



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



**MODULAREA FARMACOLOGICĂ A RĂSPUNSULUI  
ANGIOGENETIC ȘI MICROGLIAL DUPĂ  
ACCIDENTE VASCULARE ÎN MODEL ANIMAL**

**- REZUMAT -**

**CONDUCĂTOR DOCTORAT**

**Prof. Univ. Dr. POPA AUREL**

**STUDENT DOCTORAND**

**SURUGIU ROXANA**

**Craiova**

**2019**

## CUPRINS

1.	<b>Introducere</b> .....	3
2.	<b>Epidemiologie și etiologie</b> .....	4
	2.1 Factori declanșatori ai accidentului vascular cerebral.....	4
	2.2 Factori de risc pentru accidentul vascular cerebral .....	4
3.	<b>Accidentul vascular cerebral</b> .....	5
4.	<b>Rolul inflamației în accidentul vascular cerebral</b> .....	6
5.	<b>Materiale și metode</b> .....	7
6.	<b>Rezultate</b> .....	12
7.	<b>Concluzii</b> .....	15
8.	<b>Bibliografie selectivă</b> .....	16

## 1. INTRODUCERE

Actuala definiție a accidentului vascular cerebral (AVC) conform WHO - World Human Organisation (introdusă în 1970 și încă utilizată) este: "dezvoltarea rapidă a unor semne clinice de perturbare focală (sau globală) a funcției cerebrale, care durează mai mult de 24 de ore sau care duc la deces, fără alt motiv evident decât originea vasculară" [1].

Totuși, această definiție largă cuprinde accidentul vascular cerebral, hemoragiile cerebrale și subarahnoidiene fără a ține pasul cu progresul științific ce permite separarea acestora pe criterii imagistice și histopatologice. American Heart Association propune în 2013 redefinirea acestor termeni: accidentul vascular cerebral reprezintă moartea celulară secundară ischemiei focale la nivelul țesutului cerebral, al măduvei spinării sau moartea celulară retiniană, bazată pe evidențe patologice, imagistice sau alte dovezi obiective ale leziunii ischemice cerebrale, spinale sau retiniene, într-un teritoriu vascular definit sau dovezi clinice ale leziunii ischemice focale cerebrale, spinale sau retiniene, pe baza simptomelor care persistă  $\geq 24$  ore sau a decesului, cu excluderea altor etiologii [2].

Prezenta lucrare cuprinde zece capitole în care sunt prezentate ultimele actualități în domeniu, factorii de risc și tipurile de accident vascular cerebral, rolul inflamației la nivel cerebral, cât și post-AVC, materialele și metodele folosite, rezultate și discuții.

Astfel, partea generală urmărește date epidemiologice ale accidentului vascular cerebral și factorii de risc implicați, precum și povara globală a accidentului vascular cerebral. Modificările celulare și moleculare secundare AVC-ului, informații cu privire la zona de centru și penumbră, angiogeneza și neurogeneza în AVC sunt abordate în capitolele următoare.

Partea de contribuții personale pune accentul pe descrierea lotului de animale, tratamentul folosit, metodele de lucru utilizate, detalierea protocoalelor de imunohistochimie, extracție și purificare ARN, PCR cantitativ, microscopie confocală și optică și mijloacele statistice folosite. Urmează apoi detalierea rezultatelor și discuțiile prezentului studiu.

**Cuvinte cheie:** inflamație, angiogeneză, accident vascular cerebral, BrdU, 2-fotoni.

## 2. EPIDEMIOLOGIE ȘI ETIOLOGIE

### 2.1 Factori declanșatori ai accidentului vascular cerebral

Factorul de risc reprezintă orice caracteristică a unui individ ce crește riscul de AVC, comparativ cu indivizii ce nu prezintă acea caracteristică [3]. Unii din factorii de risc sunt nemodificabili: antecedentele familiale de boli cardio-vasculare, vârsta, sexul masculin, rasa, în timp ce alții pot fi modificați, ducând la o scădere a riscului de boală. Acești factori de risc, ce de cele mai multe ori co-există, însumează aproximativ 60-80% din riscul de AVC în populația generală [3]. Deși studii genomice complexe încearcă identificarea unor gene susceptibile pentru AVC, cu identificarea anumitor loci, este totuși un efect modest în relevanța clinică [4].

### 2.2 Factori de risc pentru accidentul vascular cerebral

Factorii de risc au un efect cumulativ asupra structurii și funcției vaselor de sânge, la nivel local și sistemic. Mulți din factorii de risc alterează structura vasculară având efect pro-aterosclerotic, cu rigidizare arterială, cu îngustarea și torsionarea arteriolelor și capilarelor [5]. La nivel cerebral, aceste schimbări morfologice sunt adesea asociate cu reducerea fluxului cerebral prin alterarea mecanismelor de reglare cerebro-vasculare.

Vârsta înaintată, hipertensiunea arterială, diabetul zaharat și hipercolesterolemia alterează mecanismele adaptative vitale responsabile de perfuzia adecvată [6]. Abilitatea endoteliului de reglare microvasculară este compromisă, în timp ce creșterea fluxului de sânge secundar activității neurale este suprasat, ducând la o desincronizare între necesarul și aportul energetic [7].

Hipertensiunea și diabetul alterează mecanismele vasculare protective ce mențin fluxul cerebro-vascular stabil în perioadele de scădere a presiunii sangvine, facilitând apariția sau intensitatea crescută a fenomenelor ischemice la scăderea perfuziei [8]. Aceste modificări vasculare cresc vulnerabilitatea cerebrală la ischemie, secundar unei ocluzii vasculare, prin compromiterea dezvoltării colateralelor din vase adiacente neobstruate, lucru vital pentru limitarea zonei de infarct [9]. Pe lângă riscul vascular, vârsta înaintată și diabetul zaharat cresc susceptibilitatea celulelor cerebrale la injurie, amplificând efectele ischemice, însă mecanismele ce stau la baza acestui lucru nu sunt încă elucidate [10].

### 3. ACCIDENTUL VASCULAR CEREBRAL

Odată cu declanșarea căilor patologice ale cascadei ischemice se produc leziuni neuronale ireversibile în miezul ischemic în câteva minute de la debut. Severitatea leziunii depinde de gradul și durata ischemiei și capacitatea creierului de a se recupera și de a se repara [11].

Excitotoxicitatea și excesul de calciu sunt factorii majori ce apar în stadiile inițiale ale morții celulare ischemice. Calea este dependentă de glutamat, cel mai abundent neurotransmițător, ce se acumulează în spațiul extracelular ca o consecință a disfuncției pompelor ionice și mecanismelor de recaptare [12]. Excesul de glutamat duce la stimularea prelungită a receptorilor inotropici NMDA și AMP, crescând influxul de calciu, sodiu și apă la nivel neuronal. Influxul masiv de calciu activează procesele catabolice mediate de proteaze, lipază și nucleaze [13]. În plus, activarea enzimelor  $\text{Ca}^{2+}$  dependente duce la producerea de oxid nitric, metaboliți ai acidului arahidonic, acționând ca factori declanșatori ai morții celulare. Fosforilarea oxidativă devine inefficientă, fiind urmată de depleția ATP-ului și producerea de ROS, eliberarea calciului din mitocondrie, accelerând seria de evenimente ce duce la moartea celulară [14].

Influxul crescut de calciu rezultat din supraactivarea receptorilor pentru glutamat, împreună cu ionii de calciu eliberați din mitocondrie și din alte depozite, nu sunt totuși suficienți pentru a compensa depozitul de calciu intracelular ca urmare a stimulării excitotoxice. Alte canale și pompe de ioni activate în timpul ischemiei sunt și ele implicate în mecanismele de acumulare a calciului, cuprinzând pompa  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , hemicanalele, canale pentru anioni reglate de volum și canalele TRP [15-18].

Pentru progresia patogenică a accidentul vascular cerebral sunt responsabile ischemia și inflamația, chiar dacă mecanismele implicate sunt multiple [19].

Zona de penumbră, ce înconjoară țesutul ischemic este ținta terapiei ce vizează recuperarea post-AVC, fiind aria ce poate fi ușor restaurată odată cu restabilirea fluxului cerebral. Așadar, definiția zonei de penumbră se referă la ariile din țesutul cerebral, afectate de scăderea fluxului sanguin, dar fără a fi moarte încă, conferind premisele că odată cu instaurarea terapiei corespunzătoare, țesutul ar putea fi recuperat și zona de infarct limitată, astfel încât deficitul secundar accidentului vascular cerebral ar putea fi mai mic [20].

#### 4. ROLUL INFLAMAȚIEI ÎN ACCIDENTUL VASCULAR CEREBRAL

Mulți dintre factorii de risc cardio-vasculari cresc producerea de specii de oxigen reactiv (ROS - reactive oxygen species) și promovează un status pro-inflamator sistemic și cerebral [21]. Sursele vasculare generatoare de ROS sunt enzime ca NADPH-oxidaza, xantin-oxidaza, enzime mitocondriale și oxid nitric sintetaza. Multe din efectele nocive ale stresului oxidativ asupra vaselor de sânge sunt corelate cu inactivarea biologică a oxidului nitric [22]. Astfel, pierderea efectelor vaso-reglatoare ale oxidului nitric asupra endoteliului vascular duce la vasoconstricție, cu efect negativ în reglarea fluxului microvascular [22]. Pierderea efectului antiagregant, antiproliferativ și de menținere a adeziunii celulare duce la agregare plachetară, adeziune leucocitară la celulele endoteliale, proliferare a țesutului muscular neted, etape cheie ale inflamației vasculare [23].

Cu debutul ischemiei cerebrale, microgliile, astrocitele, celulele endoteliale și neuronii eliberează o serie de citokine, cum ar fi interleukin-1 (IL-1) și factorul de necroză tumorală  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), care permit recrutarea leucocitelor activate și, în final, adeziunea la endoteliul microvascular. Rezultă astfel obstrucția canalului vascular, urmată de transmigrarea în zonele infarctate împreună cu monocitele și macrofagele [24].

Medierea inflamației postischemice poate bloca evenimente secundare care extind leziunea cerebrală. Cu toate acestea, în etapele ce vizează limitarea procesului ischemic, inflamația promovează evenimente critice necesare reparației țesutului. Prin urmare, intervențiile terapeutice care vizează inflamația postischemică trebuie îndreptate către reducerea potențialul distructiv al inflamației în faza acută, îmbunătățind în același timp contribuțiile benefice la reparația țesuturilor în stadii tardive ale ischemiei cerebrale [25].

## 5. MATERIALE ȘI METODE

Experimentele din prezentul studiu au fost efectuate în Laboratorul de Neurobiologia Îmbătrânirii, din cadrul Disciplinei de Biochimie a Universității de Medicină și Farmacie din Craiova, cu aprobarea Comisiei Universitare de Etică privind Experimentele pe Animale, îndeplinind cerințele etice ale Legii Naționale privind Utilizarea Animalelor Experimentale.

Toate experimentele au fost supervizate de către Prof. univ. dr. Aurel Popa-Wagner.

Prezentul studiu este structurat în două etape.

Pentru primul experiment s-a folosit un grup de 65 de animale, șobolani din rasa Sprague-Dawley, cu vârste cuprinse între 3 și 5 luni și greutatea între 290 și 360 grame. Animalele au fost divizate aleatoriu în trei grupe de supraviețuire post-AVC: animale sacrificate în ziua 3, 14 și 28, fiecare lot cuprinzând 20 de animale. Acestea au fost subdivizate în grupuri de câte 10 animale, fiecare sublot primind BrdU zilnic, timp de o săptămână înaintea sau după inducerea accidentului vascular cerebral. Grupul de control a fost format din 5 șobolani.

Al doilea experiment desfășurat a utilizat un lot de 30 de șoareci de sex masculin, din rasa C57BL/6J, cu vârsta între 6 și 9 luni, iar greutatea între 27 și 40 grame, divizați în 3 grupuri: grupul denumit „1/2xTratament” (N=10), grupul „1/3xTratament” (N=10) și grupul „Control” (N=10). Consecutiv, pentru evaluarea in vivo a efectului tratamentului am folosit 21 de șoareci transgenici, masculi CX3CR1 divizați corespunzător în 4 grupe de tratament: grupul „1xTratament” (N=4), „1/2xTratament” (N=4), „1/3xTratament” (N=4) și grupul control (N=5).

Animalele din primul experiment au primit injecții intraperitoneale cu Bromodeoxiuridină (BrdU) în doză de 50mg/kgc, zilnic, timp de o săptămână înaintea inducerea accidentului vascular cerebral pentru evidențierea fenotipului celulelor proliferatoare înainte de inducerea accidentului vascular cerebral. Pentru identificarea celulelor ce proliferază după constituirea infarctului s-a administrat BrdU zilnic, în prima săptămână după AVC.

Al doilea experiment a constat în administrarea unui antagonist selectiv al receptorului C3a al complementului (SB 290157 trifluoroacetate salt - N<sup>2</sup>-[2-(2,2-diphenylethoxy) acetyl]-L-arginine trifluoroacetate salt): 1mg/ml în

1xPBS/0,1%DMSO. In vivo, pentru injectare a fost folosită o seringă Hamilton montată într-un instrument stereotaxic, în acest mod fiind injectat 1 $\mu$ l de soluție, injectare unică intracorticală. Pentru loturile „1/2xTratament” și „1/3xTratament” s-au folosit diluții 1:1, respectiv 1:2 din concentrația inițială, iar grupul „Control” a primit o soluție de PBS/0,1%DMSO.

După inducerea accidentului vascular cerebral, toate animalele din grupul „1/2xTratament” și „1/3xTratament” au primit trei injecții a câte 1  $\mu$ l din diluțiile corespunzătoare, în timp ce grupul „Control” a primit soluție de PBS/0,1%DMSO.

Tehnica de inducere a accidentului vascular a fost aceeași pentru ambele experimente: ocluzia arterei cerebrale medii. Bifurcația arterei medii cerebrale a fost cauterizată în trei puncte cu un cauter electric, fără a leza țesutul adiacent, pentru inducerea anesteziei s-a folosit un amestec de 3-5% Sevofluran în 75% oxid nitric și 25% oxigen, iar efectul anestezic a fost menținut cu 1–1.5% Sevofluran.

În primul experiment animalele au fost sacrificate la 3, respectiv 14 și 28 după ocluzia arterei cerebrale medii, folosindu-se procedura de anestezie injectabilă prin administrarea intraperitoneală a unui amestec de xylazină și ketamină.

Animalele din al doilea experiment au fost sacrificate la 7 zile după inducerea accidentului vascular cerebral, iar studiul in vivo a avut ca scop sacrificarea animalelor la 3 zile după urmărirea modificărilor induse de leziune.

După anestezierea profundă a animalelor, verificată prin abolirea reflexelor nociceptive (Pinch Reflex), s-a practicat recoltarea țesutului cerebral, apoi au urmat etape specifice de conservare a țesutului cerebral în funcție de tehnicile de prelucrare ce urmau a fi folosite. Astfel, țesutul ce urma să parcurgă etapele de analiză genetică a fost suspus unei proceduri de înghețare prin introducerea acestuia la -70°C, iar țesutul ce urma a fi prelucrat prin secționare fixat în soluție de paraformaldehidă 4% în 5xPB la o temperatură de 4°C pentru 24 de ore.

Omogenizarea țesutului a fost făcută în soluție D (Guanidinium Tiocianat 4M/Citrat de sodiu 1M-Sarcosyl10%/2-mercaptoethanol în apa RNA-se free), iar ARN-ul a fost extras folosind reactivul TRIzol (Invitrogen life technolo, Karlsruhe, Germany). Înlăturarea ADN-ului genomic a fost realizată cu Rneasy



Plus Kit (Qiagen). Reactivul funcționează prin distrugerea celulelor și componentelor celulare, dar cu menținerea integrității ARN-ului, cu producerea unei inhibări eficiente a RNazelor în timpul etapelor de liză și omogenizare.

Pentru PCR cantitativ (qPCR) în timp real s-a sintetizat ADNc din ARN-ul purificat folosind kitul de revers-transcripție High-Capacity cDNA (Applied Biosystems, USA). PCR-ul cantitativ a fost efectuat într-o placă cu pereți subțiri de 96 de godeuri de 0,1 ml (Applied Biosystems), folosind sistemul One Step Plus. În fiecare godeu fost pus un volum de 20 μl obținut din: 10 μl iQ SYBER Green Master Mix (BioRad Laboratories, Hercules, CA), 2 μl primer sens și anti-sens specific genei cuantificate (Qiagen, Alameda, CA) și 8 μl ADNc prediluat. Godeurile de control au conținut apa-NF ca înlocuitor al primer-ului.

Datele au fost analizate folosind metoda  $\Delta\Delta Ct$ .

Volumul infarctului după ocluzia cerebralei medii a fost obținut prin determinarea imunohistochimică a NeuN – marker neuronal nuclear, lipsa acestuia indicând pierderea neuronilor de la acel nivel. Fiecare a zecea secțiune a fost marcată, imaginile obținute la microscopul optic au fost prelucrate folosind software-ul Image J, iar volumul a fost obținut ca suma ariilor parțiale ale zonelor de infarct.

Tehnicile de imunohistochimie și imunofluorescență au fost reprezentate de:

- a. tripla detecție Laminin, SMA, BRDU: SMA 1:1000 (mouse anti-gamma smooth muscle actin, Sigma-Aldrich, Munich, Germany), Laminin 1:2000 (rabbit anti-laminin, Sigma, Munich, Germany), rat anti-BrdU 1:2000 (AbD Serotec, Puchheim, Germany).
- b. tripla detecție Colagen IV, P4Hbeta, BrdU: anti-colagen IV 1:1000 (rabbit polyclonal anti-collagen IV, abcam, UK) și anti-P4Hbeta 1:1000 (mouse anti-P4Hbeta monoclonal antibody, Novus Biological, UK), rat anti-BrdU 1:2000 (AbD Serotec, Puchheim, Germany).
- c. tripla detecție RECA, SMA și BrdU: anti-actin 1:2000 (rabbit polyclonal anti-actin, Sigma, Munich, Germany) și anti-RECA 1:200 (mouse anti-rat endothelial cell antigen, abcam, UK), rat anti-BrdU 1:2000 (AbD Serotec, Puchheim, Germany).

- d. dublă detecție DCX și BrdU: anti-DCX (guinea pig anti-doublecortin – DCX, Millpore) și rat anti-BrdU 1:2000 (AbD Serotec, Puchheim, Germany).
- e. detecție IBA1: Rb anti IBA1 1:1000 (Wako Chemicals USA Inc., Richmond, VA, USA, 019-19741).
- f. detecție ED1: Rb anti ED1 1:1000 (Rb pAb to CD68 - ab 125212).

Cuantificarea celulelor a fost realizată folosind obiectivul de 40x din secțiuni din serii coronale. Rezultatele sunt prezentate ca număr de celule pe  $100\mu\text{m}^2$ , folosind software-ul Fiji (National Institute of Health).

Cuantificarea vaselor de sânge marcate cu BrdU a fost realizată urmărind aproximativ 30% din aria de infarct, cu accentul pe zonele în care densitatea celulelor RECA/BrdU pozitive a fost mai mare. Astfel, celulele au fost identificate cu obiectivul de 40, iar pentru numărare am folosit obiectivul de 20, acoperind un câmp microscopic de  $0.7386\text{ mm}^2$ . Numărătoarea a fost realizată de doi observatori independenți, iar rezultatele sunt exprimate ca procent  $\pm$  DS (deviația standard).

Imaginea în timp real de înaltă rezoluție a fost obținută folosind un microscop Zeiss cu laser cu doi fotoni de 7MP (2P-LSM).

Fluorescența a fost vizualizată folosind un laser cu safir de titan cu impulsuri fs (Chameleon Vision II, Coherent, Glasgow, Marea Britanie) având o putere de vârf mai mare decât 3.5W reglat la 910 nm.

Leziunea a fost realizată cu ajutorul unei seringi Hamilton ce a produs vătămare de  $500\times 500\times 1000\mu\text{m}$  și administrându-se SB 290157 (în dozele descrise anterior: doza întreagă, jumătate și o treime, animalele din grupul control primind doar vehicul). Injectarea a fost realizată lent, pe o perioadă de 60 de secunde. După injurie peste zona de craniotomie s-a fixat o fereastră cu cianoacrilat și ciment dentar, astfel încât imagini repetitive au putut fi obținute. Aceeași zonă a fost scanată pentru o perioadă de douăzeci minute, la fiecare 24 de ore, timp de 3 zile consecutive. Analiza computerizată suplimentară, cum ar fi arborizarea ramurilor microgliale, a fost făcută folosind software-ul Fiji și plugin-urile acestuia, precum și Adobe InDesign (Adobe, SUA).

Microscopia confocală a fost realizată cu un microscop confocal Zeiss LSM710 (Zeiss, Germany, Germany) și software-ul Zen 2010 versiunea software 6.0 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany). Emisia fluorescentă folosită

a fost 500-530 nm pentru FITC (verde), 550-600 nm pentru rhodamină (roșu) și 650-710 nm pentru Cy5 (albastru).

Reconstrucția 3D a fost realizată folosind un software cu algoritmi de proiecție maximală.

Analiza statistică a fost efectuată folosind GraphPad 6 și Microsoft Excel. Rezultatele imunohistochemiei au fost evaluate folosind two-way ANOVA. Pentru toate analizele morfologice a fost utilizat testul Mann-Whitney. Dacă nu se menționează altfel, toate cifrele arată valoarea medie și eroarea standard a mediei (SEM) și semnificația statistică este afișată după cum urmează: \* pentru  $p < 0,05$  și  $p < 0,01$  și \*\*\*  $p < 0,001$ .

## 6. REZULTATE

### Experimentul I

#### **Administrarea BrdU înainte de inducerea accidentului vascular cerebral nu afectează volumul infarctului.**

Volumul infarctului a fost cuantificat prin imunohistochimie folosind NeuN ca marker sensibil pentru neuronii viabili. Volumul infarctului a fost mai mare în lotul de animale perfuzat la 3 zile după inducerea accidentului vascular cerebral, probabil datorită prezentei edemului cerebral ( $129 \pm 39 \text{ mm}^3$ ), stabilizându-se la valori de  $116 \pm 29 \text{ mm}^3$  în ziua 28. Astfel, volumul infarctului între loturi a fost similar și independent de administrarea BrdU.

#### **Vascularizația cerebrală este în continuă remodelare în creierul adult fără injurie.**

Prin injectarea cu BrdU înainte de inducerea accidentului vascular cerebral am putut identifica celulele endoteliale și neuronale în proliferare în creierul adult fără injurie la șobolan.

Astfel, la 3 zile după inducerea accidentului vascular cerebral BrdU a fost încorporat în mod preferențial în nucleii celulelor din proximitatea girusului dințat. Prin dubla marcarea cu BrdU și DCX am identificat celulele neuronale precursorare. Nucleii-BrdU pozitivi și co-localizarea celulelor DCX-pozitive au fost identificate atât în zona subventriculară a ventriculului lateral, cât și în cortexul contra-lateral. Mai mult, nucleii BrdU pozitivi au co-localizat markerul de celulă endoteliale RECA în zone îndepărtate de zona de infarct, descriind astfel lumenul vaselor de sânge. Tripla colorare BrdU/RECA/SMA a identificat celule pozitive pentru endoteliu și actină din țesut muscular neted, cel mai probabil pericite, iar reconstrucția 3D a imaginilor a identificat o distribuție neuniformă a celulelor nou formate, sugestivă pentru un pattern de încorporare a celulelor endoteliale nou formate în vase de sânge pre-existente. O distribuție neuniformă a celulelor BrdU pozitive a fost identificată și la nivelul vaselor de sânge ramificate în zona de infarct. Totuși, celule BrdU pozitive nu au fost identificate în microgliile identificate în zona perilezională. Cu toate acestea, la 28 de zile după infarct am identificat o co-localizare BrdU/RECA și BrdU/NeuN în regiunea din spatele cicatricei gliale, numite insule de regenerare, prin prezența a numeroase vase de sânge și celule endoteliale.

**După accidentul vascular cerebral, nuclei BrdU-pozitivi sunt încorporați în cea mai mare parte la nivelul celulelor endoteliale în proliferare**

Administrarea zilnică a BrdU după ischemia focală a dus la identificarea celulelor endoteliale aliniată vaselor de sânge în zone îndepărtate de leziunea cerebrală la 3 zile după AVC. Concomitent, celule care exprimă markerul endotelial p4Hbeta ce par să traverseze vase mari de sânge marcate cu anticorpi anti-colagen IV au fost identificate. La 14 zile după evenimentul ischemic, celule endoteliale în proliferare erau încă detectate folosind anticorpi anti P4Hbeta și anti-BrdU. Folosind acești markeri am putut vizualiza celulele endoteliale ce se detașează de vasele de sânge în curs de dezintegrare a căror membrană bazală a fost marcată cu anticorpi anti-colagen IV.

Creșterea expresiei P4Hbeta este confirmată prin mRNA în RT-PCR folosind primeri specifici în loturile de animale perfuzate la 3 și la 14 zile, atunci când era de așteptat o creștere ca răspuns la hipoxie.

În ziua 28 după AVC, noi vase de sânge apăreau în zona peri-lezională, majoritatea BrdU<sup>+</sup> și erau, cel mai probabil celule endoteliale încorporate într-o matrice la laminină. Dubla colorare BrdU<sup>+</sup> /RECA<sup>+</sup> identifică vase de sânge în număr mare la nivelul cicatricei gliale. Vase de sânge BrdU<sup>+</sup>/RECA<sup>+</sup> au apărut și în zone de după cicatricea glială, zone numite „insule de regenerare”, IR. Chiar și la 28 de zile după evenimentul ischemic celule BrdU<sup>+</sup> părăseau peretele vascular marcat cu anticorpi anti-laminină în vecinătatea infarctului. Vase de sânge BrdU/RECA<sup>+</sup> sunt încă prezente în zone îndepărtate de infarct și în cortexul contralateral. La 3 zile după injurie, majoritatea celulelor neuroepiteliale de la nivelul cicatricei gliale și regiunii perilezionale prezintă antigen pentru nistatină.

**Experimentul II**

**Antagonistul C3aR are efecte asupra inflamației post-AVC, dar nu și asupra volumului infarctului**

Volumul de infarct la 7 zile după ocluzia arterei cerebrale medii a fost similar între lotul control și la animalele tratate, indiferent de doză. Cu toate acestea, atunci când am analizat răspunsul celular al microgliei, am constatat că animalele tratate cu antagonistul C3Ra, SB290157, au arătat o scădere cu 50% a numărului de celule microgliale fagocitare în lotul de animale ce a primit jumătate

din doza de tratament si o scădere de 75% a numărului de celule microgliale activate in lotul de animale ce a primit o treime din doză.

### **Prevenirea transformării morfologice inflamatorii prin administrarea C3aR**

Administrarea locală a SB290157 a atenuat modificările inflamatorii ale morfologiei microgliei, care erau ușor vizibile în penumbră. Într-adevăr, am găsit o reducere a numărului de celule care exprimă Iba1 cu 40% la o treime doză. Cu toate acestea, efectul dependent de doză nu a fost pronunțat . Prin urmărirea manuală a proceselor microgliale, am fost capabili să identificăm că a existat o scădere a numărului de ramificații de ordin întâi, doi si trei în grupul de control, arătând că microglia la aceste animale își scurtează procesele în pregătirea unei transformări amoeboidale. De asemenea, a existat o creștere clară a numărului de procese terminale la animalele din lotul control în comparație cu animalele tratate, un semn clar al unei scăderi a activării microgliene în grupul tratat în comparație cu martorul.

### **Administrarea intracorticală a SB290157 are impact atât asupra migrației microgliei cât și a fagocitozei**

Microscopia cu scanare laser cu doi fotoni a devenit un standard de aur pentru analiza comportamentului celular in vivo. Injectând local antagonistul C3aR, am indus o mică leziune corticală care a fost direct influențată de difuzarea antagonistului. Deși migrația microglială s-a produs, la toate dozele de SB290157, după 48 de ore, a existat o scădere a numărului de celule microgliale din jurul leziunii. În același timp, am putut observa o scădere dependentă de doză a capacității fagocitice a microgliei, cu mai puține fenotipuri fagocitice observate în grupul cu doze mari în comparație cu cele inferioare sau martorii.

## 7. CONCLUZII

În primul rând, administrarea BrdU animalelor fără accident vascular cerebral a arătat o distribuire neuniformă a celulelor endoteliale recent încorporate în vasele de sânge mature ale creierului de șobolan adult.

În al doilea rând, prin injectarea BrdU înainte de accident vascular cerebral, celule precursore neuronale marcate în mod specific în regiunea de dincolo de cicatricea glială inhibitoare care pare permisivă la evenimentele regenerative.

În al treilea rând, injecția BrdU după accident vascular cerebral a dus la etichetarea celulelor endoteliale care se încrucișează sau se detașează de vasele de sânge dezintegrate și la încorporarea lor în noi vase de sânge în miezul infarctului, țesutul cicatricial și regiunea din spatele cicatricei gliale.

În al patrulea rând, administrarea de BrdU după accident vascular cerebral a dus la încorporarea specifică a nucleelor BrdU + în arhitectura „pinwheel” a epiteliului ventricular.

Prin al doilea experiment, am arătat că antagonistul C3aR, SB290157 administrat intracortical, poate fi folosit în viitor pentru a limita neuroinflamația și, prin urmare, moartea neuronală după o leziune ischemică prin modularea tranziției microgliei la tipul fagocitic și fagocitoza secundară.

## 8. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. K. Aho, P. Harmsen, S. Hatano, J. Marquardsen, V. Smirnov și T. Strasser, „Cerebrovascular disease in the community: results of a WHO collaborative study,” *Bull World Health Organ*, vol. 58, p. 113–130, 1980.
2. R. Sacco, S. Kasner, J. Broderick, e. al., A. H. A. S. Council, C. o. C. S. a. Anesthesia, C. o. C. R. a. Intervention, C. o. C. a. S. Nursing, C. o. E. a. Prevention, C. o. P. V. Disease și P. A. a. M. Council on Nutrition, „An Updated Definition of Stroke for the 21st Century - A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association,” *Stroke*, vol. 44, pp. 2064-2089, 2013.
3. G. Hankey, „Potential new risk factors for ischemic stroke: what is their potential?,” *Stroke*, vol. 37, pp. 2181-2188, 2006.
4. R. Hegele și M. Dichgans, „Advances in stroke 2009: update on the genetics of stroke and cerebrovascular disease 2009,” *Stroke*, vol. 41, pp. 63-66, 2010.
5. C. Allen și U. Bayraktutan, „Risk factors for ischaemic stroke,” *Int. J. Stroke*, vol. 3, pp. 105-116, 2008.
6. C. Iadecola, L. Park și C. Capone, „Threats to the mind: aging, amyloid, and hypertension,” *Stroke*, vol. 40, nr. 3, pp. 40-44, 2009.
7. D. Arrick, G. Sharpe, H. Sun și W. Mayhan, „nNOS-dependent reactivity of cerebral arterioles in type 1 diabetes,” *Brain Res.*, vol. 1184, pp. 365-371, 2007.
8. Y. Kim, R. Immink, W. Stok, J. Karemaker, N. Secher și J. van Lieshout, „Dynamic cerebral autoregulatory capacity is affected early in Type 2 diabetes,” *Clin. Sci. (Lond.)*, vol. 115, pp. 255-262, 2008.
9. G. Biessels, L. van der Heide, A. Kamal, R. Bleyss și W. Gispen, „Ageing and diabetes: implications for brain function,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 441, pp. 1-14, 2002.
10. M. Moskowitz, E. Lo și C. Iadecola, „The Science of Stroke: Mechanisms in Search of Treatments,” *Neuron*, vol. 67, nr. 2, pp. 181-198, 2010.



11. U. Dirnagl, C. Iadecola și M. Moskowitz, „Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view,” *Trends Neurosci*, vol. 22, pp. 391-397, 1999.
12. D. Choi și S. Rothman, „The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death,” *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 13, pp. 171-182, 1990.
13. D. J. Ankarcrona M1, E. Bonfoco, B. Zhivotovsky, S. Orrenius, S. Lipton și P. Nicotera, „Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function,” *Neuron*, vol. 15, pp. 961-973, 1995.
14. E. Lo, T. Dalkara și M. Moskowitz, „Mechanisms, challenges and opportunities in stroke,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 4, pp. 399-415, 2003.
15. D. Bano, E. Munarriz, H. Chen, E. Ziviani, G. Lippi, K. Young și P. Nicotera, „The plasma membrane Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger is cleaved by distinct protease families in neuronal cell death,” *Ann. N Y Acad. Sci.*, vol. 1099, pp. 451-455, 2007.
16. J. Contreras, H. Sánchez, L. Véliz, F. Bukauskas, M. Bennett și J. Sáez, „Role of connexin-based gap junction channels and hemichannels in ischemia-induced cell death in nervous tissue,” *Brain Res. Brain Res. Rev.*, vol. 47, pp. 290-303, 2004.
17. J. Simard, T. Kent, M. Chen, K. Tarasov și V. Gerzanich, „Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications,” *Lancet Neurol.*, vol. 6, pp. 258-268, 2007.
18. M. Aarts și M. Tymianski, „TRPMs and neuronal cell death,” *Pflugers Arch.*, vol. 451, pp. 243-249, 2005.
19. K. Muir, P. Tyrrell, N. Sattar și E. Warburton, „Inflammation and ischaemic stroke,” *Curr Opin Neurol*, vol. 20, pp. 334-342, 2007.
20. S. Lakhan, A. Kirchgessner și M. Hofer, „Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches,” *Journal of Translational Medicine*, vol. 7, p. 97, 2009.
21. F. Faraci, „Reactive oxygen species: influence on cerebral vascular tone,” *J. Appl. Physiol.*, vol. 100, pp. 739-743, 2006.

22. E. Schulz, T. Jansen, P. Wenzel, A. Daiber și T. Münzel, „Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension,” *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 10, pp. 1115-1126, 2008.
23. C. Pepine, „The impact of nitric oxide in cardiovascular medicine: untapped potential utility,” *Am. J. Med.*, vol. 122, nr. 5, pp. S10-S15, 2009.
24. P. Deb, S. Sharma și K. Hassan, „Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis,” *Pathophysiology*, vol. 17, p. 197–218, 2010.
25. M. Moskowitz, E. Lo și C. Iadecola, „The Science of Stroke: Mechanisms in Search of Treatments,” *Neuron.*, vol. 67, nr. 2, p. 181–198, 2010.