

Η Αντίδραση της Μικρογλοίας στη Βλάβη του Νωτιαίου Μυελού

Βασιλική Δ. Ντάφου,¹ Ελευθερία-Μαρία Α. Ευαγγελοπούλου²

Microglia Reaction after Spinal Cord Injury

Abstract at the end of the article

¹Νοσηλεύτρια ΠΕ, Μεταπτυχιακή
Φοιτήτρια - Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ,
Υποσμηναγός Ελληνικής Αεροπορίας,
251 Γενικό Νοσοκομείο Αεροπορίας,
²Επίκουρη Καθηγήτρια Νευρολογίας
ΕΚΠΑ, Α' Πανεπιστημιακή Νευρολογική
Κλινική, Αιγινήτειο Νοσοκομείο, Αθήνα

Υποβλήθηκε: 23/10/2020
Επανυποβλήθηκε: 19/02/2021
Εγκρίθηκε: 06/06/2021

Υπεύθυνος αλληλογραφίας:

Βασιλική Δ. Ντάφου
Λεωφ. Παναγιώτη Κανελλόπουλου 3,
115 25 Αθήνα
Τηλ: (+30) 6982 713 831
e-mail: vasodafou@gmail.com

Εισαγωγή: Τα μικρογλοιακά κύτταρα αποτελούν ενδογενή κύτταρα ανοσίας του κεντρικού νευρικού συστήματος και εμπλέκονται στην ανοσολογική επιτήρηση, την άμυνα και τη διατήρηση της ομοιόστασής του. Σε περίπτωση βλάβης του νωτιαίου μυελού, τα μικρογλοιακά κύτταρα ανταποκρίνονται με διάφορους τρόπους, επηρεάζοντας σε μεγάλο βαθμό την εξέλιξη της και τις τελικές της επιπτώσεις στην κλινική εικόνα του ασθενούς. **Σκοπός:** Σκοπός της παρούσας ανασκόπησης της σύγχρονης βιβλιογραφίας είναι η περιγραφή της αντίδρασης της μικρογλοίας μετά από βλάβη του νωτιαίου μυελού, των ευεργετικών και επιβλαβών λειτουργιών που αυτή επιτελεί καθώς και της αλληλεπίδρασης των μικρογλοιακών κυττάρων με άλλα κύτταρα στην περιοχή της βλάβης. Έτσι θα αναδειχθεί η σημασία των μικρογλοιακών κυττάρων στην εξέλιξη της βλάβης και η ανάγκη για την περαιτέρω μελέτη τους. **Υλικό και Μέθοδος:** Αναζητήθηκαν σύγχρονη αρθρογραφία και μελέτες στην αγγλική γλώσσα στις ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων PUBMED και GOOGLE SCHOLAR. Οι λέξεις κλειδιά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν «μικρογλοιακά κύτταρα», «μικρογλοία», «βλάβη νωτιαίου μυελού». **Αποτελέσματα:** Τα μικρογλοιακά κύτταρα επιτελούν μεγάλης σημασίας λειτουργίες υπό φυσιολογικές συνθήκες αλλά και κατά τη βλάβη του νωτιαίου μυελού. Οι διακριτοί τους ρόλοι έχουν περιγραφεί με μεγαλύτερη ακρίβεια τα τελευταία χρόνια. Τα μικρογλοιακά κύτταρα συμμετέχουν σε μια μη ειδική ανοσοαπόκριση που μπορεί να επιδεινώσει τη βλάβη, αλλά είναι επίσης απαραίτητα για τις διαδικασίες αποκατάστασης και επισκευής του νωτιαίου μυελού. Συμμετέχουν σε καθοριστικό βαθμό στη φλεγμονώδη αντίδραση μετά από βλάβη του νωτιαίου μυελού, έχοντας θετικές και αρνητικές επιδράσεις. Η διενέργεια σύγχρονων πειραματικών μελετών και η ανεύρεση νέων ειδικών δεικτών για τη μικρογλοία, οδήγησαν στη συλλογή νέων γνώσεων, που αναδεικνύουν τη σημασία των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων μικρογλοίας και άλλων κυττάρων μετά τη βλάβη του νωτιαίου μυελού στον έλεγχο της φλεγμονώδους αντίδρασης, στην εξέλιξη της βλάβης και

στο λειτουργικό αποτέλεσμα αυτής. **Συμπεράσματα:** Η καλύτερη κατανόηση του τρόπου με τον οποίο τα μικρογλοιακά κύτταρα συμμετέχουν στην παθοφυσιολογία της βλάβης του νωτιαίου μυελού θα οδηγήσει σε βελτιωμένες στρατηγικές προσπάθειας τροποποίησης των κυτταρικών λειτουργιών, με τρόπο που να διατηρούνται οι ευεργετικές επιδράσεις ενώ παράλληλα να μηδενίζονται οι καταστροφικές. Για τον σκοπό αυτό η ανάγκη περαιτέρω μελετών της αντίδρασης των μικρογλοιακών κυττάρων κατά τη βλάβη του νωτιαίου μυελού καθίσταται αναγκαία, έχοντας πάντα στόχο την επίτευξη της βέλτιστης ανάρρωσης του ασθενούς μετά από μια τέτοια βλάβη.

Λέξεις-ευρητηρίου: Μικρογλοιακά κύτταρα, μικρογλοία, βλάβη νωτιαίου μυελού.

Εισαγωγή

Η βλάβη του νωτιαίου μυελού (Spinal Cord Injury - SCI) αποτελεί μία σοβαρή κατάσταση που οδηγεί σε πλήρη ή μερική απώλεια κινητικών και αισθητικών λειτουργιών κάτω από το επίπεδο της βλάβης, επηρεάζοντας επιπλέον τις λειτουργίες του αυτόνομου νευρικού συστήματος, απαιτεί δε την προσπάθεια ανεύρεσης πιο αποτελεσματικών θεραπειών από τις ήδη υπάρχουσες. Η συχνότητα εμφάνισης SCI ποικίλλει, καθώς είναι μικρότερη στις ανεπτυγμένες χώρες, και το κόστος της αντιμετώπισης των ασθενών αυτών για το σύστημα υγείας είναι εξαιρετικά υψηλό. Για παράδειγμα, στην Ισπανία για το έτος 2007 το ετήσιο κόστος κυμάνθηκε μεταξύ 131 με 302 εκατομμύρια ευρώ, ενώ στις ΗΠΑ ανέρχεται στα 10 δισεκατομμύρια ετησίως.¹

Ασθενείς με βλάβη του νωτιαίου μυελού υφίστανται σοβαρές επιπτώσεις που αφορούν στην κινητικότητα, στην κοινωνική δραστηριότητα αλλά και την ψυχική τους υγεία. Λόγω σχετικά μικρής μέσης ηλικίας εμφάνισης, η SCI πέρα από τον μεγάλο αντίκτυπο στην ποιότητα ζωής των ασθενών, ασκεί επίσης μεγάλη πίεση στο σύστημα υγείας. Η παθοφυσιολογία της βλάβης του νωτιαίου μυελού περιλαμβάνει απώλεια νευραξόνων, αποδόμηση μυελίνης, οξειδωτικό στρες, φλεγμονώδη απόκριση, διάσπαση του φράγματος αίματος-νωτιαίου μυελού με διήθηση της περιοχής από κύτταρα του ανοσοποιητικού και ενεργοποίηση αυτών, παραγωγή διαφόρων κυτοκινών και κυτταρικό θάνατο.¹

Τα κύτταρα της μικρογλοίας, τοποθετημένα διάσπαρτα σε όλο το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στον μηχανισμό

της ανταπόκρισης του οργανισμού στη SCI, ως κύριοι διαμεσολαβητές της έμφυτης ανοσοαπόκρισης του ΚΝΣ. Η πρωτογενής ιστική βλάβη που προκαλείται από τον μηχανικό τραυματισμό επιπλέκεται περαιτέρω και επιδεινώνεται από την επίδραση δευτερευόντων γεγονότων, τα οποία περιλαμβάνουν την αιμορραγία, τη φλεγμονώδη αντίδραση, το οίδημα, την ισχαιμία, την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου και την υπεροξείδωση λιπιδίων. Η απελευθέρωση ελευθέρων ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species - ROS) και φλεγμονωδών παραγόντων προκαλούν την ενεργοποίηση της μικρογλοίας.²

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας ανασκόπησης είναι η περιγραφή της αντίδρασης της μικρογλοίας μετά από βλάβη του νωτιαίου μυελού.

Μέθοδος

Αναζητήθηκε σύγχρονη σχετική με το θέμα βιβλιογραφία στην αγγλική γλώσσα στις ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων PUBMED και GOOGLE SCHOLAR. Οι λέξεις κλειδιά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν «μικρογλοιακά κύτταρα», «μικρογλοία», «βλάβη νωτιαίου μυελού».

Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

Το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ), μέρος του οποίου αποτελεί και ο Νωτιαίος Μυελός, αποτελείται από δύο διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς: τους νευρώνες και τα κύτταρα της γλοίας. Η δεύτερη κατηγορία κυττά-

ρων διακρίνεται περαιτέρω στην μακρογλοία (αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα), και τη μικρογλοία. Τα κύτταρα της μακρογλοίας όπως και οι νευρώνες προέρχονται από το εξώδερμα. Από την άλλη, τα κύτταρα της μικρογλοίας προέρχονται από τη μυελική σειρά, όπως και τα μονοκύτταρα-μακροφάγα, και εγκλωβίζονται μηχανικά στο ΚΝΣ κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη.³ Συνεπώς πρόκειται για έναν ξεχωριστό κυτταρικό πληθυσμό από πλευράς εμβρυϊκής προέλευσης (μεσόδερμα) αλλά και λειτουργίας, αφού είναι υπεύθυνα για μεγάλο μέρος της ανοσολογικής απόκρισης στο ΚΝΣ.³ Η τελευταία διακρίνεται σε δύο είδη: τη μη ειδική-έμφυτη ανοσολογική απόκριση, η οποία επάγεται από τα αστροκύτταρα και τα μικρογλοιακά κύτταρα, και την ειδική-επίκτητη η οποία επάγεται από λεμφοκύτταρα.⁴

Ο όρος Μικρογλοία

Ο όρος “Μικρογλοία” αναφέρεται για πρώτη φορά ως τίτλος κεφαλαίου του βιβλίου “Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System”, που εκδόθηκε από τον Wilder Penfield το 1932. Στο πρωτοπόρο αυτό άρθρο ο Pio del Rio Hortega παρουσίασε τη μικρογλοία ως ένα σαφώς διακριτό κυτταρικό πληθυσμό του κεντρικού νευρικού συστήματος. Συνοπτικά αναφέρει: (α) τα κύτταρα της μικρογλοίας εισέρχονται στο ΚΝΣ πρώιμα κατά την ανάπτυξή του, (β) έχουν αμοιβαδοειδή μορφολογία και προέλευση από το μεσόδερμα, (γ) χρησιμοποιούν τα αγγεία και τις μήνιγγες ως δομές οδηγούς για τη μετανάστευσή τους στις διάφορες περιοχές του εγκεφάλου, (δ) μετατρέπονται σε διακλαδωτά κύτταρα με αποφύσεις στο ώριμο ΚΝΣ, (ε) κάθε διακλαδωτό κύτταρο φαίνεται να καταλαμβάνει και να περιφρουρεί τη δική του περιοχή, (στ) μετά από ένα παθολογικό γεγονός αυτά τα κύτταρα μπορούν να μετασχηματίζονται από διακλαδωτά σε αμοιβαδοειδή, (ζ) τα μετασχηματισμένα αμοιβαδοειδή κύτταρα είναι όμοια με αυτά που απαντώνται κατά την πρώιμη ανάπτυξη του εγκεφάλου, (η) έχουν την ικανότητα να μεταναστεύουν, να πολλαπλασιάζονται και να φαγοκυτταρώνουν.⁵

Για δεκαετίες, η μικρογλοία δεν βρισκόταν στο επίκεντρο της έρευνας των νευροεπιστημών, μέχρι την πρωτοποριακή δουλειά των Georg Kreutzberg et al, οι οποίοι κατάφεραν να μελετήσουν τη διαδικασία ενεργοποίησης της μικρογλοίας, γεγονός που αναπυροδότησε την έρευνα στο πεδίο αυτό.⁶ Παρά το γεγονός πως οι παραδοχές του Pio del Rio Hortega έγιναν τον

20ό αιώνα, οι περισσότερες παρατηρήσεις του ισχύουν μέχρι σήμερα.

Τα μικρογλοιακά κύτταρα αντιπροσωπεύουν περίπου το 10% του συνόλου των κυττάρων του ΚΝΣ, και είναι ο πολυπληθέστερος πληθυσμός μονοκύτταρων φαγοκυττάρων σε αυτό.³ Σήμερα, τα κύτταρα της μικρογλοίας θεωρούνται ως τα μονοπύρηνια φαγοκύτταρα του νευρικού ιστού, ενώ εμπλέκονται στην παθογένεση πολλών νευροεκφυλιστικών, και φλεγμονωδών νόσων του ΚΝΣ.⁷ Η μελέτη των μικρογλοιακών κυττάρων αποτελεί κεντρικό αντικείμενο των νευροεπιστημών τις τελευταίες δεκαετίες. Οι λόγοι αφορούν στη μορφολογική πλαστικότητα τους, την ικανότητα να ενεργοποιούνται από ποικίλα ερεθίσματα (σηπτικά ή άσηπτα) και της μεγάλης σημασίας των διαφόρων λειτουργιών που επιτελούν τόσο στον υγίη όσο και στον παθολογικό νευρικό ιστό.³

Η προέλευση της μικρογλοίας από τη μυελική σειρά

Η προέλευση των κυττάρων της μικρογλοίας έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας. Ο Pio del Rio Hortega περιέγραψε πως τα κύτταρα της μικρογλοίας δεν είναι ούτε νευρικά ούτε αστρογλοιακά. Υποστήριξε μάλιστα την προέλευσή τους από το μεσόδερμα.⁶ Για αρκετά χρόνια υπήρχε η παραδοχή πως τα κύτταρα της μικρογλοίας, τα αστροκύτταρα και τα ολιγοδενδροκύτταρα προέρχονται από κάποιον κοινό κυτταρικό πρόγονο. Όμως οι υποστηρικτές της προέλευσης των μικρογλοιακών κυττάρων από το μεσόδερμα, βασιζόμενοι στις παρατηρήσεις και την υπόθεση του Hortega, απέδειξαν, με τη χρήση συνδυασμού φωτονικής-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και ανοσοϊστοχημείας, ότι η μικρογλοία, σε διάφορα στάδια ανάπτυξης, φέρει μορφολογικά και ανοσοϊστοχημικά χαρακτηριστικά των μονοκύτταρων μακροφάγων. Παράδειγμα αποτελεί η ανεύρεση στη μικρογλοία ανοσοϊστοχημικών δεικτών των μονοκύτταρων μακροφάγων, όπως F4/80, CD11b και του Fc υποδοχέα.⁷

Οι φαινοτυπικές ομοιότητες μεταξύ των μικρογλοιακών κυττάρων και των μονοκύτταρων μακροφάγων της κυκλοφορίας οδήγησαν στην ευρύτερη αποδοχή της μυελογενούς προέλευσής τους. Η πραγματική όμως ταυτότητα των προγονικών κυττάρων της μικρογλοίας παρέμενε αμφιλεγόμενη μέχρι πρόσφατα. Μελέτες σε πειραματικές σειρές ποντικών ανέδειξαν πως τα προγονικά κύτταρα των μικρογλοιακών κυττάρων προέρχονται από τον λεκιθικό ασκό. Ο εποικισμός του μυελού ξεκινά από την ένατη εβδομάδα της κύησης. Όμως, πληθυσμοί

καλά διαφοροποιημένων μικρογλοιακών κυττάρων μπορούν να ανιχνευθούν στο κεντρικό νευρικό σύστημα από τουλάχιστον την τριακοστή πέμπτη εβδομάδα.⁷

Η προέλευση των μικρογλοιακών κυττάρων πιστοποιήθηκε με τη μελέτη της έκφρασης του CSF-1R, υποδοχέα, υπεύθυνου για την ανάπτυξη των μυελοκυττάρων/μακροφάγων, του οποίου η γενετική εξάλειψη σε ποντίκια είχε ως αποτέλεσμα την απουσία αμφότερων των μυελοκυττάρων και των μικρογλοιακών κυττάρων.⁸ Στη μελέτη αυτή υπογραμμίστηκε και το γεγονός ότι τα προγονικά κύτταρα της μικρογλοίας που προέρχονται από τον λεκιθικό ασκό, αποτελούν διακριτό πληθυσμό από τα υπόλοιπα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα.

Οι ανωτέρω μελέτες παρέχουν αδιαμφισβήτητα στοιχεία περί της μυελικής προέλευσης της μικρογλοίας και διακρίνουν τα μικρογλοιακά κύτταρα ως ξεχωριστό κυτταρικό πληθυσμό.

Οι φαινότυποι της μικρογλοίας

Τα μικρογλοιακά κύτταρα αποτελούν ένα σύστημα υπεύθυνο για τη διατήρηση της ομοιόστασης και της ανοσολογικής επιτήρησης του ΚΝΣ. Σχηματίζουν ένα δίκτυο σύνθετων αλληλεπιδράσεων με τα υπόλοιπα κύτταρα του ΚΝΣ. Στο φυσιολογικό ΚΝΣ, τα μικρογλοιακά κύτταρα προσλαμβάνουν μια διακλαδωμένη μορφολογία, με μικρό μέγεθος σώματος και λεπτές κυτταροπλασματικές απολήξεις. Η μορφολογία αυτή είναι αρκετά διαφορετική από αυτή ενός μονοκύτταρου μακροφάγου. Σε περιστάσεις λοίμωξης του ΚΝΣ, νευροεκφυλιστικών παθήσεων, ισχαιμίας ή τραυματισμού του ΚΝΣ, ή άλλης κατάστασης που επηρεάζει την ομοιόστασή του, προκαλείται η «ενεργοποίηση» των μικρογλοιακών κυττάρων με αποτέλεσμα την αλλαγή της μορφολογίας τους σε αμοιβαδοειδή. Είναι σημαντικό να σημειώσουμε πως κάθε στιγμή, το κάθε μικρογλοιακό κύτταρο μπορεί να βρίσκεται σε τελείως διαφορετική κατάσταση σε σχέση με τα υπόλοιπα και να επιτελεί διαφορετική λειτουργία.⁵

Η μικρογλοία λοιπόν, στα πλαίσια του ανοσολογικού της ρόλου, ανάλογα με τα ερεθίσματα που δέχεται εμφανίζει διαφορετικούς φαινοτύπους. Μέχρι πρόσφατα θεωρείτο πως οι φαινότυποι αυτοί είναι δύο, κατά αντιστοιχία με τους M1/M2 φαινοτύπους των μονοκυττάρων-μακροφάγων: (α) η «αδρανής» ή «λανθάνουσα» κατάσταση ("quiescent" or "resting" state) με διακλαδωμένη μορφή (ramified) και (β) η «ενεργοποιημένη» κατάσταση ("activated" state) με αμοιβαδοειδή μορφή.⁹

Η παραπάνω διάκριση θεωρείται πλέον υπεραπλουστευμένη, αν και χρησιμοποιείται ευρέως στη βιβλιογραφία. Μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί 6 διαφορετικοί φαινότυποι σε επίπεδο μορφολογίας και δραστηριότητας (M0, M1, M2a, M2b, M2c, M2d). Επιπλέον οι όροι «λανθάνουσα» και «ενεργοποιημένη» δεν αντικατοπτρίζουν απόλυτα την πραγματικότητα, καθώς η μικρογλοία δεν παύει ποτέ να έχει ενεργό ρόλο, αφού ακόμη και στη «λανθάνουσα» κατάσταση επιτελεί την επιτήρηση του ΚΝΣ. Ίσως είναι πιο σωστή η διάκριση σε προφλεγμονώδη και αντιφλεγμονώδη φαινότυπο.⁵ Παρά τη διάκριση μεταξύ των φαινοτύπων των μικρογλοιακών κυττάρων, θα πρέπει να γνωρίζουμε ότι τα κύτταρα αυτά κινούνται μέσα σε ένα φαινοτυπικό φάσμα και δεν έχουμε να κάνουμε με αυστηρή μετάπτωση μεταξύ του ενός ή του άλλου φαινοτύπου.^{5,9}

«Λανθάνουσα» κατάσταση

Τα μικρογλοιακά κύτταρα που βρίσκονται σε «λανθάνουσα» ή «διακλαδωμένη» κατάσταση, δεν είναι αδρανή. Έχουν ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του ΚΝΣ. Οι απολήξεις των μικρογλοιακών κυττάρων, με μήκος τουλάχιστον δύο φορές τη διάμετρο του σώματος, εμφανίζουν έντονη κινητικότητα και επιτηρούν ενεργά το μικροπεριβάλλον τους. Επιμηκύνονται, βραχύνουν ή δημιουργούνται νέες από το σώμα του κυττάρου διαρκώς και ανιχνεύουν οποιαδήποτε διαταραχή της ομοιόστασης εντός του ΚΝΣ. Είναι, σε εγρήγορση, έτοιμα να μεταπέσουν στην «ενεργοποιημένη» κατάσταση όταν ανιχνεύσουν οποιαδήποτε απειλή για το ΚΝΣ. Πέρα από τη λειτουργία της επιτήρησης της ομοιόστασης, τα μικρογλοιακά κύτταρα στη «λανθάνουσα» κατάσταση παρέχουν προστασία και τροφική υποστήριξη στα νευρικά κύτταρα και μειώνουν την ενεργοποίηση των συνάψεων, όταν είναι απαραίτητο.⁵ Η έκκριση παραγόντων από τη μικρογλοία που βρίσκεται στην «αδρανή» κατάσταση είναι σχετικά περιορισμένη σε σχέση με την «ενεργοποιημένη». Παρά ταύτα, τα μικρογλοιακά κύτταρα εκκρίνουν ορισμένους νευροτροφικούς παράγοντες, όπως οι IGF-1 (insulin-like growth factor 1), TGFβ (transforming growth factor beta), BDNF (brain-derived neurotrophic factor), NGF (nerve growth factor). Επιπλέον εκφράζονται υψηλά επίπεδα microRNA-124, αλλά και χαμηλά επίπεδα CD46, MHC-II (major histocompatibility complex II) και CD11b.¹⁰

Σε ένα υγιές ΚΝΣ, τα μικρογλοιακά κύτταρα παραμένουν στη «λανθάνουσα» κατάσταση μέσω παραγόντων που εκκρίνονται από νευρώνες και άλλα κύτταρα. Τέ-

τοιοι παράγοντες είναι ο CX3CL1 (neuron-derived fractal kine) που εκκρίνεται από τους νευρώνες και προσδένεται στους υποδοχείς CX3CR1 της μικρογλοίας, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες επιφανείας των νευρώνων CD47, CD200, CD22 που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς CD172, CD200R, CD45 στην επιφάνεια των μικρογλοιακών κυττάρων και μόρια που αναστέλλουν την ανοσολογική απόκριση τα οποία εκκρίνονται από νευρώνες, αστροκύτταρα ή άλλα μικρογλοιακά κύτταρα (π.χ. νευροτροφίνες και προσταγλανδίνες).¹⁰

«Ενεργοποιημένη» κατάσταση

Η «ενεργοποιημένη» μικρογλοία μπορεί να έχει ευεργετική ή καταστροφική επίδραση στο ΚΝΣ και διακρίνεται σε δύο υποκατηγορίες. Η πρώτη είναι η M1 ή «κλασικά ενεργοποιημένη» και η δεύτερη η M2 ή «εναλλακτικά ενεργοποιημένη» μικρογλοία. Ο τρόπος της ενεργοποίησης εξαρτάται από το είδος, την ένταση και τη διάρκεια του ερεθίσματος που την εκκινεί, αλλά και από παράγοντες στο μικροπεριβάλλον του μικρογλοιακού κυττάρου.¹⁰ Η ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων αφορά ουσιαστικά στην υιοθέτηση ενός προφλεγμονώδους ή αντιφλεγμονώδους φαινοτύπου με έκκριση αντίστοιχων κυτταροκινών, κινητοποίηση και συγκέντρωση σε συγκεκριμένες περιοχές εντός του ΚΝΣ, πολλαπλασιασμό και μετασχηματισμό από μία διακλαδωμένη σε μία πιο αμοιβαδοειδή μορφή, μέσω αλλαγών στο σχήμα του σώματος και των απολήξεων.¹¹

«Κλασικά ενεργοποιημένη» μικρογλοία: M1

Η «κλασικά ενεργοποιημένη» M1 μικρογλοία είναι προφλεγμονώδης. Εκκρίνει προφλεγμονώδη μόρια, όπως IL-1β, IL-2, INFγ, CXCL9, CXCL10, iNOS και κυκλοοξυγενάση 2 (COX2). Η M1 κατάσταση επάγεται *in vivo* από παράγοντες όπως λιποπολυσακχαρίτες (LPS), ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) και βακτηριακά ή κυτταρικά αντιγόνα με συγκεκριμένα μοριακά πρότυπα που συνδέονται με παθογόνα (PAMPs: pathogen associated molecular patterns) ή ιστική βλάβη (DAMPs: damage associated molecular patterns). Μορφολογικά χαρακτηρίζεται από σχετικά ισομετρικό αμοιβαδοειδές σχήμα που διευκολύνει τον σχηματισμό φαγοσωμάτων από τα μικρογλοιακά κύτταρα.¹¹

«Εναλλακτικά ενεργοποιημένη» μικρογλοία: M2

Η «εναλλακτικά ενεργοποιημένη» M2 μικρογλοία έχει αντιφλεγμονώδη επίδραση. Αυτή οφείλεται στην αυξημένη έκφραση αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών,

όπως IL-4, IL-10, IL-13 και TGF-β, και αργινάση-1 (Arg1). Η «εναλλακτική» ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων είναι περίπλοκη διαδικασία και διακρίνεται περαιτέρω σε τρεις υποκατηγορίες: τη M2a, τη M2β και τη M2γ. Μορφολογικά τα M2 μικρογλοιακά κύτταρα έχουν πιο μακρόστενο σχήμα σε σχέση με τα M1, και υψηλότερα επίπεδα F-ακτίνης, τα οποία ενισχύουν τη δημιουργία φαγοσωμάτων δίνοντας στα κύτταρα τη δυνατότητα φαγοκυττάρωσης. Ο φαινότυπος M2a συμμετέχει στην επιδιόρθωση και την αναγέννηση του νευρικού ιστού, δρα μακροπρόθεσμα και επάγεται από παρασιτικά παραπροϊόντα ή σχετιζόμενα σηματοδοτικά μόρια όπως οι IL-3 και IL-4. Ο M2β συμμετέχει στην ανοσολογική ρύθμιση, επάγεται δε από την ενεργοποίηση των FCγ (Fragment crystallisable γ) υποδοχέων, των TLR (toll-like receptors) υποδοχέων και από ανοσοσυμπλέγματα. Ο M2c είναι φαινότυπος απενεργοποίησης, συμμετέχει δηλαδή στην καταστολή της φλεγμονής και επάγεται σε απάντηση σε συγκεκριμένους αντιφλεγμονώδεις παράγοντες όπως η IL-10, ο TGF-β και τα γλυκοκορτικοειδή.^{10,11}

Η Αντίδραση της Μικρογλοίας στη Βλάβη του Νωτιαίου Μυελού

Κακώσεις νωτιαίου μυελού

Η κάκωση του νωτιαίου μυελού (Spinal Cord Injury – SCI) ορίζεται ως η βλάβη στον νωτιαίο μυελό, η οποία, είτε παροδικά είτε μόνιμα, προκαλεί αλλαγές στη φυσιολογική λειτουργία του. Οι κακώσεις του νωτιαίου μυελού έχουν καταστροφικές επιπτώσεις για τους ασθενείς, σε σωματικό, ψυχολογικό, επαγγελματικό και οικογενειακό επίπεδο. Η απώλεια της ατομικής ανεξαρτησίας και τα αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας των ασθενών αυτών επίσης χαρακτηρίζουν τις βλάβες του νωτιαίου μυελού.¹²

Συνοπτικά, σε παθοφυσιολογικό επίπεδο, η βλάβη του νωτιαίου μυελού μπορεί να διακριθεί σε δύο φάσεις, την πρωτογενή και τη δευτερογενή βλάβη. Η πρωτογενής βλάβη είναι το αποτέλεσμα των φυσικών δυνάμεων που ασκήθηκαν κατά την κάκωση του ΝΜ και η έκτασή της είναι καθοριστική για τη σοβαρότητα της κάκωσης. Αφού συμβεί η πρωτογενής βλάβη, ακολουθεί μια αλληλουχία γεγονότων, τα οποία συμβάλλουν στην επέκταση της περιοχής της βλάβης στον νευρικό ιστό και τη μεγέθυνση των νευρολογικών επιπτώσεων της κάκωσης. Η δευτερογενής λοιπόν βλάβη αφορά στην καθυστερημένη και προσοδευτική βλάβη νευρικού ιστού, η οποία ακολουθεί την πρωτογενή βλάβη.¹²

Η φλεγμονώδης αντίδραση μετά τη βλάβη του νωτιαίου μυελού

Τα μικρογλοιακά κύτταρα, όπως προαναφέρθηκε, αποτελούν ενδογενή κύτταρα ανοσίας του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ). Προέρχονται από κύτταρα του λεκιθικού ασκού που εγκαθίστανται στο ΚΝΣ κατά την εμβρυονική φάση.^{7,8} Θα πρέπει να διακρίνονται από τα μακροφάγα που προέρχονται από τα μονοκύτταρα-μακροφάγα της κυκλοφορίας, τα οποία εισέρχονται στο ΚΝΣ από το περιφερικό αίμα μετά από βλάβη, και από τα μακροφάγα που είναι εγκατεστημένα στις μήνιγγες ή τον περιαγγειακό χώρο σε φυσιολογικές ή παθολογικές συνθήκες. Αυτά τα μυελοειδή κύτταρα αποτελούν σημαντικούς ανταποκριτές στην πρώιμη βλάβη του ΚΝΣ, έχοντας ωφέλιμες αλλά και καταστροφικές λειτουργίες.¹³ Η ενεργοποιημένη μικρογλοία και τα μονοκύτταρα-μακροφάγα συνεισφέρουν στη δευτερογενή βλάβη μέσω της απελευθέρωσης προφλεγμονωδών παραγόντων όπως οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Παρόλα αυτά εμφανίζουν επίσης ευεργετικές και προστατευτικές για τον ιστό επιδράσεις, όπως ο περιορισμός της επέκτασης της βλάβης, η απομάκρυνση των υπολειμμάτων των κατεστραμμένων κυττάρων και η παραγωγή αντιφλεγμονωδών παραγόντων όπως η IL-10.¹³

Στον φυσιολογικό νωτιαίο μυελό, τα μικρογλοιακά κύτταρα προσλαμβάνουν μια διακλαδωτή μορφολογία, όντας σε «λανθάνουσα» κατάσταση. Αυτός ο φαινότυπος δεν εμποδίζει την επιτέλεση συνεχούς ανοσολογικής επιτήρησης του μικροπεριβάλλοντος μέσω της ενεργότητας των κυτταροπλασματικών τους διεργασιών,^{5,10} γεγονός που επιτρέπει στη μικρογλοία να αντιδρά άμεσα σε διαταραχές του μικροπεριβάλλοντος. Στην περίπτωση ενός τραυματισμού, τα κύτταρα της μικρογλοίας είναι τα πρώτα που ανταποκρίνονται. Ενεργοποιούνται εκκινώντας κυτταροπλασματικές διαδικασίες στο εσωτερικό τους. Κατά την ενεργοποίησή τους υφίστανται μεταβολές στη μορφολογία τους και μετασχηματίζονται σε σφαιροειδή, «αμοιβαδοειδή» κύτταρα με κοντές, παχιές προσεκβολές, μοιάζοντας έτσι μορφολογικά στα μονοκύτταρα-μακροφάγα.²

Προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και χημειοκίνες όπως IL-1β, TNF, IL-6, CCL2 και CCL3 παράγονται μέσα σε λίγα λεπτά μετά τη βλάβη από τους νευρώνες, τα αστροκύτταρα και τη μικρογλοία. Παράλληλα, μοριακά μοτίβα σχετιζόμενα με βλάβη (damage-associated molecular patterns - DAMPs) αναγνωρίζονται από υποδοχείς ανα-

γνώρισης προτύπων (pattern recognition receptors – PRRs). Οι υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (PRRs) αποτελούν μέρος της έμφυτης ανοσοαπόκρισης και αρχικά ανακαλύφθηκαν για τον ρόλο τους στην αναγνώριση παθογόνων συνδέοντας συγκεκριμένα μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με παθογόνα (pathogen associated molecular patterns - PAMP) που εκφράζονται από μικρόβια. Οι κύριες οικογένειες PRR περιλαμβάνουν υποδοχείς τύπου Toll (TLRs), υποδοχείς τύπου Nod (NLR), υποδοχείς τύπου RIG (RLR), υποδοχείς τύπου AIM2 (ALRs) και υποδοχείς λεκτίνης τύπου C. Η ευρεία έκφραση αυτών των PRR στο ΚΝΣ και η απελευθέρωση DAMPs εντός και γύρω από θέσεις τραυματισμού υποδηλώνουν σημαντικό ρόλο για αυτές τις οικογένειες υποδοχέων στη διαμεσολάβηση φλεγμονής μετά τον τραυματισμό. Σημαντικά δεδομένα δείχνουν τώρα ότι οι PRRs συγκαταλέγονται μεταξύ των πρώτων ανταποκριτών στον τραυματισμό του ΚΝΣ και η ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων σε μικρογλοία, νευρώνες και αστροκύτταρα προκαλεί έμφυτη ανοσοαπόκριση στον εγκέφαλο και στον νωτιαίο μυελό.¹⁴

Διαφορετικές τάξεις PRRs έχουν περιγραφεί να έχουν σημαντικούς και διακριτούς ρόλους στη βλάβη του νωτιαίου μυελού. Παράδειγμα, η ενεργοποίηση των Toll-like υποδοχέων (TLRs), ιδιαίτερα του TLR2, μπορεί να προκαλέσει την ενεργοποίηση του NF-κΒ, κάτι που πιθανόν να έχει νευροτοξικές επιπτώσεις. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων λεκτίνης C-τύπου (CLRs) προάγει την ενεργοποίηση των μακροφάγων και τη βλάβη των νευραξόνων. Η πρωτεΐνη HMGB1 (high mobility group box 1) είναι άλλο ένα πιθανό μοτίβο DAMP, η παρουσία του οποίου αυξάνεται στη βλάβη του νωτιαίου μυελού, και σχετίζεται με ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων και νευροτοξική δράση των μακροφάγων. Μπορεί να συνδεθεί με έναν συγκεκριμένο υποδοχέα PRR (RAGE) και να οδηγήσει έτσι σε έκφραση των IL-1β και TNF μετά τη βλάβη του νωτιαίου μυελού.¹⁵

Η έκφραση προφλεγμονωδών μορίων, όπως οι κυτταροκίνες, η κυκλοοξυγενάση-2, η συνθετάση του νιτρικού οξέος (iNOS) και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες, σε συνδυασμό με τον σχηματισμό και ενεργοποίηση φλεγμονοσωμάτων (πολυμοριακά κυτταροπλασματικά συμπλέγματα), συμβάλλουν στην προσέλκυση κυττάρων του ανοσοποιητικού από την περιφέρεια στο σημείο της βλάβης του νωτιαίου μυελού. Παρόμοια με άλλους τραυματισμένους ιστούς, τα ουδετερόφιλα είναι τα πρώτα κύτταρα που διηθούν το σημείο της βλάβης. Συνήθως ο αριθμός

τους στην περιοχή της βλάβης φτάνει στο ζενίθ μία μέρα μετά τη βλάβη, και ακολουθεί η γρήγορη μείωσή τους.¹⁶

Πολλές μελέτες έχουν αναγνωρίσει μηχανισμούς για τη στόχευση των ουδετεροφίλων ή των πρώιμα εισερχόμενων μονοκυττάρων, θεωρώντας την παρεμπόδιση τους υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση της βλάβης του νωτιαίου μυελού.¹⁷ Από την άλλη μεριά, άλλες μελέτες κατέγραψαν προβληματική ανάρρωση και αυξημένη καταστροφή ιστού στις περιπτώσεις που έλειπαν τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα από το σημείο της βλάβης.¹⁸ Τα μονοκύτταρα-μακροφάγα εισέρχονται στην περιοχή της βλάβης του νωτιαίου μυελού περίπου 2 με 3 ημέρες μετά τον τραυματισμό και ο αριθμός τους φτάνει στο ζενίθ 7 με 10 ημέρες μετά. Στη συνέχεια, αν και ο αριθμός τους στην περιοχή μειώνεται σταδιακά, δεν μηδενίζεται και παραμένουν στον ιστό για παρατεταμένες χρονικές περιόδους. Έχουν βρεθεί μονοκύτταρα-μακροφάγα στην περιοχή έως και ένα έτος μετά τη βλάβη. Αυτή η παρατεταμένη παρουσία των ενεργοποιημένων μακροκυττάρων-μακροφάγων και της μικρογλοίας στον τραυματισμένο νωτιαίο μυελό αποτελεί παράγοντα κινδύνου για συνεχιζόμενη τοπική ιστική βλάβη.^{17,19}

Η διήθηση μυελοειδών κυττάρων από την περιφέρεια στο σημείο βλάβης του νωτιαίου μυελού έχει κάνει δύσκολο τον διαχωρισμό των μονοκυττάρων-μακροφάγων από τα μικρογλοιακά κύτταρα. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η «αμοιβαδοειδής» εμφάνιση της μικρογλοίας όταν ενεργοποιείται, κάνει τη διάκρισή της με μορφολογικά κριτήρια από τα μονοκύτταρα-μακροφάγα εξαιρετικά δύσκολη.

Διάκριση μεταξύ μονοκυττάρων-μακροφάγων και μικρογλοιακών κυττάρων

Προηγούμενες προσεγγίσεις στο πρόβλημα της διάκρισης των μικρογλοιακών κυττάρων από τα μονοκύτταρα-μακροφάγα περιελάμβαναν τον καθορισμό του επιπέδου έκφρασης του CD45 (δείκτης λευκοκυττάρων) με κυτταρομετρία ροής. Η μικρογλοία και τα μονοκύτταρα-μακροφάγα εκφράζουν CD11b+ στα ίδια επίπεδα, αλλά διαφορετικά επίπεδα CD45 (μονοκύτταρα-μακροφάγα: CD11b+ CD45 υψηλή έκφραση, μικρογλοία: CD11b+ CD45 χαμηλή έκφραση). Παρόλ' αυτά, η ενεργοποιημένη μικρογλοία είναι δυνατόν να έχει υψηλή έκφραση του CD45.²⁰

Πρόσφατα, ένας αριθμός ειδικών για τα μικρογλοιακά κύτταρα δεικτών έχει περιγραφεί, επιτρέποντας την καλύτερη μελέτη των μικρογλοιακών κυττάρων και της αντίδρασής τους στη βλάβη του νωτιαίου μυελού. Δείκτες

που χαρακτηρίζονται ως ειδικοί για τη μικρογλοία στο ΚΝΣ περιλαμβάνουν τους P2RY12, Tmem119, FCRLS και Sall1. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε πως δεν εκφράζονται όλοι οι παραπάνω δείκτες με τρόπο σταθερό στα πλαίσια της βλάβης του νωτιαίου μυελού. Η έκφραση του P2RY12 για παράδειγμα χάνεται πρώιμα μετά τη βλάβη στον νωτιαίο μυελό.²¹

Πολλά πειραματικά μοντέλα ποντικών έχουν χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση μικρογλοίας και μονοκυττάρων-μακροφάγων στα πλαίσια της βλάβης του νωτιαίου μυελού. Παράδειγμα είναι το μοντέλο ποντικών που έχουν σεσημασμένη λυσοζύμη Μ, με πράσινη φθορίζουσα χρωστική (lysozyme-M enhanced green fluorescent protein, eGFP). Η eGFP εκφράζεται στα μονοκύτταρα-μακροφάγα και στα ουδετερόφιλα, αλλά όχι στα μικρογλοιακά κύτταρα, καθιστώντας το πειραματικό μοντέλο χρήσιμο για τη διάκριση μεταξύ των κυττάρων αυτών στην περίπτωση βλάβης του νωτιαίου μυελού.²² Σε συνδυασμό με την ανίχνευση της έκφρασης κι άλλων δεικτών όπως FCRLS και CD11b/CD45, η διάκριση της μικρογλοίας από τα μονοκύτταρα-μακροφάγα γίνεται πιο ξεκάθαρη.^{20,23}

Οι αλληλεπιδράσεις της μικρογλοίας μετά από βλάβη του νωτιαίου μυελού

Αλληλεπίδραση με νευράξονες

Η διερεύνηση των πολλών και διακριτών δράσεων των μικρογλοιακών κυττάρων περιλαμβάνει και την προσπάθεια ανάδειξης του ρόλου τους στη βλάβη των νευραξόνων μετά από βλάβη στον νωτιαίο μυελό. Μια μελέτη προσπάθησε με χρήση μικροσκοπικής δύο φωτονίων σε μοντέλο ποντικών με σεσημασμένους με φθορίζουσα χρωστική νευράξονες, μικρογλοιακά κύτταρα και μονοκύτταρα-μακροφάγα, να διερευνήσει τον ρόλο των μυελοειδών κυττάρων στην καταστροφή των νευραξόνων μετά από τραυματισμό του νωτιαίου μυελού.²⁴ Η επαφή μεταξύ CX3CR1+ μυελοειδών κυττάρων (μικρογλοία και μονοκύτταρα-μακροφάγα) και νευραξόνων ήταν απαραίτητη για να επέλθει η βλάβη στον νευράξονα, είτε αυτή αφορά σε λέπτυνση είτε σε πλήρη διατομή αυτού, και παρατηρήθηκε στο 10% των επαφών. Το εύρημα αυτό ενισχύεται και από το γεγονός ότι σε συνθήκη έλλειψης CX3CR1 σηματοδότησης, προάγεται η επούλωση, μετά από βλάβη του νωτιαίου μυελού. Μοντέλα χιμαιρικών ποντικών χρησιμοποιήθηκαν για τη διάκριση μεταξύ μονοκυττάρων-μακροφάγων και μικρογλοιακών κυττάρων, αποκαλύπτοντας μεγάλες

διαφορές στη συμπεριφορά των δύο κυτταρικών τύπων: τα μακροφάγα κινούνταν δύο φορές ταχύτερα από τη μικρογλοία και ήταν υπεύθυνα για το σύνολο των καταστροφικών επαφών για το νευράξονα. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι ο συνολικός αριθμός των επαφών μακροφάγου-νευράξονα ήταν σταθερός δύο με οκτώ ημέρες μετά τη βλάβη του νωτιαίου μυελού, παρά τη μεγάλη αύξηση του αριθμού των μονοκύτταρων-μακροφάγων στο ίδιο διάστημα.²⁴

Φαγοκυττάρωση

Με τη χρήση του πειραματικού μοντέλου ποντικών LysM-eGFP, εκτιμήθηκε επίσης η φαγοκυτταρική δραστηριότητα της μικρογλοίας και των μονοκύτταρων-μακροφάγων μετά από βλάβη του νωτιαίου μυελού. Η φαγοκυττάρωση των κυτταρικών θραυσμάτων αποτελεί προαπαιτούμενη διαδικασία για την ανάρρωση μετά από βλάβη στον νωτιαίο μυελό. Τις πρώτες ημέρες μετά τη βλάβη, τα μικρογλοιακά κύτταρα είναι ο κύριος φαγοκυτταρικός τύπος κυττάρου που έρχεται σε στενή επαφή με τους κατεστραμμένους νευράξονες. Όταν τα μονοκύτταρα-μακροφάγα καταφθάνουν στην περιοχή της βλάβης, έρχονται σε επαφή με τους κατεστραμμένους νευράξονες και αναλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος της φαγοκυτταρικής δραστηριότητας μέχρι τη 14η ημέρα. Το φαγοκυτταρωμένο υλικό παραμένει εντός των μακροφάγων καθόλη τη διάρκεια παρακολούθησης του πειραματικού μοντέλου (42 ημέρες) σε αντίθεση με την παροδική μόνο ανίχνευσή του εντός των μικρογλοιακών κυττάρων. Οι λόγοι πίσω από αυτό θα μπορούσαν να είναι ο δυσανάλογος αριθμός κυτταρικών θανάτων των μικρογλοιακών κυττάρων ή η καλύτερη επεξεργασία του φαγοκυτταρωμένου υλικού από τα μικρογλοιακά κύτταρα.²⁵ Ο κυτταρικός θάνατος μετά από τη φαγοκυττάρωση της μυελίνης και των κυτταρικών θραυσμάτων ήταν πολύ συχνότερος για τα μονοκύτταρα-μακροφάγα συγκριτικά με τα μικρογλοιακά κύτταρα, κάτι που υποδεικνύει την καλύτερη επεξεργασία των φαγοκυτταρωμένων υλικών ως την πιο αποδεκτή εξήγηση. Μια εναλλακτική εξήγηση είναι η μεταστροφή των μικρογλοιακών κυττάρων σε έναν περισσότερο αντιφλεγμονώδη φαινότυπο σε μετέπειτα χρονικά σημεία από τη βλάβη.²⁶

Αλληλεπίδραση με τα μονοκύτταρα-μακροφάγα

Στην προσπάθεια να καθορίσουμε τον τρόπο αντίδρασης της μικρογλοίας μετά από βλάβη του νωτιαίου μυελού, είναι σημαντικό να αντιμετωπίζουμε τις κυτταρικές διεργασίες όχι μεμονωμένα, αλλά στο πλαίσιο των

αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυτταρικών τύπων στο μικροπεριβάλλον του ιστού.

Μία πρόσφατη μελέτη αναδεικνύει τη σημασία της αλληλεπίδρασης μεταξύ μικρογλοίας και μονοκύτταρων-μακροφάγων μετά από βλάβη του νωτιαίου μυελού.²⁷ Ανεδείχθη πως μικρογλοιακά κύτταρα και μονοκύτταρα-μακροφάγα μπορούν να αλληλοεπηρεάσουν τις λειτουργίες τους σε μεγάλο βαθμό. Μονοκύτταρα-μακροφάγα που απομονώνονται από τραυματισμένο νωτιαίο μυελό καταστέλλουν τη φαγοκυτταρική λειτουργία της μικρογλοίας, ενώ η μικρογλοία με τη σειρά της ενισχύει τη φαγοκυτταρική λειτουργία των μακροφάγων. Επιπρόσθετα, τα μονοκύτταρα-μακροφάγα καταστέλλουν την επαγόμενη από λιποπολυσακχαρίτες (LPS) μικρογλοιακή παραγωγή IL-1β, TNF και IL-6, αλλά και άλλων φλεγμονωδών μορίων του μονοπατιού NFκΒ, μέσω σηματοδότησης προσταγλανδίνης E2 (PGE2). Η μικρογλοιακή φαγοκυττάρωση δεν ήταν κατεσταλμένη στη μικρογλοία από βλάβη νωτιαίου μυελού μοντέλου ποντικών, τα οποία είτε σχεδιάστηκαν να μην έχουν μονοκύτταρα-μακροφάγα στην περιοχή της βλάβης είτε σχεδιάστηκαν να μην παράγουν PGE2. Αυτές οι επιδράσεις στην αλληλεπίδραση μικρογλοίας-μακροφάγων επιβεβαιώνονται στη βλάβη του νωτιαίου μυελού *in vivo*, σε μελέτη με μοντέλο ποντικών, όπου η απουσία των μονοκύτταρων-μακροφάγων από την περιοχή της βλάβης του νωτιαίου μυελού οδήγησε σε μειωμένη ανάρρωση και αύξηση της έκφρασης προφλεγμονωδών παραγόντων. Επιπλέον, η παρουσία των μονοκύτταρων-μακροφάγων δεν κατέστειλε εντελώς τη λειτουργία της μικρογλοίας, μην επηρεάζοντας την επιβίωσή της.^{28,29}

Εξάλειψη των μικρογλοιακών κυττάρων και απώλεια της οργάνωσης νευροπροστατευτικού ιστού

Μεγάλο ενδιαφέρον έχει η μελέτη της επίδρασης της απώλειας των μικρογλοιακών κυττάρων μέσω της χρήσης διαφορετικών αναστολέων του υποδοχέα 1 του παράγοντα διέγερσης αποικιών (CSF1R), που οδηγεί σε εξάλειψη των μικρογλοιακών κυττάρων στο ΚΝΣ.³⁰ Τρεις πρόσφατες μελέτες αποτίμησαν τις επιδράσεις της αναστολής του CSF1R μετά από βλάβη στον νωτιαίο μυελό. Στην πρώτη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε μακροχρόνια θεραπεία με από του στόματος αναστολέα CSF1R, ο οποίος εμποδίζει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό μικρογλοίας και μακροφάγων σε μοντέλο ποντικών με βλάβη του νωτιαίου μυελού.³⁰ Η θεραπεία αυτή οδήγησε σε μικρή βελτίωση σε ό,τι αφορά στην κινητική ανάρρωση, μειωμένη γλοίωση (γλοίωση: αντιδραστι-

κή ανάπτυξη ουλώδους ιστού πέριξ της βλάβης), και μειωμένη εμφάνιση μικροκοιλοτήτων. Παρά ταύτα δεν είναι ξεκάθαρο το πόσο επηρεάζεται η επιβίωση και ο πολλαπλασιασμός των μονοκύτταρων-μακροφάγων ή πώς αυτό θα επηρεάζε την ανάρρωση του ασθενούς.³⁰

Στις δύο άλλες μελέτες, χορηγήθηκε ο PLX5622 αναστολέας του CSF1R, ο οποίος διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και οδήγησε στην εξάλειψη του 98% των μικρογλοιακών κυττάρων του άνευ βλάβης νωτιαίου μυελού. Φάνηκε επίσης πως ο PLX5622 οδηγεί σε εξάλειψη της μικρογλοίας αλλά όχι των μονοκύτταρων-μακροφάγων.^{31,32} Και οι δύο μελέτες ανέδειξαν πως η εξάλειψη της μικρογλοίας παρεμποδίζει την κινητική ανάρρωση στα μοντέλα ποντικών με βλάβη νωτιαίου μυελού. Το χρονικό σημείο της εξάλειψης όμως φαίνεται να έχει σημασία. Τα καλύτερα αποτελέσματα φάνηκε να παρατηρούνται όταν ο PLX5622 χορηγήθηκε δύο με τρεις εβδομάδες πριν τη βλάβη του νωτιαίου μυελού και συνεχιζόμενα μετά από αυτή.^{31,32}

Μετά από τη βλάβη του νωτιαίου μυελού, τα μικρογλοιακά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και συγκεντρώνονται πέριξ της περιοχής της βλάβης, σχηματίζοντας ένα κυτταρικό «όριο» μαζί με GFAP+ αστροκύτταρα, με τα οποία έρχονται σε επαφή.³³ Παράλληλα LysM+ κύτταρα από το περιφερικό αίμα αποικίζουν την περιοχή της βλάβης.²⁴ Η εξάλειψη των μικρογλοιακών κυττάρων με τη χρήση PLX5622 έχει ως αποτέλεσμα τη διαταραχή του «ορίου» μικρογλοίας-αστροκυττάρων, με μείωση του πολλαπλασιασμού των αστροκυττάρων και διάχυτη κατανομή μονοκύτταρων-μακροφάγων στον περιβάλλοντα ιστό, κάτι που διαμεσολαβείται από τον IGF-1. Το φαινόμενο αυτό χαρακτηρίζεται επίσης από αυξημένο μέγεθος βλάβης και απώλεια νευρώνων και ολιγοδενδροκυττάρων.³⁴

Ενώ φαίνεται να υπάρχει ασυμφωνία μεταξύ της αναφερόμενης βελτίωσης μετά από χρήση του αναστολέα CSF1R με το όνομα GW2580 και της επιδείνωσης και αύξησης της ιστικής καταστροφής από τη χρήση του αναστολέα PLX5622, τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να εξηγηθούν από τις διαφορές στη λειτουργία των δύο αναστολέων (στόχευση διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών και αναστολή του πολλαπλασιασμού έναντι της εξάλειψης των μικρογλοιακών κυττάρων), αλλά και από τη χρήση τους σε διαφορετικά πειραματικά μοντέλα ποντικών. Είναι πολύ πιθανό πως η αναστολή του πολλαπλασιασμού των μικρογλοιακών κυττάρων και, πιθανόν των μονοκυττάρων, θα μπορούσε να μειώσει την ένταση

μιας ανοσολογικής απάντησης διατηρώντας παράλληλα την επιθυμητή ανοσολογική λειτουργία. Από την άλλη, η πλήρης εξάλειψη της μικρογλοίας θα εξαφάνιζε όλες τις προστατευτικές της λειτουργίες. Επιπλέον, η χρήση διαφορετικών πειραματικών μοντέλων με διαφορετικού βαθμού φλεγμονώδεις αντιδράσεις ίσως αποτελεί αιτία της διακύμανσης των αποτελεσμάτων.³⁵

Αλληλεπίδραση με τα αστροκύτταρα

Όπως συζητήθηκε παραπάνω, τα μικρογλοιακά κύτταρα είναι απαραίτητα για τον σχηματισμό του «ορίου» μικρογλοίας-αστροκυττάρων πέριξ της βλάβης του νωτιαίου μυελού, ελέγχοντας έτσι το μέγεθος της βλάβης αυτής. Πρόσφατες δημοσιεύσεις υποστηρίζουν τη σημασία του «ορίου» μικρογλοίας-αστροκυττάρων στον τραυματισμό του κεντρικού νευρικού συστήματος. Σε πειραματικό μοντέλο τραυματικής βλάβης, κυτταροκίνες που παρήχθησαν από τη μικρογλοία (TNF, IL-6 και IL-1β) μείωσαν την έκφραση του υποδοχέα P2Y1 στα αστροκύτταρα, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ουλώδους ιστού και τη νευροπροστασία. Αντίθετα, η εξάλειψη ή η απενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων μειώνει την ανταπόκριση των αστροκυττάρων, οδηγώντας σε μείωση του σχηματισμού ουλώδους ιστού και προωθώντας την εκφύλιση του νευρικού ιστού. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο με το αποτέλεσμα άλλης μελέτης, η οποία έδειξε πως η διαταραχή του πολλαπλασιασμού των αστροκυττάρων που σχηματίζουν ουλώδη ιστό έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της αυθόρμητης αναγέννησης των νευραξόνων σε μοντέλο σοβαρής βλάβης του νωτιαίου μυελού.^{36,37}

Παρόλ' αυτά, η ενεργοποιημένη μικρογλοία μπορεί να έχει και καταστροφικές λειτουργίες. Πρόσφατες μελέτες περιγράφουν το πώς προκαλεί την ανάδυση ενός νευροτοξικού φαινοτύπου των αστροκυττάρων, που χαρακτηρίζονται ως A1 αναλογικά με τον M1 προφλεγμονώδη φαινότυπο των μακροφάγων. Τα A1 αστροκύτταρα χάνουν τις φυσιολογικές αστροκυτταρικές λειτουργίες όπως ο σχηματισμός συνάψεων και η φαγοκυτταρική δραστηριότητα και γίνονται εν τέλει νευροτοξικά. Ο A1 φαινότυπος μπορεί να προκληθεί από έναν συνδυασμό IL-1α, TNF και C1q. Απουσία του καθενός από αυτούς τους παράγοντες οδηγεί σε μείωση της δραστηριότητας του A1 φαινοτύπου. *In vivo*, τα A1 αστροκύτταρα μπορούν να ανιχνευθούν σε μεταθανάτιο νευρικό ιστό του ΚΝΣ ασθενών με νευροεκφυλιστικές ή νευροφλεγμονώδεις ασθένειες (Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Multiple Sclerosis). Παίζουν επίσης ρόλο στον τραυματισμό του

ΚΝΣ. Ακόμη και μικρός αριθμός ενεργοποιημένων μικρογλοιακών κυττάρων είναι αρκετός για να επάγει τον φαινότυπο A1 στα αστροκύτταρα.^{36,38}

Είναι σημαντικό να αναφέρουμε πως η αντιμετώπιση των A1 αστροκυττάρων με χορήγηση TGFβ ή FGF οδήγησε σε επαναφορά του φαινοτύπου από A1 σε μη νευροτοξικό. Αυτό έχει σημασία καθώς η μικρογλοία εκφράζει σε υψηλά επίπεδα TGFβ και IGF την 7η ημέρα μετά τη βλάβη, και έχει δυναμικά την ικανότητα να αναστρέψει τον A1 φαινότυπο των αστροκυττάρων. Είναι επίσης πιθανό πως η εξάλειψη των μικρογλοιακών κυττάρων και η επακόλουθη μείωση των αντιφλεγμονωδών διαμεσολαβητών που αυτά θα παρήγαγαν, να βοηθά στη διατήρηση του A1 φαινοτύπου στα αστροκύτταρα. Περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη για τη διαλεύκανση του οφέλους και των κινδύνων από την επιρροή της μικρογλοίας στα αστροκύτταρα στα πλαίσια της βλάβης του νωτιαίου μυελού.^{39,40}

Συμπεράσματα

Τα μικρογλοιακά κύτταρα επιτελούν μεγάλης σημασίας λειτουργίες υπό φυσιολογικές συνθήκες αλλά και κατά τη βλάβη του νωτιαίου μυελού. Συμμετέχουν σε καθοριστικό βαθμό στη φλεγμονώδη αντίδραση, έχοντας θετικές και αρνητικές επιδράσεις. Οι διακριτοί

τους ρόλοι έχουν περιγραφεί με μεγαλύτερη ακρίβεια τα τελευταία χρόνια. Τα μικρογλοιακά κύτταρα συμμετέχουν σε μια μη ειδική ανοσοαπόκριση που μπορεί να επιδεινώσει τη βλάβη, αλλά είναι επίσης απαραίτητα για τις διαδικασίες αποκατάστασης και επισκευής του νωτιαίου μυελού.

Η διενέργεια σύγχρονων πειραματικών μελετών και η ανεύρεση νέων ειδικών για τη μικρογλοία δεικτών, οδήγησαν στη συλλογή νέων γνώσεων που αναδεικνύουν τη σημασία των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων μικρογλοίας και άλλων κυττάρων μετά τη βλάβη του νωτιαίου μυελού στον έλεγχο της φλεγμονώδους αντίδρασης, στην εξέλιξη της βλάβης και στο λειτουργικό αποτέλεσμα αυτής.

Η καλύτερη κατανόηση του τρόπου με τον οποίο τα μικρογλοιακά κύτταρα συμμετέχουν στην παθοφυσιολογία της βλάβης του νωτιαίου μυελού θα οδηγήσει σε βελτιωμένες στρατηγικές προσπάθειας τροποποίησης των κυτταρικών λειτουργιών, με τρόπο που να διατηρούνται οι ευεργετικές επιδράσεις ενώ παράλληλα να μηδενίζονται οι καταστροφικές. Για τον σκοπόν αυτό η ανάγκη περαιτέρω μελετών της αντίδρασης των μικρογλοιακών κυττάρων κατά τη βλάβη του νωτιαίου μυελού καθίσταται αναγκαία, έχοντας πάντα στόχο την επίτευξη της βέλτιστης ανάρρωσης του ασθενούς μετά από μια τέτοια βλάβη.

ABSTRACT

Microglia Reaction after Spinal Cord Injury

Vasiliki D. Ntafou,¹ Eleftheria-Maria A. Evangelopoulos²

¹RN, Postgraduate Student – School of Medicine UoA, Lieutenant of the Greek Air Force, 251 Air Force General Hospital,

²Assistant Professor of Neurology, NKUoA, A' Department of Neurology, Eginition University Hospital, Athens, Greece

Introduction: Microglial cells are endogenous immune cells of the central nervous system and are involved in immune surveillance, defense and maintenance of homeostasis. In case of spinal cord injury, microglial cells respond to various stimuli, greatly influencing the inflammation process and its final effects on patient's clinical status. **Aim:** The purpose of this review of the modern literature is to describe the reaction of microglia after spinal cord injury, the beneficial and harmful functions it performs as well as the interaction of microglial cells with other cells in the area of the lesion. This will highlight the importance of microglial cells for the development of the lesion and the need for their further study. **Material and Method:** Recent articles and studies in English language were searched in the electronic databases PUBMED and GOOGLE SCHOLAR. The keywords used were "microglia cells", "microglia", "spinal cord injury". **Results:** The microglial cells perform important functions under normal conditions but also during spinal cord injury. Their distinct roles have been described more accurately in recent years. Microglial cells are involved in a non-specific immune response that can exacerbate damage, but are also essential for spinal cord repair and restoration procedures. They participate to a decisive extent in the inflammatory reaction after spinal cord injury, having positive and negative effects. Modern experimental studies and the discovery of new microglia-specific markers have led to the acquisition of new knowledge, highlighting

the importance of interactions between microglial and other cells after spinal cord injury in regulating inflammation, in controlling the overall damage and in its functional result. **Conclusions:** A better understanding of how microglial cells are involved in the pathophysiology of spinal cord injury will lead to improved strategies for modifying cellular function, in order to maintain beneficial effects while eliminating catastrophic ones. To this end, the need for further studies of the response of microglial cells to spinal cord injury becomes necessary, always aiming to achieve optimal recovery of the patient after such an injury.

Key-words: Microglial cells, microglia, spinal cord injury.

✉ **Corresponding Author:** Vasiliki D. Ntafou, 3 Panagioti Kanellopolou Ave., GR-115 25 Athens, Greece, Tel: (+30) 6982 713 831, e-mail: vasodafou@gmail.com

Βιβλιογραφία

1. Anwar MA, Al Shehabi TS, Eid AH. Inflammogenesis of Secondary Spinal Cord Injury. *Front Cell Neurosci* 2016, 10:98
2. Zhou Y, Li N, Zhu L, Lin Y, Cheng H. The microglial activation profile and associated factors after experimental spinal cord injury in rats. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 2018, 14:2401–2413
3. Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annual Review of Immunology* 2017, 35:441–468
4. Waisman A, Liblau RS, Becher B. Innate and adaptive immune responses in the CNS. *The Lancet Neurology* 2015, 14:945–955
5. Kettenmann H, Hanisch U.-K, Noda M, Verkhratsky A Physiology of microglia. *Physiological Reviews* 2011, 91:461–553
6. Wolf SA, Boddeke HWGM, Kettenmann H. Microglia in Physiology and Disease. *Annual Review of Physiology* 2017, 79:619–643
7. Ginhoux F, Prinz M., Origin of microglia: Current concepts and past controversies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2015 7(8)
8. Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K et al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science (New York N.Y.)* 2012, 336:86–90
9. Yu L, Su X, Li S, Zhao F, Mu D, Qu Y. Microglia and Their Promising Role in Ischemic Brain Injuries: An Update. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2020. 14
10. Kabba JA, Xu Y, Christian H, Ruan W, Chenai K, Xiang Y et al. Microglia: Housekeeper of the Central Nervous System. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2018, 38:53–71
11. Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes-Frontiers in Cellular. *Neuroscience* 2020, 14:198
12. Ahuja CS, Wilson JR, Nori S, Kotter MRN, Druschel C, Curt A, Fehlings MG. Traumatic spinal cord injury. *Nature Reviews Disease Primers* 2017, 3:17018
13. Zhang N, Yin Y, Xu S-J, Wu Y-P, Chen W-S. Inflammation & apoptosis in spinal cord injury. *The Indian Journal of Medical Research* 2012, 135:287–296
14. Kiger IKA, de Rivero Vaccari JP, Dietrich WD, Popovich PG, Keane RW. Pattern recognition receptors and central nervous system repair. *Experimental Neurology* 2014, 258:5–16
15. Tong J, Ren Y, Wang X, Dimopoulos VG, Kesler HN, Liu W, et al. Assessment of NgR1 Function In Vivo After Spinal Cord Injury. *Neurosurgery* 2014, 75:51–60
16. Noble LJ, Donovan F, Igarashi T, Goussev S, Werb Z. Matrix Metalloproteinases Limit Functional Recovery after Spinal Cord Injury by Modulation of Early Vascular Events. *The Journal of Neuroscience* 2002, 22:7526–7535
17. Neirinx V, Coste C, Franzen R et al. Neutrophil contribution to spinal cord injury and repair. *J Neuroinflammation* 2014, 11:150
18. Nguyen HX, O'Barr TJ, Anderson AJ. Polymorphonuclear leukocytes promote neurotoxicity through release of matrix metalloproteinases reactive oxygen species and TNF-alpha. *Journal of Neurochemistry* 2007, 102:900–912
19. Gensel JC, Zhang B. Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. *Brain Research* 2015, 1619:1–11 <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.12.045>
20. Bellver-Landete V, Bretheau F, Mailhot B, Vallières N, Lessard M, Janelle M-E et al. Microglia are an essential component of the neuroprotective scar that forms after spinal cord injury. *Nature Communications* 2019, 10:518
21. van Wageningen TA, Vlaar E, Kooij G, Jongenelen CAM, Geurts JGG, van Dam A-M. Regulation of microglial TMEM119 and P2RY12 immunoreactivity in multiple sclerosis white and grey matter lesions is dependent on their inflammatory environment. *Acta Neuropathologica Communications* 2019, 7:206
22. Mawhinney LA, Thawer SG, Lu W-Y, Rooijen N, van Weaver LC, Brown A et al. Differential Detection and Distribution of Microglial and Hematogenous Macrophage Populations in the

- Injured Spinal Cord of Iys-EGFP-ki Transgenic Mice. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 2012, 71:180–197
23. Bradbury EJ, Burnside ER. Moving beyond the glial scar for spinal cord repair. *Nature Communications* 2019, 10:3879
 24. David S, Kroner A, Greenhalgh AD, Zarruk JG, López-Vales R. Myeloid cell responses after spinal cord injury. *Journal of Neuroimmunology* 2018, 32:197–108
 25. Caravagna C, Jaouën A, Debarbieux F, Rougon G. Overview of Innovative Mouse Models for Imaging Neuroinflammation. *Current Protocols in Mouse Biology* 2016, 6:131–147
 26. Da Pozzo E, Tremolanti C, Costa B, Giacomelli C, Milenkovic VM, Bader S et al. Microglial Pro-Inflammatory and Anti-Inflammatory Phenotypes Are Modulated by Translocator Protein Activation. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, 20(18)
 27. Kolos EA, Korzhevskii DE. Spinal Cord Microglia in Health and Disease. *Acta Naturae* 2020, 12:4–17
 28. Esposito E, Cuzzocrea S. Anti-TNF therapy in the injured spinal cord. *Trends in Pharmacological Sciences* 2011, 32:107–115
 29. Hamamoto Y, Ogata T, Morino T, Hino M, Yamamoto H. Prostaglandin E1 analog increases spinal cord blood flow at the point of compression during and after experimental spinal cord injury. *Spinal Cord* 2010, 48:149–153
 30. Gerber YN, Saint-Martin GP, Bringuier CM, Bartolami S, Goze-Bac C, Noristani HN et al. CSF1R Inhibition Reduces Microglia Proliferation Promotes Tissue Preservation and Improves Motor Recovery After Spinal Cord Injury. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2018, 12
 31. Ali S, Mansour AG, Huang W, Queen NJ, Mo X, Anderson JM et al. CSF1R inhibitor PLX5622 and environmental enrichment additively improve metabolic outcomes in middle-aged female mice. *Aging (Albany NY)* 2020, 12:2101–2122
 32. Spangenberg E, Severson PL, Hohsfield LA, Crapser J, Zhang J, Burton EA et al. Sustained microglial depletion with CSF1R inhibitor impairs parenchymal plaque development in an Alzheimer's disease model. *Nature Communications* 2019, 10:1–21
 33. Wilhelmsson U, Andersson D, de Pablo Y, Pekny R, Ståhlberg A, Mulder J et al. Injury Leads to the Appearance of Cells with Characteristics of Both Microglia and Astrocytes in Mouse and Human Brain. *Cerebral Cortex* 2017, 27:3360–3377
 34. Domingues HS, Portugal CC, Socodato R, Relvas JB. Oligodendrocyte Astrocyte and Microglia Cross talk in Myelin Development Damage and Repair. *Front Cell Dev Biol* 2016, 4:71
 35. Neal ML, Fleming SM, Budge KM, Boyle AM, Kim C, Alam G et al. Pharmacological inhibition of CSF1R by GW2580 reduces microglial proliferation and is protective against neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration. *The FASEB Journal* 2020, 34:1679–1694
 36. Quintas C, Vale N, Gonçalves J, Queiroz G. Microglia P2Y13 Receptors Prevent Astrocyte Proliferation Mediated by P2Y1 Receptors. *Frontiers in Pharmacology* 2018, 9:418
 37. Shinozaki Y, Shibata K, Yoshida K, Shigetomi E, Gachet C, Ikenaka K et al. Transformation of Astrocytes to a Neuroprotective Phenotype by Microglia via P2Y1 Receptor Down-regulation. *Cell Reports* 2017, 19:1151–1164
 38. Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states: Microglia bioenergetics with acute polarization. *British Journal of Pharmacology* 2016, 173:649–665
 39. Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 2017, 541:481–487
 40. Liu L, Liu J, Bao J, Bai Q, Wang G. Interaction of Microglia and Astrocytes in the Neurovascular Unit. *Frontiers in Immunology* 2020, 11