



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ  
ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ

**«Μη-επεμβατική διάνοιξη αιματοεγκεφαλικού φραγμού με  
χρήση εστιασμένων υπερήχων»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Γεσθημανή Κ.Σαμιωτάκη**

**Επιβλέπων : Κωνσταντίνα Σπ. Νικήτα**  
Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Ιούλιος 2009





ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ  
ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ

**«Μη-επεμβατική διάνοιξη αιματοεγκεφαλικού φραγμού με  
χρήση εστιασμένων υπερήχων»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

Γεσθημανή Κ. Σαμιωτάκη

**Επιβλέπων : Κωνσταντίνα Σπ. Νικήτα**

Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την 17<sup>η</sup> Ιουλίου 2009.

.....  
Κωνσταντίνα Σπ. Νικήτα  
Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

.....  
Δημήτριος Κουτσούρης  
Καθηγητής Ε.Μ.Π.

.....  
Γεώργιος Ματσόπουλος  
Επίκουρος Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Ιούλιος 2009

.....  
Γεσθημανή Κ. Σαμιωτάκη

Διπλωματούχος Ηλεκτρολόγος Μηχανικός και Μηχανικός Υπολογιστών Ε.Μ.Π.

Copyright © Γεσθημανή Σαμιωτάκη, 2009.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς τον συγγραφέα.

Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

## Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως στόχο να παρουσιάσει την αποτελεσματική in vivo μεταφορά του νευροτρόφου παράγοντα BDNF στη δομή του ιπποκάμπου στον εγκέφαλο πειραματόζων. Ο BDNF είναι ένας δυναμικά θεραπευτικός παράγοντας για τη νόσο του Alzheimer, καθώς και άλλων νευροεκφυλιστικών παθήσεων. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι η εφαρμογή διακρανιακών εστιασμένων υπερήχων και ενδοφλέβια χορήγηση μικροφουσαλίδων για την διάνοιξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Προηγούμενες μελέτες έχουν αποδείξει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου, και την έχουν καταστήσει ως την μοναδική παροδική, μη-επεμβατική και εντοπισμένη τεχνική για την μεταφορά κάποιων μη φαρμακευτικών ουσιών δια του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Η συχνότητα των υπερήχων που εφαρμόστηκαν ήταν 1.525 MHz, η ακουστική ένταση ήταν 0.46MPa με duty cycle 20%. Η εφαρμογή έγινε σε 4 σημεία στην περιοχή του αριστερού ιπποκάμπου, ενώ ο δεξής χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος. Το κάθε σημείο έλαβε δύο ομάδες παλμών (Ο.Π.) υπερήχου. Μικροφουσαλίδες Definity® χορηγήθηκαν στην κυκλοφορία μέσω ένεσης στην φλέβα της ουράς των πειραματοζών σε συγκέντρωση 0.05ml ανά γραμμάριο μάζας ακριβώς πριν την εφαρμογή του υπερήχου. Φωσφορίζον BDNF χορηγήθηκε με ένεση στη μηριαία φλέβα σε συγκέντρωση 0.05mg ανά γραμμάριο μάζας, 10 λεπτά μετά την εφαρμογή των υπερήχων. Κάθε πειραματόζωο θανατώθηκε για ex vivo μελέτη 20 λεπτά μετά την ενδοφλέβια χορήγηση του BDNF. Οι εγκέφαλοι μονιμοποιήθηκαν σε παραφορμαλδεΐδη και μελετήθηκαν για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν ως μοντέλα ήταν συνολικά ποντίκια τύπου C57B1/6, και όλες οι πειραματικές διαδικασίες ήταν εγκεκριμένες από το Columbia University Institutional Animal Care and Use Committee.

**Λέξεις κλειδιά:** αιματοεγκεφαλικός φραγμός, εστιασμένος υπέρηχος, μικροφουσαλίδες, φθορίζουσα μικροσκοπία

## **Abstract**

This diploma thesis is purposed to show the effective in vivo delivery of the neurotrophic factor BDNF at the formation of the hippocampus in the brain of an animal model. BDNF is a potentially therapeutic agent for the Alzheimer's disease, as well as for other neurodegenerative diseases. The method of focused ultrasound through the intact skull, after the injection of an ultrasound contrast agent, was used to open the blood-brain barrier(BBB). Previous studies have shown that this method is the only transient, non-invasive and localized technique for the delivery of some pharmacological agents through the BBB. The frequency of the ultrasound used was 1.525MHz, the acoustic pressure was 0.46Mpa with duty cycle 20%. The ultrasound was applied at four sonication locations at the region of the left hippocampus, whereas the right hippocampus was used as control. Each sonication location was sonicated two times. Microbubbles Definity® were injected at the blood circulation through the tail vein of the animal models with concentration of 0.05µl per kilogram of body mass before the sonication. Fluorescent BDNF was injected into the blood flow at the femoral vein with concentration 0.05mg per kilogram of body mass, 10 minutes after the sonications. Each animal model was sacrificed for ex vivo study 20 minutes after the injection of BDNF. The animal models were transcardially perfused, and the brains were removed and immersion-fixed in paraformaldehyde, and were studied with the use of fluorescent microscopy. All animal procedures were approved by the Columbia University Institutional Animal Care and Use Committee. A total of 3 adult male mice were used for this study (CB57L/6 strain, 17-23 g, Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN).

**Key words:** blood-brain barrier, focused ultrasound, microbubbles, fluorescent microscopy



## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Κωνσταντίνα Νικήτα , καθηγήτρια Ε.Μ.Π., για την καθοδήγηση και την υποστήριξή της καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Dr.Elisa Konofagou, Assistant Professor, Columbia University, Department of Biomedical Engineering, η οποία μου έδωσε την δυνατότητα να πραγματοποιήσω την έρευνα που επιθυμούσα στο εργαστήριο Ultrasound and Elasticity Imaging Laboratory, Biomedical Engineering, Columbia University, σε συνεργασία με το Biomedical Simulations and Imaging Laboratory, N.T.U.A. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω επίσης για την βοήθεια, την στήριξη και την καθοδήγησή της σε επίπεδο ακαδημαϊκό αλλά και προσωπικό.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους James J.Choi, senior Ph.D. student, Columbia University , και Babak Baseri, research scientist, Columbia University, οι οποίοι με βοήθησαν σε αυτά τα πρώτα μου βήματα στην ακαδημαϊκή έρευνα, τόσο με τις γνώσεις τους και την διάθεσή τους να τις μοιραστούν, αλλά και με την εξαιρετική μας συνεργασία.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, αλλά και τους πολύ καλούς μου φίλους, οι οποίοι βρίσκονταν στο πλευρό μου όλο το διάστημα κατά το οποίο έλειψα στο εξωτερικό για να πραγματοποιήσω την έρευνα.

## Περιεχόμενα

<b>1.Εισαγωγή</b>	13
<b>1.1</b> Η ανάγκη μεταφοράς φαρμακευτικών ουσιών στον εγκέφαλο και ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός	13
<b>1.2</b> Ανασκόπηση μεθόδων μεταφοράς φαρμακευτικών ουσιών στον εγκέφαλο	14
<b>1.3</b> Εστιασμένος υπέρηχος για την διάνοιξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού	16
<b>2. Ο Αιματοεγκεφαλικός φραγμός</b>	18
<b>2.1</b> Ορισμός του αιματοεγκεφαλικού φραγμού	18
<b>2.2</b> Λειτουργία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού	18
<b>2.3</b> Ο φαινότυπος του αιματοεγκεφαλικού φραγμού	21
<b>2.4</b> Επαγωγή των ιδιοτήτων του αιματοεγκεφαλικού φραγμού	22
<b>2.5</b> Επηρεασμός ( Modulation) της λειτουργίας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού	23
<b>2.6</b> Αλλαγές στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό σε παθολογικές καταστάσεις	23
<b>3. Εστιασμένος Υπέρηχος</b>	24
<b>3.1</b> Βασικές Αρχές	24
<b>3.1.1</b> Εισαγωγή στους υπέρηχους	24
<b>3.1.2</b> Πλάτος και Ένταση	28
<b>3.1.3</b> Ανάκλαση και Διάδοση	29
<b>3.1.4</b> Σκέδαση	30
<b>3.1.5</b> Απορρόφηση	34
<b>3.1.6</b> Εξασθένηση της υπερηχητικής δέσμης σε ιστούς	35

3.1.7 Συμβολή κυμάτων	36
3.2 Μετατροπείς - Δημιουργία και λήψη των υπερήχων	36
3.2.1 Παραγωγή και ανίχνευση υπερήχων – φασματική καμπύλη συντονισμού	37
3.2.2 Κατασκευή μετατροπέα μονού στοιχείου	39
3.2.3 Μη εστιασμένοι μετατροπείς	41
3.2.4 Εστιασμένοι Μετατροπείς ( Focused Transducers)	42
3.2.5 Χαρακτηριστικά της υπερηχητικής δέσμης	44
3.2.6 Ακουστικές παράμετροι εστιασμένου υπερήχου	45
<b>4. Μικροφουσαλίδες και αλληλεπίδραση με τον υπέρηχο</b>	<b>46</b>
4.1 Γενικά	46
4.2 Περιγραφή της μεθόδου – Μικροφουσαλίδες και Αιματοεγκεφαλικός φραγμός	47
4.3 Προηγούμενες πειραματικές μελέτες για την ταλάντωση των μικροφουσαλίδων	49
<b>5. Νευροφυσιολογία και Νευρώνες</b>	<b>53</b>
5.1 Κεντρικό Νευρικό Σύστημα	53
5.1.1 Δομή του εγκεφάλου	54
5.2 Δομή βιολογικού νευρώνα	56
5.3 Λειτουργία νευρωνικών συνάψεων	57
5.4 Πλαστικότητα	62
5.5 Ο ιππόκαμπος	66
<b>6. Brain-derived neurotrophic factor</b>	<b>71</b>
6.1 Γενικά	71
6.2 Ιδιότητες και επιδράσεις του BDNF	72

6.3	Επιδράσεις του BDNF στο μοντέλο της νόσου του Alzheimer	73
<b>7.</b>	<b>Πειραματική διάταξη και Μέθοδοι</b>	<b>74</b>
7.1	Προετοιμασία	74
7.1.1	Εξοπλισμός υπερήχου	74
7.1.2	Πειραματόζωα και αναισθησία	76
7.1.3	Μικροφουσαλίδες	76
7.1.4	Brain- Derived Neurotrophic Factor	76
7.2	Πειραματική διαδικασία	77
7.2.1	Εύρεση της περιοχής-στόχου	77
7.2.2	Εφαρμογή υπερήχων	79
7.2.3	Χορήγηση BDNF, αφαίμαξη και τομή	81
7.2.5	Χρήση φθορίζουσας μικροσκοπίας	82
<b>8.</b>	<b>Αποτελέσματα</b>	<b>83</b>
8.1	Φθορισμός BDNF	83
8.2	Φθορισμός BDNF και μεταφορά στον εγκέφαλο 1 <sup>ου</sup> πειραματόζωου	84
8.3	Φθορισμός BDNF και μεταφορά στον εγκέφαλο 2 <sup>ου</sup> πειραματόζωου	85
8.4	Φθορισμός BDNF και μεταφορά στον εγκέφαλο 3 <sup>ου</sup> πειραματόζωου	86
<b>9.</b>	<b>Συμπεράσματα</b>	<b>87</b>
<b>10.</b>	<b>Βιβλιογραφία</b>	<b>88</b>

# **1. Εισαγωγή**

## **1.1 Η ανάγκη μεταφοράς φαρμακευτικών ουσιών στον εγκέφαλο και ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός**

Η πρόοδος την νευροεπιστήμης έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη πολλών νέων διαγνωστικών και θεραπευτικών παραγόντων με δυνητική χρήση στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) . Πολλές νευρολογικές διαταραχές δεν είναι εφικτό να θεραπευτούν μέσω φαρμακευτικών ουσιών και θεραπευτικών παραγόντων (agents) λόγω της φυσικής άμυνας του εγκεφάλου, τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμος είναι ένα πλαστικό και δυναμικό σύστημα, το οποίο υπό φυσιολογικές συνθήκες διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης στον χώρο του ΚΝΣ. Αυτό το σύστημα άμυνας είναι μια εξειδικευμένη διάταξη του τοιχώματος των αιμοφόρων αγγείων, η οποία αποτρέπει την είσοδο ουσιαστικά όλων των μεγάλων μορίων από το αίμα στον εγκέφαλο, εμποδίζοντας την ανεξέλεγκτη είσοδο ουσιών και παραγόντων οι οποίοι θα μπορούσαν να αλλοιώσουν την εσωτερική αρμονία του ΚΝΣ ή/και να δράσουν βλαπτικά. Κατ'αυτόν τον τρόπο όμως ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός καθιστά αναποτελεσματικές κάποιες δυνητικά νευρολογικά ενεργές ουσίες και φαρμακευτικά σκευάσματα , επειδή δεν μπορούν να μεταφερθούν (delivered) στα σημεία όπου είναι απαραίτητο (Rubin et al.,2009). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η διέλευση από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό να αποτελεί τον περιοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη της μεταφοράς φαρμάκων στον εγκέφαλο. Σήμερα, περισσότερο από το 98% των φαρμάκων που αποτελούνται από μικρά μόρια, και σχεδόν 100% των νευροθεραπευτικών ουσιών που αποτελούνται από μεγάλα μόρια δεν μπορούν να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Pardridge 2005).

Μερικά μόνο φάρμακα που αποτελούνται από μικρά μόρια , λιποδιαλυτά, και μικρή μοριακή μάζα κάτω από 400-500 Da μπορούν να διασχίσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό σε φαρμακολογικά σημαντικές ποσότητες (Pardridge 2003), και μόνο σε ορισμένες ασθένειες όπως η κατάθλιψη, ο χρόνιος πόνος, και η επιληψία, έχουν επίδραση. Δεν υπάρχει θεραπεία για την νόσο του Alzheimer ή του Huntington, όπως ούτε και για την αμυοτροφική πλευρική σκλήρωση. Επίσης, δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία για σοβαρές θανατηφόρους ασθένειες του ΚΝΣ όπως ο καρκίνος του εγκεφάλου, το έμφραγμα, ο τραυματισμός του εγκεφάλου ή του νωτιαίου μυελού, μόλυνση από HIV. Και παρότι L-Dopa θεραπεία χρησιμοποιείται επί δεκαετίες για τη νόσο του Parkinson, δεν υπάρχει κανένα νευροπροστατευτικό

φάρμακο ικανό να σταματήσει την νευροεκφύλιση. Επίσης, δεν υπάρχει καμία αποτελεσματική θεραπεία για παιδικές διαταραχές, συμπεριλαμβανομένου του αυτισμού, κ.ά. Πολλές από αυτές τις διαταραχές θα μπορούσαν να θεραπευθούν με φάρμακα, ένζυμα, γονίδια, ή βιοτεχνολογικά προϊόντα από μεγάλα μόρια όπως επανασυντιθέμενες πρωτεΐνες, όμως όλα αυτά δεν μπορούν να διασχίσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

## **1.2 Ανασκόπηση μεθόδων μεταφοράς φαρμακευτικών ουσιών στον εγκέφαλο**

Για να είναι επιτυχημένο ένα σύστημα μεταφοράς φαρμακευτικών ουσιών, η χορήγηση του θεραπευτικού παράγοντα στον εγκέφαλο θα πρέπει να είναι χρονικά και τοπικά ορισμένη, δηλαδή «παροδική» και «εντοπισμένη», καθώς επίσης και μη-επεμβατική, δηλαδή αναίμακτη. Οι περισσότερες σύγχρονες τεχνικές δεν συνδιάζουν ταυτόχρονα όλα τα παραπάνω στοιχεία, όπως περιγράφεται παρακάτω:

- Στην λιπιδιοποίηση (lipidization), λιπιδικές ομάδες (lipid groups) προστίθενται στα πολωμένα άκρα των μορίων για να αυξήσουν την διαπερατότητα (permeability) του παράγοντα (Lieb et al. 1986; Fischer et al. 1998). Σε αυτή την τεχνική αυξάνεται η διαπερατότητα του φαρμάκου, όχι μόνο στην επιθυμητή περιοχή, αλλά σε ολόκληρο το σώμα, οπότε λόγω των παρενεργειών πρέπει να περιορίζεται η χορηγούμενη δόση.
- Άλλες τεχνικές, οι οποίες βρίσκονται υπό μελέτη, είναι μέθοδοι μεταφοράς φαρμάκων βασισμένες στην νευροχειρουργική, όπου τα φάρμακα χορηγούνται με επεμβατικό τρόπο στην επιθυμητή περιοχή με ένεση (Blasberg et al. 1975 ; Fung et al.1996). Το φάρμακο εξαπλώνεται μέσω διάχυσης και εντοπίζεται στην επιθυμητή περιοχή, αλλά η διάχυση δεν επιτρέπει στα μόρια να μετακινηθούν πέραν του σημείου έκλυσης. Ένα ακόμη μειονέκτημα είναι ότι οι επεμβατικές αυτές μέθοδοι διαπερνούν τον ιστό στον εγκέφαλο κοντά στην περιοχή που ιδανικά πρέπει να χορηγηθεί η ουσία, προκαλώντας αναίτια βλάβη.
- Άλλες τεχνικές χρησιμοποιούν διαλύτες αναμειγμένους με φάρμακα ή κάποιες φαρμακολογικές ουσίες συννημένες στα φάρμακα για να διαταράξουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό μέσω διαστολής και συστολής των αιμοφόρων αγγείων (Pardridge 2005). Ωστόσο, αυτή η διαταραχή δεν είναι εντοπισμένη

μέσα στον εγκέφαλο σε συγκεκριμένες περιοχές, και επίσης οι ουσίες και οι διαλύτες είναι δυνητικά τοξικοί και άρα επιβλαβείς για τον οργανισμό.

- Κατανοώντας την δομή και την λειτουργία των διαβιβαστών ενδογενώς μέσα στην κυτταρική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων, έντονες χημικές μεταβολές των φαρμάκων μπορεί να επιτρέψουν την διέλευση τους από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Partridge 2005). Αυτή η τεχνική μπορεί να αποτελέσει μια μέθοδο μεταφοράς ειδικά για τον εγκέφαλο, αλλά απαιτεί ειδική προσοχή σε κάθε είδους φαρμάκου μόριο και ένα εξειδικευμένο σύστημα μεταφοράς, καταλήγοντας σε διαδικασίες που κοστίζουν πολύ σε χρόνο και χρήμα ενώ ταυτόχρονα δεν θα είναι και πάλι εντελώς εντοπισμένες στην επιθυμητή περιοχή.
- Επομένως, η μόνη τεχνική διάνοιξης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού η οποία είναι πραγματικά παροδική, εντοπισμένη και μη-επεμβατική είναι ο εστιασμένος υπέρηχος με χορήγηση μικροφουσαλίδων (Partridge 2005). Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει ότι ο εστιασμένος υπέρηχος διαταράσσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό ενώ παράλληλα προκαλεί ανεπιθύμητες βλάβες στον ιστό (Bakay et al.1956 ; Ballantine et al. 1960; Patrick et al. 1990; Choi et al.2005; Kinoshita et al.2006). Ωστόσο, με την χορήγηση μικροφουσαλίδων, ο εστιασμένος υπέρηχος έχει αποδειχθεί να διανοίγει παροδικά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Hynynen et al.2001). Επίσης έχει δειχθεί ότι η διάνοιξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού μπορεί να παρατηρηθεί με δυναμικής αντίθεσης ενισχυμένη απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού (contrast-enhanced MRI). Η επιλογή χρήσης μικροφουσαλίδων προέκυψε από το γεγονός ότι επιτρέπει την μείωση της έντασης του υπερήχου ενώ παράλληλα προκαλεί την απαιτούμενη διαταραχή στο αγγειακό σύστημα χωρίς να προκαλεί φθορά στους νευρώνες (Mc Dannold et al. 2005; Hynynen et al.2005). Επίσης έχουν γίνει και προκαταρκτικές μελέτες, για την κατανόηση του μηχανισμού διάνοιξης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, σύμφωνα με τις οποίες υπάρχουν ενδείξεις πιθανής διαπλάτυνσης των στενών συνάψεων ή ενεργοποίησης διάφορων μηχανισμών μεταφοράς ουσιών στην περιοχή (Sheikov et al.2004). Παρ'όλα αυτά, ο ολοκληρωμένος μηχανισμός διάνοιξης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού με εστιασμένο υπέρηχο παραμένει ακόμη άγνωστος.

Μέθοδος	Μη-επεμβατική	Εντοπι-σμένη
<b>Διακρανιακή ένεση φαρμάκων</b> Διάχυση του φαρμάκου κοντά στην επιθυμητή περιοχή	X	✓
<b>Λιπιδιοποίηση</b> Πρόσθεση λιπιδικών ομάδων στα άκρα των μορίων για αύξηση της διαπερατότητας του παράγοντα	✓	X
<b>Διαλύτες και βοηθητικές ουσίες</b> Προκαλούν διαστολή ή συστολή των αιμοφόρων αγγείων	✓	X
<b>Χημική μεταβολή φαρμάκων</b> Μετατροπή των χημικών ιδιοτήτων φαρμάκων ώστε να διέλθουν από οδούς στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό	✓	X
<b>Εστιασμένος Υπέρηχος (Focused Ultrasound)</b> Εφαρμόζεται μετά από ενδοφλέβια χορήγηση φουσαλιδών	✓	✓

### 1.3 Εστιασμένος υπέρηχος για την διάνοιξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού

Παρά το γεγονός ότι έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στη διάνοιξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού με χρήση εστιασμένου υπέρηχου, ο μηχανισμός του φαινομένου θα πρέπει να μελετηθεί αναλυτικά πρωτού εφαρμοσθεί ως κλινική μέθοδος για μεταφορά φαρμάκων, όπως επίσης και η ασφάλεια καθώς και η αποτελεσματικότητα της μεθόδου θα πρέπει να οριστούν. Επομένως, απαιτούνται εκτεταμένα πειράματα και το πειραματόζωο που θα χρησιμοποιηθεί θα πρέπει να επιλεγεί με αρκετή προσοχή.

Πρώτον, ένα προφανές πρόβλημα με την πειραματική διαδικασία εφαρμογής εστιασμένου υπέρηχου στον εγκέφαλο είναι οι αποκλίσεις στο πλάτος και στη φάση που εισάγονται λόγω του κρανίου. Σε ανθρώπους, ορισμένες μελέτες έχουν δείξει την δυνατότητα διόρθωσης αυτών των αποκλίσεων με τη χρήση προσαρμοζόμενων τεχνικών, και αυτές οι μέθοδοι έχουν εφαρμοστεί σε κρανία ζώων ( Thomas et al.,1996 ; Hynynen et al.1998), απλώς αυτές οι μέθοδοι απαιτούν σύνθετο και εξειδικευμένο εργαστηριακό εξοπλισμό (Pernot et al.2003 ; Hynynen et al. 2004). Σε μελέτες διάνοιξης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού μέχρι στιγμής, χρησιμοποιείται πιο συχνά κρανιοτομή σε πειράματα σε ζώα για την απλοποίηση των πειραματικών διαδικασιών. Η επιλογή την κρανιοτομής είναι απόρροια της συνθετότητας της χρήσης μεθόδων για την διόρθωση της απόκλισης φάσης. Ωστόσο, στο ποντίκι το κρανίο είναι πολύ πιο λεπτό από το μήκος κύματος 1mm του υπέρηχου που εφαρμόζεται σε συχνότητα 1.5MHz, και επομένως προκαλεί ασήμαντα σφάλματα. Έτσι είναι πιθανό



να επιτευχθεί εστίαση του υπερήχου στον εγκέφαλο του ποντικιού, χωρίς να γίνει κρανιοτομή ή χρήση μεθόδων διόρθωσης των αποκλίσεων.

Δεύτερον, ένας άλλος παράγοντας που θα πρέπει να ληφεί υπόψη είναι ο αριθμός των ζώων που χρειάζονται για αυτά τα πειράματα. Τα ποντίκια εμφανίζουν το πλεονέκτημα ότι είναι εύκολα διαθέσιμα στα εργαστήρια, και δεν είναι ιδιαίτερα απαιτητική η συντήρηση και η φροντίδα τους.

Τελευταίο και πιο σημαντικό, είναι η δυνατότητα της σύγχρονης επιστήμης παραγωγής γενετικώς μεταλλαγμένων ζώων ώστε να εκφράζουν γενετικά αρκετές από τις νευρολογικές ασθένειες. Όμως τα περισσότερα πειραματόζωα-μοντέλα για τις νευρολογικές ασθένειες περιορίζονται σε ποντίκια. Για παράδειγμα, προς το παρόν τα μοναδικά μοντέλα για την νόσο του Alzheimer και του Huntington μέχρι στιγμής είναι ποντίκια. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, οι μελλοντικές μελέτες διάνοιξης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού να πρέπει να εφαρμοσθούν σε ποντίκια.

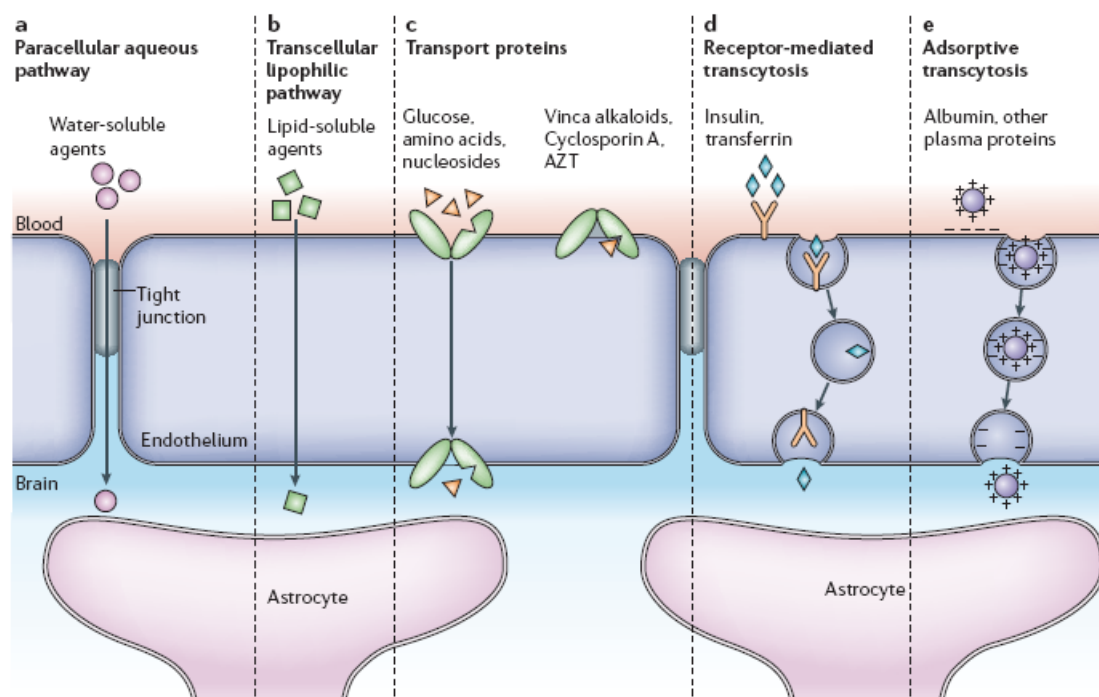
## **2. Ο Αιματοεγκεφαλικός φραγμός**

### **2.1 Ορισμός του αιματοεγκεφαλικού φραγμού**

Το κεντρικό νευρικό σύστημα αποτελείται από τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα του ΚΝΣ κύτταρα ενώνονται μεταξύ τους με στενές διακυτταρικές συνάψεις, γνωστές και ως “tight junctions” (TJs). Οι στενές συνάψεις μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων και η βασική μεμβράνη στην οποία επικάθονται αυτά, καθώς και οι δομικές και διαμεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες πληρούν τον χώρο μεταξύ των κυτταρικών επιφανειών στις στενές συνάψεις, συγκροτούν ένα ουσιώδες δομικό και λειτουργικό υπόβαθρο, το οποίο ελέγχει και ρυθμίζει τη διέλευση μοριακών παραγόντων από τον αγγειακό αυλό προς τον νευροπιληματικό χώρο, μέσω της ανάπτυξης πολλών επιμέρους μηχανισμών πρόσληψης και περαιτέρω προώθησής τους (Rubbin et al.,2009). Τα μόνα μόρια που μπορούν να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό είναι μικρά λιπο-διαλυτά μόρια με μοριακό βάρος μικρότερο από 400 Da και με λιγότερους από 9 δεσμούς υδρογόνου (Pardirdge,2007). Συνολικά δεν μπορούν να διαπεράσουν μόρια με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 400 Da, με μικρή λιποδιαλυτότητα, ή μεγάλο ηλεκτρικό φορτίο.

### **2.2 Λειτουργία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού**

Το τριχοειδικό δίκτυο στον εγκέφαλο είναι πολύ πυκνό, σχηματίζει μια περιοχή περίπου 20 m<sup>2</sup> / 1300g ανθρώπινου εγκεφάλου, οπότε κανένας νευρώνας ή γλοιακό κύτταρο δεν απέχει περισσότερο από 20μm από γειτονικό τριχοειδές αγγείο, και κάθε νευρώνας αιματοδοτείται από το δικό του μικρο-αγγείο (Microvessel) (Pardridge, 2002). Τα επιθηλιακά τοιχώματα στον εγκέφαλο αποτελούν έναν ευρύ αλλά λεπτό φραγμό, ευθυγραμμισμένο με ένα απλό συνεχές στρώμα από ενδοθηλιακά κύτταρα. Το πάχος των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι 200nm. Δρα ως ένα φυσικό φράγμα χάρη στις στενές συνάψεις μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων οι οποίες αναγκάζουν τις κινήσεις των μορίων να ακολουθούν ένα διακυτταρικό μονοπάτι δια μέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, παρά ένα παρακυτταρικό μονοπάτι δια μέσου των συνάψεων όπως συμβαίνει στα περισσότερα ενδοθήλια. Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται τα μονοπάτια δια μέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Πηγή Abbott and Romero 1996) :



**Εικόνα 1**

**Μονοπάτια δια μέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού.** Ένα σχηματικό διάγραμμα των ενδοθηλιακών κυττάρων που αποτελούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και τις διασυνδέσεις τους με τους περιαγγειακούς ποδίσκους των αστροκυττάρων. Φαίνονται εδώ οι κύριες οδοί για μοριακή κίνηση δια μέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού.

**a** | Φυσιολογικά, οι στενές συναψεις αποτρέπουν αυστηρά την είσοδο υδατοδιαλυτών συστατικών, συμπεριλαμβανομένων των πολικών φαρμάκων

**b** | Ωστόσο, η μεγάλη επιφάνεια των λιπιδικών μεμβρανών του ενδοθηλίου προσφέρει μια αποτελεσματική δίοδο για λιποδιαλυτούς παράγοντες.

**c** | Το ενδοθήλιο περιέχει πρωτεΐνες για την μεταφορά γλυκόζης, αμινοξέων, βάσεων πουρινών, νουκλεοτιδίων, χολίνης και άλλων ουσιών. Μερικοί μεταφορείς είναι ενεργειακά εξεργώμενοι, (για παράδειγμα η Ρ-γλυκοπρωτεΐνη) και δρουν ως μεταφορείς έκχυσης. AZT αζιδοθυμιδίνη

**d** | Ορισμένες πρωτεΐνες, όπως η ινσουλίνη και η τρανσφερίνη, απορροφώνται από ενδοκυττάρωση και διακυττάρωση μέσω ειδικών υποδοχέων

**e** | Πρωτεΐνες του πλάσματος όπως η αλβουμίνη μεταφέρονται ελάχιστα, αλλά η μετατροπή τους σε κατιόντα μπορεί να αυξήσει την απορρόφησή τους από ενδοκυττάρωση και διακυττάρωση από απορροφητικούς παράγοντες.

Η μεταφορά φαρμάκων δια μέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού γίνεται κυρίως μέσω των οδών b-e , και για το ΚΝΣ ειδικά μέσω της b.

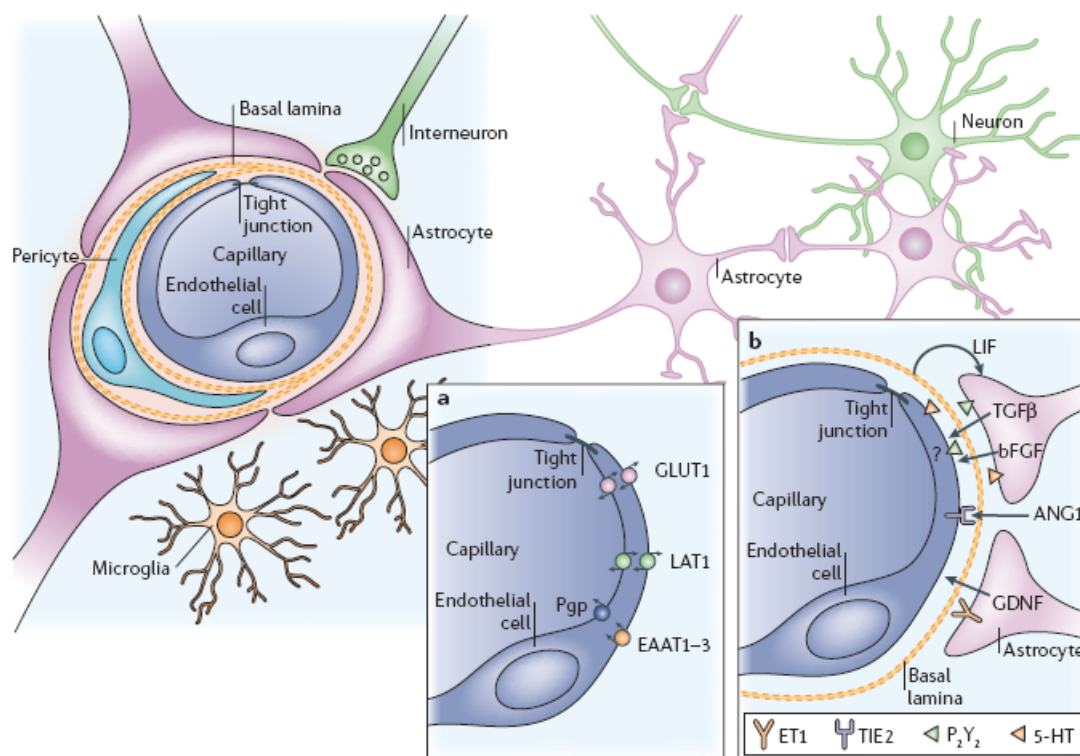
Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός εμποδίζει την κίνηση ιόντων και υγρών μεταξύ αίματος και εγκεφάλου, αλλά επιτρέπει σε ειδικούς μεταφορείς ιόντων και σε κανάλια να ρυθμίσουν την κίνηση ιόντων, να δημιουργήσουν ένα εγκεφαλικό ρευστό μέσο ιδανικό για την λειτουργία των νευρώνων. Αυτό το ρευστό μέσο ( ISF : interstitial fluid) είναι παρεμφερές με το πλάσμα του αίματος ως προς την σύνθεσή του, όμως έχει μικρότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, σε  $K^+$  και  $Ca^{2+}$ , αλλά υψηλότερα επίπεδα  $Mg^{2+}$ . Πολύ σημαντική είναι η λειτουργία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού να προστατεύει τον εγκέφαλο από διακυμάνσεις της ιοντικής συγκέντρωσης που μπορεί να συμβούν μετά από ένα γεύμα ή άσκηση ( Cserr et al. 1984). Ο φραγμός συμβάλλει στην χωριστή διατήρηση νευροδιαβιβαστών και νευροενεργών παραγόντων που επενεργούν στο ΚΝΣ , αλλά και στο ΠΝΣ, ώστε παρόμοιοι παράγοντες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στα δύο συστήματα χωρίς να υπάρχει διομιλία (crosstalk). Κατ' αυτόν τον τρόπο, ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη διατήρηση ενός αυστηρώς οργανωμένου μικροπεριβάλλοντος για τα ηλεκτρικά σήματα μεταξύ των νευρώνων.

Μικρά μόρια που περιέχουν αέρια όπως το  $O_2$  και το  $CO_2$  μπορούν εύκολα να περάσουν μέσα από τις λιπιδικές μεμβράνες, και επίσης υπάρχει δίοδος για την είσοδο μικρό λιπόφιλων παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων κάποιων φαρμάκων όπως τα βαρβιτουρικά και η εθανόλη. Η παρουσία ενός συστήματος διαβίβασης ουσιών στις μεμβράνες των ενδοθηλιακών κυττάρων ( Luminal και abluminal) ελέγχει την την διακυτταρική κίνηση μικρών υδρόφιλων μορίων αποτελώντας ένα «επιλεκτικό φραγμό μεταφοράς», ενώ ο συνδιασμός ενδοκυτταρικών και εξοκυτταρικών ενζύμων αποτελεί έναν «μεταβολικό φραγμό». Μεγάλα υδρόφιλα μόρια όπως τα πεπτίδια και οι πρωτεΐνες γενικά απορρίπτονται, εκτός από ειδικές περιπτώσεις που η είσοδος γίνεται λόγω υποδοχέων ή απορροφητικών παραγόντων. Γενικότερα το ενδοθηλίο στον εγκέφαλο έχει πολύ μικρότερο βαθμό απορρόφησης ουσιών από ότι το περιφερειακό ενδοθηλίο, και ο όρος «αιματοεγκεφαλικός φραγμός» αφορά σε ένα μεγάλο εύρος ενεργητικών και παθητικών ιδιοτήτων του ενδοθηλίου στον εγκέφαλο (Abott et al. 2006). Εφόσον οι στενές συνάψεις εμποδίζουν αυστηρά την είσοδο υδρόφιλων φαρμάκων, και περιορίζουν σημαντικά την είσοδο μεγάλων μορίων όπως τα πεπτίδια, οι στρατηγικές και οι μέθοδοι μεταφοράς φαρμάκων στο ΚΝΣ θα πρέπει να λαμβάνουν υπόψη τους αυτές τις ιδιότητες του αιματοεγκεφαλικού φραγμού.

### 2.3 Ο φαινότυπος του αιματοεγκεφαλικού φραγμού

Οι στενές συνάψεις στο επιθήλιο του εγκεφάλου εμποδίζουν ακόμη και την είσοδο μικρών μορίων όπως το  $\text{Na}^+$  και το  $\text{Cl}^-$ , τόσο ώστε η δια-ενδοθηλιακή ηλεκτρική αντίσταση ( Transendothelial electrical resistance TEER) η οποία είναι τυπικά 2-20  $\text{Ohm.cm}^2$  στα περιφερειακά τριχοειδή, μπορεί να είναι  $>1000. \text{Ohm.cm}^2$  στο εγκεφαλικό ενδοθήλιο (Butt et al. 1990).

Σύμφωνα με τις πιο πρόσφατες ιστολογικές μελέτες τα τριχοειδή στον εγκέφαλο περιστοιχίζονται από ή σχετίζονται στενά με διάφορα κύτταρα, περιλαμβανομένων περιαγγειακών ποδίσκων των αστροκυττάρων, περικυττάρων και μικρογλοιακών κυττάρων όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα(Πηγή Abbott et al. 2006):



**Εικόνα 2**

**Κυτταρικά συστατικά του αιματοεγκεφαλικού φραγμού.** Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός αποτελείται από τριχοειδή επιθηλιακά κύτταρα, περιστοιχισμένα από την βασική μεμβράνη και τους αστροκυτταρικούς περιαγγειακούς ποδίσκους. Τα αστροκύτταρα αποτελούν τον κυτταρικό σύνδεσμο με τους νευρώνες. Στην εικόνα φαίνονται επίσης περικύτταρα και μικρογλοιακά κύτταρα.

**a** | Χαρακτηριστικά εγκεφαλικών ενδοθηλιακών κυττάρων που παρατηρήθηκαν σε καλλιέργεια κυττάρων. Τα κύτταρα εκφράζουν έναν αριθμό διαβιβαστών και υποδοχέων, μερικοί απο τους οποίους φαίνονται στην εικόνα.

**b** | Παραδείγματα αμφίδρομης αγωγής μεταξύ αστρογλοιακών-ενδοθηλιακών κυττάρων, απαραίτητης στην εδραίωση και διατήρηση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Μερικά χαρακτηριστικά των ενδοθηλιακών κυττάρων φαίνονται στην εικόνα. Οι πληροφορίες έχουν συλλεχθεί από συν-καλλιέργειες αστρογλοιακών και ενδοθηλιακών σε θρεπτικό μεσο.

## **2.4 Επαγωγή των ιδιοτήτων του αιματοεγκεφαλικού φραγμού**

Όπως αναφέρεται και παραπάνω τα σώματα των νευρικών κυττάρων τυπικά δεν απέχουν παραπάνω από 10μm από το κοντινότερο τριχοειδές. Αυτές οι στενές συσχετίσεις μεταξύ των κυττάρων, ειδικά των αστροκυττάρων και των τριχοειδών του εγκεφάλου, οδήγησαν στην υπόθεση ότι είναι ικανές να συμβάλλουν στην δημιουργία των εξειδικευμένων χαρακτηριστικών του φαινότυπου του φραγμού στο τριχοειδές ενδοθήλιο του εγκεφάλου (Davson & Oldendorf 1967). Πλέον όμως έχει αποδειχθεί ότι και τα αστροκύτταρα μπορούν να επηρεάσουν τις ιδιότητες του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, ενδυναμώνοντας τις συνάψεις ( « ανατομικός φραγμός» physical barrier) ( Δεηοθψκ et al. 1990), καθώς επίσης την έκφραση και τον εντοπισμό μεταφορέων και εξειδικευμένων συστημάτων ενζύμων ( «μεταβολικός φραγμός») ( Haseloff et al. 2005). Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι μερικά από τα υπόλοιπα κύτταρα στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό , συμπεριλαμβανομένων των περικυττάρων, των περιαγγειακών μακροφάγων και των νευρώνων συνεισφέρουν στην επαγωγή των ιδιοτήτων του αιματοεγκεφαλικού φραγμού ( Ramsauer et al.2002, Zenker et al.2003, Schiera et al.2003). Γενικά, λαμβάνοντας υπόψη την συνθετότητα των ιδιοτήτων του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, και τις ανατομικές σχέσεις μεταξύ των σχετιζόμενων κυττάρων στην περιοχή, είναι αναμενόμενο να παρατηρήσουμε συνεργικές επαγωγικές ιδιότητες που αφορούν σε παραπάνω από ένα είδος κυττάρου. Κατά την ενήλικη ζωή τα γλοιακά κύτταρα και τα αστροκύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έκφραση παραγόντων που επηρεάζουν την λειτουργικότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, για αυτό άλλωστε εμφανίζονται βλάβες στον αιμ/κό φραγμό σε ορισμένες νευροπαθολογικές περιπτώσεις.

## **2.5 Επηρεασμός ( Modulation) της λειτουργίας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού**

Παρότι ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός συνιστά μια σχετικά σταθερή δομή, πολλά από τα χαρακτηριστικά του φαινότυπου υπόκεινται σε αλλαγές ή αλλοιώσεις. Για παράδειγμα, διάνοιξη των στενών ενώσεων παρατηρείται σε περιπτώσεις φλεγμονής, η οποία μπορεί να οδηγήσει ακόμη και σε οίδημα στον εγκέφαλο (Huber et al.2001), ενώ σε περιπτώσεις υπογλυκαιμίας ή υποξίας παρατηρείται αύξηση του διαβιβαστή GLUT1 ( Boado et al. 2002). Κάποιοι χημικοί παράγοντες με την κυκλοφορία του αίματος, ή αν εκλύονται από κύτταρα που σχετίζονται με τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, είναι ικανοί να αυξήσουν την διαπερατότητα του επιθηλίου στον εγκέφαλο, και κάποιοι άλλοι έχουν ακριβώς το αντίθετο αποτέλεσμα. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν η βραδυκίνη, η ισταμίνη, η σεροτονίνη, η γλουταμίνη (glutamate), νουκλεοτίδια πουρινών ( ATP, ADP, AMP), η αδενοσίνη, η φωσφολιπιδάση A2, το αραχιδονικό οξύ, προσταγλανδίνες, λευκοτρίνες, ιντερλευκίνες ( IL-1α , IL-1β, IL-6), TNFα (tumor necrosis factor- α), MIP1 και MIP2 ( macrophage-inhibitory proteins ), C3a-desArg (complement-derived polypeptide C3a-desArg), ελεύθερες ρίζες, νιτρικό οξύ. Στην δεύτερη κατηγορία ανήλουν τα στεροΐδη, αυξημένο διακυτταρικό κυκλικό AMP, η αδρενομεδουλίνη και νοραδρενεργικοί παράγοντες (Abbott et al. 2006).

## **2.6 Αλλαγές στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό σε παθολογικές καταστάσεις**

Πολλές παθολογίες του ΚΝΣ προκαλούν διαταραχή της λειτουργίας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, και σε πολλές από αυτές διαταράσσεται και η συνεργασία μεταξύ αστροκυττάρων – ενδοθηλίου. Τα τριχοειδή αγγεία σε γλοιακούς όγκους είναι πιο ασθενή ως προς την διαπερατότητά τους (leaky) από ότι σε φυσιολογικούς ιστούς, είτε γιατί απουσιάζουν οι επαγωγικοί παράγοντες ( Inductive factors) είτε γιατί αυξάνεται η έκλυση κάποιων παραγόντων όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας ( Vascular endothelial growth factor VEGF). Παρακάτω καταγράφονται οι παθολογικές καταστάσεις που επηρεάζουν την λειτουργία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού: εγκεφαλικό επεισόδιο, τραυματισμός, μολύνσεις ή φλεγμονές, πολλαπλή σκλήρυνση, ο ιός του HIV, η νόσος του Alzheimer, η νόσος του Parkinson, η επιληψία, και εγκεφαλικοί όγκοι.

### **3. Εστιασμένος Υπέρηχος**

Ο υπέρηχος είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για διαγνωστικούς σκοπούς σε κλινικό επίπεδο. Οι διαφορετικές ακουστικές ιδιότητες των διαφορετικών ιστών είναι αυτές που επιτρέπουν την οπτική αναπαράσταση του ιστού σε κάθε επίπεδο, καθώς και το βάθος του χρησιμοποιώντας την διαφορά του χρόνου που χρειάζεται το ακουστικό κύμα από τον εκπομπό transducer για να φτάσει στο αντικείμενο/ιστό και μετά να επιστρέψει στον λήπτη transducer. Ωστόσο, με την πρόοδο της τεχνολογίας στον τομέα των υπερήχων, γίνεται χρήση της μεθόδου και για θεραπευτικούς σκοπούς. Ο εστιασμένος υπέρηχος δεν είναι παρά η ίδια μέθοδος με μόνη διαφορά ότι η υπερηχητική δέσμη είναι «εστιασμένη», και χρησιμοποιείται για εντοπισμένη εφαρμογή του υπερήχου, για θεραπευτικούς σκοπούς, με στόχο να μην επηρεαστούν οι ιστοί γύρω από την περιοχή ενδιαφέροντος.

#### **3.1 Βασικές Αρχές**

##### **3.1.1 Εισαγωγή στους υπέρηχους**

Το ηχητικό κύμα είναι υλικό κύμα διότι απαιτεί ύπαρξη υλικού μέσου για τη διάδοση της μηχανικής ενέργειας που μεταφέρει, σε αντίθεση με το ηλεκτρομαγνητικό κύμα για παράδειγμα το οποίο διαδίδεται και στο κενό, και επίσης το ηχητικό κύμα είναι κατά κανόνα *διαμήκες* κύμα καθώς η ταλάντωση των δομικών μονάδων του μέσου γύρω από τη θέση ισορροπίας τους πραγματοποιείται κατά τη διεύθυνση της διάδοσης του κύματος ( ενώ το ηλεκτρομαγνητικό κύμα είναι εγκάρσιο γιατί ταλαντώνονται κάθετα στη διεύθυνση διάδοσης). Το ηχητικό κύμα μπορεί να διαδοθεί σε αέρια, υγρά και στερεά μέσα και μόνο σε στερεά μέσα και μόνο μπορεί να είναι και εγκάρσιο κύμα. Τα ηχητικά κύματα που διαδίδονται σε ιστούς είναι διαμήκη, και μόνο αυτά είναι σημαντικά στην απεικόνιση με χρήση υπερήχων, καθώς τα εγκάρσια κύματα δεν διαδίδονται αποτελεσματικά σε μαλακούς ιστούς.

##### **Πυκνώματα και αραιώματα**

Η ταλάντωση των δομικών μονάδων του μέσου έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πυκνωμάτων και αραιωμάτων, λόγω των μεταβολών της πίεσης. Η παλμική κίνηση της πηγής πιέζει τις δομικές μονάδες του μέσου, οι οποίες πιέζουν τις γειτονικές τους δομικές μονάδες κλπ. Έτσι δημιουργούνται πυκνώματα και αραιώματα που κινούνται κατά τη διεύθυνση διάδοσης του κύματος, τα οποία



αντιστοιχούν σε περιοχές υψηλότερης και χαμηλότερης αντίστοιχα πίεσης. Φυσικά, δεν υπάρχει δηλαδή μεταφορά μάζας.

### Ακουστική πίεση

Ακουστική πίεση είναι ο ποσοτικός όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει την δύναμη του ηχητικού κύματος της πηγής, και η μέγιστη τιμή που παίρνει ονομάζεται πλάτος της πίεσης,  $P$ . Η μονάδα μέτρησης της πίεσης στο υπερήχους είναι το Pascal.



**Εικόνα 3:** Στιγμιότυπο του μέσου κατά τη διάδοση του ηχητικού κύματος. Το μήκος κύματος είναι  $\lambda$  και το πλάτος της ακουστικής πίεσης είναι  $P$

### Περίοδος και συχνότητα

Ένας χρήσιμος τρόπος να εκφράσουμε την χωρική συμπεριφορά του ηχητικού κύματος είναι να απεικονίσουμε την πίεση ως προς τον χρόνο σε ένα συγκεκριμένο στιγμιότυπο. Η συχνότητα  $f$  του υπερήχου καθορίζεται από τον αριθμό των παλμών της πηγής ανά δευτερόλεπτο και μετράται σε Hz. Ο χρόνος που χρειάζεται για μια διαταραχή να ολοκληρώσει ένα κύκλο προτού επαναληφθεί ονομάζεται περίοδος  $T$  και είναι το αντίστροφο της συχνότητας :

$$T = \frac{1}{f}$$

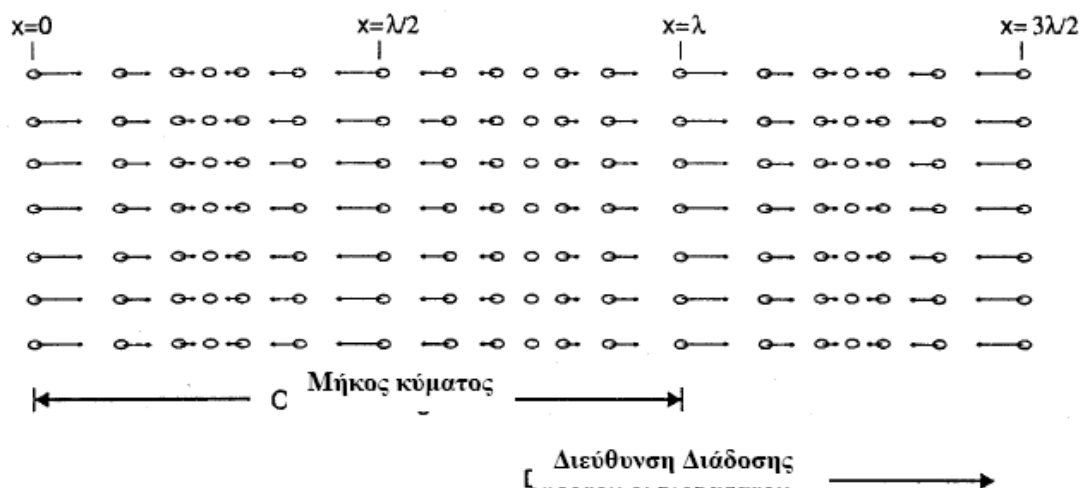
Τα ηχητικά κύματα κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με τη συχνότητά τους  $\nu$  σε τρεις περιοχές: την *υποηχητική* ( $f < 20$  Hz, προκαλούμενα από σεισμικά ή θαλάσσια κύματα), την *ακουστική* ( $20 \text{ Hz} < f < 20 \text{ kHz}$ , αντιληπτά από το ανθρώπινο αυτί) και την

υπερηχητική περιοχή ( $20 \text{ kHz} < f < \sim 3 \text{ GHz}$ , αντιληπτά από π.χ. από τα δελφίνια και τις νυχτερίδες).

## Υπέρηχος

Υπέρηχος λοιπόν είναι μια μηχανική ταλάντωση/δόνηση της ύλης με συχνότητα πάνω από το ακουστικό όριο των  $20 \text{ kHz}$ . Στον διαγνωστικό υπέρηχο χρησιμοποιείται ένα εύρος συχνοτήτων από  $1 \text{ MHz}$  έως  $20 \text{ MHz}$ ,

Το κύμα διαδίδεται μέσα στον ιστό σαν μια διαταραχή των σωματιδίων του μέσου που συντηρεί τη διάδοση του κύματος. Η ταλάντωση είναι κατά μήκος της διεύθυνσης διάδοσης του κύματος, καθιστώντας το ένα διαμήκες κύμα, χωρίς συνολική μετατόπιση των σωματιδίων και μεταφορά μάζας. Το υπερηχητικό κύμα επιδρά ως απλή διαταραχή στο μέσο.



**Εικόνα 4:** Μετατόπιση των σωματιδίων για ένα διαδιδόμενο υπερηχητικό κύμα σε μια σταθερά χρόνο. Τα Βέλη δείχνουν τη κατεύθυνση και το μέγεθος της ταχύτητας των σωματιδίων.

## Ταχύτητα Ήχου

Η απόσταση που διανύεται από τα σωματίδια κατά την διάδοση του ήχου ονομάζεται «σωματιδιακή» μετατόπιση και συνήθως είναι της τάξης των μερικών δεκάτων του νανομέτρου. Η ταχύτητα των σωματιδίων που ταλαντώνονται καλείται «σωματιδιακή ταχύτητα». Η σωματιδιακή ταχύτητα διαφέρει από τον ρυθμό

διάδοσης της ενέργειας στο μέσο, η οποία ορίζεται ως «φασική ταχύτητα» και παίρνει αρκετά μεγαλύτερες τιμές σε σχέση με την σωματιδιακή ταχύτητα. Παρά το γεγονός ότι τα σωματίδια κινούνται κατά μερικά δέκατα του νανόμετρου, η διαταραχή που προκαλούν μεταδίδεται σε άλλα σωματίδια του μέσου σε πολύ μεγαλύτερη απόσταση.

Η ταχύτητα διάδοσης του ηχητικού κύματος σε ένα μέσο καθορίζεται από τα χαρακτηριστικά του μέσου, και ειδικά για τα διαμήκη ηχητικά κύματα σε υγρά ή σε σωματικού ιστούς δίνεται από τη σχέση:

$$c = \sqrt{\frac{B}{\rho}} = \sqrt{\frac{1}{\rho \cdot \kappa}}$$

όπου  $\rho$  είναι η μέση πυκνότητα,  $B$  είναι μια σταθερά που ονομάζεται συντελεστής σκληρότητας (bulk modulus) και  $\kappa$  είναι η αδιαβατική συμπιεστότητα (adiabatic compressibility). Ισχύει  $B=1/\kappa$ . Το  $B$  ουσιαστικά περιγράφει την σκληρότητα του μέσου, και την αντίστασή του στην συμπίεση. Και η παραπάνω σχέση ( . ) δείχνει πως η ταχύτητα διάδοσης σε ένα μέσο εξαρτάται από την πυκνότητα του μέσου αλλά και από την σκληρότητά του. Η συμπιεστότητα εκφράζεται σε  $m^2/N$  και είναι περίπου  $457 \cdot 10^{-12} m^2/N$  στο νερό.

Η ταχύτητα του ήχου σε βιολογικού ιστούς είναι πολύ σημαντική παράμετρος σε εφαρμογές απεικόνισης. Η μικρότερη ταχύτητα παρατηρείται στους πνεύμονες, και οφείλεται στη παρουσία αέρα. Στους υπόλοιπους βιολογικούς ιστούς η ταχύτητα του ήχου κυμαίνεται από 1500 έως 1600 m/s . Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η ταχύτητα του ήχου σε επιλεγμένους ιστούς :

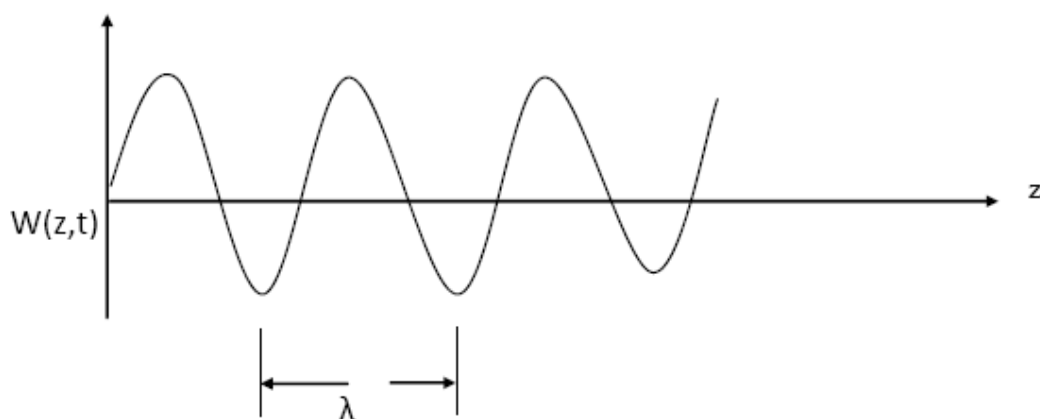
Ιστός / Υλικό	Ταχύτητα ήχου ( m/s )
Πνεύμονας	600
Λίπος	1460
Ήπαρ	1555
Αίμα	1560
Νεφρά	1565
Μύς	1600
Οφθαλμός	1620
Κρανιακό οστό	4080

## Μήκος κύματος

Το μήκος κύματος  $\lambda$  είναι η απόσταση μεταξύ δύο διαδοχικών χαμηλών ή υψηλών μετώπων πίεσης του ηχητικού κύματος (στο διάστημα της οποίας επιτυγχάνεται ένας κύκλος). Είναι η απόσταση την οποία διανύει το ηχητικό κύμα κατά τη διάρκεια μιας περιόδου  $T$ . Το μήκος κύματος συνδέεται με την συχνότητα και την ταχύτητα σύμφωνα με τη σχέση:

$$\lambda = \frac{c}{f}$$

όπου  $c$  είναι η ταχύτητα διάδοσης του ήχου στο μέσο.



**Εικόνα 5:** Ημιτονικό κύμα υπερήχων διαδιδόμενο στην  $z$  διεύθυνση σε συγκεκριμένο χρόνο

### 3.1.2. Πλάτος και Ένταση

Το πλάτος της πίεσης  $P$  ορίζεται ως η μέγιστη αύξηση ( ή μείωση) στην τιμή της πίεσης. Η ένταση σε ένα σημείο της δέσμης του υπερήχου είναι ανάλογη με το τετράγωνο του πλάτους της έντασης και συνδέονται με την παρακάτω σχέση:

$$I = \frac{p^2}{2\rho c}$$

όπου  $\rho$  είναι η πυκνότητα του μέσου και  $c$  είναι η ταχύτητα διάδοσης του ήχου.

### 3.1.3 Ανάκλαση και Διάδοση

#### Ακουστική εμπέδηση Z

Η χαρακτηριστική ακουστική εμπέδηση Z, ορίζεται ως ο λόγος της ακουστικής πίεσης σε ένα σημείο του μέσου διάδοσης προς τη ταχύτητα του σωματιδίου στο ίδιο σημείο. Ακόμη για την ακουστική εμπέδηση ενός διαδιδόμενου επίπεδου κύματος ισχύει:

$$Z = \rho c$$

Είναι δηλαδή ίση με το γινόμενο της πυκνότητας του μέσου  $\rho$  και της ταχύτητας του ήχου  $c$ . Η ακουστική εμπέδηση εξαρτάται μόνο από τις μηχανικές ιδιότητες του μέσου και όχι από την συχνότητα του ηχητικού κύματος. Η μονάδα μέτρησης της είναι το Rayl ( $1\text{Rayl} = 1 \text{ kg/m}^2/\text{sec}$ ).

#### Ανάκλαση – Κάθετη Πρόσπτωση

Όταν ένα ηχητικό κύμα προσπίπτει σε μια διεπιφάνεια μεταξύ δύο υλικών με διαφορετική ακουστική εμπέδηση, μέρος της ενέργειας του κύματος θα ανακλαστεί (ανακλώμενο κύμα) και μέρος της ενέργειας του κύματος θα διαδοθεί (διαδιδόμενο κύμα) στο επόμενο μέσο. Το πλάτος του διαδιδόμενου κύματος εξαρτάται από την διαφορά των ακουστικών εμπεδήσεων των δύο μέσων. Για κάθετη πρόσπτωση, ο συντελεστής ανάκλασης R της πίεσης είναι ο λόγος του πλάτους της πίεσης του ανακλώμενου κύματος,  $P_r$ , προς το πλάτος της πίεσης του προσπίπτοντος κύματος,  $P_i$ :

$$R = \frac{Z_2 - Z_1}{Z_2 + Z_1} = \frac{P_r}{P_i}$$

Όπου  $Z_1$  είναι η χαρακτηριστική ακουστική εμπέδηση του πρώτου μέσου και  $Z_2$  του δεύτερου- επόμενου μέσου.

Στις περισσότερες διεπιφάνειες μεταξύ των μαλακών ιστών στο σώμα ο συντελεστής ανάκλασης είναι αρκετά μικρός ώστε το ηχητικό κύμα να διαδίδεται στους επόμενους ιστούς. Όταν όμως παρεμβάλλεται αέρας το κύμα ανακλάται σε μεγάλο βαθμό, και αυτός είναι και ο λόγος που χρησιμοποιείται τζελ ή έλαιο μεταξύ του υπερηχητικού μετατροπέα (transducer) και της επιφάνειας που εφαρμόζεται ο υπέρηχος σε κλινικές εφαρμογές.

#### Μη-κάθετη πρόσπτωση

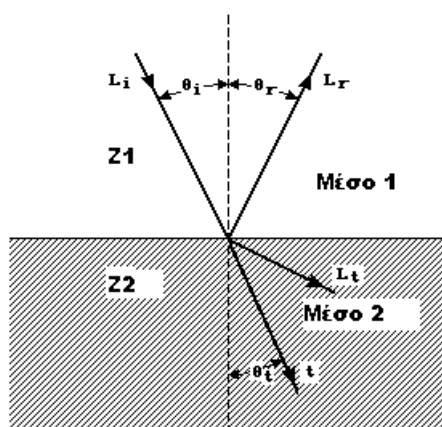
Στη περίπτωση της μη κάθετης πρόσπτωσης, το κύμα ανακλάται υπό γωνία

$\theta_r$ , και διαθλάται υπό γωνία  $\theta_t$ . Το φαινόμενο αυτό επηρεάζει την αντήχηση η οποία είναι πολύ σημαντική στον κλινικό υπέρηχο, γιατί όπως θα αναλυθεί και παρακάτω, ο μετατροπέας (transducer) λαμβάνει το ανακλώμενο κύμα, και το πλάτος της αντήχησης που θα ληφθεί εξαρτάται από την κλίση της γωνίας του προσπίπτοντος κύματος στον ιστό.

Όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα, ο συντελεστής ανάκλασης (reflection coefficient) είναι:

$$Ra = \frac{Z_2 \cos\theta_i - Z_1 \cos\theta_t}{Z_2 \cos\theta_i + Z_1 \cos\theta_t} = \frac{Pr}{Pt}$$

όπου  $\theta_i$  είναι η γωνία πρόσπτωσης,  $\theta_t$  η γωνία διάδοσης του κύματος,  $\theta_r$  είναι η γωνία ανάκλασης και ισχύει  $\theta_i = \theta_r$ .



**Εικόνα 6:** Ανάκλαση και διάθλαση ενός επίπεδου κύματος στο σύνορο μεταξύ δύο μέσων με ακουστικές εμπεδήσεις  $Z_1$  και  $Z_2$  στην περίπτωση μη-κάθετης πρόσπτωσης.  $L_i$ : προσπίπτον κύμα,  $L_r$ : ανακλώμενο κύμα,  $L_t$ : διαδιδόμενο κύμα.

Αυτές οι γωνίες συνδέονται με τον νόμο του Snell σύμφωνα με τη σχέση:

$$\frac{\sin\theta_t}{\sin\theta_i} = \frac{c_2}{c_1}$$

όπου  $c_1$  και  $c_2$  οι ταχύτητες στο μέσο διάδοσης.

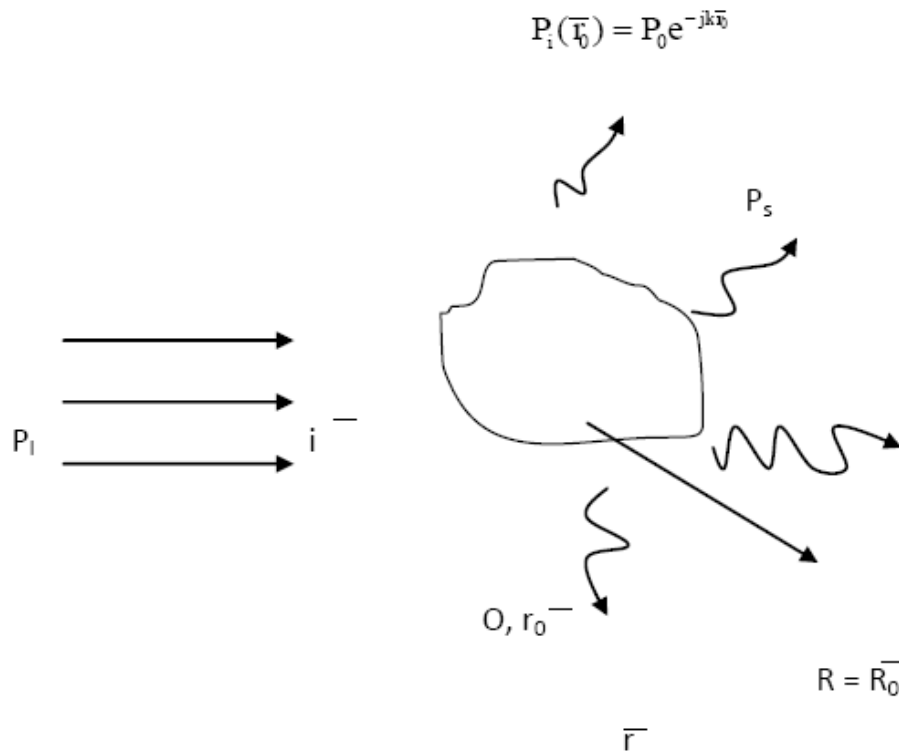
### 3.1.4 Σκέδαση

Όταν ένα κύμα διαδίδεται σε ένα μέσο, η ενέργειά του μειώνεται ως συνάρτηση της απόστασης. Η ενέργεια μπορεί να μεταβάλλεται λόγω ανάκλασης ή σκέδασης ή απορρόφησης από το μέσο και μετατρέπεται της σε θερμότητα. Η

πίεση ενός επίπεδου κύματος που διαδίδεται κατά την διεύθυνση  $z$  μπορεί να εκφραστεί ως:

$$P_z = P_{z_0} \cdot e^{-\beta z}$$

όπου  $P_{z_0}$  είναι η πίεση στη θέση  $z = 0$  και  $\beta$  είναι ο συντελεστής εξασθένησης της πίεσης με μονάδα μέτρησης nepers ανά cm. Η σκέδαση ενός επιπέδου κύματος από έναν (μοναδικό) σκεδαστή συχνά περιγράφεται από τον όρο «διατομή σκέδασης» (scattering cross-section). Αυτός ο όρος ορίζεται σαν την συνολική ισχύ που σκεδάζεται από το αντικείμενο ανά μονάδα προσπίπτουσας έντασης. Εάν υποθέσουμε ένα προσπίπτον επίπεδο κύμα με προσπίπτουσα πίεση  $P_i$  στην θέση  $r_0$  όπως παρατηρούμε και στο παρακάτω σχήμα, ισχύει:



**Εικόνα 7:** Σκέδαση ενός επίπεδου κύματος που προσπίπτει πάνω σ'ένα αντικείμενο  $O$ , που είναι τοποθετημένο στη θέση  $\vec{r}_0$ .

Όπου  $\vec{k} = k \cdot \vec{i}$  είναι το διάνυσμα του κυματαριθμού. Η τιμή της πίεσης που σκεδάζεται στην θέση  $\vec{r}$  δίνεται από τη σχέση:

$$P(\vec{r}) = P_0 e^{-jk \cdot \vec{r}} + P_s(\vec{r})$$

όπου  $\bar{i}$  και  $\bar{o}$  είναι οι διευθύνσεις της πρόσπτωσης και της παρατήρησης υποθέτοντας ότι το σημείο της παρατήρησης είναι στο μακρινό πεδίο του σκεδαστή και ότι  $R = |r - r_0|$ .

Στην τελευταία σχέση ο όρος  $f(\bar{o}, \bar{i})$  καλείται συνάρτηση του πλάτους σκέδασης και περιγράφει της ιδιότητες σκέδασης του αντικειμένου. Η σκεδαζόμενη ένταση είναι λοιπόν:

$$I_s = \left( \frac{f(\bar{o})}{R} \right)^2$$

Η διαφορική διατομή  $\sigma_d(\bar{i}, \bar{o})$ , η οποία ορίζεται σαν η ισχύς που σκεδάζεται στην διεύθυνση  $\bar{o}$  ανά στερεά γωνία και ανά προσπίπτουσα ένταση, ορίζεται από τη σχέση:

$$\sigma_d(\bar{o}) = f(\bar{o})^2$$

Η διατομή σκέδασης δίνεται λοιπόν από τη σχέση:

$$\sigma_s = \int \sigma_d(\bar{o}) d\Omega$$

όπου  $d\Omega$  το διαφορικό της στερεάς γωνίας. Η ενεργός διατομή σκέδασης αποτελεί μια μέθοδο μέτρησης της σκέδασης, εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του υλικού-μέσου και αποτελεί μια ένδειξη του πόσο ισχυρά σκεδάζει το συγκεκριμένο υλικό.

Ανάλογα μπορούμε να ορίσουμε την διατομή απορρόφησης του αντικειμένου  $\sigma_i$  σαν την συνολική ισχύ ανά προσπίπτουσα ένταση που απορροφάται από το αντικείμενο. Η απώλεια ενέργειας εξαιτίας της παρουσίας του αντικειμένου είναι:

$$2\beta = (\sigma_i + \sigma_s)$$

όπου το  $2\beta$  είναι ο συντελεστής εξασθένησης της έντασης. Αν υπάρχουν περισσότερα του ενός αντικείμενα, θα έχουμε αντίστοιχα:

$$2\beta = n(\sigma_i + \sigma_s)$$



όπου  $n$  είναι η συγκέντρωση των σωματιδίων. Η παραπάνω σχέση ισχύει για μικρά  $n$  εξαιτίας των διαφορετικών φαινομένων πολλαπλής σκέδασης που εμφανίζονται όταν αυξάνει η τιμή του  $n$ .

Στην πραγματικότητα, δεν έχει νόημα να μιλάμε για ανακλαστική ισχύ της κάθε δομής του μέσου διάδοσης, καθώς το οπισθοσκεδαζόμενο σήμα εξαρτάται από την ενισχυτική και καταστρεπτική αλληλεπίδραση (συμβολή) των κυμάτων που προέρχονται από έναν αριθμό μικρών δομών του ιστού. Μάλιστα, αυτό που καθορίζει την ένταση του επιστρεφόμενου σήματος είναι οι διακυμάνσεις μέσα στον ιστό και η σύσταση του ιστού. Για το λόγο αυτό, το μέγεθος του επιστρεφόμενου σήματος περιγράφεται με όρους ισχύος του σκεδαζόμενου σήματος (power of the returned signal). Καθώς οι μικρές δομές επανεκπέμπουν κύματα σε όλες τις διευθύνσεις και οι διάφορες δομές σκέδασης μπορεί να διαταχθούν (ordered) σε κάποια διεύθυνση, η επιστρεφόμενη ισχύς είναι γενικά ανεξάρτητη από τη σχετική θέση ανάμεσα στον πομπό και τον λήπτη του υπέρηχου. Ένα τέτοιο μέσο διάδοσης ονομάζεται ανισοτροπικό (anisotropic), παραδείγματα του οποίου είναι ο μυϊκός και νεφρικός ιστός. Συγκρίνοντας τους διάφορους τύπους ιστών, τόσο το αίμα όσο και ο ιστός του ήπατος (εάν εξαιρεθούν τα μεγάλα αγγεία αιμάτωσης του), είναι ένα αρκετά ισοτροπικά μέσα σκέδασης (isotropic scattering media). Για την εκπομπή και τη συλλογή του σήματος στους ιατρικούς υπέρηχους χρησιμοποιείται συνήθως μόνο ένας μετατροπέας (transducer) και μόνο το οπισθοσκεδαζόμενο σήμα, λαμβάνεται υπόψη. Η ισχύς του σήματος που δημιουργείται από έναν μόνο σκεδαστή χαρακτηρίζεται όπως αναφέρθηκε και παραπάνω από την ενεργό διατομή σκέδασης (scattering cross section). Εάν ο σκεδαστής είναι τόσο μικρός ώστε το προσπίπτον κύμα να έχει ομοιόμορφη ένταση,  $I_i$ , τότε η σκεδαζόμενη ισχύς δίνεται από τη σχέση:

$$P_s = I_i \sigma_s$$

όπου  $\sigma_s$  είναι η ενεργός διατομή σκέδασης.

Υποθέτοντας ότι η σκεδαζόμενη ενέργεια που εκπέμπεται ομοιόμορφα σε όλες τις κατευθύνσεις, η ένταση είναι:

$$I_s = \frac{P_s}{4\pi R^2} = \frac{\sigma_s}{4\pi R^2} I_i$$

όπου  $R$  είναι η απόσταση από τη περιοχή σκέδασης. Αυτή είναι η περίπτωση για ένα

σκεδαστή που παρουσιάζει διαφοροποίηση στην συμπίεστικότητα του, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός σφαιρικού κύματος. Η συλλεγόμενη ισχύς εξαρτάται από την ενεργό διατομή σκέδασης και την εκπεμπόμενη ισχύ. Εξαρτάται επίσης, από την απόσταση σε σχέση με τον μετατροπέα και σε μεγάλο βαθμό από το ποια είναι η ενεργή επιφάνεια (aperture) του μετατροπέα. Γενικά, ένας μεγάλος μετατροπέας αποδίδει και ένα αυξημένο (μεγαλύτερο) σήμα λήψης-καταγραφής.

### 3.1.5 Απορρόφηση

Οι μηχανισμοί απορρόφησης στους βιολογικούς ιστούς είναι αρκετά σύνθετοι αλλά υποθέτουμε ότι προέρχονται κυρίως από:

1. Κλασσική απορρόφηση εξαιτίας του ιξώδους
2. Φαινόμενα χαλάρωσης

Και τα δύο αυτά φαινόμενα εξαρτώνται από την συχνότητα  $f$  του κύματος. Η κλασσική απορρόφηση περιγράφει τις απώλειες τριβής που σχετίζονται με το ιξώδες του μέσου. Μάλιστα, έχει αποδειχτεί ότι σε υλικά όπως ο αέρας ή το νερό, όπου η κλασσική απορρόφηση υπερισχύει, η απορρόφηση είναι ανάλογη του όρου  $f^2$ .

Παρόλα αυτά στην περίπτωση των βιολογικών ιστών τα πράγματα δεν περιγράφονται με παρόμοιο τρόπο. Αντίθετα σε τέτοιες περιπτώσεις χρησιμοποιείται η έννοια του φαινομένου χαλάρωσης. Συγκεκριμένα, όταν ένα μόριο εξωθείται-διεγείρεται σε μία νέα θέση και στη συνέχεια αφήνεται ελεύθερο, απαιτείται ένας συγκεκριμένος χρόνος ώστε το μόριο να επιστρέψει στην αρχική του, ουδέτερη θέση (κατάσταση χαμηλότερης δυνατής δυναμικής ενέργειας). Ο χρόνος αυτός καλείται χρόνος χαλάρωσης (relaxation time) του μορίου. Αν ο χρόνος αυτός είναι μικρός σε σχέση με την περίοδο του κύματος τότε η επίδραση της χαλάρωσης θα είναι μικρή. Διαφορετικά, εάν οι χρόνοι αυτοί είναι συγκρίσιμοι τότε πιθανόν τα μόρια να μην προλαβαίνουν να επανέλθουν στις αρχικές τους θέσεις ωστόσο ένα δεύτερο κύμα καταφθάσει και τα επαναδιεγείρει. Έτσι, ενώ το κύμα ωθεί τα μόρια προς μία κατεύθυνση αυτά κινούνται λόγω της προηγούμενης κατάστασής τους προς την αντίθετη. Λόγω της ύπαρξης αυτού του φαινομένου απαιτείται περισσότερη ενέργεια για να αντιστραφεί η κίνηση των μορίων. Από την άλλη μεριά όμως εάν αυξηθεί αρκετά η συχνότητα τα μόρια δεν θα μπορούν να ακολουθήσουν την κίνηση του κύματος και δεν θα εμφανίζεται η επίδραση της χαλάρωσης. Η μέγιστη απορρόφηση εμφανίζεται όταν η κίνηση της χαλάρωσης των μορίων είναι τελείως εκτός

συγχρονισμού συγκρινόμενη με αυτή του κύματος. Η απορρόφηση των υπερήχων στους βιολογικούς ιστούς περιγράφεται από την μαθηματική σχέση:

$$\frac{\beta_a}{f^2} = A + \sum_i \left( \frac{B_i}{f_{ri}} \right)$$

όπου A και B, οι σταθερές που αντιπροσωπεύουν τα μεγέθη της κλασσικής απορρόφησης και της απορρόφησης εξαιτίας της χαλάρωσης αντίστοιχα. Επίσης  $f_{ri}$  είναι η συχνότητα χαλάρωσης του i μορίου. Όμως, καθώς οι βιολογικοί ιστοί αποτελούνται από διαφορετικούς τύπους μορίων αλληλοεπικαλύπτονται τα φαινόμενα-διαδικασίες χαλάρωσης, με αποτέλεσμα την σχεδόν γραμμική συνάρτηση από την συχνότητα f, φαινόμενο που παρατηρείται πειραματικά σε πολλούς μαλακούς ιστούς.

### 3.1.6 Εξασθένηση της υπερηχητικής δέσμης σε ιστούς

Καθώς μία υπερηχητική δέσμη διαπερνά έναν ιστό, το πλάτος και η έντασή της μειώνονται σε συνάρτηση με την απόσταση. Υποθέτουμε ότι η μείωση είναι γραμμική. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται εξασθένηση και οφείλεται σε δύο παράγοντες: στην ανάκλαση και την διάθλαση στις επιφάνειες που συναντά, αλλά και στην απορρόφηση. Για τους κλινικούς υπέρηχους, ο συντελεστής εξασθένησης μετρείται σε ντεσιμπέλ ανά εκατοστό (dB/[Hz \*cm]). Χαρακτηριστικές τιμές για διαφόρους τύπους ιστών φαίνονται στον επόμενο πίνακα.

Ιστός	Συντελεστής εξασθένησης σε 1MHz (dB/[MHz*cm])
Νερό	0.0002
Αίμα	0.18
Συκώτι	0.5
Μύς	1.2

Η εξασθένηση εξαρτάται από τη συχνότητα, και μάλιστα αυξάνεται καθώς αυξάνεται η συχνότητα. Αυτό το φαινόμενο αποτελεί και έναν από τους πιο

περιοριστικούς παράγοντες στην κλινική χρήση υπερήχων, καθώς με την αύξηση της συχνότητας η διείσδυση της δέσμης στους ιστούς μειώνεται σημαντικά. Για να υπολογίσουμε την εξασθένηση μια δέσμης καθώς αυτή περνά έναν ιστό δεδομένου πάχους πολλαπλασιάζουμε τον συντελεστή εξασθένησης ( $\text{dB}/[\text{Hz}\cdot\text{cm}]$ ) με την απόσταση που διανύει η δέσμη (cm) και την συχνότητα του κύματος (Hz) οπότε τελικά η μονάδα μέτρησης της εξασθένησης είναι το ντεσιμπέλ.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η εξασθένηση στον ιστό οφείλεται σε έναν αριθμό φαινομένων. Η σκέδαση του πεδίου θα διασκορπίσει τμήματα της ενέργειας προς όλες τις κατευθύνσεις. Η απορρόφηση αποτελεί την μετατροπή της ενέργειας του κύματος σε θερμική ενέργεια, λόγω ταλαντωτικών απωλειών, απαγωγής θερμότητας, απωλειών που σχετίζονται με ανταλλαγές της ενέργειας ανάμεσα στα μόρια, κλπ. Ερευνητικές μελέτες αποκάλυψαν ότι, η απορρόφηση συνεισφέρει κατά 75 έως 95% στη συνολική εξασθένηση (Parker 1983).

### **3.1.7 Συμβολή κυμάτων**

Όταν τα κύματα παράγονται από παραπάνω από μία πηγή, τότε το αποτέλεσμα είναι η συμβολή τους και η δημιουργία ενός άλλου κύματος που το πλάτος του εξαρτάται από την σχετική διαφορά φάσης των κυμάτων. Η συμβολή μπορεί να είναι ενισχυτική, όταν τα αρχικά κύματα βρίσκονται σε συμφωνία φάσης, οπότε το πλάτος που προκύπτει είναι το άθροισμα των πλάτων τους, ή καταστρεπτική όταν έχουν αντίθετες φάσεις οπότε το προκύπτον κύμα έχει μηδενικό πλάτος.

## **3.2 Μετατροπείς (transducers) - Δημιουργία και λήψη των υπερήχων**

Γενικά ως μετατροπείς καλούμε τις συσκευές αυτές που μετασχηματίζουν μία μορφή ενέργειας σε μία άλλη. Στην ιατρική χρησιμοποιούνται πολλά διαφορετικά είδη μετατροπέων, ανάλογα με την παράμετρο ενδιαφέροντος (π.χ. την πίεση, την κίνηση κ.ά.). Ο υπερηχητικός μετατροπέας (Ultrasonic transducer) μετατρέπει την ακουστική ενέργεια σε ηλεκτρικό σήμα, και το αντίστροφο. Λειτουργεί δηλαδή και ως εκπομπός και ως δέκτης.

Η λειτουργία των μετατροπέων στηρίζεται στο πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο, το οποίο ανακαλύφθηκε το 1880 περίπου από τους Pierre και Jacques Curie, σύμφωνα

με το οποίο όταν εφαρμόζεται δύναμη σε έναν επιφάνεια από κρύσταλλο quartz, το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία ηλεκτρικού φορτίου. Και αντίστροφα, όταν εφαρμόζεται κάποιο ηλεκτρικό σήμα σε έναν κρύσταλλο, το κρύσταλλο δονείται στέλλοντας ηχητικό κύμα στο μέσο. Έτσι προκύπτει και η διπλή συμπεριφορά των μετατροπών ως εκπομπή και δέκτης ακουστικών σημάτων.

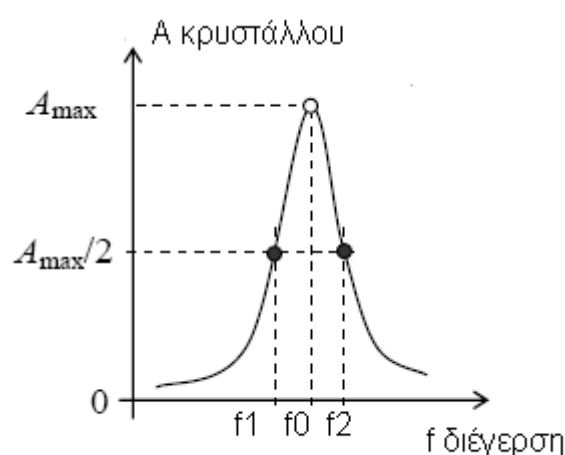
Πιεζοηλεκτρικά υλικά, όπως το quartz και η τουρμαλίνη, χρησιμοποιούνται ως στοιχειώδεις κυψέλες για την κατασκευή ενός μετατροπέα. Ένας καλά σχεδιασμένος μετατροπέας θα κάνει κάτι τέτοιο με υψηλή ακρίβεια και απόδοση μετατροπής, μικρή παραγωγή θορύβου ή άλλα παρενέργειες (artefacts). Επίσης, είναι σημαντικό για τον σχεδιασμό του μετατροπέα, να παρέχεται από τη διάταξη έλεγχος πάνω στην διακριτική ικανότητα (system resolution) και τη χωρική μεταβολή (βήμα, spatial variation) αυτής.

### **3.2.1 Παραγωγή και ανίχνευση υπερήχων – φασματική καμπύλη συντονισμού**

Η συνήθης μέθοδος παραγωγής και ανίχνευσης υπερήχων βασίζεται στους πιεζοηλεκτρικούς κρυστάλλους. Όταν στους κρυστάλλους αυτούς, οι οποίοι είναι κομμένοι σε μορφή σφαιρικού πλακιδίου με συγκεκριμένες κρυσταλλογραφικές διευθύνσεις, εφαρμοστεί πίεση και μεταβληθεί το πάχος τους, το υλικό πολώνεται ηλεκτρικά και προκαλείται συσσώρευση αντίθετων ηλεκτρικών φορτίων στις επιφάνειες που υφίστανται την πίεση. Η συσσώρευση αυτή δημιουργεί μετρήσιμη διαφορά δυναμικού μεταξύ των επιφανειών (πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο) που είναι ανάλογη της πίεσης. Εάν η μεταβολή της πίεσης είναι περιοδική τότε ο κρύσταλλος εξαναγκάζεται σε περιοδική μεταβολή-ταλάντωση του πάχους του και η δημιουργούμενη διαφορά δυναμικού είναι περιοδική. Συνεπώς το πλακίδιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ανιχνευτής – δέκτης ηχητικών κυμάτων. Αντίστροφα, η εφαρμογή διαφοράς δυναμικού μεταξύ των επιφανειών του κρυστάλλου έχει ως αποτέλεσμα την μεταβολή του πάχους του, ένα φαινόμενο το οποίο ονομάζεται ηλεκτροσυστολή. Η εφαρμογή εναλλασσόμενης τάσης σε πιεζοηλεκτρικό πλακίδιο το εξαναγκάζει σε περιοδική συστολή-ταλάντωση, η οποία δημιουργεί ηχητικά κύματα στο περιβάλλον ελαστικό μέσο. Τότε το πλακίδιο λειτουργεί ως πομπός ηχητικών κυμάτων με μόνη διαφοροποίηση ως προς την ανίχνευσή τους το ηλεκτρικό κύκλωμα με το οποίο αυτό συνδέεται.

## Συχνότητα συντονισμού

Και οι δύο παραπάνω περιπτώσεις αποτελούν παραδείγματα εξαναγκασμένης ταλάντωσης με τα προσπίπτοντα ηχητικά κύματα ή την εφαρμοζόμενη τάση να έχουν το ρόλο του διεγέρτη. Η απόκριση του κρυστάλλου στον εξαναγκασμό του σε ταλάντωση δεν είναι η ίδια σε όλες τις συχνότητες, υπάρχει μια περιοχή συχνοτήτων διέγερσης γύρω από την οποία το πλάτος της ταλάντωσής του, έστω  $A$ , μεγιστοποιείται, και εξαρτάται από το πάχος του πλακιδίου του συγκεκριμένου κρυστάλλου- πιεζοηλεκτρικού στοιχείου.



**Εικόνα 8:** Καμπύλη συντονισμού

Η φασματική αυτή κατανομή ενός πομπού αντανάκλαται φυσικά και στα εκπεμπόμενα ηχητικά κύματα. Για δεδομένο πλάτος ταλάντωσης του διεγέρτη το μέγιστο πλάτος της ταλάντωσης του κρυστάλλου εμφανίζεται όταν η συχνότητα του διεγέρτη είναι ίση με την ιδιοσυχνότητα του πλακιδίου  $f_0$ . Η ιδιοσυχνότητα του πλακιδίου εξαρτάται από τη ταχύτητα του ήχου στο πλακίδιο και από το πάχος του. Για κάποιο συγκεκριμένο πιεζοηλεκτρικό υλικό η επιλογή του πάχους καθορίζει λοιπόν και τη περιοχή συχνοτήτων της καμπύλης συντονισμού, συνεπώς και την περιοχή ηχητικών κυμάτων που μπορούν να εκπεμφθούν ή ανιχνευτούν. Ως μέτρο της οξύτητας του συντονισμού χρησιμοποιούμε τον ονομαζόμενο παράγοντα ποιότητας

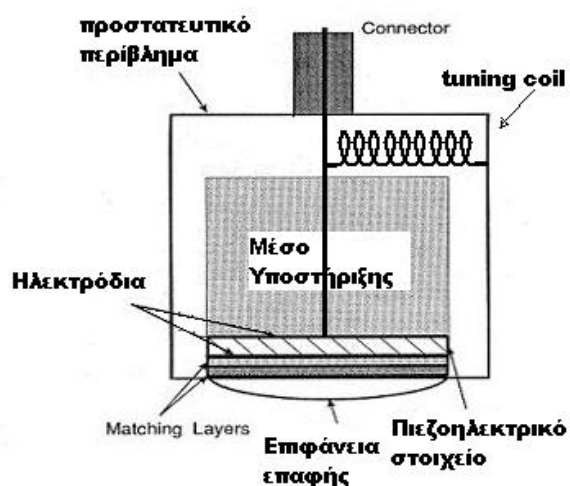
$$Q = \frac{f_0}{|f_2 - f_1|}$$

όπου  $f_1$  και  $f_2$  τις συχνότητες του διεγέρτη όπου το πλάτος ταλάντωσης του πλακιδίου είναι το μισό του μεγίστου. Όσο μεγαλύτερη η τιμή του  $Q$  τόσο στενότερη είναι η καμπύλη συντονισμού, άρα και η φασματική περιοχή ικανοποιητικής διέγερσης του κρυστάλλου.

Επίσης, εάν το πλάτος της διεγείρουσας τάσης του πομπού δεν παραμένει σταθερό, τότε θα μετρηθεί ο συνδυασμός των φασματικών κατανομών πομπού και δέκτη. Ο συνδυασμός αυτός αποδίδεται στα μαθηματικά με τον όρο συνέλιξη ή αναδίπλωση (convolution) και δυσκολεύει την εύρεση της πραγματικής φασματικής κατανομής του δέκτη. Για το λόγο αυτό, είναι προτιμότερο να μεταβάλουμε το πλάτος της διεγείρουσας τάσης σε κάθε συχνότητα διέγερσης έτσι ώστε το πλάτος ταλάντωσης του κρυστάλλου-πομπού να κρατείται κάθε φορά σταθερό. Τότε, η όποια μεταβολή του ανιχνευόμενου πλάτους θα οφείλεται αποκλειστικά στη φασματική απόκριση του δέκτη.

### 3.2.2 Κατασκευή μετατροπέα μονού στοιχείου

Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται μια τυπική σχεδίαση ενός μετατροπέα μονού στοιχείου. Αποτελείται από το πιεζοηλεκτρικό στοιχείο, τα στρώματα προσαρμογής (matching layers), το μέσο υποστήριξης (backing material), το πηνίο συντονισμού (tuning coil), ένα προστατευτικό περίβλημα, τον συνδετήρα (connector), και τα ηλεκτρόδια.



**Εικόνα 9:** Διάταξη υπερηχητικού μετατροπέα μονού στοιχείου (single element transducer)

## **Πιεζοηλεκτρικό στοιχείο**

Πρόκειται για κάποιο πιεζοηλεκτρικό κεραμικό (piezoelectric ceramic) [συνήθως μόλυβδος ζirkόνιο τιτάνιο (lead zirconate titanate-PZT)] ή πλαστικό [πολυβινυλιδικό διφθορίδιο (polyvinylidene difluoride-PVDF)], κομμένο σε κυλινδρικό σχήμα. Στη μπροστινή και πίσω επιφάνειά του τοποθετούνται ηλεκτρόδια και το στοιχείο πολώνεται μόνιμα σε όλο το πάχος του. Μετά από αυτό, το στοιχείο έχει την ιδιότητα, όποτε εφαρμόζεται μια διαφορά τάσης ανάμεσα στα ηλεκτρόδια, να παρουσιάζει μια αντίστοιχη αλλαγή στο πάχος του και, ενώ στην αντίστροφη περίπτωση, δηλαδή όταν εφαρμόζεται πίεση στις δύο επιφάνειες του παράγεται διαφορά δυναμικού ανάμεσα στα ηλεκτρόδια.

## **Στρώματα προσαρμογής (matching layers)**

Οι περισσότεροι μετατροπείς έχουν στρώματα προσαρμογής για να βελτιώνεται η ευαισθησία τους, δηλαδή η ικανότητά τους να ανιχνεύουν αδύναμες αντηχήσεις. Τα στρώματα προσαρμογής παρέχουν αποδοτικότερη μετάδοση του υπερηχητικού κύματος από τον μετατροπέα στον ιστό και αντίστροφα. Αυτό το επιτυγχάνουν μειώνοντας τις ανακλάσεις στην επιφάνεια μεταξύ τους.

Για παράδειγμα η ακουστική εμπέδηση των πιεζοηλεκτρικών κεραμικών υλικών όπως το PZT, είναι 20 φορές μεγαλύτερη από αυτή του μαλακού ιστού. Επομένως, ο συντελεστής ανάκλασης στη διεπιφάνειά τους είναι πολύ κοντά στην μονάδα, και το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας που παράγεται από τον μετατροπέα επιστρέφει πίσω στο στοιχείο. Σε αυτή την περίπτωση ένα τυπικό στρώμα προσαρμογής που χρησιμοποιείται έχει πάχος  $\frac{1}{4}$  του μήκος κύματος του υπερηχητικού κύματος και η ακουστική του εμπέδηση έχει μια τιμή ενδιάμεση των εμπεδήσεων του ιστού και του πιεζοηλεκτρικού στοιχείου. Με αυτό τον τρόπο μειώνονται κατά πολύ οι ανακλάσεις στις δύο διεπιφάνειες, και τελικά γίνεται πολύ πιο αποδοτική η μετάδοση του υπερήχου στον ιστό.

## **Μέσο υποστήριξης (backing material)**

Μετά την διέγερση του μετατροπέα από ηλεκτρική ενέργεια από την γεννήτρια, το πιεζοηλεκτρικό στοιχείο δονείται στη συχνότητα ταλάντωσής του, και στη συνέχεια ο παλμός μεταδίδεται στο μέσο που ακολουθεί. Ιδανικά οι παλμοί που παράγονται θα πρέπει να έχουν πολύ μικρή διάρκεια, και αυτό βελτιώνει κατά πολύ



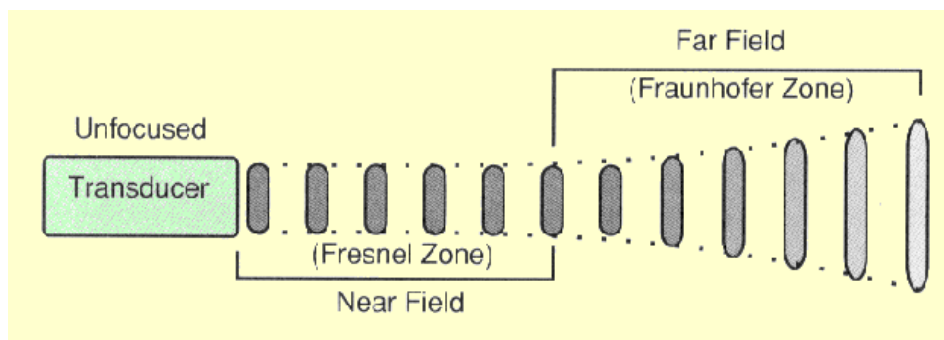
τις ιδιότητες του μετατροπέα. Δηλαδή θα πρέπει αμέσως μετά την διέγερση η δόνηση του μετατροπέα να σταματάει ακαριαία. Για αυτό το λόγο το μέσο υποστήριξης στους περισσότερους μετατροπείς παίζει καθοριστικό ρόλο, και πρέπει να έχει δύο χαρακτηριστικές ιδιότητες. Πρώτον, η ακουστική του εμπέδισή θα πρέπει να είναι συγκρίσιμη με αυτή του μετατροπέα. Αυτό εξυπηρετεί στη μείωση των ανακλάσεων στην μεταξύ τους διαχωριστική επιφάνεια. Δεύτερον, θα πρέπει να απορροφά τα κύματα που μεταφέρονται σε αυτό.

### Προστατευτικό περίβλημα

Το περίβλημα του στοιχείου θα πρέπει να εξασφαλίζει την ηλεκτρική θωράκιση και την ακουστική αποσύζευξη του, γιατί διαφορετικά το δυναμικό εύρος του στοιχείου, μειώνεται είτε εξαιτίας της ακουστικής αντήχησης, είτε εξαιτίας ηλεκτρονικής παρεμβολής. Επομένως είναι αναγκαία η ύπαρξη ενός πλαστικού περιβλήματος με ένα στρώμα θωράκισης είτε, ένα μεταλλικό περίβλημα με κατάλληλη ακουστική μόνωση.

### 3.2.3 Μη εστιασμένοι μετατροπείς

Ένας μη εστιασμένος μετατροπέας παράγει μία υπερηχητική δέσμη η οποία διακρίνεται σε δύο ξεχωριστές περιοχές. Η πρώτη περιοχή ονομάζεται περιοχή κοντινού πεδίου και έχει το μήκος κοντινού πεδίου (Near Field Length NFL), και η δεύτερη ονομάζεται μακρινού πεδίου και έχει αντίστοιχα το μήκος του μακρινού πεδίου (Far Field Length FFL). Επίσης η περιοχή κοντινού πεδίου ονομάζεται και ζώνη Fresnel, και η περιοχή μακρινού πεδίου ονομάζεται και ζώνη Fraunhofer, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Εικόνα 10: Δέσμη μη-εστιασμένου μετατροπέα

Στην περιοχή κοντινού πεδίου ο υπερηχητικός παλμός έχει σχετικά σταθερή διάμετρο, και το μήκος δίνεται από τη σχέση

$$NFL = D^2 / 4\lambda$$

Όπου D είναι η διάμετρος του μετατροπέα και λ το μήκος κύματος.

Σε αυτό το σημείο, αξίζει να τονισθεί ότι εφόσον το μήκος κύματος είναι αντίστροφο της συχνότητας, για ένα δεδομένο μέγεθος μετατροπέα το NFL είναι ανάλογο της συχνότητας.

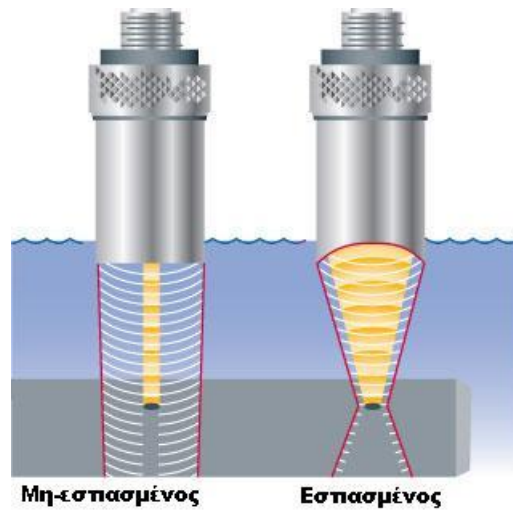
Στο μακρινό πεδίο η δέσμη αρχίζει και αποκλίνει. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι υπερηχητικοί παλμοί να είναι μεγαλύτεροι σε διάμετρο αλλά να έχουν μικρότερη ένταση εκεί. Η γωνία απόκλισης σε μοίρες υπολογίζεται από τη σχέση

$$\theta = 70\lambda/D$$

Σε αυτήν την περίπτωση αξίζει να σημειωθεί ότι με την αύξηση της συχνότητας μειώνεται η γωνία απόκλισης της δέσμης στο μακρινό πεδίο. Και αυτό είναι και ένα από τα πλεονεκτήματα της χρήσης υψηλών συχνοτήτων.

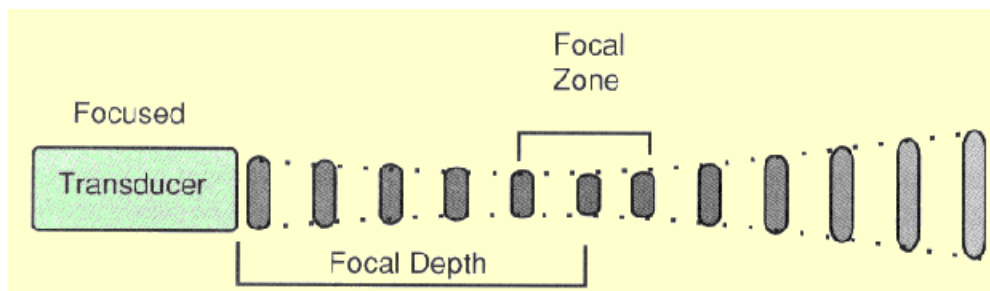
### **3.2.4 Εστιασμένοι Μετατροπείς ( Focused Transducers)**

Οι εστιασμένοι μετατροπείς χρησιμοποιούνται για άλλες εφαρμογές εκτός της ιατρικής απεικόνισης. Οι μονού στοιχείου εστιασμένοι μετατροπείς είτε έχουν έναν ακουστικό φακό προσκολλημένο στον επίπεδο κυλινδρικό δίσκο του πιεζοηλεκτρικού στοιχείου, είτε έχουν ένα σχηματισμένο κοίλο δίσκο πιεζοηλεκτρικού στοιχείου. Με αυτό τον τρόπο η εκπεμπόμενη υπερηχητική δέσμη είναι εστιασμένη. Γενικότερα χρησιμοποιούνται γιατί έχουν αυξημένη ευαισθησία και απόδοση σε μια ορισμένη περιοχή, όπου εστιάζεται η υπερηχητική δέσμη.



**Εικόνα 11:** Σχηματική απεικόνιση της υπερηχητικής δέσμης σε έναν μη-εστιασμένο καθώς και σε εστιασμένο μετατροπέα

Η εστία είναι το σημείο όπου η υπερηχητική δέσμη είναι στενότερη. Η ζώνη εστίασης είναι η περιοχή στην οποία το πλάτος της δέσμης είναι λιγότερο από το διπλάσιο του πλάτους στην εστία. Όσο εντονότερα εστιασμένος είναι ένας μετατροπέας τόσο μικρότερο εστιακό βάθος έχει, και τόσο στενότερη ζώνη εστίασης.



**Εικόνα 12:** Δέσμη εστιασμένου μετατροπέα

Αν  $d$  είναι η διάμετρος του μετατροπέα και  $F$  είναι η εστιακή απόσταση, το πλάτος της δέσμης στην εστιακή απόσταση υπολογίζεται από της σχέση

$$W = \frac{1.22\lambda}{d}$$

Για απόλυτα όμοιους μετατροπείς με ίδια διάμετρο και ίδια εστία, αλλά διαφορετική συχνότητα, ο μετατροπέας υψηλότερης συχνότητας έχει στενότερη υπερηχητική δέσμη στην περιοχή εστίασης. Γενικότερα, για τους εστιασμένους μετατροπείς μονού στοιχείου, η εστιακή απόσταση είναι κατασκευαστικό χαρακτηριστικό.

### 3.2.5 Χαρακτηριστικά της υπερηχητικής δέσμης

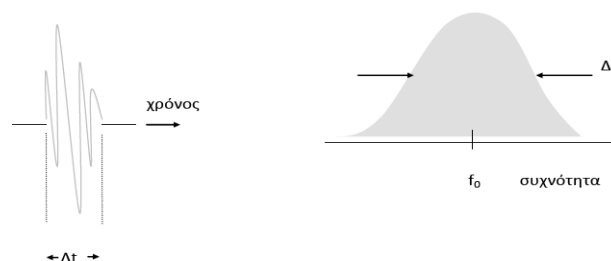
Η διέγερση του μετατροπέα, ουσιαστικά του πιεζοηλεκτρικού κρυστάλλου, επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ενός παλμού τάσης, συνήθως τετραγωνικού, μικρής διάρκειας της τάξης του nanosecond. Το πλάτος του παλμού κυμαίνεται από μερικές εκατοντάδες Volt, για τους παλαιότερους τύπους μετατροπέων, έως μερικά δέκατα του Volt για τους νεότερους μετατροπείς οι οποίοι διαθέτουν χαμηλότερες ακουστικές εμπεδήσεις και υψηλότερες πιεζοηλεκτρικές σταθερές.

Ο διεγερμένος κρύσταλλος ωθείται σε ταλάντωση με αποτέλεσμα να παράγεται ένα φθίνον ημιτονοειδές μηχανικό κύμα το οποίο και καλείται παλμικό κύμα. Η διάρκεια του παλμικού αυτού κύματος εξαρτάται από την συχνότητα του κρυστάλλου και από την απόσβεση. Η διάρκεια αυτή μετριέται συνήθως, σε αριθμό κύκλων μέχρι το αρχικό πλάτος του κύματος να μειωθεί στο 10%.

Το χωρικό μήκος του παλμού (spatial pulse length, SPL) ισούται με το γινόμενο του μήκους κύματος επί των αριθμό των κύκλων. Δηλαδή:

$$\text{SPL} = \text{αριθμός κύκλων (n)} * \text{μήκος κύματος (λ)}$$

Καθώς το παλμικό κύμα δεν ακολουθεί την κατανομή ενός κανονικού (ακριβές) ημίτονου, η μορφή του μπορεί να παρασταθεί από το αντίστοιχο φάσμα κατανομής της συχνότητάς του, από την οποία μπορεί να προκύψει το εύρος ζώνης (bandwidth) του κύματος, όπως φαίνεται και παρακάτω.



**Εικόνα 13:** Ένας παλμός υπερήχων με χρονική διάρκεια  $\Delta t$  και το αντίστοιχο φάσμα συχνοτήτων του που περιλαμβάνει την κεντρική συχνότητα  $f_0$  και εύρος συχνοτήτων  $\Delta f$

Θα πρέπει επίσης να επισημανθεί ότι, όσο στενότερος είναι ο παλμός τόσο περισσότερο ευρύ θα είναι το αντίστοιχο φάσμα συχνοτήτων του γεγονός που αποτελεί περιοριστικό παράγοντα της χρησιμοποίησης ιδιαίτερα στενών παλμών.

### **3.2.6 Ακουστικές παράμετροι εστιασμένου υπερήχου**

#### **Συχνότητα υπερήχου(f)**

Είναι η συχνότητα του υπερηχητικού κύματος, είναι ουσιαστικά ο αριθμός των κυμάτων(κύκλων) κατά την διάρκεια ενός μήκους παλμού.

#### **Διάρκεια Ο.Π. ( ομάδας παλμών)**

Είναι η συνολική διάρκεια ενός «shot» ή ομάδας παλμών (Ο.Π.), η οποία αποτελείται από επαναλαμβανόμενους παλμούς, οι οποίοι εμφανίζονται με μια συγκεκριμένη συχνότητα, την συχνότητα του υπερήχου f. Μετράται σε sec.

#### **PRF (Pulse Repetition Frequency) / Συχνότητα επανάληψης παλμών**

Είναι η συχνότητα με την οποία επαναλαμβάνεται ένας παλμός σε μια Ο.Π. με υπέρηχο. Είναι ουσιαστικά ο αριθμός των παλμών κατά τη διάρκεια μιας Ο.Π. και μετράται σε Herz.

#### **Μήκος Παλμού(Pulse Length-PL) και Duty Cycle(DC%)**

Κάθε φορά που ο παλμός επαναλαμβάνεται μέσα σε μία Ο.Π. έχει μια ορισμένη διάρκεια η οποία ονομάζεται μήκος παλμού και μετράται σε sec. Το duty cycle ορίζεται ως ο λόγος του μήκους του παλμού προς τη χρονική διάρκεια μεταξύ δύο παλμών.

Ισχύει :  $DC\% = PL \times PRF$

## **4. Μικροφουσαλίδες και αλληλεπίδραση με τον υπέρηχο**

### **4.1 Γενικά**

Πριν από μερικά χρόνια χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά μικροφουσαλίδες κατά την διακρανιακή εφαρμογή εστιασμένου υπερήχου για την διάνοιξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, και αποδείχθηκε ότι η μέθοδος ήταν μη-επεμβατική και αναστρέψιμη (Hynynen et al. 2001), και με ακουστικές παραμέτρους και duty cycle αρκετά χαμηλά είναι ασφαλής και δεν προκαλεί θερμικά φαινόμενα (Choi et al. 2007b) . Ακόμη, με ιστολογικές μελέτες έχει αποδειχθεί ότι δεν προκαλείται βλάβη στους νευρώνες στην περιοχή εφαρμογής του υπερήχου (McDannold et al. 2005).

Γενικότερα οι μικροφουσαλίδες χρησιμοποιούνται για πολλές θεραπευτικές εφαρμογές καθώς και για διαγνωστικές μεθόδους. Σε διαγνωστικές μεθόδους, μετά την εισαγωγή των μικροφουσαλίδων στην κυκλοφορία και την εφαρμογή υπερήχων, η αντήχηση που παράγουν είναι αρκετά διαφορετική από αυτή των περιβάλλοντων ιστών και έτσι εξυπηρετούν στην καλύτερη απεικόνιση των αγγείων και της ροής του αίματος. Σε θεραπευτικές εφαρμογές έχουν χρησιμοποιηθεί για διάφορους σκοπούς, εκτός από την διάνοιξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Για παράδειγμα, χρησιμοποιούνται για τη λύση κυτταρικών θρόμβων ( Luo et al.1998), για τη λύση κυτταρικών μεμβρανών (Clark and Hill 1970) κ.ά.

Οι μικροφουσαλίδες αυτές είναι μικρές φουσαλίδες αερίου που περιβάλλονται από ένα σταθεροποιητικό κάλυμμα, με τυπική διάμετρο της τάξης των μικρομέτρων. Χορηγούνται με ενδοφλέβια ένεση, και παραμένουν στην αιματική ροή συμπεριφερόμενες με τρόπο ανάλογο των ερυθροκυττάρων ( Jayaweera et al. 1994). Έχουν κατασκευαστεί και χρησιμοποιηθεί διάφορα ήδη φουσαλίδων. Αρχικά είχαν κατασκευαστεί οι Albunex® οι οποίες περιείχαν πυρήνα από αέρα και κάλυμμα από αλβουμίνη. Στη συνέχεια αναπτύχθηκαν μικροφουσαλίδες με φθορίζοντα αέριο πυρήνα όπως οι Optison® οι οποίες έχουν και πρωτεϊνικό κέλυφος, και οι Definity® οι οποίες έχουν φωσφολιπιδικό κέλυφος. Επίσης χρησιμοποιούνται και οι μικροφουσαλίδες PESDA με μεμβράνη από αλβουμίνη και αέριο φθοριούχο άνθρακα. Στον παρακάτω πίνακα μερικά χαρακτηριστικά καθώς και οι συνιστώμενες δόσεις για τις μικροφουσαλίδες αυτές:

	Μεμβράνη	Αέριο	Συγκέντρωση(mL <sup>-1</sup> )	Μέση διάμετρος (μm)	Συνιστώμενη δόση
<b>Optison</b>	Αλβουμίνη	C <sub>3</sub> F <sub>8</sub>	5.0-8.0 x 10 <sup>8</sup>	3.0 – 4.5	0.5 mL kg <sup>-1</sup>
<b>Definity</b>	Λιπιδική	C <sub>3</sub> F <sub>8</sub>	1.2 x 10 <sup>10</sup>	1.1 – 3.3	10 (μL kg <sup>-1</sup> )
<b>PESDA</b>	Αλβουμίνη	C <sub>4</sub> F <sub>10</sub>	6.5 x 10 <sup>8</sup>	2.5 – 4.9	2.5-10 (μL kg <sup>-1</sup> )

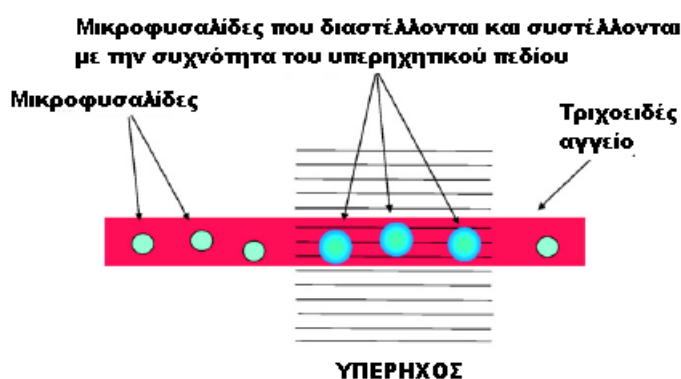
**Πίνακας:** Χαρακτηριστικά και συνιστώμενη δόση για μικροφουσαλίδες που χρησιμοποιούνται με εφαρμογή υπερήχου για θεραπεία και απεικόνιση

Οι υπερηχητικοί παλμοί που εφαρμόζονται είναι συνήθως σε συχνότητα κοντά στη συχνότητα συντονισμού των φουσαλίδων, οπότε οι φουσαλίδες αυξάνουν και μειώνουν σε διάμετρο, ταλαντώνονται. Οι μικροφουσαλίδες απορροφούν και εκπέμπουν την ηχητική ενέργεια κατά την εφαρμογή των υπερήχων. Ο μηχανισμός λειτουργίας των μικροφουσαλίδων στην διάνοιξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού δεν είναι ακόμη γνωστός. Ακόμη βρίσκεται σε στάδιο έρευνας η αλληλεπίδραση των φουσαλίδων με τα τριχοειδή του εγκεφάλου, και ο ρόλος που μπορεί να διαδραματίζει το κρανίο και τα διάφορα μηχανικά φαινόμενα κατά την διακρανιακή εφαρμογή του υπερηχητικού κύματος.

#### **4.2 Περιγραφή της μεθόδου – Μικροφουσαλίδες και Αιματοεγκεφαλικός φραγμός**

Σε αυτή την μέθοδο για την διάνοιξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού χορηγούνται μικροφουσαλίδες Definity® στην αιματική ροή πριν την εφαρμογή του υπερήχου. Στο κυκλοφορικό σύστημα η αιματική ροή περνάει διαδοχικά από τις μεγάλες αρτηρίες, τα αρτηρίδια, τα τριχοειδή αγγεία, τα μετατριχοειδή φλεβίδια, τα φλεβίδια, τις μικρές φλέβες, και τις μεγάλες φλέβες. Οι μικροφουσαλίδες έχουν, σύμφωνα με τον κατασκευαστή τους, διάμετρο 1-3.3μm , η μέγιστη διάμετρος τους δεν ξεπερνά τα 10μm, και η συγκέντρωσή τους είναι περίπου 1.2 x 10<sup>10</sup> /mL. Μπορούν να μεταφερθούν μέσα από το δίκτυο των τριχοειδών τα οποία έχουν διάμετρο 4-8μm. Όταν οι μικροφουσαλίδες περνούν από τον όγκο του ιστού και εκτίθενται στον εστιασμένο υπέρηχο διαστέλλονται και συστέλλονται με την συχνότητα του ακουστικού κύματος, ανάλογα με την περίοδο ταλάντωσης της

ακουστικής πίεσης. Η ταλάντωση των μικροφουσαλίδων δημιουργεί εφαπτόμενες στην επιφάνειά τους δυνάμεις που προκαλούν εντονότερη ροή του υγρού στον περιβάλλοντα χώρο. Επίσης, στις μικροφουσαλίδες εφαρμόζεται και η δύναμη ταλάντωσης στην κατεύθυνση διάδοσης του υπερηχητικού κύματος. Πάνω από ένα όριο ακουστικής έντασης, η αδράνεια του υγρού του περιβάλλοντος χώρου προκαλεί την θραύση των μικροφουσαλίδων, η οποία οδηγεί σε έκλυση θερμότητας και πίεσης και στην δημιουργία ενός υπερηχητικού κύματος ακτινικά γύρω από το σημείο της θραύσης (Arfel et al. 1995). Εάν οι μικροφουσαλίδες θραύσουν κοντά σε ένα τοίχωμα αγγείου μπορούν να προκαλέσουν υγρά ρεύματα τα οποία μπορούν να διαπεράσουν το τοίχωμα. Επίσης, οι φουσαλίδες απορροφούν μέρος της ενέργειας του υπερηχητικού παλμού μειώνοντας κατά πολύ την επίδραση που θα είχε ο υπέρηχος στους ιστούς χωρίς την ύπαρξή τους (Hynynen et al. 2001). Η σχέση μεταξύ των ακουστικών σημάτων που εκπέμπονται από τις φουσαλίδες και της διάνοιξης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού βρίσκεται ακόμη σε ερευνητικό στάδιο.



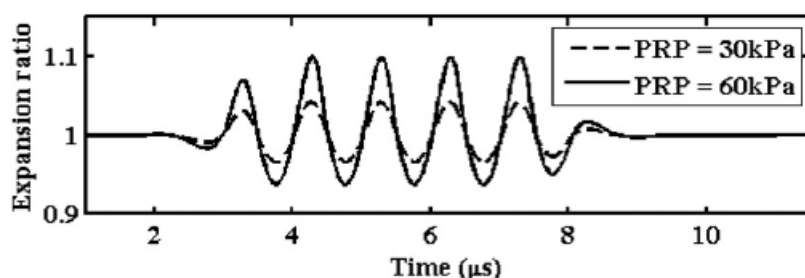
**Εικόνα 14:** Διάγραμμα διαταραχής του αιματοεγκεφαλικού φραγμού με συνδιασμένη χρήση μικροφουσαλίδων και υπερήχου

Οι μελέτες που έχουν γίνει μέχρι στιγμής έχουν ότι οι ταλαντώσεις μια μικροφουσαλίδας εντός ενός μικρού αγγείου εξαρτώνται από τη διάμετρο του αγγείου και της μικροφουσαλίδας, καθώς και από τις μηχανικές ιδιότητες του αγγείου και των συνδετικών ιστών ( Qin and Ferrara, 2007). Γενικότερα η συχνότητα συντονισμού των μικροφουσαλίδων σε ένα δύσκαμπτο (rigid) αγγείο μειώνεται σημαντικά, και επίσης μειώνεται όσο μειώνεται η ακτίνα του αγγείου και μήκος του αγγείου στο οποίο βρίσκεται.



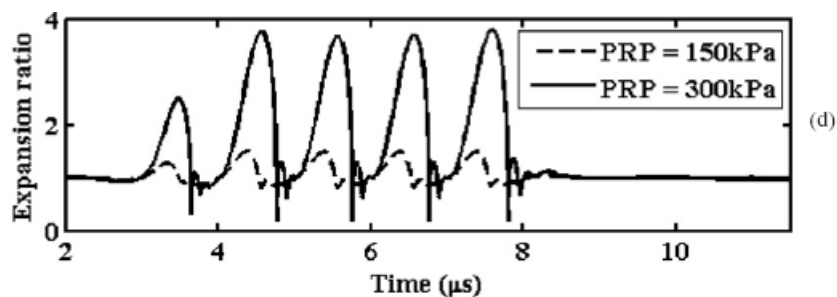
### 4.3 Προηγούμενες πειραματικές μελέτες για την ταλάντωση των μικροφουσαλίδων

Οι μικροφουσαλίδες συστέλλονται όταν η τιμή της πίεσης είναι θετική και διαστέλλονται όταν είναι αρνητική. Η αρνητικότερη τιμή της πίεσης ονομάζεται peak rarefactional pressure (PRP) και είναι αυτή που θα προκαλέσει την καταστροφή της φουσαλίδας. Για χαμηλές τιμές PRP η ταλάντωση των μικροφουσαλίδων αντιστοιχίζεται στα πυκώματα και τα αραιώματα του υπερηχητικού κύματος, με συχνότητα που πλησιάζει αρκετά αυτήν του υπερηχητικού κύματος. Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται ο «λόγος διεύρυνσης» (expansion ratio) των φουσαλίδων, ο οποίος ορίζεται ως η στιγμιαία ακτίνα κανονικοποιημένη ως προς την αρχική τιμή της ακτίνας της μικροφουσαλίδας για πλάτη PRP 30kPa και 60kPa. Σε αυτές τις τιμές πίεσης, η ταλάντωση είναι σχεδόν ημιτονοειδής και η κλιμάκωση της διεύρυνσης του μεγέθους της φουσαλίδας είναι σχεδόν γραμμική σε αυτήν την περιοχή τιμών PRP.



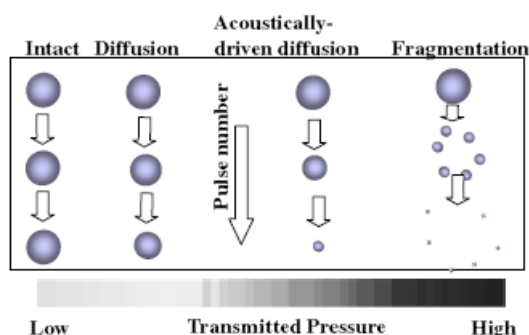
**Εικόνα 15:** Για χαμηλή PRP η ταλάντωση των μικροφουσαλίδων είναι αρμονική με συχνότητα κοντά σε αυτήν του εφαρμοζόμενου υπερήχου. Και το expansion ratio είναι σχεδόν ανάλογο της PRP.

Για υψηλότερη τιμή PRP η διαστολή της μικροφουσαλίδας καθώς και η ταχύτητα καταστροφής της αυξάνονται σημαντικά, και η ταλάντωση δεν έχει πλέον γραμμική εξάρτηση με την πίεση. Ακόμη όσο αυξάνεται η PRP, η διεύρυνση/διαστολή των μικροφουσαλίδων ακολουθείται από συγκριτικά γρηγορότερη καταστροφή τους. Για παράδειγμα, όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα, όταν διπλασιάζεται η συχνότητα από 150kPa σε 300kPa ο λόγος διεύρυνσης αυξάνεται περισσότερο από 2.5 φορές.



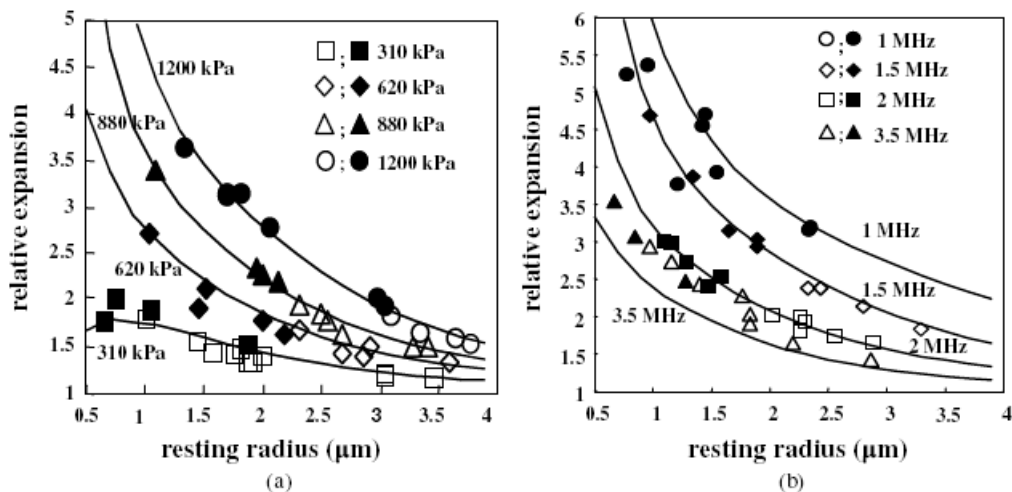
**Εικόνα 16:** Για υψηλή PRP, η μη-γραμμικότητα της ταλάντωσης και ο λόγος διεύρυνσης αυξάνουν πολύ πιο γρήγορα από την PRP (Πηγή Qin et al.2009)

Οι μηχανισμοί καταστροφής των μικροφουσαλίδων περιλαμβάνουν διάχυση (diffusion) του αερίου του πυρήνα της μικροφουσαλίδας χωρίς της εφαρμογή υπερήχων, αυξημένη διάχυση του αερίου με την εφαρμογή υπερήχων, και κατάτμηση(fragmentation) της μικροφουσαλίδας κατά την ταλάντωση όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα ( Chomas et al.2001a)



**Εικόνα 17:** Αναπαράσταση των μηχανισμών καταστροφής των μικροφουσαλίδων, περιλαμβανομένων της διάχυσης, της διάχυσης λόγω της εφαρμογής υπερήχων και του κατακερματισμού τους

Η διαστολή και η καταστροφή των μικροφουσαλίδων με λιπιδική μεμβράνη καθορίζονται από τη διάμετρό τους σε κατάσταση ηρεμίας, από τη συχνότητα, από τη φάση και το πλάτος του υπερήχων που εφαρμόζεται. Η αύξηση της PRP, η μείωση της συχνότητας και η μείωση της διαμέτρου της μικροφουσαλίδας, αυξάνουν την κανονικοποιημένη διεύρυνση και την πιθανότητα κατακερματισμού της μικροφουσαλίδας, όπως φαίνεται στα παρακάτω διαγράμματα:



**Εικόνα 18:** (a) Σχετική διεύρυνση των μικροφουσαλίδων κατά τη διάρκεια εφαρμογής υπερηχητικού ημιτονοειδούς κύματος σε 2.25 MHz με PRP που κυμαίνεται μεταξύ 310kPa και 1200kPa. (b) Σχετική διεύρυνση των μικροφουσαλίδων κατά τη διάρκεια εφαρμογής υπερηχητικού ημιτονοειδούς κύματος με PRP 800kPa και συχνότητα από 1MHz έως 3.5MHz. (πηγή Qin et al.2009)

Για τις μικροφουσαλίδες με λιπιδική μεμβράνη τα λιπιδικά μόρια διαμορφώνουν ένα περίβλημα γύρω από το αέριο στον πυρήνα, και σχηματίζουν ένα θύλακα που αφήνει ακάλυπτο ένα μέρος της διεπιφάνειας αερίου-υγρού κατά την διαστολή. Αντίθετα, οι μικροφουσαλίδες με αλβουμινική μεμβράνη μπορεί να θραύσουν κατά την ταλάντωση (Bloch et al. 2004).

Το Mechanical Index – MI (Μηχανικός δείκτης) ορίζεται ως η PRP μετρούμενη σε megaPascals, προς την τετραγωνική ρίζα της κεντρικής συχνότητας του υπερήχου σε megahertz. Κρίνοντας με βάση το MI μπορεί κανείς να προβλέψει το βαθμό διάνοιξης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Επίσης το duty cycle του υπερηχητικού παλμού διαδραματίζει και αυτό σημαντικό ρόλο για την ταλάντωση και την καταστροφή των μικροφουσαλίδων, καθώς οι μικροφουσαλίδες κατά την διάρκεια του παλμού, καθώς και μεταξύ των παλμών, μπορούν να διασπαστούν και να επανενωθούν .

Σε προηγούμενες μελέτες και πειράματα έχει αποδειχθεί ότι το κατώφλι για την διάνοιξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού μειώνεται από 0.7MPa σε 0.4MPa όταν αυξάνεται το μήκος του παλμού από 0.1ms σε 10ms, με κεντρική συχνότητα 1.5MHz (McDonald et al.2008). Επίσης, με χρήση MRI in vivo και έχει αποδειχθεί ότι είναι ασφαλής και αποτελεσματική η διάνοιξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού με ακουστική πίεση 0.569MPa και duty cycle 20%, και συχνότητα 1.525MHz ( Choi et al.

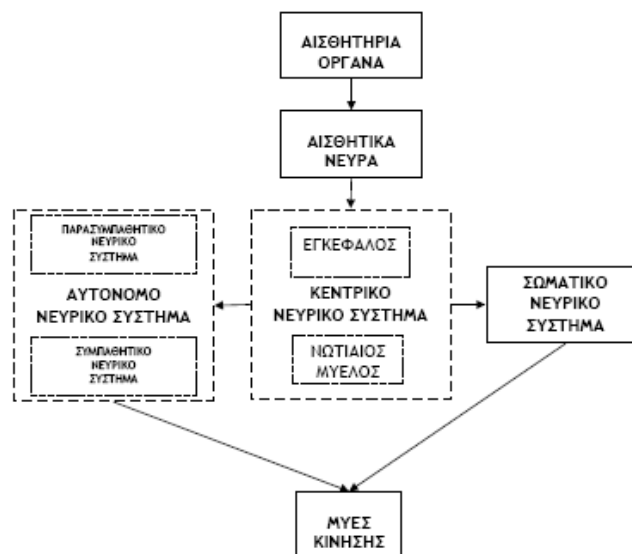
Submitted 2009). Βέβαια ακόμη οι προτιμότερες τιμές για όλες τις παραμέτρους στην βελτιστοποίηση της διάνοιξης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού in vivo δεν έχει μελετηθεί, και είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη γιατί εκτός από τα χαρακτηριστικά του υπερήχου, εξαρτάται και από τα χαρακτηριστικά των μικροφουσαλίδων και την φυσιολογία των πειραματοζώων που χρησιμοποιούνται ως μοντέλα.

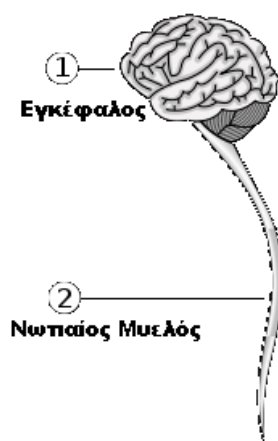
## 5. Νευροφυσιολογία και Νευρώνες

### 5.1 Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

Το νευρικό σύστημα αποτελείται από έναν εκτεταμένο νευρικό ιστό, ο οποίος με την συμμετοχή των αιμοφόρων αγγείων και των συνδετικών ιστών διαμορφώνει τα όργανα του νευρικού συστήματος, δηλαδή τον νωτιαίο μυελό και τα όργανα των αισθήσεων. Το νευρικό σύστημα απαρτίζεται από το κεντρικό νευρικό σύστημα(ΚΝΣ) και τον περιφερικό νευρικό σύστημα(ΠΝΣ). Το κεντρικό νευρικό σύστημα αποτελείται από τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό. Το ΚΝΣ επεξεργάζεται τα νευρικά ερεθίσματα του περιφερικού και αισθητηριακού νευρικού συστήματος, ελέγχει τη μνήμη, τη σκέψη, τις κινητικές λειτουργίες κλπ. Αποτελεί κέντρο όλων των ανώτερων πνευματικών λειτουργιών, όπως η νοημοσύνη, η μάθηση, η συγκίνηση, η μνήμη. Ο νευρώνας είναι η θεμελιώδης δομή του νευρικού συστήματος. Το ΠΝΣ περιλαμβάνει όλο το νευρικό ιστό της περιφέρειας του σώματος, και η κύρια λειτουργία του είναι να μεταβιβάζει σήματα από τα αισθητήρια όργανα στο ΚΝΣ να επιστρέφει εντολές από το ΚΝΣ στα αισθητήρια όργανα.

Τα κινητικά νεύρα ανήκουν είτε στο σωματικό νευρικό σύστημα (εκούσια αντίδραση), είτε στο αυτόνομο νευρικό σύστημα (ακούσια αντίδραση). Το αυτόνομο νευρικό σύστημα αποτελείται από δύο ανταγωνιστικά νευρικά συστήματα, το συμπαθητικό και το παρασυμπαθητικό. Το ΚΝΣ αποτελείται από εκατοντάδες ομάδες νευρώνων, και κάθε ομάδα έχει τα δικά της χαρακτηριστικά οργάνωσης .

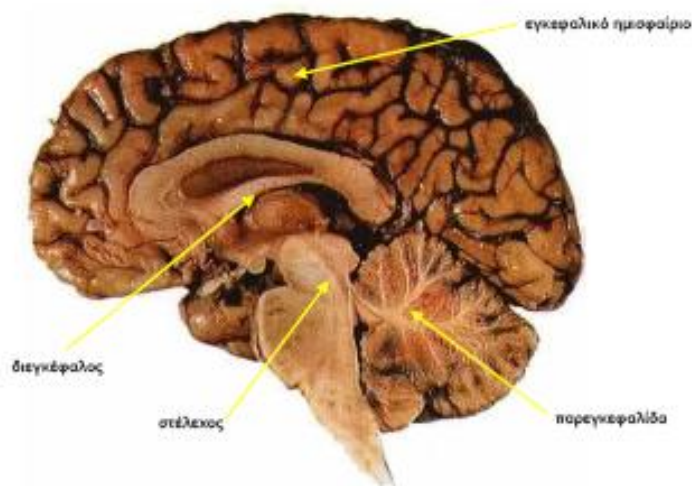




**Εικόνα 19:** Το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

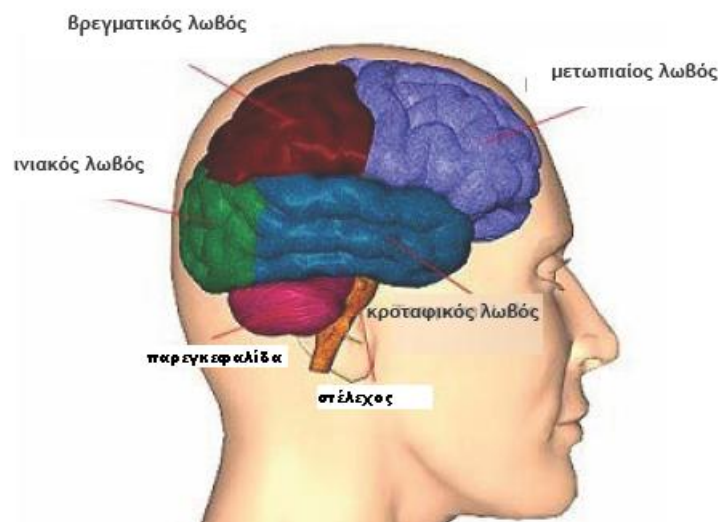
### 5.1.1 Δομή του εγκεφάλου

Στον εγκέφαλο αλλά και στον νωτιαίο μυελό διακρίνονται δύο διαφορετικές υφές: η φαιά ουσία και η λευκή ουσία. Η φαιά ουσία περιέχει νευρώνες και νευρογλοιακά κύτταρα και δενδρίτες. Το γκρι (φαιό) χρώμα οφείλεται στην αριθμητική υπεροχή των κυτταρικών σωμάτων έναντι των δενδριτών. Η λευκή ουσία περιέχει πολλούς δενδρίτες και νευρογλοιακά κύτταρα. Ο εγκέφαλος χωρίζεται σε 4 διαφορετικές περιοχές: τα εγκεφαλικά ημισφαίρια, τον διεγκέφαλο, το στέλεχος και την παρεγκεφαλίδα.



**Εικόνα 20:** Περιοχές του εγκεφάλου

Τα **εγκεφαλικά ημισφαίρια** συνιστούν τη μεγαλύτερη περιοχή του εγκεφάλου και επικοινωνούν με μια δεσμίδα νευρικών ινών που ονομάζεται μεσολόβιο. Παρόλο που έχουν διαφορετική λειτουργία, σχετίζονται και τα δύο με την αντίληψη, τη λογική, τη σκέψη, τη μάθηση, τη μνήμη και την δημιουργία κινήσεων. Ο φλοιός των ημισφαιρίων έχει έντονη πτύχωση, η οποία επιτρέπει την συνάθροιση πολλών νευρώνων σε μικρό χώρο. Μεγάλες αύλακες χωρίζουν τον φλοιό σε τέσσερις περιοχές οι οποίες ονομάζονται λοβοί: ο μετωπιαίος λοβός( έλεγχος εκούσιων κινήσεων), ο κροταφικός λοβός (επεξεργασία ερεθισμάτων ακοής και γεύσης), ινιακός λοβός (επεξεργασία οπτικών ερεθισμάτων), και βρεγματικός λοβός (κέντρο αντίληψης αισθήσεων).



**Εικόνα 21:** Οι λοβοί του εγκεφάλου

Ο **διεγκέφαλος** συμπληρώνει τον πρόσθιο εγκέφαλο. Αποτελείται από τον θάλαμο και τον υποθάλαμο. Ο θάλαμος λειτουργεί ως σταθμός μεταφοράς πληροφοριών από τα αισθητήρια όργανα προς τον φλοιό και συμμετέχει στην λειτουργία της συνείδησης. Ο υποθάλαμος περιέχει ομάδες κυττάρων που συντονίζουν νευρικές και ορμονικές λειτουργίες. Συνδέεται με ενέργειες όπως η πρόσληψη τροφής, η ρύθμιση της θερμοκρασίας, η αναπαραγωγή.

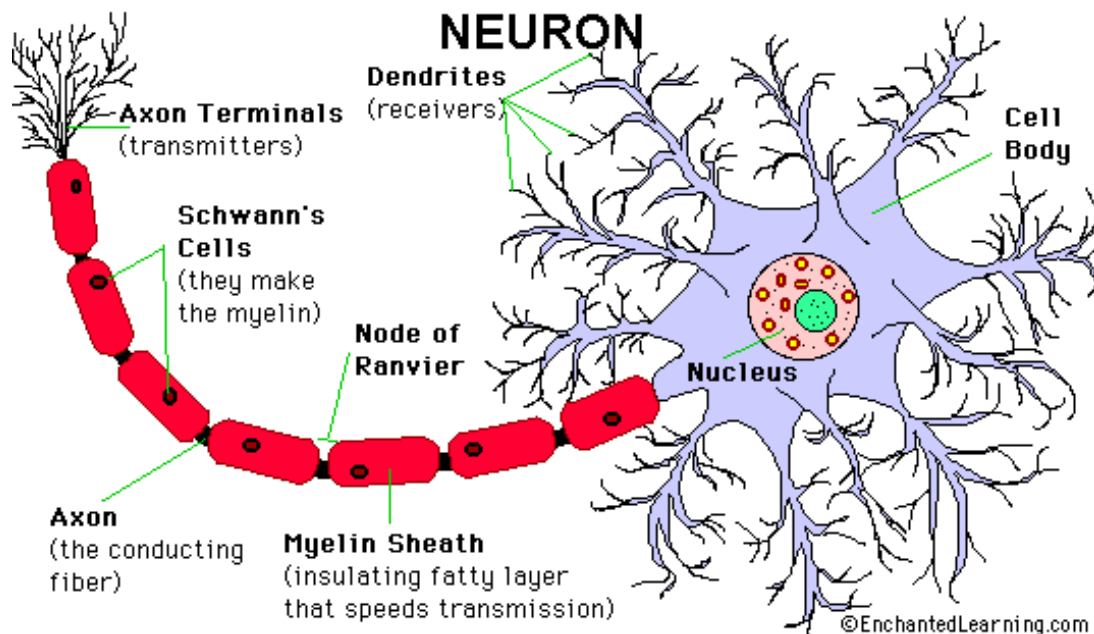
Το **στέλεχος** αποτελείται από τρία τμήματα: τον μεσεγκέφαλο, τη γέφυρα, και τον προμήκη. Από το στέλεχος διέρχονται οι νευράξονες από και προς τον εγκέφαλο. Επίσης, στο στέλεχος υπάρχει ένα δίκτυο από μικρά νευρικά κύτταρα τα οποία διακλαδίζονται και δημιουργούν τον δικτυωτό μηχανισμό, ο οποίος ξεχωρίζει από όλα τα ερεθίσματα μόνο τα σημαντικά. Επαναλαμβανόμενα ή οικεία ερεθίσματα

αγνοούνται και μόνο ισχυρές διεγέρσεις γίνονται αντιληπτές. Εάν δεν υπήρχε αυτό το φίλτρο, θα έφθανε ως τον εγκέφαλο τεράστιο πλήθος πληροφοριών.

Η **παρεγκεφαλίδα** βρίσκεται στο πίσω μέρος του εγκεφάλου, και ο παρεγκεφαλιδικός φλοιός περιέχει πολύ μεγάλο αριθμό νευρικών κυττάρων, των οποίων οι εκτενείς δενδρίτες στον άνθρωπο συμμετέχουν σε 200.000 συνάψεις ο καθένας, ενώ συγκριτικά οι νευρώνες του φλοιού δέχονται 10.000 συνάψεις ο καθένας. Η παρεγκεφαλίδα παίζει σημαντικό ρόλο στην ισορροπία, στον έλεγχο της στάσης του σώματος και στο συντονισμό κινήσεων.

## 5.2 Δομή βιολογικού νευρώνα

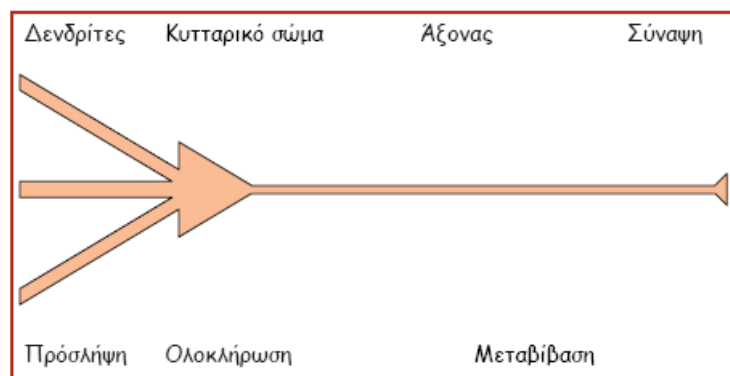
Ο νευρώνας αποτελείται από τρία κύρια μέρη: το σώμα, το οποίο έχει διάμετρο 10-80μm και συνιστά το κύριο μέρος του νευρώνα, τον νευράξονα, που προχωρεί από το σώμα προς το περιφερειακό νεύρο (έξοδος του νευρώνα), και τους δενδρίτες, οι οποίοι είναι λεπτές προσεκβολές του σώματος του νευρώνα (είσοδο του νευρώνα).



**Εικόνα 22:** Δομή βιολογικού νευρώνα. Αποτελείται από το κυτταρικό σώμα, τους δενδρίτες και τον νευράξονα. Στο κυτταρικό σώμα βρίσκεται και ο πυρήνας του κυττάρου. Επίσης, το μεγαλύτερο μέρος του νευράξονα καλύπτεται από μυελίνη, η οποία παράγεται στα κύτταρα Schwann. Οι κόμβοι του Ranvier είναι στενώματα των εμμέλων νευρικών ινών, κατά κανονικά διαστήματα, από τα οποία απουσιάζει το έλυτρο μυελίνης και ο νευράξονας περικλείεται μόνο από αποφυάδες των κυττάρων του Schwann.



Στις επιφάνειες των δενδριτών και του σώματος υπάρχουν μικρές απολήξεις σχήματος βολβού, τα **συναπτικά κομβία ή συνάψεις**, το 80-90% των οποίων βρίσκονται στους δενδρίτες. Τα κομβία είναι οι τελικές απολήξεις νευρικών ινιδίων που ξεκινούν από πολλούς νευρώνες και συνήθως καθένα προέρχεται από ξεχωριστό προηγούμενο νευρώνα. Ένας δενδρίτης μπορεί να έχει σημεία επαφής με έναν, μερικούς ή ακόμη και χιλιάδες άλλους νευρώνες στις συνάψεις. Τα κομβία μπορεί να είναι διεγερτικά, με έκκριση ουσίας που διεγείρει τον νευρώνα, ή ανασταλτικά, με έκκριση ουσίας που αναστέλλει την δραστηριότητα του νευρώνα. Μεγάλα τμήματα του άξονα είναι τυλιγμένα με ένα λιπώδες, μονωτικό υλικό, φτιαγμένο από τις τεντωμένες εξωτερικές μεμβράνες των γλοιακών κυττάρων, που ονομάζεται έλυτρο μυελίνης.



**Εικόνα 23:** Σχηματική απεικόνιση νευρώνα

### 5.3 Λειτουργία νευρωνικών συνάψεων

Το κομβίο χωρίζεται από το σώμα του νευρώνα με το συναπτικό χάσμα, το οποίο έχει συνήθως πλάτος 20-30nm. Στο εσωτερικό του κομβίου βρίσκονται δύο ειδών μορφώματα: αποθηκευτικά κυστίδια, τα οποία περιέχουν νευροδιαβιβαστικές ουσίες, και μιτοχόνδρια, τα οποία προμηθεύουν το ATP που απαιτείται για την σύνθεση καινούριας διαβιβαστικής ουσίας.

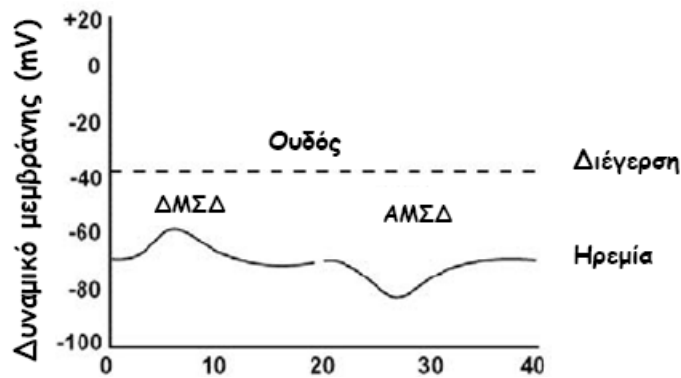
Οι άξονες των νευρώνων μεταδίδουν ηλεκτρικές ώσεις, που ονομάζονται **δυναμικά ενέργειας**, τα οποία μεταδίδονται κατά μήκος των νευρικών ινών. Κατά την εξάπλωση δυναμικού ενέργειας σε ένα συναπτικό κομβίο, εκπολώνεται η μεμβράνη του κομβίου, και η εκπόλωση αυτή προκαλεί εκκένωση μερικών κυστιδίων μέσα στο συναπτικό χάσμα. Στη συνέχεια μεταβάλλονται τα χαρακτηριστικά της

διαπερατότητας του νευρώνα, και απελευθερώνεται ο νευροδιαβιβαστής. Κάθε νευρώνας εκκλύει μόνο έναν τύπο νευροδιαβιβαστή σε όλες τις νευρικές απολήξεις. Οι πιο σημαντικές διαβιβαστικές ουσίες είναι η ακετυλχολίνη, η νοραδρεναλίνη, η αδρεναλίνη, η ντοπαμίνη, η γλυκίνη, και το γ-αμινοβουτανικό οξύ (GABA). Ειδικότερα, το χολινεργικό σύστημα είναι ένα σύστημα νευροδιαβιβαστών που εμπλέκονται στην ρύθμιση της μνήμης και της μάθησης, και χρησιμοποιεί την ακετυλχολίνη για την μετάδοση των νευρικών ώσεων. Είναι το σύστημα που εκφυλίζεται στην νόσο του Alzheimer.

Το δυναμικό ενέργειας είναι ένα πολύπλοκο ηλεκτρικό γεγονός. Οι νευρικές ίνες λειτουργούν σαν αγωγοί ηλεκτρικού ρεύματος και έτσι το δυναμικό ενέργειας που δημιουργείται σε ένα σημείο, προκαλεί κλιμάκωση της τάσης ανάμεσα στις εν ενεργεία και στις εν ηρεμία μεμβράνες, που βρίσκονται δίπλα του. Με τον τρόπο αυτό, το δυναμικό ενέργειας μεταδίδεται με ένα κύμα εκπόλωσης που εξαπλώνεται από το ένα άκρο της νευρικής ίνας στο άλλο.

Το δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης του σώματος ενός νευρώνα είναι ίσο με  $-70\text{mV}$ . Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της αντλίας νατρίου-καλίου, η οποία μετατοπίζει περισσότερα θετικά ιόντα νατρίου προς τα έξω και λιγότερα ιόντα καλίου προς τα μέσα, και έχει ως αποτέλεσμα να μην εξισορροπούνται τα αρνητικά ιόντα από άλλα θετικά, και το εσωτερικό του νευρώνα να φορτίζεται αρνητικά.

Κατά την διέγερση του κομβίου, όπου εκκρίνεται διαβιβαστική ουσία στο συναπτικό χάσμα, εισέρχονται στον νευρώνα ιόντα νατρίου και εξουδετερώνεται ένα μέρος της αρνητικότητας του δυναμικού ηρεμίας της μεμβράνης, και έτσι αυξάνεται σε  $-59\text{mV}$  ( διεγερτικό μετασυναπτικό δυναμικό). Το δυναμικό ενέργειας εξαπλώνεται προς την περιφέρεια κατά μήκος του άξονα, και προς τα πίσω, προς το σώμα του νευρώνα (retrograde). Ο ουδός διέγερσης του νευρώνα υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι  $-59\text{mV}$ . Οι ανασταλτικές συνάψεις αυξάνουν την διαπερατότητα της μετασυναπτικής μεμβράνης μόνο για τα ιόντα καλίου, και κατά συνέπεια το νάτριο δεν εισέρχεται στον νευρώνα, ενώ ταυτόχρονα τα αρνητικά ιόντα μένουν ανεπηρέαστα και δεν διαχέονται. Η συσσώρευση αρνητικών ιόντων κάνει το δυναμικό του εσωτερικού του νευρώνα αρνητικότερο από κάθε άλλη φορά ( $-75\text{mV}$ ), και το φαινόμενο αυτό ονομάζεται υπερπόλωση. Η αύξηση της αρνητικότητας του δυναμικού της μεμβράνης καθιστά τον νευρώνα λιγότερο διεγερσιμο. Το νέο διεγερτικό δυναμικό θα πρέπει να είναι  $+16\text{mV}$ .



**Εικόνα 24:** Το διεγερτικό μετασυναπτικό δυναμικό (ΔΜΣΔ) είναι μία αλλαγή στο δυναμικό της μεμβράνης από -70 mV σε σχεδόν -59 mV. Το ανασταλτικό συναπτικό δυναμικό (ΑΜΣΔ) έχει το αντίθετο αποτέλεσμα.

### Άθροιση συναπτικών δυναμικών

Η διέγερση ενός νευρώνα δεν προκαλείται ποτέ μόνο από ένα συναπτικό κομβίο. Από ένα κομβίο απελευθερώνεται διαβιβαστική ουσία που αρκεί για την πρόκληση διεγερτικού μετασυναπτικού δυναμικού της τάξης 1mV. Για να προκληθεί διέγερση πρέπει να ξεπεραστεί ο ουδός, και απαιτούνται συνήθως 10mV ή και περισσότερα. Συνήθως διεγείρονται ταυτόχρονα πολλά διεγερτικά κομβία των οποίων οι επιδράσεις μπορούν να αθροιστούν στο χώρο αλλά και στον χρόνο. Κατά την άθροιση στο χώρο, αθροίζονται ταυτόχρονα πολλά μετασυναπτικά δυναμικά που παράγονται από την διέγερση πολλών κομβίων διάσπαρτων σε διάφορες περιοχές της νευρωνικής μεμβράνης. Κατά την άθροιση στο χρόνο, αθροίζονται διαδοχικά μετασυναπτικά δυναμικά που επαναλαμβάνονται γρήγορα.

### Χημικοί μεταφορείς σήματος

Οι νευροδιαβιβαστές αποθηκεύονται σε μικροσκοπικά σφαιρικά (συναπτικά) κυστίδια, στις απολήξεις των αξόνων, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως. Υπάρχουν κυστίδια τα οποία χρησιμοποιούνται για αποθήκευση και κυστίδια που βρίσκονται πιο κοντά στις νευρικές απολήξεις, που είναι έτοιμα να απελευθερώσουν το περιεχόμενό τους. Η άφιξη ενός δυναμικού ενέργειας έχει ως αποτέλεσμα το άνοιγμα των ιοντικών καναλιών, που επιτρέπουν στο ασβέστιο ( $Ca^{++}$ ) να εισέλθει στο κύτταρο. Ακολούθως ενεργοποιούνται ένζυμα που δρουν σε μία πληθώρα προσυναπτικών πρωτεϊνών, όπως οι «σνερ-snare», «ταγμίνη-tagmin» και «μπρεβίνη-brevin». Οι νευροεπιστήμονες πολύ πρόσφατα ανακάλυψαν

ότι αυτές οι προσυναπτικές πρωτεΐνες κυκλοφορούν, προσκολλώνται και παγιδεύουν άλλες, κάνοντας τα συναπτικά κυστίδια να συγχωνεύονται με τη μεμβράνη, να ανοίγουν και να απελευθερώνουν το χημικό μεταφορέα από τη νευρική απόληξη.

Ο μεταφορέας στη συνέχεια διαχέεται σε ένα κενό μεγέθους 20 νανομέτρων, στο συναπτικό χάσμα. Τα συναπτικά κυστίδια ξανασηματίζονται, όταν οι μεμβράνες τους προσροφηθούν πίσω στη νευρική απόληξη, όπου και ξαναγεμίζουν με νευροδιαβιβαστή, ώστε να επαναληφθεί η ίδια διαδικασία, δηλαδή μία διαδικασία συνεχούς ανακύκλωσης. Όταν ο νευροδιαβιβαστής φτάσει στην απέναντι θέση, γεγονός που συμβαίνει εκπληκτικά γρήγορα – μέσα σε λιγότερο από ένα χιλιοστό του δευτερολέπτου – αλληλεπιδρά με ειδικές μοριακές δομές, τους υποδοχείς, που βρίσκονται στη μεμβράνη του επόμενου νευρώνα. Τα γλοιακά κύτταρα επίσης βρίσκονται γύρω από το συναπτικό χάσμα. Τα γλοιακά κύτταρα έχουν κάποιους μεταφορείς οι οποίοι απορροφούν το διαβιβαστή από το χάσμα. Με τον τρόπο αυτό οι χημικοί μεταφορείς σήματος απομακρύνονται πριν φτάσει το επόμενο δυναμικό ενέργειας. Επίσης, τα γλοιακά κύτταρα στη συνέχεια επεξεργάζονται το διαβιβαστή και τον ξαναστέλνουν για αποθήκευση στα κυστίδια των νευρικών απολήξεων για μελλοντική χρήση. Η λειτουργία των γλοιακών κυττάρων δεν είναι ο μόνος τρόπος με τον οποίο οι νευροδιαβιβαστές απομακρύνονται από τη σύναψη. Μερικές φορές τα ίδια τα νευρικά κύτταρα αντλούν τα μόρια του διαβιβαστή πίσω στις νευρικές απολήξεις τους. Άλλες φορές ο διαβιβαστής διασπάται με τη βοήθεια άλλων χημικών ουσιών που βρίσκονται στο συναπτικό χάσμα.

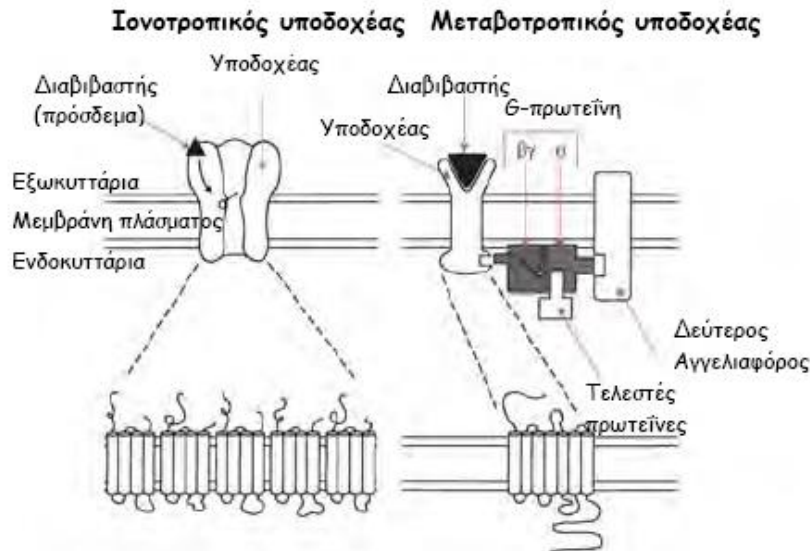
### **Μεταφορείς σήματος – Υποδοχείς**

Η πρόσδεση του διαβιβαστή στους αντίστοιχους υποδοχείς, οδηγεί στη διάνοιξη ενός ιοντικού καναλιού. Αυτοί οι υποδοχείς ονομάζονται ιονοτροπικοί υποδοχείς. Αν το ιοντικό κανάλι επιτρέψει να εισέλθουν θετικά ιόντα ( $\text{Na}^+$  ή  $\text{Ca}^{++}$ ), η εισροή θετικού ρεύματος οδηγεί σε διέγερση. Αυτό προκαλεί μία αλλαγή στο δυναμικό της μεμβράνης, το οποίο ονομάζεται διεγερτικό μετασυναπτικό δυναμικό ( $\Delta\text{M}\Sigma\Delta$ -EPSP). Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, ένας μεγάλος αριθμός συνάψεων συγκλίνουν σε ένα νευρώνα και, ανά πάσα στιγμή, κάποιες είναι ενεργείς και κάποιες άλλες όχι. Αν το άθροισμα αυτών των  $\Delta\text{M}\Sigma\Delta$  φτάσει τον ουδό για την πυροδότηση μιας ώσης, δημιουργείται ένα νέο δυναμικό ενέργειας και το σήμα μεταδίδεται μέσω του άξονα του νευρώνα.

Ο κύριος διεγερτικός νευροδιαβιβαστής στον εγκέφαλο είναι το γλουταμικό οξύ. Η μεγάλη ακρίβεια της νευρικής δραστηριότητας απαιτεί η διέγερση ορισμένων νευρώνων να συνοδεύεται από την καταστολή της δραστηριότητας άλλων. Αυτό επιτυγχάνεται με την αναστολή. Στις ανασταλτικές συνάψεις, η ενεργοποίηση των υποδοχέων οδηγεί στη διάνοιξη ιοντικών καναλιών, τα οποία επιτρέπουν την εισροή αρνητικά φορτισμένων ιόντων, προκαλώντας μία αλλαγή στο δυναμικό της μεμβράνης που ονομάζεται ανασταλτικό μετα- συναπτικό δυναμικό (ΑΜΣΔ-IPSP). Το ΑΜΣΔ δεν επιτρέπει την εκπόλωση της μεμβράνης και ως εκ τούτου την έναρξη ενός δυναμικού ενέργειας στο κυτταρικό σώμα του υποδέκτη νευρώνα. Υπάρχουν δύο ανασταλτικοί νευροδιαβιβαστές : το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) και η γλυκίνη.

Η μελέτη των διεγερτικών και των ανασταλτικών νευροδιαβιβαστών αποκάλυψε την ύπαρξη ενός μεγάλου αριθμού άλλων χημικών ουσιών που απελευθερώνονται από τους νευρώνες. Πολλές από αυτές επηρεάζουν τους νευρωνικούς μηχανισμούς αλληλεπιδρώντας με διαφορετικές πρωτεΐνες στις μεμβράνες των νευρώνων, που ονομάζονται μεταβοτροπικοί υποδοχείς. Αυτοί οι υποδοχείς δεν περιέχουν ιοντικά κανάλια, δεν εντοπίζονται πάντα στην περιοχή της σύναψης και, κυρίως, δεν οδηγούν στην έναρξη δυναμικών ενέργειας. Τώρα πλέον θεωρούμε ότι αυτοί οι υποδοχείς ρυθμίζουν ή τροποποιούν την τεράστια ποικιλία χημικών διεργασιών που πραγματοποιούνται στο εσωτερικό των νευρώνων και για το λόγο αυτό η επίδραση που ασκούν οι μεταβοτροπικοί υποδοχείς ονομάζεται νευρορύθμιση ή νευροτροποποίηση. Οι μεταβοτροπικοί υποδοχείς συνήθως βρίσκονται σε πολύπλοκα σωματίδια που συνδέουν το εξωτερικό του κυττάρου με ένζυμα που βρίσκονται μέσα στο κύτταρο και που επηρεάζουν τον μεταβολισμό του. Όταν ένας νευροδιαβιβαστής αναγνωριστεί και δεσμευτεί σε ένα μεταβοτροπικό υποδοχέα, συνδετικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες, που ονομάζονται G-πρωτεΐνες και άλλα ένζυμα της μεμβράνης ενεργοποιούνται ομαδικά. Δεν επιτρέπουν τη διέλευση ιόντων από τη μεμβράνη, όπως οι ιονοτροπικοί υποδοχείς, αλλά αντίθετα ενεργοποιούν ταχύτατα δεύτερους αγγελιαφόρους. Τα αποτελέσματα της νευροτροποποίησης περιλαμβάνουν μεταβολές στα ιοντικά κανάλια, στους υποδοχείς, στις αντλίες, ακόμη και στην έκφραση γονιδίων. Αυτές οι αλλαγές έχουν βραδύτερη έναρξη και μεγαλύτερη διάρκεια από αυτές που προκαλούνται από τους διεγερτικούς και τους ανασταλτικούς διαβιβαστές και τα αποτελέσματά τους επεκτείνονται πέρα από το επίπεδο της σύναψης. Αν και δεν προκαλούν δυναμικά

ενέργειας, επιδρούν ουσιαστικά στη διαδικασία μετάδοσης των ώσεων δια μέσου των νευρωνικών δικτύων.



**Εικόνα 25:** Οι ιονοτροπικοί υποδοχείς (αριστερά) συνδέονται με ένα κανάλι μέσα από το οποίο περνούν ιόντα (π.χ.  $\text{Na}^+$  και  $\text{K}^+$ ). Το κανάλι αποτελείται από 5 υπομονάδες τοποθετημένες κυκλικά. Οι μεταβοτροπικοί υποδοχείς (δεξιά) δεν συνδέονται με κανάλια, αλλά με ρυθμιστικές G- πρωτεΐνες μέσα στην κυτταρική μεμβράνη, οι οποίες βοηθούν στη μεταφορά του σήματος. Οι τελεστές είναι εκτελεστικές πρωτεΐνες που βοηθούν στη παραγωγή δεύτερων αγγελιοφόρων.

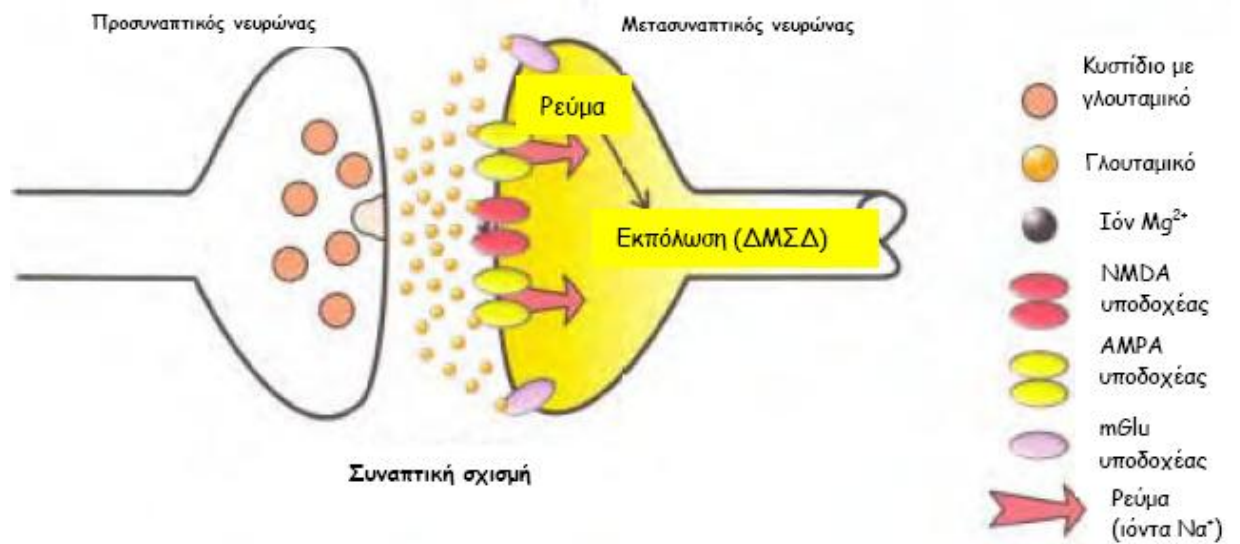
## 5.4 Πλαστικότητα

Κατά τη διάρκεια της ζωής μας, ο εγκέφαλός μας αλλάζει διαρκώς, και αυτή η ικανότητα του εγκεφάλου για αλλαγή ονομάζεται πλαστικότητα. Ωστόσο, δεν αλλάζει ο εγκέφαλος ως σύνολο, αλλά οι μεμονωμένοι νευρώνες τροποποιούνται για διάφορους λόγους – κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, ως απάντηση σε εγκεφαλική βλάβη αλλά και κατά τη διάρκεια της μάθησης. Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί πλαστικότητας, εκ των οποίων ο πιο σημαντικός είναι η **συναπτική πλαστικότητα** – η έρευνα που ασχολείται με το πώς οι νευρώνες μεταβάλλουν την ικανότητά τους να επικοινωνούν μεταξύ τους. Οι συνδέσεις των νευρώνων στα πρώτα στάδια της ζωής απαιτούν λεπτό συντονισμό. Όπως αλληλεπιδρούμε με το περιβάλλον μας, αυτές οι συναπτικές συνδέσεις αρχίζουν να μεταβάλλονται. Δημιουργούνται νέες συνάψεις, οι χρήσιμες συνάψεις ενισχύονται, και οι συνάψεις

που σπάνια χρησιμοποιούνται αποδυναμώνονται ή ακόμη και καταργούνται για πάντα. Διατηρούνται οι εν ενεργεία συνάψεις και εκείνες που μεταβάλλονται, ενώ οι υπόλοιπες περικόπτονται.

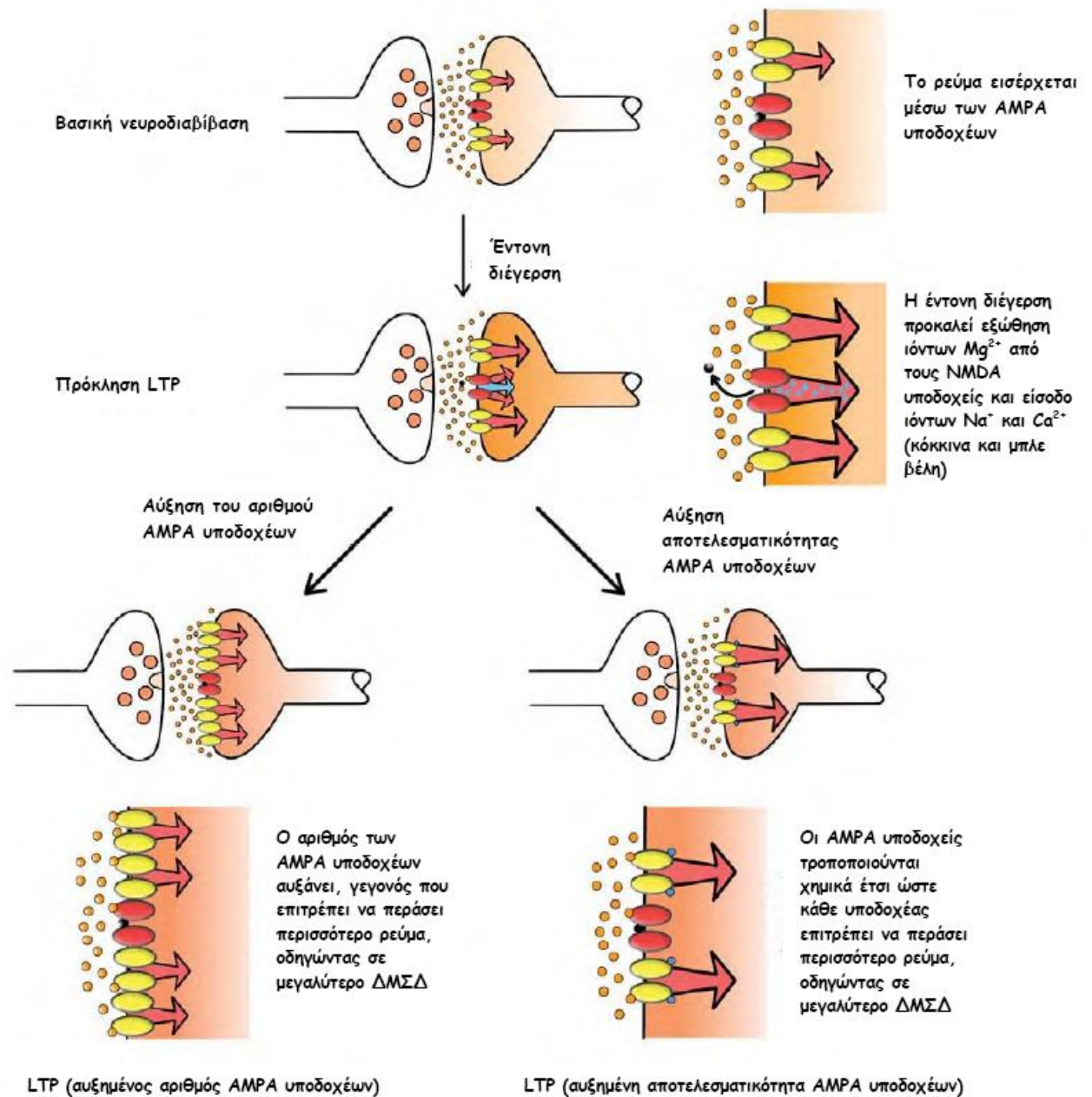
Η συναπτική διαβίβαση προϋποθέτει την απελευθέρωση ενός χημικού νευροδιαβιβαστή που στη συνέχεια ενεργοποιεί συγκεκριμένες πρωτεΐνες, που ονομάζονται υποδοχείς. Η φυσιολογική ηλεκτρική απάντηση στην απελευθέρωση νευροδιαβιβαστή αποτελεί μέτρηση της συναπτικής ισχύος. Αυτή μπορεί να ποικίλλει και η μεταβολή μπορεί να διαρκεί για λίγα δευτερόλεπτα, λίγα λεπτά ή ακόμη για μια ζωή. Οι νευροεπιστήμονες ενδιαφέρονται ιδιαίτερα για τις μακράς διάρκειας μεταβολές στη συναπτική ισχύ, που μπορούν να προκληθούν από σύντομες περιόδους νευρωνικής δραστηριότητας, κυρίως σε δύο διαδικασίες που ονομάζονται **μακροπρόθεσμη ενδυνάμωση (long-term potentiation, LTP)**, η οποία αυξάνει την συναπτική ισχύ, και **μακροπρόθεσμη καταστολή (long-term depression, LTD)**, που την μειώνει.

Το γλουταμικό είναι ένα αμινοξύ, που χρησιμοποιείται από ολόκληρο τον οργανισμό μας για την κατασκευή πρωτεϊνών. Είναι ο νευροδιαβιβαστής που λειτουργεί στις πιο πολλές πλαστικές συνάψεις του εγκεφάλου μας – αυτές που εκδηλώνουν LTP και LTD. Οι υποδοχείς γλουταμικού, οι οποίοι βρίσκονται κυρίως στην υποδοκτική πλευρά της σύναψης, δηλαδή στους μετασυναπτικούς νευρώνες, είναι τεσσάρων ειδών: τρία είδη ιονοτροπικών υποδοχέων με τα ονόματα AMPA (α-αμινο- μεθυλο-ισοξαζολ-προπιονικό οξύ), NMDA (N-μέθυλο -D- ασπαρτικό οξύ) και καϊνικοί. Ο τελευταίος τύπος είναι μεταβοτροπικός και λέγεται mGluR. Αν και όλα τα είδη των υποδοχέων γλουταμικού απαντούν στον ίδιο νευροδιαβιβαστή, το γλουταμικό, οι λειτουργίες που εκτελούν είναι πολύ διαφορετικές. Οι ιονοτροπικοί υποδοχείς χρησιμοποιούν τα ιοντικά κανάλια τους για τη δημιουργία διεγερτικού μετασυναπτικού δυναμικού (ΔΜΣΔ) ενώ οι μεταβοτροπικοί υποδοχείς παρουσιάζουν τη νευροτροποποιητική δράση που περιγράφηκε προηγουμένως, ρυθμίζοντας το μέγεθος και τη φύση αυτής της απάντησης. Όλοι οι υποδοχείς είναι σημαντικοί για τη συναπτική πλαστικότητα, αλλά γνωρίζουμε περισσότερα για τους AMPA και τους NMDA υποδοχείς, οι οποίοι θεωρούνται ότι είναι τα μόρια της μνήμης. Μεγάλο μέρος αυτής της γνώσης προέκυψε από πρωτοποριακές μελέτες για τη δημιουργία νέων φαρμάκων, που ασκούν τη δράση τους σε αυτούς τους υποδοχείς, μεταβάλλοντας τη δραστηριότητά τους.



**Εικόνα 26:** Το γλουταμικό οξύ απελευθερώνεται από τις συναπτικές απολήξεις, διασχίζει τη συναπτική σχισμή και προσδένεται στους διάφορους τύπους υποδοχέων: AMPA, NMDA και mGLUR.



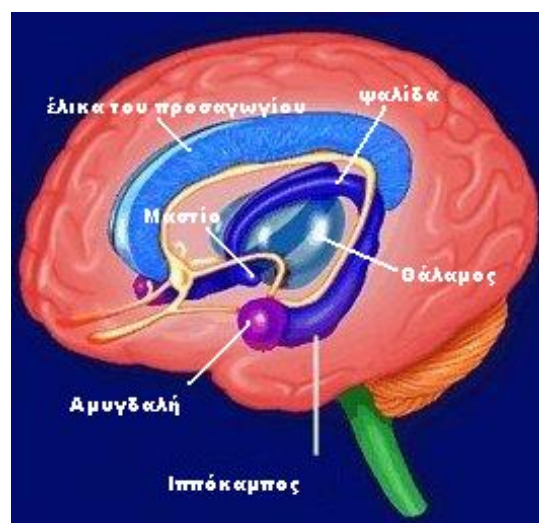


**Εικόνα 27:** Οι NMDA υποδοχείς (κόκκινο) αποτελούν το μοριακό μηχανισμό της μάθησης. Ο νευροδιαβιβαστής απελευθερώνεται τόσο κατά την βασική δραστηριότητα του νευρώνα, όσο και κατά την επαγωγή LTP (πάνω αριστερά). Η θέση όπου το  $Mg^{2+}$  (μικροί μαύροι κύκλοι, πάνω δεξιά) δεσμεύει το κανάλι  $Ca^{2+}$ , βρίσκεται έσα στην κυτταρική μεμβράνη και εκτοπίζεται από έντονη εκπόλωση (επόμενο διάγραμμα κάτω). Αυτό συμβαίνει όταν οι νευρώνες χρειάζεται να αλλάξουν τη συνδεσμολογία τους με άλλους νευρώνες. Η LTP μπορεί να εκφραστεί είτε ως αύξηση του αριθμού των AMPA υποδοχέων (κίτρινοι υποδοχείς, κάτω αριστερά) είτε ως αύξηση της αποτελεσματικότητας των AMPA υποδοχέων (κάτω δεξιά).

Οι αλλαγές στη λειτουργία των AMPA υποδοχέων δεν είναι η μόνη διαδικασία που παρατηρείται. Καθώς οι αναμνήσεις μονιμοποιούνται, στον εγκέφαλο συμβαίνουν δομικές αλλαγές. Οι συνάψεις που έχουν περισσότερους ενσωματωμένους AMPA υποδοχείς λόγω της εκδήλωσης LTP, αλλάζουν το σχήμα τους, μπορεί να αυξήσουν το μέγεθός τους, ή μπορεί ακόμα να δημιουργηθούν νέες συνάψεις από το δένδριτη, οπότε η εργασία που εκτελούσε μία σύναψη τώρα εκτελείται από δύο. Αντίθετα, οι συνάψεις που χάνουν AMPA υποδοχείς μετά από την εκδήλωση LTD μπορεί να αποδυναμωθούν και να καταργηθούν.

## 5.5. Ο ιππόκαμπος

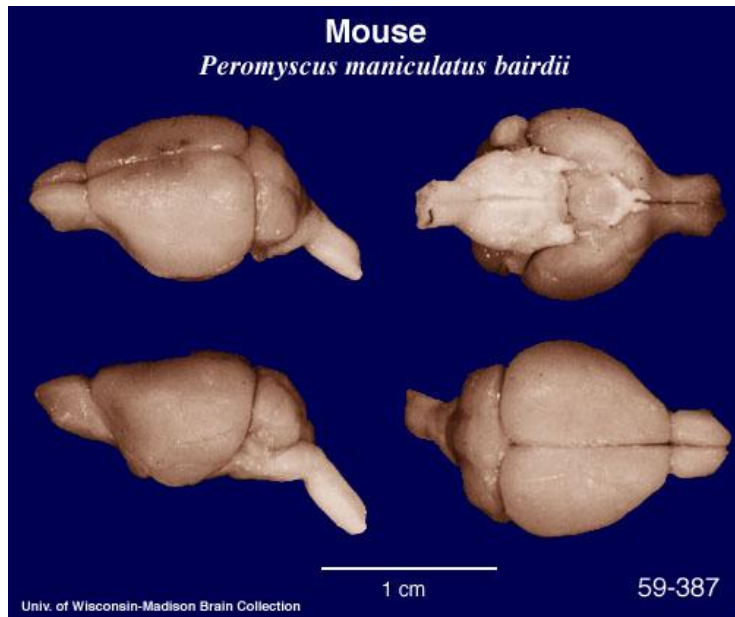
Ο ιππόκαμπος είναι μια δομή στον εγκέφαλο των θηλαστικών σημαντική για την απόκτηση επεισοδιακής και έκδηλης μνήμης. Και βρίσκεται στο εσωτερικό της περιοχής των κροταφικών λοβών και στις δύο πλευρές του εγκεφάλου. Εάν ο ιππόκαμπος υποστεί βλάβη νέα επεισόδια ή γεγονότα δεν είναι δυνατόν να αποθηκευθούν στην μακρόχρονη μνήμη. Πολλές εγκεφαλικές διαταραχές αφορούν τον ιππόκαμπο, συμπεριλαμβανομένης της νόσου του Alzheimer, της νόσου του Parkinson, την σχιζοφρένεια, την επιληψία κ.ά. Λόγω του σημαντικού ρόλου που παίζει στην μάθηση και στην μνήμη, ο ιππόκαμπος έχει μελετηθεί εκτενώς ανατομικά, φυσιολογικά, ψυχοφυσιολογικά καθώς και ως προς την δυνατότητα προσομοίωσής του με μοντέλα.



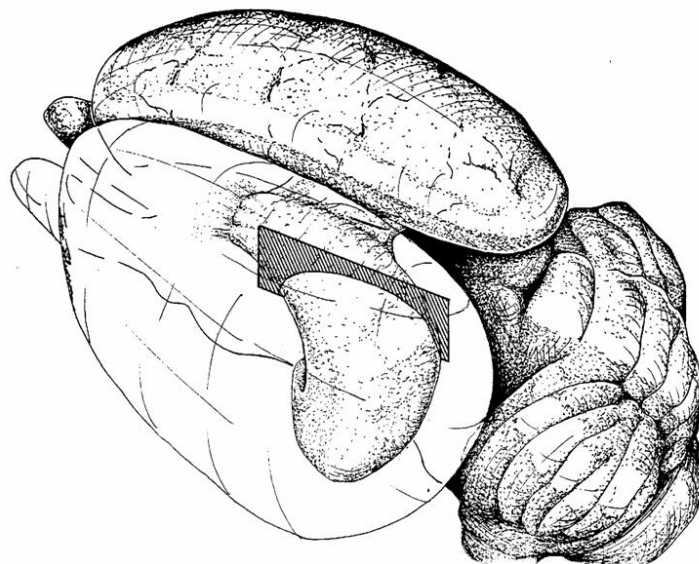
Εικόνα 28: Διάφορες λειτουργικές δομές στον εγκέφαλο

Το ιπποκάμπιο σύστημα μνήμης περιλαμβάνει τον ιππόκαμπος (ο οποίος περιλαμβάνει της 4 CA (carnu Ammonis / κέρασ του Άμμωνος) περιοχές, την οδοντωτή έλικα και το υπέρεισμα(subiculum) )καθώς και τον ενδορινικό, τον περιρινικό και τον μεταρινικό φλοιό στην παρακείμενο παραιπποκάμπιο περιοχή.

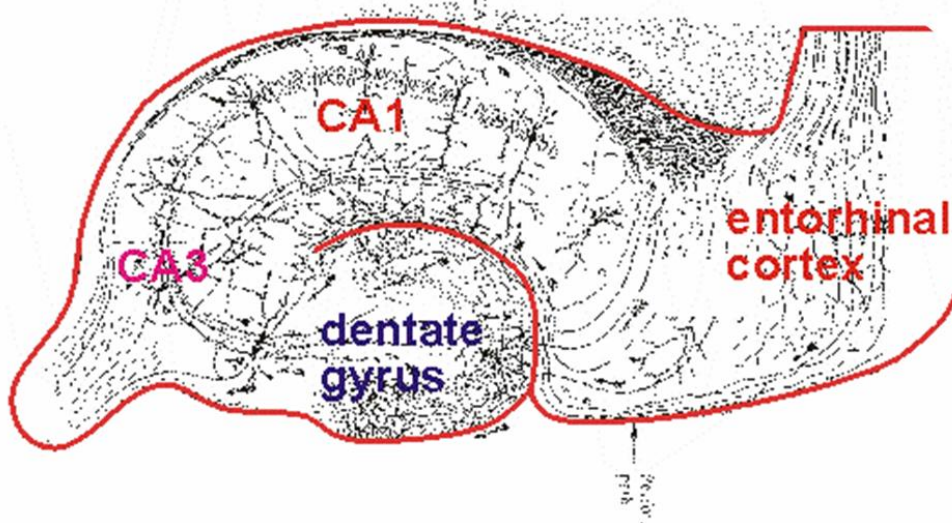
Παρακάτω φαίνονται μερικές εικόνες για τον εγκέφαλο του ποντικιού.



**Εικόνα 29:** Εγκέφαλος ποντικιού



**Εικόνα 30α:** Εγκέφαλος ποντικιού όπου φαίνεται η δομή του ιπποκάμπου (αριστερή) και κάθετη τομή



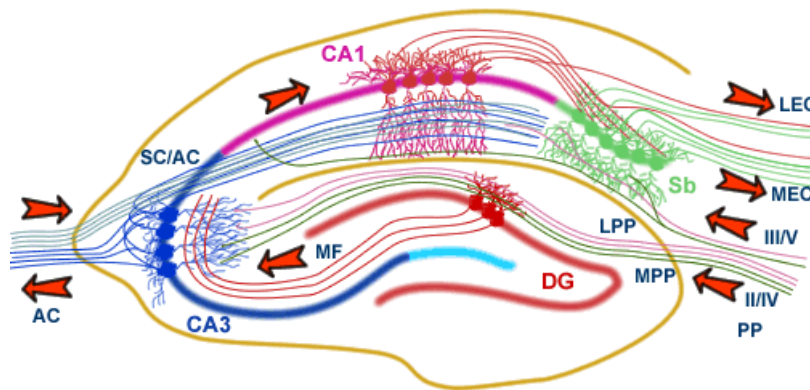
**Εικόνα 30β:** Η κάθετη τομή , όπου φαίνονται οι περιοχές CA1, CA3 , η οδοντωτή έλικα/dentate gyrus και ο ενδορινικός φλοιός/ entorhinal cortex.

Η άνω περιοχή του ιπποκάμπου είναι η CA1 και η κάτω περιοχή του ιπποκάμπου είναι η CA3. Ανάμεσά τους βρίσκεται η CA2 η οποία είναι όμως πολύ μικρή. Επίσης ανάμεσα στην CA3 και στην οδοντωτή έλικα παρεμβάλλεται η περιοχή CA4 η οποία είναι ελαχίστων διαστάσεων. Γενικά οι διασυνδέσεις στον ιππόκαμπο ακολουθούν μια «πεταλοειδή» μορφή, ξεκινώντας επό τον ενδορινικό φλοιό. Διάφορες στιβάδες και περιοχές μορίων ορίζονται από τις συνδέσεις που γίνονται. Οι βασικές στιβάδες πυραμιδικών μορίων είναι στις περιοχές CA1-4 καθώς και στην οδοντωτή έλικα.

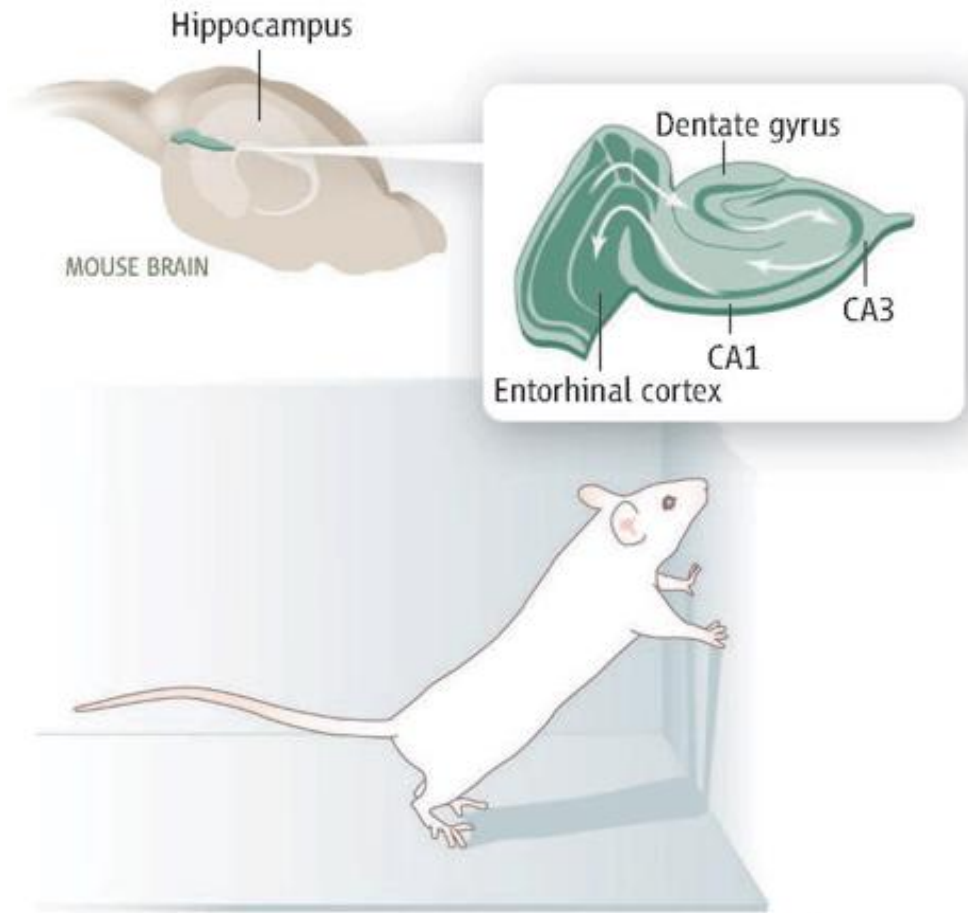
### **Οδοί/μονοπάτια στον ιππόκαμπο**

Η διαπυραϊνισα οδός (perforant path) είναι η κύρια είσοδος στον ιππόκαμπο. Οι άξονες προέρχονται κυρίως από τις περιοχές II και III του ενδορινικού φλοιού, με μικρότερη συνεισφορά από τις περιοχές IV και V. Οι άξονες από τις στιβάδες II/IV προβάλλουν στα κοκκώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας και τα πυραμιδικά κύτταρα της περιοχής CA3, ενώ αυτά από τις στιβάδες III/V προβάλλουν στα πυραμιδικά κύτταρα του υπερείσματος. Οι mossy fibers είναι οι άξονες των κοκκώδων κυττάρων της οδοντωτής έλικας. Προβάλλουν από την οδοντωτή έλικα στα πυραμιδικά κύτταρα της CA3 περιοχής. Πολλά κοκκώδη κύτταρα μπορούν να διαμορφώσουν συνάψεις με ένα πυραμιδικό κύτταρο στην CA3. Αυτή η οδός μελετάται εκτενώς ως μοντέλο για την πλαστικότητα των νευρώνων.

Το μονοπάτι του Schaffer (Schaffer Collateral Pathway) περιλαμβάνει τους άξονες που προβάλλουν από την CA3 περιοχή στην CA1. Το μονοπάτι από την περιοχή CA1 στο υπέρισμα και στον ενδορινικό φλοιό αποτελεί την κύρια έξοδο από τον ιππόκαμπο.

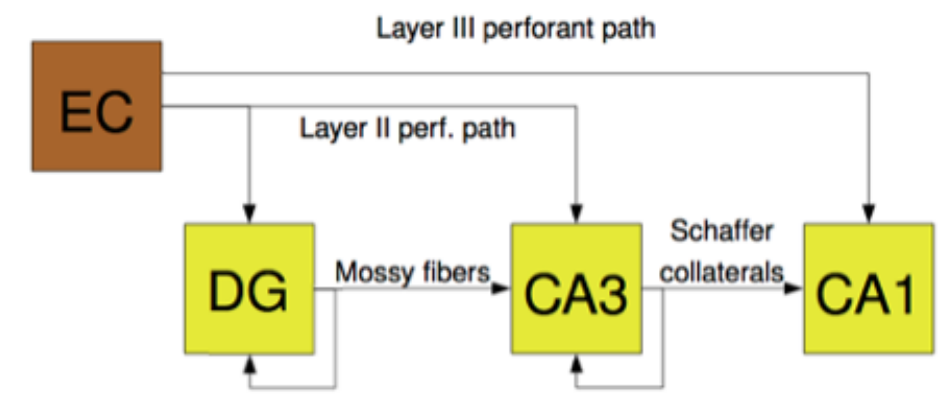


**Εικόνα 31:** Το δίκτυο στον ιππόκαμπο. Ο ιππόκαμπος αποτελεί ένα δίκτυο μονής κατεύθυνσης με είσοδο από τον ενδορινικό φλοιό (entorhinal cortex- EC ) που συνδέεται με την οδοντωτή έλικα (dentate gyrus - DG) και τα πυραμιδικά κύτταρα της CA3 περιοχής μέσω της διαπυραμίδου οδού (perforant pathway - PP), η οποία διαιρείται σε πλευρική (lateral - LPP) και μέση ( medial - MPP). Τα κύτταρα στην CA3 περιοχή δέχονται είσοδο επίσης από την οδοντωτή έλικα (DG) μέσω των Mossy fibers (MF). Και προβάλλουν τους άξονες τους στα πυραμιδικά κύτταρα της CA1 μέσω του Schaffer Collateral Pathway ( SC). Οι νευρώνες της CA1 προβάλλουν άξονες στο υπέρισμα (subiculum – Sb), και τελικά αυτοί οι νευρώνες καταλήγουν να αποτελούν την έξοδο πίσω στον ενδορινικό φλοιό, ορίζοντας έτσι έναν κύκλο.



**Εικόνα 32:** Ο ιππόκαμπος (δεξιά δομή) στο ποντίκι και μία οριζόντια τομή του

Το δίκτυο εισόδων στον ιππόκαμπο φαίνεται και στο επόμενο διάγραμμα:



## **6. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)**

### **6.1 Γενικά**

Στις αρχές της δεκαετίας του 1950 ανακαλύφθηκε ο παράγοντας νευρικής ανάπτυξης NGF (Nerve Growth Factor) χάρη στην «τροφική» ( ενισχύει την επιβίωση και την ανάπτυξη) επίδρασή του σε αισθητικούς και συμπαθητικούς νευρώνες. Το 1982, ο BDNF , το δεύτερο μέλος της νευροτροφικής οικογένειας , αποδείχθηκε πως ενισχύει την επιβίωση κάποιων υποπληθυσμών των νωτιαίων γαγγλίων.

Το γονίδιο του BDNF στους ανθρώπους έχει εντοπιστεί στο χρωμόσωμα 11, και σε αμινοξέα έχει κατά 50% ομοιότητα με τις νευροτροφίνες NGF, NT-3, NT-4/5. Κάθε νευροτροφίνη αρχικά παράγεται ως προνευροτροφίνη, και στην συνέχεια «κόβεται» και παίρνει την τελική της μορφή από κάποιες πρωτεάσες όπως η φουρίνη, καταλήγοντας τελικά να έχει το μισό περίπου μοριακό βάρος.

Κάθε νευροτροφίνη συνδέεται με έναν ή περισσότερους υποδοχείς tropomyosin-related kinase (trk). Ο trkA είναι ο υποδοχέας που συνδέεται με τον NGF, ο trkB είναι υποδοχέας που συνδέεται με τον BDNF και τον NT-4/5, και ο trkC με τον NT-3. Οι υποδοχείς trk υπάρχουν με ολόκληρο το μήκος τους (trk.FL) καθώς και σε «ακρωτηριασμένες» μορφές από τις οποίες απουσιάζει η κινάση (trkB.T1, trkB.T2). Παρότι, οι περισσότερες λειτουργίες του BDNF σχετίζονται με το trkB πλήρους μήκους, υπάρχουν και υποθέσεις για λειτουργία με τις ακρωτηριασμένες μορφές του, οι οποίες σχετίζονται με την ανάπτυξη των νευρώνων. Ακόμη έχει αποδειχθεί από πρόσφατες έρευνες ότι ο BDNF ενεργοποιεί την μετάδοση σημάτων μέσω των ιόντων ασβεστίου των γλοιακών κυττάρων, αφού συνδεθεί με ακρωτηριασμένο trkB υποδοχέα. Επίσης, όλες οι νευροτροφίνες συνδέονται με τον υποδοχέα p75, ο οποίος συμβολίζεται για αυτόν τον λόγο ως p75<sup>NTR</sup> (Binder and Scharfman, 2004).

### **Φυσιολογική έκφραση του γονιδίου του BDNF**

Γενικά ο BDNF παράγεται στο ΚΝΣ φυσιολογικά κατά την διάρκεια της ζωής. Διάφορα ερεθίσματα είναι υπεύθυνα για αλλαγές στην έκφραση του γονιδίου του BDNF σε φυσιολογικές αλλά και παθολογικές καταστάσεις, περιλαμβάνοντας οπτικά ερεθίσματα, νοητική καθώς και φυσική άσκηση. Κατόπιν αυτών των ερεθισμάτων έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα mRNA BDNF στον οπτικό φλοιό, στον υποθάλαμο, στον ιππόκαμπο κ.ά.,

γενικώς ευρέως στο ΚΝΣ. Ο BDNF ως πρωτεΐνη εντοπίζεται στο σώμα των νευρώνων, στον νευράξονα αλλά και στους δενδρίτες (Conner et al. 1997). Ιδιαίτερα υψηλή ανοσοαντίδραση παρουσιάζουν οι άξονες των κοκκωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας.

Σε αντίθεση με το κλασικό μοντέλο για τους τροφικούς παράγοντες οι οποίες παράγονται μετά από τον εντοπισμό του νευρώνα –στόχου (target- derived trophic factor model), όπως για παράδειγμα η NGF, σύμφωνα με το οποίο οι νευροτροφίνες μεταφέρονται ανάδρομα (retrogradely) δηλαδή από την σύναψη προς το κυτταρικό σώμα, πλέον υπάρχουν και αποδείξεις ότι ο BDNF μεταφέρεται και πρόδρομα (anterogradely) δηλαδή από το κυτταρικό σώμα προς την σύναψη ( Conner et al.2007). Επίσης, υπάρχουν αποδείξεις ότι τόσο ο BDNF όσο και ο υποδοχέας του trkB μεταφέρονται εντός του κυττάρου.

## **6.2 Ιδιότητες και επιδράσεις του BDNF**

Ο BDNF δρα ενισχυτικά ως προς την επιβίωση και την ανάπτυξη των νευρώνων, συμπεριλαμβανομένων των νωτιαίων γαγγλίων, των νευρώνων στον ιππόκαμπο και στον φλοιό. Εκτός από το ΚΝΣ, ο BDNF έχει ευεργετικές επιδράσεις και στο ΠΝΣ. Ειδικότερα, ομοζυγωτικά knockout ποντίκια (-/-) στο γονίδιο του BDNF δεν επιβιώνουν παραπάνω από 3 εβδομάδες, ενώ ετεροζυγωτικά ποντίκια (+/-) επιβιώνουν απλώς εκδηλώνουν μια σειρά από φαινότυπους όπως η παχυσαρκία αλλά και η μειωμένη ικανότητα αντίληψης του χώρου. Γενικότερα, η φυσιολογική λειτουργία του γονιδίου παραγωγής της στον εγκέφαλο είναι πολύ σημαντική για την ανάπτυξη του εγκεφάλου, καθώς παίζει καθοριστικό ρόλο στην δενδριτική μορφολογία των νευρώνων και στα μονοπάτια και τις συνάψεις που θα διαμορφώσουν οι άξονές τους.

Ο BDNF ενισχύει τις διεγερτικές συνάψεις και αποδυναμώνει τις ανασταλτικές συνάψεις στον εγκέφαλο. Έχει αποδειχθεί ότι παίζει σπουδαίο ρόλο στην συναπτική πλαστικότητα (ικανότητα του εγκεφάλου να τροποποιεί τους μεμονωμένους νευρώνες και τις συνάψεις μεταξύ τους -αποδυνάμωση, κατάργηση, δημιουργία- ως απάντηση σε εγκεφαλική βλάβη ή και κατά τη διάρκεια της μάθησης, βλ.Κεφ.5 ).

Ο BDNF συνδέεται με το trkB σε νευρώνες του ΚΝΣ, και ιδιαίτερα του ιπποκάμπου, προκαλώντας LTP (long-term potentiation -μακροπρόθεσμη ενδυνάμωση) :μακράς διάρκειας μεταβολές στη συναπτική ισχύ, που μπορούν να προκληθούν από σύντομες περιόδους νευρωνικής δραστηριότητας. Μελέτες έχουν αποδείξει ότι ο μηχανισμός μετάδοσης σήματος από τον BDNF περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του υποδοχέα trkB, στη



συνέχεια την ενεργοποίηση της κινάσης MAP καθώς και PI-3, και ακολούθως αρχίζει να γίνεται έκφραση γονιδίων από τον πυρήνα του νευρώνα που ενισχύουν την επιβίωση και την ανάπτυξή του.

### **6.3 Επιδράσεις του BDNF στο μοντέλο της νόσου του Alzheimer**

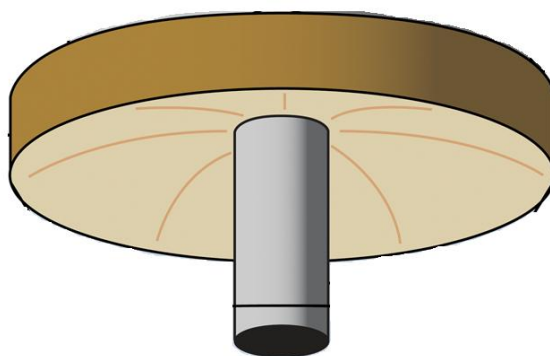
Σύμφωνα με την μελέτη των Nagahara et al.2009, ο BDNF εξασκεί καθοριστικής σημασίας ρόλο και έχει ευεργετικές επιδράσεις στα κυκλώματα των νευρώνων που εμπλέκονται στη νόσο του Alzheimer, δρώντας χωρίς να επηρεάζει την ύπαρξη των αμυλοειδικών πλακών οι οποίες παρουσιάζονται κατά την ασθένεια αυτή. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως η παραγωγή του BDNF είναι εξαιρετικά μειωμένη στην περιοχή του ιππόκαμπου ήδη από τα πρώτα στάδια της ασθένειας. Συγκεκριμένα, μετά από ενδοφλέβια χορήγηση BDNF στον ιππόκαμπο του εγκεφάλου πειραματόζων μεταλλαγμένων ώστε να παρουσιάζουν συμπτώματα της νόσου, έγιναν συμπεριφορικές μελέτες αλλά και ανατομικές μελέτες σε επίπεδο κυττάρων αλλά και μορίων με στόχο να εξακριβωθεί η επίδραση του BDNF στον ιππόκαμπο σε παθολογικές καταστάσεις, αλλά και λόγω του γήρατος. Αποδείχθηκε ότι ελτιώνει την μάθηση και την μνήμη, αναστέλλει την απώλεια των νευρικών συνάψεων, προφυλάσσει τους νευρώνες από τον θάνατο, και ανατρέπει την ατροφία τους. Τελικά, ο BDNF αποτελεί μια δυνητική θεραπεία για την νόσο του Alzheimer, εάν καταφέρει να μεταφερθεί εξωγενώς με αποτελεσματικών τρόπο.

## 7. Πειραματική διάταξη και Μέθοδοι

### 7.1 Προετοιμασία

#### 7.1.1 Εξοπλισμός υπερήχου

Χρησιμοποιήθηκε ένας υπερηχητικός μετατροπέας μονού στοιχείου με κυκλικό διάφραγμα Εστιασμένου Υπερήχου (single-element circular-aperture FUS transducer), με ένα κενό στο κέντρο του για την τοποθέτηση ενός υπερηχητικού μετατροπέα, ο οποίος χρησιμοποιείται για απεικόνιση. Η κεντρική συχνότητα του μετατροπέα για την παραγωγή των υπερηχητικών κυμάτων ήταν 1.525MHz, το βάθος εστίασης 90mm, η εξωτερική ακτίνα 30mm, και η εσωτερική ακτίνα 11.2mm. Ο υπερηχητικός μετατροπέας για την απεικόνιση ήταν και πάλι μονού στοιχείου, εκπομπής και λήψης (single-element pulse-echo diagnostic transducer) με κεντρική συχνότητα 7.5MHz και εστιακό βάθος 60mm, και τοποθετήθηκε με τέτοιο τρόπο στο κενό στο κέντρο του FUS μετατροπέα ώστε οι εστίες των δύο μετατροπέων να επικαλύπτονται.



**Εικόνα 33** : Οι δύο μετατροπείς τοποθετημένοι ώστε να επικαλύπτονται οι εστίες τους. Ο πάνω μετατροπέας είναι ο θεραπευτικός FUS μετατροπέας, όπου στο κέντρο του έχει τοποθετηθεί ο pulse-echo μετατροπέας για την απεικόνιση

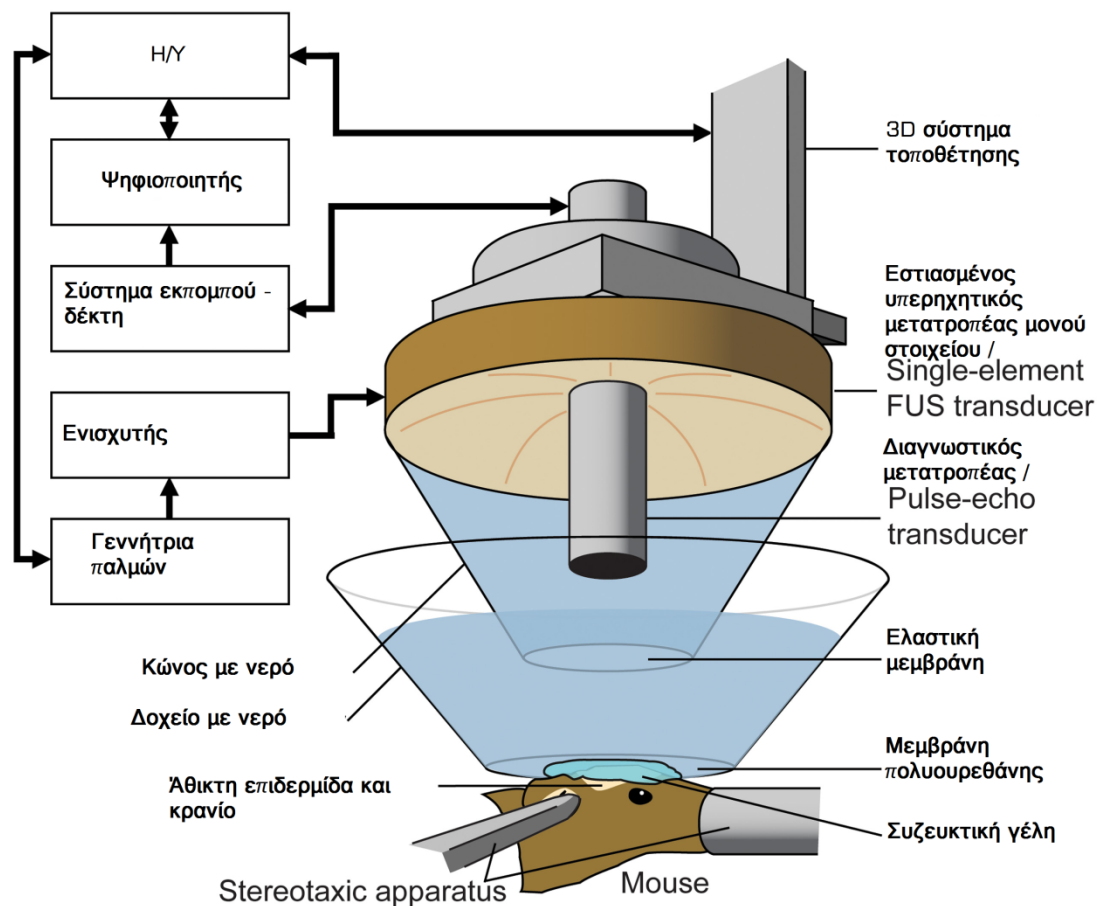
Επίσης, τοποθετήθηκε ένας διάφανος κώνος με διυλισμένο νερό χωρίς φυσαλίδες ή αέρα, στεγασμένος με μια εξαιρετικά λεπτή μεμβράνη πολυουρεθάνης, υψηλής υπερηχητικής διαπερατότητας (Trojan; Church & Dwight Co., Inc., Princeton, NJ, USA).

Ο FUS μετατροπέας ήταν συνδεδεμένος με ένα σύστημα τοποθέτησης τριών διαστάσεων (3D positioning system), (Velmex Inc., Lachine, QC, Canada, και ο έλεγχός του γινόταν δια μέσου μίας γεννήτριας παλμών (Agilent Technologies, Palo

Alto, CA, USA). Ανάμεσα στην γεννήτρια παλμών και τον μετατροπέα υπήρχε ένας ενισχυτής 50-dB ( ENI Inc., Rochester, NY, USA).

Ο διαγνωστικός υπερηχητικός μετατροπέας οδηγούταν από ένα σύστημα εκπομπής και λήψης ( pulser- receiver, Panametrics, Waltham, MA, USA)το οποίο ήταν συνδεδεμένο με έναν ψηφιοποιητή ( digitizer Gage Applied Technologies, Inc. Lachine, QC, Canada). Με τις κατάλληλες μετρήσεις με τη χρήση ενός υδροφώνου( needle hydrophone Precision Acoustics Ltd., Dorchester, Dorset, UK;) με διάμετρο 0.2mm, οι διαστάσεις της υπερηχητικής δέσμης βρέθηκαν να είναι για την μισή ένταση 1.32mm πλευρικά και 13mm κάθετα. Αναλυτικά έχει περιγραφεί η μέθοδος από τους Choi JJ et al.2007.

Παρακάτω φαίνεται το σχήμα της πειραματικής διάταξης για τον υπέρηχο.



**Εικόνα 34:** Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για την in vivo μελέτη. Τα ποντίκια τοποθετήθηκαν σε ένα στρώμα πολυουρεθάνης και ένα δοχείο με νερό στερεώθηκε πάνω από το κεφάλι τους. Επίσης χρησιμοποιήθηκε και γέλη ως συζευκτικό μέσο ώστε να αποφευχθούν φαινόμενα έντονης ανάκλασης και

διάθλασης κατά την διέλευση του υπερηχητικού κύματος από τον μετατροπέα . Το κεφάλι του κάθε πειραματόζωου σταθεροποιήθηκε με έναν στερεοταξικό μηχανισμό.

### **7.1.2 Πειραματόζωα και αναισθησία**

Όλες οι διαδικασίες έγιναν μετά από έγκριση του Columbia University Animal Care and Use Committee. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν τρία (3) ποντίκια για αυτήν την μελέτη τύπου CB57L/6, βάρους 17-23g, Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN. Τα ποντίκια αναισθητοποιήθηκαν με ένα μίγμα οξυγόνου ( 0.8L/min σε πίεση 1.0Bar , 21<sup>o</sup> C ) και 1.5-2.0% αέριο isoflurane (Aerrane, Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, IL) με τη χρήση ενός εξατμιστήρα για αναισθησία (anesthisia vaporizer Surgi Vet, Inc. Waukesha, WI). Τα βιολογικά σήματα και η κατάσταση των ποντικίων ήταν συνεχώς υπό παρακολούθηση, και η αναισθησία ρυθμιζόταν ανάλογα με τις ανάγκες και τις φυσιολογικές αντιδράσεις του οργανισμού τους.

### **7.1.3 Μικροφουσαλίδες**

Οι μικροφουσαλίδες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τύπου Definity® ( Bristol-Myers Squibb Medical Imaging Inc., North Billerica, Massachusetts). Όπως περιγράφεται και στο αντίστοιχο κεφάλαιο έχουν λιπιδικό κέλυφος και οκταφθοριούχο άνθρακα ( Octafluoropropane), διάμετρο που κυμαίνεται μεταξύ 1.1-3.3μm, και μέση συγκέντρωση 1.2x10<sup>10</sup> μικροφουσαλίδες ανά mL. Για κάθε ένα από τα πειράματα ενεργοποιήθηκε καινούριο φιαλίδιο Definity® σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευαστικής εταιρείας. Στη συνέχεια χορηγήθηκε σε κάθε πειραματόζωο ένα διάλυμα 1:20 Definity® σε PBS (phosphate buffered saline) το οποίο είναι ένα αλατούχο σταθεροποιητικό διάλυμα, ενδοφλέβια μέσω ένεσης στην φλέβα της ουράς.

### **7.1.4 Brain- Derived Neurotrophic Factor (BDNF)**

Αγοράστηκε πρωτεΐνη BDNF συζευγμένη με χρώση Alexa Fluor®594 από την εταιρεία Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA, USA). Η BDNF Human Recombinant είχε παραχθεί σε Escherichia Coli ως ομοδιμερές, με πολυπεπτιδική αλυσίδα που περιείχε 2x119 αμινοξέα με συνολικό μοριακό βάρος 26.984 Da. Σύμφωνα με τον παρασκευαστή της τα πέντε πρώτα αμινοξέα ήταν Met-His-Ser-Asp-Pro. Η βιολογική της δραστηριότητα είχε ελεγχθεί νευρικά κύτταρα του προεγκέφαλου αρουραίων. Η σύνδεση της πρωτεΐνης με την χρώση Alexa Fluor® ήταν σε αναλογία περίπου 1-1

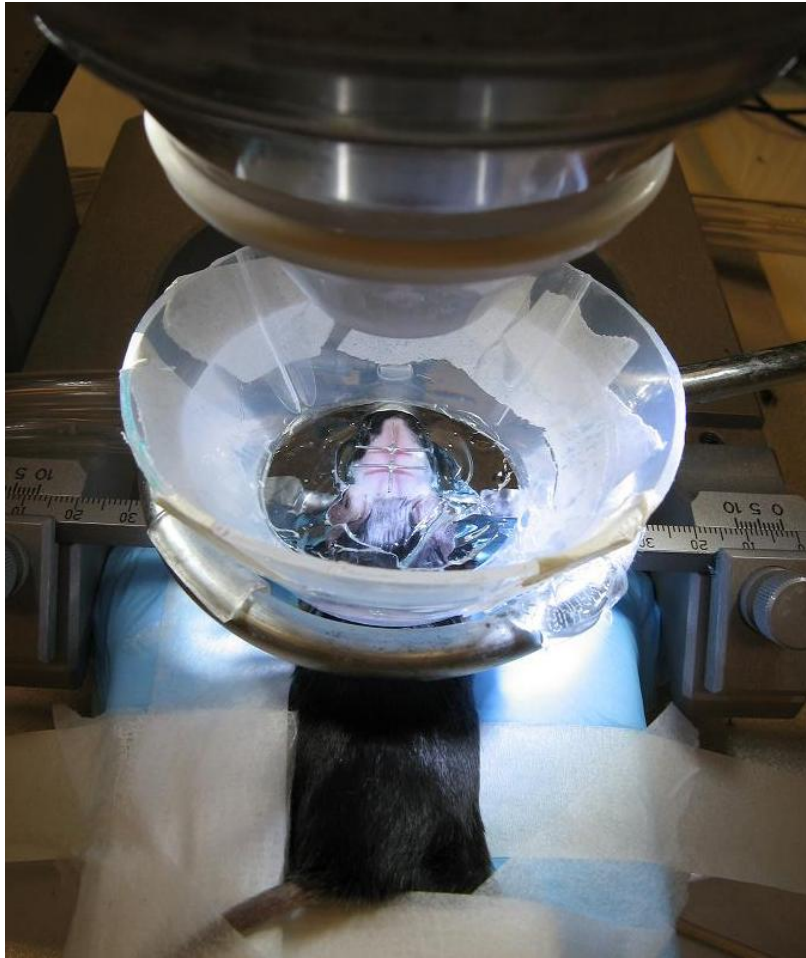
λόγου μορίων, και το σκεύασμα ήταν σε μορφή σκόνης, και διατηρήθηκε σε φιαλίδια στους  $-18^{\circ}\text{C}$  μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

## **7.2 Πειραματική διαδικασία**

### **7.2.1 Εύρεση της περιοχής-στόχου**

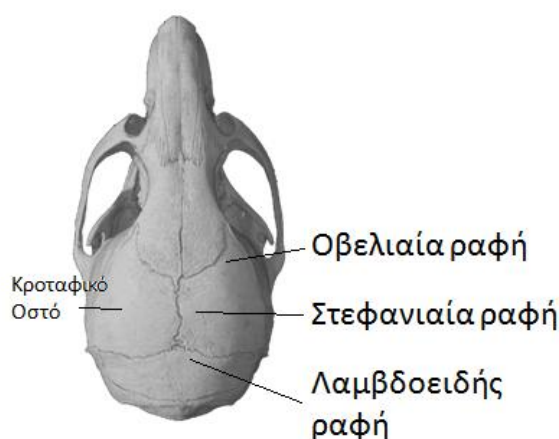
Τα πειραματόζωα τοποθετήθηκαν σε ένα στρώμα από πολυουρεθάνη, το οποίο ήταν στερεωμένο σε μια στεροταξική πλατφόρμα ειδικά σχεδιασμένη για το σκοπό της στόχευσης του εστιασμένου υπερήχου. Το τρίχωμα στην κεφαλή των ποντικών αφαιρέθηκε με μηχανή και κρέμα αποτρίχωσης. Ένα δοχείο με νερό είχε τοποθετηθεί πάνω από τα κεφάλια των ποντικών. Ο πάτος του δοχείου ήταν από μία εξαιρετικά λεπτή πλαστική διάφανη μεμβράνη ακουστικά και οπτικά διαπερατό(Saran; SC Johnson, Racine, WI, USA). Επίσης χρησιμοποιήθηκε γέλη για να μειωθούν τυχόν διαφορές ανάμεσα στις ακουστικές εμπεδήσεις μεταξύ της πλαστικής μεμβράνης και της επιδερμίδας του ποντικίου.

Επίσης χρησιμοποιήθηκε ένα μεταλλικό πλέγμα ως αναφορά για να στοχεύσουμε τον ιππόκαμπο του ποντικίου. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα οστά του κρανίου των ποντικών και τα σημεία όπου ενώνονται ως ανατομικά σημάδια. Ο εντοπισμός και στόχευση του ιππόκαμπου έγινε ανάλογα με τα οστά και την γνωστή έως τώρα ανατομία του κρανίου και του εγκεφάλου του ποντικίου. Το μεταλλικό πλέγμα δεν αποτελούταν παρά από τρεις μεταλλικές λεπτές μπάρες πάχους 0.30mm, οι δύο εκ των οποίων ήταν παράλληλα τοποθετημένες μεταξύ τους σε απόσταση 4.00mm, και η τρίτη ήταν κάθετη στο κέντρο τους. Το πλέγμα τοποθετήθηκε μέσα στο δοχείο νερού πάνω από το κεφάλι του ποντικίου, σε κάθε πείραμα, ευθυγραμμισμένο με τις ραφές των οστών οι οποίες ήταν εμφανείς.



**Εικόνα 35:** Φωτογραφία κατά την πειραματική διαδικασία, όπου φαίνεται και το μεταλλικό πλέγμα στερεωμένο στην κορυφή του κεφαλιού του πειραματόζωου, από όπου έχει αφαιρεθεί το τρίχωμα

Η κεντρική ράβδος ήταν τοποθετημένη κατά μήκος της στεφανιαίας ραφής, και η μία από τις δύο παράλληλες ήταν τοποθετημένη κατά μήκος της λαμβδοειδούς ραφής. Ο ιππόκαμπος θεωρείται ότι βρίσκεται στη μέση μεταξύ των δύο παράλληλων ράβδων του μεταλλικού πλέγματος και σε απόσταση 2.25mm μακριά από την κεντρική κάθετη ράβδο. Με τη χρήση του pulse-echo transducer, και σάρωση της περιοχής, μετά από επεξεργασία του σήματος από Η/Υ, παραγόταν μια εικόνα του πλέγματος.

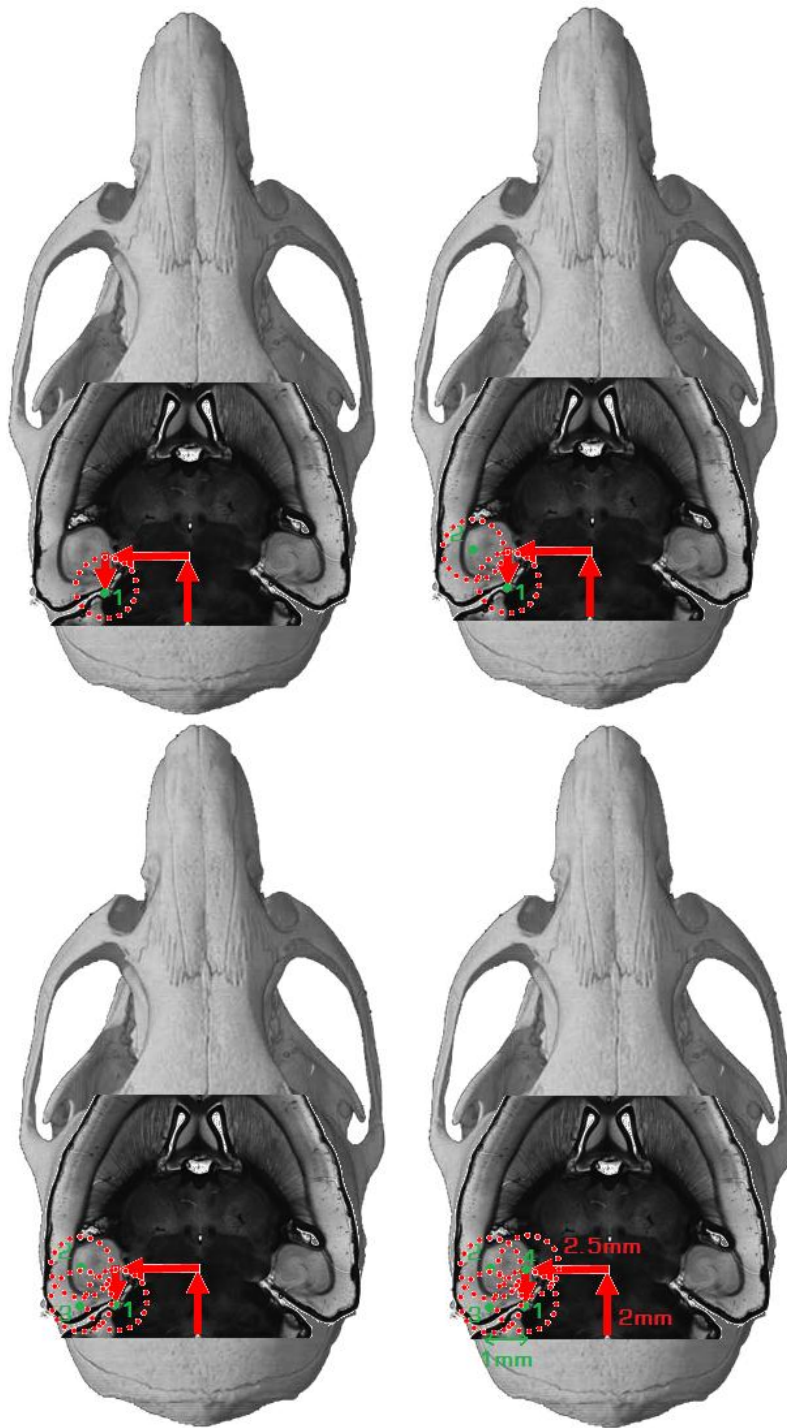


**Εικόνα 36:** Οστά και ραφές στο κρανίο του ποντικιού

Με βάση την εικόνα αυτή, μέσω ελέγχου από τον Η/Υ του 3D συστήματος τοποθέτησης, ο FUS μετατροπέας τοποθετήθηκε σε κάθε πείραμα 2.00mm μακριά από την λαμβδοειδή ραφή προς το βρέγμα, και 2.25mm μακριά από την οβελιαία ραφή. Η εφαρμογή των υπερήχων έγινε μόνο στη μία δομή του ιπποκάμπου, ενώ η άλλη χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος. Το σημείο εστίασης της εστιασμένης υπερηχητικής δέσμης τοποθετήθηκε με κατάλληλη μετακίνηση του μετατροπέα 3.00mm κάτω από την κορυφή του κρανίου, με τέτοιο τρόπο ώστε η υπερηχητική δέσμη να διαδοθεί μέσα από το αριστερό κροταφικό οστό στον αριστερό ιππόκαμπο, και ελάχιστα στην πλευρική περιοχή του θαλάμου. Με αυτό τον τρόπο η εφαρμογή του υπερήχου ήταν ακριβής και εστιασμένη.

### 7.2.2 Εφαρμογή υπερήχων

Για την διάνοιξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού με αυτήν την μέθοδο, όπως περιγράφηκε και προηγουμένως, ήταν απαραίτητη η χορήγηση μικροφουσαλίδων. Οι Definity® μικροφουσαλίδες χορηγήθηκαν ενδοφλέβια στην φλέβα στην ουρά του κάθε ποντικιού πριν από την εφαρμογή του υπερήχου. Η συγκέντρωση ήταν 50μL ανά κιλό μάζας του κάθε ποντικιού. Ένα λεπτό μετά την ένεση, έγινε η εφαρμογή των υπερήχων, συνολικά οκτώ «Ο.Π.» , από δύο Ο.Π. σε τέσσερις περιοχές του αριστερού ιππόκαμπου. Οι τέσσερις αυτές περιοχές σχημάτιζαν συνολικά ένα χώρο στον ιππόκαμπο εμβαδού 1x1 mm<sup>2</sup>. Το πρώτο καθώς και το τρίτο κτύπημα είχαν επικάλυψη στην οπίσθια περιοχή του ιπποκάμπου, και στην οπίσθια πλευρική περιοχή του θαλάμου, ενώ το δεύτερο και το τέταρτο κτύπημα είχαν επικάλυψη στην πρόσθια περιοχή του ιπποκάμπου καθώς και στην πρόσθια πλευρική περιοχή του θαλάμου.



**Εικόνα 37:** Χρήση εικόνων με τις ανατομικές λεπτομέρειες του εγκεφάλου τοποθετημένες πάνω από εικόνες CT. Φαίνεται ο τρόπος μετακίνησης του 3D συστήματος για εφαρμογή των Ο.Π. σε κάθε ένα από τα τέσσερα επιθυμητά σημεία.

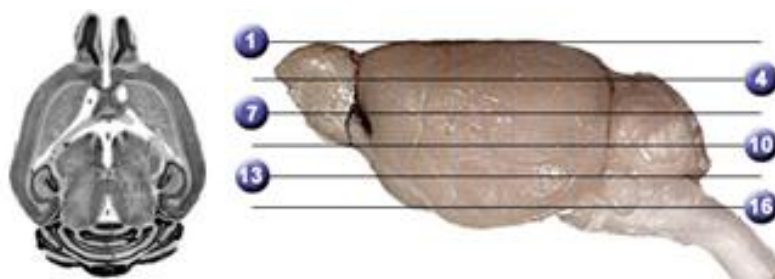
Κάθε Ο.Π. απείχε από το επόμενο χρονικά κατά 30sec, δηλαδή η διάρκεια του κτυπήματος ήταν 30sec. Και ανά δύο, τα κτυπήματα γίνονταν στην ίδια περιοχή. Η συχνότητα επανάληψης παλμών /PRF ήταν 10Hz, άρα συνολικά σε κάθε κύττημα μεταδόθηκαν 300 παλμοί, αφού η περίοδος ήταν  $1/10\text{Hz} = 100\text{ms}$ , και



30sec/100ms=300 παλμοί. Το duty cycle ήταν 20%, δηλαδή σε κάθε 100ms ο παλμός είχε διάρκεια 20ms. Η συχνότητα του υπερήχου ήταν 1.525MHz, και η ακουστική πίεση ήταν 0.46MPa. Η βαθμονόμηση και οι τιμές λήφθηκαν πειραματικά, χρησιμοποιώντας τις τιμές εξασθένησης για το κρανίο.

### 7.2.3 Χορήγηση BDNF, αφαίμαξη και τομή

Χορηγήθηκε ο BDNF ενδοφλέβια μέσω της μηριαίας φλέβας, 10 λεπτά μετά την εφαρμογή των υπερήχων. Η δόση ήταν 90mg ανά χιλιόγραμμο της σωματικής μάζας του ποντικίου, διαλυμένο σε 0.2mL PBS. Και τα τρία ποντίκια θανατώθηκαν 30 λεπτά μετά την εφαρμογή των υπερήχων, οπότε ο χρόνος κυκλοφορίας της πρωτεΐνης στο αίμα ήταν αρκετός για να φτάσει στα κύτταρα - στόχους. Έγινε κάθαρση του αίματος από την κυκλοφορία με PBS για 4-5 λεπτά, και στην συνέχεια με 4% παραφορμαλδεΐδη για 7-8 λεπτά με ρυθμό 6.8ml/min. Στη συνέχεια, διατηρήθηκε μόνο ο εγκέφαλος μαζί με το κρανίο από κάθε ποντίκι σε διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 4% για μία ημέρα, ενώ ακολούθως αφαιρέθηκαν και τα οστά του κρανίου και μονιμοποιήθηκαν οι εγκέφαλοι στα διαλύματα για ακόμη μία ημέρα. Μετά το πέρας αυτών των δύο ημερών, οι εγκέφαλοι μεταφέρθηκαν σε διάλυμα ζάχαρης (Sucrose) 10% για 30 λεπτά, 20% για την επόμενη 1 ώρα και 30% για άλλες 24 ώρες. Ο κάθε εγκέφαλος ενσωματώθηκε σε ένα μέσο Optimum Cutting Temperature (OCT), και με χρήση ξηρού πάγου και isopentane πάγωσαν. Οι παγωμένοι αυτοί κύβοι τμήθηκαν οριζόντια με μικροτόμο σε τομές της τάξης από 10 έως 150μm πάχους για την απεικόνιση φθορισμού. Επιλέχθηκαν οι τομές στις οποίες περιλαμβάνεται ο ιππόκαμπος, και τοποθετήθηκαν σε γυάλινα μικρά πλακίδια (slides), ενώ στη συνέχεια διατηρήθηκαν στους -18°C για περαιτέρω ανάλυση.



**Εικόνα 38:** Ένα δείγμα οριζόντια τομής στο σημείο 10 (αριστερά), και τα βάθη σε mm από την κορυφή του εγκεφάλου του ποντικίου (δεξιά)

#### 7.2.4 Φθορίζουσα μικροσκοπία

Οι εικόνες ανακτήθηκαν με τη χρήση μικροσκοπίου (BX61; Olympus; Melville, NY, USA) με φίλτρο ευαίσθητο σε μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής στα 595nm και 615nm αντίστοιχα, δηλαδή φθορίζουσας μικροσκοπίας, κατάλληλη να εντοπίσει τον φθορίζοντα BDNF που είχε παραγγελλθεί με βάση αυτά τα μήκη κύματος. Εικόνες λήφθηκαν για κάθε τομή σε τέσσερις τιμές εστίασης-ζουμ , 1.25x, 4x και 10x, ώστε να μπορέσουμε να παρατηρήσουμε καλύτερα την μεταφορά του BDNF από το κυκλοφορικό σύστημα στους νευρώνες ( νευράξονες και συναπτικά κομβία).



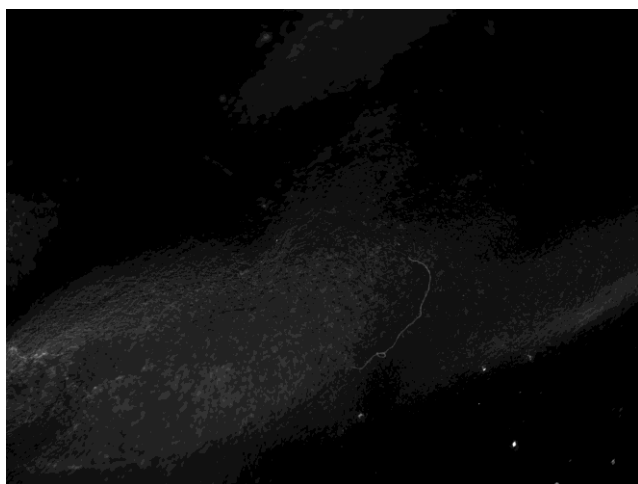
**Εικόνα 39 :** Μικροσκόπιο

## **8. Αποτελέσματα**

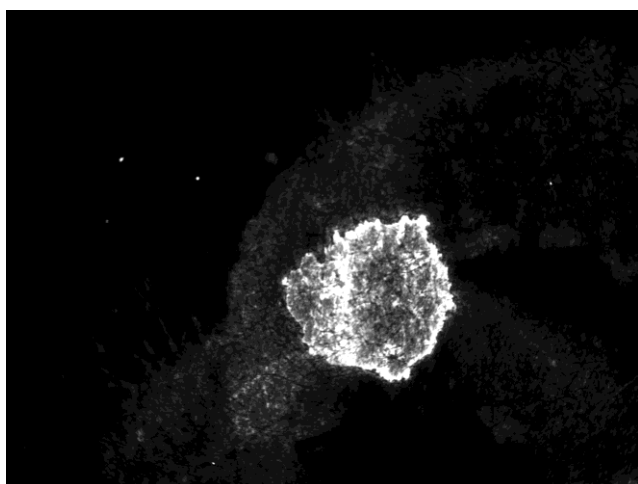
Όλες οι λήψεις έγιναν με μικροσκόπιο στη λειτουργία φθορίζουσας μικροσκοπίας, για την ανίχνευση μεταφοράς της φθορίζουσας ουσίας BDNF στον εγκέφαλο.

### **8.1. Φθορισμός BDNF**

Πρώτα ελέγξαμε τον φθορισμό του BDNF που χορηγήσαμε, κρατώντας ένα ελάχιστο μέρος του το οποίο τοποθετήσαμε κάτω από το μικροσκόπιο, αμέσως μετά την χορήγηση του υπόλοιπου μέρους του στα πειραματόζωα. Ως έλεγχο χρησιμοποιήσαμε και μια σταγόνα από PBS.



**Εικόνα :** Δείγμα PBS



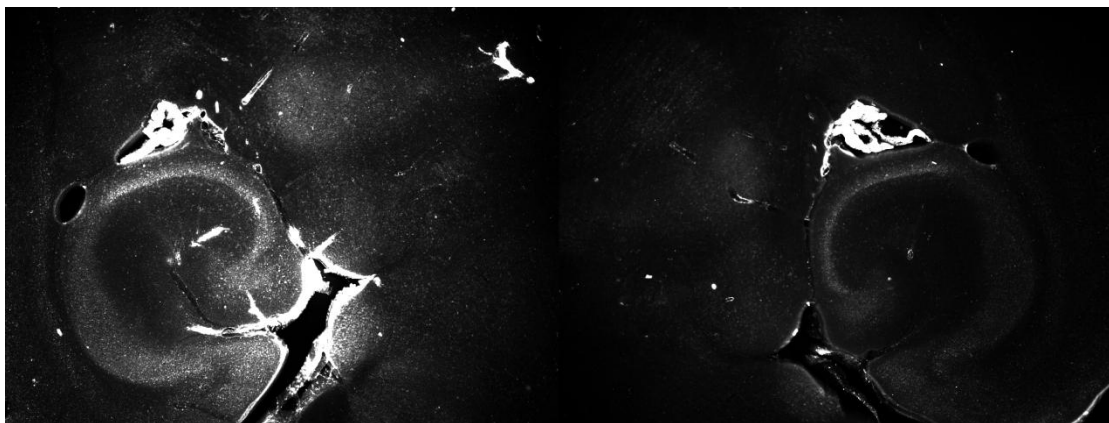
**Εικόνα :** Δείγμα από τον BDNF που χρησιμοποιήθηκε .

Παρατηρούμε ότι όντως ήταν φθορίζουσα η ουσία.

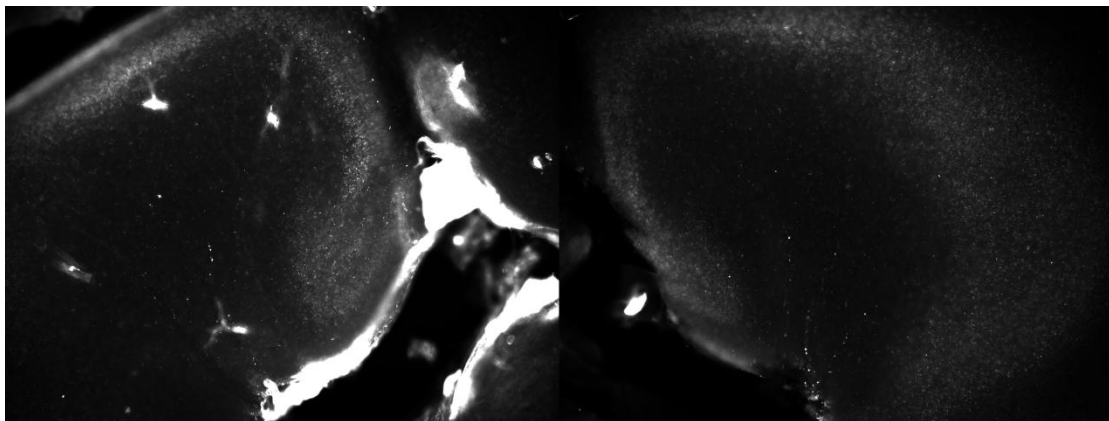
## 8. 2 Φθορισμός BDNF και μεταφορά στον εγκέφαλο του 1<sup>ου</sup> πειραματόζωου



Εικόνα : Ζουμ 1.25x, οριζόντια τομή του εγκεφάλου

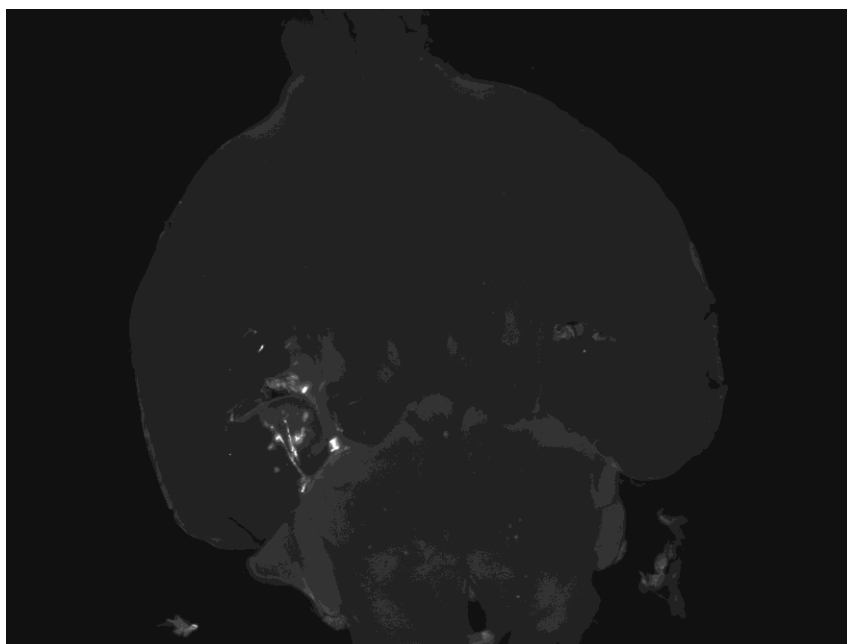


Εικόνα : Ζουμ 4x, οριζόντια τομή του εγκεφάλου

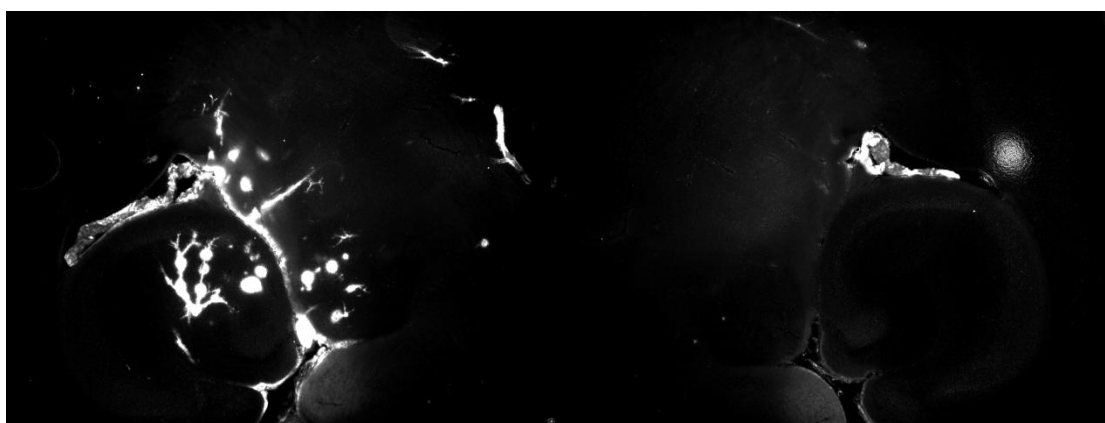


Εικόνα : Ζουμ 10x, οριζόντια τομή του εγκεφάλου

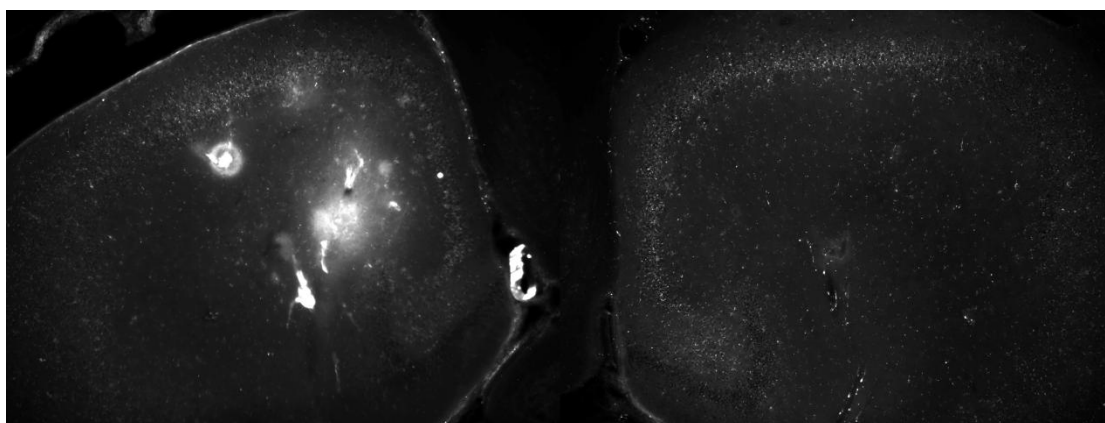
### 8. 3 Φθορισμός BDNF και μεταφορά στον εγκέφαλο του 2ου πειραματόζωου



Εικόνα : Ζουμ 1.25x, οριζόντια τομή του εγκεφάλου

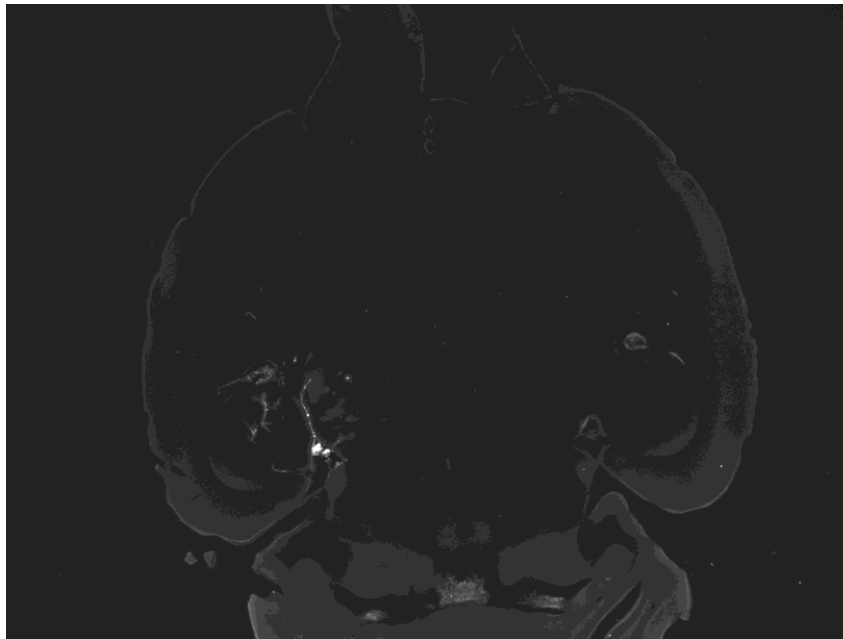


Εικόνα : Ζουμ 4x, οριζόντια τομή του εγκεφάλου

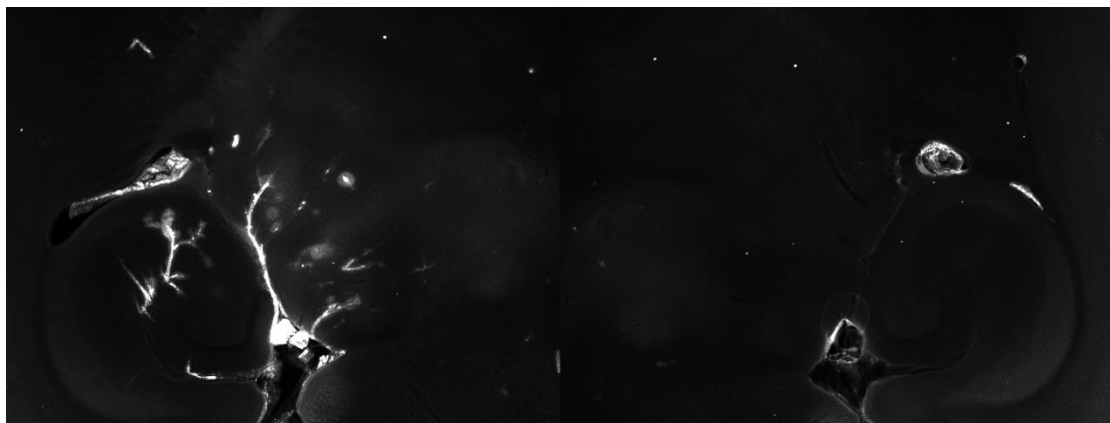


Εικόνα : Ζουμ 10x, οριζόντια τομή του εγκεφάλου

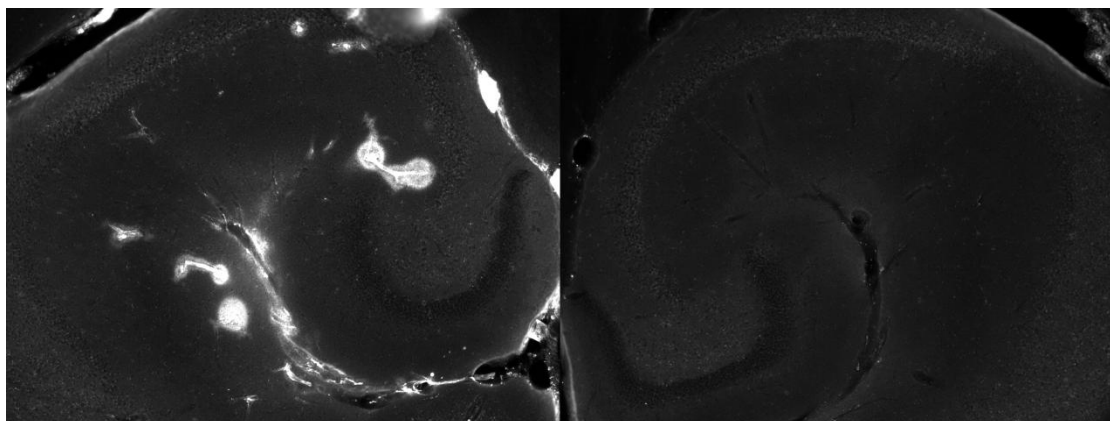
#### 8. 4 Φθορισμός BDNF και μεταφορά στον εγκέφαλο του 3ου πειραματόζωου



Εικόνα : Ζουμ 1.25x, οριζόντια τομή του εγκεφάλου



Εικόνα : Ζουμ 4x, οριζόντια τομή του εγκεφάλου



Εικόνα : Ζουμ 10x, οριζόντια τομή του εγκεφάλου

## **9. Συμπεράσματα**

Από την προσεκτική μελέτη των εικόνων της φθορίζουσας μικροσκοπίας διαπιστώνεται ο κατά πολύ υψηλότερος φθορισμός στον αριστερό ιππόκαμπο όπου εφαρμόστηκαν οι εστιασμένοι υπέρηχοι, σε σχέση με τον δεξί. Αυτό αποδεικνύει οί ο φθορίζοντας νευτροφικός παράγοντας BDNF, μοριακού βάρους 26.984 Da (>>400Da) ο οποίος φυσιολογικά δεν μπορεί να περάσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, μπόρεσε να τον διαπεράσει στην περιοχή που εφαρμόστηκαν οι υπέρηχοι, άρα η μη-επεμβατική διάνοιξη με χρήση εστιασμένων υπερήχων ήταν αποτελεσματική και εντοπισμένη.

Κοντά στα μεγαλύτερα αιμοφόρα αγγεία παρατηρείται υψηλότερη φωτεινότητα άρα και συγκέντρωση του BDNF, γεγονός που οφείλεται στο μέγεθός τους σε σχέση με τα τριχοειδή. Δηλαδή, λόγω του όγκου τους, στα μεγαλύτερα αιμοφόρα αγγεία υπάρχει περισσότερος BDNF άρα και το αποτέλεσμα δείχνει φωτεινότερο. Ωστόσο, διαπιστώνεται, σε μεγαλύτερο ζουμ, κοιτάζοντας προσεκτικά ότι υπάρχει μεταφορά του BDNF και στα τριχοειδή ανάμεσα στους νευρώνες. Υπάρχουν σημεία πολύ φωτεινά στον αριστερό ιππόκαμπο, ανάμεσα στους νευράξονες αλλά και στα σώματα των νευρώνων, γεγονός που αποδεικνύει την μεταφορά της ουσίας εκεί. Ενώ, αντίθετα στον δεξί ιππόκαμπο όχι.

Τελικά διαπιστώνεται η εντοπισμένη, μη-επεμβατική διάνοιξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού στην περιοχή του ιππόκαμπου και η αποτελεσματική μεταφορά της δυνητικά θεραπευτικής ουσίας

## 10. Βιβλιογραφία

### Δημοσιευμένες εργασίες:

Abott N. Joan, Lars Ronnback, Elisabeth Hansson Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience* 2006; 7:41-53. (2006)

Abbott, N. J. & Romero, I. A. Transporting therapeutics across the blood–brain barrier. *Mol. Med. Today* 2, 106–113 (1996).

Backay L, Hueter TF, Ballantine HT, Sosa D. Ultrasonically produced changes in the blood-brain barrier. *Arch Neurol* 1956;76:457– 467.

Ballantine HT, Bell E, Manlapaz J. Progress and problems in the neurological applications of focused ultrasound. *J Neurosurg* 1960; 17:858–876.

Blasberg RG, Patlak C, Fenstermacher JD. Intrathecal chemotherapy brain tissue profiles after entriculocisternal perfusion. *J Pharmacol Exp Ther* 1975;195:73– 83.

Bloch S H, Wan M, Dayton P A and Ferrara K W 2004 Optical observation of lipid- and polymer-shelled ultrasound microbubble contrast agents *Appl. Phys. Lett.* 84 631–3

Boado, R. J. & Pardridge, W. M. Glucose deprivation and hypoxia increase the expression of the GLUT-1 glucose transporter via a specific mRNA *cis*-acting regulatory element. *J. Neurochem.* 80, 552–554 (2002).

Butt, A. M., Jones, H. C. & Abbott, N. J. Electrical resistance across the blood–brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J. Physiol. (Lond.)* 429, 47–62 (1990).

Choi JJ, Pernot M, Small SA, Konofagou EE. Feasibility of transcranial, localized drug-delivery in the brain of Alzheimer’s-model mice using focused ultrasound. *IEEE Proc Symp Ultras Ferroelectr Freq Quality Control* 2005;2(18-21):988 –999.

Choi JJ, Pernot M, Small SA, Konofagou EE, Noninvasive, transcranial and localized opening of the blood-brain barrier using focused ultrasound in mice. *Ultrasound Med Biol* 2007b;33:95-104.



Choi JJ, Wang S, Tung Y-S, Morrison B III, Konofagou EE. Molecules of various pharmacologically-relevant sizes can cross the ultrasound-induced blood-brain barrier opening in vivo. Submitted in *Ultrasound in Medicine and Biology* 2009.

Chomas J E, Dayton P, Allen J, Morgan K and Ferrara K W 2001a Mechanisms of contrast agent destruction *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 48 232–48

Csser, H. F. & Bundgaard, M. Blood-brain interfaces in vertebrates: a comparative approach. *Am. J. Physiol.* 246, R277-2888 (1984)

Clarke P R and Hill C R 1970 Physical and chemical aspects of ultrasonic disruption of cells *J. Acoust. Soc. Am.* 47 649–53

Davson, H. & Oldendorf, W. H. Transport in the central nervous system. *Proc. R. Soc. Med.* 60, 326–328 (1967).

Dehouck, M.-P., Meresse, S., Delorme, P., Fruchart, J. C. & Cecchelli, R. An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood–brain barrier *in vitro*. *J. Neurochem.* 54, 1798–1801 (1990).

Fung LK, Shin M, Tyler B, Brem H, Saltzman WM. Chemotherapeutic drugs released from polymers distribution of 1,3-bis(2-chloroethyl)- 1-nitrosourea in the rat brain. *Pharm Res* 1996;13:671– 682.

Fischer H, Gottschlich R, Seelig A. Blood-brain barrier permeation molecular parameters governing assive diffusion. *J Membr Biol* 1998;165:201–211.

Haseloff, R. F., Blasig, I. E., Bauer, H.-C. & Bauer, H. In search of the astrocytic factor(s) modulating lood–brain barrier functions in brain capillary endothelial cells *in vitro*. *Cell. Mol. Neurobiol.* 25, 25–39 (2005).

Huber, J. D., Egleton, R. D. & Davis, T. P. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood–brain barrier. *Trends Neurosci.* 24, 719–725 (2001).

Hynynen K, Clement GT, McDannold N, et al. 500-element ultrasound phased array system for noninvasive focal surgery of the brain: A preliminary rabbit study with ex vivo human skulls. *Magn Reson Med* 2004;52:100 –107.

Hynynen K, Jolesz F. Demonstration of potential noninvasive ultrasound brain therapy through an intact skull. *Ultrasound Med Biol* 1998;24:275–283.

Hynynen K, McDannold N, Martin H, Jolesz F, Vykhodtseva N. The threshold for brain damage in rabbits induced by bursts of ultrasound in the presence of an ultrasound contrast agent (Optison). *Ultrasound Med Biol* 2003;29:473–481.

Hynynen K, McDannold N, Sheikov NA, Jolesz FA, Vykhodtseva N. Local and reversible blood-brain barrier disruption by noninvasive focused ultrasound at frequencies suitable for trans-skull sonications. *Neuroimage* 2005;24(1):12–20.

Hynynen K, McDannold N, Vykhodtseva N, Jolesz FA. Noninvasive MR imaging-guided focal opening of the blood-brain barrier in rabbits. *Radiology* 2001;220:640–646.

Kinoshita M, McDannold N, Jolesz FA, Hynynen K. Targeted delivery of antibodies through the blood-brain barrier by MRI-guided focused ultrasound. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340(4):1085–1090.

Lieb WR, Stein WD. Non-Stokesian nature of transverse diffusion within human red cell membranes. *J Membr Biol* 1986;92:111–119.

Luo H, Birnbaum Y, Fishbein M C, Peterson T M, Nagai T, Nishioka T and Siegel R J 1998 Enhancement of thrombolysis in vivo without skin and soft tissue damage by transcutaneous ultrasound *Thromb. Res.* 89 171–7

McDannold N, Vykhodtseva N, Jolesz FA, Hynynen K. MRI investigation of the threshold for thermally induced blood-brain barrier disruption and brain tissue damage in the rabbit brain. *Magn Reson Med* 2004;51(5):913–923.

McDannold N, Vykhodtseva N, Raymond S, Jolesz FA, Hynynen K. MRI-guided targeted blood-brain barrier disruption with focused ultrasound: Histological findings in rabbits. *Ultrasound Med Biol* 2005;30:1527–1537.

McDannold N, Vykhodtseva N and Hynynen K 2008 Effects of acoustic parameters and ultrasound contrast agent dose on focused-ultrasound induced blood–brain barrier disruption *Ultrasound Med. Biol.* 34 930–7

Pardridge WM., The blood-brain barrier: Bottleneck in brain drug development. *NeuroRx* 2005;2(1):3–14.

Pardridge, W.M. Blood–brain barrier drug targeting: the future of brain drug development, *Mol. Interv.* 3 (2) (2003) 90–105, 51.

Pardridge, W.M. Drug and gene delivery to the brain: the vascular route, *Neuron* 36 (4) (2002) 555–558.

Pardridge, W.M. (2007). Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov. Today* 12,54–61.

Patrick JT, Nolting MN, Goss SA, et al. Ultrasound and the blood-brain barrier. *Adv Exp Med Biol* 1990;267:369 –381.

Pernot M, Aubry JF, Tanter M, Thomas JL, Fink M. High power transcranial beam steering for ultrasonic brain therapy. *Physics Med Biol* 2003;48:2577–2589.

Qin Shengping, Caskey F Charles, Ferrara W Katherine. Ultrasound contrast microbubbles in imaging and therapy: physical principles and engineering. *Phys. Med. Biol.* 54 (2009) R27-R57

Ramsauer, M., Krause, D. & Dermietzel, R. Angiogenesis of the blood–brain barrier *in vitro* and the uncton of cerebral pericytes. *FASEB J.* 16, 1274–1276 (2002).

Rubin LL, Staddon JM. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci* 1999;22:11–28.

Schiera, G. *et al.* Synergistic effects of neurons and astrocytes on the differentiation of brain capillary endothelial cells in culture. *J. Cell. Mol. Med.* 7, 165–170 (2003).

Sheikov N, McDannold N, Vykhodtseva N, Jolesz F, Hynynen K. Cellular mechanisms of the blood-brain barrier opening induced by ultrasound in presence of microbubbles. *Ultrasound Med Biol* 2004;30(7):979 –989.

Thomas JL, Fink M. Ultrasonic beam focusing through tissue inhomogeneities with a time reversal mirror: Application to transskull therapy. *IEEE Trans on Ultras Ferroelectr Freq Quality Control* 1996;43(6):1122–1129.

Zenker, D., Begley, D. J., Bratzke, H., Rübsamen-Waigmann, H. & von Briesen, H. Human blood-derived macrophages enhance barrier function of cultured primary bovine and human brain capillary endothelial cells. *J. Physiol. (Lond.)* 551, 1023–1032 (2003).

**Βιβλία:**

*Neuroscience - Science of the Brain: An Introduction for Young Students* Published by The British Neuroscience Association ISBN 0-9545204-0-8 56pp, Publication date: August 2003

*Προσομοίωση Φυσιολογικών Συστημάτων* , Κωνσταντίνα Σπ. Νικήτα, Καθηγήτρια Ε.Μ.Π., Αθήνα, Ιούλιος 2008

*Μετρήσεις και έλεγχοι στη Βιοϊατρική Τεχνολογία*, Δημήτρης Κουτσούρης, Καθηγητής Ε.Μ.Π., Αθήνα 2004