# Πανεπιστήμιο Κρήτης Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών, Τμήμα Βιολογίας Ιατρική Σχολή

Πτυχιακή Εργασία

« Μελέτη της αυτοφαγίας σε ολιγοδενδροκύτταρα γηραιών μυών »

Ευσταθία Θώμογλου

A.M. 3184

Επιστημονικά Υπεύθυνη Καθηγήτρια: Δόμνα Καραγωγέως Ακαδημαϊκά Υπεύθυνη Καθηγήτρια: Κυριακή Σιδηροπούλου

Ηράκλειο, Οκτώβριος 2023

## Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο Βασικών Νευροεπιστημών, θέλω να ευχαριστήσω την καθηγήτρια Δόμνα Καραγωγέως που μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω αυτήν την εργασία, δείχνοντάς μου εμπιστοσύνη στα πρώτα μου ερευνητικά βήματα στο εργαστήριό της. Θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη Νίκη Κτενά, υπεύθυνη για την εργαστηριακή μου επίβλεψη, για όλο το χρόνο που αφιέρωσε στην καθοδήγηση και στήριξή μου, τις συμβουλές αλλά και την εμπιστοσύνη που μου έδειχνε όλη τη χρονιά, τον Αλέξανδρο για την καθοδήγηση τις πρώτες εβδομάδες, και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου που ήταν δίπλα μου στην εκπόνηση της εργασίας: τον κ. Κώστα Θεοδωράκη, τον Ηλία, τον Στέφανο, τη Σοφία, τη Δέσποινα, τον Ιάσονα, τη Φαίη, την Εβρίμ και την Αθανασία. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την εκπόνηση αυτής της πτυχιακή Σιδηροπούλου, ως υπεύθυνη του τμήματος Βιολογίας για την εκπόνηση αυτής της πτυχιακής εργασίας.

# Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	2
Περίληψη – Λέξεις κλειδιά	4
Abstract – Key words	5
1. Εισαγωγή	6
1.1 Τα νευρογλοιακά κύτταρα	6
<b>1.1.1</b> Η γενεαλογία των ολιγοδενδροκυττάρων	6
<b>1.1.2</b> Η Μυελίνη	7
1.1.3 Μικρογλοιακά κύτταρα	10
<b>1.1.4</b> Αστροκύτταρα	12
<b>1.2</b> Η αυτοφαγία	13
<b>1.2.1</b> Η αυτοφαγία στα ολιγοδενδροκύτταρα	15
<b>1.2.2</b> Ο ρόλος της αυτοφαγίας στη μυελίνη του ΚΝΣ και ΠΝΣ	16
<b>1.3</b> Γήρανση	17
<b>1.3.1</b> Γήρανση σε ολιγοδενδροκύτταρα και μυελίνη	17
1.3.2 Αυτοφαγία και γήρανση	18
Σκοπός της εργασίας	18
2. Υλικά και Μέθοδοι	19
2.1 Πειραματόζωα	19
<b>2.2</b> Γονοτύπηση	20
<b>2.3</b> Προετοιμασία ιστού ΚΝΣ για ανοσοϊστοχημεία	22
<b>2.3.1</b> Μονιμοποίηση και απομόνωση εγκεφάλου από πειραματόζωα	22
2.3.2 Προετοιμασία εγκεφάλου για κρυοτομές	23
2.3.3 Ανοσοϊστοχημεία	24
2.4 Προετοιμασία ιστού ΚΝΣ για Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης	25
<b>2.4.1</b> Μονιμοποίηση και απομόνωση οπτικών νεύρων από πειραματόζωα	25
3. Αποτελέσματα	28
3.1 Η αυτοφαγία στα ολιγοδενδροκύτταρα είναι απαραίτητος μηχανισμός για τη διατήρηση της μυελίν και της ακεραιότητας των αξόνων του ΚΝΣ κατά τη γήρανση	/ης 28
<b>3.2</b> Πληθυσμοί πρόδρομων και ώριμων ολιγοδενδροκυττάρων στο μεσολόβιο γηραιών μυών με cKO τ atg5 και μυών της ομάδας ελέγχου	του 30
<b>3.3</b> Αυξημένη πυκνότητα μικρογλοιακών κυττάρων στο μεσολόβιο γηραιών μυών με cKO του <i>atg5</i> σε σχέση με τους μύες της ομάδας ελέγχου	€ 31
<b>3.4</b> Παρόμοιοι αριθμοί αστροκυττάρων στο μεσολόβιο γηραιών μυών με cKO του <i>atg5</i> και μυών της ομάδας ελέγχου	32
4. Συζήτηση	33
Βιβλιογραφία	35

# Περίληψη

Η (μακρο)αυτοφαγία, αποτελεί ένα απαραίτητο, εξελικτικά συντηρημένο καταβολικό κυτταρικό μονοπάτι που οδηγεί κυτταροπλασματικά υλικά όπως πρωτεΐνες, οργανίδια αλλά και παθογόνα, στο λυσόσωμα για αποδιάταξη. Παρεμπόδισή της, μέσω γενετικής απαλοιφής κρίσιμων γονιδίων της αυτοφαγίας, από ολιγοδενδροκύτταρα μυών, έχει φανεί πως επιφέρει σημαντικές διαταραχές στη δομή της μυελίνης, εκφυλισμό αξόνων και συσσώρευση πρωτεΐνών της μυελίνης στα ολιγοδενδροκύτταρα μυών, έχει φανεί πως επιφέρει σημαντικές διαταραχές στη δομή της μυελίνης, εκφυλισμό αξόνων και συσσώρευση πρωτεΐνών της μυελίνης στα ολιγοδενδροκύτταρα. Ωστόσο, ο ρόλος της αυτοφαγίας σε ολιγοδενδροκύτταρα μυών κατά τη γήρανση δεν έχει μελετηθεί εκτενώς. Στην παρούσα μελέτη, κατόπιν γενετικής απαλοιφής του γονιδίου Atg5, η πρωτεΐνη του οποίου είναι κρίσιμη για τη συγκρότηση του αυτοφαγοσώματος, από ολιγοδενδροκύτταρα μυών, πραγματοποιήθηκε ιστολογική ανάλυση οπτικών νεύρων και μεσολοβίου των μυών στην ηλικία των 22 μηνών, και παρατηρήθηκε η κατάσταση της μυελίνης, των αξόνων και η απόκριση μικρογλοιακών και αστρογλοιακών κυττάρων. Τα ζώα με απαλοιφή της αυτοφαγίας στα ολιγοδενδροκύτταρα παρουσιάζουν σημαντική αποδιάταξη μυελίνης, αυξημένο νευροεκφυλισμό αξόνων και αυξημένη πυκνότητα μικρογλοιακών κυττάρων, υποδεικνύοντας πως η αυτοφαγία στα ολιγοδενδροκύτταρα είναι απαραίτητος μηχανισμός για τη διατήρηση της ομοιόστασης της μυελίνης στο ΚΝΣ κατά τη γήρανση.

# Λέξεις κλειδιά

Αυτοφαγία, ολιγοδενδροκύτταρα, μυελίνη, γήρανση, μικρογλοιακά κύτταρα, ΚΝΣ

### Abstract

(Macro)autophagy constitutes an essential, evolutionary conserved degradation pathway, that leads cytoplasmic material such as proteins, organelles, even pathogens to lysosomes for degradation. Genetic inhibition of autophagy, through the ablation of core autophagic genes, in oligodendrocytes in mice, causes significant myelin disruption, axon degeneration and accumulation of myelin proteins in oligodendrocytes. However, the role of autophagy in oligodendrocytes in ageing is not extensively studied. In this study, genetic inhibition of autophagy was achieved through the ablation of *atg5*, a core autophagic gene, in mouse oligodendrocytes. Central nervous system (CNS) tissues from 22 month old transgenic mice were histologically examined, in order to observe myelin and axon phenotypes, as well as microglial and astrocytes populations. Mice deficient in autophagy in oligodendrocytes, exhibit significant myelin membrane decompaction, axon degeneration and higher microglia density, indicating that autophagy in oligodendrocytes is an essential mechanism for the maintenance of CNS myelin homeostasis in ageing.

#### Key words

Autophagy, oligodendrocytes, myelin, ageing, microglial cells, CNS

# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Τα νευρογλοιακά κύτταρα

Στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) και πιο συγκεκριμένα στον εγκέφαλο, τα νευρογλοιακά κύτταρα αποτελούν μια ποικιλόμορφη ομάδα κυττάρων, πολύ ετερογενή ως προς τις μορφές και τις λειτουργίες της (von Bartheld et al., 2016; Jäkel and Dimou, 2017). Καταλαμβάνουν ένα μεγάλο μέρος του εγκεφάλου των θηλαστικών και περιλαμβάνουν τα πρόδρομα ολιγοδενδροκύτταρα, τα ολιγοδενδροκύτταρα και τα μικρογλοιακά κύτταρα, που συνεισφέρουν με τις λειτουργίες τους, ποικιλοτρόπως στο ΚΝΣ (Jäkel and Dimou, 2017; Allen et al., 2018). Για παράδειγμα, μπορούν να ρυθμίζουν το πλήθος των νευρώνων στο ΚΝΣ (Sierra et al., 2010), να συντελούν στον προσανατολισμό των αξόνων (Minocha et al., 2015), στη δημιουργία των συνάψεων (Reemst et al., 2016), αλλά και να επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω σημάτων που στέλνουν και λαμβάνουν (Rinholm et al., 2011; Colonna and Butovsky, 2017; Tognatta et al., 2020).

## 1.1.1 Η γενεαλογία των ολιγοδενδροκυττάρων

Η γενεαλογία των ολιγοδενδροκυττάρων, περιλαμβάνει τα κύτταρα που ξεκινώντας από πρόδρομα ολιγοδενδροκύτταρα (oligodendrocyte precursor cells, OPCs), διαφοροποιούνται σε ώριμα, που έχουν την ικανότητα μυελίνωσης αξόνων (Zhou et al., 2021). Τα OPCs μπορούν να διακριθούν καθώς εκφράζουν παράγοντες όπως το αντιγόνο NG2 (nerve/glial-antigen 2) και ο υποδοχέας platelet-derived growth factor  $\alpha$  (PDGF- $\alpha$  receptor). Βρίσκονται τόσο στις περιοχές της φαιάς όσο και της λευκής ουσίας και μορφολογικά έχουν μικρά κυτταρικά σώματα, διαμέτρου 10-15 μm, με πολλαπλές διακλαδώσεις (Levine et al., 2001). Η προέλευση και διαφοροποίηση των ολιγοδενδροκυττάρων είναι δυναμική διαδικασία. Κατά την ανάπτυξη, τα κύτταρα της γενεαλογίας των ολιγοδενδροκυττάρων προκύπτουν από νευροεπιθηλιακά κύτταρα στην κοιλιακή ζώνη. Στους μύες, στην εμβρυϊκή ημέρα 12,5 (E12.5) ένας πληθυσμός OPCs που προέρχεται από πρόδρομα κύτταρα που εκφράζουν Nkx2.1, μεταναστεύει από την έσω γαγγλιακή προεξογή και την πρόσθια ενδοσκελιαία περιοχή του κοιλιακού πρόσθιου εγκεφάλου, σε όλα τα μέρη του τηλεγκεφάλου και τελικά στον εγκεφαλικό φλοιό μετά την E16. Στη συνέχεια, ένας άλλος πληθυσμός OPCs που προέργεται από πρόδρομα κύτταρα που εκφράζουν Gsh2, ξεπερνά τα πρώτα, καθώς μεταναστεύει από την πλευρική και ουριαία γαγγλιακή προεξοχή στο φλοιό. Τέλος, ένας τρίτος πληθυσμός που προέργεται από πρόδρομα κύτταρα που εκφράζουν Emx1, μετακινείται στο φλοιό μετά τη γέννηση (Kessaris et al., 2006).





# 1.1.2 Η Μυελίνη

Η διαφοροποίηση των OPCs σε ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα χαρακτηρίζεται από ταχεία αύξηση της μορφολογικής τους πολυπλοκότητας καθώς το κύτταρο διακλαδίζεται και επεκτείνει την ξεδιπλωμένη του μεμβράνη (Σχήμα 1) (Michalski and Kothary, 2015). Το έλυτρο μυελίνης, αποτελεί μια εκτεταμένη και τροποποιημένη πλασματική μεμβράνη που τυλίγεται γύρω από τον άξονα του νευρικού κυττάρου σε ομόκεντρες στρώσεις. Η μεμβράνη της μυελίνης προέρχεται και αποτελεί τμήμα των κυττάρων Schwann στο περιφερικό νευρικό σύστημα (ΠΝΣ), και των ολιγοδενδροκυττάρων στο KNΣ (Brady and Siegel, 2005, p.51). Κατά τα πρώτα στάδια της διαφοροποίησης τα ολιγοδενδροκύτταρα επεκτείνουν τις προεξογές τους, οι οποίες έργονται σε επαφή με γυμνούς άξονες νευρώνων και προκαλούν τη μυελίνωση. Ακολούθως, οι μεμβράνες τυλίγουν τους άξονες σε ομόκεντρες στρώσεις, συμπιέζονται εκτοπίζοντας το κυτταρόπλασμα και δημιουργείται τελικά ώριμη μυελίνη (Σγήμα 2). Μεμονωμένα τμήματα μυελίνης που περιβάλλουν έναν άξονα και είναι συνδεδεμένα με το σώμα του ολιγοδενδροκυττάρου αποτελούν τα μεσοκομβικά τμήματα. Στο ΚΝΣ, ένα ολιγοδενδροκύτταρο έχει τη δυνατότητα μυελίνωσης πολλών αξόνων. Το μη μυελινωμένο διάστημα μεταξύ των μεσοκομβικών τμημάτων αποτελεί τον κόμβο του Ranvier όπου η μεταβίβαση των δυναμικών ενέργειας των αξόνων και η ροή ιόντων επιτυγχάνονται μέσω εκπόλωσης της μεμβράνης, από υψηλής πυκνότητας τασοελεγχόμενους διαύλους νατρίου (Michalski and Kothary, 2015). Όταν τμήμα της μεμβράνης του άξονα σε έναν κόμβο εκπολώνεται, το ρεύμα τοπικά αδυνατεί να διαρρεύσει μέσα από την υψηλής αντίστασης μεμβράνη της μυελίνης, αλλά περνά ακριβώς έξω από αυτήν, εκπολώνοντας τελικά τη μεμβράνη στον επόμενο κόμβο (Brady and Siegel, 2005, p.52). Με αυτόν τον τρόπο, πραγματοποιείται αλματώδης μετάδοση δυναμικών ενέργειας, από κόμβο σε κόμβο. Χωρίς τη μυελίνη, οι άξονες θα απαιτούσαν τεράστια ποσά ενέργειας για να διατηρήσουν τις διαβαθμίσεις ιόντων κατά μήκος του άξονα, με αποτέλεσμα τα νευρωνικά κυκλώματα να είναι αναποτελεσματικά για την κάλυψη των αναγκών ενός ανώτερου νευρικού συστήματος (Michalski and Kothary, 2015).



Σχήμα 2: Η διαδικασία της μυελίνωσης: Τα ολιγοδενδροκύτταρα επεκτείνουν την άκρη της μεμβράνης τους αναζητώντας μη μυελινωμένο άξονα. Όταν έρχονται σε επαφή με αυτόν, η μεμβράνη τους αναπτύσσεται ταυτόχρονα γύρω από τον άξονα, τυλίγοντάς τον, ενώ επεκτείνεται και πλευρικά ώστε να καλυφθεί μεγάλη επιφάνειά του. Οι εξωτερικές στρώσεις της μεμβράνης είναι αυτές που τοποθετήθηκαν πρώτες και ξεκινούν να συμπυκνώνονται με τη βοήθεια της MBP. Η διαδικασία μεταφέρεται προς το εσωτερικό, για τα καινούρια στρώματα της μεμβράνης. Αναπαριστώνται επίσης η εγκάρσια τομή του άξονα και της μυελίνης που τον περιβάλλει και τα στάδια που αυτή επεκτείνεται πλευρικά (Προσαρμογή εικόνας από Michalski and Kothary, 2015).

## Σύσταση της μυελίνης

Η μυελίνη είναι μια μεμβρανική δομή που αποτελείται σε μεγάλο ποσοστό (70-85%) από λιπίδια και μικρότερο (15-30%) από πρωτεΐνες, σε αντίθεση με τις περισσότερες βιολογικές μεμβράνες στις οποίες η αναλογία πρωτεϊνών/λιπιδίων είναι υψηλότερη. Η δομή της μεμβράνης της μυελίνης είναι μια λιπιδική διπλοστιβάδα με μεμβρανικές πρωτεΐνες ενσωματωμένες ή προσαρτημένες στις επιφάνειές της (Σχήμα 3). Οι εγκεφαλοζίτες (γαλακτοσυλκεραμίδιο) είναι το πιο σύνηθες λιπίδιο της μεμβράνης της μυελίνης, ενώ το σουλφατίδιο είναι κρίσιμο για την αλληλεπίδραση αξόνων ολιγοδενδροκυττάρων αλλά και για την ωρίμανσή τους. Περιέχει ακόμη πλήθος φωσφολιπιδίων και χοληστερόλη. Η πρωτεϊνική σύσταση της μυελίνης του ΚΝΣ περιλαμβάνει κυρίως την πρωτεολιπιδική πρωτεΐνη (proteolipid protein, PLP) και τη βασική πρωτεΐνη της μυελίνης (myelin basic protein, MBP) σε ποσοστό 60-80% στα περισσότερα είδη. Η πρώτη είναι διαμεμβρανική και με το εξωκυττάριο τμήμα της συντελεί στη σταθεροποίηση των διαδοχικών στρωμάτων της μεμβράνης. Η δεύτερη βρίσκεται στο ενδοκυττάριο τμήμα της μεμβράνης, παράγεται σε πολλές μορφές καθώς το mRNA του γονιδίου της υφίσταται εναλλακτικό μάτισμα και βοηθά στη συμπύκνωση της μυελίνης (Brady and Siegel, 2005, p.52-60). Απώλεια της αλληλεπίδρασης της MBP με τη μεμβράνη της μυελίνης επιφέρει αποσταθεροποίηση, θραύση της μυελίνης και γενικότερα παθολογίες που εμφανίζονται και σε πολλές νευροεκφυλιστικές ασθένειες του ΚΝΣ (Weil et al., 2016). Η δομή της μυελίνης μπορεί να διακριθεί στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ως

στρώσεις από εναλλασσόμενες σκουρόχρωμες και φωτεινότερες σειρές των πρωτεϊνών που βρίσκονται στο ενδοκυττάριο και εξωκυττάριο τμήμα της πλασματικής μεμβράνης αντίστοιχα, και συνεπώς παρουσιάζουν μεγαλύτερη ή μικρότερη συμπύκνωση (Brady and Siegel, 2005, p.52-60).



Σχήμα 3: Σχηματική αναπαράσταση της μοριακής οργάνωσης της συμπυκνωμένης μεμβράνης της μυελίνης του ΚΝΣ. Η εξωκυττάρια επιφάνεια των ολιγοδενδροκυττάρων φαίνεται στο επάνω μέρος του σχήματος με προεξοχές της PLP, η οποία διαπερνά τη λιπιδική διπλοστιβάδα. Ενδοκυττάρια βρίσκεται η MBP (Προσαρμογή εικόνας από Brady and Siegel, 2005, p.57).

Τα ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα μορφολογικά διακρίνονται λόγω του μικρού μεγέθους τους και της μεγάλης πυκνότητας του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα, λόγω υψηλής συμπύκνωσης. Εξαιτίας του τρόπου διαφοροποίησης τους, βρίσκονται συνήθως σε σειρές γειτονικά μεταξύ τους (Baumann and Pham-Dinh, 2001). Εκτός από την παραγωγή μυελίνης, έχουν τη δυνατότητα να υποστηρίζουν και να προωθούν την επιβίωση των νευρώνων και μέσω της παραγωγής νευροτροφικών παραγόντων (Du and Dreyfus, 2002).

# Πλαστικότητα της μυελίνης

Η πλειοψηφία των ώριμων ολιγοδενδροκυττάρων που παράγουν μυελίνη δημιουργείται στους μύες τις πρώτες 4 μεταγεννητικές εβδομάδες. Ωστόσο, τα OPCs συνεχίζουν να διαιρούνται και να διαφοροποιούνται σε νέα ολιγοδενδροκύτταρα στην ενήλικη ζωή (Rivers et al., 2008; Zhi et al., 2023). Ο ρυθμός με τον οποίο τα OPCs πολλαπλασιάζονται, διαφέρει μεταξύ των περιοχών του KNΣ. Για παράδειγμα, είναι πιο αργός στο οπτικό νεύρο σε σχέση με το μεσολόβιο (Young et al., 2013). Επίσης, ο κυτταρικός κύκλος των OPCs στο μεσολόβιο επιβραδύνεται σημαντικά σε συνάρτηση με την ηλικία, ενώ στο φλοιό αυξάνεται γραμμικά (Psachoulia et al., 2009). Παρόλο που η ολιγοδενδρογένεση συνεχίζεται και στην ενήλικη ζωή, ελαττώνεται σημαντικά κατά τη γήρανση, όπως έχει φανεί σε οπτικά νεύρα μυών. Το γεγονός αυτό φαίνεται να μην οφείλεται σε ανεπάρκεια OPCs, αλλά σε αδυναμία τους να διαφοροποιηθούν σε ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα κατά τη γήρανση (Zhi et al., 2023).

Η ικανότητα του ΚΝΣ να μεταβάλει την ενεργότητά του, ως απόκριση σε εσωτερικά ή εξωτερικά ερεθίσματα, μέσω τροποποίησης της δομής, των λειτουργειών ή των συνάψεών του, χαρακτηρίζεται ως πλαστικότητα (Mateos-Aparicio and Rodríguez-Moreno, 2019). Το είδος της πλαστικότητας που

έχει μελετηθεί εκτενέστερα είναι εκείνο που αναφέρεται σε αλλαγές στη δομή των νευρώνων και των συνάψεων. Ωστόσο, η μυελίνη και τα ολιγοδενδροκύτταρα εμφανίζουν επίσης πλαστικότητα, η οποία περιλαμβάνει αλλαγές στο μήκος, πάγος, κατανομή και συμπύκνωση της μεμβράνης της μυελίνης. Η πλαστικότητα της μυελίνης έχει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση της λειτουργίας του εγκεφάλου, αλλά και σε μηχανισμούς σχετικούς με μνήμη και μάθηση (Chapman and Hill, 2020). Η αναδιαμόρφωση της μυελίνης που πραγματοποιείται στο ενήλικο ΚΝΣ και πιο συγκεκριμένα στα οπτικά νεύρα, έχει φανεί πως μεσολαβείται από τα νέα ολιγοδενδροκύτταρα που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της ζωής, είτε καθώς αυτά αντικαθιστούν τα προηγούμενα που έγουν πεθάνει, είτε προσθέτοντας επιπλέον μυελίνη. Βέβαια, από τα νέα ολιγοδενδροκύτταρα που διαφοροποιούνται στην ενήλικη ζωή, μόνο μια μικρή μερίδα καταφέρνει να επιβιώσει και να δημιουργήσει τελικά μυελίνη (Young et al., 2013). Η αναδιαμόρφωση της μυελίνης περιλαμβάνει επιπλέον και την αποδόμηση των συστατικών της, προκειμένου να διατηρηθεί η λειτουργικότητά της, όμως οι μηγανισμοί οι οποίοι μεσολαβούν αυτήν την αποδόμηση είναι λιγότερο μελετημένοι (Aber et al., 2022). Μελέτες στο παρελθόν, έχουν δείξει την ικανότητα κυρίως των μικρογλοιακών κυττάρων αλλά και των αστροκυττάρων στο KNΣ, για φαγοκύτωση μυελίνης και θραυσμάτων της (Ponath et al., 2017; Ronzano et al., 2020).

## 1.1.3 Μικρογλοιακά κύτταρα

Το ΚΝΣ αποικίζεται από ένα εκτεταμένο και δραστικό δίκτυο μονοπύρηνων φαγοκυττάρων, με τα μικρογλοιακά κύτταρα να αποτελούν την πιο άφθονη ομάδα κυττάρων αυτού του δικτύου. Προέρχονται από πρώιμα μυελοειδή προγονικά κύτταρα του εμβρυϊκού λεκιθικού σάκου, που μεταναστεύουν στον αναπτυσσόμενο νευρικό σωλήνα, πολλαπλασιάζονται, εποικίζουν το παρέγχυμα και συνεχίζουν να διαιρούνται κατά τη διάρκεια της ζωής. Κατά την ανάπτυξη βοηθούν στο σχηματισμό νευρωνικών κυκλωμάτων διαμορφώνοντας τις συνάψεις και την ισχύ τους. Άλλα μονοπύρηνα φαγοκύτταρα που αποτελούν μακροφάγα του ΚΝΣ, έχουν διαφορετική προέλευση από τα μικρογλοιακά κύτταρα (Colonna and Butovsky, 2017).

Τα μικρογλοιακά είναι διακλαδισμένα κύτταρα, με πολλαπλούς κλάδους και προεξοχές που επεκτείνονται από το σώμα του κυττάρου. Οι προεξοχές, βρίσκονται σε συνεχή κίνηση, προεκβάλλουν και ανασύρονται προκειμένου να καλύψουν μεγάλες αποστάσεις κατά την εξερεύνηση εγκεφαλικών περιοχών. Έρχονται σε επαφή με τους νευρώνες, τα αστροκύτταρα και τα αγγεία επιβλέποντας τη λειτουργικότητα των συνάψεων. Επαγωγή μικρών βλαβών ενεργοποιεί τα μικρογλοιακά που βρίσκονται κοντά στην περιοχή τα οποία κατευθύνουν τις προεξοχές τους προς το σημείο του τραυματισμού για τη φαγοκύτωση του κατεστραμμένου ιστού. Μεγαλύτεροι τραυματισμοί ή φλεγμονώδη σήματα επάγουν μορφολογικές αλλαγές στα μικρογλοιακά κύτταρα και τις διακλαδώσεις τους, όπως μεγέθυνση του κυτταρικού σώματος που σχετίζεται με φαγοκύτωση και προφλεγμονώδη λειτουργία. Γενικότερα το σχήμα και οι κινήσεις τους, αντικατοπτρίζουν αλλά και εξαρτώνται από τα ερεθίσματα που δέχονται, από απλή επιτήρηση της νευρωνικής δραστηριότητας, μέχρι επιδράσεις χημικών ή μικροβιακές μολύνσεις. Εκφράζουν υποδοχείς αναγνώρισης μοτίβων, που ανιχνεύουν μοριακά μοτίβα παθογόνων ή κατεστραμμένων ιστών (Colonna and Butovsky, 2017).

Η ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κατηγοριοποιείται ως κλασική (M1) ή εναλλακτική (M2). Η ενεργοποίηση τύπου M1 είναι μια προφλεγμονώδης κατάσταση όπου τα μικρογλοιακά κύτταρα παράγουν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, επάγοντας τελικά φλεγμονή και νευροτοξικότητα. Η ενεργοποίηση τύπου M2 περιλαμβάνει αντιφλεγμονώδεις και θεραπευτικές δράσεις των μικρογλοιακών. Επάγεται από ιντερλευκίνες ή ανίχνευση αποπτωτικών κυττάρων και προωθεί την απελευθέρωση αντιφλεγμονωδών παραγόντων. Ο διαχωρισμός της δράσης τους σε αυτές τις δύο κατηγορίες, παρόλο που βοηθά στην κατανόηση των λειτουργιών των μικρογλοιακών κυττάρων, δεν είναι απόλυτος καθώς δεν περιγράφει την ακριβή λειτουργία τους in vivo. Αυτή ποικίλει, αφού εξαρτάται από τα ερεθίσματα και το γενικότερο πλαίσιο στο οποίο τα κύτταρα αυτά δρουν, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν συχνά ενδιάμεσες και μεικτές λειτουργίες και όχι έναν ξεκάθαρο φαινότυπο M1 ή M2 (Colonna and Butovsky, 2017).

Τα μικρογλοιακά κύτταρα αλληλεπιδρούν ακόμα με τα αστροκύτταρα στέλνοντας και λαμβάνοντας σήματα. Για παράδειγμα, σε περίπτωση μικρού τραυματισμού, τα αστροκύτταρα μπορούν να κατευθύνουν τις προεξοχές των μικρογλοιακών στο σημείο της βλάβης μέσω των παραγόντων που εκλύουν. Επιπλέον, βοηθούν στην εξασθένιση των φλεγμονωδών αποκρίσεων των μικρογλοιακών κυττάρων, με την έκλυση άλλων ουσιών. Αντίστροφα, τα σήματα που μεταφέρουν τα μικρογλοιακά κύτταρα στα αστροκύτταρα περιλαμβάνουν επαγωγή πρωτεόλυσης, αστρογλοίωσης ακόμα και απομυελίνωσης (Colonna and Butovsky, 2017).

Η αλληλεπίδραση μικρογλοιακών κυττάρων με τα ολιγοδενδροκύτταρα, βρίσκεται σε μια καλά ρυθμισμένη ισορροπία μεταξύ ενεργοποιημένων μικρογλοιακών, που μπορεί να είναι απαραίτητα για τη συντήρηση των ολιγοδενδροκυττάρων, αλλά και επιβλαβή σε κάποιες περιπτώσεις. Ακόμα, τα ολιγοδενδροκύτταρα μπορούν να ρυθμίσουν την ενεργότητα των πρώτων μέσω της παραγωγής κυτοκινών και άλλων ουσιών. Τα μικρογλοιακά κύτταρα, παρόλο που μπορεί να προκαλέσουν καταστροφή ολιγοδενδροκυττάρων και μυελίνης σε φλεγμονώδεις αποκρίσεις, μπορούν επίσης να συντελέσουν στη απομάκρυνση θραυσμάτων μυελίνης κατά την απομυελίνωση (Peferoen et al., 2014), αλλά και γενικότερα στη διαμόρφωση του μυελινικού καλύμματος (Hughes and Appel, 2020). Είναι χρήσιμα στη διατήρηση της δομής της μυελίνης, την ελάττωση περιπτώσεων πλεονάζουσας μυελίνης αλλά και απομυελίνωσης αξόνων, και μπορούν να ρυθμίζουν το λιπιδικό προφίλ των ολιγοδενδροκυττάρων μέσω της σηματοδότησης TGFβ–TGFβR1 (McNamara et al., 2023). Επιπλέον, βοηθούν στη στρατολόγηση, πολλαπλασιασμό και ωρίμανση των OPCs σε μια απομυελινωμένη περιοχή (Peferoen et al., 2014), άλλα και κατά την ανάπτυξη (Wlodarczyk et al, 2017).

Τα μικρογλοιακά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα καθαρισμού θραυσμάτων μυελίνης. Παρόλα αυτά, σταδιακά, επέρχεται συσσώρευση αδιάλυτων λυσοσωμικών συσσωματωμάτων σε αυτά και δυσλειτουργία του λυσοσωματικού μονοπατιού. Η μυελίνη όχι μόνο είναι άφθονη σα δομή στο ΚΝΣ αλλά και πλούσια σε λιπίδια, υψηλά συμπυκνωμένη και συνεπώς δυσδιάλυτη. Ως αποτέλεσμα, το μονοπάτι αποδιάταξής της μέσω μικρογλοιακών κυττάρων, είναι επιρρεπές στη συμφόρηση. Με την ηλικία, τα κύτταρα αυτά συγκεντρώνουν στα λυσοσώματα δομές λόγω του αυξημένου φορτίου μυελίνης, με αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία τους κατά τη γήρανση (Safaiyan et al., 2016). Κατά τη γήρανση τα μικρογλοιακά κύτταρα επηρεάζονται με πολλούς τρόπους. Παρόλο που παρατηρείται απώλεια σε νευρώνες, μυελινωμένους άξονες και μερικά γλοιακά κύτταρα, η πυκνότητα των μικρογλοιακών κυττάρων είναι αυξημένη, γεγονός που φανερώνει την ικανότητά τους να εξακολουθούν να διαιρούνται κατά τη διάρκεια της ζωής, αλλά και να είναι ανοσολογικά ενεργά. Με την ηλικία, τα μικρογλοιακά κύτταρα εκφράζουν μάρτυρες χαρακτηριστικούς της ενεργοποιημένης τους κατάστασης, και αυτή η έκφραση είναι ιδιαίτερα αυξημένη σε περιοχές λευκής ουσίας. Έχει παρατηρηθεί μια συσχέτιση μεταξύ των αυξημένων θραυσμάτων μυελίνης κατά τη γήρανση και της επακόλουθης ενεργοποίησης των μικρογλοιακών κυττάρων στις περιογές αυτές, για τη φαγοκύτωση των θραυσμάτων (Conde and Streit, 2006). Μορφολογικά, παρουσιάζουν συγνά κυτταροπλασματικά έγκλειστα, που σχετίζονται με τη φαγοκύτωση ουσιών, ελαττωμένη διακλάδωση, βραχύτερες προεξοχές και μειωμένη ικανότητα εξερεύνησης του εγκεφάλου. Γενικότερα, ενώ κάποιες μελέτες υποστηρίζουν πως κατά τη γήρανση τα μικρογλοιακά κύτταρα συντονίζουν τις δράσεις τους προς μια περισσότερο νευροπροστατευτική λειτουργία (Conde and Streit, 2006; Colonna and Butovsky, 2017), άλλες δείχνουν ότι με την ηλικία μειώνεται η ικανότητα φαγοκύτωσης θραυσμάτων μυελίνης και τα μικρογλοιακά κύτταρα τείνουν να είναι φλεγμονώδη (Sen et al., 2022).

# 1.1.4 Αστροκύτταρα

Τα αστροκύτταρα είναι γλοιακά κύτταρα εξωδερμικής, νευροεπιθηλιακής προέλευσης. Αναπτύσσονται από γλοιακά ενδιάμεσα προγονικά κύτταρα, διαφοροποιούνται και συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται ακόμα και μεταγεννητικά, ώστε να φτάσουν στην απαραίτητη αφθονία. Είναι αρκετά ετερογενή σε μορφή και λειτουργία, και συντελούν στη διατήρηση ομοιόστασης και στην υποστήριξη του ΚΝΣ κατά την ανάπτυξη, τη διάρκεια της ζωής και τη γήρανση. Είναι ενσωματωμένα και άρρηκτα συνδεδεμένα με τα νευρωνικά δίκτυα, (Verkhratsky and Nedergaard, 2018) προσφέρουν τροφική υποστήριξη στους άξονες και μεσολαβούν στη δημιουργία των συνάψεων. Απορροφούν γλυκόζη από την κυκλοφορία και την αποθηκεύουν ως γλυκογόνο ή τη μετατρέπουν σε γαλακτικό οξύ ώστε να τροφοδοτήσουν τους νευρώνες. Εξαιτίας της υψηλής ετερογένειάς τους λειτουργικά, είναι δύσκολο να κατανεμηθούν αυστηρά σε κατηγορίες, καθώς παρουσιάζουν διαφορές ανάλογα με την εγκεφαλική περιοχή και τα ερεθίσματα που δέχονται από τους υπόλοιπους κυτταρικούς πληθυσμούς (Hasel and Liddelow, 2021).

Τα αστροκύτταρα μπορούν να αποκρίνονται σε πολλές μορφές τραυματισμού ή βλάβης στο ΚΝΣ μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται αστρογλοίωση. Χαρακτηρίζεται από αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση, τη δομή και τη λειτουργία τους. Ένας ήπιος τραυματισμός ή φλεγμονή στο ΚΝΣ μπορεί να προκαλέσει ήπια αντίδραση των αστροκυττάρων που δεν περιλαμβάνει τον πολλαπλασιασμό τους αλλά αλλαγές τη γονιδιακή έκφραση. Ωστόσο, η έντονη απόκρισή τους χαρακτηρίζεται από αυξημένη έκφραση της GFAP, υπερτροφία και πολλαπλασιασμό των κυττάρων και συμβαίνει κατόπιν σοβαρού τραυματισμού, μόλυνσης ή κάποιας νεροεκφυλιστικής ασθένειας. Η αστρογλοίωση μπορεί να προκληθεί από πληθώρα ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών μηχανισμών οι οποίοι οδηγούν σε αντίδραση των αστροκυττάρων σε βλάβες του ΚΝΣ. Τέτοιοι μπορεί να είναι μόρια και παράγοντες που εκλύονται από κατεστραμμένα κύτταρα ή σηματοδοτικά μονοπάτια (Anderson et al., 2014).

Τα αστροκύτταρα είναι κρίσιμα για τη διατήρηση της ακεραιότητας της μυελίνης, αλλά και την ανάπτυξη των ολιγοδενδροκυττάρων στο ΚΝΣ, μέσω του πολλαπλασιασμού, μετανάστευσης και

διαφοροποίησης των OPCs. Στοχευμένη απαλοιφή αστροκυττάρων στο ενήλικο KNΣ έχει ως αποτέλεσμα λιγότερο συμπυκνωμένη μυελίνη και απώλεια μυελίνης, που σχετίζονται με μειωμένη έκφραση της MBP. Μάλιστα, η μυελίνη των αξόνων με μεγαλύτερη διάμετρο, φαίνεται πως επηρεάζεται περισσότερο σε σχέση με αυτή των μικρότερης διαμέτρου αξόνων (Tognatta et al., 2020). Τα αστροκύτταρα προσφέρουν υποστήριξη στα ολιγοδενδροκύτταρα, εκλύοντας ουσίες, που βοηθούν στην επιβίωσή τους, την ικανότητα μυελίνωσης ή τη στρατολόγηση και διαφοροποίηση OPCs (Rinholm et al., 2011; Moore et al., 2011). Ακόμα, σε αστροκύτταρα στο οπτικό νεύρο γηραιού οργανισμού, έχουν παρατηρηθεί κυτταροπλασματικά λιπιδικά έγκλειστα, με θραύσματα μυελίνης, γεγονός που υποδεικνύει την ικανότητα των αστροκυττάρων στη φαγοκύτωση και καθαρισμό δομών μυελίνης, ακόμα και κατά τη γήρανση (Nag and Wadhwa, 2012).

## 1.2 Η αυτοφαγία

Από την άλλη πλευρά, η αυτοφαγία, είναι ένα απαραίτητο και εξελικτικά συντηρημένο κυτταρικό μονοπάτι μεταφοράς πρωτεϊνών, παθογόνων και οργανιδίων όπως μιτοχόνδρια, στα λυσοσώματα για αποδιάταξη και ανακύκλωση (Belgrad et al., 2020). Στα κύτταρα των θηλαστικών, έχουν περιγραφεί τρείς κύριες μορφές αυτοφαγίας, η μικροαυτοφαγία, η μακροαυτοφαγία και η αυτοφαγία που μεσολαβείται από σαπερόνες. Η πρώτη περιλαμβάνει την εγκόλπωση του κυτταροπλάσματος απευθείας από τη λυσοσωμική μεμβράνη, η οποία προεξέχει και περικυκλώνει το φορτίο. Η αυτοφαγία μεσολαβούμενη από σαπερόνες, διαφέρει καθώς δεν αξιοποιεί μεμβρανικές δομές για την απομόνωση και μεταφορά των φορτίων, αλλά πρωτεΐνες – σαπερόνες που ανιγνεύουν τις πρωτεΐνες που χρειάζεται να αποδιαταχθούν και φέρουν ένα ειδικό πενταπεπτίδιο. Έτσι ξεδιπλώνονται και μεταφέρονται μεμονωμένα στο λυσόσωμα μέσα από κανάλια του (Parzych and Klionsky, 2014). Σε αντίθεση και με τις δύο αυτές μορφές, η μακροαυτοφαγία περιλαμβάνει απομόνωση του κυτταροπλασματικού φορτίου που βρίσκεται μακριά από το λυσόσωμα, από νεοσύστατα μεμβρανικά κυστίδια, τα αυτοφαγοσώματα τα οποία συντήκονται με το λυσόσωμα, μεταφέροντας ένα εσωτερικό κυστίδιο στο διαμέρισμα αποδιάταξης. Στην παρούσα μελέτη, με τον όρο αυτοφαγία γίνεται αναφορά στη μακροαυτοφαγία, η οποία είναι το βασικό ενδοκυτταρικό καταβολικό μονοπάτι αποδιάταξης και ανακύκλωσης πρωτεϊνών και οργανιδίων (Levine and Klionsky, 2004).

Η αυτοφαγία είναι μια προσαρμοστική διαδικασία που προκαλείται ως απόκριση σε διαφορετικές μορφές στρες, όπως στέρηση θρεπτικών, αυξητικών παραγόντων, μόλυνση ή υποξία. Η μη επιλεκτική αυτοφαγία στοχεύει στο να προμηθεύσει το κύτταρο με θρεπτικά συστατικά για βασικές του λειτουργίες, κατά περιόδους στέρησης ή άλλων μορφών στρες. Ωστόσο, η αυτοφαγία έχει φανεί πως λειτουργεί και επιλεκτικά, προστατεύοντας από ανεπιθύμητα και δυνητικά επικίνδυνα κυτταροπλασματικά υλικά, όπως κατεστραμμένα μιτοχόνδρια ή συσσωρευμένες πρωτεΐνες. Τέλος, έχει φανεί πως μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τα κύτταρα και για την έκλυση κυτταροπλασματικών συστατικών (Dikic and Elazar, 2018).

Η περίπλοκη αυτή διαδικασία συντονίζεται από μια ομάδα πρωτεϊνών ATGs, οι οποίες κωδικοποιούνται από τα αντίστοιχα γονίδια, autophagy related genes. Η επαγωγή της αυτοφαγίας προκαλεί στρατολόγηση των ATGs σε μια ειδική υποκυτταρική περιοχή, το σημείο συγκρότησης του φαγοπόρου (phagophore assembly site, PAS) και σχηματισμό μιας μεμβράνης σε σχήμα κυπέλλου για απομόνωση, το φαγοπόρο (Dikic and Elazar, 2018). Η προέλευση της μεμβράνης του

αυτοφαγοσώματος μπορεί να είναι η μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου, μεμβράνες μιτοχονδρίων, ακόμα και η πλασματική μεμβράνη ή το σύμπλεγμα Golgi (Belgrad et al., 2020). Σταδιακή επιμήκυνση αυτής της μεμβράνης γύρω από μια μερίδα του κυτταροπλάσματος, επεκτείνει το φαγοπόρο σε ένα κυστίδιο, το αυτοφαγόσωμα, που περιέχει πλέον το αυτοφαγικό φορτίο. Οι ATGs που εμπλέκονται περισσότερο, σε αυτό το στάδιο, της επιμήκυνσης του φαγοπόρου, είναι αυτές της οικογένειας των ATG8. Για την ωρίμανσή τους η πρωτεάση ATG4 μεσολαβεί αποκόπτοντας μερικά κατάλοιπα, ώστε να μπορούν να προσδεθούν στη μεμβράνη του κυστιδίου. Ενεργοποιούνται από το ένζυμο ATG7 και τελικά η πρόσδεση γίνεται μέσω της ATG3. Για την αποτελεσματική πρόσδεση των ATG8, η ATG3 χρειάζεται να ενεργοποιηθεί από το σύμπλοκο ATG12~ATG5, το οποίο βρίσκεται στο PAS συνδεδεμένο μέσω των ATG16L και WIPI2. Τελικά, η πρόσδεση και των ATG8s στο σύμπλοκο του κυστιδίου, προωθεί την επέκταση του φαγοπόρου. Κατόπιν της επέκτασης και του κλεισίματος του φαγοπόρου ακολουθεί η ωρίμανση του αυτοφαγοσώματος που περιλαμβάνει απομάκρυνση των ATGs από τη μεμβράνη του και μεταφορά του στο λυσόσωμα με τη βοήθεια των μικροσωληνίσκων. Πραγματοποιείται σύντηξη της εξωτερικής μεμβράνης του αυτοφαγοσώματος με αυτή του λυσοσώματος σχηματίζοντας το αυτολυσόσωμα. Η σύντηξη οδηγεί στην απελευθέρωση ενός αυτοφαγικού σώματος με μονή μεμβράνη, στον αυλό του λυσοσώματος με αποτέλεσμα την αποδιάταξη του αυτοφαγικού σώματος μαζί με το περιεχόμενο φορτίο (Σχήμα 4) (Dikic and Elazar, 2018).



**Σχήμα 4:** Αναλυτική αναπαράσταση της αυτοφαγίας ξεκινώντας από το εναρκτήριο ερέθισμα, έως την τελική αποδιάταξη του φορτίου στο λυσόσωμα (Dikic and Elazar, 2018).

Ερεθίσματα όπως η στέρηση θρεπτικών προκαλούν τη μη επιλεκτική αυτοφαγία στην οποία εγκολπώνονται μη ειδικά, διάφορα κυτταροπλασματικά υλικά. Αντίθετα, συγκεκριμένα σήματα ή γεγονότα μπορούν να προκαλέσουν την επιλεκτική αυτοφαγική στόχευση κυτταρικών δομών, όπως κατεστραμμένα μιτοχόνδρια, εισβάλλοντα βακτήρια ή συσσωρευμένες πρωτεΐνες (Dikic and Elazar, 2018). Η επιλεκτική αυτοφαγία απαιτεί τη σήμανση του φορτίου με μόρια όπως αλυσίδες ουβικιτίνης, που αναγνωρίζονται από προσαρμοστές και τελικά υποδοχείς αυτοφαγίας. Πιο αναλυτικά, οι κυτταροπλασματικοί προσαρμοστές του φορτίου όπως η πρωτεΐνη p62, αναγνωρίζουν και προσδένουν ουβικιτινιλιωμένα συσσωματώματα πρωτεϊνών του κυτταροπλάσματος και τα συνδέουν με τις ATG8 πρωτεΐνες του αυτοφαγοσώματος. Αυτή η σύνδεση είναι δυνατή μέσω της περιοχής αλληλεπίδρασης-ελαφριάς αλυσίδας 3 (light chain 3 (LC3)-interacting region, Lir) που φέρουν οι προσαρμοστές, η οποία αναγνωρίζεται από τις πρωτεΐνες ATG8. Τελικά, τα συσσωματώματα πρωτεϊνών μεταφέρονται στον αυλό του αυτοφαγοσώματος (Liu et al., 2016; Belgrad et al., 2020).

Από το σύνολο των ATGs που έχουν ανακαλυφθεί, η πρωτεΐνη ATG5 είναι ιδιαίτερα σημαντική για την αυτοφαγία καθώς είναι αναπόσπαστη για το σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος (Ye et al., 2018). Οι μορφές αυτοφαγίας που περιγράφηκαν παραπάνω, αποτελούν μορφές κανονικής αυτοφαγίας. Η μη κανονική αυτοφαγία, χαρακτηρίζεται από σχηματισμό αυτοφαγικού κυστιδίου, χωρίς τη συμβολή μερικών πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην κανονική μακροαυτοφαγία για το σχηματισμό αυτοαφαγοσώματος ή την επέκτασή του. Για παράδειγμα έχει περιγραφεί αυτοφαγία που δεν απαιτεί την πρωτεΐνη Beclin-1 για το σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος ή τις πρωτεΐνες ATG5, ATG7 και LC3 για την επέκτασή του. Η τελευταία ωστόσο, παρατηρήθηκε σε εμβρυϊκούς ιστούς με στόχο την καταστροφή μιτοχονδρίων, ενώ παράλληλα ήταν ενεργή και η κανονική αυτοφαγία. Παρόλα αυτά, η ATG5 έχει φανεί πως είναι κρίσιμη τόσο στα κανονικά όσο και στα μη κανονικά μονοπάτια αυτοφαγίας (Codogno et al., 2011; Ye et al., 2018). Γενετική απαλοιφή του γονιδίου της, καταστέλλει την αυτοφαγία, ενώ ολική απαλοιφή του είναι θνησιγόνος μετά τη γέννηση. Για αυτό το λόγο το Atg5 αποτελεί συχνά γονίδιο-στόχο ιστοειδικά, σε μελέτες αυτοφαγίας. Εμπλέκεται ακόμα σε πολλές ανοσολογικές λειτουργίες όπως η αρνητική ρύθμιση της έμφυτης αντιικής ανοσολογικής απόκρισης, η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός λεμφοκυττάρων και η αντιγονοπαρουσίαση, τις οποίες φαίνεται να ρυθμίζει μέσω της αυτοφαγίας. Ακόμα, στην τροποποιημένη μορφή της, κατόπιν αφαίρεσης μερικών αμινοξέων, λειτουργεί για την επαγωγή απόπτωσης (Ye et al., 2018).

# 1.2.1 Αυτοφαγία στα ολιγοδενδροκύτταρα

Παρόλο που έχει μελετηθεί εκτενώς στα νευρικά κύτταρα, η αυτοφαγία στα νευρογλοιακά κύτταρα είναι λιγότερο μελετημένη, παρά την εμπλοκή της τόσο στην ανάπτυξη όσο και σε ασθένειες. Τα ολιγοδενδροκύτταρα υποβάλλονται σε σημαντικές μορφολογικές και λειτουργικές αλλαγές όπως η αυξημένη παραγωγή λιπιδίων και πρωτεϊνών και η συμπύκνωση των μεμβρανών της μυελίνης, επομένως η αυτοφαγία είναι απαραίτητη όχι μόνο στη λειτουργία αλλά και στην ανάπτυξή τους. Η έκφραση των *Atg* γονιδίων ποικίλει στα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης των ολιγοδενδροκύτταρα χρειάζεται να παράγουν μεγάλα ποσά μεμβρανικών πρωτεϊνών, αναγκαίων για τη συμπύκνωση και τη σταθεροποίηση της μυελίνης (Lin and Popko, 2009). Η ικανότητα των ολιγοδενδροκυττάρων να συμπυκνώνουν ή να αφαιρούν ταχέως επιπλέον στρώσεις μυελίνης υπό φυσιολογικές συνθήκες, υποδεικνύει πως υπάρχει κάποιος έλεγχος της ανακύκλωσης των

κυτταροπλασματικών υλικών σε αυτά, επομένως η αυτοφαγία μπορεί να κατέχει κάποιο ρόλο στη δομική πλαστικότητα των ολιγοδενδροκυττάρων (Belgrad et al., 2020).

## 1.2.2 Ρόλος της αυτοφαγίας στη μυελίνη του KNS και ΠNS

Προηγούμενες μελέτες, διερευνώντας το ρόλο της αυτοφαγίας στη μυελίνη του ΠΝΣ, έδειξαν πως μεσολαβεί στην αποδόμηση της μυελίνης μετά από τραυματισμό νεύρων. Πιο συγκεκριμένα, κατόπιν τραυματισμού στα περιφερικά νεύρα, ενεργοποιείται ισχυρά μια επιλεκτική μορφή αυτοφαγίας στα κύτταρα Schwann, η οποία ονομάστηκε μυελινοφαγία, για την πέψη των πρωτεϊνών και των λιπιδίων της μυελίνης, που συνεισφέρει τελικά στην επιδιόρθωση της βλάβης (Gomez-Sanchez et al., 2015).

Στο ΚΝΣ, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει πως η αυτοφαγία αποτελεί βασικό ομοιοστατικό μονοπάτι των ολιγοδενδροκυττάρων. Η αυτοφαγία είναι απαραίτητη για τη διαφοροποίηση και την επιβίωση των OPCs αλλά και για τη σωστή δημιουργία της μυελίνης. Πιο συγκεκριμένα, OPCs με απαλοιφή της αυτοφαγίας αδυνατούν να διαφοροποιηθούν σε ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα (Bankston et al., 2019; Ktena et al., 2022) και οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο. Μια μικρή μερίδα από αυτά, που επιβιώνει, ωριμάζει σε ολιγοδενδροκύτταρα που δημιουργούν μυελίνη με ανώμαλη δομή, ξεδιπλωμένη ή με εγκλεισμένο κυτταρόπλασμα εντός της μεμβράνης (Bankston et al., 2019). Έχει παρατηρηθεί πως ο σχηματισμός και η όξυνση του αυτοφαγοσώματος είναι μια διαδικασία που μπορεί να συμβεί τόσο στο σώμα του ολιγοδενδροκυττάρου, όσο και στις προεξογές του, επιτρέποντας την αποδιάταξη τόσο κυτταροπλασματικών όσο και μεμβρανικών συστατικών της μυελίνης. Επιπλέον, η δυνατότητά του να μετακινείται από τις προεξογές, στο σώμα του ολιγοδενδροκυττάρου, δείχνει πως η αυτοφαγία μπορεί να ρυθμίζει και να είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη της μυελίνης (Bankston et al., 2019; Aber et al., 2022). Οι βασικές πρωτεΐνες της μυελίνης MBP και PLP έχουν ανιχνευθεί στα αυτοφαγοσώματα, γεγονός που υποδεικνύει την αποδιάταξη τους μέσω αυτοφαγίας (Aber et al., 2022; Ktena et al., 2022). Μάλιστα, παρεμπόδιση της αυτοφαγικής λειτουργίας οδηγεί σε συσσώρευση μη λειτουργικής PLP (Ktena et al., 2022). Συνεισφέρει ακόμα, στην αποκατάσταση κατόπιν τραυματισμού του νωτιαίου μυελού. Μετά τον τραυματισμό παρατηρείται απώλεια μυελίνης η οποία καταστράφηκε και κατόπιν απομακρύνθηκε μέσω αυτοφαγίας (Saraswat Ohri et al., 2018). Απαλοιφή της αυτοφαγίας από ολιγοδενδροκύτταρα μυών έγει φανεί πως προκαλεί διαταραγμένους φαινοτύπους μυελίνης, όπως απώλεια μυελίνης, διαχωρισμό των μεμβρανών της μυελίνης και χαλάρωση του μυελινικού καλύμματος, αλλά και νευροεκφυλισμό των αξόνων (Yang, 2019; Aber et al., 2022; Ktena et al., 2022). Εκτός από τις διαταραγές στη μυελίνη, οι μύες με γενετική απαλοιφή της αυτοφαγίας από τα ολιγοδενδροκύτταρα παρουσιάζουν κινητικά ελλείματα, σωματικό ρίγος (Aber et al., 2022), ελλείματα στην κινητική μάθηση (Ktena et al., 2022) και γενικότερα ένα φαινότυπο πρόωρης διαταραχής της εγκεφαλικής λειτουργίας, ακόμα και σε νεαρά ζώα (Yang, 2019).

# 1.3 Γήρανση

Η μελέτη της γήρανσης αποκτά αυξανόμενη σημασία τις τελευταίες δεκαετίες, ιδιαίτερα στο Δυτικό κόσμο, λόγω του διαρκώς αυξανόμενου πληθυσμού γηραιότερων ηλικιών και των συνεπακόλουθων προβλημάτων υγείας. Η μελέτη παθολογιών και καταστάσεων υγείας κατά τη γήρανση αυξάνεται διαρκώς, ώστε οι ανάγκες του ηλικιωμένου πληθυσμού να λαμβάνονται υπόψη στη χάραξη πολιτικών και την οργάνωση των υπηρεσιών υγείας (Balcombe and Sinclair, 2001; Evered and Whelan, 2008, p.17). Μέχρι στιγμής δεν έχει δοθεί ακριβής ορισμός που περιγράφει τη γήρανση, αλλά από τις μελέτες της απορρέει πως είναι μια διαδικασία παγκόσμια, ενδογενής, εκφυλιστική και προοδευτική που συχνά συνοδεύεται και από παθολογίες. Κάποιες θεωρίες την αποδίδουν σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, συσσώρευση ανεπιθύμητων προϊόντων στα κύτταρα, εξάντληση αναντικατάστατων συστατικών, αυτοανοσία ή μέρος της ανάπτυξης που ελέγχεται γονιδιακά (Balcombe and Sinclair, 2001).

# 1.3.1 Γήρανση σε ολιγοδενδροκύτταρα και μυελίνη

Στο ΚΝΣ δομές όπως ο φλοιός, η λευκή ουσία και τα οπτικά νεύρα υφίστανται σημαντικό και μη αντιστρεπτό εκφυλισμό κατά τη γήρανση. Το οπτικό νεύρο, αποτελείται κυρίως από τους άζονες των νευρικών κυττάρων που ξεκινούν από τον αμφιβληστροειδή και καταλήγουν στον οπτικό φλοιό. Οι άζονες αυτοί είναι σχεδόν πλήρως μυελινωμένοι κατά την ενηλικίωση αλλά υφίστανται εκφυλισμό, οι ίδιοι και η μυελίνη που τους περιβάλλει, κατά τη γήρανση, που συνοδεύεται και από ανεπάρκεια όρασης (Zhi et al., 2023). Οι γνωστικές ανεπάρκειες που παρατηρούνται σε ανθρώπους και άλλα θηλαστικά κατά τη γήρανση, αποδιδόντουσαν για πολύ καιρό σε απώλεια και εκφυλισμό νευρώνων στο φλοιό των ζώων. Πλέον είναι γνωστικό πως όλες αυτές οι ανεπάρκειες έχουν πιο εκτεταμένη βάση. Με την ηλικία, το μυελινικό κάλυμμα υφίσταται επίσης εκφυλιστικές δομικές αλλαγές (Peters, 2002). Έχει φανεί πως η μυελίνη είναι από τις πιο επιρρεπείς δομές του ΚΝΣ στη γήρανση και της επιπτώσεις της (Xie et al., 2014). Οι επιδράσεις της γήρανσης στη μυελίνη είναι παράγωγή μυελίνης. Συμβαίνουν συνεπώς αλλαγές και στα ολιγοδενδροκύτταρα που σχηματίζουν μυελίνη κατά τη γήρανση.

Η πιο συχνή από αυτές τις αλλαγές είναι ο διαχωρισμός των μεμβρανών της μυελίνης (myelin split) με την παγίδευση πυκνού κυτταροπλάσματος. Πρόκειται για το κυτταρόπλασμα του ολιγοδενδροκυττάρου που δημιουργεί την αντίστοιχη μυελίνη και μπορεί να περιέχει έγκλειστα, λυσοσώματα ή κυστίδια. Έχει επιπλέον υποστηριχθεί ότι η παρουσία πυκνού κυτταροπλάσματος στο μυελινικό κάλυμμα είναι ενδεικτικό του εκφυλισμού του. Η διόγκωση των αξόνων (balloons) είναι μια ακόμα μορφή εκφυλισμού που σχετίζεται με τη γήρανση. Πρόκειται για στρογγυλές, σφαιρικές κοιλότητες που προκαλούν διόγκωση στη μεμβράνη της μυελίνης. Μπορεί να είναι μικρές φυσαλίδες του κυτταροπλάσματος μέσα στη μυελίνη, ή μεγαλύτερες σφαίρες που περιέχουν υγρό. Έχουν παρατηρηθεί και σε διαγονιδιακά ποντίκια με ελλείματα ή υπερβολική ποσότητα της PLP. Ακόμα, κατά τη γήρανση στη μυελίνη παρατηρούνται συχνότερα καλύμματα με πλεονάζουσα μυελίνη, στο εσωτερικό των οποίων ο άξονας βρίσκεται στην άκρη της άφθονης μυελίνης. Για αυτές τις δομές πιστεύεται ότι ευθύνεται η συνεχής σύνθεση μυελίνης με την ηλικία, η οποία δε ρυθμίζεται επαρκώς. Όλες οι αλλαγές που προαναφέρθηκαν, επηρεάζουν την ακεραιότητα της μυελίνης και οδηγούν σε συμπεριφορικά ελλείματα καθώς επιφέρουν αλλαγές στην ταχύτητα μετάδοσης σήματος των νευρικών κυττάρων, διαταράσσοντας τα νευρωνικά κυκλώματα (Peters, 2002).

Τα ολιγοδενδροκύτταρα που περιέχουν πυκνά κυτταροπλασματικά έγκλειστα κατά τη γήρανση, είναι συνδεδεμένα με τις αντίστοιχες μεμβράνες μυελίνης που υφίστανται εκφυλισμό και περιέχουν επίσης πυκνές δομές. Θεωρείται ότι οι ουσίες στα κυτταροπλασματικά έγκλειστα προκύπτουν από μετακίνηση υλικών από τη μεμβράνη προς το κυτταρικό σώμα του ολιγοδενδροκυττάρου και περιέχουν θραύσματα μυελίνης. Η αποσύνθεση μερικών μεμβρανών με την ηλικία, δείχνει ότι το μητρικό ολιγοδενδροκύτταρο δεν είναι ικανό να τις συντηρήσει (Peters, 2002). Η αδυναμία του να επεξεργαστεί την ανακύκλωση και ομοιόσταση κυτταροπλασματικών δομών κατά τη γήρανση μπορεί να συνδέεται με τη μείωση της αυτοφαγικής δραστηριότητας σε αυτές τις ηλικίες (Yang, 2019).

# 1.3.2 Αυτοφαγία και γήρανση

Η προστατευτικές δράσεις που ασκεί η αυτοφαγία στην ομοιόσταση του κυττάρου ελαττώνονται με την ηλικία. Μερικά γονίδια της αυτοφαγίας, όπως τα Atg5, Atg7 και Beclin 1 είναι λιγότερο ενεργοποιημένα κατά τη γήρανση (Tabibzadeh, 2023), ωστόσο άλλα όπως το Map1lc3, περισσότερο (Young et al., 2009). Η σχέση της αυτοφαγίας με τη γήρανση δεν έχει ακόμα διαλευκανθεί πλήρως, καθώς φαίνεται πως η αυτοφαγία ασκεί ανασταλτική αλλά και επαγωγική δράση στη γήρανση. Από τη μια μεριά, απαλοιφή της αυτοφαγίας σε διάφορες ηλικίες επιφέρει φαινότυπο πρόωρης γήρανσης, όπως έχει φανεί σε ζώα με απαλοιφή των γονιδίων Atg7 ή Atg5. Αυτός περιλαμβάνει συσσωρευμένα και κατεστραμμένα μιτογόνδρια, λιπίδια και πρωτεΐνες, ακόμα και αυξημένη λιποφουσκίνη, μια ουσία που είναι ενδεικτική της γήρανσης (Tabibzadeh, 2023). Επιπλέον είναι χρήσιμη και στην πρόληψη φαινοτύπων γήρανσης καθώς επαναφορά της λειτουργίας των αυτοφαγικών γονιδίων στα επίπεδα του νέου οργανισμού, μπορεί να αντισταθμίσει τα ελλείματα και τις βλάβες που σχετίζονται με τη γήρανση (Yang et al., 2010). Από την άλλη μεριά, έχει δειχθεί πως η αυτοφαγία μπορεί να λειτουργεί σαν έναυσμα για την επαγωγή της γήρανσης, είναι ενεργή στα γηραιά κύτταρα και μερικές πρωτεΐνες της αυξημένες. Στην ίδια μελέτη δείχτηκε πως καταστολή γονιδίων αυτοφαγίας καθυστερεί τη γήρανση και την έκλυση παραγόντων που σχετίζονται με αυτή. Μάλιστα, φαίνεται πως η αυτοφαγία λειτουργώντας καταβολικά, προμηθεύει το κύτταρο με αμινοξέα, για τη σύνθεση αυτών των παραγόντων κατά την επαγόμενη γήρανση (Young et al., 2009).

# Σκοπός της εργασίας

Παρά το γεγονός ότι ο ρόλος της αυτοφαγίας έχει μελετηθεί στα ολιγοδενδροκύτταρα και τη μυελίνη κατά την ενήλικη ζωή, η μελέτη της κατά τη γήρανση είναι περιορισμένη. Η παρούσα εργασία έχει στόχο τη μελέτη της επίδρασης της απαλοιφής της αυτοφαγίας από ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα γηραιών μυών, ηλικίας 22 μηνών, στην ομοιόσταση της μυελίνης και των αξόνων του ΚΝΣ. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω γενετικής απαλοιφής του γονιδίου *atg5* ειδικά στα ολιγοδενδροκύτταρα των μυών και ιστολογικής ανάλυσης δομών του ΚΝΣ, για την παρατήρηση της κατάστασης της μυελίνης, των αξόνων και της απόκρισης άλλων κυτταρικών πληθυσμών.

## 2. Υλικά και Μέθοδοι

## 2.1 Πειραματόζωα

Τα πειραματικά ζώα που γρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη ήταν μύες γενετικού υποβάθρου C57BL/6.  $\Delta$ ιασταυρώθηκαν διαγονιδιακοί μύες  $Atg5^{F/F}$  και  $plpCre^{ERT2}$  και χρησιμοποιήθηκαν οι αρσενικοί απόγονοι  $plpCre^{ERT2}$ ;  $atg5^{F/F}$ , οι οποίοι εκφράζουν το γονίδιο για την πρωτεΐνη Cre recombinase υπό τον υποκινητή πρωτεΐνης PLP, που είναι ενεργός στα ολιγοδενδροκύτταρα. Η Cre<sup>ERT2</sup> μορφή της Cre recombinase φέρει μια τριπλή μετάλλαξη G400V/M543A/L544A, του ανθρώπινου υποδοχέα οιστρογόνων και είναι ευαίσθητη σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις ταμοξιφαίνης (Leone et al, 2003). Επιπλέον, οι μύες φέρουν τα αλληλόμορφα  $Atg5^{F/F}$ , στα οποία το εξώνιο 3 του γονιδίου Atg5, πλαισιώνεται από αλληλουχίες loxP, τις οποίες αναγνωρίζει η Cre recombinase (Σχήμα 5) (Hara et al., 2006). Στους μύες χορηγήθηκε ταμοξιφαίνη (Sigma-Aldrich, T5648) με σκοπό την επαγωγή γενετικής υπό συνθήκη απαλοιφής (conditional Knockout, cKO) του γονιδίου atg5, υπό τη δράση του ενζύμου Cre recombinase, στα κύτταρα που ο υποκινητής του γονιδίου για την PLP είναι ενεργός, δηλαδή στα ολιγοδενδροκύτταρα. Αυτοί οι μύες αποτελούν την cKO ομάδα. Ταμοξιφαίνη χορηγήθηκε επίσης στους μύες της ομάδας ελέγχου, που είχαν γονότυπο  $Atg5^{F/F}$ . Η ταμοξιφαίνη χορηγήθηκε με ενδοπεριτονιακές ενέσεις σε δόση 1mg/μυ/ημέρα για 10 ημέρες με ενδιάμεσο διάλειμμα 2 ημερών (Leone et al, 2003), στην ηλικία των 2,5 μηνών και τα ζώα θυσιάστηκαν στην ηλικία των 22 μηνών. Οι γονότυποι των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν ελέγχθηκαν μέσω Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).



Σχήμα 5: (Α) Σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου CreERT2 υπό τον υποκινητή της PLP (Προσαρμογή εικόνας από Leone et al., 2003). (Β) Στόχευση και γενετική απαλοιφή του εξωνίου 3 του γονιδίου *atg5*. Αναπαράσταση του αγρίου τύπου αλληλομόρφου, του αλληλομόρφου *Flox* και του ελλειμματικού γονιδίου κατόπιν ανασυνδυασμού από την Cre recombinase (Προσαρμογή εικόνας από Hara et al., 2006).

## 2.2 Γονοτύπηση

## Απομόνωση γενωμικού DNA από ουρά ζώου

Ένα τμήμα της ουράς του ζώου αποκόπτεται, ώστε να απομονωθεί από αυτό το γενωμικό DNA του ζώου για τη γονοτύπηση. Το τμήμα ουράς επωάζεται με 80 μl διαλύματος EDTA 0,4 mM, NaOH 50mM σε αναλογία 1:1, για 20 λεπτά στους 95°C και κατόπιν ανακινείται έντονα σε αναδευτή Vortex για τουλάχιστον 10 δευτερόλεπτα. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται ακόμα δύο φορές. Στη συνέχεια, προστίθενται στο δείγμα 80 μl διαλύματος εξουδετέρωσης (Tris HCl 40 mM, pH=8,0), ώστε να πραγματοποιηθεί εξουδετέρωση του NaOH από το HCl. Τελικά, αποθηκεύεται στους -20°C ώστε να χρησιμοποιηθεί στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

## Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

### Πρόγραμμα atg5 PCR

Βήμα	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος
1	94	3 min
2	94	30 sec
3	60	30 sec
4	72	1 min
5	Go to step 2, 29 times	
6	72	6 min
7	4	$\infty$

### Πρωτόκολλο αντίδρασης:

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
DNA	3 µl
Εκκινητές (0,4 μΜ συγκέντρωση κάθε εκκινητή)	0,6 μl από κάθε εκκινητή (3 εκκινητές)
dNTPs (2mM τελική συγκέντρωση)	2 µl
Minotech PCR buffer με 15 mM MgCl2 (10X)	2 µl
Taq polymerase Minotech (2u/µl)	0,4 µl
ddH2O	10,8 µl
Τελικός όγκος	20 µl

### Αναμενόμενες μπάντες ηλεκτροφόρησης:

350 bp	+/+
750 bp	flox / flox
350 & 750 bp	flox / +

Σε 1% gel αγαρόζης, 90V

Εκκινητές:

Atg5-1 exon3-1 (forward)	5-GAA TAT GAA GGC ACA CCC CTG AAA TG-3	26nt
Atg5-2 check2 (forward)	5-ACA ACG TCG AGC ACA GCT GCG CAA GG-3	26nt
Atg5-3 short2 (reverse)	5-GTA CTG CAT AAT GGT TTA ACT CTT GC-3	26nt

# Про́ураµµа plpCre PCR

Βήμα	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος
1	94	3 min
2	94	30 sec
3	59	30 sec
4	72	1 min
5	Go to step 2, 31 times	
6	72	5 min
7	4	8

Πρωτόκολλο αντίδρασης:

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
DNA	1 μl
Εκκινητές (0,4 μΜ συγκέντρωση κάθε εκκινητή)	1 μl από κάθε εκκινητή (2 εκκινητές)
dNTPs (2mM τελική συγκέντρωση)	2 µl
Minotech PCR buffer με 15 mM MgCl2 (10X)	2 µl
Taq polymerase Minotech (2u/µl)	0,4 µl
ddH2O	12, µl
Τελικός όγκος	20 µl

Αναμενόμενες μπάντες ηλεκτροφόρησης:

500 bp	plp-Cre <sup>ERT2</sup> +
-	plp-Cre <sup>ERT2</sup> -

Σε 1% gel αγαρόζης, 90V

Εκκινητές:

plp Intron 1 (forward)	5-CAC TCT GTG CTT GGT AAC ATG G-3	22nt
plp Cre (reverse)	5-TCG GAT CCG CCG CAT AAC C-3	19nt

## 2.3 Προετοιμασία ιστού του ΚΝΣ για ανοσοϊστοχημεία

## 2.3.1 Μονιμοποίηση και απομόνωση εγκεφάλου από πειραματόζωα

Μέσω διακαρδιακής διάχυσης 4% Παραφορμαλδεΰδης (PFA) σε 1X PBS, επιτυγχάνεται η μονιμοποίηση του εγκεφάλου του ζώου.

## Παρασκευή διαλύματος PBS 10X

 $\Sigma\epsilon$ 1L ddH2O διαλύονται 12,8 g Na2HPO4, 4,4 g Na2H2PO4, 70,1 g NaCl και 2 g KCl.

# Παρασκευή 4% PFA σε 1X PBS

100 ml 10X PBS διαλύονται σε 400 ml ddH2O ώστε να αραιωθεί σε 2X PBS. Στη συνέχεια, 100 ml από το 2X PBS αναμειγνύονται με 100 ml 8% PFA (Sigma-Aldrich, Cat# 16005) και τελικά παρασκευάζεται 4% PFA σε 1X PBS.

Για την παρασκευή του μείγματος αναισθησίας, αναμειγνύονται κεταμίνη (Narketan) με ξυλαζίνη (Xylapan) σε αναλογία 4:3.

Αρχικά, το ζώο αναισθητοποιείται με ενδοπεριτοναϊκή ένεση με μείγμα κεταμίνης/ξυλαζίνης. Χορηγούνται 100μl μείγματος σε κάθε ζώο. Στην απαγωγό ατμών, τοποθετείται ο μυς στην πλάτη, με τα τέσσερα άκρα του στερεωμένα ώστε να παραμείνει ακίνητος κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. Σε πάγο είναι τοποθετημένα δύο falcon, ένα με 1X PBS και ένα με την 4% PFA σε 1X PBS. Κόβεται το δέρμα στο στέρνο του ζώου με ψαλίδι ώστε να μείνουν εκτεθειμένα το διάφραγμα και το ήπαρ. Με τομή από το διάφραγμα κατά μήκος των πλευρών, εκτίθεται πλήρως η καρδιά. Με λαβίδα στερεώνεται η καρδιά και η βελόνα της αντλίας εισχωρείται στην αριστερή κοιλία υπό γωνία σχεδόν παράλληλη με τον άξονα της καρδιάς. Παράλληλα τρυπάται ο δεξής κόλπος ώστε να βρίσκει από εκεί διέξοδο το αίμα του ζώου. Η αντλία τότε ξεκινά να διοχετεύει στο ζώο τα διαλύματα της επιλογής, με σταθερό ρυθμό. Αρχικά, το σωληνάκι παροχής της αντλίας τοποθετείται στο falcon με το 1X PBS και αφήνονται 25 ml PBS να διοχετευτούν στο ποντίκι. Παράλληλα παρατηρείται πως το ήπαρ του ζώου αποκτά ωχρή όψη. Στη συνέχεια το σωληνάκι παροχής μεταφέρεται στο falcon με την 4% PFA από την οποία διοχετεύονται 30 ml. Καθώς η 4% PFA εισέρχεται στην κυκλοφορία παρατηρούνται σημάδια όπως σωματικοί σπασμοί ή ανύψωση της ουράς του ζώου. Την ολοκλήρωση αυτής της διαδικασίας ακολουθεί η εκτομή του εγκεφάλου του ποντικιού (Wu et al., 2021).

Με μία οριζόντια τομή στο λαιμό με ψαλίδι απομονώνεται η κεφαλή του ζώου και με μια τομή κατά μήκος της γραμμής από το λαιμό προς τη μύτη αφαιρείται το δέρμα της κεφαλής, ώστε να εκτεθεί το κρανίο. Με ένα ψαλίδι, αφαιρούνται τα οστά στο οπίσθιο μέρος του κρανίου και υπολείμματα μυών. Τοποθετώντας το ψαλίδι στο ινιακό τρήμα, γίνονται δύο τομές στα πλευρικά τμήματα του κρανίου και μία κατά μήκος της ραχιαίας πλευράς του ώστε να αφαιρεθεί πλήρως το κρανίο, με τη βοήθεια λαβίδας. Επίσης αφαιρούνται οι μήνιγγες (Wu et al., 2021).

Κατόπιν επιτυχούς διάχυσης με 4% PFA, ο εγκέφαλος έχει συσταλεί ελαφρώς, είναι σκληρότερος και έχει ωχρή καφέ όψη. Μετά την εκτομή του παραμένει σε 4% PFA για 30 λεπτά και στη συνέχεια γίνεται πλύση με 1X PBS. Τέλος φυλάσσεται σε διάλυμα 30% σουκρόζης σε 1X PBS, 0,01% NaN3, για προστασία από το κρύο και μικροοργανισμούς, όπου και παραμένει στους 4°C (Wu et al., 2021).

## 2.3.2 Προετοιμασία εγκεφάλου για κρυοτομές

## Έγκλειση εγκεφάλου σε gelatin – sucrose gel και πάγωμα

To gel 7,5% gelatin/ 15% sucrose (Cat. No. G-2500, Sigma) θερμαίνεται σε υδατόλουτρο στους 37°C ώστε να ρευστοποιηθεί. Στον πυθμένα από πηγάδι ενός 6-well plate απλώνεται μια λεπτή στρώση του μείγματος gelatin/sucrose με σταγονόμετρο και αφήνεται για μία ώρα στους 4°C ώστε να στερεοποιηθεί. Ο μονιμοποιημένος εγκέφαλος που πρόκειται να εγκλεισθεί φυλάσσεται από τη διαδικασία της μονιμοποίησης και εκτομής σε διάλυμα σουκρόζης 30%. Αφήνεται να στεγνώσει σε χαρτί Whatman και τοποθετείται στο well, πάνω από το στερεό gel. Στη συνέχεια, προστίθεται gelatin/sucrose ώστε να καλύψει τον εγκέφαλο και αφήνεται να στερεοποιηθεί επίσης στους 4°C ονernight.

Με ένα ξυράφι αποκόβεται ένα block παγωμένης gelatin/sucrose που περιέχει τον εγκέφαλο με συγκεκριμένο προσανατολισμό για τις τομές του στην κρυοτόμο. Το block κολλάται σε μια βάση με κόλα για ιστό. Σε ένα μεγάλο beaker τοποθετείται ξηρός πάγος και μέσα σε αυτό ένα μικρότερο beaker με μεθυλοβουτάνιο. Με ένα θερμόμετρο μέσα σε αυτό ελέγχεται η θερμοκρασία να βρίσκεται μεταξύ -35°C και -45°C και τότε μόνο ο εγκλεισμένος εγκέφαλος τοποθετείται στο μεθυλοβουτανίου για περίπου 1 λεπτό. Με την τοποθέτηση του εγκεφάλου, βγαίνουν φυσαλίδες στο διάλυμα, ενώ όσο παγώνει σταματάνε. Ο εγκέφαλος απομακρύνεται από το μεθυλοβουτάνιο όταν έχουν σταματήσει πλήρως να βγαίνουν οι φυσαλίδες, τυλίγεται με αλουμινόχαρτο και φυλάσσεται στους -80°C.

## Εμβάπτιση αντικειμενοφόρων πλακών

Η διαδικασία αυτή γίνεται με σκοπό να προετοιμαστούν οι αντικειμενοφόροι πλάκες που χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για τη λήψη κρυοτομών, ώστε να είναι καθαρές και καλυμμένες με gelatin προκειμένου να κολλήσουν οι τομές.

## Παρασκευή gelatin

Σε ένα beaker σε θερμαινόμενο stirrer διαλύονται 1,25 g gelatin (Fluka Biochemika, Cat. No. 48722) σε 250 ml ddH2O αναδευόμενα με μαγνήτη. Αφού κρυώσει προστίθενται 0,125 g chrome alum.

Οι πλάκες που πρόκειται να καλυφθούν τοποθετούνται αρχικά σε γυάλινα racks και βυθίζονται δύο φορές σε ddH2O και δύο φορές σε 100% αιθανόλη ώστε να ξεπλυθούν. Επωάζονται στους 55°C για 10 λεπτά και κατόπιν αφήνονται να επιστρέψουν σε θερμοκρασία δωματίου για να τοποθετηθούν στην gelatin. Παραμένουν εκεί για 5 λεπτά και τελικά αφήνονται να στεγνώσουν overnight.

## Κρυοτομές εγκεφάλου

Η κρυοτόμος (LEICA) ρυθμίζεται σε θερμοκρασία -25°C. Ο παγωμένος εγκέφαλος στη gelatin/sucrose κολλάται και σταθεροποιείται στη βάση της κρυοτόμου με κόλλα για ιστό. Συλλέχθηκαν τομές στο στεφανιαίο (coronal) επίπεδο του εγκεφάλου, πάχους 12 μm, στις εμβαπτισμένες αντικειμενοφόρους πλάκες οι οποίες κατόπιν φυλάχθηκαν σε θερμοκρασία -20°C.

## 2.3.3 Ανοσοϊστοχημεία

Η ανοσοϊστοχημεία στις κρυοτομές εγκεφάλου των γηραιών ζώων πραγματοποιείται με σκοπό τη σήμανση αντιγόνων-μαρτύρων κυττάρων ενδιαφέροντος, με φθορίζοντα αντισώματα, στις στεφανιαίες εγκεφαλικές τομές, για την παρακολούθησή τους στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.

## Διαλύματα:

Blocking solution: 5% Bovine serum albumin (BSA), 0,5% Triton X-100, σε 1X PBS.

Primary antibody solution: διάλυμα των πρωτογενών αντισωμάτων στις αναλογίες που αναγράφονται παρακάτω, σε blocking solution

Secondary antibody solution: διάλυμα των δευτερογενών αντισωμάτων και DAPI στις αναλογίες που αναγράφονται παρακάτω, σε blocking solution

Οι πλάκες με τις τομές έργονται σε θερμοκρασία δωματίου και διαγράφονται περιμετρικά με υδρόφοβο Dako Pen (Cat. No. S200230, Dako, Agilent Technologies) ώστε να σχηματιστεί ένα πλαίσιο από το οποίο δεν μπορούν να διαρρεύσουν τα διαλύματα που πρόκειται να προστεθούν. Στη συνέγεια, για δευτερογενή μονιμοποίηση των τομών, τοποθετείται 100% ακετόνη -20°C σε γυάλινο rack για αντικειμενοφόρους, στο οποίο βυθίζονται οι πλάκες και παραμένουν στους -20°C για 10 λεπτά. Ακολουθούν τρείς πεντάλεπτες πλύσεις των τομών σε 1X PBS σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα γίνεται κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων με το Blocking solution. Απλώνονται 200 μl Blocking solution σε κάθε πλάκα και επωάζονται για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, απομακρύνεται το διάλυμα αυτό και προστίθενται 200μl Primary antibody solution σε κάθε πλάκα, με το οποίο επωάζονται στους 4°C για 18 ώρες. Ακολουθούν τρείς πεντάλεπτες πλύσεις με 1X PBS σε θερμοκρασία δωματίου πριν την τοποθέτηση 200 μl Secondary antibody solution σε κάθε πλάκα και την επώαση για 1,5 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι. Κατόπιν γίνονται ακόμα τρεις πεντάλεπτες πλύσεις με 1X PBS στο σκοτάδι, οι πλάκες σκουπίζονται ώστε να τοποθετηθούν 60 μl του μέσου προστασίας του φθορισμού Mowiol (Calbiochem, Cat. No. 475904) σε κάθε μια, και καλυπτρίδα (24mm x 50mm). Περιμετρικά της καλυπτρίδας απλώνεται βερνίκι νυχιών για την κάλυψη των κενών χώρων και μόνωση του χώρου των τομών. Τέλος, οι τομές παρατηρούνται και φωτογραφίζονται στο Συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (TCS SP8, LEICA DMI-8) και οι πλάκες αποθηκεύονται στους -20°C.

Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανοσοϊστοχημείας ήταν: antiadenomatous polyposis coli clone CC1 (APC/CC-1) (1:100, mouse, Millipore Cat# OP80), antiplatelet derived growth factor receptor alpha (PDGFRa) (1:100, rat, Millipore Cat# CBL1366), antiionized calcium binding adaptor molecule 1 (IBA1) (1:500, rabbit, Invitrogen Cat# PA5-21274), anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) (1:2000, mouse, Sigma-Aldrich Cat# G3893), anti-MBP (1:200, rat, Serotec).

Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν δευτερογενή αντισώματα σημασμένα με φθοροχρώματα Alexa Fluor 488, 555, 633, Cy3 (Invitrogen, Carlsbad, CA, 1:800). Το DAPI (Dako, Hamburg, Germany, 1:2000) χρησιμοποιήθηκε επίσης, για τη σήμανση και οπτικοποίηση των πυρήνων.

## Ανάλυση αποτελεσμάτων ανοσοϊστοχημείας

Στις εικόνες που αποκτήθηκαν από τις τομές κατόπιν ανοσοϊστοχημείας, ποσοτικοποιήθηκαν οι πληθυσμοί πρόδρομων, ώριμων ολιγοδενδροκυττάρων, αστροκυττάρων αλλά και η πυκνότητα των μικρογλοιακών κυττάρων, στο μεσολόβιο των γηραιών μυών με απαλοιφή του *atg5* και των γηραιών μυών της ομάδας ελέγχου. Επιλέχθηκε η κεντρική περιοχή του μεσολοβίου και αναλύθηκαν τρεις τομές από κάθε ζώο. Υπολογίστηκε ο αριθμός των PDGFRa–, CC1– και GFAP– θετικών κυττάρων και η πυκνότητα των IBA-1 μικρογλοιακών κυττάρων, ως προς το αντίστοιχο εμβαδό της περιοχής του μεσολοβίου, με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος ImageJ. Η στατιστική ανάλυση των τιμών των δύο ομάδων ζώων, πραγματοποιήθηκε με unpaired t-tests. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± SEM. Στατιστικά σημαντικά θεωρήθηκαν τα αποτελέσματα που p-value < 0,05. Η κατασκευή των διαγραμμάτων έγινε με το υπολογιστικό πρόγραμμα GraphPad Prism 8.

## 2.4 Προετοιμασία ιστού ΚΝΣ για Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης

## 2.4.1 Μονιμοποίηση και απομόνωση οπτικών νεύρων από πειραματόζωα

Μέσω διακαρδιακής διάχυσης 2,5% γλουταραλδεΰδης (GA) σε 0,1 M phosphate buffer (PB), επιτυγχάνεται η μονιμοποίηση ιστών του κεντρικού νευρικού συστήματος των μυών που πρόκειται να παρατηρηθούν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

## Παρασκευή διαλύματος 0,2 M PB

Σε beaker σε θερμαινόμενο stirrer διαλύονται 12g NaH2PO4(H2O) σε 500ml ddH2O και παράγεται το Διάλυμα Α. Σε ένα διαφορετικό beaker σε θερμαινόμενο stirrer διαλύονται 28,4g Na2HPO4 σε 1L ddH2O και παράγεται το Διάλυμα Β. Σε καθαρό σκεύος αναμειγνύονται 153,6 ml Διαλύματος Α και 500 ml Διαλύματος Β και παρασκευάζονται 0,2M PB. Προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή τιμή του pH=7,20, μπορεί να προστεθεί επιπλέον ποσότητα Διαλύματος Α ή Β αναλόγως, καθώς μετράται η τιμή pH του διαλύματος, σε θερμοκρασία 25°C.

## Παρασκευή 2,5% GA σε 0,1M PB

Με ογκομετρικό σωλήνα λαμβάνονται 250ml ddH2O και 250ml PB 0,2M και αναμειγνύονται στο δοχείο ενός φίλτρου, ώστε να ληφθεί τελικά υψηλά καθαρό διάλυμα PB 0,1M. 360ml του διαλύματος PB 0,1M, αναμειγνύονται με 40ml 2,5% GA, ώστε να παραχθεί το τελικό διάλυμα.

Για την παρασκευή του μείγματος αναισθησίας, αναμειγνύονται κεταμίνη (Narketan) με ξυλαζίνη (Xylapan) σε αναλογία 4:3.

Αρχικά, το ζώο αναισθητοποιείται με ενδοπεριτοναϊκή ένεση μείγματος κεταμίνης/ξυλαζίνης. Χορηγούνται 100μl μείγματος σε κάθε ζώο. Στην απαγωγό ατμών, τοποθετείται ο μυς στην πλάτη, με τα τέσσερα άκρα του στερεωμένα ώστε να παραμείνει ακίνητος κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. Σε πάγο είναι τοποθετημένα δύο falcon, ένα με 0,1M PB και ένα με 2,5% GA σε 0,1M PB, pH=7,20. Κόβεται το δέρμα στο στέρνο του ζώου με ψαλίδι ώστε να μείνουν εκτεθειμένα το διάφραγμα και το ήπαρ. Με τομή από το διάφραγμα κατά μήκος των πλευρών, εκτίθεται πλήρως η καρδιά. Με λαβίδα στερεώνεται η καρδιά και η βελόνα της αντλίας εισχωρείται στην αριστερή κοιλία υπό γωνία σχεδόν παράλληλη με τον άξονα της καρδιάς. Παράλληλα τρυπάται και ο δεξής κόλπος ώστε να βρίσκει από εκεί διέξοδο το αίμα του ζώου. Η αντλία τότε ξεκινά να διοχετεύει στο ζώο τα διαλύματα της επιλογής, με σταθερό ρυθμό. Αργικά, το σωληνάκι παρογής της αντλίας τοποθετείται στο falcon με το 0,1M PB και αφήνονται 25 ml PB να διοχετευτούν στο ποντίκι. Παράλληλα παρατηρείται πως το ήπαρ του ζώου αποκτά ωγρή όψη. Στη συνέγεια το σωληνάκι παροχής μεταφέρεται στο falcon με το διάλυμα 2,5% GA, 0,1M PB από το οποίο διοχετεύονται 30ml. Καθώς η 2,5% GA εισέρχεται στην κυκλοφορία παρατηρούνται σημάδια όπως σωματικοί σπασμοί ή ανύψωση της ουράς του ζώου. Την ολοκλήρωση αυτής της διαδικασίας ακολουθεί η απομόνωση των οπτικών νεύρων του μυός, για την οποία, ασκείται πίεση περιμετρικά του οφθαλμού με μία λαβίδα, ενώ με μία δεύτερη απομακρύνεται προσεκτικά ο οφθαλμός με το οπτικό του νεύρο. Τα νεύρα που συλλέγονται αποθηκεύονται σε διάλυμα 2,5% GA, 0,1M PB στους 4°C overnight και πραγματοποιούνται για 3 ημέρες πλύσεις με 0,1M PB. Τελικά, αποθηκεύονται σε διάλυμα 30% σουκρόζης σε 0,1 MPB, 0,05% NaN3, για προστασία από το κρύο και μικροοργανισμούς, όπου και παραμένουν στους 4°C (Wu et al., 2021).

Η περεταίρω προετοιμασία των δειγμάτων για παρακολούθηση στο Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης, πραγματοποιήθηκε από τη Μονάδα Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας, του Πανεπιστημίου της Λοζάνης στην Ελβετία. Τα δείγματα επωάστηκαν με 2% (wt/vol) τετροξείδιο του οσμίου και 1,5% (wt/vol) K4[Fe(CN)6] σε διάλυμα PB 100 mM για 1 ώρα σε πάγο. Ακολούθησε πλύση με νερό και τα δείγματα επωάστηκαν για 1 ώρα σε 1% (wt/vol) ταννικό οξύ σε PB 100 mM, και στη συνέχεια σε 1% (wt/vol) οξικό ουρανύλιο για 2 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τέλος, πραγματοποιήθηκε αφυδάτωση των δειγμάτων υπό διαβαθμίσεις συγκέντρωσης αιθανόλης, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και διήθηση με μείγμα αιθανόλης και Epon-Araldite (EMS). Μετά από αρκετούς κύκλους επωάσεων σε 100% Epon-Araldite, ακολούθησε ο εγκλεισμός των δειγμάτων για 24 ώρες στους 60°C (Kolotuev, 2014). Οι διαδικασίες αυτές πραγματοποιήθηκαν ταυτόχρονα στα δείγματα των μυών cKO και των μωών της ομάδας ελέγχου, ώστε να αποφευχθούν πιθανές επιδράσεις παραγόντων που προκύπτουν από τη μονιμοποίηση και τον εγκλεισμό των ιστών.

Τομές από τα blocks των εγκλεισμένων οπτικών νεύρων συλλέχθηκαν με τη χρήση μαχαιριού από διαμάντι 35° (Diatome, Biel, Switzerland) τοποθετημένο σε μικροτόμο Leica UC6 (Leica, Vienna). Τομές πάχους 70 nm λήφθηκαν σε επίπεδο κάθετο στον άξονα των νεύρων, σε απόσταση περίπου 1mm από την κεφαλή του νεύρου. Οι τομές συλλέχθηκαν σε πλέγματα άνθρακα με αυλακώσεις, επικαλυμμένα με πολυαιθεριμίδιο. Η παρακολούθηση και ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο FEI CM100 (Thermo Fischer Scientific) στα 80kV, εξοπλισμένο με κάμερα TVIPS, στο πρόγραμμα EMTVIPS. Η επεξεργασία και ανάλυση των εικόνων που αποκτήθηκαν έγινε με τη χρήση του προγράμματος Fiji.

#### Ανάλυση εικόνων Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου

Στις εικόνες που αποκτήθηκαν από το Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο καταμετρήθηκε η περίμετρος του κυτταροπλάσματος αξόνων, με σκοπό να υπολογιστούν κατόπιν οι διάμετροί τους. Σε συνδυασμό με αυτό μετρήθηκε και η περίμετρος των νευρικών ινών, δηλαδή του άξονα με τη μυελίνη που τον περιβάλλει, ώστε να υπολογιστεί ο λόγος g-ratio, που είναι ο λόγος της ακτίνας του άξονα, προς τη συνολική ακτίνα της νευρικής ίνας, για τους άξονες των οπτικών νεύρων των γηραιών μυών με cKO του *atg5* και των μυών της ομάδας ελέγχου. Τέλος, πραγματοποιήθηκε μέτρηση αξόνων με αποδιατεταγμένη μυελίνη και νευροεκφυλισμένων αξόνων. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος ImageJ. Η στατιστική ανάλυση των τιμών για τις δύο ομάδες ζώων, πραγματοποιήθηκε με unpaired t-tests, και για τις τιμές των διαμέτρων των αξόνων με two-way Analysis of Variance (ANOVA) test. Στατιστικά σημαντικά θεωρήθηκαν τα αποτελέσματα που p-value < 0,05. Η κατασκευή των διαγραμμάτων έγινε με το υπολογιστικό πρόγραμμα GraphPad Prism 8.

# 3. Αποτελέσματα

# 3.1 Η αυτοφαγία στα ολιγοδενδροκύτταρα είναι απαραίτητος μηχανισμός για τη διατήρηση της μυελίνης και της ακεραιότητας των αξόνων του ΚΝΣ κατά τη γήρανση

Με σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου της αυτοφαγίας στη διατήρηση της μυελίνης του ΚΝΣ κατά τη γήρανση, πραγματοποιήθηκε ιστολογική ανάλυση, με εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης, σε τομές οπτικού νεύρου, κάθετες στον άξονα του νεύρου, από τους μύες με cKO του atg5 και τους μύες της ομάδας ελέγχου, ηλικίας 22 μηνών (Εικόνα 1Α). Το οπτικό νεύρο είναι μια περιοχή που αποτελείται κυρίως από άξονες νευρώνων, το μεγαλύτερο ποσοστό των οποίων είναι πλήρως μυελινωμένο (Zhi et al., 2023), διακρίνονται εύκολα από τον περιβάλλοντα ιστό και είναι προσανατολισμένοι προς μια συγκεκριμένη κατεύθυνση (Berman et al., 2018). Για αυτούς τους λόγους είναι ιδανικό για μελέτη της υπερδομής της μυελίνης με Ηλεκτρονική μικροσκοπία. Σύμφωνα με την ανάλυση, οι μύες με cKO του atg5 είχαν σημαντικά αυξημένη αφθονία αξόνων με ξεδιπλωμένη μυελίνη αλλά και εκφυλισμένους άξονες (Εικόνα 1B). Προκειμένου να συγκριθεί το πάγος της μυελίνης που περιβάλει τους άξονες των δύο ομάδων ζώων, το οποίο μπορεί να δώσει μια εικόνα για την περιέλιξη των μεμβρανών, υπολογίστηκε ο λόγος g-ratio. Πρόκειται για το λόγο της ακτίνας του άξονα προς την ακτίνα της νευρικής ίνας, δηλαδή του άξονα μαζί με τη μυελίνη που τον περιβάλλει και είναι ενδεικτικός του πάγους της μυελίνης του άξονα (Σγήμα 6) (Paus and Toro, 2009). Η ανάλυση του g-ratio έδειξε πως οι άξονες των μυών cKO είχαν μια τάση για μικρότερα gratios, δηλαδή παχύτερα ή πιο εκτεταμένα στρώματα μυελίνης σε σύγκριση με τους μύες της ομάδας ελέγχου (Εικόνα 1Γ). Η πάχυνση αυτή μπορεί να αντικατοπτρίζει χαλάρωση στο περιτύλιγμα των στρωμάτων μυελίνης. Επιπλέον, δεδομένου ότι οι μεγαλύτερης διαμέτρου άξονες είναι πιο επιρρεπείς στον εκφυλισμό λόγω των αυξημένων απαιτήσεών τους σε ενέργεια (Perge et al., 2012), πραγματοποιήθηκε ανάλυση των διαμέτρων των αξόνων, ώστε να μελετηθεί αν οι διαταραχές της μυελίνης έχουν κάποια επίπτωση σε αυτούς. Η ανάλυση έδειξε πως οι μύες της ομάδας cKO είχαν μεγαλύτερη αφθονία αξόνων διαμέτρου <500nm σε σχέση με τους μύες της ομάδας ελέγχου. Αντίθετα, οι άξονες διαμέτρου >800nm ήταν μειωμένοι στους μύες με απαλοιφή της αυτοφαγίας από τα ολιγοδενδροκύτταρα (Εικόνα 1Δ). Υπήρξε δηλαδή μια τάση για ανακατανομή στα ποσοστά των διαμέτρων των αξόνων, προς τις χαμηλότερες τιμές, στα ζώα της ομάδας cKO. Ωστόσο, εφόσον η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική, η τάση αυτή μπορεί απλώς να υποδηλώνει, πως οι μεγάλης διαμέτρου άξονες είναι πιο ευάλωτοι στην περίπτωση της απαλοιφής της αυτοφαγίας.



**Σχήμα 6:** Σχηματική αναπαράσταση εγκάρσιας τομής ενός μυελινωμένου άξονα που υποδεικνύει το λόγο gratio (Paus and Toro, 2009).



**Εικόνα 1:** Η αυτοφαγία στα ολιγοδενδροκύτταρα είναι απαραίτητος μηχανισμός για τη διατήρηση της μυελίνης και των αξόνων του ΚΝΣ.

(A) Αντιπροσωπευτικές εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου τομών οπτικών νεύρων από μύες της ομάδας ελέγχου και μύες με απαλοιφή της αυτοφαγίας από τα ολιγοδενδροκύτταρα. Διακρίνονται εκφυλισμένοι άξονες (κίτρινος αστερίσκος) και άξονες με αποδιατεταγμένη μυελίνη (κόκκινα βέλη).

(B) Ποσοτικοποίηση των εκφυλισμένων αξόνων και των αξόνων με αποδιατεταγμένη μυελίνη σε οπτικά νεύρα μυών με απαλοιφή της αυτοφαγίας στα ολιγοδενδροκύτταρα και μυών της ομάδας ελέγχου.

(Γ) Το πάχος της μεμβράνης της μυελίνης εκτιμήθηκε υπολογίζοντας το λόγο g-ratio για τις νευρικές ίνες στις τομές οπτικών νεύρων μυών με cKO του *atg5* και μυών της ομάδας ελέγχου. Διάγραμμα του μέσου όρου

29

τιμών g-ratio για κάθε ομάδα ζώων και διάγραμμα της κατανομής των τιμών g-ratio ως προς τις αντίστοιχες τιμές διαμέτρου των αξόνων που μετρήθηκαν από τα ζώα των δύο ομάδων (μετρήθηκαν 80 άξονες από κάθε μυ).

N=3 μύες ανά γονότυπο. Η στατιστική σημαντικότητα καθορίστηκε με Student's t-test \*p<0,05. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM. Κλίμακα 1μm.

(Δ) Ποσοτικοποίηση των ποσοστών των αξόνων με μικρή (<500nm), μεσαία (500-799nm) και μεγάλη (>800nm) διάμετρο σε οπτικά νεύρα cKO μυών και μυών της ομάδας ελέγχου (μετρήθηκαν 320 άξονες από κάθε μυ). N=3-4 μύες ανά γονότυπο. Η στατιστική σημαντικότητα καθορίστηκε με two-way ANOVA test \*p<0,05. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± SEM.</p>

# **3.2** Πληθυσμοί πρόδρομων και ώριμων ολιγοδενδροκυττάρων στο μεσολόβιο γηραιών μυών με cKO του *atg5* και μυών της ομάδας ελέγχου

Με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης της απαλοιφής της αυτοφαγίας από τα ολιγοδενδροκύτταρα, στους πληθυσμούς πρόδρομων και ώριμων ολιγοδενδροκυττάρων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοϊστοχημείας για τα CC1+ (ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα) και PDGFRa+ (πρόδρομα ολιγοδενδροκύτταρα) σε στεφανιαίες τομές μεσολοβίου μυών cKO και μυών της ομάδας ελέγχου, στην ηλικία των 22 μηνών. Το μεσολόβιο του εγκεφάλου είναι μια περιοχή με άξονες πλούσιους σε μυελίνη, για αυτό το λόγο προτιμάται η παρατήρησή του σε μελέτες της μυελίνης. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στον αριθμό των διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών μεταξύ των δύο ομάδων ζώων (Εικόνα 2). Η απώλεια της αυτοφαγίας, στα ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα δεν επιφέρει το θάνατό τους ακόμα και για 19 μήνες μετά την απαλοιφή του *atg5*, γεγονός που υποδεικνύει πως δεν είναι αναπόσπαστη για την επιβίωση του συγκεκριμένου κυτταρικού πληθυσμού, και δεν οδηγεί σε μεταβολή του πληθυσμού των πρόδρομων ολιγοδενδροκυττάρων.



Εικόνα 2: Οι πληθυσμοί των πρόδρομων και ώριμων ολιγοδενδροκυττάρων δε μεταβάλλονται σημαντικά κατόπιν απαλοιφής του *atg5* στα ολιγοδενδροκύτταρα.

(A) Αντιπροσωπευτικές εικόνες συνεστιακού μικροσκοπίου από κρυοτομές, στην περιοχή του μεσολοβίου από 22 μηνών μύες με απαλοιφή του *atg5* από τα ολιγοδενδροκύτταρα και μύες της ομάδας ελέγχου. Με μάρτυρες της γενεαλογίας των ολιγοδενδροκυττάρων σημάνθηκαν μέσω ανοσοϊστοχημείας τα PDGFRa+ (πράσινο) πρόδρομα ολιγοδενδροκύτταρα και CC1+ (κόκκινο) ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα. Με DAPI (μπλε) σημάνθηκαν οι πυρήνες. Οι περιοχές στα τετράγωνα πλαίσια φαίνονται σε μεγέθυνση στα δεξιά.

(B) Ποσοτικοποίηση των πρόδρομων (PDGFRa+) και ώριμων (CC1+) ολιγοδενδροκυττάρων ως προς το αντίστοιχο εμβαδό της περιοχής του μεσολοβίου.

N=3-4 μύες ανά γονότυπο. Η στατιστική σημαντικότητα καθορίστηκε με Student's t-test \*p<0,05. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM. Κλίμακα 200μm.

# 3.3 Αυξημένη πυκνότητα μικρογλοιακών κυττάρων στο μεσολόβιο γηραιών μυών με cKO του atg5 σε σχέση με τους μύες της ομάδας ελέγχου

Στη συνέχεια, μελετήθηκε αν η έλλειψη της αυτοφαγίας από τα ολιγοδενδροκύτταρα, μέσω των διαταραχών που έχει φανεί να προκαλεί στην ομοιόσταση της μυελίνης, συσχετίζεται με κάποια απόκριση των μικρογλοιακών κυττάρων. Για το σκοπό αυτό, υπολογίστηκε η πυκνότητα μικρογλοιακών κυττάρων κατόπιν ανοσοϊστοχημείας για τα IBA-1+ μικρογλοιακά κύτταρα, σε στεφανιαίες τομές εγκεφάλου μυών cKO για το *atg5* και μυών της ομάδας ελέγχου, ηλικίας 22 μηνών. Στην περιοχή του μεσολοβίου, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην πυκνότητα των μικρογλοιακών μεταξύ των δύο ομάδων ζώων (Εικόνα 3).



**Εικόνα 3:** Αυξημένη πυκνότητα μικρογλοιακών κυττάρων στο μεσολόβιο γηραιών μυών με απαλοιφή του *atg5* στα ολιγοδενδροκύτταρα.

(A) Αντιπροσωπευτικές εικόνες συνεστιακού μικροσκοπίου από κρυοτομές, στην περιοχή του μεσολοβίου από 22 μηνών μύες με cKO του atg5 και μύες της ομάδας ελέγχου. Στην περιοχή του μεσολοβίου που σημάνθηκε μέσω ανοσοϊστοχημείας για την πρωτεΐνη MBP (πράσινο), διακρίνονται τα μικρογλοιακά IBA-1+ κύτταρα σημασμένα με κόκκινο χρώμα. Με DAPI (μπλε) σημάνθηκαν οι πυρήνες. (B) Ποσοτικοποίηση της (IBA-1+) πυκνότητας των μικρογλοιακών κυττάρων στο αντίστοιχο εμβαδό της περιοχής του μεσολοβίου.

N=5 μύες ανά γονότυπο. Η στατιστική σημαντικότητα καθορίστηκε με Student's t-test \*p<0,05. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM. Κλίμακα 200μm.

# 3.4 Παρόμοιοι αριθμοί αστροκυττάρων στο μεσολόβιο γηραιών μυών με cKO του *atg5* και μυών της ομάδας ελέγχου

Τέλος, προκειμένου να μελετηθεί αν υπάρχει κάποια συσχέτιση της έλλειψης της αυτοφαγίας από τα ολιγοδενδροκύτταρα, μέσω των διαταραχών που φαίνεται πως προκαλεί στην ομοιόσταση της μυελίνης, με τους πληθυσμούς των αστροκυττάρων, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία για τα GFAP+ (αστροκύτταρα) σε στεφανιαίες τομές εγκεφάλου μυών cKO για το *atg5* και μυών της ομάδας ελέγχου, ηλικίας 22 μηνών. Στην περιοχή του μεσολοβίου, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στον αριθμό των κυττάρων μεταξύ των δύο ομάδων ζώων, γεγονός που υποδεικνύει πως η απώλεια της αυτοφαγίας από τα ολιγοδενδροκύτταρα, δεν προκάλεσε μεταβολή στον αριθμό των αστροκυττάρων.



**Εικόνα 4:** Ο αριθμός των αστροκυττάρων δε μεταβάλλεται σημαντικά κατόπιν απώλειας του *atg5* στα ολιγοδενδροκύτταρα.

(A) Αντιπροσωπευτικές εικόνες συνεστιακού μικροσκοπίου από κρυοτομές, στην περιοχή του μεσολοβίου από μύες cKO για το *atg5* και μύες της ομάδας ελέγχου, ηλικίας 22 μηνών. Στην περιοχή του μεσολοβίου, διακρίνονται τα GFAP+ αστροκύτταρα (κόκκινο). Με DAPI (μπλε) σημάνθηκαν οι πυρήνες.

(B) Ποσοτικοποίηση των (GFAP+) αστροκυττάρων ως προς το αντίστοιχο εμβαδό της περιοχής του μεσολοβίου.

N=3-4 μύες ανά γονότυπο. Η στατιστική σημαντικότητα καθορίστηκε με Student's t-test \*p<0,05. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM. Κλίμακα 200μm.

# 4. Συζήτηση

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν πως η αυτοφαγία στα ολιγοδενδροκύτταρα αποτελεί απαραίτητη διαδικασία για τη διατήρηση της μυελίνης και της ακεραιότητας των αξόνων, στο KNΣ κατά τη γήρανση. Η πρωτεΐνη ATG5 είναι κρίσιμη για το μονοπάτι της αυτοφαγίας, καθώς συντελεί στο σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος. Γηραιοί μύες με γενετική απαλοιφή του γονιδίου *atg5* από τα ολιγοδενδροκύτταρα, εμφάνισαν σημαντικά διαταραγμένους φαινοτύπους μυελίνης και εκφυλισμένους άξονες νευρώνων στα οπτικά νεύρα. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή στους πληθυσμούς των πρόδρομων, ώριμων ολιγοδενδροκυττάρων και αστροκυττάρων στο μεσολόβιο αυτών των ζώων, αλλά σημαντική αύξηση στην πυκνότητα των IBA-1+ μικρογλοιακών κυττάρων.

Από τα ευρήματα της μελέτης, φαίνεται πως η αυτοφαγία δεν είναι απαραίτητη για την επιβίωση των ήδη ώριμων ολιγοδενδροκυττάρων ακόμα και κατά τη γήρανση. Η απαλοιφή της από ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα στην ηλικία των 3 μηνών, δεν προκάλεσε μεταβολή στον αριθμό των ολιγοδενδροκυττάρων στους μύες με απώλεια αυτοφαγίας, σε σχέση με τους μύες της ομάδας ελέγχου, στην ηλικία των 22 μηνών. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει πως η αυτοφαγία είναι απαραίτητη για την ωρίμανση και διαφοροποίηση των πρόδρομων ολιγοδενδροκυττάρων (Bankston et al., 2019; Ktena et al., 2022). Σε ήδη ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα φαίνεται πως η απώλεια της αυτοφαγίας δεν προκαλεί το θάνατό τους ακόμα και 19 μήνες μετά την απαλοιφή του atg5. Το γεγονός αυτό συνάδει με την παρατήρηση των Yang, 2019; Aber et al., 2022 και Ktena et al., 2022 όπου απαλείφοντας το atg5 σε ολιγοδενδροκύτταρα, δεν εντόπισαν διαφορές στους αριθμούς των OPCs και ολιγοδενδροκυττάρων στο KNΣ των μυών, στην ηλικία των 21 ημερών, 2 και 6 μηνών αντίστοιχα. Γενικότερα σε περιπτώσεις απομυελίνωσης έχει παρατηρηθεί πολλαπλασιασμός και αύξηση του πληθυσμού των OPCs στο σημείο της βλάβης, προκειμένου να μεσολαβήσουν την επαναμυελίνωση (Prayoonwiwat and Rodriguez, 1993; Chang et al., 2002; Kuhlmann et al., 2009). Ωστόσο, στους φαινοτύπους μυελίνης που παρατηρήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη, δεν περιλαμβάνεται η απομυελίνωση, αλλά οι εκτεταμένες διαταραχές της μυελίνης, οι οποίες όπως φαίνεται δεν οδηγούν σε αύξηση των OPCs για να επανορθώσουν τις βλάβες.

Η απαλοιφή της αυτοφαγίας από τα ολιγοδενδροκύτταρα μυών, επέφερε σημαντικές διαταραχές στη δομή της μυελίνης και εκφυλισμό των αξόνων των γηραιών ζώων. Το οπτικό νεύρο αποτελείται κυρίως από τους άξονες των γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς. Ο εκφυλισμός των αξόνων του οπτικού νεύρου, μπορεί να οφείλεται στην απώλεια της μυελίνης που τους προστατεύει ή σε απώλεια των γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς, που έχει αναφερθεί προηγουμένως, κατά τη γήρανση (Peters, 2002; Peters, 2009). Επιπλέον, παρατηρήθηκε μια μικρή μετατόπιση στα ποσοστά των διαμέτρων των αξόνων των cKO μυών προς χαμηλότερες τιμές, η οποία ωστόσο δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Η τάση αυτή μπορεί να υποδηλώνει ότι οι μεγάλης διαμέτρου άξονες είναι πιο ευάλωτοι στην περίπτωση της απαλοιφής της αυτοφαγίας από τα ολιγοδενδροκύτταρα και των επακόλουθων διαταραχών της μυελίνης.

Προηγούμενες μελέτες έχουν εντοπίσει πλήθος διαφορετικών φαινοτύπων διαταραχής μυελίνης κατά τη γήρανση, όπως διαχωρισμό των μεμβρανών της μυελίνης, με παγιδευμένο πυκνό κυτταρόπλασμα, θραύσματα, αφθονία πλεονάζουσας μυελίνης, αλλά και εκφυλισμένους άξονες. Εκτός από αυτές τις αλλαγές, η παραγωγή της μυελίνης συνεχίζεται κατά τη γήρανση, γεγονός που

υποδεικνύει την παρουσία υποκείμενων ενδογενών μηχανισμών συντήρησης της μυελίνης (Peters, 2002; Xie et al., 2014; Zhi et al., 2023). Παρόμοιες βλάβες και εκφυλισμοί στη μυελίνη, έχουν παρατηρηθεί και σε προηγούμενες μελέτες, κατόπιν απαλοιφής της αυτοφαγίας από ολιγοδενδροκύτταρα μυών σε νεαρότερες ηλικίες. Δεδομένης της δυνατότητας των πρωτεϊνών της μυελίνης PLP και MBP να αποδιατάσσονται μέσω αυτοφαγίας, οι εξής παθολογικοί φαινότυποι μυελίνης αποδόθηκαν σε αδυναμία του ολιγοδενδροκυττάρου να ανακυκλώσει τα ενδοκυτταρικά συστατικά του, συσσώρευση της πρωτεΐνης PLP, με αποτέλεσμα διαταραχή της ομοιόστασης της μυελίνης (Yang, 2019; Aber et al., 2022; Ktena et al., 2022).

Η ανάπτυξη και αποδιάταξη της μυελίνης στο ΚΝΣ βρίσκονται σε μια ισορροπία της οποίας οι υποκείμενοι μηχανισμοί δεν έχουν διαλευκανθεί πλήρως. Τα ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα μπορούν να εξακολουθούν να επεκτείνουν τις μεμβράνες τους στην ενήλικη ζωή (Snaidero et al., 2014), ενώ παράλληλα η αποδιάταξη της μεμβράνης και η ανακύκλωση των πρωτεϊνών και των λιπιδίων της μυελίνης είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της ομοιόστασής της και ρυθμίζονται με πολλούς τόπους (Buscham et al., 2019). Πληθώρα μελετών στο παρελθόν έχει δείξει τη σημασία των μικρογλοιακών κυττάρων στη φαγοκύτωση της μυελίνης κατά την ανάπτυξη (Hughes and Appel, 2020; Djannatian et al., 2023), στην απομάκρυνση θραυσμάτων μυελίνης (Safaiyan et al., 2016) ακόμα και κατά τη γήρανση (Conde and Streit, 2006), στην αποφυγή απομυελίνωσης και υπερμυελίνωσης και γενικότερα στη διαμόρφωση και διατήρηση της μυελινικής δομής (McNamara et al., 2023). Στην παρούσα μελέτη, η πυκνότητα των μικρογλοιακών κυττάρων ήταν αυξημένη στα ζώα με απαλοιφή της αυτοφαγίας από τα ολιγοδενδροκύτταρα. Θα ήταν χρήσιμη επιπλέον, η περεταίρω διερεύνηση του τύπου των μικρογλοιακών κυττάρων που φάνηκε να ξεχωρίζει στη συγκεκριμένη μελέτη, ώστε να γίνει κάποια συσχέτιση με τη λειτουργία που μπορεί να έχει.

Η φαγοκύτωση θραυσμάτων μυελίνης από αστροκύτταρα είναι απόκριση που σχετίζεται με βλάβες και θραύσματα μυελίνης σε περιπτώσεις πολλαπλής σκλήρυνσης και άλλες παθολογίες του ΚΝΣ που περιλαμβάνουν καταστροφή μυελίνης. Ωστόσο, το ποσοστό μυελίνης που απομακρύνεται από τα αστροκύτταρα φαίνεται να είναι σημαντικά μικρότερο από αυτό που απομακρύνουν τα μικρογλοιακά (Ponath et al., 2017). Στη μελέτη του Yang, 2019 παρατηρήθηκε ενεργοποίηση αστροκυττάρων στο φλοιό μυών με απαλοιφή της αυτοφαγίας από τα ολιγοδενδροκύτταρα, λόγω της έντονα διακλαδισμένης όψης τους και της έντονης έκφρασης της GFAP (Yang, 2019), που αποτελούν χαρακτηριστικά ενεργοποιημένων αστροκυττάρων (Cheng et al., 2019). Στην παρούσα μελέτη ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στον πληθυσμό των αστροκυττάρων in vivo, στους γηραιούς μύες με απαλοιφή της αυτοφαγίας, σε σχέση με τους μύες της ομάδας ελέγχου.

Συνδυάζοντας λοιπόν όλα αυτά, φαίνεται πως η αυτοφαγία στα ολιγοδενδροκύτταρα είναι απαραίτητος μηχανισμός για τη διατήρηση της μυελίνης και την ακεραιότητα των αξόνων στο KNΣ, ιδιαίτερα κατά τη γήρανση, που μυελινική δομή είναι πιο ευαίσθητη σε διαταραχές. Η εντονότερη πυκνότητα μικρογλοιακών κυττάρων που παρατηρήθηκε σε αυτή τη μελέτη, στους γηραιούς μύες χωρίς αυτοφαγία, μπορεί να αποδοθεί ως ήπια απόκριση στις μυελινικές βλάβες κατά τη γήρανση, με στόχο τον καθαρισμό τους. Θα μπορούσε λοιπόν να γίνει η υπόθεση πως η αυτοφαγία στα ολιγοδενδροκύτταρα σε συνδυασμό με τη φαγοκύτωση των μικρογλοιακών κυττάρων συμβάλουν στη διατήρηση της ομοιόστασης της μυελίνης στο KNΣ κατά τη γήρανση. Ωστόσο, για τον ισχυρισμό μιας τέτοιας πρότασης απαιτείται περεταίρω μελέτη των υποκείμενων μηχανισμών στα μικρογλοιακά κύτταρα και της φαγοκύτωσης μυελίνης από αυτά, υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες.

# Βιβλιογραφία

Aber ER, Griffey CJ, Davies T, et al. Oligodendroglial macroautophagy is essential for myelin sheath turnover to prevent neurodegeneration and death. *Cell Rep.* 2022;41(3):111480. doi:10.1016/j.celrep.2022.111480

Allen NJ, Lyons DA. Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science*. 2018;362(6411):181-185. doi:10.1126/science.aat0473

Anderson MA, Ao Y, Sofroniew MV. Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci Lett.* 2014;565:23-29. doi:10.1016/j.neulet.2013.12.030

Balcombe NR, Sinclair A. Ageing: definitions, mechanisms and the magnitude of the problem. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2001;15(6):835-849. doi:10.1053/bega.2001.0244

Bankston AN, Forston MD, Howard RM, et al. Autophagy is essential for oligodendrocyte differentiation, survival, and proper myelination. *Glia*. 2019;67(9):1745-1759. doi:10.1002/glia.23646

Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev.* 2001;81(2):871-927. doi:10.1152/physrev.2001.81.2.871

Belgrad J, De Pace R, Fields RD. Autophagy in Myelinating Glia. *J Neurosci*. 2020;40(2):256-266. doi:10.1523/JNEUROSCI.1066-19.2019

Berman S, West KL, Does MD, Yeatman JD, Mezer AA. Evaluating g-ratio weighted changes in the corpus callosum as a function of age and sex. *Neuroimage*. 2018;182:304-313. doi:10.1016/j.neuroimage.2017.06.076

Brady S, Siegel G, Albers R.W, Price D.L. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 7<sup>th</sup> ed. Elsevier Science; 2005

Buscham TJ, Eichel MA, Siems SB, Werner HB. Turning to myelin turnover. *Neural Regen Res.* 2019;14(12):2063-2066. doi:10.4103/1673-5374.262569

Chang A, Tourtellotte WW, Rudick R, Trapp BD. Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2002;346(3):165-173. doi:10.1056/NEJMoa010994

Chapman TW, Hill RA. Myelin plasticity in adulthood and aging. *Neurosci Lett.* 2020;715:134645. doi:10.1016/j.neulet.2019.134645

Cheng X, Wang J, Sun X, Shao L, Guo Z, Li Y. Morphological and functional alterations of astrocytes responding to traumatic brain injury. *J Integr Neurosci*. 2019;18(2):203-215. doi:10.31083/j.jin.2019.02.110

Codogno P, Mehrpour M, Proikas-Cezanne T. Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating?. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;13(1):7-12. Published 2011 Dec 14. doi:10.1038/nrm3249

Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol*. 2017;35:441-468. doi:10.1146/annurev-immunol-051116-052358

Conde JR, Streit WJ. Microglia in the aging brain. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006;65(3):199-203. doi:10.1097/01.jnen.0000202887.22082.63

Davalos D, Grutzendler J, Yang G, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci*. 2005;8(6):752-758. doi:10.1038/nn1472

Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(6):349-364. doi:10.1038/s41580-018-0003-4

Djannatian M, Radha S, Weikert U, et al. Myelination generates aberrant ultrastructure that is resolved by microglia. *J Cell Biol*. 2023;222(3):e202204010. doi:10.1083/jcb.202204010

Du Y, Dreyfus CF. Oligodendrocytes as providers of growth factors. *J Neurosci Res*. 2002;68(6):647-654. doi:10.1002/jnr.10245

Evered D, Whelan J. Research and the Ageing Population. 2<sup>nd</sup> ed. Wiley; 2008

Gomez-Sanchez JA, Carty L, Iruarrizaga-Lejarreta M, et al. Schwann cell autophagy, myelinophagy, initiates myelin clearance from injured nerves. *J Cell Biol*. 2015;210(1):153-168. doi:10.1083/jcb.201503019

Hara T, Nakamura K, Matsui M, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*. 2006;441(7095):885-889. doi:10.1038/nature04724

Hartley MD, Altowaijri G, Bourdette D. Remyelination and multiple sclerosis: therapeutic approaches and challenges. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2014;14(10):485. doi:10.1007/s11910-014-0485-1

Hasel P, Liddelow SA. Astrocytes. Curr Biol. 2021;31(7):R326-R327. doi:10.1016/j.cub.2021.01.056

Hughes AN, Appel B. Microglia phagocytose myelin sheaths to modify developmental myelination. *Nat Neurosci*. 2020;23(9):1055-1066. doi:10.1038/s41593-020-0654-2

Jäkel S, Dimou L. Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:24. Published 2017 Feb 13. doi:10.3389/fncel.2017.00024

Kessaris N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M, Richardson WD. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci*. 2006;9(2):173-179. doi:10.1038/nn1620

Ktena N, Kaplanis SI, Kolotuev I, et al. Autophagic degradation of CNS myelin maintains axon integrity. *Cell Stress*. 2022;6(12):93-107. Published 2022 Nov 21. doi:10.15698/cst2022.12.274

Kuhlmann T, Miron V, Cui Q, Wegner C, Antel J, Brück W. Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis [published correction appears in Brain. 2009 Apr;132(Pt 4):1118. Cuo, Q [corrected to Cui, Q]]. *Brain*. 2008;131(Pt 7):1749-1758. doi:10.1093/brain/awn096

Leone DP, Genoud S, Atanasoski S, et al. Tamoxifen-inducible glia-specific Cre mice for somatic mutagenesis in oligodendrocytes and Schwann cells. *Mol Cell Neurosci*. 2003;22(4):430-440. doi:10.1016/s1044-7431(03)00029-0

Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*. 2004;6(4):463-477. doi:10.1016/s1534-5807(04)00099-1

Levine JM, Reynolds R, Fawcett JW. The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends Neurosci*. 2001;24(1):39-47. doi:10.1016/s0166-2236(00)01691-x

Lin W, Popko B. Endoplasmic reticulum stress in disorders of myelinating cells. *Nat Neurosci*. 2009;12(4):379-385. doi:10.1038/nn.2273

Liu WJ, Ye L, Huang WF, et al. p62 links the autophagy pathway and the ubiqutin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cell Mol Biol Lett.* 2016;21:29. Published 2016 Dec 13. doi:10.1186/s11658-016-0031-z

Mateos-Aparicio P, Rodríguez-Moreno A. The Impact of Studying Brain Plasticity. *Front Cell Neurosci*. 2019;13:66. Published 2019 Feb 27. doi:10.3389/fncel.2019.00066

McNamara NB, Munro DAD, Bestard-Cuche N, et al. Microglia regulate central nervous system myelin growth and integrity. *Nature*. 2023;613(7942):120-129. doi:10.1038/s41586-022-05534-y

Michalski JP, Kothary R. Oligodendrocytes in a Nutshell. *Front Cell Neurosci*. 2015;9:340. Published 2015 Sep 1. doi:10.3389/fncel.2015.00340

Minocha S, Valloton D, Ypsilanti AR, et al. Nkx2.1-derived astrocytes and neurons together with Slit2 are indispensable for anterior commissure formation. *Nat Commun.* 2015;6:6887. Published 2015 Apr 23. doi:10.1038/ncomms7887

Moore CS, Abdullah SL, Brown A, Arulpragasam A, Crocker SJ. How factors secreted from astrocytes impact myelin repair. *J Neurosci Res*. 2011;89(1):13-21. Doi:10.1002/jnr.22482

Nag TC, Wadhwa S. Accumulation of lipid inclusions in astrocytes of aging human optic nerve. *Acta Biol Hung.* 2012;63 Suppl 1:54-64. doi:10.1556/ABiol.63.2012.Suppl.1.6

Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(3):460-473. doi:10.1089/ars.2013.5371

Peferoen L, Kipp M, van der Valk P, van Noort JM, Amor S. Oligodendrocyte-microglia cross-talk in the central nervous system. *Immunology*. 2014;141(3):302-313. doi:10.1111/imm.12163

Perge JA, Niven JE, Mugnaini E, Balasubramanian V, Sterling P. Why do axons differ in caliber?. *J Neurosci*. 2012;32(2):626-638. doi:10.1523/JNEUROSCI.4254-11.2012

Peters A. The effects of normal aging on myelin and nerve fibers: a review. *J Neurocytol*. 2002;31(8-9):581-593. doi:10.1023/a:1025731309829

Peters A. The effects of normal aging on myelinated nerve fibers in monkey central nervous system. *Front Neuroanat*. 2009;3:11. Published 2009 Jul 6. doi:10.3389/neuro.05.011.2009

Ponath G, Ramanan S, Mubarak M, et al. Myelin phagocytosis by astrocytes after myelin damage promotes lesion pathology. *Brain*. 2017;140(2):399-413. doi:10.1093/brain/aww298

Prayoonwiwat N, Rodriguez M. The potential for oligodendrocyte proliferation during demyelinating disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1993;52(1):55-63. doi:10.1097/00005072-199301000-00007

Psachoulia K, Jamen F, Young KM, Richardson WD. Cell cycle dynamics of NG2 cells in the postnatal and ageing brain. *Neuron Glia Biol*. 2009;5(3-4):57-67. doi:10.1017/S1740925X09990354

Reemst K, Noctor SC, Lucassen PJ, Hol EM. The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during Brain Development. *Front Hum Neurosci*. 2016;10:566. Published 2016 Nov 8. doi:10.3389/fnhum.2016.00566

Rinholm JE, Hamilton NB, Kessaris N, Richardson WD, Bergersen LH, Attwell D. Regulation of oligodendrocyte development and myelination by glucose and lactate. *J Neurosci*. 2011;31(2):538-548. doi:10.1523/JNEUROSCI.3516-10.2011

Rivers LE, Young KM, Rizzi M, et al. PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. *Nat Neurosci.* 2008;11(12):1392-1401. doi:10.1038/nn.2220

Ronzano R, Thetiot M, Lubetzki C, Desmazieres A. Myelin Plasticity and Repair: Neuro-Glial Choir Sets the Tuning. *Front Cell Neurosci*. 2020;14:42. Published 2020 Feb 28. doi:10.3389/fncel.2020.00042

Safaiyan S, Kannaiyan N, Snaidero N, et al. Age-related myelin degradation burdens the clearance function of microglia during aging. *Nat Neurosci*. 2016;19(8):995-998. doi:10.1038/nn.4325

Saraswat Ohri S, Bankston AN, Mullins SA, et al. Blocking Autophagy in Oligodendrocytes Limits Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *J Neurosci.* 2018;38(26):5900-5912. doi:10.1523/JNEUROSCI.0679-17.2018

Sen MK, Mahns DA, Coorssen JR, Shortland PJ. The roles of microglia and astrocytes in phagocytosis and myelination: Insights from the cuprizone model of multiple sclerosis. *Glia*. 2022;70(7):1215-1250. doi:10.1002/glia.24148

Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, et al. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell*. 2010;7(4):483-495. doi:10.1016/j.stem.2010.08.014

Snaidero N, Möbius W, Czopka T, et al. Myelin membrane wrapping of CNS axons by PI(3,4,5)P3dependent polarized growth at the inner tongue. *Cell*. 2014;156(1-2):277-290. doi:10.1016/j.cell.2013.11.044

Tabibzadeh S. Role of autophagy in aging: The good, the bad, and the ugly. *Aging Cell*. 2023;22(1):e13753. doi:10.1111/acel.13753

Tognatta R, Karl MT, Fyffe-Maricich SL, et al. Astrocytes Are Required for Oligodendrocyte Survival and Maintenance of Myelin Compaction and Integrity. *Front Cell Neurosci*. 2020;14:74. Published 2020 Apr 2. doi:10.3389/fncel.2020.00074

Verkhratsky A, Nedergaard M. Physiology of Astroglia. *Physiol Rev.* 2018;98(1):239-389. doi:10.1152/physrev.00042.2016

von Bartheld CS, Bahney J, Herculano-Houzel S. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *J Comp Neurol*. 2016;524(18):3865-3895. doi:10.1002/cne.24040

Weil MT, Möbius W, Winkler A, et al. Loss of Myelin Basic Protein Function Triggers Myelin Breakdown in Models of Demyelinating Diseases. *Cell Rep.* 2016;16(2):314-322. doi:10.1016/j.celrep.2016.06.008

Włodarczyk A, Holtman IR, Krueger M, et al. A novel microglial subset plays a key role in myelinogenesis in developing brain. *EMBO J.* 2017;36(22):3292-3308. doi:10.15252/embj.201696056

Wu J, Cai Y, Wu X, Ying Y, Tai Y, He M. Transcardiac Perfusion of the Mouse for Brain Tissue Dissection and Fixation. *Bio Protoc*. 2021;11(5):e3988. Published 2021 Mar 5. doi:10.21769/BioProtoc.3988

Xie F, Liang P, Fu H, Zhang JC, Chen J. Effects of normal aging on myelin sheath ultrastructures in the somatic sensorimotor system of rats. *Mol Med Rep.* 2014;10(1):459-466. doi:10.3892/mmr.2014.2228

Yang C., 2019. *The role of basal autophagy in oligodendrocyte development* (Doctoral dissertation, UCL (University College London)).

Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil GS. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metab.* 2010;11(6):467-478. doi:10.1016/j.cmet.2010.04.005

Ye X, Zhou XJ, Zhang H. Exploring the Role of Autophagy-Related Gene 5 (*ATG5*) Yields Important Insights Into Autophagy in Autoimmune/Autoinflammatory Diseases. *Front Immunol*. 2018;9:2334. Published 2018 Oct 17. doi:10.3389/fimmu.2018.02334

Young AR, Narita M, Ferreira M, et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev.* 2009;23(7):798-803. doi:10.1101/gad.519709

Young KM, Psachoulia K, Tripathi RB, et al. Oligodendrocyte dynamics in the healthy adult CNS: evidence for myelin remodeling. *Neuron*. 2013;77(5):873-885. doi:10.1016/j.neuron.2013.01.006

Zhi JJ, Wu SL, Wu HQ, et al. Insufficient Oligodendrocyte Turnover in Optic Nerve Contributes to Age-Related Axon Loss and Visual Deficits. *J Neurosci*. 2023;43(11):1859-1870. doi:10.1523/JNEUROSCI.2130-22.2023

Zhou B, Zhu Z, Ransom BR, Tong X. Oligodendrocyte lineage cells and depression. *Mol Psychiatry*. 2021;26(1):103-117. doi:10.1038/s41380-020-00930-0