μέσω των οποίων η κολιστίνη προκαλεί την όποια νευροπροστατευτική, νευροτοξική, φλεγμονώδη ή και αντιφλεγμονώδη δράση δεν έχουν για την ώρα διευκρινιστεί. Η δράση της στο νευρικό σύστημα μπορεί να σχετίζεται με την αλληλεπίδραση της με την ακετυλοχολινεστεράση (*Ajiboye, 2018, Stamatiou και συν., 2023a*) ή τις καθεψίνες (*πρόσφατες in silico μελέτες του εργαστηρίου μας*). Τα ένζυμα αυτά είναι γνωστό ότι σχετίζονται με νευροεκφυλιστικές ασθένειες (*Ajiboye, 2018, Hook και συν., 2020*) και ίσως η συγκέντρωση της κολιστίνης στο σημείο δράσης της να παίζει καθοριστικό ρόλο στο νευροπροστατευτική ή νευροεκφυλιστική της δράση.

Η παρούσα πτυχιακή επιβεβαιώνει και επεκτείνει τα ευρήματα προηγούμενων ερευνών που έχουν δείξει ότι η σήψη μπορεί να επηρεάσει την ακεραιότητα του ΑΕΦ. Ωστόσο, η προσθήκη της κολιστίνης και η εξέταση της συγκεκριμένης περιοχής (CA1) προσθέτει μια νέα διάσταση στην κατανόηση της θεραπείας της σήψης. Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου έχουν επίσης συμβάλει στην κατανόηση των επιπτώσεων της θεραπείας με κολιστίνη στην ανάπτυξη μυοπάθειας και εμφυσήματος στους πνεύμονες σηπτικών και μη αρουραίων Wistar γεγονός που υποδηλώνει την πολυπλοκότητα στη δράση της κολιστίνης (*Stamatiou και συν., 2023a, Stamatiou και συν., 2023b*). Οι μηχανισμοί δράσης της κολιστίνης στο ΑΕΦ χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης μέσω μοριακών και βιοχημικών αναλύσεων. Μελλοντικές μελέτες θα πρέπει να επικεντρωθούν στη διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στη ρήξη του ΑΕΦ και τους μοριακούς στόχους της κολιστίνης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ajiboye T. O. (2018). Colistin sulphate induced neurotoxicity: Studies on cholinergic, monoaminergic, purinergic and oxidative stress biomarkers. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 103, 1701-1707. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.189>
- Annane, D., & Sharshar, T. (2015). Cognitive decline after sepsis. *The Lancet. Respiratory medicine*, 3(1), 61-69. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70246-2](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70246-2)
- Avendaño-Ortiz, J., Ponce-Alonso, M., Llanos-González, E., Barragán-Prada, H., Barbero-Herranz, R., Lozano-Rodríguez, R., Márquez-Garrido, F. J., Hernández-Pérez, J. M., Morosini, M. I., Cantón, R., Del Campo, R., & López-Collazo, E. (2023). The Impact of Colistin Resistance on the Activation of Innate Immunity by Lipopolysaccharide Modification. *Infection and immunity*, 91(2), e0001223. <https://doi.org/10.1128/iai.00012-23>
- Barichello, T., Generoso, J. S., Silvestre, C., Costa, C. S., Carrodore, M. M., Cipriano, A. L., Michelon, C. M., Petronilho, F., Dal-Pizzol, F., Vilela, M. C., & Teixeira, A. L. (2012). Circulating concentrations, cerebral output of the CINC-1 and blood–brain barrier disruption in Wistar rats after pneumococcal meningitis induction. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 31(8), 2005-2009. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1533-2>
- Batista, C. R. A., Gomes, G. F., Candelario-Jalil, E., Fiebich, B. L., & de Oliveira, A. C. P. (2019). Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation as a Bridge to Understand Neurodegeneration. *International journal of molecular sciences*, 20(9), 2293. <https://doi.org/10.3390/ijms20092293>
- Begley, D. J., & Brightman, M. W. (2003). Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Progress in drug research. Fortschritte der Arzneimittelforschung. Progres des recherches pharmaceutiques*, 61, 39–78. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8049-7_2
- Cabezas, R., Ávila, M., Gonzalez, J., El-Bachá, R. S., Báez, E., García-Segura, L. M., Jurado Coronel, J. C., Capani, F., Cardona-Gomez, G. P., & Barreto, G. E. (2014). Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 211. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00211>
- CDC. Data & Reports. (2020) Sepsis, CDC, [cdc.gov/sepsis/index.html](https://www.cdc.gov/sepsis/index.html)
- Comim, C. M., Vilela, M. C., Constantino, L. S., Petronilho, F., Vuolo, F., Lacerda-Queiroz, N., Rodrigues, D. H., da Rocha, J. L., Teixeira, A. L., Quevedo, J., & Dal-Pizzol, F. (2011). Traffic of leukocytes and cytokine up-regulation in the central nervous system in sepsis. *Intensive care medicine*, 37(4), 711-718. <https://doi.org/10.1007/s00134-011-2151-2>
- Cunningham, S., Prasad, A., Collyer, L., Carr, S., Lynn, I. B., & Wallis, C. (2001). Bronchoconstriction following nebulised colistin in cystic fibrosis. *Archives of disease in childhood*, 84(5), 432-433. <https://doi.org/10.1136/adc.84.5.432>
- Dai, C., Xiao, X., Li, J., Ciccotosto, G. D., Cappai, R., Tang, S., Schneider-Futschik, E. K., Hoyer, D., Velkov, T., & Shen, J. (2019). Molecular Mechanisms of Neurotoxicity Induced by Polymyxins and Chemoprevention. *ACS chemical neuroscience*, 10(1), 120-131. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.8b00300>
- Dal-Pizzol, F., Rojas, H. A., dos Santos, E. M., Vuolo, F., Constantino, L., Feier, G., Pasquali, M., Comim, C. M., Petronilho, F., Gelain, D. P., Quevedo, J., Moreira, J. C., & Ritter, C. (2013). Matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 activities are associated with blood-brain barrier

- dysfunction in an animal model of severe sepsis. *Molecular neurobiology*, 48(1), 62-70. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8433-7>
- Danielski, L. G., Giustina, A. D., Badawy, M., Barichello, T., Quevedo, J., Dal-Pizzol, F., & Petronilho, F. (2018). Brain Barrier Breakdown as a Cause and Consequence of Neuroinflammation in Sepsis. *Molecular neurobiology*, 55(2), 1045-1053. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0356-7>
- Davidson, T. L., & Stevenson, R. J. (2024). Vulnerability of the Hippocampus to Insults: Links to Blood-Brain Barrier Dysfunction. *International journal of molecular sciences*, 25(4), 1991. <https://doi.org/10.3390/ijms25041991>
- del Zoppo G. J. (2010). The neurovascular unit, matrix proteases, and innate inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1207, 46-49. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05760.x>
- Deng, I., Corrigan, F., Zhai, G., Zhou, X. F., & Bobrovskaya, L. (2020). Lipopolysaccharide animal models of Parkinson's disease: Recent progress and relevance to clinical disease. *Brain, behavior, & immunity - health*, 4, 100060. <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2020.100060>
- Flierl, M. A., Stahel, P. F., Rittirsch, D., Huber-Lang, M., Niederbichler, A. D., Hoesel, L. M., Touban, B. M., Morgan, S. J., Smith, W. R., Ward, P. A., & Ipaktchi, K. (2009). Inhibition of complement C5a prevents breakdown of the blood-brain barrier and pituitary dysfunction in experimental sepsis. *Critical care (London, England)*, 13(1), R12. <https://doi.org/10.1186/cc7710>
- Garcia-Vello, P., Di Lorenzo, F., Zucchetta, D., Zamyatina, A., De Castro, C., & Molinaro, A. (2022). Lipopolysaccharide lipid A: A promising molecule for new immunity-based therapies and antibiotics. *Pharmacology & therapeutics*, 230, 107970. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107970>
- Gern, O. L., Mulenge, F., Pavlou, A., Ghita, L., Steffen, I., Stangel, M., & Kalinke, U. (2021). Toll-like Receptors in Viral Encephalitis. *Viruses*, 13(10), 2065. <https://doi.org/10.3390/v13102065>
- Griton, M., Dhaya, I., Nicolas, R., Raffard, G., Periot, O., Hiba, B., & Konsman, J. P. (2020). Experimental sepsis-associated encephalopathy is accompanied by altered cerebral blood perfusion and water diffusion and related to changes in cyclooxygenase-2 expression and glial cell morphology but not to blood-brain barrier breakdown. *Brain, behavior, and immunity*, 83, 200-213. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.10.012>
- Hawkins, B. T., & Davis, T. P. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacological reviews*, 57(2), 173-185. <https://doi.org/10.1124/pr.57.2.4>
- Hook, V., Yoon, M., Mosier, C., Ito, G., Podvin, S., Head, B. P., Rissman, R., O'Donoghue, A. J., & Hook, G. (2020). Cathepsin B in neurodegeneration of Alzheimer's disease, traumatic brain injury, and related brain disorders. *Biochimica et biophysica acta. Proteins and proteomics*, 1868(8), 140428. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140428>
- Hughes, C. G., Pandharipande, P. P., Thompson, J. L., Chandrasekhar, R., Ware, L. B., Ely, E. W., & Girard, T. D. (2016). Endothelial Activation and Blood-Brain Barrier Injury as Risk Factors for Delirium in Critically Ill Patients. *Critical care medicine*, 44(9), e809-e817. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000001739>
- Jin, L., Li, J., Nation, R. L., & Nicolazzo, J. A. (2011). Impact of p-glycoprotein inhibition and lipopolysaccharide administration on blood-brain barrier transport of colistin in mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(2), 502-507. <https://doi.org/10.1128/AAC.01273-10>
- Kasiakou, S. K., Michalopoulos, A., Soteriades, E. S., Samonis, G., Sermaides, G. J., & Falagas, M. E. (2005). Combination therapy with intravenous colistin for management of infections due to

- multidrug-resistant Gram-negative bacteria in patients without cystic fibrosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(8), 3136-3146. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.8.3136-3146.2005>
- Kempf, I., Jouy, E., & Chauvin, C. (2016). Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. *International journal of antimicrobial agents*, 48(6), 598-606. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.09.016>
- Leyrolle, Q., Layé, S., & Nadjar, A. (2019). Direct and indirect effects of lipids on microglia function. *Neuroscience letters*, 708, 134348. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134348>
- Li, J., Milne, R. W., Nation, R. L., Turnidge, J. D., & Coulthard, K. (2003). Stability of colistin and colistin methanesulfonate in aqueous media and plasma as determined by high-performance liquid chromatography. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(4), 1364-1370. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.4.1364-1370.2003>
- Liddelw, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Münch, A. E., Chung, W. S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Stevens, B., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541(7638), 481-487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>
- Masciantonio, M. G., Lee, C. K. S., Arpino, V., Mehta, S., & Gill, S. E. (2017). The Balance Between Metalloproteinases and TIMPs: Critical Regulator of Microvascular Endothelial Cell Function in Health and Disease. *Progress in molecular biology and translational science*, 147, 101-131. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.01.001>
- Mikacenic, C., Hahn, W. O., Price, B. L., Harju-Baker, S., Katz, R., Kain, K. C., Himmelfarb, J., Liles, W. C., & Wurfel, M. M. (2015). Biomarkers of Endothelial Activation Are Associated with Poor Outcome in Critical Illness. *PloS one*, 10(10), e0141251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141251>
- Mina, F., Comim, C. M., Dominghini, D., Cassol, O. J., Jr, Dall Igna, D. M., Ferreira, G. K., Silva, M. C., Galant, L. S., Streck, E. L., Quevedo, J., & Dal-Pizzol, F. (2014). IL1- β involvement in cognitive impairment after sepsis. *Molecular neurobiology*, 49(2), 1069-1076. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8581-9>
- Novianti, E., Katsuura, G., Kawamura, N., Asakawa, A., & Inui, A. (2021). Atractylenolide-III suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation via downregulation of toll-like receptor 4 in mouse microglia. *Heliyon*, 7(10), e08269. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08269>
- Patel, J. P., & Frey, B. N. (2015). Disruption in the Blood-Brain Barrier: The Missing Link between Brain and Body Inflammation in Bipolar Disorder?. *Neural plasticity*, 2015, 708306. <https://doi.org/10.1155/2015/708306>
- Peng, X., Luo, Z., He, S., Zhang, L., & Li, Y. (2021). Blood-Brain Barrier Disruption by Lipopolysaccharide and Sepsis-Associated Encephalopathy. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 768108. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.768108>
- Prescott, H. C., Carmichael, A. G., Langa, K. M., Gonzalez, R., & Iwashyna, T. J. (2019). Paths into Sepsis: Trajectories of Presepsis Healthcare Use. *Annals of the American Thoracic Society*, 16(1), 116-123. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201806-391OC>
- Prescott, H. C., Osterholzer, J. J., Langa, K. M., Angus, D. C., & Iwashyna, T. J. (2016). Late mortality after sepsis: propensity matched cohort study. *BMJ (Clinical research ed.)*, 353, i2375. <https://doi.org/10.1136/bmj.i2375>
- Qing-Qing Tao , Rong-Rong Lin , Yi-He Chen , Zhi-Ying Wu. Discerning the Role of Blood Brain Barrier Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Aging and disease*. 2022, 13(5): 1391-1404 <https://doi.org/10.14336/AD.2022.0130-1>

- Reis, P. A., Alexandre, P. C. B., D'Avila, J. C., Siqueira, L. D., Antunes, B., Estado, V., Tibiriça, E. V., Verdonk, F., Sharshar, T., Chrétien, F., Castro-Faria-Neto, H. C., & Bozza, F. A. (2017). Statins prevent cognitive impairment after sepsis by reverting neuroinflammation, and microcirculatory/endothelial dysfunction. *Brain, behavior, and immunity*, 60, 293-303. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.11.006>
- Silva, A. Y. O., Amorim, É. A., Barbosa-Silva, M. C., Lima, M. N., Oliveira, H. A., Granja, M. G., Oliveira, K. S., Fagundes, P. M., Neris, R. L. S., Campos, R. M. P., Moraes, C. A., Vallochi, A. L., Rocco, P. R. M., Bozza, F. A., Castro-Faria-Neto, H. C., & Maron-Gutierrez, T. (2020). Mesenchymal Stromal Cells Protect the Blood-Brain Barrier, Reduce Astroglisis, and Prevent Cognitive and Behavioral Alterations in Surviving Septic Mice. *Critical care medicine*, 48(4), e290-e298. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000004219>
- Skibsted, S., Jones, A. E., Puskarich, M. A., Arnold, R., Sherwin, R., Trzeciak, S., Schuetz, P., Aird, W. C., & Shapiro, N. I. (2013). Biomarkers of endothelial cell activation in early sepsis. *Shock (Augusta, Ga.)*, 39(5), 427-432. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3182903f0d>
- Skrzypczak-Wiercioch, A., & Sałat, K. (2022). Lipopolysaccharide-Induced Model of Neuroinflammation: Mechanisms of Action, Research Application and Future Directions for Its Use. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(17), 5481. <https://doi.org/10.3390/molecules27175481>
- Sofroniew M. V. (2014). Multiple roles for astrocytes as effectors of cytokines and inflammatory mediators. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 20(2), 160-172. <https://doi.org/10.1177/1073858413504466>
- Soker, S., Miao, H. Q., Nomi, M., Takashima, S., & Klagsbrun, M. (2002). VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *Journal of cellular biochemistry*, 85(2), 357-368. <https://doi.org/10.1002/jcb.10140>
- Stamatiou, R., Vasilaki, A., Tzini, D., Deskata, K., Zacharouli, K., Ioannou, M., Sgantzios, M., Zakynthinos, E., & Makris, D. (2023b). Colistin Effects on Emphysematous Lung in an LPS-Sepsis Model. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(12), 1731. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12121731>
- Stamatiou, R., Vasilaki, A., Tzini, D., Tsolaki, V., Zacharouli, K., Ioannou, M., Fotakopoulos, G., Sgantzios, M., & Makris, D. (2023a). Critical-Illness: Combined Effects of Colistin and Vasoactive Drugs: A Pilot Study. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(6), 1057. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12061057>
- Stanimirovic, D. B., & Friedman, A. (2012). Pathophysiology of the neurovascular unit: disease cause or consequence?. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 32(7), 1207-1221. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.25>
- Sudwarts, A., Ramesha, S., Gao, T., Ponnusamy, M., Wang, S., Hansen, M., Kozlova, A., Bitarafan, S., Kumar, P., Beaulieu-Abdelahad, D., Zhang, X., Collier, L., Szekeres, C., Wood, L. B., Duan, J., Thinakaran, G., & Rangaraju, S. (2022). BIN1 is a key regulator of proinflammatory and neurodegeneration-related activation in microglia. *Molecular neurodegeneration*, 17(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s13024-022-00535-x>
- Wang, J., Yi, M., Chen, X., Muhammad, I., Liu, F., Li, R., Li, J., & Li, J. (2016). Effects of colistin on amino acid neurotransmitters and blood-brain barrier in the mouse brain. *Neurotoxicology and teratology*, 55, 32-37. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2016.03.004>
- Ward, N. L., & Lamanna, J. C. (2004). The neurovascular unit and its growth factors: coordinated response in the vascular and nervous systems. *Neurological research*, 26(8), 870-883. <https://doi.org/10.1179/016164104X3798>

- Wu, Y., Li, P., Goodwin, A. J., Cook, J. A., Halushka, P. V., Zingarelli, B., & Fan, H. (2020). miR-145a Regulation of Pericyte Dysfunction in a Murine Model of Sepsis. *The Journal of infectious diseases*, 222(6), 1037-1045. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa184>
- Zeiler, M. J., Melander, R. J., & Melander, C. (2020). Second-Generation Meridianin Analogues Inhibit the Formation of Mycobacterium smegmatis Biofilms and Sensitize Polymyxin-Resistant Gram-Negative Bacteria to Colistin. *ChemMedChem*, 15(17), 1672-1679. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000438>
- Zeng, H., He, X., Tuo, Q. H., Liao, D. F., Zhang, G. Q., & Chen, J. X. (2016). LPS causes pericyte loss and microvascular dysfunction via disruption of Sirt3/angiopoietins/Tie-2 and HIF-2 α /Notch3 pathways. *Scientific reports*, 6, 20931. <https://doi.org/10.1038/srep20931>
- Zhang, R. Y., Zhang, H., Huang, J., Qu, H. P., & Tang, Y. Q. (2014). Angiogenic factors in sepsis: are we ready for the new therapeutic era? *Critical care (London, England)*, 18(1), 403. <https://doi.org/10.1186/cc13710>
- Zhao, J., Bi, W., Xiao, S., Lan, X., Cheng, X., Zhang, J., Lu, D., Wei, W., Wang, Y., Li, H., Fu, Y., & Zhu, L. (2019). Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. *Scientific reports*, 9(1), 5790. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42286-8>