



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικό και Καποδιστριακό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

«Ανάπτυξη *in vitro* κυτταρικού συστήματος  
προσομοίωσης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού»

« Development of an *in vitro* cell-based platform to mimic  
the blood-brain barrier»

Αικατερίνη-Μαρίνα Τσαμπάρη του Παναγιώτη

Aikaterini-Marina Tsampari

Πτυχιακή εργασία για την απόκτηση τίτλου σπουδών

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:  
Εμμανουηλίδου Ευαγγελία

Αθήνα, Φεβρουάριος 2022

## Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

**Εμμανουηλίδου Ευαγγελία**, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Συνεπιβλέπουσες καθηγήτριες:

**Λιαδάκη Καλλιόπη**, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Ζίφα Αιμιλία**, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας-Νευροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## Περιεχόμενα

<b>Περίληψη</b> .....	<b>4</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>5</b>
<b>1. Εισαγωγή</b> .....	<b>6</b>
1.1 Αιματοεγκεφαλικός φραγμός.....	7
1.2 Δομή και λειτουργία αιματοεγκεφαλικού φραγμού.....	8
1.3 Ενδοθηλιακά κύτταρα.....	10
1.3.1 Στεγανές συνδέσεις μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων.....	11
1.3.1.1 Στενοσύνδεσμοι.....	12
1.3.1.2 Συνδέσεις προσκόλλησης.....	14
1.3.2 Διαμεμβρανικά συστήματα διακυτταρικής μεταφοράς.....	15
1.3.3 Βασική μεμβράνη.....	19
1.3.4 Μόρια προσκόλλησης λευκοκυττάρων (LAMs).....	21
1.4 Περικύτταρα.....	22
1.5 Αστροκύτταρα.....	23
1.6 Παθολογία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού.....	24
1.7 In vitro μοντέλα αιματοεγκεφαλικού φραγμού.....	25
1.8 Καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων σε Transwell.....	26
1.8.1 Μονοκαλλιέργειες.....	27
1.8.2 Συγκαλλιέργειες με αστροκύτταρα και περικύτταρα.....	28
<b>2. Ερευνητική υπόθεση &amp; σκοπός</b> .....	<b>30</b>
<b>3. Υλικά &amp; μέθοδοι</b> .....	<b>32</b>
3.1 Υλικά.....	33
3.1.1 Διαχείριση πειραματόζων.....	33
3.1.2 Διαχείριση κυτταροκαλλιιεργειών.....	33
3.1.3 Συσκευές και υλικά.....	33
3.1.4 Διαλύματα.....	34
3.2 Μέθοδοι.....	37
3.2.1 Απομόνωση ενδοθηλιακών κυττάρων με BSA.....	37
3.2.2 Απομόνωση ενδοθηλιακών κυττάρων με δεξτράνη.....	38
3.2.3 Επίστρωση κυττάρων σε καλυπτρίδες (coverslips).....	39
3.2.4 Μέτρηση κυττάρων και έλεγχος ζωτικότητας με χρώση trypan blue.....	40
3.2.5 Μονιμοποίηση κυττάρων (fixation).....	40
3.2.6 Ανοσοκυτταροχημεία-Χρώση κυττάρων (Staining).....	41
3.2.7 Μικροσκοπία φθορισμού.....	42
3.2.8 Απόψυξη και ψύξη κυτταρικής σειράς C6.....	42
3.2.9 Ανακαλλιέργεια κυττάρων (split).....	43
<b>4. Αποτελέσματα</b> .....	<b>44</b>
4.1 Απομόνωση ενδοθηλιακών με δεξτράνη και επίστρωση με κολλαγόνο.....	45
4.2 Δοκιμή με διαφορετικές συγκεντρώσεις ηπαρίνης.....	46
4.3 Απομόνωση ενδοθηλιακών σε φλάσκα επιστρωμένη με κολλαγόνο IV και φιβρονεκτίνη.....	47
4.4 Ανοσοκυτταροχημεία ενδοθηλιακών κυττάρων.....	48
4.5 Ανοσοκυτταροχημεία κυττάρων C6.....	49
<b>5. Συζήτηση</b> .....	<b>51</b>
<b>Βιβλιογραφία</b> .....	<b>55</b>

## Περίληψη

Ο ανθρώπινος εγκέφαλος είναι ένα πολύ ευαίσθητο όργανο, απαραίτητο και καθοριστικό στη ρύθμιση πολλαπλών λειτουργιών του οργανισμού. Για αυτό το λόγο, είναι επιτακτική η ύπαρξη εξειδικευμένων φραγμών, ικανών να τον προστατεύουν και να εμποδίζουν την είσοδο βλαβερών ουσιών. Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός αποτελεί έναν τέτοιο φραγμό που διαχωρίζει το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα από τον υπόλοιπο οργανισμό. Πρόκειται για ένα πολύπλοκο κυτταρικό σύστημα, που έχει προστατευτικό ρόλο, καθώς η μεταφορά μορίων στον εγκέφαλο είναι επιλεκτική μέσα από ειδικά πρωτεϊνικά συστήματα μεταφοράς. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ένας σημαντικός αριθμός δυσλειτουργιών του φραγμού που οδηγούν σε παθολογικές καταστάσεις, οι οποίες χρήζουν φαρμακευτικής αντιμετώπισης. Τα φάρμακα που παρασκευάζονται για διαταραχές του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος είναι απαραίτητο να μπορούν να διαπεράσουν τον φραγμό, ώστε να δράσουν στα σημεία-στόχους τους. Η προστατευτική φύση του φραγμού, όμως, αποτελεί τροχοπέδη σε αυτή τη διαδικασία, αφού η πλειοψηφία των φαρμάκων αδυνατεί να φτάσει στον εγκέφαλο ή εισέρχεται με μια αμελητέα βιοδιαθεσιμότητα. Έτσι, στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η κατασκευή ενός *in vitro* συστήματος προσομοίωσης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, ώστε να γίνει δοκιμή φαρμακευτικών ουσιών, που θα αποτελέσουν μελλοντικά πιθανά φάρμακα για την καταπολέμηση τέτοιων ασθενειών. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού αναπτύχθηκε το πρωτόκολλο απομόνωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων, το οποίο τροποποιήθηκε σε πολλαπλά σημεία με σκοπό την εύρεση των ιδανικών συνθηκών για την επιτυχημένη απομόνωσή τους. Συγκεκριμένα, απομονώθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα από νεαρά ποντίκια και ταυτόχρονα έγινε μια καλλιέργεια κυττάρων C6, η οποία επιβεβαιώθηκε πειραματικά ότι αποτελούσε μια καθαρή καλλιέργεια αστροκυττάρων. Ωστόσο, λόγω του περιορισμένου αριθμού ενδοθηλιακών κυττάρων δεν ήταν δυνατή η ολοκληρωμένη αναπαραγωγή του φραγμού σε πλατφόρμα transwell.

## Abstract

The human brain is a very sensitive organ, necessary and crucial for the regulation of multiple functions of the body. For this reason, the existence of special barriers, capable of protecting the brain and preventing the entry of harmful substances, is imperative. The blood-brain barrier is one such barrier that separates the Central Nervous System from the rest of the body. It is a complex cellular system, which has a protective role, as the transport of molecules to the brain is selective through special protein transport systems. However, a significant number of barrier dysfunctions leading to pathological conditions have been observed and require pharmaceutical treatment. Drugs made for disorders of the Central Nervous System must be able to cross the barrier in order to reach their target sites. The protective nature of the barrier, though, constitutes an obstacle to this process, as the majority of drugs delivered are unable to reach the brain or enter it with negligible bioavailability. Thus, the aim of the present thesis is to develop an *in vitro* platform to mimic the blood-brain barrier, as a means to test pharmaceutical molecules, which will constitute future potential drugs to combat such diseases. To achieve this goal, we developed an isolation protocol of endothelial cells that was modified at multiple points in order to find the ideal conditions for their successful isolation. Specifically, endothelial cells were isolated from young mice and at the same time a C6 cell line, which was experimentally confirmed to be a pure astrocyte culture, was cultured. However, due to the limited number of endothelial cells, a complete replication of the barrier on a transwell system was not possible.

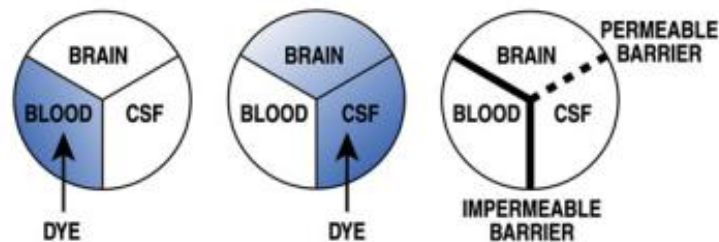
---

## **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

---

## 1.1 Αιματοεγκεφαλικός φραγμός

Η ανακάλυψη της ύπαρξης ενός αγγειακού φραγμού μεταξύ της κυκλοφορίας του αίματος και του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) έγινε τον 19<sup>ο</sup> αιώνα από τα πειράματα του Paul Ehrlich και του Edwin E. Goldman. Αναλυτικά, όταν έγινε από τον Ehrlich ένθεση διάφορων χρωστικών, όπως trypan blue, στην κυκλοφορία του αίματος, οι ίδιες αφομοιώθηκαν από όλα τα όργανα εκτός από τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό. Αρχικά, το πόρισμα του Ehrlich μετά από αυτά τα πειράματα ήταν η έλλειψη συγγένειας των χρωστικών αυτών για το νευρικό σύστημα. Ωστόσο, αργότερα όταν ο Goldman, συνεργάτης του Ehrlich, έκανε ένθεση των χρωστικών στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό πραγματοποιήθηκε χρώση μόνο του νευρικού ιστού. Το γεγονός αυτό τον οδήγησε στο συμπέρασμα ότι υπάρχει ένας αδιαπέραστος φραγμός μεταξύ του εγκεφάλου και της κυκλοφορίας του αίματος και ότι οι χρωστικές που εισέρχονται στο ΚΝΣ δεν μπορούν να διαπεράσουν τον φραγμό αυτό και να καταλήξουν στο αίμα. Ο φραγμός αυτός ονομάστηκε αιματοεγκεφαλικός φραγμός (Engelhardt & Sorokin, 2009).



**Εικόνα 1.** Τα πειράματα που οδήγησαν στην ανακάλυψη της ύπαρξης ενός αδιαπέραστου φραγμού μεταξύ της κυκλοφορίας του αίματος και του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (Zlokovic, 2008).

Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός αποτελεί ένα κυτταρικό σύστημα διεπαφής μεταξύ του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) και της κυκλοφορίας του αίματος. Πρόκειται για ένα πολύπλοκο και δυναμικό νευροαγγειακό σύστημα, το οποίο χαρακτηρίζεται από χαμηλή διαπερατότητα. Συγκεκριμένα, ο φραγμός αυτός περιορίζει την ελεύθερη μετακίνηση μορίων, μέσω συστημάτων που ελέγχουν αυστηρά την είσοδο και έξοδο ουσιών από τον εγκέφαλο, με αποτέλεσμα να ρυθμίζεται η ορθή λειτουργία των νευρώνων και κατ' επέκταση η ομοιοστάση του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (Wang et al., 2015). Συνεπώς, ο όρος ουσιαστικά χρησιμοποιείται για να περιγράψει τις ξεχωριστές ιδιότητες της μικροκυκλοφορίας του ΚΝΣ (Daneman & Prat, 2015). Λόγω των επιτακτικών λειτουργιών του φραγμού μια πιθανή διατάραξή του έχει σαν συνέπεια την πρόκληση διαταραχών και

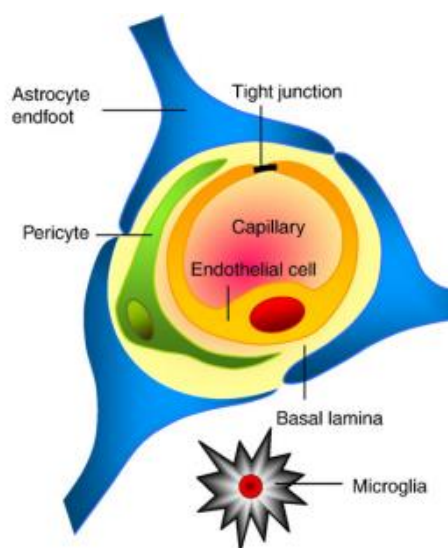
νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως η ασθένεια Πάρκινσον και η σκλήρυνση κατά πλάκας. Ωστόσο, η εξ' ορισμού περιοριστική φύση του ως προς τη διέλευση ουσιών αποτελεί τροχοπέδη για τη θεραπεία των ασθενειών αυτών, καθώς εμποδίζεται η μεταφορά των φαρμάκων στο ΚΝΣ (Langen, Ayloo, & Gu, 2019).

## 1.2 Δομή και λειτουργία αιματοεγκεφαλικού φραγμού

Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός αποτελείται από μικρά τριχοειδή αγγεία. Το συνολικό μήκος των τριχοειδών στον ανθρώπινο εγκέφαλο είναι περίπου 400 μίλια (Cirolla, 2009). Τα τοιχώματα των τριχοειδών αγγείων είναι μη θυριδωτά και απαρτίζονται από διάφορους τύπους κυττάρων. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι εκείνα που συγκροτούν τα τοιχώματα και κατ' επέκταση καθιστούν το βασικό φραγμό (Helms et al., 2016). Πρόκειται για μια συνεχή κατασκευή που επενδύει την εσωτερική επιφάνεια των τριχοειδών (Wilhelm et al., 2011). Αυτά περιβάλλονται και καλύπτονται σε ποσοστό περίπου 30%-70% από περικύτταρα, που έχουν ιδιότητες ανάλογες των λείων μυϊκών ινών. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα περικύτταρα καλύπτονται από τη βασική μεμβράνη, καθώς και από τις ποδικές αποφύσεις των αστροκυττάρων, οι οποίες εφάπτονται με τις εξωτερικές επιφάνειες του αυλού των τριχοειδών. Με αυτόν τον τρόπο, το ενδοθήλιο και η πρωτεϊνική επιφάνεια των μικροαγγείων περιβάλλονται σε ποσοστό μεγαλύτερο από 95% από τα αστροκύτταρα. Τόσο τα αστροκύτταρα όσο και τα περικύτταρα ρυθμίζουν το φαινότυπο των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω μονοπατιών διακυτταρικής επικοινωνίας, όχι πλήρως γνωστών και καλά μελετημένων. Όλη αυτή η ειδική κυτταρική κατασκευή των μικροαγγείων του εγκεφαλικού φραγμού είναι γνωστή με τον όρο νευροαγγειακή μονάδα (Neurovascular Unit-NVU) και αποτελεί στην ουσία τα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών, καθώς και τους κυτταρικούς τύπους που τα περιβάλλουν. Συνεπώς, είναι μια δομή από κύτταρα που επικοινωνούν και αλληλεπιδρούν, με σκοπό να ρυθμίσουν τις ιδιότητες του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Helms et al., 2016). Ωστόσο, κάποιες περιοχές του εγκεφάλου, και συγκεκριμένα τα περικοιλιακά όργανα που συνορεύουν με την τρίτη και την τέταρτη κοιλία, στερούνται τον φραγμό αυτό και χαρακτηρίζονται από θυριδωτά τριχοειδή. Στις περιοχές αυτές τα μικροαγγεία φέρουν πόρους που επιτρέπουν τη διέλευση μορίων διαμέσου του τοιχώματος του αγγείου. Οι μη προστατευμένες αυτές περιοχές του εγκεφάλου είναι κατά κύριο λόγο υπεύθυνες για τη ρύθμιση του αυτόνομου νευρικού συστήματος και των ενδοκρινών αδένων του σώματος, καθώς και την επικοινωνία του εγκεφάλου με τα περιφερειακά όργανα (Ballabh, Braun, & Nedergaard, 2004).



Τα τριχοειδή αγγεία του φραγμού τροφοδοτούν τον εγκέφαλο με θρεπτικά και οξυγόνο, απομακρύνουν διοξείδιο του άνθρακα και απόβλητα του μεταβολισμού, συμμετέχουν στη διατήρηση του ισοζυγίου του νερού και των ηλεκτρολυτών στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και προστατεύουν τους νευρώνες από δυνητικά τοξικές ουσίες παρούσες στην κυκλοφορία του αίματος. Οι παραπάνω λειτουργίες επιτυγχάνονται μέσω της παρουσίας ισχυρών συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων, αλλά και της ειδικής έκφρασης διαφορετικών μεταφορέων στις μεμβράνες τους, όπως οι SLCs (solute carriers) και οι ενεργητικοί μεταφορείς ABCs (Helms et al., 2016). Με αυτόν τον τρόπο, καθίσταται δυνατή η αποτροπή της ελεύθερης διέλευσης διάφορων μορίων από την κυκλοφορία του αίματος στον εγκέφαλο, προστατεύοντας έτσι το ΚΝΣ από τοξίνες, παθογόνα, φλεγμονές και τραυματισμούς (Wilhelm et al., 2011). Οι ξεχωριστές αυτές ιδιότητες του ενδοθηλίου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού είναι υπεύθυνες για την αυστηρή ρύθμιση της ομοιόστασης του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (Daneman & Prat, 2015).



**Εικόνα 2.** Αναπαράσταση της δομής της νευροαγγειακής μονάδας (NVU). Στην εικόνα απεικονίζονται οι κυτταρικοί πληθυσμοί που απαρτίζουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Abbott, Patabendige, Dolman, Yusof, & Begley, 2010).

Συνεπώς, ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός έχει διπλό ρόλο, τη λειτουργία του φραγμού (barrier function) και τη λειτουργία της μεταφοράς ουσιών (carrier function). Μέσω της λειτουργίας του φραγμού εμποδίζεται η είσοδος πιθανών τοξικών ή βλαβερών ουσιών από το αίμα στον εγκέφαλο μέσω διάφορων αμυντικών μέσων. Αρχικά, οι στεγανοί σύνδεσμοι που αναπτύσσονται μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων δημιουργούν έναν φραγμό που περιορίζει την ελεύθερη παρακυτταρική μετακίνηση υδρόφιλων μορίων, δηλαδή τη μετακίνηση μορίων μεταξύ δύο ενδοθηλιακών κυττάρων. Ταυτόχρονα, η διακυτταρική διέλευση μορίων, δηλαδή δια μέσου του ίδιου

του ενδοθηλιακού κυττάρου μέσω κυτταροπλάσματος, είναι περιορισμένη λόγω του χαμηλού βαθμού ενδοκυττάρωσης και πινοκυττάρωσης, χαρακτηριστικό των ενδοθηλιακών κυττάρων του εγκεφάλου. Επίσης, ένας άλλος αμυντικός μηχανισμός που διατηρεί την ισχύ του φραγμού είναι η ύπαρξη ενζύμων, όπως η ακετυλοχολινεστεράση και η αλκαλική φωσφατάση, τα οποία έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν διαφορετικά χημικά μόρια (Wilhelm et al., 2011). Αυτός ο μεταβολικός φραγμός αποτελείται από ένα συνδυασμό ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων ενζύμων. Εξωκυττάρια ένζυμα όπως πεπτιδάσες και νουκλεοτιδάσες μεταβολίζουν πεπτιδία και ATP αντίστοιχα, ενώ ενδοκυττάρια ένζυμα όπως οι μονοαμινο-οξειδάσες και ένζυμα του κυττοχρώματος P450 καθιστούν ανενεργά πολλά τοξικά για τον εγκέφαλο μόρια (Abbott, Ronnback, & Hansson, 2006).

Η δεύτερη λειτουργία του φραγμού, δηλαδή της μεταφοράς ουσιών, αφορά τόσο τη μεταφορά θρεπτικών ουσιών στον εγκέφαλο, όσο και την απομάκρυνση βλαβερών μεταβολιτών. Η μετακίνηση σημαντικών πολικών ουσιών στον εγκέφαλο, όπως η γλυκόζη και τα αμινοξέα, ρυθμίζεται από πρωτεϊνικά συστήματα μεταφοράς και διαμεμβρανικούς ενεργητικούς μεταφορείς. Αντίθετα, τα αέρια του αίματος, το οξυγόνο και το διοξείδιο του άνθρακα, καθώς και μικρά λιποδιαλυτά μόρια διαχέονται παθητικά δια μέσω του φραγμού (Wilhelm et al., 2011).

### 1.3 Ενδοθηλιακά κύτταρα

Ανάλογα με τον ιστό στον οποίο εντοπίζονται τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν ξεχωριστά χαρακτηριστικά, τα οποία δίνουν γένεση σε μια δομική και λειτουργική ετερογένεια στο αγγειακό δίκτυο. Λόγω της μορφολογίας, λειτουργίας και βιοχημείας τους τα ενδοθηλιακά κύτταρα που απαρτίζουν τα τοιχώματα των τριχοειδών του εγκεφάλου διαφέρουν και ξεχωρίζουν από τα ενδοθηλιακά κύτταρα στους υπόλοιπους ιστούς (Engelhardt & Sorokin, 2009). Είναι μονόστιβα πλακώδη επιθηλιακά κύτταρα μεσοδερμικής προέλευσης (Daneman & Prat, 2015). Αποτελούν τον πιο σημαντικό τύπο κυττάρων του φραγμού όσο αφορά τη διαπερατότητα, λόγω συγκεκριμένων βιολογικών τους χαρακτηριστικών. Αρχικά, τα κύτταρα αυτά είναι στενά συνδεδεμένα μέσω στενοσυνδέσμων και συνδέσεων προσκόλλησης χωρίς να δημιουργούν πόρους στην πλασματική τους μεμβράνη, με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η παρακυτταρική επικοινωνία. Επίσης, χαρακτηρίζονται από μικρό βαθμό πινοκυττωτικής δραστηριότητας, γεγονός που περιορίζει τη διακυτταρική μετακίνηση μορίων μέσω κυστιδίων (Daneman & Prat, 2015). Σημαντικό τους γνώρισμα είναι επίσης η έκφραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνικών συστημάτων ενεργητικής μεταφοράς που ρυθμίζουν την είσοδο

και έξοδο ουσιών από το εγκεφαλικό παρέγχυμα (Wilhelm et al., 2011). Συγκεκριμένα, τα συστήματα αυτά επιτρέπουν την διέλευση υδρόφιλων βιολογικά σημαντικών ουσιών, όπως αμινοξέων και μονοκαρβοξυλικών οξέων, ενώ ταυτόχρονα προστατεύουν το εγκεφαλικό παρέγχυμα από δυνητικά τοξικά αμφιπαθή και υδρόφοβα μόρια. Λόγω της άνισης κατανομής των διάφορων μεμβρανικών πρωτεϊνών μεταξύ των εσωτερικών και εξωτερικών επιφανειών του αγγείου τα ενδοθηλιακά κύτταρα εμφανίζουν υψηλή πόλωση (Naik & Cucullo, 2012). Σημαντικό χαρακτηριστικό τους είναι επίσης το ότι περιέχουν μιτοχόνδρια σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με τα ενδοθηλιακά κύτταρα άλλων ιστών, γεγονός που συμβάλλει στη μεγάλη παραγωγή ATP μέσω κυτταρικής αναπνοής. Έτσι, παρέχεται η απαραίτητη ενέργεια για την πραγματοποίηση των λειτουργιών της ενεργητικής μεταφοράς (Daneman & Prat, 2015). Τέλος, τα ενδοθηλιακά κύτταρα του εγκεφάλου χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα έκφρασης μορίων προσκόλλησης λευκοκυττάρων (LAMs-Leukocyte Adhesion Molecules), έτσι ώστε να αποτρέπεται η είσοδος κυττάρων του ανοσοποιητικού στον εγκέφαλο (Langen et al., 2019), καθώς και από υψηλή διαενδοθηλιακή ηλεκτρική αντίσταση (transendothelial electrical resistance TEER), ένδειξη που φανερώνει την μεγάλη του ισχύ ως φραγμό (Wilhelm et al., 2011). Αντίθετα, τα τριχοειδή της συστημικής κυκλοφορίας εμφανίζουν διενδοθηλιακές σχισμές, διάκενα και αρκετά πινοκυττωτικά κυστίδια. Λόγω αυτών των χαρακτηριστικών τους επιτρέπεται η σχετικά μη εκλεκτική διάχυση διαμέσου του τοιχώματος των τριχοειδών (Kandel, Schwartz, & Jessell, 2000).

### 1.3.1 Στεγανές συνδέσεις μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων

Τα επιθηλιακά κύτταρα που καλύπτουν περιφερειακούς ιστούς χαρακτηρίζονται από τρία είδη συνδέσεων. Συγκεκριμένα, έχουν στενοσυνδέσμους (tight junctions) στην κορυφαία πλευρά της μεμβράνης τους, δεσμοσώματα (desmosomes) στην βασηοπλευρική πλευρά και συνδέσεις προσκόλλησης (adherens junctions) μεταξύ των δεσμοσωμάτων και των στενοσυνδέσμων. Τα δεσμοσώματα απουσιάζουν από το ενδοθήλιο του εγκεφάλου, ενώ ταυτόχρονα η κατανομή των συνδέσεων του φραγμού είναι διαφορετική (Langen et al., 2019). Η ύπαρξη στενών συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων του ενδοθηλίου είναι ένα από τα πιο σημαντικά στοιχεία που προσδίδει στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό το φαινότυπο που έχει (Wilhelm et al., 2011). Οι στεγανές αυτές συνδέσεις αποτελούνται από σύμπλοκα διαμεμβρανικών και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, που συνδέονται με την ακτίνη του κυτταροσκελετού (Engelhardt & Sorokin, 2009). Πρόκειται για πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα, που αλληλεπιδρούν τόσο σε δομικό όσο και

λειτουργικό επίπεδο, με σκοπό να σφραγίζονται τα κενά μεταξύ των κυττάρων, εμποδίζοντας έτσι και τις παρακυτταρικές και τις εξωκυτταρικές οδούς (Keane & Campbell, 2015). Έτσι, δημιουργείται ένας φραγμός υψηλής αντίστασης για μόρια, ιόντα και ξеноβιοτικές ουσίες της κυκλοφορίας του αίματος. Συνεπώς, η μετακίνηση πολικών μορίων κατά μήκος του ενδοθηλίου του εγκεφαλικού φραγμού αποτρέπεται μέσω των στενοσυνδέσμων και των συνδέσεων προσκόλλησης, με αποτέλεσμα η διέλευση μορίων να είναι δυνατή μόνο δια μέσου των κυττάρων (Wilhelm et al., 2011). Επίσης, οι στενοσύνδεσμοι χωρίζουν την κορυφαία από την βασεοπλευρική μεμβράνη οδηγώντας σε ασύμμετρη κατανομή πρωτεϊνών και λιπιδίων στις δύο πλευρές της μεμβράνης των ενδοθηλιακών κυττάρων, με αποτέλεσμα να δημιουργείται μια πολικότητα μεταξύ του αυλού των τριχοειδών και του εξωκυττάρου χώρου (Daneman & Prat, 2015).

### 1.3.1.1 Στενοσύνδεσμοι

Οι στενοσύνδεσμοι έχουν μια επιλεκτική διαπερατότητα σε μη φορτισμένα μόρια μεγέθους μέχρι 4 nm, καθώς σχηματίζουν πόρους διαμέτρου 4 nm, ενώ για μόρια μεγαλύτερου μεγέθους η διαπερατότητα είναι περιορισμένη και δυνατή μόνο μέσω πιθανών ασυνεχειών των στενοσυνδέσμων. Η ισχύς των στενοσυνδέσμων, η ηλεκτρική αντίσταση κατά μήκος του ενδοθηλίου και κατ' επέκταση η αποτελεσματικότητά του φραγμού μπορούν να διαφοροποιηθούν μέσω αλλαγών στην ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου (Abbott et al., 2010). Τα διαμεμβρανικά μόρια που εγκαθιδρύουν τους στενοσυνδέσμους είναι οι κλαουδίνες (claudins), οι οκκλουδίνες (occludins) και τα συνδετικά μόρια προσκόλλησης (JAMs-Junctional Adhesion Molecules) (Daneman & Prat, 2015). Οι κλαουδίνες και οι οκκλουδίνες είναι προσδεμένες με κυτταροπλασματικές, ρυθμιστικές πρωτεΐνες σκαλωσιάς που περιέχουν PDZ περιοχές αλληλεπίδρασης, όπως οι ZO-1, ZO-2 και ZO-3 (zonulae occludentes), αλλά και πρωτεΐνες χωρίς PDZ μοτίβα, όπως η σινγκουλίνη (cingulin) και η JACOP (Junction-Associated Coiled-Coil Protein) (Wilhelm et al., 2011). Οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες είναι εκείνες που συμβάλλουν στην πρόσδεση του συμπλόκου των στενοσυνδέσμων στην ακτίνη, τη βασική πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού που είναι υπεύθυνη για τη δομική και λειτουργική ακεραιότητα του ενδοθηλίου. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες ZO μέσω της σινγκουλίνης ή άλλων πρωτεϊνών βοηθούν τα μόρια των συνδέσεων προσκόλλησης να προσδεθούν στην ενδοκυττάρια ακτίνη (Abbott et al., 2010).

Η κλαουδίνη είναι μια φωσφοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 22 kDa και έχει τέσσερις διαμεμβρανικές επικράτειες. Οι κλαουδίνες ενός ενδοθηλιακού κυττάρου συνδέονται ομοτυπικά μέσω των εξωκυττάρων επικρατειών

(extracellular loops) με κλαουδίνες στα γειτονικά ενδοθηλιακά κύτταρα, με τα οποία αναπτύσσουν τους στενοσυνδέσμους, ενώ με το καρβοξυτελικό τους άκρο προσδένονται στις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Οι κλαουδίνες 1,3, 5 και 11 είναι οι βασικότερες στο ενδοθήλιο του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Ballabh et al., 2004). Επίσης, η έκφραση της κλαουδίνης 3,5 και 12 φαίνεται να συμβάλλει στην υψηλή διαενδοθηλιακή ηλεκτρική αντίσταση (Abbott et al., 2006).

Οι οκκλουδίνες είναι φωσφοπρωτεΐνες με μοριακό βάρος 65 kDa, που ρυθμίζουν ενεργά την παρακυτταρική διαπερατότητα. Διαθέτουν επίσης τέσσερις διαμεμβρανικές επικράτειες, όπως και οι κλαουδίνες. Ωστόσο, φαίνεται πως οι οκκλουδίνες δε φέρουν καμία ομοιότητα στην αμινοξική τους αλληλουχία με τις κλαουδίνες. Το μακρύ καρβοξυτελικό τους άκρο, καθώς και το αμινοτελικό βρίσκονται στην κυτταροπλασματική πλευρά. Ο τρόπος με τον οποίο δημιουργούν τις συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων είναι όμοιος με την περίπτωση της κλαουδίνης. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούν τις εξωκυτταρικές τους επικράτειες για να δημιουργήσουν τις συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων και προσδένονται στις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες ZO μέσω του καρβοξυτελικού τους άκρου. Η έκφραση της οκκλουδίνης είναι σημαντικά αυξημένη στα ενδοθηλιακά κύτταρα του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, σε σχέση με τα ενδοθηλιακά σε μη νευρικούς ιστούς. Τόσο οι κλαουδίνες, όσο και οι οκκλουδίνες είναι απαραίτητες για το σχηματισμό του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, καθώς σχηματίζουν το εξωκυττάριο τμήμα των συνδέσεων (Ballabh et al., 2004).

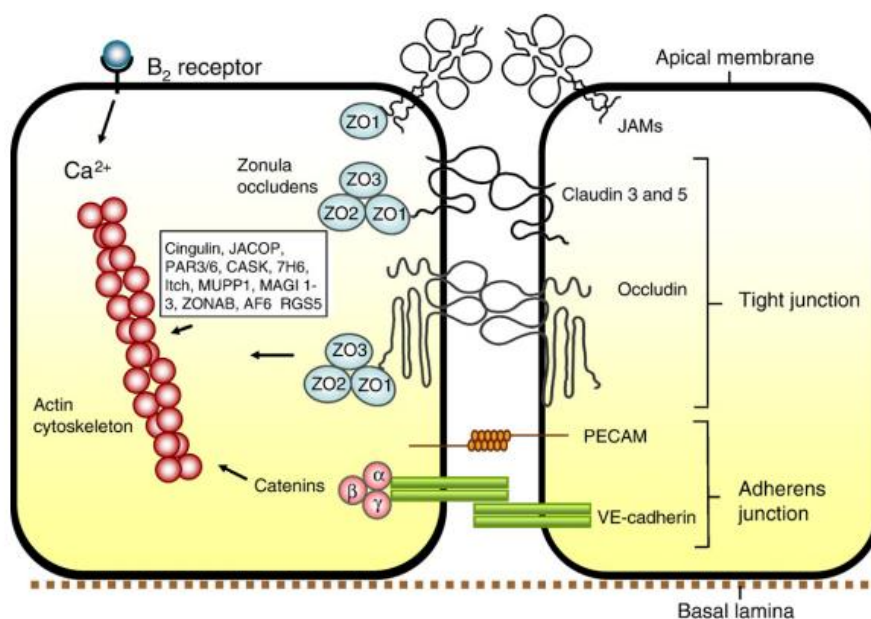
Τα JAMs είναι μέλη της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών και έχουν μοριακό βάρος περίπου 40 kDa. Έχουν μια διαμεμβρανική επικράτεια και το εξωκυττάριο τμήμα τους απαρτίζεται από δυο βρόχους «τύπου» ανοσοσφαιρίνης, που συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς. Η λειτουργία τους αφορά τόσο την ενίσχυση της προσκόλλησης των κυττάρων μεταξύ τους, όσο και τη διευκόλυνση της μετανάστευσης λευκοκυττάρων δια μέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Ballabh et al., 2004). Συγκεκριμένα, η εξωκυτταρική τους επικράτεια αλληλεπιδρά με τα λευκοκύτταρα συμβάλλοντας έτσι στη διαδικασία της μετανάστευσης (Abbott et al., 2010).

Οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες σκαλωσίας ή προσαρμογής ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών MAGUK (Membrane-Associated Guanylate Kinase-like protein) και έχουν ομοιότητες στην αλληλουχία μεταξύ τους. Διαθέτουν τρεις περιοχές αλληλεπίδρασης PDZ, μια περιοχή SH3 και μια περιοχή γουανυλικής κινάσης (GUK-guanyl kinaselike). Το καρβοξυτελικό άκρο της κλαουδίνης αλληλεπιδρά με την PDZ, ενώ η οκκλουδίνη με την επικράτεια GUK. Ταυτόχρονα, η ακτίνη προσδένεται στο καρβοξυτελικό άκρο των πρωτεϊνών

ZO συνδέοντας έτσι τα διαμεμβρανικά στοιχεία και παρέχοντας δομική στήριξη στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Ballabh et al., 2004).

### 1.3.1.2 Συνδέσεις προσκόλλησης

Οι συνδέσεις προσκόλλησης προσδίδουν στον ιστό μια δομική στήριξη, καθώς συγκρατούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα ενωμένα σε συνεργασία με τους στενοσυνδέσμους. Αποτελούν έναν σημαντικό τύπο συνδέσεων και πιθανή διάσπασή τους μπορεί προκαλέσει διατάραξη του φραγμού (Abbott et al., 2010). Το βασικότερο στοιχείο των συνδέσεων αυτών είναι η VE-καδερίνη (VE-cadherin, vascular endothelial cadherin), μια πρωτεΐνη που ρυθμίζεται από το ασβέστιο. Η ίδια ενεργοποιεί τις συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων μέσω ομοτυπικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των εξωκυττάρων επικρατειών της στην επιφάνεια των κυττάρων (Ballabh et al., 2004). Ταυτόχρονα, το κυτταροπλασματικό της τμήμα συνδέεται στην ακτίνη του κυτταροσκελετού μέσω ενδιάμεσων κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, όπως η β-κατενίνη και η γ-κατενίνη ή η plakoglobin. Εκείνες με τη σειρά τους μέσω άλλων πρωτεϊνών (πχ α-ακτίνη και vinculin) συνδέονται με την ακτίνη του κυτταροσκελετού σταθεροποιώντας το σύμπλοκο των συνδέσεων προσκόλλησης (Engelhardt & Sorokin, 2009).



**Εικόνα 3.** Σχηματική απεικόνιση των στεγανών συνδέσεων που αναπτύσσονται μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι στενοσύνδεσμοι και οι συνδέσεις προσκόλλησης εγκαθιδρύονται μέσω ομοτυπικών αλληλεπιδράσεων κλαουδινών, οκκλουδινών και καδερινών μεταξύ δύο κυττάρων. Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με την ενεργοποιημένη ακτίνη μέσω κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών. Η ενεργοποίηση της ακτίνης κινητοποιείται από την αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, που μπορεί να επιτευχθεί για παράδειγμα μέσω σύνδεσης προσδετών σε υποδοχείς (πχ τον υποδοχέα B<sub>2</sub> βραδυκινίνης) (Abbott et al., 2010).



### 1.3.2 Διαμεμβρανικά συστήματα διακυτταρικής μεταφοράς

Λόγω της μειωμένης διαπερατότητας που εγκαθιδρύεται από τις στενές συνδέσεις μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων, η μεταφορά μορίων και θρεπτικών απαραίτητων για τις μεταβολικές ανάγκες του εγκεφάλου από την κυκλοφορία του αίματος στο εγκεφαλικό παρέγχυμα επιτυγχάνεται μόνο μέσω διακυτταρικών οδών. Συνεπώς, τα θρεπτικά υλικά υπόκεινται στον επιλεκτικό έλεγχο των μεμβρανών των ενδοθηλιακών κυττάρων αναφορικά με το είδος και την ποσότητά τους. Έτσι, υπάρχουν συστήματα μεταφοράς που καθιστούν δυνατή αυτή τη μεταφορά μορίων. Τα συστήματα αυτά περιλαμβάνουν i) τη διαμεμβρανική διάχυση, ii) τη μεταφορά μέσω κάποιου φορέα κομιστή ή οδηγού (Carrier-Mediated Transport - CMT), iii) τη διακυτταρική μεταφορά μέσω κάποιου υποδοχέα (Receptor-Mediated Transcytosis – RMT), iv) την ενεργητική μεταφορά, v) τη μεταφορά μέσω απορρόφησης σε κυστίδιο (Adsorptive-Mediated Transcytosis – AMT) και vi) τη διαενδοθηλιακή μετανάστευση κυττάρων του ανοσοποιητικού (Zlokovic, 2008).

#### i. Διαμεμβρανική διάχυση

Η διαμεμβρανική μεταφορά είναι δυνατή από λιποδιαλυτά μόρια και από τα αέρια του αίματος (οξυγόνο, διοξείδιο του άνθρακα), που μπορούν να διαπεράσουν παθητικά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Abbott et al., 2010). Ο συντελεστής διόδου μιας ουσίας από το πλάσμα του αίματος στο εγκεφαλικό παρέγχυμα εξαρτάται από τον συντελεστή της λιποδιαλυτότητάς της. Η ανταλλαγή λιποδιαλυτών αερίων δεν επηρεάζεται από τη διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, αλλά περιορίζεται μόνο από το εμβαδόν επιφάνειας των αιμοφόρων αγγείων και από την αιματική ροή προς τον εγκέφαλο (Kandel et al., 2000). Αντίθετα, η είσοδος μορίων με υψηλή πολικότητα στην επιφάνειά τους, μεγαλύτερη από 80 Å, εμποδίζεται. Ακόμα και υδατοδιαλυτές ουσίες με πολύ μικρό μοριακό βάρος, όπως το  $H^+$  και το  $Cl^-$ , δε διακινούνται δια μέσου της μεμβράνης παρά μόνο με ειδικούς μεμβρανικούς μεταφορείς (Vander, Sherman, & Luciano, 2001). Επίσης, μόρια που έχουν την τάση να σχηματίζουν περισσότερους από 6 δεσμούς υδρογόνου δεν μπορούν να διαπεράσουν τον φραγμό, λόγω της αυξημένης ελεύθερης ενέργειας που απαιτείται για τη μετάβαση από μια υδάτινη φάση στη λιπιδιακή της κυτταρικής μεμβράνης. Μη διαπερατά είναι και μόρια μοριακού βάρους μεγαλύτερου των 450 Da, καθώς και μόρια που διαθέτουν περιστρεφόμενους δεσμούς. Το φορτίο του εκάστοτε μορίου φαίνεται πως επηρεάζει επίσης την εισχώρηση του στον εγκέφαλο. Συγκεκριμένα, η είσοδος θετικά φορτισμένων μορίων ευνοείται λόγω αλληλεπίδρασής τους με τον

αρνητικά φορτισμένο γλυκοκάλυκα και τα φωσφολιπίδια της πλασματικής μεμβράνης. (Abbott et al., 2010).

## ii. Ενεργητική μεταφορά

Οι ενεργητικοί μεταφορείς μετακινούν μόρια δια μέσου της μεμβράνης κόντρα στη βαθμίδωση της συγκέντρωσής τους. Για την επίτευξη αυτής της λειτουργίας χρησιμοποιούν ενέργεια από την υδρόλυση του ATP. Το γεγονός αυτό αντικατοπτρίζει τις υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις, οι οποίες καλύπτονται από το μεγάλο ποσοστό μιτοχονδρίων στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Zlokovic, 2008). Μια οικογένεια ενεργητικών μεταφορέων που εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στο ενδοθήλιο του φραγμού είναι οι ABCs (ATP-Binding Cassette). Πρόκειται για μια υπεροικογένεια πρωτεϊνών με 48 μέλη που κατηγοριοποιούνται σε 7 υποοικογένειες βάση δομικής ομολογίας. Αυτοί εντοπίζονται συνήθως στη μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων από την πλευρά του αυλού και συνεισφέρουν στην απομάκρυνση μορίων από τον εγκέφαλο. Σημαντικοί μεταφορείς του φραγμού που ανήκουν στην οικογένεια των ABCs είναι ο P-gp (P-glycoprotein, Multidrug Resistance Protein, ABCB1), οι Multidrug Resistance-associated Proteins (MRPs) και η Breast Cancer Resistance Protein (BRCP, ABCG2). Οι μεταφορείς αυτοί διαθέτουν νευροπροστατευτική δράση, καθώς απομακρύνουν από τον εγκέφαλο νευροτοξικά ενδογενή ή ξеноβιοτικά μόρια. Ωστόσο, η λειτουργία των μεταφορέων σε συνδυασμό με το γεγονός ότι λιπόφιλα μόρια αποτελούν υποστρώματά τους περιορίζει τη δραστηριότητα πολλών φαρμάκων, τα οποία για να μπορέσουν να εισχωρήσουν στον φραγμό και να δράσουν στο ΚΝΣ πρέπει εξ' ορισμού να έχουν αυξημένη λιποφιλικότητα. Ο P-gp αποτελεί ένα τέτοιο παράδειγμα μεταφορέα που ρυθμίζει τη γρήγορη απομάκρυνση χορηγούμενων τοξικών λιπόφιλων μεταβολιτών, όπως αμφιπαθή κατιονικά φάρμακα. Με ενεργητική μεταφορά μπορούν να μετακινηθούν και διάφορα ιόντα δια μέσω του φραγμού, έτσι ώστε να διατηρείται ιδανική η συγκέντρωσή τους για την ορθή λειτουργία της συναπτικής σηματοδότησης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα μεταφορέα ιόντων αποτελεί η αντλία  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase), η οποία διατηρεί υψηλή τη συγκέντρωση του  $\text{Na}^+$  στον εγκέφαλο (Abbott et al., 2010).

## iii. Μεταφορά μέσω κάποιου φορέα κομιστή ή οδηγού

Ο μηχανισμός αυτός διευκολύνει τη μεταφορά θρεπτικών όπως εξόζες (γλυκόζη), μονοκαρβοξυλικά οξέα (πυροσταφυλικό), νουκλεοσίδια (αδενοσύνη), πουρίνες (αδενίνη, γουανίνη), αμίνες (χολίνη) και βιταμίνες. Η μεταφορά ρυθμίζεται από τις μεταβολικές ανάγκες του εγκεφάλου και από



τις συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων στο πλάσμα. Τα μόρια μετακινούνται κατά την κλίση συγκέντρωσής τους, η οποία είναι συνήθως από το αίμα προς τον εγκέφαλο (Zlokovic, 2008). Οι πιο σημαντικοί μεταφορείς τέτοιων μορίων ανήκουν στην οικογένεια των SLCs (solute carriers). Ο slc2a1 ή glut1 (slc2 υποοικογένεια) αποτελεί έναν μεταφορέα της οικογένειας αυτής, που εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα ενδοθηλιακά του ΚΝΣ σε σχέση με ενδοθηλιακά κύτταρα άλλων ιστών. Ο ρόλος του είναι να διευκολύνει την παροχή γλυκόζης στο ΚΝΣ σύμφωνα με την κλίση συγκέντρωσής της, δηλαδή από την κυκλοφορία του αίματος στον εγκέφαλο (Daneman & Prat, 2015). Κάποιοι από αυτούς τους μεταφορείς εμφανίζουν πολικότητα στην έκφρασή τους, καθώς εκφράζονται είτε στην μεμβράνη από την πλευρά του αυλού των τριχοειδών είτε στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Συνεπώς, ανάλογα με την θέση των μεταφορέων στη μεμβράνη έχουμε επιλεκτική μετακίνηση είτε από την κυκλοφορία του αίματος στον εγκέφαλο είτε από τον εγκέφαλο στο αίμα. Αντίθετα, μεταφορείς που εντοπίζονται και στις δύο πλευρές της μεμβράνης καθιστούν δυνατή τη μεταφορά ουσιών δια μέσου του ενδοθηλίου (Abbott et al., 2010).

#### iv. Διακυτταρική μεταφορά μέσω κάποιου υποδοχέα

Η μεταφορά μέσω υποδοχέα περιλαμβάνει μεταφορά πρωτεϊνών και πεπτιδίων τόσο από την κυκλοφορία του αίματος στον εγκέφαλο (ινσουλίνη, τρανσφερίνη), όσο και από τον εγκέφαλο στο αίμα (απολιποπρωτεΐνες) (Sweeney, Sagare, & Zlokovic, 2018). Πρόκειται για ένα μηχανισμό ενδοκυττάρωσης που συμβάλλει στη μεταφορά μεγαλύτερων μορίων και συμπλόκων απαραίτητων για τον εγκέφαλο. Συγκεκριμένα, τα μόρια προσδένονται στους ειδικούς υποδοχείς τους στην εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου, αλληλεπίδραση η οποία πυροδοτεί την ενδοκυττάρωση. Μετά τη σύνδεση προσδέτη-υποδοχέα το σύμπλοκο εισέρχεται στο εσωτερικό του ενδοθηλιακού κυττάρου μέσω κυστιδίων κλαθρίνης. Στη συνέχεια, τα κυστίδια που δημιουργούνται μεταφέρονται μέσω του κυτταροπλάσματος στην αντίθετη πλευρά του κυττάρου, ώστε να πραγματοποιηθεί η εξωκυττάρωση και κατ' επέκταση η μεταφορά των μορίων στον εγκέφαλο (Pulgar, 2018). Στα ενδοθηλιακά κύτταρα του εγκεφάλου τα επίπεδα ενδοκυττάρωσης είναι σημαντικά χαμηλότερα σε σχέση με τα αντίστοιχα σε ενδοθηλιακά κύτταρα σε μη νευρικούς ιστούς (Daneman & Prat, 2015).

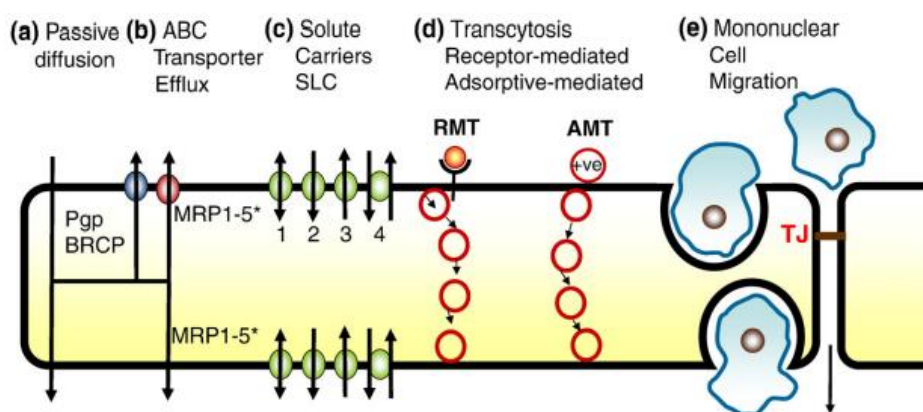
#### v. Μεταφορά μέσω απορρόφησης σε κυστίδια

Μέσω αυτού του μηχανισμού επιτυγχάνεται η μεταφορά πρωτεϊνών του πλάσματος, όπως η αλβουμίνη. Συγκεκριμένα, τα μόρια πρέπει να φέρουν ένα

υψηλό θετικό φορτίο, έτσι ώστε να μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τις θέσεις πρόσδεσης στην επιφάνεια των κυττάρων (Abbott et al., 2010). Η μεταφορά καθίσταται δυνατή μέσω της δημιουργίας μικροσπηλαίων (caveolae), δηλαδή εγκολπώσεων της πλασματικής μεμβράνης διαμέτρου περίπου 50-80nm σε περιοχές που εντοπίζονται λιπιδικές σχεδίες. Αυτές οι εγκολπώσεις είναι πλούσιες σε σφιγγολιπίδια και χοληστερόλη (Zlokovic, 2008). Η βιογένεση αυτών των μικροσπηλαίων βασίζεται σε μεμβρανικές πρωτεΐνες, τις καβεολίνες, οι οποίες προσδένονται σε κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, τις καβίνες και αμφοότερες κινητοποιούν την δημιουργία του κυστιδίου (Ayloo & Gu, 2019).

vi. Διαενδοθηλιακή μετανάστευση κυττάρων του ανοσοποιητικού

Τα λευκοκύτταρα και τα μονοκύτταρα έχουν τη δυνατότητα πολλές φορές να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται διαπίδυση. Με αυτόν τον τρόπο, τα κύτταρα μεταφέρονται από το κυκλοφορικό σύστημα στον εγκέφαλο μέσω διείσδυσης από περιοχές κοντά στους στενοσυνδέσμους ή από πιθανές ασυνέχειες του τοιχώματος του ενδοθηλίου. Ωστόσο, η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται δια μέσου του κυτταροπλάσματος των ενδοθηλιακών κυττάρων χωρίς να έχουμε ανακατάταξη στη δομή των στενοσυνδέσμων. Η μετανάστευση αυτή των κυττάρων μπορεί να επιτευχθεί και με τη βοήθεια των συνδετικών μορίων προσκόλλησης (JAMs), τα οποία αλληλεπιδρούν με τα κύτταρα (Abbott et al., 2010).



**Εικόνα 4.** Απεικόνιση των μηχανισμών μεταφοράς του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. (a) Διαμεμβρανική διάχυση, (b) Ενεργητική μεταφορά (ABCs, MRPs, Pgp, BCRPs), (c) Μεταφορά μέσω κάποιου φορέα κομιστή ή οδηγού (SLCs), (d) Διακυτταρική μεταφορά μέσω υποδοχέα ή απορρόφησης σε κυστίδια, (e) Διαενδοθηλιακή μετανάστευση κυττάρων ανοσοποιητικού (Abbott et al., 2010).

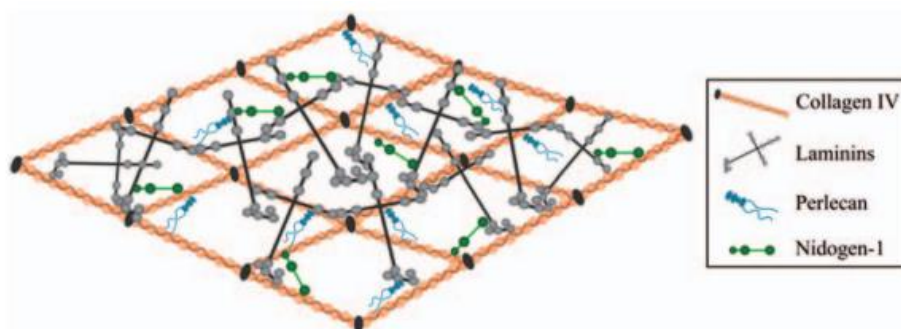
### 1.3.3 Βασική μεμβράνη

Η βασική αγγειακή μεμβράνη αποτελεί ένα τρισδιάστατο δίκτυο εξωκυττάρων μακρομορίων, που συγκρατεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα περικύτταρα σε μια ενιαία κυτταρική κατασκευή, ενώ ταυτόχρονα βρίσκεται σε στενή επαφή με τις πλασματικές μεμβράνες των ποδικών αποφύσεων των αστροκυττάρων που περικλείουν τα τριχοειδή. Στο ΚΝΣ η βασική μεμβράνη διαχωρίζει τα ενδοθηλιακά κύτταρα από τους νευρώνες και τα κύτταρα της γλοίας, ενώ ταυτόχρονα συμβάλλει στην ανάπτυξη των αγγείων, τη δομική στήριξη και το σχηματισμό του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Ταυτόχρονα, παρουσιάζει υψηλή ικανότητα πρόσδεσης μορίων όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Vascular Endothelial Growth Factor-VEGF) και ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (basic Fibroblast Growth Factor-bFGF) (Thomsen, Routhé, & Moos, 2017). Έχει πάχος 30-40 nm και αποτελείται από πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας, όπως φιβρονεκτίνη και κολλαγόνο τύπου IV (Serlin, Shelef, Knyazer, & Friedman, 2015). Οι διάφοροι κυτταρικοί τύποι του φραγμού προσκολλώνται στην κυτταρική μεμβράνη μέσω ιντεγκρινών ή δυστρογλυκάνης (dystroglycan), ενισχύοντας έτσι τις μηχανικές ιδιότητες του φραγμού και διατηρώντας σταθερή τη θέση των κυττάρων. Αναλυτικά, η δυστρογλυκάνη αποτελείται από δυο υπομονάδες, την α, μια υψηλά γλυκοσυλιωμένη εξωκυττάρια υπομονάδα και τη β, η οποία είναι διαμεμβρανική. Η α υπομονάδα προσκολλάται στις πρωτεΐνες της βασικής μεμβράνης, ενώ η β λειτουργεί σαν συνδετικός κρίκος μεταξύ της α υπομονάδας και της ακτίνης του κυτταροσκελετού του εκάστοτε κυττάρου. Οι ιντεγκρίνες είναι ετεροδιμερείς διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες, που αποτελούνται από α και β αλυσίδες, οι οποίες προσδέονται σε διάφορες πρωτεΐνες της βασικής μεμβράνης και ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια. Η πρόσδεση των ενδοθηλιακών κυττάρων, των περικυττάρων και των αστροκυττάρων στη βασική μεμβράνη οφείλεται σε έκφραση διαφορετικών ισομορφών των ιντεγκρινών (Thomsen et al., 2017).

Η βασική μεμβράνη συντίθεται από πρωτεΐνες από τέσσερις μεγάλες οικογένειες γλυκοπρωτεϊνών, τις λαμινίνες, τις ισομορφές του κολλαγόνου IV, τα νιδογόνα ή εντακτίνες (nidogen/entactin) και τις πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαράνης (HSPG-Heparan Sulfate Proteoglycans). Έχει πάχος 20-200 nm και συνίσταται δομικά από δύο μεμβράνες, την ενδοθηλιακή βασική μεμβράνη και την παρεγχυματική βασική μεμβράνη (Thomsen et al., 2017). Η ενδοθηλιακή βασική μεμβράνη είναι εκείνη που διαχωρίζει τα ενδοθηλιακά κύτταρα από τα περικύτταρα, ενώ η παρεγχυματική εσωκλείει τους δύο κυτταρικούς τύπους σε μια ενιαία κυτταρική δομή (Wilhelm et al., 2011). Οι

δύο αυτές μεμβράνες διαχωρίζονται από τα περικύτταρα. Σε φυσιολογικές συνθήκες, σε περιοχές χωρίς περικύτταρα είναι αδιαχώριστες και μοιάζουν σαν μια μεμβράνη (Xu, Nirwane, & Yao, 2019). Η ενδοθηλιακή αποτελείται από φιβρονεκτίνη, κολλαγόνο τύπου IV, λαμινίνες 4 και 5 και περλεκάνη, ενώ η δεύτερη περιλαμβάνει φιβρονεκτίνη, λαμινίνη 1 και 2 και agrin (Zenaro, Piacentino, & Constantin, 2017).

Ο σχηματισμός της αγγειακής μεμβράνης κινητοποιείται αρχικά από τη δημιουργία ενός αρχικού πλέγματος λαμινινών και τη συνακόλουθη πρόσδεση των νιδογόνων και των HSPGs. Αυτός ο αρχικός πολυμερισμός των λαμινινών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το ασβέστιο. Στη συνέχεια, οι δύο τελευταίες οικογένειες πρωτεϊνών προσδένονται στο κολλαγόνο τύπου IV επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τη δημιουργία ενός δεύτερου σταθεροποιητικού δικτύου από πολυμερή. Συνεπώς, η συναρμολόγηση της βασικής μεμβράνης καθίσταται δυνατή μέσω του σχηματισμού των ανεξάρτητων ικριωμάτων της λαμινίνης και του κολλαγόνου IV, τα οποία στη συνέχεια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες της βασικής μεμβράνης (Thomsen et al., 2017).



**Εικόνα 5.** Σχηματική αναπαράσταση της αρχιτεκτονικής της αγγειακής βασικής μεμβράνης (Thomsen et al., 2017).

Η λαμινίνη είναι μια τριμερής πρωτεΐνη που αποτελείται από  $\alpha$ ,  $\beta$  και  $\gamma$  αλυσίδες. Ένας μεγάλος αριθμός ισομορφών προκύπτει από το διαφορετικό συνδυασμό αυτών των υπομονάδων (Xu et al., 2019). Συγκεκριμένα, υπάρχουν πέντε  $\alpha$  αλυσίδες, τέσσερις  $\beta$  αλυσίδες και τρεις  $\gamma$ , ο συνδυασμός των οποίων μπορεί να δώσει 16 διαφορετικές ισομορφές. Η  $\alpha$  υπομονάδα της λαμινίνης είναι εκείνη που αλληλεπιδρά με τις ιντεγκρίνες που εκφράζονται στα κύτταρα του φραγμού (Thomsen et al., 2017). Οι διάφοροι κυτταρικοί τύποι του φραγμού παρουσιάζουν εξειδίκευση ως προς την έκφραση των διάφορων ισομορφών των λαμινινών. Λόγω αυτού του γεγονότος, οι λαμινίνες έχουν μια διαφορετική κατανομή μεταξύ της ενδοθηλιακής και της παρεγχυματικής βασικής μεμβράνης (Xu et al., 2019).

Το κολλαγόνο IV είναι μια τριμερής πρωτεΐνη με τρεις α αλυσίδες και αποτελεί το πιο άφθονο συστατικό της βασικής μεμβράνης. Αναλυτικότερα, υπάρχουν έξι διαφορετικές α αλυσίδες από τον συνδυασμό των οποίων μπορούν να προκύψουν τρεις διαφορετικές ισομορφές του κολλαγόνου IV. Η ισομορφή που εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό στον εγκέφαλο αποτελείται από δύο α1 αλυσίδες και μία α2 (Thomsen et al., 2017).

Τα νιδογόνα είναι θειομένες μονομερείς γλυκοπρωτεΐνες και σταθεροποιούν τη σύνδεση του δικτύου του κολλαγόνου IV με το αντίστοιχο των λαμινινών (Xu et al., 2019). Υπάρχουν δύο ισομορφές που έχουν αναγνωρισθεί, το νιδογόνο-1 και νιδογόνο-2. Το νιδογόνο-1 είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση της σύνδεσης και τη σταθεροποίηση των δικτύων της λαμινίνης και του κολλαγόνου IV, ενώ ταυτόχρονα συμβάλλει στη σύνδεση πρωτεϊνών, όπως η περλεκάνη. Το νιδογόνο-2 συμβάλλει επίσης στην πρόσδεση μορίων της βασικής μεμβράνης και η ύπαρξή του είναι περισσότερο σημαντική κατά την εμβρυογένεση, όπου η έκφραση του παρουσιάζεται αυξημένη (Thomsen et al., 2017).

Υπάρχουν τρεις σημαντικές πρωτεογλυκάνες που είναι παρούσες στην αγγειακή βασική μεμβράνη, η περλεκάνη, η αγκρίνη και το κολλαγόνο XVII, με την περλεκάνη και την αγκρίνη να είναι οι πιο άφθονες. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, καθώς και στην πρόσδεση αυξητικών παραγόντων ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο παρακρινή σηματοδοτικά μονοπάτια (Thomsen et al., 2017).

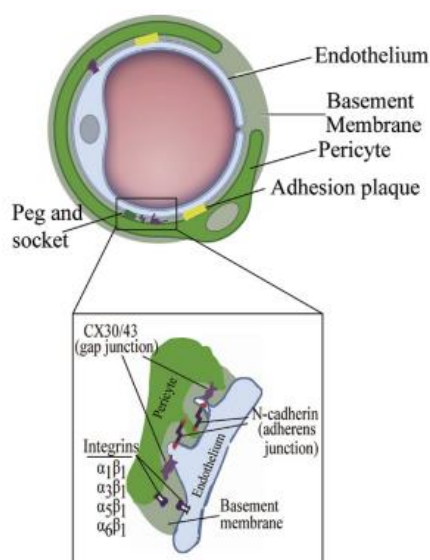
#### 1.3.4 Μόρια προσκόλλησης λευκοκυττάρων (LAMs)

Η κυκλοφορία κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος είναι περιορισμένη στο ΚΝΣ σε σχέση με τους περιφερειακούς ιστούς. Αυτό συμβαίνει, γιατί σε φυσιολογικές συνθήκες τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν χαμηλά επίπεδα LAMs, τα οποία αντίθετα υπερεκφράζονται σε αυτοάνοσα νοσήματα, όπως η πολλαπλή σκλήρυνση. Έτσι, ένας πολύ μικρός αριθμός λευκοκυττάρων και ειδικά T κυττάρων εισέρχονται στον εγκέφαλο. Τα μόρια αυτά μεσολαβούν σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων του αίματος και των ενδοθηλιακών κυττάρων του φραγμού, έτσι ώστε τα πρώτα να διεισδύσουν μέσω διαπίδυσης και να εγκατασταθούν στο εγκεφαλικό παρέγχυμα (Daneman & Prat, 2015). Κατά συνέπεια, ο ρόλος τους αφορά την αρχική προσκόλληση των κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα. Η είσοδος των λευκοκυττάρων πυροδοτεί την απελευθέρωση κυτοκινών και χημειοκινών, μόρια τα οποία στρατολογούν περισσότερα λεμφοκύτταρα, λειτουργώντας με αυτόν τον τρόπο ως ένας μηχανισμός

θετικής ανατροφοδότησης. Τα πιο γνωστά μόρια προσκόλλησης λευκοκυττάρων είναι οι σελεκτίνες (E-σελεκτίνη και P-σελεκτίνη), οι οποίες είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες (Langen et al., 2019).

#### 1.4 Περικύτταρα

Τα περικύτταρα του ΚΝΣ ανάλογα με την τοποθεσία τους στο αναπτυσσόμενο αγγειακό δίκτυο προκύπτουν είτε από μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα μεσοδερμικής προέλευσης, είτε από κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας (ElAli, Theriault, & Rivest, 2014). Τα περικύτταρα παράκεινται των τριχοειδών του φραγμού και καλύπτουν περίπου 30-70% του ενδοθηλίου. Εκτέρωθεν των κυττάρων αυτών εντοπίζεται η βασική μεμβράνη, τόσο η ενδοθηλιακή που διαχωρίζει τα περικύτταρα από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, όσο και η παρεγχυματική που περιβάλλει τα περικύτταρα (Wilhelm et al., 2011). Η απόσταση μεταξύ των περικυττάρων και των ενδοθηλιακών εκτιμάται ότι είναι γύρω στα 20 nm. Οι δύο αυτοί κυτταρικοί τύποι ενώνονται μεταξύ τους μέσω τριών διαφορετικών διακυτταρικών συνδέσεων. Συγκεκριμένα, αναπτύσσονται χασμοσύνδεσμοι, πλάκες προσκόλλησης και συνδέσεις γνωστές ως "peg-and-socket", μέσω των οποίων και επικοινωνούν μεταξύ τους σε μεγάλο βαθμό. Οι τελευταίες συνδέσεις σχηματίζονται με τη βοήθεια N-καδερινών και κοννεξινών 30/43 και επιτρέπουν τη μεταφορά σηματοδοτικών μορίων και θρεπτικών (Liebner et al., 2018).



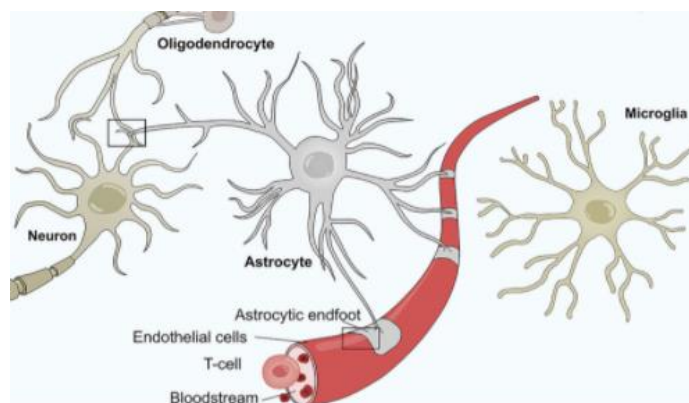
**Εικόνα 6.** Σχηματική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης των περικυττάρων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Στην εικόνα φαίνεται συγκεκριμένα ο σχηματισμός των συνδέσεων "peg-and-socket", οι οποίες αναπτύσσονται μεταξύ των δύο κυτταρικών τύπων (Zhang et al., 2020).



Η βασική λειτουργία των περικυττάρων αφορά τη ρύθμιση της δομικής σταθερότητας και ακεραιότητας του τοιχώματος των τριχοειδών, ενώ ταυτόχρονα έχουν και ρόλο στη ρύθμιση της αγγειογένεσης, καθώς και στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, μέσω απελευθέρωσης μεγάλου αριθμού αυξητικών παραγόντων και αγγειογενετικών μορίων (Zlokovic, 2008). Επίσης, ρυθμίζουν το σχηματισμό του αιματοεγκεφαλικού φραγμού στα αρχικά αναπτυξιακά στάδια, καθώς και την επιβίωση του ιστού και τη διατήρηση των λειτουργιών κατά την ενήλικη ζωή και το γήρας (Daneman & Prat, 2015). Πολύ σημαντική λειτουργία των περικυττάρων είναι επίσης και η ρύθμιση της αιματικής ροής του εγκεφάλου μέσω αλλαγής της διαμέτρου των τριχοειδών μέσω ινιδίων ακτίνης. Δυσλειτουργία ή απώλεια των περικυττάρων επιφέρει απώλεια της ακεραιότητας του φραγμού (Serlin et al., 2015). Η επιστράτευση των περικυττάρων σε συνδυασμό με την παραγωγή των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας, που σχηματίζουν τη βασική μεμβράνη, συμβάλλουν στη δημιουργία ενός σταθερού αγγειακού δικτύου. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω ιντεγκρινών που εκφράζονται από τα περικύτταρα, οι οποίες συμβάλλουν στην πρόσδεσή τους στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στη βασική μεμβράνη (EIAli et al., 2014).

### 1.5 Αστροκύτταρα

Τα αστροκύτταρα ανήκουν στην κατηγορία των νευρογλοιακών κυττάρων. Οι ποδικές αποφύσεις τους βρίσκονται σε επαφή με τη βασική μεμβράνη καλύπτοντας με αυτόν τον τρόπο περισσότερο από το 99% του ενδοθηλίου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Helms et al., 2016). Η πρόσδεση του κυτταροσκελετού των αποφύσεων με τη μεμβράνη πραγματοποιείται μέσω διακριτών πρωτεϊνών που εκφράζονται στα αστροκύτταρα, όπως του συμπλέγματος δυστρογλυκάνης-δυστροφίνης. Τα αστροκύτταρα, όπως και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, είναι στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους μέσω χασμοσυνδέσμων και συνδέσεων προσκόλλησης (Daneman & Prat, 2015).



**Εικόνα 7.** Τα αστροκύτταρα καλύπτουν με τις ποδικές αποφύσεις τους τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, περιορίζοντας έτσι την είσοδο παθογόνων και κυττάρων του

*ανοσοποιητικού στο ΚΝΣ. Ταυτόχρονα σε φυσιολογικές συνθήκες αλληλεπιδρούν με νευρώνες, ολιγοδενδροκύτταρα και μικρογλοιακά κύτταρα (Linnerbauer & Rothhammer, 2020).*

Η ύπαρξη των κυττάρων αυτών είναι καθοριστική, αφού επάγουν και διατηρούν τις ιδιότητες του αιματοεγκεφαλικού φραγμού με ποικίλους τρόπους. Αρχικά, έχουν ρυθμιστικό ρόλο στη διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Συγκεκριμένα, η αλληλεπίδραση των δύο τύπων κυττάρων συμβάλλει στην αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη δημιουργία στενοσυνδέσμων, καθώς και πρωτεϊνών των ειδικών συστημάτων μεταφοράς, όπως ο GLUT1, ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο την ακεραιότητα του φραγμού. Εκτός από αυτές τις πρωτεΐνες τα αστροκύτταρα εκφράζουν επίσης και υδατοπορίνες, γεγονός σημαντικό για τη ρύθμιση της ομοιόστασης του νερού στο ΚΝΣ, ενώ ταυτόχρονα συντελούν σημαντικά στην ομοιόσταση της συγκέντρωσης του καλίου και του γλουταμικού οξέος στον εξωκυττάριο χώρο (Naik & Cucullo, 2012). Επιπλέον, η συνεισφορά των αστροκυττάρων στην ορθή λειτουργία των νευρώνων και γενικότερα του φραγμού είναι καθοριστική μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών Sonic Hedgehog (Shh). Το γεγονός αυτό έχει αποδειχθεί μέσα από πειράματα σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια, στα οποία το σηματοδοτικό αυτό μονοπάτι είχε διαταραχθεί. Σε αυτά τα ποντίκια παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, συνοδευόμενη από μειωμένη έκφραση των πρωτεϊνών των στεγανών συνδέσεων, καθώς και από μια διαταραγμένη βασική μεμβράνη (Daneman & Prat, 2015). Τα αστροκύτταρα έχουν, επίσης, ρόλο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, καθώς λειτουργούν σαν σκαλωσίες καθοδηγώντας τους νευρώνες κατά τη μετανάστευσή τους και διεγείρουν την αύξησή τους με την έκκριση αυξητικών παραγόντων. Ταυτόχρονα τους υποστηρίζουν μεταβολικά, προμηθεύοντάς τους για παράδειγμα γαλακτικό οξύ και απομακρύνοντας την αμμωνία. Τέλος, αποτελούν και έναν συνδεδεμένο κρίκο μεταξύ του νευρικού συστήματος και της κυκλοφορίας του αίματος, επειδή ρυθμίζουν τη ροή του αίματος ως απόκριση της νευρωνικής δραστηριότητας. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω επαγωγής της συστολής ή διαστολής των περικυττάρων που καλύπτουν τα τριχοειδή (Naik & Cucullo, 2012).

## 1.6 Παθολογία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού

Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός παθολογικών καταστάσεων του ΚΝΣ, κατά τις οποίες παρατηρείται δυσλειτουργία στοιχείων του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται η πολλαπλή σκλήρυνση, το



εγκεφαλικό οίδημα, η επιληψία, η ανάπτυξη όγκων, το γλαύκωμα, αλλά και νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως το Αλτσχάιμερ και το Πάρκινσον. Η σοβαρότητα της δυσλειτουργίας που υφίσταται ο φραγμός ποικίλει από ήπια και παροδικά ανοίγματα των στεγανών συνδέσεων μέχρι και χρόνια κατάρρευση του φραγμού και διαταράξεις των συστημάτων μεταφοράς. Ένα πρώιμο στάδιο της φλεγμονής του ΚΝΣ αναγνωρίζεται ως η ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων ακόμα και σε μη φλεγμονώδεις διαταραχές (Abbott et al., 2010). Επίσης, σε παθολογικές καταστάσεις η διαπερατότητα του φραγμού αυξάνεται μέσω απελευθέρωσης διάφορων χημικών διαμεσολαβητών, όπως το ασπαρτικό, ο TNF- $\alpha$ , το ATP, το NO, μόρια τα οποία παράγονται από τα αστροκύτταρα (Ballabh et al., 2004). Ωστόσο, στις παραπάνω παθολογικές καταστάσεις δεν είναι εντελώς ξεκάθαρο αν η διατάραξη του φραγμού αποτελεί το αίτιο για την πρόκληση της νόσου. Σε κάθε περίπτωση όμως, η προκαλούμενη δυσλειτουργία συνεισφέρει στην ανάπτυξη και επιδείνωση της εκάστοτε παθολογίας (Abbott et al., 2010).

### 1.7 *In vitro* μοντέλα αιματοεγκεφαλικού φραγμού

Η ανάπτυξη *in vitro* μοντέλων του αιματοεγκεφαλικού φραγμού προήλθε τόσο από την ανάγκη κατανόησης των μοριακών μηχανισμών που ρυθμίζουν το περιβάλλον του εγκεφάλου, όσο και από την ανάγκη ανάπτυξης πιο αποτελεσματικών φαρμάκων που να στοχεύουν στο ΚΝΣ. Η εμφάνιση αυτών των μοντέλων στην επιστημονική κοινότητα έγινε στις αρχές του 1970 (Naik & Cucullo, 2012). Για την κατασκευή τέτοιων μοντέλων συνήθως απομονώνονται κύτταρα από χοίρο, βοοειδή ζώα, αρουραίο ή ποντίκι με τη χρήση μιας ποικιλίας μεθόδων απομόνωσης και καλλιέργειας. Αντίθετα, η χρήση ανθρώπινου ιστού είναι περιορισμένη για βιοηθικούς λόγους (Helms et al., 2016). Συνήθως, προτιμώνται τα τρωκτικά για την ανάπτυξη *in vitro* μοντέλων, λόγω της διαθεσιμότητας αντισωμάτων και κλωνοποιημένων γονιδίων (Wilhelm et al., 2011). Η πολυπλοκότητα των μοντέλων αυτών αναφορικά με τις κυτταρικές καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται ποικίλλει από μονοκαλλιέργειες έως και συγκαλλιέργειες με τρεις διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Επίσης, υπάρχει η δυνατότητα χρήσης διάφορων τύπων κυττάρων για την ανάπτυξη ενός τέτοιου *in vitro* συστήματος. Ωστόσο, τα πρωτογενή κύτταρα μπορούν να προσομοιάσουν πιο αξιόπιστα τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά και τις αποκρίσεις του αιματοεγκεφαλικού φραγμού *in vitro* (Sivandzade & Cucullo, 2018).

Έτσι, η χρήση των μοντέλων αυτών γίνεται κατά κόρον για τη διερεύνηση διάφορων ερευνητικών ερωτημάτων χάρις στα ποικίλα πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν. Αρχικά, πρόκειται για μια πειραματική μέθοδο σημαντικά πιο

οικονομική σε σχέση με τις πειραματικές προσεγγίσεις σε ζωντανούς οργανισμούς. Ταυτόχρονα, το περιβάλλον των πειραμάτων είναι πολύ πιο απλοποιημένο και επιτρέπει την εύκολη μελέτη και διαχείριση του μοντέλου, χωρίς να λαμβάνονται υπόψη σημαντικές παράμετροι σχετικές με την αντιμετώπιση ενός ολόκληρου οργανισμού. Επομένως, τα παραπάνω χαρακτηριστικά των *in vitro* μοντέλων τα καθιστούν ιδανικά πειραματικά μέσα, παρόλο που ακριβής αναπαραγωγή των πολύπλοκων λειτουργιών του εγκεφάλου είναι αδύνατη (Naik & Cucullo, 2012).

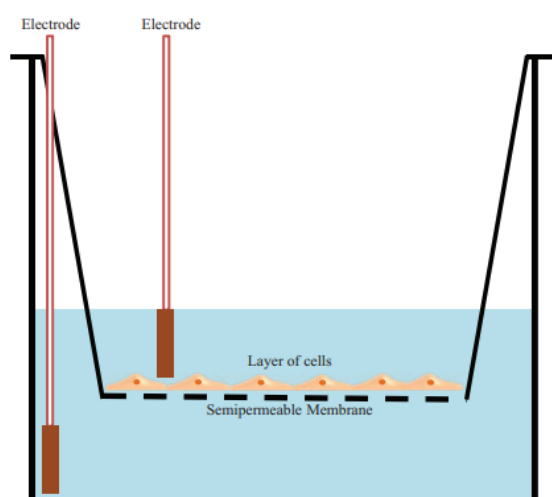
Ωστόσο, τέτοιες καλλιέργειες κυττάρων πραγματοποιούνται *ex situ*, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται σημαντικά η έκφραση σχετικών βιολογικών παραγόντων των κυττάρων, όπως για παράδειγμα μεταφορέων ή ενζύμων. Αυτό σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα μοντέλα αυτά αποτελούν ένα τεχνητό περιβάλλον που στερείται την έκθεση σε φυσιολογικούς παράγοντες, τροποποιούν τη φυσιολογία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού *in vitro* και κατ' επέκταση την ανταπόκρισή του σε ενδογενή και εξωγενή ερεθίσματα. Γι' αυτό και η επαλήθευση των ευρημάτων από *in vitro* πειράματα σε *in vivo* συνθήκες κρίνεται απαραίτητη (Sivandzade & Cucullo, 2018).

### 1.8 Καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων σε σύστημα transwell

Οι συγκαλλιέργειες ή μονοκαλλιέργειες κυττάρων αναπτύσσονται σε συστήματα transwell, δηλαδή ειδικές πλατφόρμες που δημιουργούν ένα περιβάλλον που παρομοιάζει τη δομή των αγγείων του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Συγκεκριμένα, τα συστήματα transwell αποτελούνται από μια μικροπορώδη ημιπερατή μεμβράνη, η οποία δημιουργεί δύο διαφορετικά διαμερίσματα. Το ένα αντιπροσωπεύει το περιβάλλον στο εσωτερικό του αγγείου, την αγγειακή πλευρά και το άλλο το περιβάλλον του εγκεφάλου, την παρεγχυματική πλευρά (Naik & Cucullo, 2012). Οι πόροι της μικροπορώδους μεμβράνης έχουν διάμετρο που ποικίλλει από 0,4 μm έως 3 μm. Έτσι, επιτρέπεται η ανταλλαγή θρεπτικών, εξωγενών ουσιών και παραγόντων που εκκρίνονται από τα κύτταρα, αλλά η μετανάστευση κυττάρων δεν καθίσταται δυνατή (Jackson et al., 2019). Τα συστήματα αυτά είναι ιδανικά για μελέτες κινητικής, λόγω των σταθερών όγκων των δύο διαφορετικών διαμερισμάτων, ενώ τα κύτταρα μπορούν ακόμα και να αποκολληθούν και να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω μελέτες. Σε γενικές γραμμές, πρόκειται για ένα σύστημα εύκολο στο χειρισμό και γι' αυτό χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό για την κατασκευή *in vitro* μοντέλων (Wilhelm & Krizbai, 2014).

Ο καθορισμός των ιδιοτήτων του φραγμού στο *in vitro* μοντέλο μπορεί να γίνει μέσα από διάφορες δοκιμές, όπως η μέτρηση της διαενδοθηλιακής

ηλεκτρικής αντίστασης (TEER), η μέτρηση της διαπερατότητας φθορίζουσων χρωστικών μέσω φασματοφωτομετρίας, αλλά και ο καθορισμός της ακεραιότητας των στεγανών συνδέσεων μέσω ανοσοφθορισμού (Jackson et al., 2019). Η μέτρηση της αντίστασης λόγω της περιορισμένης επεμβατικότητας στα κύτταρα είναι ο πιο συνήθης τρόπος εξακρίβωσης ότι ένα *in vitro* μοντέλο είναι αξιόπιστο. Πρόκειται για μια ευαίσθητη μέθοδο με την οποία τα ζωντανά κύτταρα μπορούν να παρακολουθούνται σε διάφορα στάδια της ανάπτυξης και διαφοροποίησης τους. Για τη μέτρησή της χρησιμοποιούνται δύο ηλεκτρόδια. Το ένα τοποθετείται στην αγγειακή πλευρά και το άλλο στην παρεγχυματική πλευρά του συστήματος transwell, έτσι ώστε να παρεμβάλλεται μεταξύ τους το μονόστιβο ενδοθήλιο. Η μονάδα μέτρησής της είναι το  $\text{Ohm} \times \text{cm}^2$  (Srinivasan et al., 2015).

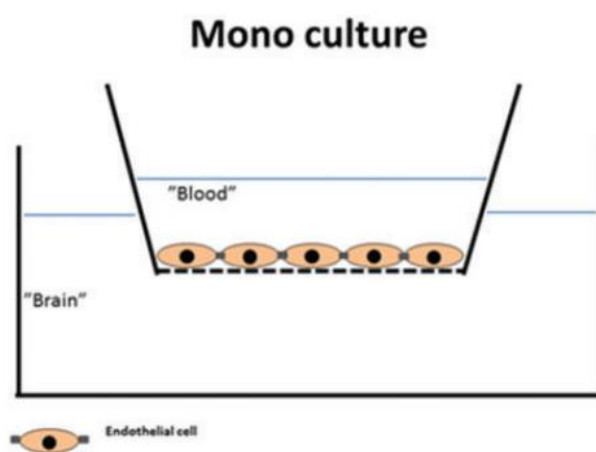


**Εικόνα 8.** Αναπαράσταση του τρόπου με τον οποίο μετράται η διαενδοθηλιακή ηλεκτρική αντίσταση (TEER). Τα δύο ηλεκτρόδια τοποθετούνται στα δύο διαφορετικά διαμερίσματα με τέτοιο τρόπο ώστε να διαχωρίζονται από τη στοιβάδα των κυττάρων. Υψηλές τιμές της TEER γνωστοποιούν την ύπαρξη ενός αρκετά καλού και αξιόπιστου *in vitro* μοντέλου (Srinivasan et al., 2015).

### 1.8.1 Μονοκαλλιέργειες

Οι μονοκαλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων αποτελούν ένα καλό μοντέλο για δοκιμές διαπερατότητας φαρμάκων ή μετρήσεις συγγένειας μεταξύ προσδετών με τους υποδοχείς τους. Παρόλα αυτά, λόγω της απλής αυτής ανακατασκευής του αιματοεγκεφαλικού φραγμού τα μοντέλα αυτά δεν μπορούν να μιμηθούν πλήρως την πολυπλοκότητα του *in vivo* συστήματος. Για παράδειγμα, η έλλειψη αλληλεπιδράσεων με άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς, όπως τα αστροκύτταρα που περιβάλλουν τα αγγεία ή τους νευρώνες και τα άλλα παρεγχυματικά κύτταρα, καθώς και η έλλειψη έκθεσης σε κύτταρα του αίματος, περιορίζουν σημαντικά την ικανότητα του ενδοθηλίου να αναπτύξει και να διατηρήσει τις ιδιότητες και τις λειτουργίες

του αιματοεγκεφαλικού φραγμού που παρατηρούνται *in vivo* (Sivandzade & Cucullo, 2018). Επίσης, λόγω της έλλειψης των παραπάνω φυσιολογικών συνθηκών σε αυτά τα μοντέλα είναι πιθανή η αποδιαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, γεγονός που προκαλεί επίσης απώλεια των χαρακτηριστικών του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Συγκεκριμένα, δε δημιουργούνται οι κατάλληλες στεγανές συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων και κατά συνέπεια καθίσταται δυνατή η παρακυτταρική διάχυση επηρεάζοντας έτσι την αξιοπιστία των μετρήσεων διαπερατότητας του μονόστιβου ενδοθηλίου (Naik & Cucullo, 2012).



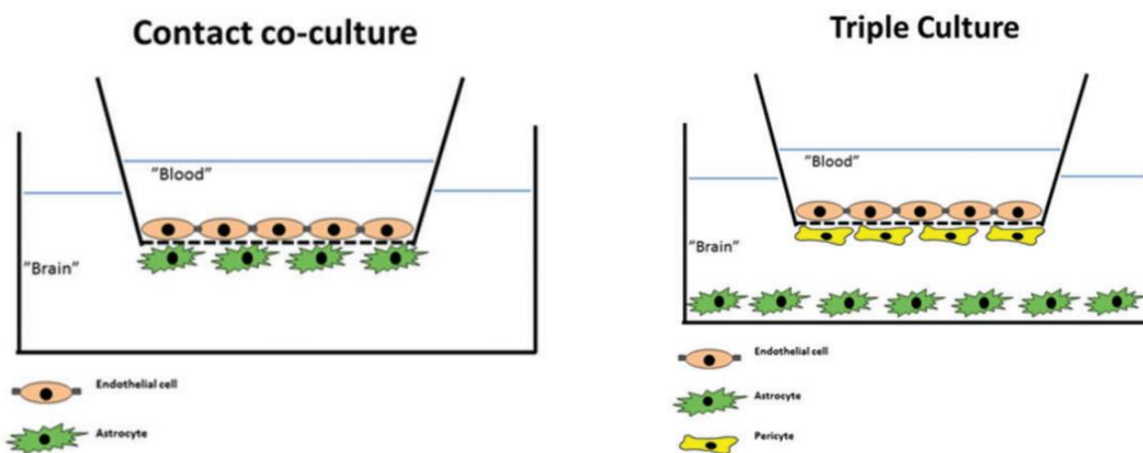
**Εικόνα 9.** Αναπαράσταση μονοκαλλιέργειας ενδοθηλιακών κυττάρων εγκεφάλου. Τα κύτταρα καλλιεργούνται στην άνω επιφάνεια της μικροπορώδους ημιπερατής μεμβράνης. Λόγω της έλλειψης των υπόλοιπων κυτταρικών τύπων της νευροαγγειακής μονάδας, στο σύστημα προστίθεται θρεπτικό μέσο για την προαγωγή της ανάπτυξης και διαφοροποίησης των κυττάρων (Helms et al., 2016).

### 1.8.2 Συγκαλλιέργειες με αστροκύτταρα και περικύτταρα

Η συγκαλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με αστροκύτταρα και περικύτταρα αποτελεί ένα πιο πιστό μοντέλο αναπαράστασης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού *in situ*. Η αλληλεπίδραση των κυτταρικών αυτών πληθυσμών συμβάλλει στον καθορισμό ενός ορθού φαινοτύπου, καθώς επιτυγχάνονται τόσο η κατάλληλη λειτουργία του φραγμού, όσο και η ορθή μορφολογία του μέσω έκφρασης μεταφορέων και δημιουργίας στεγανών συνδέσεων (Naik & Cucullo, 2012). Για αυτό το λόγο είναι το πιο διαδεδομένο μοντέλο, καθώς επάγει τις επιθυμητές ιδιότητες του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Το γεγονός αυτό αντικατοπτρίζεται στην αυξημένη διαενδοθηλιακή αντίσταση που προκαλεί η παρουσία δύο ή και τριών διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών στην καλλιέργεια, καθώς επίσης και οι χαμηλές τιμές διαπερατότητας (Wilhelm et al., 2011). Η TEER ουσιαστικά μετράει την ιοντική αγωγιμότητα κατά μήκος του φραγμού, γι' αυτό και στην συγκαλλιέργεια με τα αστροκύτταρα όπου το αγγειακό δίκτυο

είναι ολοκληρωμένο οι τιμές της είναι υψηλότερες. Συγκεκριμένα όμως, το μοντέλο με τα αστροκύτταρα και τα περικότταρα έχει παρουσιάσει μέσα από πειραματικές διαδικασίες τις υψηλότερες τιμές TEER σε σχέση με τα υπόλοιπα μοντέλα (Naik & Cucullo, 2012).

Η συγκαλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων με αστροκύτταρα μπορεί να διαμορφωθεί και μέσω απουσίας επαφής μεταξύ των δύο κυτταρικών πληθυσμών, όπου τα αστροκύτταρα τοποθετούνται στον πάτο του φρεατίου της καλλιέργειας χωρίς να έρχονται σε επαφή με την ημιπερατή μεμβράνη. Η διαμόρφωση αυτή εξυπηρετεί στην επαγωγή της διαφοροποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσα από παράγοντες που διαχέονται από τα αστροκύτταρα (Helms et al., 2016).



**Εικόνα 10.** Αναπαράσταση συγκαλλιέργειας ενδοθηλιακών με αστροκύτταρα σε επαφή στα αριστερά και συγκαλλιέργειας με αστροκύτταρα και περικότταρα στα δεξιά. Στην πρώτη περίπτωση τα αστροκύτταρα τοποθετούνται στην κάτω επιφάνεια της μεμβράνης και έρχονται σε άμεση επαφή με το ενδοθήλιο. Στην τριπλή καλλιέργεια, τα αστροκύτταρα τοποθετούνται στον πάτο του φρεατίου, ενώ τα περικότταρα στην κάτω επιφάνεια της μικροπορώδους μεμβράνης. Η διαμόρφωση αυτή προσομοιάζει περισσότερο πιστά την κατανομή των κυττάρων σε συνθήκες *in vivo* (Helms et al., 2016).

---

## **2. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ & ΣΚΟΠΟΣ**

---

Οι ξεχωριστές ιδιότητες του αιματοεγκεφαλικού φραγμού που περιγράφηκαν στην εισαγωγή δυσχεραίνουν την επιτυχή χορήγηση φαρμάκων στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα, εξαιτίας της περιορισμένης διαπερατότητάς του. Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας αποτελεί η κατασκευή ενός *in vitro* κυτταρικού συστήματος προσομοίωσης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, ώστε να πραγματοποιηθεί δοκιμή φαρμακευτικών ουσιών, σχετικά με το αν μπορούν να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό ή όχι. Ένα τέτοιο μοντέλο παρουσιάζεται χρήσιμο για τη δοκιμή της διανομής φαρμάκων στον εγκέφαλο, του τρόπου απόκρισης του φραγμού στις ουσίες αυτές, αλλά και την πιθανή πρόκληση τοξικότητας. Συνεπώς, το κυτταρικό αυτό σύστημα μπορεί να αποτελέσει ένα μέσο βελτίωσης των μεθόδων χορήγησης φαρμάκων στο ΚΝΣ.

---

### ***3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ***

---



## 3.1 Υλικά

### 3.1.1 Διαχείριση πειραματόζωων

Για την εκπόνηση των πειραμάτων θυσιάστηκαν θηλυκά ποντίκια 2 μηνών C57BL/6. Τα ζώα διαβίωναν σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και τροφή. Η αναισθητοποίησή τους έγινε με ισοφλουράνιο, έναν φθοριωμένο αιθέρα με μυοχαλαρωτική και αναισθητική δράση.

### 3.1.2 Διαχείριση κυτταροκαλλιιεργειών

Όλες οι πειραματικές διαδικασίες μετά την απομόνωση των εγκεφάλων από τα πειραματόζωα εκπονήθηκαν σε απαγωγό καθέτου νηματικής ροής. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται στο χώρο των κυτταροκαλλιιεργειών ψεκάζονται με διάλυμα 70% αιθανόλης σε νερό (EtOH) πριν εισαχθούν στον απαγωγό. Μετά τη λήξη της εργασίας στον απαγωγό πραγματοποιείται καθαρισμός του απαγωγού και των πιπετών με διάλυμα 70% αιθανόλης και στη συνέχεια εφαρμόζεται αυστηρά ακτινοβολία UV για 20 min.

### 3.1.3 Συσκευές και υλικά

Για την απομόνωση των ενδοθηλιακών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν:

- HBSS του προμηθευτή Gibco Life Technologies με αριθμό καταλόγου 24020117
- DMEM του προμηθευτή Sigma Aldrich με αριθμό καταλόγου RNB19557
- Dextran του προμηθευτή MP Biomedicals με αριθμό καταλόγου 180140
- TLCK του προμηθευτή Sigma Aldrich με αριθμό καταλόγου 90182
- Puromycin του προμηθευτή InvivoGen με αριθμό καταλόγου QLL4205
- Ισοφλουράνιο του προμηθευτή Piramal Healthcare με αριθμό καταλόγου B113E14A
- DPBS του προμηθευτή Gibco Life Technologies με αριθμό καταλόγου 1378741
- Collagenase/dispase του προμηθευτή Sigma Aldrich με αριθμό καταλόγου 55824023
- Sodium Selenate του προμηθευτή Sigma Aldrich με αριθμό καταλόγου 55261
- Insulin του προμηθευτή Sigma Aldrich με αριθμό καταλόγου I-5500

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πρωτόκολλα ανοσοκυτταροχημείας φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Αντίσωμα	Οργανισμός	Αρ. Καταλόγου	Προμηθευτής	Αραίωση
<b>CD31</b>	Κουνέλι	ab28364	Abcam	1/100
<b>PMCA</b>	Κουνέλι	ab2825	Abcam	1/100
<b>anti-488</b>	Κουνέλι	ab150077	Abcam	1/1000
<b>anti-594</b>	Κουνέλι	20111	Biotium	1/1000
<b>anti-GFAP</b>	Κουνέλι	Z0334	Dako	1/2000
<b>anti-Iba1</b>	Ποντικός	MABN92	Merck Millipore	1/750

### 3.1.4 Διαλύματα

Διάλυμα κολλαγόνου για επίστρωση (coating) ενός τρυβλίου 6 φρεατίων (6-well plate)

1. Γίνεται προετοιμασία του διαλύματος κολλαγόνου και προσθήκη 2ml διαλύματος σε κάθε φρεάτιο του τρυβλίου.

Αντιδραστήρια	Όγκοι
κολλαγόνο 1/50	0,24 ml
0,15M NaCl (1,5M stock)	1,2 ml
dd H <sub>2</sub> O	10,66 ml
Τελικός Όγκος	12 ml

2. Το τρυβλίο αφήνεται να επωαστεί για 16 ώρες στους 37 °C και την επόμενη μέρα αφαιρείται το διάλυμα κολλαγόνου.
3. Γίνεται ένα πλύσιμο με ddH<sub>2</sub>O και ένα με PBS.

Διάλυμα HBSS pH=7,4 100 ml

1. Σε δύο falcon 50ml προστίθενται 44,5ml αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O, 0,5ml πενικιλίνη στρεπτομυκίνη (penicillin/streptomycin) και 5ml HBSS 10x.
2. Το διάλυμα ανακινείται καλά για να γίνει ομοιογενές.
3. Γίνεται πεχαμέτρηση και προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα NaOH εφόσον χρειάζεται, ώστε να φτάσει το pH στο 7,4.
4. Γίνεται φιλτράρισμα με φίλτρο 0,22 μm και το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4 °C.

Διάλυμα 25% BSA σε HBSS pH=7,4 25 ml

1. Σε 15ml HBSS διαλύονται 6,25 gr BSA σε RT με ανακίνηση.
2. Προστίθεται HBSS μέχρι τα 25ml.

3. Το pH ρυθμίζεται στο 7,4 με πεχάμετρο.
4. Το διάλυμα φιλτράρεται με 0,22 μm φίλτρο και αποθηκεύεται στους 4 °C.

#### Διάλυμα πέψης με collagenase στο πρωτόκολλο με τη BSA

Αντιδραστήρια	Όγκοι
1 mg/ml collagenase II (3 mg/ml stock)	1,4 ml
30 U/ml DNase I (3000 U/ml stock)	42 μl
0,36Mm CaCl <sub>2</sub> (7,2 mM stock)	140 μl
HBSS	2618 μl
Τελικός Όγκος	4,2 ml

#### Θρεπτικό υλικό ενδοθηλιακών κυττάρων στο πρωτόκολλο με τη BSA

Αντιδραστήρια	Όγκοι
DMEM/F12 (+πενικιλίνη στρεπτομυκίνη)	24 ml
FBS (20% τελική συγκέντρωση)	6 ml
Ηπαρίνη	30 μl
2 ng/ml bFGF (50ng/μl stock)	1,2 μl
Τελικός Όγκος	30 ml

#### Θρεπτικό υλικό ενδοθηλιακών κυττάρων για τη δοκιμή διαφορετικών συγκεντρώσεων ηπαρίνης

Αντιδραστήρια	Όγκοι						
DMEM/F12(+πενικιλίνη στρεπτομυκίνη)	8 ml						
FBS (20% τελική συγκέντρωση)	2 ml						
2 ng/ml bFGF (50ng/μl stock)	0,4 μl						
Ηπαρίνη (5 kU/ml stock)	<table border="1"> <tr> <td>2μl (1U/ml)</td> <td>5μl (2,5U/ml)</td> <td>10 μl (5U/ml)</td> <td>20μl (10U/ml)</td> <td>30μl (15U/ml)</td> <td>90μl (45U/ml)</td> </tr> </table>	2μl (1U/ml)	5μl (2,5U/ml)	10 μl (5U/ml)	20μl (10U/ml)	30μl (15U/ml)	90μl (45U/ml)
2μl (1U/ml)	5μl (2,5U/ml)	10 μl (5U/ml)	20μl (10U/ml)	30μl (15U/ml)	90μl (45U/ml)		
8 μg/ml πουρομυκίνη (10mg/ml stock)	8μl						
Τελικός Όγκος	5 ml						

#### Διάλυμα 1 μg/cm<sup>2</sup> κολλαγόνου IV και 1 μg/cm<sup>2</sup> φιβρονεκτίνης (FN) για επίστρωση (coating) φλασκών T-25

1. Αρχικά, γίνεται αραιώση του stock του κολλαγόνου.

Αντιδραστήρια	Όγκοι
15 μg/ml κολλαγόνο IV (stock 1μg/ml)	27 μl
dd H <sub>2</sub> O	1773 μl
Τελικός Όγκος	1,8 ml

2. Στη συνέχεια, προετοιμάζεται το διάλυμα του κολλαγόνου IV και της φιβρονεκτίνης για το coating.

Αντιδραστήρια	Όγκοι
15 µg/ml κολλαγόνο IV	1,67 ml
15 mg/ml φιμπρονεκτίνη	1,67 ml
dd H <sub>2</sub> O	0,66 ml
Τελικός Όγκος	4 ml

#### Διάλυμα κολλαγόνου IV/φιμπρονεκτίνης για επίστρωση καλυπτρίδων

1. Αρχικά, γίνεται αραίωση του stock του κολλαγόνου.

Αντιδραστήρια	Όγκοι
16 µg/ml κολλαγόνο IV (stock 1mg/ml)	9,6 µl
dd H <sub>2</sub> O	590 µl
Τελικός Όγκος	600 µl

2. Τοποθετούνται 4 καλυπτρίδες σε τρυβλίο 24 φρεατίων.
3. Γίνεται προετοιμασία του διαλύματος κολλαγόνου IV/φιμπρονεκτίνης και προστίθεται 0,5 ml διαλύματος σε κάθε καλυπτρίδα.

Αντιδραστήρια	Όγκοι
4 µg/ml κολλαγόνο IV (16 µg/ml αρχική)	500 µl
4 µg/ml φιμπρονεκτίνη (15 µg/ml stock)	530 µl
dd H <sub>2</sub> O	970 µl
Τελικός Όγκος	2 ml

#### Διάλυμα 18% δεξτράνης (dextran)

1. Αρχικά ετοιμάζονται 50ml διαλύματος DPBS (stock DPBS 10x). Σε falcon των 50ml προστίθενται 45ml αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O και 5ml DPBS και γίνεται καλή ανακίνηση για να γίνει ομοιογενές.
2. Σε 20ml DPBS προστίθενται 4,5gr δεξτράνης και γίνεται ανακίνηση σε μαγνητικό αναδευτήρα.
3. Αφού διαλυθεί η δεξτράνη προστίθενται 250µl πενικιλίνη στρεπτομυκίνη (1/100) και 250µl Glutamax (1/100).
4. Προστίθεται DPBS μέχρι τα 25ml.
5. Γίνεται φιλτράρισμα με 0,22µm φίλτρο και το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.

#### Διάλυμα πέψης με collagenase/dispase στο πρωτόκολλο με τη δεξτράνη

Αντιδραστήρια	Όγκοι
1 ng/ml collagenase/dispase	250µl
30 U/ml DNase I (3000 U/ml stock)	25 µl
0,147 µg/ml TLCK (14,7 µg/ml)	25 µl
1x πενικιλίνη στρεπτομυκίνη	25 µl
DMEM (+CaCl <sub>2</sub> /MgCl <sub>2</sub> )	2175 µl
Τελικός Όγκος	2,5 ml

## Θρεπτικό υλικό ενδοθηλιακών κυττάρων στο πρωτόκολλο με τη dextran

Αντιδραστήρια	Όγκοι
DMEM/F12 (+πενικιλίνη στρεπτομυκίνη)	16 ml
FBS (20% τελική συγκέντρωση)	4 ml
2 ng/ml bFGF (50 ng/ml stock)	0,8 μl
5 U/ml ηπαρίνη (5kU/ml stock)	20 μl
8 μg/ml πουρομυκίνη (10mg/ml stock)	16 μl
10ng/ml sodium selenate (1μg/ml stock)	200 μl
8,4μg/ml insulin (4,2mg/ml stock)	40 μl
7,6μl/ml transferrin (20mg/ml)	7,6 μl
Τελικός Όγκος	20 ml

- Η πουρομυκίνη προστίθεται στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων μόνο για τις δύο πρώτες μέρες της καλλιέργειας. Από την τρίτη μέρα και μετά ετοιμάζεται θρεπτικό χωρίς πουρομυκίνη.
- Για την αλλαγή του θρεπτικού υλικού γίνεται ένα πλύσιμο με PBS και στη συνέχεια προστίθενται στη φλάσκα 4,5ml θρεπτικού. Η αλλαγή του θρεπτικού γίνεται κάθε δύο μέρες.

## 3.2 Μέθοδοι

### 3.2.1 Απομόνωση ενδοθηλιακών κυττάρων με BSA

Για την πραγματοποίηση των πρωτοκόλλου αυτού παρασκευάζονται τα διαλύματα HBSS pH=7,4 και 25% BSA/HBSS από την προηγούμενη ημέρα. Ταυτόχρονα, παρασκευάζεται το διάλυμα κολλαγόνου και γίνεται επίστρωση ενός τρυβλίου 6 φρεατίων (6-well plate), καθώς χρειάζεται μια overnight επώαση πριν την επίστρωση των κυττάρων. Την επόμενη μέρα απομονώνονται 4 εγκέφαλοι από θηλυκά ποντίκια 2 μηνών C57BL/6. Οι εγκέφαλοι ρολάρονται σε αποστειρωμένα Wattmann για να απομακρυνθούν οι μήνιγγες και στη συνέχεια απομακρύνονται οι σφρητικοί λοβοί και η παρεγκεφαλίδα. Το υπόλοιπο μέρος του εγκεφάλου κόβεται σε επιμέρους κομμάτια (4 ή 6) και μεταφέρεται σε ομογενοποιητή. Για κάθε εγκέφαλο γίνεται ξεχωριστή ομογενοποίηση σε 3ml HBSS (4 °C). Έπειτα, γίνεται μεταφορά του ομογενοποιητήματος σε σωλήνα τύπου falcon των 15 ml και πραγματοποιείται ένα πλύσιμο του ομογενοποιητή με ακόμα 3ml HBSS. Η ποσότητα αυτή μεταφέρεται επίσης στο falcon (συνολικά 6ml). Τα ομογενοποιημένα από τους 4 εγκεφάλους φυγοκεντρώνονται σε 1350g για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου (RT-room temperature) σε φυγόκεντρο Heraeus. Στη συνέχεια, απορρίπτεται το υπερκείμενο προσεκτικά και η πελέτα σε κάθε falcon επαναιωρείται σε 11ml 25% BSA/HBSS. Γίνεται φυγοκέντρηση

σε 1500g για 15 min σε RT. Η χρήση της BSA αποτελεί ένα κρίσιμο βήμα κατά την εκτέλεση του πρωτοκόλλου, καθώς διαχωρίζει τα κύτταρα με μυελίνη από τα ενδοθηλιακά κύτταρα που επιθυμούμε να απομονώσουμε. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης απορρίπτεται η μυελίνη από το υπερκείμενο και αφού γίνει επαναιώρηση της κάθε πελέτας σε 1ml HBSS, μεταφέρεται σε καθαρό falcon των 15ml. Είναι σημαντικό η μυελίνη να απομακρυνθεί εντελώς, ώστε να αποκτηθεί στο τέλος ένας καθαρός αριθμός ενδοθηλιακών κυττάρων. Σε κάθε falcon προστίθενται 5ml HBSS και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε 1350g για 5 min σε RT. Η κάθε πελέτα επαναιωρείται σε 1ml διαλύματος collagenase/dispase για κάθε εγκέφαλο και γίνεται επώαση στους 37 °C σε shaking incubator για 1h και 15 min. Κάθε 15 min τα κύτταρα ανακινούνται ελαφρώς, ώστε να μην δημιουργηθούν συσσωματώματα. Αφού ολοκληρωθεί η επώαση πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε 1350g για 5 min σε RT. Το διάλυμα πέψης απορρίπτεται και η πελέτα επαναιωρείται σε 5ml HBSS (37 °C). Έπειτα, γίνεται φυγοκέντρηση σε 1350g για 5 min σε RT. Στο μεταξύ, αφαιρείται το διάλυμα κολλαγόνου από τα φρεάτια του τρυβλίου και γίνεται ένα πλύσιμο με ddH<sub>2</sub>O και ένα με PBS. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης γίνεται επαναιώρηση των κυττάρων από κάθε εγκέφαλο σε 2ml θρεπτικού υλικού και στη συνέχεια μεταφέρονται σε ένα φρεάτιο (1 εγκέφαλος ανά φρεάτιο) από το τρυβλίο 6 φρεατίων, στο οποίο έχει γίνει επίστρωση με κολλαγόνο.

### 3.2.2 Απομόνωση ενδοθηλιακών κυττάρων με δεξτράνη

Για την πραγματοποίηση των πρωτοκόλλου αυτού παρασκευάζονται τα διαλύματα HBSS pH=7,4 και 18% dextran από την προηγούμενη ημέρα. Ταυτόχρονα, παρασκευάζεται το διάλυμα κολλαγόνου IV/φιμπρονεκτίνης και γίνεται επίστρωση μιας φλάσκας, καθώς χρειάζεται μια 16ωρη επώαση πριν την επίστρωση των κυττάρων. Την επόμενη μέρα απομονώνονται δύο εγκέφαλοι από θηλυκά ποντίκια 2 μηνών C57BL/6. Οι εγκέφαλοι ρολάρονται σε αποστειρωμένα Wattmann για να απομακρυνθούν οι μήνιγγες και στη συνέχεια απομακρύνονται οι οσφρητικοί λοβοί και η παρεγκεφαλίδα. Το υπόλοιπο μέρος του εγκεφάλου κόβεται σε επιμέρους κομμάτια (4 ή 6) και μεταφέρεται σε ομογενοποιητή. Για κάθε εγκέφαλο γίνεται ξεχωριστή ομογενοποίηση σε 3ml HBSS (4 °C). Έπειτα, γίνεται μεταφορά του ομογενοποιημένου σε falcon των 15 ml και πραγματοποιείται ένα πλύσιμο του ομογενοποιητή με ακόμα 2ml HBSS. Η ποσότητα αυτή μεταφέρεται επίσης στο falcon (συνολικά 5ml). Τα ομογενοποιημένα από τους 2 εγκεφάλους φυγοκεντρώνται σε 1350g για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου (RT-room temperature) σε φυγόκεντρο Heraeus. Στη συνέχεια, απορρίπτεται

το υπερκείμενο προσεκτικά, η πελέτα σε κάθε falcon επαναιωρείται σε 11ml δεξτράνης 18% και γίνεται πολύ καλό vortex για 2min. Έπειτα, γίνεται φυγοκέντρηση σε 6000g για 10 min στους 4°C σε φυγόκεντρο Sorvall (RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge). Η χρήση της BSA αποτελεί ένα κρίσιμο βήμα κατά την εκτέλεση του πρωτοκόλλου, καθώς διαχωρίζει τα κύτταρα με μυελίνη από τα ενδοθηλιακά κύτταρα που επιθυμούμε να απομονώσουμε. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης απορρίπτεται η μυελίνη και η δεξτράνη από το υπερκείμενο σε όσο το δυνατόν μεγαλύτερο βαθμό και αφού γίνει επαναιώρηση της κάθε πελέτας σε 1ml HBSS, μεταφέρονται όλα τα κύτταρα και από τους δύο εγκεφάλους σε καθαρό falcon των 15ml. Είναι σημαντικό η μυελίνη να απομακρυνθεί εντελώς, ώστε να αποκτηθεί στο τέλος ένας καθαρός αριθμός ενδοθηλιακών κυττάρων. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε 1350g για 5 min σε RT. Η πελέτα επαναιωρείται σε 700 μl διαλύματος collagenase/dispase και γίνεται επώαση στους 37 °C σε shaking incubator για 1h και 15 min. Κάθε 15 min τα κύτταρα ανακινούνται ελαφρώς, ώστε να μην δημιουργηθούν συσσωματώματα. Αφού ολοκληρωθεί η επώαση πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε 1350g για 5 min σε RT. Το διάλυμα πέψης απορρίπτεται και η πελέτα επαναιωρείται σε 5ml HBSS (37 °C). Έπειτα, γίνεται φυγοκέντρηση σε 1350g για 5 min σε RT. Στο μεταξύ, αφαιρείται το διάλυμα κολλαγόνου IV/φιμπρονεκτίνης από τη φλάσκα και γίνεται ένα πλύσιμο με ddH<sub>2</sub>O και ένα με PBS. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης γίνεται επαναιώρηση των κυττάρων σε 4,5ml θρεπτικού υλικού και στη συνέχεια μεταφέρονται στη φλάσκα (2 εγκεφαλοί ανά φλάσκα), στην οποία έχει γίνει επίστρωση με κολλαγόνο IV/φιμπρονεκτίνη.

### 3.2.3 Επίστρωση κυττάρων σε καλυπτρίδες (coverslips)

Αρχικά, πριν γίνει η επίστρωση των κυττάρων πρέπει να προηγηθεί το coating των καλυπτρίδων, ώστε να μπορέσουν να προσκολληθούν τα κύτταρα στην επιφάνειά τους. Για το σκοπό αυτό, οι καλυπτρίδες τοποθετούνται σε ένα τρυβλίο 24 φρεατίων (ο αριθμός των καλυπτρίδων που χρησιμοποιείται εξαρτάται από τις ανάγκες του πειράματος). Στη συνέχεια, προετοιμάζεται το διάλυμα κολλαγόνου IV/φιμπρονεκτίνης και προστίθεται 0,5 ml διαλύματος σε κάθε καλυπτρίδα. Το τρυβλίο αφήνεται να επωαστεί για 16 ώρες στους 37 °C και την επόμενη μέρα αφαιρείται το διάλυμα κολλαγόνου. Ακολούθως, πραγματοποιούνται δύο πλυσίματα με ddH<sub>2</sub>O και μετά την απόρριψη του ddH<sub>2</sub>O η καλυπτρίδα τοποθετείται στο κέντρο του φρεατίου, έτσι ώστε όταν προστεθούν τα κύτταρα να μην διαχυθούν στα τοιχώματα. Το τρυβλίο αφήνεται ανοιχτό στον απαγωγό για

2-3 ώρες για να φύγει εντελώς η υγρασία και στη συνέχεια εφαρμόζεται ακτινοβολία UV, καθώς το stock του κολλαγόνου είναι μη αποστειρωμένο.

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία της επίστρωσης των καλυπτρίδων μπορεί να ξεκινήσει η επίστρωση των κυττάρων στις καλυπτρίδες. Αρχικά, απορρίπτεται το θρεπτικό υλικό, γίνεται ένα πλύσιμο με PBS και προστίθεται ανάλογος όγκος θρυψίνης. Η επώαση των κυττάρων με τη θρυψίνη πραγματοποιείται για 2min στους 37°C. Μετά το πέρας της επώασης, η θρυψίνη απενεργοποιείται με διπλάσιο όγκο θρεπτικού υλικού. Τα κύτταρα μεταφέρονται σε falcon και φυγοκεντρώνονται σε 300g για 5min σε RT. Το υπερκείμενο αφαιρείται και προστίθενται 400μl θρεπτικού υλικού για επαναιώρηση. Τέλος, από το εναιώρημα των κυττάρων προστίθενται 90μl σε κάθε καλυπτρίδα. Τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C για μισή ώρα και μετά το πέρας του χρόνου αυτού προστίθενται 500μl θρεπτικού υλικού. Τα κύτταρα αφήνονται στον επωαστήρα στους 37°C μέχρι να γίνει η μονιμοποίησή τους.

#### 3.2.4 Μέτρηση κυττάρων και έλεγχος ζωτικότητας με χρώση trypan blue

Ο έλεγχος της βιωσιμότητας των κυττάρων γίνεται με τη βοήθεια της χρωστικής trypan blue. Πρόκειται για μια χρωστική που βάφει μπλε μόνο τα νεκρά κύτταρα, καθώς δεν μπορεί να διαπεράσει τη μεμβράνη των ζωντανών κυττάρων. Τα κύτταρα μαζί με τη χρωστική (περίπου 10 μl) τοποθετούνται στη συνέχεια σε αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer), ώστε να καταμετρηθούν.

Κατά την απομόνωση ενδοθηλιακών κυττάρων με BSA καταμετρήθηκαν κατά μέσο όρο 25,5 κύτταρα συνεπώς η συγκέντρωση της κυτταροκαλλιέργειας ήταν:

$$25,5 \times 10^4 = 255.000 \text{ κύτταρα/ml δείγματος}$$

#### 3.2.5 Μονιμοποίηση των κυττάρων (fixation)

Αφού γίνει η επίστρωση των ενδοθηλιακών κυττάρων στις καλυπτρίδες την επόμενη μέρα πραγματοποιείται η μονιμοποίησή τους. Για το σκοπό αυτό, απορρίπτεται αρχικά το θρεπτικό υλικό από το τρυβλίο 24 φρεατίων. Ύστερα, γίνεται ένα πλύσιμο με PBS σε RT και προστίθεται 3,7% φορμαλδεΰδη/PBS για 15 min στους 4 °C. Στη συνέχεια, γίνονται 2 πλυσίματα με PBS 1x σε RT και οι καλυπτρίδες αφήνονται σε PBS στους 4 °C μέχρι να γίνει το πρωτόκολλο της ανοσοκυτταροχημείας.



### 3.2.6 Ανοσοκυτταροχημεία – Χρώση κυττάρων (Staining)

Αρχικά, πραγματοποιούνται 3 πλυσίματα των καλυπτρίδων στις οποίες έχουν μονιμοποιηθεί τα κύτταρα με PBS για 5 min. Το PBS αφαιρείται και γίνεται μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων (blocking) με 10% NGS, 0,2% Triton X-100 σε PBS για 1 ώρα σε RT. Στη συνέχεια, γίνεται η επώαση με τα πρωτογενή αντισώματα σε 2% NGS και 0,05% Triton X-100. Συγκεκριμένα, στο θάλαμο ανοσοκυτταροχημείας τοποθετείται ένα κομμάτι πάραφιλμ, στο οποίο προστίθενται από το διάλυμα των πρωτογενών αντισωμάτων από 40 μl για κάθε καλυπτρίδα. Η κάθε καλυπτρίδα τοποθετείται με τέτοιο τρόπο, ώστε η πλευρά που φέρει τα κύτταρα να έρχεται σε επαφή με το διάλυμα των αντισωμάτων. Την επόμενη ημέρα οι καλυπτρίδες μεταφέρονται στο τρυβλίο 24 φρεατίων και γίνονται 3 πλυσίματα με PBS για 5 min σε RT. Έπειτα, πραγματοποιείται η επώαση με τα δευτερογενή αντισώματα σε 2% NGS, 0,05% Triton X-100 και 1/4000 DAPI για 2 ώρες σε RT στο σκοτάδι. Η επώαση αυτή εκτελείται με παρόμοιο τρόπο με τον αντίστοιχο των πρωτογενών αντισωμάτων. Μετά το πέρας των 2 ωρών οι καλυπτρίδες μεταφέρονται στο τρυβλίο 24 φρεατίων και πραγματοποιούνται 3 πλυσίματα με PBS για 5 min σε RT. Σε όλα τα βήματα για τα δευτερογενή αντισώματα το τρυβλίο 24 φρεατίων καλύπτεται με αλουμινόχαρτο, ώστε να αποφευχθεί το photobleaching και να μπορεί να παρατηρηθεί ο φθορισμός. Τέλος, οι καλυπτρίδες τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρες πλάκες (slides) χρησιμοποιώντας vectashield ως μέσο, ώστε να διατηρηθεί ο φθορισμός και να είναι δυνατή η παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο.

- Τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται για τη χρώση των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι το CD31 σε συγκεντρώσεις 1/50 και 1/100 και το PMCA (Plasma Membrane Calcium ATPase) σε συγκέντρωση 1/100. Αυτές οι δύο πρωτεΐνες είναι πρωτεΐνες-μάρτυρες (markers) για τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη χρώση των κυττάρων C6 ήταν το anti-GFAP σε συγκέντρωση 1/2000 και το anti-Iba1 σε συγκέντρωση 1/750. Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το anti-488 σε συγκέντρωση 1/1000 και το anti-594 σε συγκέντρωση 1/1000.

### 3.2.7 Μικροσκοπία φθορισμού

Για τις ανάγκες της παρούσας πτυχιακής εργασίας χρησιμοποιήθηκε μικροσκοπία φθορισμού με σκοπό τον εντοπισμό πρωτεϊνών στα κύτταρα, οι οποίες αποτελούν δείκτες για την ταυτοποίησή τους. Έτσι, προηγήθηκε έμμεσος ανοσοφθορισμός, δηλαδή σήμανση των κυττάρων με ειδικά

αντισώματα και δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες χρωστικές, όπως εξηγήθηκε παραπάνω. Κάθε χρωστική διεγείρεται από ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος και εκπέμπει ακτινοβολία, δηλαδή φθορισμό, μεγαλύτερου μήκους κύματος καθιστώντας δυνατή την παρατήρησή της. Με αυτόν τον τρόπο, οι ειδικές φθορίζουσες χρωστικές παρατηρούνται ως ξεχωριστά χρώματα στο μικροσκόπιο μέσω της χρήσης ειδικών φίλτρων φθορισμού, τα οποία απομονώνουν την ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την πρωτεΐνες CD31 και GFAP εκπέμπουν στο πράσινο φως, ενώ το αντίστοιχο για την Iba1 εκπέμπει στο κόκκινο φως. Επίσης, η χρωστική DAPI εκπέμπει στο μπλε φως. Για την εκτενή παρατήρηση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ένα σύνολο τριών φακών με διαφορετικές μεγεθύνσεις (X20, X40, X60). Η λήψη όλων των φωτογραφιών από το μικροσκόπιο πραγματοποιήθηκε με ενσωματωμένη κάμερα και χρήση του λογισμικού Basler Microscopy Software.

### 3.2.8 Απόψυξη και ψύξη κυτταρικής σειράς C6

Αρχικά, για την απόψυξη της κυτταρικής σειράς C6 από τους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  το θρεπτικό υλικό των κυττάρων προθερμαίνεται στους  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  (DMEM high glucose, 10% FBS, penicillin/streptomycin). Στη συνέχεια, τα κύτταρα λαμβάνονται από τον καταψύκτη των  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  και αποψύχονται σε υδατόλουτρο  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  για περίπου 1 min. Τα κύτταρα μεταφέρονται σε falcon των 50 ml και έπειτα πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε 200g (1000 rpm) για 5 min σε RT. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, απορρίπτεται το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 3 ml θρεπτικού υλικού χωρίς πιπετάρισμα. Τέλος, προστίθενται επιπλέον 2 ml θρεπτικού υλικού στο falcon και στη συνέχεια τα κύτταρα μεταφέρονται σε ένα τρυβλίο 60 mm (συνολικός όγκος 5ml).

Για την ψύξη των κυττάρων C6 αρχικά αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και γίνεται ένα πλύσιμο με 4 ml PBS. Ακολούθως, πραγματοποιείται μια επώαση με 4 ml θρυψίνης στους  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  και έπειτα προστίθενται 8 ml θρεπτικού υλικού. Τα κύτταρα μεταφέρονται σε σωλήνα τύπου falcon των 50 ml και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 200 g για 5 min. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο αφαιρείται και στην πελέτα προστίθενται 900  $\mu\text{l}$  FBS και 100  $\mu\text{l}$  DMSO. Τα κύτταρα τοποθετούνται και διατηρούνται στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  για μελλοντική χρήση.

### 3.2.9 Ανακαλλιέργεια κυττάρων (split)

Όταν το 80% της επιφάνειας του τρυβλίου καλυφθεί από τα κύτταρα είναι απαραίτητο να γίνει ανακαλλιέργειά τους, ώστε να συνεχιστεί απρόσκοπτα η ανάπτυξή τους. Η διαδικασία ξεκινά με αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και πραγματοποίηση ενός πλύσιματος με 1 ml PBS. Στη συνέχεια, γίνεται ένα πλύσιμο με 0,5 ml PBS/ 0,5 ml θρυψίνης και αφήνεται να επωαστεί για 2 min στους 37 °C. Μετά το πέρας της επώασης, προστίθενται ακόμα 2 ml θρεπτικού υλικού. Έπειτα, λαμβάνονται 150 μl από τα κύτταρα και προστίθενται σε ένα καινούργιο τρυβλίο με 2 ml θρεπτικού υλικού (αραίωση 1/20).

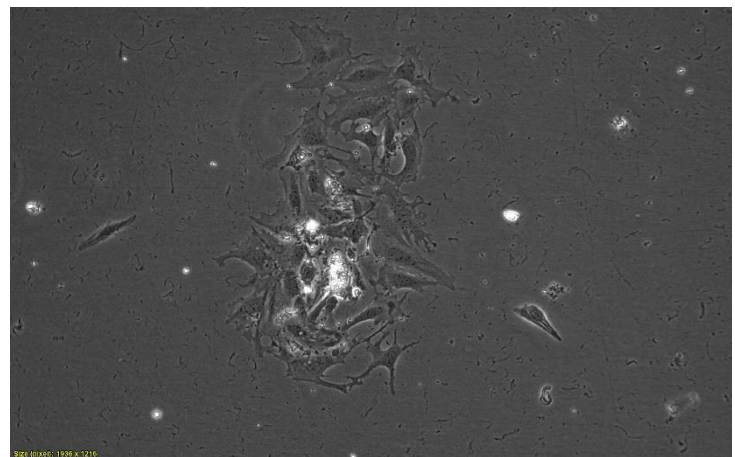
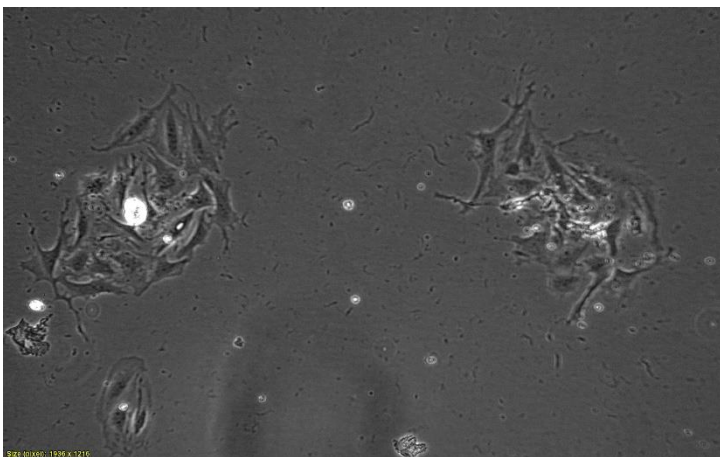
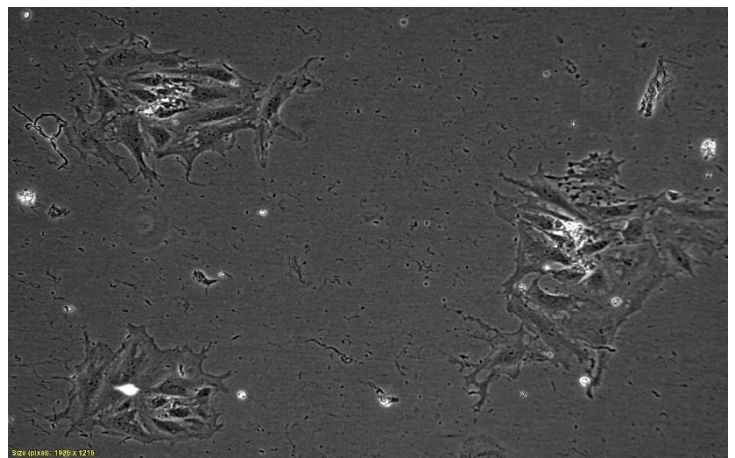
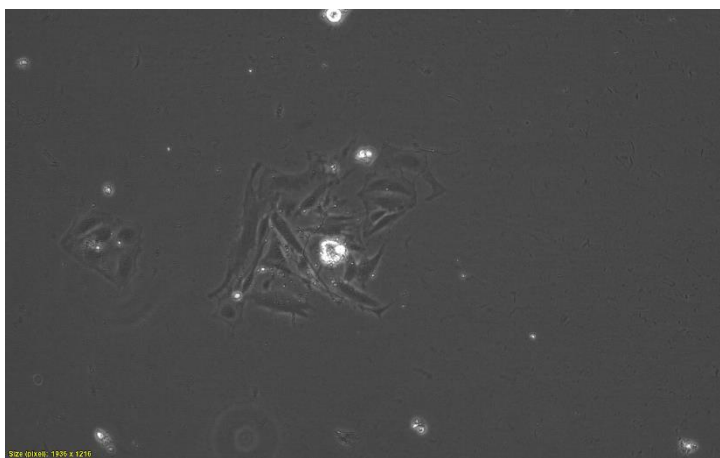
---

## **4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

---

### 3.1 Απομόνωση ενδοθηλιακών κυττάρων με χρήση δεξτράνης και επίστρωση με κολλαγόνο

Για την απομόνωση των κυττάρων στο συγκεκριμένο πείραμα έγινε επίστρωση μιας φλάσκας T-25 με κολλαγόνο. Τα κύτταρα απομονώθηκαν και διαχωρίστηκαν από τα κύτταρα με μυελίνη με τη χρήση δεξτράνης. Ο διαχωρισμός αυτός αποτελεί ένα σημαντικό βήμα κατά τη διαδικασία της απομόνωσης, έτσι ώστε να έχουμε ένα καθαρό πληθυσμό ενδοθηλιακών κυττάρων. Στη φλάσκα καλλιεργήθηκαν κύτταρα προερχόμενα από έναν εγκέφαλο ποντικού. Στις παρακάτω εικόνες από το μικροσκόπιο απεικονίζονται τα ενδοθηλιακά κύτταρα της καλλιέργειας.



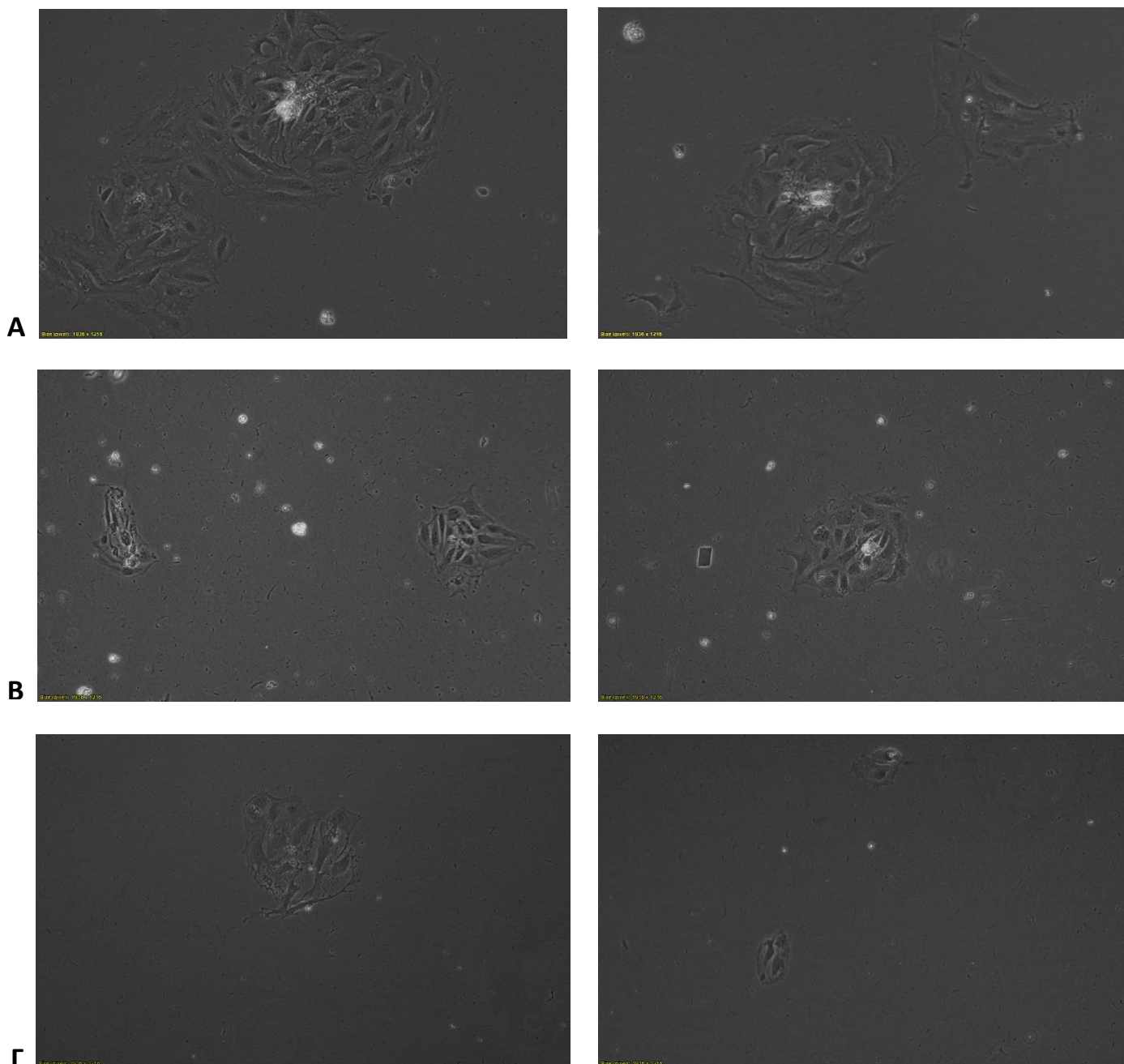
**Εικόνα 11.** Παρατήρηση ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω οπτικού μικροσκοπίου κατά την 6<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας. Οι παραπάνω φωτογραφίες έχουν ληφθεί με χρήση φακού με μεγέθυνση 20X.

Τα κύτταρα που έχουν απομονωθεί έχουν αρχίσει να δημιουργούν συστάδες αποκτώντας την επιθυμητή δομή ενδοθηλιακού κυττάρου. Ωστόσο, ο αριθμός των κυττάρων είναι πολύ μικρός, ενώ ταυτόχρονα φαίνεται να κινητοποιείται ήδη από την 6<sup>η</sup> ημέρα η διαδικασία της αποσύνθεσης και του κυτταρικού θανάτου. Συγκεκριμένα, μετά από παρατήρηση στο μικροσκόπιο

η δομή των κυττάρων έχει αρχίσει να αλλοιώνεται, γεγονός που πιθανώς προκαλείται από την περιορισμένη παρακρινή σηματοδότηση λόγω του μικρού αριθμού των κυττάρων.

### 3.2 Δοκιμή με διαφορετικές συγκεντρώσεις ηπαρίνης

Όπως και στο προηγούμενο πείραμα, τα κύτταρα και σε αυτή την περίπτωση απομονώθηκαν με τη χρήση δεξτράνης, ενώ η επίστρωση των φλασκών έχει γίνει επίσης με κολλαγόνο. Ωστόσο, σε αυτήν την πειραματική διαδικασία



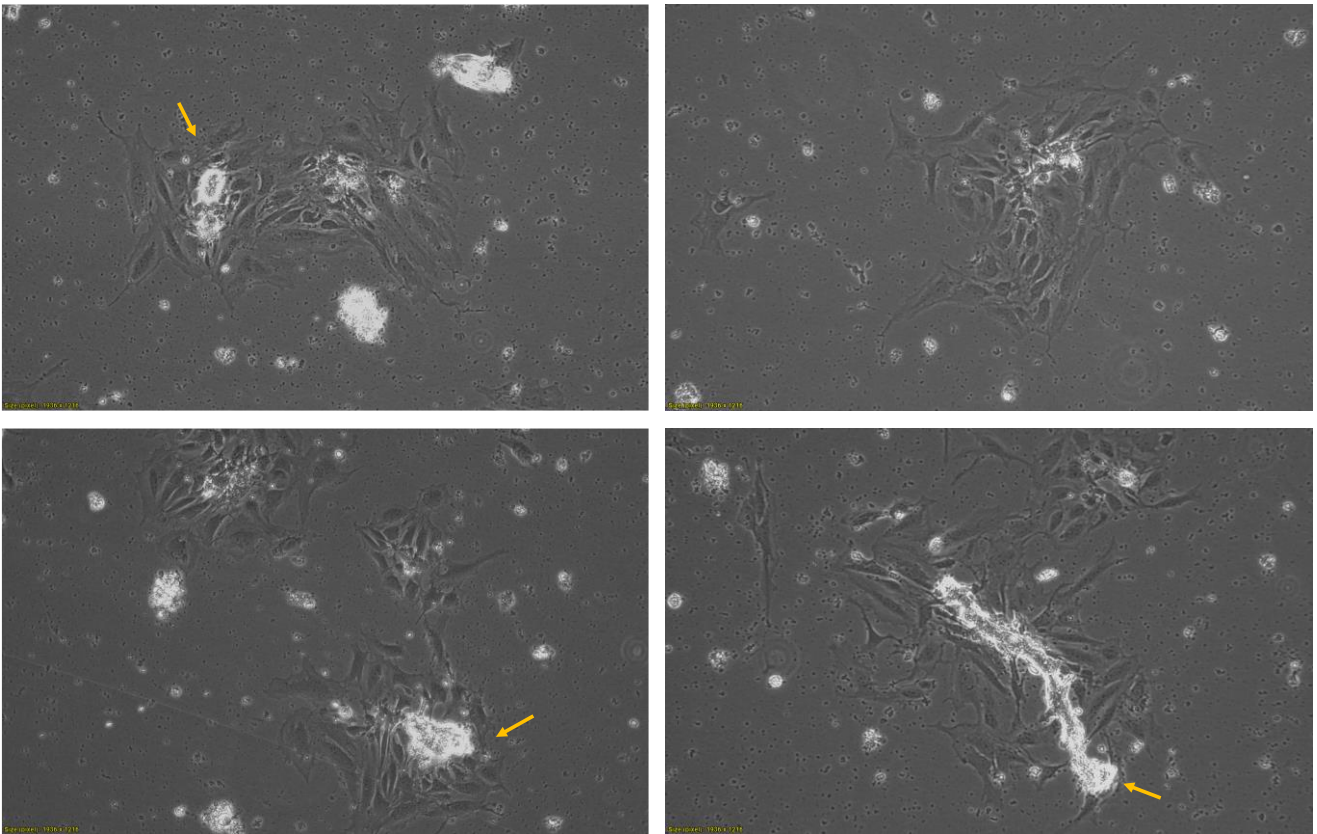
**Εικόνα 12.** Παρατήρηση ενδοθηλιακών κυττάρων κατά την 6<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας. Στην καλλιέργεια των εικόνων A στο θρεπτικό προστέθηκε ηπαρίνη σε συγκέντρωση 5 U/ml, σε εκείνη των B η ηπαρίνη βρισκόταν σε συγκέντρωση 15 U/ml, ενώ στη Γ σε 45 U/ml. Οι παραπάνω φωτογραφίες έχουν ληφθεί με χρήση φακού με μεγέθυνση 20X.



δοκιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις ηπαρίνης με σκοπό την εύρεση της βέλτιστης για την ανάπτυξη και διαίρεση των κυττάρων. Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν τρεις φλάσκες σε κάθε μια από τις οποίες στο θρεπτικό υλικό που προστέθηκε υπήρχε διαφορετική συγκέντρωση ηπαρίνης. Μετά από παρατήρηση στο μικροσκόπιο ήταν εμφανές ότι η συγκέντρωση 5 U/ml είναι η βέλτιστη για την επιβίωση των κυττάρων της καλλιέργειας και για την προαγωγή της ανάπτυξης και διαφοροποίησής τους. Στις εικόνες Α τα κύτταρα φαίνεται ότι έχουν προσκολληθεί στην επιφάνεια του πλαστικού της φλάσκας, δημιουργούν συστάδες και έχουν αποκτήσει την κατάλληλη διαμόρφωση. Αντίθετα, στις άλλες δύο καλλιέργειες όπου η ηπαρίνη βρίσκεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρούμε ότι ο αριθμός των κυττάρων είναι σημαντικά μικρότερος. Επίσης, έγινε επιπλέον δοκιμή και κάποιων μικρότερων τελικών συγκεντρώσεων ηπαρίνης (1 U/ml, 2,5U/ml), αλλά και μιας ενδιάμεσης (10 U/ml), οι οποίες όμως δεν ήταν εξίσου αποτελεσματικές με τη συγκέντρωση 5 U/ml.

### 3.3 Απομόνωση ενδοθηλιακών κυττάρων σε φλάσκα επιστρωμένη με κολλαγόνο IV και φιμπρονεκτίνη

Η απομόνωση των ενδοθηλιακών κυττάρων έγινε με δεξτράνη και η επίστρωση στη φλάσκα με κολλαγόνο IV και φιμπρονεκτίνη. Στη φλάσκα καλλιεργήθηκαν κύτταρα προερχόμενα από δύο εγκεφάλους ποντικιών. Στην πειραματική αυτή διαδικασία η τροποποίηση του πρωτοκόλλου αφορούσε την αλλαγή του υλικού επίστρωσης της φλάσκας. Με την αλλαγή αυτού του παράγοντα διερευνήθηκε το κατά πόσο το υλικό επίστρωσης επηρεάζει την πορεία της καλλιέργειας. Όπως φαίνεται στις παρακάτω φωτογραφίες από το μικροσκόπιο τα κύτταρα έχουν προσκολληθεί σε ικανοποιητικό βαθμό στην επιφάνεια της φλάσκας. Ο αριθμός των κυττάρων της καλλιέργειας είναι μεγαλύτερος σε σχέση με τον αντίστοιχο σε καλλιέργειες στις οποίες η επίστρωση γινόταν μόνο με κολλαγόνο. Επίσης, τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν δημιουργήσει συστάδες και ταυτόχρονα δεν έχει εκκινηθεί η διαδικασία της αποσύνθεσης. Ταυτόχρονα, φαίνεται ότι στην καλλιέργεια υπάρχουν θραύσματα αγγείων (κίτρινα βέλη), από όπου τα κύτταρα αρχίζουν να διαιρούνται και να δημιουργούν συστάδες, γεγονός που δεν παρατηρήθηκε στον ίδιο βαθμό στα προηγούμενα πρωτόκολλα. Επίσης σημαντικό είναι ότι με την καλλιέργεια κυττάρων προερχόμενων από δύο εγκεφάλους αντί για έναν σε μία φλάσκα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα πολλαπλασιάζονται με ταχύτερο ρυθμό και επιβιώνουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.



**Εικόνα 13.** Παρατήρηση ενδοθηλιακών κυττάρων κατά την 5<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας. Οι παραπάνω φωτογραφίες έχουν ληφθεί με χρήση φακού με μεγέθυνση 20X. Στα κίτρινα βέλη φαίνονται θραύσματα των αγγείων, από τα οποία έχουν ξεκινήσει να πολλαπλασιάζονται τα ενδοθηλιακά κύτταρα.

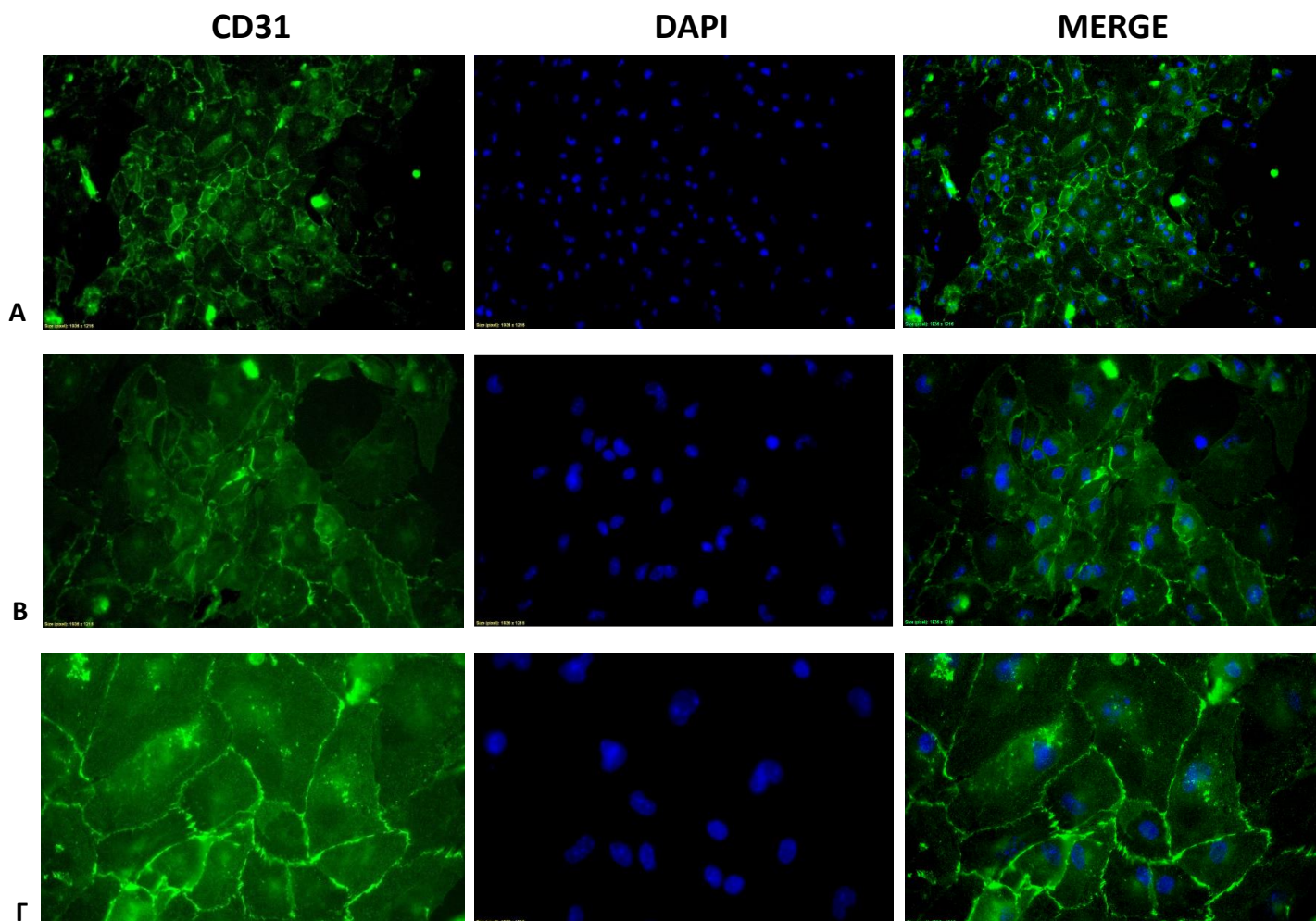
### 3.4 Ανοσοκυτταροχημεία ενδοθηλιακών κυττάρων

Στο πείραμα αυτό τα κύτταρα απομονώθηκαν με BSA. Η BSA (Bovine Serum Albumin) είναι μια πρωτεΐνη που καθιστά δυνατό τον διαχωρισμό των κυττάρων από τα κύτταρα με μυελίνη, δηλαδή τους νευρώνες. Μετά την απομόνωση των ενδοθηλιακών κυττάρων πραγματοποιήθηκε η χρώση τους (ανοσοκυτταροχημεία) την 22<sup>η</sup> μέρα, με σκοπό την ταυτοποίηση τους. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα CD31 και PMCA, που αποτελούν δείκτες για ενδοθηλιακά κύτταρα και εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Τα δευτερογενή τους αντισώματα εκπέμπουν ακτινοβολία στο πράσινο φως, γεγονός που καθιστά δυνατή την παρατήρηση των κυττάρων. Επίσης, χρησιμοποιείται ο φθορίζον ιχνηθέτης DAPI, ο οποίος σημαίνει ειδικά τους πυρήνες των κυττάρων καθώς δημιουργεί ισχυρούς δεσμούς με το DNA και εκπέμπει ακτινοβολία στο μπλε φως. Παρακάτω φαίνονται οι εικόνες από το μικροσκόπιο φθορισμού.

Όπως φαίνεται στις φωτογραφίες, η απομόνωση των ενδοθηλιακών κυττάρων ήταν επιτυχής, καθώς έχει γίνει χρώση τόσο των πυρήνων όσο και



των κυτταροπλασματικών μεμβρανών. Συγκεκριμένα, στη μεγέθυνση 60X τα ενδοθηλιακά κύτταρα οριοθετούνται ευκρινώς, ενώ στις εικόνες που έχουμε μεγέθυνση 20X είναι εμφανής η δημιουργία του επιθυμητού πλέγματος του ενδοθηλίου.

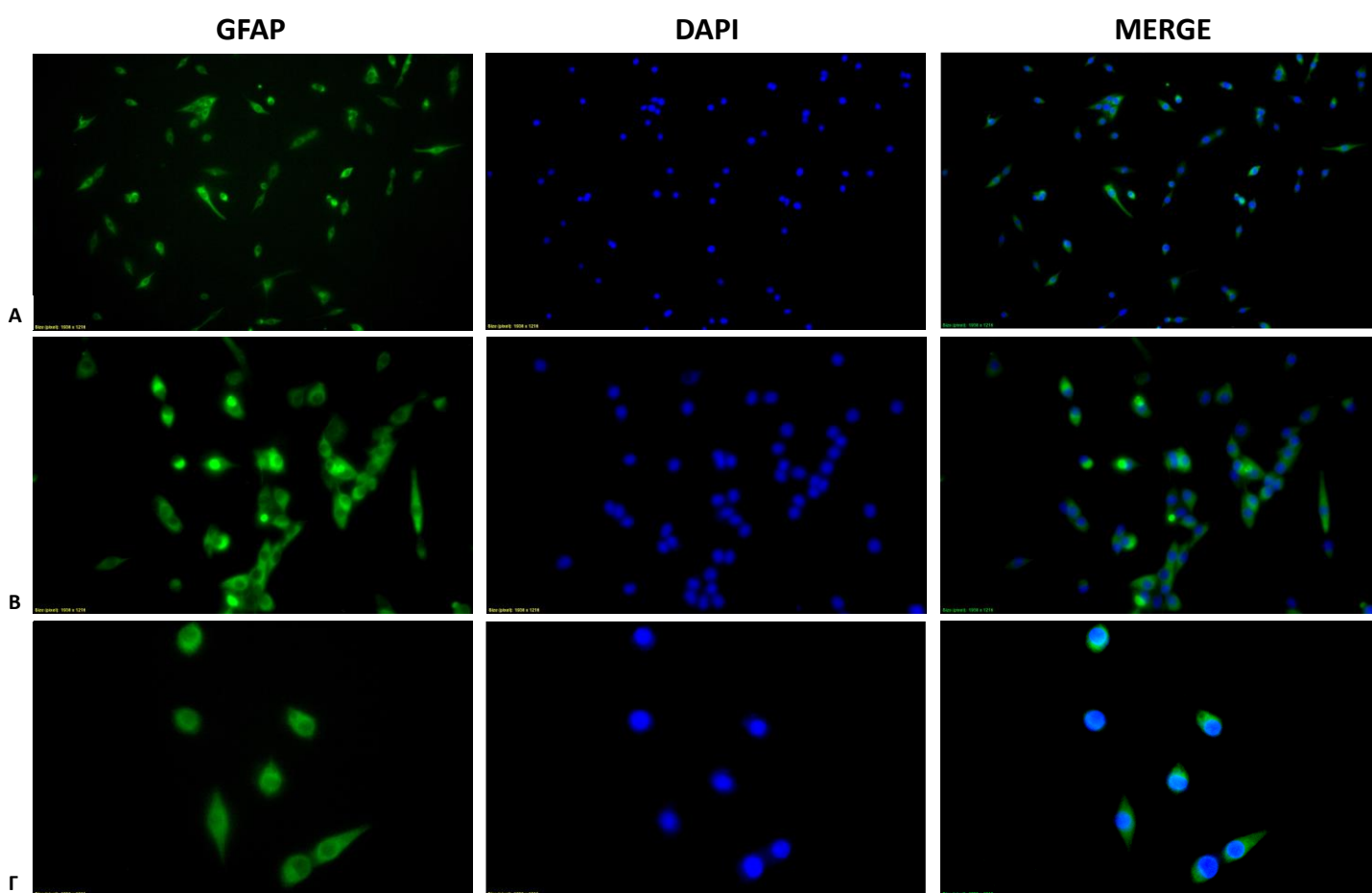


**Εικόνα 14.** Χρώση ενδοθηλιακών κυττάρων (ανοσοκυτταροχημεία) κατά την 22<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας. Χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα CD31, που είναι μάρτυρας για τα ενδοθηλιακά. Η χρώση των πυρήνων έχει γίνει με τη χρωστική DAPI. Οι φωτογραφίες A έχουν ληφθεί με χρήση φακού με μεγέθυνση 20X, οι B με 40X και οι Γ με 60X.

### 3.5 Ανοσοκυτταροχημεία κυττάρων C6

Το πρωτόκολλο της ανοσοκυτταροχημείας πραγματοποιήθηκε και στην καλλιέργεια των κυττάρων C6 που αποψύχθηκε από τους -80 °C, έτσι ώστε να ταυτοποιηθεί ότι η καλλιέργεια είναι καθαρή μόνο με αστροκύτταρα. Η κυτταρική σειρά C6 αποτελεί μια καρκινική κυτταρική σειρά προερχόμενη από νευρογλοιακά κύτταρα γλοιώματος αρουραίου. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα anti-GFAP και anti-Iba1. Η GFAP είναι πρωτεΐνη-δείκτης για τα αστροκύτταρα και το δευτερογενές της αντίσωμα εκπέμπει

ακτινοβολία στο πράσινο φως. Αντίθετα, η Iba1 είναι δείκτης για τα μικρογλοιακά κύτταρα και το δευτερογενές της αντίσωμα εκπέμπει στο κόκκινο φως. Όπως και στη χρώση των ενδοθηλιακών κυττάρων έτσι και σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήθηκε ο φθορίζον ανιχνευτής DAPI για τη χρώση των πυρήνων. Από την παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο φάνηκε ότι στην καλλιέργεια ο μοναδικός κυτταρικός τύπος που υπήρχε ήταν αυτός των αστροκυττάρων, καθώς ανιχνεύθηκε μόνο πράσινη χρώση και καθόλου κόκκινη. Συνεπώς, διαθέτουμε μια καθαρή καλλιέργεια αστροκυττάρων, η οποία στη συνέχεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε σύστημα transwell, για την κατασκευή του αιματοεγκεφαλικού φραγμού.



**Εικόνα 15.** Χρώση της κυτταρικής σειράς C6 (ανοσοκυτταροχημεία). Χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα GFAP, που αποτελεί μάρτυρα για τα αστροκύτταρα και Iba1, που είναι μάρτυρας για τη μικρογλοία. Η χρώση των πυρήνων έχει γίνει με τη χρωστική DAPI. Οι φωτογραφίες A έχουν ληφθεί με χρήση φακού με μεγέθυνση 20X, οι B με 40X και οι Γ με 60X. Η χρώση με Iba1 δεν έδωσε κάποιο αποτέλεσμα, γεγονός που φανερώνει ότι στην καλλιέργεια δεν υπήρχαν μικρογλοιακά κύτταρα, αλλά μόνο αστροκύτταρα.

---

## **5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

---

Όπως έχει καταστεί σαφές, οι θεραπευτικές επιλογές για την καταπολέμηση διαταραχών του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος είναι περιορισμένες λόγω της ύπαρξης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Έτσι, η κατασκευή ενός *in vitro* μοντέλου προσομοίωσής του μπορεί να παρουσιαστεί χρήσιμη για τη δοκιμή καινούριων φαρμάκων και την αντιμετώπιση τέτοιων ασθενειών. Η μεγαλύτερη πρόκληση στην ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού *in vitro* μοντέλου είναι οι καλλιέργειες των κυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν να είναι καθαρές, ώστε να επιτευχθεί μια υψηλή διαενδοθηλιακή ηλεκτρική αντίσταση με όσο το δυνατόν χαμηλή παθητική διαπερατότητα. Συνεπώς, η αξιοπιστία του συνίσταται στην ικανότητα αναπαραγωγής των φυσιολογικών και βιολογικών χαρακτηριστικών της αρχιτεκτονικής τους σε έναν ζωντανό οργανισμό (Nozohouri, Noorani, Al-Ahmad, & Abbruscato, 2021).

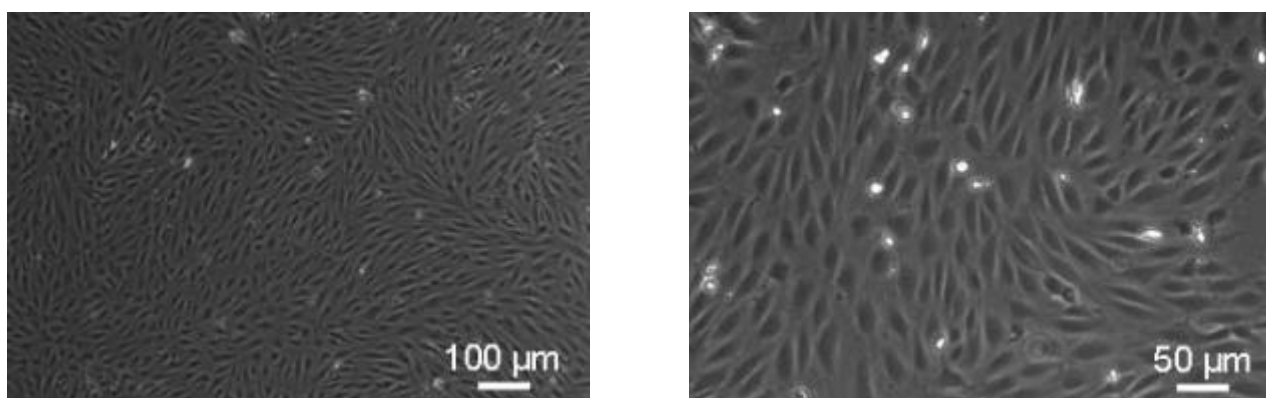
Ένα πολύ σημαντικό βήμα για τη δημιουργία ενός *in vitro* κυτταρικού συστήματος προσομοίωσης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού είναι η επιτυχής απομόνωση των ενδοθηλιακών κυττάρων του εγκεφάλου. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού λαμβάνονται υπόψη σημαντικές παράμετροι όπως για παράδειγμα η επιλογή της κατάλληλης ηλικίας των πειραματόζωνων, το υλικό επίστρωσης της φλάσκας για την προσκόλληση των κυττάρων, η ποσότητα των κυττάρων της καλλιέργειας, αλλά και η καθαρότητά της (Wilhelm et al., 2011).

Αρχικά, πρέπει να γίνει η επιλογή της πηγής που θα προμηθεύσει τα επιθυμητά κύτταρα για την κατασκευή του *in vitro* συστήματος. Συγκεκριμένα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ενδοθηλιακά κύτταρα από κυτταρικές σειρές, πρωτογενή κύτταρα ή ολοδύναμα βλαστοκύτταρα. Η χρήση πρωτογενούς καλλιέργειας για την κατασκευή ενός *in vitro* μοντέλου αποτελεί προτιμότερη επιλογή σε σχέση με μια κυτταρική σειρά. Αυτό συμβαίνει γιατί παρόλο που η απομόνωσή τους είναι πιο ακριβή και χρονοβόρα, τα πρωτογενή κύτταρα προσομοιάζουν σε μεγαλύτερο βαθμό τις *in vivo* συνθήκες (Bernard-Patrzynski et al., 2019). Στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής εργασίας, θυσιάστηκαν θηλυκά ποντίκια 2 μηνών για την απόκτηση πρωτογενών ενδοθηλιακών κυττάρων. Παρόλο που η απομόνωση των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι εφικτή, η χαμηλή απόδοση καλλιεργείων από τέτοια είδη μπορεί να αποτελέσει εμπόδιο στις πειραματικές διαδικασίες κατά την κατασκευή τέτοιων συστημάτων (Helms et al., 2016).

Επίσης, μια πρωτογενής καλλιέργεια είναι δύσκολο να διατηρηθεί καθαρή χωρίς επιμολύνσεις, ενώ ταυτόχρονα είναι πιθανό να χαθούν γρήγορα τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του φραγμού (Nozohouri et al., 2021). Για τη

διασφάλιση της ύπαρξης μιας καθαρής καλλιέργειας χρησιμοποιούνται τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη, αλλά και πουρομυκίνη τις πρώτες δύο ημέρες, καθώς πρόκειται για ένα αντιβιοτικό που μπορεί να οδηγήσει σε καθαρότητα της καλλιέργειας της τάξεως του 95-99% (Bernard-Patrzynski et al., 2019). Με αυτόν τον τρόπο, εξασφαλίζεται η αποφυγή επιμολύνσεων στην καλλιέργεια. Ταυτόχρονα, σημαντικό είναι να λάβουμε μόνο τον επιθυμητό κυτταρικό τύπο, δηλαδή τα ενδοθηλιακά κύτταρα, κατά την εκτέλεση των μεθόδων απομόνωσης. Συνεπώς, για την απομάκρυνση των κυττάρων με μυελίνη ακολουθήθηκε ένα πρωτόκολλο με αλβουμίνη (BSA) και ένα με δεξτράνη (dextran). Εν τέλει, φάνηκε ότι και τα δύο πρωτόκολλα ήταν εξίσου αποτελεσματικά ως προς αυτή την παράμετρο, αφού δεν λήφθηκαν νευρώνες στην καλλιέργεια μετά την ολοκλήρωση της απομόνωσης.

Η λειτουργία του φραγμού που επάγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα ρυθμίζεται σε πολύ μεγάλο βαθμό από το μικροπεριβάλλον των κυττάρων (Neuhaus, 2021). Έτσι, εκτός από την ύπαρξη μιας καθαρής καλλιέργειας μεγάλη σημασία έχει και η πυκνότητα των κυττάρων στην καλλιέργεια αυτή. Σύμφωνα με τα πειράματα που διεξήχθησαν, η συγκέντρωση των κυττάρων στη φλάσκα φάνηκε να παίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωσή τους. Σε πειράματα στα οποία σε μία φλάσκα καλλιεργούνταν κύτταρα προερχόμενα από έναν εγκέφαλο τα κύτταρα οδηγούνταν σε κυτταρικό θάνατο αρκετά σύντομα (συνήθως σε διάστημα 6 ημερών). Αντίθετα, σε πειράματα όπου καλλιεργήθηκαν κύτταρα που απομονώθηκαν από 2 ή 3 εγκέφαλους σε μια φλάσκα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα παρέμειναν ζωντανά για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (πάνω από 14 ημέρες). Επομένως, το γεγονός ότι τα κύτταρα είναι πιο πυκνά στην καλλιέργεια συμβάλλει στην επιβίωσή τους λόγω παρακρινών παραγόντων που εκκρίνονται από τα ίδια και σηματοδοτικών μονοπατιών που επηρεάζουν τον κύκλο ζωής τους.



**Εικόνα 11.** Καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων από αρουραίο. Τα κύτταρα της καλλιέργειας είναι πολύ πυκνά μεταξύ τους, γεγονός που ευνοεί την επιβίωσή τους (Wilhelm, Fazakas, & Krizbai, 2011).

Επίσης, πολύ καθοριστικό βήμα για την καλλιέργεια είναι το υλικό επίστρωσης των φλασκών (coating), ώστε τα ενδοθηλιακά κύτταρα να προσκολληθούν για να λάβουν την σωστή δομή και να αρχίσουν να πολλαπλασιάζονται. Η επιλογή αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς σε περίπτωση που τα κύτταρα δεν έχουν καταφέρει να προσκολληθούν στη φλάσκα μετά την αλλαγή του θρεπτικού μέσου, που γίνεται την επόμενη ημέρα από εκείνη της απομόνωσης, αυτά χάνονται. Έτσι, σύμφωνα με τα όσα ειπώθηκαν σχετικά με την αναγκαιότητα ύπαρξης μιας πυκνής σε κύτταρα καλλιέργειας, εάν τα κύτταρα δεν έχουν προσκολληθεί τότε οι πιθανότητες επιβίωσής τους είναι περιορισμένες λόγω περιορισμένης σηματοδότησης. Σε γενικές γραμμές, η επίστρωση της φλάσκας είναι απαραίτητο να γίνει με ένα υλικό το οποίο να προσομοιάζει τη σύσταση της βασικής αγγειακής μεμβράνης. Γι' αυτό, ιδανικά επιτακτικό είναι να χρησιμοποιείται κολλαγόνο τύπου IV και φιμπρονεκτίνη (Wilhelm & Krizbai, 2014). Στα πειράματα στα οποία δε χρησιμοποιήθηκε ο κατάλληλος τύπος κολλαγόνου, η απόδοση της καλλιέργειας ήταν πολύ χαμηλή, καθώς τα κύτταρα δεν κατάφεραν να προσκολληθούν με αποτέλεσμα κατά την αλλαγή θρεπτικού υλικού να χάνονται. Αντίθετα, όταν για την επίστρωση (coating) χρησιμοποιήθηκε κολλαγόνο τύπου IV και φιμπρονεκτίνη ένας σημαντικά μεγαλύτερος αριθμός κυττάρων κατάφερε να προσκολληθεί. Κατά συνέπεια, η πυκνότητα των κυττάρων στη φλάσκα ήταν ιδιαίτερα αυξημένη και επομένως υπήρχε μια επαρκής σηματοδότηση μεταξύ των κυττάρων για την επιτυχή ανάπτυξη και επιβίωσή τους.

Συμπερασματικά, οι παράμετροι που πρέπει να ληφθούν υπόψιν στο πρωτόκολλο είναι πολλές. Λόγω του περιορισμένου αριθμού ενδοθηλιακών κυττάρων δεν ήταν δυνατή η κατασκευή του φραγμού σε σύστημα transwell. Ωστόσο, βάσει των παραπάνω ευρημάτων είναι δυνατή η βελτίωση του πρωτοκόλλου απομόνωσης, ώστε να έχουμε έναν ικανό αριθμό κυττάρων για την αναπαραγωγή του επιθυμητού αυτού κυτταρικού συστήματος.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abbott, N. J., Patabendige, A. A., Dolman, D. E., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*, *37*(1), 13-25. doi:10.1016/j.nbd.2009.07.030
- Abbott, N. J., Ronnback, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, *7*(1), 41-53. doi:10.1038/nrn1824
- Ayloo, S., & Gu, C. (2019). Transcytosis at the blood-brain barrier. *Curr Opin Neurobiol*, *57*, 32-38. doi:10.1016/j.conb.2018.12.014
- Ballabh, P., Braun, A., & Nedergaard, M. (2004). The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis*, *16*(1), 1-13. doi:10.1016/j.nbd.2003.12.016
- Bernard-Patrzynski, F., Lecuyer, M. A., Puscas, I., Boukhatem, I., Charabati, M., Bourbonniere, L., . . . Roullin, V. G. (2019). Isolation of endothelial cells, pericytes and astrocytes from mouse brain. *PLoS One*, *14*(12), e0226302. doi:10.1371/journal.pone.0226302
- Cipolla, M. J. (2009). In *The Cerebral Circulation*. San Rafael (CA).
- Daneman, R., & Prat, A. (2015). The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *7*(1), a020412. doi:10.1101/cshperspect.a020412
- ElAli, A., Theriault, P., & Rivest, S. (2014). The role of pericytes in neurovascular unit remodeling in brain disorders. *Int J Mol Sci*, *15*(4), 6453-6474. doi:10.3390/ijms15046453
- Engelhardt, B., & Sorokin, L. (2009). The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin Immunopathol*, *31*(4), 497-511. doi:10.1007/s00281-009-0177-0
- Helms, H. C., Abbott, N. J., Burek, M., Cecchelli, R., Couraud, P. O., Deli, M. A., . . . Brodin, B. (2016). In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J Cereb Blood Flow Metab*, *36*(5), 862-890. doi:10.1177/0271678X16630991
- Jackson, S., Meeks, C., Vezina, A., Robey, R. W., Tanner, K., & Gottesman, M. M. (2019). Model systems for studying the blood-brain barrier: Applications and challenges. *Biomaterials*, *214*, 119217. doi:10.1016/j.biomaterials.2019.05.028
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. (2000). *Principles of neural science* (4th ed.). New York: McGraw-Hill, Health Professions Division.
- Keaney, J., & Campbell, M. (2015). The dynamic blood-brain barrier. *FEBS J*, *282*(21), 4067-4079. doi:10.1111/febs.13412
- Langen, U. H., Ayloo, S., & Gu, C. (2019). Development and Cell Biology of the Blood-Brain Barrier. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *35*, 591-613. doi:10.1146/annurev-cellbio-100617-062608
- Liebner, S., Dijkhuizen, R. M., Reiss, Y., Plate, K. H., Agalliu, D., & Constantin, G. (2018). Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease. *Acta Neuropathol*, *135*(3), 311-336. doi:10.1007/s00401-018-1815-1
- Linnerbauer, M., & Rothhammer, V. (2020). Protective Functions of Reactive Astrocytes Following Central Nervous System Insult. *Front Immunol*, *11*, 573256. doi:10.3389/fimmu.2020.573256
- Naik, P., & Cucullo, L. (2012). In vitro blood-brain barrier models: current and perspective technologies. *J Pharm Sci*, *101*(4), 1337-1354. doi:10.1002/jps.23022
- Neuhaus, W. (2021). In Vitro Models of the Blood-Brain Barrier. *Handb Exp Pharmacol*, *265*, 75-110. doi:10.1007/164\_2020\_370
- Nozohouri, S., Noorani, B., Al-Ahmad, A., & Abbruscato, T. J. (2021). Estimating Brain Permeability Using In Vitro Blood-Brain Barrier Models. *Methods Mol Biol*, *2367*, 47-72. doi:10.1007/7651\_2020\_311

- Pulgar, V. M. (2018). Transcytosis to Cross the Blood Brain Barrier, New Advancements and Challenges. *Front Neurosci*, *12*, 1019. doi:10.3389/fnins.2018.01019
- Serlin, Y., Shelef, I., Knyazer, B., & Friedman, A. (2015). Anatomy and physiology of the blood-brain barrier. *Semin Cell Dev Biol*, *38*, 2-6. doi:10.1016/j.semcdb.2015.01.002
- Sivandzade, F., & Cucullo, L. (2018). In-vitro blood-brain barrier modeling: A review of modern and fast-advancing technologies. *J Cereb Blood Flow Metab*, *38*(10), 1667-1681. doi:10.1177/0271678X18788769
- Srinivasan, B., Kolli, A. R., Esch, M. B., Abaci, H. E., Shuler, M. L., & Hickman, J. J. (2015). TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom*, *20*(2), 107-126. doi:10.1177/2211068214561025
- Sweeney, M. D., Sagare, A. P., & Zlokovic, B. V. (2018). Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol*, *14*(3), 133-150. doi:10.1038/nrneurol.2017.188
- Thomsen, M. S., Routhe, L. J., & Moos, T. (2017). The vascular basement membrane in the healthy and pathological brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, *37*(10), 3300-3317. doi:10.1177/0271678X17722436
- Vander, A. J., Sherman, J. H., & Luciano, D. S. (2001). *Human physiology : the mechanisms of body function* (8th ed.). Boston: McGraw-Hill.
- Wang, Y., Wang, N., Cai, B., Wang, G. Y., Li, J., & Piao, X. X. (2015). In vitro model of the blood-brain barrier established by co-culture of primary cerebral microvascular endothelial and astrocyte cells. *Neural Regen Res*, *10*(12), 2011-2017. doi:10.4103/1673-5374.172320
- Wilhelm, I., Fazakas, C., & Krizbai, I. A. (2011). In vitro models of the blood-brain barrier. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, *71*(1), 113-128.
- Wilhelm, I., & Krizbai, I. A. (2014). In vitro models of the blood-brain barrier for the study of drug delivery to the brain. *Mol Pharm*, *11*(7), 1949-1963. doi:10.1021/mp500046f
- Xu, L., Nirwane, A., & Yao, Y. (2019). Basement membrane and blood-brain barrier. *Stroke Vasc Neurol*, *4*(2), 78-82. doi:10.1136/svn-2018-000198
- Zenaro, E., Piacentino, G., & Constantin, G. (2017). The blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*, *107*, 41-56. doi:10.1016/j.nbd.2016.07.007
- Zhang, Z. S., Zhou, H. N., He, S. S., Xue, M. Y., Li, T., & Liu, L. M. (2020). Research advances in pericyte function and their roles in diseases. *Chin J Traumatol*, *23*(2), 89-95. doi:10.1016/j.cjtee.2020.02.006
- Zlokovic, B. V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, *57*(2), 178-201. doi:10.1016/j.neuron.2008.01.003