

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ**

**TEZĂ DE DOCTORAT
*REZUMAT***

**EVALUAREA ROLULUI AQUAPORINEI 4 ÎN
ECHILIBRUL APEI ȘI FRAȚIUNII SOLUBILE
DE AMILOID A β 40 ÎN SISTEMUL NERVOS
CENTRAL**

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC,
PROF. DR. PIRICI NICOLAE DANIEL**

**DOCTORAND,
DR. NICOLA (ROȘU) GABRIELA CAMELIA**

**CRAIOVA
2019**

CUPRINS

PARTEA GENERALĂ

INTRODUCERE.....	2
1. ANATOMIA ȘI HISTOLOGIA SNC.....	4
2. EPIDEMIOLOGIA ȘI FIZIOPATOLOGIA BOLII ALZHEIMER.....	5
3. EPIDEMIOLOGIA ȘI FIZIOPATOLOGIA AVC ISCHEMIC.....	6

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

4. ROLUL SPAȚIILOR PERIVASCULARE ÎN MIGRAREA CELULELOR SISTEMULUI IMUN ÎN SNC	7
5. INHIBAREA AQUAPORINEI 4 SCADĂ DRENAJUL PERIVASCULAR INTRACEREBRAL AL AMILOIDULUI A β 40	9
6. DISTRIBUȚIA AQUAPORINELOR 1 ȘI 4 ÎN SNC.....	11
7. EXPRESIA AQUAPORINELOR 1/4 ÎN AVC.....	13
8. CONCLUZII	15
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ.....	17

PARTEA GENERALĂ

Introducere

În acest studiu am analizat rolul aquaporinei 4 în două dintre cele mai frecvente patologii neurologice: Boala Alzheimer și Accidentul Vascular Cerebral, ambele bolii fiind apanajul persoanelor vârstnice.

Boala Alzheimer este cea mai importantă și cea mai frecventă boală degenerativă a SNC și reprezintă între 50 și 75% din totalitatea cazurilor de demență. S-a observat că distribuția demenței la nivel mondial variază în funcție de factorii socio-economici și culturali, însă prevalența AD este mai crescută în țările dezvoltate, comparativ cu cele în curs de dezvoltare (Ferri et al., 2005). Datorită tulburărilor de personalitate, disnomiei, dezorientării temporo-spațiale și amneziei, pacientul ajunge în cele din urmă complet imobil, izolat și mut. În cele din urmă decesul acestor pacienți apare datorită bolilor de inimă, malnutriției sau infecțiilor secundare.

Principalele modificări morfologice care apar în cadrul bolii Alzheimer sunt reprezentate de acumularea amiloidului A β și a proteinelor tau la nivel cerebral. Amiloidul se poate găsi sub forma unor plăci la nivelul parenchimului cerebral dar și ca angiopatie amiloidă cerebrală, prin depunerea acestuia în pereții vaselor de sânge. Depozitele de amiloid pot fi difuze atunci când se continuă difuz cu substanță cerebrală înconjurătoare sau compacte atunci când sunt bine delimitate de țesutul nervos înconjurător (Wisniewski et al., 1989).

Accidentul vascular cerebral ocupă primul loc ca frecvență și importanță dintre toate afecțiunile neurologice ale adultului. Accidentul vascular cerebral produce anual aproximativ 7,8 milioane de decese la nivel mondial și reprezintă aproximativ 13% din cauzele de deces. În conformitate cu ultima recenzie cuprinzătoare din 2004 a Organizației Mondiale a

Sanat ții (OMS) AVC se găsește în primele cinci cauze de deces indiferent de categoria socială. Cei mai importanți dintre factorii de risc pentru AVC sunt: fibrilația atrială, diabetul zaharat de tip 2, hipertensiunea arterială, hiperlipidemia și fumatul.

 n lucrarea de fața am arătat pe modele animale că inhibarea AQP4 produce o întârziere în drenajul perivascular al A β , determină creșterea acumulării acestuia în jurul vaselor de sânge, în special cele cu diametru mai mic, favoriz nd astfel depunerea de amiloid în pereții vasculari, caracteristică  nt lnit  în boala Alzheimer. Am evaluat de asemena prin tehnici de imunofluorescența expresia celor două aquaporine la nivelul SNC și am găsit o expresie crescută a AQP4 la nivelul piei mater; expresia ridicată a AQP1 am  ntalnit-o la nivelul substanței albe. Ambele aquaporine au fost exprimate în piciorușele perivascularare ale astrocitelor.

CUVINTE CHEIE: Boala Alzheimer, Accident Vascular Cerebral, Amiloid A β 40, Aquaporina 4.

PARTEA GENERALĂ

1. ANATOMIA ȘI HISTOLOGIA SNC

Sistemul nervos poate fi împărțit din punct de vedere structural în sistem nervos central și sistem nervos periferic. Sistemul nervos central este alcătuit din encefal și măduva spinării iar sistemul nervos periferic este alcătuit din nervii cranieni, nervii spinali și ganglionii asociați lor.

Atât encefalul cât și măduva spinării sunt protejate de structuri osoase respectiv cutia craniană și canalul vertebral. Pe lângă protecția osoasă, SNC mai este protejat și de trei membrane conjunctive, denumite meninge. Encefalul este partea sistemului nervos central localizat în cutia craniană și este alcătuit din: trunchiul cerebral (bulb rahidian, punte și mezencefal), cerebelul, diencefalul (talamusul, metatalamusul, subtalamusul, epitalamusul și hipotalamusul) și telencefalul (Felten et al., 2016).

Din punct de vedere histologic sistemul nervos central este alcătuit din parenchim și stromă. Parenchimul sistemului nervos central conține totalitatea celulelor nervoase iar stroma cuprinde fine elemente conjunctive, celule gliale și vase sanguine. Parenchimul este limitat la suprafață de un strat de nevroglie astrocitară și în profunzime de un epiteliu ependimar. Între aceste limite parenchimul este structurat în două zone tisulare diferite ca aspect funcțional și morfologic: substanță cenușie și substanță albă. Substanța cenușie este alcătuită din dendrite, corpi neuronali, celule nevroglie, porțiunea inițială nemielinizată a axonilor și o bogată rețea de vase sanguine. Substanța albă este alcătuită din axoni mielinizați organizați în cordoane sau fascicule.

2. EPIDEMIOLOGIA ȘI FIZIOPATOLOGIA BOLII ALZHEIMER

Demența este un sindrom clinic cauzat de neurodegenerare și este caracterizată prin deteriorarea progresivă a capacității cognitive și a capacității pentru viața independentă. Manifestările clinice cuprind afectarea memoriei și cel puțin una din următoarele: afazie, agnozie, apraxie și tulburări ale funcțiilor motorii complexe. Este o prioritate în domeniul sănătății și al asistenței sociale pentru multe țări cu venituri ridicate.

AD reprezintă cam 50%-75% din totalitatea cazurilor de demență. Demența cerebrovasculară cumulează încă 10%-20%, urmată de demența cu corpi Lewy (LBD, 10%-15%), degenerarea frontotemporală (FDT, 5% până la 15%), demența mixtă (10%-15%) și alte cauze (de la 2% până la 5%) (Kawas, 2003).

Distribuția demenței în lume pare să varieze în funcție de diferențele culturale și socio-economice. Interesant, prevalența generală a demenței în general și AD, în special, pare a fi mai mare în țările dezvoltate decât în cele în curs de dezvoltare (Ferri et al., 2005).

Factorii de risc pentru AD se împart în două categorii: factori de risc modificabili și nemodificabili. Din categoria factorilor de risc modificabili fac parte : diabetul, hipertensiunea (HTA), dislipidemia, obezitatea, fumatul, activitatea fizică scăzută, hipoperfuzia cerebrală, accidentul vascular cerebral (AVC), depresia, traumatismele craniene, contuziile. Din categoria factorilor de risc nemodificabili fac parte : vârsta, sexul, istoricul familial, rasa, sindromul Down, amiloidoza cerebrală (Hebert et al., 2013, Seshadri et al., 1997, Alzheimer's, 2016).

Modificările macroscopice în boala Alzheimer sunt reprezentate de lărgirea șanțurilor și atrofia girilor, în special în regiunile temporale mediale, dar poate afecta și regiunile parietale și temporale mediale (hipocampus). Poate fi prezentă și o mărire semnificativă a sistemului ventricular, fiind afectați în special ventriculii laterali. Modificările morfologice din cadrul acestei boli se caracterizează prin acumularea peptidelor de amiloid în parenchimul cerebral sub forma unor plăci dar și în pereții vaselor de sânge ca angiopatie amiloidă cerebrală dar și prin prezența ghemurilor neurofibrilare alcătuite din agregarea proteinei tau în prelungirile și corpii neuronali.

3. EPIDEMIOLOGIA ȘI FIZIOPATOLOGIA AVC ISCHEMIC

AVC-ul reprezintă boala neurologică cu cea mai mare frecvență și importanță dintre toate bolile neurologice ale adultului; este a cincea cauză principală a morții și o cauză majoră a dizabilității în întreaga lume (Writing Group et al., 2016). În Europa, incidența leziunilor cerebrale variază de la o țară la alta, cu aproximativ 100-200 de AVC-uri la 100 000 de locuitori pe an, ceea ce reprezintă o povară uriașă pentru economie. România face parte din primele zece țări din lume ca și incidență a AVC-ului. Mortalitatea prin AVC este de șase la șapte ori mai mare în țara noastră decât în Statele Unite și de trei până la patru ori mai mare decât în restul țărilor Uniunii Europene (UE). Aceste statistici negative nu țin de nivelul economic al țării noastre ci de sistemul de sănătate din România unde lipsește prevenția primară și secundară (Pavaloiu and Mogoanta, 2017). Statisticile arată ca incidența maximă a AVC-ului apare în 75% din cazuri după vârsta de 65 de ani, vârstă asociată, cu o recuperare mult mai dificilă după AVC (Brown et al., 2003, Badan et al., 2003, Markus et al., 2005).

Factorii de risc pentru AVC se împart în două categorii: factori de risc modificabili și factori de risc nemodificabili. Din categoria factorilor de risc

nemodificabili fac parte: vârsta, sexul, rasa și genetica; iar din categoria factorilor de risc modificabili fac parte: HTA, fumatul, consumul de alcool, obezitatea, dieta, activitatea fizică, dislipidemia.

Fiziopatologia infarctului cerebral cuprinde două procese: primul este reprezentat de pierderea aportului de glucoză și oxigen datorită ocluziei vasculare și al doilea este reprezentat de modificările metabolismului celular care duc în final la dezintegrarea structurilor celulare și membranelor acestora.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

4. ROLUL SPAȚIILOR PERIVASCULARE ÎN MIGRAREA CELULELOR SISTEMULUI IMUN ÎN SNC

Introducere: Spațiile Virchow-Robin (VR) sunt spațiile perivascularare ce înconjoară vasele de sânge cerebrale în cursul lor din spațiul subarahnoidian către parenchimul cerebral. În mod fiziologic aceste spații pot fi observate doar microscopic însă atunci când ele se dilată pot fi observate și pe imaginile de RMN (Hirabuki et al., 1994). Tuberculoza este o infecție granulomatoasă cronică cauzată de *Mycobacterium tuberculosis*. Infecția SNC cu MTB apare sub forma meningitei subacute sau cronice. Tuberculoamele pot fi de asemenea prezente și pot fi interpretate ca leziuni înlocuitoare de spațiu (Rock et al., 2008). Meningita tuberculoasă poate fi singura manifestare a TB sau poate fi asociată cu TB pulmonară sau cu forma diseminată (Sharma et al., 2012). O altă consecință este apariția vasculitei în teritoriul areterei cerebrale medii, vertebro-bazilar sau în cercul arterial al lui Willis (Misra et al., 2011).

Material și metodă: În acest studiu noi am utilizat țesut nervos provenit de la un pacient de 71 ani, diagnosticat cu meningită tuberculoasă.

După examinarea macroscopică țesutul a fost fixat și procesat pentru includerea la parafină în Departamentul de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova iar pregătirea pentru IHC în Centrul pentru Studii de Morfologie Microscopică și Imunologie din cadrul UMF Craiova. După fixarea în formol 10% toate fragmentele de țesut au fost secționare la microtom și apoi colorate cu HE pentru diagnosticul histopatologic de bază. Secțiunile de creier au fost prelucrate în continuare pentru IHC și am utilizat următorii anticorpi: anti-colagen IV [mouse, Dako (Glostrup, Denmark), cod M0785, 1:50], anti-antigen comun leucocitar [LCA, cluster of differentiation 45 (CD45)] (mouse, Dako, code M0701, 1:100) sau anticorpul anti-actina mușchiului neted (mouse, Dako, code M0851, 1:100) ca și anticorpi primari. După recuperarea antigenică la microunde în soluție citrat cu $\text{pH}=6$ și blocarea peroxidazei anticorpii primari au fost incubati pe secțiuni peste noapte la 4°C . Următoarea zi, după o spălare minuțioasă un anticorp secundar capră anti-șoarece legat cu HRP a fost adăugat pe secțiuni pentru 30 minute (Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan), enzima a fost vizualizată cu DAB (Dako) și lamele au fost acoperite cu un mediu pe bază de xilen (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Rezultate: La microscopie, plămânul a reconfirmat boala activă, prezentând alveolită generalizată mixtă purulentă și mononucleară, cu zone mari de necroză cazeoasă confluentă, înconjurată de reacție granulomatoasă cronică cu celule epitelioide și celule gigante Langhans. La examinarea microscopică a creierului în regiunea șanțului lateral, în leptomeninge și straturile corticale superioare a fost prezent un exudat cu polimorfonucleare și mononucleare, cu coexistența fibrinei și a zonelor de hemoragie și necroză cazeoasă. Nu au fost găsite celule gigante Langhans aici dar spre straturile corticale medii, regiunea afectată era înconjurată de numeroase astrocite reactive. Embolii septici au putut fi identificați în vasele corticale mai mari. Exudatul inflamator nu a fost limitat la meninge și cortexul înconjurător, acesta a fost extins în jurul tuturor vaselor din regiunea corticală, fără a

implica însă substanța albă de dedesubt. Am identificat celule mononucleare inflamatorii în parenchimul cerebral, în spațiile perivasculare dilatate, dar și celule care păreau că disecă pereții vasculari. În încercarea de a clarifica această observație am continuat cu efectuarea IHC pentru colagen IV și, în mai multe cazuri, aceasta a delimitat clar spațiile vacuolare și saculare în grosimea pereților înconjurate de colagen IV și care conțineau nucleii rotunzi cu aspect de celule limfatice. Spațiile perivasculare dilatate conțineau și celule limfatice și vase mici fără un spațiu perivascular dilatat clar. Imunomarcarea pentru actina mușchiului neted a confirmat că acești nucleii păreau că disecă peretele muscular, că aceste celule nu ar fi celule musculare netede și că aceste spații sunt distincte de spațiile perivasculare.

Discuții: Meningita tuberculoasă este localizarea cea mai rară a TB (cu o incidență de 5-15%) și cea mai severă. În special în țările în curs de dezvoltare, meningita tuberculoasă are o rată mare a mortalității și morbidității, a doua cea mai mare incidență din lume se găsește în China (Bartzatt, 2011). Unele studii au postulat că doar complexe imune pot pătrunde în membrana bazală nu și celulele imune competente (Carare et al., 2013), însă studiile noastre au arătată în cazul influxului de celule imune în creier într-un caz de meningită cu encefalită au existat celule imune în grosimea membranei bazale, pe lângă grupările clasice din jurul vaselor de sânge (Rosu et al., 2018).

5. INHIBAREA AQUAPORINEI 4 SCADE DRENAJUL PERIVASCULAR INTRACEREBRAL AL AMILOIDULUI A β 40

Introducere: A β este produs în timpul activității neuronale, din APP, o preteină membranară care acționează ca un receptor de semnalizare (Bero et al., 2011, Neve and McPhie, 2007). În condiții fiziologice, APP este scindată de α -secretază, ceea ce împiedică formarea A β , iar fragmentul

carboxi-terminal rezultat este apoi clivat de γ -secretază (Chow et al., 2010). Produsele rezultate nu agregă (Blennow et al., 2006).

Material și metodă: Acest studiu a fost efectuat pe 16 șoareci masculi C57BL / 6J (N = 8 pentru studii ex vivo și N = 8 pentru studii in vivo). Înainte de injectarea intracraniană a amiloidului A β 40 marcat fluorescent, o parte din animalele incluse în studiu au primit intraperitoneal o doză de inhibitor al aquaporinei 4 TGN-020, iar vasele cerebrale au fost marcate cu Sulfurodamină 101 pentru a putea fi vizualizate. Am urmărit drenajul perivascular al A β 40 timp de 20 minute cu ajutorul unui microscop Zeiss cu excitatie de tip 2 fotoni, ulterior șoarecii au fost anesteziați, decapitați și jumătate din creier a fost pregătit pentru microscopia de fluorescență și cealaltă jumătate a fost pregătită pentru microscopia electronică.

Rezultate: Imagistica in vivo a confirmat că A β 40 a difuzat rapid în neuropilul înconjurător, cu un număr mic de vase care prezintă o acumulare de peptidă A β 40 în apropierea lor, mai ales cele localizate în vecinătatea locului injectiei și aproape imediat după începerea injectiei; unele dintre ele fiind vizibile până la 30 de minute după aceea. După injectarea sistemică a inhibitorului AQP 4 TGN-020, înainte de injectia cu A β 40, imagistica in vivo a arătat clar o acumulare vasculară mai mare de peptidă A β 40 în comparație cu grupul netratat.

În continuare, am fost interesați să evaluăm dacă drenarea A β are loc uniform pentru vasele de toate dimensiunile. Ca atare, am decis să măsurăm diametrul vaselor care prezintă depozite de A β . La animalele tratate cu inhibitor AQP4, acumularea de A β a fost mai mare în jurul vaselor mai mici (8,366 +/- 0,821 μ m) comparativ cu martorii (13,17 +/- 1,532 μ m). Dacă am căutat vasele care nu aveau depuneri de A β în jurul lor, nu a existat nicio diferență între diametrele medii ale acestora pentru animalele tratate și, respectiv, netratate (5.192 \pm 0.289 μ m / 5.558 \pm 0.246 μ m), (p = 0.33).

Nu au existat diferențe morfologice vizibile microscopic ale vaselor de sânge la animalele tratate și netratate, așa cum s-a vizualizat pe emisferile incluse la parafină, fără hemoragii acute și nici un infiltrat inflamator ascuns în pereții vasului.

Discuții: În studiul de față, am arătat pentru prima dată că inhibarea AQP4 scade direct drenajul A β prin căile glimfactice și, prin urmare, reglarea lui sau scăderea legată de vârstă la nivelul piciorușelor astrocitare perivasculare ar contribui foarte mult la acumularea de A β în creierul pacienților LOAD. Într-adevăr, o serie de modificări ale astrocitelor au fost descrise pe modelele de șoareci cu AD și în patologia umană, cum ar fi detașarea prelungirilor astrocitelor de bariera hematoencefalică, reducerea metabolismului la nivelul piciorușelor, inclusiv pierderea AQP4, precum și o afectare generală a drenajului perivascular (Wilcock et al., 2009, Merlini et al., 2011, Hawkes et al., 2011).

Impactul deficitelor AQP4 asociate cu vârsta asupra clearance-ului A β sunt și mai pronunțate în deficitale de lungă durată, comparativ cu experimentul prezent, deoarece s-a arătat că în timpul somnului, clearance-ul glimfatic este crescut cu până la 60% permițând, în condiții normale, un clearance optim la nivel cerebral (Xie et al., 2013).

6. DISTRIBUȚIA AQUAPORINELOR 1 ȘI 4 ÎN SNC

Introducere: Aquaporinele sunt canale cu permeabilitate selectivă pentru apă, descoperite prima dată în 1990. În corpul uman aceste proteine au diferite funcții și localizări. Cele mai importante aquaporine prezente în creier sunt AQP1, AQP4 și AQP9, însă studii recente au identificat în culturi de astrocite și neuroni și AQP3, AQP5 și AQP8.

Material și metodă: În acest studiu noi am utilizat țesut nervos provenit de pacienți care au decedat datorită altor boli decât cele neurologice. Pacienții au fost internați și urmăriți în secția de Neurologie, a Spitalului

Clinic de Neuropsihiatrie Craiova. După examinarea macroscopică s-a recoltat țesut din toate zonele corticale majore, a fost procesat în mod obișnuit pentru includerea la parafină, blocurile obținute au fost secționare la microtom la o grosime de 4 μm și apoi din baia de apă caldă au fost pescuite pe lame de microscopie acoperite cu poli-L-lizină. Colorația clasică cu HE a confirmat că nu există modificări histopatologice evidente în cortexul cerebral sau substanța albă, adică glioză ușoară, stază și edem perivascular și pericelular izolat. De la fiecare pacient am selectat blocuri din lobii frontal, parietal, temporal și occipital și am procesat secțiunile mai departe pentru IHC. Anticorpii pe care i-am utilizat au fost anti-AQP1, anti-AQP4 și anti-GFAP. Am realizat și reacții de dublă imunofluorescență atât pentru cele două aquaporine cât și pentru GFAP și aquaporine.

Rezultate: Am evaluat aici pentru prima dată localizarea AQP1 și AQP4 în cortexul cerebral și în substanța albă, la persoanele care nu au avut afecțiuni neurologice (Rosu et al., 2019). Așa cum a mai fost descris în literatură (Mogoanta et al., 2014) cea mai mare parte a AQP4 a fost exprimată în pia mater, peteșial în astrocitele corticale și mai densă în astrocitele din substanța albă. Când am evaluat AQP1 în cortex am găsit puține astrocite pozitive și cu o slabă colocalizare cu AQP4 sau chiar fără a se colocaliza cu aceasta. Am intenționat să vedem cea mai frecventă expresie celulară pentru AQP1 și am evaluat-o concomitant cu GFAP. În toate cazurile între cele două semnale a existat o apropiere, ca și în cazul AQP4. Deoarece ambele sunt proteine membranare, semnalul pentru aquaporină înconjoară citoscheletul GFAP, acesta fiind modelul de expresie în imaginile analizate

Discuții: Această familie străveche de proteine, aquaporinele, sunt prezente în toate formele de viață, arătându-și importanța în menținerea homeostaziei normale a tuturor organismelor. Ele sunt prezente într-un număr mai mare în organismele multicelulare în comparație cu cele unicelulare, unde există doar câteva (Heymann and Engel, 2000, Zardoya, 2005).

Principalele roluri pe care le îndeplinesc aquaporinele în SNC sunt neuroexcitabilitatea, migrarea astrocitară și facilitarea mișcării apei în interiorul și în afara SNC (Arcienega et al., 2010). AQP1 este prezentă la nivelul plexurilor coroide și are rol în producerea LCR și AQP4 este prezentă în celulele endimale și astrocitele subependimale, în special la nivelul piciorușelor perivascularare ale astrocitelor și are rol în absorbția LCR (Nielsen et al., 1997, Mogoanta et al., 2014, Rash et al., 1998, Popescu et al., 2017).

7. EXPRESIA AQUAPORINELOR 1/4 ÎN AVC

Introducere: În lume, AVC-ul reprezintă principala cauză de deces în țările dezvoltate, iar prevalența acestei afecțiuni este în ușoară creștere (Kim et al., 2010). AVC-ul ischemic este cel mai comun tip, reprezintă 80% din toate tipurile de AVC și apare datorită scăderii bruște a fluxului sanguin într-o anumită regiune din creier; disfuncțiile neurologice sunt principalele consecințe ale acestei afecțiuni (Richard Green et al., 2003). În acest articol ne-am axat pe descrierea localizării aquaporinelor 1 și 4 în AVC și pe observarea gradului lor de colocalizare în diferite zone precum: cicatricea perilezională, substanța albă perilezională, zone de control din substanța albă și cortex.

Material și metodă: Noi am utilizat aici țesut cerebral de la 8 pacienți care au avut confirmată o patologie ischemică cerebrală și 5 pacienți care au decedat din alte cauze. Acești pacienți au fost internați și diagnosticați în clinica de Neurologie a Spitalului Clinic de Neuropsihiatrie, Universitatea de Medicină și Farmacie Craiova și materialul lor biologic fusese inclus în proiectul băncii de creier care este în curs în cadrul Departamentului de Histologie din UMF Craiova. Vârstele medii au fost 67.13 ± 5.03 pentru pacienții cu AVC și 66.40 ± 7.02 pentru cazurile de control. Am realizat colorații histologice clasice precum hematoxilină-eozină dar și tehnici de

imunofluorescență simplă, dublă și triplă. Anticorpii utilizați de noi în acest studiu au fost : anti-AQP1, anti-AQP4, anti-Collagen IV și anti-GFAP.

Rezultate: Am evaluat pentru prima dată imunoexpresia AQP1 față de AQP4 pe secțiuni seriate din țesut perilezional, atât în cortex, cât și în substanța albă. Atât în țesutul de control cât și în toate regiunile analizate de noi în creierul pacienților cu AVC expresia AQP4 a fost mai mare decât a AQP1. În continuare, am evaluat comparativ expresia celor două aquaporine, în secțiuni colorate fluorescent din cortexul perilezional. Astfel, în timp ce AQP4 a fost intens exprimat de pia mater și de astrocite focale în cortexul propriu-zis, AQP1 a fost aproape inexistent la nivelul piei mater și doar astrocitele rare sunt marcate pozitiv de acest marker. O constatare interesantă a fost că, în timp ce majoritatea semnalului pentru AQP1 a co-localizat cu GFAP, nu toate semnalele AQP4 proveneau de la astrocite marcate de GFAP.

Cel mai interesant fenomen a fost, însă, în cicatricea glială care înconjoară nucleul necrotic, unde expresia AQP1 părea să fie restricționată la imediata vecinătate a membranei gemistocitelor, zonele perinucleare fiind lipsite de semnal. Această caracteristică nu a fost observată pentru AQP4 în regiunile cicatriceale.

Discuții: Am analizat aici pentru prima dată imunoexpresia AQP4 față de AQP1 pe secțiuni seriate atât prin creierul pacienților care suferă de AVC cât și prin creierul normal (Rosu et al., 2019). Deși imunoexpresia ambelor aquaporine a fost pozitivă în aceleași zone: în astrocite și în jurul vaselor de sânge. În toate zonele analizate de noi: zona din jurul lichefactiei, cicatricea glială, substanța albă perilezională și cortexul, expresia AQP4 a fost mai crescută decât expresia AQP1. Ar fi interesant de arătat în viitor relația tridimensională dintre vasele de sânge și astrocitele pozitive pentru AQP4 respectiv AQP1 pe secțiuni seriate scanate (Serbanescu and Plesea, 2015).

Studiul nostru, precum și alte studii care au analizat expresia imunohistochimică a AQP4 în creierul normal au arătat că aceasta este

prezentă în celulele gliale cu structura astrocitelor și în celulele endimale. De asemenea, au arătat ca celulele gliale au fost colorate în mezenfal, măduva spinării, talamus și cerebel. La fel ca în studiul nostru, neuronii din cerebel, măduva spinării și creier nu au fost pozitivi pentru acești markeri. Positivitatea astrocitelor pentru AQP4 a fost diferită, astfel încât în procesele perivascularare a avut cea mai mare intensitate, în pia și în stratul endimale, date similare cu cele obținute de noi (Nielsen et al., 1997).

8. CONCLUZII

În studiul de față am evaluat paternul de expresie al AQP 4, care este cel mai bine reprezentat canal de apă la nivelul SNC, în AVC ischemic, precum și capacitatea sa de a modula eliminarea fracțiunii solubile de amiloid A β . Am arătat pentru prima dată că inhibarea AQP4 reduce eliminarea perivasculară a A β din creier.

Am arătat în acest studiu că atunci când este inhibată AQP4, există o întârziere semnificativă a drenării de A β începând cu 10 până la 30 de minute după injectare; acumularea A β în jurul vaselor de sânge este mai mare și se depune în general în vasele cu diametrul mai mic, explicând astfel depunerea de A β în pereții vaselor de sânge cu diferite disfuncționalități (hipertensiune, modificări asociate vârstei).

Am fost interesați de asemenea să evaluăm expresia aquaporinelor 1 și 4 în creierul normal și în cazul infarctului cerebral. Am analizat pentru prima dată expresia celor două aquaporine la nivelul cortexului și substanței albe în creierul normal, prin tehnici de imunofluorescență. Am observat că la nivelul piei mater, AQP 4 are o expresie foarte ridicată în comparație cu AQP1 care este foarte puțin exprimată aici, iar gradul de colocalizare pentru cei doi markeri este scăzut. La nivelul astrocitelor corticale semnalul pentru AQP4 a fost exprimat zonal, am găsit mai puține astrocite pozitive pentru

AQP1 cu o colocalizare slabă între cele două. În schimb la nivelul substanței albe expresia AQP1 a fost mai crescută, în această zonă am găsit atât astrocite pozitive pentru ambele aquaporine cât și astrocite care exprimau doar una dintre aquaporine. Am evaluat concomitent expresia AQP1 cu GFAP și am găsit o colocalizare perfectă între cei doi markeri.

În cortexul perilezional, pe imaginile de imunohistochimie, am găsit semnal pozitiv pentru cele două aquaporine în jurul vaselor de sânge și în astrocitele intraparenchimotoase, însă cu o expresie mai ridicată pentru AQP4. Și la nivelul substanței albe am avut semnal pozitiv pentru ambele aquaporine însă cu diferențe mult mai subtile. În aceleași zone am analizat gradul de colocalizare pentru cele două aquaporine prin tehnici de imunofluorescență. Deși în majoritatea cazurilor expresia AQP 4 a fost mai mare decât a AQP1, am găsit și unele zone de cicatrice perilezională unde expresia AQP 1 a fost mai mare.

Coroborând toate datele obținute de noi atât prin intermediul imaginilor microscopice, cât și prin analiza statistică, am arătat că expresia celor două aquaporine crește în AVC, colocalizându-se atât cu colagenul IV cât și cu GFAP, dar valorile AQP4 sunt constant mai mari.

Am fost preocupați de asemenea să evaluăm rolul pe care îl are spațiul perivascular în drenarea celulelor inflamatorii în SNC. Am arătat pentru prima dată că aceste celule sunt prezente în spațiul perivascular și mai mult le-am identificat, prin mijloace histologice și imunohistochimice, în buzunare ale membranei bazale vasculare. Am găsit de asemenea și câteva spații vacuolare sau saculare, în grosimea membranei bazale, ce erau delimitate de colagen de tip IV și conțineau nuclei de celule inflamatorii, evidențiați prin colorații imunohistochimice.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- ALZHEIMER'S, A. 2016. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*, 12, 459-509.
- ARCIENEGA, II, BRUNET, J. F., BLOCH, J. & BADAUT, J. 2010. Cell locations for AQP1, AQP4 and 9 in the non-human primate brain. *Neuroscience*, 167, 1103-14.
- BADAN, I., PLATT, D., KESSLER, C. & POPA-WAGNER, A. 2003. Temporal dynamics of degenerative and regenerative events associated with cerebral ischemia in aged rats. *Gerontology*, 49, 356-65.
- BARTZATT, R. 2011. Tuberculosis infections of the central nervous system. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, 11, 321-7.
- BERO, A. W., YAN, P., ROH, J. H., CIRRITO, J. R., STEWART, F. R., RAICHLER, M. E., LEE, J. M. & HOLTZMAN, D. M. 2011. Neuronal activity regulates the regional vulnerability to amyloid-beta deposition. *Nat Neurosci*, 14, 750-6.
- BLENNOW, K., DE LEON, M. J. & ZETTERBERG, H. 2006. Alzheimer's disease. *Lancet*, 368, 387-403.
- BROWN, A. W., MARLOWE, K. J. & BJELKE, B. 2003. Age effect on motor recovery in a post-acute animal stroke model. *Neurobiol Aging*, 24, 607-14.
- CARARE, R. O., TEELING, J. L., HAWKES, C. A., PUNTENER, U., WELLER, R. O., NICOLL, J. A. & PERRY, V. H. 2013. Immune complex formation impairs the elimination of solutes from the brain: implications for immunotherapy in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun*, 1, 48.
- CHOW, V. W., MATTSO, M. P., WONG, P. C. & GLEICHMANN, M. 2010. An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromolecular Med*, 12, 1-12.
- FELTEN, D. L., O' BANION, M. K. & MAIDA, M. S. 2016. Overview of the nervous system. In: FELTEN, D. L. O. B., M.K.; MAIDA, M.S. (ed.) *Netter's atlas of neuroscience*. 3rd ed. Philadelphia, USA: Elsevier.
- FERRI, C. P., PRINCE, M., BRAYNE, C., BRODATY, H., FRATIGLIONI, L., GANGULI, M., HALL, K., HASEGAWA, K., HENDRIE, H., HUANG, Y., JORM, A., MATHERS, C., MENEZES, P. R., RIMMER, E. & SCAZUFCA, M. 2005. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, 366, 2112-2117.
- HAWKES, C. A., HARTIG, W., KACZA, J., SCHLIEBS, R., WELLER, R. O., NICOLL, J. A. & CARARE, R. O. 2011. Perivascular drainage of solutes is impaired in the ageing mouse brain and in the presence of cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol*, 121, 431-43.
- HEBERT, L. E., WEUVE, J., SCHERR, P. A. & EVANS, D. A. 2013. Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology*, 80, 1778-83.
- HEYMANN, J. B. & ENGEL, A. 2000. Structural clues in the sequences of the aquaporins. *J Mol Biol*, 295, 1039-53.
- HIRABUKI, N., FUJITA, N., FUJII, K., HASHIMOTO, T. & KOZUKA, T. 1994. MR appearance of Virchow-Robin spaces along lenticulostriate arteries: spin-echo and two-dimensional fast low-angle shot imaging. *AJNR Am J Neuroradiol*, 15, 277-81.
- KAWAS, C. H. 2003. Clinical practice. Early Alzheimer's disease. *N.Engl.J.Med.*, 349, 1056-1063.
- KIM, J. H., LEE, Y. W., PARK, K. A., LEE, W. T. & LEE, J. E. 2010. Agmatine attenuates brain edema through reducing the expression of aquaporin-1 after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 30, 943-9.

- MARKUS, T. M., TSAI, S. Y., BOLLNOW, M. R., FARRER, R. G., O'BRIEN, T. E., KINDLER-BAUMANN, D. R., RAUSCH, M., RUDIN, M., WIESSNER, C., MIR, A. K., SCHWAB, M. E. & KARTJE, G. L. 2005. Recovery and brain reorganization after stroke in adult and aged rats. *Ann Neurol*, 58, 950-3.
- MERLINI, M., MEYER, E. P., ULMANN-SCHULER, A. & NITSCH, R. M. 2011. Vascular beta-amyloid and early astrocyte alterations impair cerebrovascular function and cerebral metabolism in transgenic arcAbeta mice. *Acta Neuropathol*, 122, 293-311.
- MISRA, U. K., KALITA, J. & MAURYA, P. K. 2011. Stroke in tuberculous meningitis. *J Neurol Sci*, 303, 22-30.
- MOGOANTA, L., CIUREA, M., PIRICI, I., MARGARITESCU, C., SIMIONESCU, C., ION, D. A. & PIRICI, D. 2014. Different dynamics of aquaporin 4 and glutamate transporter-1 distribution in the perineuronal and perivascular compartments during ischemic stroke. *Brain Pathol*, 24, 475-93.
- NEVE, R. L. & MCPHIE, D. L. 2007. Dysfunction of amyloid precursor protein signaling in neurons leads to DNA synthesis and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 1772, 430-7.
- NIELSEN, S., NAGELHUS, E. A., AMIRY-MOGHADDAM, M., BOURQUE, C., AGRE, P. & OTTERSEN, O. P. 1997. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci*, 17, 171-80.
- PAVALOIU, R. & MOGOANTA, L. 2017. Clinical, Epidemiological and Etiopathogenic Study of Ischemic Stroke. *Curr Health Sci J*, 43, 258-262.
- POPESCU, E. S., PIRICI, I., CIUREA, R. N., BALSEANU, T. A., CATALIN, B., MARGARITESCU, C., MOGOANTA, L., HOSTIUC, S. & PIRICI, D. 2017. Three-dimensional organ scanning reveals brain edema reduction in a rat model of stroke treated with an aquaporin 4 inhibitor. *Rom J Morphol Embryol*, 58, 59-66.
- RASH, J. E., YASUMURA, T., HUDSON, C. S., AGRE, P. & NIELSEN, S. 1998. Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 11981-6.
- RICHARD GREEN, A., ODERGREN, T. & ASHWOOD, T. 2003. Animal models of stroke: do they have value for discovering neuroprotective agents? *Trends Pharmacol Sci*, 24, 402-8.
- ROCK, R. B., OLIN, M., BAKER, C. A., MOLITOR, T. W. & PETERSON, P. K. 2008. Central nervous system tuberculosis: pathogenesis and clinical aspects. *Clin Microbiol Rev*, 21, 243-61, table of contents.
- ROSU, G. C., NECHITA, D., BUSUIOC, C. J., ISTRATE-OFITERU, A. M., MARGARITESCU, O. C., STANCA, I. D., PIRICI, D. & BONDARI, D. 2018. A case of tuberculous meningitis and the role of perivascular spaces in lymph cell migration in the brain. *Rom J Morphol Embryol*, 59, 1205-1210.
- ROSU, G. C., PIRICI, I., ISTRATE-OFITERU, A. M., IOVAN, L., TUDORICA, V., MOGOANTA, L., GILCEAVA, I. C. & PIRICI, D. 2019. Expression patterns of aquaporins 1 and 4 in stroke. *Rom J Morphol Embryol*, 61, in press.
- SERBANESCU, M. S. & PLESEA, I. E. 2015. A hardware approach for histological and histopathological digital image stain normalization. *Rom J Morphol Embryol*, 56, 735-41.
- SESHADRI, S., WOLF, P. A., BEISER, A., AU, R., MCNULTY, K., WHITE, R. & D'AGOSTINO, R. B. 1997. Lifetime risk of dementia and Alzheimer's disease. The impact of mortality on risk estimates in the Framingham Study. *Neurology*, 49, 1498-504.
- SHARMA, S. K., MOHAN, A. & SHARMA, A. 2012. Challenges in the diagnosis & treatment of miliary tuberculosis. *Indian J Med Res*, 135, 703-30.

- WILCOCK, D. M., VITEK, M. P. & COLTON, C. A. 2009. Vascular amyloid alters astrocytic water and potassium channels in mouse models and humans with Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 159, 1055-69.
- WISNIEWSKI, H. M., WEN, G. Y. & KIM, K. S. 1989. Comparison of four staining methods on the detection of neuritic plaques. *Acta Neuropathol. (Berl)*, 78, 22-27.
- WRITING GROUP, M., MOZAFFARIAN, D., BENJAMIN, E. J., GO, A. S., ARNETT, D. K., BLAHA, M. J., CUSHMAN, M., DAS, S. R., DE FERRANTI, S., DESPRES, J. P., FULLERTON, H. J., HOWARD, V. J., HUFFMAN, M. D., ISASI, C. R., JIMENEZ, M. C., JUDD, S. E., KISSELA, B. M., LICHTMAN, J. H., LISABETH, L. D., LIU, S., MACKAY, R. H., MAGID, D. J., MCGUIRE, D. K., MOHLER, E. R., 3RD, MOY, C. S., MUNTNER, P., MUSSOLINO, M. E., NASIR, K., NEUMAR, R. W., NICHOL, G., PALANIAPPAN, L., PANDEY, D. K., REEVES, M. J., RODRIGUEZ, C. J., ROSAMOND, W., SORLIE, P. D., STEIN, J., TOWFIGHI, A., TURAN, T. N., VIRANI, S. S., WOO, D., YEH, R. W., TURNER, M. B., AMERICAN HEART ASSOCIATION STATISTICS, C. & STROKE STATISTICS, S. 2016. Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics--2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 133, 447-54.
- XIE, L., KANG, H., XU, Q., CHEN, M. J., LIAO, Y., THIYAGARAJAN, M., O'DONNELL, J., CHRISTENSEN, D. J., NICHOLSON, C., ILIFF, J. J., TAKANO, T., DEANE, R. & NEDERGAARD, M. 2013. Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science*, 342, 373-7.
- ZARDOYA, R. 2005. Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family. *Biol Cell*, 97, 397-414.