



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Η επίδραση της φλεγμονής στο συναίσθημα και τη μνήμη»

Βαΐα Σγουρή

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Αποστολία Χατζηευθυμίου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας, Επιβλέπουσα
- Άννα Βασιλάκη, Επίκουρος Καθηγήτρια Φαρμακολογίας
- Δημήτριος Μπόγδανος, Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως
μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στις
Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής

Λάρισα, 2025



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS
“The effect of inflammation on emotion and memory”

Vaia Sgouri

Advisory Thesis Committee:

- Apostolia Hatziefthimiou, Associate Professor of Medical Physiology, Supervisor
- Anna Vasilaki, Assistant Professor of Pharmacology
- Dimitrios Bogdanos, Professor of Pathology and Autoimmune Diseases

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in
partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Physiology

Larissa, 2025

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT.....	9
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	10
Αποκρίσεις του οργανισμού σε μολυσματικούς παράγοντες.....	10
Πειραματικά μοντέλα σήψης	12
Μοντέλα σήψης προκαλούμενα με τη χορήγηση LPS.....	12
Η επίδραση του LPS στον εγκέφαλο	13
Παθοφυσιολογία της εγκεφαλοπάθειας της σήψης.....	15
Η επίδραση της συστηματικής χορήγησης LPS στο ΚΝΣ	21
ΣΚΟΠΟΣ.....	23
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	24
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	24
Πειραματόζωα	24
Νευρολογική εξέταση	25
Εκτίμηση της συμπεριφοράς του πειραματόζωου	27
Αξιολόγηση Μνήμης/Γνωστικής Λειτουργίας.....	28
I. Δοκιμασία αναγνώρισης καινούργιου αντικειμένου (NORT)	28
Αξιολόγηση Άγχους	31
I. Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (OFT)	31
II. Δοκιμασία φωτεινού-σκοτεινού πεδίου (LDBT)	32
Αξιολόγηση Καταθλιπτικής Συμπεριφοράς.....	33
I. Δοκιμασία αναγκαστικής κολύμβησης (FST).....	33
Έλεγχος της ακεραιότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού – Ποσοτικός προσδιορισμός της χρωστικής Evans blue σε ομογενοποίηση εγκεφάλου	36
Ιστοπαθολογική εξέταση τομών εγκεφάλου	40
Δημιουργία τομών σε κρυτόμο	40
Χρώση Αιματοξυλίνης/Ηωσίνης (H&E).....	40
Στατιστική ανάλυση	42
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	44
Μεταβολή του βάρους των πειραματόζωων μετά τη χορήγηση LPS	44
Νευρολογική εκτίμηση των πειραματόζωων	45
Αξιολόγηση Μνήμης/Γνωστικής Λειτουργίας.....	47
I. Δοκιμασία αναγνώρισης καινούργιου αντικειμένου (NORT)	47
Αξιολόγηση Άγχους	53
I. Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (OFT)	53
II. Δοκιμασία φωτεινού-σκοτεινού πεδίου (LDBT)	55
Αξιολόγηση Καταθλιπτικής Συμπεριφοράς.....	58
I. Δοκιμασία αναγκαστικής κολύμβησης (FST).....	58
Ποσοτικός προσδιορισμός χρωστικής Evans blue στον εγκεφαλικό ιστό	61
Ιστοπαθολογική εξέταση τομών εγκεφάλου	62
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	67
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	74

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους με στήριξαν καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής μου προσπάθειας και συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Αρχικά, ευχαριστώ από καρδιάς την κα. Χατζηευθυμίου Αποστολία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας του τμήματος Ιατρικής και επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας για την πολύτιμη καθοδήγηση και τη διαρκή υποστήριξη της.

Ευχαριστώ θερμά την κα. Βασιλάκη Άννα, Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας και την κα. Σταματίου Ροδόπη, για τις έμπρακτες και χρήσιμες συμβουλές τους, τον κ. Μπέγα Ηλία, ΕΤΕΠ του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, για την σημαντική συμβολή του στην πραγματοποίηση των πειραμάτων.

Θα ήθελα, επίσης, να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στην κα. Ιωάννου Μαρία, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής και την κα. Ζαχαρούλη Κωνσταντίνα για την πολύτιμη επιστημονική τους υποστήριξη.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην οικογένεια και τους φίλους μου για την αμέριστη συμπαράσταση και στήριξη τους, καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ABCs: ATP-binding cassette transporters, Μεταφορείς κασέτας που συνδέονται με ATP

AJs: Adherens junctions, Συνδέσεις προσκόλλησης

ATP: Adenosine triphosphate, Τριφωσφορική αδενοσίνη

BBB: Blood–brain barrier, Αιματοεγκεφαλικός φραγμός

BCB: Blood–CSF barrier, Φραγμός αίματος-εγκεφαλονωτιαίου υγρού

BSA: Bovine Serum Albumin, Λευκωματίνη ορού βοοειδών

CAM-ICU: Confusion Assessment Method for the ICU, Μέθοδος αξιολόγησης σύγχυσης για τη ΜΕΘ

CART: Cocaine- and amphetamine-regulated transcript, Μεταγράφομα ρυθμιζόμενο από κοκαΐνη και αμφεταμίνη

CD14: Cluster of differentiation 14, Σύμπλεγμα διαφοροποίησης 14

CECs: Circulating endothelial cells, Εγκεφαλικά ενδοθηλιακά κύτταρα

CLP: Cecal ligation and puncture, Εντερική απολίνωση και διάτρηση

CSF: Cerebrospinal fluid, Εγκεφαλονωτιαίο υγρό

CT: Computed tomography, Αξονική τομογραφία

CVOs: Circumventricular organs, Περικοιλιακά όργανα

DG: Dentate gyrus, οδοντωτή έλικα

DR: Discrimination Ratio, Δείκτης διάκρισης

DS: Difference score, Διαφορικό σκορ

EB: Evans blue

EBD: Evans blue dye, Χρωστική Evans blue

ESS: Euthyroid sick syndrome, Σύνδρομο ευθυρεοειδούς ασθενούς

FST: Forced swim test, Δοκιμασία αναγκαστικής κολύμβησης

GCS: Glasgow Coma Scale, Κλίμακα κώματος Γλασκώβης

GH: Growth hormone, Αυξητική ορμόνη

H&E: Hematoxylin and Eosin, Αιματοξυλίνη και Ηωσίνη

HPA axis: Hypothalamic pituitary adrenal axis, Άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων

ICDSC: Intensive Care Delirium Screening Checklist, Λίστα ελέγχου διαλογής παραληρήματος εντατικής θεραπείας

IGF-1: Insulin-like growth factor-1, Ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας-1

IL: Interleukin, Ιντερλευκίνη

IL-1R1: Interleukin-1 Receptor Type 1, Υποδοχέας Ιντερλευκίνης-1 Τύπου 1

iNOS: Inducible nitric oxide synthase, Επαγωγή συνθετάση μονοξειδίου του αζώτου

LC: Locus coeruleus (ceruleus), Υπομέλας τόπος

LDBT: Light-dark box test, Δοκιμασία φωτεινού-σκοτεινού πεδίου

LHA: Lateral hypothalamic area, Πλάγια υποθαλαμική περιοχή

LPS: Lipopolysaccharide, Λιποπολυσακχαρίτης

MCH: Melanin-concentrating hormone, Ορμόνη συγκέντρωσης μελανίνης

MEWS: Modified Early Warning Score, Τροποποιημένη βαθμολόγηση έγκαιρης προειδοποίησης

MMPs: Matrix metalloproteinases, Μεταλλοπρωτεϊνάσες

MoCA: Montreal Cognitive Assessment, Γνωστική αξιολόγηση του Μόντρεαλ

MRI: Magnetic resonance imaging, Μαγνητική τομογραφία

Myd88: Myeloid differentiation factor 88, Παράγοντας μυελοειδούς Διαφοροποίησης 88

NEWS: National Early Warning Score, Βαθμολόγηση εθνικής έγκαιρης προειδοποίησης

NF-κB: Nuclear factor κB, Πυρηνικός παράγοντας κB

NLRs: NOD-like receptors

NORT: Novel object recognition test, Δοκιμασία αναγνώρισης καινούργιου αντικειμένου

NPCs: Neural precursor cells, Νευρικά πρόδρομα κύτταρα

NSE: Neuron-specific enolase, Νευρωνική ειδική ενολάση

NTI: Non-thyroidal illness, Μη θυρεοειδική νόσος

NTS: Nucleus tractus solitarius, Πυρήνας μονήρους δεσμίδας

NVU: Neurovascular unit, Νευροαγγειακή μονάδα

OD: Optical density, Οπτική πυκνότητα

OFT: Open field test, Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου

PAMPs: Pathogen-Associated Molecular Patterns, Μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με παθογόνα

PFC: Prefrontal cortex, προμετωπιαίος φλοιός

P-gp: P-glycoprotein, P-γλυκοπρωτεΐνη

POMC: Proopiomelanocortin, Προοπιομελανοκορτίνη

PRRs: Pattern Recognition Receptors, Υποδοχείς αναγνώρισης μοτίβων

RAGE: Receptor for advanced glycation end products, Υποδοχέας τελικών προϊόντων προηγμένης γλυκοζυλίωσης

RI: Recognition Index, Δείκτης αναγνώρισης

ROS: Reactive oxygen species, Αντιδραστικές μορφές οξυγόνου

S100β: S100 calcium-binding protein B, S100 πρωτεΐνη δέσμησης ασβεστίου B

SAD: Sepsis-associated delirium, Παραλήρημα που σχετίζεται με σήψη

SAE: Sepsis-associated encephalopathy, Εγκεφαλοπάθεια που σχετίζεται με σήψη

SIRS: Systemic inflammatory response syndrome, Σύνδρομο συστημικής φλεγμονώδους απόκρισης

SOFA: Sepsis-related Organ Failure Assessment, Εκτίμηση οργανικής ανεπάρκειας σχετιζόμενης με σήψη

T3: Triiodothyronine, Τριωδοθυρονίνη

T4: Thyroxine, Θυροξίνη

TCA: Trichloroacetic acid, Τριχλωροξικό οξύ

TGF- β : Transforming growth factor-b, Μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας- β

TJs: Tight junctions, Στενές συνδέσεις

TLR-4: Toll like receptor-4, Υποδοχέας τύπου Toll-4

TLRs: Toll-like receptors, Υποδοχείς τύπου Toll

TNF- α : Tumour Necrosis Factor- α , Παράγοντας νέκρωσης όγκου- α

HEG: Ηλεκτροεγκεφαλογράφημα

ΚΝΣ: Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

ΜΕΘ: Μονάδα εντατικής θεραπείας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εγκεφαλοπάθεια που σχετίζεται με σήψη (Sepsis associated encephalopathy – SAE) είναι ένα σοβαρό νευρολογικό σύνδρομο, που χαρακτηρίζεται από διάχυτη εγκεφαλική δυσλειτουργία και αποτελεί την πιο συχνή αιτία εγκεφαλοπάθειας στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) παγκοσμίως. Υπολογίζεται ότι περισσότερο από το 50% των ασθενών με σήψη εμφανίζουν SAE και ενδέχεται να εκδηλώνουν επίμονες σωματικές, γνωστικές και ψυχολογικές διαταραχές ακόμα κι έπειτα από την έξοδο από την ΜΕΘ. Η παθοφυσιολογία και οι υποκείμενοι μοριακοί μηχανισμοί της SAE δεν είναι ακόμα πλήρως αποσαφηνισμένοι. Η πολυπαραγοντικότητα της αιτιολογίας, η έλλειψη στοχευμένης φαρμακολογικής θεραπευτικής αντιμετώπισης και η υψηλή συχνότητα εμφάνισης της SAE καθιστούν αναγκαία την διερεύνηση της πιθανής χρήσης ενός πρότυπου ζωικού μοντέλου σήψης ως μοντέλο SAE. Στο πλαίσιο αυτό, η συγκεκριμένη εργασία εξετάζει την απώτερη επίδραση της σήψης στη συμπεριφορά των πειραματοζώων και στη δομή του εγκεφάλου, σε συγκριτική μελέτη με τη φλεγμονή. Ενήλικοι αρουραίοι Wistar χωρίστηκαν σε τρεις πειραματικές ομάδες: μια ομάδα ελέγχου και δύο ομάδες που έλαβαν ενδοπεριτοναϊκά 0.25mg/kg LPS για την πρόκληση ήπιας φλεγμονώδους αντίδρασης ή 2.5mg/kg LPS για την πρόκληση σήψης. Τα ζώα υποβλήθηκαν για ένα μήνα σε επαναλαμβανόμενες νευρολογικές αξιολογήσεις και σε συμπεριφορικές δοκιμασίες: αναγνώρισης καινούργιου αντικειμένου (Novel object recognition test – NORT), ανοιχτού πεδίου (Open field test – OFT), φωτεινού/σκοτεινού πεδίου (Light-dark box test – LDBT) και αναγκαστικής κολύμβησης (Forced swim test – FST). Μετά από 35 μέρες τα ζώα θανατώθηκαν, ελέγχθηκε η ακεραιότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (BBB) με τη χρήση χρωστικής Evans Blue και εξετάστηκαν ιστολογικά οι οβελιαίες τομές του εγκεφάλου μετά από χρώση ηωσίνης/αιματοξυλίνης. Η ομάδα επαγόμενης κατάστασης σήψης εμφάνισε συμπεριφορά ασθενείας (sickness behavior) με εκδηλώσεις νοητικής έκπτωσης και έντονου άγχους, διαταραχή του BBB, ισχαιμικές και αιμορραγικές εγκεφαλικές βλάβες, δομικές αλλοιώσεις χαρακτηριστικές της SAE, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Από την άλλη, η ομάδα ήπιας φλεγμονώδους απόκρισης παρουσίασε νευρολογικά ελλείμματα και ένα διαφορετικό συμπεριφορικό φαινότυπο άγχους και καταθλιπτικής συμπεριφοράς, αντιπροσωπεύοντας μία ενδιάμεση κατάσταση μεταξύ των άλλων ομάδων, χωρίς τη παρουσία μόνιμων παθολογικών βλαβών.

Λέξεις-κλειδιά: Εγκεφαλοπάθεια που σχετίζεται με σήψη, LPS, αιματοεγκεφαλικός φραγμός, συμπεριφορά ασθενείας

ABSTRACT

Sepsis-associated encephalopathy (SAE) is a severe neurological syndrome characterized by diffuse brain dysfunction and represents the most common cause of encephalopathy in Intensive Care Units (ICUs) worldwide. More than 50% of septic patients are estimated to develop SAE and may present with persistent physical, cognitive, and psychological impairments even after ICU discharge. The pathophysiology and molecular mechanisms underlying SAE are not yet fully understood. The multifactorial etiology, the lack of targeted pharmacological treatments, and its high incidence highlight the need to investigate the potential use of a standard animal model of sepsis as a model for SAE. In this context, the present study examines the long-term effects of sepsis on animal behavior and brain structure, in a comparative analysis with inflammation. Adult Wistar rats were divided into three experimental groups: a control group and groups administered intraperitoneally with either 0.25mg/kg LPS to induce a mild inflammatory response or 2.5mg/kg LPS to induce sepsis. Over the course of one month, the animals were subjected to repeated neurological assessments and behavioral tests: Novel object recognition test (NORT), Open field test (OFT), Light-dark box test (LDBT), and Forced swim test (FST). After 35 days, the animals were sacrificed, the integrity of the blood-brain barrier (BBB) was evaluated using Evans Blue dye, and sagittal sections of the brain were examined histologically after eosin/hematoxylin staining. The sepsis-induced group displayed sickness behavior with manifestations of cognitive decline and severe anxiety, BBB disruption, ischemic and hemorrhagic brain lesions, and structural alterations characteristic of SAE, compared to the control group. On the other hand, the mild inflammatory response group presented neurological deficits and a different behavioral phenotype of anxiety and depressive behavior, representing an intermediate state between the other groups, without the presence of permanent pathological lesions.

Keywords: Sepsis-associated encephalopathy, LPS, blood–brain barrier, sickness behavior

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Αποκρίσεις του οργανισμού σε μολυσματικούς παράγοντες

Η φλεγμονή συνιστά μία φυσική ανοσολογική απόκριση έναντι μίας μόλυνσης, η οποία μπορεί να προκληθεί από παθογόνους παράγοντες, ιστικές βλάβες και ανοσολογικές αντιδράσεις. Σε απάντηση προς μία μόλυνση, κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος στρατολογούνται στο σημείο της φλεγμονής, με σκοπό τη διατήρηση της ομοιόστασης. Πρόκειται για έναν αυστηρά ελεγχόμενο προστατευτικό μηχανισμό, που υποχωρεί μετά την αποκατάσταση της μόλυνσης (*Sarah, 2023, Nedeva et al, 2019*).

Η σήψη αποτελεί μία, απειλητική για τη ζωή, δυσλειτουργία οργάνων που προκαλείται από μια απορρυθμισμένη απόκριση του ξενιστή στη μόλυνση (*Singer et al, 2016*). Όμοια με τη φλεγμονή, αποτελεί μια σύνθετη φυσιολογική απόκριση του οργανισμού, ωστόσο κατά τη σήψη, η κινητοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος προκαλείται από ένα ερέθισμα πολύ ισχυρότερο σε σχέση με μία τυπική μόλυνση και καθίσταται ανεξέλεγκτη, με αποτέλεσμα την εκτενή φλεγμονή, τη δυσλειτουργία οργάνων και την εδραίωση μιας σοβαρής και δυνητικά θανατηφόρου κατάστασης (*Sarah, 2023; Nedeva et al, 2019*).

Ως διφασική ασθένεια, η σήψη διακρίνεται σε μια αρχική *προφλεγμονώδη* και σε μία *αντιφλεγμονώδη απόκριση*. Κατά τη φλεγμονώδη φάση, η απελευθέρωση ενός καταρράκτη προφλεγμονωδών κυτταροκινών οδηγεί σε ενεργοποίηση του συμπληρώματος και σε διαταραχές της πήξης του αίματος, με τελικό αποτέλεσμα την εκτεταμένη βλάβη των ιστών και την πολυοργανική δυσλειτουργία. Οι ασθενείς που υπερβαίνουν αυτή τη φάση εισέρχονται στη φάση της ανοσοκαταστολής, η οποία χαρακτηρίζεται από απόπτωση B- και T-λεμφοκυττάρων (CD4+ και CD8+) καθώς και δενδριτικών κυττάρων, γεγονός που οδηγεί σε παράλυση του ανοσοποιητικού συστήματος και αυξημένη ευπάθεια σε δευτερογενείς λοιμώξεις. Η ανάρρωση του ασθενούς εξαρτάται από την επίτευξη ομοιοστατικής ισορροπίας μεταξύ της εξεσημασμένης φλεγμονής που προηγείται και της ανοσοκαταστολής που ακολουθεί (*Nedeva et al, 2019*). Το *σηπτικό σοκ* είναι ένα υποσύνολο της σήψης με σημαντικές κυκλοφορικές, κυτταρικές και μεταβολικές ανωμαλίες, οι οποίες συνδέονται με εξαιρετικά υψηλό κίνδυνο θανάτου (*Singer et al, 2016*).

Η *εγκεφαλοπάθεια που σχετίζεται με σήψη* (Sepsis associated encephalopathy – SAE) είναι ένα σοβαρό νευρολογικό σύνδρομο, το οποίο έχει συσχετιστεί μακροπρόθεσμα με σοβαρές νευρολογικές και ψυχιατρικές καταστάσεις όπως νοητική έκπτωση, επιληψία, αναπηρία και κατάθλιψη (*Sonneville et al, 2023*). Αυτή η οργανική εγκεφαλική δυσλειτουργία και επιπλοκή της σήψης μπορεί να αναφέρεται επίσης ως παραλήρημα που σχετίζεται με σήψη (Sepsis-associated

delirium – SAD), όρος που υπογραμμίζει την οξεία και δυνητικά αναστρέψιμη φύση της (*Ebersoldt et al, 2007*).

Πρόκειται για την πιο συχνή αιτία εγκεφαλοπάθειας σε Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) παγκοσμίως και πιστεύεται ότι >50% των ασθενών με σήψη εμφανίζουν εγκεφαλοπάθεια (*Chaudhry & Duggal, 2014*). Ακόμα κι έπειτα από ανάκαμψη της σήψης και έξοδο από την ΜΕΘ, οι ασθενείς εκδηλώνουν ένα ευρύ φάσμα σωματικών, γνωστικών και ψυχικών διαταραχών (*Sonneville et al, 2023*). Η νευρολογική έκπτωση είναι δυνατό να επιμείνει για αρκετούς μήνες μετά από την υποχώρηση του αρχικού επεισοδίου σήψης και η νευροφλεγμονή να εξελιχθεί σε μόνιμο νευρολογικό έλλειμμα, υπονομεύοντας έτσι την αποκατάσταση των ασθενών μετά τη σήψη (*Atterton et al, 2020*).

Για την έγκαιρη ταυτοποίηση και αντιμετώπιση της σήψης έχει καθιερωθεί η χρήση μιας ποικιλίας κλινικών διαγνωστικών μεταβλητών και εργαλείων, όπως τα κριτήρια του συνδρόμου συστημικής φλεγμονώδους απόκρισης (Systemic Inflammatory Response Syndrome – SIRS), η εκτίμηση οργανικής ανεπάρκειας σχετιζόμενης με σήψη (Sequential Organ Failure Assessment – SOFA), η βαθμολόγηση της εθνικής έγκαιρης προειδοποίησης (National Early Warning Score – NEWS) ή τροποποιημένη βαθμολόγηση έγκαιρης προειδοποίησης (Modified Early Warning Score – MEWS) (*Evans et al, 2021*). Τα συμπτώματα της SAE είναι δυνατό να υπάρχουν ήδη πριν την εκπλήρωση των κριτηρίων της σήψης (*Chung et al, 2020*). Ωστόσο, για την SAE δεν έχουν καθοριστεί συγκεκριμένα διαγνωστικά κριτήρια, καθιστώντας δύσκολο τον προσδιορισμό της συχνότητας εμφάνισης της, η οποία κυμαίνεται από 9% έως 71% σε ασθενείς με σοβαρή σήψη ανάλογα με τη μελέτη και τα κριτήρια που χρησιμοποιούνται (*Chaudhry & Duggal, 2014*).

Ελλείπει μιας πρότυπης διαγνωστικής μεθόδου, για τη διάγνωση της SAE ακολουθείται μια πολυπαραγοντική προσέγγιση. Πρώτο βήμα αποτελεί η επιβεβαίωση της σήψης και ο αποκλεισμός άλλων τύπων εγκεφαλοπάθειας (για παράδειγμα λόγω ηπατικής ή νεφρικής ανεπάρκειας). Η πιθανή εμφάνιση του παραληρήματος, ως χαρακτηριστικό σύμπτωμα της SAE, πριν από την οριστική διάγνωση της σήψης, απαιτεί την διαφορική διάγνωση από συχνές αιτίες παραληρήματος, όπως η αναισθησία, η υποξία και οι μεταβολικές διαταραχές (π.χ. ηπατική ή νεφρική εγκεφαλοπάθεια, υπογλυκαιμία, φαρμακογενές παραλήρημα) (*Li et al, 2025*). Στους σηπτικούς ασθενείς, η αξιολόγηση της νοητικής κατάστασης, που αποτελεί το κύριο κλινικό γνώρισμα της SAE, πραγματοποιείται με τη εφαρμογή νευρολογικής εξέτασης για τον αποκλεισμό άλλων βλαβών του ΚΝΣ και την χρήση ποικίλων εργαλείων, όπως η κλίμακα κώματος Γλασκώβης (Glasgow Coma Scale – GCS), η γνωστική αξιολόγηση του Μόντρεαλ (Montreal Cognitive Assessment – MoCA), η κλίμακα διέγερσης-καταστολής του Ρίτσμοντ (Richmond Agitation-Sedation Scale – RASS), η μέθοδος αξιολόγησης σύγχυσης για τη ΜΕΘ (Confusion Assessment Method for the ICU – CAM-ICU) και η λίστα ελέγχου διαλογής παραληρήματος

εντατικής θεραπείας (Intensive Care Delirium Screening Checklist – ICDSC). Στις συμπληρωματικές εξετάσεις, που παρέχουν υποστηρικτικά στοιχεία, συμπεριλαμβάνονται το ηλεκτροεγκεφαλογράφημα (HEΓ), νευροαπεικονιστικές τεχνικές, όπως το διακρανιακό υπερηχογράφημα Doppler, η μαγνητική τομογραφία (Magnetic resonance imaging – MRI) και η αξονική τομογραφία (Computed tomography – CT), καθώς και η ανίχνευση βιοδεικτών στο πλάσμα ή στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, όπως η νευρωνική ειδική ενολάση (Neuron-specific enolase – NSE) και η S100 πρωτεΐνη δέσμευσης ασβεστίου B (S100 calcium-binding protein B – S100β) (*Wang et al., 2024*). Συνεπώς, η διάγνωση της SAE δεν βασίζεται σε μία μεμονωμένη, ειδική διαγνωστική εξέταση, αλλά στην συνεκτίμηση της κλινικής εικόνας, στον αποκλεισμό άλλων αιτιολογιών εγκεφαλοπάθειας, τις κλίμακες βαθμολόγησης παραληρήματος, σε ηλεκτροφυσιολογικά και βιοχημικά ευρήματα.

Πειραματικά μοντέλα σήψης

Υπάρχουν τέσσερις κύριες κατηγορίες μοντέλων σήψης, οι οποίες αφορούν:

- i) Τη χορήγηση (συνήθως ενδοπεριτοναϊκά) βακτηριακών προϊόντων π.χ. λιποπολυσακχαρίτη (Lipopolysaccharide – LPS)
- ii) Την ενδοπεριτοναϊκή εισαγωγή σφαιριδίων κοπράνων
- iii) Τον ενοφθαλμισμό μολυσματικών παραγόντων, συνήθως βακτηρίων
- iv) Τη δημιουργία ενδογενούς περιττωματικής πηγής επιμόλυνσης π.χ. εντερική απολίνωση και διάτρηση (cecal ligation and puncture – CLP) (*Deitch, 2005*).

Στα πειραματικά μοντέλα σήψης, πέραν της χορήγησης ενδοτοξινών για την πρόκληση ενδοτοξιναιμίας, χρησιμοποιούνται επίσης στελέχη βακτηρίων ή μυκήτων. Επιπλέον, η πρόκληση σήψης δύναται να επιτευχθεί μέσω σύνθετων προσεγγίσεων, όπως τα λεγόμενα *μοντέλα διπλού πλήγματος*, τα οποία αναπτύχθηκαν με στόχο τη μίμηση της πολλαπλής οργανικής ανεπάρκειας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο συνδυασμός της χειρουργικής επέμβασης CLP και της διαδοχικής δευτερογενούς λοίμωξης από *P. Aeruginosa* (*Cai et al., 2023*).

Μοντέλα σήψης προκαλούμενα με τη χορήγηση LPS

Η χρήση μιας και μόνης δόσης LPS φαίνεται ότι είναι ικανή να προσομοιάσει τις επιδράσεις της βακτηριακής σήψης χωρίς την παρουσία μολυσματικών παραγόντων (*Bison et al., 2009; Stamatiou et al., 2023*). Η ευρεία χρήση του συγκεκριμένου ζωικού προτύπου οφείλεται στην αξιοπιστία, στην αποτελεσματικότητα, στην αποδοτικότητα και στον ελεγχόμενο χαρακτήρα του (*Deitch, 2005*).

Η περιφερική ανοσολογική διέγερση που προκαλείται με τη χορήγηση του LPS δεν παρουσιάζει απόλυτη συνάφεια με τη χρήση ζωντανών βακτηρίων για την πρόκληση φλεγμονής.

Παρά το γεγονός ότι η χορήγηση LPS αδυνατεί να προσομοιάσει πλήρως τη χρήση μικροοργανισμών εντούτοις, συγκριτικά με τη χρήση παθογόνων βακτηρίων, υπερτερεί όσον αφορά την ασφάλεια και συνιστά μια πιο απλή επιλογή μοντελοποίησης της σήψης, η οποία δεν ενέχει κινδύνους επιμόλυνσης και δεν απαιτεί την εξασφάλιση ιδιαίτερων συνθηκών διαβίωσης των πειραματοζώων (*Hoogland et al., 2015*). Η χρησιμοποίηση ενός κανονικοποιημένου και τιτλοδοτημένου αντιδραστηρίου σε καθορισμένες δόσεις εγγυάται την αναπαραγωγιμότητα μιας μονοφασικής έμφυτης αναστολογικής απάντησης (*Denver & Cunningham, 2025*).

Η επίδραση του LPS στον εγκέφαλο

Στην περίπτωση φλεγμονής στην περιφέρεια, η φλεγμονή μεταφέρεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) κυρίως μέσω νευρωνικών μονοπατιών και σημείων επικοινωνίας του ΚΝΣ με την περιφέρεια. Όσον αφορά τις νευρωνικές οδούς που εμπλέκονται, καθοριστικό ρόλο διαδραματίζει το πνευμογαστρικό νεύρο, ενώ μπορεί να εμπλέκονται και άλλα νεύρα, όπως το τρίδυμο. Τα σπλαχνικά όργανα διαθέτουν προσαγωγές ίνες του πνευμονογαστρικού, μέσω των οποίων το φλεγμονώδες σήμα μεταβιβάζεται στους μυελικούς πυρήνες του αυτόνομου νευρικού συστήματος (medullary autonomic nuclei), όπως ο μικτός, ο παραβραχιόνιος και ο πηρήνας μονήρους δεσμίδας (ambiguous, parabrachial and nucleus tractus solitarii), οι οποίοι συνδέονται με ενδοκρινικά κέντρα και το μεταιχμιακό σύστημα. Η επικοινωνία του ΚΝΣ με την περιφέρεια γίνεται στα περικολιακά όργανα (Circumventricular organs – CVOs), όπως η έσχατη πτέρυγα (area postrema), τα οποία επιτρέπουν την πρόσβαση στον εγκέφαλο μορίων της κυκλοφορίας, καθώς οι περιοχές αυτές του εγκεφάλου δεν διαθέτουν αιματοεγκεφαλικό φραγμό (brain – blood barrier –BBB). Πέρα από τα παραπάνω μονοπάτια, τα εγκεφαλικά ενδοθηλιακά κύτταρα και τα περιφερικά ανοσοκύτταρα συμβάλλουν επίσης στη φλεγμονή του εγκεφάλου. Η έκφραση υποδοχέων κυτταροκινών, όπως του Παράγοντα Νέκρωσης Όγκων α (Tumor necrosis factor-α – TNF-α) ή της ιντερλευκίνης (Interleukin – IL) 1β στην κυτταρική επιφάνεια των εγκεφαλικών ενδοθηλιακών κυττάρων, σε νευρικά και γλοιακά κύτταρα, αλλά και η προσκόλληση των λεμφοκυττάρων στο αγγειακό ενδοθήλιο εξυπηρετούν την επικοινωνία μεταξύ περιφέρειας και εγκεφάλου (*Mazeraud et al. 2020; D'Mello & Swain, 2017*).

Η επίδραση του LPS στο ΚΝΣ μπορεί να είναι άμεση, δηλαδή να προκαλείται μέσω της δράσης του ίδιου του λιποπολυσακχαρίτη ή έμμεση, ως αποτέλεσμα διαμεσολάβησης εκκρινόμενων φλεγμονωδών παραγόντων. Στη μεταφορά του LPS από τη περιφέρεια στο εγκεφαλικό παρέγχυμα συμμετέχουν λιποπρωτεΐνες ενεργούς μεταφοράς και τα CVOs, τα οποία στερούνται της προστασίας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (*Vargas-Caraveo et al., 2017*). Πιθανό μηχανισμό μεταφοράς του LPS στο ΚΝΣ αποτελεί επίσης η μεταγωγή μέσω περιφερικών νεύρων (*Zakaria et al., 2017*). Ομοίως με τον λιποπολυσακχαρίτη, ορισμένες από τις εκκρινόμενες στην κυκλοφορία

προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες μπορούν να μεταφερθούν στο ΚΝΣ (*Du & Wang, 2020*). Ταυτόχρονα η προκαλούμενη από LPS διάρρηξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού εξυπηρετεί την είσοδο φλεγμονωδών παραγόντων και νευροτοξινών, που ενεργοποιούν τα ανοσοποιητικά κύτταρα του εγκεφάλου, οδηγώντας σε ένα φαύλο κύκλο εγκεφαλικής βλάβης και ανοσολογικής απόκρισης (*Peng et al, 2021*).

Κατά τη συστηματική φλεγμονή, η αναγνώριση μορίων Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs), όπως είναι το LPS, από υποδοχείς Pattern recognition receptor (PRRs), όπως οι Toll-like receptors (TLRs) και οι NOD-like Receptors (NLRs), οι οποίοι εκφράζονται σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, λαμβάνει χώρα τόσο στο σημείο της φλεγμονής, όσο και στη κυκλοφορία του αίματος. Ειδικότερα, ο LPS αναγνωρίζεται από τον υποδοχέα TLR-4 στην επιφάνεια κυττάρων που απαρτίζουν τον BBB, με αποτέλεσμα τη μετάβαση φλεγμονώδους σήματος στον εγκέφαλο, χωρίς να απαιτείται η είσοδος των φλεγμονωδών μορίων στο εγκεφαλικό παρέγχυμα (*Denver & Cunningham, 2025*). Ο TLR-4 εκφράζεται σε αφθονία στα ενδοθήλια και τα επιθήλια των τριχοειδών αγγείων, στις μήνιγγες, στο χοριοειδές πλέγμα και στα CVOs, σε μικρογλοιακά κύτταρα, αστροκύτταρα και νευρικά πρόδρομα κύτταρα (Neural progenitor cells – NPCs), αλλά επίσης και σε μακροφάγα, ενδοθηλιακά, επιθηλιακά κύτταρα και τανυκύτταρα (tanicytes) (*Denver & Cunningham, 2025; Domínguez-Rivas et al, 2021*).

Η σύνδεση του LPS με τον υποδοχέα του συμπλέγματος διαφοροποίησης 14 (Cluster of differentiation 14 – CD14) στην μεμβράνη των μικρογλοιακών κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του συμπλόκου LPS-CD14, το οποίο αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα TLR-4. Στη συνέχεια, με τη διαμεσολάβηση καταρρακτών μεταγωγής σήματος ενεργοποιούνται τα μικρογλοιακά κύτταρα, ομοίως με τα αστροκύτταρα. Η ενεργοποίηση τους προκαλεί μεταγραφική τροποποίηση και την απελευθέρωση μιας σειράς παραγόντων: προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως ιντερλευκίνες (IL-1, IL-6, IL-12, IL-17A, IL-18), επαγωγίμης συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (Inducible nitric oxide synthase – iNOS), TNF- α , p40, χημειοκίνες (CCL2, CCL5, CXCL8) και πρωτεΐνες συμπληρώματος (C3, C3a, C5a) καθώς και αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, για παράδειγμα IL-10, και του Μεταμορφωτικού Αυξητικού Παράγοντα β (Transforming growth factor beta – TGF- β) (*Zakaria et al, 2017*).

Οι υποδοχείς TLRs πυροδοτούν καταρράκτες σηματοδότησης, που καταλήγουν στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού Πυρηνικού Παράγοντα κB (Nuclear factor κB – NF- κB), ο οποίος με τη σειρά του επάγει την παραγωγή βασικών προφλεγμονωδών μεσολαβητών (π.χ. IL-1 β , IL-6, TNF- α) (*Domínguez-Rivas et al, 2021*). Για παράδειγμα, η σύνδεση του LPS με τον υποδοχέα TLR-4, οδηγεί στην ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού TLR-4/MyD88/NF- κB , υπεύθυνο για την πρόκληση της νευροφλεγμονής (*Du & Wang, 2020*). Ο παράγοντας

διαφοροποίησης MyD88 εμπλέκεται όχι μόνο στη ρύθμιση της φλεγμονής αλλά και σε διεργασίες απόπτωσης και πυρόπτωσης (*Wen et al, 2023*).

Παθοφυσιολογία της εγκεφαλοπάθειας της σήψης

Η SAE συνιστά μία εξαιρετικά ετερογενή και πολύπλευρη ασθένεια όσον αφορά την αιτιολογία της νόσου και την εξέλιξη της (*Nedeva et al, 2019*). Η παθοφυσιολογία και οι υποκείμενοι μοριακοί μηχανισμοί της που εμπλέκονται δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένοι (*Flierl et al, 2010*). Μέχρι στιγμής έχουν προταθεί αρκετοί πιθανοί παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί, οι οποίοι αφορούν: διαταραχή του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, ισχαιμικές/αιμορραγικές βλάβες, φλεγμονή νευρικού συστήματος (ενεργοποίηση μικρογλοίας, αστρογλοίωση, αλλαγές στις συνάψεις, στον αριθμό των ακανθών και στη νευροδιαβίβαση). Αυτοί οι παράγοντες πιθανώς εμπλέκονται παράλληλα, επηρεάζουν ο ένας τον άλλον και συμβάλλουν σε διαφορετικό βαθμό στην ανάπτυξη της (*Chaudhry & Duggal, 2014; Mazeraud et al. 2020*). Ωστόσο, κανένας από τους παραπάνω παράγοντες δεν αποτελεί απαραίτητη συνθήκη για την ανάπτυξη της SAE (*Chung et al, 2020*).

Κατά την SAE παρατηρούνται τρεις κύριες παθοφυσιολογικές διεργασίες: η νευροφλεγμονή, η ισχαιμία και το κυτταρικό μεταβολικό στρες. Επίσης παρατηρείται διαταραχή του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, αποσύζευξη της νευροαγγειακής μονάδας και εγκεφαλικά επεισόδια (αιμορραγικά ή ισχαιμικά). Ταυτόχρονα, προκαλείται νευροφλεγμονή από την ενεργοποίηση της μικρογλοίας και την αστρογλοίωση. Οι παραπάνω διαδικασίες, σε συνδυασμό με άλλους συστημικούς παράγοντες, όπως η υποξία, επιφέρουν διεργετοτοξικότητα και διατάραξη της μεταβολικής ισορροπίας, με αποτέλεσμα την αυξημένη νευρωνική απόπτωση (*Mazeraud et al. 2020*).

I. Αιματοεγκεφαλικός φραγμός. Η φυσιολογική λειτουργία του ΚΝΣ εξασφαλίζεται από την ύπαρξη βιολογικών φραγμών, όπως ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός, ο φραγμός αίματος-εγκεφαλονωτιαίου υγρού (blood–CSF barrier, BCB) και ο αραχνοειδής φραγμός. Μεταξύ αυτών, ο BBB αποτελεί τον κυριότερο προστατευτικό φραγμό και την μεγαλύτερη διεπιφάνεια μεταξύ αίματος και εγκεφάλου. Ο ρόλος του έγκειται στην προστασία του ΚΝΣ και τη διατήρηση της ομοιόστασης του εγκεφάλου (*Kadry et al, 2020*).

Ο BBB συγκροτείται κατά κύριο λόγο από μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία επενδύουν τα εγκεφαλικά τριχοειδή αγγεία του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού (*Kadry et al. 2020*). Εκτός από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, στη διαμόρφωσή του συμμετέχουν επίσης τα αστροκύτταρα, τα περικύτταρα, καθώς και οι στενές και οι προσκολλητικές συνδέσεις (*Wu et al. 2023*). Επιπλέον δομικά στοιχεία του είναι οι νευρώνες, τα μικρογλοιακά κύτταρα και η βασική μεμβράνη. Όλα τα παραπάνω συστατικά συνθέτουν τη λεγόμενη νευροαγγειακή μονάδα

(neurovascular unit, NVU), που διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη δημιουργία και την ανάπτυξη του BBB (*Alahmari, 2021*).

Η καταστροφική επίδραση του LPS στην ακεραιότητα του BBB μπορεί να επιτελείται άμεσα ή έμμεσα. Οι άμεσοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν παρακυτταρικά και διακυτταρικά μονοπάτια. Η προσβολή των στενών συνδέσεων (tight junctions, TJs) και των συνδέσεων προσκόλλησης (adherens junctions, AJs), οι οποίες καθορίζουν την ακεραιότητα των παρακυτταρικών φραγμών, οδηγεί σε αυξημένη διαπερατότητα του BBB. Από την άλλη, διαταραχές στην εκροή λιποδιαλυτών ουσιών, μέσω των μεταφορέων κασέτας που συνδέονται με ATP (ATP-binding cassette transporters – ABCs), όπως η P-γλυκοπρωτεΐνη (P-gp) ή στην κυστιδιακή μεταφορά μακρομορίων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα του BBB — διαδικασία γνωστή ως τρανσκύτωση — επιδρούν σημαντικά στην διακυτταρική διαπερατότητα, επιτρέποντας τη διείσδυση φλεγμονωδών παραγόντων και νευροτοξινών (*Peng et al, 2021*). Ειδικότερα, στη μορφολογική και λειτουργική τροποποίηση του BBB, καθοριστικοί διαμεσολαβητές φαίνεται πως είναι οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, συμπεριλαμβανομένων του TNF-α, της πρωτεΐνης HMGB1 (High mobility group box 1 protein), των ιντερλευκινών IL-1β, IL-6, καθώς και τα σφιγγολιπίδια (*Xin et al, 2022; Kuperberg & Wadgaonkar, 2017*).

Η ισχαιμία και η νευροφλεγμονή ασκούν έμμεση επίδραση στην ακεραιότητα του BBB, επιδεινώνοντας τη πρόιμη βλάβη που προκύπτει από μειορρύθμιση (downregulation) των TJs και την αυξημένη διαπερατότητα του εγκεφαλικού ενδοθηλίου, υπό τη διαμεσολάβηση προφλεγμονωδών παραγόντων. Ισχαιμικά επεισόδια εμφανίζονται σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου, όπως ο ιππόκαμπος, η αμυγδαλή, ο μετωπιαίος φλοιός και ο υποθάλαμος (*Gao & Hernandez, 2021*). Η ισχαιμία προκαλείται εξαιτίας των απότομων αλλαγών της συστημικής αρτηριακής πίεσης και συντελεί στην ενεργοποίηση των γλοιακών κυττάρων. Τα μικρογλοιακά κύτταρα ενεργοποιούνται ταχύτατα, πολλαπλασιάζονται και εκκρίνουν προφλεγμονώδεις παράγοντες, μεταλλοπρωτεϊνάσες (Matrix metalloproteinases – MMPs) και αντιδραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive oxygen species – ROS) (*Tian et al, 2024*).

Παρά το γεγονός ότι η νευροφλεγμονή και η ισχαιμία επιδεινώνουν σημαντικά τη βλάβη του BBB, η συμβολή των μικρογλοιακών κυττάρων, των αστροκυττάρων και των περικυττάρων αποδεικνύεται δευτερεύουσας σημασίας για την εκδήλωση του φαινομένου. Η εμπλοκή και μόνο των μικροαγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων καθίσταται επαρκής για την μεταβολή της ακεραιότητας του BBB (*Banks et al, 2015*).

Η διάρρηξη του BBB δεν λαμβάνει χώρα ομοιόμορφα σε ολόκληρο τον εγκεφαλικό ιστό. Ορισμένες περιοχές, όπως ο θάλαμος, η παρεγκεφαλίδα, η γέφυρα του εγκεφαλικού στελέχους και ο μετωπιαίος φλοιός εμφανίζουν αυξημένη ευπάθεια στη προσβολή, σε σύγκριση με άλλες (*Banks et al, 2015*). Η ευαισθησία συγκεκριμένων περιοχών σε φλεγμονώδεις και

νευροεκφυλιστικές διαδικασίες αποδίδεται στην δομική και λειτουργική ετερογένεια του BBB. Τα ανατομικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά του, όπως η αγγείωση, η μεταβολική δραστηριότητα και η διαπερατότητα διαφοροποιούνται ανάλογα με τη περιοχή, καθορίζοντας την εκλεκτική ανθεκτικότητα στη διαταραχή του φραγμού (*Beltran-Velasco & Clemente-Suárez, 2025*).

II. Νευροφλεγμονή. Στους ασθενείς με SAE, η εμφάνιση νευροφλεγμονής και οξειδωτικού στρες στον εγκεφαλικό ιστό, σε συνδυασμό με την εκδήλωση συμπτωμάτων νοητικής έκπτωσης ή σύγχυσης και κώματος, απουσία προφανούς λοίμωξης του ΚΝΣ, φανερώνει ότι η νευροφλεγμονώδης απόκριση δεν οφείλεται στην εισβολή ενός παθογόνου στον εγκέφαλο, αλλά στη συστηματική φλεγμονή που ενεργοποιεί την ανοσοαπόκριση του εγκεφάλου (*Peng et al, 2021; Barichello et al, 2023*).

Η συστηματική λοίμωξη και φλεγμονή επιφέρουν φαινοτυπικές αλλαγές στη μικρογλοία, χωρίς τη ύπαρξη νευρωνικής βλάβης. Σε απάντηση στη νευροφλεγμονή, τα μικρογλοιακά κύτταρα μεταναστεύουν και συσσωρεύονται γύρω από τα εγκεφαλικά αιμοφόρα αγγεία, όπου σε στενή επαφή με τα ενδοθηλιακά κύτταρα ασκούν προστατευτικό ρόλο για την ακεραιότητα του BBB. Η αρχική ενεργοποίηση της μικρογλοίας προηγείται οποιασδήποτε διακριτής αλλαγής στην διαπερατότητα του BBB. Όταν η φλεγμονή επιμένει, υπερισχύει ένας υπέρμετρα ενεργοποιημένος φαινότυπος των μικρογλοιακών κυττάρων, ο οποίος φαγοκυτταρώνει τα τελικά άκρα των αστροκυττάρων, με τελικό αποτέλεσμα τη βλάβη του BBB (*Haruwaka et al, 2019*).

Η πόλωση των μικρογλοιακών κυττάρων, που συνιστούν την κύρια μορφή ενεργού ανοσολογικής άμυνας του ανοσοποιητικού συστήματος στο ΚΝΣ, οδηγεί στη διάκριση τριών φαινοτύπων. Υπό την επίδραση εξωγενών παραγόντων, τα μικρογλοιακά κύτταρα μπορεί να μεταβούν από μια κατάσταση ηρεμίας (φαινότυπος M0) προς μία ενεργοποιημένη κατάσταση. Η ενεργοποιημένη μικρογλοία έχει διττό ρόλο, καθώς μπορεί να πολωθεί είτε προς τον φαινότυπο M1, ο οποίος επιδεινώνει τη φλεγμονώδη βλάβη του εγκεφάλου, υπό την απελευθέρωση προφλεγμονωδών παραγόντων (π.χ. TNF-α, IL-6, IL-1β), είτε προς τον φαινότυπο M2, ο οποίος εκκρίνει αντιφλεγμονώδεις και νευροπροστατευτικούς παράγοντες (π.χ. TGF-β, IL-10, IL-4, IL-13), συμβάλλοντας στο περιορισμό της φλεγμονώδους αντίδρασης και στην αποκατάσταση της νευρικής λειτουργίας (*Tian et al, 2024*).

Η μετάβαση της μικρογλοίας σε διαφορετικούς φαινότυπους δύναται να διαταράξει την ομοιοστατική της λειτουργία. Ως αναπόσπαστο τμήμα της NVU, η μικρογλοία ρυθμίζει τη δραστηριότητα των νευρωνικών κυκλωμάτων, μέσω δυναμικής επαφής με προσυναπτικά και μετασυναπτικά στοιχεία. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι δυναμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ μικρογλοίας και συναπτικών στοιχείων συμβάλλουν στη συναπτική αναδιαμόρφωση. Κατά την επαγόμενη από LPS συστηματική φλεγμονή, η ενεργοποιημένη μικρογλοία χάνει την ικανότητα

ρύθμισης της λειτουργικής συνδεσιμότητας με αποτέλεσμα την αδυναμία συγχρονισμού των τοπικών νευρωνικών κυκλωμάτων (*Schafer et al, 2012; Haruwaka et al, 2019*).

Σε ζωικά μοντέλα σήψης, η συστημική χορήγηση LPS, που χρησιμοποιείται για την επαγωγή της φλεγμονώδους απόκρισης, προκαλεί επίσης και ενεργοποίηση των αστροκυττάρων. Η μετάβαση των αστροκυττάρων, ομοίως με τη μικρογλοία, από μια κατάσταση ηρεμίας σε μία ενεργοποιημένη κατάσταση οδηγεί σε περαιτέρω ενεργοποίηση της μικρογλοίας, σε απελευθέρωση ROS, κυτταροκινών και σε αστρογλοίωση, με τελικό αποτέλεσμα το νευρωνικό θάνατο (*Danielski et al, 2022*). Τα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα διακρίνονται σε δύο φαινοτυπικές κατηγορίες: “A1” και “A2”, σε αντιστοιχία με την ονοματολογία “M1” και “M2” των μακροφάγων. Κατά τη νευροφλεγμονή επικρατεί ο φαινότυπος A1, ο οποίος ρυθμίζει θετικά τη γονιδιακή έκφραση της κλασικής οδού του καταρράκτη του συμπληρώματος και του συστατικού του συμπληρώματος 3 (C3), με τοξική επίδραση για τους νευρώνες και τα ολιγοδενδροκύτταρα, ενώ κατά την ισχαιμία επικρατεί ο φαινότυπος A2, ο οποίος υποστηρίζει, με την αύξηση της έκφρασης νευροτροφικών παραγόντων, την επιβίωση και την ανάπτυξη των νευρώνων (*Liddelow et al, 2017*).

Η ενεργοποίηση των γλοιακών κυττάρων οφείλεται επίσης και στην αυξημένη διαπερατότητα του BBB. Η διάρρηξη του φραγμού επιτρέπει τη διείσδυση κυττάρων του ανοσοποιητικού από τη κυκλοφορία του αίματος στον εγκέφαλο. Ακολουθεί απελευθέρωση φλεγμονωδών διαμεσολαβητών και ενεργοποίηση μικρογλοιακών κυττάρων και αστροκυττάρων, η οποία οδηγεί σε έκκριση ROS, κυτταροκινών, χημειοκινών και νευροχημικών ουσιών (*Barichello et al, 2023*).

Τα παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά της SAE, προκαλούν αλλαγές στη δραστηριότητα των κυττάρων γλοίας και των νευρώνων. Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, οι αλλοιώσεις στην έκφραση των νευροδιαβιβαστών, η διατάραξη της συναπτικής δραστηριότητας και η απώλεια της νευρωνικής πλαστικότητας, ως συνέπειες της νευροφλεγμονής επηρεάζουν νευροενδοκρινικές και κυρίως γνωσιακές λειτουργίες, όπως για παράδειγμα η μνήμη (*Manabe & Heneka, 2022; Barichello et al, 2023*).

III. Οξειδωτικό στρες. Εκτός από τη νευροφλεγμονή, στην παθογένεση και εξέλιξη της SAE εμπλέκεται και το οξειδωτικό στρες. Τα εγκεφαλικά κύτταρα είναι ιδιαίτερα ευάλωτα στο οξειδωτικό στρες που επάγεται από τη δράση του LPS, λόγω της αυξημένης κατανάλωσης οξυγόνου και της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε λιπίδια. Η υπερπαραγωγή ROS οδηγεί σε οξείδωση πρωτεϊνών, λιπιδική υπεροξείδωση και βλάβες στο DNA. Τα προϊόντα της λιπιδικής υπεροξείδωσης προκαλούν διάρρηξη της μιτοχονδριακής μεμβράνης και, κατά συνέπεια, κυτταρικό θάνατο (*Savran et al, 2019*).

Έντονη ενεργοποίηση και απόπτωση νευρώνων έχει ανιχνευτεί στον ιππόκαμπο, στην αμυγδαλή, στο πυρήνα της μονήρους δεσμίδας (nucleus tractus solitarius – NTS) και στον

υπομέλανα τόπο (Locus coeruleus – LC). Η νευρωνική δυσλειτουργία αποτελεί δευτερεύουσα συνέπεια της ενεργοποίησης της μικρογλοίας και της πρώιμης μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας. Στην πρώτη περίπτωση, η αύξηση της διεγερσιμότητας των νευρώνων, που διαμεσολαβείται από την έκλυση κυτταροκινών, νιτρικού οξειδίου, διεγερτικών νευροδιαβιβαστών και νευροτοξικών μεταβολιτών φτάνει τα όρια της υπερδιεγερσιμότητας και της διεγερτοτοξικότητας τους. Στην δεύτερη περίπτωση, προαποπτωτικές μεταβολικές διαδικασίες, όπως η εξάντληση των αποθεμάτων ATP και η αυξημένη παραγωγή αντιδραστικών μορφών οξυγόνου/αζώτου εμπλέκονται στη προσβολή των γλουκών κυττάρων και των νευρώνων (*Mazeraud et al, 2020*).

Η επίδραση της φλεγμονής στη συμπεριφορά

Ένα ερέθισμα, ανάλογα με την ένταση, τη διάρκεια και τη συχνότητα του μπορεί να προκαλέσει από μηδενική έως πολύ ισχυρή, και συνεπώς καταστροφική, απόκριση. Σε περίπτωση αναγνώρισης του ερεθίσματος αυτού σαν προειδοποίηση μίας επερχόμενης σοβαρής κατάστασης, το ίδιο ερέθισμα είναι δυνατόν να λειτουργήσει ως έναυσμα προετοιμασίας. Επομένως παράγοντες ικανοί να πυροδοτήσουν καταστροφικές αποκρίσεις, πιθανόν σε χαμηλά επίπεδα να προάγουν προσαρμοστικές αποκρίσεις, με αποτέλεσμα την πρόκληση ανοχής και την εδραίωση ενός προστατευτικού φαινοτύπου σε γονιδιωματικό, μοριακό και κυτταρικό επίπεδο (*Gidday, 2006*).

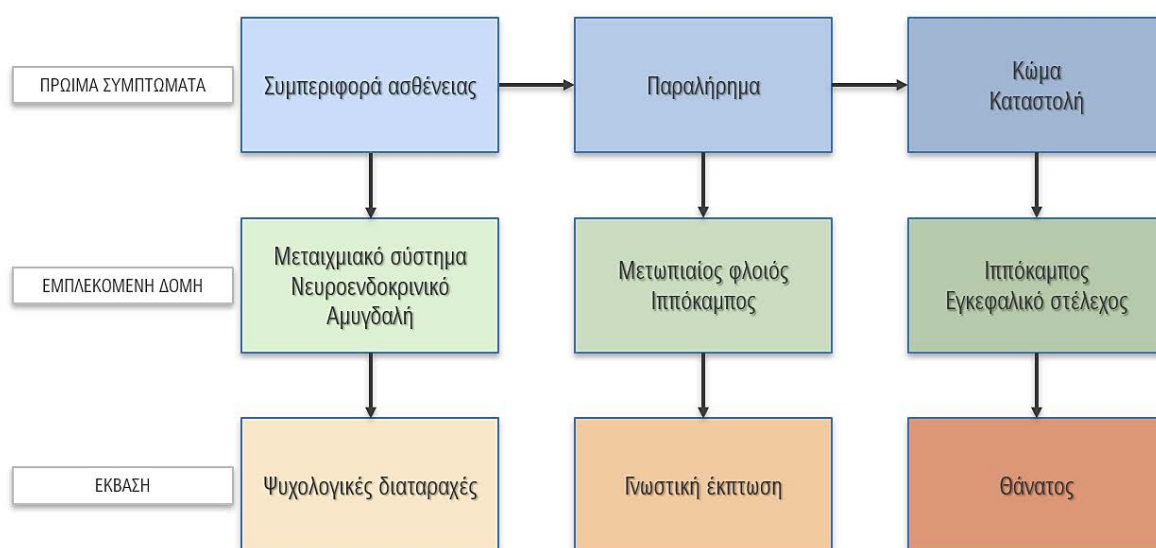
Προγενέστερες μελέτες έχουν δείξει ότι ένα φλεγμονώδες ερέθισμα μπορεί να επηρεάσει νευρωνικά κυκλώματα, που εμπλέκονται στη ρύθμιση της διάθεσης, της κινητικής δραστηριότητας, του άγχους και του συναισθήματος. Οι επιδράσεις της φλεγμονής στη συμπεριφορά ενδέχεται να αντανakλούν μια προσαρμοστική απόκριση λόγω της ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού, -με σκοπό τη διατήρηση ενεργειακών αποθεμάτων, την ενίσχυση της επαγρύπνησης, την επίτευξη κοινωνικών και συναισθηματικών προσαρμογών- ή μπορεί να αποτελούν ένα ψυχιατρικό σύμπτωμα, ως αποτέλεσμα της χρόνιας φλεγμονής. Επιπλέον, συμπτώματα όπως η ανηδονία, η κινητική επιβράδυνση και το άγχος είναι δυνατόν να προκληθούν από φλεγμονώδη ερεθίσματα, αλλά και να αντιστραφούν υπό την επίδραση αυτών, μέσω ανταγωνισμού των κυτταροκινών. Αυτό αποδίδεται στην εξειδίκευση των φλεγμονωδών παραγόντων για συγκεκριμένες περιοχές και λειτουργικά δίκτυα του εγκεφάλου (*Goldsmith et al, 2023*).

Η συστηματική λοίμωξη πυροδοτεί ένα φάσμα μεταβολικών και συμπεριφορικών αλλαγών, που χαρακτηρίζονται ως «*συμπεριφορά ασθένειας*» (“*sickness behavior*”). Πρόκειται για μία εξελικτικά συντηρημένη φυσιολογική απάντηση του οργανισμού στην ασθένεια, με στόχο την εξοικονόμηση ενέργειας και τη διευκόλυνση της ανάρρωσης, που περιλαμβάνει συμπτώματα, όπως πυρετό, λήθαργο, ανηδονία, μειωμένη όρεξη και κινητικότητα.

Η συμπεριφορά ασθενείας μπορεί να προκληθεί από τη συστηματική χορήγηση LPS, λόγω της ισχυρής ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος, σε ανθρώπους όπως και σε τρωκτικά (*Kealy et al, 2020*).

Από ψυχολογικής άποψης, η συμπεριφορά ασθενείας επιφέρει αλλαγές στη διάθεση, και εκδήλωση συμπτωμάτων κατάθλιψης και άγχους (*Lasselín et al, 2016*). Οι χαρακτηριστικές εκδηλώσεις της συμπεριφοράς ασθενείας εμφανίζουν εξαιρετική ομοιότητα με τη συμπτωματολογία ψυχιατρικών ασθενειών, με αποτέλεσμα να συγχέονται λαθεμένα κατά την ερμηνεία των μελετών συμπεριφοράς. Με σκοπό τη διάκριση μεταξύ συμπεριφοράς ασθενείας και καταθλιπτικής/αγχώδους συμπεριφοράς, είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψιν η αλληλοεπικάλυψη των συμπτωμάτων στην αξιολόγηση των δεικτών, που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση των συμπεριφορικών εκδηλώσεων (*Biesmans et al, 2013*).

Παρά τις υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις ενός οργανισμού για την καταπολέμηση των ασθενειών, ο μεταβολικός επαναπρογραμματισμός, που συμβαίνει κατά την ανοσολογική απόκριση, εκδηλώνεται μέσω της ανορεξίας. Το αρνητικό ενεργειακό ισοζύγιο φαίνεται να συμβάλλει προστατευτικά στην ανοσολογική άμυνα του ξενιστή, γεγονός που υπογραμμίζει την πολυπλοκότητα της διατροφικής συμπεριφοράς, της οποίας κεντρικός ρυθμιστής είναι το ΚΝΣ (*Aviello et al, 2021*).



Εικόνα 1: Νευροανατομική συσχέτιση των πρώιμων συμπτωμάτων κατά την οξεία φάση της εγκεφαλοπάθειας που σχετίζεται με σήψη (*Sepsis associated encephalopathy, SAE*) και της τελικής έκβασης, που περιλαμβάνει μακροχρόνιες ψυχολογικές διαταραχές και γνωστική έκπτωση, κατά τη χρόνια φάση

Με βάση την κλινική πορεία, η εγκεφαλοπάθεια που σχετίζεται με τη σήψη διαιρείται σε οξεία και χρόνια φάση. Κατά την οξεία φάση, τα πρώιμα συμπτώματα περιλαμβάνουν σύγχυση, παραλήρημα, παραισθήσεις, μειωμένη συγκέντρωση, αλλαγές στη συνείδηση και στη συμπεριφορά. Στην χρόνια φάση εμφανίζονται συμπτώματα νοητικής έκπτωσης, που αφορούν

την μνήμη, την προσοχή, την ομιλία και την εκτέλεση λειτουργιών και αγγίζουν τα όρια της άνοιας. Επιπλέον, παρατηρούνται συγκινησιακά και ψυχολογικά συμπτώματα, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται η κατάθλιψη, το άγχος, το μετατραυματικό στρες και οι αυτοκαταστροφικές τάσεις (*Chung et al, 2020*). Τα πρώιμα συμπτώματα σχετίζονται με τις μακροχρόνιες ψυχολογικές και νοητικές συνέπειες με την εμπλοκή συγκεκριμένων δομών. Η γνωστική δυσλειτουργία που σχετίζεται με τη σήψη οφείλεται σε πρώιμη προσβολή του ιππόκαμπου και του μετωπιαίου λοβού και οι ψυχολογικές διαταραχές σε προσβολή δομών του μεταίχμιου συστήματος (*Mazeraud et al, 2020*) (Εικόνα 1).

Η επίδραση της συστημικής χορήγησης LPS στο ΚΝΣ

Ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) αποτελεί συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και ισχυρή ενδοτοξίνη. Καθώς συνιστά τον κύριο παράγοντα της λοιμογόνου δράσης τους, προκαλεί ένα έντονο φλεγμονώδες ερέθισμα και χρησιμοποιείται ευρύτατα ως παράγοντα επαγωγής ανοσολογικής απόκρισης σε ζωικά μοντέλα. Η συστημική χορήγηση του βακτηριακού LPS σε αρουραίους οδηγεί σε ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού και του ενδοκρινικού συστήματος και σε εκδήλωση αλλαγών στη συμπεριφορά (*Ramírez et al, 2019*). Η επαγωγή νευροφλεγμονωδών αντιδράσεων συμβαίνει σε μοριακό, κυτταρικό και συμπεριφορικό επίπεδο (*Domínguez-Rivas et al, 2021*). Ακόμα και σε χαμηλές δόσεις π.χ. 1μg/kg μπορεί να προκληθούν σημαντικές ανοσολογικές και συμπεριφορικές αντιδράσεις, οι οποίες πιθανόν να είναι αλληλένδετες (*Bison et al, 2009*).

Η χρήση του LPS σε υψηλές δόσεις (π.χ. 5mg/kg) έχει καθιερωθεί ως μοντέλο επαγωγής σήψης (*Dumbuya et al, 2022; Chen et al, 2019*). Από την άλλη, η επαναλαμβανόμενη διαδοχική ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση χαμηλών δόσεων αξιοποιείται ως πειραματικό μοντέλο προσομοίωσης της χρόνιας και επίμονης νευροφλεγμονής που χαρακτηρίζει τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως το Alzheimer (*Qin et al, 2007; Bahaidrah et al, 2022*).

Η άπαξ συστημική χορήγηση LPS σε χαμηλές δόσεις (π.χ. 0.2mg/kg) προκαλεί διάφορες συμπεριφορικές, φυσιολογικές και ορμονικές αντιδράσεις. Χαρακτηρίζεται ως πρόκληση ή προετοιμασία του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς και ως ανοσοδιεγερτικός, ανοσορρυθμιστικός, ανοσοτροποποιητικός ή και στρεσογόνος παράγοντας (*Bison et al, 2009; Rosenzweig et al, 2004; Mizobuchi & Soma, 2021; Fang et al, 2023*). Παρότι η απόκριση είναι δόσοεξαρτώμενη, δεν υφίσταται αναλογική σχέση μεταξύ δόσης και απόκρισης, διότι η συσχέτιση είναι πολύπλοκη.

Η φλεγμονώδης απόκριση, μέσω της ενεργοποίησης της μικρογλοίας και της απελευθέρωσης προφλεγμονωδών κυτταροκινών επηρεάζει άμεσα νευρωνικές διεργασίες που σχετίζονται με τη νόσηση, όπως η συναπτική πλαστικότητα και η νευροδιαβίβαση, ιδιαίτερα στην οδοντωτή έλικα

(dentate gyrus – DG) του ιπποκάμπου. Ωστόσο, δεν έχει διευκρινιστεί κατά πόσο η νευροφλεγμονή επιδρά βλαπτικά ή ευεργετικά στη μνήμη και τη μάθηση. Η συστηματική χορήγηση χαμηλών δόσεων LPS (π.χ. 100μg/kg) πιθανολογείται ότι δεν πλήττει ολιστικά τις εξαρτώμενες από τον ιππόκαμπο λειτουργίες μνήμης, αλλά τροποποιεί επιλεκτικά ορισμένους τύπους, όπως η μνήμη αναγνώρισης, οι οποίοι υποστηρίζονται από συγκεκριμένες και ανεξάρτητες μεταξύ τους νευρωνικές διαδικασίες (*Hennigan et al, 2007; Czerniawski et al, 2016; Kupferschmid & Therrien, 2018; Kupferschmid et al, 2017*).

Όσον αφορά την κατάθλιψη, χαμηλές δόσεις LPS (π.χ. 0.83mg/kg) χρησιμοποιούνται τόσο για την δημιουργία μοντέλων κατάθλιψης, εναλλάξιμα με στρεσογόνους παράγοντες, όσο και για την ανακούφιση των συμπτωμάτων της κατάθλιψης σε μοντέλα χρόνιου στρες (*Li et al, 2021; Guo et al, 2023; Cai et al, 2020*). Η ανάπτυξη καταθλιπτικής συμπεριφοράς και η καταστολή της νευρογένεσης έχουν συσχετιστεί στενά με την ενεργοποίηση της μικρογλοίας, με την εμπλοκή διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών π.χ. BDNF/TrkB/ERK/CREB, NF-kB/NLRP3, TLR, JAK/STAT (*Kreisel et al, 2014; Fang et al, 2023*). Ωστόσο, η δραστηριότητα της μικρογλοίας φαίνεται πως αποτελεί δευτερογενή συνέπεια της διαταραχής της ομοιόστασης και της ακεραιότητας των φραγμών του εγκεφάλου, -οι οποίοι αποτελούν τους κύριους παράγοντες στη παθοφυσιολογία της περιφερικής φλεγμονής- παρά πρωταρχική αιτία των καταθλιπτικών συμπτωμάτων (*Turkheimer et al, 2023*).

Χαμηλές δόσεις LPS (π.χ. 0.2mg/kg) ικανές να εγείρουν ήπια ανοσολογική απόκριση, σε αντιδιαστολή με τις υψηλές δόσεις (π.χ. 5mg/kg), που χρησιμοποιούνται για την επαγωγή σηπτικών καταστάσεων, μπορούν να προσφέρουν προστασία διασταυρούμενης ανοχής (*He et al, 2019*). Σε μοντέλα ασθενειών τρωκτικών, η νευροπροστασία φαίνεται πως αποδίδεται σε μείωση της έκφρασης προφλεγμονωδών κυτταροκινών (π.χ. TNF-α), στην ενεργοποίηση της μικρογλοίας και των μακροφάγων, στην διήθηση του ΚΝΣ από ουδετερόφιλα, καθώς και στην αύξηση των επιπέδων αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (Super Oxide Dismutase – SOD) (*Rosenzweig et al, 2004; Lin et al, 2009; Bordet et al, 2000*). Ταυτόχρονα με την αναστολή της μικρογλοιακής ενεργοποίησης και την προφύλαξη από τις επακόλουθες νευρικές βλάβες, προάγεται η δυναμική μετάβαση των μικρογλοιακών κυττάρων από την κατάσταση ηρεμίας σε ένα νευροπροστατευτικό φαινότυπο, άρρηκτα συνδεδεμένο με τη φλεγμονώδη ρύθμιση, την φαγοκυττάρωση, την αντιοξειδωτική και την αντι-αποπτωτική δράση (*Mizobuchi & Soma, 2021*). Η νευροπροστασία αποδεικνύεται ότι εμφανίζεται μόνο σε χαμηλές δόσεις LPS (π.χ. 0.5mg/kg) και εξαλείφεται σε υψηλότερες δόσεις (π.χ. 2mg/kg), όμως οι πιθανοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στις διαφορετικές επιδράσεις του LPS στο ΚΝΣ, ανάλογα με τη δόση του, χρίζουν περαιτέρω διερεύνησης (*Bordet et al, 2000; Bison et al, 2009*).

ΣΚΟΠΟΣ

Σήψη είναι η απειλητική για τη ζωή δυσλειτουργία οργάνων που προκαλείται από μια απορυθμισμένη απόκριση του ξενιστή στη μόλυνση (*Singer et al, 2016*). Η εγκεφαλοπάθεια που σχετίζεται με σήψη (Sepsis associated encephalopathy, SAE) είναι ένα σοβαρό νευρολογικό σύνδρομο, το οποίο έχει συσχετιστεί μακροπρόθεσμα με σοβαρές νευρολογικές και ψυχιατρικές καταστάσεις όπως νοητική έκπτωση, επιληψία, αναπηρία και κατάθλιψη (*Sonneville et al, 2023*). Πρόκειται για την πιο συχνή αιτία εγκεφαλοπάθειας στη ΜΕΘ (Μονάδα Εντατικής Θεραπείας) παγκοσμίως και πιστεύεται ότι >50% των ασθενών με σήψη εμφανίζουν SAE (*Chaudhry & Duggal, 2014*). Ακόμα κι έπειτα από ανάκαμψη της σήψης και έξοδο από την ΜΕΘ, οι ασθενείς εκδηλώνουν ένα ευρύ φάσμα σωματικών, γνωστικών και ψυχικών διαταραχών (*Sonneville et al, 2023*).

Η παθοφυσιολογία και οι υποκείμενοι μοριακοί μηχανισμοί της SAE δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένοι (*Flierl et al, 2010*). Μέχρι στιγμής έχουν προταθεί αρκετοί πιθανοί παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί, οι οποίοι αφορούν: διαταραχή του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, ισχαιμικές/αιμορραγικές βλάβες και φλεγμονή νευρικού συστήματος (αστρογλοίωση, ενεργοποίηση μικρογλοίας) (*Chaudhry & Duggal, 2014; Mazeraud et al, 2020*). Η πολυπαραγοντικότητα της αιτιολογίας, η έλλειψη στοχευμένης φαρμακολογικής θεραπευτικής αντιμετώπισης και η υψηλή συχνότητα εμφάνισης της SAE καθιστούν αναγκαία την εγκαθίδρυση ενός τυπικού πρότυπου ζωικού μοντέλου σήψης/φλεγμονής, με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης της απομακρυσμένης σήψης στον εγκέφαλο και στη συμπεριφορά των πειραματοζώων καθώς και της επίδρασης κλινικώς χορηγούμενων φαρμάκων, τα οποία χρησιμοποιούνται κατά την εντατική θεραπεία (*Robba et al, 2018*).

Σκοπό της συγκεκριμένης εργασίας αποτελεί η μελέτη της μακροχρόνιας επίδρασης της ήπιας και της έντονης φλεγμονής στην εγκεφαλική λειτουργία (μνήμη/μάθηση, συναίσθημα) στην ακεραιότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και στη δομή του εγκεφάλου.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πειραματόζωα

Για την μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ενήλικες αρσενικοί αρουραίοι τύπου Wistar, ηλικίας έξι εβδομάδων (~1.5 μηνός) και βάρους ~140gr. Η φροντίδα και οι πειραματικοί χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε συμφωνία με τις διεθνείς κατευθυντήριες του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 22ας Σεπτεμβρίου 2010 περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς (2010/63/EE).

Η φύλαξη των πειραματόζωων έλαβε χώρα στις εγκαταστάσεις του εκτροφείου του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σε ένα ρυθμιζόμενο περιβάλλον θερμοκρασίας 22-24°C, σχετικής υγρασίας 50-55% και σταθερού κύκλου 12h/12h φωτός/σκότους (12 ώρες φωτός από 7:00π.μ. μέχρι 19:00μ.μ. και 12 ώρες σκότους από 19:00μ.μ. έως 7:00π.μ.). Τα ζώα στεγάζονταν σε κλουβιά Makrolon (46cm μήκος×25cm πλάτος×20cm ύψος), τέσσερα ανά κλουβί, με ελεύθερη και συνεχή πρόσβαση σε νερό και τροφή. Σύμφωνα με το πειραματικό πρωτόκολλο δεν απαιτούνται ιδιαίτερες συνθήκες στέγασης και φροντίδας των πειραματόζωων.

Για την μελέτη της επίπτωσης της σήψης στη δομή και λειτουργία του εγκεφάλου (διάθεση, μνήμη, μάθηση) δεν θα μπορούσε να εφαρμοστεί η αρχή της αντικατάστασης των πειραματόζωων (“Replacement”). Ωστόσο, καταβλήθηκε η μέγιστη δυνατή προσπάθεια με στόχο τόσο την μείωση του αριθμού των πειραματόζωων που χρησιμοποιήθηκαν (“Reduction”), όσο και την επίτευξη της βέλτιστης διαβίωσης και της ελάχιστης ταλαιπωρίας των ζώων καθ’ όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων (“Refinement”).

Η πρόκληση σήψης/φλεγμονής επιτυγχάνεται με την εφάπαξ χορήγηση με ενδοπεριτοναϊκή ένεση του λιποπολυσακχαρίτη (Lipopolysaccharide – LPS) του βακτηρίου *Escherichia coli* (στελέχη: 0111:B4, L3012/ 026:B6, L8274, Sigma-Aldrich). Η προσέγγιση αυτή προσομοιάζει τις επιδράσεις της βακτηριακής σήψης, χωρίς την παρουσία ζώντων μολυσματικών παραγόντων.

Τα πειραματόζωα κατανέμονται σε τρεις ομάδες:

- ο Ομάδα I (Ομάδα Ελέγχου): Στα ζώα χορηγείται ενδοπεριτοναϊκά (ip) φυσιολογικός ορός σε όγκο ισοδύναμο με αυτό των πειραματικών ομάδων.
- ο Ομάδα II (Ομάδα Ήπιας Φλεγμονώδους Απόκρισης): Χορηγείται ip μία εφάπαξ δόση LPS σε συγκέντρωση 0.25mg/kg για την πρόκληση ήπιας (υποκλινικής) φλεγμονής.
- ο Ομάδα III (Ομάδα Επαγόμενης Κατάστασης Σήψης): Χορηγείται ip μία εφάπαξ δόση LPS σε συγκέντρωση 2.5mg/kg για την πρόκληση έντονης φλεγμονώδους αντίδρασης που προσομοιάζει τη σήψη.

Η δόση 2.5mg/kg αναφέρεται σε LPS δραστικότητας 500.000 EU/mg, ομοίως και η υποδεκαπλάσια δόση 0.25mg/kg. Λαμβάνοντας υπόψιν αυτή την ισοδυναμία, για την επίτευξη των δόσεων 2.5mg/kg και 0.25mg/kg χρησιμοποιήθηκαν στελέχη LPS διαφορετικής δραστικότητας: 0111:B4, L3012, Sigma-Aldrich (500.000 EU/mg) και 026:B6, L8274, Sigma-Aldrich (10.000 EU/mg) αντίστοιχα.

Νευρολογική εξέταση

Η νευρολογική εξέταση περιλαμβάνει τον έλεγχο της ισορροπίας, του συντονισμού των κινήσεων και των αισθητικοκινητικών αντανακλαστικών.

Για την νευρολογική εξέταση χρησιμοποιήθηκαν (Εικόνα 2):

Δοκός: 100×2×2cm

Κλουβί : 46×25×20cm

Ικρίωμα: 27×15×9cm

Η δοκός ισορροπίας, με πάχος και πλάτος 2cm, τοποθετείται σε ύψος 29cm, στο πάνω μέρος δύο παράλληλων ικριωμάτων, που απέχουν μεταξύ τους απόσταση 46cm. Κάτω από τη δοκό τοποθετείται το κλουβί Α και σε συνέχεια της παραπάνω διάταξης, εφαπτόμενο εξωτερικά του ενός εκ των δύο ικριωμάτων το κλουβί Β.



Εικόνα 2: Πειραματική διάταξη ελέγχου ισορροπίας

Για την αξιολόγηση των ευρημάτων της νευρολογικής εξέτασης χρησιμοποιήθηκε το «Φύλλο αξιολόγησης εστιακού νευρολογικού ελλείμματος» (Εικόνα 3).

Η Εκτίμηση Νευρολογικών Ελλειμμάτων περιλαμβάνει τις παρακάτω δοκιμασίες:

ι. Δοκιμή γενικής ισορροπίας (“General balance test”): Προσεκτική τοποθέτηση των μπροστινών ποδιών του αρουραίου στο άκρο της δοκού ισορροπίας (Εικόνα 2), κράτημα της ουράς του με το ένα χέρι και υποστήριξη του σώματος του με το άλλο και παρατήρηση της συμπεριφοράς του για 15 δευτερόλεπτα.

- ii. Έλεγχος προσγείωσης (“Landing test”): Ελεύθερη πτώση του αρουραίου από τη δοκό ισορροπίας (ύψος $\leq 29\text{cm}$) στο κλουβί Α, με τα πόδια στραμμένα προς τα κάτω και παρατήρηση της συμπεριφοράς κατά τη προσγείωση.
- iii. Έλεγχος ανύψωσης ουράς (“Tail raise test”): Ανύψωση του αρουραίου από τη βάση της ουράς στον αέρα σε ύψος $\sim 40\text{cm}$ και παρατήρηση των αντανάκλαστικών των πρόσθιων και οπίσθιων ποδιών για 15 δευτερόλεπτα (κάμψη και έκταση).
- iv. Έλεγχος συρσίματος (“Drag test”): Τοποθέτηση του αρουραίου σε κλουβί ή παρόμοια επίπεδη επιφάνεια με το ρύγχος του σε κοντινή απόσταση από έναν από τους τοίχους. Κράτημα από τη βάση της ουράς του και σύρσιμο με σταθερή ταχύτητα 20cm/sec κατά μήκος του κλουβιού.

Εκτίμηση Νευρολογικών Ελλειμμάτων				
Ημερομηνία: __ / __ / __ Ωρα: __ : __		Πειραματόζωο: #__		
Δοκιμή	0 Φυσιολογικό	1 Μερική δυσλειτουργία	2 Σοβαρό έλλειμμα	Σκορ
1. Γενική ισορροπία & βάδιση (General balance test)	Φυσιολογική ισορροπία και βάδιση	Έλλειψη βάδισης, αλλά διατήρηση ισορροπίας	Πλήρης έλλειψη ισορροπίας ή πτώση	
2. Προσγείωση (Landing test)	Φυσιολογική αντίδραση προσγείωσης	Μερική ή καθυστερημένη αντίδραση	Καμία αντίδραση / κάθετη πτώση	
3. Ανύψωση από την ουρά (Tail raise test)	Φυσιολογικό αντανάκλαστικό έκτασης	Μερική/ασθενής έκταση	Απουσία αντανάκλαστικού	
4. Έλεγχος συρσίματος (Drag test)	Κανονική έκταση & αντίσταση	Μερική αντίδραση	Καμία ανταπόκριση	
5. Αντανάκλαστικό ανόρθωσης (Righting reflex)	Πλήρης και άμεση ανόρθωση	Μερική ή καθυστερημένη ανόρθωση	Καμία ανόρθωση	
6. Αντανάκλαστικό αυτιού (Ear reflex)	Φυσιολογική αντίδραση	Μερική αντίδραση	Απουσία αντίδρασης	
7. Αντανάκλαστικό οφθαλμού (Eye reflex)	Φυσιολογικός βλεφαρισμός	Μερικός ή καθυστερημένος	Καμία αντίδραση	
8. Ανταπόκριση σε ήχο (Startle reflex)	Άμεση κινητική αντίδραση	Αργή ή χωρίς πάγωμα	Απουσία ανταπόκρισης	
9. Αντανάκλαστικό ουράς (σε ερέθισμα) (Tail reflex)	Άμεση απόσυρση / συστροφή	Καθυστερημένη ή ανεπαρκής αντίδραση	Καμία ανταπόκριση	
10. Αντανάκλαστικό κάμψης άκρου (Paw flexion reflex)	Φυσιολογική κάμψη (withdrawal)	Μερική / υποτονική	Καμία κάμψη	
				__/20

Εικόνα 3: Φύλλο αξιολόγησης εστιακού νευρολογικού ελλείμματος

- v. Αντανάκλαστικό ανόρθωσης (“Righting reflex”): Τοποθέτηση του αρουραίου σε ύπτια θέση και καταγραφή της συμπεριφοράς του (προσπάθεια ανόρθωσης).
- vi. Αντανάκλαστικό αυτιού (“Ear reflex”): Ελαφρύ άγγιγμα έξω ακουστικού πόρου με το βαμβακερό άκρο μίας μπατονέτας και καταγραφή αντιδράσεων. Επανάληψη για το άλλο αυτί.

- vii. Αντανακλαστικό ματιού (“Eye reflex”): Απαλό άγγιγμα ματιού με το βαμβακερό άκρο μίας μπατονέτας και καταγραφή αντιδράσεων. Επανάληψη για το άλλο μάτι.
- viii. Αντανακλαστικό ήχου (“Sound reflex”): Σύντομο, απότομο, δυνατό χτύπημα χεριών (ο αρουραίος βρίσκεται σε απόσταση 10-15cm από τα χέρια με το ρύγχος του προς την αντίθετη κατεύθυνση).
- ix. Αντανακλαστικό ουράς (“Tail reflex”): Δυνατό τσίμπημα με τα χέρια ή με λαβίδα μεταξύ της μέσης και της βάσης της ουράς. Για να εξασφαλιστεί ότι η πίεση που ασκείται σε κάθε τσίμπημα είναι η ίδια, η ουρά τοποθετείται επί της άρθρωσης του δείκτη και πιέζεται με την άκρη του αντίχειρα.
- x. Αντανακλαστικό κάμψης ποδιού (“Paw flexion reflex”): Κράτημα αρουραίου με το ρύγχος του προς την αντίθετη κατεύθυνση με το ένα χέρι. Έκταση του πίσω ποδιού μακριά από το σώμα με το άλλο χέρι και δυνατό τσίμπημα με τα χέρια στο πέλμα του ποδιού. Επανάληψη και για τα δύο πίσω πόδια (*Yarnell et al, 2016*).

Τα εστιακά νευρολογικά ελλείματα αξιολογούνται με βάση μια κλίμακα τριών σημείων, σύμφωνα με την οποία η φυσιολογική αντίδραση καταγράφεται ως “0”, η μερική ή καθυστερημένη αντίδραση ως “1” και η απουσία αντίδρασης ως “2” (*Yarnell et al, 2016*). Η κατηγοριοποίηση της βαρύτητας των νευρολογικών ελλειμμάτων γίνεται με βάση τον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Κατηγοριοποίηση βαρύτητας νευρολογικών ελλειμμάτων

Συνολικό Σκορ (0–20)	Ερμηνεία
0–2*	Φυσιολογικό
3–5	Ήπια νευρολογικά ελλείματα
6–10	Μέτρια νευρολογικά ελλείματα
11–20	Σοβαρά νευρολογικά ελλείματα

*: Η τιμή “2” δεν μπορεί να προέχεται από σοβαρό νευρολογικό έλλειμμα όπως αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Εκτίμηση της συμπεριφοράς του πειραματόζωου

Για την μελέτη της συμπεριφοράς των πειραματόζωων, εφαρμόζονται πειράματα μνήμης-μάθησης: αναγνώριση καινούργιου αντικειμένου (“Novel object recognition test” – NORT), άγχους: ανοιχτό πεδίο (“Open field test” – OFT), φωτεινό/σκοτεινό πεδίο (“Light-dark box test” – LDBT) και κατάθλιψης: αναγκαστική κολύμβηση (“Forced swim test” – FST).

Πριν την έναρξη της εκτίμησης της συμπεριφοράς, προηγείται ηρέμηση (“handling”) των πειραματόζωων για 2 εβδομάδες, 1 φορά την ημέρα για 5 λεπτά, με σκοπό τον περιορισμό του στρες που προκαλείται από τον πειραματικό χειρισμό και την βελτίωση της απόδοσης τους στα πειράματα συμπεριφοράς (*Costa et al, 2012*). Διατηρείται συνέπεια ως προς τη χρονική διάρκεια και τη συχνότητα της ηρέμησης για κάθε ζώο και κάθε πειραματική ομάδα (*Leger et al, 2013*).

Επειδή οι συμπεριφορικές αποκρίσεις των τρωκτικών επηρεάζονται από τον κιρκάδιο ρυθμό και το κύκλο φωτός/σκότους τα πειράματα μελέτης συμπεριφοράς πραγματοποιούνται μεταξύ 8:00π.μ και 13:00μ.μ. (*Leger et al, 2013*).

Τα πειραματόζωα μεταφέρονται στην αίθουσα του πειράματος τουλάχιστον 60 λεπτά πριν από την έναρξη κάθε δοκιμασίας, με ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό. Τα ζώα σημαίνονται με μαρκαδόρο στη βάση της ουράς τους για αναγνώριση, αν κρίνεται απαραίτητο. Ζυγίζονται καθημερινά και η μεταβολή του βάρους υπολογίζεται με βάση την εξίσωση (*On Wah et al, 2018*):

$$\% \text{ Μεταβολή βάρους} = \frac{\text{Βάρος την ημέρα της ζύγισης} - \text{Βάρος την ημέρα της ένεσης}}{\text{Βάρος την ημέρα της ένεσης}} \times 100$$

Αξιολόγηση Μνήμης/Γνωστικής Λειτουργίας

I. Δοκιμασία αναγνώρισης καινούργιου αντικειμένου (NORT)

Η δοκιμασία NORT κατατάσσεται στην κατηγορία των πειραμάτων μνήμης και μάθησης (*Rodriguez et Wetsel, 2006*). Εφαρμόζεται για τη μελέτη ενός ευρέος φάσματος γνωστικών και νευροψυχολογικών παραμέτρων και βασίζεται στην εγγενή τάση των αρουραίων για προσέγγιση και εξερεύνηση νέων αντικειμένων. Όταν εκτεθούν σε ένα καινούργιο ταυτόχρονα με ένα γνωστό αντικείμενο, οι αρουραίοι πλησιάζουν συχνότερα και ξοδεύουν περισσότερο χρόνο για να εξερευνήσουν το καινούργιο σε σύγκριση με το παλιό αντικείμενο (*Ennaceur, 2010*).

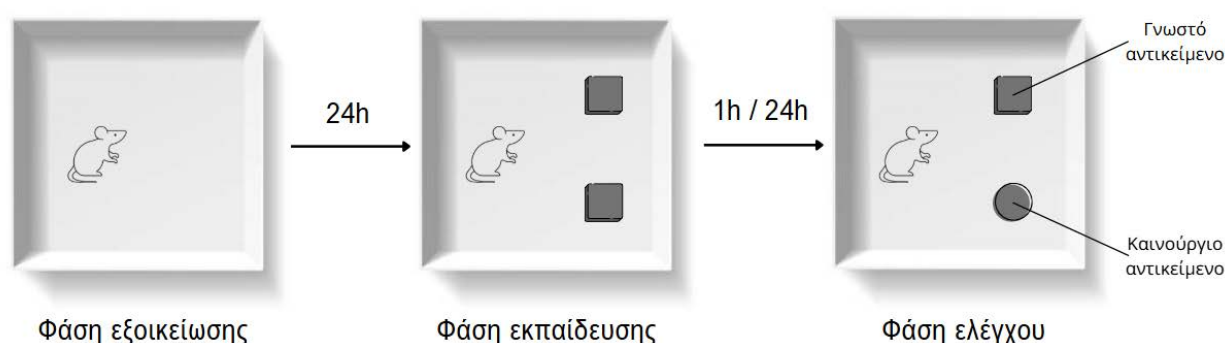
Η εξερεύνηση των αντικειμένων λαμβάνει χώρα μέσα σε ένα ξύλινο, λευκό κουτί, εσωτερικών διαστάσεων: 70cm(μήκος)×70cm(πλάτος)×50cm(ύψος). Κάθε αντικείμενο τοποθετείται σε καθορισμένη θέση, ώστε το κέντρο του να απέχει απόσταση ίση με 17cm από τα τοιχώματα της κάθε πλευράς του κουτιού (*Bekci et al, 2024*).



Εικόνα 4: Αντικείμενα (κύβος και κύλινδρος) που χρησιμοποιήθηκαν στη δοκιμασία αναγνώρισης καινούργιου αντικειμένου (“Novel object recognition test” – NORT)

Τα αντικείμενα που χρησιμοποιήθηκαν, εμφανίζουν διακριτές διαφορές ως προς το σχήμα, το χρώμα και το υλικό κατασκευής, όμως είναι παρόμοια όσον αφορά την προσιτότητα, το μέγεθος και την πολυπλοκότητα. Η επιλογή τους βασίζεται στον αποκλεισμό της εξερεύνησης λόγω θελκτικότητας ή προτίμησης από τα πειραματόζωα (*Ennaceur, 2010*). Πρόκειται για ένα μεταλλικό κύβο με ακμή ίση με 8cm και ένα κύλινδρο διαμέτρου 7cm και ύψους 7.5cm (Εικόνα 4).

Η δοκιμασία αναγνώρισης καινούργιου αντικειμένου διακρίνεται σε τρία στάδια: εξοικείωση, εκπαίδευση και έλεγχος (Εικόνα 5):



Εικόνα 5: Τα στάδια της δοκιμασίας αναγνώρισης καινούργιου αντικειμένου (“Novel object recognition test” – NORT)

I. Φάση εξοικείωσης: Εγκλιματισμός πειραματόζωων σε δοκιμαστικό κουτί: Ο αρουραίος τοποθετείται για 5 λεπτά μέσα στο άδειο κουτί όπου διενεργείται η δοκιμασία, κοιτώντας προς την αντίθετη πλευρά από εκείνη όπου πρόκειται να τοποθετηθούν τα αντικείμενα, για 5 λεπτά ελεύθερης εξερεύνησης.

II. Φάση εκπαίδευσης: Αναφέρεται αλλιώς ως Δοκιμασία 1 ή Δοκιμασία δείγματος. Δύο πανομοιότυπα αντικείμενα τοποθετούνται σε συγκεκριμένες θέσεις στο δοκιμαστικό κουτί (π.χ. σε μικρή απόσταση από την αριστερή και την δεξιά πίσω γωνία). Ο αρουραίος τοποθετείται μέσα στο κουτί όπου διενεργείται η δοκιμασία, με το ρύγχος του προς την αντίθετη πλευρά από εκείνη των αντικειμένων και αφήνεται ελεύθερος να εξερευνήσει για 5 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, μετράται ο χρόνος εξερεύνησης κάθε αντικειμένου.

III. Φάση ελέγχου: Αναφέρεται και ως Δοκιμασία 2 ή Δοκιμασία επιλογής. Μετά από μεσοδιάστημα μίας ώρας ή 24 ωρών, το ένα εκ των δύο όμοιων αντικειμένων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη φάση εκπαίδευσης αντικαθίσταται από ένα νέο αντικείμενο. Ο αρουραίος υποβάλλεται στην ίδια διαδικασία και καταγράφεται ο χρόνος εξερεύνησης του γνωστού και του καινούργιου αντικείμενο (*Mathiasen & DiCamillo, 2010; Vogel-Ciernia et al, 2014*).

Η ίδια σειρά φάσεων εφαρμόζεται σε όλα τα πειραματόζωα. Μετά από κάθε πείραμα, το κουτί και τα αντικείμενα καθαρίζονται σχολαστικά με αιθανόλη 70%, ώστε να αποκλειστεί η επίδραση της οσμής στην αναγνώριση των αντικειμένων (*Vogel-Ciernia et al, 2014*).

Ως εξερεύνηση ορίζεται η αλληλεπίδραση του αρουραίου με το αντικείμενο, όταν η μύτη του αρουραίου βρίσκεται στραμμένη προς την κατεύθυνση του αντικειμένου, σε απόσταση $\leq 1\text{cm}$, ώστε μία νοητή γραμμή από τα μάτια προς τη μύτη να τέμνει το αντικείμενο. Όταν ο αρουραίος στέκεται, κινείται, επιδίδεται σε μια επαναλαμβανόμενη συμπεριφορά γύρω από το αντικείμενο ή ανεβαίνει πάνω σε αυτό, δεν θεωρείται ότι εξετάζει το αντικείμενο (*Vogel-Ciernia & Wood, 2014*).

Η απόδοση της δοκιμασίας ποσοτικοποιείται με την βοήθεια του δείκτη διάκρισης (“Discrimination Index” – DI), ο οποίος ισοδυναμεί με την διάρκεια εξερεύνησης για το νέο ($T_{(new)}$) συγκριτικά με του παλιό αντικείμενο ($T_{(old)}$), σε αναλογία με τον συνολικό χρόνο εξερεύνησης ($T_{(total)}$), όπως αποτυπώνεται στην ακόλουθη εξίσωση. Ο δείκτης διάκρισης αντικατοπτρίζει την διακριτική ικανότητα και θεωρείται μέτρο της ευαισθησίας της μνήμης αναγνώρισης (*Sivakumaran et al, 2018*).

$$DI = \frac{T_{(new)} - T_{(old)}}{T_{(total)}}$$

Επιπλέον, ως μέτρο αναγνώρισης χρησιμοποιούνται ο δείκτης αναγνώρισης (“Recognition Index” – RI) και το διαφορικό σκορ (“Difference score” – DS), οι οποίοι αντιπροσωπεύουν το ποσοστό του χρόνου που αφιερώθηκε στην εξερεύνηση του νέου αντικειμένου (T_N) σε σχέση με το συνολικό χρόνο που αφιερώθηκε στην εξερεύνηση και των δύο αντικειμένων ($T_N + T_F$) και τη διαφορά ως προς το χρόνο που αφιερώθηκε για την εξερεύνηση του καινούργιου (T_N) σε σχέση με το οικείο αντικείμενο (T_F) αντίστοιχα (*Antunes & Biala, 2012; Kenney et al, 2011*).

$$RI = \frac{T_N}{T_N + T_F}$$

$$DS = T_N - T_F$$

όπου $N(Novel)$: το καινούργιο αντικείμενο και $F(Familiar)$: το γνωστό αντικείμενο

Η ανάλυση της δοκιμασίας έγινε χειροκίνητα σύμφωνα με τον ορισμό της εξερεύνησης. Για κάθε πειραματόζωο υπολογίστηκαν ο δείκτης διάκρισης (DI), ο δείκτης αναγνώρισης (RI) και το διαφορικό σκορ (DS) κατά τη φάση εκπαίδευσης και τη φάση ελέγχου.

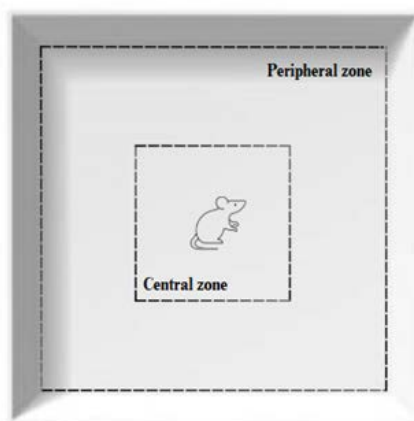
Αξιολόγηση Άγχους

Τα συμπεριφορικά πειράματα μελέτης του άγχους βασίζονται σε θεμελιώδεις αρχές της φύσης των αρουραίων. Από τη μία, οι αρουραίοι απεχθάνονται και αποφεύγουν ενστικτωδώς τους φωτεινούς και ανοιχτούς χώρους. Από την άλλη, διαθέτουν μια έμφυτη περιέργεια, που τους οδηγεί προς την εξερεύνηση ενός καινούργιου περιβάλλοντος. Στις δοκιμασίες ανοιχτού πεδίου (OFT) και φωτεινού-σκοτεινού πεδίου (LDBT), ο συνδυασμός δύο αντικρουόμενων ενστίκτων αποτελεί στρεσογόνο συνθήκη για τους αρουραίους και επιτρέπει την μελέτη της αγχώδης συμπεριφοράς τους (*Reddy et al, 2024*).

I. Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (OFT)

Η φάση της εξοικείωσης, που κρίνεται απαραίτητη για την οικειοποίηση των πειραματοζώων με την πειραματική διάταξη και προηγείται των φάσεων της εκπαίδευσης και του ελέγχου κατά την αναγνώριση καινούργιου αντικειμένου μπορεί να εκτιμηθεί ως μία δοκιμασία ανοιχτού πεδίου.

Το κεντρικό τμήμα του ανοιχτού πεδίου οροθετείται ως ένα νοητό τετράγωνο διαστάσεων 35cm×35cm (25% της συνολικής επιφάνειας), ενώ το περιφερειακό τμήμα καταλαμβάνει το υπόλοιπο μέρος του πεδίου (Εικόνα 6). Ο αρουραίος τοποθετείται στο κέντρο της πειραματικής αρένας και καταγράφεται η συμπεριφορά του στο χρονικό διάστημα 5 λεπτών ελεύθερης εξερεύνησης ενός καινούργιου περιβάλλοντος (*Reddy et al, 2024*).



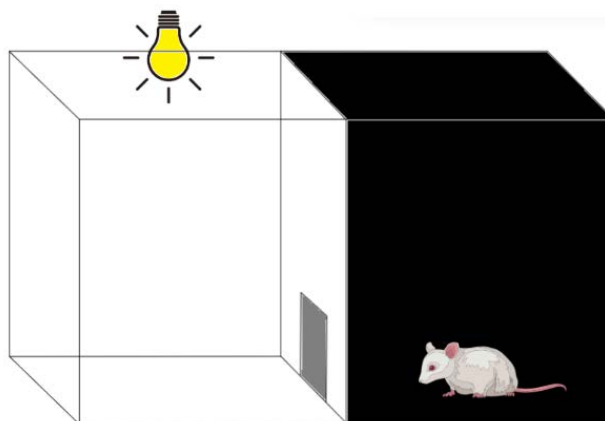
Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση της δοκιμασίας ανοιχτού πεδίου (“Open field test” – OFT)

Με τη βοήθεια του προγράμματος ImageJ πραγματοποιείται χαρτογράφηση της πορείας του πειραματοζώου και εκτιμώνται οι εξής παράμετροι: η συνολική απόσταση που διανύθηκε, ο αριθμός των διαβιβάσεων στο κέντρο, η απόσταση και ο χρόνος σε κάθε διαμέρισμα του πεδίου (κέντρο και περιφέρεια). Τα αποτελέσματα εκφράζονται επίσης ως επί τοις εκατό ποσοστά του συνόλου.

Ο χρόνος που περνούν τα πειραματόζωα στην περιφέρεια υποδεικνύει τον βαθμό θιγμοταξίας τους. Η θιγμοταξία, δηλαδή η τάση παραμονής κοντά σε τοιχώματα, αποτελεί μέτρο αγχώδους συμπεριφοράς. Συνεπώς, όσο αυξάνεται ο χρόνος παραμονής στο περιφερειακό τμήμα του ανοιχτού πεδίου, τόσο μεγαλύτερη είναι η θιγμοταξία, η οποία συνιστά έγκυρο δείκτη άγχους (Seibenhener & Wooten, 2015).

II. Δοκιμασία φωτεινού-σκοτεινού πεδίου (LDBT)

Η πειραματική συσκευή (Εικόνα 7) είναι ένα ορθογώνιο κουτί εσωτερικών διαστάσεων 48×27×24cm, που υποδιαιρείται σε δύο ίσα μέρη (24×27×24cm). Το ένα διαμέρισμα διαθέτει μαύρα τοιχώματα και κλείνεται στο πάνω μέρος από μία σκουρόχρωμη ημιδιάφανη επιφάνεια, η οποία επιτρέπει την διέλευση φωτός έντασης ίσης με 5lux. Το άλλο διαμέρισμα έχει λευκά τοιχώματα και είναι ανοιχτό στην οροφή. Πάνω από το κέντρο του φωτεινού διαμερίσματος προσαρμόζεται μία λάμπα, ώστε η φωτεινότητα να ισοδυναμεί με 600lux. Τα δύο διαμερίσματα συνδέονται μεταξύ τους μέσω ενός μικρού ανοίγματος (10×10cm), που επιτρέπει την διάβαση του αρουραίου από το ένα στο άλλο (Pitsikas et al, 2019; Pitsikas et al, 2008; Grivas et al, 2013; Narayanan et al, 2018).



Εικόνα 7: Πειραματική συσκευή για τη δοκιμασία φωτεινού-σκοτεινού πεδίου (“Light-dark box test” – LDBT)

Κάθε αρουραίος τοποθετείται ξεχωριστά στο κέντρο του φωτεινού τμήματος της διάταξης, με τη πλάτη προς το άνοιγμα και αφήνεται ελεύθερος να εξερευνήσει για χρονικό διάστημα 10 λεπτών (File et al, 2005). Μετά από κάθε δοκιμασία, το κουτί καθαρίζεται με 70% αιθανόλη, προκειμένου να εξαλειφθούν οι οσμές και τα ίχνη (Serchov et al, 2016).

Για κάθε βίντεο εξετάζονται οι εξής παράμετροι: ο αριθμός των διαβάσεων από το άνοιγμα, ο συνολικός χρόνος παραμονής σε κάθε διαμέρισμα και η περίοδος αδράνειας πριν από την πρώτη μεταβίβαση από το φωτεινό στο σκοτεινό διαμέρισμα (File et al, 2005). Η είσοδος του αρουραίου σε ένα διαμέρισμα σηματοδοτείται από την τοποθέτηση των δύο μπροστινών ποδιών του μέσα σε αυτό, εκτός κι αν ο αρουραίος επιστρέψει στο αρχικό διαμέρισμα (Serchov et al, 2016).

Αξιολόγηση Καταθλιπτικής Συμπεριφοράς

I. Δοκιμασία αναγκαστικής κολύμβησης (FST)

Η δοκιμασία αναγκαστικής κολύμβησης (FST) στηρίζεται στην έμφυτη τάση των αρουραίων να δραπετεύσουν, όταν βρεθούν σε ένα αποκρουστικό και περιοριστικό περιβάλλον, όπως ένας διαφανής κύλινδρος με νερό. Αρχικά επιδίδονται σε μια έντονη προσπάθεια διαφυγής, ενώ μετά από μερικά λεπτά την ενεργητικότητα τους διαδέχεται η ακινησία ως εκδήλωση παραίτησης (*Drayson et al, 2023*).

Ως πειραματική συσκευή χρησιμοποιείται ένα γυάλινο κυλινδρικό δοχείο διαμέτρου 20cm και ύψους 40cm (Εικόνα 8), το οποίο περιέχει νερό θερμοκρασίας 23-25°C σε βάθος 30cm. Η κύρια διαφορά της τροποποιημένης σε σχέση με την κλασική δοκιμασία αναγκαστικής κολύμβησης αφορά στο βάθος του νερού, το οποίο τυπικά κυμαίνεται σε 13-18cm (*Slattery & Cryan, 2012; Chen et al, 2020*).



Εικόνα 8: Πειραματική συσκευή για τη δοκιμασία αναγκαστικής κολύμβησης (“Forced Swim Test” – FST)

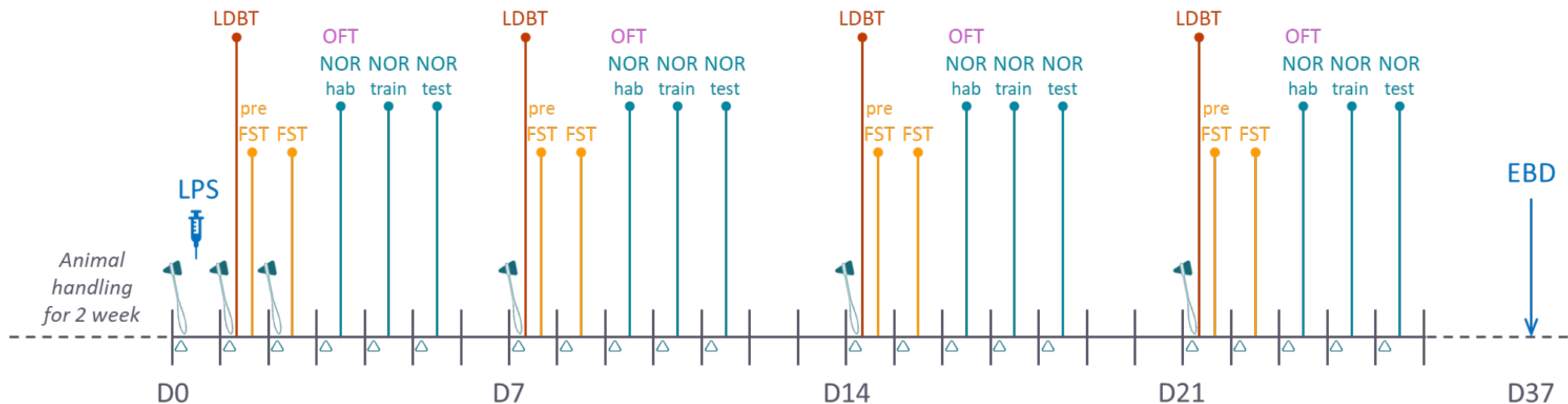
Η FST διεξάγεται σε δύο μέρες. Την πρώτη μέρα λαμβάνει χώρα η δοκιμασία προ-ελέγχου (“pre-test”), κατά την οποία ο αρουραίος τοποθετείται στο πειραματικό κύλινδρο και αφήνεται να κολυμπήσει για 15 λεπτά. Την επόμενη μέρα, κατά τη δοκιμασία ελέγχου, ο αρουραίος τοποθετείται εκ νέου στο κύλινδρο για 5 λεπτά και καταγράφεται η διάρκεια ακινησίας. Μετά την απομάκρυνση του από το κύλινδρο, ο αρουραίος στεγνώνεται με τη χρήση μιας βαμβακερής πετσέτας και μεταφέρεται προσωρινά σε ένα ξεχωριστό κλουβί μέχρι να στεγνώσει τελείως και να επιστραφεί στο ζωοτροφείο. Ο όρος «ακινησία» (“immobility”) υποδηλώνει τις ελάχιστες κινήσεις που απαιτούνται αυστηρά και μόνο για την αποτροπή του πνιγμού και την διατήρηση του κεφαλιού πάνω από την επιφάνεια του νερού. Η πρώτη δοκιμασία πραγματοποιείται με στόχο την εξοικείωση των πειραματοζώων στο πειραματικό περιβάλλον και την γρηγορότερη εκδήλωση της

ακινήσιος κατά την δοκιμασία ελέγχου. Επομένως, κατά την πρώτη δοκιμασία δεν απαιτείται η καταμέτρηση του διαστήματος ακινήσιος (*Castagné et al, 2010; Yankelevitch-Yahav et al, 2015*).

Με σκοπό την ελαχιστοποίηση της αντανάκλασης και την βέλτιστη βιντεοσκόπηση, επιλέγεται το φόντο που παρέχει την μέγιστη δυνατή αντίθεση και η κάμερα στερεώνεται οριζόντια ως προς επιφάνεια του νερού, σε απόσταση 90cm από το κυλινδρικό δοχείο, στο επίπεδο του οποίου η ένταση του φωτισμού είναι 100–120 lux. Η θέση της κάμερας παραμένει σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια των βιντεοσκοπήσεων (*Nandi et al, 2021*).

Η ανάλυση πραγματοποιείται με τη βοήθεια του προγράμματος DBscorer (Depression Behavior Scorer) (<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0305-21.2021>). Η «ακινήσια» εκφράζεται ως επί τοις εκατό ποσοστό του συνολικού χρόνου της δοκιμασίας.

Για το χρόνο που επιλέχτηκε να γίνουν οι δοκιμασίες εκτίμησης της συμπεριφοράς λήφθηκαν υπόψιν τα προτεινόμενα μεσοδιαστήματα για την επανάληψη των δοκιμών, παρότι υποστηρίζεται ότι το διάστημα μεταξύ των περισσότερων δοκιμών δεν επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την συνολική απόδοση των πειραματοζώων (*Paylor et al, 2006; Cnops et al, 2022*). Η σειρά των δοκιμών συμπεριφοράς (LDBT, FST, NOR) επαναλαμβάνεται κάθε 1 εβδομάδα, για συνολικό διάστημα 4 εβδομάδων (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Χρονοδιάγραμμα πειραμάτων.

Συντμήσεις: **LPS**: Lipopolysaccharide (λιποπολυσακχαρίτης), **LDBT**: Light-dark box test (δοκιμασία φωτεινού/σκοτεινού πεδίου), **FST**: Forced swim test (δοκιμασία αναγκαστικής κολύμβησης), **preFST**: δοκιμασία προκαταρκτικού ελέγχου, **OFT**: Open field test (δοκιμασία ανοιχτού πεδίου), **NOR**: Novel object recognition (αναγνώριση καινούργιου αντικειμένου), **NOR hab** (habituation): φάση εξοικείωσης στο χώρο, **NOR train**: φάση εκμάθησης αντικειμένων, **NOR test**: φάση ελέγχου, **EBD**: Evans blue dye (χρωστική Evans blue)

: νευρολογική εξέταση. : ζύγιση βάρους ζώων

Έλεγχος της ακεραιότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού – Ποσοτικός προσδιορισμός της χρωστικής Evans blue σε ομογενοποίηση εγκεφάλου

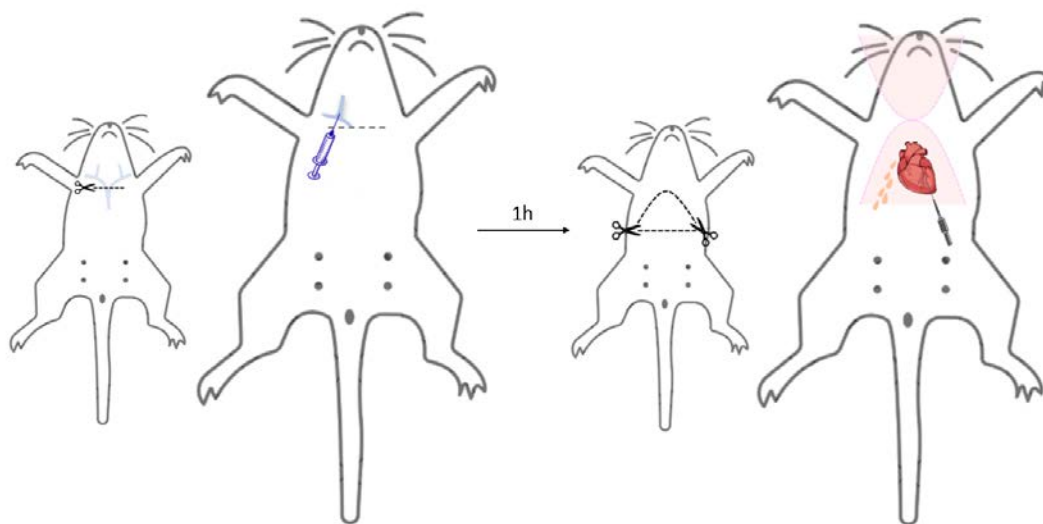
Η χρωστική Evans blue (EB), η οποία μπορεί να αναφέρεται ως “Evans blue dye” (EBD), είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος δείκτης για τη διερεύνηση της ακεραιότητας του εγκεφαλικού φραγμού σε *in vivo* πειράματα ζωικών μοντέλων, παρά ορισμένους περιορισμούς που μπορεί να παρουσιάζει η χρήση της (*Petronilho et al, 2019*). Χαρακτηρίζεται ως μη τοξική και ανενεργή ουσία, με υψηλά επίπεδα σύνδεσης με την αλβουμίνη και έλλειψη κυτταρικής πρόσληψης (*Wang & Lai, 2014*). Ωστόσο, η ταυτόχρονη παρουσία της EBD σε ελεύθερη μορφή και συνδεδεμένη με αλβουμίνη ή άλλες πρωτεΐνες πλάσματος (μη ειδική σύνδεση με αλβουμίνη), καθώς και η πιθανή σύνδεση της σε ιστούς, δυσχεραίνει την ποσοτικοποίηση, η οποία συνιστά τον κυριότερο περιορισμό στην χρήση της. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της χρωστικής γίνεται με διάφορες φασματοσκοπικές μεθόδους: χρωματομετρία, φασματοφωτομετρία και φθοροφασματομετρία (η EBD παρουσιάζει φυσικό φθορισμό) (*Saunders et al, 2015*).

Η ανίχνευση της EBD στο εγκεφαλικό παρέγχυμα υποδηλώνει διαταραχή του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (BBB) (*Wang & Lai, 2014*). Για την μελέτη της διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού με τη χρήση της EBD (Sigma-Aldrich, E2129), τα πειραματόζωα αρχικά αναισθητοποιούνται με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση (i.p.) Τιλεταμίνης και Ζολαζεπάμης (Zoletil®) σε δόση 15mg/kg και 15mg/kg (30mg/kg) αντίστοιχα και Ξυλαζίνης (Rompun®) για την μυοχάλαση, σε δόση 21.4mg/kg. Ενώ το ζώο βρίσκεται σε βαθιά αναισθησία, γίνεται αποκάλυψη της σφαγίτιδας φλέβας και έγχυση του διαλύματος EBD (2% w/v σε φυσιολογικό ορό) σε συνολική δόση 3ml/kg. Σε επιτυχή χορήγηση της EBD, τα μάτια, η μύτη και το δέρμα του αρουραίου αποκτούν μπλε χρώμα μέσα σε διάστημα 10sec από την ένεση (*Goldim et al, 2019; Panahpour et al, 2018*) (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Ραχιαία όψη αρουραίου μετά από τη χορήγηση EB

Μία ώρα μετά τη χορήγηση της χρωστικής ακολουθεί ενδοκαρδιακή διάχυση (“perfusion”) με φυσιολογικό ορό (0.9% NaCl) για την απομάκρυνση του διαλύματος EBD από την κυκλοφορία του αίματος. Για τη διάχυση, αν χρειάζεται η αναισθησία επαναλαμβάνεται. Ο αρουραίος τοποθετείται σε ύπτια θέση και τα πόδια του σταθεροποιούνται στην επιφάνεια. Με τομή κάτω από τον θώρακα και άνοιγμα της θωρακικής κοιλότητας αποκαλύπτεται η καρδιά. Γίνεται τρύπημα της αριστερής του κοιλίας και χορήγηση φυσιολογικού ορού ~250ml υπό συνεχή ροή και πίεση 110 mmHg μέχρι το υγρό απορροφά από τον δεξιό κόλπο να είναι τελείως καθαρό (*Petronilho et al, 2019*) (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση της χειρουργικής διαδικασίας χορήγησης της χρωστικής Evans blue, μέσω της σφαγίτιδας φλέβας, που ακολουθείται από ενδοκαρδιακή διάχυση, έπειτα από άνοιγμα της θωρακικής κοιλότητας μία ώρα μετά.

Μετά τον αποκεφαλισμό των πειραματόζων, ο εγκέφαλος απομονώνεται και διχοτομείται. Το ένα ημισφαίριο φυλάσσεται στους -80°C μέχρι την ποσοτικοποίηση της EB, ενώ το άλλο ημισφαίριο μονιμοποιείται και χρησιμοποιείται για τη δημιουργία τομών.

Μονιμοποίηση ιστού: Από το ημισφαίριο λαμβάνονται τομές πάχους 1mm παράλληλες προς τη μέση γραμμή, οι οποίες κόβονται σε μικροτόμο (McIlwain Tissue Chopper MTC/2E). Για την μονιμοποίηση τους, οι τομές μεταφέρονται σε διάλυμα 4% w/v παραφορμαλδεΰδης (paraformaldehyde – PFA) για 1 ώρα και έπειτα σε διάλυμα 30% w/v σουκρόζης έως καταβύθισης, με σκοπό τη κρυοπροστασία και τη διατήρηση της μορφολογίας του ιστού. Ακολουθεί ταχεία ψύξη των τομών με τη βοήθεια ισοπεντανίου και αποθήκευση στους -80°C μέχρι την συλλογή οβελιαίων τομών στο κρυοτόμο (*Xu et al, 2019*).

Ποσοτικός προσδιορισμός της χρωστικής Evans blue στον εγκεφαλικό ιστό: Αρχικά πραγματοποιείται ζύγιση των ημισφαιρίων, τα οποία βρίσκονται αποθηκευμένα στους -80°C . Σε κάθε δείγμα προστίθεται ορισμένη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος (Phosphate Buffered Saline – PBS, Πίνακας 2) και γίνεται ομογενοποίηση με τη βοήθεια μηχανικού ομογενοποιητή (Reidolph SilentCrusher S).

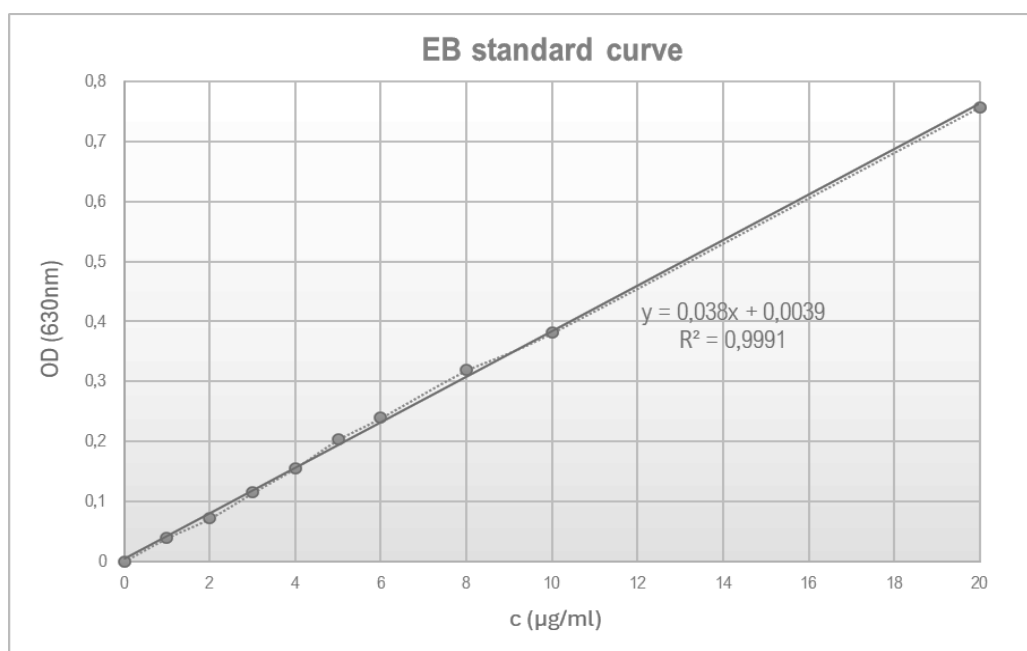
Πίνακας 2: Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος PBS 0.2M (pH=7.4)

Διάλυμα	Τελική συγκέντρωση
Na ₂ HPO ₄	20mM
KH ₂ PO ₄	3.6mM
KCl	5.4mM
NaCl	274mM

Η ρύθμιση του pH γίνεται με τη προσθήκη σταγόνων 4% w/v NaOH.

Ένα τμήμα του ομογενοποιημάτος συλλέγεται και αποθηκεύεται στους -20°C για την μέτρηση της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford, ενώ το υπόλοιπο ομογενοποίημα αξιοποιείται για τον προσδιορισμό της χρωστικής Evans blue ως εξής:

Μετά από προσθήκη PBS 0,2M (τελικός όγκος: 2,5ml) και 2.5ml τριχλωροξικού οξέος 60% (trichloroacetic acid – TCA), κάθε ομογενοποίημα φυγοκεντρείται σε επιτάχυνση 1.322g (200RPM) για 30 λεπτά, σε φυγόκεντρο (Centurion Scientific-K240R). Τα δείγματα αφήνονται σε ψυχρό θάλαμο (4 °C) για 10 λεπτά και ακολουθεί συλλογή του υπερκειμένου. Το υπερκείμενο κάθε δείγματος μεταφέρεται σε τριπλέτα σε 96-well plate, όπου πραγματοποιείται μέτρηση της απορρόφησης στα 630nm, με τη χρήση φασματοφωτομέτρου (BIO-TEK) και η ποσότητα της χρωστικής Evans blue σε κάθε δείγμα ποσοτικοποιείται με τη χρήση πρότυπης καμπύλης (Διάγραμμα 1), που δημιουργείται με πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 1-20μg/ml EB σε PBS 0.2M. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μg/g ιστού και μg/mg πρωτεΐνης (*Panahpour et al., 2018; Shim et al., 2013*).

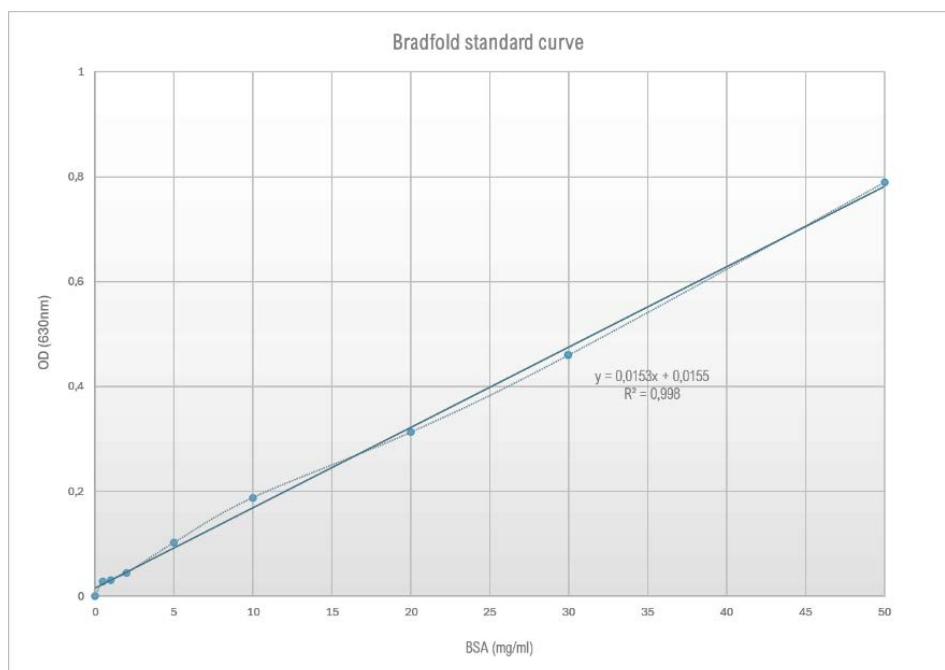


Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη Evans blue

Προσδιορισμός συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης

Η εκτίμηση της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης επιτυγχάνεται με την εφαρμογή της δοκιμασίας πρωτεΐνης Bradford (Bradford protein assay). Πρόκειται για μία γρήγορη και ευαίσθητη χρωματομετρική μέθοδο, που βασίζεται στη σύνδεση μεταξύ πρωτεΐνης και χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250. Ως αποτέλεσμα της δημιουργίας συμπλόκου με υψηλό συντελεστή απόσβεσης, παρατηρείται παράλληλα με την αλλαγή χρώματος του διαλύματος από κόκκινο σε μπλε, μετατόπιση του μεγίστου της απορρόφησης της χρωστικής σε υψηλότερο μήκος κύματος (από 465nm σε 595nm). Η ποσοτικοποίηση της ολικής πρωτεΐνης στα δείγματα καθίσταται δυνατή από την αντιστοίχιση της απορρόφησης της χρωστικής σε συγκεκριμένο μήκος κύματος με την συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης (*Bradford, 1976*).

Κατά την προετοιμασία των δειγμάτων, αξιοποιείται ένα τμήμα των ομογενοποιημάτων, το οποίο φυλάσσεται στους -20°C. Μετά από προσθήκη γνωστής ποσότητας PBS 0.2M σε κάθε δείγμα ομογενοποιηματος, ακολουθεί φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 10,000 στροφές το λεπτό για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία 4 °C με τη χρήση της φυγόκεντρου Heraeus Biofuge Fresco. Γίνεται λήψη του υπερκείμενου από τα δείγματα. Στη συνέχεια 5μl από το υπερκείμενο αναμιγνύονται με 795μl απεσταγμένου νερού (dH₂O) και 200μl αντιδραστηρίου Bradford, ενώ η υπόλοιπη ποσότητα μπορεί να αποθηκευτεί στους -20°C για περαιτέρω χρήση.



Διάγραμμα 2: Πρότυπη καμπύλη δοκιμασίας πρωτεΐνης Bradford

Το αντιδραστήριο Bradford περιέχει 0.01% w/v χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250, 4.7% w/v αιθανόλη (EtOH) και 8.5% w/v φωσφορικό οξύ (H₃PO₄) και παρασκευάζεται ως εξής: Πραγματοποιείται διάλυση 100mg χρωστικής σε 50ml 95% EtOH. Έπειτα από ανάδευση του διαλύματος, ακολουθεί προσθήκη 100ml 85% H₃PO₄ και συμπλήρωση με απεσταγμένο νερό

(dH₂O) έως τελικού όγκου 1L. Το διάλυμα φιλτράρεται και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

Για την μετατροπή των τιμών της απορρόφησης της χρωστικής σε συγκέντρωση πρωτεΐνης, δημιουργείται μία πρότυπη καμπύλη με διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης λευκωματίνης ορού βοοειδών (BSA) (Διάγραμμα 2). Ένα μητρικό διάλυμα BSA 1mg/ml αραιώνεται σε PBS 0,2M σε τελικές συγκεντρώσεις 0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 30 και 50 mg/mL. Σε κάθε διάλυμα προστίθεται σταθερή ποσότητα του αντιδραστηρίου Bradford.

Η μέτρηση της τιμής της απορρόφησης (630nm) πραγματοποιείται με τη χρήση φασματοφωτομέτρου BIO-TEK ταυτόχρονα για τα πρότυπα διαλύματα BSA και τα δείγματα. Τα δεδομένα της απορρόφησης αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών μετρήσεων σε 96-well plate.

Ιστοπαθολογική εξέταση τομών εγκεφάλου

Δημιουργία τομών σε κρυοτόμο

Οι τομές πάχους 1mm καλύπτονται περιμετρικά με Cryostat Matrix για την υποστήριξη και την προστασία του ιστού. Με τη χρήση της κρυοτόμου (Leica CM1850 Cryostat), μετά από προσαρμογή της κλίσης κοπής, λαμβάνονται τομές πάχους 10μm σε θερμοκρασία -20 °C. Οι τομές συλλέγονται σε αντικειμενοφόρες πλάκες ζελατινοποιημένες και Eppredia Superfrost™ (Thermo Fisher Scientific) (Collins et al, 2018).

Η ζελατινοποίηση των αντικειμενοφόρων πλακών πραγματοποιείται έπειτα από καθαρισμό με απορρυπαντικό και πλύσιμο με απεσταγμένο νερό για 3 φορές. Παρασκευάζεται διάλυμα ζελατίνης 1L με τη διάλυση 5g ζελατίνης (300 bloom) και 0,5g δωδεκαϋδρικού θειικού καλίου [CrK(SO₄)₂·12H₂O], υπό ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα, σε θερμοκρασία που δεν υπερβαίνει τους 45°C. Το διάλυμα ζελατίνης διηθείται με διηθητικό χωνί. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες εμβαπτίζονται 5 φορές για 5 δευτερόλεπτα στο διάλυμα ζελατίνης και αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 48 ώρες πριν τη χρήση.

Χρώση Αιματοξυλίνης/Ηωσίνης (H&E)

Για την παρατήρηση πιθανών ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων του εγκεφάλου των πειραματοζώων πραγματοποιείται χρώση των οβελιαίων τομών του εγκεφάλου με αιματοξυλίνη και ηωσίνη (H&E). Οι κυτταρικοί πυρήνες χρωματίζονται μωβ λόγω της αιματοξυλίνης, ενώ τα συστατικά του κυτταροπλάσματος αποκτούν ροζ απόχρωση από την ηωσίνη. Η χρώση των πυρήνων οφείλεται στο θετικό φορτίο της αιματίνης, του κύριου προϊόντος οξείδωσης της αιματοξυλίνης, το οποίο συμβάλλει στη σύνδεση της με τα ανιονικά συστατικά των ιστών, κυρίως την χρωματίνη. Για την αφαίρεση της περίσσειας αιματοξυλίνης και τη διαφοροποίηση των

πυρήνων από τα υπόλοιπα κυτταρικά ή εξωκυτταρικά στοιχεία, χρησιμοποιείται όξινο αλκοολικό διάλυμα. Πρόκειται για διάλυμα αιθανόλης 95% με περιεκτικότητα 0.01% v/v σε πυκνό υδροχλωρικό οξύ (37% HCl). Ακολούθως, το αντιδραστήριο Bluing δρα ξουδετερώνοντας την οξύτητα και σταθεροποιώντας τη χρωματική αντίθεση, καθώς μετατρέπει το χρώμα των πυρήνων από ερυθρό σε μπλε. Παρασκευάζεται με διάλυση 5 g θειικού μαγνησίου επταϋδρίτη ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, MW = 246.48 g/mol) και 0.875 g όξινου ανθρακικού νατρίου (NaHCO_3 , MW = 84.01 g/mol) σε 250 ml απεσταγμένου νερού (*Zhang & Xiong, 2014*).

Πριν από τη χρώση, τα δείγματα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου. Αρχικά οι ιστοί εμβαπτίζονται σε διαλύματα αλκοόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης για 2 λεπτά στο καθένα ξεχωριστά (50%, 70%, 95%, 100% αιθανόλη) και στη συνέχεια σε διάλυμα ξυλόλης 2 φορές για 10 λεπτά, με σκοπό τον καθαρισμό. Ακολουθεί η επανυδάτωση τους με εκ νέου εμβάπτιση σε διαλύματα αλκοόλης μειούμενης συγκέντρωσης (100%, 95%, 70% αιθανόλη) και τελικά νερό, ώστε να προστεθεί η αιματοξυλίνη (Hematoxylin H, Biognost).

Μετά από ξέπλυμα της χρωστικής με τρεχούμενο νερό βρύσης, οι αντικειμενοφόρες πλάκες βυθίζονται 4-5 φορές σε όξινο αλκοολικό διάλυμα και σε αντιδραστήριο Bluing για 30sec. Στη συνέχεια τοποθετούνται σε υδατικό διάλυμα Ηωσίνης (Eosin N° 45380, Mediplants) 1% w/v για 30sec. Έπειτα από την απομάκρυνση του ύδατος με τη χρήση αλκοολικών διαλυμάτων και την προσθήκη ξυλόλης, οι ιστοί αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Τα βήματα παρουσιάζονται επιγραμματικά παρακάτω (πίνακας 1).

Πίνακας 3: Διαδικασία χρώσης με Ηωσίνη και Αιματοξυλίνη

ΔΙΑΛΥΜΑ	ΧΡΟΝΟΣ
Αιθανόλη 50%	2min
Αιθανόλη 70%	2min
Αιθανόλη 95%	2min
Αιθανόλη 100%	2min
Ξυλόλη	10min (×2 φορές)
Αιθανόλη 100%	5min (×2 φορές)
Αιθανόλη 95%	2min (×2 φορές)
Αιθανόλη 70%	2min (×2 φορές)
Ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό	2sec
Αιματοξυλίνη	8min
Ξέπλυμα με νερό βρύσης	2min
Όξινο αλκοολικό διάλυμα	4-5 εμβάπτισεις
Ξέπλυμα με νερό βρύσης	2sec
Bluing agent	30sec
Ξέπλυμα με νερό βρύσης	8min
Ηωσίνη	30sec
Αιθανόλη 95%	2min (×2 φορές)
Αιθανόλη 100%	2min (×2 φορές)
Ξυλόλη	5min (×2 φορές)

Την επόμενη μέρα, ενσταλάζεται μικρή ποσότητα καστορελαίου σε κάθε τομή και οι αντικειμενοφόρες πλάκες επικαλύπτονται με καλυπτρίδα η οποία σφραγίζεται με διάφανο βερνίκι. Αφού ολοκληρωθεί η χρώση, οι αντικειμενοφόροι τοποθετούνται σε κασετίνα και φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου (*Zhang & Xiong, 2014*).

Στατιστική ανάλυση

Οι πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιούνται σε συμμόρφωση με τη συνθήκη των 3Rs (Replacement, Reduction, Refinement). Η αρχή της αντικατάστασης (Replacement) δεν είναι δυνατό να εφαρμοστεί για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης μελέτης. Ωστόσο, καταβάλλεται προσπάθεια περιορισμού του αριθμού των πειραματόζων (Reduction) και εξασφάλισης της βέλτιστης διαβίωσης και της μικρότερης δυνατής ταλαιπωρίας των ζώων (Refinement).

Ο υπολογισμός του αριθμού των ζώων που θα χρησιμοποιηθούν στη συγκεκριμένη μελέτη έγινε με βάση τη μελέτη των *Arifin & Zahiruddin (2017)* η οποία αφορά τον υπολογισμό του μεγέθους δείγματος για μελέτες σε ζώα με τη χρήση της προσέγγισης εξίσωσης πόρων (resource equation approach). Σύμφωνα με την προσέγγιση αυτή:

1. για τα πειράματα όπου ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων είναι ίσος με τη μονάδα (π.χ. μελέτη της διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού) και όπου για τη συλλογή των δειγμάτων είναι απαραίτητη η θανάτωση των ζώων, απαιτούνται για τα πείραμα 3 ομάδων ζώων 5-7 ζώα/ομάδα και εφαρμογή one-way ANOVA για ανεξάρτητη μεταβλητή, για την σύγκριση των ομάδων και t-test για σύγκριση μεταξύ 2 ομάδων.

2. για τις μελέτες συμπεριφοράς όπου ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων είναι ίσος 2 και όπου για τη συλλογή των δειγμάτων δεν είναι απαραίτητη η θανάτωση των ζώων, απαιτούνται για πείραμα 3 ομάδων ζώων 3-4 ζώα/ομάδα και για πειράματα όπου ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων είναι ίσος 4-6 και όπου για τη συλλογή των δειγμάτων δεν είναι απαραίτητη η θανάτωση των ζώων, απαιτούνται 2 ζώα/ομάδα και εφαρμογή μικτής ανάλυσης διακύμανσης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων.

Φυσικά, στη δεύτερη περίπτωση δεν είναι απαραίτητη η χρήση ζώων διαφορετικών από αυτών της πρώτης περίπτωσης, και προκειμένου να μην υπάρξει διαφοροποίηση ως προς το χειρισμό των πειραματόζων, ιστολογικά δείγματα θα συλλεχθούν από όλα τα ζώα και κατά συνέπεια κάθε ομάδα πειραματόζων θα απαρτίζεται από 5-7 ζώα.

Μετά από έλεγχο της κανονικότητας (Shapiro-Wilk test και Kolmogorov-Smirnov test), διαπιστώθηκε ότι τα πειραματικά δεδομένα ακολουθούν την κανονική κατανομή, απαραίτητη προϋπόθεση για την χρήση παραμετρικών στατιστικών μεθόδων. Υπό αυτή τη παραδοχή, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με την εφαρμογή unpaired t-test και

ordinary one-way ANOVA test, με τη βοήθεια των προγραμμάτων GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) και Jamovi. Λαμβάνεται ως στατιστικά σημαντική η διαφορά μεταξύ των τιμών για την οποία ισχύει: $p < 0.05$. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SEM.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

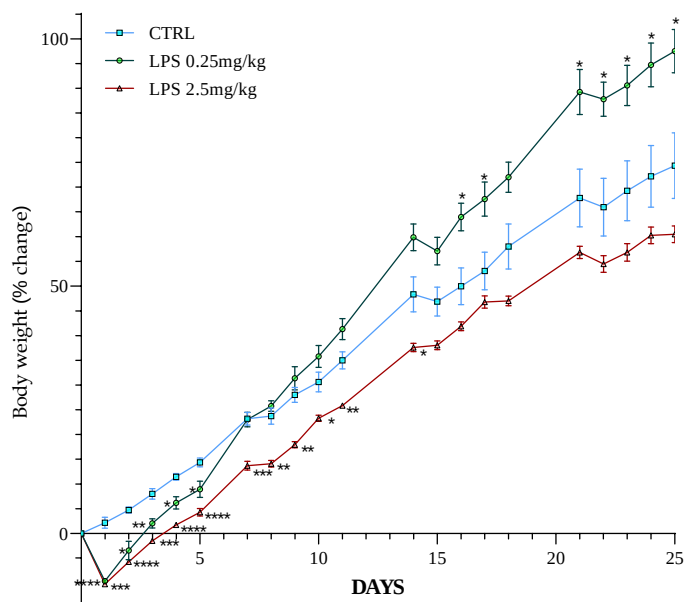
Μεταβολή του βάρους των πειραματόζωων μετά τη χορήγηση LPS

Το βάρος των πειραματόζωων, πριν την πειραματική διαδικασία (Ημέρα 0), δεν διέφερε σημαντικά για τα πειραματόζωα της κάθε ομάδας (Πίνακας 5). Πραγματοποιήθηκε καθημερινή ζύγιση των πειραματόζωων για χρονικό διάστημα 25 ημερών μετά από την ένεση. Η επί τοις εκατό μεταβολή του σωματικού βάρους, που υπολογίστηκε από την αντίστοιχη εξίσωση, παρουσιάζεται σε συνάρτηση με το χρόνο για κάθε ομάδα ξεχωριστά στο Διάγραμμα 3.

Πίνακας 4: Βάρος(g) της ομάδας ελέγχου (CTRL, N=6) και των ομάδων των πειραματόζωων που έλαβαν 0.25mg (LPS 0.25mg/kg, N=5) ή 2.5mg (LPS 2.5mg/kg, N=5) LPS/kg βάρους.
N:ο αριθμός των πειραματόζωων

Ημέρα	Ομάδα CTRL	Ομάδα LPS 0.25mg/kg	Ομάδα LPS 2.5mg/kg
0	167.2±13.26	144.8±3.44	187.2±1.02
1 ^η	171.3±15.01	130.8±2.65**	168.0±0.63
2 ^η	175.0±13.83	139.6±1.33*	176.4±0.98
3 ^η	180.3±13.97	147.6±2.13*	184.4±1.47
4 ^η	186.3±15.04	153.6±2.13*	190.4±1.60
5 ^η	191.0±14.83	157.6±2.99*	195.2±1.85
25 ^η	288.7±17.95	285.6±5.23	300.4±3.76

* $p < 0.05$ και ** $p < 0.001$ στατιστικά σημαντική διαφορά της ομάδας LPS 0.25mg/kg, σε σύγκριση με την ομάδα CTRL, two-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση σφάλματος



Διάγραμμα 3: Ποσοστιαία (%) μεταβολή σωματικού βάρους σε σχέση με την ημέρα της χορήγησης 0.9% NaCl ή LPS σε συνάρτηση με το χρόνο (ημέρες)

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ και **** $p < 0.0001$ στατιστικά σημαντική διαφορά των ομάδων πειραματόζωων που έλαβαν 0.25mg (LPS 0.25mg/kg, N=5) ή 2.5mg (LPS 2.5mg/kg, N=5) LPS/kg βάρους σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (CTRL, N=6), two-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση σφάλματος

Την 1^η εβδομάδα (ημέρα 1-5) μετά την i.p. χορήγηση LPS παρατηρείται σημαντική ($p < 0.05$) ελάττωση του σωματικού βάρους μόνο των ζώων της ομάδας LPS 0.25mg/kg, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Πίνακας 5). Μετά από 25 μέρες το βάρος των πειραματόζωων δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ των ομάδων (Πίνακας 5).

Όταν υπολογίστηκε η ποσοστιαία (%) μεταβολή του βάρους διαπιστώθηκε ότι η επί τοις εκατό μεταβολή σωματικού βάρους για την ομάδα LPS 0.25mg/kg αγγίζει την 7^η ημέρα μετά από τη χορήγηση LPS και εν συνεχεία υπερβαίνει τα επίπεδα της ομάδας ελέγχου, ενώ για την ομάδα LPS 2.5mg/kg εξελίσσεται παράλληλα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και δεν ξεπερνά ποτέ τα επίπεδα αυτής (Διάγραμμα 3). Επίσης, η κλίση της καμπύλης μεταβολής του σωματικού βάρους είναι πιο απότομη για την ομάδα ήπιας φλεγμονώδους απόκρισης (LPS 0.25mg/kg), σε σύγκριση με την ομάδα επαγόμενης σήψης (LPS 2.5mg/kg), υποδηλώνοντας μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης σωματικού βάρους (Διάγραμμα 3).

Νευρολογική εκτίμηση των πειραματόζωων

Τα πειραματόζωα υποβάλλονται σε νευρολογική εξέταση τις ημέρες 0, 1, 2, 7, 14 και 21 και κατανέμονται σε τέσσερις κατηγορίες ανάλογα με την βαρύτητα των νευρολογικών ελλειμμάτων τους, σύμφωνα με τον Πίνακα 1. Υπολογίζεται το σκορ για καθεμία δοκιμή, το συνολικό σκορ, που εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα (Πίνακας 6) και ο αριθμός των πειραματόζωων που αντιστοιχεί σε κάθε κατηγορία, ως ποσοστό επί του συνόλου (Πίνακας 7). Η αύξηση της βαθμολογίας συνεπάγεται την μείωση της νευρολογικής απόδοσης.

Την 1^η ημέρα μετά τη χορήγηση του φυσιολογικού ορού ή του LPS παρατηρείται σημαντική αύξηση της συνολικής βαθμολογίας κατά τη νευρολογική εκτίμηση μόνο στα πειραματόζωα που έλαβαν 0.25mg/kg LPS (Πίνακας 6). Στα πειραματόζωα που έλαβαν 2.5mg/kg LPS παρατηρείται σημαντική διαφορά στην βαθμολογία στη δοκιμή προσγείωσης (“Landing test”). Την 2^η ημέρα η απόδοση των πειραματόζωων στη νευρολογική εξέταση επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα.

Η βαρύτητα των νευρολογικών ελλειμμάτων αξιολογείται με βάση το συνολικό σκορ (0–20). Οι τιμές από 0 έως 2 λαμβάνονται ως φυσιολογικές, εκτός κι αν η τιμή 2 προκύπτει από σοβαρό μεμονωμένο έλλειμμα. Η βαθμολόγηση με υψηλότερο σκορ υποδεικνύει τη παρουσία νευρολογικών ελλειμμάτων. Η προοδευτική αύξηση του σκορ αντανακλά και μεγαλύτερη βαρύτητα νευρολογικής δυσλειτουργίας. Ειδικότερα, τιμές 3–5 αντιστοιχούν σε ήπια, 6–10 σε μέτρια και 11–20 σε σοβαρά νευρολογικά ελλείμματα (Πίνακας 1). Την 1^η ημέρα, το ποσοστό των πειραματόζωων που έλαβαν 0.25mg/kg LPS και εμφανίζουν ήπια ή μέτρια νευρολογικά ελλείμματα είναι σημαντικά υψηλότερο σε σύγκριση το ποσοστό των πειραματόζωων που έλαβαν φυσιολογικό ορό (Πίνακας 7).

Πίνακας 5: Αποτελέσματα νευρολογικής εξέτασης για την ομάδα ελέγχου (CTRL, N=6) και τις ομάδες πειραματόζωων που έλαβαν 0.25mg (LPS 0.25, N=5) ή 2.5mg (LPS 2.5, N=5) LPS/kg βάρους

	Day 0			Day 1			Day 2			Day 7			Day 14			Day 21		
	CTRL	LPS 0.25	LPS 2.5	CTRL	LPS 0.25	LPS 2.5	CTRL	LPS 0.25	LPS 2.5	CTRL	LPS 0.25	LPS 2.5	CTRL	LPS 0.25	LPS 2.5	CTRL	LPS 0.25	LPS 2.5
Balance test	0.17±0.167	0.20±0.200	0	0	0.40±0.400	0	0	0.20±0.200	0.20±0.200	0.17±0.167	0.60±0.245	0	0	0.60±0.245	0.20±0.200	0.17±0.167	0.20±0.200	0
Landing test	0.17±0.167	0	0	0	0.40±0.245	0.80±0.200*	0.17±0.167	0	0.40±0.245	0.17±0.167	0	0.40±0.245	0.17±0.167	0.20±0.200	0.20±0.200	0.17±0.167	0.60±0.245	0.40±0.245
Tail raise test	0.50±0.224	0.20±0.200	0	0.33±0.211	0.40±0.245	0.40±0.245	0	0.40±0.245	0	0	0.20±0.200	0.20±0.200	0	0.60±0.245	0	0.17±0.167	0.20±0.200	0
Drag test	0	0	0	0	0.40±0.245	0.20±0.200												
Righting reflex	0.17±0.167	0	0	0.50±0.224	0.60±0.245	0.60±0.245	0	0.60±0.245	0.40±0.245	0.17±0.167	0.40±0.245	0	0.33±0.211	0.20±0.200	0	0	0	0
Ear reflex	0	0.20±0.200	0.20±0.200	0.17±0.167	0.60±0.400	0												
Eye reflex	0	0	0	0.33±0.211	0.40±0.245	0.20±0.200	0	0	0.20±0.200	0	0	0	0	0.40±0.245	0.60±0.245	0.17±0.167	0	0.40±0.245
Sound reflex	0.33±0.333	0	0	0.50±0.342	0.40±0.245	0.80±0.374	0.17±0.167	0.40±0.245	0.20±0.200	0.33±0.211	0.40±0.245	0.20±0.200	0.33±0.333	0.20±0.200	0.20±0.200	0	0	0.40±0.245
Tail reflex	0.17±0.167	0.40±0.245	0.20±0.200	0	0.40±0.245	0.60±0.245	0.33±0.211	0.40±0.245	0	0.33±0.211	0.60±0.400	0.60±0.245	0.17±0.167	0.80±0.374	0.60±0.245	0.33±0.333	0.60±0.400	0.60±0.245
Paw-flexion reflex	0	0.40±0.245	0	0.17±0.167	1.00±0.316	0	0.17±0.167	0.20±0.200	0	0	0.40±0.245	0	0.17±0.167	0.20±0.200	0.20±0.200	0	0.20±0.200	0.40±0.245
TOTAL SCORE	1.50±0.764	1.40±0.748	0.40±0.245	2.00±0.447	5.00±0.630*	3.60±0.678	1.00±0.365	2.40±0.400	1.40±0.678	1.17±0.601	3.00±0.837	1.40±0.510	1.17±0.477	3.60±1.364	2.00±0.837	1.17±0.749	2.00±0.707	2.20±0.800

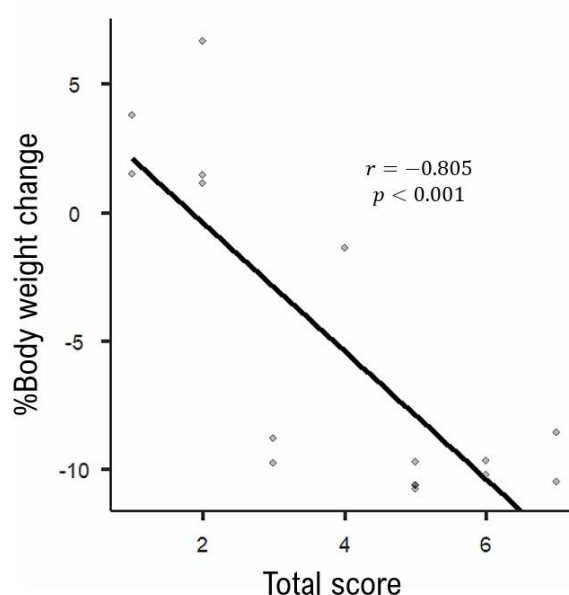
* $p < 0,05$ στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, two-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση σφάλματος

Πίνακας 6: Ποσοστό (%) πειραματοζώων χωρίς ή με ήπια, μέτρια και βαριά ελλείμματα κατά τη νευρολογική εκτίμηση για την ομάδα ελέγχου (control, N=6) και τις ομάδες πειραματοζώων που έλαβαν 0.25mg (LPS 0.25, N=5) ή 2.5mg (LPS 2.5, N=5) LPS/kg βάρους

ΗΜΕΡΑ	CONTROL				LPS 0.25mg/kg				LPS 2.5mg/kg			
	Φυσιολογικό	Ήπια ελλείμματα	Μέτρια ελλείμματα	Βαριά ελλείμματα	Φυσιολογικό	Ήπια ελλείμματα	Μέτρια ελλείμματα	Βαριά ελλείμματα	Φυσιολογικό	Ήπια ελλείμματα	Μέτρια ελλείμματα	Βαριά ελλείμματα
0	83.33	16.67	0	0	80.00	20.00	0	0	100.00	0	0	0
1	83.33	16.67	0	0	0*	80.00	20.00	0	20.00	60.00	20.00	0
2	100.00	0	0	0	80.00	20.00	0	0	60.00	40.00	0	0
7	83.33	16.67	0	0	40.00	60.00	0	0	80.00	20.00	0	0
14	66.67	33.33	0	0	60.00	20.00	20.00	0	80.00	20.00	0	0
21	66.67	33.33	0	0	60.00	40.00	0	0	60.00	40.00	0	0

* $p < 0,05$ στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, Fisher's exact test

Τη 1^η ημέρα μετά τη χορήγηση LPS, το συνολικό σκορ της νευρολογικής εξέτασης δεν παρουσιάζει συσχέτιση με το βάρος των πειραματοζώων ($p=0.18$), αλλά αντίθετα παρουσιάζει σημαντική αρνητική συσχέτιση με τη μεταβολή του βάρους των πειραματοζώων όλων των ομάδων (Pearson's $r = -0.805$ & $p < 0.001$, Διάγραμμα 4).



Διάγραμμα 4: Συσχέτιση της μεταβολής του σωματικού βάρους του πειραματοζώου (%Body weight change) και του συνολικού σκορ (Total score) της νευρολογικής εξέτασης για όλες τις ομάδες την 1^η ημέρα μετά τη χορήγηση LPS

*** $p < 0,001$ στατιστικά σημαντική διαφορά (Pearson's correlation)

Αξιολόγηση Μνήμης/Γνωστικής Λειτουργίας

I. Δοκιμασία αναγνώρισης καινούργιου αντικειμένου (NORT)

Η δοκιμασία NORT έγινε την 5^η, 11^η, 18^η και 25^η ημέρα μετά τη χορήγηση LPS ή φυσιολογικού ορού και υπολογίστηκαν οι δείκτες: “Discrimination index” (DI, Διαγράμματα 5 & 9), “Recognition Index” (RI, Διάγραμμα 6 & 10) και “Difference score” (DS, Διάγραμμα 7 & 11), οι

οποίοι εκφράζουν την αναγνωριστική ικανότητα των αρουραίων για τα καινούργια αντικείμενα και υπολογίστηκαν με βάση τις παρακάτω εξισώσεις:

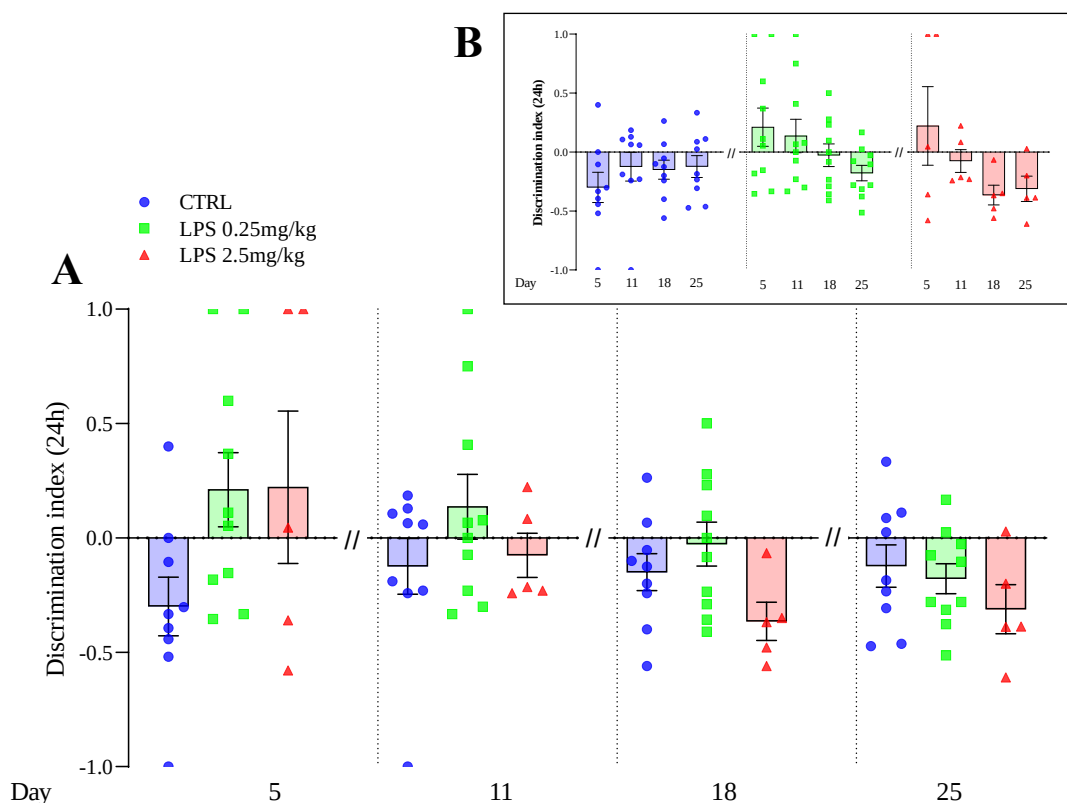
$$DI = \frac{T_{(new)} - T_{(old)}}{T_{(total)}} \quad RI = \frac{T_N}{T_N + T_F} \quad DS = T_N - T_F$$

όπου $N(Novel)$: το καινούργιο αντικείμενο και $F(Familiar)$: το γνωστό αντικείμενο

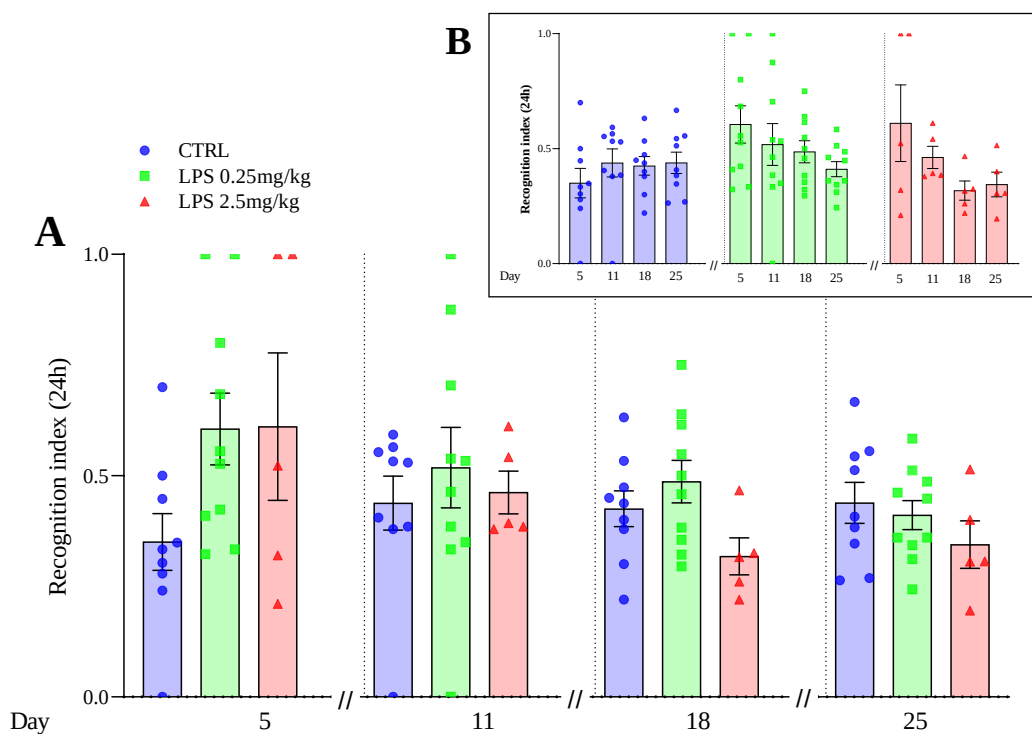
Για τον υπολογισμό του διαφορικού σκορ, τα δεδομένα της Δοκιμασίας 2 κανονικοποιήθηκαν ως προς τα αποτελέσματα της Δοκιμασίας 1, με σκοπό την εξάλειψη της ενδογενούς προτίμησης των πειραματοζώων για το ένα ή το άλλο αντικείμενο (ΔDS, Διάγραμμα 8 & 12).

Όταν κατά τη NORT μεσολάβησε διάστημα 24 ωρών από την αντικατάσταση του γνωστού από το νέο αντικείμενο, τα πειραματόζωα που έλαβαν LPS δεν παρουσίασαν διαφορά ως προς το δείκτη διάκρισης (Διάγραμμα 5A), το δείκτη αναγνώρισης (Διάγραμμα 6A) και το διαφορικό σκορ (Διάγραμμα 7A & 8A) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

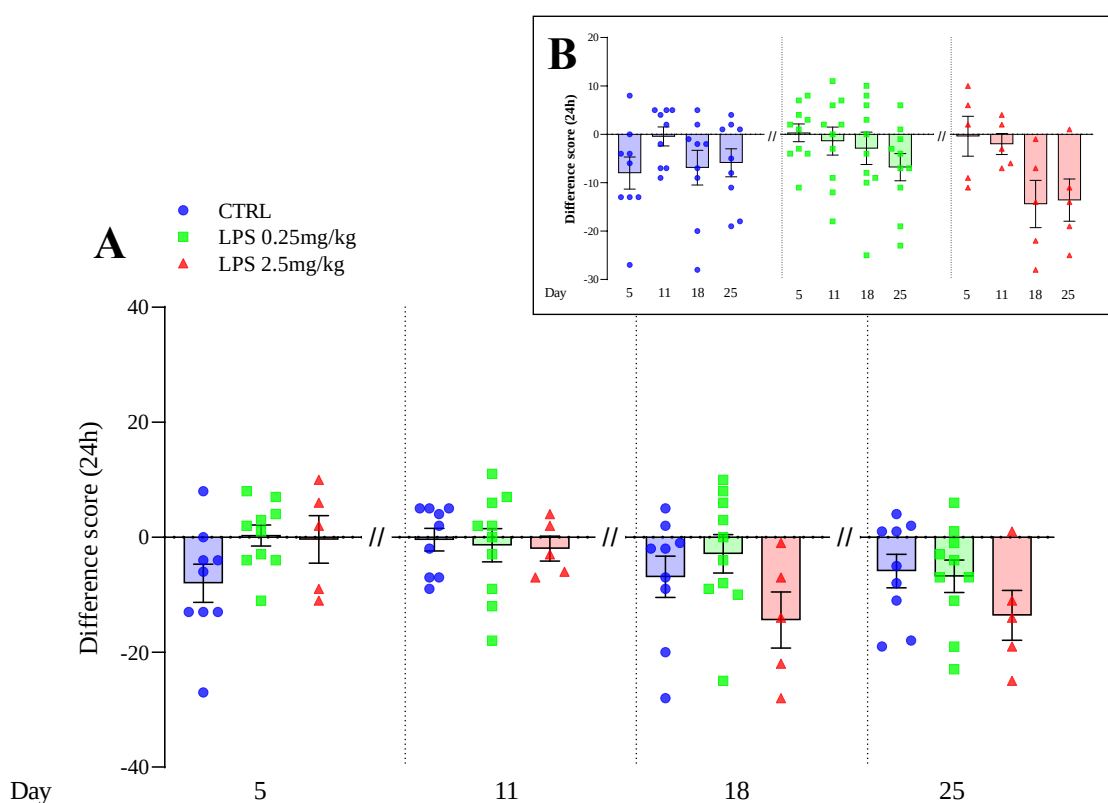
Όσον αφορά τις επιμέρους ομάδες των πειραματοζώων, δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στους δείκτες διάκρισης (Διάγραμμα 5B) ή αναγνώρισης (Διάγραμμα 6B) και στο διαφορικό σκορ (Διάγραμμα 7B & 8B) από την 5^η έως την 25^η ημέρα.



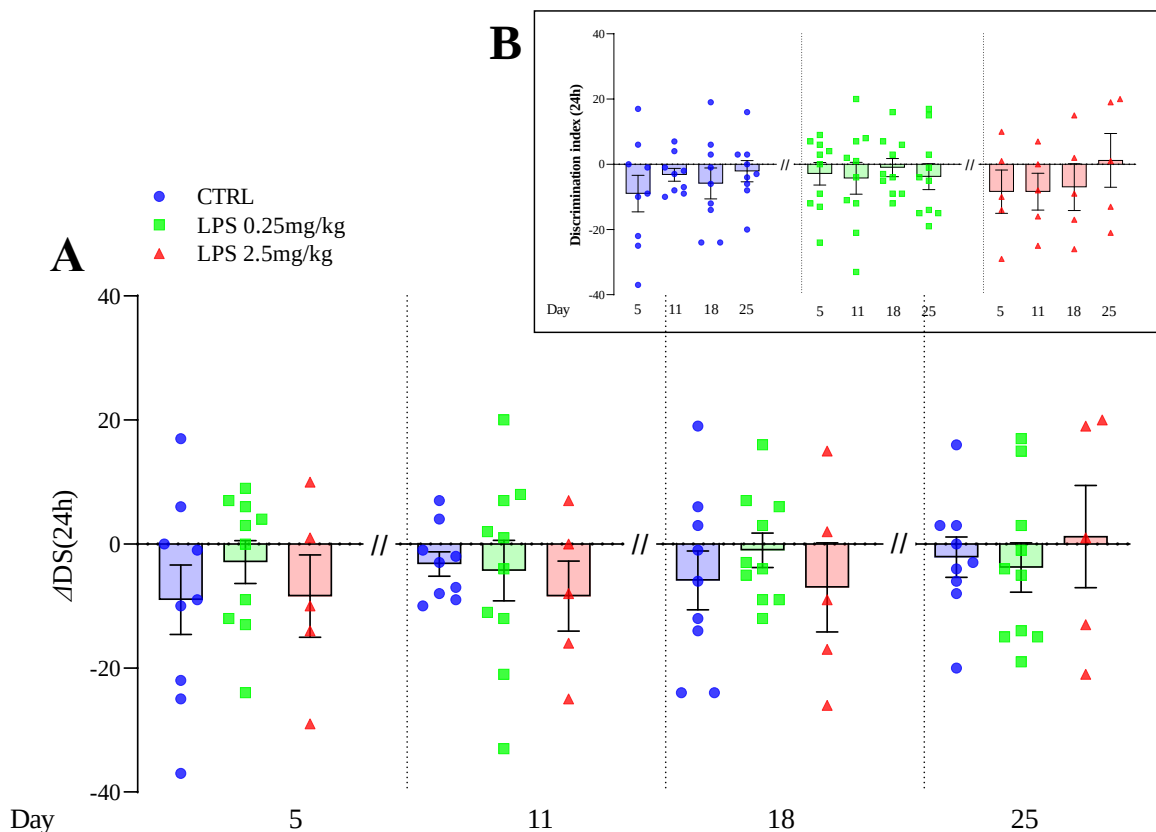
Διάγραμμα 5: Δείκτης διάκρισης (Discrimination index) για τη δοκιμασία αναγνώρισης καινούργιου αντικειμένου (NORT) με μεσοδιάστημα 24 ωρών για την ομάδα ελέγχου (CTRL, $N=9$) και τις ομάδες πειραματοζώων που έλαβαν 0.25mg (LPS 0.25mg/kg, $N=10$) ή 2.5mg (LPS 2.5mg/kg, $N=5$) LPS/kg βάρους (A) και για κάθε ξεχωριστή ομάδα σε διαδοχικές δοκιμές (B).



Διάγραμμα 6: Δείκτης αναγνώρισης (Recognition index) για τη δοκιμασία αναγνώρισης καινούργιου αντικειμένου (NORT) με μεσοδιάστημα 24 ωρών για την ομάδα ελέγχου (CTRL, N=9) και τις ομάδες πειραματόζωων που έλαβαν 0.25mg (LPS 0.25mg/kg, N=10) ή 2.5mg (LPS 2.5mg/kg, N=5) LPS/kg βάρους (A) και για κάθε ξεχωριστή ομάδα σε διαδοχικές δοκιμές (B).

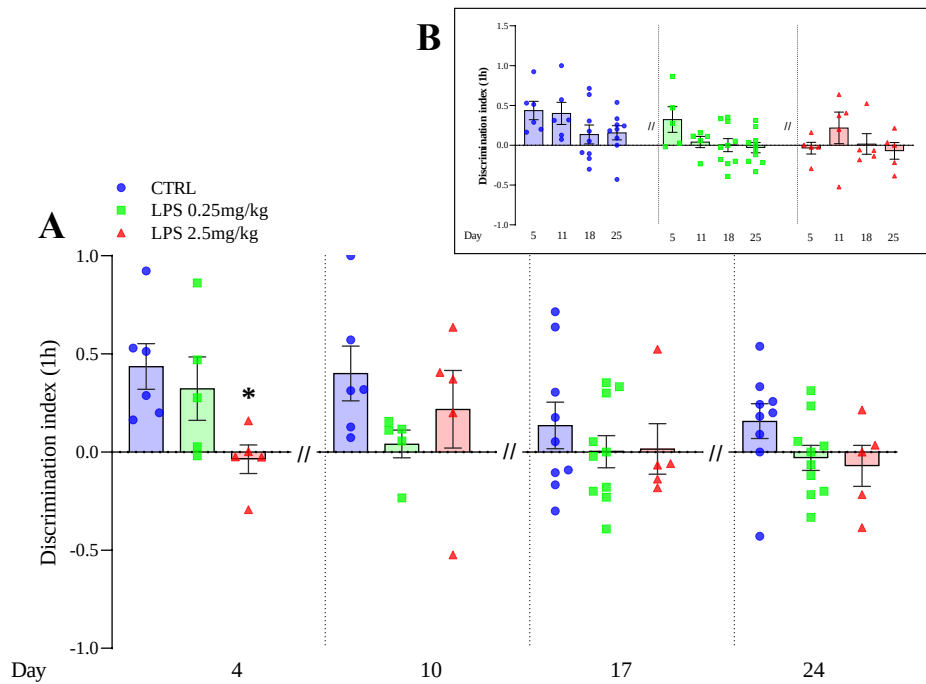


Διάγραμμα 7: Διαφορικό σκορ (DS) για τη δοκιμασία αναγνώρισης καινούργιου αντικειμένου (NORT) με μεσοδιάστημα 24 ωρών για την ομάδα ελέγχου (CTRL, N=9) και τις ομάδες πειραματόζωων που έλαβαν 0.25mg (LPS 0.25mg/kg, N=10) ή 2.5mg (LPS 2.5mg/kg, N=5) LPS/kg βάρους (A) και για κάθε ξεχωριστή ομάδα σε διαδοχικές δοκιμές (B).



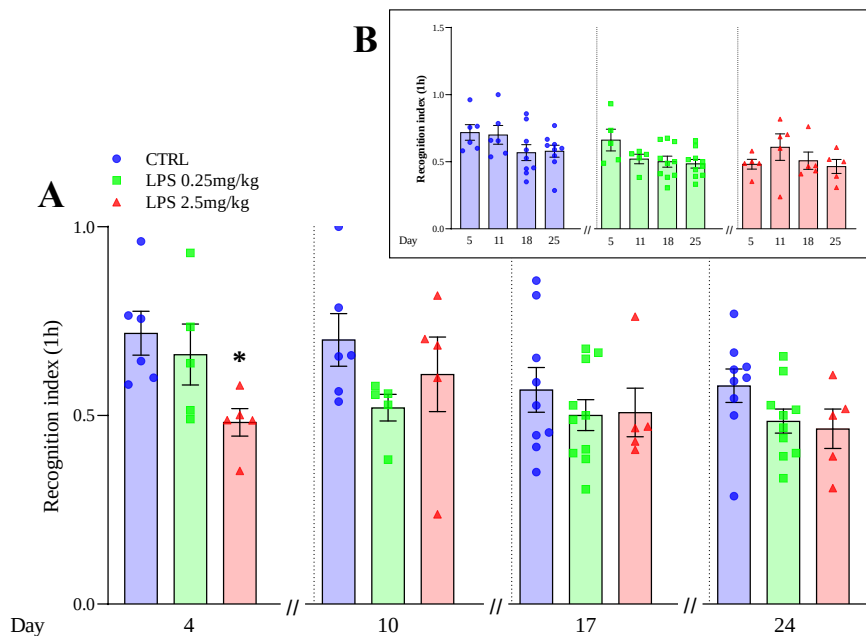
Διάγραμμα 8: Διαφορικό σκορ (ΔDS) για τη δοκιμασία αναγνώρισης καινούργιου αντικείμενου (NORT) με μεσοδιάστημα 24 ωρών για την ομάδα ελέγχου (CTRL, $N=9$) και τις ομάδες πειραματόζων που έλαβαν 0.25mg (LPS 0.25mg/kg, $N=10$) ή 2.5mg (LPS 2.5mg/kg, $N=5$) LPS/kg βάρους (A) και για κάθε ξεχωριστή ομάδα σε διαδοχικές δοκιμές (B).

Η δοκιμασία NORT επαναλήφθηκε με τη μεσολάβηση διαστήματος μίας ώρας από την αντικατάσταση του γνωστού από το νέο αντικείμενο την 4^η, 10^η, 17^η και 24^η ημέρα. Την 4^η ημέρα, τα πειραματόζωα που έλαβαν LPS 2.5mg/kg εμφανίζουν στατιστικά σημαντική ελάττωση των δεικτών διάκρισης ($p<0.05$, Διάγραμμα 9A) και αναγνώρισης ($p<0.05$, Διάγραμμα 10A), καθώς και του διαφορικού σκορ ($p<0.05$, Διάγραμμα 11A & 12A), σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (CTRL). Την 24^η ημέρα, η διαφορά ως προς το διαφορικό σκορ επανεμφανίζεται για την ομάδα LPS 2.5mg/kg ($p<0.001$, Διαγράμματα 11A), σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.



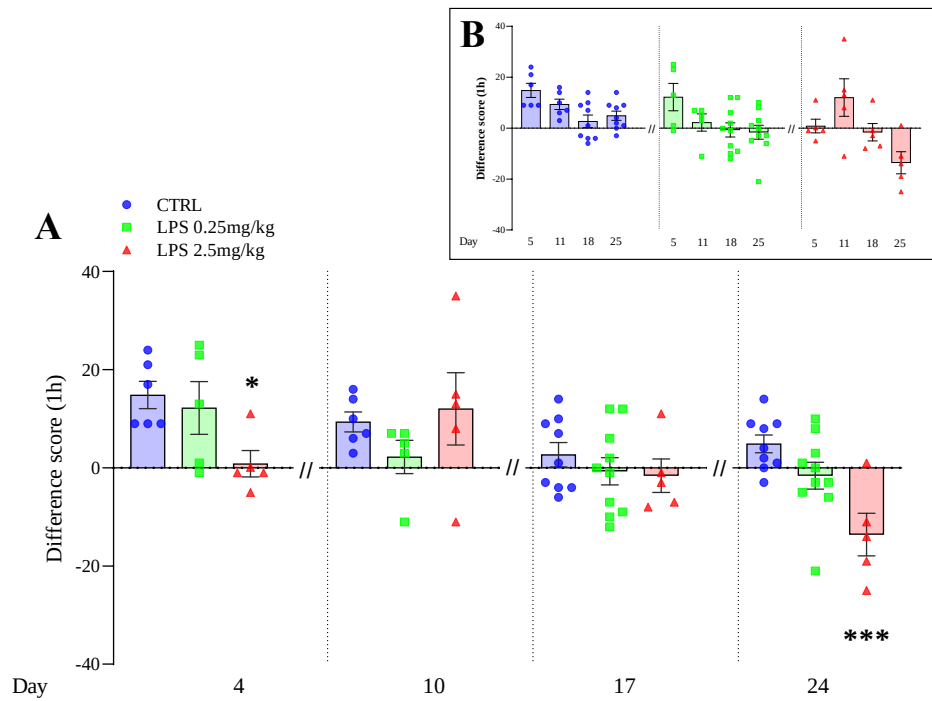
Διάγραμμα 9: Δείκτης διάκρισης (*Discrimination index*) για τη δοκιμασία αναγνώρισης καινούργιου αντικειμένου (*NORT*) με μεσοδιάστημα μίας ώρας για την ομάδα ελέγχου (*CTRL*, $N=9$) και τις ομάδες πειραματόζωων που έλαβαν 0.25mg (*LPS 0.25mg/kg*, $N=10$) ή 2.5mg (*LPS 2.5mg/kg*, $N=5$) *LPS/kg* βάρους (*A*) και για κάθε ξεχωριστή ομάδα σε διαδοχικές δοκιμές (*B*).

* $p<0.05$, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (*one-way ANOVA*, *Dunnett's multiple comparisons test*) και σε σύγκριση με την πρώτη εκ των διαδοχικών δοκιμών (*RM one-way ANOVA*, *Dunnett's multiple comparisons test*). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση σφάλματος



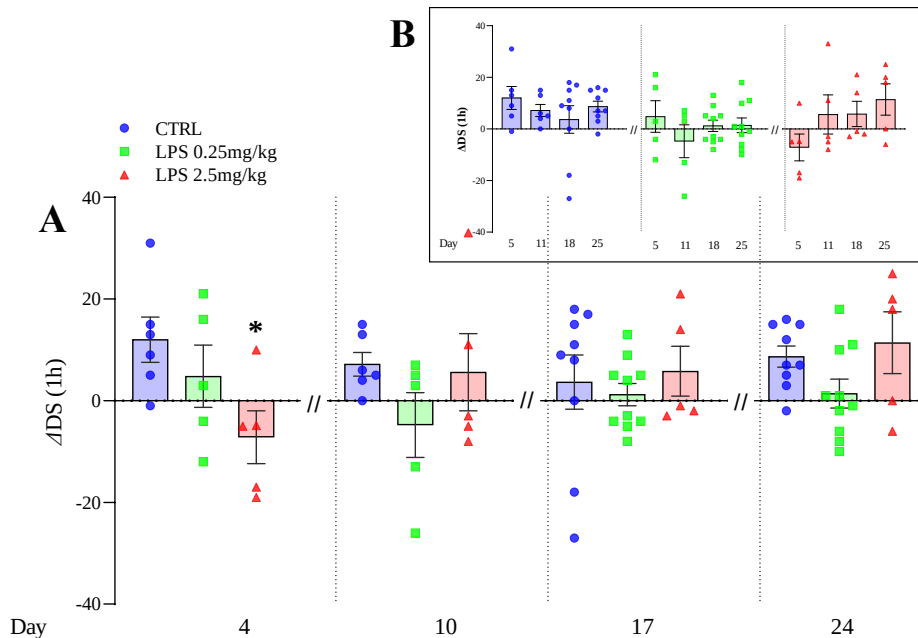
Διάγραμμα 10: Δείκτης αναγνώρισης (*Recognition index*) για τη δοκιμασία αναγνώρισης καινούργιου αντικειμένου (*NORT*) με μεσοδιάστημα μίας ώρας για την ομάδα ελέγχου (*CTRL*, $N=9$) και τις ομάδες πειραματόζωων που έλαβαν 0.25mg (*LPS 0.25mg/kg*, $N=10$) ή 2.5mg (*LPS 2.5mg/kg*, $N=5$) *LPS/kg* βάρους (*A*) και για κάθε ξεχωριστή ομάδα σε διαδοχικές δοκιμές (*B*).

* $p<0.05$, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (*one-way ANOVA*, *Dunnett's multiple comparisons test*) και σε σύγκριση με την πρώτη εκ των διαδοχικών δοκιμών (*RM one-way ANOVA*, *Dunnett's multiple comparisons test*). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση σφάλματος



Διάγραμμα 11: Διαφορικό σκορ (DS) για τη δοκιμασία αναγνώρισης καινούργιου αντικειμένου (NORT) με μεσοδιάστημα μίας ώρας για την ομάδα ελέγχου (CTRL, N=9) και τις ομάδες πειραματόζωων που έλαβαν 0.25mg (LPS 0.25mg/kg, N=10) ή 2.5mg (LPS 2.5mg/kg, N=5) LPS/kg βάρους (A) και για κάθε ξεχωριστή ομάδα σε διαδοχικές δοκιμές (B).

*** $p < 0.001$, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test) και σε σύγκριση με την πρώτη εκ των διαδοχικών δοκιμών (RM one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση σφάλματος



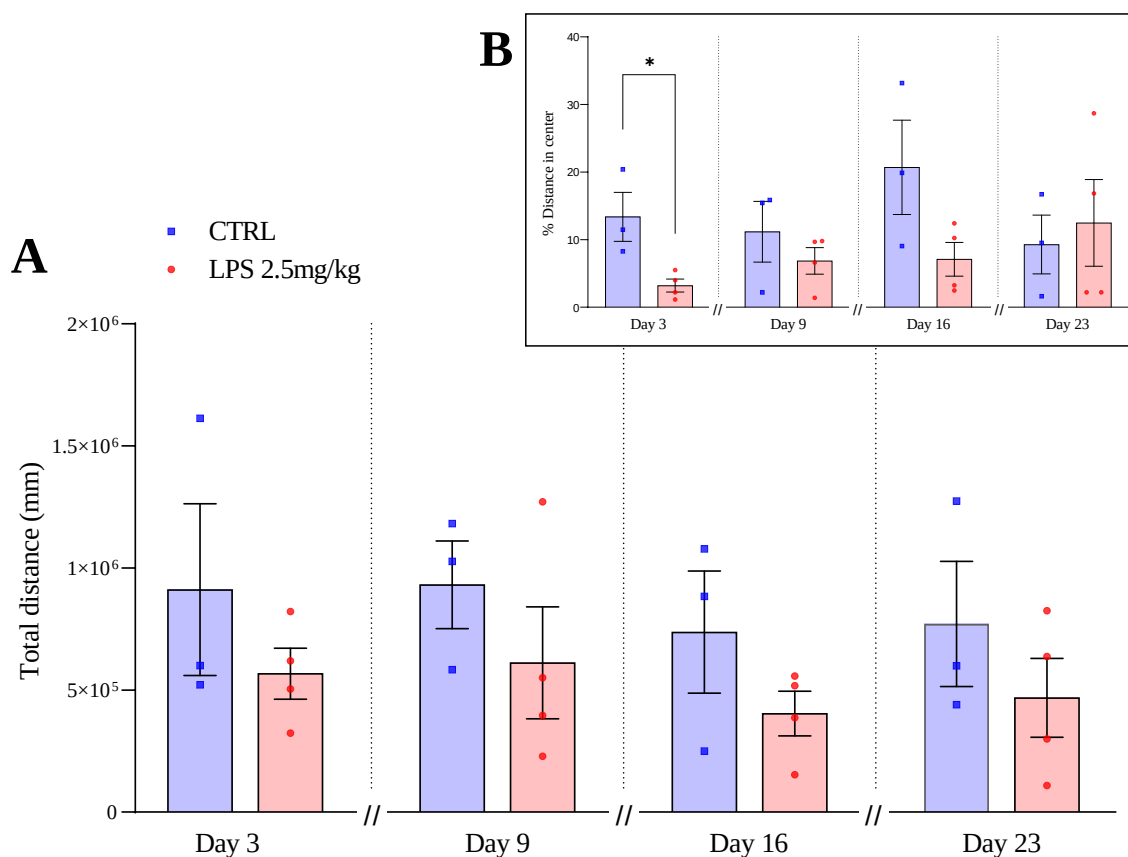
Διάγραμμα 12: Διαφορικό σκορ (ΔDS) για τη δοκιμασία αναγνώρισης καινούργιου αντικειμένου (NORT) με μεσοδιάστημα μίας ώρας για την ομάδα ελέγχου (CTRL, N=9) και τις ομάδες πειραματόζωων που έλαβαν 0.25mg (LPS 0.25mg/kg, N=10) ή 2.5mg (LPS 2.5mg/kg, N=5) LPS/kg βάρους (A) και για κάθε ξεχωριστή ομάδα σε διαδοχικές δοκιμές (B).

* $p < 0.05$, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test) και σε σύγκριση με την πρώτη εκ των διαδοχικών δοκιμών (RM one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση σφάλματος

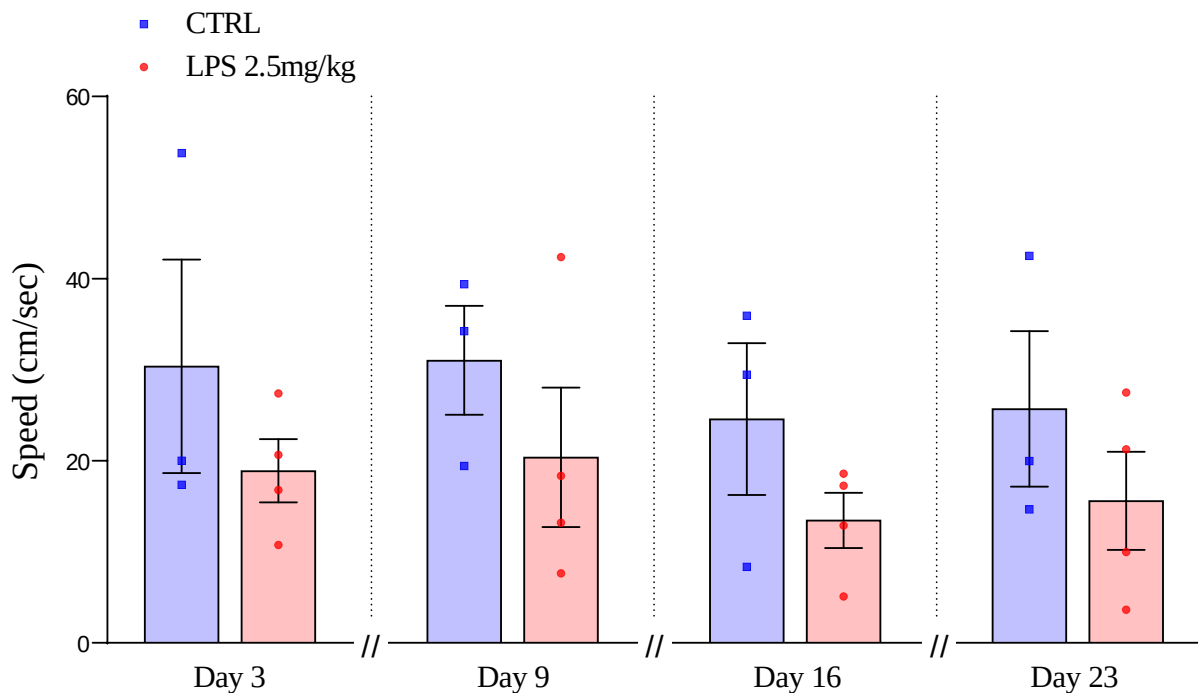
Αξιολόγηση Άγχους

I. Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (OFT)

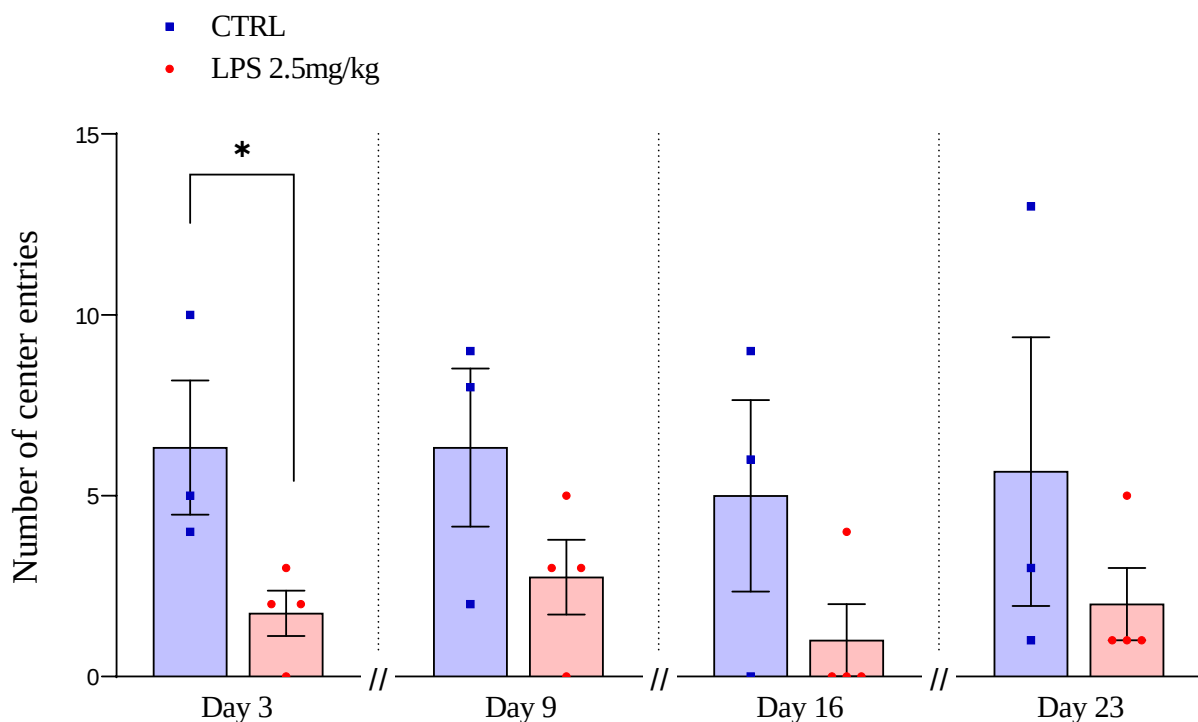
Από την χαρτογράφηση της πορείας των πειραματοζώων, λαμβάνουμε πληροφορίες για την συνολική απόσταση που διανύθηκε, την ταχύτητα κίνησης, τον αριθμό των διαβιβάσεων στο κεντρικό διαμέρισμα και το επί τοις εκατό ποσοστό της απόστασης και του χρόνου σε κάθε διαμέρισμα του πεδίου (κέντρο και περιφέρεια) για την ομάδα ζώων που έλαβε i.p. 2.5mg/kg LPS και την ομάδα ελέγχου. Από την ανάλυση των πειραμάτων αυτών προέκυψε ότι τα ζώα που έλαβαν LPS εμφάνισαν την 3^η μόνο ημέρα, σε σύγκριση με τα ζώα ελέγχου, ελαττωμένο ποσοστό απόστασης ($p < 0,05$, Διάγραμμα 13B) στο κεντρικό διαμέρισμα όπως και ελαττωμένο αριθμό διαβάσεων από το κέντρο ($p < 0,05$, Διάγραμμα 15).



Διάγραμμα 13: Η συνολική απόσταση (mm) (A) και το ποσοστό (%) της απόστασης (B) που διανύθηκε στο κεντρικό διαμέρισμα του πεδίου κατά την δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (“Open field test” - OFT) για την ομάδα που έλαβε 2.5mg LPS/kg βάρους (LPS 2.5mg/kg, N=4), σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (CTRL, N=3) * $p < 0,05$ στατιστικά σημαντική διαφορά (unpaired t-test). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση σφάλματος

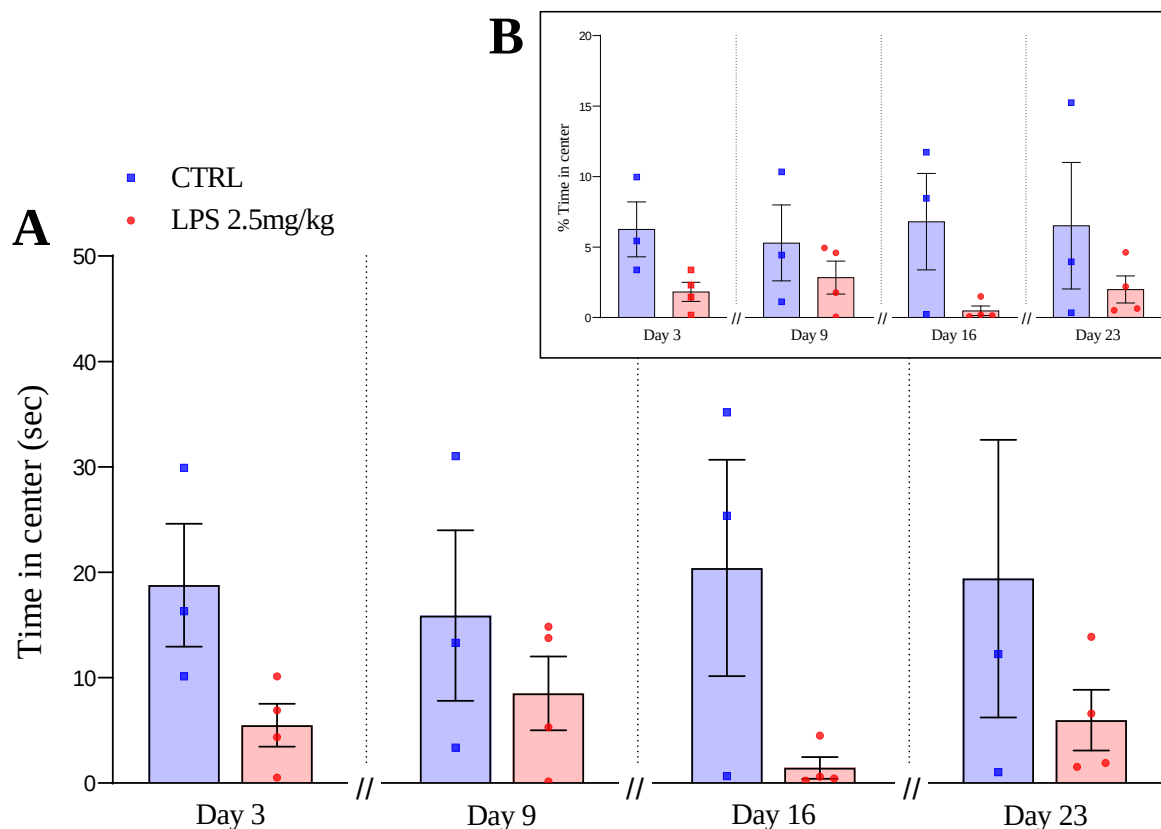


Διάγραμμα 14: Η ταχύτητα κίνησης κατά την δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (“Open field test” - OFT) για την ομάδα που έλαβε 2.5mg LPS/kg βάρους (LPS 2.5mg/kg, N=4), σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (CTRL, N=3), unpaired t-test. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση σφάλματος



Διάγραμμα 15: Ο αριθμός των διαβιβάσεων στο κεντρικό διαμέρισμα του πεδίου κατά την δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (“Open field test” - OFT) για την ομάδα που έλαβε 2.5mg LPS/kg βάρους (LPS 2.5mg/kg, N=4), σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (CTRL, N=3)

* $p < 0,05$ στατιστικά σημαντική διαφορά (unpaired t-test). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση σφάλματος



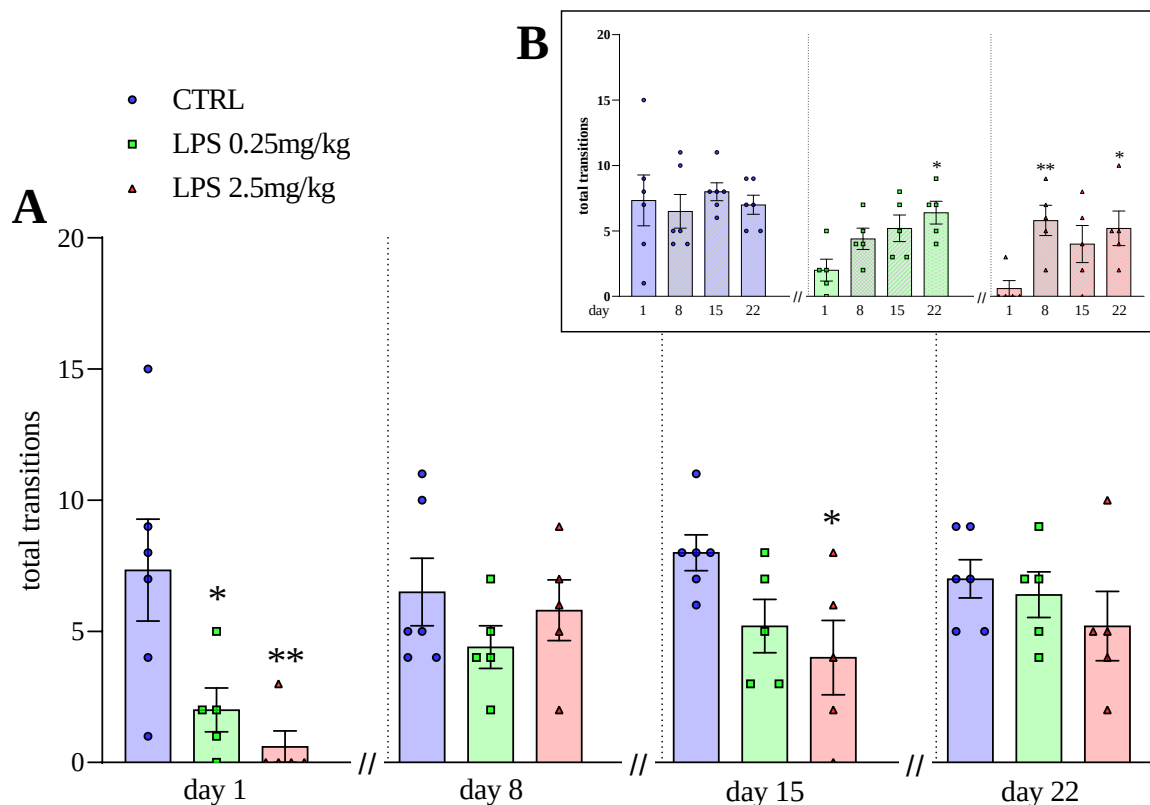
Διάγραμμα 16: Ο χρόνος (sec) (A) και το ποσοστό (%) του χρόνου (B) στο κεντρικό διαμέρισμα του πεδίου κατά την δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (“Open field test” - OFT) για την ομάδα που έλαβε 2.5mg LPS/kg βάρους (LPS 2.5mg/kg, N=4), σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (CTRL, N=3), unpaired t-test. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση σφάλματος

II. Δοκιμασία φωτεινού-σκοτεινού πεδίου (LDBT)

Οι παράμετροι που εξετάστηκαν είναι οι εξής: ο αριθμός των διαβιβάσεων των πειραματοζώων από το σκοτεινό προς το φωτεινό διαμέρισμα, η συνολική διάρκεια παραμονής στο φως και ο χρόνος καθυστέρησης μέχρι την πρώτη μετάβαση από το φωτεινό πεδίο, όπου τοποθετείται ο αρουραίος κατά την έναρξη της δοκιμασίας, προς το σκοτεινό.

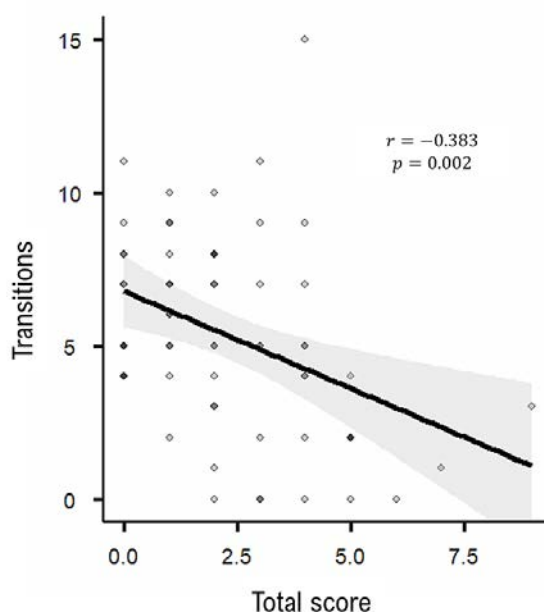
Όσον αφορά το συνολικό αριθμό των μεταβιβάσεων από το σκοτεινό στο φωτεινό πεδίο, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου είναι ελαττωμένος και στις δύο ομάδες LPS κατά την 1^η ημέρα ($p < 0,05$, Διάγραμμα 17A) και την 14^η ημέρα στατιστικά σημαντική διαφορά παρουσιάζεται μόνο για την ομάδα LPS 2.5mg/kg ($p < 0,05$, Διάγραμμα 17A).

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα μεταξύ των διαδοχικών δοκιμών κάθε ομάδας, σε σχέση με την 1^η ημέρα, ο αριθμός των διαβιβάσεων στην ομάδα LPS 0.25mg/kg αυξάνεται σταδιακά σε κάθε δοκιμασία και διαφέρει σημαντικά κατά την 21^η ημέρα ($p < 0,05$, Διάγραμμα 17B), ενώ για την ομάδα LPS 2.5mg/kg αυξάνεται από την 7^η ημέρα και στη συνέχεια παραμένει αμετάβλητος ($p < 0,05$, Διάγραμμα 17B).



Διάγραμμα 17: Αριθμός διαβιβάσεων από το σκοτεινό προς το φωτεινό διαμέρισμα κατά τη δοκιμασία φωτεινού-σκοτεινού πεδίου (“Light-dark box test” – LDBT) για την ομάδα ελέγχου (CTRL, N=6) και τις ομάδες πειραματόζων που έλαβαν 0.25mg (LPS 0.25mg/kg, N=5) ή 2.5mg (LPS 2.5mg/kg, N=5) LPS/kg βάρους (A) και για κάθε ξεχωριστή ομάδα σε διαδοχικές δοκιμές (B).

** $p < 0.001$, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test) και * $p < 0.05$, σε σύγκριση με την πρώτη εκ των διαδοχικών δοκιμών (RM one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση σφάλματος

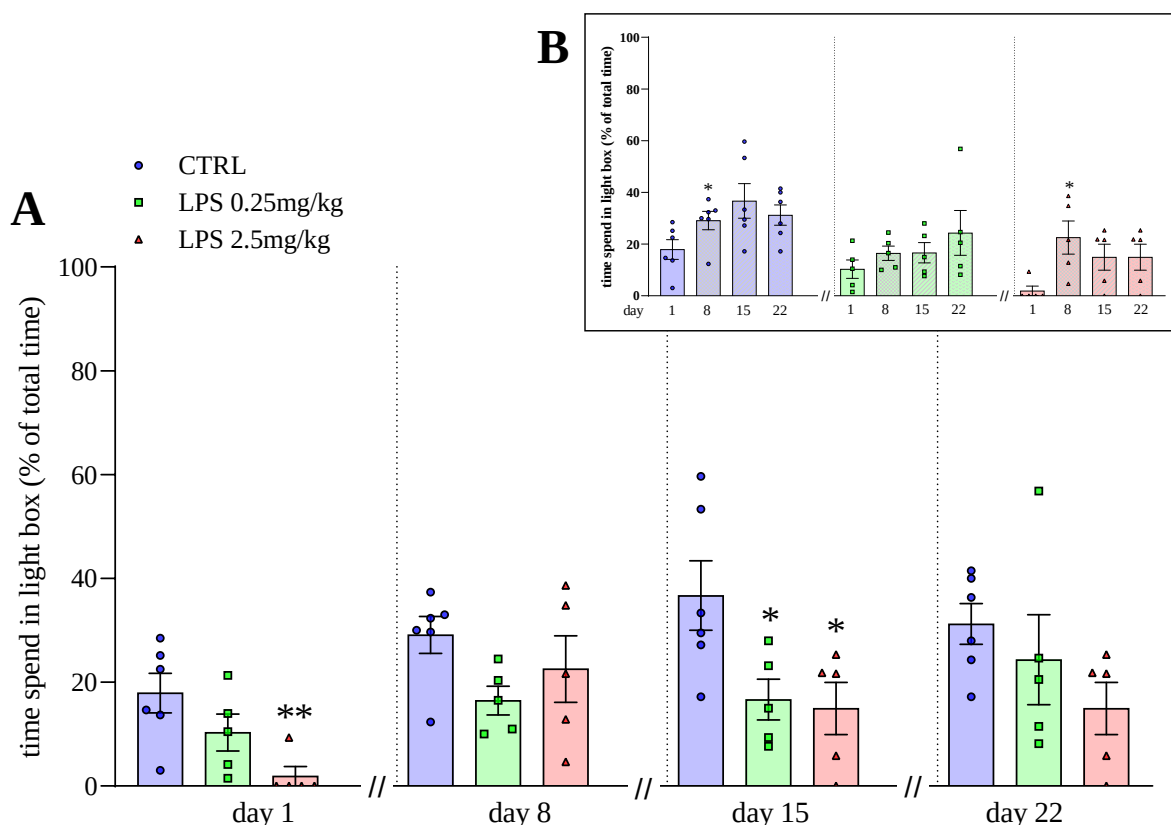


Διάγραμμα 18: Συσχέτιση του αριθμού των διαβιβάσεων κατά τη δοκιμασία φωτεινού-σκοτεινού πεδίου (“Light-dark box test” – LDBT) και του συνολικού σκορ (Total score) της νευρολογικής εξέτασης για όλες τις ομάδες πειραματόζων

** $p < 0.01$ στατιστικά σημαντική διαφορά (Pearson's correlation)

Για όλες τις ομάδες πειραματόζων, ο αριθμός των διαβιβάσεων από το σκοτεινό προς το φωτεινό διαμέρισμα, κατά τη δοκιμασία LDBT, εμφανίζει σημαντική αρνητική συσχέτιση με το συνολικό σκορ της νευρολογικής εξέτασης (Pearson's $r = -0.383$ & $p < 0.01$, Διάγραμμα 18).

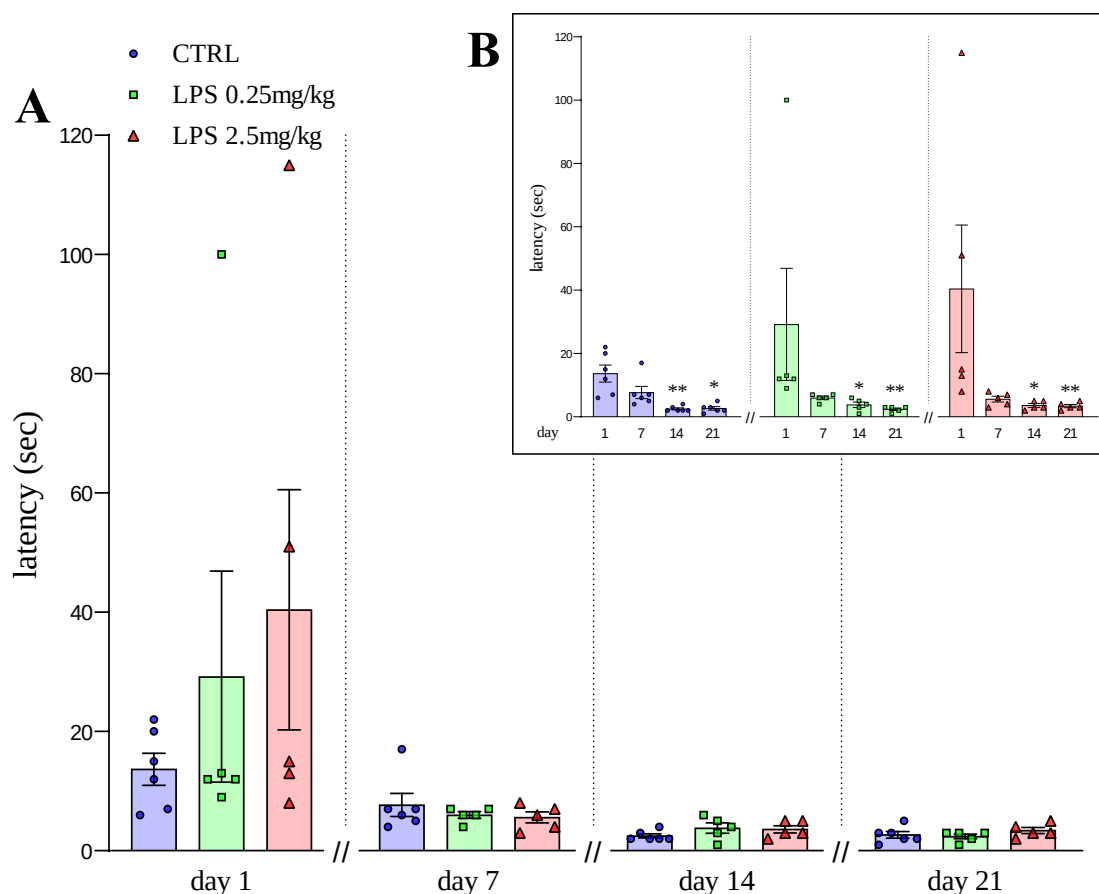
Τα ζώα που έλαβαν LPS 2.5mg/kg πέρασαν σημαντικά λιγότερο χρόνο στο φωτεινό πεδίο και περισσότερο στο σκοτεινό πεδίο σε σχέση με τα ζώα ελέγχου την 1^η και την 14^η ημέρα ($p < 0.05$, Διάγραμμα 19A). Παρόμοια και τα ζώα που έλαβαν 0.25mg/kg LPS, παρέμειναν σημαντικά μικρότερο διάστημα στο φωτεινό πεδίο την 14^η ημέρα ($p < 0.05$, Διάγραμμα 19A). Ο χρόνος παραμονής στο φωτεινό πεδίο αυξήθηκε σημαντικά την 7^η και την 21^η ημέρα, σε σύγκριση με την 1^η ημέρα, στα ζώα που έλαβαν 2.5mg/kg LPS ($p < 0.05$, Διάγραμμα 19B).



Διάγραμμα 19: Χρόνος στο φωτεινό πεδίο (sec) κατά τη δοκιμασία φωτεινού-σκοτεινού πεδίου ("Light-dark box test" – LDBT) για την ομάδα ελέγχου (CTRL, $N=6$) και τις ομάδες πειραματόζων που έλαβαν 0.25mg (LPS 0.25mg/kg, $N=5$) ή 2.5mg (LPS 2.5mg/kg, $N=5$) LPS/kg βάρους (A) και για κάθε ξεχωριστή ομάδα σε διαδοχικές δοκιμές (B).

* $p < 0.001$, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test) και * $p < 0.05$, σε σύγκριση με την πρώτη εκ των διαδοχικών δοκιμών (RM one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση σφάλματος

Σχετικά με το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μέχρι την πρώτη μετάβαση από το φωτεινό στο σκοτεινό πεδίο (λανθάνων χρόνος), δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά για τις ομάδες LPS σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Διάγραμμα 20A). Σε όλες τις ομάδες, ο λανθάνων χρόνος μέχρι την πρώτη διαβίβαση ελαττώνεται σημαντικά κατά την 3^η και 4^η εβδομάδα ($p < 0.001$, Διάγραμμα 20B).



Διάγραμμα 20: Ο λανθάνων χρόνος (sec) μέχρι την πρώτη διαβίβαση (“latency”) κατά τη δοκιμασία φωτεινού-σκοτεινού πεδίου (“Light-dark box test” – LDBT) για την ομάδα ελέγχου (CTRL, N=6) και τις ομάδες πειραματόζωων που έλαβαν 0.25mg (LPS 0.25mg/kg, N=5) ή 2.5mg (LPS 2.5mg/kg, N=5) LPS/kg βάρους (A) και για κάθε ξεχωριστή ομάδα σε διαδοχικές δοκιμές (B).

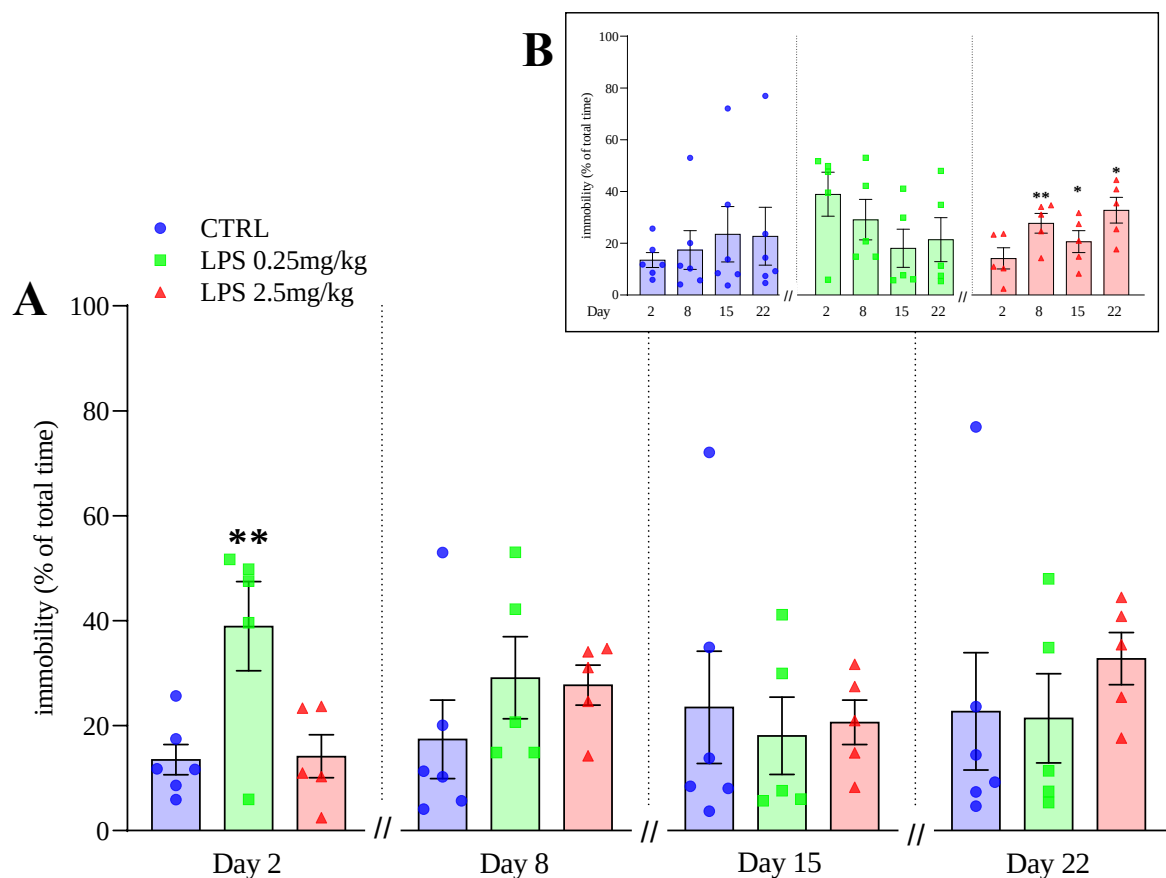
* $p < 0.05$ και ** $p < 0.001$, σε σύγκριση με την πρώτη εκ των διαδοχικών δοκιμών (RM one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση σφάλματος

Αξιολόγηση Καταθλιπτικής Συμπεριφοράς

I. Δοκιμασία αναγκαστικής κολύμβησης (FST)

Μετρήθηκε η διάρκεια της ακινησίας (“immobility”), που αποδίδεται ως επί τοις εκατό ποσοστό του συνολικού χρόνου κολύμβησης και ο λανθάνων χρόνος μέχρι την πρώτη ακινησία (“latency”).

Σημειώνεται στατιστικά σημαντική αύξηση του χρόνου ακινησίας ($p < 0.001$, Διάγραμμα 21A) για την ομάδα ζώων που έλαβε LPS 0.25mg/kg σε σχέση με την ομάδα ελέγχου την 2^η ημέρα, ενώ μία τέτοια διαφορά δεν παρατηρείται στα ζώα που έλαβαν 2.5mg/kg LPS (Διάγραμμα 21A). Μετά την πρώτη εβδομάδα, η καταθλιπτική συμπεριφορά, με δείκτη το χρόνο παραμονής των ζώων σε ακινησία, υποχωρεί στα ζώα που έλαβαν LPS 0.25mg/kg και πλησιάζει σταδιακά τα επίπεδα των ζώων ελέγχου (Διάγραμμα 21A). Ωστόσο, σε αντίθεση με την ομάδα LPS 0.25mg/kg, στα ζώα που έλαβαν 2.5mg/kg LPS, ο χρόνος ακινησίας αυξάνεται μετά την πρώτη εβδομάδα και για το χρονικό διάστημα των 3 επόμενων εβδομάδων ($p < 0.05$, Διάγραμμα 21B).



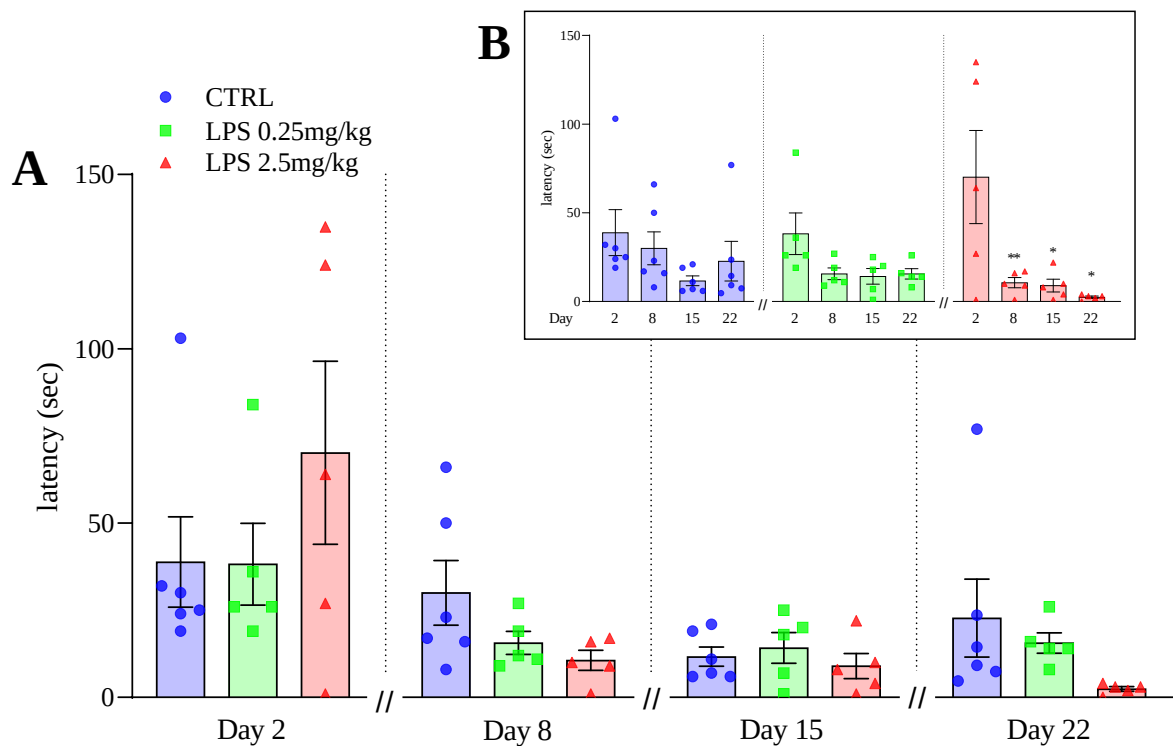
Διάγραμμα 21: Η ακινησία (immobility) ως επί τοις εκατό ποσοστό του συνολικού χρόνου της δοκιμασίας αναγκαστικής κολύμβησης (“Forced Swim Test” – FST) για την ομάδα ελέγχου (CTRL, N=6) και τις ομάδες πειραματόζωων που έλαβαν 0.25mg (LPS 0.25mg/kg, N=5) ή 2.5mg (LPS 2.5mg/kg, N=5) LPS/kg βάρους (A) και για κάθε ξεχωριστή ομάδα σε διαδοχικές δοκιμές (B).

** $p < 0.001$, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test)

* $p < 0.05$ και ** $p < 0.001$, σε σύγκριση με την πρώτη εκ των διαδοχικών δοκιμών (RM one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση σφάλματος

Το ποσοστό ακινησίας των πειραματόζωων δεν εμφανίζει συσχέτιση με το βάρος (Pearson's $r = -0.162$ & $p = 0.2$) ή το συνολικό σκορ της νευρολογικής εξέτασης (Pearson's $r = -0.02$ & $p = 0.86$).

Ο λανθάνων χρόνος μέχρι την εκδήλωση της πρώτης περιόδου ακινησίας δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ των ζώων που έλαβαν LPS και των CTRL ζώων (Διάγραμμα 22A). Παρατηρείται όμως στατιστικά σημαντική ελάττωση του χρόνου αυτού στην ομάδα ζώων που έλαβε LPS 2.5mg/kg, σε σύγκριση με τη πρώτη δοκιμασία. Συγκεκριμένα, στο διάστημα των 3 εβδομάδων που ακολουθεί την πρώτη δοκιμασία, τα πειραματόζωα αυτά πέφτουν πολύ πιο γρήγορα σε κατάσταση ακινησίας σε σχέση με την πρώτη εβδομάδα ($p < 0.05$, Διάγραμμα 22B).



Διάγραμμα 22: Ο λανθάνων χρόνος (sec) μέχρι την πρώτη ακινησία (“latency”) κατά τη δοκιμασία αναγκαστικής κολύμβησης (“Forced Swim Test” – FST) για την ομάδα ελέγχου (CTRL, N=6) και τις ομάδες πειραματόζωων που έλαβαν 0.25mg (LPS 0.25mg/kg, N=5) ή 2.5mg (LPS 2.5mg/kg, N=5) LPS/kg βάρους (A) και για κάθε ξεχωριστή ομάδα σε διαδοχικές δοκιμές (B).

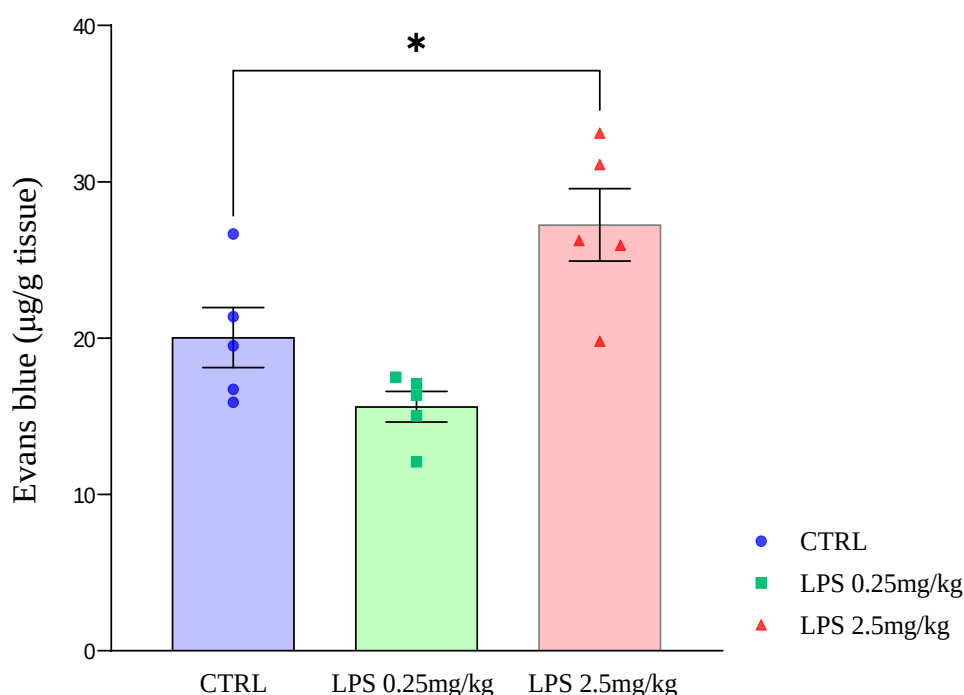
* $p < 0.05$ και ** $p < 0.001$, σε σύγκριση με την πρώτη εκ των διαδοχικών δοκιμών (RM one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση σφάλματος

Ποσοτικός προσδιορισμός χρωστικής Evans blue στον εγκεφαλικό ιστό

Η ποσότητα της χρωστικής EB που αντιστοιχεί σε κάθε εγκεφαλικό ημισφαίριο υπολογίζεται με βάση τις τιμές της απορρόφησης (OD_{630nm}), σύμφωνα με τη πρότυπη καμπύλη. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως $\mu g/g$ ιστού.

Τα δεδομένα δεν παρουσιάζουν κανονική κατανομή για όλες τις πειραματικές ομάδες, σύμφωνα με το Shapiro-Wilk test ($p=0,03$). Κατά τη δοκιμασία Grubbs ($\alpha = 0,05$) εντοπίστηκε μία ακραία τιμή για την ομάδα ελέγχου (CTRL, $N=6$). Μετά από τον αποκλεισμό της συγκεκριμένης τιμής από το σύνολο των δεδομένων (CTRL, $N=5$), η κανονικότητα επιβεβαιώθηκε και η συγκριτική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test.

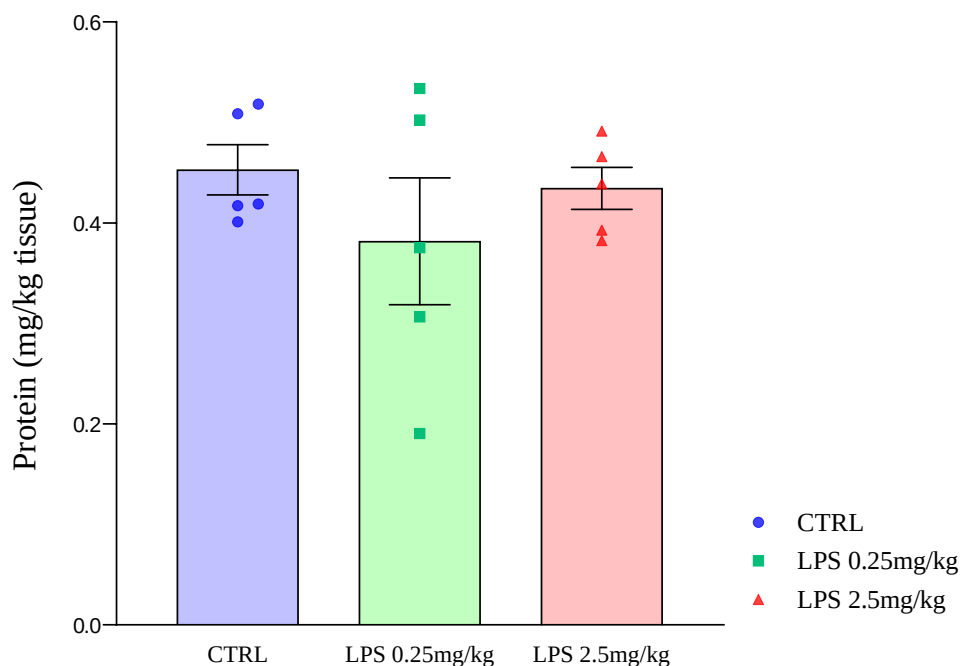
Η ποσότητα της χρωστικής EB(μg) ως προς το βάρος του ιστού(g) παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0,03$) για την ομάδα LPS 2.5mg/kg ($N=5$) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($N=5$). Τα επίπεδα για την ομάδα LPS 0.25mg/kg ($N=5$) δεν διαφέρουν σε σχέση με τα φυσιολογικά επίπεδα (Διάγραμμα 23).



Διάγραμμα 23: Η ποσότητα της χρωστικής(μg) ως προς το βάρος του ιστού(g) για τις ομάδες πειραματόζων που έλαβαν 0.25mg (LPS 0.25mg/kg, $N=5$) ή 2.5mg (LPS 2.5mg/kg, $N=5$) LPS/kg βάρους, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (CTRL, $N=5$)

* $p<0,05$ στατιστικά σημαντική διαφορά, one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση σφάλματος

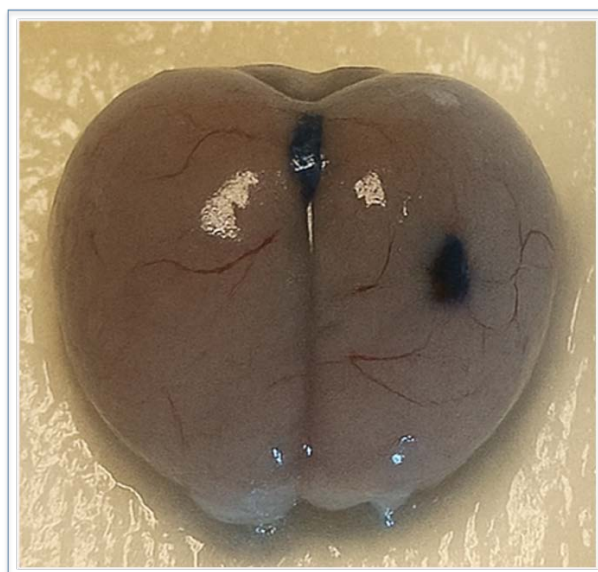
Η ολική ποσότητα της πρωτεΐνης σε κάθε ημισφαίριο προσδιορίζεται με βάση την πρότυπη καμπύλη Bradford. Η ποσότητα της πρωτεΐνης(mg) ανά βάρος ιστού(kg) κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα για όλες τις πειραματικές ομάδες (Διάγραμμα 24).



Διάγραμμα 24: Η ποσότητα της πρωτεΐνης(mg) ανά βάρος ιστού(kg) για τις ομάδες πειραματόζων που έλαβαν 0.25mg (LPS 0.25mg/kg, N=5) ή 2.5mg (LPS 2.5mg/kg, N=5) LPS/kg βάρους, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (CTRL, N=5), one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση σφάλματος

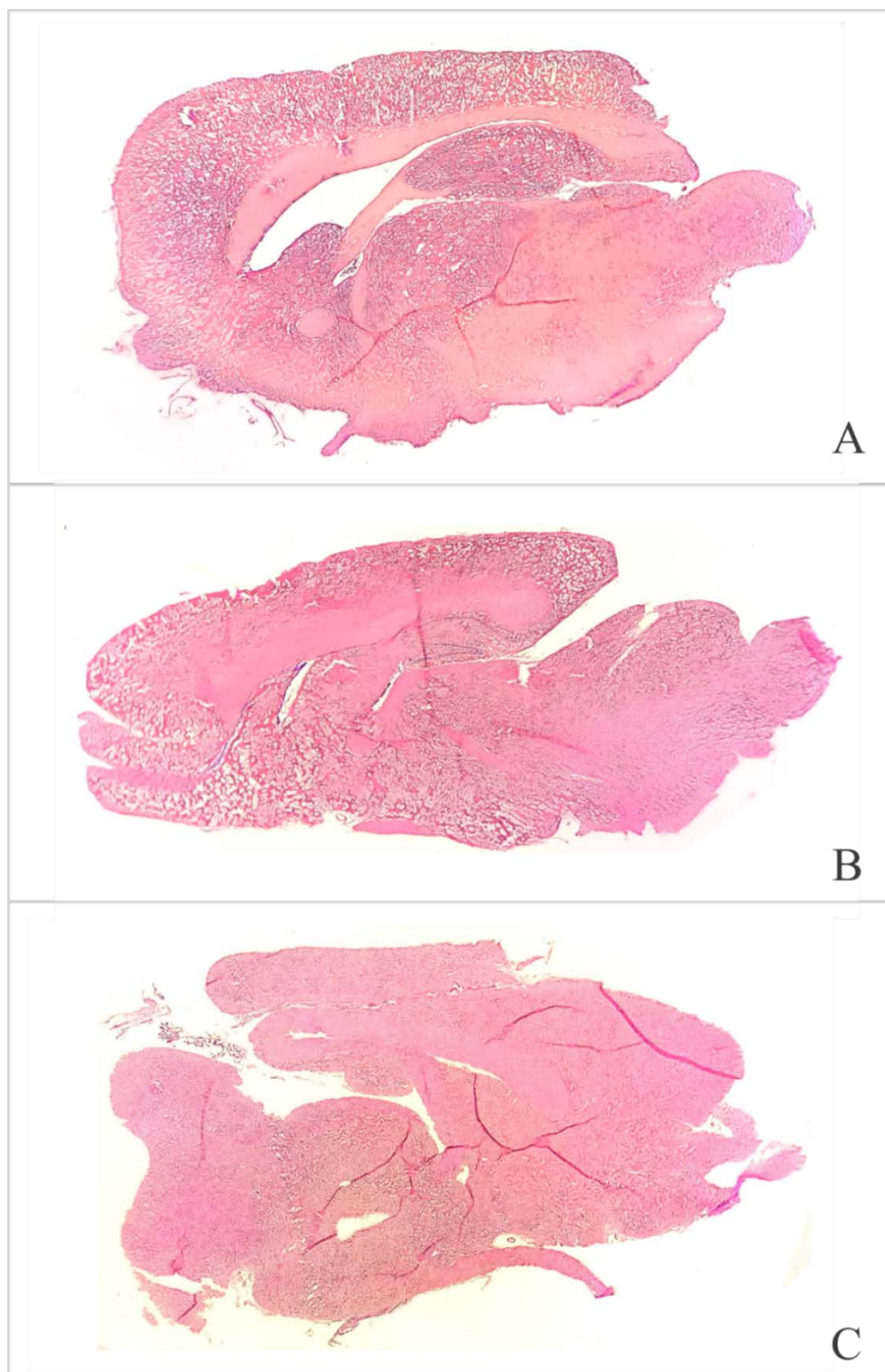
Ιστοπαθολογική εξέταση τομών εγκεφάλου

Έπειτα από τη χορήγηση της EB και την ενδοκαρδιακή διάχυση, έγινε απομόνωση ολόκληρου του εγκεφάλου. Στους απομονωμένους εγκεφάλους των πειραματόζων που έλαβαν LPS 2.5mg/kg υπήρχαν αγγειακές βλάβες, οι οποίες απουσίαζαν από την ομάδα ελέγχου. Ειδικότερα, ισχαιμικές βλάβες έγιναν ορατές μακροσκοπικά σε όλα τα ζώα της ομάδας και αιμορραγικές σε ένα από αυτά (Εικόνα 13). Όσον αφορά την ομάδα πειραματόζων που έλαβε LPS 0.25mg/kg δεν παρατηρήθηκαν μακροσκοπικές αλλοιώσεις.



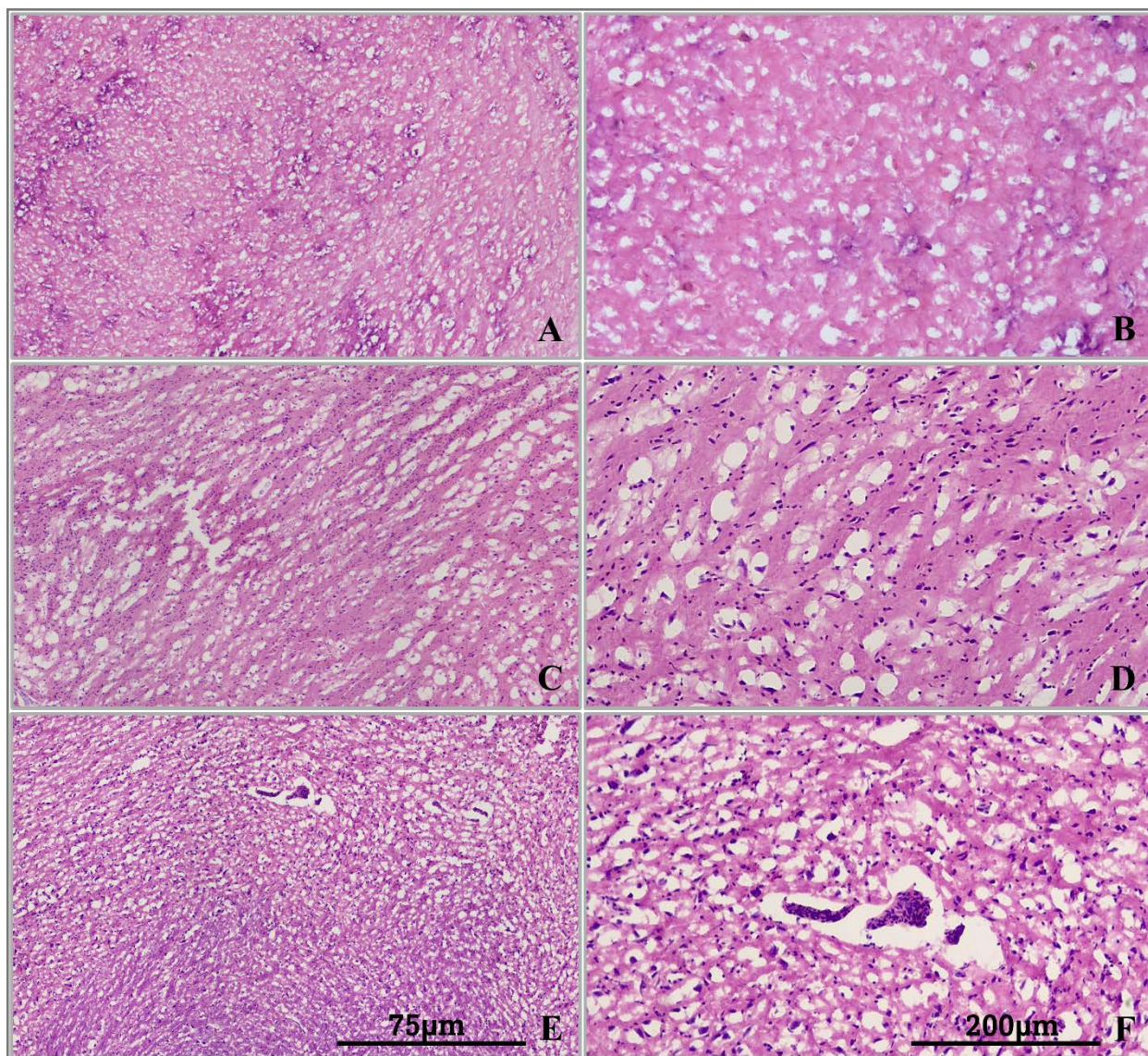
Εικόνα 12: Απομονωμένος εγκέφαλος με αγγειακές βλάβες

Μετά από λήψη οβελιαίων τομών 10μm με τη βοήθεια κρυοτόμου, πραγματοποιείται χρώση H&E για μικροσκοπική εξέταση των ιστολογικών αλλοιώσεων (Εικόνα 14).



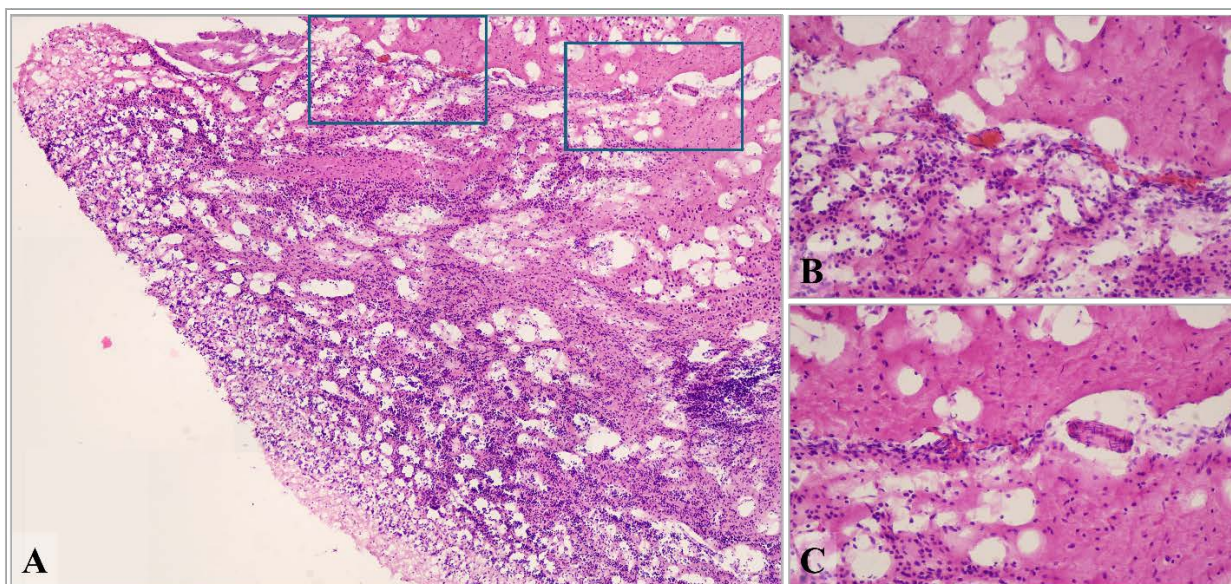
Εικόνα 13: Οβελιαίες τομές εγκεφάλου σε χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης (H&E) για την ομάδα ελέγχου (CTRL) (A) και τις ομάδες πειραματόζωων που έλαβαν 0.25mg (LPS 0.25mg/kg) (B) ή 2.5mg (LPS 2.5mg/kg) LPS/kg βάρους (C). Οι φωτογραφίες λήφθηκαν από στερεοσκόπιο.

Η ομάδα πειραματόζων που έλαβε LPS 0.25mg/kg παρουσίασε εστιακή διήθηση λεμφοκυττάρων μικρού μεγέθους, ενώ η ομάδα πειραματόζων που έλαβε LPS 2.5mg/kg εμφάνισε εκτεταμένη λεμφοκυτταρική και μικρογλοιακή διήθηση (Εικόνα 15).



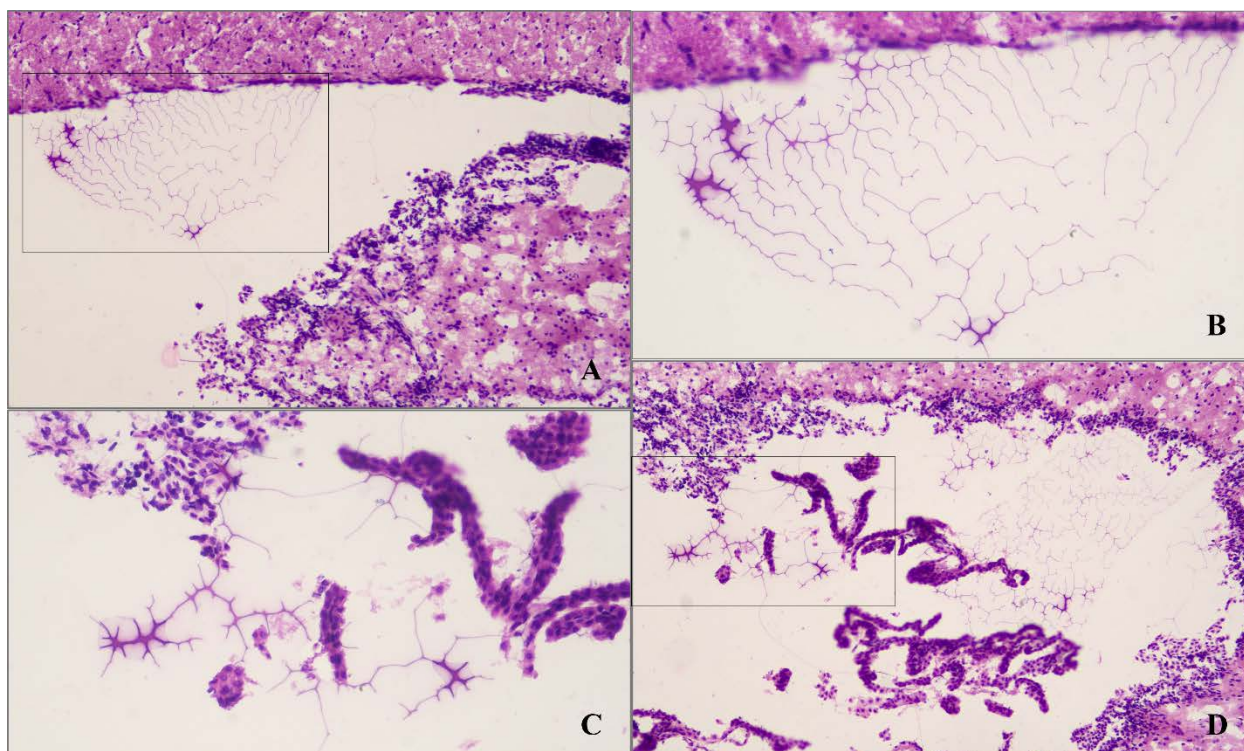
Εικόνα 14: Απεικόνιση εγκεφαλικού παρεγχύματος στη περιοχή μεσεγκεφαλικού δικτυωτού σχηματισμού (mRT: mesencephalic Reticular Formation), όπου διακρίνεται λεμφοκυτταρική διήθηση για την ομάδα LPS 0.25mg/kg (C, D) και εκτενέστερα για την ομάδα LPS 2.5mg/kg (E, F), σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (A, B). Οι φωτογραφίες λήφθηκαν από μικροσκόπιο Nikon Eclipse 50i, σε μεγέθυνση 10×

Τρία πειραματόζωα της ομάδας LPS 0.25mg/kg (N=5) εμφάνισαν φλεγμονώδη διήθηση εντοπισμένη στο χοριοειδές πλέγμα, ενώ σε ένα από αυτά παρατηρήθηκε διήθηση του προμετωπιαίου λοβού από ανοσοκύτταρα (Εικόνα 16).



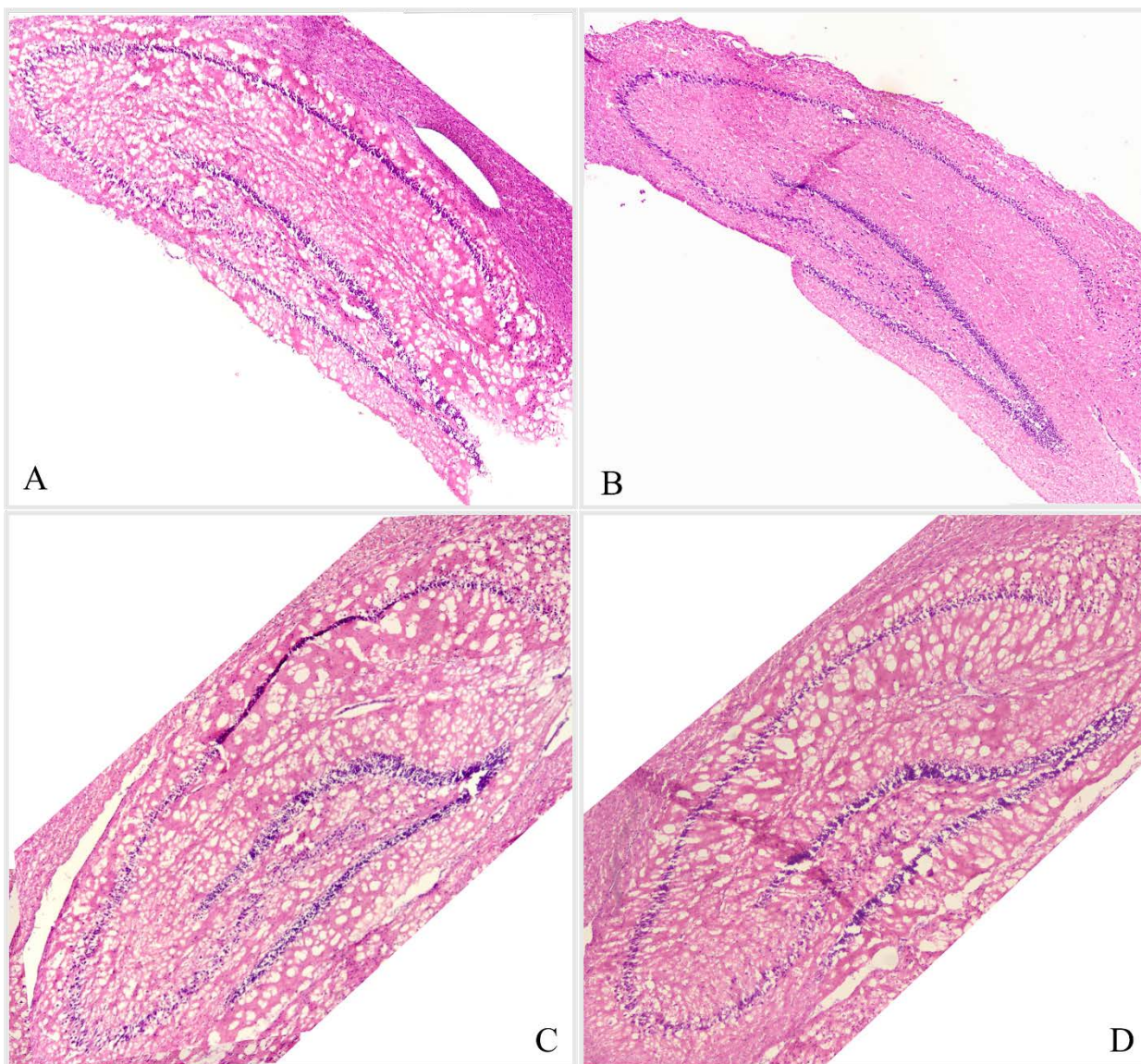
Εικόνα 15: Χαρακτηριστικές εικόνες προμετωπιαίου λοβού με έντονη φλεγμονώδη διήθηση σε 10× μεγέθυνση (A) και αγγείων που περιβάλλονται από λεμφοκύτταρα σε 20× μεγέθυνση (B)(C). Οι φωτογραφίες λήφθηκαν από μικροσκόπιο Nikon Eclipse 50i.

Σε όλα τα πειραματόζωα της ομάδας LPS 2.5mg/kg παρουσιάστηκε πυκνή συγκέντρωση φλεγμονωδών κυττάρων, που δεν περιορίζονταν στις κοιλίες, αλλά εκτείνονταν σε ολόκληρο το εγκεφαλικό παρέγχυμα (Εικόνα 17).



Εικόνα 16: Φλεγμονώδης διήθηση στο χοριοειδές πλέγμα της τρίτης κοιλίας. Οι φωτογραφίες λήφθηκαν από μικροσκόπιο Nikon Eclipse 50i, σε μεγεθύνσεις 10× (A)(D) και 20×(B)(C).

Σε καμία από τις ομάδες, δεν υπήρχαν ενδείξεις προσβολής του ιππόκαμπου από κύτταρα του ανοσοποιητικού ή δομικές αλλοιώσεις (Εικόνα 18).



Εικόνα 17: Απεικονίσεις ιπποκάμπου για την ομάδα LPS 2.5mg/kg (B, D), σε σύγκριση με την ομάδα LPS 0.25mg/kg (A) και την ομάδα ελέγχου (C). Οι φωτογραφίες λήφθηκαν από μικροσκόπιο Nikon Eclipse 50i, σε μεγέθυνση 4×

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η επίδραση του LPS στο σωματικό βάρος

Η ελάττωση του σωματικού βάρους μία ημέρα μετά από την χορήγηση LPS αποτελεί χαρακτηριστική ένδειξη της συμπεριφοράς ασθένειας. Τη 1^η ημέρα, τα πειραματόζωα που έλαβαν LPS εμφάνισαν σημαντική μείωση σωματικού βάρους (Διάγραμμα 3), με αποτέλεσμα το βάρος των ζώων της ομάδας LPS 0.25mg/kg να παρουσιάζει διαφορά τη 1^η εβδομάδα, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Πίνακας 5). Από τη 1^η ημέρα κι έπειτα, ο ρυθμός αύξησης του σωματικού βάρους για την ομάδα LPS 2.5mg/kg, όπως αποτυπώνεται από την κλίση του διαγράμματος, κυμαίνεται σε επίπεδα αντίστοιχα με εκείνα της ομάδας ελέγχου, ενώ η ομάδα LPS 0.25mg/kg εμφανίζει συγκριτικά ταχύτερο ρυθμό αύξησης βάρους (Διάγραμμα 3). Το βάρος των πειραματόζωων δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ των ομάδων μετά τη 1^η εβδομάδα. Συνεπώς, οι διαφορετικοί ρυθμοί μεταβολής του σωματικού βάρους οδηγούν σε εξάλειψη της αρχικής διαφοράς που παρατηρείται στο βάρος μεταξύ των ομάδων. Λαμβάνοντας ως δείκτη το ποσοστό (%) μεταβολής του σωματικού βάρους την επόμενη ημέρα από την χορήγηση LPS, η συμπεριφορά ασθένειας για την ομάδα επαγόμενης κατάστασης σήψης παρουσιάζει υψηλότερη κλινική βαρύτητα, σε σύγκριση με την ομάδα ήπιας φλεγμονώδους απόκρισης.

Ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) έχει χαρακτηριστεί ως ανορεκτικός παράγοντας, ο οποίος δρα στον υποθάλαμο, επηρεάζοντας τη γονιδιακή έκφραση κυτταροκινών και νευροπεπτιδίων (*Gayle et al., 1999*). Η ενδοτοξιναιμία επιδρά σε ένα σύνθετο δίκτυο νευρωνικών πληθυσμών του υποθαλάμου, οι οποίοι εκφράζουν υποδοχείς λεπτίνης και ρυθμίζουν τη διατροφική συμπεριφορά. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η ανορεκτική απόκριση προκαλείται μέσω αύξησης των επιπέδων των ανορεξιογόνων παραγόντων POMC (Proopiomelanocortin) και CART (Cocaine- and amphetamine-regulated transcript), στο τοξοειδή πυρήνα, καθώς και ελάττωσης των επιπέδων των ορεξιογόνων πεπτιδίων MCH (Melanin-concentrating hormone) και γαλανίνης στην πλάγια υποθαλαμική περιοχή (Lateral hypothalamic area – LHA) (*Sergeyev et al. 2001*). Μελέτες σε ζωικά μοντέλα αρουραίων στις οποίες χρησιμοποιήθηκε LPS (i.p.) σε δόση 250μg/kg κατέδειξαν ότι η λεπτίνη και προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως η IL-6, που εκκρίνονται στη περιφέρεια, παίζουν σημαντικό ρόλο στην καταστολή της θερμιδικής πρόσληψης, ως μέρος της συμπεριφοράς ασθένειας (*Harden et al, 2011, Harden et al, 2006*).

Η συστημική φλεγμονή κατά την οξεία φάση της σήψης έχει συσχετιστεί με ενδοκρινική δυσλειτουργία, μέσω ποικίλων ορμονικών μονοπατιών, όπως ο άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (Hypothalamic pituitary adrenal axis – HPA), ο άξονας ινσουλίνης-γλυκαγόνου-γλυκόζης και ο σωματοτρόπος άξονας (Growth hormone-Insulin-like growth factor-1 – GH-IGF-1). Αυτές οι ορμονικές αλλαγές οδηγούν σε διατάραξη της ενδοκρινικής και μεταβολικής

ομοιόστασης (*Mehdi et al, 2023*). Οι διαφορές στη θερμιδική πρόσληψη επιφέρουν με τη σειρά τους δυναμικές μεταβολικές αλλαγές (*Murata et al, 2025*). Μέχρι στιγμής, η διατάραξη της ορμονικής και μεταβολικής ισορροπίας έχει συσχετιστεί κατά κύριο λόγο με την απώλεια βάρους στα αρχικά στάδια της φλεγμονώδους απόκρισης, ενώ η μακροχρόνια επίδραση της στην ενδοκρινική λειτουργία παραμένει ασαφής.

Η ήπια φλεγμονώδης απόκριση προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση του σωματικού βάρους των πειραματοζώων την 17^η, 18^η ημέρα και από την 21^η έως και την 25^η ημέρα μετά τη χορήγηση LPS 0.25mg/kg (Διάγραμμα 3). Η μεταβολή αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί σε αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης στο αίμα. Ο υπερκορτιζολισμός ή αλλιώς σύνδρομο Cushing έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση κατάθλιψης σε ασθενείς με διαβήτη (*Mázala-de-Oliveira et al, 2023*), υποδεικνύοντας πιθανή σύνδεση μεταξύ της εκδήλωσης καταθλιπτικής συμπεριφοράς και μεταβολικής διαταραχής στην ομάδα LPS 0.25mg/kg. Κατά τη χρόνια φάση, είναι πιθανό να εκδηλώνεται το σύνδρομο ευθυρεοειδούς ασθενούς (Euthyroid sick syndrome – ESS), ή αλλιώς μη θυρεοειδική νόσος (Non-thyroidal illness – NTI), το οποίο χαρακτηρίζεται από υπολειτουργία του άξονα υποθαλάμου–υπόφυσης λόγω μείωσης των επιπέδων T3 (Triiodothyronine) και έχει επίσης συσχετιστεί επίσης με την κατάθλιψη (*Mendi et al, 2025, Widmer & Schuetz, 2018*).

Με βάση τα αποτελέσματα, η ραγδαία αύξηση βάρους που παρατηρείται για την ομάδα ήπιας φλεγμονώδους απόκρισης φαίνεται πως αποτελεί μία προσαρμοστική μεταβολική αντίδραση, η οποία δρα αντιρροπιστικά στη μείωση του σωματικού βάρους, που προκαλείται κατά την εκδήλωση της συμπεριφοράς ασθενείας, και επιτυγχάνει την επαναφορά του βάρους των πειραματοζώων στα επίπεδα της ομάδας ελέγχου.

Η επίδραση του LPS στη νευρολογική εκτίμηση

Η νευρολογική εξέταση πραγματοποιήθηκε τις ημέρες 0,1,2,7,14 και 21. Η αξιολόγηση έγινε με βάση το σκορ για κάθε νευρολογική δοκιμή και το συνολικό σκορ (Πίνακας 6) και τα πειραματόζωα κατανεμήθηκαν σε ομάδες με βάση τη βαρύτητα των νευρολογικών ελλειμμάτων (Πίνακας 7).

Οι ομάδες LPS εμφάνισαν σημαντικές διαφορές, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, μόνο την 1^η ημέρα. Συγκεκριμένα, η ομάδα LPS 0.25mg/kg παρουσίασε διαφορά ως προς το συνολικό σκορ της νευρολογικής εξέτασης, ενώ η ομάδα LPS 2.5mg/kg ως προς τη δοκιμή προσγείωσης (Πίνακας 6). Επιπλέον, την 1^η ημέρα το ποσοστό των πειραματοζώων με νευρολογικά ελλείμματα (ήπια και μέτρια) είναι στατιστικά αυξημένο για την ομάδα LPS 0.25mg/kg, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Πίνακας 7).

Το συνολικό σκορ της νευρολογικής εξέτασης συσχετίζεται αρνητικά με τη μεταβολή του βάρους των πειραματοζώων την 1^η ημέρα (Διάγραμμα 4). Συνεπώς, υπάρχει θετική συσχέτιση

μεταξύ της μείωσης σωματικού βάρους, η οποία αποτελεί δείκτη της συμπεριφοράς ασθενείας και της παρουσίας νευρολογικού ελλείμματος. Η παραδική αύξηση του νευρολογικού σκορ, σε αντιστοιχία με το ποσοστό ελάττωσης του σωματικού βάρους, υποδεικνύει ότι η παρουσία του νευρολογικού ελλείμματος συμπεριλαμβάνεται εξίσου στα συμπτώματα της συμπεριφοράς ασθενείας, αντί να αντανακλά μία μόνιμη νευρολογική βλάβη.

Ακολούθησε συσχέτιση της νευρολογικής εξέτασης και των πειραμάτων συμπεριφοράς, με βάση τους κυριότερους δείκτες. Το συνολικό σκορ συσχετίζεται αρνητικά με τον αριθμό των διαβιβάσεων από το σκοτεινό προς το φωτεινό διαμέρισμα, κατά τη δοκιμασία LDBT (Διάγραμμα 18), υποδεικνύοντας σημαντική συσχέτιση νευρολογικού ελλείμματος και άγχους. Επιπλέον, βρέθηκε ότι ο λανθάνων χρόνος μέχρι την εκδήλωση της πρώτης ακινησίας κατά τη δοκιμασία FST συσχετίζεται θετικά με το συνολικό σκορ για όλες τις ομάδες (Pearson's $r=0.33$ & $p<0.01$). Αυτή η θετική συσχέτιση φανερώνει ότι η ύπαρξη νευρολογικού ελλείμματος πιθανόν να συμβάλλει στη καθυστέρηση της εκδήλωσης της καταθλιπτικής συμπεριφοράς. Ειδικότερα για την ομάδα επαγόμενης σήψης, η ακινησία, ως κύριος δείκτης εκτίμησης της καταθλιπτικής συμπεριφοράς, συσχετίζεται αρνητικά με το συνολικό σκορ της νευρολογικής εξέτασης (Pearson's $r=-0.734$ & $p<0.001$). Η απουσία στατιστικά σημαντικού νευρολογικού ελλείμματος στα πειραματόζωα της ομάδας επαγόμενης σήψης δύναται να συνέβαλε στην ενίσχυση της κινητικότητας, κατάσταση που αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για την εκδήλωση καταθλιπτικής συμπεριφοράς. Αντίθετα, η εκδήλωση υψηλού ποσοστού ακινησίας στα πειραματόζωα της ομάδας ήπιας φλεγμονώδους απόκρισης τη 2^η ημέρα (Διάγραμμα 21) πιθανόν να ενισχύεται από τη παρουσία παροδικής νευρολογικής βλάβης.

Σε συνάφεια με την κλινική εξέταση που χρησιμοποιείται στη ΜΕΘ, ως διαγνωστικό εργαλείο της SAE, η αξιολόγηση των νευρολογικών ελλειμμάτων κρίνεται απαραίτητη. Εντούτοις, απαιτείται επικύρωση αυτής της προσέγγισης με πειράματα συμπεριφοράς (*Xin et al, 2025*).

Η επίδραση του LPS στη συμπεριφορά

Οι σωματικές, γνωστικές και συναισθηματικές αποκρίσεις που εξετάζονται λειτουργούν ανεξάρτητα (*Kupferschmid et al, 2017*). Γι' αυτό το λόγο δημιουργήθηκε μια σειρά/πλατφόρμα πειραμάτων συμπεριφοράς τα οποία επαναλαμβάνονται για μεγάλο χρονικό διάστημα. Ωστόσο, υπάρχει πιθανότητα αλληλοεπικάλυψης ή και αλληλεπίδρασης μεταξύ των συμπεριφορικών εκδηλώσεων. Για παράδειγμα, η αναγκαστική κολύμβηση αποτελεί μέσο πρόκλησης στρες και έχει εφαρμοστεί με σκοπό την μελέτη της συνεργιστικής δράσης του χρόνιου στρες και της επαγόμενης από LPS φλεγμονής (*Espinosa-Oliva et al, 2011*). Παράλληλα, το στρες αναγνωρίζεται ως σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την εκδήλωση κατάθλιψης (*Biesmans et al, 2016*). Στο πλαίσιο αυτό, χρησιμοποιούνται πολλαπλοί δείκτες για την κριτική αξιολόγηση της

συμπεριφοράς, σε σύγκριση τόσο με την ομάδα ελέγχου, όσο και μεταξύ της ίδιας ομάδας κατά τις διαδοχικές επαναλήψεις των δοκιμασιών και πραγματοποιείται στατιστική συσχέτιση των αποτελεσμάτων.

Μνήμη-Μάθηση

Καθώς δεν υπάρχει εξειδίκευση των πειραμάτων συμπεριφοράς ως προς συγκεκριμένο γνωστικό τομέα (*Tanila, 2018*), η βραχυπρόθεσμη και η μακροπρόθεσμη μνήμη ελέγχονται με την ίδια δοκιμασία (NORT), με αλλαγή του μεσοδιαστήματος μεταξύ της φάσης εκπαίδευσης και της φάσης ελέγχου (1h, 24h) (*Bekci et al, 2024*).

Κατά την αξιολόγηση της βραχυπρόθεσμης μνήμης, με μεσοδιάστημα 1 ώρας, η ομάδα επαγόμενης σήψης παρουσιάζει γνωστική έκπτωση την 1^η εβδομάδα, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, κατά συμφωνία και τριών δεικτών που χρησιμοποιούνται (Διαγράμματα 9A, 10A, 11A & 12A), η οποία επανεμφανίζεται την 4^η εβδομάδα (Διάγραμμα 11A). Η διαφορά αυτή απουσιάζει από την ομάδα ήπιας φλεγμονώδους απόκρισης.

Η νοητική σύγχυση και η γνωστική έκπτωση, που εμφανίζονται στο άμεσο χρονικό διάστημα μετά τη χορήγηση LPS, μπορούν να θεωρηθούν πρώιμα συμπτώματα της συμπεριφοράς ασθενείας. Το υποτονικό παραλήρημα αποτελεί σοβαρή έκφανση της συμπεριφοράς ασθενείας, που καθορίζει την βαρύτητα της (*Mazeraud et al, 2020*). Συνεπώς, η γνωστική εξασθένηση, η οποία παρουσιάζεται μόνο στην ομάδα επαγόμενης σήψης, υποδεικνύει υψηλότερη κλινική βαρύτητα συμπεριφοράς ασθενείας, σε σχέση με την ομάδα ήπιας φλεγμονώδους απόκρισης.

Κατά το έλεγχο της μακροπρόθεσμης μνήμης, με μεσοδιάστημα 24 ωρών, για την ομάδα ήπιας επαγόμενης σήψης παρατηρείται μία αυξητική τάση στους δείκτες, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Διαγράμματα 5A, 6A, 7A & 8A), που υποδεικνύει μια πιθανή ενίσχυση της γνωσιακής λειτουργίας.

Η εκτίμηση της βραχυπρόθεσμης μνήμης ενδέχεται να υποδηλώνει μια μακροχρόνια νευροπροστατευτική δράση. Η πρόκληση ήπιας ανοσολογικής απόκρισης πιστεύεται ότι διεγείρει το ανοσοποιητικό σύστημα και λειτουργεί ως ανοσοτροποποιητικός παράγοντας. Ορισμένες κυτταροκίνες έχουν συσχετιστεί με την νευροπροστατευτική δράση. Για παράδειγμα, υποστηρίζεται ότι η IL-10 εμπλέκεται στο μηχανισμό μετατροπής των μικρογλοιακών κυττάρων σε ένα νευροπροστατευτικό φαινότυπο (*Mizobuchi & Soma, 2021*). Επίσης, η IL-6 πιστεύεται πως ασκεί προστατευτικό και νευροτροφικό ρόλο, καθώς σηματοδοτεί την αύξηση της έκφρασης των νευροτροφινών (π.χ. Ngf, BDNF, Nt-3), που υποστηρίζουν την επιβίωση των νευρώνων, συμβάλλοντας ως ρυθμιστικός μηχανισμός έναντι της νευροφλεγμονής (*Pienaar et al, 2025*).

Άγχος

Την 1^η εβδομάδα, οι ομάδες πειραματοζώων που έλαβαν LPS εμφάνισαν άγχος, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Με βάση τους κύριους δείκτες αξιολόγησης της δοκιμασίας LDBT, δηλαδή τον αριθμό των διαβιβάσεων από το σκοτεινό στο φωτεινό διαμέρισμα του κουτιού και το χρόνο παραμονής στο φωτεινό διαμέρισμα, η παρουσία του άγχους είναι πιο έντονη στην ομάδα επαγόμενης σήψης, σε σχέση με την ομάδα ήπιας φλεγμονώδους απόκρισης (Διαγράμματα 15 & 17). Η χαρτογράφηση της κίνησης των πειραματοζώων της ομάδας επαγόμενης κατάστασης σήψης, κατά την ανάλυση της δοκιμασίας OFT, επιβεβαίωσε την έντονη παρουσία άγχους, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου την 1^η εβδομάδα, με την εμφάνιση θιγμοταξίας (Διαγράμματα 13 & 14).

Το άγχος αποτελεί ένδειξη της συμπεριφοράς ασθενείας. Η άμεση εκδήλωση άγχους μετά τη χορήγηση LPS συμπεριλαμβάνεται στα συμπτώματα αυτού του συνδρόμου και αποκαλύπτει την εκδήλωση συμπεριφοράς ασθενείας και στις δύο ομάδες πειραματοζώων που έλαβαν LPS, αλλά σε διαφορετικό βαθμό: η κλινική βαρύτητα είναι υψηλότερη για την ομάδα επαγόμενης σήψης.

Το άγχος, ως εκδήλωση της συμπεριφοράς ασθενείας, φαίνεται πως υποχωρεί την 2^η εβδομάδα και για τις δύο ομάδες. Εντούτοις, στην ομάδα επαγόμενης σήψης, επανεμφανίζεται τη 3^η εβδομάδα (Διαγράμματα 15 & 17). Αντίθετα, η ομάδα ήπιας φλεγμονώδους απόκρισης δεν παρουσιάζει αυτή την υποτροπή. Η ελάττωση της προσέγγισης και του χρόνου παραμονής στο κέντρο του πεδίου κατά τη δοκιμασία OFT για την ομάδα επαγόμενης σήψης, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Διάγραμμα 16), παρότι δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά καθιστά φανερή την επανεμφάνιση άγχους τη 3^η εβδομάδα.

Συνεπώς, το άγχος, ως σύμπτωμα της συμπεριφοράς ασθενείας, εκδηλώνεται στην ομάδα ήπιας φλεγμονώδους απόκρισης και σε μεγαλύτερο βαθμό στην ομάδα επαγόμενης σήψης. Επιπλέον, η ομάδα επαγόμενης σήψης παρουσιάζει μία εμμένουσα αγχώδη συμπεριφορά, η οποία εντείνεται πέρα από τις εκδηλώσεις της συμπεριφοράς ασθενείας και επιμένει μέχρι την 3^η εβδομάδα.

Καταθλιπτική συμπεριφορά

Κατά την αξιολόγηση της καταθλιπτικής συμπεριφοράς, η ομάδα ήπιας φλεγμονώδους απόκρισης σημείωσε αυξημένο ποσοστό του χρόνου ακινησίας την 2^η ημέρα, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Διάγραμμα 21Α). Η αύξηση της ακινησίας, ως κύριος δείκτης της καταθλιπτικής συμπεριφοράς, υποχωρεί μετά τη 1^η εβδομάδα και παραμένει σταθερά στα επίπεδα της ομάδας ελέγχου.

Επειδή σε κλινικό επίπεδο, η κατάθλιψη που σχετίζεται με τη φλεγμονή αναπτύσσεται σε ένα υπόβαθρο επίμονης φλεγμονής (*Biesmans et al, 2013*), το αυξημένο ποσοστό ακινησίας, που παρουσιάζει η ομάδα ήπιας φλεγμονώδους απόκρισης κατά την 2^η ημέρα, δεν μπορεί να αποδοθεί

σε καταθλιπτική συμπεριφορά, παρότι αποτελεί δείκτη αυτής. Σε αυτή τη περίπτωση, αποτελεί πιθανή εκδήλωση της συμπεριφοράς ασθενείας, η οποία αποδίδεται πιθανόν σε κόπωση, ανηδονία, νευρολογική βλάβη ή συνδυασμό των παραπάνω συμπτωμάτων ασθενείας.

Από την άλλη, το ποσοστό ακινησίας για την ομάδα επαγόμενης κατάστασης σήψης δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Διάγραμμα 21Α). Ωστόσο, αυξάνεται σημαντικά από τη 2^η εβδομάδα σε σχέση με τη 1^η και παραμένει στα ίδια επίπεδα για το χρονικό διάστημα των 3 επόμενων εβδομάδων (Διάγραμμα 21Β).

Για την ομάδα επαγόμενης κατάστασης σήψης, φαίνεται ότι η καταθλιπτική συμπεριφορά, με βάση τους αντίστοιχους δείκτες, αυξάνεται σημαντικά όταν το άγχος υποχωρεί. Ο αριθμός των διαβιβάσεων από το φωτεινό προς το σκοτεινό πεδίο – δείκτης αντιστρόφως ανάλογος του άγχους – κατά τη δοκιμασία LDBT συσχετίζεται θετικά με το ποσοστό της ακινησίας, κατά τη δοκιμασία FST (Pearson's $r=0.516$ & $p=0.02$). Το γεγονός αυτό αποκαλύπτει πιθανή συσχέτιση της αγχώδους και της καταθλιπτικής συμπεριφοράς με συμπληρωματικό τρόπο.

Η παρουσία της συμπεριφοράς ασθενείας δεν συνεπάγεται την ταυτόχρονη εκδήλωση όλων των χαρακτηριστικών συμπτωμάτων της, εξαιτίας της αλληλοεξουδετέρωσης ορισμένων συμπεριφορών. Συμπεριφορά ασθενείας εμφανίζεται και στις δύο ομάδες πειραματοζώων, που έλαβαν LPS, όμως φανερώνεται με διαφορετικές εκδηλώσεις και κλινική βαρύτητα. Στην ήπια φλεγμονή αποτυπώνεται κυρίως με καταθλιπτική συμπεριφορά και μείωση των αντανάκλαστικών αντιδράσεων, ενώ στην έντονη φλεγμονή που προσομοιάζει τη σήψη με αγχώδη και παραληρηματική συμπεριφορά.

Αξιολόγηση ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων

Η μικροσκοπική μελέτη των οβελιαίων τομών του εγκεφάλου δεν φανέρωσε παθολογικές μεταβολές στη δομή του ιππόκαμπου, οι οποίες να υποστηρίζουν τις πιθανές επιπτώσεις της έντονης ανοσολογικής απόκρισης στην γνωστική λειτουργία, σε καμία από τις πειραματικές ομάδες (Εικόνα 18).

Το πειραματόζωο με τις πιο εκτεταμένες ιστολογικές αλλοιώσεις (ισχαιμικές και αιμορραγικές), όπως απεικονίζονται μακροσκοπικά (Εικόνα 13), σημείωσε τη χαμηλότερη επίδοση στα συμπεριφορικά πειράματα αξιολόγησης άγχους (LDBT, OFT) και μνήμης-γνωστικής λειτουργίας (NOR) την 4^η εβδομάδα, σε σύγκριση με τα πειραματόζωα της ίδιας ομάδας που έλαβαν LPS 2.5mg/kg. Επιπλέον, παρουσίασε σταδιακή αύξηση των δεικτών κατάθλιψης (FST) με το πέρας των εβδομάδων. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την παράλληλη συσχέτιση των μελετών συμπεριφοράς με την ιστολογική εξέταση του εγκεφάλου και υπογραμμίζει την ετερογένεια της SAE, όπως περιγράφεται βιβλιογραφικά.

Στην ομάδα πειραματοζώων που έλαβαν LPS 0.25mg/kg, η φλεγμονώδης διήθηση περιορίστηκε στο χοριοειδές πλέγμα των κοιλιών. Ένα πειραματόζωο παρουσίασε διήθηση του προμετωπιαίου λοβού από ανοσοκύτταρα (Εικόνα 16). Στην περίπτωση αυτή, δεν παρατηρήθηκαν ενδείξεις άγχους, καταθλιπτικής συμπεριφοράς ή νοητικής δυσλειτουργίας, σύμφωνα με τους δείκτες αξιολόγησης συμπεριφοράς (LDBT, FST, NORT) κατά την 4η εβδομάδα. Το συγκεκριμένο ζώο σημείωσε μάλιστα την πιο θετική συμπεριφορική απόκριση στις δοκιμασίες FST και NORT, σε σχέση με τα υπόλοιπα πειραματόζωα της ίδιας ομάδας. Ωστόσο, η νευρολογική εξέταση κατέδειξε τα σοβαρότερα νευρολογικά ελλείμματα, συγκριτικά τόσο με τα ζώα της ομάδας του όσο και με εκείνα της ομάδας επαγόμενης σήψης, τα οποία δεν υποχώρησαν πλήρως μέχρι την 4η εβδομάδα.

Συμπερασματικά, η ήπια και η έντονη φλεγμονή παρουσιάζουν διακριτούς συμπεριφορικούς φαινοτύπους και δομικές μεταβολές στον εγκέφαλο. Η ήπια φλεγμονώδης απόκριση, η οποία επάγεται με την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση LPS σε δόση 0.25mg/kg, οδηγεί σε παροδικά νευρολογικά ελλείμματα, εκδήλωση αγχώδους και καταθλιπτικής συμπεριφοράς, καθώς και σε πιθανή ενίσχυση της γνωσιακής λειτουργίας. Σε ιστολογικό επίπεδο, παρατηρείται εστιακή φλεγμονώδης διήθηση, εντοπισμένη κυρίως στην περικοιλιακή περιοχή. Αντίθετα, η έντονη φλεγμονή, η οποία προσομοιάζει καταστάσεις σήψης και προκαλείται με τη χορήγηση LPS σε δόση 2.5mg/kg, συνοδεύεται από έντονο άγχος και σημαντική γνωσιακή έκπτωση. Ιστολογικά, καταγράφεται εκτεταμένη διήθηση κυττάρων του ανοσοποιητικού σε ολόκληρο τον εγκεφαλικό ιστό, χωρίς εστιακή εντόπιση. Επιπλέον, παρατηρούνται σοβαρές μορφολογικές αλλοιώσεις, που περιλαμβάνουν διάρρηξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, ισχαιμικές και αιμορραγικές βλάβες.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alahmari A. Blood-Brain Barrier Overview: Structural and Functional Correlation. *Neural Plast.* 2021;2021:6564585. Published 2021 Dec 6. doi:10.1155/2021/6564585.
- Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process.* 2012 May;13(2):93-110. doi: 10.1007/s10339-011-0430-z.
- Arifin WN, Zahiruddin WM. Sample Size Calculation in Animal Studies Using Resource Equation Approach. *Malays J Med Sci.* 2017;24(5):101-105. doi:10.21315/mjms2017.24.5.11.
- Atterton B, Paulino MC, Povea P, Martin-Loeches I. Sepsis Associated Delirium. *Medicina (Kaunas).* 2020 May 18;56(5):240. doi: 10.3390/medicina56050240.
- Aviello G, Cristiano C, Luckman SM, D'Agostino G. Brain control of appetite during sickness. *Br J Pharmacol.* 2021;178(10):2096-2110. doi:10.1111/bph.15189.
- Bahaidrah KA, Alzahrani NA, Aldhahri RS, Mansouri RA, Alghamdi BS. Effects of Different Lipopolysaccharide Doses on Short- and Long-Term Spatial Memory and Hippocampus Morphology in an Experimental Alzheimer's Disease Model. *Clin Transl Neurosci.* 2022;6(3):20. doi:10.3390/ctn6030020.
- Banks WA, Gray AM, Erickson MA, et al. Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption: roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and elements of the neurovascular unit. *J Neuroinflammation.* 2015;12:223. Published 2015 Nov 25. doi:10.1186/s12974-015-0434-1.
- Barichello T, Giridharan VV, Catalão CHR, Ritter C, Dal-Pizzol F. Neurochemical effects of sepsis on the brain. *Clin Sci (Lond).* 2023;137(6):401-414. doi:10.1042/CS20220549.
- Bekci E, Gokmen RC, Kanit L, Gozen O, Balkan B, Koylu EO, Keser A. Enhanced Novel Object Recognition and Spatial Memory in Rats Selectively Bred for High Nicotine Preference. *Brain Sci.* 2024 Apr 25;14(5):427. doi: 10.3390/brainsci14050427.
- Beltran-Velasco AI, Clemente-Suárez VJ. Impact of Peripheral Inflammation on Blood-Brain Barrier Dysfunction and Its Role in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci.* 2025;26(6):2440. Published 2025 Mar 9. doi:10.3390/ijms26062440.
- Biesmans S, Matthews LJ, Bouwknecht JA, et al. Systematic Analysis of the Cytokine and Anhedonia Response to Peripheral Lipopolysaccharide Administration in Rats. *Biomed Res Int.* 2016;2016:9085273. doi:10.1155/2016/9085273.
- Biesmans S, Meert TF, Bouwknecht JA, et al. Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:271359. doi:10.1155/2013/271359.

- Bison S, Carboni L, Arban R, Bate S, Gerrard AP, Razzoli M. Differential behavioral, physiological, and hormonal sensitivity to LPS challenge in rats. *Int J Interferon Cytokine Mediator Res.* 2009;1:1–13. doi:10.2147/ijicmr.s4273.
- Bordet R, Deplanque D, Maboudou P, et al. Increase in endogenous brain superoxide dismutase as a potential mechanism of lipopolysaccharide-induced brain ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000;20(8):1190-1196. doi:10.1097/00004647-200008000-00004.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1–2):248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Cai L, Rodgers E, Schoenmann N, Raju RP. Advances in Rodent Experimental Models of Sepsis. *Int J Mol Sci.* 2023;24(11):9578. doi:10.3390/ijms24119578.
- Cai Z, Ye T, Xu X, et al. Antidepressive properties of microglial stimulation in a mouse model of depression induced by chronic unpredictable stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2020;101:109931. doi:10.1016/j.pnpbp.2020.109931.
- Castagné V, Moser P, Roux S, Porsolt RD. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Curr Protoc Pharmacol.* 2010 Jun;Chapter 5:Unit 5.8. doi: 10.1002/0471141755.ph0508s49.
- Chaudhry N, Duggal AK. Sepsis Associated Encephalopathy. *Adv Med.* 2014;2014:762320. doi: 10.1155/2014/762320.
- Chen D, Wang J, Xing Y, Jia P, Zhang Y, Wang J, Feng Y, Liu B, Li X, Liu S. Behavioral assessment of post-stroke depression and anxiety in rodents. *Brain Hemorrhages.* 2020;1(2):105–111. doi:10.1016/j.heest.2020.02.004.
- Chen S, Tang C, Ding H, Wang Z, Liu X, Chai Y, Jiang W, Han Y, Zeng H. Maf1 Ameliorates Sepsis-Associated Encephalopathy by Suppressing the NF- κ B/NLRP3 Inflammasome Signaling Pathway. *Front Immunol.* 2020 Dec 23;11:594071. doi: 10.3389/fimmu.2020.594071.
- Chung HY, Wickel J, Brunkhorst FM, Geis C. Sepsis-Associated Encephalopathy: From Delirium to Dementia? *J Clin Med.* 2020;9(3):703. Published 2020 Mar 5. doi:10.3390/jcm9030703.
- Cnops V, Iyer VR, Parathy N, Wong P, Dawe GS. Test, rinse, repeat: A review of carryover effects in rodent behavioral assays. *Neurosci Biobehav Rev.* 2022;135:104560. doi:10.1016/j.neubiorev.2022.104560.
- Collins SC, Wagner C, Gagliardi L, Kretz PF, Fischer MC, Kessler P, Kannan M, Yalcin B. A method for parasagittal sectioning for neuroanatomical quantification of brain structures in the adult mouse. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2018;8(3):e48. doi:10.1002/cpmo.48.

- Costa R, Tamascia ML, Nogueira MD, Casarini DE, Marcondes FK. Handling of adolescent rats improves learning and memory and decreases anxiety. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2012;51(5):548-553.
- Czapski GA, Gajkowska B, Strosznajder JB. Systemic administration of lipopolysaccharide induces molecular and morphological alterations in the hippocampus. *Brain Res*. 2010;1356:85-94. doi:10.1016/j.brainres.2010.07.096.
- Czerniawski J, Miyashita T, Lewandowski G, Guzowski JF. Systemic lipopolysaccharide administration impairs retrieval of context-object discrimination, but not spatial, memory: Evidence for selective disruption of specific hippocampus-dependent memory functions during acute neuroinflammation. *Brain Behav Immun*. 2015;44:159-166. doi:10.1016/j.bbi.2014.09.014.
- Danielski LG, Giustina AD, Gava FF, Barichello T, Petronilho F. The Many Faces of Astrocytes in the Septic Brain. *Mol Neurobiol*. 2022;59(12):7229-7235. doi:10.1007/s12035-022-03027-7.
- Deitch EA. Rodent models of intra-abdominal infection. *Shock*. 2005;24 Suppl 1:19-23. doi:10.1097/01.shk.0000191386.18818.0a.
- Denver P, Cunningham C. Microglial activation and neuroinflammation in acute and chronic cognitive deficits in sepsis. *Neuropharmacology*. 2025;267:110285. doi:10.1016/j.neuropharm.2024.110285.
- D'Mello C, Swain MG. Immune-to-Brain Communication Pathways in Inflammation-Associated Sickness and Depression. *Curr Top Behav Neurosci*. 2017;31:73-94. doi:10.1007/7854_2016_37.
- Domínguez-Rivas E, Ávila-Muñoz E, Schwarzscher SW, Zepeda A. Adult hippocampal neurogenesis in the context of lipopolysaccharide-induced neuroinflammation: A molecular, cellular and behavioral review [published correction appears in Brain Behav Immun. 2022 Jan;99:412. doi: 10.1016/j.bbi.2021.11.004.]. *Brain Behav Immun*. 2021;97:286-302. doi:10.1016/j.bbi.2021.06.014.
- Drayson OGG, Vozenin MC, Limoli CL. A rigorous behavioral testing platform for the assessment of radiation-induced neurological outcomes. *Methods Cell Biol*. 2023;180:177-197. doi:10.1016/bs.mcb.2023.02.015.
- Du H, Wang S. Omarigliptin Mitigates Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation and Dysfunction of the Integrity of the Blood-Brain Barrier. *ACS Chem Neurosci*. 2020;11(24):4262-4269. doi:10.1021/acscchemneuro.0c00537.
- Dumbuya JS, Li S, Liang L, Chen Y, Du J, Zeng Q. Effects of hydrogen-rich saline in neuroinflammation and mitochondrial dysfunction in rat model of sepsis-associated

- encephalopathy. *J Transl Med*. 2022 Nov 26;20(1):546. doi: 10.1186/s12967-022-03746-4.
- Ebersoldt M, Sharshar T, Annane D. Sepsis-associated delirium. *Intensive Care Med*. 2007;33(6):941-950. doi:10.1007/s00134-007-0622-2.
- Ennaceur A. One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behav Brain Res*. 2010;215(2):244-254. doi:10.1016/j.bbr.2009.12.036.
- Espinosa-Oliva AM, de Pablos RM, Villarán RF, et al. Stress is critical for LPS-induced activation of microglia and damage in the rat hippocampus. *Neurobiol Aging*. 2011;32(1):85-102. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2009.01.012.
- Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Med*. 2021;47(11):1181-1247. doi:10.1007/s00134-021-06506-y.
- Fang S, Wu Z, Guo Y, Zhu W, Wan C, Yuan N, Chen J, Hao W, Mo X, Guo X, Fan L, Li X, Chen J. Roles of microglia in adult hippocampal neurogenesis in depression and their therapeutics. *Front Immunol*. 2023;14:1193053. doi:10.3389/fimmu.2023.1193053.
- File SE, Lippa AS, Beer B, Lippa MT. Animal tests of anxiety. *Curr Protoc Pharmacol*. 2005;Chapter 5:. doi:10.1002/0471141755.ph0538s27.
- Flierl MA, Rittirsch D, Huber-Lang MS, Stahel PF. Pathophysiology of septic encephalopathy--an unsolved puzzle. *Crit Care*. 2010;14(3):165. doi:10.1186/cc9035.
- Gage GJ, Kipke DR, Shain W. Whole animal perfusion fixation for rodents. *J Vis Exp*. 2012;(65):3564. Published 2012 Jul 30. doi:10.3791/3564.
- Gao Q, Hernandez MS. Sepsis-Associated Encephalopathy and Blood-Brain Barrier Dysfunction. *Inflammation*. 2021;44(6):2143-2150. doi:10.1007/s10753-021-01501-3.
- Gayle D, Ilyin SE, Plata-Salamán CR. Feeding status and bacterial LPS-induced cytokine and neuropeptide gene expression in hypothalamus. *Am J Physiol*. 1999;277(4):R1188-R1195. doi:10.1152/ajpregu.1999.277.4.R1188.
- Gidday JM. Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(6):437-448. doi:10.1038/nrn1927.
- Goldim MPS, Della Giustina A, Petronilho F. Using Evans Blue Dye to Determine Blood-Brain Barrier Integrity in Rodents. *Curr Protoc Immunol*. 2019;126(1):e83. doi:10.1002/cpim.83.
- Goldsmith DR, Bekhbat M, Mehta ND, Felger JC. Inflammation-Related Functional and Structural Dysconnectivity as a Pathway to Psychopathology. *Biol Psychiatry*. 2023;93(5):405-418. doi:10.1016/j.biopsych.2022.11.003.

- Grivas V, Markou A, Pitsikas N. The metabotropic glutamate 2/3 receptor agonist LY379268 induces anxiety-like behavior at the highest dose tested in two rat models of anxiety. *Eur J Pharmacol.* 2013;715(1-3):105-110. doi:10.1016/j.ejphar.2013.05.048.
- Guo D, Xu Y, Liu Z, et al. IGF2 inhibits hippocampal over-activated microglia and alleviates depression-like behavior in LPS- treated male mice. *Brain Res Bull.* 2023;194:1-12. doi:10.1016/j.brainresbull.2023.01.001.
- Harden LM, du Plessis I, Poole S, Laburn HP. Interleukin-6 and leptin mediate lipopolysaccharide-induced fever and sickness behavior. *Physiol Behav.* 2006;89(2):146-155. doi:10.1016/j.physbeh.2006.05.016.
- Harden LM, du Plessis I, Roth J, Loram LC, Poole S, Laburn HP. Differences in the relative involvement of peripherally released interleukin (IL)-6, brain IL-1 β and prostanoids in mediating lipopolysaccharide-induced fever and sickness behavior. *Psychoneuroendocrinology.* 2011;36(5):608-622. doi:10.1016/j.psyneuen.2010.09.003.
- Haruwaka K, Ikegami A, Tachibana Y, et al. Dual microglia effects on blood brain barrier permeability induced by systemic inflammation. *Nat Commun.* 2019;10(1):5816. Published 2019 Dec 20. doi:10.1038/s41467-019-13812-z.
- He F, Zhang N, Lv Y, Sun W, Chen H. Low-dose lipopolysaccharide inhibits neuronal apoptosis induced by cerebral ischemia/reperfusion injury via the PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway in rats. *Mol Med Rep.* 2019;19(3):1443-1452. doi:10.3892/mmr.2019.9827.
- Hennigan A, Trotter C, Kelly AM. Lipopolysaccharide impairs long-term potentiation and recognition memory and increases p75NTR expression in the rat dentate gyrus. *Brain Res.* 2007;1130(1):158-166. doi:10.1016/j.brainres.2006.10.066.
- Hoogland IC, Houbolt C, van Westerloo DJ, van Gool WA, van de Beek D. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. *J Neuroinflammation.* 2015;12:114. doi:10.1186/s12974-015-0332-6.
- Kádár A, Wittmann G, Liposits Z, Fekete C. Improved method for combination of immunocytochemistry and Nissl staining. *J Neurosci Methods.* 2009;184(1):115-118. doi:10.1016/j.jneumeth.2009.07.010.
- Kadry H, Noorani B, Cucullo L. A blood-brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids Barriers CNS.* 2020;17(1):69. Published 2020 Nov 18. doi:10.1186/s12987-020-00230-3.
- Kealy J, Murray C, Griffin EW, et al. Acute Inflammation Alters Brain Energy Metabolism in Mice and Humans: Role in Suppressed Spontaneous Activity, Impaired Cognition, and Delirium. *J Neurosci.* 2020;40(29):5681-5696. doi:10.1523/JNEUROSCI.2876-19.2020.

- Kenney JW, Adoff MD, Wilkinson DS, Gould TJ. The effects of acute, chronic, and withdrawal from chronic nicotine on novel and spatial object recognition in male C57BL/6J mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2011;217(3):353-365. doi:10.1007/s00213-011-2283-7.
- Kreisel T, Frank MG, Licht T, et al. Dynamic microglial alterations underlie stress-induced depressive-like behavior and suppressed neurogenesis. *Mol Psychiatry*. 2014;19(6):699-709. doi:10.1038/mp.2013.155.
- Kuperberg SJ, Wadgaonkar R. Sepsis-Associated Encephalopathy: The Blood-Brain Barrier and the Sphingolipid Rheostat. *Front Immunol*. 2017;8:597. Published 2017 Jun 16. doi:10.3389/fimmu.2017.00597.
- Kupferschmid BJ, Therrien B, Rowsey PJ. Effects of low-dose lipopolysaccharide and age on spatial learning in different Morris water maze protocols. *SAGE Open Med*. 2017;5:2050312117729112. doi:10.1177/2050312117729112.
- Kupferschmid BJ, Therrien BA. Spatial Learning Responses to Lipopolysaccharide in Adult and Aged Rats. *Biol Res Nurs*. 2018;20(1):32-39. doi:10.1177/1099800417726875.
- Lasselin J, Elsenbruch S, Lekander M, et al. Mood disturbance during experimental endotoxemia: Predictors of state anxiety as a psychological component of sickness behavior. *Brain Behav Immun*. 2016;57:30-37. doi:10.1016/j.bbi.2016.01.003.
- Leger M, Quiedeville A, Bouet V, Haelewyn B, Boulouard M, Schumann-Bard P, Freret T. Object recognition test in mice. *Nat Protoc*. 2013;8(12):2531-2537. doi:10.1038/nprot.2013.155.
- Li J, Jia Q, Yang L, et al. Sepsis-associated encephalopathy: Mechanisms, Diagnosis, and Treatments update. *Int J Biol Sci*. 2025;21(7):3214-3228. doi:10.7150/ijbs.102234.
- Li W, Xu Y, Liu Z, et al. TRPV4 inhibitor HC067047 produces antidepressant-like effect in LPS-induced depression mouse model. *Neuropharmacology*. 2021;201:108834. doi:10.1016/j.neuropharm.2021.108834.
- Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*. 2017;541(7638):481-487. doi:10.1038/nature21029.
- Lin HY, Huang CC, Chang KF. Lipopolysaccharide preconditioning reduces neuroinflammation against hypoxic ischemia and provides long-term outcome of neuroprotection in neonatal rat. *Pediatr Res*. 2009;66(3):254-259. doi:10.1203/PDR.0b013e3181b0d336.
- Manabe T, Heneka MT. Cerebral dysfunctions caused by sepsis during ageing. *Nat Rev Immunol*. 2022;22(7):444-458. doi:10.1038/s41577-021-00643-7.
- Mathiasen JR, DiCamillo A. Novel object recognition in the rat: a facile assay for cognitive function. *Curr Protoc Pharmacol*. 2010;Chapter 5:. doi:10.1002/0471141755.ph0559s49.

- Mázala-de-Oliveira T, Silva BT, Campello-Costa P, Carvalho VF. The role of the adrenal-gut-brain axis on comorbid depressive disorder development in diabetes. *Biomolecules*. 2023;13(10):1504. doi:10.3390/biom13101504.
- Mazeraud A, Righy C, Bouchereau E, Benghanem S, Bozza FA, Sharshar T. Septic-Associated Encephalopathy: a Comprehensive Review. *Neurotherapeutics*. 2020;17(2):392-403. doi:10.1007/s13311-020-00862-1.
- Mehdi SF, Qureshi MH, Pervaiz S, et al. Endocrine and metabolic alterations in response to systemic inflammation and sepsis: a review article. *Mol Med*. 2025;31(1):16. Published 2025 Jan 21. doi:10.1186/s10020-025-01074-z.
- Mittli D, Tukacs V, Ravasz L, et al. LPS-induced acute neuroinflammation, involving interleukin-1 beta signaling, leads to proteomic, cellular, and network-level changes in the prefrontal cortex of mice. *Brain Behav Immun Health*. 2023;28:100594. doi:10.1016/j.bbih.2023.100594.
- Mizobuchi H, Soma GI. Low-dose lipopolysaccharide as an immune regulator for homeostasis maintenance in the central nervous system through transformation to neuroprotective microglia. *Neural Regen Res*. 2021;16(10):1928–1934. doi: 10.4103/1673-5374.308067.
- Murata S, Yamashita H, Kido S, Harada D, Ohtsuru S, Sato N. DYNAMIC METABOLIC CHANGES OBSERVED IN AN LPS-INDUCED SYSTEMIC INFLAMMATION RAT MODEL USING CONTINUOUS LONG-TERM INDIRECT CALORIMETRY EXPERIMENTS. *Shock*. 2023;60(1):130-136. doi:10.1097/SHK.0000000000002144.
- Nandi A, Virmani G, Barve A, Marathe S. DBscorer: An Open-Source Software for Automated Accurate Analysis of Rodent Behavior in Forced Swim Test and Tail Suspension Test. *eNeuro*. 2021;8(6):ENEURO.0305-21.2021. Published 2021 Nov 4. doi:10.1523/ENEURO.0305-21.2021.
- Narayanan SN, Kumar RS. An improved light dark box test by using a real-time video tracking system. *Acta Biol Hung*. 2018;69(4):371-384. doi:10.1556/018.69.2018.4.1.
- Nedeva C, Menassa J, Puthalakath H. Sepsis: Inflammation Is a Necessary Evil. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:108. Published 2019 Jun 20. doi:10.3389/fcell.2019.00108.
- On Wah DT, Kavaliers M, Bishnoi IR, Ossenkopp KP. Lipopolysaccharide (LPS) induced sickness in early adolescence alters the behavioral effects of the short-chain fatty acid, propionic acid, in late adolescence and adulthood: Examining anxiety and startle reactivity. *Behav Brain Res*. 2019;360:312-322. doi:10.1016/j.bbr.2018.12.003.
- Ormerod BK, Hanft SJ, Asokan A, Haditsch U, Lee SW, Palmer TD. PPAR γ activation prevents impairments in spatial memory and neurogenesis following transient illness. *Brain Behav Immun*. 2013;29:28-38. doi:10.1016/j.bbi.2012.10.017.

- Panahpour H, Farhoudi M, Omid Y, Mahmoudi J. An In Vivo Assessment of Blood-Brain Barrier Disruption in a Rat Model of Ischemic Stroke. *J Vis Exp*. 2018;(133):57156. Published 2018 Mar 11. doi:10.3791/57156.
- Paylor R, Spencer CM, Yuva-Paylor LA, Pieke-Dahl S. The use of behavioral test batteries, II: effect of test interval. *Physiol Behav*. 2006;87(1):95-102. doi:10.1016/j.physbeh.2005.09.002.
- Peng X, Luo Z, He S, Zhang L, Li Y. Blood-Brain Barrier Disruption by Lipopolysaccharide and Sepsis-Associated Encephalopathy. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:768108. doi:10.3389/fcimb.2021.768108.
- Petronilho F, Goldman JL, Barichello T. Evans blue-albumin as a marker to evaluate blood-brain barrier integrity in neonatal and adult rodents. In: Barichello T, ed. *Blood-Brain Barrier*. Vol 142. Neuromethods. New York, NY: Humana Press; 2019:151–158. doi:10.1007/978-1-4939-8946-1_12.
- Pienaar L, Ramsamy A, Millen AME, Baijnath S. Regional Molecular Changes in Chronic Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation. *Biol Psychiatry Glob Open Sci*. 2025;5(5):100515. doi:10.1016/j.bpsgos.2025.100515.
- Pitsikas N, Boultsadakis A, Georgiadou G, Tarantilis PA, Sakellaridis N. Effects of the active constituents of *Crocus sativus* L., crocins, in an animal model of anxiety. *Phytomedicine*. 2008;15(12):1135-1139. doi:10.1016/j.phymed.2008.06.005.
- Pitsikas N, Georgiadou G, Delis F, Antoniou K. Effects of Anesthetic Ketamine on Anxiety-Like Behaviour in Rats. *Neurochem Res*. 2019;44(4):829-838. doi:10.1007/s11064-018-02715-y.
- Qin L, Wu X, Block ML, et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*. 2007;55(5):453-462. doi:10.1002/glia.20467.
- Ramírez K, Quesada-Yamasaki D, Fornaguera-Trías J. A protocol to perform systemic lipopolysaccharide (LPS) challenge in rats. *Odovtos Int J Dent Sci*. 2019;21(1):53-66. doi:10.15517/ijds.v21i1.35510.
- Reddy DS, Li Y, Qamari T, Ramakrishnan S. Behavioral Assays for Comprehensive Evaluation of Cognitive and Neuropsychiatric Comorbidities of Traumatic Brain Injury and Chronic Neurological Disorders. *Curr Protoc*. 2024;4(10):e70019. doi:10.1002/cpz1.70019.
- Robba C, Crippa IA, Taccone FS. Septic encephalopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2018;18(12):82. doi:10.1007/s11910-018-0895-6.
- Rodriguez RM, Wetsel WC. Assessments of Cognitive Deficits in Mutant Mice. In: Levin ED, Buccafusco JJ, eds. *Animal Models of Cognitive Impairment*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2006.

- Rosenzweig HL, Lessov NS, Henshall DC, Minami M, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Endotoxin preconditioning prevents cellular inflammatory response during ischemic neuroprotection in mice. *Stroke*. 2004;35(11):2576-2581. doi:10.1161/01.STR.0000143450.04438.ae.
- Sarah V. Inflammation and sepsis: Unraveling the complex relationship for improved patient outcomes. *J Clin Path Lab Med*. 2023;5(3):153.
- Saunders NR, Dziegielewska KM, Møllgård K, Habgood MD. Markers for blood-brain barrier integrity: how appropriate is Evans blue in the twenty-first century and what are the alternatives?. *Front Neurosci*. 2015;9:385. Published 2015 Oct 29. doi:10.3389/fnins.2015.00385.
- Savran M, Ozmen O, Erzurumlu Y, Savas HB, Asci S, Kaynak M. The Impact of Prophylactic Lacosamide on LPS-Induced Neuroinflammation in Aged Rats. *Inflammation*. 2019 Oct;42(5):1913-1924. doi: 10.1007/s10753-019-01053-7.
- Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, et al. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron*. 2012;74(4):691-705. doi:10.1016/j.neuron.2012.03.026.
- Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp*. 2015;(96):52434. doi:10.3791/52434.
- Serchov T, van Calker D, Biber K. Light/dark transition test to assess anxiety-like behavior in mice. *Bio-Protocol*. 2016;6(19):e1957. doi:10.21769/BioProtoc.1957.
- Sergeyev V, Broberger C, Hökfelt T. Effect of LPS administration on the expression of POMC, NPY, galanin, CART and MCH mRNAs in the rat hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res*. 2001;90(2):93-100. doi:10.1016/s0169-328x(01)00088-2.
- Shim KH, Jeong KH, Bae SO, et al. Assessment of ZnO and SiO₂ nanoparticle permeability through and toxicity to the blood-brain barrier using Evans blue and TEM. *Int J Nanomedicine*. 2014;9 Suppl 2(Suppl 2):225-233. Published 2014 Dec 15. doi:10.2147/IJN.S58205.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801-810. doi:10.1001/jama.2016.0287.
- Sivakumaran MH, Mackenzie AK, Callan IR, Ainge JA, O'Connor AR. The Discrimination Ratio derived from Novel Object Recognition tasks as a Measure of Recognition Memory Sensitivity, not Bias. *Sci Rep*. 2018;8(1):11579. Published 2018 Aug 1. doi:10.1038/s41598-018-30030-7.

- Slattery DA, Cryan JF. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nat Protoc.* 2012;7(6):1009-1014. Published 2012 May 3. doi:10.1038/nprot.2012.044.
- Sonneville R, Benganem S, Jeantin L, et al. The spectrum of sepsis-associated encephalopathy: a clinical perspective. *Crit Care.* 2023;27(1):386. Published 2023 Oct 5. doi:10.1186/s13054-023-04655-8.
- Stamatiou R, Vasilaki A, Tzini D, et al. Colistin Effects on Emphysematous Lung in an LPS-Sepsis Model. *Antibiotics (Basel).* 2023;12(12):1731. doi:10.3390/antibiotics12121731.
- Tanila H. Testing cognitive functions in rodent disease models: Present pitfalls and future perspectives. *Behav Brain Res.* 2018;352:23-27. doi:10.1016/j.bbr.2017.05.040.
- Tian M, Zhan Y, Cao J, Gao J, Sun J, Zhang L. Targeting blood-brain barrier for sepsis-associated encephalopathy: Regulation of immune cells and ncRNAs. *Brain Res Bull.* 2024;209:110922. doi:10.1016/j.brainresbull.2024.110922.
- Turkheimer FE, Veronese M, Mondelli V, Cash D, Pariante CM. Sickness behaviour and depression: An updated model of peripheral-central immunity interactions. *Brain Behav Immun.* 2023;111:202-210. doi:10.1016/j.bbi.2023.03.031.
- Vargas-Caraveo A, Sayd A, Maus SR, et al. Lipopolysaccharide enters the rat brain by a lipoprotein-mediated transport mechanism in physiological conditions. *Sci Rep.* 2017;7(1):13113. Published 2017 Oct 13. doi:10.1038/s41598-017-13302-6.
- Vogel-Ciernia A, Wood MA. Examining object location and object recognition memory in mice. *Curr Protoc Neurosci.* 2014;69:8.31.1-8.31.17. Published 2014 Oct 8. doi:10.1002/0471142301.ns0831s69.
- Wang HL, Lai TW. Optimization of Evans blue quantitation in limited rat tissue samples. *Sci Rep.* 2014;4:6588. Published 2014 Oct 10. doi:10.1038/srep06588.
- Wang R, Bi W, Huang S, et al. Recent advances in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of sepsis-associated encephalopathy. *Brain-X.* 2024;2:e67. doi:10.1002/brx2.67.
- Wen R, Zhang TN, Zhang T, et al. A novel long noncoding RNA-lncRNA-AABR07066529.3 alleviates inflammation, apoptosis, and pyroptosis by inhibiting MyD88 in lipopolysaccharide-induced myocardial depression. *FASEB J.* 2023;37(8):e23063. doi:10.1096/fj.202201680R.
- Widmer A, Schuetz P. Endocrine dysfunction during sepsis—are changes in hormone levels a physiological adaptation or a therapeutic target? *J Lab Precis Med.* 2018;3(61):1-6. doi:10.21037/jlpm.2018.07.02.

- Wu D, Chen Q, Chen X, Han F, Chen Z, Wang Y. The blood-brain barrier: structure, regulation, and drug delivery. *Signal Transduct Target Ther.* 2023;8(1):217. Published 2023 May 25. doi:10.1038/s41392-023-01481-w.
- Xin Y, Tian M, Pei X, et al. Optimized Mouse Model of Sepsis-Associated Encephalopathy: A Rational Standard Based on Modified SHIRPA Score and Neurobehaviors in Mice. *CNS Neurosci Ther.* 2025;31(4):e70365. doi:10.1111/cns.70365.
- Xin Y, Wang J, Chu T, Zhou Y, Liu C, Xu A. Electroacupuncture Alleviates Neuroinflammation by Inhibiting the HMGB1 Signaling Pathway in Rats with Sepsis-Associated Encephalopathy. *Brain Sci.* 2022;12(12):1732. Published 2022 Dec 17. doi:10.3390/brainsci12121732.
- Xu Y, He Q, Wang M, et al. Quantifying blood-brain-barrier leakage using a combination of evans blue and high molecular weight FITC-Dextran. *J Neurosci Methods.* 2019;325:108349. doi:10.1016/j.jneumeth.2019.108349.
- Yankelevitch-Yahav R, Franko M, Huly A, Doron R. The forced swim test as a model of depressive-like behavior. *J Vis Exp.* 2015;(97):52587. Published 2015 Mar 2. doi:10.3791/52587.
- Yao L, Xue X, Yu P, Ni Y, Chen F. Evans Blue Dye: A Revisit of Its Applications in Biomedicine. *Contrast Media Mol Imaging.* 2018;2018:7628037. doi:10.1155/2018/7628037.
- Yarnell AM, Barry ES, Mountney A, Shear D, Tortella F, Grunberg NE. The Revised Neurobehavioral Severity Scale (NSS-R) for Rodents. *Curr Protoc Neurosci.* 2016;75:9.52.1-9.52.16. Published 2016 Apr 8. doi:10.1002/cpns.10.
- Zakaria R, Wan Yaacob WM, Othman Z, Long I, Ahmad AH, Al-Rahbi B. Lipopolysaccharide-induced memory impairment in rats: a model of Alzheimer's disease. *Physiol Res.* 2017;66(4):553-565. doi:10.33549/physiolres.933480.
- Zhang J, Xiong H. Brain tissue preparation, sectioning, and staining. In: Xiong H, Gendelman HE, eds. *Current Laboratory Methods in Neuroscience Research.* New York, NY: Springer; 2014:3–22. doi:10.1007/978-1-4614-8794-4_1.