



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Πειραματική μελέτη της μικρογλοίας στο Κεντρικό Νευρικό  
Σύστημα κατόπιν χορήγησης αντιγόνου του *Ελικοβακτηριδίου του*  
*Πυλωρού***

**Μποζίκη Μαρίνα Κλεοπάτρα**

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Χατζηγεωργίου Γεώργιος, Καθηγητής Νευρολογίας, Επιβλέπων
- Γερμενής Αναστάσιος, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας
- Γρηγοριάδης Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας

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

Λάρισα, Φεβρουάριος, 2015





UNIVERSITY OF THESSALY  
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE  
FACULTY OF MEDICINE



**MASTER PROGRAM IN  
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”**

**MASTER THESIS  
Experimental study of microglia in the Central Nervous System  
following *Helicobacter Pylori* antigen administration**

By  
Boziki Marina Kleopatra

Examining committee:

- Hatzigeorgiou Georgios, Professor in Neurology, Supervisor
- Germenis Anastasios, Professor in Laboratory Immunology
- Grigoriadis Nikolaos, Associate Professor in Neurology

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 Clinical  
Applications of Molecular Medicine

Larisa, February, 2015



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ- ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9
ABSTRACT	11
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	17
1. Ανοσιακή απάντηση στην περιφέρεια	19
2. Φυσική ανοσία στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα – τα κύτταρα της γλοίας	21
3. Ο ρόλος της μικρογλοίας στην Πολλαπλή Σκλήρυνση (ΠΣ)	23
4. Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα (ΠΑΕ)	26
5. Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού (ΕΠ)	26
6. Ενδείξεις νοσοτροποποιητικής δράσης του ΕΠ στην ΠΣ και στην ΠΑΕ – ο ρόλος της μικρογλοίας	28
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	35
7. ΥΛΙΚΟ	37
7.1. Πειραματόζωα	37
7.2. Αντιγόνα	37
8. ΜΕΘΟΔΟΙ	39
8.1. Μονιμοποίηση ιστού και προετοιμασία για ιστοπαθολογική μελέτη	39
8.2. Ανοσοϊστοχημικές τεχνικές	39
8.3. Στατιστική ανάλυση	40
9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	41
9.1. Ποσοτική μελέτη ενεργοποίησης της μικρογλοίας στο ΚΝΣ	41
9.1.1. Επίπεδο μετωπιαίου πόλου	42
9.1.2. Προμετωπιαίο επίπεδο	43
9.1.3. Διεγκέφαλος	45
9.1.4. Διεγκέφαλος – ουραίο επίπεδο	47
9.1.5. Παρεγκεφαλίδα – ουραίο επίπεδο	50
9.1.6. Νωτιαίος μυελός	52
9.2. Ποιοτικός χαρακτηρισμός της μικρογλοίας ως προς το φαινότυπο ενεργοποίησης – προκαταρκτικά αποτελέσματα	53
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	57



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ- ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Πειραματικής Ανοσολογίας και Νευροανοσολογίας της Β'Νευρολογικής Κλινικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Α.Χ.Ε.Π.Α. στη Θεσσαλονίκη, κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2013-2014.

Θεωρώ καθήκον, αλλά πρωτίστως προσωπική μου ανάγκη, να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και τις θερμές μου ευχαριστίες, σε όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση αυτής της μελέτης:

Στον κύριο Χατζηγεωργίου Γεώργιο, Καθηγητή Νευρολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, ο οποίος, ως επιβλέπων της μελέτης, μου παρείχε τη δυνατότητα να εκπονήσω την παρούσα μελέτη, καθώς και για την αμέριστη βοήθεια και συμπαράσταση.

Στον κύριο Γρηγοριάδη Νικόλαο, Αναπληρωτή Καθηγητή Νευρολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης για την αμέριστη εμπιστοσύνη, καθοδήγηση και βοήθεια που μου προσέφερε στη διάρκεια της παραμονής και εργασίας μου στο Εργαστήριο Πειραματικής Ανοσολογίας και Νευροανοσολογίας της Β' Νευρολογικής Κλινικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Στον κύριο Γερμενή Αναστάσιο, Καθηγητή Πειραματικής Ανοσολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, ως μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τη βοήθεια και συμπαράσταση κατά τη διενέργεια της παρούσας μελέτης.

Στον κύριο Δαρδιάτη Ευθύμιο, Επίκουρο Καθηγητή Νευρολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τη βοήθεια και συμπαράσταση κατά τη διενέργεια της παρούσας μελέτης.

Στον Διευθυντή της Β' Νευρολογικής Κλινικής του Π.Γ.Ν.Θ. ΑΧΕΠΑ κύριο Μανουσάκη - Καρακώστα Δημήτριο, για την έμπρακτη στήριξη στη διάρκεια εκπόνησης της μελέτης.

Θερμές ευχαριστίες απευθύνω στα μέλη του Εργαστηρίου Πειραματικής Ανοσολογίας και Νευροανοσολογίας της Β' Νευρολογικής Κλινικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Πιο συγκεκριμένα ευχαριστώ την Τεχνολόγο Ιατρικών Εργαστηρίων κα. Όλγα Τουλούμη, την Τεχνολόγο Ιατρικών Εργαστηρίων κα. Ευαγγελία Νουσιοπούλου, τη Βιολόγο και Υποψήφια Διδάκτωρ του Α.Π.Θ. κα. Ευαγγελία Κεσίδου, την Κτηνίατρο κα. Ευαγγελία Κωφίδου, το

Βιοχημικό και Υποψήφιο Διδάκτορα του ΑΠΘ κ. Πασχάλη Θεοτόκη, τη Βιολόγο και Υποψήφια Διδάκτωρ του ΑΠΘ κα. Νικολέτα Δεληβάνογλου, για τη συμβολή τους στη διάρκεια της διενέργειας της παρούσας μελέτης.

Επίσης ευχαριστώ τη Βιολόγο και Διδάκτωρ κα. Ρόζα Λαγουδάκη, τη Μοριακή Βιολόγο και Υποψήφια Διδάκτωρ του ΔΠΘ κα. Πουλατσίδου Κυριακή-Νεφέλη, τη Βιολόγο και Μεταπτυχιακή φοιτήτρια του ΑΠΘ κα. Ξηροφώτου Αναστασία και το συνεργάτη του Εργαστηρίου κ. Δημήτρο Μυστρίδη για την ηθική και επιστημονική τους συμπαράσταση.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά το Διευθυντή του Τμήματος Ιατρικής Μικροβιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου ΠΑΣΤΕΡ κύριο Μεντή Ανδρέα, καθώς και τον Κύριο Ερευνητή του Τμήματος Ιατρικής Μικροβιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου ΠΑΣΤΕΡ, κύριο Σγούρα Διονύσιο, για την τιμή να μου επιτρέψουν εκπαιδευτώ στο Εργαστήριο του Τμήματος Ιατρικής Μικροβιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου ΠΑΣΤΕΡ σε τεχνικές καλλιέργειας του στελέχους Sydney Strain 1 του Ελικοβακτηριδίου του Πυλωρού και του βακτηρίου *Escherichia coli*, για την παροχή των μικροβιακών στελεχών, καθώς και για την πολύτιμη επιστημονική τους συμβουλή στην παρούσα μελέτη. Το Βιολόγο και Διδάκτορα κ. Παπαδάκο Κωνσταντίνο και τη Βιολόγο και Υποψήφια Διδάκτωρ κα. Σουγλέρη Ιωάννα ευχαριστώ για την εκπαίδευση και την πολύτιμη έμπρακτη βοήθειά τους στην καλλιέργεια και επεξεργασία των μικροβιακών στελεχών.

Ευχαριστώ τους συνεργάτες μου στη λήψη ειδικότητας, Ιατρούς κα Μαμουλή Δήμητρα, κ. Χατζηγεωργίου Σταύρο, κα. Πολυχρονιάδου Ελένη, κα. Κουφού Ελένη, κ. Παπαδόπουλο Γεώργιο, κα. Κουτρουλού Ιωάννα, κ. Μπακιρτζή Χρήστο, κ. Νατσή Κωσταντίνο, κ. Ζιάμο Χρήστο, κα. Τρέσκα Ιουλία, κα Συντηλά Στελίνα - Αγγελίνα, κα. Παπαζαφειρίου Παναγιώτα και κ. Κυριαζή Οδυσσέα, για τη συναδελφικότητα και την ηθική συμπαράσταση στη διάρκεια περάτωσης της μελέτης.

Θερμές ευχαριστίες στη Νευρολόγο κα Δερετζή Γεωργία, στον Ιατρό και Διδάκτορα του ΑΠΘ κ. Γαβαλά Εμμανουήλ και στον Γαστρεντερολόγο και Διδάκτορα του ΑΠΘ κ. Ζαβό Χρήστο, συνεργάτες, για την ηθική και επιστημονική συμπαράσταση.

Θερμές ευχαριστίες στον κύριο Ιωάννη Κουντουρά, Γαστρεντερολόγο, Καθηγητή Παθολογίας του ΑΠΘ, του οποίου η πολυετής ερευνητική εργασία στο πεδίο της ανοσοτροποποιητικής δράσης του Ελικοβακτηριδίου του Πυλωρού έθεσε τα θεμέλια για τη διενέργεια της παρούσας μελέτης.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Πολλαπλή Σκλήρυνση (ΠΣ) είναι αυτοάνοση φλεγμονώδης νόσος του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ), διαμεσολαβούμενη από T-λεμφοκύτταρα. Σε αντίθεση με την κλασική θεώρηση αναφορικά με την παθογένεση της νόσου, πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα υποδεικνύουν νευροεκφυλιστικές αλλοιώσεις από τα πρώιμα στάδια, ενώ πληθαίνουν οι ερευνητές που υποστηρίζουν ότι η ΠΣ ενδέχεται να είναι μια πρωτοπαθώς νευροεκφυλιστική νόσος. Περιβαλλοντικοί παράγοντες, κυρίως λοιμώξεις, επίσης θεωρείται ότι συμβάλλουν στην παθογένεση της νόσου. Εντούτοις, μεμονωμένος αιτιολογικός παραγοντας δεν έχει ταυτοποιηθεί ως σήμερα. Το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού (ΕΠ), gram-αρνητικό σπειροειδές βακτήριο, αποικίζει το γαστρικό βλεννογόνο κατά προσέγγιση του 50% του πληθυσμού στον αναπτυγμένο κόσμο. Επιδημιολογικές μελέτες συνδέουν τη λοίμωξη από με την ΠΣ, δίχως διαθέσιμα πειραματικά ερευνητικά δεδομένα. Στα πλαίσια έρευνας των ανοσοτροποποιητικών ιδιοτήτων αντιγόνου του ΕΠ σε πειραματικό μοντέλο της ΠΣ, την Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα (ΠΑΕ), διαπιστώθηκε σχετική προστατευτική δράση του αντιγόνου ΕΠ έναντι της νόσου. Προκειμένου να μελετηθούν μηχανισμοί ενδεχόμενης νευροπροστατευτικής δράσης του αντιγόνου ΕΠ, η παρούσα μελέτη έχει ως σκοπό να διερευνήσει την επίδραση χορήγησης αντιγόνου ΕΠ στη μικρογλοία του ΚΝΣ. Για το σκοπό αυτό χορηγήθηκε αντιγόνο ΕΠ σε PBS σε πειραματόζωα της φυλής C57Bl/6, σε τρεις διαδοχικές εβδομαδιαίες ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις. Πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε αντιγόνο *e.coli* ή PBS χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα θετικών και αρνητικών μαρτύρων αντίστοιχα. Κατόπιν ολοκλήρωσης της χορήγησης του αντιγόνου μελετήθηκε ο βαθμός ενεργοποίησης της μικρογλοίας στο ΚΝΣ με τεχνικές ανοσοϊστοχημείας. Δεν διαπιστώθηκε σημαντικού βαθμού ενεργοποίηση της μικρογλοίας στο ΚΝΣ πειραματοζώων που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, συγκριτικά με τα πειραματόζωα που έλαβαν PBS. Αντιθέτως, διαπιστώθηκε σημαντικά αυξημένος βαθμός ενεργοποίησης της μικρογλοίας στο ΚΝΣ πειραματοζώων που έλαβαν αντιγόνο *e.coli*, συγκριτικά με τα πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ και PBS. Τα ερευνητικά αυτά αποτελέσματα υποδεικνύουν ενδεχόμενη νευροπροστατευτική δράση, ειδική για το αντιγόνο ΕΠ, μέσω τροποποίησης του βαθμού ενεργοποίησης της μικρογλοίας στο ΚΝΣ.

**Λέξεις κλειδιά:** Πολλαπλή Σκλήρυνση, Κεντρικό Νευρικό Σύστημα, *Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού*, Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα, μικρογλοία, νευροπροστασία

## ABSTRACT

Multiple Sclerosis (MS) is an autoimmune T-cell mediated inflammatory disease of the Central Nervous System (CNS). Contrary to the classical concept regarding disease pathogenesis, recent research indicates neurodegenerative pathology early in the course of the disease. On the basis of these findings, it has been suggested that MS may be a primary neurodegenerative disease. Environmental factors, namely, infectious agents, are also regarded to contribute in disease pathogenesis. Nevertheless, a single causative agent remains to be elucidated. *Helicobacter Pylori* (HP), a spiral gram-negative bacterium colonizes gastric mucosa of approximately 50% of the population in the developed world. Epidemiological evidence links HP infection with MS. However, experimental evidence on the field is lacking. A relative protective effect of HP antigen administration against Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE), the most commonly used animal model of MS, has been shown in a study regarding immune-modulating properties of HP antigen. In order to elucidate possible neuroprotective effect of HP antigen, the present study aims at investigating the effect of HP antigen administration on microglia in the CNS. For this purpose, C57Bl/6 mice were intraperitoneally administered with HP antigen on three consecutive weekly injections. Mice administered with e.coli antigen or PBS served as positive and negative controls, respectively. Following antigen administration, the degree of microglia activation was assessed by the use of techniques of immunohistochemistry. No significant microglia activation was shown in the CNS of mice that were administered with HP antigen, compared to mice that received PBS. On the contrary, significantly increased microglia activation was shown in the CNS of mice administered with e.coli antigen, compared to mice administered with HP antigen, as well as to mice administered with PBS. These results indicate possible HP antigen specific neuroprotective effect by modification of microglia activation in the CNS.

**Keywords:** Multiple Sclerosis, Central Nervous System, *Helicobacter Pylori*, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, microglia, neuroprotection



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ΠΣ αποτελεί νόσο αυτοάνοσης αρχής, διαμεσολαβούμενη από αυτοαντιδρώντα, έναντι της μυελίνης, T-λεμφοκύτταρα. Στον αναπτυγμένο κόσμο αποτελεί τη συχνότερη αιτία αναπηρίας προερχόμενης από το ΚΝΣ, σε νεαρούς ενήλικες. Το γεγονός ότι η ΠΣ πλήττει ένα ιδιαίτερα παραγωγικό τμήμα του πληθυσμού, προκαλώντας σοβαρού βαθμού αναπηρία, καθιστά τη νόσο έναν από τα κύρια ερευνητικά πεδία στον τομέα της θεραπευτικής, μαζί με τον καρκίνο και τη λοίμωξη από τον ιό της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας. Τα τελευταία έτη, με την προσθήκη των ανοσοτροποποιητικών παραγόντων, κατά κύριο λόγο μονοκλωνικών αντισωμάτων, με ειδική επίδραση σε κυτταρικούς πληθυσμούς του ανοσιακού συστήματος που διαμεσολαβούν τη φλεγμονή στο ΚΝΣ, έγιναν σαφείς οι σημαντικές δυνατότητες φαρμακευτικής παρέμβασης στη νόσο. Οι νεότεροι νοσοτροποποιητικοί παράγοντες καθιστούν δυνατό τον έλεγχο, σε μεγάλο βαθμό, των υποτροπών και, σε σημαντικό ποσοστό, δύνανται να εξασφαλίσουν σημαντική καθυστέρηση της φυσικής πορείας της νόσου με ηπιότερη κλινική εικόνα και επιμήκυνση του χρονικού διαστήματος που απαιτείται μέχρι ο ασθενής να φτάσει σε χαρακτηριστικά σημεία – σταθμούς της κλινικής πορείας της νόσου, τα οποία δηλώνουν μόνιμη κλινική επιδείνωση.

Εντούτοις, η ιατρική κοινότητα σήμερα απέχει από τη δυνατότητα πλήρους θεραπείας της νόσου. Αντιθέτως, η δυνατότητα ελέγχου της φάσης της φλεγμονής με φαρμακευτικούς παράγοντες, ανέδειξε το γεγονός ότι εκτός της ανοσιακής απάντησης, στη φυσική πορεία της νόσου επιδρά και νευροεκφυλιστικός μηχανισμός, ο οποίος δεν επηρεάζεται από τους παράγοντες αυτούς. Σημαντική ένδειξη του ρόλου που παίζει η νευροεκφύλιση στη νόσο, αποτελεί η επίδραση της ηλικίας. Μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες υποδεικνύουν ότι, ανεξαρτήτως της κλινικής μορφής της νόσου (διαλείπουσα – υποτροπιάζουσα ή πρωτοπαθώς προϊούσα) και ανεξαρτήτως της ηλικίας έναρξης της νόσου (η νόσος πρωτοπαθώς προϊούσας μορφής εμφανίζεται ηλικιακά κατά μέσο όρο μια δεκαετία αργότερα από τη διαλείπουσα – υποστοπιάζουσα ΠΣ), η ηλικία έναρξης της προοδευτικότητας της αναπηρίας είναι σταθερή. Επίσης, σύμφωνα με την κλασική θεώρηση, η αναπηρία που οφείλεται στην ΠΣ αποδίδεται κατά κύριο λόγο σε κινητικά συμπτώματα, ενώ οι διαταραχές του συναισθήματος και η γνωστική έκπτωση δε συνεισφέρουν στο βαθμό της συνολικής αναπηρίας. Με την πρόσφατη συνεισφορά του μαγνητικού συντονισμού 7T

αναγνωρίζονται πλέον βλάβες και στο φλοιό του εγκεφάλου ασθενών με πρόωμη ΠΣ, ενώ η εγκεφαλική ατροφία και ο βαθμός γνωστικής έκπτωσης θεωρούνται πρόωμα προγνωστικά στοιχεία της νόσου. Στο πλαίσιο αυτό, πληθαίνουν οι ερευνητές οι οποίοι αναγνωρίζουν το νευροεκφυλιστικό συστατικό της νόσου ως αρχικά δρων, ενώ η ανοσιακή απάντηση και η φλεγμονή θεωρούνται πλέον από πολλούς ότι αναπτύσσονται δευτεροπαθώς, ως προσπάθεια του οργανισμού να αποκαταστήσει την εκφυλιστική βλάβη ή ως αντίδραση στα προϊόντα της. Σε κάθε περίπτωση, σε αντιθεση με την κλασική θεώρηση, η ΠΣ ενδέχεται να είναι μια πρωτοπαθώς νευροεκφυλιστική νόσος.

Αναφορικά με τους αιτιολογικούς παράγοντες της νόσου, η θεωρία της υγιεινής φαίνεται ότι συγκεντρώνει εκ νέου το ενδιαφέρον της ερευνητικής κοινότητας. Μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες και νέες τεχνικές στο πεδίο μελέτης μικροβιακών παθογόνων αλλά και συμβιοτικών μικροοργανισμών (microbiomics), παρέχουν ενδείξεις ανοσοτροποποιητικής δράσης ποικίλων μικροβίων. Το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού (ΕΠ) είναι ένα Gram-αρνητικό παθογόνο, το οποίο αποικίζει κατά προσέγγιση το γαστρικό βλεννογόνο του 50% του πληθυσμού στον αναπτυγμένο κόσμο. Η περιγραφή του για πρώτη φορά το 1983 από τους Warren και Marshall ως αιτιολογικό παθογόνο του γαστρικού έλκους, τιμήθηκε με βραβείο Nobel. Το ΕΠ διαθέτει ένα μεγάλο αριθμό μηχανισμών με τους οποίους τροποποιεί την ανοσιακή απάντηση του ξενιστή, προκειμένου να επιτύχει χρόνια παραμονή στο γαστρικό βλεννογόνο, και η οποία σε μεγάλο ποσοστό συνοδεύεται από ενεργό φλεγμονή. Η ερευνητική ομάδα υπό τον Καθηγητή κύριο Κουντουρά Ιωάννη, επί σειρά ετών μελετά ενδείξεις επιδημιολογικής συσχέτισης της λοίμωξης από ΕΠ με μια σειρά νευροεκφυλιστικών νοσημάτων, όπως η νόσος Alzheimer (ΝΑ), η νόσος Parkinson και το γλαύκωμα. Αυξημένο ποσοστό λοίμωξης από ΕΠ έχει διαπιστωθεί σε ασθενείς με ΠΣ, αποτελέσματα τα οποία μερικώς επιβεβαιώνονται στη βιβλιογραφία. Αντικρουόμενα αποτελέσματα ενδεχομένως να οφείλονται σε εθνολογικές και μεθοδολογικές διαφορές.

### **Σκοπός της μελέτης**

Η παρούσα μελέτη έχει ως σκοπό τη διερεύνηση, για πρώτη φορά, της ανοσοτροποποιητικής δράσης αντιγόνου του ΕΠ στη μικρογλοία του ΚΝΣ πειραματοζώων. Η ερευνητική ομάδα υπό τον Αναπληρωτή Καθηγητή Νευρολογίας κύριο Γρηγοριάδη Νικόλαο έχει μελετήσει ενδείξεις ανοσοτροποποιητικής δράσης αντιγόνου του ΕΠ σε πειραματικό μοντέλο της ΠΣ, την Πειραματική Αυτοάνοση

Εγκεφαλομυελίτιδα (ΠΑΕ). Διαπιστώθηκε σχετική προστατευτική δράση του αντιγόνου του ΕΠ στην ΠΑΕ, ενδεχομένως μέσω τροποποίησης της αντιγονοπαρουσίασης και του βαθμού έκφρασης μορίων Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας τύπου II (ΜΣΙ-II). Εντούτοις, ενδέχεται το αντιγόνο του ΕΠ να ασκεί ιδιαίτερη επίδραση στη μικρογλοία του ΚΝΣ πειραματόζων, όταν χορηγείται πριν από την πρόκληση της ΠΑΕ. Για το σκοπό αυτό χορηγήθηκε αντιγόνο ΕΠ σε πειραματόζωα και κατόπιν μελετήθηκε ο βαθμός ενεργοποίησης της μικρογλοίας στο ΚΝΣ, με τεχνικές ανοσοιστοχημείας, ενώ ξεχωριστές ομάδες πειραματόζων που έλαβαν αντιγόνο *e.coli* ή PBS χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί ή αρνητικοί μάρτυρες αντίστοιχα. Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, διαπιστώθηκε σημαντικά μειωμένος βαθμός ενεργοποίησης της μικρογλοίας στο ΚΝΣ πειραματόζων που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, συγκριτικά με πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο *e.coli*, ενώ ο βαθμός ενεργοποίησης της μικρογλοίας ήταν συγκρίσιμος μεταξύ πειραματόζων που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ και PBS.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, παρέχονται για πρώτη φορά ενδείξεις ειδικής επίδρασης του αντιγόνου του ΕΠ στη μικρογλοία του ΚΝΣ πειραματόζων, φαινόμενο που ενδέχεται να διαμεσολαβεί σχετική νευροπροστατευτική δράση του αντιγόνου του ΕΠ έναντι της πρόκλησης της ΠΑΕ (pre-conditioning).





## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## 1. Ανοσιακή απάντηση στην περιφέρεια

Η ανοσιακή απάντηση στην περιφέρεια έχει ευρύτατα μελετηθεί. Κύτταρα μυελογενούς προέλευσης, δένδριτικά κύτταρα και μακροφάγα, κυκλοφορούν δια του αίματος στους ιστούς ελέγχοντας για την παρουσία «ξένων» αντιγόνων – αντιγόνων προέλευσης άλλης από αυτή του ίδιου οργανισμού. Εφόσον τα κύτταρα αυτά έλθουν σε επαφή με ξένο αντιγόνο ή κύτταρο, πχ. μικροβιακής προέλευσης, το φαγοκυτταρώνουν και το υποβάλλουν σε διαδικασίες ενδοκυττάριας διάσπασης και επεξεργασίας. Στην αναγνώριση αυτή ιδιαίτερα των μικροβιακών αντιγόνων σημαντικό ρόλο παίζουν μοριακές αλληλουχίες οι οποίες εκφράζονται στην επιφάνεια των μικροβίων και οι οποίες διατηρούνται φυλογενετικά (έχουν μικρή πιθανότητα μετάλλαξης), είναι κοινές σε ένα μεγάλο αριθμό παθογόνων (προς αποφυγή μεγάλου αριθμού διαφορετικών υποδοχέων απαραίτητων για την αναγνώρισή τους), και είναι σαφώς διακριτές από αλληλουχίες των συστατικών του εαυτού. Επομένως η αναγνώριση των παθογόνων από το σύστημα της φυσικής ανοσίας είναι στην πραγματικότητα ειδική, βασιζόμενη σε υποδοχείς που αναγνωρίζουν μοριακά μοτίβα (pattern-recognition receptors/PRRs), και οι οποίοι έχουν αναπτυχθεί με σκοπό να αντιλαμβάνονται συστατικά παθογόνων μικροοργανισμών, τα ονομαζόμενα μοριακά μοτίβα-σχετιζόμενα με παθογόνα (pathogen - associated molecular patterns/PAMPs) [1-2]. Οι υποδοχείς των μορίων αυτών εκφράζονται στην επιφάνεια μακροφάγων και δένδριτικών κυττάρων αποτελώντας το σύστημα των Toll-like υποδοχέων (Toll-like receptors/TLRs). Η περιγραφή της κρυσταλλικής δομής της εξωτερικής επιφάνειας αρκετών TLRs παρείχε πληροφορίες ως προς τη δομή τους και έκανε σαφές το γεγονός ότι αρκετοί PAMPs δρουν ως συνδέτες για τους TLRs [3]. Οι PAMPs που αναγνωρίζουν οι TLRs περιλαμβάνουν λιπίδια, λιποπρωτείνες, πρωτείνες και νουκλειακά οξέα μιας ποικιλίας μικροβίων όπως βακτήρια, ιοί, παράσιτα και μήκυτες [4]. Επί του παρόντος, 10 και 12 λειτουργικοί TLRs έχουν περιγραφεί στον άνθρωπο και στον ποντικό αντίστοιχα, εκ των οποίων οι TLR1 έως TLR9 είναι κοινοί στα δυο είδη. Ο TLR10 του ποντικού δεν είναι λειτουργικός λόγω μετάλλαξης από ρετροϊό, και οι TLR11, TLR12 και TLR13 έχουν απαλειφθεί από το ανθρώπινο γονιδίωμα. Μελέτες σε διαγονιδιακούς ποντικούς από τους οποίους απουσιάζει επιλεκτικά διαφορετικός TLR δείχνουν ότι ο

κάθε TLR έχει ξεχωριστή λειτουργία αναφορικά με την αναγνώριση των PAMP και την προκαλούμενη ανοσολογική αντίδραση [4]. Ο TLR4, σημαντικό μέλος της οικογένειας των TLRs, αναγνωρίστηκε ως ο υποδοχέας ο οποίος ανταποκρίνεται στους βακτηριακούς λιποπολυσακχαρίτες (lipopolysaccharide/LPS), ένα συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης των Gram-αρνητικών βακτηρίων, τα οποία δύνανται να προκαλέσουν σηπτικό shock. Ο TLR2 ευθύνεται για την αναγνώριση ενός ευρέος φάσματος PAMPs βακτηρίων, μυκήτων, παρασίτων και ιών [4]. Παρόλο που το σύστημα των TLRs είναι σημαντικό στην ανάπτυξη της ανοσολογικής αντίδρασης έναντι της λοίμωξης, η μη-φυσιολογική κινητοποίηση του συστήματος συνεισφέρει στην παθογένεση της οξείας και χρόνιας φλεγμονής, όπως επίσης και σε συστηματικές αυτοάνοσες νόσους. Πειραματόζωα στα οποία υπολείπεται η αρνητική ρύθμιση του συστήματος των TLRs εμφανίζονται ευαίσθητα στην πρόκληση αυτοανοσίας.

Σύμφωνα με την κλασική θεώρηση, κατόπιν της ενεργοποίησης των μηχανισμών της φυσικής ανοσίας, και σε δεύτερο χρόνο, λαμβάνει χώρα η κινητοποίηση της επίκτητης ανοσιακής απάντησης, η οποία διαμεσολαβείται από ειδικά – έναντι του αντιγόνου T- και B-λεμφοκύτταρα, δια του μηχανισμού της αντιγονοπαρουσίασης. Τα δενδριτικά κύτταρα είναι τα κατ'έξοχην αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, ονομαζόμενα ως «επαγγελματικά αντιγονοπαρουσιαστικά» κύτταρα [5]. In vitro, δύνανται να παραχθούν από το περιφερικό αίμα ή το μυελό των οστών κατόπιν καλλιέργειας παρουσίας granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). Η προσθήκη ιντερλευκίνης-4 θεωρείται απαραίτητη, προς καταστολή της διαφοροποίησής τους σε μακροφάγα. [5]. Καθώς λαμβάνει χώρα η ωρίμανσή τους, μειώνεται η φαγοκυτταρική τους ικανότητα και η έκφραση μορίων απαραίτητων για την παγίδευση αντιγόνων, ενώ αυξάνεται σημαντικά η έκφραση των μορίων ΜΣΙ-II. Η έκφραση μορίων συν-παρουσίασης (co-stimulatory molecules), όπως B7.1, B7.2 και CD40 επίσης αυξάνεται σε αυτό το στάδιο, όπως και των μορίων ICAM-1 και ICAM-2, τα οποία θεωρείται ότι συνεισφέρουν στις μεταναστευτικές και αντιγονο-παρουσιαστικές ιδιότητες των δενδριτικών κυττάρων. Η έκφραση των υποδοχέων χημειοκινών CCR5 και CXCR4 επιτρέπει τη χημειοταξία των δενδριτικών κυττάρων προς περιοχές πλούσιες σε T-λεμφοκύτταρα, συνηθέστερα τους επιχώριους λεμφαδένες. Η ενεργοποίηση των φυσικών (naïve) T-λεμφοκυττάρων από ώριμα δενδριτικά κύτταρα επάγει τη δημιουργία T-λεμφοκυττάρων με δραστικό φαινότυπο, τα οποία μετέχουν σε ποικίλες

ανοσιακές απαντήσεις [6-8]. Η επαγωγή αυτή λαμβάνει χώρα μέσω των κυτταροκινών που εκκρίνουν, τα δενδρική κύτταρα, όπως ιντερλευκίνη-12, ιντερλευκίνη-23 και ιντερλευκίνη-10, όπως επίσης και μέσω των μορίων επιφανείας που εκφράζουν όπως OX40-L [9] και ICOS-1 [10], και τα οποία αλληλεπιδρούν με αντίστοιχους υποδοχείς στην επιφάνεια φυσικών T-λεμφοκυττάρων. Διαμεσολαβείται με τον τρόπο αυτό η δέσμευση των T-λεμφοκυττάρων σε μια από τις κυτταρικές σειρές ενεργοποίησης, όπως βοηθητικά Th1, Th2, Th17 ή T-ρυθμιστικά (CD4+CD25+Foxp3+) λεμφοκύτταρα.

Τα T-λεμφοκύτταρα διακρίνουν μεταξύ υλικών ξένης προέλευσης και του εαυτού, μέσω της παρουσίας θραυσμάτων αντιγόνων από τα μόρια του ΜΣΙ, στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Μόνον υπό την προϋπόθεση ότι το κατάλληλο αντιγονικό πεπτιδίον παρουσιάζεται από ένα μόριο του ΜΣΙ, δύναται να πυροδοτηθεί T-κυτταρική ανοσολογική απάντηση. Η υλοποίηση της αναγνώρισης και της έναρξης του σηματοδοτικού μονοπατιού, από την αρχική αναγνώριση του αντιγόνου, έως τη λύση του κυττάρου-στόχος, πραγματοποιείται σε συγκεκριμένο τμήμα της επιφάνειας του T-λεμφοκυττάρου, στο χώρο της ονομαζόμενης «ανοσολογικής σύναψης», και απαιτεί τη σύγχρονη δράση πολλών μορίων σε συσχέτιση με τον TCR, όπως είναι οι συν-υποδοχείς CD8 και CD4, και άλλοι βοηθητικοί υποδοχείς, όπως το σηματοδοτικό μόριο CD3. Ο πυρήνας της ανοσολογικής σύναψης αποτελείται από το τριμοριακό σύμπλεγμα, το σύμπλεγμα μορίου ΜΣΙ/πεπτιδίου/TCR [11].

## **2. Φυσική ανοσία στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα – τα κύτταρα της γλοίας**

Σύμφωνα με την κλασική θεώρηση το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) θεωρείται ως όργανο υπό ανοσιακή επιτήρηση, ως αποτέλεσμα της ύπαρξης του αιματο-εγκεφαλικού φραγμού (ΑΕΦ). Ο ΑΕΦ συνιστά ένα σύνθετο ανατομικό και φυσιολογικό όριο, το οποίο ελέγχει τη διέλευση κυττάρων, μεταβολιτών και βιολογικώς δραστικών μορίων, με βάση τα δομικά και βιοχημικά τους χαρακτηριστικά, από- και προς το ΚΝΣ. Σχηματίζεται κατά κύριο λόγο από τα ενδοθηλιακά κύτταρα της εσωτερικής επιφάνειας των τριχοειδών αγγείων του ΚΝΣ [12]. Αστροκύτταρα και περικύτταρα του εγκεφαλικού παρεγχύματος, στον περιβάλλοντα χώρο των αγγείων, επίσης συνεισφέρουν στο σχηματισμό του ΑΕΦ. Στεργές (“tight”) συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων αυτών λειτουργούν ως ηθμός για

κυκλοφορούσες μικρο- και μακρομοριακές ενώσεις από το αίμα στο ΚΝΣ και αντιστρόφως [13]. Ως αποτέλεσμα, κύτταρα τα οποία φυσιολογικά συμμετέχουν σε ανοσιακές απαντήσεις στην περιφέρεια (στο αίμα και σε άλλους ιστούς – όργανα), δεν εισέρχονται ελεύθερα στο ΚΝΣ.

Παρά την ύπαρξη του ΑΕΦ, το ΚΝΣ υπόκειται σε ποικίλες ανοσιακές διεργασίες, οι οποίες διαμεσολαβούνται από ενδογενή κύτταρα φυσικής ανοσίας, τα οποία φυσιολογικά ανευρίσκονται στο εγκεφαλικό παρέγχυμα και το νωτιαίο μυελό. Πρόκειται για κύτταρα της γλοίας, τα μικρογλοιακά κύτταρα και τα αστροκύτταρα, τα οποία απαντούν αποκλειστικά στο ΚΝΣ, δίχως να εκπροσωπούνται από αντίστοιχους ανοσιακούς κυτταρικούς πληθυσμούς στο αίμα και σε άλλους ιστούς [14]. Τα μικρογλοιακά αποτελούν τα κύρια κύτταρα της φυσικής ανοσίας του ΚΝΣ [15], τα οποία φυλογενετικά προέρχονται από το λεκιθικό ασκό [16]. Στο ΚΝΣ τα μικρογλοιακά κύτταρα πολλαπλασιάζονται ενδογενώς από προγονικά κύτταρα του ΚΝΣ, ενώ η προέλευσή τους δεν σχετίζεται με τα κύτταρα του περιφερικού αίματος [17]. Επί ενεργοποίησης, τα μικρογλοιακά κύτταρα χαρακτηρίζονται από μορφολογικές αλλαγές [18], όπως η αύξηση του μεγέθους του κυτταρικού σώματος, η βράχυνση και η πάχυνση των κυτταροπλασματικών προσεκβολών. Τα μικρογλοιακά κύτταρα θεωρούνται ως κύτταρα ανάλογα των ιστικών μακροφάγων, παρά τη διαφορετική τους φυλογενετική προέλευση. Αναφορικά με τα μακροφάγα του αίματος μυελογενούς προέλευσης, αυτά λειτουργικά κατατάσσονται σε υποομάδες M1, M2a, M2b και M2c [19-20]. Ενδεικτικά, ως M1 χαρακτηρίζεται φαγοκυτταρικός φαινότυπος, ο οποίος σχετίζεται με την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως ιντερλευκίνης (IL)-1β, IL-6, IL-23, παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF-α) και κυτταροτοξικών μορίων, όπως ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και μονοξείδιο του αζώτου (NO). Ως M2 χαρακτηρίζεται επίσης φαγοκυτταρικός φαινότυπος, ο οποίος όμως πυροδοτεί αντι-φλεγμονώδη απάντηση με την παραγωγή IL-10, και TGF-β [21-22]. Μια τέτοια λειτουργική διαφοροποίηση δεν έχει εντούτοις επιβεβαιωθεί σε σχέση με τα μακροφάγα των ιστών ή τα μικρογλοιακά κύτταρα.

Εκτός από τοπικά ερεθίσματα στο ΚΝΣ, διαπιστώνεται ότι η παρουσία συστηματικής φλεγμονής δύναται να ενεργοποιήσει τα μικρογλοιακά κύτταρα [23-24]. Η συστηματική χορήγηση LPS, η οποία κινητοποιεί τη φυσική ανοσία στην περιφέρεια, επιφέρει νευροπροστατευτικά αποτελέσματα πειραματικά. Η συστηματική χορήγηση LPS επιφέρει αντίδραση stress (stress preconditioning), η

οποία, με τη διαμεσολάβηση κυτταροκινών ενεργοποιεί τη μικρογλοία στο ΚΝΣ, προστατεύοντας έναντι της μεταγενέστερης εφαρμογής πειραματικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου ή τραυματικής βλάβης του ΚΝΣ [25-28]. Η μοριακή βάση του νευροπροστατευτικού μηχανισμού δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί.

Η χρόνια νευροεκφυλιστική βλάβη επίσης επιφέρει ενεργοποίηση της μικρογλοίας, δίχως να έχει αποσαφηνιστεί το λειτουργικό αποτέλεσμα της ενεργοποίησης προς ωφέλιμη ή βλαπτική κατεύθυνση, αναφορικά με την επιβίωση των νευρικών κυττάρων. Η ενεργοποίηση της μικρογλοίας επί βλάβης των νευρικών κυττάρων ενδέχεται να αποτελεί δευτερογενές φαινόμενο, καθώς είναι γνωστή η ιδιότητα των νευρώνων να εκφράζουν επιφανειακούς και διαλυτούς παράγοντες οι οποίοι αναστέλλουν την ενεργοποίηση της μικρογλοίας [29]. Τα μικρογλοιακά κύτταρα βρίσκονται σε συνεχή λειτουργική επαφή με τους νευρώνες, όπως υποδεικνύεται από έναν αριθμό σηματοδοτικών μορίων που εκφράζονται στην επιφάνεια των νευρικών κυττάρων, και τους αντίστοιχους συνδέτες τους στην επιφάνεια των μικρογλοιακών κυττάρων, όπως τα CD200/CD200R, CD47/CD172a και CX3CL1/CX3CR1, αντίστοιχα [30-32]. Ενδείξεις ωστόσο αναφορικά με συνεισφορά των μικρογλοιακών κυττάρων στη νευροεκφυλιστική διαδικασία παρέχονται από πειραματικό μοντέλο νόσου κινητικού νευρώνα, στο οποίο η στοχευμένη διαγραφή μετάλλαξης της υπεροξειδικής δισμουτάσης στα μικρογλοιακά κύτταρα είχε ως αποτέλεσμα σημαντική αύξηση του χρόνου επιβίωσης των πειραματοζώων [33]. Σε πειραματικό μοντέλο της νόσου Alzheimer (NA), στοχευμένη απαλοιφή του υποδοχέα χημειοκινών CX3CR1 στα μικρογλοιακά κύτταρα είχε ως αποτέλεσμα τροποποίηση της ενεργοποίησης της μικρογλοίας και πιο αποτελεσματική απομάκρυνση του νευροτοξικού β-αμυλοειδούς [34-38].

### **3. Ο ρόλος της μικρογλοίας στην Πολλαπλή Σκλήρυνση**

Η Πολλαπλή Σκλήρυνση (ΠΣ) είναι μια αυτοάνοσης αρχής, φλεγμονώδης απομυελινωτική νόσος του ΚΝΣ [39-40]. Η νόσος προσβάλλει κατά προσέγγιση 300.000 άτομα στις Η.Π.Α. και 2 εκ. παγκοσμίως και αποτελεί τη συχνότερη αιτία προοδευτικής αναπηρίας, προερχόμενης από το ΚΝΣ, σε νεαρούς ενήλικες. Ως νόσος αυτοάνοσης αρχής, θεωρείται ότι η αιτιολογία της είναι πολυπαραγοντική, στη βάση αλληλεπίδρασης γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Ως κύριος γενετικός προδιαθετικός παράγοντας ενοχοποιείται το ΜΣΙ, ενώ μεγάλες επιδημιολογικές

μελέτες επίσης καταδεικνύουν λοιμώδεις παράγοντες σε συσχέτιση με τη νόσο. Εντούτοις, μεμονωμένος αιτιολογικός παράγοντας δεν έχει ενοχοποιηθεί.

Παθογενετικά η νόσος διαμεσολαβείται από T-λεμφοκύτταρα ειδικά έναντι αυτοαντιγόνου της μυελίνης, τα οποία επιτίθενται στο ΚΝΣ προκαλώντας τις, χαρακτηριστικές για τη νόσο, «απομυελινωτικές πλάκες». Κλινικά η νόσος εκδηλώνεται με κινητικό έλλειμα ποικίλου βαθμού, προκαλώντας σημαντικού βαθμού αναπηρία [41]. Κατά την έναρξη οι ασθενείς συχνά παρουσιάζονται με διαλείπουσα-υποτροπιάζουσα μορφή, η οποία χαρακτηρίζεται από υποτροπιάζοντα επεισόδια υποξείας έναρξης ακολουθούμενα από πλήρη αποκατάσταση στα μεσοδιαστήματα (relapsing remitting MS - RRMS). Εντούτοις, μετά την παρέλευση άλλοτε άλλου χρονικού διαστήματος ετών, η νόσος μεταπίπτει σε μεταγενέστερο στάδιο (breakthrough disease) χαρακτηριζόμενο από προοδευτικά επιδεινούμενη λειτουργικότητα, οριζόμενο ως το στάδιο της δευτεροπαθώς προϊούσας ΠΣ (secondary progressive MS - SPMS). Η πρωτοπαθώς προϊούσα μορφή (primary progressive MS) της νόσου απαντά στο 10-15% των ασθενών, χαρακτηριζόμενη από εξ αρχής προοδευτικά επιδεινούμενη κλινική αναπηρία, δίχως σαφή επεισόδια εξάρσεων και υφέσεων [42]. Διαγνωστικά κριτήρια για τη νόσο, στη βάση της νευρολογικής σημειολογίας, του ιατρικού ιστορικού και της κλινικοεργαστηριακής διερεύνησης, ιδιαίτερα με τη συνεισφορά της μαγνητικής τομογραφίας, έχουν προταθεί και χρησιμοποιούνται ευρύτατα [43].

Μέχρι προσφάτως, παθολογοανατομικά η ΠΣ θεωρούνταν νόσος τη λευκής ουσίας του ΚΝΣ, για την οποία έχουν περιγραφεί χαρακτηριστικού τύπου βλάβες [44]. Ο χαρακτηρισμός αυτός των βλαβών, σε συνδυασμό με τη φυσική πορεία της νόσου, υποδεικνύουν δυο διακριτούς παθογενετικούς μηχανισμούς. Σύμφωνα με την κλασική θεώρηση, η φλεγμονή χαρακτηρίζει τις κλινικές υποτροπές με λεμφοκυτταρική διήθηση του ΚΝΣ στα σημεία των βλαβών και συνοδό οίδημα, ενώ η νευροεκφύλιση σηματοδοτεί την προοδευτικότητα και την εγκατάσταση μόνιμου νευρολογικού ελλείμματος. Εντούτοις, το ενδεχόμενο η νόσος να είναι εξ αρχής νευροεκφυλιστικού τύπου με επεισόδια δευτεροπαθούς ανοσιακής απάντησης, επίσης έχει προταθεί [45]. Επίσης, αναγνωρίζεται σήμερα απομυελίνωση και της φαιάς ουσίας (βασικά γάγγλια και φλοιός) στα αρχικά στάδια της νόσου, η οποία σχετίζεται με μη αναστρέψιμη αναπηρία και νοητική έκπτωση, ενώ παθολογία της πρόωρης βλάβης του φλοιού με χαρακτηριστικά της έντονης φλεγμονής είναι διαφορετική από εκείνη της χρόνιας νευροεκφύλισης [46].



Στην ΠΣ, οι διαδικασίες της απομυελίνωσης και της νευροεκφύλισης φαίνεται ότι σχετίζονται με την παρουσία ενεργοποιημένης μικρογλοίας, όπως υποδεικνύεται από την παρουσία μικρογλοιακών κυττάρων και μακροφάγων στα σημεία των βλαβών [47]. Η ενεργοποίηση της μικρογλοίας δεν περιορίζεται στα σημεία της απομυελίνωσης, αλλά παρατηρείται διάχυτα στη λευκή και φαιά ουσία φυσιολογικής μορφολογίας (normal appearing white matter/ NAWM, normal appearing grey matter/NAGM) [48]. Στη NAWM, σε ασθενείς με προοδευτική ΠΣ, συσσωματώματα μικρογλοιακών κυττάρων περιγράφονται στα όρια των απομυελινωτικών βλαβών [49]. Η ενεργοποίηση αυτή της μικρογλοίας σε περιοχές άλλες από τα σημεία της απομυελίνωσης ενδέχεται να υποδεικνύει αντιδραστική κινητοποίηση της νευροεκφυλιστικής διαδικασίας σε φαινομενικά υγιή ιστό, ως απάντηση στις καταστροφικές βλάβες σε άλλα σημεία του εγκεφαλικού παρεγχύματος.

Στο σχηματισμό των απομυελινωτικών βλαβών, τα μικρογλοιακά κύτταρα ενδέχεται να συνεισφέρουν μέσω προκαλούμενης βλάβης στα ολιγοδενδροκύτταρα. Οι απομυελινωτικές βλάβες στην ΠΣ χαρακτηρίζονται από εστιακή απώλεια ολιγοδενδροκυττάρων [50]. Τα μικρογλοιακά κύτταρα υπό τις συνθήκες αυτές εκφράζουν νευροτοξικά μόρια, όπως NO, ενεργείς ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species/ROS), γλουταμικό, ενεργοποιημένα συστατικά του συμπληρώματος και TNFα [51-52]. Πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι μικρογλοιακά κύτταρα με M1 φαινότυπο, ενεργοποιημένα *in vitro* παρουσία LPS ή IFN-γ, ασκούν άμεση τοξική δράση σε ολιγοδενδροκύτταρα [53]. Επίσης, μικρογλοιακά κύτταρα M1 φαίνεται ότι δρουν ανασταλτικά στη δημιουργία νέων ολιγοδενδροκυττάρων από αντίστοιχα πρόδρομα κύτταρα, μέσω της παραγωγής TNFα, *in vitro* [54-55]. Αντιθέτως, ο M2 φαινότυπος, κατόπιν επώασης παρουσία IL-4, φαίνεται ότι επάγει τη δημιουργία νέων ολιγοδενδροκυττάρων μέσω της παραγωγής IGF-1 [55], παρέχοντας ενδείξεις ότι διαφορετικοί τύποι μικρογλοιακών κυττάρων ενδέχεται να συνεισφέρουν στην απομυελίνωση και επαναμυελίνωση, αντίστοιχα. Η προαγωγή της επαναμυελίνωσης από M2 μικρογλοιακά κύτταρα υποστηρίζεται επίσης από πειραματικά δεδομένα *in vivo*, σύμφωνα με τα οποία, η ενδοθηκική χορήγηση M2 μικρογλοιακών κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα επαναμυελίνωση στο νωτιαίο μυελό και κλινική βελτίωση σε μοντέλο Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας (ΠΑΕ) [56].

#### 4. Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα

Η Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα (ΠΑΕ) αποτελεί το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο πειραματικό μοντέλο της ΠΣ σε τρωκτικά. Η μέθοδος πρόκλησης βασίζεται στην αρχή ότι πλήρης ομογενοποιημένος ιστός του ΚΝΣ, ή συστατικά αυτού, χορηγούμενα υπό συνθήκες ασκούν εγκεφαλιτιδογόνο δράση και δύνανται να ενεργοποιήσουν την απάντηση του ανοσιακού συστήματος έναντι του ΚΝΣ [57]. Κεκαθαρμένες εγκεφαλιτιδογόνες πρωτεΐνες ή συνθετικά ανακατασκευασμένα μόρια, συνηθέστερα συστατικά της μυελίνης, όπως η βασική πρωτεΐνη μυελίνης (Myelin Basic Protein, MBP), η πρωτεολιπιδική πρωτεΐνη (Proteolipid Protein, PLP) και η πρωτεΐνη μυελίνης των ολιγοδενδροκυττάρων (Myelin Oligodendrocyte Protein, MOG) έχουν αυτή την ιδιότητα. Η PLP είναι κύρια μεμβρανική πρωτεΐνη της μυελίνης [58], ενώ η MOG είναι έλασσον συστατικό [59]. Η MOG είναι ιδιαίτερα εγκεφαλιτιδογόνο μόριο για τα τρωκτικά [60]. Ποντικοί της φυλής C57BL/6 αναπτύσσουν χρόνια μονοφασική νόσο, ως απάντηση σε συστηματική χορήγηση πεπτιδίου που φέρει τον επίτοπο 35-55 της MOG (MOG<sub>35-55</sub>) (MOG ΠΑΕ) [61]. Ως συνθήκες κατάλληλες για την κινητοποίηση της ανοσιακής απάντησης του ξενιστή θεωρείται η συγχορήγηση του πεπτιδίου με ελαιώδες συμπληρωματικό εναιώρημα (adjuvant), πλήρες συμπλήρωμα Freund's, το οποίο περιέχει Μυκοβακτηρίδιο Φυματίωσης (ΜΦ) αδρανοποιημένο δια θερμότητας. Το πλήρες συμπλήρωμα Freund's (complete Freund's adjuvant / CFA) κινητοποιεί μηχανισμούς αντιγονοπαρουσίασης στους επιχώριους λεμφαδένες στα σημεία της ένεσης, πιθανότατα μέσω του συστήματος υποδοχέων TLR [62-63]. Στο ίδιο μοντέλο, η συγχορήγηση βακτηριακής τοξίνης (*Bordetella pertussis* toxin) προκαλεί αύξηση της διαπερατότητας του ΑΕΦ, με αποτέλεσμα διέλευση ειδικών έναντι της MOG Τ-λεμφοκυττάρων στο ΚΝΣ [64], τα οποία διαμεσολαβούν απομυελινωτικού τύπου βλάβη. Η φυσική πορεία της MOG ΠΑΕ έγκειται στην ανάπτυξη μυϊκής αδυναμίας εντός 7-10 ημερών κατόπιν της αρχικής ανοσοποίησης, με κλινική κορύφωση εντός 10-14 ημερών. Ακολουθεί αποκατάσταση στο φυσιολογικό εντός 3-4 εβδομάδων.

#### 5. Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού

Το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού (ΕΠ) είναι μικροαερόφιλο, Gram-αρνητικό, σπειροειδές βακτήριο, το οποίο κατά κανόνα αποικίζει το γαστρικό

βλεννογόνο του άντρου του στομάχου. Το ΕΠ περιέγραψαν για πρώτη φορά οι Marshall και Warren το 1983 [65]. Κλινικά η λοίμωξη από το ΕΠ συνδέεται με γαστρικά νοσήματα, όπως γαστρίτιδα, νόσος πεπτικού έλκους, λέμφωμα mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) ή γαστρικός καρκίνος [66-67]. Η λοίμωξη κατά κανόνα λαμβάνει χώρα κατά την παιδική ηλικία και είναι ασυμπτωματική. Στον ανεπτυγμένο κόσμο, κατά προσέγγιση 50% του πληθυσμού είναι χρόνιοι φορείς, ενώ από αυτούς μόνον ένα ποσοστό 10% αναμένεται να αναπτύξει γαστρική νόσο. Η λοίμωξη από ΕΠ ενεργοποιεί την ανοσιακή απάντηση του οργανισμού, κινητοποιώντας την τοπική και συστηματική έκλυση κυτταροκινών από γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα, τη διήθηση του γαστρικού βλεννογόνου από ουδετερόφιλα, μακροφάγα και λεμφοκύτταρα και την παραγωγή αντισωμάτων ειδικών έναντι εντιγόνων του ΕΠ [68-69]. Ως Gram-αρνητικό βακτήριο, το ΕΠ διαθέτει τοίχωμα από λιποπολυσακχαριδική άλυσσο (Lipopolysaccharide, LPS) το οποίο, σε αντίθεση με το τοίχωμα άλλων βακτηρίων, χαρακτηρίζεται από χαμηλή ενδοτοξινική και ανοσιακή δραστηριότητα [70]. Σε αντίθεση με την αναγνώριση από τον υποδοχέα TLR4 [4], που κατά κανόνα επάγει η βακτηριακή LPS, η LPS του ΕΠ επάγει μηχανισμούς μοριακής σηματοδότησης της φυσικής ανοσίας μέσω του υποδοχέα TLR2 [71]. Η χαμηλή βιολογική δραστηριότητα της LPS του ΕΠ μέσω του TLR2 επιτρέπει στο βακτήριο να διαφύγει της ανοσιακής απάντησης του ξενιστή, με αποτέλεσμα εμμένονσα λοίμωξη και φλεγμονή στο γαστρικό βλεννογόνο [72]. Ο υποδοχέας TLR4 μετέχει σε μικρότερο βαθμό στη σηματοδότηση της LPS του ΕΠ [72-74]. Επίσης, κατά την πρώιμη φάση της λοίμωξης από ΕΠ, η σηματοδότηση μέσω TLR9 καταστέλλει την επαγόμενη από ΕΠ γαστρίτιδα μέσω μείωσης της προ-φλεγμονώδους κυτταροκίνης του παράγοντα TNFα [75].

Το στέλεχος ΕΠ Sydney Strain 1 (SS1) απομονώθηκε για πρώτη φορά από ασθενή με νόσο πεπτικού έλκους από τους Lee και συν., το 1997. [76]. Το στέλεχος δύναται να αποικίσει το γαστρικό βλεννογόνο ποντικών της φυλής C57Bl/6 προκαλώντας χρόνια γαστρίτιδα και, ως εκ τούτου, αποτελεί το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο μοντέλο πειραματικής λοίμωξης από το ΕΠ. Η εφαρμογή του μοντέλου επέτρεψε το χαρακτηρισμό των αντιγονικών χαρακτηριστικών του στελέχους, τη μελέτη της συνοδού γαστρικής παθολογίας και τις προσπάθειες για ανάπτυξη εμβολίου έναντι της λοίμωξης από το ΕΠ.

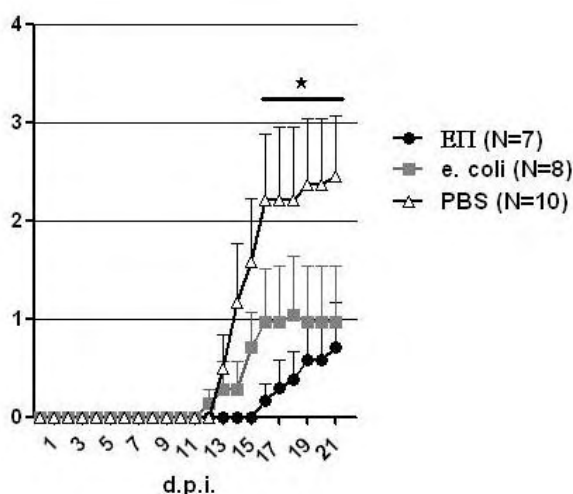
## 6. Ενδείξεις νοσοτροποποιητικής δράσης του ΕΠ στην ΠΣ και στην ΠΑΕ – ο ρόλος της μικρογλοίας

Παρόλο που ο ακριβής παθογενετικός μηχανισμός της ΠΣ δεν έχει αποσαφηνιστεί, θεωρείται ότι συνθήκες συστηματικής φλεγμονής ενδέχεται να συνεισφέρουν στην εκδήλωση της νόσου [77]. Η λοίμωξη από ΕΠ σχετίζεται επιδημιολογικά με έναν αριθμό νοσημάτων του ΚΝΣ, όπως το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, η ΝΑ, η ήπια γνωστική διαταραχή και η νόσος Parkinson [78-83]. Αντικρουόμενα βιβλιογραφικά δεδομένα αναφορικά με αρνητική [84-85] ή θετική [86] συσχέτιση της λοίμωξης από ΕΠ και της ΠΣ ενδέχεται να αποδοθούν σε πληθυσμιακή ποικιλομορφία.

Με βάση πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα, η λοίμωξη από ΕΠ απαντά συχνότερα σε ασθενείς με κλινικώς μεμονωμένο σύνδρομο (ΚΜΣ) (πρώτο απομυελινωτικό επεισόδιο) συγκριτικά με υγιείς ενήλικες, ενώ η επιτυχής εκρίζωση του ΕΠ σε αυτό το στάδιο ενδέχεται να καθυστερήσει την εξέλιξη σε ΠΣ [87]. Η παρατήρηση ότι ασθενείς με ΚΜΣ και λοίμωξη από ΕΠ παρουσιάζουν υψηλότερες συγκεντρώσεις προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-2 και IL-12 συγκριτικά με ασθενείς δίχως λοίμωξη από ΕΠ βρίσκεται σε συμφωνία με αναφορές ότι η παρουσία προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών στο αίμα ασθενών με ΠΣ συνδέεται με ενεργό νόσο [87].

Αναφορικά με το ρόλο της λοίμωξης από ΕΠ στην ΠΑΕ, δεν υπάρχουν ως σήμερα διαθέσιμα ερευνητικά δεδομένα. Ενδείξεις νοσοτροποποιητικής δράσης του ΕΠ στην ΠΑΕ παρέχονται από πειράματα χορήγησης αντιγόνου του ΕΠ σε PBS, απουσία adjuvant, για χρονικό διάστημα τριών εβδομάδων (τρεις εβδομαδιαίες ενδοπεριτοναικές εγχύσεις, preconditioning) και κατόπιν πρόκληση της ΠΑΕ σε ποντικούς της φυλής C57Bl/6 (αναδημοσίευση από: [88] και [89]). Διαπιστώθηκε σχετική προστατευτική δράση του αντιγόνου του ΕΠ έναντι της ΠΑΕ, συγκριτικά με την ομάδα πειραματοζώων που έλαβε αντιγόνο *escherichia coli* (*e. coli*) και αυτή των πειραματοζώων που έλαβαν PBS (**Εικόνα 1**, αναδημοσίευση από: [88] και [89]).

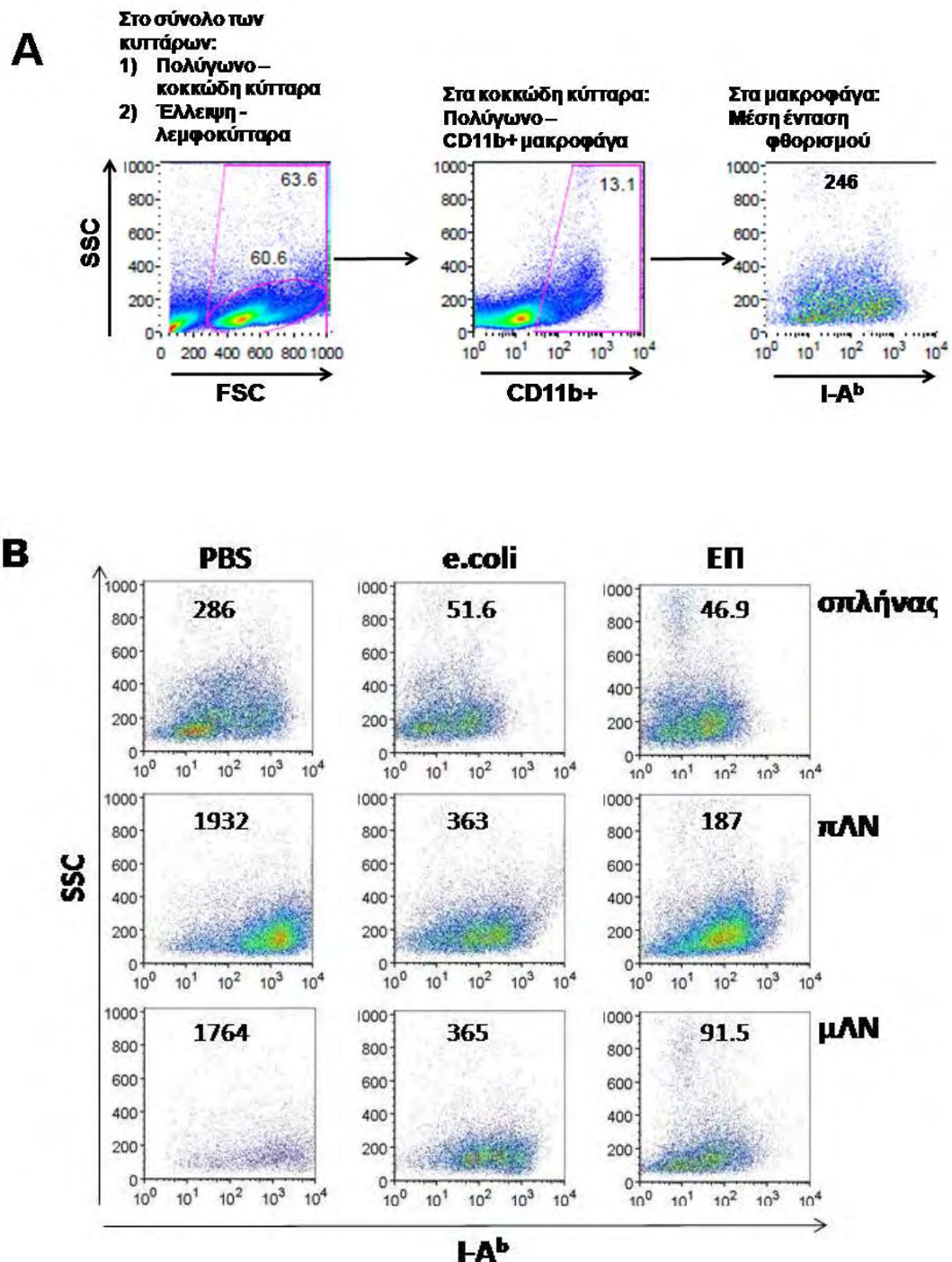
**Εικόνα 1.** Συγκριτική ανάλυση κλινικής πορείας ΠΑΕ σε πειραματόζωα, τα οποία έλαβαν πριν από την πρόκληση της νόσου αντιγόνο ΕΠ, e.coli ή διάλυμα PBS.

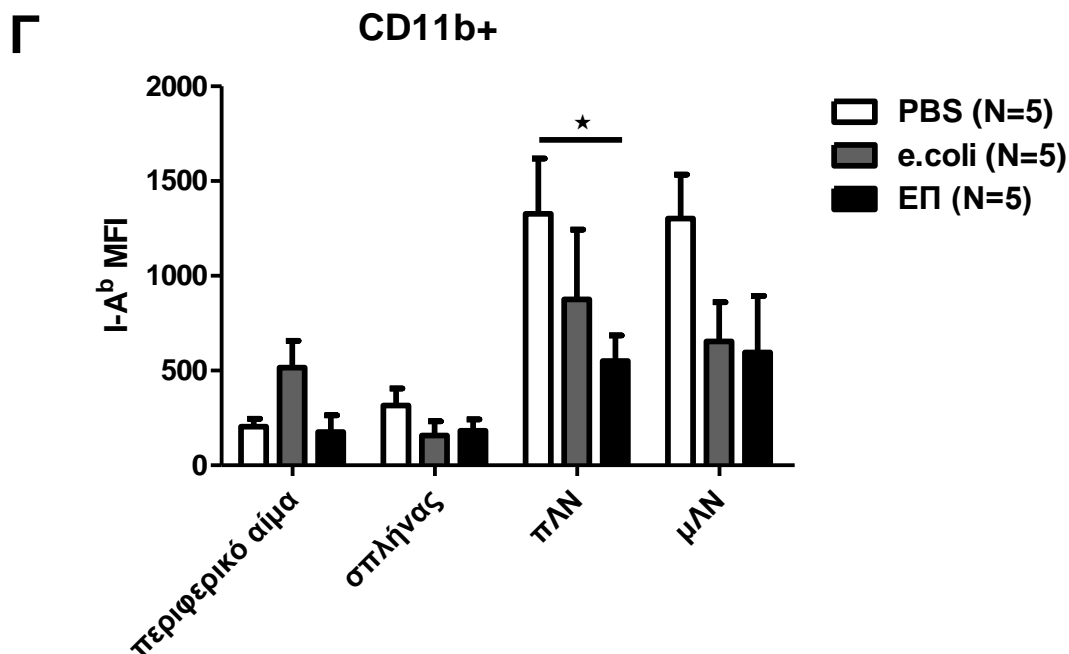


**Εικόνα 1.** Συγκριτική ανάλυση κλινικής πορείας ΠΑΕ σε πειραματόζωα τα οποία έλαβαν πριν από την πρόκληση της νόσου αντιγόνο ΕΠ, e.coli ή διάλυμα PBS. Αποτελέσματα βαθμολογίας με βάση την κλίμακα αξιολόγησης αναπηρίας, στα πλαίσια ΠΑΕ (μ.ο.  $\pm$  τ.σ.μ.ο.). Χρονική περίοδος παρακολούθησης: 21 ημέρες. d.p.i., days post-induction.

Μελέτη της ανοσιακής απάντησης στην περιφέρεια, αμέσως μετά την ολοκλήρωση της περιόδου των ενδοπεριτοναϊκών εγχύσεων μικροβιακών αντιγόνων ή PBS, και πριν από την πρόκληση της ΠΑΕ, με τεχνικές κυτταρομετρίας ροής, έδειξε μικρότερο βαθμό έκφρασης μορίων ΜΣΙ-II σε τρεις πληθυσμούς αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (B220+ B-λεμφοκύτταρα, CD11b+ μακροφάγα κύτταρα και CD11c+ δένδριτικά κύτταρα) στα πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, συγκριτικά με τις άλλες δυο πειραματικές ομάδες (Ενδεικτικά αποτελέσματα για τα B220+ B-λεμφοκύτταρα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 2**, αναδημοσίευση από: [88] και [89]). Μελέτη τριών πληθυσμών T-λεμφοκυττάρων, Th1, Th17 και T-ρυθμιστικών με τεχνικές κυτταρομετρίας ροής δεν έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών ομάδων πειραματοζώων.

**Εικόνα 2.** Ανάλυση βαθμού έκφρασης αντιγονοπαρουσιαστικών μορίων MHC-II (I-A<sup>b</sup>) στα μακροφάγα κύτταρα, με κυτταρομετρία ροής, συγκριτικά για κάθε πειραματική ομάδα και για κάθε όργανο της περιφέρειας.



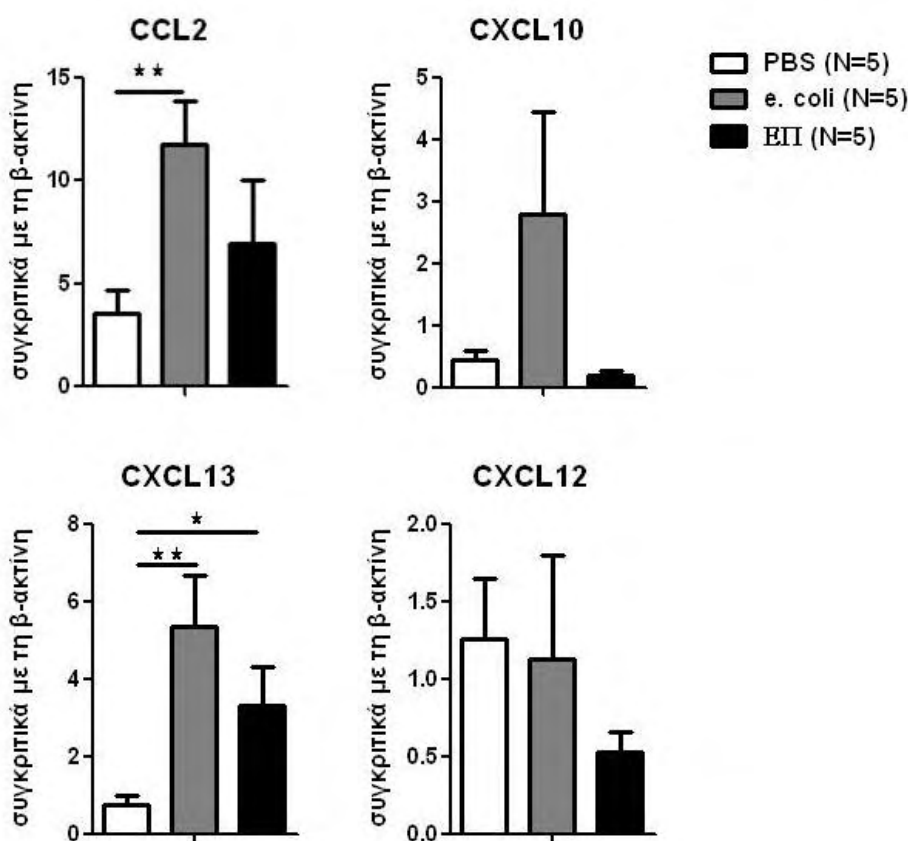


**Εικόνα 2.** Ανάλυση βαθμού έκφρασης αντιγονοπαρουσιαστικών μορίων MHC-II (I-A<sup>b</sup>) στα μακροφάγα κύτταρα, με κυτταρομετρία ροής, συγκριτικά για κάθε πειραματική ομάδα και για κάθε όργανο της περιφέρειας. Α) Παράδειγμα διαδοχικής ανάλυσης για ένα δείγμα. Στα πρώτα δυο διαγράμματα από τα αριστερά, οι αριθμοί εκφράζουν ποσοστό (%) επί του συνολικού κυτταρικού πληθυσμού. Στο τελευταίο διάγραμμα ο αριθμός εκφράζει μέση ένταση φθορισμού. Β) Αντιπροσωπευτικά διαγράμματα ανάλυσης μέσης έντασης φθορισμού για το μόριο I-A<sup>b</sup> σε όργανα της περιφέρειας. Οι αριθμοί εκφράζουν μέση ένταση φθορισμού. Γ) Ποσοτικοποίηση ανάλυσης βαθμού έκφρασης αντιγονοπαρουσιαστικών μορίων I-A<sup>b</sup> στα μακροφάγα. Οι ράβδοι εκφράζουν μ.ο. ± τ.σ.μ.ο. για κάθε πειραματική ομάδα. Αποτελέσματα από δυο ανεξάρτητα πειράματα. (SSC=Side Scatter, FSC=Forward Scatter, MFI=Mean Fluorescence Intensity, πλν=περιφερικοί λεμφαδένες, μλν=μεσεντέριοι λεμφαδένες).

Από τη συγκριτική ανάλυση χημειοκινών CCL2, CXCL10, CXCL12 και CXCL13, με μοριακές τεχνικές αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αληθινού χρόνου (Real-Time PCR) στους περιφερικούς λεμφαδένες πειραματοζώων που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, e.coli ή διάλυμα PBS, διαπιστώθηκε σημαντική επαγωγή της έκφρασης χημειοκινών CCL2 και CXCL13 στους περιφερικούς λεμφαδένες πειραματοζώων που έλαβαν αντιγόνο e.coli, συγκριτικά με πειραματόζωα που έλαβαν

διάλυμα PBS, καθώς και επαγωγή της έκφρασης CXCL13 στους περιφερικούς λεμφαδένες πειραματοζώων που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, συγκριτικά με αυτή πειραματοζώων που έλαβαν διάλυμα PBS, αν και ο βαθμός έκφρασης ήταν μικρότερος συγκριτικά με την ομάδα πειραματοζώων που έλαβαν αντιγόνο *e. coli* (Εικόνα 3, αναδημοσίευση από: [88] και [89]).

**Εικόνα 3:** Συγκριτική ανάλυση βαθμού έκφρασης κυτταροκινών CCL2, CXCL10, CXCL12 και CXCL13 στους περιφερικούς λεμφαδένες πειραματοζώων που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, *e.coli* ή διάλυμα PBS.



**Εικόνα 3.** Συγκριτική ανάλυση βαθμού έκφρασης κυτταροκινών CCL2, CXCL10, CXCL12 και CXCL13 στους περιφερικούς λεμφαδένες πειραματοζώων που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, *e.coli* ή διάλυμα PBS. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως απόλυτες μονάδες μέτρησης, συγκριτικά με το βαθμό έκφρασης β-ακτίνης. Οι ράβδοι εκφράζουν μ.ο. ± τ.σ.μ.ο. για κάθε πειραματική ομάδα \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$ .



Με βάση τα ερευνητικά αυτά δεδομένα, η νοσοτροποποιητική δράση της χορήγησης αντιγόνου του ΕΠ πριν από την πρόκληση της ΠΑΕ, ενδέχεται να αποδοθεί στην επίδραση του αντιγόνου στο μηχανισμό της αντιγονοπαρουσίασης, πιθανόν μέσω παρεμβολής στο βαθμό έκφρασης των μορίων ΜΣΙ-II. Ενώ το αντιγόνο *e.coli* επιτρέπει την έκφραση των μορίων ΜΣΙ-II στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, το αντιγόνο του ΕΠ έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του βαθμού έκφρασης των μορίων αυτών. Ως αποτέλεσμα, κατά την πρόκληση της ΠΑΕ, αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα που έχουν έρθει σε επαφή με αντιγόνο του ΕΠ ενδεχομένως δεν επιτελούν υπό άριστες συνθήκες την παρουσίαση του εγκεφαλιτιδογόνου πεπτιδίου στα Τ-λεμφοκύτταρα. Ως πιθανός μηχανισμός τροποποίησης της ΠΑΕ από το αντιγόνο του ΕΠ προτείνεται είτε η αλληλεπίδραση του αντιγόνου με τα Τ-λεμφοκύτταρα υπό μη-βέλτιστες συνθήκες, γεγονός που καθιστά μέρος των Τ-λεμφοκυττάρων ανενεργό. Ενδεχομένως να πρόκειται για μηχανισμό κινητοποίησης της ανοσιακής ανοχής, ο οποίος είναι γνωστό ότι ενεργοποιείται όταν απουσιάζουν οι βέλτιστες συνθήκες και η μέγιστη ισχύς του αντιγονικού ερεθίσματος [90]. Αναφορικά με την αύξηση των φλεγμονωδών χημειοκινών CCL2 και CXCL13 στους περιφερικούς λεμφαδένες των πειραματοζώων που έλαβαν αντιγόνο *e. coli*, και σε μικρότερο βαθμό των πειραματοζώων που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, υποδεικνύεται η χαμηλή ανοσογονικότητα του αντιγόνου ΕΠ, συγκριτικά με το αντιγόνο *e.coli*.

Τα μικρογλοιακά κύτταρα είναι κύτταρα του ΚΝΣ τα οποία ενεργοποιούνται και συνεισφέρουν στη φλεγμονή, στα πλαίσια ΠΣ και ΠΑΕ. Είναι ευρύτατα παραδεκτό ότι υπό συνθήκες πρόκλησης ΠΑΕ, κατόπιν της αύξησης της διαπερατότητας του ΑΕΦ και της διήθησης του ΚΝΣ από κύτταρα της φυσικής ανοσίας τα οποία διαμεσολαβούν τη φλεγμονή, η διάκριση μεταξύ των ενδογενών και των προερχόμενων από το αίμα κυττάρων, καθίσταται αδύνατη με κοινές ανοσοιστοχημικές τεχνικές. Εντούτοις, πριν από την κλινική έναρξη της ΠΑΕ και τη διήθηση του ΚΝΣ από μακροφάγα κύτταρα, τα κύτταρα της μικρογλοίας περιγράφεται ότι βρίσκονται σε ενεργοποιημένη κατάσταση [91]. Στην περίπτωση αυτή τα μικρογλοιακά κύτταρα εκφράζουν μόρια CD45, MHC-II, CD40, CD86 και CD11c [91]. Επίσης, η συστηματική χορήγηση LPS έχει περιγραφεί ότι επιφέρει φλεγμονή στο ΚΝΣ, μέσω ενεργοποίησης των υποδοχέων TLR στα κύτταρα φυσικής ανοσίας του ΚΝΣ [62, 92-93]. Πειραματόζωα γενετικά τροποποιημένα με απουσία της TLR ενδοκυττάριας σηματοδότησης (MyD88-/-), αναφέρεται ότι παραμένουν

σχετικά προστατευμένα έναντι φλεγμονής στο ΚΝΣ κατόπιν συστηματικής χορήγησης αντιγόνου μικροβιακής προέλευσης [94].

Από τα δεδομένα αυτά προκύπτει ότι η μικρογλοία του ΚΝΣ δύναται να αντιληφθεί ερεθίσματα είτε συστηματικής φλεγμονής, είτε παρουσίας μικροβιακών αντιγόνων, μέσω κατάλληλου συστήματος υποδοχέων. Ενώ οι πρώτες αναφορές αυτού του φαινομένου έγιναν σε συσχέτιση με την επίδραση LPS ευρύτατα πειραματικά χρησιμοποιούμενων βακτηρίων, όπως η *e. coli*, η δράση του αντιγόνου του ΕΠ δεν έχει μελετηθεί. Η τροποποίηση της διαδικασίας της αντιγονοπαρουσίασης από μόνη της δεν επαρκεί ως μηχανισμός νοσοτροποποίησης της ΠΑΕ από το ΕΠ, εφόσον η μελέτη των Τ-λεμφοκυττάρων αναφορικά με το δραστικό ή ρυθμιστικό τους λειτουργικό φαινότυπο δεν υποδεικνύει διαφορές μεταξύ των πειραματοζώων που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, *e.coli* ή PBS. Η νοσοτροποποιητική δράση του ΕΠ στην ΠΑΕ ενδέχεται να διαμεσολαβείται μέσω ειδικού σηματοδοτικού μονοπατιού από την περιφέρεια, όπου δύναται να χορηγηθεί συστηματικά, προς τη μικρογλοία του ΚΝΣ, μέσω της επαγωγής ειδικού νευροπροστατευτικού φαινοτύπου.

Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι ο λεπτομερής χαρακτηρισμός και η συγκριτική μελέτη της ενεργοποίησης της μικρογλοίας σε ποικίλες περιοχές στο ΚΝΣ πειραματοζώων κατόπιν συστηματικής χορήγησης αντιγόνου του ΕΠ, *e. coli* ή PBS, με τεχνικές ανοσοϊστοχημείας.

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## 7. ΥΛΙΚΟ

### 7.1. Πειραματόζωα

Χρησιμοποιήθηκαν 21 ποντικοί wtC57Bl/6, γένους θηλυκού, ηλικίας 6-8 εβδομάδων. Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε τρεις πειραματικές ομάδες ως εξής: πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε συστηματικά αντιγόνο ΕΠ (N=7), πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε συστηματικά αντιγόνο *e. coli* (N=7, ομάδα θετικών μαρτύρων) και πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε συστηματικά PBS (N=7, ομάδα αρνητικών μαρτύρων).

### 7.2. Αντιγόνα

Για την παρασκευή αντιγόνου ΕΠ [76], στέλεχος SS1 καλλιεργήθηκε σε τρυβλία με αιματούχο άγαρ (Columbia Blood Agar, Oxoid) παρουσία αντιβιοτικών, εμπλουτισμένων με 5% κατ' όγκο ολικό αίμα αλόγου και 1% κατ' όγκο Vitox (Oxoid), υπό μικροαερόφιλες συνθήκες (CampyGen, Oxoid), στους 37°C. Για την παρασκευή αντιγόνου *Escherichia coli*, στέλεχος DH5a καλλιεργήθηκε σε τρυβλία με Luria broth (LB) (Becton Dickinson) παρουσία αντιβιοτικών υπό μικροαερόφιλες συνθήκες (CampyGen, Oxoid), στους 37°C. Κατόπιν συλλογής και έκπλυσης των καλλιεργειών με διάλυμα PBS, πραγματοποιήθηκε θραύση των κυττάρων με υπερήχηση (sonication), εντός λουτρού (4°C) και κατόπιν το αντιγόνο διατηρήθηκε στους -80°C.



## 8. ΜΕΘΟΔΟΙ

### 8.1. Μονιμοποίηση ιστού και προετοιμασία για ιστοπαθολογική μελέτη

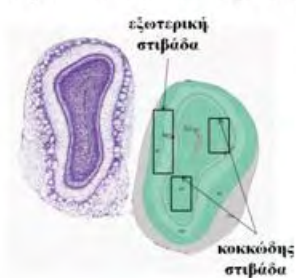
Τα πειραματόζωα κατόπιν ενδοπεριτοναϊκής έγχυσης αντιγόνου ΕΠ, αντιγόνου *e.coli* ή διαλύματος PBS, θυσιάστηκαν με τεχνική ευθανασίας για λήψη ιστών και ιστοπαθολογική μελέτη. Τα πειραματόζωα αναισθητοποιήθηκαν με θανάσιμη δόση πεντοβαρβιτάλης, οι δε εγκεφαλοι και νωτιαίοι μυελοί διηθήθηκαν μέσω της ανιούσας αορτής με ψυχρό PBS, ακολουθούμενο από ψυχρή παραφορμαλδεΰδη 4% σε PBS. Οι ιστοί τμήθηκαν και μονιμοποιήθηκαν με παραμονή στο ίδιο μονιμοποιητικό μέσο για 24 ώρες στους 4°C.

### 8.2. Τεχνικές Ανοσοϊστοχημείας

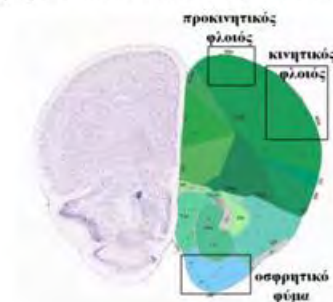
Μελετήθηκαν εγκάρσιες τομές παραφίνης εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού, πάχους 10  $\mu\text{m}$ . Κατόπιν ενυδάτωσης οι τομές επώασθησαν για 10 λεπτά σε διάλυμα κιτρικού οξέος, pH 6, και κατόπιν για 30 λεπτά σε fetal bovine serum (FBS). Κατόπιν έκπλυσης, οι τομές επώασθηκαν επί 12 ώρες με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης Iba1 (Ionized calcium binding adaptor molecule 1) (1:400, goat polyclonal, Abcam), για τη μελέτη ενεργοποίησης της μικρογλοίας. Κατόπιν έκπλυσης, χρησιμοποιήθηκε goat anti-mouse (Biotium 555) αντίσωμα. Για τη μελέτη του φαινοτύπου ενεργοποίησης M1 της μικρογλοίας οι τομές επώασθηκαν επί 12 ώρες με αντίσωμα έναντι, είτε iNOS (Inducible nitric oxide synthase) (Santa-Cruz, mouse polyclonal, 1:100), είτε ΜΣΙ-II (Abcam, mouse polyclonal, 1:100), ενώ κατόπιν έκπλυσης χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα goat anti-mouse (Santa-Cruz, 1:200). Για τη μελέτη του φαινοτύπου ενεργοποίησης M2 της μικρογλοίας οι τομές επώασθηκαν επί 12 ώρες με αντίσωμα έναντι, είτε arginase (Santa-Cruz, mouse polyclonal, 1:400), είτε CD206 (Santa-Cruz, goat polyclonal, 1:50), ενώ κατόπιν έκπλυσης χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα goat anti-mouse (Santa-Cruz, 1:200) ή rabbit anti-goat (Chemicon, 1:200) αντίστοιχα. Οι τομές μελετήθηκαν σε μικροσκόπιο (Zeiss Axioplan 2; Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Gottingen, Germany) και ψηφιοποιήθηκαν μέσω ψηφιακής κάμερας (DS-5Mc-L1; Nikon, Tokyo, Japan). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε φακό μεγέθυνσης 20x. Ελήφθησαν αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες, τουλάχιστον τέσσερις, ανά χαρακτηριστική περιοχή (**Εικόνα 4**) και ανά πειραματόζωο. Για κάθε πειραματόζωο μελετήθηκαν δυο τομές με απόσταση μεταξύ τους 20  $\mu\text{m}$ .

#### Εικόνα 4: Πρωτόκολλο μελέτης αντιπροσωπευτικών περιοχών του εγκεφάλου

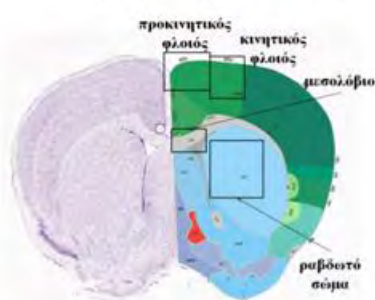
Επίπεδο μετωπιαίου πόλου (Επίπεδο 15)



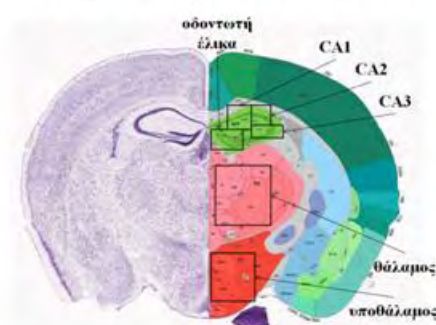
Προμετωπιαίο επίπεδο (Επίπεδο 37)



Διεγκεφαλος (Επίπεδο 55)



Διεγκεφαλος – ονυαίο επίπεδο (Επίπεδο 68)



Παρεγκεφαλίδα – ονυαίο επίπεδο (Επίπεδο 129)



Προέλευση εικόνων: Allen Institute for Brain Science

### 8.3. Στατιστική ανάλυση

Οι συνολικές συγκρίσεις μεταξύ των πειραματικών ομάδων πραγματοποιήθηκαν στη βάση μη παραμετρικής δοκιμασίας Kruskal-Wallis, ενώ κατόπιν εφαρμόστηκε Dunn's Post-Hoc ανάλυση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. Η στατιστική σημαντικότητα ετέθη στο επίπεδο  $p=0,05$ . Η στατιστική ανάλυση και η γραφική παράσταση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση λογισμικού GraphPad Prism 6 (GraphPad Software).



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 8.4. Ποσοτική μελέτη ενεργοποίησης της μικρογλοίας στο ΚΝΣ

Αναφορικά με την ενεργοποίηση της μικρογλοίας, δε διαπιστώθηκε σημαντικά διαφορετικός αριθμός IBA1+ κυττάρων σε υπό μελέτη περιοχές του εγκεφάλου μεταξύ πειραματοζώων που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, συγκριτικά με πειραματοζώα που έλαβαν PBS. Αντιθέτως, διαπιστώθηκε σημαντικά αυξημένος αριθμός IBA1+ κυττάρων σε υπό μελέτη περιοχές του εγκεφάλου πειραματοζώων που έλαβαν αντιγόνο *e.coli*, συγκριτικά με πειραματοζώα που έλαβαν PBS, καθώς και συγκριτικά με πειραματοζώα που έλαβαν PBS (Πίνακας 1).

**Πίνακας 1: ανάλυση του αριθμού (μ.ο. ± τ.σ.μ.ο.) των IBA1+ κυττάρων ανά περιοχή του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού.**

Περιοχή	<i>ΕΠ</i>	<i>e.coli</i>	PBS	p <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>	p <sup>c</sup>	p <sup>d</sup>
<b>Επίπεδο μετωπιαίου πόλου</b>							
οσφρητικός βολβός							
εξωτερική	136±8,6	128,9±7,92	110,4±5,83	0,037	<0,05	ns	ns
στιβάδα	110,8±4,16	131,1±4,01	100,4±4,26	<0,001	ns	<0,01	<0,001
κοκκώδης							
στιβάδα							
<b>Προμετωπιαίο επίπεδο</b>							
οσφρητικός βολβός	121,7±6,6	132,5±5,27	104,7±6,78	0,017	ns	<0,05	ns
προκινητικός φλοιός	101,5±6,55	13,04±4,04	98,57±5,6	<0,001	ns	<0,01	<0,01
κινητικός φλοιός	111,3±4,45	136,5±4,3	108,3±6,69	0,001	ns	<0,01	<0,01
<b>Διεγκέφαλος</b>							
μεσολόβιο	64,63±6,23	100,6±6,9	94,83±9,86	0,02	ns	ns	<0,05
προκινητικός φλοιός	111,2±4,24	115,9±6,98	119,3±10,24	ns	ns	ns	ns
κινητικός φλοιός	110,6±6,25	129,5±5,2	115,3±7,78	ns	ns	ns	ns
ραβδωτό σώμα	93,33±4,66	121,9±2,77	96,89±3,49	<0,001	ns	<0,001	<0,001
<b>Διεγκέφαλος – ουραίο επίπεδο</b>							
οδοντωτή έλικα	95,03±3,39	114,5±3,67	91,94±5,44	<0,001	ns	<0,001	<0,01
ιππόκαμπος							
CA1	88,58±3,36	109,9±5,86	81,92±8,07	0,002	ns	<0,05	<0,01
CA2	91,73±4,39	107,9±4,8	86,28±5,06	0,014	ns	<0,05	ns
CA3	91,42±5,46	105,3±3,82	91,05±7,7	ns	ns	ns	ns
θάλαμος	58,4±3,36	85,94±2,37	70,02±2,87	<0,001	ns	<0,01	<0,001
υποθάλαμος	86,02±5,92	102,2±6,32	89,33±5,96	0,025	ns	ns	<0,05
<b>Παρεγκεφαλίδα – ουραίο επίπεδο</b>							
παρεγκεφαλίδα							

κοκκώδης	86,76±12,1	88,45±5,51	82,1±8,57	0,01	ns	<0,05	<0,05
στιβάδα	51,88±3,93	73,87±6,61	53,25±4,16	0,013	ns	<0,05	ns
μοριώδης στιβάδα	46,92±4,12	57,8±9,77	34,14±2,52	ns	ns	ns	ns
φαιά ουσία	79,88±6,9	86,31±2,83	71,81±4,06	0,011	ns	ns	<0,05
εγκεφαλικό στέλεχος							
Νωτιαίος μυελός				0,006	ns	<0,05	<0,05

<sup>a</sup>, Δοκιμασία Kruskal-Wallis

<sup>b</sup>, Bonferroni's Post-Hoc *EII* έναντι PBS

<sup>c</sup>, Bonferroni's Post-Hoc *e.coli* έναντι PBS

<sup>d</sup>, Bonferroni's Post-Hoc *EII* έναντι *e.coli*

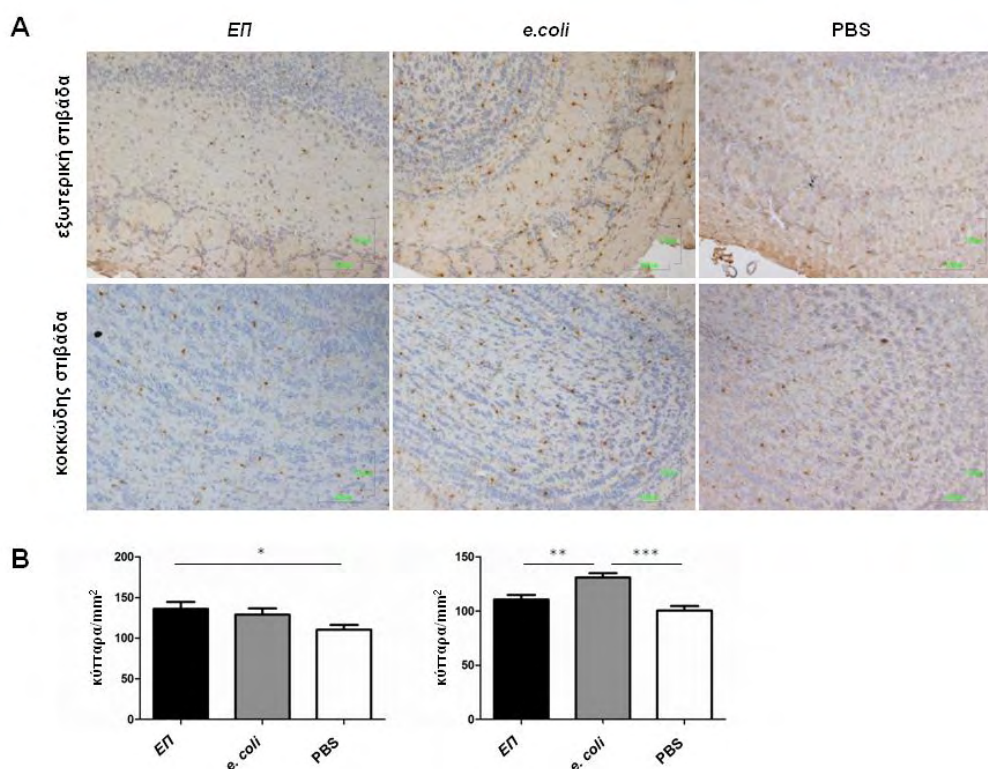
\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001

μ.ο. = μέσος όρος, τ.σ.μ.ο. = τυπικό σφάλμα του μέσου όρου

#### 8.4.1. Επίπεδο μετωπιαίου πόλου

Διαπιστώθηκε σημαντικά αυξημένος αριθμός IBA1+ κυττάρων στην εξωτερική στιβάδα του οσφρητικού βολβού πειραματόζων που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ συγκριτικά με πειραματόζωα που έλαβαν PBS. Στην κοκκιώδη στιβάδα του οσφρητικού βολβού διαπιστώθηκε σημαντικά αυξημένος αριθμός IBA1+ κυττάρων στα πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο *e.coli*, συγκριτικά με πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ και PBS (Πίνακας 1 και Εικόνα 5).

**Εικόνα 5:** Μελέτη του βαθμού ενεργοποίησης της μικρογλοίας στο επίπεδο του μετωπιαίου πόλου, συγκριτικά για πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, αντιγόνο *e.coli* ή PBS.



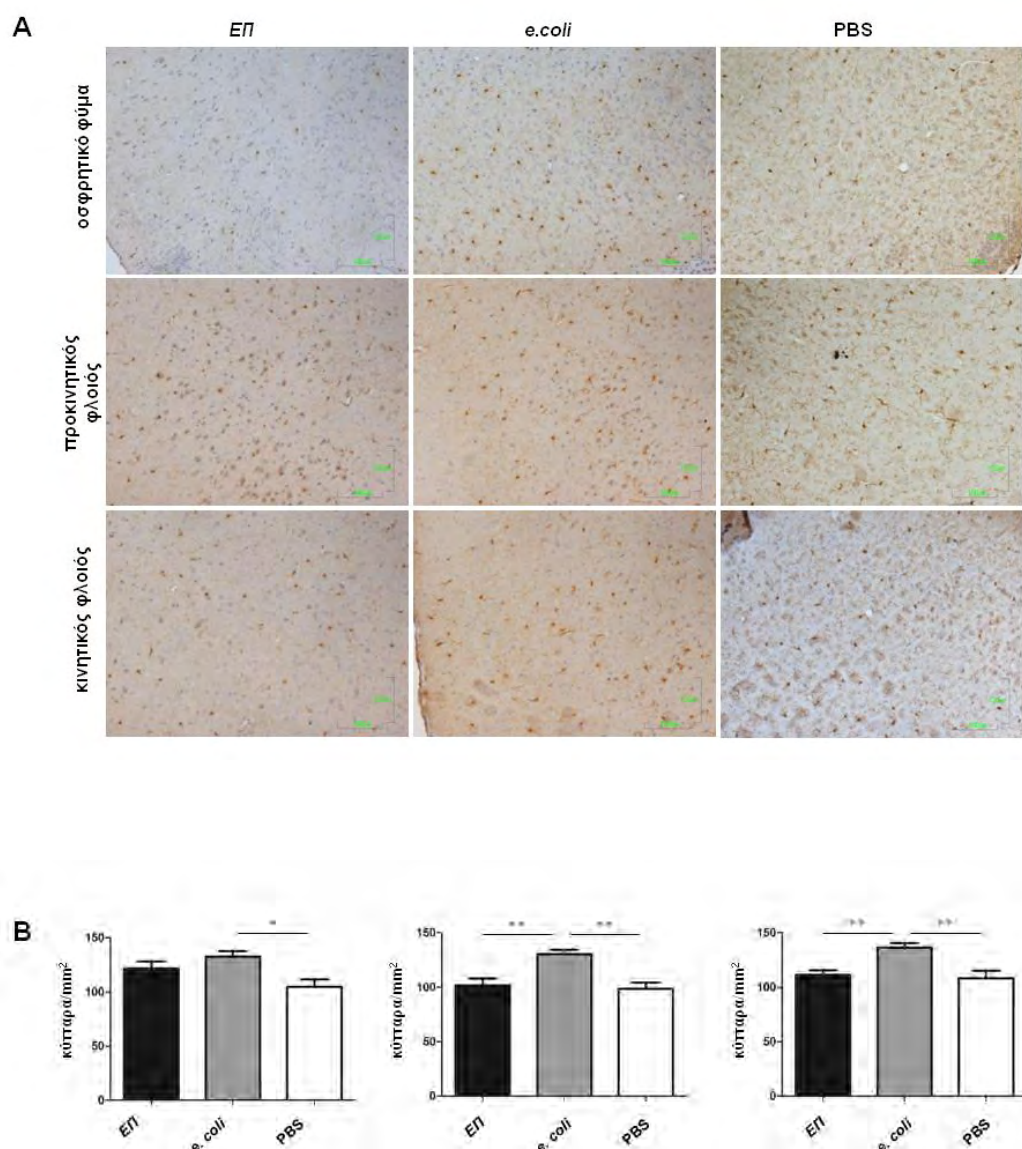
**Εικόνα 5.** Μελέτη του αριθμού IBA1+ κυττάρων στο επίπεδο του οσφρητικού πόλου. (Α) αντιπροσωπευτικές περιοχές της εξωτερικής (άνω) και της κοκκώδους (κάτω) στιβάδας του οσφρητικού βολβού πειραματόζωων που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, αντιγόνο *e.coli* και PBS. (Β) Ποσοτικοποίηση του βαθμού ενεργοποίησης της μικρογλοίας ως αριθμός IBA1+ κυττάρων ανά mm<sup>2</sup> στις περιοχές της εξωτερικής (αριστερά) και της κοκκώδους (δεξιά) στιβάδας του οσφρητικού βολβού πειραματόζωων που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, αντιγόνο *e.coli* και PBS. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν μ.ο. ± τ.σ.μ.ο. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

#### 8.4.2. Προμετωπιαίο επίπεδο

Διαπιστώθηκε σημαντικά αυξημένος αριθμός IBA1+ κυττάρων στο οσφρητικό φύμα πειραματόζωων που έλαβαν αντιγόνο *e.coli* συγκριτικά με πειραματόζωα που έλαβαν PBS. Στον προκινητικό φλοιό διαπιστώθηκε σημαντικά αυξημένος αριθμός IBA1+ κυττάρων στα πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο *e.coli*, συγκριτικά με

πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ και PBS. Ομοίως στον κινητικό φλοιό διαπιστώθηκε σημαντικά αυξημένος αριθμός IBA1+ κυττάρων στα πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο *e.coli*, συγκριτικά με πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ και PBS (Πίνακας 1 και Εικόνα 6).

**Εικόνα 6:** Μελέτη του βαθμού ενεργοποίησης της μικρογλοίας στο προμετωπιαίο επίπεδο, συγκριτικά για πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, αντιγόνο *e.coli* ή PBS.



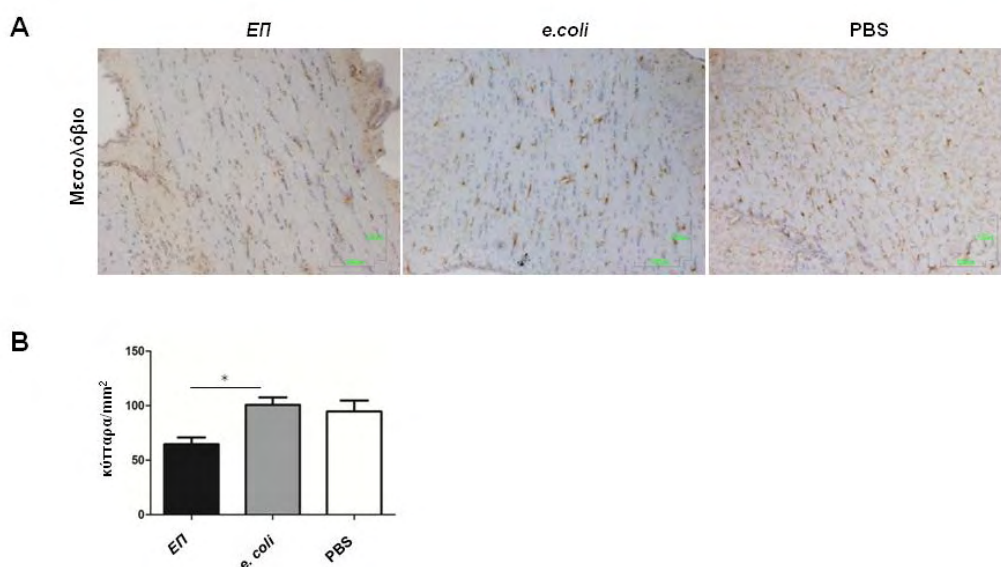
**Εικόνα 6.** Μελέτη του αριθμού IBA1+ κυττάρων στο προμετωπιαίο επίπεδο. (Α) αντιπροσωπευτικές περιοχές του οσφρητικού φύματος (άνω), του προκινητικού (μέσο) και του κινητικού (κάτω) φλοιού πειραματοζώων που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ,

αντιγόνο *e.coli* και PBS. (B) Ποσοτικοποίηση του βαθμού ενεργοποίησης της μικρογλοίας ως αριθμός IBA1+ κυττάρων ανά mm<sup>2</sup> στις περιοχές του οσφρητικού φύματος (αριστερά), του προκινητικού (μέσο) και του κινητικού (δεξιά) φλοιού πειραματόζων που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, αντιγόνο *e.coli* και PBS. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν μ.ο. ± τ.σ.μ.ο. \*p<0,05, \*\*p<0,01

#### 8.4.3. Διεγκέφαλος

Διαπιστώθηκε σημαντικά αυξημένος αριθμός IBA1+ κυττάρων στο μεσολόβιο πειραματόζων που έλαβαν αντιγόνο *e.coli* συγκριτικά με πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ (Πίνακας 1 και Εικόνα 7).

**Εικόνα 7:** Μελέτη του βαθμού ενεργοποίησης της μικρογλοίας στο μεσολόβιο, συγκριτικά για πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, αντιγόνο *e.coli* ή PBS.

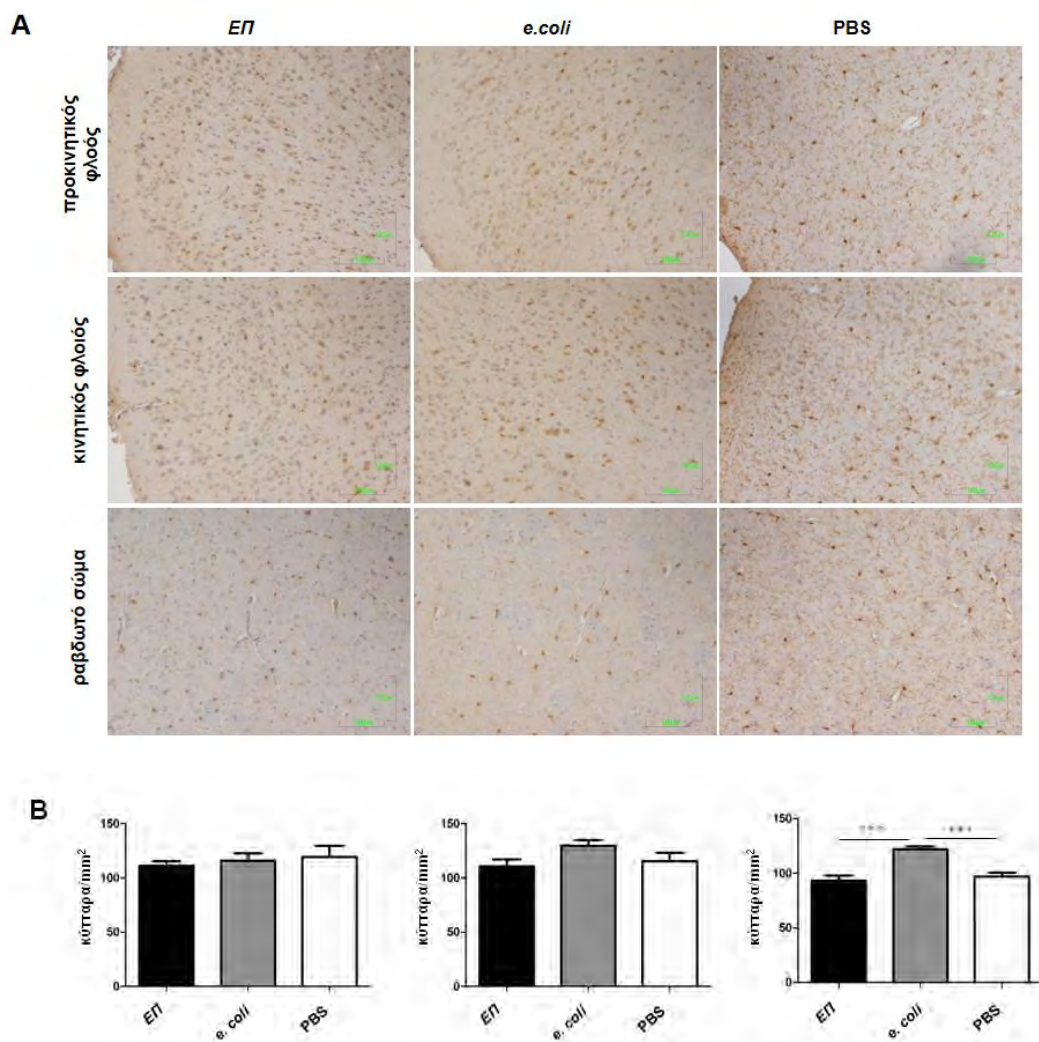


**Εικόνα 7.** Μελέτη του αριθμού IBA1+ κυττάρων στο μεσολόβιο. (A) αντιπροσωπευτικές περιοχές του μεσολοβίου πειραματόζων που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, αντιγόνο *e.coli* και PBS. (B) Ποσοτικοποίηση του βαθμού ενεργοποίησης της μικρογλοίας ως αριθμός IBA1+ κυττάρων ανά mm<sup>2</sup> στο μεσολόβιο πειραματόζων που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, αντιγόνο *e.coli* και PBS. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν μ.ο. ± τ.σ.μ.ο. \*p<0,05



Αναφορικά με τον προκινητικό και κινητικό φλοιό στο επίπεδο του διεγκεφάλου, δε διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά στον αριθμός IBA1+ κυττάρων μεταξύ των πειραματόζων που έλαβαν αντιγόνο *e.coli*, αντιγόνο ΕΠ ή PBS. Εντούτοις, διαπιστώθηκε σημαντικά αυξημένος αριθμός IBA1+ κυττάρων στο ραβδωτό σώμα πειραματόζων που έλαβαν αντιγόνο *e.coli*, συγκριτικά με πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ και PBS (Πίνακας 1 και Εικόνα 8).

**Εικόνα 8: Μελέτη του βαθμού ενεργοποίησης της μικρογλοίας στο επίπεδο του διεγκεφάλου, συγκριτικά για πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, αντιγόνο *e.coli* ή PBS.**



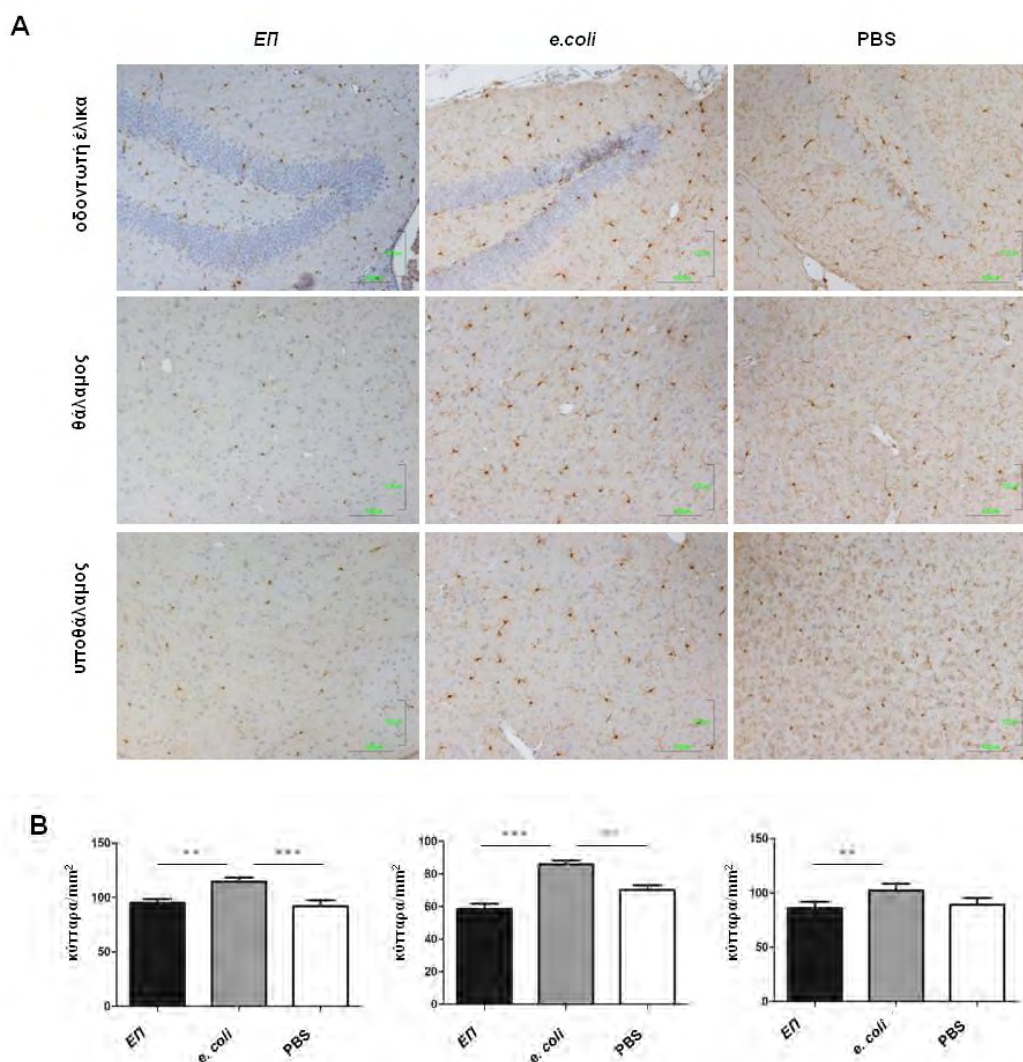
**Εικόνα 8.** Μελέτη του αριθμού IBA1+ κυττάρων στο επίπεδο του διεγκεφάλου. (Α) αντιπροσωπευτικές περιοχές του προκινητικού (άνω) και του κινητικού (μέσο) φλοιού, καθώς και του ραβδωτού σώματος (κάτω) πειραματόζων που έλαβαν

αντιγόνο ΕΠ, αντιγόνο e.coli και PBS. (B) Ποσοτικοποίηση του βαθμού ενεργοποίησης της μικρογλοίας ως αριθμός IBA1+ κυττάρων ανά mm<sup>2</sup> στις περιοχές του προκινητικού (αριστερά) και του κινητικού (μέσο) φλοιού, καθώς και του ραβδωτού σώματος (δεξιά) πειραματόζων που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, αντιγόνο e.coli και PBS. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν μ.ο. ± τ.σ.μ.ο. \*\*\*p<0,001

#### **8.4.4. Διεγκέφαλος – ουραίο επίπεδο**

Διαπιστώθηκε σημαντικά αυξημένος αριθμός IBA1+ κυττάρων στην οδοντωτή έλικα και το θάλαμο πειραματόζων που έλαβαν αντιγόνο e.coli, συγκριτικά με πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ και PBS. Επίσης, διαπιστώθηκε σημαντικά αυξημένος αριθμός IBA1+ κυττάρων στον υποθάλαμο πειραματόζων που έλαβαν αντιγόνο e.coli, συγκριτικά με πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ (**Πίνακας 1** και **Εικόνα 9**).

**Εικόνα 9:** Μελέτη του βαθμού ενεργοποίησης της μικρογλοίας στο ουραίο επίπεδο του διεγκεφάλου (οδοντωτή έλικα, θάλαμος, υποθάλαμος), συγκριτικά για πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο *ΕΠ*, αντιγόνο *e.coli* ή *PBS*.

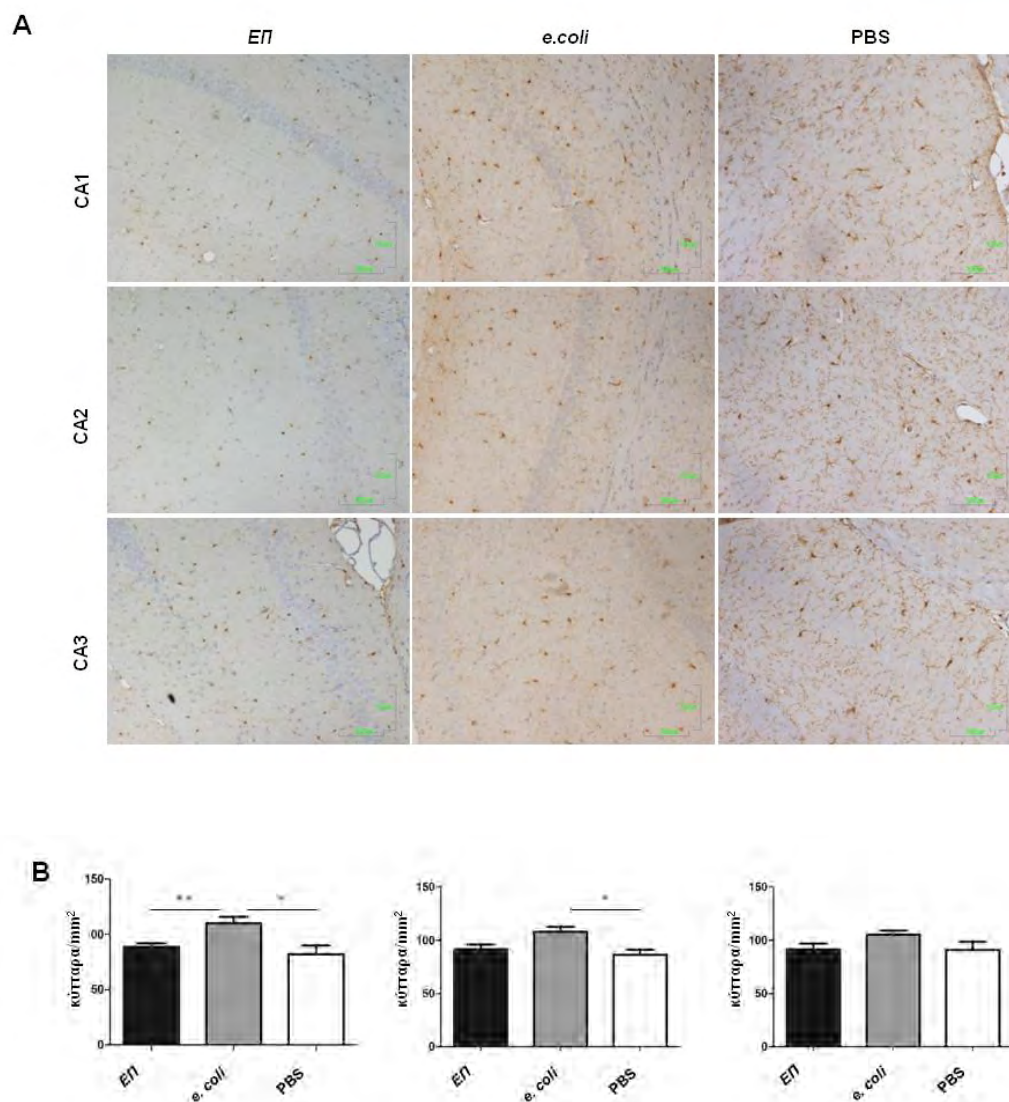


**Εικόνα 9.** Μελέτη του αριθμού IBA1+ κυττάρων στο επίπεδο του διεγκεφάλου (οδοντωτή έλικα, θάλαμος, υποθάλαμος). (Α) αντιπροσωπευτικές περιοχές της οδοντωτής έλικας (άνω), του θαλάμου (μέσο) και του υποθαλάμου (κάτω) πειραματόζωων που έλαβαν αντιγόνο *ΕΠ*, αντιγόνο *e.coli* και *PBS*. (Β) Ποσοτικοποίηση του βαθμού ενεργοποίησης της μικρογλοίας ως αριθμός IBA1+ κυττάρων ανά mm<sup>2</sup> στις περιοχές της οδοντωτής έλικας (αριστερά), του θαλάμου (μέσο) και του υποθαλάμου (δεξιά) πειραματόζωων που έλαβαν αντιγόνο *ΕΠ*, αντιγόνο *e.coli* και *PBS*. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν μ.ο. ± τ.σ.μ.ο. \*\**p*<0,01, \*\*\**p*<0,001



Στον ιππόκαμπο διαπιστώθηκε σημαντικά αυξημένος αριθμός IBA1+ κυττάρων στην περιοχή CA1 πειραματόζων που έλαβαν αντιγόνο *e.coli*, συγκριτικά με πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ και PBS. Επίσης, διαπιστώθηκε σημαντικά αυξημένος αριθμός IBA1+ κυττάρων στην περιοχή CA2 πειραματόζων που έλαβαν αντιγόνο *e.coli*, συγκριτικά με πειραματόζωα που έλαβαν PBS (Πίνακας 1 και Εικόνα 10). Δε διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές στην περιοχή CA3 μεταξύ των τριών πειραματικών ομάδων.

**Εικόνα 10: Μελέτη του βαθμού ενεργοποίησης της μικρογλοίας στις περιοχές του ιπποκάμπου, συγκριτικά για πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, αντιγόνο *e.coli* ή PBS.**

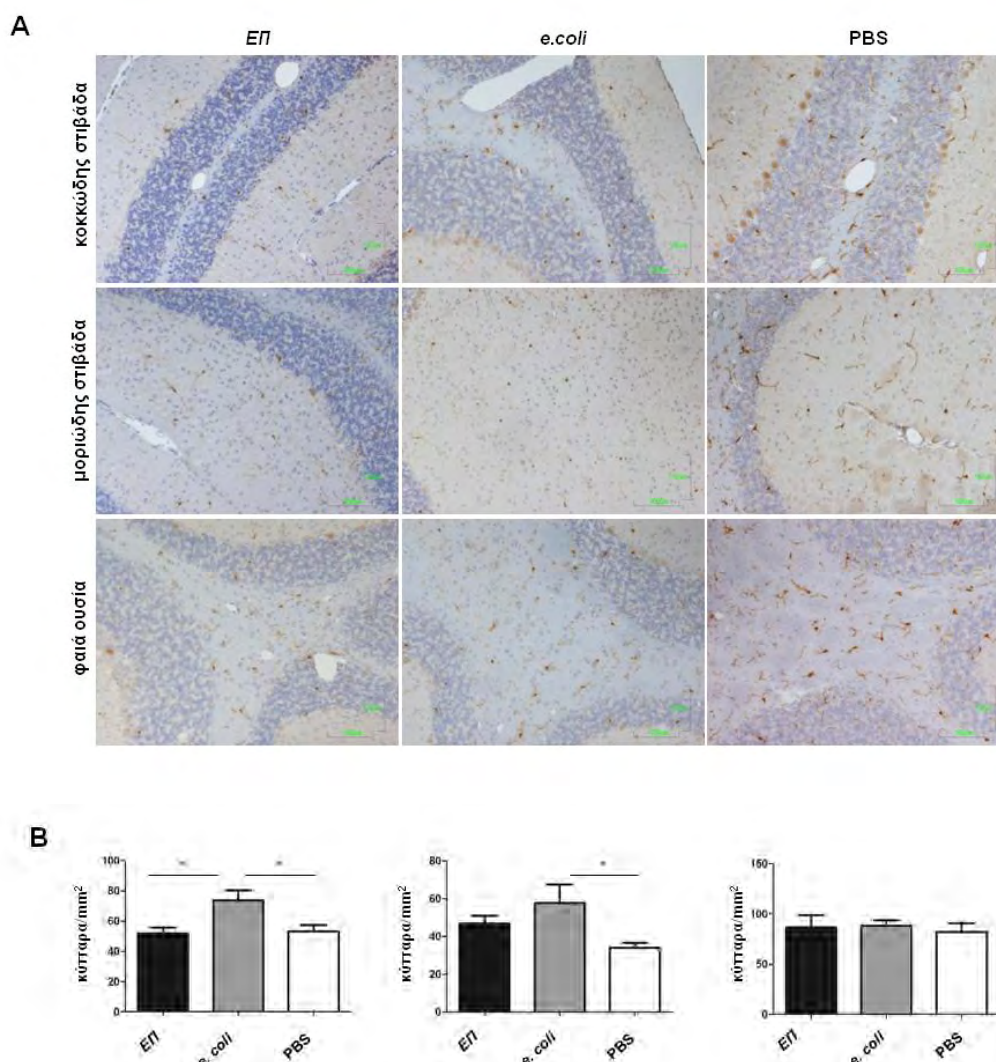


**Εικόνα 10.** Μελέτη του αριθμού IBA1+ κυττάρων στον ιππόκαμπο. (Α) αντιπροσωπευτικές περιοχές CA1 (άνω), CA2 (μέσο) και CA3 (κάτω) πειραματόζων που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, αντιγόνο *e.coli* και PBS. (Β) Ποσοτικοποίηση του βαθμού ενεργοποίησης της μικρογλοίας ως αριθμός IBA1+ κυττάρων ανά mm<sup>2</sup> στις περιοχές CA1 (αριστερά), CA2 (μέσο) και CA3 (δεξιά) πειραματόζων που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, αντιγόνο *e.coli* και PBS. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν μ.ο. ± τ.σ.μ.ο. \*p<0,05, \*\*p<0,01.

#### **8.4.5. Παρεγκεφαλίδα – ουραίο επίπεδο**

Στην κοκκώδη στιβάδα της παρεγκεφαλίδας διαπιστώθηκε σημαντικά αυξημένος αριθμός IBA1+ κυττάρων στα πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο *e.coli*, συγκριτικά με πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ και PBS. Επίσης, στη μοριώδη στιβάδα διαπιστώθηκε σημαντικά αυξημένος αριθμός IBA1+ κυττάρων στα πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο *e.coli*, συγκριτικά με πειραματόζωα που έλαβαν PBS. Δε διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές αναφορικά με τη φαιά ουσία της παρεγκεφαλίδας, μεταξύ των τριών πειραματικών ομάδων (**Πίνακας 1** και **Εικόνα 11**).

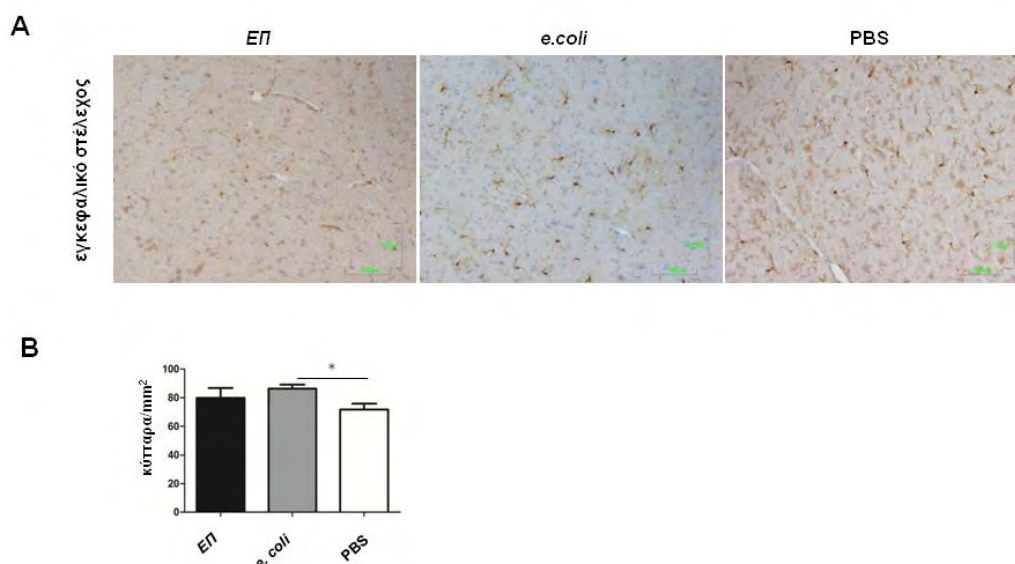
**Εικόνα 11:** Μελέτη του βαθμού ενεργοποίησης της μικρογλοίας σε περιοχές της παρεγκεφαλίδας, συγκριτικά για πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, αντιγόνο *e.coli* ή PBS.



**Εικόνα 11.** Μελέτη του αριθμού IBA1+ κυττάρων στην παρεγκεφαλίδα. (Α) αντιπροσωπευτικές εικόνες κοκκώδους στιβάδας (άνω), μοριώδους στιβάδας (μέσο) και φαιάς ουσίας (κάτω) πειραματόζων που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, αντιγόνο e.coli και PBS. (Β) Ποσοτικοποίηση του βαθμού ενεργοποίησης της μικρογλοίας ως αριθμός IBA1+ κυττάρων ανά mm<sup>2</sup> στις περιοχές της κοκκώδους στιβάδας (αριστερά), της μοριώδους στιβάδας (μέσο) και της φαιάς ουσίας (δεξιά) πειραματόζων που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, αντιγόνο e.coli και PBS. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν μ.ο. ± τ.σ.μ.ο. \*p<0,05.

Στο εγκεφαλικό στέλεχος, στο ίδιο επίπεδο μελέτης, διαπιστώθηκε σημαντικά αυξημένος αριθμός IBA1+ κυττάρων στα πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο e.coli, συγκριτικά με πειραματόζωα που έλαβαν PBS (**Πίνακας 1** και **Εικόνα 12**).

**Εικόνα 12:** Μελέτη του βαθμού ενεργοποίησης της μικρογλοίας στο εγκεφαλικό στέλεχος, συγκριτικά για πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο *ΕΠ*, αντιγόνο *e.coli* ή *PBS*.

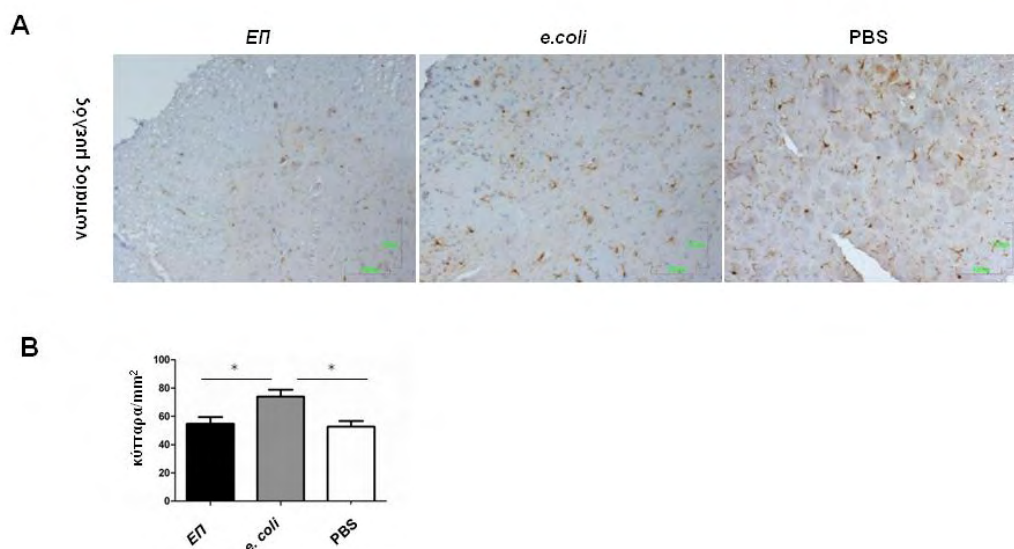


**Εικόνα 12.** Μελέτη του αριθμού IBA1+ κυττάρων στο εγκεφαλικό στέλεχος. (Α) αντιπροσωπευτικές εικόνες εγκεφαλικού στελέχους πειραματοζώων που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, αντιγόνο *e.coli* και *PBS*. (Β) Ποσοτικοποίηση του βαθμού ενεργοποίησης της μικρογλοίας ως αριθμός IBA1+ κυττάρων ανά mm<sup>2</sup> στο εγκεφαλικό στέλεχος πειραματοζώων που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, αντιγόνο *e.coli* και *PBS*. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν μ.ο. ± τ.σ.μ.ο. \**p*<0,05.

#### 8.4.6. Νωτιαίος μυελός

Στο νωτιαίο μυελό διαπιστώθηκε σημαντικά αυξημένος αριθμός IBA1+ κυττάρων στα πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο *e.coli*, συγκριτικά με πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ και *PBS* (Πίνακας 1 και Εικόνα 13).

**Εικόνα 13: Μελέτη του βαθμού ενεργοποίησης της μικρογλοίας στο νωτιαίο μυελό, συγκριτικά για πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, αντιγόνο *e.coli* ή PBS.**



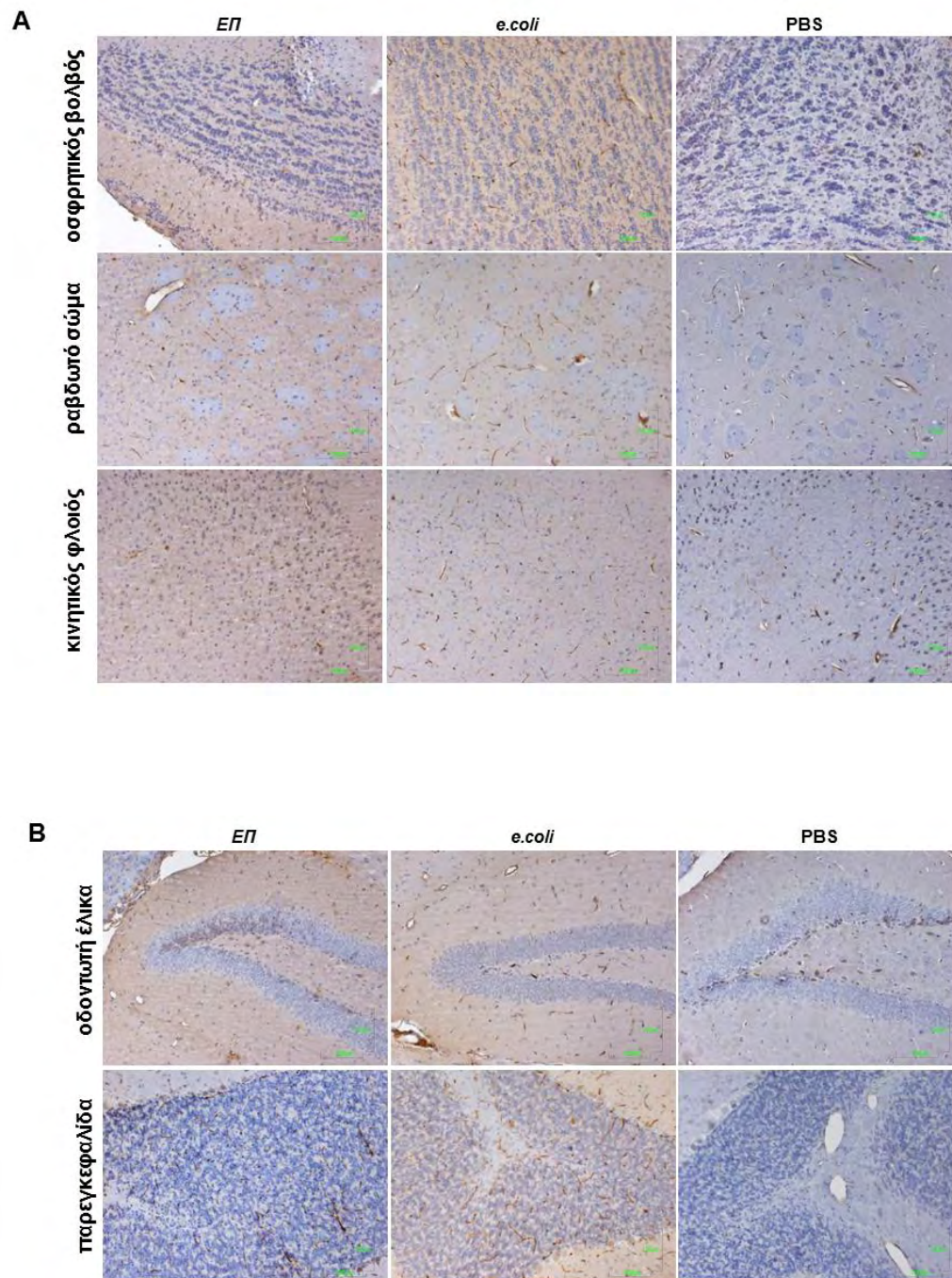
**Εικόνα 13.** Μελέτη του αριθμού IBA1+ κυττάρων στο νωτιαίο μυελό. (Α) αντιπροσωπευτικές εικόνες νωτιαίου μυελού πειραματόζωων που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, αντιγόνο *e.coli* και PBS. (Β) Ποσοτικοποίηση του βαθμού ενεργοποίησης της μικρογλοίας ως αριθμός IBA1+ κυττάρων ανά mm<sup>2</sup> στο νωτιαίο μυελό πειραματόζωων που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, αντιγόνο *e.coli* και PBS. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν μ.ο. ± τ.σ.μ.ο. \*p<0,05.

### 8.5. Ποιοτικός χαρακτηρισμός της μικρογλοίας ως προς το φαινότυπο ενεργοποίησης – προκαταρκτικά αποτελέσματα.

Με σκοπό την ποιοτική μελέτη ενεργοποίησης της μικρογλοίας, είτε προς την κατεύθυνση του M1, είτε προς την κατεύθυνση του M2 φαινοτύπου, πραγματοποιήθηκε χρώση παρασκευασμάτων του ΚΝΣ των τριών πειραματικών ομάδων έναντι δεικτών iNOS, arginase, ΜΣΙ-II και CD206, με τεχνικές απλής ανοσοϊστοχημείας. Διαπιστώθηκε παρουσία θετικής χρώσης σε πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο *e.coli*, σε αντίθεση με πειραματόζωα που έλαβαν ΕΠ ή PBS. Εντούτοις, διαπιστώθηκε παρουσία θετικού σήματος σε αγγειακές δομές κατά κύριο λόγο και σε μικρότερο βαθμό σε κυτταρικές δομές ενδεικτικές μικρογλοίας (**Εικόνα 14**).



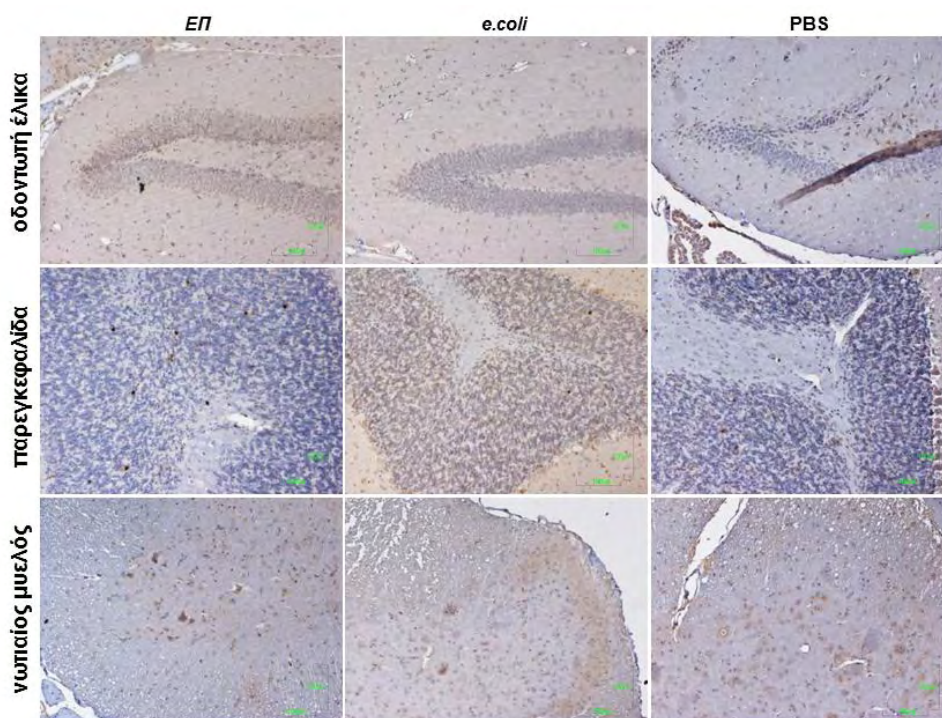
**Εικόνα 14: Ποιοτική μελέτη ενεργοποίησης της μικρογλοίας ως προς φαινότυπο M1 στο ΚΝΣ, συγκριτικά για πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο *ΕΠ*, αντιγόνο *e.coli* ή PBS.**



**Εικόνα 14.** Χρώση έναντι iNOS, συγκριτικά για πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, αντιγόνο *e.coli* ή PBS. (Α) οσφρητικός βολβός, ραβδωτό σώμα, κινητικός φλοιός. (Β) οδοντωτή έλικα, παρεγκεφαλίδα.

Αντιθέτως, διαπιστώθηκε παρουσία arginase+ κυττάρων κατά κύριο λόγο στην κοκκώδη στιβάδα της παρεγκεφαλίδας σε πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, σε αντίθεση με πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο *e.coli* ή PBS (**Εικόνα 15**). Δε διαπιστώθηκαν διαφορές κατά την αδρή ποιοτική μελέτη με τεχνικές ανοσοϊστοχημείας, των δεικτών ΜΣΙ-II και CD206, στις υπό μελέτη εγκεφαλικές περιοχές, μεταξύ των τριών πειραματικών ομάδων.

**Εικόνα 15:** Ποιοτική μελέτη ενεργοποίησης της μικρογλοίας ως προς φαινότυπο M2 στο ΚΝΣ, συγκριτικά για πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, αντιγόνο *e.coli* ή PBS.



**Εικόνα 15.** Χρώση έναντι arginase, στην οδοντωτή έλικα, την παρεγκεφαλίδα και το νωτιαίο μυελό, συγκριτικά για πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, αντιγόνο *e.coli* ή PBS.





## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων, με κύριο τις λοιμώξεις από ιικά και βακτηριακά παθογόνα, στην παθογένεση της ΠΣ, επιβεβαιώνεται στη βάση επιδημιολογικών μελετών. Ένας αριθμός ιών και βακτηρίων θεωρείται ότι συνδέεται με την εμφάνιση της νόσου, όπως η λοίμωξη από τον ιό Epstein-Barr, ερπητοϊούς και το *χλαμύδιο της πνευμονίας* [95-96]. Εντούτοις, συγκεκριμένος λοιμώδης παράγοντας δεν έχει απομονωθεί ως σήμερα. Το ΕΠ αναφέρεται στη βιβλιογραφία ότι σχετίζεται με έναν αριθμό γαστρικών και εξωγαστρικών νοσημάτων, όπως η νόσος γαστρικού έλκους, ο καρκίνος του στομάχου και η αυτοάνοση γαστρίτιδα [66-67], καθώς επίσης και συστηματικά ρευματικά νοσήματα, καρδιαγγειακή νόσος και αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο. Από τις εξωγαστρικές νόσους που σχετίζονται με το ΕΠ, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν νευροεκφυλιστικά νοσήματα, για τα οποία επιδημιολογική συσχέτιση με το ΕΠ έχει πρόσφατα περιγραφεί, όπως η ΝΑ, η νόσος Parkinson και το γλαύκωμα [80, 82, 97].

Αναφορικά με τη λοίμωξη από το ΕΠ σε σχέση με την ΠΣ, έχει αναφερθεί μεγαλύτερη συχνότητα λοίμωξης σε ασθενείς με ΠΣ, συγκριτικά με υγιή πληθυσμό [86]. Ομοίως και σε ασθενείς με ΚΜΣ, αναφέρεται υψηλότερη συχνότητα λοίμωξης από ΕΠ, συγκριτικά με υγιείς ενήλικες, ενώ πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι επιτυχής εκρίζωση του βακτηρίου κατόπιν αντιβιοτικής αγωγής, σχετίζεται με χαμηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης ΠΣ [87]. Εντούτοις, τα αποτελέσματα αυτά μερικώς μόνον επιβεβαιώνονται σε επιδημιολογικές μελέτες σε διαφορετικούς πληθυσμούς, με ορισμένες από αυτές να υποδεικνύουν σχετική προστατευτική δράση της λοίμωξης από ΕΠ, έναντι της ΠΣ [84-85]. Οι εθνολογικές διαφορές και διαφορές στη μεθοδολογία, ενδεχομένως να ευθύνονται για τα αντικρουόμενα αποτελέσματα [98]. Μια σημαντική διάκριση από πλευράς μεθοδολογίας είναι η χρησιμοποιούμενη μέθοδος προκειμένου να αποδειχθεί ενεργός λοίμωξη από το ΕΠ. Η βιοψία γαστρικού βλεννογόνου αποτελεί το διαγνωστικό gold standard για την αναγνώριση ενεργού φλεγμονής από το ΕΠ, ενώ οι συχνά χρησιμοποιούμενες ορολογικές μέθοδοι, οι οποίες βασίζονται στην ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του ΕΠ στον ορό των ασθενών, δε δύνανται να διακρίνουν μεταξύ παλαιάς, και ενεργού λοίμωξης με φλεγμονώδη βλάβη στο γαστρικό βλεννογόνο [99-100]. Παθογενετικά, η χρόνια ενεργός φλεγμονώδης αντίδραση που κινητοποιείται από το ΕΠ στο γαστρικό

βλεννογόνο, ενδέχεται να συνδέεται με την εμφάνιση της ΠΣ, με μια σειρά από μηχανισμούς.

Παρόλο που το ΕΠ είναι παθογόνο για τον οργανισμό, διαθέτει μια ποικιλία μηχανισμών προκειμένου να αποφύγει την ανοσιακή απάντηση του ξενιστή, με αποτέλεσμα χρόνια εμμένουσα λοίμωξη από το ΕΠ στο γαστρικό βλεννογόνο. Εντούτοις, η ανοσιακή απάντηση του ξενιστή κινητοποιείται μερικώς και κατόπιν τροποποίησης από το ΕΠ, όμως η επαγόμενη φλεγμονή δεν δύναται να αποβάλλει τον μικροοργανισμό. Τοπικά στο γαστρικό βλεννογόνο παρατηρείται έκλυση κυτταροκινών από τα επιθηλιακά κύτταρα, διήθηση του γαστρικού βλεννογόνου από ουδετερόφιλα, μακροφάγα και λεμφοκύτταρα και επαγωγή της παραγωγής ειδικών – έναντι του ΕΠ αντισωμάτων [68-69]. Το ΕΠ διαθέτει λιποπολυσακχαριδική άλυσο (Lipopolysaccharide, LPS) τοιχώματος χαμηλής βιολογικής δραστηριότητας, η οποία κινητοποιεί τη φυσική ανοσία με σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα TLR2 [71], και σε μικρότερο βαθμό μέσω του TLR5 [101] ενώ άλλα βακτήρια κατά κανόνα επάγουν ισχυρότερες ανοσιακές απαντήσεις μέσω συστήματος υποδοχέα TLR4, το οποίο τυπικά επάγει η LPS. Με τον τρόπο αυτό το ΕΠ διαφεύγει της ανοσιακής απάντησης του ξενιστή και προκαλεί επίμονη λοίμωξη και χρόνια φλεγμονή στο γαστρικό βλεννογόνο. Επιπλέον το ΕΠ διαθέτει μια πρωτεΐνη, την πρωτεΐνη ενεργοποιούσα τα ουδετερόφιλα (neutrophil activating protein, NAP), δια της οποίας επάγεται η διήθηση του γαστρικού βλεννογόνου από ουδετερόφιλα και μονοπύρρηνα κύτταρα [71, 102-104]. NAP θετικά ΕΠ στελέχη συνδέονται με την παθογένεση σιδηροπενικής αναιμίας, επειδή παρουσιάζουν αυξημένη ικανότητα πρόσληψης σιδήρου λόγω αυξημένων μεταβολικών αναγκών [105-106]. Ένας άλλος μηχανισμός που επιστρατεύεται από το ΕΠ προκειμένου να διαφύγει της ανοσιακής απάντησης του ξενιστή είναι αυτός της μοριακής μίμησης. Σύμφωνα με την αρχή της μοριακής μίμησης, βακτήρια ή ιοί διαθέτουν αντιγόνα τα οποία ομοιάζουν δομικά με συστατικά του ξενιστή, με αποτέλεσμα να διαφεύγουν της «ανοσοεπαγρύπνισης» του συστήματος της φυσικής ανοσίας. Μοριακή μίμηση μεταξύ του LPS O - ειδικού αντιγόνου του ΕΠ και των αντιγόνων Lewis<sup>x</sup> ή Lewis<sup>y</sup> στα ερυθρά αιμοσφαίρια του οργανισμού, και τα οποία εκφράζονται και από τα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα, έχει ευρέως περιγραφεί [107]. Επίσης, έχει χαρακτηριστεί λεπτομερώς και μοριακή μίμηση μεταξύ αντιγόνου του ΕΠ και της αντλίας K<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup> των επιθηλιακών κυττάρων του γαστρικού βλεννογόνου που παράγουν το γαστρικό υγρό [108]. Όπως πολύ συχνά συμβαίνει σε βιολογικά παραδείγματα μοριακής μίμησης, λόγω της παρόμοιας

μοριακής σύνθεσης παράγονται αντισώματα από τον οργανισμό τα οποία, μέσω διασταυρούμενης αντίδρασης, αναγνωρίζουν και τα δυο αντιγόνα, μικροβιακής και ίδιας προέλευσης, με αποτέλεσμα την πρόκληση αυτοάνοσης βλάβης. Παράδειγμα τέτοιας βλάβης από το ΕΠ είναι η ατροφική γαστρίτιδα, η οποία συχνά συνοδεύει τη χρόνια ενεργό λοίμωξη από το ΕΠ, διαμεσολαβείται από αντισώματα έναντι του γαστρικού επιθηλίου και συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης γαστρικού καρκίνου. Μοριακή μίμηση μεταξύ μικροβιακού αντιγόνου και αντιγόνου του νευρικού συστήματος έχει περιγραφεί χαρακτηριστικά στην παθογένεση του συνδρόμου Guillain-Barre (Guillain-Barre syndrome, GBS). Πρόκειται για οξεία απομυελινωτική πολυνευροπάθεια αυτοάνοσης αρχής, η οποία διαμεσολαβείται από αυτοαντισώματα έναντι της μυελίνης των περιφερικών νεύρων. Σε μεγάλο ποσοστό ασθενών, η λοίμωξη από *campylobacter jejuni* προηγείται χρονικά της κλινικής εμφάνισης του συνδρόμου, ενώ μοριακή μίμηση μεταξύ αντιγόνων του μικροβίου και συστατικών της μυελίνης έχει περιγραφεί [109]. Το παράδειγμα αυτό αποτελεί το πληρέστερα κατανοητό παράδειγμα παθογένεσης νοσηματος του νευρικού συστήματος μέσω μοριακής μίμησης από μικροβιακό παθογόνο. Πρόσφατα αναφέρθηκε μοριακή μίμηση μεταξύ αντιγόνων μικροβιακής προέλευσης, μεταξύ των οποίων και του ΕΠ, και του υποδοχέα T-λεμφοκυττάρων (T-cell receptor, TCR), προερχόμενου από ασθενή με ΠΣ, ενώ η αναπαραγωγή της νόσου πειραματικά στάθηκε δυνατή με τη χρήση πειραματοζώων γενετικά τροποποιημένων (humanized) για το συγκεκριμένο, ανθρώπινης προέλευσης, TCR [110]. Παρέχεται με τον τρόπο αυτό, για πρώτη φορά, πειραματική ένδειξη ότι αντιγόνο μικροβιακής προέλευσης, συμπεριλαμβανομένου του ΕΠ, δύναται, υπό συνθήκες, να προκαλέσει ΠΣ, μέσω αναγνώρισης από ανθρώπινο TCR.

Η υπόθεση της μοριακής μίμησης αναφορικά με τον παθογενετικό μηχανισμό, με τον οποίο η λοίμωξη από ΕΠ δύναται να προκαλέσει ΠΣ, είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα. Εντούτοις, όπως κάθε παράδειγμα μοριακής μίμησης, είναι εξαιρετικά δύσκολο, από πλευράς μεθοδολογίας, να αποδειχθεί. Ο μηχανισμός της μοριακής μίμησης και η κινητοποίηση του συστήματος των TLR είναι παθογενετικοί μηχανισμοί ειδικοί – έναντι αντιγόνου, παρόλο που ο δεύτερος επάγει την απάντηση της φυσικής ανοσίας. Επίσης είναι γνωστό ότι η λοίμωξη από ΕΠ κινητοποιεί σε μεγάλη συχνότητα ειδικά έναντι του ΕΠ CD4+ και, σε μικρότερο βαθμό, CD8+ T-λεμφοκύτταρα στο γαστρικό βλεννογόνο, ενώ μικρότερος αριθμός μη ειδικών T-λεμφοκυττάρων, αναφέρεται στο δωδεκαδάκτυλο [111]. Στο σημείο αυτό κρίνεται

σκόπιμο να αναφερθεί η φλεγμονή ως μη-ειδικός έναντι αντιγόνου μηχανισμός, δια του οποίου το ΕΠ επάγει τοπική, στο γαστρικό βλεννογόνο, και συστηματική ανοσιακή απάντηση. Στο γαστρικό βλεννογόνο φορέων ΕΠ ανευρίσκονται υψηλά επίπεδα φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως IFN $\gamma$ , IL-12, IL-18, IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , και IL-6 [112-113].

Παρά την ύπαρξη μελετών στη βιβλιογραφία αναφορικά με τον παθογενετικό ρόλο του ΕΠ στην ΠΣ, δεν υπάρχουν ως σήμερα πειραματικά δεδομένα που να μελετούν το φαινόμενο σε επίπεδο μηχανισμών. Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο μελέτης της ανοσοτροποποιητικής επίδρασης αντιγόνου του ΕΠ στο ευρύτερα χρησιμοποιούμενο πειραματικό μοντέλο ΠΣ, την ΠΑΕ. Στο πλαίσιο της μελέτης αυτής διαπιστώθηκε σχετική προστατευτική επίδραση της χορήγησης αντιγόνου του ΕΠ στην ΠΑΕ [88-89]. Στην επίδραση αυτή ενδεχομένως συνεισφέρει τροποποίηση της αντιγονοπαρουσίασης από το ΕΠ, εφόσον διαπιστώθηκε μείωση της έκφρασης μορίων του ΜΣΙ-II από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα πειραματοζώων που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, συγκριτικά με αυτά που έλαβαν αντιγόνο *e.coli* ή PBS. Επίσης, στη βάση μελέτης των επιχώριων λεμφαδένων στο σημείο χορήγησης του αντιγόνου με μοριακές τεχνικές, διαπιστώθηκε σημαντική αντιγονικότητα του στελέχους *e.coli* με βάση το παραγόμενο προφίλ χημειοκινών, συγκριτικά με αυτό του ΕΠ ή του PBS [88-89]. Τα αποτελέσματα αυτά, εντούτοις, δεν δύναται να τεθούν άμεσα υπό ερμηνεία στο πεδίο της ΠΣ, εφόσον το πειραματικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε είναι αυτό της ανοσοποίησης έναντι του μικροβιακού αντιγόνου πριν από την πρόκληση της ΠΑΕ (pre-conditioning), και όχι αυτό της πρόκλησης ΠΑΕ κατόπιν λοίμωξης από ζωντανό ΕΠ. Η προσέγγιση της ανοσοτροποποίησης μέσω παρεμβολής στην αντιγονοπαρουσίαση έχει προταθεί ως μηχανισμός νευροπροστασίας στην ΠΣ. Στη βάση αυτή έχει δοκιμαστεί πειραματικά η χρήση τροποποιημένων πεπτιδικών συνδετών (Altered Peptide Ligands, APLs), οι οποίοι ομοιάζουν δομικά προς το αυτοαντιγόνο της μυελίνης και οι οποίοι δύνανται να αναγνωριστούν από τον TCR με χαμηλότερη χημική συγγένεια, με αποτέλεσμα την πρόκληση συνθηκών που επάγουν ανοσολογική ανοχή και προστασία έναντι της αυτοανοσίας [114]. Ανάλογη προσέγγιση, η οποία ομοιάζει προς ανοσοποίηση («εμβολιασμό») έναντι αντιγόνων της μυελίνης χρησιμοποίησε πρόσφατα ερευνητική ομάδα σε κλινική δοκιμή σε ασθενείς με ΠΣ, με ενθαρρυντικά αποτελέσματα [115]. Παρόλο που μοριακή μίμηση μεταξύ των αντιγόνων του ΕΠ και της μυελίνης, του συχνότερου αυτοαντιγόνου στην ΠΣ, δεν έχει αποδειχθεί, ο παραπάνω μηχανισμός

ενδέχεται να ερμηνεύει τη σχετική προστατευτική δράση του αντιγόνου του ΕΠ στην ΠΑΕ, μέσω ανοσοποίησης έναντι του αντιγόνου του ΕΠ, το οποίο επάγει μη βέλτιστη αντιγονοπαρουσίαση, και ως αποτέλεσμα συνθήκες ανοσολογικής ανοχής.

Εντούτοις, η υπόθεση της σχετικής προστατευτικής δράσης του αντιγόνου του ΕΠ μέσω παρεμβολής του στη διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης, ενδεχομένως δεν αποτελεί πλήρη ερμηνεία του φαινομένου. Ένα ποσοστό των πειραματοζώων παρουσίασε κλινικά ΠΑΕ, χαμηλότερης έντασης συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου [88-89]. Επομένως κρίνεται σκόπιμο να υποτεθεί η δημιουργία ειδικών έναντι του αυτοαντιγόνου – της MOG – T-λεμφοκυττάρων, τα οποία διέφυγαν της ανοσολογικής ανοχής και εισήλθαν στο ΚΝΣ. Ο κύριος κυτταρικός πληθυσμός στο ΚΝΣ που διαμεσολαβεί μηχανισμούς νευροπροστασίας είναι η μικρογλοία. Είναι γνωστή η ικανότητα της μικρογλοίας να αντιλαμβάνεται την παρουσία αντιγόνων μικροβιακής προέλευσης στην περιφέρεια και να αντιδρά με ενεργοποίηση. Το φαινόμενο έχει περιγραφεί πειραματικά κατόπιν χορήγησης μικροβιακής LPS συστηματικά (pre-conditioning), οπότε παρατηρείται έκδηλη ενεργοποίηση μικρογλοιακών κυττάρων στο ΚΝΣ, στη βάση αλλαγών στη μορφολογία των κυττάρων [92-94]. Προκύπτουν επομένως ενδείξεις ότι παρά το γεγονός ότι το ΚΝΣ βρίσκεται υπό μειωμένη «ανοσοαπεργύπνιση», λόγω της ύπαρξης του ΑΕΦ που δεν επιτρέπει σε κύτταρα της φυσικής ανοσίας να διέλθουν εντός του ΚΝΣ για να αναγνωρίσουν «ξένα» αντιγόνα, το ΚΝΣ βρίσκεται σε άμεση και λειτουργική επικοινωνία με την περιφέρεια, πιθανότατα μέσω της κυκλοφορίας κυτταροκινών και χημειοκινών που αποτελούν δείκτες φλεγμονής. Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης διαπιστώθηκαν διαφορές στο βαθμό ενεργοποίησης της μικρογλοίας σε ποικίλες περιοχές του ΚΝΣ, κατόπιν συστηματικής χορήγησης αντιγόνου του ΕΠ, συγκριτικά με αντιγόνο *e.coli* ή PBS. Συγκεκριμένα, παρουσία αντιγόνου ΕΠ, διαπιστώθηκε κατάσταση μικρογλοίας η οποία δεν διέφερε σημαντικά από εκείνη κατά τη χορήγηση PBS. Τα μικρογλοιακά κύτταρα ήταν λιγότερα σε αριθμό, με μικρά κυτταρικά σώματα και λεπτές προσεκβολές. Αντιθέτως, κατόπιν της χορήγησης αντιγόνου *e.coli* διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση του αριθμού των μικρογλοιακών κυττάρων, με συνοδό αύξηση του μεγέθους του κυτταρικού σώματός τους και του πάχους των προσεκβολών, σημεία ενεργοποίησης της μικρογλοίας. Προκύπτει επομένως το συμπέρασμα ότι η επίδραση του αντιγόνου του ΕΠ στη μικρογλοία είναι ειδική, εφόσον δεν παρατηρείται κατόπιν της χορήγησης αντιγόνου *e.coli*.

Αναφορικά με το φαινότυπο ενεργοποίησης της μικρογλοίας στο ΚΝΣ, στα πλαίσια της παρούσας μελέτης παρουσιάζονται προκαταρκτικά αποτελέσματα τα οποία δεν επιτρέπουν την ασφαλή εξαγωγή συμπερασμάτων. Πραγματοποιήθηκε μελέτη σε μικρό αριθμό παρασκευασμάτων αναφορικά με την έκφραση δεικτών που χαρακτηρίζουν το M1 φαινότυπο, όπως iNOS και MΣΙ-II, καθώς και το M2 φαινότυπο, όπως arginase και CD206 [116-117]. Παρατηρήθηκαν ποιοτικές διαφορές στην έκφραση iNOS, η οποία ήταν παρούσα κατά κύριο λόγο σε πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο e.coli, συγκριτικά με πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ ή PBS. Η παρατήρηση αυτή ενδεχομένως είναι ενδεικτική ενεργοποίησης της μικρογλοίας προς την κατεύθυνση M1, επομένως προ-φλεγμονώδους φαινοτύπου. Αντιθέτως, η παρουσία κυττάρων arginase+ σε πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο ΕΠ, παράλληλα με την απουσία ανάλογου σήματος σε πειραματόζωα που έλαβαν αντιγόνο e.coli ή PBS, ενδέχεται να υποδεικνύει ενεργοποίηση της μικρογλοίας έναντι M2, επομένως αντιφλεγμονώδους, φαινοτύπου, γεγονός που συνάδει με τη σχετική προστατευτική επίδραση της χορήγησης αντιγόνου ΕΠ έναντι της ΠΑΕ. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν την ανάγκη περαιτέρω μελέτης του φαινοτύπου ενεργοποίησης της μικρογλοίας του ΚΝΣ σε κάθε πειραματική ομάδα, με τη χρήση διπλής ανοσοϊστοχημικής χρώσης, η οποία επιτρέπει τη μελέτη συνέκφρασης των δεικτών, χαρακτηριστικών είτε M1, είτε M2 φαινοτύπου, με το δείκτη IBA1, ο οποίος εκφράζεται κατ' εξοχήν στα μικρογλοιακά κύτταρα.

Η ενεργοποίηση της μικρογλοίας ενδέχεται να έχει είτε νευροπροστατευτικές, είτε βλαπτικές επιδράσεις στο ΚΝΣ. Στην ΠΑΕ, διαφορετικού τύπου ενεργοποίηση δύναται να διευκολύνει την επαναμυελίνωση ή να την αποτρέπει, με αποτέλεσμα βελτίωση ή επιδείνωση της κλινικής εικόνα αντίστοιχα [55]. Για τα κύτταρα της φυσικής ανοσίας έχουν περιγραφεί δυο φαινότυποι ενεργοποίησης, M1 και M2, προφλεγμονώδους και αντι-φλεγμονώδους αντίστοιχα, οι οποίοι κατά κύριο λόγο απαντούν στα μακροφάγα κύτταρα του αίματος και των ιστών. Εφόσον το ΚΝΣ δεν διαθέτει μακροφάγα κύτταρα παρά μόνον όσα εισέρχονται δια του ΑΕΦ από το περιφερικό αίμα υπό συνθήκες φλεγμονής του ΚΝΣ, είναι αμφίβολο κατά πόσο ο φαινοτυπικός αυτός χαρακτηρισμός δύναται να εφαρμοστεί για τα μικρογλοιακά κύτταρα. Ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν την εφαρμογή αυτή, εντούτοις, κρίνεται σκόπιμο στο σημείο αυτό να τονιστεί ότι, υπό συνθήκες φλεγμονής, οπότε μεγάλος αριθμός κυττάρων της φυσικής ανοσίας εισέρχονται στο ΚΝΣ, ο διαχωρισμός της προέλευσης των κυττάρων αυτών, είτε ως κύτταρα περιφερικού αίματος, είτε ως

ενδογενή μικρογλοία του ΚΝΣ, είναι εξαιρετικά δύσκολη με συνήθεις τεχνικές ανοσοϊστοχημείας. Η συγκριτική μελέτη δεικτών ειδικών έναντι, είτε του M1, είτε του M2 φαινοτύπου ενεργοποίησης, παράλληλα με τη μελέτη δεικτών που κατ' εξοχήν εκφράζονται από τα μικρογλοιακά κύτταρα, ενδέχεται να επιτρέψει την εξαγωγή συμπερασμάτων αναφορικά με την ανοσοτροποποιητική δράση του αντιγόνου του ΕΠ στο ΚΝΣ.





## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho, *Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity*. Nat Immunol, 2001. **2**(8): p. 675-80.
2. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
3. Jin, M.S. and J.O. Lee, *Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes*. Immunity, 2008. **29**(2): p. 182-91.
4. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
5. Steinman, R.M. and J. Banchereau, *Taking dendritic cells into medicine*. Nature, 2007. **449**(7161): p. 419-26.
6. Jung, S., et al., *In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens*. Immunity, 2002. **17**(2): p. 211-20.
7. Probst, H.C. and M. van den Broek, *Priming of CTLs by lymphocytic choriomeningitis virus depends on dendritic cells*. J Immunol, 2005. **174**(7): p. 3920-4.
8. Sapoznikov, A., et al., *Organ-dependent in vivo priming of naive CD4+, but not CD8+, T cells by plasmacytoid dendritic cells*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1923-33.
9. Flynn, S., et al., *CD4 T cell cytokine differentiation: the B cell activation molecule, OX40 ligand, instructs CD4 T cells to express interleukin 4 and upregulates expression of the chemokine receptor, Blr-1*. J Exp Med, 1998. **188**(2): p. 297-304.
10. Ito, T., et al., *Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand*. J Exp Med, 2007. **204**(1): p. 105-15.
11. Sharpe, A.H. and G.J. Freeman, *The B7-CD28 superfamily*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(2): p. 116-26.
12. Engelhardt, B. and L. Sorokin, *The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction*. Semin Immunopathol, 2009. **31**(4): p. 497-511.

13. Bauer, H.C., et al., *"You Shall Not Pass"-tight junctions of the blood brain barrier*. Front Neurosci, 2014. **8**: p. 392.
14. Ransohoff, R.M. and M.A. Brown, *Innate immunity in the central nervous system*. J Clin Invest, 2012. **122**(4): p. 1164-71.
15. Ransohoff, R.M. and A.E. Cardona, *The myeloid cells of the central nervous system parenchyma*. Nature, 2010. **468**(7321): p. 253-62.
16. Ginhoux, F., et al., *Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages*. Science, 2010. **330**(6005): p. 841-5.
17. Ajami, B., et al., *Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life*. Nat Neurosci, 2007. **10**(12): p. 1538-43.
18. del Rio-Hortega P, P.W., *Cerebral cicatrix: The reaction of neuroglia and microglia to brain wounds.*, B.J.H. Hospital., Editor. 1892. p. 278–303.
19. Geissmann, F., et al., *Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(6): p. 453-60.
20. Gordon, S. and P.R. Taylor, *Monocyte and macrophage heterogeneity*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(12): p. 953-64.
21. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 958-69.
22. Benarroch, E.E., *Microglia: Multiple roles in surveillance, circuit shaping, and response to injury*. Neurology, 2013. **81**(12): p. 1079-88.
23. Palin, K., et al., *Systemic inflammation switches the inflammatory cytokine profile in CNS Wallerian degeneration*. Neurobiol Dis, 2008. **30**(1): p. 19-29.
24. Perry, V.H., C. Cunningham, and C. Holmes, *Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(2): p. 161-7.
25. Mirrione, M.M., et al., *Microglial ablation and lipopolysaccharide preconditioning affects pilocarpine-induced seizures in mice*. Neurobiol Dis, 2010. **39**(1): p. 85-97.
26. Weinstein, J.R., I.P. Koerner, and T. Moller, *Microglia in ischemic brain injury*. Future Neurol, 2010. **5**(2): p. 227-246.
27. Shpargel, K.B., et al., *Preconditioning paradigms and pathways in the brain*. Cleve Clin J Med, 2008. **75 Suppl 2**: p. S77-82.

28. Rosenzweig, H.L., et al., *Endotoxin preconditioning prevents cellular inflammatory response during ischemic neuroprotection in mice*. Stroke, 2004. **35**(11): p. 2576-81.
29. Hanisch, U.K. and H. Kettenmann, *Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain*. Nat Neurosci, 2007. **10**(11): p. 1387-94.
30. Barclay, A.N., et al., *CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells*. Trends Immunol, 2002. **23**(6): p. 285-90.
31. Oldenborg, P.A., H.D. Gresham, and F.P. Lindberg, *CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPalpha) regulates Fcgamma and complement receptor-mediated phagocytosis*. J Exp Med, 2001. **193**(7): p. 855-62.
32. Hatori, K., et al., *Fractalkine and fractalkine receptors in human neurons and glial cells*. J Neurosci Res, 2002. **69**(3): p. 418-26.
33. Boillee, S., et al., *Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia*. Science, 2006. **312**(5778): p. 1389-92.
34. Prinz, M., et al., *Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration*. Nat Neurosci, 2011. **14**(10): p. 1227-35.
35. Cardona, A.E., et al., *Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor*. Nat Neurosci, 2006. **9**(7): p. 917-24.
36. Harrison, J.K., et al., *Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(18): p. 10896-901.
37. Lee, S., et al., *CX3CR1 deficiency alters microglial activation and reduces beta-amyloid deposition in two Alzheimer's disease mouse models*. Am J Pathol, 2010. **177**(5): p. 2549-62.
38. Liu, Z., et al., *CX3CR1 in microglia regulates brain amyloid deposition through selective protofibrillar amyloid-beta phagocytosis*. J Neurosci, 2010. **30**(50): p. 17091-101.
39. Compston A, C.C., Lassman H, et al., *McAlpine's multiple sclerosis*. 4th ed ed. 2006, Edinburgh, Scotland: Churchill Livingstone
40. Weiner, H.L., *Multiple sclerosis is an inflammatory T-cell-mediated autoimmune disease*. Arch Neurol, 2004. **61**(10): p. 1613-5.

41. Nylander, A. and D.A. Hafler, *Multiple sclerosis*. J Clin Invest, 2012. **122**(4): p. 1180-8.
42. Miller, D.H. and S.M. Leary, *Primary-progressive multiple sclerosis*. Lancet Neurol, 2007. **6**(10): p. 903-12.
43. Polman, C.H., et al., *Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria*. Ann Neurol, 2011. **69**(2): p. 292-302.
44. Lucchinetti, C., et al., *Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination*. Ann Neurol, 2000. **47**(6): p. 707-17.
45. Kassmann, C.M., et al., *Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes*. Nat Genet, 2007. **39**(8): p. 969-76.
46. Popescu, B.F. and C.F. Lucchinetti, *Meningeal and cortical grey matter pathology in multiple sclerosis*. BMC Neurol, 2012. **12**: p. 11.
47. Fogg, D.K., et al., *A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells*. Science, 2006. **311**(5757): p. 83-7.
48. Mildner, A., et al., *CCR2+Ly-6Chi monocytes are crucial for the effector phase of autoimmunity in the central nervous system*. Brain, 2009. **132**(Pt 9): p. 2487-500.
49. King, I.L., T.L. Dickendesher, and B.M. Segal, *Circulating Ly-6C+ myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease*. Blood, 2009. **113**(14): p. 3190-7.
50. Radtke, C., et al., *Demyelinating diseases and potential repair strategies*. Int J Dev Neurosci, 2007. **25**(3): p. 149-53.
51. Zajicek, J.P., et al., *Interactions between oligodendrocytes and microglia. A major role for complement and tumour necrosis factor in oligodendrocyte adherence and killing*. Brain, 1992. **115** ( Pt 6): p. 1611-31.
52. Merrill, J.E., et al., *Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide*. J Immunol, 1993. **151**(4): p. 2132-41.
53. Block, M.L., L. Zecca, and J.S. Hong, *Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(1): p. 57-69.
54. Butovsky, O., et al., *Induction and blockage of oligodendrogenesis by differently activated microglia in an animal model of multiple sclerosis*. J Clin Invest, 2006. **116**(4): p. 905-15.

55. Butovsky, O., et al., *Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells*. Mol Cell Neurosci, 2006. **31**(1): p. 149-60.
56. Rasmussen, S., et al., *Reversible neural stem cell niche dysfunction in a model of multiple sclerosis*. Ann Neurol, 2011. **69**(5): p. 878-91.
57. Dobson, R. and G. Giovannoni, *Autoimmune disease in people with multiple sclerosis and their relatives: a systematic review and meta-analysis*. J Neurol, 2013. **260**(5): p. 1272-85.
58. Vaughan, K., et al., *A molecular view of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalitis: what can we learn from the epitope data?* J Neuroimmunol, 2014. **267**(1-2): p. 73-85.
59. Mony, J.T., R. Khorooshi, and T. Owens, *MOG extracellular domain (p1-125) triggers elevated frequency of CXCR3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Th1 cells in the CNS of mice and induces greater incidence of severe EAE*. Mult Scler, 2014.
60. Bettelli, E., *Building different mouse models for human MS*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1103**: p. 11-8.
61. Mendel, I., N. Kerlero de Rosbo, and A. Ben-Nun, *A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells*. Eur J Immunol, 1995. **25**(7): p. 1951-9.
62. Olson, J.K. and S.D. Miller, *Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs*. J Immunol, 2004. **173**(6): p. 3916-24.
63. Su, S.B., et al., *Essential role of the MyD88 pathway, but nonessential roles of TLRs 2, 4, and 9, in the adjuvant effect promoting Th1-mediated autoimmunity*. J Immunol, 2005. **175**(10): p. 6303-10.
64. Bruckener, K.E., et al., *Permeabilization in a cerebral endothelial barrier model by pertussis toxin involves the PKC effector pathway and is abolished by elevated levels of cAMP*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 9): p. 1837-46.
65. Marshall, B.J. and J.R. Warren, *Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration*. Lancet, 1984. **1**(8390): p. 1311-5.
66. Ernst, P.B. and B.D. Gold, *The disease spectrum of Helicobacter pylori: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer*. Annu Rev Microbiol, 2000. **54**: p. 615-40.

67. Frenck, R.W., Jr. and J. Clemens, *Helicobacter in the developing world*. Microbes Infect, 2003. **5**(8): p. 705-13.
68. Lindholm, C., et al., *Induction of chemokine and cytokine responses by Helicobacter pylori in human stomach explants*. Scand J Gastroenterol, 2001. **36**(10): p. 1022-9.
69. Rossi, G., et al., *Immunohistochemical study of lymphocyte populations infiltrating the gastric mucosa of beagle dogs experimentally infected with Helicobacter pylori*. Infect Immun, 2000. **68**(8): p. 4769-72.
70. Muotiala, A., et al., *Low biological activity of Helicobacter pylori lipopolysaccharide*. Infect Immun, 1992. **60**(4): p. 1714-6.
71. Lepper, P.M., et al., *Lipopolysaccharides from Helicobacter pylori can act as antagonists for Toll-like receptor 4*. Cell Microbiol, 2005. **7**(4): p. 519-28.
72. Rad, R., et al., *Extracellular and intracellular pattern recognition receptors cooperate in the recognition of Helicobacter pylori*. Gastroenterology, 2009. **136**(7): p. 2247-57.
73. Kawahara, T., et al., *Type I Helicobacter pylori lipopolysaccharide stimulates toll-like receptor 4 and activates mitogen oxidase 1 in gastric pit cells*. Infect Immun, 2001. **69**(7): p. 4382-9.
74. Yokota, S., et al., *Highly-purified Helicobacter pylori LPS preparations induce weak inflammatory reactions and utilize Toll-like receptor 2 complex but not Toll-like receptor 4 complex*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2007. **51**(1): p. 140-8.
75. Otani, K., et al., *Toll-like receptor 9 signaling has anti-inflammatory effects on the early phase of Helicobacter pylori-induced gastritis*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **426**(3): p. 342-9.
76. Lee, A., et al., *A standardized mouse model of Helicobacter pylori infection: introducing the Sydney strain*. Gastroenterology, 1997. **112**(4): p. 1386-97.
77. Tzartos, J.S., et al., *Association of innate immune activation with latent Epstein-Barr virus in active MS lesions*. Neurology, 2012. **78**(1): p. 15-23.
78. Deretzi, G., et al., *Gastrointestinal immune system and brain dialogue implicated in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases*. Curr Mol Med, 2011. **11**(8): p. 696-707.

79. Wu, Y., et al., *Overexpression of YKL-40 predicts plaque instability in carotid atherosclerosis with CagA-positive Helicobacter pylori infection*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e59996.
80. Kountouras, J., et al., *Relationship between Helicobacter pylori infection and Alzheimer disease*. Neurology, 2006. **66**(6): p. 938-40.
81. Kountouras, J., et al., *Association between Helicobacter pylori infection and mild cognitive impairment*. Eur J Neurol, 2007. **14**(9): p. 976-82.
82. Nielsen, H.H., et al., *Treatment for Helicobacter pylori infection and risk of Parkinson's disease in Denmark*. Eur J Neurol, 2012. **19**(6): p. 864-9.
83. Kountouras, J., *Helicobacter pylori: an intruder involved in conspiring glaucomatous neuropathy*. Br J Ophthalmol, 2009. **93**(11): p. 1413-5.
84. Li, W., et al., *Helicobacter pylori infection is a potential protective factor against conventional multiple sclerosis in the Japanese population*. J Neuroimmunol, 2007. **184**(1-2): p. 227-31.
85. Long, Y., et al., *Helicobacter pylori infection in Neuromyelitis Optica and Multiple Sclerosis*. Neuroimmunomodulation, 2013. **20**(2): p. 107-12.
86. Gavalas, E., et al., *Helicobacter pylori and multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 2007. **188**(1-2): p. 187-9; author reply 190.
87. Deretzi G., G.E., Boziki M. et al., *Impact of Helicobacter Pylori eradication in Clinically Isolate Syndrome*. submitted.
88. Μποζίκη, *Μελέτη των ανοσοτροποποιητικών ιδιοτήτων του Ελικοβακτηριδίου του Πυλωρού σε πειραματικό μοντέλο Πολλαπλής Σκλήρυνσης*. 2014, Διδακτορική Διατριβή, Α.Π.Θ.: Θεσσαλονίκη.
89. Boziki M., K.E., Kofidou E. et al, *Immune modulating properties of Helicobacter Pylori antigen administration in a mouse model of multiple sclerosis*. manuscript in preparation.
90. Macian, F., et al., *T-cell anergy*. Curr Opin Immunol, 2004. **16**(2): p. 209-16.
91. Ponomarev, E.D., et al., *Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity*. J Neurosci Res, 2005. **81**(3): p. 374-89.
92. Chakravarty, S. and M. Herkenham, *Toll-like receptor 4 on nonhematopoietic cells sustains CNS inflammation during endotoxemia, independent of systemic cytokines*. J Neurosci, 2005. **25**(7): p. 1788-96.
93. Beutler, B., *The Toll-like receptors: analysis by forward genetic methods*. Immunogenetics, 2005. **57**(6): p. 385-92.

94. Koedel, U., et al., *MyD88 is required for mounting a robust host immune response to Streptococcus pneumoniae in the CNS*. Brain, 2004. **127**(Pt 6): p. 1437-45.
95. Swanborg, R.H., J.A. Whittum-Hudson, and A.P. Hudson, *Infectious agents and multiple sclerosis--are Chlamydia pneumoniae and human herpes virus 6 involved?* J Neuroimmunol, 2003. **136**(1-2): p. 1-8.
96. Giovannoni, G., et al., *Infectious causes of multiple sclerosis*. Lancet Neurol, 2006. **5**(10): p. 887-94.
97. Kountouras, J., et al., *Normal-tension glaucoma and Alzheimer's disease: Helicobacter pylori as a possible common underlying risk factor*. Med Hypotheses, 2007. **68**(1): p. 228-9.
98. Kountouras, J., et al., *Helicobacter pylori may hold a variable role in multiple sclerosis based on ethnicity*. Med Hypotheses, 2008. **71**(4): p. 614-5.
99. Kountouras, J., et al., *Alzheimer's disease and Helicobacter pylori infection: Defective immune regulation and apoptosis as proposed common links*. Med Hypotheses, 2007. **68**(2): p. 378-88.
100. Kountouras, J., et al., *Association between Helicobacter pylori infection and acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy*. Eur J Neurol, 2005. **12**(2): p. 139-43.
101. Gewirtz, A.T., et al., *Helicobacter pylori flagellin evades toll-like receptor 5-mediated innate immunity*. J Infect Dis, 2004. **189**(10): p. 1914-20.
102. Kountouras, J., C. Zavos, and D. Chatzopoulos, *Pathogenetic links between colorectal neoplasia and Barrett's esophagus*. Gastrointest Endosc, 2006. **64**(2): p. 298.
103. Del Giudice, G., et al., *The design of vaccines against Helicobacter pylori and their development*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 523-63.
104. Kountouras, J., et al., *Helicobacter pylori and colorectal cancer risk--letter*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2014. **23**(2): p. 365.
105. Yokota, S., et al., *Positive relationship between a polymorphism in Helicobacter pylori neutrophil-activating protein a gene and iron-deficiency anemia*. Helicobacter, 2013. **18**(2): p. 112-6.
106. Liao, J.H., et al., *Up-regulation of neutrophil activating protein in Helicobacter pylori under high-salt stress: structural and phylogenetic*



- comparison with bacterial iron-binding ferritins*. Biochimie, 2013. **95**(6): p. 1136-45.
107. Moran, A.P., et al., *Phenotypic variation in molecular mimicry between Helicobacter pylori lipopolysaccharides and human gastric epithelial cell surface glycoforms. Acid-induced phase variation in Lewis(x) and Lewis(y) expression by H. Pylori lipopolysaccharides*. J Biol Chem, 2002. **277**(8): p. 5785-95.
  108. D'Ellos, M.M., et al., *H(+),K(+)-atpase (proton pump) is the target autoantigen of Th1-type cytotoxic T cells in autoimmune gastritis*. Gastroenterology, 2001. **120**(2): p. 377-86.
  109. Shahrizaila, N. and N. Yuki, *Guillain-barre syndrome animal model: the first proof of molecular mimicry in human autoimmune disorder*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 829129.
  110. Harkiolaki, M., et al., *T cell-mediated autoimmune disease due to low-affinity crossreactivity to common microbial peptides*. Immunity, 2009. **30**(3): p. 348-57.
  111. Lundgren, A., et al., *Helicobacter pylori-specific CD4+ T cells home to and accumulate in the human Helicobacter pylori-infected gastric mucosa*. Infect Immun, 2005. **73**(9): p. 5612-9.
  112. Vilaichone, R.K., et al., *Gastric mucosal cytokine levels in relation to host interleukin-1 polymorphisms and Helicobacter pyloricagA genotype*. Scand J Gastroenterol, 2005. **40**(5): p. 530-9.
  113. Sakai, K., et al., *Levels of interleukin-18 are markedly increased in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa among patients with specific IL18 genotypes*. J Infect Dis, 2008. **197**(12): p. 1752-61.
  114. Katsara, M., et al., *Altered peptide ligands of myelin basic protein ( MBP87-99 ) conjugated to reduced mannan modulate immune responses in mice*. Immunology, 2009. **128**(4): p. 521-33.
  115. Jurynczyk, M., et al., *Immune regulation of multiple sclerosis by transdermally applied myelin peptides*. Ann Neurol, 2010. **68**(5): p. 593-601.
  116. Colton, C.A., *Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain*. J Neuroimmune Pharmacol, 2009. **4**(4): p. 399-418.
  117. Martinez, F.O., et al., *Macrophage activation and polarization*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 453-61.

