

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA” DIN BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
FIZIOPATOLOGIE**

***Rolul AQP-4 în menținerea echilibrului hidric la nivel
cerebral***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. DANIELA ADRIANA ION**

**Doctorand:
POPESCU ELENA SILVIA**

2017

Doresc să adresez mulțumiri doamnei Profesor Universitar Doctor Daniela Adriana Ion, care mi-a coordonat cu profesionalism și bunăvoință teza de doctorat precum și Laboratorului de Medicină Experimentală și Cercetare Fundamentală din Departamentul II de Fiziopatologie al Universității de Medicină și Farmacie Carol Davila, București.

De asemenea, doresc să mulțumesc domnului Profesor Universitar Doctor Nicolae Daniel Pirici, domnului Profesor Universitar Doctor Laurențiu Mogoantă, precum și tuturor colegilor din Centrul de Cercetare Pentru Morfologie Microscopică și Imunologie și din Departamentele de Anatomie, Fiziologie, Histologie, Anatomie Patologică și Medicină Internă ale Universității de Medicină și Farmacie din Craiova pentru sprijinul permanent și necondiționat pe care mi l-au oferit pe parcursul realizării acestei lucrări.

Mulțumesc doamnei Profesor Universitar Doctor Sabina Andrada Zurac și colegelor din Laboratorul de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic Colentina, doamnele doctor Cristiana Gabriela Popp și Mirela-Daniela Cioplea precum și doamnei Alina Culia, care m-au sprijinit în realizarea lucrării.

Mulțumesc domnului Profesor Mart Saarma și doamnei cercetător științific Yulia Sidorova din cadrul Laboratorului de Neuroștiințe al Institutului de Biotehnologie, Universitatea din Helsinki, Finlanda, care m-au ajutat în vara anului 2015 să învăț câteva tehnici de imunohistochimie ce mi-au fost foarte utile.

Mulțumesc de asemenea doamnelor cercetător științific Carmen Cristina Diaconu de la Institutul de Virusologie Ștefan Nicolau, doamnei Florina Raicu și domnului Relu Cocos, cercetători științifici la Catedra de Genetică a UMF Carol Davila, doamnei doctor Florina Mihaela Nedelea, medic primar genetician la Spitalul Clinic de Obstetrică și Ginecologie Filantropia, precum și doamnelor doctor Marina Ruxandra Oțelea, Elena Bălășescu și domnului doctor Mihai Lazăr și tuturor celorlalți colegi din Departamentul II de Fiziopatologie pentru sprijinul și bunăvoința pe care mi le-au arătat.

Mulțumesc de asemenea părinților mei Elena și George Popescu, care m-au sprijinit în realizarea acestei teze și m-au încurajat și ajutat întotdeauna să depășesc toate obstacolele.

Cuprins

I. Partea generală.....	pag. 11
1. Accidentul vascular cerebral.....	pag. 11
1.1. AVC – generalități.....	pag. 11
1.1.1.AVC - definiție.....	pag. 11
1.1.2.AVC – clasificare în funcție de etiologie.....	pag. 11
1.1.3.AVC –fiziopatologie.....	pag. 12
1.1.4.AVC – semne și simptome.....	pag. 12
1.1.5.AVC – epidemiologie.....	pag. 12
1.1.6.AVC – prevenție.....	pag. 12
1.1.7.AVC – tratament.....	pag. 13
1.1.8.AVC – noțiuni de histopatologie.....	pag. 13
2. Edemul cerebral.....	pag. 14
2.1. Edemul cerebral – generalități.....	pag. 14
2.2. Clasificarea in funcție de etiologie a tipurilor de edem cerebral.....	pag. 15
2.3. Diagnosticul edemului cerebral.....	pag. 15
2.4. Tratamentul edemului cerebral.....	pag. 15
2.5. Mecanisme de formare a edemelor vasogenic și citotoxic și metode experimentale de prevenție a acestora.....	pag. 16

2.5.1. Edemul citotoxic – mecanisme de formare și metode experimentale de prevenire a producerii sale.....	pag. 16
2.5.2. Edemul vasogenic – mecanisme de formare și metode experimentale de prevenire a producerii sale.....	pag. 16
3. Noțiuni de histologie a sistemului nervos central.....	pag. 17
3.1. Tipuri de celule prezente la nivelul sistemului nervos central.....	pag. 17
3.1.1. Celulele gliale.....	pag. 17
3.1.2. Neuronii.....	pag. 17
3.1.2.1. Proteina GAP-43.....	pag. 18
3.2. Învelișurile meningeale ale sistemului nervos central.....	pag. 18
4. Aquaporinele – prezentare generală.....	pag. 19
4.1. Definiție.....	pag. 19
4.2. Izoforme.....	pag. 19
4.3. Distribuție.....	pag. 19
4.4. Structura.....	pag. 20
4.5. Alte funcții.....	pag. 20
5. AQP-4.....	pag. 20
5.1. Generalități.....	pag. 20
5.2. Localizare.....	pag. 21
5.3. Structura.....	pag. 21
5.4. Formațiunile ortogonale de particule (OAP).....	pag. 21
5.5. Complexul DAPC.....	pag. 22
5.6. Expresia AQP-4 la nivelul SNC.....	pag. 22

5.7. Rolul AQP-4 în producerea edemului cerebral.....	pag. 23
5.8. Alte roluri ale AQP-4.....	pag. 23
5.9. Rolul AQP-4 în neuroinflamație.....	pag. 24
5.10. Inhibitorii AQP-4 cunoscuți până în prezent.....	pag. 25
6. Relația dintre AQP-4 și alte proteine localizate la nivel cerebral.....	pag. 26
6.1 Endoglina.....	pag. 26
6.2. Canalele de potasiu.....	pag. 26
6.2.1. Canalele de potasiu Kir.....	pag. 27
6.2.1.1. Canalele de potasiu Kir 4.1.....	pag. 27
6.3. Alfa sintrofina.....	pag. 28
6.4. GFAP (glial fibrillary acidic protein).....	pag. 28
7. Corpii amilacei.....	pag. 28
II. Partea specială.....	pag. 29
1. Scopul, obiectivele și etapele studiului.....	pag. 29
2. Material și metodă.....	pag. 31
2.1. Material și metoda folosite în prima etapa a studiului.....	pag. 31
2.1.1. Colectarea și prelucrarea materialului de studiu.....	pag. 31
2.1.1.1. Fixarea în formol a țesutului cerebral.....	pag. 31
2.1.1.2. Includerea țesutului în parafină.....	pag. 31
2.1.1.3. Realizarea de secțiuni din blocurile de parafină.....	pag. 32
2.1.1.4. Deparafinarea și rehidratarea secțiunilor.....	pag. 32
2.1.1.5. Colorarea hematoxin-eozină a secțiunilor.....	pag. 32

2.1.2. Selectarea celor mai relevante blocuri și secțiuni din totalul materialului disponibil.....	pag. 32
2.1.3. Marcarea imunohistochimică a secțiunilor subțiri.....	pag. 32
2.1.3.1. Deparafinizarea și rehidratarea lamelor.....	pag. 32
2.1.3.2. Etalarea antigenului (antigen retrieval).....	pag. 33
2.1.3.3. Blocarea activității peroxidazei endogene.....	pag. 33
2.1.3.4. Blocarea legării nespecifice a anticorpilor.....	pag. 33
2.1.3.5. Incubarea cu anticorp primar.....	pag. 33
2.1.3.6. Detecția semnalului folosind peroxidaza.....	pag. 33
2.1.3.7. Colorarea hematoxin-eozina.....	pag. 33
2.1.3.8. Montarea lamelor.....	pag. 33
2.1.4. Dubla imunomarcare a secțiunilor groase.....	pag. 33
2.1.5. Analiza lamelor la microscop și preluarea și prelucrarea de imagini.....	pag. 34
2.1.6. Analiza imaginilor preluate.....	pag. 34
2.2. Material și metoda folosite în cea de-a doua etapă a studiului.....	pag. 34
2.2.1. Obținerea acordului aparținătorilor și a acordului de etică. Criterii de selecție a lotului de studiu.....	pag. 34
2.2.1.1. Selectarea lamelor și marcarea, pe lame, a zonelor de țesut cerebral ischemic și a zonelor controlaterale, neafectate de ischemie.....	pag. 34
2.2.2. Realizarea de blocuri și lame multitisulare.....	pag. 34
2.2.3. Deparafinarea și rehidratarea lamelor multitisulare obținute în vederea imunomarcării.....	pag. 35
2.2.4. Stabilirea diluțiilor optime ale anticorpilor primari.....	pag. 35

2.2.5. Anticorpii primari utilizați.....	pag. 35
2.2.6. Imunomarcarea și counterstainingul lamelor multitisulare.....	pag. 36
2.2.7. Prelevarea și prelucrarea imaginilor de microscopie.....	pag. 36
2.2.8. Preluarea și prelucrarea imaginilor de microscopie. Interpretarea rezultatelor.....	pag. 36
2.3. Material și metoda folosite în cea de-a treia etapă a studiului.....	pag. 37
2.3.1. Animalele utilizate.....	pag. 37
2.3.2. Efectuarea intervenției chirurgicale.....	pag. 37
2.3.3. Prepararea TGN-020 și tratamentul cu acest inhibitor.....	pag. 37
2.3.4. Anestezierea și perfuzia cu formalină a animalelor.....	pag. 37
2.3.4.1. Pregătirea sistemului de perfuzie.....	pag. 37
2.3.4.2. Efectuarea intervenției chirurgicale în vederea perfuziei.....	pag. 37
2.3.4.3. Realizarea perfuziei cu soluție fixatoare.....	pag. 37
2.3.4.4. Disecția animalului și prelevarea creierului.....	pag. 37
2.3.5. Scanarea ex-vivo a întregii suprafețe a creierului animalului.....	pag. 37
2.3.6. Fixarea creierului animalului.....	pag. 37
2.3.7. Includerea în parafină a creierului animalului.....	pag. 38
2.3.8. Secționarea blocurilor de parafină.....	pag. 38
2.3.9. Colorarea hematoxin-eozină a secțiunilor.....	pag. 38
2.3.10. Marcarea imunohistochimică a secțiunilor.....	pag. 38
2.3.10.1. Selectarea secțiunilor destinate a fi analizate.....	pag. 38
2.3.10.2. Procesarea și marcarea imunohistochimică a secțiunilor selectate.....	pag. 38
2.3.11. Scanarea secțiunilor imunomarcate și colorate hematoxin-eozină.....	pag. 38
2.3.12. Analiza imagistică și volumetrică a secțiunilor.....	pag. 38

3. Rezultate.....	pag. 39
3.1. Rezultate obținute în prima etapă a studiului.....	pag. 39
3.1.1. Rezultate obținute în urma analizei secțiunilor subțiri.....	pag. 39
3.1.2. Rezultate obținute în urma analizei secțiunilor groase.....	pag. 40
3.2. Rezultate obținute în cea de-a doua etapă a studiului.....	pag. 41
3.3. Rezultate obținute în cea de-a treia etapă a studiului.....	pag. 46
4. Discuții.....	pag. 50
4.1. Discuții privind prima etapă a studiului.....	pag. 50
4.2. Discuții privind etapa a II-a a studiului.....	pag. 53
4.3. Discuții privind etapa a III-a a studiului.....	pag. 57
5. Concluzii.....	pag. 60
5.1.1. Concluzii privind prima etapă a studiului.....	pag. 60
5.1.1. Concluzii privind analiza secțiunilor subțiri.....	pag. 61
5.1.2. Concluzii privind analiza secțiunilor groase.....	pag. 61
5.2. Concluzii privind a doua etapă a studiului.....	pag. 62
5.3. Concluzii privind a treia etapă a studiului.....	pag. 63
5.4. Contribuții personale.....	pag. 65
Bibliografie.....	pag. 66

LISTA PUBLICAȚIILOR

rezultate în urma cercetării științifice din programul de studii doctorale

Articole

1. Pirici I, Mărgăritescu C, Mogoantă L, Petrescu F, Simionescu CE, Popescu ES, Cecoltan S, Pirici D. Corpora amylacea in the brain form highly branched three-dimensional lattices. Rom J Morphol Embryol. 2014. 55(3 Suppl): 1071-1077.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25607387>
2. Popescu ES, Pirici I, Ciurea RN, Bălșeanu TA, Cătălin B, Mărgăritescu C, Mogoantă L, Hostiuc S, Pirici D. Three-dimensional organ scanning reveals brain edema reduction in a rat stroke treated with an aquaporin 4 inhibitor. Rom J Morphol Embryol. 2017. 58(1): 59-66.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28523299>
3. Popescu ES, Pirici D, Zurac SA, Ion DA: Aqp-4 and its role in maintaining the hydric balance in the brain. RJN. 2017. 16 : 2 (39-45).
https://view.publitas.com/amph/rjn_2017_2_art-01/page/1

Prezentări

1. The role of AQP-4 in maintaining the hydric balance in the brain. Congresul Național de Fiziopatologie (Congresul Societății Române de Fiziopatologie – SRFP), Iași, mai 2015.
2. Stagiul de mobilitate doctorală 7 iulie-30 septembrie 2015, Institutul de Biotehnologie, Helsinki, Finlanda. Conferința finală a proiectului „Cercetarea doctorală și postdoctorală prioritate a învățământului superior românesc (Doc-Postdoc) ”, București, 26 noiembrie 2015.
3. AQP-4 și rolul său în accidentul vascular cerebral. Conferința finală a proiectului „Cercetarea doctorală și postdoctorală prioritate a învățământului superior românesc (Doc-Postdoc) ”, București, 27 noiembrie 2015.

Rezumate publicate

1. Elena Silvia Popescu, Nicolae Daniel Pirici, Carmen Cristina Diaconu, Daniela Adriana Ion. Rolul AQP-4 în menținerea echilibrului hidric la nivel cerebral. / The role of AQP-4 in maintaining the hydric balance in the brain. Rezumatele lucrărilor Congresului Național de Fiziopatologie cu participare internațională „Clasic și modern în fiziopatologie”, Iași, 7-10 mai 2015.

LISTA DE ABREVIERI

- **A** – Aria
- **ACM** – artera cerebrală medie
- **ADH** - antidiuretic hormone, hormon antidiuretic
- **ANOVA** – analysis of variance, analiza variației
- **AQP** - aquaporină
- **ASIC** - acid-sensing ion channels, canalele ionice sensibile la variații de pH
- **ATP** - adenzin trifosfat
- **AVC** - accident vascular cerebral
- **BDNF** – brain-derived neurotrophic factor, factorul neurotrofic derivat de la nivelul creierului
- **BIR** – Baculovirus IAP Repeat, domeniul cu repetiție de tip IAP al baculovirusului
- **CD 105** – cluster of differentiation 105, moleculă de suprafață utilizată în diferențierea celulară
- **CO₂** – dioxid de carbon
- **CT** - Computer Tomography, tomografie computerizată
- **CXCR4** – C-X-C motif chemokine ligand 12, ligandul 12 al chemokinei cu motiv C-X-C
- **DAB** – 3,3'-diaminobenzidină
- **DAPC** – dystrophin-associated protein complex, complexul proteic asociat distrofinei
- **DPX** – distiren, plastifiant, xilen (soluție de montare)
- **EDTA** – ethyldiaminetetraacetic acid, acid etilendiamintetraacetic
- **ENG** – endoglina
- **g** - gram
- **GAP-43** – **growth** – associated protein 43, proteina 43 asociată creșterii
- **GFAP** – glial fibrillary acidic protein, proteina fibrilară acidă glială
- **H₂O₂** – peroxid de hidrogen (apă oxigenată)
- **IgG** – imunoglobulina G
- **INR** - International Normalized Ratio – test de măsurare a vitezei de coagulare a sângelui
- **K** - potasiu
- **kDa** – kilodaltoni
- **KCNJ** – potassium voltage-gated channel subfamily J – subfamilia J de canale de potasiu voltaj-dependente
- **Kir** - potassium- inwardly rectifying channel, canalul de potasiu cu direcționare spre interior a fluxului
- **Kir 4.1** – potassium- inwardly rectifying channel 4.1, canalul de potasiu cu direcționare spre interior a fluxului 4.1
- **LCR** - lichid cefalorahidian
- **mg/kg** – miligrame per kilogram

- **min** - minut
- **ml** - mililitru
- **nervos**
- **N** – normal
- **Na** - natriu
- **NC_{Ca-ATP}** - non-selective cation Ca-ATP channel, canalul cationic neselectiv de calciu și ATP
- **NH₃** - amoniac
- **NKCC** – Na-K-Cl cotransporter, transportorul pentru sodiu, potasiu și clor
- **NMDA** – N-methyl-D-aspartate receptor, receptorul pentru N-metil-D-aspartat
- **OAP** – orthogonal arrays of particles, formațiuni ortogonale de particule
- **OMS** – Organizația Mondială a Sănătății
- **O₂** - oxigen
- **RMN** - rezonanță magnetică nucleară
- **SNC** – sistemul nervos central
- **SNTA1** – syntrophin alpha 1, gena pentru sintrofina alfa 1
- **SUR-1** - sulfonylurea receptor 1, receptorul 1 pentru sulfonyluree
- **SUR-1 NC_{Ca-ATP}** - sulfonylurea receptor 1 – non-selective cation Ca-ATP channel, canalul cationic neselectiv de calciu și ATP reglat de receptorul 1 pentru sulfonyluree
- **SUR1/TRPM4** – sulfonylurea receptor 1/ transient receptor potential cation channel subfamily M member 4 – membrul 4 al subfamiliei M de canale ionice cu potențial de receptor tranzitoriu melastatină-4 reglat de receptorul 1 pentru sulfonyluree
- **tPA** - tissue plasminogen activator, activator tisular al plasminogenului
- **TBST** – tris-buffered saline, 0,1% Tween 20, soluție-tampon salină ce conține , 0,1% Tween 20
- **TGF-β** – TGF- beta, factorul de creștere și transformare beta
- **TM** – transmembrane domain, domeniu transmembranar
- **VEGF** – vascular endothelial growth factor, factorul de creștere al celulelor endoteliale
- **α-sintrofina** – sintrofina alfa
- **Å** – Ångstrom (1 Å = 10⁻¹ nm = 10⁻⁴ μm = 10⁻⁷ mm)
- **μl** – microlitri
- **3D** – tridimensional

Introducere

Accidentul vascular cerebral reprezintă, la nivel global, conform statisticilor OMS pentru anul 2011, cea de-a doua cauză de mortalitate la persoanele peste 60 de ani. La ora actuală singurul tratament non-chirurgical aprobat este folosirea de soluții hiperosmolare cu efect în scăderea presiunii intracraniene; totuși, din cauza duratei instalării efectului acestora la câteva zile de la apariția edemului cerebral, administrarea lor nu poate preveni apariția leziunilor neurologice și a sechelelor. Incidența crescută și severitatea importantă a acestei patologii impun găsirea unei noi modalități de tratament, care să fie eficientă înaintea instalării edemului cerebral, prevenind apariția acestuia.

I. Partea generală

1. Accidentul vascular cerebral

1.1. AVC- generalități

1.1.1. AVC- definiție

Accidentul vascular cerebral (AVC) este o afecțiune produsă de moartea bruscă a celulelor cerebrale cauzată de întreruperea aportului de sânge, care duce la încetarea aportului de oxigen și substanțe nutritive și la scăderea clearance-ului produșilor rezultați în urma metabolismului celular, la nivelul unei porțiuni localizate a creierului. Cea mai frecventă cauză a accidentului vascular cerebral este ruptura sau tromboza (cauzată cel mai frecvent de prezența unei placi ateromatoase) unui vas de sânge. ^[1,2,3]

1.1.2. AVC – clasificare în funcție de etiologie

Din punct de vedere al etiologiei, AVC poate fi clasificat în AVC ischemic (ce reprezintă aproximativ 70-80% din totalul cazurilor de AVC ^[2] și apare prin obstrucția bruscă a irigației unei porțiuni cerebrale) și AVC hemoragic (ce reprezintă aproximativ 20-30% din totalitatea

cazurilor de AVC și este cauzat de ruptura bruscă a unui vas de sânge de la nivel cerebral).^[4] La rândul său, AVC ischemic poate fi clasificat, din punct de vedere al mecanismului de producere, în AVC trombotic – reprezentând aproximativ 50% din totalul accidentelor vasculare cerebrale^[5] și AVC embolic – reprezentând aproximativ 30% din totalul accidentelor vasculare cerebrale^[5], aceste patologii având drept cauză obstrucția unui vas de sânge de către un tromb, respectiv un embol.^[5]

1.1.3. AVC – fiziopatologie

Aproximativ un sfert din totalul debitului cardiac este destinat irigației cerebrale, fluxul mediu fiind de aproximativ 700-800 ml/min (55-65 ml/100 g/min). Atunci când irigarea creierului cu sânge scade la 15-20 ml/100g/min, după câteva minute de la acest eveniment apar ischemia și deficitul neurologic. Dacă fluxul sangvin scade și mai mult, la 8-10 ml/100g/min, se instalează necroza ischemică (infarctul).^[6] Dacă inițial leziunile cerebrale induse de hipoxie sunt reversibile, odată cu continuarea procesului ischemic ele devin, în scurt timp, permanente. Astfel, deficitul neurologic se instalează rapid în AVC, în decurs de secunde, minute sau ore, indicând originea vasculară a simptomelor apărute.^[5]

1.1.4. AVC – semne și simptome

Paralizia feței și a membrului superior și inferior ipsilateral sunt cele mai comune simptome ale AVC, însă în funcție de localizarea ischemiei pot apărea confuzie, vertij, tulburări de echilibru și coordonare, lipotimie, sincopă și pierderea stării de conștiință, cefalee severă, pierderea memoriei, agnozie, afazie, apraxie, anopsie unilaterală sau bilaterală, comă și moarte.^[1,2,3]

1.1.5. AVC – epidemiologie

Accidentul vascular cerebral reprezintă, la nivel global, una dintre cele mai importante cauze de deces și dizabilitate, această patologie constituind, conform statisticilor Organizației Mondiale a Sănătății pentru anul 2011, cea de-a doua cauză de mortalitate la persoanele peste 60 de ani, respectiv cea de-a cincea cauză de deces pentru persoanele cu vârsta sub 59 de ani.^[6]

1.1.6. AVC – prevenție

Prevenirea apariției bolilor cardiovasculare se poate face atât prin evitarea expunerii la factori de risc (ca fumatul, consumul excesiv de alcool, consumarea de alimente nesănătoase, bogate în

lipide saturate și glucide, inactivitatea fizică,^[3] consumul de cocaină și alte droguri intravenoase) ce pot predispute la apariția acestui tip de patologie, cât și prin monitorizarea atentă și regulată a anumitor patologii (ca hipertensiune arterială, diabet zaharat sau obezitate).^[3]

1.1.7. AVC – tratament

AVC reprezintă o urgență medicală, de aceea este ideal ca tratamentul să fie făcut rapid, pentru diminuarea sechelelor și creșterea șanselor de supraviețuire.^[2] Tratamentul pentru AVC ischemic trebuie administrat în funcție de durata de timp trecută de la producerea acestei patologii.^[7]

Pacienții cu AVC ischemic care s-a produs în urmă cu mai puțin de 3 ore și nu prezintă contraindicații sunt trombolizați,^[7] pentru tromboliză fiind folosit tPA^[7], pentru embolii – heparină iar în restul cazurilor – pacienți cărora nu li s-a efectuat tromboliza și la care nu a fost găsită o cauză de embolie - se folosesc aspirină sau clopidogrel (pentru pacienții alergici la aspirină).^[7]

De asemenea, pacienții ce au microinfarcte fără hemoragii intracraniene semnificative primesc, în primele 24 - 48 de ore, heparină, după care tratamentul lor este continuat cu warfarină, cu monitorizarea constantă a INR-ului.^[7]

Pacienților ce au AVC hemoragic le este administrat de urgență manitol, pentru a scădea presiunea intracraniană, și sunt hiperventilați.^[2] De asemenea, pentru tratamentul acestor pacienți pot fi folosiți și corticosteroizii.^[2] Apoi ei sunt tratați chirurgical prin identificarea, atunci când este posibil, a hemoragiei și oprirea acesteia.^[5]

Ulterior, pacienții ce au suferit accident vascular cerebral urmează programe de reabilitare, în urma cărora aproximativ 10% sunt independenți funcțional, fără sechele semnificative, circa 10% rămân cu dizabilități permanente severe fiind incapabili să se îngrijească singuri, iar restul de aproximativ 80% sunt externați cu recomandări de tratament, îngrijire și recuperare la domiciliu.^[2]

1.1.8. AVC – Noțiuni de histopatologie

Un studiu^[11] efectuat în 2004 de Mena H și colaboratorii săi pe un număr de 137 de cazuri de infarct cerebral uman a clasificat evoluția AVC în trei faze principale:

- Prima etapă, reprezentată de leziunea neuronală acută, este prezentă la 1-2 zile post-AVC și este reprezentată de modificări structurale neuronale însoțite de spongioza neuropilului, prezența inflamației cronice și a infiltratului macrofagic, precum și a neovascularizației și a cavităților. În această fază nu a fost prezentă feruginația neuronală (acumularea de depozite minerale – incluzând fierul – în jurul neuronilor morți).^[8]
- Cea de-a doua fază, numită fază de organizare, este la rândul său împărțită în două etape: o prima fază de inflamație acută, caracterizată de necroză de coagulare și cuprinsă între 3 și 37 de zile, și o fază de inflamație cronică, ce poate cuprinde, la rândul său, necroza de coagulare, precum și prezența neuronilor roșii, a leziunilor neuronale, a infiltratului inflamator de mononucleare și macrofage, a astrogliozei, a inelelor leucocitare perivasculare și a cavităților și este cuprinsă între 10 zile și 53 de ani. De asemenea, în faza de inflamație cronică s-a constatat absența neutrofilelor.^[8]
- Cea de-a treia fază, faza de resorbție, reprezentată de absența răspunsului inflamator și cuprinsă între 26 de zile și 23 de ani.^[8]

2. Edemul cerebral

2.1. Edemul cerebral – generalități

Edemul cerebral reprezintă o entitate patologică ce se caracterizează prin creșterea volumului apei la nivel cerebral peste conținutul normal de 80%, cu creșterea consecutivă a presiunii intracerebrale și apariția ischemiei, precum și, în unele cazuri, a hernierii cerebrale și exitusului.^[9] În momentul de față, metodele farmacologice de reducere a edemului cerebral sunt administrarea de soluții hiperosmolare, inducerea comei cu ajutorul barbituricelor (pentru a scădea rata metabolismului cerebral și astfel a scădea producerea apei la acest nivel), sau administrarea de steroizi.^[9]

În ciuda severității prognosticului pacienților cu edem cerebral apărut în urma AVC ischemic, cele mai folosite metode de tratament – decompresia chirurgicală sau administrarea de soluții hipertone, ca diureticele (de exemplu manitol), pentru scăderea edemului cerebral - nu împiedică producerea leziunilor neurologice și a sechelelor, deoarece devin eficiente numai la câteva zile de la instalarea edemului cerebral.^[10]

2.2. Clasificarea în funcție de etiologie a tipurilor de edem cerebral

În funcție de fiziopatologie, edemul cerebral poate fi împărțit în mai multe tipuri, multe dintre acestea putând apărea concomitent. Astfel, edemul cerebral poate fi vasogenic, citotoxic (numit și ionic), osmotic sau hipostatic, interstițial sau hidrocefalic și hidrostatic, toate aceste tipuri de edem având în comun pierderea echilibrului dintre cele patru compartimente hidrice prezente la nivel cerebral: compartimentul vascular, lichidul cefalorahidian (prezent în ventriculii cerebrali), compartimentul interstițial al parenchimului cerebral și spațiul intracelular. ^[9]

2.3. Diagnosticarea edemului cerebral

Simptomele ce indică prezența unei presiuni intracraniene crescute sunt: letargie, cefalee, vărsături în jet, paralizii de nervi cranieni, alterarea percepției senzoriale, abolirea reflexului extensor plantar, bradicardie, hipertensiune, tahipnee sau bradipnee și în cele din urmă comă și exitus. ^[9]

Investigația de elecție pentru diagnosticul edemului cerebral este reprezentată de CT, unde zonele afectate sunt hipodense comparativ cu parenchimul cerebral normal. ^[14] Pe RMN, zonele de edem cerebral apar sub forma unui semnal puternic pe secvența T2 și slab pe secvența T1, iar diferențierea leziunii de edemul înconjurător se face prin RMN cu contrast, substanța de contrast marcând strict zona lezională. ^[9]

2.4. Tratamentul edemului cerebral

Primele măsuri întreprinse în tratarea edemului cerebral sunt menținerea unei oxigenări adecvate și a tensiunii arteriale în limite normale. Ulterior, sunt luate măsuri specifice ca ventilație artificială, utilizarea de agenți hiperosmotici (în principal manitol și săruri hiperosmolare), steroizi sau diuretice. În cazul în care acest tratament nu este eficient, se trece, în ultimă instanță, la craniotomie decompresivă, și la inducerea comei cu ajutorul barbituricelor (pentru a scădea nivelul metabolismului cerebral și astfel acumularea de apă și creșterea presiunii intracraniene). Astfel, niciunul din aceste tratamente nu previne formarea edemului cerebral. ^[9]

2.5. Mecanisme de formare a edemelor vasogenic și citotoxic și metode experimentale de prevenție a acestora

2.5.1. Edemul citotoxic – mecanisme de formare și metode experimentale de prevenire a producerii sale

Scăderea irigației tisulare ce apare în AVC ischemic duce la scăderea aportului de oxigen la nivelul țesutului cerebral și, prin urmare, la scăderea capacității celulelor cerebrale de a efectua procesul de fosforilare oxidativă ^[11] cu scăderea sintezei de ATP ce duce la pierderea activității ATP-azelor, printre care și cea a ATP-azei Na/K, ce scoate Na din celule la schimb cu K ^[11] Acumularea sodiului (urmată de influxul altor cationi) în celule duce la influxul anionilor și al apei, și ulterior la balonizarea celulelor prin mecanism osmotice, rezultând edemul citotoxic. ^[16] Deși acesta nu duce la formarea unui edem cerebral proeminent, prin golirea spațiului interstițial de ioni se creează un gradient ce permite trecerea ionilor din capilare (ce au, în AVC, o permeabilitate crescută) în spațiul interstițial, atrăgând osmotice și apa, cu apariția edemului ionic. Ulterior, prin pierderea, din cauza ischemiei, a joncțiunilor strânse endoteliale, se formează și edemul vasogen. ^[11]

Proteinele-canal a căror inhibiție poate duce la ameliorarea nivelului edemului oncotic sunt reprezentate de canalul ASIC, canalul NC_{Ca-ATP} reglat de SUR1, canalele TRP, canalul NKCC, canalele receptor NMDA și aquaporinele (AQP). ^[11]

2.5.2. Edemul vasogenic – mecanisme de formare și metode experimentale de prevenire a producerii sale

Primul eveniment ce duce la apariția edemului vasogenic este distrugerea joncțiunilor strânse, ^[9] cu apariția unui influx masiv de plasmă și proteine cu greutate moleculară mare. Ulterior, activarea celulelor gliale duce la eliberarea de compuși inflamatori, cu pătrunderea unei cantități și mai crescute de exsudat proteic în lichidul extracelular. ^[9]

Printre proteinele a căror blocare ar putea împiedica apariția edemului vasogenic se numără receptorii V1 și V2 pentru vasopresină (ADH), matrix-metaloproteinazele, VEGF (vascular endothelial growth factor, factorul de creștere al celulelor endoteliale vasculare) și receptorul de tip B pentru endotelină. [9]

3. Noțiuni de histologie a sistemului nervos central

3.1. Tipuri de celule prezente la nivelul sistemului nervos central

În funcție de rolul lor, celulele de la nivelul SNC se împart în: celule gliale sau nevroglii, cu rol de susținere, nutritiv, protecție și producție a tecii de mielină, respectiv neuroni, cu rol în transmiterea impulsului nervos. [12]

3.1.1. Celulele gliale

Astroците – sunt celule stelate, localizate predominant la interfața creier-sânge sau creier-LCR dar și în interiorul parenchimului cerebral, cu rol în transportul apei [13], în clearance-ul anumitor ioni sau neurotransmițători de la nivel sinaptic, în repararea leziunilor țesutului cerebral, crearea unei bariere între țesutul cerebral și sânge sau țesutul cerebral și LCR [12] precum și rol de susținere. [13] De asemenea, ele au un rol important și în izolarea electrică și furnizarea de nutrienți. [12]

Oligodendrogiile au rol în transmiterea impulsului nervos, ele producând, la nivelul sistemului nervos central, teaca de mielină. [12,13]

Celulele ependimare ale SNC tapetează ventriculii cerebrali. [12, 13] Ele formează plexurile coroide, având rol în secreția LCR. [19]

Microgliile au rol de celule prezentatoare de antigen, transformându-se în fagocite în prezența unei leziuni sau a unui proces infecțios. [12]

3.1.2. Neuroni

Neuronii sunt celule specializate în primirea, prelucrarea și transferul informației. [14,15]

3.1.2.1. Proteina GAP-43

Proteina GAP-43 este o proteina integrală ^[16] localizată la nivelul sistemului nervos ^[17], exprimată în timpul dezvoltării neuronale ^[17]. GAP-43 este, astfel, un marker al dezvoltării neuronale ^[28], fiind prezent în neuronii în curs de diferențiere sau de regenerare, ^[16] și fiind, de asemenea, asociat cu plasticitatea neuronală la adult. ^[17]

3.2. Învelișurile meningeale ale sistemului nervos central

Meningele este alcătuit din trei straturi: dura mater, arahnoida și pia mater. ^[12]

Dura mater este stratul extern, fibros, cu consistență crescută, ce captușește pe interior cutia craniană, fiind atașat periostului, dar care este prezent și la nivelul coloanei vertebrale. ^[12]

Arahnoida este stratul intermediar al meningelui, situat între dura mater, la exterior și pia mater, la interior. Între arahnoidă și pia mater există spațiul subarahnoidian, în care sunt vase cerebrale ce pătrund în parenchimul cerebral acoperite de pia mater. ^[12]

Arahnoida alcatuiește, în anumite zone, formațiuni de celule numite granulații arahnoidiene, ce pătrund, sub formă de vili, în interiorul sinusurilor cerebrale și au rol în secreția unidirecțională a LCR în interiorul acestora, funcționând prin mecanism asemănător unei valve unidirecționale. ^[18,12]

Pia mater este stratul intern al meningelui, aflat în contact direct cu parenchimul cerebral, în sanțurile căruia pătrunde. ^[18] De asemenea, pia mater fuzionează cu celulele ependimare ce căptușesc ventriculii laterali, formând granulațiile arahnoidiene, cu rol în secreția LCR. ^[18] Mai mult, vasele de sânge din spațiul subarahnoidian ce pătrund în parenchimul cerebral sunt acoperite de pia mater. ^[12]

4. Aquaporinele – prezentare generală

4.1. Definiție

Aquaporinele (AQP) sunt o familie vastă de proteine-canal transmembranare întâlnite în majoritatea organismelor vii ^[19] cu rol în transportul bidirecțional, în funcție de gradientul osmotic sau de presiunea hidrostatică, al apei de o parte și de alta a membranei plasmatice puțin permeabile pentru apa și electroliți. ^[19,20,21].

4.2. Izoforme

La mamifere și om, la ora actuală sunt cunoscute 13 izoforme ale aquaporinei, notate de la 0 la 12 (AQP 0 – AQP 12) ^[19], ce au rol fie în transportul exclusiv al apei (AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5) ^[19], fie în transportul apei și al glicerolului (ca de exemplu AQP3, AQP7, AQP9, AQP10) ^[21,22,23], fie al solviților mici polari (ca AQP-9). ^[21] De asemenea, substanța transportată de unele AQP (ca AQP6, AQP8, AQP11, AQP12) nu a fost încă identificată. ^[22]

4.3. Distribuție

Aquaporinele sunt distribuite în numeroase țesuturi și organe. ^[23] Astfel, la nivel renal, sunt prezente AQP-1, AQP-2, AQP-3 și AQP-6. ^[23] La nivel pulmonar sunt prezente AQP-1 și AQP-5. ^[38] În sistemul nervos central sunt prezente AQP-1 și AQP-2 ^[23] iar la nivelul celulelor retiniene Muller a fost semnalată prezența AQP-4 ^[23] În afară de rinichi, plămân și sistemul nervos central, aquaporinele sunt prezente și în alte organe, ca glande salivare, intestin, ficat, pancreas, țesut adipos, inimă, ovare, testicule și leucocite. ^[24] Astfel, AQP-7 este localizată la nivelul celulelor insulare pancreatice, al țesutului adipos, rinichiului, ovarelor și testiculelor. ^[24] De asemenea, la nivelul glandei salivare, al intestinului, pancreasului, ficatului, inimii, plămânului și testiculului este localizată AQP-8, o altă aquaporină selectivă pentru apă, iar la nivelul creierului, ficatului, testiculelor și leucocitelor este prezentă AQP-9, o proteină-canal specializată în transportul apei și al solviților mici. ^[24]

4.4. Structură

Aquaporinele sunt proteine mici, de ≈ 30 kDa^[21] cu o structură comună formată din 6 domenii transmembranare de tip α -helix^[23] și două domenii α -helix ce traversează parțial membrana celulară^[21], domenii care conțin o secvență-consens compusă din asparagină-prolină-alanină (NPA) ce intră în alcătuirea unui por de ≈ 28 Å ($1\text{Å}=0,1$ nm)^[25,26]. Atât capătul amino-terminal cât și cel carboxi-terminal ale aquaporinelor sunt situate intracelular.^[23] Deși fiecare astfel de monomer formează un por de apă ce funcționează independent, aquaporinele au tendința de a forma, la nivelul membranelor celulare, tetrameri stabili dispuși la rândul lor în structuri dreptunghiulare numite formațiuni ortogonale de particule (OAP, orthogonal arrays of particles), al căror rol nu a fost încă pe deplin elucidat.^[21]

4.5. Alte funcții

Aquaporinele au un rol important și în menținerea hidratării epiteliale și a homeostaziei metabolismului energetic.^[19] În țesutul adipos, expresia acestor proteine este modulată hormonal, fiind declanșată de creșterea nivelului catecolaminelor și al insulinei.^[19] În plus, s-a dovedit că aquagliceroporinele sunt implicate și în procesul de proliferare celulară și cel de carcinogeneză.^[19]

Mai mult, deși până la ora actuală rolul acestor procese nu este cunoscut, aquaporinele pot transporta, în anumite condiții, gaze ca NH_3 , NO , CO_2 și O_2 , ioni ca Cl , K sau solviți mici ca H_2O_2 .^[21]

5. AQP-4

5. 1. Generalități

Cea mai abundentă aquaporină de la nivel cerebral este AQP-4^[21], localizată preponderent la nivel astrocitar^[21] și având ca rol principal transportul bidirecțional al apei de o parte și de alta a membranei celulare, însă fiind implicată și în procese ca migrarea celulară sau neuroexcitație.^[21]

5.2. Localizare

AQP-4 este una dintre cele mai abundente proteine de la nivel cerebral și este localizată preponderent la interfața creier-LCR și creier-sânge, însă se întâlnește într-o cantitate mai mică și în parenchimul cerebral, în special perisinaptic, pe suprafața extensiilor membranei plasmatică astrogliale ce flanchează sinapsele neuronale.^[20] De asemenea – însă într-o mai mică măsură comparativ cu nivelurile sale din creier - AQP-4 poate fi întâlnită și în alte organe și țesuturi, ca: tubi colectori renali, organe senzoriale (urechea internă, epiteliu olfactiv, celule retiniene)^[21], mușchi scheletic, epiteliu respirator, celule parietale gastrice, neuroni de la nivelul stomacului și intestinului, și diverse epitelii glandulare^[21,27,28,29]

În sistemul nervos central, AQP-4 este situată cu precădere la nivelul prelungirilor membranelor astrocitare aflate la interfața creier-LCR sau creier-sânge, flancând pia mater sau microvasele cerebrale dar și, într-o cantitate mai mică, pe suprafața prelungirilor astrocitare care căptușesc sinapsele neuronale. Astfel, la nivelul sistemului nervos central AQP-4 are o distribuție polarizată, la interfața dintre creier și sânge sau LCR.^[20]

5.3. Structură

De-a lungul canalului monomeric al AQP-4 există 3 specializări ce asigură selectivitatea pentru apă a acestei proteine-canal.^[20] Astfel, pentru împiedicarea pătrunderii în canal a unor molecule mai mari decât cea a apei, prima specializare constă în îngustarea porului până la dimensiunea de ≈ 28 Å.^[20] Următoarea specializare are rolul de a bloca intrarea în canal a apei protonate sau a cationilor, și constă în prezența unui reziduu de arginina. Ultima specializare structurală are, de asemenea, rol în respingerea protonilor, însă are și funcția suplimentară de a reorienta direcția de curgere a moleculelor de apă, și este reprezentată de prezența, în porțiunea centrală a canalului, a dipolilor încarcați pozitiv.^[20]

5.4. Formațiunile ortogonale de particule (OAP)

S-a constatat că AQP-4 are capacitatea de a polimeriza, alcătuind, la nivel plasmalemal, formațiuni supramoleculare, vizibile la microscopul optic, ce au primit denumirea de formațiuni ortogonale de particule, sau OAP: orthogonal arrays of particles.^[20,21]

Formațiunile ortogonale de particule sunt localizate la interfața dintre sânge și lichidul cefalorahidian, respectiv dintre sânge și creier, fiind implicate în asigurarea controlului fluxului apei între sânge și creier.^[20] Astfel, după knock-out-ul pentru AQP-4, nivelul edemului cerebral postischemic este semnificativ mai scăzut.^[20,30, 26, 31]

Formațiunile ortogonale proteice conțin izoforma M23 a AQP-4, considerată a fi, alături de izoforma M1, una dintre izoformele clasice ale acestei proteine-canal.^[32] Astfel, deși atât M1, cât și M23 pot forma heterotetrameri prezenți la nivel membranar, numai izoforma M23 are capacitatea de a intra în componența OAP.^[20] Fiecare tetramer al izoformei M23 are un por central considerat a fi implicat în transportul gazos^[20].

5.5. Complexul DAPC

Ancorarea AQP-4 la nivelul plasmalemei astrocitare este realizată prin intermediul complexului DAPC (dystrophin-associated protein complex, complexul proteic asociat distrofinei)^[20], alcătuit din mai multe proteine ca α -sintrofina, distrofina, β -dystroglicanul, laminina sau α -dystrobrevina, ce, împreună, conectează citoskeletul de matricea extracelulară.^[33] Absența uneia sau mai multor astfel de proteine componente ale DAPC^[33] duce la pierderea polarității AQP-4 și distrugerea OAP.^[33]

În plus, s-a constatat că AQP-4 și canalul pentru potasiu Kir 4.1 sunt colocalizate. Este cunoscut faptul că ambele proteine sunt conectate la DAPC (dystrophin-associated protein complex).^[19, 34]

5.6. Expresia AQP-4 la nivelul SNC

AQP-4 este cea mai abundentă proteină-canal de apă de la nivelul sistemului nervos central^[21], unde este exprimată cu precădere la interfața creier-sânge și creier-LCR, în prelungirile plasmalemei astrocitare^[21] ce mărginesc microvasele sangvine sau intra în alcătuirea gliei limitans însă și, într-o măsură mai mică, în endocitele periventriculare și ale canalului central al măduvei spinale și în celulele endoteliale.^[35] Polaritatea expresiei AQP-4 este realizată prin interacțiuni intracelulare pe care această proteină le realizează cu α -sintrofina sau agrina^[35], ambele aceste din urma proteine fiind componente ale complexului DAPC.^[36]

5.7. Rolul AQP-4 în producerea edemului cerebral

Prezența ischemiei are drept consecință consumul rezervelor de ATP, ceea ce blochează pompele celulare ATP-dependente printre care și pompa Na/K, cu acumularea consecutivă a sodiului la nivel intracelular. Acest proces duce la balonizarea celulei din cauza pătrunderii în celulă a unei cantități crescute de apă cu apariția edemului citotoxic, precum și la patrunderea, în spațiul extracelular cerebral, a unei cantități crescute de electroliți și apă. ^[32,37]

Prezența AQP-4 are, astfel, un rol esențial în apariția edemului citotoxic cu balonizarea consecutivă a astrogliilor și a neuronilor. ^[38]

Persistența ischemiei are drept consecință distrugerea jonctiunilor strânse endoteliale și prin urmare distrugerea barierei hematoencefalice, apa pătrunzând astfel într-o cantitate foarte mare la nivel cerebral, cu apariția edemului vasogenic ^[32,37]. Concomitent apare și up-reglarea AQP-4, ce ajută la clearance-ul edemului cerebral. ^[38]

Prin urmare, dacă AQP-4 are un rol esențial în producerea edemului citotoxic, ea are un rol protector în edemul vasogenic, prezența sa facilitând scăderea edemului cerebral și împiedicând formarea leziunilor neurologice. ^[38]

Modularea nivelului de AQP-4, cu scăderea nivelului acestei proteine sau blocarea sa în prima fază a ischemiei, respectiv cu creșterea nivelului său în fazele tardive ale ischemiei, ar putea constitui o țintă terapeutică în AVC ischemic. ^[38,39]

5.8. Alte roluri ale AQP-4

În afară de rolul protector pe care îl are în edemul vasogenic, AQP-4 este implicată în scăderea neuroinflamației prin menținerea inactivă a microgliilor, în tamponarea - prin intermediul relației cu receptorul pentru potasiu Kir4.1, cu care AQP-4 funcționează în tandem – a potasiului în exces de la nivel perisinaptic rezultat în urma impulsului nervos, sau în reglarea volumului lichidian perisinaptic prezent în exces în urma impulsului nervos, prin redirectionarea cantității de apă prezente în exces în interiorul astrogliilor. ^[20]

Există, de asemenea, teoria – neconfirmată până în prezent - a implicării AQP-4 în clearance-ul metaboliților toxici, absența sa contribuind la apariția unor boli neurodegenerative ca Parkinson sau Alzheimer.^[20]

S-a constatat, de asemenea, că AQP-4 este implicată în producerea crizelor epileptice, al căror grad de severitate este mult mai crescut la animalele cu knock-out pentru această proteină.^[20]

AQP-4 are rol și în asigurarea funcționalității unor organe de simț, absența sa de la nivelul celulelor retiniene Muller ducând la modificări fine pe electroretinograma, în timp ce absența sa de la nivelul urechii interne duce la apariția deficitului de auz.^[20]

Mai mult, există ipoteza implicării AQP-4 în reglarea expresiei neurotrofinelor la nivel cerebral, la șoarecii cu knock-out pentru AQP-4 înregistrându-se perioade lungi de depresie ce au disparut odată cu administrarea neurotrofinei BDNF.^[20]

În plus, s-a constatat că absența AQP-4 duce la scăderea memoriei locale. Până la ora actuală, nu au fost elucidate mecanismele responsabile de acest proces.^[20]

5.9. Rolul AQP-4 în neuroinflamație

Numeroase studii au constatat că prezența AQP-4 este implicată în modularea secreției de citokine proinflamatorii de către astrocite și microglia și în procesul de activare și migrare astrocitară (astrogliază) prezent în neuroinflamație.^[40] Studii efectuate pe modele murine de epilepsie au demonstrat că șoarecii cu knock-out pentru AQP-4 au un prag mult mai scăzut de declanșare a crizelor epileptice și o severitate mult mai crescută a acestora, în timp ce nivelul inflamației cerebrale la aceste animale este scăzut.^[40]

De asemenea, s-a constatat că la șobolanii cu knock-out pentru AQP-4 nivelul inflamației cerebrale rezultate în urma inducerii de encefalomielită autoimună a fost semnificativ mai scăzut comparativ cu cel al șobolanilor wild-type^[40], această observație demonstrând o posibilă implicare a AQP-4 în procesul de neuroinflamație.

De asemenea, s-a constatat că absența AQP-4 la nivelul podocitelor astrocitare endoteliale duce la scăderea procesului de astrogliază, această observație putând fi explicată prin scăderea ratei de migrare a astrocitelor în absența AQP-4.^[40]

Mai mult, s-a constatat că, în neuromielita optică - o boala autoimuna ce afectează nervul optic și maduva rahidiană, ducând la orbire și paralizie – sunt prezenți anticorpi de tip IgG ce țintesc specific AQP-4 situată la nivelul OAP, nu însă și izoforma liberă a AQP-4. ^[40]

Într-un studiu efectuat în 2016 de H Yu și echipa sa se demonstrează că expresia citokinelor proinflamatorii crește în urma crizelor comițiale și că blocarea AQP-4 cu acetazolamida duce la scăderea nivelului citokinelor proinflamatorii în timpul crizelor epileptice. ^[41]

Totodată, studii efectuate de alte grupuri de cercetători au constatat că nivelul AQP-4 crește în prezența neuroinflamației cronice, și că distribuția anormală a AQP-4 la nivelul SNC favorizează apariția crizelor epileptice. ^[41]

5.10. Inhibitorii AQP-4 cunoscuți până în prezent

În anul 2007, grupul lui Vincent Huber a demonstrat capacitatea crescută a arilsulfonamidelor de a inhiba AQP-4. Dintre acești compuși, cea mai mare eficiență o are acetazolamida, ce inhibă în proporție de $\cong 80\%$ transportul apei prin intermediul AQP-4. ^[42] Totodată, același grup a identificat două antiepileptice, topiramatul și zonisamida, capabile de a bloca permeabilitatea acestui canal de apă. ^[42]

Un studiu efectuat în anul 2011 de un alt grup de cercetători (Igarashi, Huber, Tsujita și Nakada) ^[42] pe un model ischemie cerebrală focală a arătat că tratamentul, înainte de inducerea leziunii cerebrale, cu TGN-020 (2 – nicotinamid -1,3,4-tiadiazol) a dus, conform studiilor imagistice prin RMN, la prezența unui volum cerebral semnificativ mai scăzut ($12,1 \pm 6,3\%$) la șoarecii ce au primit pretratament cu TGN-020 înainte de inducerea leziunii ischemice cerebrale comparativ cu grupul control ($20,8 \pm 5,9\%$). ^[43]

Deși efectul neuroprotector al eritropoietinei era deja cunoscut, un model de intoxicație cu apă a demonstrat că pretratamentul cu acest factor de creștere a inhibat fluxul apei prin proteina-canal AQP-4. ^[42]

În plus, deoarece nivelul de AQP-4 crește în inflamație, un rol important în scăderea edemului cerebral postischemic îl pot avea substanțele antiinflamatoare. Spre exemplu, s-a constatat ^[42] că

administrarea, în AVC ischemic, a AMD3100, un antagonist al receptorului CXCR4 pentru chemokina proinflamatoare CXCL12 (cu rol în recrutarea leucocitelor la locul leziunii tisulare) a dus la o scădere marcată a răspunsului inflamator și a împiedicat, astfel, distrugerea barierei hematoencefalice.^[42]

Mai mult, studiile efectuate pe modele murine de ocluzie a arterei cerebrale medii au arătat că medicamentul Tongxinluo are capacitatea, prin scăderea expresiei citokinelor proinflamatorii la aceste animale, de a menține integritatea barierei hematoencefalice.^[42]

6. Relația dintre AQP-4 și alte proteine localizate la nivel cerebral

6.1. Endoglina

Endoglina (ENG), cunoscută și sub denumirea de CD 105, este o proteină homodimerică cu rol de co-receptor al complexului TGF- β ^[44].

Deoarece, în țesuturile normale, neafectate de leziuni și mature endoglina apare la nivelul vaselor tinere, imature, în componența celulelor endoteliale ce proliferază, ea este considerată un marker al angiogenezei.^[44]

S-a observat că nivelul acestei proteine este crescut – atât la nivelul leziunii ischemice cât și perilezional - la nivelul leziunilor de ischemie-reperfuzie, inclusiv a celor din cadrul infarctului miocardic acut.^[45]

6.2. Canalele de potasiu

Canalele de potasiu sunt structuri ubicuitare, prezente în toate regnurile, al căror rol este transportul potasiului de o parte și de alta a membranei celulare . Există numeroase tipuri de canale de potasiu, cum ar fi canalele de potasiu voltaj-dependente, canalele de potasiu activate de ligand, canalele de potasiu ce orientează spre interior substanța transportată sau canalele de potasiu cu domenii în tandem ale porului.^[46]

6.2.1. Canalele de potasiu Kir

Proteinele Kir (inwardly rectifying K^+ channels, Kir) sunt canale de potasiu prezente în numeroase țesuturi ce direcționează fluxul acestui cation cu precădere spre interiorul celulei. Canalele Kir numără până la ora actuală 15 membri încadrați în 7 subfamilii ce, din punct de vedere funcțional, se împart în: canale Kir clasice (Kir 2.x), în permanență active, canale de potasiu reglate de receptori cuplați cu proteine G (Kir 3.x), canale de potasiu sensibile la ATP (Kir 6.x) și canale de transport al potasiului (Kir1.x, Kir4.x, Kir5.x, Kir7.x), unde x reprezintă un membru al subfamiliei respective.^[47] De exemplu, în subfamilia Kir2.x sunt incluși membrii Kir2.1, Kir2.2, Kir2.3 sau Kir2.4.^[47]

6.2.1.1. Canalul de potasiu Kir 4.1

Kir4.1 (KCNJ10) –cunoscută și sub denumirea de BIR10, K_{AB-2} , BIRK-1 și Kir1.2^[47] este o proteină-canal prezentă la nivelul celulelor gliale adulte cu rol în menținerea constantă a nivelului potasiului în spațiul extracelular și perisinaptic.^[48]

Aceste proteine-canal sunt absente în celulele gliale imature, în curs de proliferare,^[49] fiind exprimate odată cu diferențierea astrocitelor. Totodată, proteinele Kir4.1 sunt asociate, în cursul ciclului celular, cu stadiul de repaus proliferativ.^[49] La nivel cerebral, canalele de potasiu Kir4.1 sunt situate cu precădere la nivelul prelungirilor astrocitare ce mărginesc vasele sangvine precum și la nivelul extensiilor membranare astrocitare perivascularare ale celulelor Muller retiniene.^[48]

În urma studiilor de imunoprecipitare, s-a constatat că, la șoarecii cu knock-out pentru alfa-sintrofina, proteina Kir4.1 nu se leagă la complexul DAPC.^[48]

Studii de imunoprecipitare au confirmat că, în astrocitele de la nivel cerebral, Kir4.1 interacționează cu α -sintrofina, având o localizare polarizată la nivelul unor regiuni membranare țintite.^[48]

În plus, s-a constatat că, la nivelul SNC, proteinele-canal Kir4.1 sunt colocalizate cu AQP-4, care are astfel un rol foarte important în tamponarea potasiului rezultat în urma depolarizării neuronale.^[48] S-a constatat că, la animalele cu deleție pentru α -sintrofina, expresia AQP-4 este cu 70% mai scăzută la nivelul extensiilor membranei plasmatice astrocitare, însă expresia Kir4.1 rămâne neschimbată, fapt ce sugerează că α -sintrofina nu este implicată în ancorarea Kir4.1, însă

ea are o contribuție semnificativă în ancorarea AQP-4 la nivelul membranei podocitare a astrocitelor.^[50]

6.3. Alfa-sintrofina

Sintrofinele sunt un grup de proteine-adaptor (proteine eșafod) localizate la nivelul membranei plasmactice, cu rol în ancorarea unei multitudini de proteine plasmalemale, interconectând citoskeletul actinic de matricea extracelulară și ancorand astfel numeroși receptori sau alte componente ale membranei celulare.^[51]

Alfa-sintrofina este o proteină de aproximativ 58 KDa (8 exoni, peste 24 kb, 2 situsuri de inițiere a transcripției)^[52] din familia sintrofinelor codificată de gena SNTA1, localizată pe cromozomul 20q11.21.^[53]

Sintrofina poate fi implicată în diferite procese fiziologice, ca reglarea presiunii sangvine și secreția insulinei, sau patologice, ca edem cerebral, diferite forme ale distrofiei musculare sau sindromul de QT lung, menționat mai sus.^[51]

6.4. GFAP (glial fibrillary acidic protein)

GFAP (Glial fibrillary acidic protein, proteina fibrilară acida glială) este o proteină codificată de gena GFAP, situată pe cromozomul 17 (17q21.31) implicată în formarea filamentelor intermediare ale astrocitelor mature. Astfel, prin polimerizare, monomerii de GFAP intra în alcătuirea filamentelor intermediare, ce sunt, alături de filamentele de actina și microtubuli, componente esențiale ale citoskeletului, cu rol în menținerea structurii celulare.^[54,55]

Proteina GFAP este de regulă utilizată pentru diferențierea astrocitelor de alte celule gliale.^[55]

7. Corpii amilacei

Corpii amilacei reprezintă formațiuni sferice, bazofile, cu diametrul mediu de 15 μm, alcătuite dintr-un învelis glucidic și un nucleu compus din proteine degradate din care o mare parte sunt implicate în stressul celular și procesul de senescență (de exemplu, ubiquitina). Corpii amilacei

apar la nivel cerebral la pacienții în vârstă ca proces al îmbătrânirii normale, fiziologice și - într-o cantitate mai mare comparativ cu subiecții normali, în vârstă- la pacienții cu afecțiuni neurodegenerative ca boala Alzheimer, boala Parkinson, demență vasculară, scleroza multiplă, epilepsie, boala Huntington sau boala Pick.^[56] Rolul corpurilor amilacei nu este, în prezent, pe deplin cunoscut, existând ipoteza ca sunt implicați în protecția împotriva inflamației acute la nivel cerebral.^[57]

II. Partea specială

1. Scopul, obiectivele și etapele studiului

Scopul principal al studiului de față constă în elucidarea rolului pe care aquaporina-4 (AQP-4) îl are în menținerea echilibrului hidric la nivel cerebral. Pentru aceasta, studiul a fost împărțit în trei etape, și anume:

1. Elucidarea structurii corpurilor amilacei și a relației lor cu astrocitele (având ca marker GFAP și AQP-4), respectiv cu membranele bazale vasculare (având ca marker colagenul IV) pe țesut cerebral necrotic provenit de la persoane vârstnice decedate de cauze non-neurologice.
2. Evaluarea nivelului de expresie și al localizării AQP-4, al α -sintrofinei și al CD 105 în țesutul cerebral normal comparativ cu țesutul cerebral ischemic. Evaluarea nivelului de expresie și al distribuției α -sintrofinei și CD 105 la nivelul substanței albe comparativ cu substanța cenușie.
3. Elucidarea efectului tratamentului cu un inhibitor al AQP-4 asupra AVC ischemic indus pe țesut cerebral necrotic provenit de la șobolani.

Fiecare dintre cele trei etape are la rândul ei obiective specifice, care sunt prezentate în cele ce urmează.

Astfel, **prima etapa a studiului** are două obiective principale :

- primul obiectiv este reprezentat de elucidarea structurii corpurilor amilacei (formațiuni glicoproteice prezente la nivel cerebral atât în îmbătrânirea fiziologică, cât și în anumite

afecțiuni neurodegenerative ca boala Parkinson, boala Alzheimer sau boala Huntington) în țesut cerebral necrotic provenit de la persoane vârstnice decedate de cauze non-neurologice;

- cel de-al doilea obiectiv este reprezentat de evaluarea – la nivelul acelorași țesuturi - a relației corpurilor amilacei cu astrocitele și membranele bazale vasculare înconjurătoare, prin imunomarcare cu anticorpi specifici ubiquitinei (proteină întâlnită la nivelul corpurilor amilacei), GFAP (marker astrocitar), AQP-4 (proteină-canal prezentă la nivel astrocitar) și respectiv collagen IV (proteină specifică membranelor bazale vasculare).

Cea de-a doua etapa a studiului are patru obiective principale:

- evaluarea gradului de expresie și a distribuției proteinei AQP-4 la nivelul țesutului cerebral normal comparativ cu țesutul cerebral ischemic;
- evaluarea gradului de expresie și distribuție a proteinei CD 105 (endoglină) la nivelul țesutului cerebral normal comparativ cu țesutul cerebral ischemic;
- evaluarea, în țesutul cerebral ischemic, a gradului de expresie și distribuție a proteinei CD 105 (endoglină) la nivelul substanței albe comparativ cu substanța cenușie;
- evaluarea gradului de expresie și distribuție a proteinei α -sintrofina la nivelul țesutului cerebral normal comparativ cu țesutul cerebral ischemic;
- evaluarea, în țesutul cerebral ischemic, a gradului de expresie și distribuție a proteinei α -sintrofina la nivelul substanței albe comparativ cu substanța cenușie.

Cea de-a treia etapa a studiului are ca obiective evaluarea rolului AQP-4 în producerea edemului cerebral postischemic, acest lucru constând în:

- evaluarea histopatologică a volumului zonei de infarct la șobolani cu AVC ischemic indus prin ocluzia arterei cerebrale medii tratați, respectiv netratați cu un inhibitor al AQP-4, respectiv la cazuri-control reprezentate de șobolani sănătoși, fără AVC ischemic și la cazuri placebo, reprezentate de șobolani la care s-a realizat craniotomie fără ocluzia arterei cerebrale medii;
- evaluarea histopatologică a volumului emisferelor cerebrale la cele 4 grupuri de animale;

- evaluarea volumetrică, folosind un scanner, a modificărilor volumelor cerebrale globale la aceste grupuri de animale.

2. Material și metodă

2.1. Material și metodă folosite în prima etapa a studiului

2.1.1. Obținerea consimțământului scris al rudelor, prelevarea și prelucrarea țesuturilor

După obținerea consimțământului scris al rudelor, a fost colectat material necroptic sub formă de blocuri de parafină conținând țesut cerebral fixat, în prealabil, în formol, de la 6 pacienți cu vârste cuprinse între 72 și 89 ani decedați de cauze non-neurologice.

Prelevarea și prelucrarea țesuturilor au fost realizate la Clinica de Neurologie, respectiv Departamentul de Anatomie Patologică din cadrul Universității de Medicină și Farmacie, Craiova.

Astfel, după efectuarea necropsiei, analiza neuropatologică a relevat prezența atrofiei corticale în diferite grade, ateromatozei arterelor poligonului Willis și a ventriculomegaliei.

2.1.1.1. Fixarea în formol a țesutului cerebral

Pentru prezervarea arhitecturii celulare și tisulare a fragmentului studiat și pentru menținerea localizării și a configurației antigenelor ce vor fi analizate prin tehnici de imunohistochimie, fragmente tisulare din toate regiunile corticale au fost fixate în formol în vederea includerii, ulterior, în parafină.

2.1.1.2. Includerea țesutului în parafină

Țesuturile au fost apoi incluse în parafină, cu obținerea de blocuri de parafină ce au fost apoi secționate.

2.1.1.3. Realizarea de secțiuni din blocurile de parafină

Blocurile de parafină obținute au fost secționate cu ajutorul unui microtom rotativ (achiziționat de la firma Thermo Scientific) cu sistem de transfer al secțiunilor pe bază de cascadă de apă, cu obținerea de secțiuni cu grosimea de 4 μm .

2.1.1.4. Deparafinarea și rehidratarea secțiunilor

Lamele au fost apoi depozitate într-un suport și trecute, treptat, prin mai multe băi, cu îndepărtarea cerii prin imersie în xilen, apoi imersie în alcool și rehidratare în apă.

2.1.1.5. Colorarea hematoxilin-eozină a secțiunilor

Pentru vizualizarea nucleului și a componentelor citoplasmatiche a fost efectuată colorația hematoxilin-eozină.

2.1.2. Selectarea celor mai relevante blocuri și secțiuni din totalul materialului disponibil

Pe baza acestor lame, în cadrul Centrului pentru Studii de Morfologie Microscopică și Imunologie al Universitatii de Medicina si Farmacie, Craiova, s-a realizat o selecție a blocurilor de parafină ce demonstau cea mai mare densitate de corpi amilacei, cu obținerea de 15 astfel de blocuri ce au fost în continuare secționate, cu realizarea de secțiuni cu grosimea de 4 μm , respectiv 50 μm .

2.1.3. Marcarea imunohistochimică a secțiunilor subțiri

Lamele ce conțineau secțiunile subțiri (4 μm) selectate au fost apoi prelucrate și imunomarcate cu anticorp specific GFAP provenit de la șoarece (mouse anti-human, clona ABIN125137, provenit de la Antibodies Online). Diluția anticorpului a fost 1:300.

2.1.3.1. Deparafinizarea și rehidratarea lamelor

În vederea deparafinizării, lamele au fost imersate în băi succesive de xilen, alcool și apoi apă.

2.1.3.2. Etalarea antigenului (antigen retrieval)

Etalarea antigenului a fost realizată prin incubarea peste noapte în soluție-tampon la 70°C.

2.1.3.3. Blocarea activității peroxidazei endogene

Pentru blocarea peroxidazei endogene a fost folosit un amestec de apă oxigenată cu metanol, ce a fost incubat cu țesuturile timp de 15 minute la temperatura camerei.

2.1.3.4. Blocarea legării nespecifice a anticorpilor

Blocarea legării nespecifice a fost realizată prin incubare cu lapte degresat 3% și TBST prin incubare timp de o oră la temperatura camerei într-un mediu umed.

2.1.3.5. Incubarea cu anticorp primar

Secțiunile au fost incubate cu un anticorp anti-GFAP provenit de la șoarece, diluția sa fiind de 1:300. Incubarea a fost făcută la 4°C timp de 18 ore într-un mediu umed.

2.1.3.6. Detecția semnalului folosind peroxidaza

Amplificarea semnalului a fost făcută timp de 30 de minute, după care a fost realizată detecția semnalului folosind DAB.

2.1.3.7. Colorarea hematoxin-eozină

Pentru vizualizarea nucleilor și a componentelor citoplasmatiche a fost ulterior efectuată colorația standard hematoxin-eozină.

2.1.3.8. Montarea lamelor

Lamele au fost montate folosind mediul de montare DPX.

2.1.4. Dubla imunomarcare a secțiunilor groase

Dubla imunomarcare a secțiunilor groase a fost realizată prin incubarea anticorpului specific ubiquitineicu un anticorp specific GFAP, AQP-4 sau collagenului IV.

2.1.5. Analiza lamelor la microscop și preluarea și prelucrarea de imagini

Lamele au fost apoi scanate după care, din imaginile obținute, au fost decupate zonele cu o densitate mare a corpurilor amilacei iar imaginile rezultate au fost aliniate sub formă de șiruri corespunzătoare ordinii obținerii secțiunilor din blocurile de parafină.

În cadrul Centrului pentru Studii de Morfologie Microscopică și Imunologie al Universității de Medicină și Farmacie, Craiova au fost preluate imagini fluorescente ale secțiunilor (microscop Nikon Eclipse 90i) din prelucrarea cărora (folosind funcția 3D Constructor a softului Image ProPlus) au rezultat imagini tridimensionale ale șirurilor de secțiuni seriate.

2.1.6. Analiza imaginilor preluate

Imaginile preluate au fost analizate cu ajutorul softurilor Image ProPlus, respectiv Excel. Măsurătorile statistice au fost realizate folosind testul t Student iar pentru realizarea corelațiilor a fost utilizat coeficientul Pearson, valoarea $p < 0,05$ fiind considerată statistic semnificativă.

2.2. Material si metodă folosite în cea de-a doua etapă a studiului

2.2.1. Obținerea acordului aparținătorilor și a avizului de etica.

În urma obținerii consimțământului informat scris al aparținătorilor pacienților selectați și a avizului de etică de la Comisia de Etica a Spitalului Clinic Colentina, condusă de domnul Profesor Universitar Doctor Gheorghe Dan, au fost selectate, din arhivele Spitalului Clinic Colentina și ale Institutului Național de Boli Infecțioase Prof. Dr. Matei Balș, din București, un număr de 42 buletine necroptice provenite de la pacienți cu accident vascular ischemic, de ambele sexe.

2.2.2. Selectarea lamelor si marcarea, pe lame, a zonelor de țesut cerebral ischemic si a zonelor controlaterale, neafectate de ischemie

Pe baza buletinelor necroptice au fost selectate și notate, de la fiecare pacient inclus în lotul de studiu, numărul lamei colorată hematoxinilin-eozină, respectiv al blocului de parafină conținând

țesut necroptic afectat de accident vascular cerebral precum și numărul lamei și al blocului de parafina corespunzător zonei controlaterale celei afectate de accident vascular ischemic, de la același pacient. Atunci când nu au existat lame și blocuri efectuate din zona controlaterală sau atunci când analiza la microscopul optic a zonelor controlaterale releva prezența de țesut cerebral afectat de ischemie, au fost selectate lame și blocuri corespunzătoare unor zone sănătoase, neafectate de ischemie. Apoi, din histoteca Laboratorului Secției de Anatomie Patologică a Spitalului Clinic Colentina au fost selectate blocurile de parafină și lamele corespunzătoare acestei liste. Pe baza analizei la microscopul optic a lamelor colorate hematoxilin-eozină au fost selectate zonele tisulare necesare efectuării de blocuri multitisulare.

2.2.3. Realizarea de blocuri si lame multitisulare

Blocurile multitisulare și, ulterior, lamele multitisulare precum și imunomarcarea acestora au fost realizate în Laboratorul Secției de Anatomie Patologică din cadrul Spitalului Clinic Colentina, secție condusă de doamna Profesor Universitar Doctor Sabina Andrada Zurac. Astfel, în urma analizei la microscopul optic a lamelor colorate hematoxilin-eozină selectate au fost decupate zone afectate de ischemie, respectiv zone de țesut cerebral sănătos din porțiunea controlaterală, ce au fost reincluse în parafină cu obținerea unui număr de 14 blocuri multitisulare conținând câte 6 fragmente tisulare ce proveneau de la 3 pacienți (pentru fiecare pacient existând un caz-martor, cu țesut cerebral ischemic, și un caz-control, cu țesut cerebral sănătos din zona controlaterală). Blocurile multitisulare obținute au fost ulterior secționate, din fiecare bloc multitisular a fost obținut un set de 14 lame multitisulare.

2.2.4. Deparafinarea și rehidratarea lamelor multitisulare obținute în vederea imunomarcării

Lamele multitisulare obținute au fost, apoi, deparafinate și rehidratate în vederea imunomarcării.

2.2.5. Stabilirea diluțiilor optime ale anticorpilor primari

Pentru evitarea obținerii unui fundal foarte intens colorat au fost testate mai multe metode de etalare a antigenului și mai multe diluții ale anticorpilor, stabilindu-se diluțiile optime: 1:8000 pentru AQP-4, 1:500 pentru CD 105 și 1:10 pentru α -sintrofina. A fost stabilită metoda optimă

de etalare a antigenului, aceasta fiind, pentru toate cele trei cazuri, fierberea în citrat timp de 10 minute la 300 de grade Celsius urmată de scăderea temperaturii la 100 grade Celsius și fierberea încă 20-30 de minute.

2.2.6. Anticorprii primari utilizați

Anticorprii primari utilizați în acest studiu au fost: pentru AQP-4: Aquaporin 4, rabbit anti-human de la Alomone Labs, cod APC-035; pentru α -sintrofina, Syntrophin, alpha 1, rabbit anti-human, de la Antibodies Online, cod ABIN1714323; pentru CD 105, mouse anti-human, de la Novus Antibodies, cod NBP2-26495.

2.2.7. Imunoarcarea lamelor multitisulare

Lamele au fost deparafinate și rehidratate, etalarea antigenului fiind făcută așa cum a fost descris mai sus.

Blocarea peroxidazei endogene a fost realizată prin incubare, timp de 5 minute la temperatura camerei, cu Peroxidase Block din kitul Novolink Max Polymer Detection System de la Leica Biosystems.

Apoi, blocarea legării nespecifice a anticorpilor a fost realizată prin incubare, timp de 5 minute la temperatura camerei, cu Protein Block din kitul Novolink Max Polymer Detection System de la Leica Biosystems.

Incubarea cu anticorpi primari a fost realizată timp de o oră la temperatura camerei, în mediu umed. Apoi, lamele au fost incubate cu anticorprii secundari, iar detecția semnalului a fost efectuată cu ajutorul DAB. Ulterior lamele au fost colorate cu hematoxină și montate.

2.2.8. Preluarea și prelucrarea imaginilor de microscopie. Interpretarea rezultatelor.

Preluarea și prelucrarea imaginilor de microscopie precum și interpretarea rezultatelor au fost realizate în cadrul Departamentului de Histologie și al Departamentului de Metodologia Cercetării Științifice și Imunologie ale Universității de Medicină și Farmacie Craiova, sub îndrumarea domnului Profesor Universitar Doctor Nicolae-Daniel Pirici.

2.3. Material si metoda folosite in cea de-a treia etapa a studiului

2.3.1. Animalele utilizate

În cea de-a treia etapa a studiului au fost utilizați 21 șobolani Sprague-Dawley, procurați de la Institutul Național „Cantacuzino”, București, ce au fost împărțiți în 4 grupuri: grupul I: grupul-control (4 animale sănătoase); grupul II: grup control cu placebo (6 animale la care s-a efectuat craniotomie și sutura ulterioară a mușchilor și a pielii); grupul III (5 animale la care a fost indus AVC ischemic însă nu s-a administrat ulterior tratament) grupul IV (6 animale la care a fost indus AVC ischemic și s-a administrat apoi tratament).

2.3.2. Efectuarea intervenției chirurgicale

Interventia chirurgicală a fost făcută la grupurile de animale II, III și IV și a constat în ocluzia arterei cerebrale medii după anestezia cu o mixtură de ketamină/xilazină. La grupul de animale II (placebo), după expunerea MCA nu s-a efectuat coagularea acesteia și inducția ocluziei ci mușchii și pielea au fost suturate.

2.3.3. Prepararea TGN-020 și tratamentul cu acest inhibitor

Fiecărui dintre șobolanii din grupul IV i s-a administrat, intraperitoneal, la 15 minute post-operator, o injecție cu inhibitorul TGN-020 sub formă de clorură în concentrația de 100 mg/kg.

2.3.4. Anestezierea și perfuzia cu formalină a animalelor

După 3 zile, animalele au fost anesteziate profund și perfuzate cu soluție salină de formol timp de 36-60 de minute, cu prelevarea ulterioară și fixarea organelor timp de 2 zile.

2.3.5. Scanarea ex-vivo a întregii suprafețe a creierului animalului

Întreaga suprafața a creierului fiecărui animal a fost scanată cu obținerea de imagini tridimensionale. Apoi, creierele au fost secționate și fixate.

2.3.6. Fixarea creierului animalului

Creierul animalului a fost fixat timp de 2 zile în soluție formalină 10%.

2.3.7. Includerea în parafină a creierului animalului

După încheierea perioadei de fixare, creierul a fost prelucrat în vederea includerii în parafină

2.3.8. Secționarea blocurilor de parafină

Au fost realizate secțiuni subțiri, cu dimensiunile de $10 \times 5 \mu\text{m}$, respectiv groase, de $10 \times 20 \mu\text{m}$.

2.3.9. Colorarea hematoxin-eozină a secțiunilor

Din secțiunile obținute au fost colorate hematoxin-eozină secțiuni corespunzătoare fiecărui caz.

2.3.10. Marcarea imunohistochimică a secțiunilor

2.3.10.1. Selectarea secțiunilor destinate a fi analizate

Pentru fiecare caz disponibil, din secțiunile subțiri au fost alese 15 secțiuni situate la $250 \mu\text{m}$ una față de cealaltă ce acopereau întreaga suprafață a infarctului.

2.3.10.2. Procesarea și marcarea imunohistochimică a secțiunilor selectate

Secțiunile selectate au fost imunomarcate pentru GAP-43 (pentru detecția semnalului fiind folosit DAB), apoi lamele au fost colorate hematoxin-eozina și montate.

2.3.11. Scanarea secțiunilor imunomarcate și colorate hematoxin-eozina

În urma immunostaining-ului, toate slide-urile au fost scanate cu salvarea imaginilor obținute în format .tiff.

2.3.12. Analiza imagistică și volumetrică a secțiunilor

Emisferele cerebrale și zonele infarctate au fost încercuite manual, apoi volumele lor au fost calculate folosind formula $\text{Volumul } (\mu\text{m}) = A \times 15 \times 250$, unde 15 reprezintă numărul secțiuni ce acoperă zona de interes situate la distanța de $250 \mu\text{m}$ una față de cealaltă iar „A” reprezintă totalul zonelor de interes.

După scanarea de suprafață a creierului, volumele efective ale creierului au fost calculate după îndepărtarea zonelor corespunzătoare bulbilor olfactivi și cerebelului. Datele au fost reprezentate în Excel.

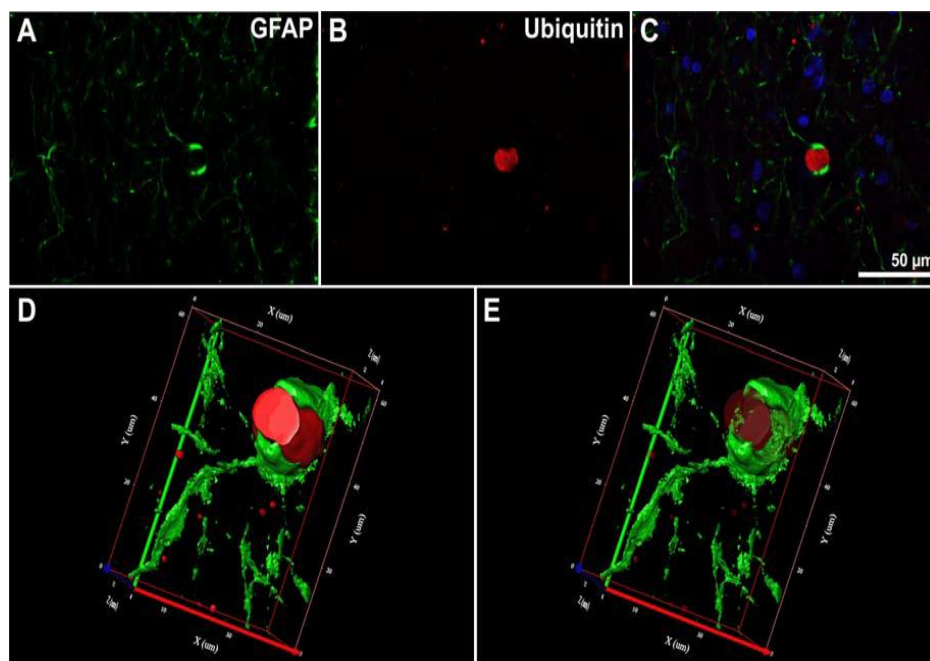
3. Rezultate

3.1. Rezultate obținute în prima etapă a studiului.

3.1.1. Rezultate obținute în urma analizei secțiunilor subțiri.

Analiza secțiunilor subțiri, de 4 μm , marcate pentru GFAP a relevat prezența unor formațiuni discoidale, neînconjurate de inflamație. Aceste date corespund cu datele din literatură ce tratează aspectul corpiilor amilacei și al țesutului neuronal înconjurator.

În urma obținerii de imagini tridimensionale din secțiunile seriate subțiri realizate, s-a dovedit că peste două treimi din corpiii amilacei identificați făceau parte din structuri complexe, înalt ramificate, cu tendință de înmugurire ce ocazional comunicau între ele, formând punți.



Imaginea 3.1 [58]

Alinierea secțiunilor seriate (imaginile A, B și C) și obținerea unor imagini tridimensionale ale șirurilor de secțiuni consecutive a dus la demonstrarea aspectului complex, ramificat, al corpurilor amilacei (imaginile G, H, I, J).

Săgețile din imaginile A, B, C, D, E și F indică fragmente de corpi amilacei ce înmuguresc, situate perivascular. Imaginile G, H, I și J, G reprezintă reconstrucții tridimensionale realizate pe baza șirului de secțiuni seriate, și demonstrează că alinierea acestor secțiuni duce la vizualizarea unei structuri complexe, cu numeroase ramificații.

Analiza localizării și structurii corpurilor amilacei a arătat că agregatele situate perivascular sunt mai complexe și mai bogate comparativ cu cele din neuropil.

Identificarea, pe lame, a unor structuri sferoide alungite sau fuzionate și vizualizarea – în urma analizei imaginilor tridimensionale obținute – a unor punți între aceste complexe demonstrează capacitatea acestora de a comunica între ele.

Dimensiunile și morfologia corpurilor amilacei variază de la structuri deosebit de complexe, care comunicau între ele, formând punți, și ocupau uneori întreaga grosime a secțiunilor, până la structuri simple, izolate, puțin ramificate.

S-a constatat că – așa cum era de așteptat – GFAP este prezentă la nivel perivascular (această proteină fiind situată în citoskeletul astrocitar) însă ea nu colocalizează întotdeauna cu corpii amilacei.

În urma analizei a peste 2500 de corpi amilacei situate în jurul a 50 de vase sange a putut fi calculată dimensiunea medie a corpurilor amilacei, aceasta fiind de $12,03 \mu\text{m} (\pm 5,17 \mu\text{m})$, precum și diametrul mediu al vaselor de sânge, acesta fiind de $180,13 (\pm 45,2) \mu\text{m}$.

Astfel, a putut fi identificată prezența unei corelații directe puternice între numărul corpiilor amilacei asociați vaselor de sânge și diametrul vaselor [$r(48) = 0,82, p < 0,01$].

De asemenea, a existat o corelație directă între numărul de puncte de înmugurire în arhitectura structurală a corpiilor amilacei și diametrul vaselor de sânge [$r(48) = 0,75, p < 0,01$].

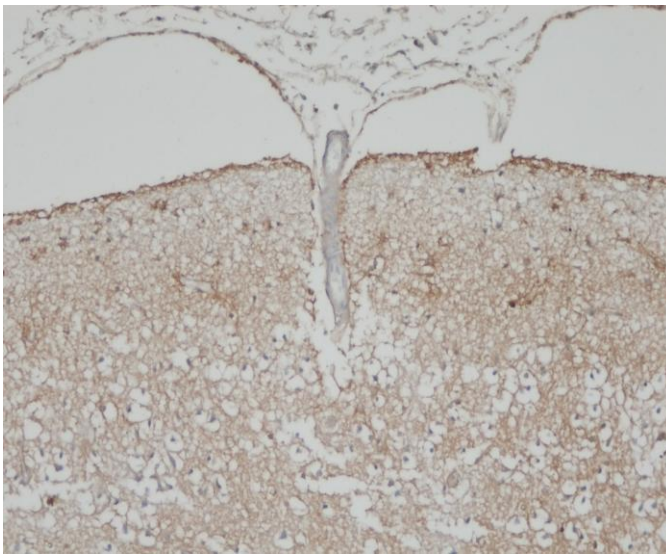
3.1.2. Rezultate obținute în urma analizei secțiunilor groase.

Evaluarea secțiunilor de 50 μm dublu imunomarcate pentru ubiquitină și GFAP a demonstrat structura complexă, ramificată, cu tendință de înmugurire a corpiilor amilacei.

Astfel, s-a demonstrat că formațiunile rotunde descrise în literatura drept corpi amilacei reprezintă de fapt structuri complexe, mari, tridimensionale și ramificate.

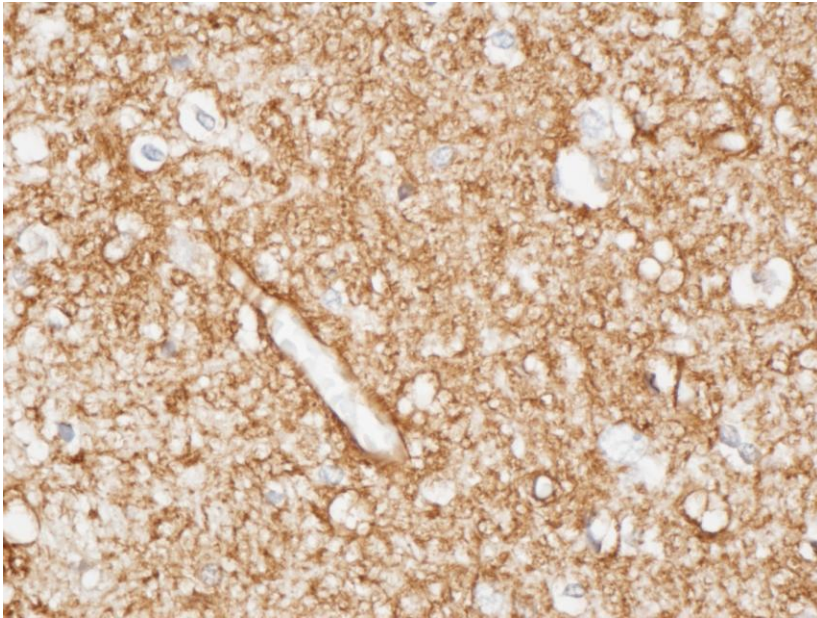
De asemenea, analiza secțiunilor groase imunomarcate pentru ubiquitină și GFAP a arătat că aceste două proteine nu colocalizează, însă GFAP poate înconjura, ocazional (uneori complet) corpiii amilacei.

3.2. Rezultate obținute în cea de-a doua etapă a studiului



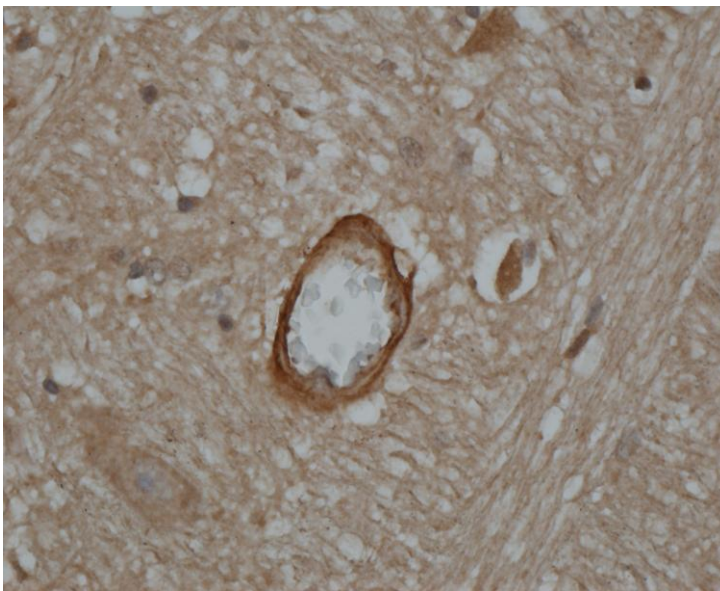
Imaginea 3.2

În zona cu leziune ischemică – în această imagine, stratul molecular în zona de pătrundere a vaselor meningeale în acest strat, AQP-4 își pierde distribuția polarizată la interfața creier-sânge și creier-LCR, fiind prezentă, în schimb, în toate procesele astrocitare, cu o distribuție difuză. De asemenea, nivelul său este crescut la nivelul leziunii ischemice și perilezional comparativ cu țesuturile neafectate de ischemie.



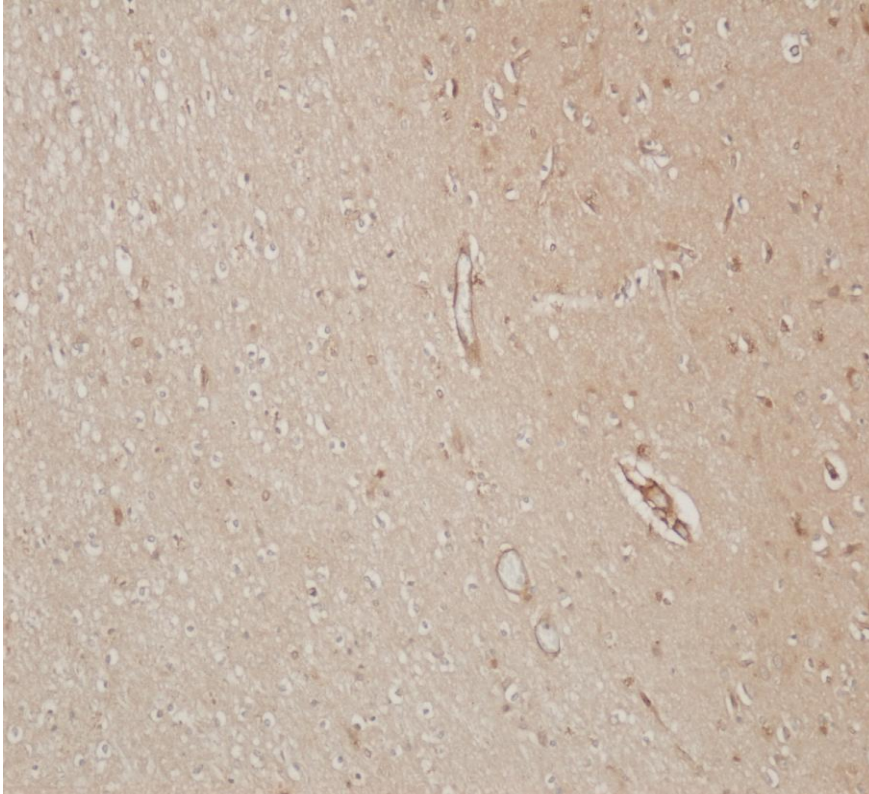
Expresia AQP-4 la nivelul glia limitans perivasculară în țesutul cerebral ischemic. AQP-4 este prezentă difuz, nepolarizat, și are o expresie mai crescută comparativ cu normalul. Totuși, expresia sa este mai intensă la nivel perivascular.

Imaginea 3.3



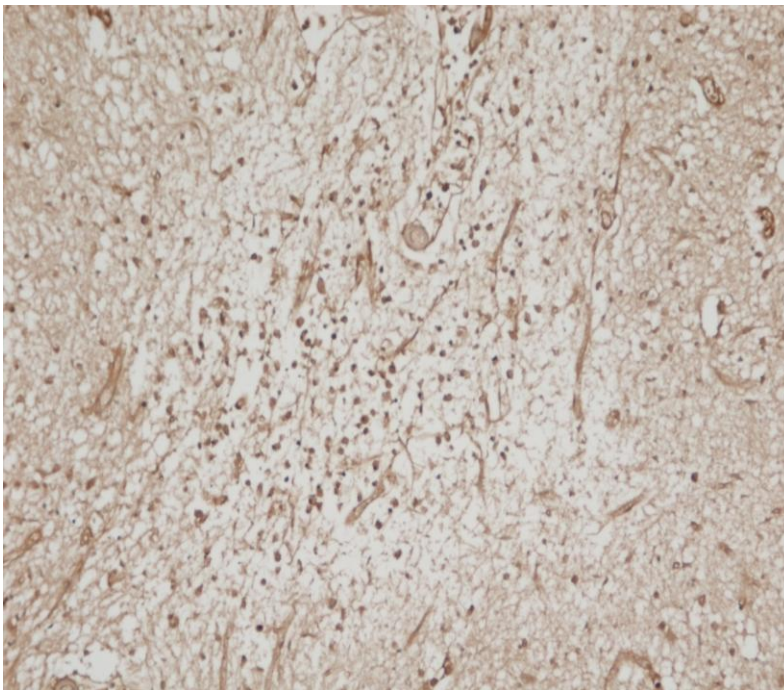
Porțiuni de țesut cerebral neafectat de ischemie de la nivelul nucleilor bazali ce demonstrează prezența CD 105 la nivel vascular, semnalul fiind foarte intens la nivelul endoteliului și al adventiceii.

Imaginea 3.4



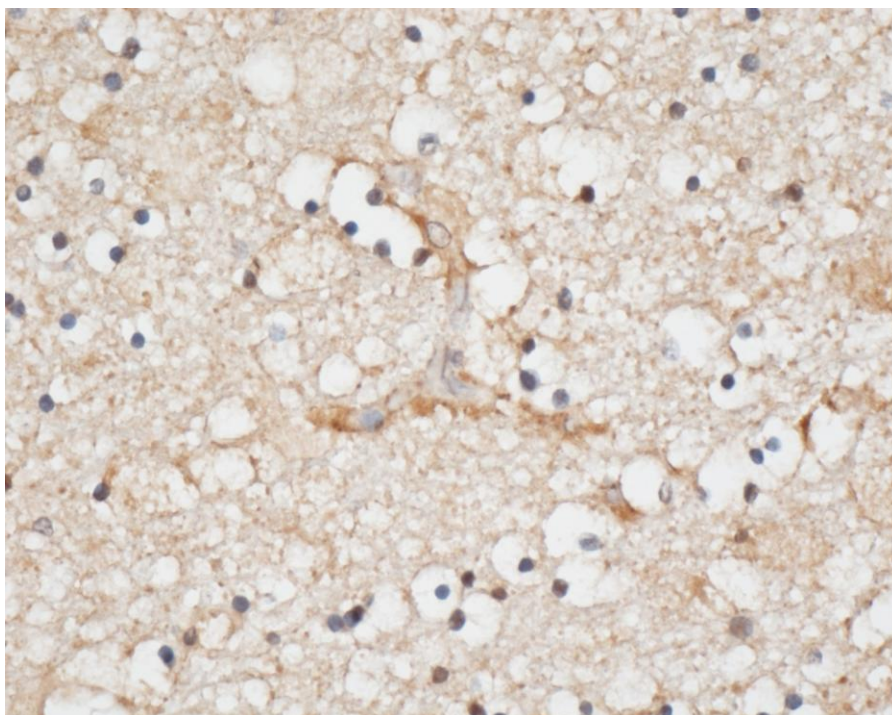
În țesutul cerebral sănătos, nivelul de expresie al CD 105 este mai crescut în substanța cenușie (dreapta) comparativ cu substanța alba (stânga).

Imaginea 3.5



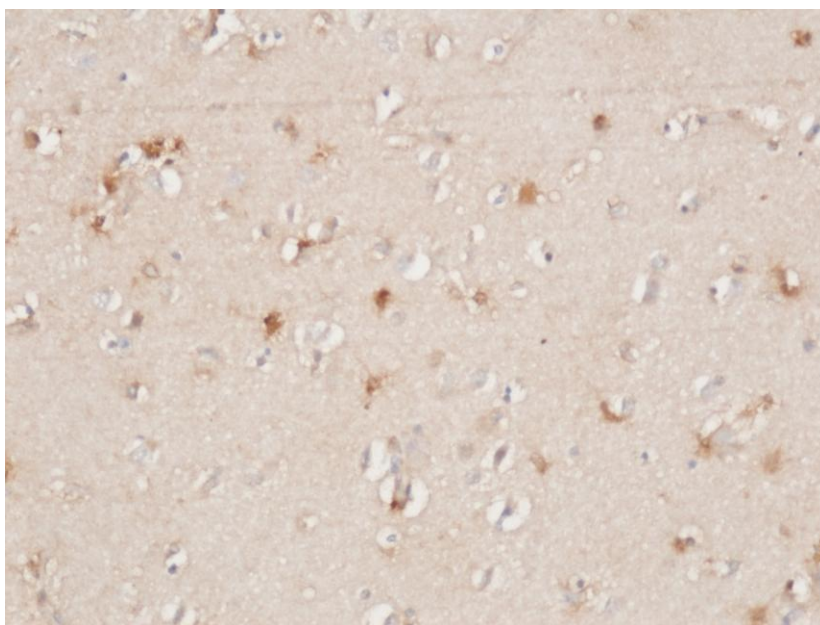
Zonă de țesut cerebral ischemic ce prezintă demielinizare și rarefiere a neuropilului. De asemenea, la nivelul neuropilului există o reactivitate vasculară crescută, evidențiată prin prezența unui semnal intens pozitiv pentru CD 105.

Imaginea 3.6



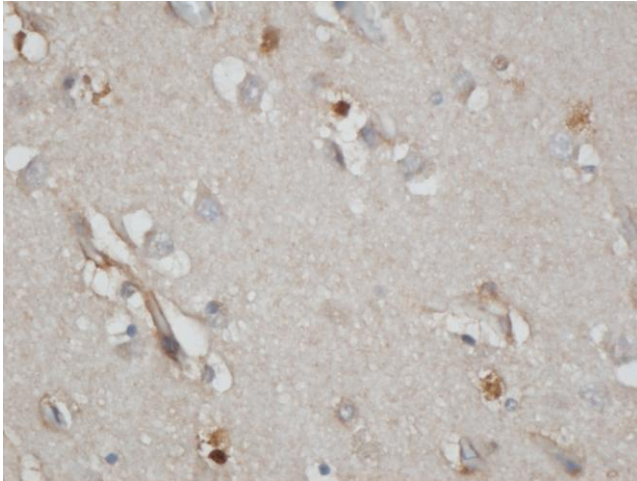
Porțiune de țesut cerebral de la nivelul glia limitans perivasculară ce demonstrează prezența unei expresii crescute a α -sintrofinei la acest nivel.

Imaginea 3.7



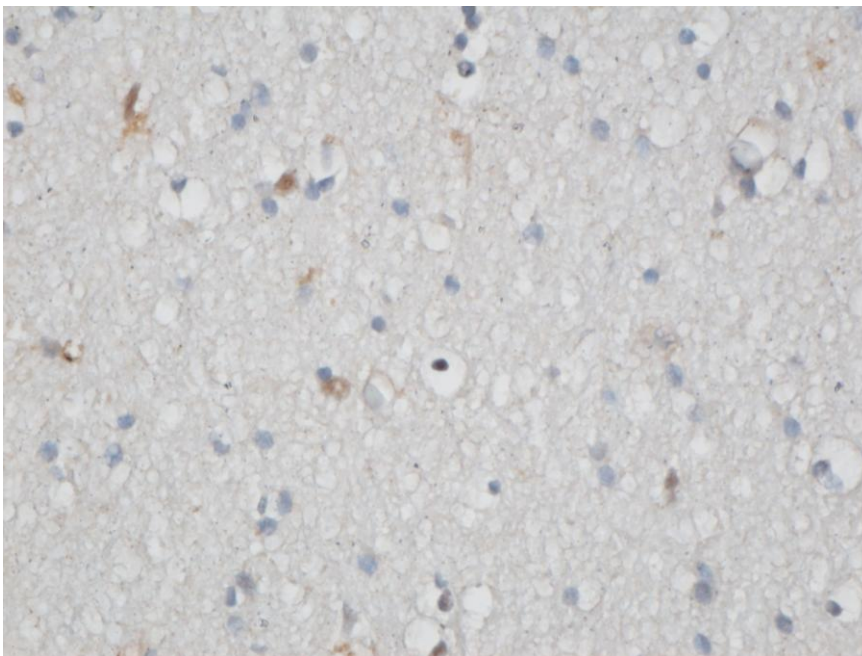
Porțiune de țesut cerebral ischemic ce demonstrează prezența, la nivel perilezional, a unei expresii crescute a α -sintrofinei în membrana astrocitară.

Imaginea 3.8



Porțiuni de țesut cerebral de la nivelul substanței cenușii ce demonstrează prezența α -sintrofinei în peretele vaselor de sânge și la nivelul membranei astrocitare.

Imaginea 3.9



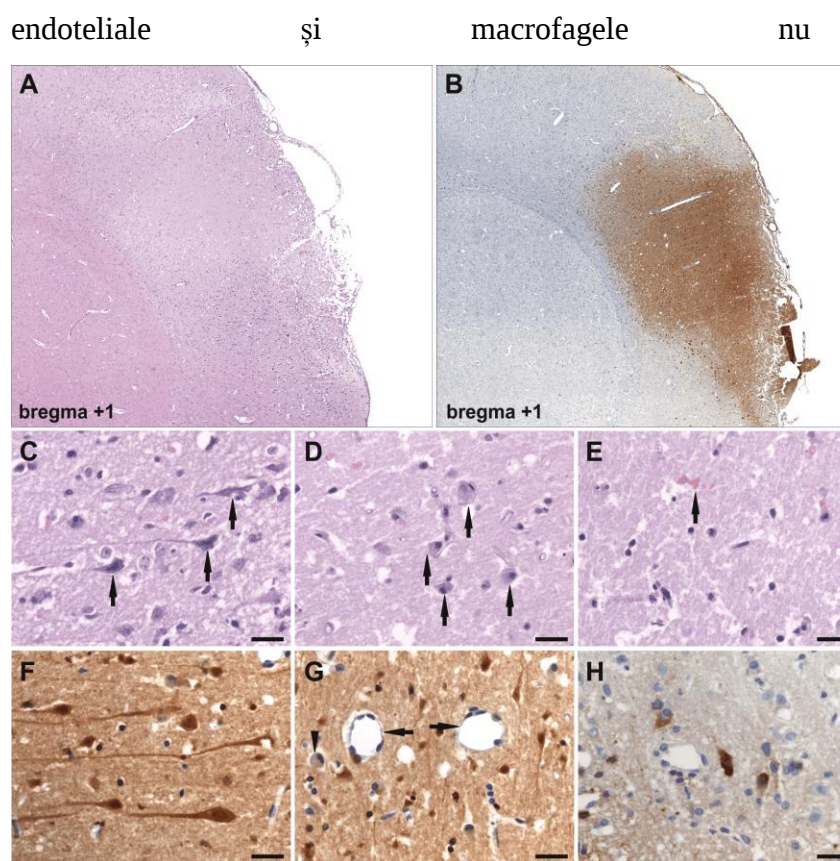
Porțiuni de țesut cerebral provenită de la nivelul substanței albe, în care semnalul pentru α -sintrofină este prezent numai la nivel astrocitar, nu și la nivelul capilarelor sangvine.

Imaginea 3.10

3.3. Rezultate obținute în cea de-a treia etapă a studiului

Din cei 21 de șobolani incluși în experiment, 20 au supraviețuit până la perfuzia cu formol.

Prezența infarctului a fost confirmată la animalele supuse ocuziei arterei cerebrale medii (incluse în grupurile III și IV) prin analiza macroscopică și microscopică. Astfel, din punct de vedere macroscopic, necroza a fost delimitată la nivelul cortexului temporal în timp ce analiza la microscop a relevat prezența semnelor patognomonice pentru infarctul cerebral recent, ca: aspectul spumos al neuropilului, pierderea contururilor celulare cu modificări nucleare permanente, micșorarea corpiilor neuronali, prezența citoplasmei eozinofilice sau cromatoliza corpiilor Nissl. De asemenea, centrul infarctului prezintă un număr mic de macrofage spumoase iar perilezional sunt prezente astrocite gemistocitice, acestea fiind patognomonice țesutului cerebral infarctat. Au putut, de asemenea, fi identificate – însă într-o cantitate mică – mici peteșii reprezentate de extravazate eritrocitare de la nivel capilar. Așa cum a fost așteptat, zonele infarctate au demonstrat un semnal puternic pentru GAP43, restul neuropilului fiind mult mai slab colorat. Așa cum era de așteptat la acest tip de staining, la nivelul țesutului lezional celulele



Secțiune coronală de țesut cerebral de la un șobolan la care s-a efectuat OACM fără administrare de TGN-020 (grupul III). Analiza histopatologică – hematoxilin-eozină (A, C, D, E) și imunohistochimică – GAP-43 (B, F, G, H) a confirmat existența infarctului în acest țesut, prin prezența (figurile A și B) de neuroni eozinofilici, micșorați cu modificări nucleare ireversibile și a macrofagelor spumoase, precum și a extravazatelor eritrocitare prezente sub formă de peteșii (imaginea C, săgeți). Imaginile F, G și H au fost imunomarcate pentru GAP-43. În imaginea F sunt prezente celule glial-like (acestea având dimensiuni mai mici comparativ cu neuronii) precum și pericarionii (ale căror prelungiri reprezintă dendritele apicale). Imaginea G relevă prezența unui macrofag spumos (capul săgeții) precum și două vase de sânge la nivelul cărora poate fi observată o relativă conservare a arhitecturii celulelor endoteliale (săgeți). În imaginea H este demonstrat stainingul neuronal la nivel perilezional. Liniile orizontale din imaginile C-H, colțul din dreapta jos, reprezintă 20 μm.

Imaginea 3.11.^[59]

Comparând țesuturile provenite de la animalele cu ocluzia ACM ce au primit tratament cu cele care nu au fost tratate în urma ocluziei, nu s-a înregistrat nicio diferență din punct de vedere a intensității colorației sau a localizării celulare a acesteia.

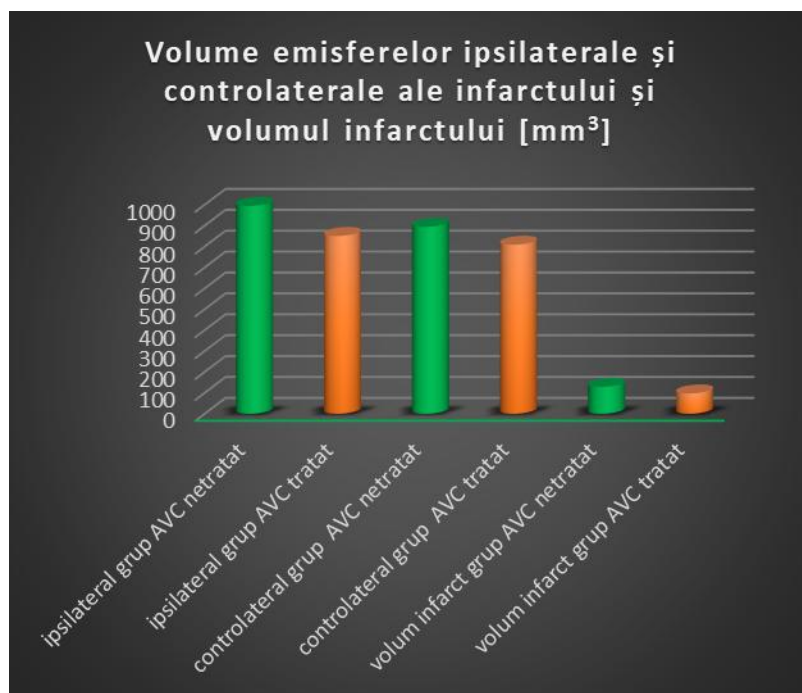
În țesuturile control (la care nu s-a realizat ocluzie ACM) și placebo (la care s-a realizat numai craniotomie, fără ocluzia ACM), așa cum era de așteptat, nu a existat staining tisular.

Calculul volumului regiunilor infarctate a fost realizat pe baza principiului Cavalieri, în urma obținerii unei regiuni de 250 μm (distanța dintre regiunile prelevate, măsurată în microni, începând de la nivelul bregmei + 2) $\times$ 15 (regiuni analizate) = 3750 μm ce cuprindea întreaga suprafață a infarctelor.

Comparând, pe baza acestui calcul, volumele emisferelor ipsilaterale infarctului, s-a constatat că, la animalele cu ocluzia ACM care nu au primit tratament, acestea au fost semnificativ mai crescute ($995,10 \pm 71,42 \text{ mm}^3$) comparativ cu animalele cu ocluzia ACM care au primit tratament ($851,05 \pm 54,2 \text{ mm}^3$) ($p < 0,01$) și cu volumele animalelor control tratate cu placebo ($766,92 \pm 56,26 \text{ mm}^3$) ($p < 0,01$).

Comparând volumele emisferelor controlaterale infarctului, acestea au avut - cu excepția volumelor mai mici comparativ cu cele ipsilaterale infarctului – o distribuție asemănătoare celor prezentate anterior. Astfel, s-a constatat că, similar volumelor emisferelor ipsilaterale infarctelor, și volumele controlaterale zonei ischemice au fost cele mai mari la animalele cu ocluzia ACM care nu au primit tratament ($894,27 \pm 71,42 \text{ mm}^3$) comparativ cu animalele cu ocluzia ACM ce au primit tratament ($808,87 \pm 61,8 \text{ mm}^3$) și cu grupul control placebo ($p < 0,05$, respectiv $p < 0,01$).

Așa cum era de așteptat, între volumele emisferelor controlaterale ale animalelor cu ocluzia arterei cerebrale medii care au primit tratament și cele ale animalelor din grupul placebo nu a existat o diferență semnificativă statistic.



Volumele infarctelor, respectiv emisferelor ipsilaterale și controlaterale la grupul AVC tratat, respectiv la grupul AVC netratat.

Grafic 1

Similar, volumele zonelor corespunzătoare centrului propriu-zis al infarctului au fost, la animalele cu ocluzia ACM ce nu au primit tratament, ușor mai crescute comparativ cu animalele ce au primit tratament ($129,05 \pm 22,36 \text{ mm}^3$ versus $97,25 \pm 21,34 \text{ mm}^3$) ($p < 0,05$).

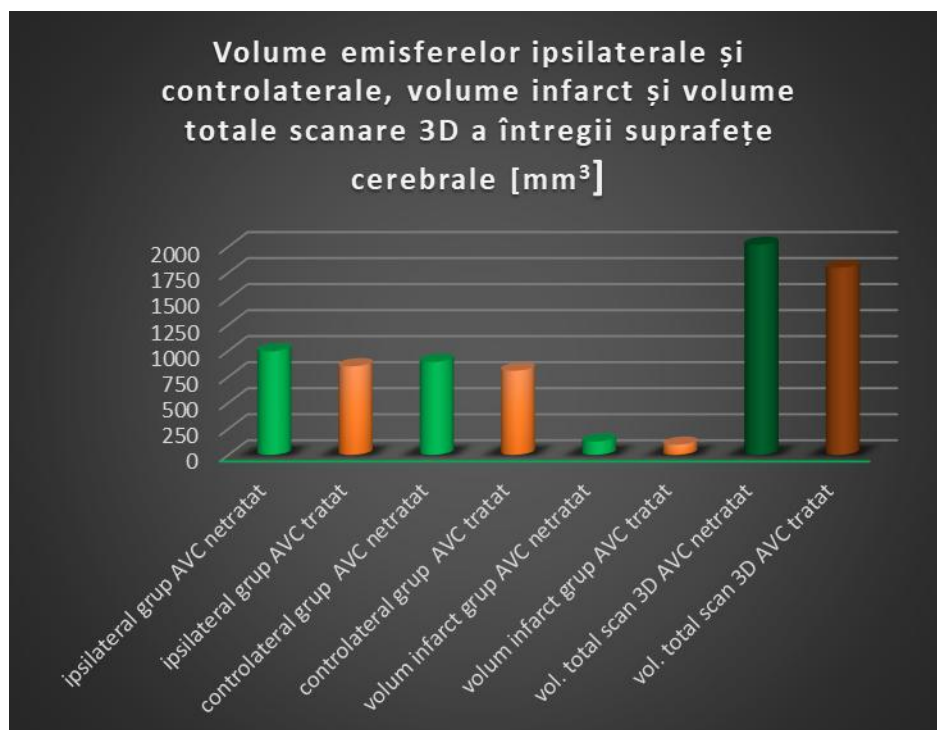
După re poziționarea pe masa de scanat a fiecărui specimen din cele trei grupuri de animale (animale cu OACM care nu au primit tratament – grupul III, animale cu OACM care au primit tratament – grupul IV, respectiv animale la care nu s-a efectuat OACM, ci doar craniotomie și sutura ulterioară a mușchilor și pielii – grupul II), rescanare și efectuarea, pe baza datelor obținute, a unui test T împerecheat, s-a constatat că nu există diferențe semnificative între rezultatele corespunzătoare animalelor cu AVC tratate, animalelor cu AVC netratate, respectiv grupului control cu placebo, la care s-a realizat numai craniotomie ($p < 0,05$).

În urma scanării tridimensionale de suprafață și a analizei volumetrice a celor trei grupuri de studiu (II, III și IV), s-a constatat că animalele cu ocluzia ACM ce nu au primit tratament au avut volume totale mai mari ($2018,25 \pm 115,24 \text{ mm}^3$) ($p < 0,01$) comparativ cu animalele cu ocluzia ACM care au primit tratament ($1798,45 \pm 115,24 \text{ mm}^3$) ($p < 0,01$) și cu animalele din grupul placebo, la care s-a realizat craniotomie cu sutura ulterioară a mușchilor și pielii ($1742,21 \pm$

96,21 mm³) ($p < 0,01$) Nu a existat nicio diferență semnificativă între animalele cu AVC tratate și animalele din grupul placebo.

Corelând volumele emisferelor ipsilaterale și volumele miezului infarctelor s-a observat existența unei corelații directe foarte puternice [$r(4) = 0,842$, $p < 0,05$]. De asemenea, o corelație directă puternică [$r(4) = 0,684$, $p < 0,05$] a fost observată între volumele miezului infarctelor și volumele emisferelor controlaterale.

În plus, comparând volumele emisferelor ipsilaterale/volumele miezului infarctelor și volumele totale telencefalice-diencefalice s-a observat existența unei corelații directe foarte puternice [$r(4) = 0,853$, $p < 0,10$], respectiv [$r(4) = 0,714$, $p < 0,05$].



Volumele emisferelor ipsilaterale și controlaterale, volumele infarctului și volumele totale rezultate în urma scanării tridimensionale la animalele din grupul AVC tratat, respectiv la animalele din grupul AVC netratat.

Grafic 2

4. Discuții

4.1. Discuții privind prima etapă a studiului

În prima etapă a studiului, după realizarea de blocuri de parafină din țesut necroptic provenit din toate zonele cerebrale ale pacienților analizați, au fost mai întâi selectate, cu ajutorul analizei la microscopul optic a lamelor colorate hematoxin-eozină obținute, blocurile de parafină cele mai relevante pentru acest studiu. Din aceste blocuri au fost tăiate secțiuni subțiri, ce au fost imunomarcate cu GFAP (folosind ca metodă de detecție DAB) iar apoi s-a efectuat counterstaining folosind colorația hematoxin-eozină, și secțiuni groase, ce au fost dublu imunomarcate cu ubiquitina (prezentă în corpii amilacei) și fie collagen IV (prezent în membranele bazale vasculare), fie aquaporina-4 sau GFAP (proteine prezente la nivel astrocitar), semnalul fiind detectat folosind anticorpi secundari marcați fluorescent. Toate secțiunile au fost apoi scanate cu ajutorul unui microscop dotat cu scanner, și, după prelevarea imaginilor, zonele bogate în corpi amilacei au fost decupate cu ajutorul unui soft și aliniate cu obținerea unei suprapuneri a imaginilor secțiunilor seriate consecutive, ce au fost ulterior reconstituite cu formarea de imagini tridimensionale.

Apoi, secțiunile subțiri, imunomarcate pentru GFAP și colorate hematoxin-eozină au fost analizate la microscopul optic.

Analiza a confirmat datele existente în literatură cu privire la structura corpurilor amilacei, aceștia prezentându-se ca **formațiuni rotunde sau sferice**, bazofile, neînconjurate de infiltrat inflamator. Analiza imaginilor tridimensionale obținute prin suprapunerea imaginilor acestor secțiuni a demonstrat prezența GFAP perivascular, însă nu neaparat în jurul corpurilor amilacei. Aceasta observație este în concordanță cu datele din literatură care menționează prezența astrocitelor perivascular (prelungirile membranare ale acestor celule căptușind capilarele cerebrale).

Analiza imaginilor tridimensionale obținute prin alinierea suprafețelor bogate în corpi amilacei din secțiuni consecutive subțiri – imunomarcate pentru GFAP (semnalul fiind detectat folosind DAB) și colorate hematoxin-eozină sau groase - imunomarcate pentru ubiquitina (prezentă în corpii amilacei) și fie collagen (prezent în membranele bazale vasculare), fie AQP-4 sau GFAP (prezente în astrocite) – semnalul fiind detectat utilizând anticorpi secundari fluorescenți - a

demonstrat faptul că peste două treimi din corpii amilacei identificați făceau parte din agregate complexe, ramificate, cu tendință la înmugurire, ce uneori comunică între ele. Aceste structuri complexe cuprindeau, de cele mai multe ori, întreaga grosime a structurilor tridimensionale obținute, demonstrând faptul că **structurile sferice sau rotunde descrise drept corpi amilacei în urma observației la microscopia optica sunt de fapt agregate complexe, ce înmuguresc și comunica frecvent între ele, formând punți.**

Au fost astfel evaluați peste 2500 corpi amilacei, în jurul a aproximativ 50 de vase sangvine.

S-a constatat **existența unei relații direct proporționale între diametrul vaselor de sânge și numărul corpurilor amilacei prezenți la nivel perivascular, respectiv numărul punctelor de înmugurire ale acestora.**

În total, grosimea medie a suprafeței analizate tridimensional a corpurilor amilacei (situați atât intraparenchimos, cât și perivascular) a fost de aproximativ 160 μm .

În ceea ce privește morfologia rețelelor de corpi amilacei, nu au existat diferențe între cei situați la nivel perivascular și cei situați intraparenchimos.

Dubla imunomarcare a secțiunilor groase a demonstrat, la rândul său, structura complexă a corpurilor amilacei.

Mai mult, imunostainingul pentru GFAP și ubiquitină a demonstrat prezența GFAP în jurul corpurilor amilacei, aceste structuri fiind înconjurate – uneori complet – de GFAP (prezent în citoskeletul astrocitar – în acest caz, fiind prezent în extensiile membranare astrocitare), fără însă ca această proteină să colocalizeze cu ubiquitina.

Lamele marcate pentru collagen IV și ubiquitină au demonstrat prezența corpurilor amilacei la nivel perivascular, subependimar, subpial, sau în neuropil. Asemenea GFAP și ubiquitinei, nu a existat colocalizare între collagenul IV și această proteină. Uneori semnalul pentru collagen IV a înconjurat complet ubiquitina, demonstrând prezența ocazională a corpurilor amilacei în dedublări ale membranei bazale vasculare.

Lamele imunomarcate pentru AQP-4 și ubiquitina au arătat că, deși aceste proteine sunt prezente în imediata proximitate, nu există colocalizare, corpii amilacei fiind înconjurați de extensiile membranelor plasmactice astrocitare.

Deși este cunoscut faptul că AQP-4 (situată la nivelul membranei celulare astrocitare) și GFAP (un filament intermediar citoskeletal) nu colocalizează,^[60] având localizări diferite la nivel celular, în studiul de față, deși niciuna dintre aceste proteine nu a colocalizat cu ubiquitina, ambele au fost situate în imediata apropiere a corpurilor amilacei, probabil din cauza distorsiunii extensiilor membranare astrocitare cu pierderea, la contactul cu corpii amilacei, a dispoziției normale a membranei și citoskeletului acestor celule.

Deși până la ora actuală în literatură există numeroase studii ce tratează corpii amilacei, nu a fost încă pe deplin elucidat care sunt compoziția, modul de producere și rolul acestor formațiuni complexe.

În ceea ce privește compoziția corpurilor amilacei, nu a fost încă stabilit dacă ei sunt alcătuiți din celule gliale degradate sau din fragmente neuronale.^[61,62,63]

Din punct de vedere al modului de formare a corpurilor amilacei, există, în prezent, două teorii care încearcă să explice acest fenomen.^[64] Prima, ipoteza vasculară, susține că aceste formațiuni apar în bolile vasculare cronice la interfața creier-sânge și creier-lichid cefalorahidian, având rolul de a izola proteine degradate și glicoproteine care, în urma pătrunderii în parenchimul cerebral, ar putea avea rol imunogen, declanșând un proces inflamator la nivelul creierului.^[64,65,66] Această ipoteză ar putea fi explicată de prezența corpurilor amilacei la nivel subpial, subependimar sau perivascular. Cea de-a doua ipoteză, o posibilă explicație pentru prezența corpurilor amilacei în bolile neurodegenerative, afirmă că aceste structuri complexe sunt rezultatul acumulării, la nivelul parenchimului cerebral, de proteine degradate ce au fost supuse stressului oxidativ.^[67,68]

Observația, în urma analizelor de microscopie electronică, că aceste structuri complexe nu au o membrană proprie,^[69,70,71] precum și constatarea, în urma studiului de față, că aceste structuri sunt uneori localizate în dedublarile membranei vasculare pot sugera o origine vasculară a acestor formațiuni, ele putând reprezenta o structură situată la interfața creier-sânge sau creier-

lichid cefalorahidian cu rol de barieră protectoare împotriva pătrunderii de antigene imunogene la nivel cerebral.

Studiul de față este primul care folosește secțiuni seriate sau imunofluorescența pe secțiuni groase pentru a evalua structura corpurilor amilacei din creier și totodată primul ce descrie complexitatea tridimensională a acestor formațiuni (indiferent de localizarea lor perivasculară sau intraparenchimatoasă) la nivel cerebral.

4.2. Discuții privind etapa a II-a a studiului

În cea de-a doua etapă a studiului s-a încercat evaluarea rolului AQP-4 în menținerea echilibrului hidric la nivel cerebral atât în condiții fiziologice cât și în condiții patologice, de ischemie, folosind țesut cerebral necrotic provenit de la pacienți cu AVC ischemic și țesut cerebral necrotic provenit din zonele controlaterale, sănătoase, ale acestor pacienți sau – când acest lucru nu a fost posibil – de la persoane decedate neafectate de accident vascular ischemic.

Pentru aceasta, am evaluat atât nivelul de expresie și distribuție al AQP-4 în țesutul cerebral ischemic comparativ cu țesutul cerebral neafectat de ischemie, comparându-le cu datele din literatură, cât și relația acestui canal de apă cu alte proteine învecinate, ca α -sintrofina, proteină cu rol în ancorarea AQP-4 la membrana plasmatică astrocitara, sau CD-105, proteina specifică vaselor de sânge noi, imature, a cărei expresie crește în ischemie. În plus, deoarece în literatură studiile privind distribuția acestor proteine la nivelul substanței albe comparativ cu substanța cenușie sunt foarte puține sau inexistente, am încercat evaluarea nivelului și a distribuției α -sintrofinei și al CD 105 în aceste locații.

În vederea realizării obiectivelor acestui studiu am efectuat blocuri multitisulare obținute din țesut necrotic, respectiv țesut controlateral sănătos de la fiecare pacient inclus în studiu (atunci când a fost posibil, de la același pacient, iar când zona controlaterală era afectată de ischemie, de la o persoană a cărei cauză de deces nu a fost AVC ischemic). După secționarea blocurilor, realizarea lamelor și deparafinarea lor, precum și după stabilirea metodei optime de etalare a antigenului și diluțiilor optime ale anticorpilor, lamele au fost imunomarcate, separat, pentru AQP-4, CD-105 sau α -sintrofina, detecția semnalului fiind realizată folosind cromogenul DAB, și, după analiza lor la microscopul optic, au fost preluate și prelucrate imagini de microscopie.

În urma analizei datelor obținute, am constatat că, în ceea ce privește modul de distribuție a AQP-4 în țesutul cerebral normal, datele obținute sunt concordante cu cele din literatură ^[20], această proteină fiind localizată predominant la interfața creier-sânge (perivascular) sau creier-LCR (la intermediul gliei limitans externă și internă, subpial precum și subependimar) și într-o mică măsură intraparenchimos, având o distribuție polarizată la nivelul prelungirilor membranare astrocitare pericapilare, subpiale, subependimare sau perisinaptice.

În ceea ce privește nivelul de expresie și distribuția AQP-4 la nivelul țesutului cerebral ischemic, deși toate studiile sunt în unanimitate de acord că nivelul său crește, post-ischemic, la nivelul leziunii și perilezional ^[72,73], **părerile cu privire la modul de distribuție a acestei proteine-canal sunt, la ora actuală, împartite.** Astfel, există studii ce susțin că, post-ischemic, AQP-4 își pierde complet distribuția polarizată de pe suprafața prelungirilor membranei astrocitare situate la nivel perivascular, subpial și subependimar, fiind distribuită difuz intraparenchimos, pe întreaga arie a membranei plasmatică astrocitare.^[72] În același timp, alte studii susțin că, deși distribuția polarizată a AQP-4 este într-o oarecare măsură pierdută, aceasta nu se pierde în totalitate, nivelul său rămânând mai crescut la interfața creier-sânge, respectiv creier-LCR chiar și în condiții post-ischemice.^[73]

Conform acestui studiu în condiții post-ischemice nivelul de AQP-4 a fost într-adevăr crescut, iar distribuția polarizată a fost într-o oarecare măsură pierdută, însă nivelul său a continuat să fie mai crescut la nivel perivascular, subpial și subependimar comparativ cu restul parenchimului cerebral.

De aceea, deși la prima vedere datele furnizate de studiile din literatura par contradictorii, conform studiului de față, ele nu sunt, AQP-4 având, în țesutul cerebral postischemic, o expresie mai crescută comparativ cu țesutul cerebral normal, difuză, însă totuși mult mai pronunțată la nivel perivascular, subpial și subependimar.

Deoarece în ischemie bariera hematoencefalică este distrusă, pierderea integrității complexului DAPC cu pierderea consecutivă a localizării normale a α -sintrofinei, proteina cu rol în ancorarea AQP-4 la membrana plasmatică astrocitare, duc la pierderea distribuției polarizate AQP-4 și la

expresia sa difuză, proporțional cu nivelul ischemiei, pe suprafața membranei plasmatice astrocitare.

Din punct de vedere al expresiei și distribuției sintrofinei în țesutul cerebral ischemic comparativ cu țesutul cerebral sănătos, datele din acest studiu converg cu cele din literatură, α -sintrofina având aproximativ aceeași localizare, la nivel celular și tisular, ca AQP-4. Astfel, ambele sunt prezente în membrana celulară astrocitara fie la nivel intraparenchimos, fie la nivel subpial sau subendotelial, fie la nivel perivascular. Fiind în concordanță cu expresia AQP-4, și nivelul de α -sintrofină crește perilezional .

Studiul de față a identificat, de asemenea, faptul ca distribuția α -sintrofinei diferă în substanța cenușie – unde este exprimată atât în astrocite, cât și în peretele vascular – față de substanța albă, unde această proteină este exprimată numai la nivelul membranei celulare astrocitare. Localizarea diferită a α -sintrofinei la nivelul substanței cenușii comparativ cu substanța albă ar putea fi explicată prin faptul ca structura astrocitara este diferită între cele doua compartimente.^[74] Astfel, dacă astrocitele protoplasmice de la nivelul substanței cenușii au o structură foarte complexă, cu numeroase procese membranare fine și complexe (având lungimea medie de aproximativ 50 μm) și o densitate de aproximativ 10.000-30.000 de astrocite protoplasmice/ mm^3 , astrocitele fibroase de la nivelul substanței albe au extensii ale membranei plasmatice mai puțin complexe însă mai lungi (având lungimea medie de aproximativ 300 μm) comparativ cu cele ale astrocitelor protoplasmice iar densitatea lor este mult mai mare, fiind de aproximativ 200.000 de astrocite fibroase/ mm^3 ;^[74] de asemenea, deși ambele tipuri de astrocite prezintă extensii membranare ce captează microvasele cerebrale precum și pia mater sau endimul ^[170], la nivelul substanței albe distribuția astrocitelor la nivel perivascular este mai scăzută comparativ cu substanța cenușie;^[75] mai mult, spre deosebire de substanța cenușie, prelungirile membranare ale astrocitelor perivasculare din substanța albă (astrocite fibroase) învelesc complet microvasele cerebrale;^[75] în plus, cu ajutorul tehnicilor de microscopie electronica s-a constatat că, în substanța albă, spațiile perivasculare astrocitare sunt semnificativ mai mari comparativ cu substanța cenușie.^[75] Diferențele structurale precum și în densitatea astrocitelor specifice celor doua compartimente împreună cu localizarea lor diferită semnifică existența unor tipuri diferite de echilibru hidric la nivelul acestor compartimente, precum și, posibil, niveluri diferite de expresie a unor proteine implicate în menținerea acestui echilibru,

printre care și AQP-4, α -sintrofina sau CD 105. De asemenea, o densitate de 6 până la 20 de ori mai mare a astrocitelor fibroase comparativ cu astrocitele protoplasmice semnifică un nivel mult mai crescut al AQP-4 la acest nivel, ceea ce ar putea explica apariția mult mai precoce a edemului citotoxic post-ischemic la nivelul substanței albe comparativ cu substanța cenușie. Este deci posibil ca distribuția astrocitelor la nivel perivascular într-o cantitate mai mare în substanța cenușie comparativ cu substanța albă să reprezinte un mecanism protector împotriva edemului citotoxic. De asemenea, prezența unor procese astrocitare mai lungi și mai puțin complexe ale astrocitelor fibroase comparativ cu cele protoplasmice poate fi explicată prin necesitatea eliminării rapide a edemului în condițiile unei cantități de astrocite perivascularare mai reduse în substanța albă.

Pe de altă parte, o altă explicație a distribuției inegale a α -sintrofinei între cele două compartimente ar putea consta în distrugerea mult mai rapidă a barierei hematoencefalice în substanța albă decât în substanța cenușie odata cu apariția edemului cerebral care, din cauza numărului crescut de astrocite de la nivelul substanței albe, este prezent mai precoce și într-o cantitate mai mare. Integritatea barierei hematoencefalice și, astfel, a complexului DAPC este pierdută mai repede în substanța albă, cu schimbarea polarității α -sintrofinei, în timp ce în substanța cenușie arhitectura barierei hematoencefalice este păstrată mai mult timp.

Un studiu efectuat în anul 2015 ^[76] a arătat că, la animalele cu knock-out pentru gena ce codifică distroglicanul, formațiunile ortogonale de particule (OAP) sunt dezorganizate, în timp ce același model de animal avea AQP-4 intacte, dispuse normal, polarizat, acest lucru sugerând o legătură directă între distroglican și AQP-4 ce alcătuiesc formațiunile ortogonale de particule, legătură care însă nu exista între distroglican și AQP-4 individuale, care nu fac parte din aceste formațiuni, ele fiind conectate numai prin intermediul α -sintrofinei la complexul DAPC.

În plus, există studii ce afirmă că pierderea, în ischemie, a distribuției polarizate a unor proteine ca AQP-4, α -sintrofina sau β -distroglicanul (ultimele două fiind componente ale complexului DAPC) au rolul de a preveni formarea unei cantități crescute de edem cerebral. ^[76,77]

În ceea ce privește distribuția CD 105 la nivelul țesutului cerebral ischemic comparativ cu cel sănătos, s-a constatat că – așa cum este descris în literatură – nivelul acestei proteine este mai crescut perilezional comparativ cu țesutul cerebral normal, CD 105 fiind un marker al

angiogenezei și apărând la nivelul vaselor imature, nou-formate în ischemie (ischemia stimulând producția de VEGF). Astfel, concordant cu datele din literatură, CD 105 a fost prezentă la nivel vascular, în endoteliu și adventice.

De asemenea, în ceea ce privește distribuția CD 105 în substanța albă comparativ cu cea cenușie, am constatat prezența unei expresii mai crescute a endoglinei în substanța cenușie decât în substanța albă, o explicație putând consta în rolul îndeplinit de CD 105 de co-receptor al complexului TGF- β , complex ce este implicat în regenerarea neuronală și glială. Aceasta explicație este posibilă, dat fiind faptul că în substanța cenușie densitatea neuronală este semnificativ mai crescută comparativ cu substanța albă și că procesul ischemic duce la o distrugere importantă a neuronilor și a celulelor gliale.^[78]

Deși datele obținute în această etapă a studiului aduc informații relevante în clarificarea mecanismelor de menținere a echilibrului hidric la nivel cerebral, una din limitările acestei analize este reprezentată de numărul mic de pacienți incluși, fiind prin urmare necesară, în studii viitoare, evaluarea modelelor de distribuție și expresie a AQP-4, α -sintrofinei și CD 105 pe un lot extins de pacienți.

4.3. Discuții privind etapa a III-a a studiului

În etapa a III-a a studiului s-a încercat elucidarea rolului pe care AQP-4 îl are în menținerea echilibrului hidric la nivel cerebral în condiții fiziologice, respectiv în condiții patologice (ischemie) prin ocluzia, la șobolani, a arterei cerebrale medii și administrarea, consecutiv inducerii ischemiei, a inhibitorului de AQP-4 TGN-020.

Astfel, în această etapă de studiu cei 21 de șobolani incluși au fost împărțiți în patru grupuri: primul, grupul control, a cuprins 4 șobolani sănătoși; cel de-al doilea grup, placebo, a cuprins 6 șobolani la care s-a realizat craniotomie fără ocluzia arterei cerebrale medii și sutura ulterioară a mușchilor și a pielii; cel de-al treilea grup a cuprins 5 șobolani la care s-a realizat ocluzia arterei cerebrale medii iar cel de-al patrulea grup a cuprins 6 șobolani la care, în urma ocluziei arterei cerebrale medii, s-a administrat, prin injectare intraperitoneală, inhibitorul de AQP-4 TGN-020.

Aceste animale au fost apoi perfuzate cu soluție formalină neutră 10% și după prelevarea creierului, acesta a fost scanat cu ajutorul unui scanner tridimensional, după care a fost secționat

(pentru o mai buna fixare) și lăsat în continuare 2 zile cu soluție fixatoare de formalină neutră 10%. După includerea în parafină și secționarea blocurilor obținute din țesutul cerebral al tuturor șobolanilor incluși în studiu, lamele obținute au fost deparafinate și colorate hematoxin-eozină, din fiecare bloc fiind selectată aleator o lamă și, ulterior, alte 14 lame la distanța de 250 μm una față de cealaltă astfel încât întreg miezul infarctului să fie acoperit. Lamele provenind din blocurile cu AVC ischemic au fost imunomarcate pentru GAP-43 (un marker de regenerare neurală utilizat – în urma observației că, după ischemia corticală, expresia sa crește ducând la regenerare axonală aberantă [79,80, 81] -în delimitarea zonei infarctate), pentru detectarea semnalului fiind utilizat cromogenul DAB, după care a fost realizat counter-staining cu hematoxin-eozină. Apoi, toate lamele au fost scanate și zonele cu AVC ischemic, respectiv fiecare emisferă cerebrală, au fost înconjurate manual. Volumele fiecărei emisfere cerebrale, precum și volumele zonelor ischemice au fost calculate folosind principiul Cavalieri (ce afirmă că, în cazul unor substanțe solide care au aceeași înălțime, dacă secțiunile efectuate de două plane paralele între ele și paralele cu baza sunt egale, atunci și volumele acestor substanțe solide vor fi egale [82]) după formula:

Volumul (μm) = A × 15 × 250 în care A reprezintă suma zonelor înconjurate, 15 reprezintă numărul de secțiuni prelevate (ce acopera întreaga zonă de infarct) iar 250 - reprezintă distanța dintre 2 secțiuni (grosimea secțiunilor fiind, deci, de 15 secțiuni × 250 μm = 3750 μm).

Volumele cerebrale au fost calculate în urma îndepărtării zonelor corespunzătoare bulbilor olfactivi și cerebelului după care datele au fost transferate în Microsoft Excel și interpretate folosind analiza de varianță ANOVA împreună cu testul Fisher pentru cea mai puțin semnificativă diferență, fiind considerată semnificativ statistica valoarea $p < 0,05$.

În urma confirmării histopatologice a zonelor ischemice atât prin analiza histopatologică a lamelor colorate cu hematoxin-eozină cât și prin analiza imunohistochimica lamelor marcate cu GAP-43, au fost analizate volumele emisferelor provenite de la toate animalele incluse în studiu precum și volumele zonelor ischemice ce au fost în prealabil calculate utilizând principiul Cavalieri, conform metodei $\text{Volumul } (\mu\text{m}) = A \times 15 \times 250$ (detaliată mai sus).

În urma acestei analize s-a constatat că **volumele emisferelor ipsilaterale zonei infarctizate** ale șobolanilor cu AVC care nu au primit tratament erau semnificativ mai crescute comparativ cu

volumele emisferelor ipsilaterale zonei infarctizate ale șobolanilor cu AVC care au fost tratați post-ischemic cu TGN-020, iar acestea din urmă erau, la rândul lor, semnificativ mai crescute comparativ cu volumele emisferelor ipsilaterale de la șobolanii cu craniotomie și sutura mușchilor și a pielii, reprezentând grupul control placebo.

În cazul emisferelor controlaterale, s-a constatat ca cele ale șobolanilor cu AVC netratați erau semnificativ mai crescute decât cele ale șobolanilor tratați, însă nu a existat nicio diferență semnificativă între șobolanii tratați și placebo. Toate volumele emisferelor controlaterale au fost mai scăzute decât cele ale emisferelor ipsilaterale.

În ceea ce privește **miezul propriu-zis al infarctului** (delimitat prin semnalul pozitiv pentru GAP-43), s-a constatat că volumul acestuia a fost semnificativ mai crescut la șobolanii cu AVC netratați comparativ cu șobolanii cu AVC tratați cu inhibitorul TGN-020.

De asemenea, s-a constatat că între volumele miezului infarctului și cele ale emisferelor ipsilaterale a existat o corelație directă foarte puternică. În plus, între volumele miezului infarctelor și volumele emisferelor controlaterale a existat o corelație puternică.

Mai mult, a existat o corelație foarte puternică între volumele emisferelor ipsilaterale și volumele totale telencefalic-diencefalic, precum și între volumele zonei infarctate și volumele totale telencefalic-diencefalic. Astfel, volumele telencefalice ale șobolanilor netratați au fost semnificativ mai crescute decât cele ale șobolanilor ce au primit tratament cu TGN-020 și decât cele ale șobolanilor din grupul placebo. În schimb, nu a existat nicio diferență din punct de vedere al volumelor telencefalice între șobolanii ce au primit tratament și șobolanii din grupul placebo.

În urma scanării tridimensionale de suprafață a creierului și a analizei volumetrice totale s-a constatat ca volumul creierului șobolanilor cu AVC netratați era mai crescut decât cel al șobolanilor cu AVC netratați și decât cel al grupului placebo. Deși volumele creierului șobolanilor cu AVC netratați au fost ușor mai crescute comparativ cu cele ale grupului placebo, nu a existat o diferență semnificativă între acestea.

Acesta este primul studiu care folosește metode histopatologice și imunohistochimice pentru a demonstra efectul pe care inhibitorul pentru TGN-020 îl are în scăderea

volumelor infarctelor și ale emisferelor cerebrale în urma inducerii de ischemie prin inducerea ocluziei arterei cerebrale medii.

În plus, studiul de față este primul în care se utilizează un scanner 3D pentru a măsura, ex vivo, volumele cerebrale investigate și deși prin această metodă nu au putut fi măsurate zonele de infarct, ea a permis efectuarea de măsurători exacte (ce au putut, de asemenea, fi replicate) ale volumelor telencefalice totale.

Deși studiile efectuate anterior privitor la efectele inhibitorului TGN-020 au fost efectuate pe șoareci iar în acest studiu au fost folosiți șobolani, această abordare a facilitat desfășurarea unei intervenții chirurgicale facile și corecte datorită dimensiunilor mai crescute ale creierului șobolanului comparativ cu cel al șoarecelui. De asemenea, deoarece numărul de animale utilizat a fost mic (fiind condiționat de prețul inhibitorului TGN-020), studiul trebuie replicat pe un lot mai mare de animale. În plus, scanarea tridimensională a creierului a fost efectuată după perfuzia cu formalină, neexistând măsurători volumetrice sau imagini in vivo ale creierului. De aceea, trebuie ca, în studii viitoare, metoda de scanare tridimensională utilizată în studiul de față să fie confirmată prin studii imagistice folosind RMN.

5. Concluzii și contribuții personale

5.1. Concluzii privind prima etapa a studiului

Acest studiu este primul ce descrie structura tridimensională complexă a corpurilor amilacei din creier.

5.1.1. Concluzii privind analiza secțiunilor subțiri

Concluziile rezultate în urma analizei secțiunilor subțiri imunomarcate pentru GFAP și colorate hematoxin-eozină sunt următoarele:

1. Aspectul corpurilor amilacei corespunde cu cel descris în literatură, ca fiind structuri discoidale, laminate, bazofile, neînconjurate de inflamație.
2. Spre deosebire de ceea ce se cunoștea până în prezent, datele obținute în urma creării de imagini tridimensionale au arătat că, din totalul corpurilor amilacei identificați, peste două treimi intră în componența unor agregate complexe, înalt ramificate, cu tendință la înmugurire.

3. Din punct de vedere al complexității structurale, agregatele situate perivascular sunt mult mai complexe față de cele din neuropil.
4. Așa cum era de așteptat, proteina GFAP, marker astrocitar (prezentă în citoskeletul acestor celule) este foarte abundentă în jurul vaselor de sânge, însă poate fi prezentă și în jurul corpiilor amilacei.
5. Corpicii amilacei analizați au avut dimensiunea medie de $12,03 \mu\text{m}$ ($\pm 5,17 \mu\text{m}$).
6. Vasele de sânge analizate au avut diametrul de $180,13 \mu\text{m}$ ($\pm 45,2 \mu\text{m}$).
7. Între diametrul vaselor de sânge și numărul corpiilor amilacei a existat o corelație directă puternică [$r(48) = 0,82$, $p < 0,01$].
8. Între diametrul vaselor de sânge și numărul de puncte de înmugurire ale corpiilor amilacei a existat o corelație directă [$r(48) = 0,75$, $p < 0,01$].

5.1.2. Concluzii privind analiza secțiunilor groase

1. Analiza secțiunilor groase a confirmat și ea structura tridimensională complexă, ramificată, a corpiilor amilacei.
2. Așa cum a fost arătat și în urma analizei secțiunilor subțiri, GFAP nu colocalizează cu ubiquitina, însă poate înconjura această proteină, acest fapt fiind cel mai probabil cauzat de distorsionarea membranelor astrocitare ce înconjoară corpii amilacei.
3. Corpicii amilacei sunt localizați cu precădere la interfața creier-sânge și creier-lichid cefalorahidian. Astfel, densitatea acestor formațiuni a fost cea mai crescută în proximitatea vaselor de sânge (la distanța de $4,44 \mu\text{m} \pm 2,92 \mu\text{m}$), precum și subependimal sau subpial.
4. Dubla imunomarcare cu ubiquitină și collagen IV a demonstrat prezența corpiilor amilacei în jurul vaselor sangvine. Uneori, corpii amilacei sunt prezenți în dedublări ale membranei bazale vasculare.
5. Collagenul IV nu a colocalizat cu ubiquitina.
6. Nu a existat colocalizare între AQP-4 și ubiquitină însă aceste două proteine au fost situate în imediata proximitate, ceea ce sugerează faptul că membranele plasmatice astrocitare (bogate în AQP-4) pot înconjura corpii amilacei (bogați în ubiquitină).

7. Localizarea în imediata proximitate a AQP-4 și GFAP precum și a ubiquitinei sugerează o posibilă distorsionare a extensiilor membranei plasmactice astrocitare în proximitatea corpișorilor amilacei.

5.2. Concluzii privind a doua etapa a studiului

1. Așa cum este descris și în literatură, AQP-4 este prezentă cu precădere la interfața creier-sânge (perivascular), respectiv creier-lichid cefalorahidian (subpial) însă, într-o mai mică măsură, și intraparenchimos, la nivelul extensiilor astrocitare ce flanchează sinapsele neuronale.
2. Expresia AQP-4 este mult mai crescută la nivel perilezional comparativ cu țesutul cerebral normal, neafectat de ischemie.
3. La nivel perilezional (în țesutul cerebral ischemic), AQP-4 își pierde distribuția polarizată, ea fiind distribuită difuz, pe întreaga suprafață a membranei astrocitare.
4. Deși, la nivel perilezional, AQP-4 își pierde distribuția polarizată, nivelul său rămâne totuși, în țesutul cerebral ischemic, mai crescut la nivel subpial și perivascular comparativ cu restul parenchimului cerebral.
5. Așa cum este descris și în literatură, atât în țesutul cerebral ischemic cât și în țesutul cerebral sănătos CD 105 este distribuit la nivel vascular, în endoteliu și adventice.
6. Expresia CD 105 crește post-ischemic, nivelul acestei proteine fiind mai crescut în țesutul cerebral ischemic comparativ cu țesutul cerebral sănătos.
7. Expresia CD 105 este mai crescută la nivelul substanței cenușii comparativ cu substanța albă.
8. Așa cum este descris și în literatură, în țesutul cerebral normal, neafectat de ischemie, localizarea α -sintrofinei coincide cu cea a AQP-4, ambele fiind situate în membrana astrocitare

(unde α -sintrofina este implicată în ancorarea AQP-4 la acest nivel), cu precădere la nivel perivascular, în extensiile membranei astrogliale ce câpturesc vasele de sânge.

9. Nivelul α -sintrofinei crește perilezional, fiind mai crescut în jurul leziunii ischemice comparativ cu țesutul cerebral normal, neafectat de ischemie.

10. În țesutul cerebral ischemic, α -sintrofina are o distribuție diferită în substanța cenușie comparativ cu substanța alba. Astfel, la nivelul substanței cenușii, α -sintrofina este situată atât la nivelul vaselor de sânge cât și în astrocite, în timp ce la nivelul substanței albe, această proteină este localizată numai la nivel astrocitar.

5.3. Concluzii privind a treia etapa a studiului

1. Volumele emisferelor ipsilaterale zonei infarctului au fost semnificativ mai crescute la animalele cu OACM care nu au primit tratament ($995,10 \pm 71,42 \text{ mm}^3$) comparativ cu animalele cu OACM care au primit tratament ($851,05 \pm 54,2 \text{ mm}^3$) și cu animalele din grupul placebo, la care nu s-a realizat OACM, ci doar craniotomie cu sutura ulterioară a mușchilor și a pielii ($766,92 \pm 56,26 \text{ mm}^3$).

2. Volumele emisferelor controlaterale zonelor de infarct au avut aproximativ aceeași distribuție ca volumele emisferelor ipsilaterale zonelor infarctate. Astfel, cele mai mari volume ale emisferelor controlaterale au fost la animalele cu OACM fără tratament ($894,27 \pm 71,42 \text{ mm}^3$), urmate de animalele cu OACM care nu au primit tratament ($808,87 \pm 61,8 \text{ mm}^3$) și cu grupul placebo, la care nu s-a realizat OACM, ci numai craniotomie cu sutura ulterioară a mușchilor și pielii ($p < 0,05$, respectiv $p < 0,01$).

3. Între volumele emisferelor controlaterale ale animalelor cu OACM care au primit tratament și volumele emisferelor controlaterale ale animalelor din grupul placebo nu au existat diferențe semnificative.

4. Volumele corespunzatoare centrului propriu-zis al infarctului au arătat o creștere în dimensiuni mică, dar semnificativă la animalele cu OACM care nu au primit tratament ($129,05 \pm 22,36 \text{ mm}^3$) comparativ cu animalele cu OACM care au primit tratament.
5. Rescanarea specimenelor din grupurile cu OACM fără, respectiv cu tratament nu a dus la diferențe semnificative față de rezultatele obținute la prima scanare ($p < 0,05$ pentru scanning repetat al suprafeței creierului animalelor cu OACM tratate, respectiv netratate, respectiv control placebo). Prin urmare, efectul pozitiv al tratamentului este confirmat.
6. Scanarea tridimensională a creierului și analiza volumetrică extrasă din aceasta au relevat că cele mai mari volume ale creierului erau la animalele cu OACM care nu au primit tratament ($2018,25 \pm 115,24 \text{ mm}^3$) comparativ cu animalele cu OACM care au primit tratament ($1798,45 \pm 115,24 \text{ mm}^3$) ($p < 0,01$) și cu animalele din grupul placebo ($1742,21 \pm 96,21 \text{ mm}^3$) ($p < 0,01$).
7. Comparăția rezultatelor obținute în urma scanării tridimensionale a suprafeței externe corticale a arătat că nu a existat nicio diferență semnificativă între volumele cerebrale ale animalelor care au primit tratament comparativ cu animalele din grupul placebo (la care nu s-a indus AVC, iar după craniotomie s-a realizat sutura mușchilor și a pielii), deși primele au demonstrat o tendință către valori volumetrice mai crescute.
8. Între volumele miezului infarctului și volumele emisferelor ipsilaterale a existat o corelație directă foarte puternică. [$r(4) = 0,842$, $p < 0,05$].
9. Între volumele miezului infarctului și volumele emisferelor controlaterale a existat o corelație directă puternică. [$r(4) = 0,684$, $p < 0,05$].
10. A existat o corelație directă foarte puternică între volumele emisferelor ipsilaterale și volumele totale telencefalic-diencefalic [$r(4) = 0,853$, $p < 0,01$].
11. A existat o corelație directă foarte puternică între volumele emisferelor și volumele miezului infarctului și volumele totale telencefalic-diencefalic [$r(4) = 0,714$, $p < 0,01$].

Corelațiile de la punctele 8-11 confirmă efectul pozitiv al tratamentului cu TGN-020 în AVC ischemic la șobolani.

5.4. Contribuții personale

Studiul de față, realizat cu scopul de a lămuri unele aspecte legate de rolul pe care AQP-4 îl are la nivel cerebral și în special rolul său în menținerea echilibrului hidric în creier permite formularea unor concluzii și aduce o serie de elemente cu caracter de noutate.

Astfel, studiul efectuat în prima etapă este primul ce descrie structura complexă tridimensională a corpurilor amilacei la nivel cerebral și este, totodată, primul care folosește, în acest scop, secțiuni seriate sau secțiuni groase imunomarcate. Până în prezent, aceste structuri erau descrise pe baza imaginilor de microscopie ale secțiunilor imunomarcate ca fiind structuri rotunde sau discoidale, plate, izolate.

Studiul efectuat în cea de a doua etapă reușește să demonstreze valabilitatea a două opinii aparent contradictorii din literatură, arătând că, în timp ce nivelul AQP-4 crește în țesutul cerebral ischemic și polaritatea sa se pierde într-o oarecare măsură, nivelul său continuă, totuși, să fie mai crescut la interfața creier-sânge și, respectiv, creier-LCR. De asemenea, studiul demonstrează, pentru prima dată în literatură, distribuția diferită a α -sintrofinei în substanța albă (unde este exprimată numai în astrocite comparativ cu substanța cenușie (unde este prezentă și în astrocite și în peretele vascular). În plus, tot pentru prima dată în literatură, studiul de față demonstrează prezența CD 105 într-o cantitate mai mare în substanța cenușie comparativ cu cea albă.

Studiul efectuat în cea de-a treia etapă este primul care demonstrează prin metode histopatologice și imunohistochimice efectul pozitiv al inhibitorului TGN-020 în AVC ischemic, până în prezent fiind utilizate în acest scop numai metode imagistice. De asemenea, acesta este primul studiu în care este utilizat un scanner 3D pentru măsurarea ex-vivo a volumelor cerebrale.

Bibliografie

1. Stroke, Cerebrovascular accident. [Online]. 2016. Available from: URL: http://www.who.int/topics/cerebrovascular_accident/en/
2. Chamberlin SL, Brigham N. The Gale Encyclopedia of Neurological Disorders. Vol.II. USA. Editura Thomson Gale. 2005 ISBN: 0-7876-9160-7 (set).
3. Cardiovascular diseases (CVDs). Fact sheet. Reviewed June 2016. [Online]. Available from: URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>
4. Haberland C. Clinical Neuropathology. Editura Demos Medical Publishing. New York, 2007. ISBN-10: 1-888799-97-8. ISBN-13: 978-1-888799-97-2
5. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia A-S, McNamara JO, Williams SM. Neuroscience. 3rd Edition. Editura Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, USA. 2004.
6. World Stroke Campaign. [Online]. 2014. Available from: URL: <http://www.world-heart-federation.org/cardiovascular-health/stroke/>
7. DeLoughery TG. Hemostasis and Thrombosis. 2nd Edition. Editura Landes Bioscience. Georgetown, Texas, USA. 2004. ISBN: 1-57059-686-7.
8. Mena H, Cadavid D, Rushing EJ. Human cerebral infarct: a proposed histopathologic classification based on 137 cases. Acta Neuropathol. 2004. 108(6): 524-30.
9. Mahajan S, Bhagat H. Cerebral oedema: Pathophysiological mechanisms and experimental therapies. J Neuroanaesthesiol Crit Care 2016; 3, Suppl S1:22-8
10. Quareshi AI, Suarez JJ, Yahia AM, Mohammad Y, Uzun G, Suri MF, Zaidat OO, Ayata C, Ali Z, Wityk RJ. Timing of neurologic deterioration in massive middle cerebral artery infarction: a multicenter review. Crit Care Med. 2003.
11. Liang D, Bhatta S, Gerzanich V, Simard JM: Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling. Neurosurg Focus. 2007. 22(5):E2.
12. Eberhart C: Introduction to Neuropathology. [Online]. Available from: URL: <http://www.hopkinsmedicine.org/mcp/education/300.713%20lectures/cns1.pdf>

13. The Histology Guide. Nerves: Neural supporting cells. Supporting cells in the central nervous system. [Online]. Available from: URL:
http://www.histology.leeds.ac.uk/tissue_types/nerves/Nerve_support_cell.php
14. Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. [Online]. Available from: URL: <http://www.bu.edu/agingbrain/chapter-1-neuronal-cell-bodies-2/>
15. Mature neuron markers. [Online]. Available from: URL:
<http://www.abcam.com/neuroscience/mature-neurons-markers-and-their-functions>
16. AB5220. Anti-Growth Associated Protein-43 (GAP-43) Antibody. 2017. [Online]. Available from: URL:
http://www.merckmillipore.com/RO/ro/product/Anti-Growth-Associated-Protein-43-%28GAP-43%29-Antibody,MM_NF-AB5220?ReferrerURL=http%3A%2F%2Fwww.google.ro%2Furl%3Fsa%3Dt%26rct%3Dj%26q%3D%26esrc%3Ds%26source%3Dweb%26cd%3D1%26ved%3D0ahUKEwiT0Z2N6eLVAhWCa5oKHSPGAmIQFggwMAA%26url%3Dhttp%253A%252F%252Fwww.emdmillipore.com%252FUS%252Fen%252Fproduct%252FAnti-Growth-Associated-Protein-43-%252528GAP-43%252529-Antibody%252CMM_NF-AB5220%26usg%3DAFQjCNHsO8AfC_Thqdd94819-CzmZjsS7w&bd=1
17. Gupta SK, Mishra R, Kusum S, Spedding M, Meiri KF, Gressens P, Mani S. GAP-43 is essential for the neurotrophic effects of BDNF and positive AMPA receptor modulator S18986. *Cell Death and Differentiation*. 2009. 16: 624-637
18. Kim DJ, Czosnyka Z, Kasproicz M, Smielewski P, Baledent O, Guerguerian AM, Pickard JD, Czosnyka M: Continuous Monitoring of the Monro-Kellie Doctrine: Is It Possible? *J Neurotrauma*. 2012. 29(7): 1354 – 1363.
19. Madeira A, Moura TF, Soveral G. Detecting Aquaporin Function and Regulation. *Front Chem*. 2016. 4:3.
20. Nagelhus EA, Ottersen OP: Physiological Roles of Aquaporin-4 in Brain. *APS Journals. Physiological Reviews*. 2013. 93(4):1543-1562
21. Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin water channels in the nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 2013. 14(4):265-277.
22. Palmgren M: Regulation and Transport Mechanisms of Eukariotic Aquaporins. Doctoral Thesis. Department of Chemistry and Molecular Biology, Microbiology, University of Gothenburg, Sweden. 2013

23. Gohar O: Aquaporins: The Waterways of Nature. *Modulator*. 2010. 24: 4-9.
24. Tadayoni R, Rendon A, Soria-Jasso LE, Cisneros B. Dystrophin Dp71: the smallest but multifunctional product of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Mol Neurobiol*. 2012. 45(1): 43-60.
25. Verkman AS: Aquaporins at a glance. *J Cell Sci*. 2011. 124: 2107-2112
26. Fukuda AM, Badaut J: Aquaporin 4: A Player in Cerebral Edema and Neuroinflammation. *J Neuroinflammation*. 2012. 9 (279)
27. Verkman AS, Ratelade J, Rossi A, Zhang H, Tradtrantip L: Aquaporin-4: Orthogonal Array Assembly, CNS Functions, and Role in Neuromyelitis Optica. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2011. 32: 702-710
28. Yool AJ, Brown EA, Flynn GA: Roles for novel pharmacological blockers of aquaporins in the treatment of brain oedema and cancer. *Proceedings of the Australian Physiological Society*. 2009. 40:71-78.
29. Nagelhus EA, Veruki ML, Torp R, Haug FM, Laake JH, Nielson S, Agre P, Ottersen OP: Aquaporin-4 Water Channel Protein in the Rat Retina and Optic Nerve: Polarized Expression in Muller Cells and Fibrous Astrocytes. *J Neurosci*. 1998. 18(7): 2506-19
30. Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita T, Filiz F, Bollen AW, Chan P, Verkman AS: Aquaporin-4 Deletion in Mice Reduces Brain Edema after Acute Water Intoxication and Ischemic Stroke. *Nat Med*. 2000. 6(2): 159-63
31. Verkman AS, Binder DK, Bloch O, Auguste K, Papadopoulos MC: Three distinct roles of aquaporin-4 in brain function revealed by knockout mice. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006. 1758: 1085-1903.
32. Liang D, Bhatta S, Gerzanich , Simard JM. Cytotoxic Edema. *Mechanisms of Pathological Cell Swelling*. *Neurosurg Focus*. 2007. 22(5): E2.
33. Ehmsen J, Poon E, Davies K: The dystrophin-associated protein complex. *J Cell Sci*. 2002. 115:2801-2803
34. Connors NC, Adams Me, Froehen SC, Kofuji P: The Potassium Channel Kir4.1 Associates with the Dystrophin-Glycoprotein Complex via α -Syntrophin in Glia. *JBC*. 2004. 279: 28387-28392.
35. Nagelhus EA, Mathiisen TM, Ottersen OP. Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with Kir4.1. *Neuroscience*. 2004. 129(4): 905-13.

36. Tadayoni R, Rendon A, Soria-Jasso LE, Cisneros B. Dystrophin Dp71: the smallest but multifunctional product of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Mol Neurobiol.* 2012. 45(1): 43-60.
37. Mogoanta L, Ciurea M, Pirici I, Margaritescu C, Simionescu C, Ion DA, Pirici D: Different Dynamics of Aquaporin 4 and Glutamate Transporter-1 Distribution in the Perineuronal and Perivascular Compartments during Ischemic Stroke. *Brain Pathol.* 2014. 24(5): 475-93
38. Tourdias T, Mori N, Dragonu I, Cassagno N, Boiziau C, Aussudre J, Brochet B, Petry KG, Dousset V. Differential aquaporin 4 expression during edema build-up and resolution phases of brain inflammation. *JNeuroinflammation.* 2011. 8:143.
39. Zador Z, Stiver S, Wang V, Manley GT: Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke. *Handb.Exp.Pharmacol.* 2009; (190): 159-70.
40. Fukuda AM, Badaut J: Aquaporin 4: A Player in Cerebral Edema and Neuroinflammation. *J Neuroinflammation.* 2012. 9 (279)
41. Yu H, Qi GL, Wang J, Chen L, Deng Z, Zhao YS, Lei SS, Zhu XQ: Aquaporin 4 inhibition decreased synthesis of cytokines by acetazolamide in the hippocampus of rats with pentazolid-induced chronic epilepsy. *Genet.Mol.Res.*
42. Tang G, Yang G-Y: Aquaporin-4: A Potential Therapeutic Target for Cerebral Edema. *Int J Mol Sci.* 2016. 17(10).
43. Igarashi H, Huber VJ, Tsujita M, Nakada T: Pretreatment with a novel aquaporin 4 inhibitor, TGN-020, significantly reduces ischemic brain edema. *Neurol Sci.* 2011. 32(1): 113-116.
44. Chapter 6. Angiogenesis of Primary Brain Tumors: The Role of Endoglin (CD 105). *Molecular targets of CNS Tumors.* Sugita Y. 2011. Garami M. ISBN 978-953-307-736-9.
45. Shen F, Degos V, Chu PL, Han Z, Westbrook EM, Choi EJ, Marchuk D, Kim H, Lawton MT, Maze M, Young WL, Su H. Endoglin deficiency impairs stroke recovery. *Stroke.* 2014. 45(7): 2101-6.
46. Kuang Q, Purhonen P, Herbert H. Structure of potassium channels. *Cell Mol Life Sci.* 2015. 72: 3677-3693.
47. Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function and Physiological Roles. *Physiological Reviews.* 2010. 90(1): 291-366.

48. Connors NC, Adams ME, Froehner SC, Kofuji P. The potassium channel Kir4.1 associates with the dystrophin-glycoprotein complex via alpha-syntrophin in glia. *J Biol Chem*. 2004. 279(27): 28387-92.
49. Higashimori H, Sontheimer H. Role of Kir4.1 channels in growth control of glia. *Glia*. 2007. 55(16): 1668-79.
50. W Puwarawuttipanit, AD Bragg, DS Frydenlund, Amiry-Moghaddam M. Differential effect of α -syntrophin knockout on AQP-4 and Kir4.1 expression in retinal macroglial cells in mice. *Neuroscience*. 2006. 137 (1) : 165-75.
51. Adams ME, Anderson KNE, Froehner SC. The α -syntrophin PH and PDZ domains scaffold acetylcholine receptors, utrophin and neuronal nitric oxide synthase at the neuro-muscular junction. *J Neurosci*. 2010. 30(33): 11004-11010
52. Syntrophin, Alpha 1; SNTA1. OMIM. [Online]. Available from: URL: <https://www.omim.org/entry/601017>
53. SNTA1 Gene (Syntrophin Alpha 1). Gene Cards. [Online]. Available from: URL: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SNTA1>
54. Sandovici I, Stefanescu D, Pop V, Covic M, Rusu C, Militaru M. Capitolul 12 – Bolile monogenice. In: Covic M, Stefanescu D, Sandovici I. *Genetica Medicala*. Editia a II-a. Editura Polirom: Iasi, 2011; p:417-452.
55. GFAP Gene (Protein Coding). Gene Cards. [Online]. 2017. Available from: URL: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GFAP>
56. Rohn TT. Corpora Amylacea in Neurodegenerative Diseases: Cause or Effect? *Int J Neurol Neurother*. 2015. 2(3).
57. Amm I, Sommer T, Wolf DH. Protein quality control and elimination of protein waste: the role of ubiquitin-proteasome system. *Biochim Biophys Acta*. 2014. 1843(1):182-96.
58. Pirici I, Margaritescu C, Mogoanta L, Petrescu F, Simionescu CE, Popescu ES, Cecoltan S, Pirici D. Corpora amylacea in the brain form highly branched three dimensional lattices. *Rom J Morphol Embryol*. 2014. 55(3 Suppl): 1071-1077.
59. Popescu ES, Pirici I, Ciurea RN, Balseanu TA, Catalin B, Margaritescu C, Mogoanta L, Hostiuc S, Pirici D. Three- dimensional organ scanning reveals brain edema reduction in a rat model of stroke treated with an aquaporin 4 inhibitor. *Rom J Morphol Embryol*. 2017. 58(1): 59-66. *Rom J Morphol Embryol*. 2014.

60. Mogoanta L, Ciurea M, Pirici I, Margaritescu C, Simionescu C, Ion DA, Pirici D. Different dynamics of aquaporin 4 and glutamate transporter-1 distribution in the perineuronal and perivascular compartments during ischemic stroke. *Brain Pathol.* 2014. 24(5): 475-93.
61. Selmaj K, Pawlowska Z, Walczak A, Koziolkiewicz W, Raine CS, Cierniewski CS. Corpora amylacea from multiple sclerosis brain tissue consists of aggregated neuronal cells. *Acta Biochim Pol.* 2008. 55(1): 43-49.
62. Schipper HM, Cisse S. Mitochondrial constituents of corpora amylacea and autofluorescent astrocytic inclusions in senescent human brain. *Glia.* 1995. 14(1): 55-64.
63. Singhrao SK, Neal JW, Piddlesden SJ, Newman GR. New immunocytochemical evidence for neuronal/oligodendroglial origin for corpora amylacea. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1994. 20(1): 66-7
64. Pirici D, Margaritescu C. Corpora amylacea in aging brain and age-related brain disorders. *H Aging Gerontol.* 2014. 2(1): 33-57.
65. Meng H, Zhang X, Blaivas M, Wang MM. Localization of blood proteins thrombospondin1 and ADAMTS13 to cerebral corpora amylacea. *Neuropathology.* 2009. 29(6):664-671.
66. Singhrao SK, Morgan BP, Neal JW, Newman GR. A functional role for corpora amylacea based on evidence from complement studies. *Neurodegeneration.* 1995. 4(3): 335-345.
67. Gati I, Leel-Ossy L. Heat shock protein 60 in corpora amylacea. *Pathol Oncol Res.* 2001. 7(2): 140-144.
68. Kimura T, Takamatsu J, Miyata T, Miyakawa T, Horiuchi S. Localization of identified advanced glycation end-product structures, N epsilon(carboxymethyl)lysine and pentosidine, in age-related inclusions in human brains. *Pathol Int.* 1998. 48(8): 574-579.
69. Ramsey HJ. Ultrastructure of corpora amylacea. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1965. 24: 25-39.
70. Sbarbati A, Carner M, Coletti V, Osculati F. Extrusion of corpora amylacea from the marginal glia at the vestibular root entry zone. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996. 55(2): 196-201.
71. Leel-Ossy L. New data on the ultrastructure of the corpus amylaceum (polyglucosan body). *Pathol Oncol Res.* 2001. 7(2): 145-150.
72. Akademir G, Ratelade J, Asavapanumas N, Verkman AS. Neuroprotective effect of aquaporin-4 deficiency in a mouse model of global cerebral ischemia produced by transient 4-vessel occlusion. *Neurosci Lett.* 574: 70-75.

73. Lawrence CB, Haley MJ. The blood-brain barrier after stroke: Structural studies and the role of transcytotic vesicles. *JCBFM*. 2017. 37(2): 456-470.
 74. Morphology of astrocytes. *Network Glia*. [Online]. Available from: URL: <http://www.networkglia.eu/en/astrocytes>
 75. Suzuki M, Obara K, Sasaki Y, Matoh K, Kitabatake A, Sasaki K, Nunosawa F. Comparison of perivascular astrocytic structure between white matter and grey matter of rats. *992: 5*: 294-297.
 76. Liu H, Qiu GP, Zhuo F, Yu WH, Sun SQ, Li FH, Yang M. Lost Polarization of Aquaporin4 and Dystroglycan in the Core Lesion after Traumatic Brain Injury Suggests Functional Divergence in Evolution. 2015. [Biomed Res Int](#). 2015: 471631.
 77. Steiner E, Enzmann GU, Lin S, Ghavampour S, Hannocks MJ, Zuber B, Ruegg MA, Sorokin L, Engelhardt B. Loss of astrocyte polarization upon transient focal brain ischemia as a possible mechanism to counteract early edema formation. *Glia*. 2012. 60(11): 1646-59.
 78. Villapol S, Logan TT, Symes AJ. Role of TGF- β Signaling in Neurogenic Regions After Brain Injury. *Trends in Cell Signaling Pathways in Neuronal Fate Decision*. 2013 Sonia Villapol, Trevor T. Logan and Aviva J. Symes (2013). InTech, DOI: 10.5772/53941.
 79. Li Y, Jiang N, Powers C, Chopp M. Neuronal damage and plasticity identified by microtubule-associated protein 2, growth-associated protein 43, and cyclin D1 immunoreactivity after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 1998. 29(9): 1972-1981.
 80. Aigner L, Arber S, Kapfhammer JP, Laux T, Schneider C, Botteri F, Brenner HR, Caroni P. Overexpression of the neural growth-associated protein GAP-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice. *Cell*. 1995. 83(2): 269-278.
 81. Stroemer RP, Kent TA, Huselbosch CE. Acute increase in expression of growth associated protein GAP-43 following cortical ischemia in rat. *Neurosci Lett*, 1993, 162(1-2): 51-54.
 82. Kern WF, Bland JR. "Cavalieri's Theorem" si "Proof of Cavalieri's Theorem." Capitolele 11 si 49, în: [Solid Mensuration with Proofs, editia a II-a](#). New York: Wiley, pp. 25-27 si 145-146, 1948.
- *** Popescu ES, Pirici D, Zurac SA, Ion D: AQP-4 and its role in maintaining the hydric balance in the brain. *RJN*. 2017. 17(2): 39-45.

