

NO: 24180.
KEF: 24049.

5124

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ



«ΜΕΛΕΤΗ ΙΣΤΙΚΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ ΣΕ ΠΕΡΙΟΧΕΣ
ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ
ΕΠΙΜΥΩΝ»

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΚΑΖΑΝΗΣ ΗΛΙΑΣ

ΑΘΗΝΑ 2003

498

- Αρχιμανδρίτης Αθ. :Καθηγητής
- Βασιλόπουλος Δημ. :Καθηγητής
- Στυλιανοπούλου Φωτ. :Καθηγήτρια
- Κανέλλη-Κουτσελίνη Ελ. :Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
- Πατσούρης Ευστρ. :Αναπληρωτής Καθηγητής (Επιβλέπων)
- Φιλιππίδου Ελ. : Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
- Τσελένη-Μπαλαφούτα Σ. :Επίκουρος Καθηγήτρια

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή δεν υποδηλώνει ότι αποδέχεται τις γνώμες του συγγραφέα» (Οργανισμός Πανεπιστημίου Αθηνών, άρθρο 202, παρ. 2 του Νόμου 5343/1932)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Α. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.

1 ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΟΙ ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟΙ: «Η ΑΦΑΝΗΣ ΕΠΙΔΗΜΙΑ»σελ. 1	
1.1 Επιδημιολογία Κρονιοεγκεφαλικών Κακώσεων (ΚΕΚ).....σελ. 2	
1.2 Κοινωνικές και Οικονομικές Συνέπειες.....σελ.5	
1.3 Κατευθύνσεις Αντιμετώπισης ΚΕΚ.....σελ.6	
2 ΜΟΝΤΕΛΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΚΕΚσελ. 9	
3 ΝΕΥΡΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΚΕΚσελ. 11	
4 Η ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΙΣΤΟΥ ΣΤΟ ΕΠΙΠΕΔΟ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝσελ. 15	
5 Η ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΙΣΤΟΥ ΣΤΟ ΜΟΡΙΑΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟσελ. 17	
5.1 Γενικά.....σελ. 17	
5.2 Κυτταρικός Θάνατος.....σελ. 19	
5.3 Το σύστημα των IGFs, IGFbPs, IGF-IR.....σελ. 24	
5.3.1 IGF-I.....σελ. 25	
5.3.2 Υποδοχείς των IGFs τύπου I (IGF-IR) και τύπου II (IGF-IIR).....σελ. 29	
5.3.3 IGFbPs.....σελ. 30	
5.3.4 Το σύστημα του IGF-I και ο τραυματισμός του ΚΝΣ.....σελ. 37	
5.4 Οι νευροτροφίνες BDNF, NT-3 και οι υποδοχείς τους.....σελ. 40	
5.4.1 Γενικά.....σελ. 40	
5.4.2 BDNF.....σελ. 42	
5.4.3 Το σύστημα των BDNF/TrkB σε παθολογικές καταστάσεις του ΚΝΣ.....σελ. 44	
5.4.4 NT-3.....σελ. 46	
5.4.5 Το σύστημα NT-3/TrkC σε παθολογικές καταστάσεις του ΚΝΣ.....σελ. 46	
5.5 Το μονοξείδιο του Αζώτου (NO) και η νευρωνική συνθετάση του NO.....σελ. 47	
5.5.1 Μονοξείδιο του Αζώτου (NO).....σελ. 47	
5.5.2 Συνθετάση του NO (NOS).....σελ. 49	
5.5.3 nNOS και NO μετά από τραυματισμούς του εγκεφάλου.....σελ. 51	
5.4 Θερμοεπαγόμενη πρωτεΐνη 70 (Heat shock protein 70/Hsp70).....σελ. 52	

Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.	
ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣσελ.61	σελ.61
ΥΔΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΣσελ.64	σελ.64
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑσελ.70	σελ.70
ΠΙΝΑΚΕΣ-ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ-ΕΙΚΟΝΕΣσελ.85	σελ.85
ΣΥΖΗΤΗΣΗσελ.107	σελ.107
ΠΕΡΙΛΗΨΗσελ.122	σελ.122
SUMMARYσελ.124	σελ.124
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑσελ.125	σελ.125
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑσελ.158	σελ.158

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.

Οι κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις (ΚΕΚ) αποτελούν, σε παγκόσμια κλίμακα, την κυριότερη αιτία θανάτου νέων ανθρώπων (ηλικίες 15 έως 40 ετών). Ο αριθμός των θανάτων εξαιτίας ΚΕΚ αυξάνεται σταθερά στις αναπτυσσόμενες χώρες. Από την άλλη μεριά στα αναπτυγμένα κράτη, στα οποία τα τελευταία χρόνια καταγράφεται μείωση των θανάτων από ΚΕΚ, παρατηρείται δραματική αύξηση του αριθμού των ατόμων με σοβαρά και μακροχρόνια ιατρικά προβλήματα εξαιτίας ΚΕΚ. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων αποκαλύπτει πως το πρόβλημα των ΚΕΚ έχει τα χαρακτηριστικά επιδημίας, με σημαντικές οικονομικές και κοινωνικές προεκτάσεις.

Παρά το γεγονός πως η πρόληψη και αντιμετώπιση του προβλήματος των ΚΕΚ απαιτεί σφαιρική και πολυπαραγοντική προσέγγιση, η κυριότερη συνιστώσα παραμένει η δυνατότητα επιτυχούς ιατρικής παρέμβασης τόσο για την άμεση αντιμετώπιση του τραυματία, όσο και για τη σταδιακή αποκατάστασή του. Για να επιτευχθεί αυτό είναι απαραίτητο να μελετηθούν σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο οι επιπτώσεις του τραυματισμού του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ), να περιγραφούν οι μηχανισμοί που ευθύνονται για τις βλάβες που προκύπτουν από τον τραυματισμό και τελικά να διερευνηθούν οι δυνατότητες εξωγενούς παρέμβασης. Το συγκεκριμένο ερευνητικό πεδίο μάλιστα ίσως αποτελεί χαρακτηριστική περίπτωση στην οποία τα συμπεράσματα της βασικής έρευνας μπορούν να τύχουν άμεσης χρήσης από την εφαρμοσμένη έρευνα με πιθανότητες σύντομης πρακτικής εφαρμογής.

Η παραπάνω διαπίστωση καθώς και το γεγονός πως στη χώρα μας οι θάνατοι από ΚΕΚ, κυρίως ως αποτέλεσμα τροχαίων ατυχημάτων, είναι αυξημένοι σε σχέση με άλλα κράτη, αποτέλεσαν κίνητρα για την παρούσα ερευνητική δουλειά. Η μελέτη συγκεκριμένων πτυχών της απόκρισης του εγκεφαλικού τραυματισμού των επίμων αποκάλυψε ορισμένα ενδιαφέροντα ευρήματα, μερικά από τα οποία ίσως να περιγράφονται και για πρώτη φορά. Επίσης, μας οδήγησε στην δοκιμή των νευροπροστατευτικών/ νευροαναγεννητικών ιδιοτήτων της χορήγησης του αυξητικού παράγοντα IGF-I με αποτελέσματα πολύ θετικά και ενθαρρυντικά όσον αφορά την πιθανή θεραπευτική χρήση του.

Η ιδέα για τη συγκεκριμένη εργασία ανήκει στην Καθηγήτρια του τμήματος Νοσηλευτικής Κα Φωτεινή Στυλιανοπούλου, στο εργαστήριο της οποίας πραγματοποιήθηκε ο κύριος όγκος της πειραματικής δουλειάς. Την ευχαριστώ θερμά, όπως και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του τμήματος Νοσηλευτικής Κα Ελένη Φιλιππίδου, για τη συνεχή παρουσία τους, τη στήριξή τους (εκπαιδευτική, συμβουλευτική και κριτική) σε όλα τα πρακτικά ζητήματα «πάγκου» αλλά κυρίως για όλα τα υπόλοιπα: το διάλογο, την κατανόηση, τις ευκαιρίες...

Θερμά θέλω επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής Κο Παναγιώτη Δάβαρη, διευθυντή του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής καθώς και τον Αναπληρωτή Καθηγητή της Ιατρικής σχολής Κο Ευστράτιο Πατσούρη, γιατί αγκάλιασαν την παρούσα εργασία και ουσιαστικά μου έδωσαν τη δυνατότητα να την πραγματοποιήσω. Τους ευχαριστώ για τις υποδείξεις τους κυρίως σε θέματα που

άπτονται της παθολογοανατομικής αξιολόγησης των ευρημάτων, αλλά και τις γενικότερες συμβουλές τους και την κριτική τους.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια της Ιατρικής σχολής Κα Ελένη Κανέλλη για τη στήριξή της στην πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας. Ευχαριστώ ακόμη την Επίκουρο Καθηγήτρια της Ιατρικής σχολής Κα Ευθυμία Κιτράκη γιατί έβρισκα την πόρτα της πάντα ανοιχτή και στις μικρές και στις μεγάλες ανάγκες.

Τα τέσσερα και πλέον χρόνια που δούλεψα στον πάγκο του εργαστηρίου εκτός από τις γνώσεις που πήρα σε θέματα «επιστήμης» είχα την ευκαιρία να γνωρίσω έναν ολόκληρο κόσμο τον οποίο δεν είχα φανταστεί. Γνώρισα πολλούς νέους συναδέλφους, από όλους τους κλάδους, οι οποίοι ζουν και κινούνται στους «ρυθμούς» της έρευνας, όπως αυτοί ορίζονται μέσα στην περιέργη και δύσκολη ελληνική πραγματικότητα, αφιερώνοντας χρόνο, όρεξη και φαντασία. Δεν μπορώ να μην ευχαριστήσω την Αθανασία, το Βαγγέλη, την Αγάπη, το Σταμάτη και τη Δέσποινα στους οποίους φόρτωσα τις πρώτες προσπάθειές μου και μαζί βέβαια και τις ανασφάλειές μου. Ούτε μπορώ να μην αναφερθώ στο Θανάση, την Αποστολία, το Φάνη, τη Λίνα και το Στάθη χωρίς τους οποίους η δουλειά θα ήταν περισσότερη, δυσκολότερη και οπωσδήποτε πιο... άνοστη. Χάρη σε όλον αυτόν τον «κόσμο του εργαστηρίου» οι ώρες περνούσαν ανθρώπινα, με ζεστασιά και συντροφικότητα. Ένας κόσμος που έμεινε όμως ο μισός –για μένα- με το θάνατο της αγαπημένης Αγγέλας, της Αγγέλας των γλυκών αναμνησεων μα της πικρής γεύσης του κενού...

Την αγάπη μου και τις ευχαριστίες μου για τους εκτός των εργαστηρίων ούτως ή άλλως την κρατώ για τα εκτός των εργαστηρίων «κείμενα».

Σημείωση:

Το μεγαλύτερο μέρος της παρούσας εργασίας περιλαμβάνεται στη δημοσίευση:

- ✓ Η. Καζάνης, Ε. Φιλιππίδου, Φ. Στυλιανοπούλου (2001) Μοριακοί μηχανισμοί που ενέχονται στην απάντηση του εγκεφαλικού ιστού στο τραύμα. Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής 18: 363- 374. (**Β΄ Βραβείο Έπαθλο «Σωτήρης Παπασταμάτης» 2001**)

Επίσης, ένα τμήμα των αποτελεσμάτων (αυτών που αφορούν στην έκφραση της πρωτεΐνης nNOS) περιλαμβάνονται στη δημοσίευση:

- ✓ M. Giannacopoulou, M. Mansour, E. Kazanis, E. Bozas, H. Philippidis, F. Stylianopoulou (2000) NMDA receptor mediated changes in IGF-II gene expression in the rat brain after injury and the possible role of nitric oxide. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 26: 513-521.

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΟΙ ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟΙ: «Η ΑΦΑΝΗΣ ΕΠΙΔΗΜΙΑ».

Σύμφωνα με τα στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) (World Health Organization/ WHO), το 1998 περίπου 5,8 εκατομμύρια άνθρωποι σε όλον τον κόσμο έχασαν τη ζωή τους από τραυματισμό. Παρόλο που τα δύο τρίτα αυτών των θανάτων αφορούσαν άνδρες, οι τραυματισμοί είναι η κύρια αιτία θανάτου και για τα δύο φύλα, σε όλες τις ηλικίες. Δεδομένα από διαφορετικές περιοχές του πλανήτη αποκαλύπτουν πως σε κάθε θάνατο από τραυματισμό αντιστοιχούν 30 άνθρωποι που απαιτούν παρατεταμένη νοσοκομειακή περίθαλψη και 300 οι οποίοι χρειάζονται φροντίδα σε μονάδες επείγουσας αντιμετώπισης. Ακόμη, πολλοί περισσότεροι απαιτούν φροντίδα σε άλλες μονάδες παροχής υπηρεσιών υγείας ή στο σπίτι. Επίσης, τονίζεται πως το πρόβλημα των τραυματισμών εντοπίζεται με μεγαλύτερη ένταση στις αναπτυσσόμενες χώρες, καθώς σε αυτές αφενός υφίστανται περισσότεροι κίνδυνοι πρόκλησης τραυματισμών και αφετέρου δεν υπάρχουν τα απαραίτητα μέσα για την αντιμετώπισή τους. Το οικονομικό κόστος από τους τραυματισμούς συνίσταται τόσο στα έξοδα βραχυχρόνιας και μακρόχρονης περίθαλψης των ασθενών, όσο και στη μείωση του ανθρώπινου, παραγωγικού δυναμικού. Φυσικά δεν είναι αμελητέες οι ψυχολογικές και συναισθηματικές επιπτώσεις στους ίδιους τους ασθενείς αλλά και το περιβάλλον τους.

Τα παραπάνω στοιχεία προέρχονται από τις οδηγίες του ΠΟΥ για την ανάπτυξη ενός παγκόσμιου συστήματος παρακολούθησης των τραυματισμών (Injury Surveillance Guidelines, Holder et al. 2001). Στην εισαγωγή αυτού του εγχειριδίου γίνεται μία επιγραμματική περιγραφή του προβλήματος, όχι μόνο με ιατρικούς επιδημιολογικούς όρους, αλλά τονίζοντας και τις οικονομικές και κοινωνικές παραμέτρους. Δεν πρέπει να αποκρύπτεται άλλωστε πως οι οικονομικές συνέπειες είναι αυτές που αποτελούν τον πιο ισχυρό παράγοντα που εξαναγκάζει τις κοινωνίες αλλά και τους διεθνείς οργανισμούς να εστιάζονται σε συγκεκριμένα προβλήματα και να επιδιώκουν την αντιμετώπισή τους. Από την παρακολούθηση της διεθνούς βιβλιογραφίας γίνεται αντιληπτό πως ενώ οι γενικές επιδημιολογικές παράμετροι του φαινομένου των τραυματισμών δεν έχουν μεταβληθεί ιδιαίτερα τις τελευταίες δεκαετίες, από το 1980 και μετά το ενδιαφέρον των υπηρεσιών υγείας (με πρωτεργάτες τις ΗΠΑ) έχει αυξηθεί σημαντικά, τόσο στον τομέα της ιατρικής αντιμετώπισης των τραυματισμών, όσο και στον τομέα της πρόληψής τους. Στη συζήτηση αυτή έχει εισέλθει με τους δικούς της ρυθμούς και η Ευρώπη, καθώς έχει πλέον γίνει συνείδηση πως οι τραυματισμοί και ιδιαίτερα αυτοί του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) δεν αποτελούν σποραδικά περιστατικά, αλλά χαρακτηρίζονται από σταθερές επιδημιολογικές παραμέτρους και συνεπώς μπορούν σε μεγάλο βαθμό να προβλεφθούν και να αντιμετωπισθούν.

Οι τραυματισμοί του ΚΝΣ αποκαλούνται από ορισμένους επιστήμονες ως η «σιωπηλή» ή «αφανής» επιδημία (silent epidemic: Coburn 1992). Τα στατιστικά στοιχεία αποκαλύπτουν πως αυτού του τύπου οι τραυματισμοί αποτελούν την κύρια αιτία θανάτου και πρόκλησης μόνιμων αναπηριών στον πληθυσμό κάτω των σαράντα ετών, σε παγκόσμια κλίμακα. Πρόκειται για ιατρικό και επιδημιολογικό πρόβλημα το οποίο επεκτείνεται σε όλη την υδρόγειο, με διαφορετικά βέβαια

χαρακτηριστικά σε κάθε κράτος, ανάλογα με το επίπεδο τεχνολογικής ανάπτυξης, το επίπεδο βίας που επικρατεί και το επίπεδο των παρεχόμενων υπηρεσιών υγείας. Φαίνεται πως οι τραυματισμοί του ΚΝΣ αφορούν περισσότερο τους εργαζόμενους άνδρες ηλικίας 15-30 χρόνων με χαμηλά εισοδήματα. Οι κύριες αιτίες τους είναι τα τροχαία ατυχήματα και οι επιθέσεις. Υπολογίζεται πως το συνολικό κόστος, άμεσο και έμμεσο, από τους τραυματισμούς του ΚΝΣ άγγιξε, ενδεικτικά το 1990, τα 50 δισεκατομμύρια δολάρια (Basso et al 2001).

1.1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΡΑΝΙΟΕΓΚΕΦΑΛΙΚΩΝ ΚΑΚΩΣΕΩΝ (ΚΕΚ).

Συστηματική συλλογή δεδομένων όσον αφορά στις ΚΕΚ άρχισε να γίνεται τα τελευταία χρόνια χάρη στις δυνατότητες μηχανοργάνωσης των υπηρεσιών υγείας, αφού βέβαια είχε γίνει αντιληπτή η ανάγκη καταγραφής και αντιμετώπισης του φαινομένου. Η επεξεργασία των διαφόρων μελετών που υπάρχουν διαθέσιμες, κυρίως στο διαδίκτυο, στο επίπεδο της ανάγνωσης και όχι της επισταμένης ανάλυσης, αξιολόγησης και ομογενοποίησης των αποτελεσμάτων αποκαλύπτει πως υπάρχουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που περιγράφουν το φαινόμενο των ΚΕΚ κοινά σε όλα τα μήκη και πλάτη του κόσμου και άλλα τα οποία διαφέρουν σημαντικά. Για παράδειγμα η υπεροχή των ανδρών στους πάσχοντες από ΚΕΚ είναι σταθερή, ακόμη και ως ποσοστό (περίπου το 70%), σε πολλές, διαφορετικές χώρες. Από την άλλη μεριά, τα αίτια των ΚΕΚ, ενώ παραμένουν ίδια, διαφοροποιούνται σημαντικά ως προς την ιεράρχησή τους σε σχέση με τη συχνότητα εμφάνισής τους. Χαρακτηριστική είναι η διαφορά μεταξύ ΗΠΑ και Ευρώπης στην πρόκληση ΚΕΚ από τη χρήση όπλων. Στις ΗΠΑ η συγκεκριμένη αιτία ΚΕΚ είναι πρώτη σε συχνότητα πρόκλησης θανάτου με ΚΕΚ, ενώ στη Ευρώπη κατατάσσεται στις τελευταίες θέσεις. Μία γενική παρατήρηση η οποία εκφράζεται σχεδόν σε όλα τα κείμενα του ΠΟΥ είναι η σταδιακή μείωση της συχνότητας εμφάνισης ΚΕΚ στις αναπτυγμένες χώρες, με ταυτόχρονη σημαντική μείωση της θνησιμότητας κυρίως στις περιπτώσεις σοβαρών ΚΕΚ, σε αντίθεση με τη συνεχή ένταση του φαινομένου στις αναπτυσσόμενες χώρες, στις οποίες ταυτόχρονα η θνησιμότητα παραμένει μεγάλη.

Η σύντομη ανασκόπηση που ακολουθεί αποσκοπεί στην ενδεικτική περιγραφή των διαστάσεων του προβλήματος και στην ανάδειξη των παραμέτρων που το περιγράφουν.

❖ ΗΠΑ και ΚΑΝΑΔΑΣ.

Στις ΗΠΑ το σύστημα περίθαλψης και το ασφαλιστικό σύστημα διαφέρουν σημαντικά σε φιλοσοφία και οργάνωση από τα αντίστοιχα των Ευρωπαϊκών χωρών. Η έντονη ανάμειξη ιδιωτικών επιχειρήσεων, στο χώρο κυρίως της ασφάλισης, επιβάλλει την ανάλυση των μακροχρόνιων επιπτώσεων όλων των προβλημάτων υγείας με όρους κόστους-απόδοσης. Τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρήθηκε μικρή αύξηση των περιστατικών ΚΕΚ πιθανώς λόγω της αύξησης του πληθυσμού, της τεχνολογικής ανάπτυξης (επέδρασε κυρίως στην κατηγορία των τροχαίων ατυχημάτων) και της αύξησης του μέσου όρου ζωής. Παράλληλα η εξέλιξη των ιατρικών δυνατοτήτων άμεσης και επιτυχημένης αντιμετώπισης των τραυματισμών οδήγησε σε δραματική αύξηση του αριθμού των ατόμων με σημαντικές αναπηρίες λόγω ΚΕΚ. Οι ιδιωτικοί φορείς κλήθηκαν να καλύψουν το κόστος περίθαλψης

(άμεσης και μακροχρόνιας) και συνεπώς οδηγήθηκαν στην ανάγκη να περιγράψουν το φαινόμενο των ΚΕΚ και να προσδιορίσουν στρατηγικές αντιμετώπισής του.

Στις ΗΠΑ και τον Καναδά κάθε χρόνο υπολογίζεται πως 1,5 με 2 εκατομμύρια άνθρωποι υφίστανται ΚΕΚ. Η συχνότητα εμφάνισης του φαινομένου είναι περίπου 200 άτομα ανά 100000 κατοίκους. Οι θάνατοι από ΚΕΚ υπολογίζονται στους 75000 κάθε χρόνο, ενώ 70000-90000 άτομα επιβιώνουν με σημαντικές μακροχρόνιες δυσλειτουργίες. Αυτή τη στιγμή ζουν στις ΗΠΑ περίπου 2,5 έως 6 εκατομμύρια άτομα που πάσχουν από ΚΕΚ.

Οι κυριότερες αιτίες πρόκλησης ΚΕΚ είναι τα τροχαία ατυχήματα (50% των περιπτώσεων), οι πτώσεις από ύψη (κυρίως μετά από χρήση αλκοόλ), οι επιθέσεις (20-30%) και τα αθλητικά ατυχήματα (3%). Όσον αφορά όμως τις θανατηφόρες περιπτώσεις ΚΕΚ, η χρήση όπλων είναι υπεύθυνη για το θάνατο 34000 ατόμων κάθε χρόνο και αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου σε πολλές πολιτείες. Το ετήσιο κόστος αντιμετώπισης, περίθαλψης και αποκατάστασης των ΚΕΚ ανέρχεται ετησίως στα 9-10 δισεκατομμύρια δολάρια. (Kelly and Becker 2001 και στην ιστοσελίδα της οργάνωσης RehabTeam <http://calder.med.miami.edu/pointis/tbifam/cause2.html>).

❖ ΜΕΓΑΛΗ ΒΡΕΤΑΝΙΑ

Στη Μ. Βρετανία, περίπου 1 εκατομμύριο ασθενείς με ΚΕΚ προσέρχονται στις μονάδες εντατικής θεραπείας ετησίως (10% των επειγόντων περιστατικών). Η συχνότητα διαμορφώνεται σε 200-300 άτομα ανά 100000. Από αυτούς, το 90% (250/100000) αφορά ελαφριές (mild) ΚΕΚ, το 5% (18/100000) μέτριες (moderate) και το 5% (περίπου 8/100000) σοβαρές (severe). Οι θάνατοι από ΚΕΚ ανέρχονται σε 10/100000 (το 1% των θανάτων), με το ποσοστό όμως να είναι ιδιαίτερα υψηλό στις ηλικίες 5- 45 ετών (αποτελούν την κύρια αιτία θανάτου, με ποσοστό 20%). Σημαντικό είναι επίσης το εύρημα πως η τελική συχνότητα εμφάνισης χρόνιων δυσλειτουργιών είναι πολύ υψηλή και στις τρεις κατηγορίες σοβαρότητας των ΕΤ: 78% μετά από σοβαρό ΚΕΚ, 54% μετά από μέτριο και 51% μετά από ελαφρύ. Ενδεικτικά αναφέρεται πως οι επιπλοκές των ελαφριών τραυματισμών κατατάσσονται σε αμιγώς ιατρικές (συνεχείς και έντονες κεφαλαλγίες στο 79% των περιπτώσεων), μεικτές ψυχο-σωματικές (προβλήματα στη λειτουργία της μνήμης σε ποσοστό 59%), μέχρι και αμιγώς κοινωνικές (το 34% των ατόμων παραμένουν μακροχρόνια άνεργοι). (McGregor and Pentland 1997, Kay and Teasdale 2001).

❖ ΓΕΡΜΑΝΙΑ

Στη Γερμανία η συχνότητα των εγκεφαλικών τραυματισμών υπολογίζεται σε 200-300 άτομα στα 100000 ανά έτος. Το 73% των περιπτώσεων αφορά ελαφριούς τραυματισμούς, ενώ 10/100000 πέφτουν σε κωματώδη κατάσταση. Οι θάνατοι από ΚΕΚ ανέρχονται σε 11,5 άτομα στα 100000 και αποτελούν το 25% των θανάτων από τραυματισμούς και δηλητηριάσεις. Ενώ ο αριθμός των ελαφρών τραυματισμών είναι αυξημένος, η δυσμενής εξέλιξη των ασθενών (θάνατος ή χρόνια παραμονή σε φυτική κατάσταση) αγγίζει το 34,5%-46%. Η μέση ηλικία των ασθενών με ΚΕΚ είναι τα 39 έτη και αφορούν το ανδρικό φύλο σε ποσοστό 70%. Οι κυριότερες αιτίες είναι τα τροχαία ατυχήματα (56%), οι πτώσεις από ύψος (31%) και οι αυτοκτονίες (12%). Μόνο το 1996 νοσηλεύθηκαν 279029 άτομα με ΚΕΚ και ο μέσος χρόνος νοσηλείας τους ήταν 5,75 ημέρες. Εκτιμάται πως στη Γερμανία χρειάζονται τουλάχιστον 2300 κλίνες για ασθενείς με ΚΕΚ και πως η ετήσια δαπάνη για

ενδονοσοκομειακή περίθαλψη των ατόμων με ΚΕΚ ανήλθε το 1996 στα 912 εκατομμύρια DM, χωρίς να υπολογίζεται το κόστος εξωνοσοκομειακής περίθαλψης και αποκατάστασης (Firsching and Woischneck 2001).

❖ *ΕΥΡΩΠΗ ΓΕΝΙΚΑ*

Στα πλαίσια μιας πανευρωπαϊκής προσπάθειας καταγραφής και ελέγχου του προβλήματος των ΚΕΚ, στοιχεία από 12 ευρωπαϊκές χώρες συγκεντρώθηκαν και ομαδοποιήθηκαν ή αναλύθηκαν συγκριτικά (The European Brain Injury Consortium Survey of Head Injuries, Murray et al. 1999). Υπολογίστηκε πως η μέση ηλικία ατόμων με ΚΕΚ είναι τα 42 έτη. Η συντριπτική πλειοψηφία αφορά άνδρες (74%), ενώ τα τροχαία ατυχήματα ευθύνονται για τις περισσότερες περιπτώσεις (51%). Όσον αφορά τα αίτια μόνον εντοπίζονται σημαντικές διακυμάνσεις από χώρα σε χώρα. Για παράδειγμα, τα τροχαία ατυχήματα είναι κύριος λόγος πρόκλησης ΚΕΚ στις κάτω χώρες (48%) ενώ στη Μ.Βρετανία ευθύνονται μόνο για το 11%. Από την άλλη μεριά οι πτώσεις από ύψος (κυρίως λόγω αλκοόλ) ευθύνονται για το 1% των ΚΕΚ στην Ισπανία αλλά για το 33% στη Σκανδιναβία. Η συχνότητα των ΚΕΚ στη Γαλλία υπολογίζεται σε ορισμένες μελέτες στα 281 άτομα στα 100000 και στην Ισπανία 91/100000 (Basso et al. 2001). Σημαντική είναι η διαπίστωση πως σε χρονικό διάστημα έξι μηνών μετά την ΚΕΚ, το 31% των ασθενών έχει πεθάνει, το 3% βρίσκεται σε φυτική κατάσταση, το 6% αντιμετωπίζει σοβαρά προβλήματα, το 20% εμφανίζει δυσχέρειες μέσης σοβαρότητας και μόνο το 31% έχει καλή ανάρρωση. Το ποσοστό που εμφανίζει πολύ σοβαρά και μετριώς σοβαρά προβλήματα προέρχεται από όλες τις βαθμίδες κρισιμότητας της ΚΕΚ, όπως αυτή χαρακτηρίστηκε κατά την πρώτη εκτίμηση. Από τις πολύ σοβαρές ΚΕΚ το 36% εξελίσσεται άσχημα, από τις ενδιάμεσες το 32%, από τις μέτριες το 38% και από τις μη χαρακτηρισμένες ΚΕΚ το 38%.

❖ *ΥΠΟΛΟΙΠΟΣ ΚΟΣΜΟΣ*

Όπως αναφέρθηκε και στην αρχή, το πρόβλημα των ΚΕΚ έχει διογκούμενο μέγεθος στις υπό ανάπτυξη χώρες, όπως αυτό μπορεί να εκτιμηθεί κυρίως από ποιοτικά κριτήρια, εφόσον υπάρχει σημαντική δυσκολία καταγραφής των δεδομένων.

ΠΑΚΙΣΤΑΝ:

Στο Πακιστάν έγινε μία προσπάθεια καταγραφής του φαινομένου των ΚΕΚ, οι οποίες εμφανίζονται ως η κύρια αιτία θανάτου και αναπηρίας, ιδίως στις νεαρές, παραγωγικές ηλικίες. Η πλειοψηφία των τραυματισμών αφορούσε άνδρες (75%) μεταξύ 10 και 20 ετών (33,2%). Η κατανομή των ΚΕΚ ήταν: 52% πολύ σοβαροί τραυματισμοί, 30% μέτριοι και 18% ελαφρείς (σημαντική διαφοροποίηση από την κατανομή στις αναπτυγμένες χώρες, βλέπε ενδεικτικά Μ.Βρετανία). Το ποσοστό ικανοποιητικής ανάρρωσης ήταν 67% και η θνητότητα έφτασε το 18%. Ενδεικτική των διαφορών μεταξύ αναπτυσσόμενων και αναπτυγμένων χωρών είναι η περιγραφή των αιτιών των ΕΤ. Όπως και σε άλλες χώρες, η κύρια αιτία ΚΕΚ στο Πακιστάν είναι τα τροχαία ατυχήματα, μόνο που αυτά οφείλονται κυρίως σε πτώσεις ατόμων από τρένα, λεωφορεία και άμαξες, καθώς τα μέτρα ασφαλείας είναι ανύπαρκτα και ο κόσμος κυριολεκτικά κρέμεται από τα οχήματα. Ιδιαίτερα αυξημένες είναι επίσης οι πτώσεις από ύψη, καθώς σημαντικό χρονικό διάστημα της ημέρας οι Πακιστανοί το περνούν στις στέγες των σπιτιών τους, ως αποτέλεσμα των κλιματολογικών συνθηκών και της τεχνολογικής υπανάπτυξης

(χαρακτηριστικές φωτογραφίες και παράθεση στοιχείων στην αναφορά: Ali Raja et al. 2001). Παρά τις προαναφερθείσες καταστάσεις η συγκεκριμένη έρευνα περιορίζει τη συχνότητα εγκεφαλικών τραυματισμών στο Πακιστάν σε 91/100000 άτομα. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην αδυναμία καταγραφής πολλών περιπτώσεων οι οποίες δεν καταλήγουν σε νοσοκομεία. Μία άλλη αναφορά (Ansari and Panezai 1998) αποκαλύπτει πως η συχνότητα διεισδυτικών ΚΕΚ ως αποτέλεσμα πολεμικών επιχειρήσεων, εμφανίζει συνεχή αύξηση τα τελευταία χρόνια. Το φαινόμενο αυτό συνοδεύει τις περιόδους πολεμικών εντάσεων, όπως φάνηκε και κατά τη διάρκεια των Ισραηλινο-Αραβικών συγκρούσεων (Brandvold et al. 1990).

KINA:

Στη Λαϊκή Δημοκρατία της Κίνας έγινε συγκριτική μελέτη των ΚΕΚ σε αστικές και αγροτικές περιοχές. Στις αστικές περιοχές η συχνότητα των ΚΕΚ υπολογίστηκε σε 55,4 άτομα στα 100000, με θνησιμότητα 6,3 / 100000. Οι ΚΕΚ αφορούσαν άνδρες σε ποσοστό 62,4% και οι κύριες αιτίες τους ήταν τα τροχαία ατυχήματα (31,7%) και οι επιθέσεις (23,8%). Στις αγροτικές περιοχές η συχνότητα των ΚΕΚ ήταν 64,1/100000 κατοίκους, με θνησιμότητα 9,7/100000. Οι ΚΕΚ εστιάζονταν κυρίως στους άνδρες (71,3%) και οφείλονταν κυρίως σε πτώσεις (33,5%) και τροχαία ατυχήματα (33%). Οι τραυματισμοί από όπλα περιορίζονταν σε 1,3% στις αγροτικές και 1,4% στις αστικές περιοχές (Zhao and Wang 2001).

Ιδιαίτερα στατιστικά στοιχεία για τους κρανιοεγκεφαλικούς τραυματισμούς στην Ελλάδα δεν υπάρχουν. Καθώς όμως αυτού του είδους οι τραυματισμοί εμφανίζονται συχνότατα σε τροχαία ατυχήματα και με δεδομένο το πρόβλημα της συχνότητας τέτοιων ατυχημάτων στη χώρα μας *[βλέπε παράρτημα Ι]* γίνεται ορατό το ενδιαφέρον για τη μελέτη τους και την προσπάθεια έγκαιρης κλινικής αντιμετώπισης τους.

1.2. ΚΟΙΝΩΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΕΣ ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ.

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί ένας σημαντικός προβληματισμός γύρω από το φαινόμενο των ΚΕΚ, το κοινωνικό και οικονομικό κόστος που τους συνοδεύει και τις δυνατότητες περιορισμού του. Το πιο εύκολο κομμάτι αυτού του παζλ είναι ο προσδιορισμός των εξόδων άμεσης νοσοκομειακής αντιμετώπισης των ΚΕΚ, κατά τη μεταφορά των ασθενών και την κρίσιμη αρχική περίοδο. Πρόκειται για δαπάνες που εντάσσονται στη λειτουργία ρουτίνας των νοσηλευτικών ιδρυμάτων και οι οποίες φαίνεται πως δεν προβληματίζουν ιδιαίτερα τους δημόσιους και ιδιωτικούς ασφαλιστικούς φορείς. Ο σκεπτικισμός αφορά τη μακρόχρονη διαδικασία σταθεροποίησης, ανάνηψης και τελικά αποκατάστασης των ασθενών, μία διαδικασία η οποία εξαρτάται από πολλούς αστάθμητους παράγοντες, με ιδιαίτερα αβέβαιη έκβαση (Coburn 1992, Moorehead 1995, Banja and Johnston 1994).

Στη δεκαετία του '90, έγιναν πολλές μελέτες μακροχρόνιας παρακολούθησης των ασθενών με ΚΕΚ και των συγγενών τους, με στόχο την καταγραφή και επισήμανση των συνεπειών τους. Οι μελέτες αυτές κατέστησαν σαφές πως οι ομάδες ανθρώπων οι οποίες έρχονται σε επαφή με άτομα που έχουν σημαντικές αναπηρίες λόγω ΚΕΚ είναι ιδιαίτερα ευάλωτες σε κοινωνικά και

οικονομικά προβλήματα και συνεπώς χρειάζονται πολλαπλή στήριξη (Livingston et al. 1985). Οι συγγενείς τέτοιων ατόμων εμφανίζουν δυσκολία στο να διατηρήσουν σταθερά ωράρια (Osberg et al. 1997), είναι υποχρεωμένοι να βρουν καινούρια εργασία, να δανειστούν χρήματα, να υποστούν μείωση της περιουσίας τους ή να κηρύξουν πτώχευση, σε ποσοστό σημαντικά αυξημένο σε σχέση με άλλες κατηγορίες πολιτών (McMordie and Barker 1988). Ακόμη, τα συγγενικά πρόσωπα που είναι επιφορτισμένα με την περιποίηση των ασθενών αυτών εμφανίζουν αυξημένη συχνότητα επεισοδίων θυμού, κόπωση, νωθρότητα και αμέλεια. Επίσης, χαρακτηρίζονται από κατάχρηση φαρμακευτικών ουσιών και πολλαπλά προβλήματα συμπεριφοράς (Hall et al. 1994).

Το κόστος της προσπάθειας σταθεροποίησης και εν συνεχεία αποκατάστασης της υγείας των πασχόντων από ΚΕΚ επιβαρύνει είτε τους συγγενείς, οδηγώντας σε όλα τα προαναφερθέντα προβλήματα, είτε τους ασφαλιστικούς φορείς και τους οργανισμούς πρόνοιας, μειώνοντας τα διαθέσιμα κεφάλαιά τους. Σε επίπεδο κοινωνίας, η οικονομική επιβάρυνση μεγεθύνεται από το γεγονός πως οι ΚΕΚ πλήττουν άτομα νεαρής ηλικίας. Συνέπεια αυτής της παραμέτρου είναι αφενός η μείωση του παραγωγικού δυναμικού και αφετέρου η επιβάρυνση του συνόλου από την ανάγκη «χρηματοδότησης» ατόμων με πολλές φορές φυσιολογικό προσδόκιμο ζωής, αλλά αποκομμένων από την παραγωγική διαδικασία. Η λογιστική, στεγνά οικονομική θεώρηση του φαινομένου εκφράζεται με τη προβολή της ανάγκης κατάρτισης ενός σαφούς συστήματος άμεσης (κατά το δυνατόν) αξιολόγησης και πρόγνωσης των ΚΕΚ, το οποίο θα επιτρέπει στους γιατρούς να αποφαινόμενοι για την εξέλιξη του ασθενούς και να λαμβάνουν τις αποφάσεις τους για τη συνέχιση της προσπάθειας σταθεροποίησης και αποκατάστασης των τραυματιών. Η θεώρηση αυτή διέπεται από τη λογική πως είναι πολλαπλώς ζημιόγωνα για την κοινωνία η προσπάθεια αποκατάστασης ενός τραυματία όταν είναι σχεδόν σίγουρο πως θα επιβιώσει με βαριές αναπηρίες και αυτή θα πρέπει να επιδιώκεται μόνο με ανάληψη των οικονομικών ευθυνών από τους συγγενείς (Kaufman et al. 1995). Στην αντίθετη όχθη, η πιο ανθρωπιστική προσέγγιση εστιάζεται στο δικαίωμα του ασθενή για εξάντληση των δυνατοτήτων θεραπείας του, έστω και μερικής, χωρίς όμως να παραγνωρίζεται το κοινωνικό κόστος. Η ανθρωπιστική θεώρηση ρίχνει το βάρος της στην ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού συστήματος πρόληψης των ΚΕΚ, με βάση τα επιδημιολογικά τους χαρακτηριστικά, και την ανάπτυξη ενός υποστηρικτικού συστήματος για τις οικογένειες των ασθενών, ούτως ώστε να επιτυγχάνεται η διατήρησή τους σε ενεργό κοινωνική και παραγωγική θέση.

Ανεξαρτήτως κινήτρων, στόχων και επιδιώξεων, η δεκαετία του '90 χαρακτηρίστηκε από τον έντονο προσανατολισμό των κρατικών και ιδιωτικών φορέων στη χρηματοδότηση της καταγραφής και ανάλυσης του φαινομένου των ΚΕΚ, της πρόληψής τους, αλλά και της έρευνας στον τομέα της παθολογίας και θεραπείας τους (Vaughn and King 2001, Corrigan 2001, Berube 2001).

1.3. ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΚΕΚ.

Οι αιτίες των τραυματισμών του εγκεφάλου είναι πολλές και είναι πρακτικώς αδύνατο να εξαλειφθούν εφόσον σχετίζονται με την εξέλιξη της τεχνολογίας - παράδειγμα οι τραυματισμοί σε πολεμικές συγκρούσεις και τα τροχαία ατυχήματα- αλλά και με την έλλειψη της -παράδειγμα τα ελλειπή μέτρα ασφαλείας σε οχήματα και κτίσματα του Πακιστάν. Η εξέλιξη των βιοϊατρικών επιστημών έδωσε τη δυνατότητα πιο έγκαιρης και αποτελεσματικής αντιμετώπισης των ΚΕΚ, οδήγησε στη μείωση της θνησιμότητας, ταυτόχρονα όμως συνέτεινε στην αύξηση του αριθμού των απόμων με σοβαρές αναπηρίες και ψυχολογικά και κοινωνικά προβλήματα.

Με βάση τα παραπάνω, αυτή τη στιγμή διαμορφώνονται δύο επίπεδα δράσης στην προσπάθεια αντιμετώπισης της «σιωπηλής επιδημίας» των ΕΤ. Το πρώτο επίπεδο αφορά στην προσπάθεια συντονισμένης αντιμετώπισης και πρόληψης των αιτιών των ΕΤ. Κάθε χώρα οφείλει να καταγράψει τις κύριες αιτίες ΚΕΚ και να καταστρώσει στρατηγικές ενημέρωσης του πληθυσμού. Η τακτική αυτή έχει αποδώσει σημαντικά αποτελέσματα σε χώρες όπως η Αυστραλία και οι Η.Π.Α. (Kelly and Becker 2001, Atkinson and Merry 2001). Το δεύτερο επίπεδο αφορά στην προσπάθεια της κλινικής αντιμετώπισης των ΕΤ. Ο καθορισμός των βέλτιστων συνθηκών οργάνωσης των πρωτοβάθμιων μονάδων παροχής υπηρεσιών υγείας ώστε να είναι δυνατή η ταχύτερη πρόσβαση των περιστατικών ΚΕΚ σε εξειδικευμένα κέντρα απαιτεί διεθνές επίπεδο συνεργασίας. Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει αρκετές συγκριτικές μελέτες των ποικίλων συστημάτων και στην επιστημονική κοινότητα έχουν ήδη διαμορφωθεί οι κύριες τάσεις στον τομέα αυτό. Για παράδειγμα τονίζεται η ανάγκη να επιτυγχάνεται η άμεση πρόσβαση των ασθενών σε εξειδικευμένα τραυματιολογικά κέντρα, σε συνδυασμό με την οργάνωση μικρών ευκίνητων ομάδων πρώτης αντιμετώπισης και μεταφοράς των ασθενών με τη συμμετοχή ιατρικού προσωπικού (Murray et al. 1999, Beltrame et al. 1998, Oestern 1999, Huemer et al. 1994).

Διεθνής επιστημονική συνεργασία απαιτείται και στην προσπάθεια αποσαφήνισης και διατύπωσης οδηγιών για την αντιμετώπιση των ΚΕΚ από το αρμόδιο ιατρικό και νοσηλευτικό προσωπικό. Η εφαρμογή συγκεκριμένων κανόνων όσον αφορά τις παραμέτρους που πρέπει να παρακολουθούνται (ενδοκρανική πίεση, διάφοροι μεταβολικοί δείκτες) και τις επεμβατικές τεχνικές που πρέπει να εφαρμόζονται (χειρουργική ή όχι αντιμετώπιση), σε συνδυασμό με τη συσσώρευση εμπειρίας από τη χρήση απεικονιστικών τεχνικών, έχουν οδηγήσει στη δραματική μείωση της θνητότητας των ΚΕΚ (για παράδειγμα στη Μ. Βρετανία McGregor and Pentland 1997, Kay and Teasdale 2001). *[Βλέπε και παράρτημα 2]*

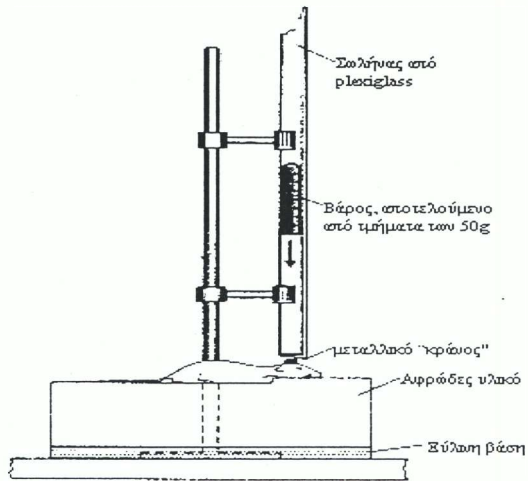
Τέλος, ως τρίτο επίπεδο δράσης πρέπει πάντα να υπογραμμίζεται η ανάγκη χρηματοδότησης της βασικής έρευνας, εργαστηριακής, κλινικής ή και επιδημιολογικής, η οποία μπορεί να προσανατολίζεται στη μελέτη της παθολογίας των ΚΕΚ, της θεραπευτικής αντιμετώπισής τους και της προσπάθειας αποκατάστασης των βλαβών που έχουν επέλθει αζαιτίας τους. Η τακτική των ΗΠΑ στις οποίες τόσο το 1996, όσο και το 2000, η αντιμετώπιση των ΚΕΚ με νόμο του κράτους (The Traumatic Brain Injury Act Amendments Corrigan 2001, Berube

2001) εντάχθηκε στις προτεραιότητες των τοπικών κυβερνήσεων αλλά και της κεντρικής διοίκησης, φαίνεται πως έδωσε ώθηση σε αυτόν τον επιστημονικό τομέα.

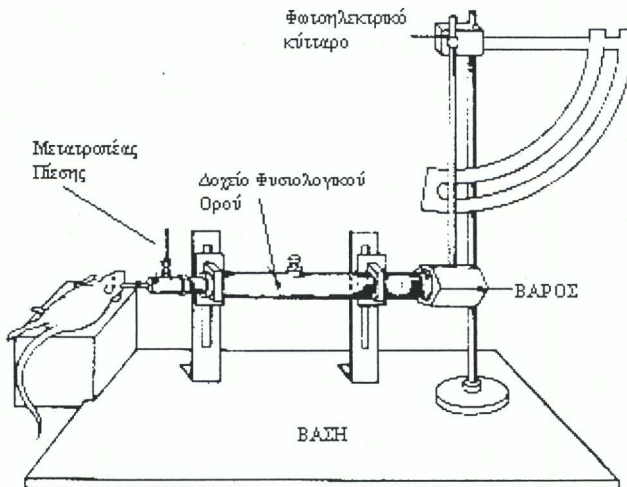
2. ΜΟΝΤΕΛΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΚΕΚ.

Η απαραίτητη, όπως αξιολογείται από όσα έχουν αναφερθεί ως τώρα, εργαστηριακή μελέτη των κρανιοεγκεφαλικών τραυματισμών απαιτεί, όπως σε όλες τις περιπτώσεις παθήσεων, την ανάπτυξη αντίστοιχων μοντέλων σε πειραματόζωα. Τα μέχρι τώρα εφαρμοζόμενα μοντέλα διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες, με βάση τη φύση και την έκταση της βλάβης που προκαλείται: Σε μοντέλα διάχυτου εγκεφαλικού τραυματισμού (diffuse brain injury) και σε μοντέλα εστιασμένου εγκεφαλικού τραυματισμού (focal brain injury), ενώ παράλληλα πρέπει να αναφερθούν και τα πρωτόκολλα ισχαιμικού τραυματισμού του εγκεφάλου. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει ποικίλα πειραματικά πρωτόκολλα (ενδεικτικά Park et al. 1999, Dixon et al. 1987, Marmarou et al. 1994, Montasser et al. 1994, Shapira et al. 1988) στα οποία επιτυγχάνεται με διάφορους τρόπους ο μαζικός- συνήθως και στα δύο ημισφαίρια- τραυματισμός του εγκεφάλου (εικ. 2.1 και 2.2). Η επίτευξη του τραυματισμού απαιτεί πάντα, για λόγους ηθικής, την αναισθησία του ζώου, συνήθως την αποκάλυψη του εγκεφαλικού ιστού με την απομάκρυνση ενός τμήματος του οστού του κρανίου και τη ρίψη κάποιου βάρους (cortical contusion injury) ή υγρού (fluid percussion injury). Συνήθως είναι δυνατός ο έλεγχος της βαρύτητας του τραυματισμού με την προσαρμογή συγκεκριμένων παραμέτρων, όπως η ταχύτητα πρόσκρουσης του βάρους ή η πίεση ρίψης του υγρού. Τα μοντέλα αυτά είναι πιο κοντά στις περιπτώσεις πολυτραυματιών με ΚΕΚ (όπως στα τροχαία ατυχήματα) ή πτώσεις από ύψος, αλλά χρειάζονται ειδικά εξοπλισμένα εργαστήρια, καθώς απαιτείται η παρακολούθηση πολλών ζωτικών λειτουργιών των πειραματόζωων.

Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει, επίσης, ποικίλα πειραματικά πρωτόκολλα, κυρίως μηχανικών βλαβών (Xie et al. 1995, Peterson et al. 1994) – όπως και το μοντέλο διεισδυτικού τραυματισμού που εφαρμόσαμε- καθώς και τραυματισμών με τοπική ενδοκρανιακή έγχυση τοξικών ουσιών- όπως NMDA (Portera-Cailliau et al. 1997), Καϊνικού ή Κουινολινικού οξέος (Portera-Cailliau et al. 1995) ή ακόμη και φωτοενεργοποιούμενων ουσιών (photothrombotic brain injury) (Kharlamov et al. 1996). Στα μοντέλα αυτά υπάρχει η δυνατότητα να μελετηθεί η καταστροφή επιλεγμένων ανατομικών περιοχών ή και συγκεκριμένων κυτταρικών πληθυσμών ή νευρικών οδών (Peterson et al. 1994), συνήθως με περιορισμένη θνητότητα αλλά συγκεκριμένη συμπτωματολογία (π.χ. κινητικές διαταραχές). Επίσης, ορισμένα πρωτόκολλα χημειοτοξικής καταστροφής συγκεκριμένων ομάδων κυττάρων (για παράδειγμα των ντοπαμινεργικών νευρώνων του ραβδωτού) χρησιμοποιούνται ως μοντέλα πειραματικής μελέτης νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Πιο συγκεκριμένα, η ενδοκοιλιακή/ενδοκρανιακή (intracerebroventricular/ icv) χορήγηση 6-υδρόξυνοταμίνης (6-OHDA) προκαλεί κυτταρικές και κινητικές αντιδράσεις που προσομοιάζουν με την ασθένεια του Parkinson (ενδεικτικό πρωτόκολλο: Guan et al. 2000), ενώ η έγχυση Κουϊνολινικού οξέος στο ραβδωτό σώμα προκαλεί συμπτώματα όμοια με της χορείας του Huntington (ενδεικτικό πρωτόκολλο: Alexi et al. 1999).



2.1. Διάταξη για την επίτευξη μηχανικού τραυματισμού με ρίψη βάρους.
[Προσαρμογή σχεδίου από Marmarou et al. (1994)]



2.2. Διάταξη για την επίτευξη μηχανικού τραυματισμού με υδατική πίεση.
[Προσαρμογή σχεδίου από Dixon et al. (1987)]

3. ΝΕΥΡΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΚΕΚ.

Είναι δύσκολο να ομαδοποιηθούν με σαφήνεια και ακρίβεια τα ανατομικά και παθολογικά χαρακτηριστικά των εγκεφαλικών τραυματισμών καθώς εμφανίζουν μεγάλη ποικιλότητα. Από τις κλινικές και εργαστηριακές παρατηρήσεις, έχει στοιχειοθετηθεί πως οι νευροπαθολογικές συνέπειες των εγκεφαλικών τραυματισμών συνδέονται άμεσα με τα βιο-μηχανικά χαρακτηριστικά (πιέσεις και δυνάμεις που αναπτύσσονται, ταχύτητα και τροχιά ξένου σώματος) αλλά και από το τμήμα του κρανίου/ εγκεφάλου που τραυματίζεται. Δύο κυρίως μηχανικά φαινόμενα είναι υπεύθυνα για τις πρωτογενείς εγκεφαλικές βλάβες κατά τη διάρκεια ενός τραυματισμού. Πρώτον, οι συνέπειες της επαφής (contact effects), το κάταγμα του κρανίου και η διάδοση κυμάτων σε όλο το εύρος του εγκεφάλου, με αφετηρία το σημείο τραυματισμού και δεύτερον, η κίνηση και παραμόρφωση του εγκεφαλικού ιστού εξαιτίας των φαινομένων επιτάχυνσης και αδράνειας (Για ανασκόπηση McIntosh et al. 1996, Karger 1995). Οι ΚΕΚ διακρίνονται συνήθως σε τρεις κατηγορίες, τις κατώσεις βαριάς μορφής ή σοβαρές ΚΕΚ (severe), τις μέτριες ή ενδιάμεσες (moderate) και τις ελαφρές (mild). Η διάκριση των τριών αυτών τύπων ΚΕΚ δεν βασίζεται τόσο στη φύση του τραύματος, αλλά κυρίως στο μέγεθος της τραυματισμένης περιοχής και στην επέκταση της καταστροφής. Στα πλαίσια της νευροπαθολογικής ταξινόμησης των συμπτωμάτων των ΚΕΚ διακρίνονται δύο στάδια εξέλιξης της εγκεφαλικής βλάβης μετά από τραυματισμό. Το πρώτο στάδιο (στάδιο πρωτογενούς εγκεφαλικής βλάβης) περιλαμβάνει τη χρονική στιγμή του τραυματισμού και χαρακτηρίζεται από τη δημιουργία των κρανιακών καταγμάτων και τη θλάση του εγκεφαλικού ιστού. Σε αυτό το στάδιο επίσης εξελίσσονται τα πρώτα αιματώματα και ο διάχυτος τραυματισμός των νευρικών αξόνων ή αξονότμηση (diffuse axonal injury). Το δεύτερο στάδιο (στάδιο δευτερογενούς, «καθυστερημένης» εγκεφαλικής βλάβης) διαρκεί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, αν και τα παθολογικά χαρακτηριστικά του οφείλονται σε διαδικασίες των οποίων η αιτία και η εκκίνηση εντοπίζονται στο χρονικό σημείο του τραυματισμού. Σε αυτό το στάδιο εκδηλώνονται ισχαιμικά επεισόδια, εγκεφαλικό οίδημα και μεταβολές των νευροχημικών χαρακτηριστικών του εγκεφαλικού ιστού. Οι δευτερογενείς εγκεφαλικές βλάβες ευθύνονται για τον αιφνίδιο θάνατο ασθενών οι οποίοι έχουν επιζήσει του τραυματισμού και φαίνεται να έχουν ομαλή εξέλιξη, με καλή επαφή με το περιβάλλον, υψηλό επίπεδο συνείδησης και φυσιολογικές δυνατότητες ομιλίας και συνεννόησης (φαινόμενο “talk and die”).

Οι κυριότερες ανατομικές και ιστοπαθολογικές παρατηρήσεις που εμφανίζονται στην πλειοψηφία των εγκεφαλικών τραυματισμών είναι η ύπαρξη αιματωμάτων (είτε εντός της εγκεφαλικής ουσίας, είτε στο επίπεδο των μηνίγγων), η απώλεια εγκεφαλονωτιαίου υγρού, η δημιουργία τραυματικών ανευρυσμάτων, η εμφάνιση επίμονου οιδήματος (με πιθανότητα λοίμωξης), η παρουσία θραυσμάτων (συνηθέστερα από τμήματα του κρανίου) και, ως συνέπεια των παραπάνω, ο διάχυτος τραυματισμός νευραξόνων. Επίσης ένα σημαντικό φαινόμενο που συχνά συνοδεύει τους ΚΕΚ είναι η ισχαιμία διαφόρων εγκεφαλικών περιοχών (McIntosh et al. 1996, Amirjamshidi et al. 1997, Kordestani et al. 1995).

Η παρουσία διαφόρων τύπων ενδοκρανιακών αιματωμάτων μετά από ΚΕΚ είναι ένα κυρίαρχο φαινόμενο (ποσοστό εμφάνισης έως και 60%). Τα επισκληρίδια

αιματώματα είναι μία χαρακτηριστική επιπλοκή των ΚΕΚ αν και συχνά δημιουργούνται ακόμη και μετά από ασήμαντα κτυπήματα της κεφαλής. Είναι αρκετά επικίνδυνα καθώς τα συμπτώματα της ύπαρξής τους μπορεί να εμφανιστούν αφού ο ασθενής έχει συνέλθει από τον τραυματισμό και παρουσιάζει εικόνα διάνυγίας πνεύματος ή ελαφράς σύγχυσης (φωτεινό διάλειμμα). Υπαραχνοειδείς αιμορραγίες δημιουργούνται συχνά στις ΚΕΚ, όμως η κλινική επίπτωσή τους στην εξέλιξη του ασθενούς είναι συνήθως μικρή (οι κλινικώς σημαντικές υπαραχνοειδείς αιμορραγίες περιορίζονται στο 18% των περιπτώσεων σύμφωνα με την ευρεία μελέτη των Adams et al. 1985). Τα υποσκληρίδια αιματώματα είναι επίσης μία επιπλοκή των ΚΕΚ η οποία μπορεί να δημιουργήσει σοβαρούς κινδύνους για την υγεία των ασθενών. Διακρίνονται σε οξεία, υποξεία και χρόνια, ανάλογα με το χρονικό διάστημα εμφάνισης και εξέλιξής τους. Χαρακτηρίζονται από σταδιακή αύξηση του μεγέθους τους, ενθυλάκωση και τελικά αυξημένη πιθανότητα να δημιουργήσουν περαιτέρω παραμόρφωση και τραυματισμό του εγκεφάλου (Bullock and Teasdale 1990, Κάζδαγλης 1996). Σε διεισδυτικούς τραυματισμούς, όπως τα τραύματα από πυροβόλα όπλα, δημιουργείται στο εγκεφαλικό παρέγχυμα μία χαρακτηριστική εικόνα που περιγράφεται ως κωνικό τούνελ. Το βλήμα κατά την είσοδό του στον εγκέφαλο παρασύρει μαζί του δέρμα, τρίχες και οστικά τεμάχια, με αποτέλεσμα να επεκτείνεται η καταστροφή του ιστού και η διάρρηξη φλεβών και αρτηριών. Αποτέλεσμα αυτού του σύνθετου τραυματισμού είναι η δημιουργία ενδοεγκεφαλικού αιματώματος, το οποίο συνήθως απαιτεί άμεση αντιμετώπιση ούτως ώστε οι ασθενείς να έχουν καλύτερη πρόγνωση (Κάζδαγλης 1996).

Ένα άλλο χαρακτηριστικό σύμπτωμα των ΚΕΚ είναι η διαταραχή της αιματικής ροής. Συνήθως μετά από σοβαρούς τραυματισμούς του εγκεφάλου καταγράφεται σημαντική μείωση της αιματικής ροής (Overgaard et al. 1981) και αυξομειώσεις της ενδοκρανιακής πίεσης. Το αποτέλεσμα αυτών των φαινομένων σε συνδυασμό με την τοπική απόφραξη συγκεκριμένων αγγείων μπορεί να οδηγήσει σε παρατεταμένη ισχαιμία ορισμένων περιοχών του εγκεφάλου. Ο ιππόκαμπος είναι μία δομή η οποία έχει χαρακτηριστεί ως ιδιαίτερα ευαίσθητη σε τέτοια επεισόδια υποξίας και ισχαιμίας (Kotapka et al. 1994).

Η σημαντικότερη ίσως δευτερογενής εγκεφαλική βλάβη η οποία συνοδεύει τις ΚΕΚ είναι ο διάχυτος τραυματισμός των νευραξόνων. Τις πρώτες ημέρες μετά το τραύμα η εκφύλιση των αξόνων είναι εμφανής με τη μορφή οιδημάτων της λευκής ουσίας κυρίως στο ύψος του μεσολοβίου και των κεντρομόλων και φυγόκεντρων νευρικών οδών του εγκεφαλικού στελέχους (Polvishock and Christman, 1995). Με την πάροδο του χρόνου ο εκφυλισμός των αξόνων είναι ορατός από την παρουσία συσσωματωμάτων μικρογλοιακών κυττάρων, αποθέσεων υπολειμμάτων μυελίνης και διογκωμένων κυτταρικών σωμάτων κατά μήκος των ινών της λευκής ουσίας. Σε περιπτώσεις πολύ σοβαρών ΚΕΚ, στις οποίες οι ασθενείς παραμένουν σε φυτική κατάσταση, παρατηρείται εκφύλιση (Wallerian degeneration) της λευκής ουσίας που βρίσκεται στο κέντρο του εγκεφάλου (McIntosh et al. 1996). Πολύ συχνά εντοπίζονται και ανατομικές αλλοιώσεις του εγκεφάλου όπως η μεταβολή (αύξηση αλλά και μείωση) του μεγέθους των κοιλιών του εγκεφάλου (Reider-Groswasser et al. 1993) και τραυματισμοί του μεσολοβίου. Ειδικά το μεσολόβιο είναι μία δομή που συχνά πλήττεται άμεσα ή έμμεσα σε ΚΕΚ

(McIntosh et al. 1996, Christiaens and Blond 1998) με σοβαρές επιπτώσεις ιδιαίτερα όταν ο τραυματισμός συμβαίνει κατά την παιδική ηλικία. (Levin et al. 2000, Benavidez et al. 1999). Επιπροσθέτως, πολύ συχνά σε περιπτώσεις εγκεφαλικών τραυματισμών εμφανίζονται βλάβες των εγκεφαλικών συζυγίων, με το προσωπικό και το οσφρητικό νεύρο να καταστρέφονται συχνότερα (Keane and Baloh 1992).

Μία πολύ σημαντική πτυχή της νευροπαθολογίας των ΚΕΚ είναι οι νευρολογικές και ψυχιατρικές παθήσεις οι οποίες συνδέονται με αυτές. Τα τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει να συγκεντρώνονται αρκετά στατιστικά στοιχεία σύμφωνα με τα οποία οι κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις συνδέονται με την ανάπτυξη, σε ύστερο χρονικό στάδιο, ποικίλων νευρολογικών και ψυχιατρικών διαταραχών. Η πιο γνωστή και καλά στοιχειοθετημένη περίπτωση σύνδεσης των ΚΕΚ με την εκδήλωση μιας νευρολογικής ασθένειας είναι η μετατραυματική επιληψία (Jacobi 1992, Temkin et al. 1991). Επίσης, ομάδες ατόμων που έχουν υποστεί τραυματισμούς στο κεφάλι, όπως βετεράνοι τραυματίες από τον πόλεμο του Βιετνάμ, εμφανίζουν σε υψηλά ποσοστά επιληπτικές κρίσεις, προβλήματα αμνησίας και άλλα ψυχοκοινωνικά σύνδρομα (Salazar et al. 1995). Ακόμη, σε χρονικό διάστημα ενός έτους μετά από κρανιακούς τραυματισμούς, η εμφάνιση σοβαρών ψυχιατρικών προβλημάτων, καταθλιπτικών επεισοδίων και επεισοδίων πανικού εμφανίζεται αυξημένη σε σχέση με το γενικό πληθυσμό (Deb et al. 1999). Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο της επιδημιολογίας των ΚΕΚ, συνεχώς επιβεβαιώνεται το γεγονός πως οι νευρολογικές επιπτώσεις των ΚΕΚ δεν περιορίζονται μόνο στα βραχυπρόθεσμα συμπτώματα που ακολουθούν το σοβαρό τραυματισμό του εγκεφάλου (μείωση επιπέδου συνείδησης και εκτεταμένες επιληπτικές κρίσεις). Πολλοί ασθενείς, οι οποίοι υποφέρουν από τις μακροχρόνιες συνέπειες ενός ΚΕΚ, αρχικώς είχαν αξιολογηθεί ως ελαφρά τραυματισμένοι, χωρίς να παρουσιάσουν σε κάποια φάση σημαντική εγκεφαλική βλάβη. Οι νευρολογικές αυτές διαταραχές ποικίλουν από επίμονους πονοκεφάλους, ελλειπή μνημονική ικανότητα έως και διαταραχές της προσοχής και της συγκέντρωσης (μεατραυματικό σύνδρομο: “post-concussion syndrome” Binder 1986).

Εκτεταμένη προσπάθεια έχει γίνει για την αναπαραγωγή και διερεύνηση των παραπάνω επιδημιολογικών δεδομένων σε πειραματόζωα. Η επιλεκτική καταστροφή των κυττάρων του ιπποκάμπου και ιδίως της Οδοντωτής Έλικας (ΟΕ) μετά από ΚΕΚ έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά (Lowenstein et al. 1992, Colicos and Dash 1996), όπως επίσης και η επιλεκτική μεταβολή των νευροχημικών ιδιοτήτων του ιπποκάμπου (αναστολή του φαινομένου της μακροχρόνιας ενδυνάμωσης των συνάψεων) (D’Ambrosio et al. 1998). Ίσως τα στοιχεία αυτά να αιτιολογούν την εμφάνιση διαταραχών της λειτουργίας της μνήμης σε υψηλό ποσοστό μετά από ΕΤ. Επίσης, επίμονες οι οποίοι είχαν υποστεί σοβαρή ΚΕΚ και επιβίωσαν για ένα χρόνο εμφάνισαν σημαντικά προβλήματα μνήμης και μάθησης όπως και κινητικές δυσκολίες (Pierce et al. 1998). Τέλος, ακόμη και σε εργαστηριακά μοντέλα ελαφρού εγκεφαλικού τραυματισμού επίμων, χωρίς την εκδήλωση σημαντικών νευρολογικών συμπτωμάτων, έχουν παρατηρηθεί συγκεκριμένες συμπεριφορικές δυσλειτουργίες, οι οποίες συνδέονται με τη μνήμη και τη μάθηση (Hogg et al. 1998). Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν την άποψη πως δευτερογενή φαινόμενα, τα οποία δεν συνδέονται άμεσα με τις πρωτογενείς βλάβες του εγκεφαλικού ιστού,

είναι υπεύθυνα για μία ποικιλία συμπεριφορικών και νευρολογικών διαταραχών μετά από ΕΤ.

4. Η ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΙΣΤΟΥ ΣΤΟ ΕΠΙΠΕΔΟ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ.

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, η απάντηση του εγκεφαλικού ιστού στον τραυματισμό εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του τραύματος. Το γεγονός μάλιστα πως η έλλειψη εμφανών μακροσκοπικών ευρημάτων -από αξονικές ή μαγνητικές τομογραφίες- δεν συνεπάγεται πάντα την απουσία δευτερογενών προβλημάτων (Reider-Groswasser et al. 1993) ενισχύει την ανάγκη για μελέτη της αντίδρασης του εγκεφαλικού ιστού σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο.

Οι ποικίλοι κυτταρικοί πληθυσμοί του εγκεφάλου εμφανίζουν διαφορετική συμπεριφορά μετά από τραυματισμό.

i) Τα μικρογλοιακά κύτταρα τα οποία συνιστούν το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα του εγκεφάλου, είναι τα πρώτα που ενεργοποιούνται και διαιρούνται μετά το τραύμα (Koshinaga et al. 2000) στην περιοχή της βλάβης του ιστού, αλλά συχνά και στο μη τραυματισμένο ημισφαίριο (στις περιπτώσεις εστιασμένου τραύματος). Δηλαδή είναι τα πρώτα κύτταρα που ενεργοποιούνται από τη διατάραξη της φυσιολογικής κατάστασης του ιστού, μετατρέπονται σε ενεργοποιημένα μικρογλοιακά κύτταρα και στη συνέχεια σε φαγοκύτταρα (Gehrmann 1996, Koshinaga et al. 2000). Η μέγιστη παρουσία τους στην περιοχή του τραύματος συνήθως παρατηρείται μετά από 72 ώρες. Η εντόπισή τους σε περιοχές μακριά από τον τραυματισμό υποδηλώνει τις περισσότερες φορές ρήξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Soares et al 1995). Η εντόπιση ενεργοποιημένων μικρογλοιακών κυττάρων στην περιοχή ενός τραυματισμού φαίνεται πως συμβάλλει στην αναγέννηση ορισμένων νευραξόνων και στην επαναδιαμόρφωση της αρχιτεκτονικής του ιστού. Εξάλλου, τα μικρογλοιακά κύτταρα έχουν βρεθεί να εκφράζουν τροφικούς παράγοντες όπως ο Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) και ο Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) (Batchelor et al. 1999, Dougherty et al. 2000). Είναι πιθανό όμως η παρουσία τους να έχει και νευροτοξικά αποτελέσματα εφόσον σε πειράματα αναστολής του πολλαπλασιασμού τους in vivo μετά από τραυματισμό παρατηρήθηκε μείωση της βλάβης του ιστού (Rogove and Tsirka 1998).

ii) Η πιο καλά τεκμηριωμένη κυτταρική αντίδραση στο τραύμα είναι η έντονη τοπική ενεργοποίηση των αστρογλοιακών κυττάρων. Η αντίδραση αυτή, η οποία περιγράφεται από τον όρο «αστρογλοϊώση», ξεκινάει μία μέρα μετά τη βλάβη και έχει ως αποτέλεσμα την επούλωση του τραύματος με το σχηματισμό της «αστροκυτταρικής ουλής» (Ridet et al. 1997, Ghimikar et al. 1996). Τα αστροκύτταρα -η ανοσοϊστοχημική εντόπιση των οποίων γίνεται μέσω της πρωτεΐνης GFAP (glial acidic fibrillary protein)- παρότι διαφοροποιημένα, αρχικά εμφανίζονται υπερτροφικά (McIntosh et al. 1996) και στη συνέχεια διαιρούνται (Hill-Felberg et al. 1999), ενώ ταυτόχρονα μεταβάλλουν τη «συμπεριφορά» τους όσον αφορά στη σύνθεση και έκκριση νευροτροφικών και αυξητικών παραγόντων, κυτοκινών και χυμοκινών (Ghimikar et al. 1996, Ridet et al. 1997).

iii) Σχετικά με την τρίτη κατηγορία γλοιακών κυττάρων, τα ολιγοδενδροκύτταρα, τα δεδομένα όχι απλώς δεν είναι ακόμη σαφή, αλλά πολύ συχνά είναι αντικρουόμενα. Αυτό το οποίο έχει πολλαπλώς αποδειχθεί είναι πως πρόκειται για μία κατηγορία κυττάρων πολύ ευαίσθητων σε βλάβες, τα οποία

καταστρέφονται ακόμα και σε περιοχές που βρίσκονται αρκετά μακρύτερα από το σημείο του τραυματισμού (Oka et al. 1993, McDonald et al. 1998, Shibata et al. 2000). Σύμφωνα με τα δεδομένα, σε περιπτώσεις τραυματισμού του εγκεφάλου, επάγεται ο πολλαπλασιασμός των ολιγοδενδροκυττάρων (όπως προκύπτει από πειράματα ενσωμάτωσης τριτιωμένης θυμιδίνης), χωρίς όμως να καθίσταται τελικά δυνατή η επαναμυελίνωση των αξόνων, των οποίων το γλοιακό περίβλημα έχει καταστραφεί (Xie et al. 1995, Ludwin 1984). Υπάρχουν όμως και εργασίες σύμφωνα με τις οποίες βλάβη του ιστού οδηγεί σε μικρής κλίμακας πολλαπλασιασμό, ο οποίος αφορά μόνο πρόδρομα ολιγοδενδρογλοιακά κύτταρα και όχι ώριμα.

iv) Όσον αφορά στα κύτταρα του αίματος (λεμφοκύτταρα, φαγοκύτταρα), η παρουσία τους εξαρτάται κυρίως από το βαθμό ρήξης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και συνήθως δεν παρατηρείται νωρίτερα από μία ημέρα μετά τον τραυματισμό (Soares et al 1995). Τα κύρια κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος τα οποία συνδέονται με τις τραυματικές καταστάσεις του ΚΝΣ είναι τα μακροφάγα. Η λειτουργία τους, όπως και σε κάθε άλλο ιστό έγκειται, στην επαναδιαμόρφωση του ιστού και στην προαγωγή της διαδικασίας επούλωσης του τραύματος. Απομακρύνουν τα υπολείμματα των κατεστραμμένων κυττάρων, ανακυκλώνουν τα λιπίδια και εκκρίνουν ποικίλες κυτοκίνες με τροφική, μιτογόνο και χημειοτακτική δράση (Lotan and Schwartz 1994).

Τέλος, σημαντικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η πιθανότητα επαγωγής του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των πρόδρομων νευρικών κυττάρων τα οποία υπάρχουν σε συγκεκριμένες δομές του εγκεφάλου (ιππόκαμπος, υποκοιλιακές περιοχές). Η εντόπιση ενσωμάτωσης βρωμοδεόξυουριδίνης (BrdU ενός αναλόγου της θυμιδίνης) σε κύτταρα κοντά σε διεισδυτικό τραυματισμό στην περιοχή της τρίτης κοιλίας, πιθανώς αποκαλύπτει τις αναγεννητικές ιδιότητες ορισμένων κυτταρικών πληθυσμών (Tzeng and Wu, 1999).

5. Η ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΙΣΤΟΥ ΣΤΟ ΜΟΡΙΑΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ.

5.1. ΓΕΝΙΚΑ.

Η ομοιόσταση και η ρύθμιση της λειτουργικότητας του εγκεφαλικού ιστού, η οποία εμφανίζει μεγάλη πολυπλοκότητα, είναι αποτέλεσμα της αρμονικής δράσης μίας πλειάδας ενδογενών και εξωγενών παραγόντων. Ενδεικτικό είναι πως η διαφορετική φυσιολογία και λειτουργία των ξεχωριστών δομών του εγκεφάλου εξαρτάται από την ανατομικά διακριτή τοπική δράση τέτοιων παραγόντων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η δράση των νευροδιαβιβαστών (π.χ. γλουταμικού, γ-αμινοβουτυρικού (GABA), ακετυλοχολίνης κ.α.) η οποία περιορίζεται στη συναπτική σχισμή, με αυστηρή ρύθμιση έκκρισης και απομάκρυνσης. Όπως και στα άλλα όργανα του σώματος έτσι και στον εγκέφαλο η διακυτταρική επικοινωνία επιτυγχάνεται μέσω της δράσης ποικίλων «μορίων σημάτων». Οι τρεις μεγαλύτερες κατηγορίες τέτοιων μορίων είναι οι ορμόνες, οι αυξητικοί παράγοντες και οι κυτοκίνες. Οι ορμόνες, οι οποίες παράγονται σε συγκεκριμένα εκκριτικά κύτταρα, ελευθερώνονται στα αγγεία και μέσω της αιματικής κυκλοφορίας φτάνουν στα κύτταρα-στόχους. Οι τροφικοί παράγοντες και οι κυτοκίνες παράγονται και δρουν σε τοπικό, ιστικό επίπεδο και πολλές φορές οι δράσεις τους αλληλεπικαλύπτονται. Οι τροφικοί παράγοντες εμφανίζουν συνεχή παραγωγή σε κάθε ιστό και λειτουργούν για τη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού τόσο υπό φυσιολογικές όσο και υπό παθολογικές συνθήκες. Από την άλλη μεριά, οι κυτοκίνες διαφοροποιούνται από τους τροφικούς παράγοντες διότι η παραγωγή τους επάγεται σε συγκεκριμένες περιπτώσεις, στις οποίες η παρουσία τους είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ομοιόστασης του ιστού.

Η συντονισμένη δράση όλων των προαναφερθέντων παραγόντων εμφανίζει σταθερά χαρακτηριστικά στον ενήλικο εγκέφαλο και απορρυθμίζεται υπό παθολογικές συνθήκες, όπως για παράδειγμα σε μία λοίμωξη ή κάποια ορμονική δυσλειτουργία. Σε αυτές τις περιπτώσεις ο οργανισμός αντιδρά, προσπαθώντας να διατηρήσει την αρχική κατάσταση. Για να επιτευχθεί αυτό συχνά απαιτείται ο προγραμματισμένος θάνατος κυττάρων, η αναγέννηση ή η διαίρεση άλλων και πολλές φορές η χημειοτακτικός ελεγχόμενη μετακίνηση κυτταρικών πληθυσμών (π.χ. μικρογλοιακών κυττάρων). Πολλές φορές όμως δεν είναι δυνατή η επαναφορά του ιστού στην αρχική φυσιολογική κατάσταση ίσως και εξαιτίας του υψηλού βαθμού διαφοροποίησης των κυττάρων του νευρικού συστήματος. Γίνεται σαφές λοιπόν πως η λεπτομερής γνώση της έκφρασης και δράσης αυτών των παραγόντων και φυσικά των βιοχημικών μοριακών μηχανισμών που τις ελέγχουν μπορεί να δώσει τη δυνατότητα εξωγενών παρεμβάσεων, με την εφαρμογή κατάλληλων θεραπευτικών στρατηγικών.

Στην περίπτωση του τραυματισμού του εγκεφαλικού ιστού και ιδίως στους μηχανικούς τραυματισμούς κατά τους οποίους παρατηρείται ρήξη της συνέχειας του ιστού και καταστροφή της διαμερισματοποίησης των δομών του, έχει σαφώς περιγραφεί απόκλιση από το φυσιολογικό όσον αφορά στην έκφραση των παραγόντων αυτών, είτε ως αποτέλεσμα της ενεργητικής αντίδρασης του ιστού, είτε ως απορρύθμισή του λόγω της βλάβης. Συνέπεια αυτής της απορρύθμισης είναι η

εμφάνιση των ποικίλων παθολογοανατομικών και στη συνέχεια νευρολογικών και συμπεριφορικών συμπτωμάτων που περιγράφηκαν στα προηγούμενα τμήματα.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν μερικές μόνο από τις πτυχές που συνθέτουν την απόκριση του εγκεφάλου στο τραυματισμό (κυτταρικός θάνατος, έκφραση των νευροτροφινών BDNF και NT-3, έκφραση της θερμοεπαιγόμενης πρωτεΐνης Hsp70, του τροφικού παράγοντα IGF-I, της αστρογλοιακής πρωτεΐνης GFAP και της συνθετάσης του NO) και συνεπώς αυτές θα αναλυθούν στο εισαγωγικό μέρος. Είναι αυτονόητο όμως πως δεν υπάρχει σύστημα μορίων (μεταβολικών, δομικών κ.α.) το οποίο να μην επηρεάζεται βραχυπρόθεσμα ή πιο μακροχρόνια, σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό από τον τραυματισμό του εγκεφαλικού ιστού. Για ορισμένες από αυτές τις νευροχημικές μεταβολές του εγκεφάλου, οι οποίες δεν μελετήθηκαν στο συγκεκριμένο μοντέλο τραύματος, θα ακολουθήσει απλώς μία συνοπτική αναφορά στα μέχρι τώρα γνωστά στοιχεία, ενώ στη συνέχεια θα γίνει μία αναλυτικότερη αναφορά στις παραμέτρους που μελετήθηκαν.

Νευροδιαβιβαστές.

Οι διεγερτικοί νευροδιαβιβαστές έχει αποδειχθεί πως προκαλούν διόγκωση των κυττάρων, διάσπασή τους σε κυστίδια και τελικά νεκρωτικό θάνατο, όταν χορηγηθούν απευθείας και σε υψηλή συγκέντρωση σε νευρικά ή γλοία κύτταρα. Το φαινόμενο της κυτταροτοξικότητας των διεγερτικών νευροδιαβιβαστών (ο Αγγλικός όρος είναι “excitotoxicity”) φαίνεται πως είναι υπεύθυνο για αρκετά εκφυλιστικά φαινόμενα που συνοδεύουν τις ΚΕΚ. Η δράση των διεγερτικών αμινοξέων διαμεσολαβείται από τρεις τουλάχιστον διαφορετικές οδούς. Μετά τη σύνδεσή τους στους υποδοχείς τύπου Καϊνικού οξέος/AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate acid) ανοίγουν συγκεκριμένα κανάλια μονοσθενών ιόντων (Na^+ , K^+). Αντίστοιχα, η σύνδεσή τους με τους υποδοχείς τύπου NMDA, οδηγεί στο άνοιγμα Na^+ , Ca^{++} καναλιών. Τέλος, η ενεργοποίηση των μεταβοτροπικών υποδοχέων επιφέρει την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C. Η ανατομική εντόπιση των υποδοχέων των διεγερτικών αμινοξέων φαίνεται πως προσδιορίζει και το βαθμό ευαισθησίας των διαφόρων περιοχών του εγκεφάλου στην τοξική τους δράση. Πάντως, αρκετά δεδομένα στηρίζουν την άποψη πως μετά από ΚΕΚ υπάρχει σημαντική αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης γλουταμικού (Palmer et al. 1993) ακόμη και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό των ασθενών (Palmer et al. 1994).

Το σύστημα της ακετυλοχολίνης (Ακχ) φαίνεται πως επηρεάζεται επίσης κατά τις ΚΕΚ. Μετά τον τραυματισμό παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης της Ακχ αλλά και μείωση της δέσμευσής της στους μουςκαρινικούς υποδοχείς. Η αναστολή των υποδοχέων της Ακχ έχει νευροπροστατευτικές ιδιότητες τουλάχιστον σε ορισμένες περιοχές του εγκεφάλου (Lyeth and Hayes 1992).

Οι ΚΕΚ επιδρούν άμεσα στο συμπαθητικο-επινεφριδιο-τροποποιητικό άξονα, μέσω του οποίου ρυθμίζεται η αύξηση της ενδοκρανιακής πίεσης. Οι συγκεντρώσεις της Επινεφρίνης (Ε), Νορεπινεφρίνης (NE) και της Ντοπαμίνης (NT) συσχετίζονται με τη σοβαρότητα του τραυματισμού και έχει προταθεί να χρησιμοποιούνται ως δείκτες της παθολογίας του τραύματος. Μετά από τραυματισμό του φλοιού των ημισφαιρίων σε πειραματόζωα έχει παρατηρηθεί αύξηση των εξωκυττάριας συγκεντρώσεων της NE, ακόμη και στον υποθάλαμο,

πιθανώς μέσω της ενεργοποίησης διαφόρων νευρικών οδών που καταλήγουν σε αυτόν (McIntosh et al. 1994). Επιπροσθέτως, μετά από ΚΕΚ έχει εντοπισθεί ενεργοποίηση του σεροτονινεργικού συστήματος. Μάλιστα, σε περιοχές του φλοιού τραυματισμένων πειραματοζώων η αύξηση της σύνθεσης σεροτονίνης ταυτίζεται χρονικά με την ελάχιστη χρήση γλυκόζης (Tsuki et al. 1995).

Μεταβολές σε ιόντα.

Μεταβολή της ομοιόστασης των ιόντων ασβεστίου έχει παρατηρηθεί σε πολλά μοντέλα ΚΕΚ και θεωρείται πως αποτελεί βασικό παράγοντα εκφύλισης του ιστού. Στις τραυματισμένες περιοχές του εγκεφάλου εμφανίζεται σημαντική αύξηση των συγκεντρώσεων των Ca^{2+} για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά τον τραυματισμό. Επίσης, ο τραυματισμός του εγκεφάλου επάγει την έκφραση συγκεκριμένων ασβεστοεξαρτώμενων γονιδίων, όπως το c-fos, το c-jun και το γονίδιο της καλμπαϊντίνης.

Σε αντίθεση με το ασβέστιο, τα ιόντα μαγνησίου μειώνονται σημαντικά μετά από ΚΕΚ. Τα Mg^{2+} είναι απαραίτητα σε διάφορες λειτουργίες, όπως η σύνθεση DNA και RNA, η γλυκόλυση και η οξειδωτική φωσφορυλίωση. Επίσης, τα ιόντα μαγνησίου ρυθμίζουν τη διατήρηση της κλίσης στη συγκέντρωση άλλων ιόντων, όπως των ιόντων καλίου και νατρίου. Η μετατραυματική μείωση των επιπέδων των Mg^{2+} επιφέρει διατάραξη της κλίσης συγκέντρωσης των K^{+} και Na^{+} και οδηγεί στη δημιουργία οιδημάτων. Άλλες επιπλοκές από τη μείωση των ιόντων μαγνησίου είναι η ελαττωμένη χρήση γλυκόζης, ο περιορισμός της πρωτεϊνοσύνθεσης και η αύξηση της συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου, όλα φαινόμενα που συντείνουν στην εμφάνιση νευροεγκευλιστικών συνεπειών. Η καλά στοιχειοθετημένη σύνδεση της συγκέντρωσης των εξωκυττάρων ιόντων μαγνησίου με τις συνέπειες του τραυματισμού οδήγησαν στην πρόταση της χρήσης τους ως προγνωστικού δείκτη (Heath and Vink 1999).

Μελέτες ενδοκρανιακής διαπίδυσης, έχουν αποκαλύψει ένα ευρύ κύμα εξόδου από το κύτταρο ιόντων καλίου μετά από ΚΕΚ, το οποίο συνδέεται με τη διάδοση δυναμικών εκπόλωσης. Εκτός όμως από τις μεταβολές στην ηλεκτροφυσιολογική κατάσταση του εγκεφαλικού ιστού, η αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων καλίου επιφέρει επίσης αλλαγές στη δομή των κυτταρικών μεμβρανών, μεταβολικές και συναπτικές δυσλειτουργίες και σημαντική διαταραχή της ενεργειακής ομοιόστασης. Επίσης, καθώς η απομάκρυνση των ιόντων αυτών από το μεσοκυττάριο χώρο επιτελείται από τα αστρογλοιακά κύτταρα, η αυξημένη συγκέντρωσή τους οδηγεί σε τοπικά οιδήματα των γλοιϊών κυττάρων και αυτά με τη σειρά τους εμποδίζουν την ομαλή οξυγόνωση των νευρώνων και συμβάλλουν στην τοπική καταστροφή των αξόνων (D'Ambrosio et al. 1999).

5.2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ.

Το κυριότερο πρόβλημα, σε κάθε περίπτωση τραυματισμού είναι ο θάνατος των κυττάρων του ιστού. Κάθε μοριακή αντίδραση μελετάται κυρίως στο επίπεδο της επίδρασής της στο θάνατο ή την επιβίωση των κυττάρων. Μετά από τραυματισμό μπορούν να διακριθούν τρεις τύποι κυτταρικού θανάτου: α) Η άμεση, μηχανική (όταν υπάρχει τέτοιος είδους βλάβη) καταστροφή των κυττάρων, β) η

νεκρωτικού τύπου εκφύλιση τους και γ) ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, κυρίως με τη μορφή της απόπτωσης. Είναι πλέον σαφές πως ο νεκρωτικός και ο αποπτωτικός (προγραμματισμένος) κυτταρικός θάνατος, διαφέρουν μεταξύ τους όσον αφορά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους -είναι δηλαδή δύο διαφορετικές οδοί καταστροφής των κυττάρων- αλλά και όσον αφορά το χρόνο εμφάνισής τους, τους κυτταρικούς πληθυσμούς στους οποίους εντοπίζονται και τα αίτια επαγωγής τους (Portera-Cailliau et al. 1997, Rink et al. 1995, Portera-Cailliau et al. 1995).

Η νέκρωση εμφανίζεται, ανατομικά, πολύ κοντά στο τραύμα, χρονικά περιορίζεται στις πρώτες ώρες μετά το περιστατικό και αφορά όλους τους τύπους κυττάρων (νευρικά και γλοία). Τα κύρια μορφολογικά χαρακτηριστικά της είναι η αρχική διόγκωση του κυττάρου, η πυκνωτική μορφή του πυρήνα και στη συνέχεια η ρήξη της πυρηνικής και κυτταρικής μεμβράνης. Σε βιοχημικό επίπεδο παρατηρείται, στα αρχικά στάδια, αυξημένη κυτταροπλασματική συγκέντρωση ιόντων Ca^{2+} και στη συνέχεια αποικοδόμηση της χρωματίνης (Bredesen 1995, Majno and Joris, 1995). Η λύση του κυττάρου μετά το θάνατό του οδηγεί στην απελευθέρωση των κυτταροπλασματικών συστατικών του στο μεσοκυττάριο χώρο, φαινόμενο το οποίο είναι υπεύθυνο για την επαγωγή τοπικών οιδημάτων (κυρίως λόγω της δράσης της περίσσειας νευροδιαβιβαστών και της μεταβολής των τοπικών συγκεντρώσεων των ιόντων). Για αυτόν το λόγο, το φαινόμενο της νέκρωσης εντοπίζεται συνήθως σε ομάδες γειτονικών κυττάρων.

Από την άλλη μεριά, το φαινόμενο της απόπτωσης πρωτοεμφανίζεται μαζί με τη νέκρωση, μετά από τραυματισμό του εγκεφάλου, αλλά συνεχίζει να παρατηρείται ακόμη και σε χρονικό διάστημα που ξεπερνά τη μία εβδομάδα (Conti et al. 1998). Εμφανίζει εξάπλωση σε ανατομικά απομακρυσμένες δομές, αφορά δε και αυτή όλους τους κυτταρικούς τύπους. Για αυτούς τους λόγους ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος έχει χαρακτηριστεί ως το σημαντικότερο δευτερογενές κύμα καταστροφής του ιστού, του οποίου η μέγιστη ένταση παρατηρείται 24 έως και 72 ώρες μετά τον τραυματισμό, αλλά συνεχίζει να εκδηλώνεται για μεγάλα χρονικά διαστήματα (Kharlamov et al. 1996, Rink et al. 1995, Portera-Cailliau et al. 1995, Conti et al. 1998). Το χαρακτηριστικό της καθυστέρησης της μέγιστης επαγωγής της απόπτωσης, σε συνδυασμό με το γεγονός πως πρόκειται για ενεργητικό τρόπο θανάτου ο οποίος απαιτεί καινούρια πρωτεϊνοσύνθεση και την ενεργοποίηση συγκεκριμένων βιοχημικών οδών, την καθιστά κύριο στόχο όλων των θεραπευτικών στρατηγικών για τον περιορισμό των συνεπειών του εγκεφαλικού τραυματισμού.

Ο Kerr το 1972 ήταν αυτός που εισήγαγε τον όρο «απόπτωση», μελετώντας ωοθυλακικά κύτταρα. Η επαγωγή αυτού του τύπου κυτταρικού θανάτου ρυθμίζεται από τη δράση συγκεκριμένων εξωγενών παραγόντων ή την αυτοτελή ενεργοποίηση ενδογενών βιοχημικών οδών από κάποια τοξίνη ή φαρμακευτική ουσία. Η απόπτωση χαρακτηρίζεται μορφολογικά από την αρχική συμπίκνωση του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος και τη μετέπειτα διάσπασή του σε πολλά σωματίδια (πυκνωτικά αποπτωτικά σωματίδια) τα οποία περιβάλλονται από κυτταρική μεμβράνη και περιέχουν υπολείμματα του πυρήνα και των οργανιδίων. Στη συνέχεια τα σωματίδια αυτά φαγοκυτταρώνονται από γειτονικά μακροφάγα κύτταρα, έτσι ώστε να αποφευχθεί η διάχυση στον μεσοκυττάριο χώρο μορίων τα οποία θα μπορούσαν να οδηγήσουν στη δημιουργία φλεγμονής. Εξάλλου, η διαδικασία του

αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου συντελεί στον έλεγχο των κυτταροτοξικών συνεπειών και τον τοπικό περιορισμό της βλάβης. Τα αποπτωτικά κύτταρα, σε αντίθεση με τα νεκρωτικά, εντοπίζονται συνήθως μεμονωμένα και όχι σε ομάδες. Το βασικό βιοχημικό χαρακτηριστικό της απόπτωσης είναι η επιλεκτική πέψη της χρωματίνης από συγκεκριμένες ενδονουκλεάσες, σε ειδικά σημεία ανάμεσα στα νουκλεοσώματα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία θραυσμάτων χρωματίνης μεγέθους 180- 200 ζευγών βάσεων ή και πολλαπλασίων τους. Η ηλεκτροφόρηση του DNA των αποπτωτικών κυττάρων εμφανίζει τη χαρακτηριστική εικόνα του διανουκλεοσωμικά τμημένου DNA (ladder), η οποία αποτελεί ένα βασικό κριτήριο αναγνώρισης του φαινομένου (Bredesen 1995, Portera-Cailliau et al. 1995, Brune et al. 1997).

Υπάρχουν συγκεκριμένα γονίδια η έκφραση των οποίων έχει συνδεθεί άμεσα με την επαγωγή ή την αναστολή της απόπτωσης. Το γονίδιο το οποίο κατέχει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση του φαινομένου της απόπτωσης στα θηλαστικά θεωρείται πως είναι το *bcl-2*, του οποίου η δράση είναι αντιαποπτωτική. Η συνεχής έκφραση του *bcl-2* μετά από κατάλληλη επιμόλυνση κυττάρων έχει αποδειχθεί προστατευτική για το κύτταρο από ποικίλους τοξικούς παράγοντες. Στην ουσία υπάρχει μία οικογένεια συγγενικών στο *bcl-2* γονιδίων, όπως τα *Bax* και *Bax-x_l* των οποίων η συντονισμένη έκφραση είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση της απόπτωσης. Για παράδειγμα, η περίσσεια του *bcl-2*, σε σχέση με το *Bax*, ευνοεί την επιβίωση του κυττάρου, ενώ η αντίστροφη κατάσταση προάγει τον κυτταρικό θάνατο. Η έκφραση τόσο του γονιδίου *bcl-2* όσο και του *Bax* μεταβάλλεται μετά από ΚΕΚ σε πειραματόζωα (Hughes et al. 1996, Clark et al. 1997) και σε ανθρώπους (Ng et al. 2000). Και για τα δύο γονίδια έχουν περιγραφεί περιπτώσεις αναστολής της μεταγραφής τους βραχυπρόθεσμα μετά τον τραυματισμό και στη συνέχεια δραματικής αύξησης της έκφρασής τους. Φαίνεται όμως πως το *bcl-2* επάγεται σε κύτταρα ανθεκτικά στον τραυματισμό, τα οποία δεν είναι θετικά σε αποπτωτικούς δείκτες (αντίδραση TUNEL), σε αντίθεση με το *Bax*, του οποίου η έκφραση ταυτίζεται με την έκφραση του αποπτωτικού, ογκοκατασταλτικού γονιδίου *p53* και με μορφολογικά χαρακτηριστικά απόπτωσης. Το γεγονός πάντως πως και τα δύο γονίδια, αν και έχουν αντίθετη δράση, παρουσιάζουν την ίδια κινητική όσον αφορά στη μεταγραφική τους δραστηριότητα αποκαλύπτει πως υπάρχουν ακόμη αρκετές πτυχές της λειτουργίας τους οι οποίες παραμένουν αδιευκρίνιστες.

Ένα ακόμη χαρακτηριστικό παράδειγμα γονιδίου το οποίο συμμετέχει στη ρύθμιση του φαινομένου του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου είναι το *p53*. Πρόκειται για ένα γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί για μία φωσφοπρωτεΐνη η οποία ενέχεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, τη διαφοροποίηση του κυττάρου και τον κυτταρικό θάνατο. Το *p53* αναφέρεται συχνά ως το γονίδιο «φρουρός» του γονιδιώματος του κυττάρου. Η μεταγραφή του ενεργοποιείται σε περιπτώσεις επίδρασης στο κύτταρο παραγόντων οι οποίοι επηρεάζουν το DNA και την πιστότητα της αντιγραφής του, οδηγώντας για παράδειγμα στη μετάλλαξη συγκεκριμένων αλληλουχιών. Το *p53* συμμετέχει και ρυθμίζει το μηχανισμό που είναι υπεύθυνος για τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και την έναρξη της διαδικασίας επιδιόρθωσης του γενετικού υλικού. Όταν οι βλάβες στο DNA είναι μεγάλης έκτασης, τότε επάγει το θάνατο του κυττάρου ώστε να αποφευχθεί η

πιθανότητα να μετατραπεί σε ένα ανεξέλεγκτα διαιρούμενο (όπως τα καρκινικά) κύτταρο. Μετά από τραυματισμό του εγκεφάλου εντοπίζεται επαγωγή στην έκφραση του γονιδίου p53 (Chopp et al. 1992, Napijalsky et al. 1999, Ng et al. 2000) η οποία συνδέεται ανατομικά και χρονικά με τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο τόσο των νευρικών (Hughes et al. 1996) όσο και των ολιγοδενδρογλοιακών κυττάρων.

Τέλος, όσον αφορά τον ενδοκυττάριο μοριακό μηχανισμό ρύθμισης του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, πρέπει να σημειωθεί η συμμετοχή μιάς άλλης κατηγορίας γονιδίων, των κασπασών. Οι κασπάσες είναι μία οικογένεια πρωτεασών οι οποίες ενεργοποιούνται κατά τη διαδικασία του αποπτωτικού θανάτου και είναι υπεύθυνες για ένα μεγάλο μέρος της ελεγχόμενης αποικοδόμησης των συστατικών του κυττάρου. Χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ανενεργών μορφών, δηλαδή προενζύμων. Η ενεργοποίηση αυτών των πρόδρομων μορίων επιτυγχάνεται μέσω της δράσης άλλων πρωτεασών. Τα πεπτίδια που προκύπτουν από τη διάσπαση των προενζύμων σχηματίζουν διμερή ή τετραμερή ενεργά σύμπλοκα τα οποία έχουν τη δυνατότητα να κόβουν τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες σε κάθε αμινοξύ μετά από ασπαρτικό οξύ. Ορισμένα χαρακτηριστικά μόρια υποστρώματα των κασπασών είναι το PARP (poly ADP-ribose polymerase), η λαμινίνη A και η DNA τοποϊσομεράση (Yuan and Horvitz 1990). Η αναστολή των κασπασών μετά από εγκεφαλικό τραυματισμό οδηγεί στη μείωση του εύρους της καταστροφής του ιστού και στην ταυτόχρονη ελάττωση της παραγωγής ελευθέρων ριζών (Fink et al. 1999). Παρόμοια φαινόμενα έχουν επίσης παρατηρηθεί μετά από τραυματισμό ζώων με γενετικά τροποποιημένη μείωση της έκφρασης της κασπάσης-1 (Fink et al. 1999).

Με τον κυτταρικό θάνατο γενικότερα σχετίζονται και άλλα φαινόμενα (τόσο ενδοκυττάρια όσο και εξωκυττάρια), όπως η αυξημένη συγκέντρωση ελευθέρων ριζών, η εξωκυττάρωση των νευροδιαβιβαστών, η ισορροπία των ιόντων (π.χ. ασβεστίου, μαγνησίου) και βεβαίως η δράση νευροτροφικών και αυξητικών παραγόντων. Μετά από τον τραυματισμό η αθρόα απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών και κυρίως γλουταμικού (η οποία σε μεγάλο βαθμό είναι παθητική λόγω της ρήξης των κυτταρικών μεμβρανών των νεκρωτικών νευρικών κυττάρων) έχει συνδεθεί άμεσα με φαινόμενα κυτταροτοξικότητας (Portera-Cailliau et al. 1997, Portera-Cailliau et al. 1995). Στο μηχανισμό των φαινομένων αυτών σημαντικό ρόλο παίζει η διαταραχή της ισορροπίας των ιόντων Ca^{++} , των οποίων η είσοδος στο κυτταρόπλασμα -μετά από τη δράση του γλουταμικού στους υποδοχείς του- αυξάνεται δραματικά (Ivkovic et al. 1997). Η έντονη ενδοκυτταρική παρουσία των ιόντων Ca^{++} ενεργοποιεί δευτερογενή μηνύματα, αποτέλεσμα των οποίων είναι και η εκκίνηση των μηχανισμών προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Dubinsky and Rothman 1991).

Ένας ακόμη πολύ σημαντικός παράγοντας ο οποίος συνδέεται με τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο μετά από τραυματισμό του εγκεφάλου είναι η παρουσία ελευθέρων ριζών (Chopp et al. 1996). Οι ελεύθερες ρίζες έχουν την ιδιότητα να προκαλούν βλάβες στο γενετικό υλικό των κυττάρων. Όταν η παρουσία τους ξεπερνάει συγκεκριμένα όρια ο μηχανισμός που διαθέτουν τα κύτταρα για την επιδιόρθωση των «λαθών» του DNA δεν επαρκεί, με αποτέλεσμα να επάγεται ο θάνατός τους. Πρέπει να σημειωθεί πως τα νευρικά κύτταρα εμφανίζουν μικρότερο

ρυθμό επιδιόρθωσης του γενετικού τους υλικού σε σχέση με τα αστρογλοιακά (Chopp et al. 1996) και συνεπώς είναι πιο εύαλота στη δράση των ελευθέρων ριζών. Η δράση των ελευθέρων ριζών στην περιοχή του τραύματος έχει επιβεβαιωθεί από πολλές ομάδες. Οι Layton et al. (1997) κατέγραψαν σημαντική αύξηση της παρουσίας υπεροξειδίου του οξυγόνου (H_2O_2) μετά από διεσδυτικό εγκεφαλικό τραυματισμό, δηλαδή ενός μορίου του οποίου η φυσιολογική διάσπαση οδηγεί στην παραγωγή ριζών O^{\cdot} . Επίσης, έχει αποδειχθεί αυξημένη παρουσία του NO και των παραγώγων του (NO_2^{\cdot} , NO_3^{\cdot}) –δηλαδή μιας άλλης κατηγορίας μορίων που μπορεί να δώσουν ελεύθερες ρίζες- μετά από εγκεφαλικούς τραυματισμούς (Malinski et al. 1993, Kumura et al. 1994, Yamanaka et al. 1995). Η αυξημένη εντόπιση NO υποδηλώνεται και από την μετατραυματικά παρατηρούμενη αύξηση της παρουσίας τόσο της επαγόμενης όσο και της νευρωνικής ισομορφής της συνθετάσης του NO (neuronal Nitric Oxide Synthase/ NOS) (D'Ambrosio et al. 1998, Grzybicki et al. 1998). Επιπλέον, η χορήγηση Δεξαμεθαζόνης για την αναστολή του καταρράκτη των αντιδράσεων που οδηγούν στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών οδήγησε σε μείωση της έκτασης και έντασης της βλάβης του ιστού μετά από τραυματισμό (Ekert et al. 1997).

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι μία διαδικασία κρίσιμης σημασίας κατά τη διαδικασία της ανάπτυξης. Με αυτόν επιτυγχάνεται ο έλεγχος του αριθμού των κυττάρων ενός ιστού, η διαμόρφωση της αρχιτεκτονικής του και η απομάκρυνση μεταλλαγμένων κυττάρων (Thompson 1995). Από την άλλη μεριά, η αδυναμία έλεγχου του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου μπορεί να έχει καταστροφικές συνέπειες για τον οργανισμό και συχνά χαρακτηρίζει παθολογικές συνθήκες, κατ' εξοχήν τις νεοπλασίες αλλά και τις νευροεγκεφαλίστικες ασθένειες του ΚΝΣ (Πίνακας 5.2.1).

Το φαινόμενο του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου με τη μορφή της απόπτωσης, έχει διερευνηθεί σε πολλά μοντέλα εγκεφαλικού τραυματισμού. Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από αυτές τις μελέτες είναι συχνά αντιφατικά και η προσπάθεια αξιολόγησης του φαινομένου δυσχεραίνεται από την ουσιαστική δυσκολία να διαχωρισθεί σαφώς το φαινόμενο της απόπτωσης από αυτό της νέκρωσης. Στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο, ο μηχανικός τραυματισμός φαίνεται πως επιφέρει δύο κύματα κυτταρικού θανάτου. Το ένα, αμέσως μετά το τραύμα, περιγράφηκε ως νεκρωτικού τύπου εκφύλιση των κυττάρων. Το δεύτερο κύμα, το οποίο εντοπίστηκε τουλάχιστον 6 ώρες μετά τον τραυματισμό και σε πιο απομακρυσμένες περιοχές, είχε τα χαρακτηριστικά της απόπτωσης (Pohl et al. 1999). Σε ισχαιμικά μοντέλα τραύματος σε ανήλικους επίμυς έγινε δυνατή η διάκριση διαφορετικών φαινομένων κυτταρικού θανάτου. Μετά από ήπιο ισχαιμικό επεισόδιο, ο αποπτωτικός θάνατος κυττάρων στην περιοχή της ισχαιμίας εμφανίζεται με καθυστέρηση τριών ημερών (Beilharz et al. 1999). Αντιθέτως, η ίδια ομάδα, παρατήρησε μείωση του χρόνου εμφάνισης του φαινομένου, όταν το τραυματικό γεγονός ήταν πιο σοβαρό (ισχαιμία 60 λεπτών). Ακόμα και σε αυτήν την περίπτωση όμως, η εμφάνιση αποπτωτικών κυττάρων δεν παρατηρήθηκε ταυτόχρονα σε όλες τις δομές (η μεγαλύτερη καθυστέρηση αφορούσε το φλοιό).

Ασθένειες που συνδέονται με αναστολή του φαινομένου της Απόπτωσης	Ασθένειες που συνδέονται με ενίσχυση του φαινομένου της Απόπτωσης
1) ΝΕΟΠΛΑΣΙΕΣ Λεμφώματα ωοθυλακίων Καρκινώματα με μεταλλάξεις του γονιδίου p53 Ορμονοεξαρτώμενοι όγκοι Καρκίνος μαστού Καρκίνος προστάτη Καρκίνος ωοθηκών	1) AIDS 2) ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ Alzheimer's Parkinson's Amyotrophic Lateral Sclerosis Εκφύλιση παρεγκεφαλίδας
2) ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ Συστηματικός ερυθματώδης λύκος Αυτοάνοση σπειραματονεφρίτιδα	3) ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ Απλαστική αναιμία
3) ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ Λοιμώξεις ιού Herpes Λοιμώξεις Αδενοϊών	4) ΙΣΧΑΙΜΙΚΑ ΕΠΕΙΣΟΔΙΑ Απόφραξη μυοκαρδίου Εγκεφαλικό επεισόδιο
	5) ΗΠΙΑΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΟΞΙΝΕΣ Αλκοόλ

Πίνακας 5.2.1. Νοσήματα που συνδέονται με το φαινόμενο της απόπτωσης

[Προσαρμογή πίνακα από Thompson 1995]

Η εκδήλωση του φαινομένου της απόπτωσης σε δύο διακριτές χρονικά φάσεις έχει περιγραφεί και στον ενήλικο εγκέφαλο. Σε ένα μοντέλο μηχανικού τραυματισμού το πρώτο στάδιο απόπτωσης εμφανίστηκε στις 12 ώρες μετά το τραύμα, ακολούθησε μία περίοδος ύφεσης του φαινομένου και στη συνέχεια ένα δεύτερο κύμα απόπτωσης με διαφορετικά χρονικά χαρακτηριστικά σε κάθε περιοχή (φλοιός, υπόκαμπος και λευκή ουσία) (Conti et al. 1998). Άλλες ερευνητικές ομάδες αναφέρουν αποπτωτικό θάνατο νευρικών και άλλων τύπων κυττάρων μετά τις 12 ώρες και με χρονική επέκταση του φαινομένου για περίοδο μίας εβδομάδας ή και ενός μήνα (Portera-Cailliau et al. 1995, Rink et al. 1995, Kharlamov et al. 1996).

5.3. ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ IGFs, IGFbPs ΚΑΙ IGF-IR.

Οι Ινσουλινοειδείς Αυξητικοί Παράγοντες I και II (Insulin- like Growth Factors I και II), είναι σημαντικοί τροφικοί παράγοντες. Πρόκειται για πολυπεπτίδια τα οποία εκφράζονται σχεδόν σε όλους τους ιστούς, τόσο στα τρωκτικά όσο και στον άνθρωπο, η μέγιστη όμως ποσότητά τους εντοπίζεται στην αιματική κυκλοφορία. Το όργανο στο οποίο κυρίως παράγονται είναι το ήπαρ. Παρουσιάζουν δομική και λειτουργική ομολογία με την ινσουλίνη και το πρόδρομο μόριό της, την προ-ινσουλίνη, όπως παρόμοια είναι και η δομή των υποδοχέων τους. Σε γενικές γραμμές, η οικογένεια αυτών των παραγόντων εμφανίζει δράση ρυθμιστική του

μεταβολισμού καθώς και επαγωγής του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης. Τα βασικά στοιχεία που συνιστούν τον άξονα δράσης των IGFs είναι: **A)** Οι ίδιοι οι τροφικοί παράγοντες, **B)** οι υποδοχείς τους και **Γ)** Οι συνδεδεμένες στους IGFs πρωτεΐνες (Insulin-like Growth Factor Binding Proteins) IGFbps.

5.3.1. IGF-I.

Ο IGF-I είναι ένας αυξητικός και τροφικός παράγοντας με έντονα πλειοτροπική δράση. Η αρχική αντίληψη για τη λειτουργία του είτε στους περιφερικούς ιστούς, είτε στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα περιοριζόταν στο σύστημα της ινσουλίνης και στη διαμεσολάβηση της δράσης της αυξητικής ορμόνης. Είναι γνωστό πως η αυξητική ορμόνη επάγει την παραγωγή IGF-I, ο οποίος με τη σειρά του αναστέλλει την περαιτέρω σύνθεση αυξητικής ορμόνης, επάγει τη σύνθεση πρωτεϊνών και ενεργοποιεί την πρόσληψη γλυκόζης από τα κύτταρα. Προγεννητικά οι IGFs, οι οποίοι αναφέρονταν παλαιότερα και ως σωματομεδίνες, αποτελούν τους κύριους αυξητικούς παράγοντες ακόμη και πριν την έναρξη έκκρισης της αυξητικής ορμόνης (de Pablo and de la Rosa 1995). Όσον αφορά τη δράση του IGF-I ως ρυθμιστή του μεταβολισμού στο ΚΝΣ πρέπει να διευκρινισθεί πως αυτή περιορίζεται, μόνο στην περίοδο της ανάπτυξης και όχι στον ενήλικο οργανισμό. Ο IGF-I ανακτά την ιδιότητα του ρυθμιστή του μεταβολισμού των νευρικών κυττάρων στον εγκέφαλο του ενήλικα σε περιπτώσεις τραυματισμών. Αξίζει να προστεθεί πως η παρουσία ινσουλίνης στον εγκέφαλο είναι πολύ περιορισμένη, καθώς η είσοδος της μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού είναι μικρή, όπως αντίστοιχα μικρή είναι και η τοπική παραγωγή της.

Σύμφωνα με καινούρια πειραματικά δεδομένα ο ρόλος του IGF-I είναι πιο ευρύς. Η διαφοροποίηση νευρώνων του φλοιού και της παρεγκεφαλίδας (Sherrard 1997), η επαγωγή της απελευθέρωσης ακετυλοχολίνης από νευρικά κύτταρα του υποκάμπτου και του φλοιού και η ενίσχυση του πολλαπλασιασμού των ολιγοδενδροκυττάρων (McMoris and Dubois- Dalcq 1988) είναι ορισμένες από τις πρόσθετες λειτουργίες του. Στην μεγάλη ποικιλία των δράσεων του IGF-I μπορεί να προστεθεί επίσης η αύξηση της αιματικής ροής στους σκελετικούς μυς και σε άλλα όργανα καθώς και η μείωση της αγγειακής αντιστάσεως, ακόμη και στον εγκέφαλο (Gillespie et al. 1997).

Σημαντικά στοιχεία έχουν συσσωρευτεί τα τελευταία χρόνια σχετικά με την έκφραση των IGFs κατά την ανάπτυξη του ΚΝΣ. Συγκεκριμένα, ο IGF-I εκφράζεται σε νευρικά και γλοία κύτταρα και ο IGF-II κυρίως σε κύτταρα των μηνίγγων και του χοριοειδούς πλέγματος (de Pablo and de la Rosa 1995). Το mRNA του IGF-I αρχίζει να εντοπίζεται με την τεχνική της *in situ* υβριδοποίησης μετά το στάδιο του γαστριδίου, και η μέγιστη ποσότητά του παράγεται στην ύστερη οργανογένεση σε διάφορες περιοχές του ΚΝΣ όπως ο σφρητικός βολβός, ο υπόκαμπος και ο υποθάλαμος (de Pablo and de la Rosa 1995). Πρέπει πάντως να σημειωθεί πως η παρουσία του IGF-I στον εγκέφαλο του εμβρύου ακόμη και στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης, όταν η τοπική σύνθεσή του δεν έχει ξεκινήσει, εξασφαλίζεται με την είσοδό του από την κυκλοφορία μέσω του Εγκεφαλονωτιαίου Υγρού. Με αυτόν τον τρόπο το ΚΝΣ δεν στερείται της δράσης ενός πολύ

σημαντικού παράγοντα, απαραίτητο για την ομαλή ρύθμιση του μεταβολισμού όλων των τύπων κυττάρων.

Το mRNA του IGF-II εντοπίζεται επίσης σε μεγάλες ποσότητες στον εγκέφαλο των εμβρύων, κυρίως σε κύτταρα μεσοδερμικής προέλευσης. Στον ενήλικα η παραγωγή IGF-II μειώνεται σημαντικά και περιορίζεται μόνο στο χοριοειδές πλέγμα και στη λεπτομήνιγγα (Stylianopoulou et al. 1988a,b).

Δεδομένα από μελέτες σε πρωτογενείς καλλιέργειες εμβρυικών κυττάρων δείχνουν πως ο IGF-I παίζει σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες του πολλαπλασιασμού των πρόδρομων νευρικών και γλοιακών κυττάρων και αργότερα στη διαφοροποίησή τους. Είναι πιθανόν πως ο έλεγχος των παραπάνω διαδικασιών από τον IGF-I γίνεται μέσω της συμμετοχής του στη ρύθμιση του φαινομένου του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωσης). Χρήσιμα δεδομένα προκύπτουν από πειράματα γενετικής τροποποιημένων μυών. Μυς στους οποίους ο IGF-I εκφραζόταν σε υψηλό βαθμό κατά την ανάπτυξη, απέκτησαν εγκέφαλο του οποίου το περιεχόμενο σε μυελίνη ήταν διπλάσιο του φυσιολογικού (Carson et al. 1993, Liu et al. 1993). Επιπροσθέτως, σε παρόμοια γενετικά μοντέλα παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση όχι μόνο στον αριθμό των νευρικών κυττάρων του υποκάμπιου σχηματισμού (αυξημένη νευρογένεση) αλλά και στον αριθμό και την πυκνότητα των συνάψεων (αυξημένη συναπτογένεση) (O'Kusky et al. 2000). Αντιθέτως, η υπο-έκφραση του IGF-I συνοδεύτηκε από φαινόμενα καθυστέρησης της ανάπτυξης, εμφάνισης μειωμένου αριθμού νευρικών κυττάρων, ενώ σε ανθρώπους συνδέεται και με καταστάσεις νοητικής καθυστέρησης (Woods et al. 1996).

Τα παραπάνω στοιχεία υποδηλώνουν πως η παρουσία του IGF-I είναι απαραίτητη τόσο κατά τη ανάπτυξη του εγκεφάλου, όσο και κατά την ενήλικη ζωή. Δεν αποτελεί επομένως έκπληξη η αναφορά πειραματικών εργασιών σύμφωνα με τις οποίες τα εκφυλιστικά φαινόμενα που χαρακτηρίζουν τη γήρανση του ΚΝΣ (μείωση στη πρωτεϊνοσύνθεση και στη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων, μεταβολές στη νευροδιαβίβαση, μείωση του αριθμού των αιμοφόρων αγγείων), ταυτίζονται χρονικά με τη μείωση στην έκφραση του IGF-I και του υποδοχέα του (Sonntag et al. 1997 και 1999). Ταυτόχρονα, από άλλες ομάδες προτείνεται η ενίσχυση του άξονα Αυξητικής ορμόνης- IGF-I για την αντιμετώπιση των νοητικών δυσκολιών που προκύπτουν κατά τη γήρανση (Markowska et al. 1998).

Είναι λοιπόν γνωστό πώς ο IGF-I είναι απαραίτητος στον εγκέφαλο σε όλα τα στάδια της ζωής του οργανισμού. Η εξακρίβωση όμως της κυτταρικής εντόπισης του IGF-I στον εγκέφαλο αποτέλεσε αντικείμενο πολλών ερευνών. Έχει πλέον πολλαπλώς δειχθεί πως ο IGF-I συντίθεται σε νευρικά και γλοιακά κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα με τη μέθοδο της *in situ* υβριδοποίησης το mRNA του IGF-I εντοπίζεται σε τρεις κυρίως περιοχές του ενήλικου εγκεφάλου τοθ επίμυ. Στους οσφρητικούς βολβούς, στον υπόκαμπο (και κυρίως στην οδοντωτή έλικα και τα πυραμιδικά κύτταρα των CA1 και CA2 περιοχών) και στην παρεγκεφαλίδα (Werther et al. 1990). Πρέπει να σημειωθεί πως τα υψηλά, κατά τη εμβρυική περίοδο, επίπεδα έκφρασης του παράγοντα μειώνονται αισθητά με την ενηλικίωση, σε όλον τον εγκεφαλικό ιστό, με εξαίρεση δομές όπως ο οσφρητικός βολβός, ο φλοιός και ο υπόκαμπος (Garcia- Segura et al. 1991). Επίσης, υψηλές ποσότητες IGF-I παράγονται από τον υποθάλαμο και την υπόφυση, στα όργανα δηλαδή που

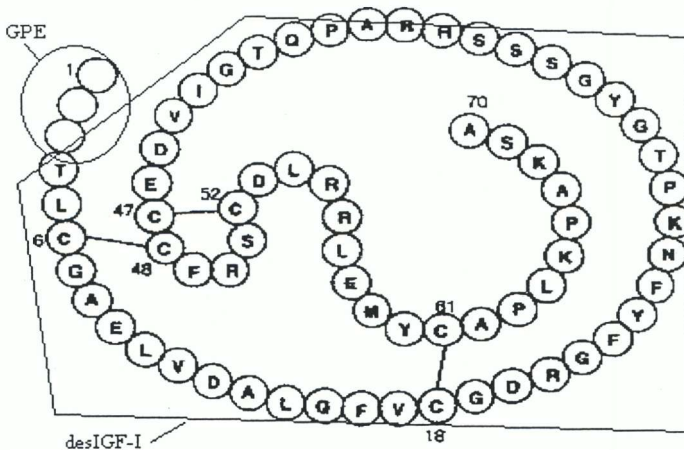
παράγεται, εκκρίνεται και δρα η αυξητική ορμόνη Εκτός από τα νευρικά και γλοιακά κύτταρα, μία άλλη κατηγορία κυττάρων η οποία επίσης συνεισφέρει, ίσως και περισσότερο, στην παραγωγή του IGF-I στο ΚΝΣ είναι τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Αρχικά προσδιορίστηκε πως ο IGF-I παράγεται σε περιφερικά αγγεία. όπως αυτά της καρδιάς μετά από ισχαιμικό επεισόδιο, και παρουσιάζει τροφική δράση όχι μόνο τοπικά στο ενδοθήλιο, αλλά και στους γειτονικούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των νευρικών κυττάρων (Hansson et al. 1987). Το 1999 οι Sonntag et al. έδειξαν πως ο IGF-I εκφράζεται σε υψηλό βαθμό και στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων του νεοφλοιού. Η επιβεβαίωση της τοπικής παραγωγής IGF-I στον εγκεφαλικό ιστό, σε συνδυασμό με πειραματικά αποτελέσματα που δείχνουν μεγάλο βαθμό επικάλυψη των περιοχών έκφρασης του IGF-I με τις περιοχές έκφρασης του τύπου I υποδοχέα των IGFs, ενδυναμώνει το χαρακτηρισμό του ως παράγοντα με αυτοκρινή και παρακρινή δράση. Παρόλα αυτά, το όργανο στο οποίο εντοπίζεται η σημαντικότερη σύνθεση IGF-I είναι το ήπαρ. Ο IGF-I που συντίθεται εκεί ελευθερώνεται στην κυκλοφορία και είναι διαθέσιμος στους διάφορους ιστούς του σώματος. Ο IGF-I φαίνεται πως έχει τη δυνατότητα να περνάει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό καθώς οσον η περιφερική χορήγησή του έχει αποδειχθεί πως επηρεάζει τα επίπεδα των παράγοντα στον εγκέφαλο (Reinhardt and Bondy 1994). Σύμφωνα με πειραματικά δεδομένα (Pan and Kastin 2000) ο IGF-I εισέρχεται στο παρέγχυμα του εγκεφάλου μάλλον μέσω ενός συστήματος μεταφοράς το οποίο χαρακτηρίζεται από κινητική κορεσμού. Πιθανότατα η είσοδος του μεσολαβείται από τους τύπου I υποδοχείς του IGF-I που βρίσκονται στα επιθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών αγγείων του εγκεφάλου (Pardridge 1993). Συνεπώς θεωρείται πολύ πιθανό πως ένα ποσοστό από τα αποθέματα IGF-I που βρίσκονται στην κυκλοφορία εισέρχεται στον εγκέφαλο, είναι όμως δύσκολο να καθορισθεί η έκταση του φαινομένου.

Η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου του IGF-I είναι ένα ακόμη θέμα το οποίο δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί. Η αυξητική ορμόνη και τα γλυκοκορτικοειδή είναι δύο παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου του σε πολλά όργανα και στον εγκέφαλο (Wood et al. 1991). Πιο ειδικά, στο δεύτερο ιντρόνιο του γονιδίου του IGF-I υπάρχει ένα στοιχείο απόκρισης στην αυξητική ορμόνη (responsive element) μέσω του οποίου επιτυγχάνεται επίδραση της αυξητικής ορμόνης, η οποία θεωρείται και ο κύριος ρυθμιστής της παραγωγής του IGF-I. Το στοιχείο αυτό εμφανίζει υπερευαισθησία στη DNAση I (Bichell et al. 1992). Όσον αφορά τα γλυκοκορτικοειδή, μία ευαίσθητη σε αυτά περιοχή έχει εντοπισθεί στον υποκινητή του γονιδίου του IGF-I, η οποία θεωρείται πως προκαλεί αναστολή της έκφρασής του (Delany et al. 1995). Ένας πρόσθετος ρυθμιστής της έκφρασης του γονιδίου του IGF-I είναι ο Επιδερμικός Αυξητικός Παράγοντας (Epidermal Growth Factor/ EGF), κυρίως σε καλλιέργειες αστροκυττάρων (Chernausek 1993). Εκτός όμως από την ορμονική ρύθμιση, πειραματικά δεδομένα στηρίζουν την υπόθεση της επίδρασης της γλουταματεργικής νευροδιαβίβασης (Nordqvist et al. 1997) καθώς και της διατροφής και πιο συγκεκριμένα των αμινοξέων, στη ρύθμιση του συστήματος του IGF-I (Thissen et al. 1994).

Η διαφορική μεταγραφή του γονιδίου του IGF-I είναι μία ακόμη διαδικασία στην οποία επιδρούν οι παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφρασή του. Ο IGF-I κωδικοποιείται από ένα πολύπλοκο γονίδιο το οποίο απαστελείται από έξι εξόνια.

Δύο από αυτά, το τρίτο και τέταρτο, κωδικοποιούν για το ώριμο πεπτιδίο (Beilharz et al. 1998). Η έναρξη της μεταγραφής σε εναλλακτικές θέσεις έναρξης που εντοπίζονται στα εξόνια 1 και 2 σε συνδυασμό με το διαφορικό μάτισμα στα 3' εξόνια οδηγούν στη δημιουργία ποικίλων μεταγράφων. Για παράδειγμα τα μετάγραφα τύπου Ea φαίνεται πως συνδέονται με την αυτοκρινή/παρακρινή δράση του IGF-I η οποία είναι ανεξάρτητη της επίδρασης της αυξητικής ορμόνης. Από την άλλη μεριά, τα μετάγραφα τύπου Eb συνδέονται με την εξαρτώμενη από την αυξητική ορμόνη ενδοκρινή δράση του IGF-I και χαρακτηρίζουν την ηπατογενή παραγωγή του (Le Roith and Roberts 1991).

Στα μέσα της δεκαετίας του '80, εντοπίστηκε μία διαδικασία μετα-μεταφραστικής τροποποίησης του ώριμου IGF-I. Πρόκειται για την *in vivo* ενζυματική μετατροπή του IGF-I, με την αποκοπή του αμινοτελικού τριπεπτιδίου Γλυκίνη- Προλίνη- Γλουταμικό οξύ (GPE). Η προκύπτουσα μορφή του IGF-I ονομάζεται *des-N(1-3)IGF-I* ή απλώς *desIGF-I* (εικ.5.3.1.α). Σε πολλές περιπτώσεις εμφανίζει αυξημένη δραστηριότητα σε σχέση με το αρχικό μόριο καθώς χαρακτηρίζεται από την ίδια συγγένεια σύνδεσης με τους υποδοχείς των IGFs, αλλά καθώς μόνο το 1% της ποσότητάς του είναι συνδεδεμένο με τις IGFFBPs στο πλάσμα, είναι τελικά πιο εύκολα διαθέσιμο στους ιστούς. Θεωρείται μάλιστα πιθανόν πως αποτελεί ουσιαστικά την ενεργό μορφή του IGF-I. Η ενζυματική μετατροπή του IGF-I συμβαίνει μάλλον κατά τη διαδικασία πρωτεόλυσης του συμπλέγματος IGF-I/IGFBP στο πλάσμα (Ballard et al. 1996).



5.3.1.α. Δομή του πεπτιδίου του IGF-I. Στις θέσεις 1-3 διακρίνεται το τριπεπτιδίο GPE.

[Προσαρμογή σχήματος από Ballard et al. (1996)]

Επιπροσθέτως, πειραματικά δεδομένα αποκαλύπτουν πως και το τριπεπτίδιο το οποίο παράγεται από την εκλεκτική πρωτεόλυση του IGF-I, δηλαδή το GPE, διαθέτει νευροτροποποιητικές ιδιότητες. Το ακραίο (καρβόξυ-τελικό) Γλουταμικό του τριπεπτιδίου συνδέεται με τους υποδοχείς τύπου NMDA του γλουταμικού οξέος. Επίσης, το GPE ενισχύει την απελευθέρωση ιόντων καλίου που προκαλεί η επίδραση της ακετυλοχολίνης σε τομές φλοιού επίμυων. Μικρότερου βαθμού ενισχυτικές ιδιότητες διαθέτει το GPE και ως προς την απελευθέρωση ντοπαμίνης από κύτταρα του ραβδωτού σώματος (Sara et al. 1989). Η διερεύνηση της πιθανής νευροπροστατευτικής δράσης του GPE σε διάφορα μοντέλα ΚΕΚ, κυρίως χημειοτοξικά, έχει δώσει αξιολογικά ευρήματα, τα οποία ενθαρρύνουν την πιθανή μελλοντική φαρμακευτική δοκιμή του (Alexi et al. 1999, Guan et al. 2000b).

5.3.2. Υποδοχείς των IGFs τύπου I (IGF-IR) και II (IGF-IIR).

Η δράση των αυξητικών, τροφικών παραγόντων IGF-I και IGF-II, διαμεσολαβείται από ειδικούς υποδοχείς. Στους τύπου I υποδοχείς συνδέεται κυρίως ο IGF-I και στους τύπου II υποδοχείς ο IGF-II, χωρίς όμως να αποκλείονται ορισμένες αλληλεπιδράσεις.

Οι τύπου I υποδοχείς ανήκουν στην ίδια οικογένεια με τους υποδοχείς της ινσουλίνης. Αποτελούνται από δύο α υπομονάδες οι οποίες είναι γλυκοζυλιωμένες και δύο β διαμεμβρανικές υπομονάδες. Η σύνδεση του αυξητικού παράγοντα γίνεται στην α υπομονάδα. Ακολουθεί η ταχύτατη αυτοφωσφορυλίωση της β υπομονάδας σε συγκεκριμένες θέσεις τυροσινών και στη συνέχεια ένας καταρράκτης αντιδράσεων, ο οποίος περιλαμβάνει ποικίλα δευτερογενή (ras, MEK) και τριτογενή (όπως το c-fos) μηνύματα. Ένα από τα υποστρώματα, το οποίο συνδέεται άμεσα με τους υποδοχείς αυτούς και έχει ευρεία εντόπιση στον εγκέφαλο των επίμυων, είναι η πρωτεΐνη IRS-1 (insulin- receptor substrate- 1) (White et al. 1994) (εικ.5.3.2.α). Η φωσφορυλίωση της IRS-1 αποτελεί το πρώτο βήμα για πολλές από τις δευτερογενείς αντιδράσεις που ακολουθούν τη σύνδεση του IGF-I στους υποδοχείς του. Επίσης, ένα γενικό χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών οι οποίες συνδέονται με τους υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων είναι πως περιέχουν επιτόπους SH2 (src homology2) ή SH3 (src homology 3). Η δυνατότητα λοιπόν διαφορετικών πρωτεϊνών να συνδέονται ενδοκυτταρικά στους ίδιους υποδοχείς είναι υπεύθυνη για την ποικιλία στο αποτέλεσμα της πρόσδεσης διαφορετικών ή και του ίδιου παράγοντα σε ίδιον τύπου υποδοχείς (Schlessinger and Ullrich 1992).

Ορισμένα στοιχεία σε σχέση με τα δευτερογενή μηνύματα που μεσολαβούν τη δράση του IGF-I, μετά τη σύνδεσή του στους υποδοχείς του, έχουν επίσης διεκρινισθεί όσον αφορά το ρόλο του ως ρυθμιστή του μεταβολισμού στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο. Τα πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν πως ο IGF-I αφενός επάγει τη φωσφορυλίωση της κινάσης AKT και αφετέρου επηρεάζει τη δραστηριότητα της εξοκινάσης με τελικό αποτέλεσμα την επαγωγή της αποθήκευσης της γλυκόζης με τη μορφή του γλυκογόνου στον εγκεφαλικό ιστό (Cheng et al. 2000).

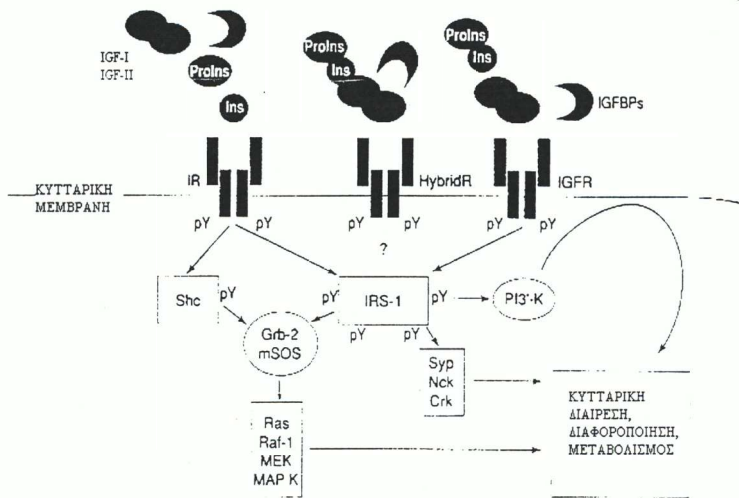
Σε άλλους ιστούς έχουν διερευνηθεί και άλλα μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Σε κύτταρα του μυοκαρδίου, η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από τον IGF-I, συνδέεται με την ενεργοποίηση της οδού της MAP κινάσης και καταλήγει στην επαγωγή της μεταγραφής των p53 και p21 (Wang et al. 1998). Η γενικευμένη εντόπιση των υποδοχέων των IGFs στον ενήλιο εγκέφαλο αποτελεί ένδειξη της σημασίας τους για τη λειτουργία του ΚΝΣ. Εντοπίζονται κυρίως στο χοριοειδές πλέγμα, στο φλοιό και στον υπόκαμπο και συνεντοπίζονται σε μεγάλο βαθμό με τους υποδοχείς ινσουλίνης (Lesniak et al. 1988). Εξίσου όμως και ίσως πιο σημαντική θεωρείται η λειτουργία των υποδοχέων αυτών κατά την ανάπτυξη. Η μέγιστη έκφρασή τους παρατηρείται στις εμβρυικές ημέρες 16 ως 18 (Garofalo et al. 1989). Έχει πολλαπλώς δειχθεί στους επίμυς πως η έκφραση των υποδοχέων των IGFs εντοπίζεται κυρίως σε πληθυσμούς νευρικών κυτταρικών σωμάτων (φαϊά ουσία) (de Pablo and de la Rosa 1995) και συνδυάζεται με την έκφραση του IGF-I.

Η συγκέντρωση των τύπου I υποδοχέων των IGFs στον εγκεφαλικό ιστό μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας, με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η δραστηριότητα του συστήματος των IGFs. Το φαινόμενο αυτό είναι ίσως εν μέρει υπεύθυνο για ορισμένες δυσλειτουργίες και μεταβολικές τροποποιήσεις που υφίσταται το γερασμένο νευρικό σύστημα (D'Costa et al. 1995).

Στον εγκέφαλο των θηλαστικών οι IGFs προσδένονται, όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, και στους υποδοχείς τύπου II. Πρόκειται για μονομερή πολυπεπτίδια (250kDa) που διακρίνονται σε τρεις περιοχές, μία εξωκυττάρια, μία διαμεμβρανική και μία μικρή υδρόφιλη κυτταροπλασματική (Morgan et al. 1987). Στον άνθρωπο οι υποδοχείς IGF-IIR είναι ταυτόσημοι με τους υποδοχείς 6- φωσφορικής μαννόζης. Η συγγένεια σύνδεσης του IGF-II με αυτούς τους υποδοχείς δεν είναι καλά προσδιορισμένη, πάντως είναι μεγαλύτερη από τη συγγένεια σύνδεσης του IGF-I, ενώ η ινσουλίνη δεν συνδέεται καθόλου με τους IGF-IIR. Μία ακόμη οντότητα η οποία πρόσφατα αναγνωρίστηκε είναι οι υποδοχείς-υβρίδια, οι οποίοι αποτελούνται από ένα τμήμα IGF υποδοχέα τύπου I και από ένα τμήμα υποδοχέα ινσουλίνης (εικ. 5.3.2.α).

5.3.3. IGFBPs.

Το 97% της συνολικής ποσότητας των αυξητικών παραγόντων IGF-I και IGF-II, σε αντίθεση με την ινσουλίνη, είναι δεσμευμένο σε συγκεκριμένες, ειδικές πρωτεΐνες, οι οποίες ονομάζονται IGF Binding Proteins (IGFBPs). Η ομάδα των πρωτεϊνών IGFBP περιλαμβάνει μέχρι τώρα επτά μόρια (IGFBP 1-7), τα οποία έχουν τη δυνατότητα να προσδένουν τους IGF-I και IGF-II με μεγαλύτερη συγγένεια από τους υποδοχείς IGF-I (Jones and Clemmons 1995). Στην περιφερική κυκλοφορία οι IGFs σχηματίζουν σύμπλοκα με τις IGFBPs, με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο χρόνος ημιζωής τους και συνεπώς να δημιουργείται ένα απόθεμα IGFs. Στους ιστούς, η σύνδεση των IGFs με τις IGFBPs επιτρέπει τον έλεγχο (θετικό και αρνητικό) της δράσης τους, ιδίως όταν αυτοί βρίσκονται σε περίσσεια, αλλά και σε συγκεκριμένες έκτακτες καταστάσεις.



Εικ: 5.3.2.α. Σχηματική παράσταση των δευτερογενών μηνυμάτων που ακολουθούν τη δέσμευση της ινσουλίνης (Ins), της προΐνσουλίνης (ProIns) και των αυξητικών παραγόντων IGF-I και IGF-II στους υποδοχείς ινσουλίνης (IR), τους υβριδικούς υποδοχείς (HybridR) και τους υποδοχείς IGFR [ο βαθμός συγγένειας κάθε μορίου για κάθε τύπο υποδοχέα περιγράφεται από την απόστασή του από τον υποδοχέα]. [Προσαρμογή σχήματος από de Pablo and de la Rosa (1995)]

Οι IGF-BPs έχουν παρόμοια αμινο- και καρβόξυ- τελικά άκρα (τα οποία περιέχουν 12 και 6 κατάλοιπα κυστεΐνης αντίστοιχα). Οι αλληλουχίες αυτές έχουν διατηρηθεί κατά την εξέλιξη ενώ η κεντρική τους περιοχή ποικίλει ανάμεσα στα διαφορετικά μόρια (Jones and Clemmons 1995). Παρόλες τις ομοιότητές τους, κάθε μία IGFBP εμφανίζει διακριτές ιδιότητες (Πίνακας 5.3.3.1).

Η *IGFBP1*, η οποία απομονώθηκε αρχικά από αμνιακό υγρό (Drop et al. 1984), έχει μέγεθος 35-40 kDa, περιλαμβάνει στο C-τελικό άκρο της το τριπεπτιδίο Αργινίνη-Γλυκίνη-Ασπαρτικό (RGD) μέσω του οποίου συνδέεται με την α5β1 ιντεγκρίνη (Jones et al. 1991). Επίσης έχει βρεθεί πως μπορεί να φωσφορυλιωθεί σε σερίνες. Η IGFBP1 διαθέτει ισχυρή μεταβολική και ορμονική ρυθμιστική δραστηριότητα η οποία εξαρτάται από τα επίπεδα φωσφορυλίωσής της.

Η *IGFBP2* έχει μέγεθος 34 kDa και απομονώθηκε αρχικά από ηπατοκύτταρα της σειράς BRL3a (Mottola et al 1986). Περιλαμβάνει και αυτή RGD αλληλουχία. Είναι η κύρια IGFBP πρωτεΐνη του εγκεφάλου των επίμυων και μία από τις τρεις πρωτεΐνες που αρχίζουν να εκφράζονται χωρίς στη διαδικασία της ανάπτυξης μαζί με τις IGFBP 4 και 5 (de Pablo and de la Rosa 1995). Η IGFBP2 αρχίζει να εκφράζεται ήδη από την εμβρυϊκή ημέρα 10. Εκφράζεται μέχρι και τα τελευταία εμβρυϊκά στάδια και η έκφρασή της συμπίπτει με την παρουσία του IGF-I και της IGFBP-5.

Η *IGFBP3*, είναι η μεγαλύτερη πρωτεΐνη της οικογένειας (150 kDa). Αποτελείται από μικρότερες υπομονάδες (White et al. 1981) και είναι η πιο συχνά απαντώμενη IGFBP στον ορό, στον οποίον βρίσκεται με τη μορφή συμπλόκων υψηλού μοριακού βάρους μαζί με την πρωτεΐνη ALS (acid-labile subunit). Η IGFBP3 εμφανίζεται N-γλυκοζυλιωμένη και περιλαμβάνει επίτοπο πρόσδεσης με την ηπαρίνη (Booth et al. 1996). Επίσης, μπορεί να φωσφορυλιώνεται (χωρίς όμως να είναι γνωστή η λειτουργική σημασία της φωσφορυλίωσης) καθώς και να προσδέεται στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, αν και η σύνδεσή της με τη θεμέλια ουσία των ινοβλαστών δεν είναι ιδιαίτερα υψηλή (Jones et al. 1993).

Τέταρτη στη σειρά ανακάλυψης ήταν η *IGFBP4*. Απομονώθηκε από καλλιέργειες κυττάρων από οστεοσαρκώματα (Mohan et al 1989) και είναι επίσης N-γλυκοζυλιωμένη.

Οι πρωτεΐνες *IGFBP 5* και *6* απομονώθηκαν από την ομάδα του Shimasaki (Shimasaki et al. 1990). Αμφότερες είναι O-γλυκοζυλιωμένες και περιέχουν επιτόπους σύνδεσης με την ηπαρίνη. Η IGFBP 5 συνδέεται σταθερά με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, ενώ η IGFBP 6 προσδέει τον IGF-II 50 φορές πιο ισχυρά από τον IGF-I. Η IGFBP-5 αρχίζει να εκφράζεται νωρίς κατά την ανάπτυξη, κυρίως στο νευροεπιθήλιο και γενικότερα σε νευροβλάστες, μετα-μιτωτικά νευρικά κύτταρα και κύτταρα γλοιακού φαινοτύπου.

Εκτός από τις 6 προαναφερθείσες IGFBPs έχει ταυτοποιηθεί ακόμη μία, η *IGFBP 7 ή mac 25*. Έχει υψηλότερη συγγένεια για την ινσουλίνη και πιθανώς εμπλέκεται σε καταστάσεις αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης (Yamanaka et al. 1997, Damon et al. 1997).

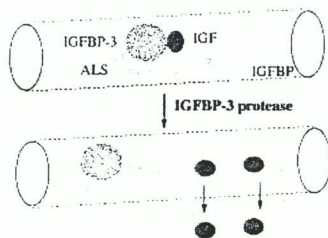
Τέλος, σχετικά πρόσφατα αναφέρθηκε η ύπαρξη τεσσάρων πολυπεπτιδίων των οποίων τα αμινοτελικά άκρα είναι ομόλογα με αυτά των IGFBPs, αλλά προσδέουν τους IGFs με πολύ χαμηλότερη συγγένεια (Kim et al. 1997).

ΔΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	IGFBPs
C-τελικό τριπεπτίδιο RGD	IGFBP-1, IGFBP-2
N-γλυκοζυλίωση	IGFBP-3, IGFBP-4
O-γλυκοζυλίωση	IGFBP-5, IGFBP-6
Επίτοπος σύνδεσης με ηπαρίνη	IGFBP-3, IGFBP-5, IGFBP-6
Φωσφορυλίωση σε σερίνες	IGFBP-1, IGFBP-3
Σινιάλο εισόδου στον πυρήνα	IGFBP-3, IGFBP-5

Πίνακας 5.3.3.1. Δομικά χαρακτηριστικά των διαφόρων IGFBPs.

[Προσαρμογή πίνακα από Rechler and Clemmons (1998)]

Στο πλάσμα σχηματίζονται σύμπλοκα βάρους 150 kDa μέσω της σύνδεσης της πρωτεΐνης ALS με το διμερές IGF-I/IGFBP-3 (Jones and Clemmons 1995). Το μέγεθος του συμπλόκου αυτού έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό του στα αγγεία, με αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου ημιζωής του IGF-I στο πλάσμα από τα 8 λεπτά (ελεύθερος IGF-I) στις 15 ώρες (Guler et al. 1989). Τα σύμπλοκα αυτά μην μπορώντας να περάσουν το φραγμό των ενδοθηλιακών κυττάρων επιτρέπουν ουσιαστικά την συγκέντρωση υψηλών ποσοτήτων IGFs χωρίς τον κίνδυνο πρόκλησης υπογλυκαιμίας. Αυτός ο ομοιοστατικός μηχανισμός εξαρτάται από τη δράση της αυξητικής ορμόνης και διαταράσσεται σε συγκεκριμένα σύνδρομα οδηγώντας σε κρίσεις υπογλυκαιμίας, όπως στην υπογλυκαιμία των όγκων των μη-νησιδιακών κυττάρων (Non-islet cell tumor hypoglycemia). Η απελευθέρωση των IGFs από τα σύμπλοκα του πλάσματος επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της οδού της περιορισμένης εκλεκτικής πρωτεόλυσης (εικ.5.3.3.α). Στόχος των πρωτεασών είναι η IGFBP-3, η οποία διασπάται σε ένα N-τελικό τμήμα (30 kDa) το οποίο εμφανίζει χαμηλή συγγένεια για τους IGFs (50 φορές μειωμένη για τον IGF-I και 20 για τον IGF-II) και ένα C-τελικό τμήμα το οποίο παραμένει συνδεδεμένο με την ALS (Lassare and Binoux 1994). Ακόμη δεν έχουν ταυτοποιηθεί οι πρωτεάσες οι οποίες συμμετέχουν σε αυτήν τη διαδικασία αλλά υπάρχουν ενδείξεις για τη συμμετοχή των μεταλλοπρωτεασών 1 και 3 και των Ca^{++} εξαρτώμενων σερινο-πρωτεασών (Fowlkes 1997, Davenport et al. 1990). Οι πρωτεάσες της IGFBP-3 επάγονται μετά από χειρουργικές επεμβάσεις, οξείες και χρόνιες παθήσεις (μόλυνση HIV, αστία) ενώ αντιθέτως περιορίζονται μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας και της ανάρρωσης. Το δεδομένο αυτό υποδεικνύει τη συμμετοχή των IGFs στην απόκριση του οργανισμού σε μεταβολικές διαταραχές (Davenport et al. 1992). Το γεγονός πως η απελευθέρωση των IGFs στο πλάσμα ρυθμίζεται, είναι ενδεικτικό της σπουδαιότητας της παρουσίας τους στην κυκλοφορία, δηλαδή της ενδοκρινούς δράσης τους, παρόλο που η αυτοκρινής και παρακρινής λειτουργία των IGFs θεωρείται πιο κρίσιμη για τον οργανισμό.



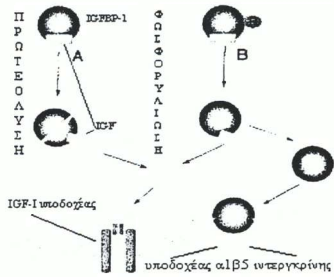
Εικ:5.3.3.α. Πρωτεολυτική απελευθέρωση των IGFs από τα σύμπλοκα IGF-IGFBP3-ALS στο πλάσμα.

[Προσαρμογή σχήματος από Rechler and Clemmons (1998)]

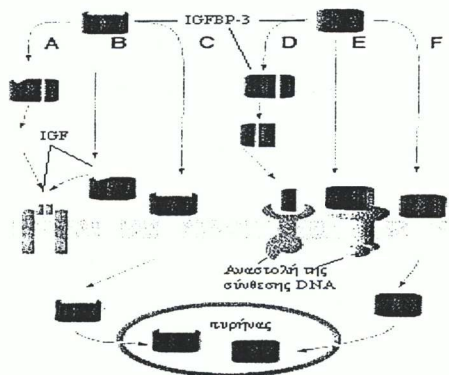
Στο επίπεδο του ιστού, υπάρχουν ποικίλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη δράση των IGFBPs (**Εικ: 5.3.3.β, 5.3.3.γ, 5.3.3.δ**). Πρώτον, ο βαθμός πρόσδεσης των IGFs στις IGFBPs. Σε γενικές γραμμές η συγγένεια των IGFs για τις IGFBPs είναι μεγαλύτερη από τη συγγένειά τους για τους υποδοχείς IGF-IRs. Συνεπώς

μετατροπές οι οποίες επηρεάζουν αυτήν τη συγγένεια έχουν ως αποτέλεσμα την αυξομείωση της βιο-διαθεσιμότητας των αυξητικών αυτών παραγόντων. Μία τέτοια τροποποίηση είναι η περιορισμένη πρωτεόλυση των IGFFBPs, από την οποία συνήθως προκύπτει ένα κομμάτι του συμπλόκου με χαμηλή συγγένεια σύνδεσης των IGFs. Άλλο παράδειγμα είναι η φωσφορυλίωση των συνδεουσών πρωτεϊνών. Για παράδειγμα, η φωσφορυλιωμένη μορφή της IGFBP- 1 συνδέεται 7 φορές πιο ισχυρά με τον IGF-I, με αποτέλεσμα να αναστέλλει τη δράση του, ενώ αντιθέτως η αποφωσφορυλίωσή της συνδέεται με την ενδυνάμωση της ενεργότητάς του. Ένας δεύτερος παράγοντας που επηρεάζει τη λειτουργία των IGFFBPs είναι η κατανομή τους στον ιστό και ο βαθμός σύνδεσής τους με την εξωκυττάρια ουσία ή την κυτταρική επιφάνεια. Σε γενικές γραμμές η ανασταλτική δράση των IGFFBPs συνδέεται με τη διαλυτή μορφή τους. Αυτό διότι σε αυτήν τη μορφή παρουσιάζουν αυξημένη συγγένεια σύνδεσης με τους IGFs με αποτέλεσμα τη δημιουργία συμπλόκων τα οποία οδηγούν στη μείωση της βιο-διαθεσιμότητάς τους. Η IGFBP-4 εμφανίζεται σχεδόν αποκλειστικά ως αναστολέας της δράσης του IGF-I διότι δεν προσδέεται καθόλου στην κυτταρική επιφάνεια ή τη θεμέλια ουσία. Αντιθέτως, το γεγονός πως η ελεύθερη IGFBP-5 αμέσως αφού προσδέσει τους IGFs συνδέεται με τη θεμέλια ουσία με αποτέλεσμα την ταυτόχρονη αποδέσμευση των παραγόντων, σε μία περιοχή πλούσια σε μεμβρανικούς υποδοχείς των IGFs, την καθιστά σημαντικό ενισχυτή της δράσης τους. Ακόμη, η προεπάωση του IGF-I με την IGFBP-3 αυξάνει τη δραστηριότητά του, όταν η χορήγηση γίνει σε τοπικό, ιστικό επίπεδο. Η σύνδεση του συμπλέγματος IGF-I/IGFBP-3 στην κυτταρική επιφάνεια μειώνει τη συγγένεια σύνδεσης του παράγοντα με αποτέλεσμα αυτός να απελευθερώνεται σε μία περιοχή πλούσια σε κυτταρικούς υποδοχείς του IGF-I. (Jones and Clemmons 1995). Επίσης, η IGFBP-5 η οποία είναι σταθερά συνδεδεμένη με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία έχει πολύ χαμηλή συγγένεια για τους IGFs. Ένας ακόμη παράγοντας ο οποίος επιδρά στη λειτουργία των IGFFBPs είναι ο σχηματισμός, με τη διαδικασία της πρωτεόλυσης, πολυπεπτιδίων με αυτόνομες ανασταλτικές ή επαγωγικές ιδιότητες. Έχουν καταγραφεί πολλά τέτοια παραδείγματα, όπως η επαγωγική δράση ενός τμήματος του N- τελικού άκρου της IGFBP-5 στη λειτουργία της ίδιας της IGFBP-5 και η ανασταλτική δράση ενός N-τελικού τμήματος της IGFBP3 (Jones and Clemmons 1995).

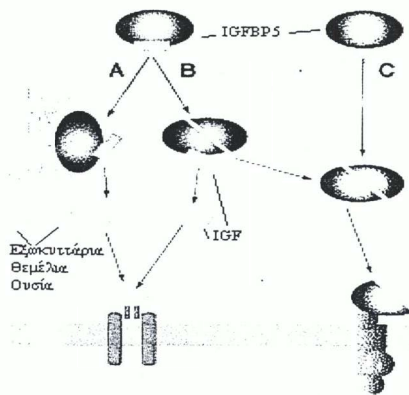
Η συγχορήγηση IGF-I και IGFBP-1 σε υποφυσιοεκτομημένους επίμυς μείωσε σημαντικά την αυξητική δράση του παράγοντα σε αντίθεση με τη χορήγηση μόνο του IGF-I. Επίσης, η υπερπαραγωγή της IGFBP-1 σε γενετικώς τροποποιημένους επίμυς είχε ως αποτέλεσμα σημαντική υστέρηση στη σωματική τους ανάπτυξη και στο βαθμό επιβίωσης των εμβρύων (Gay et al. 1997). Αντιθέτως, η χορήγηση μεταλλαγμένων μορφών της IGFBP-1 οι οποίες παρουσιάζουν μειωμένη συγγένεια για τον IGF-I, οδήγησε στην επαγωγή της δράσης του. Πρέπει όμως να σημειωθεί πως η σύνδεση του παράγοντα με την πρωτεΐνη είναι απαραίτητη έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η ρύθμιση της λειτουργίας του (Jones and Clemmons 1995). Έχουν επίσης περιγραφεί περιπτώσεις στις οποίες η χορήγηση IGFBP-1 σε συνδυασμό με IGF-I είχε ως αποτέλεσμα την επιτάχυνση των διαδικασιών επούλωσης τραυματισμών και την αποκατάσταση του κατεστραμμένου επιθηλίου (Galiano et al. 1996).



Εικ:5.3.3.β. Η αποδέσμευση του IGF από την IGFBP-1 μπορεί να γίνεται είτε μέσω πρωτεόλυσης, είτε μέσω της φωσφορυλίωσης της IGFBP-1. Η ελεύθερη IGFBP-1 μπορεί να δεσμεύεται σε υποδοχείς ιντεργκρίνης.
 [Προσαρμογή σχήματος από Rechler and Clemmons (1998)]



Εικ:5.3.3.γ. Τα σύμπλοκα IGF-IGFBP3 είτε υφίστανται πρωτεόλυση, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του IGF-I και τη σύνδεσή του στους υποδοχείς IGF-I (A), είτε συνδέονται σε υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας με αποτέλεσμα τη σταδιακή αποδέσμευση του IGF (B), είτε εισέρχονται στο κύτταρο και μεταφέρονται στον πυρήνα (C). Τα ελεύθερα μόρια IGFBP3 υφίστανται πρωτεόλυση και ένα τμήμα τους (αμινοξέα 1-95) συνδέεται με επιφανειακούς υποδοχείς αναστέλλοντας τη σύνθεση DNA, είτε συνδέονται ολόκληρα σε κυτταρικούς υποδοχείς αναστέλλοντας τη σύνθεση DNA, είτε εισέρχονται στα κύτταρα και μετακινούνται στον πυρήνα.
 [Προσαρμογή σχήματος από Rechler and Clemmons (1998)]



Εικ:5.3.3.δ. Ο IGF αποδεσμεύεται από την IGFBP5 είτε λόγω της σύνδεσής της στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (A), είτε μετά από πρωτεόλυση (B). Από την πρωτεόλυση της IGFBP5 προκύπτει ένα πεπτίδιο το οποίο συνδέεται με επιφανειακούς υποδοχείς και ενισχύει τη δράση του IGF (C).
 [Προσαρμογή σχήματος από Rechler and Clemmons (1998)]

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως οι IGFBPs εμφανίζουν και δραστηριότητα ανεξάρτητη των IGFs. Η IGFBP-1 ενεργοποιεί τη μετανάστευση κυττάρων στις ωσθήκες κινεζικών χάμστερ, σε ιστό δηλαδή στον οποίο δεν συντίθενται IGFs. Κατά πάσα πιθανότητα αυτή η δράση εξαρτάται από τη σύνδεσή της με την α5β1 ιντεγκρίνη, δια μέσου της RGD αλληλουχίας του μορίου της IGFBP-1.

Η πρωτεΐνη IGFBP που παρουσιάζει την πιο έντονη ανεξάρτητη από τους IGFs δράση είναι η IGFBP-3:

ι) *Αναστολή της ανάπτυξης.* Υπάρχουν αρκετά παραδείγματα στα οποία η χορήγηση IGFBP-3 ή ενός N-τελικού τμήματός της (αμινοξέα 1-97) επέφερε αναστολή της σύνθεσης DNA. Ακόμα δεν έχουν απομονωθεί οι υποδοχείς που μεσολαβούν για αυτήν τη δράση, φαίνεται όμως πως πρόκειται για υποδοχείς που ανήκουν στην κατηγορία των υποδοχέων του TGF-β (Transforming Growth Factor β). ιι) *Επαγωγή της απόπτωσης.* Έχουν περιγραφεί συγκεκριμένα πειράματα στα οποία η υπερέκφραση της IGFBP, ανεξάρτητα από την παρουσία IGFs οδήγησε στην επαγωγή του φαινομένου της απόπτωσης είτε άμεσα είτε αυξάνοντας την αντίστοιχη δράση άλλων ουσιών (όπως αναλόγων του κεραμιδίου).

Πρόσφατες παρατηρήσεις υποδεικνύουν την πιθανότητα οι IGFBPs είτε μόνες τους, είτε μεταφέροντας τους IGFs να εισέρχονται στον πυρήνα (Jaques et al. 1997, Li et al. 1997). Η λειτουργικότητα της παρουσίας αυτών των συμπλόκων στον πυρήνα δεν είναι σαφής και αποτελεί ένα πεδίο έρευνας ανοικτό για το μέλλον.

5.3.4. Το σύστημα του IGF-I και ο τραυματισμός του ΚΝΣ.

Ο IGF-I είναι ένας αυξητικός παράγοντας που ρυθμίζει τις διαδικασίες του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των νευρικών και των γλοιϊών κυττάρων, ο οποίος αποτέλεσε και συνεχίζει να αποτελεί μόνιο στόχο στην έρευνα για την εντόπιση ουσιών με πιθανές νευροπροστατευτικές και νευροαναγεννητικές ιδιότητες. Οι ερευνητικές εργασίες που αφορούν το σύστημα του IGF-I σε σχέση με παθολογικές καταστάσεις του ΚΝΣ μπορούν να διακριθούν σε δύο μεγάλες θεματικές κατηγορίες, ανάλογα με τον προσανατολισμό τους. Σε αυτές που διερευνούν τις μεταβολές στην έκφραση, είτε σε επίπεδο μεταγραφικό είτε σε επίπεδο πρωτεϊνής, των στοιχείων του άξονα του IGF-I και σε αυτές που διερευνούν άμεσα τις πιθανές θεραπευτικές ή προστατευτικές ιδιότητες του άξονα αυτού.

Δ)Μεταβολές στην έκφραση του άξονα του IGF-I σε παθολογικές καταστάσεις του ΚΝΣ.

Μεγάλος όγκος δουλειάς έχει επικεντρωθεί σε πειραματικά μοντέλα υποξίας/ισχαιμίας του εγκεφάλου (Hypoxic/ Ischemic Injury) (Bergstedt et al. 1993, Tapanainen et al. 1997, Beilharz et al. 1998, Guan et al. 2000) υπάρχουν όμως στοιχεία και από μοντέλα μηχανικών και χημικών τραυματισμών (García- Estrada et al. 1992, Guthrie et al. 1995, Yao et al. 1995, Breese et al. 1996, Sandberg Nordqvist et al. 1996, Kar et al. 1997, Li et al. 1998, Scheepens et al. 2000, Wildburger et al. 2001,) και νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Connor et al. 1997, Jafferli et al. 2000, Dore et al. 1996). Το γενικό συμπέρασμα από την ανασκόπηση όλων των δεδομένων είναι πως σε τραυματικές καταστάσεις του ΚΝΣ το σύστημα του IGF-I αντιδρά, σχεδόν σε όλα τα επίπεδα.

Η καταστροφή νευρικού ιστού φαίνεται πως επιφέρει άμεση τοπική επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου του IGF-I. Η επαγωγή αυτή ακολουθείται χρονικά και τοπικά από αντίστοιχη παραγωγή του πεπτιδίου. Το στοιχείο που μεταβάλλεται, εξαρτώμενο από τον τύπο του τραυματισμού και την έκτασή του, είναι η χρονική εξέλιξη του φαινομένου. Κατά κανόνα, στον νευρικό ιστό που υφίσταται τον τραυματισμό, ακόμα και σε μοντέλα επιλεκτικού τραυματισμού συγκεκριμένων νευρικών αξόνων η μεταγραφή του γονιδίου αρχίζει σε διάστημα λίγων λεπτών μετά τον τραυματισμό. Η περιοχή στην οποία επάγεται ο IGF-I είναι περιορισμένη στα όρια του τραύματος. Ένα χαρακτηριστικό που τροποποιείται καθώς περνούν οι ώρες είναι οι κυτταρικοί πληθυσμοί στους οποίους επάγεται η έκφραση του IGF-I: αρχικώς γλοία και νευρικά κύτταρα και στη συνέχεια κυρίως νευρικά. Σε εκτεταμένους μηχανικούς τραυματισμούς η επαγωγή της έκφρασης του τροφικού αυτού παράγοντα μπορεί να συνεχίζεται μέχρι και ένα μήνα μετά τον τραυματισμό. Φαίνεται πάντως πως η παρουσία του χαρακτηρίζει την περίοδο ανάπλασης του ιστού, όπως αυτή περιγράφεται από την ενεργοποίηση των γλοιϊών κυττάρων και τη διείσδυση των κυττάρων της αιματικής κυκλοφορίας.

Αξίζει να αναφερθεί πως σε post- mortem δείγματα από φλοιό ασθενών που έπασχαν από τη νόσο του Alzheimer παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του IGF-I, σε σχέση με τα χαμηλά φυσιολογικά επίπεδα. Επίσης σε ασθενείς με πλάγια μυοτροφική σκλήρυνση ή ασθένεια των κινητικών νευρώνων (Amyotrophic Lateral

Sclerosis/ ALS) η δέσμευση του [125I]IGF-I εμφανίζεται σαφώς αυξημένη στα κοιλιακά κέρατα του νατιαίου μυελού.

Ένα άλλο σταθερό εύρημα μετά από τραυματισμούς του ΚΝΣ, είναι η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της IGFBP-2. Η κύρια δεσμευτική πρωτεΐνη του IGF-I στον εγκέφαλο επάγεται μετά από τραυματισμούς με μέγιστη απόκριση τις πέντε πρώτες μέρες. Για τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των IGFbps δεν έχουν συγκεντρωθεί πολλά στοιχεία. Από τα μέχρι τώρα διαθέσιμα δεδομένα φαίνεται πως όλες επάγονται, ακολουθώντας τοπικά και χρονικά την επαγωγή του ίδιου του IGF-I. Η IGFBP-3 φαίνεται πως δεν επηρεάζεται από τους τραυματισμούς. Οι Lee et al. 1999 όμως έδειξαν μείωση στα επίπεδα της IGFBP-3 μετά από τραυματισμό. Όσον αφορά στην IGFBP-4, αναφέρονται περιπτώσεις μείωσης της έκφρασής της σε περιοχές ανατομικά απομακρυσμένες από το τραύμα (Walter et al. 1997).

Το τρίτο στοιχείο που συνθέτει το σύστημα δράσης του IGF-I είναι οι τύποι I υποδοχείς του. Η απόκριση του γονιδίου των IGF-IR στον τραυματισμό φαίνεται πως εξαρτάται από τον τύπο του τραυματισμού. Μετά από υποξία/ ισχαιμία η συγκέντρωση των IGF-IR αυξάνεται, ενώ σε μοντέλα κυτταροτοξικού τραυματισμού μειώνεται. Το γεγονός αυτό πιθανώς οφείλεται στους διαφορετικούς τύπους κυττάρων που καταστρέφονται κάθε φορά και αποκαλύπτει την αδυναμία ενεργοποίησης της σύνθεσης IGF-IR σε συγκεκριμένους πληθυσμούς κυττάρων. Η μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου IGF-IR βρίσκεται σε ένα σταθερό βασικό επίπεδο σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους. Η επιλεκτική καταστροφή των κυττάρων αυτών, σε συνδυασμό με τη μικρή ενεργοποίηση της σύνθεσης σε άλλα κύτταρα, είναι υπεύθυνη για τη γενική μείωση της πυκνότητας των υποδοχέων σε περιπτώσεις τραυματισμών.

Δύο ακόμη ενδιαφέροντα στοιχεία τα οποία αφορούν στη δραστηριότητα του άξονα του IGF-I είναι: ι) η αύξηση των επιπέδων του IGF-I στον ορό πειραματόζων με κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις, για τουλάχιστον 14 μέρες μετά τον τραυματισμό (Wildbureger et al. 2001). ιι) η αύξηση στο βαθμό διείσδυσης του IGF-I, από το ΕΝΥ στον παρεγχυματικό ιστό του εγκεφάλου, μετά από τραυματισμό. Η διείσδυση του IGF-I χαρακτηρίζεται από την αρχική δέσμευσή του σε στοιχεία της λευκής ουσίας και αργότερα, εξειδικευμένα, στην επιφάνεια νευρικών κυττάρων (Guan et al. 2000). Τα παραπάνω δεδομένα αποκαλύπτουν πως οι κρανιοεγκεφαλικοί τραυματισμοί οδηγούν στην ενεργοποίηση του συστήματος του IGF-I σε όλον τον οργανισμό (ακόμη και στο ήπαρ), πιθανώς σε μία προσπάθεια να αντιμετωπισθεί το συνολικό μεταβολικό σοκ που συνοδεύει τους σοβαρούς τραυματισμούς του ΚΝΣ.

II) Χορήγηση IGF-I: νευροπροστασία- νευροαγέννηση.

Όπως είναι αναμενόμενο, τα πειράματα χορήγησης IGF-I διακρίνονται από μεγάλη ετερογένεια σε σχέση με πολλές παραμέτρους: α) τον ιστό στον οποίον χορηγείται ο παράγοντας, όπως οι ποικίλες καλλιέργειες κυττάρων, η τοπική/ιστική χορήγηση, μέχρι και η προσπάθεια γενικευμένης φαρμακευτικής θεραπείας. β) τον τρόπο χορήγησης και τη δοσολογία. Η απλή επώαση καλλιιεργειών κυττάρων σε

διάφορες συγκεντρώσεις IGF-I είναι μία περίπτωση χορήγησης, η τοπική (π.χ. ενδοκρανιακή) έγχυση είναι μία άλλη και η χορήγηση (υποδερμικά, ενδοφλεβίως κ.λ.π.) μία ακόμη. Πρέπει βέβαια να σημειωθεί πως όταν αναφέρονται ποικίλες δοσολογίες, υπονοείται και ποικιλία στη χρονική διάρκεια της χορήγησης (από εφάπαξ δόσεις έως και μακροχρόνιες περιοδικές ή συνεχείς χορηγήσεις). γ) Τέλος, μεγάλη ποικιλία υπάρχει όσον αφορά τους στόχους της κάθε μελέτης. Εξειδικευμένη μοριακή βιολογία συγκεκριμένων ενδοκυττάρων οδών μεταγωγής σήματος, ιστοπαθολογική εκτίμηση, μέχρι και μακροχρόνια νευρολογική αξιολόγηση είναι μερικές αδρές κατηγορίες προσανατολισμού των μελετών.

Στα μέσα της δεκαετίας του '90, ο IGF-I προσέλυσε την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας ως ένα πιθανό μόριο με νευροπροστατευτικές ιδιότητες. Σε αυτή τη δεδομένη χρονική στιγμή τα αποτελέσματα από ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες είχαν αρχίσει να συγκεντρώνονται και να αξιολογούνται. Όπως αναφέρθηκενωρίτερα, πολλές μελέτες υποδείκνυαν την πιθανή θεραπευτική δράση του IGF-I μετά από τραυματισμούς του ΚΝΣ, εφόσον είχε περιγραφεί πως η ενεργοποίηση του συστήματος δράσης του ήταν ένα σταθερό εύρημα σε τέτοιες παθολογικές καταστάσεις. Με βάση τα επιμέρους αυτά ευρήματα οι Dore et al. (1997) πρότειναν τη χορήγηση του IGF-I ως πιθανού θεραπευτικού μέσου σε μία σειρά νευρο-εκφυλιστικών ασθενειών (π.χ. Alzheimer, Parkinson, Σκλήρυνση Κατά Πλάκας/ ΣΚΠ και Νωτιαία Μυϊκή Ατροφία/ NMA).

Τα περισσότερο ενθαρρυντικά στοιχεία, όσον αφορά την πιθανή θεραπευτική δράση του IGF-I, συγκεντρώνονται στο πεδίο της αναγέννησης των κινητικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού. Σχετικά πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν πως η χορήγηση IGF-I σε πειραματικά μοντέλα της NMA, όπως οι Wobbler μύες, αναστρέφει τις κινητικές δυσκολίες (Di Giulio et al. 2000, Vergani et al. 1999). Αντίστοιχα αποτελέσματα έχουν προκύψει και σε μοντέλα εκφυλισμού/τραυματισμού κυττάρων της παρεγκεφαλίδας (Fernandez et al. 1999 και 1998, Heck et al. 1999) και τραυματισμένων νευρικών αξόνων (Iwasaki and Ikeda 1999, Kermer et al. 2000). Η εταιρία Cephalon (West Chester, PA), στηριζόμενη σε ανάλογα πειράματα, διεξήγαγε κλινικές μελέτες στις οποίες χορήγησε ανασυνδυασμένο IGF-I (rhIGF-I) με την εμπορική ονομασία myotrophin. Η έρευνα περιλάμβανε δύο ομάδες ασθενών που έλασαν από NMA, μία στην Ευρώπη και μία στην Β. Αμερική. Η ομάδα της Ευρώπης έδωσε ενθαρρυντικά αποτελέσματα, σε αντίθεση με αυτή της Β. Αμερικής. Επειδή δεν έγινε δυνατή η διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων η προσπάθεια αυτή σταμάτησε (Dore et al. 1997, Walsh 1995). Από τη συγκεκριμένη δοκιμή όμως εξήχθησαν σημαντικά συμπεράσματα σχετικά με τη δυνατότητα χρήσης του rhIGF-I θεραπευτικά, όπως η πολύ μικρή πρόκληση παρενεργειών. Η ασφάλεια χορήγησης rhIGF-I έχει αποδειχθεί και από άλλες ομάδες, οι οποίες έχουν προσπαθήσει να διατηρήσουν αυξημένα ποσά IGF-I στο ορό των ασθενών τους με καθημερινή χορήγηση του παράγοντα (Rockich et al. 1999).

Η δράση του IGF-I έχει επίσης δοκιμαστεί σε ποικίλα μοντέλα τραυματισμού του ΚΝΣ. Η χορήγηση του σε πειραματόζωα μετά από ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο είχε θετικό αποτέλεσμα όσον αφορά τη διάσωση νευρικών κυττάρων και τη μείωση της εγκεφαλικής καταστροφής (Guan et al. 1996, Wang et al. 1999a), χωρίς όμως αυτό να επιβεβαιώνεται πάντα (Bergstedt and Wieloch 1993).

Επιπροσθέτως, θετικά αποτελέσματα καταγράφησαν μετά από χορήγηση IGF-I σε περιπτώσεις χημειοτοξικών και μηχανικών τραυματισμών του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού (Sharma et al. 1997 and 2000, Azcoitia et al. 1999, Saatman et al. 1997, Rajkumar et al. 1997, Fernandez et al. 1997, Pulford et al. 1999). Τα παραπάνω αποτελέσματα οδήγησαν σε μία ακόμη κλινική δοκιμή του ανασυνδυσμένου IGF-I στις ΗΠΑ (Hatton et al. 1997). Σε ασθενείς με μέτριες έως βαριές κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις (βαθμολόγηση στην κλίμακα Γλασκώβης 4-10), χορηγήθηκε rhIGF-I. Τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά, καθώς παρατηρήθηκε βελτίωση της καταβολικής δραστηριότητας των ασθενών και της νευρολογικής εξέλιξής τους. Παρόλα αυτά όμως, η θεραπευτική/κλινική χρήση του IGF-I απέχει πολύ από το να θεωρείται δεδομένη.

Συνοψίζοντας τα μέχρι τώρα πειραματικά αποτελέσματα φαίνεται πως ο IGF-I έχει νευροπροστατευτική/νευροαναγεννητική δράση (Lindholm et al. 1996, D'Mello et al. 1997, Aberg et al. 2000, Niblock et al. 2000) και η χορήγηση του, τουλάχιστον τοπικά σε κυτταρικό επίπεδο, παρουσιάζει σχεδόν σε όλες τις μελέτες νευροπροστατευτικές ιδιότητες. Επίσης, έχει πολλαπλώς δειχθεί πως ο IGF-I είναι αντι-αποπτωτικό μόριο (Russel et al. 1998, Tamatani et al. 1998, Ryu et al. 1999). Συνεπώς, ακόμη και τώρα, σχεδόν δέκα χρόνια μετά τις πρώτες δοκιμές του IGF-I με στόχο την κλινική χρήση του, τα δεδομένα επιτρέπουν αισιοδοξία όσον αφορά τη δυνατότητα χρήσης του και τις θεραπευτικές του δυνατότητες.

5.4. ΟΙ ΝΕΥΡΟΤΡΟΦΙΝΕΣ BDNF, NT-3 ΚΑΙ ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥΣ.

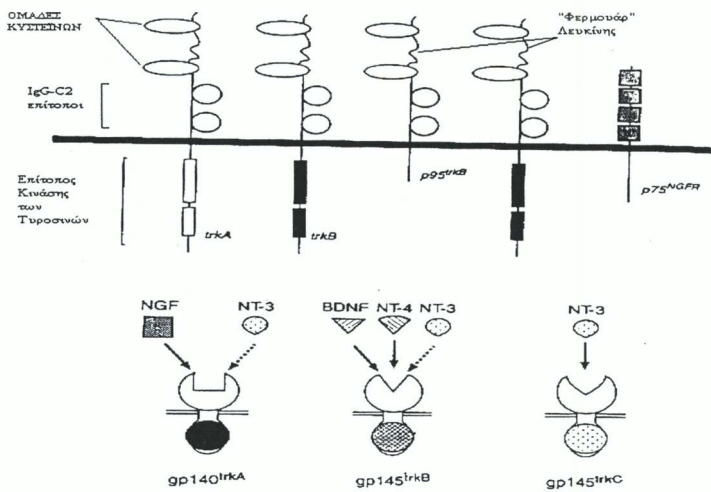
5.4.1. Γενικά.

Οι νευροτροφίνες αποτελούν μία ειδική κατηγορία τροφικών και αυξητικών παραγόντων, με έντονη δράση κατά τα στάδια της διαφοροποίησης, στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα. Στην οικογένεια των νευροτροφινών συγκαταλέγονται έξι μόρια, ο Nerve Growth Factor (NGF), ο Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), η Neurotrophin 3 (NT-3), η NT-4, η NT-5 και η NT-6. Τα μόρια των νευροτροφινών εμφανίζουν μεγάλη δομική συγγένεια και στη ουσία μόνο 6 περιοχές ευθύνονται για την ποικιλία στη δράση τους (Ip et al. 1993). Στη συγκεκριμένη εργασία θα ασχοληθούμε μόνο με τις νευροτροφίνες BDNF και NT-3, συνεπώς σε αυτές θα εστιασθεί το βάρος της ανασκόπησης.

Οι νευροτροφίνες παράγονται από μία μεγάλη ποικιλία κυττάρων του ΚΝΣ και επιδρούν επίσης σε ένα μεγάλο φάσμα κυτταρικών πληθυσμών. Είναι σαφές όμως πως υπάρχει ειδικότητα στην απόκριση κάθε κυτταρικού τύπου στις νευροτροφίνες, όπως για παράδειγμα οι κινητικοί νευρώνες αντιδρούν πιο έντονα στον BDNF παρά στην NT-3 in vitro (Henderson et al. 1993). Επιπροσθέτως, η επίδραση διαφορετικών νευροτροφινών στα ίδια κύτταρα είναι πιθανόν να επάγει διαφορετική απόκριση. Για παράδειγμα η NT-3 σε καλλιέργειες κυττάρων του ιππόκαμπου επάγει την έκφραση της πρωτεΐνης calbindin ενώ ο BDNF της ακετυλοχολινεστεράσης (Ip et al. 1993). Τα παραπάνω χαρακτηριστικά οφείλονται στην ύπαρξη διαφορετικών τύπων υποδοχέων των νευροτροφινών που οδηγούν στην ενεργοποίηση διαφορετικών οδών μεταγωγής σήματος σε κάθε κύτταρο.

Οι νευροτροφίνες δεσμεύονται σε δύο τύπους μεμβρανικών υποδοχέων (εικ. 5.4.1.α). Ο ένας περιλαμβάνει τουλάχιστον τρία διαφορετικά μόρια, σε καθένα από τα οποία δεσμεύονται σχεδόν αποκλειστικά συγκεκριμένες νευροτροφίνες. Στον υποδοχέα trkA (140 kDa) δεσμεύεται ο NGF, στον trkB (145 kDa) κυρίως οι BDNF και NT-4/5 και στον trkC (145 kDa) μόνο η NT-3. Πρόκειται για υποδοχείς των οποίων τα ενδοκυτταρικά τμήματα έχουν ιδιότητες κινάσης των τυροσινών και παρουσιάζουν 85% ομολογία μεταξύ των τριών μορίων. Η μία από ένα ζεύγος τυροσινών (αμινοξύ 674) είναι πιθανώς υπεύθυνη για την αυτοφωσφορυλίωση των υποδοχέων. Ακόμη, η υποκατάσταση μίας πολύ συντηρημένης αλανίνης από μία θρεονίνη στη θέση 723, η έλλειψη μίας επίσης πολύ συντηρημένης προλίνης στη θέση 767 και το μικρό C-τελικό άκρο διαχωρίζουν αυτούς τους υποδοχείς από άλλες κινάσες τυροσινών (Ebadi et al. 1997). Η σύνδεση του προσδέματος στον υποδοχέα ακολουθείται από την είσοδο του συμπλόκου στο κυτταρόπλασμα και την αντιδρομική μεταφορά του στο κυτταρικό σώμα. Ο δεύτερος τύπος υποδοχέα είναι μία γλυκοπρωτεΐνη 75kDa η οποία συμβολίζεται ως p75. Εμφανίζει περιορισμένες ομοιότητες με τους υποδοχείς των παραγόντων TNF-I και II και προσδένει όλες τις νευροτροφίνες με την ίδια χημική συγγένεια. Εκφράζεται σε ποικίλα νευρικά και μη-νευρικά κύτταρα στο ΚΝΣ. Τα πειραματικά δεδομένα αποκαλύπτουν πως δεν διαμεσολαβεί καμία από τις κύριες λειτουργίες των νευροτροφινών. Είναι πολύ πιθανό πως πολυμερίζεται με τους trk υποδοχείς συμβάλλοντας στη λειτουργικότητά τους ή έχει άλλους λειτουργικούς ρόλους όπως το να «συλλέγει» τις νευροτροφίνες με αποτέλεσμα την τοπική αύξηση της συγκέντρωσής τους και την «παρουσίασή» (presentation) τους στους trk υποδοχείς (Ebadi et al. 1997).

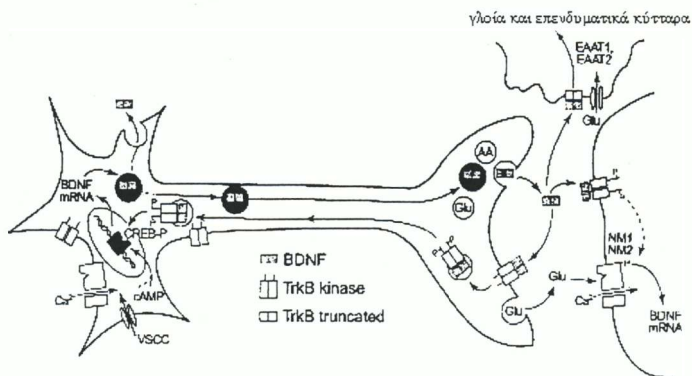
Ένα ακόμη μεγάλο κεφάλαιο που αφορά τη δράση των νευροτροφινών, ειδικότερα κατά την ανάπτυξη, είναι η «νευροτροφική υπόθεση» (“neurotrophic hypothesis” Schecterson and Bothwell, 1992). Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία κάθε νευρώνας συναγωνίζεται τους γειτονικούς του για μία περιορισμένη ποσότητα νευροτροφινών, οι οποίες παράγονται ειδικά στον «ιστό στόχο» του κάθε νευρικού κυττάρου, δηλαδή στη θέση στην οποία το κύτταρο αυτό θα προβάλλει και θα δημιουργήσει συνάψεις. Οι νευρώνες οι οποίοι διαθέτουν τους κατάλληλους υποδοχείς προσλαμβάνουν τα μόρια των νευροτροφινών στις απολήξεις τους. Στη συνέχεια αυτά μεταφέρονται αντιδρομικά στο κυτταρικό σώμα όπου επάγουν τις λειτουργίες της διαφοροποίησης και ανάπτυξης. Με αυτόν τον τρόπο οι νευροτροφίνες ελέγχουν τον αριθμό και τη σωστή δικτύωση των νευρικών κυττάρων σε κάθε συγκεκριμένη περιοχή του νευρικού συστήματος. Η νευροτροφική θεωρία βασίστηκε σε δεδομένα τα οποία αφορούσαν στην αντιδρομική μεταφορά του NGF, τα οποία στη συνέχεια επιβεβαιώθηκαν και για τις άλλες νευροτροφίνες (Mufson et al. 1999).



Εικ:5.4.1.α. Δομή των υποδοχέων των νευροτροφινών.
 [Προσαρμογή σχήματος από Ebadi et al. (1996)]

5.4.2. BDNF.

Ο BDNF ήταν η δεύτερη στη σειρά νευροτροφίνη που απομονώθηκε (Barde et al. 1982) και κλωνοποιήθηκε (Leibrock et al. 1989) μετά τον NGF. Πρόκειται για μία πρωτεΐνη 119 αμινοξέων η οποία παρουσιάζει 40% ομολογία με τον NGF. Εμφανίζει ευρεία έκφραση στον ενήλικο εγκέφαλο των επίμυων, τόσο σε επίπεδο mRNA, όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης (Kawamoto et al. 1996, Yan et al. 1997, Conner et al. 1997). Η παρουσία του πεπτιδίου του BDNF δεν ακολουθεί αυστηρά την εντόπιση του mRNA του, γεγονός που ερμηνεύεται με την αξονική, αντιδρομική μεταφορά του. Όπως προτείνεται από τη «νευροτροφική υπόθεση», ο BDNF που απελευθερώνεται από τα κύτταρα παραγωγής του, προσλαμβάνεται από προσυναπτικούς υποδοχείς άλλων νευρώνων και μεταφέρεται αντιδρομικά στα σώματά τους, όπου εισέρχεται και στον πυρήνα (Reynolds et al. 2000) ή αποθηκεύεται σε θέσεις των αξόνων και των δενδριτών. Νεώτερα δεδομένα όμως δείχνουν πως ο συσσωρευμένος στις νευρικές απολήξεις BDNF μπορεί να προέρχεται από το κυτταρικό σώμα με ορθοδρομική μεταφορά. Η αποθήκευσή του εκεί είναι απαραίτητη για τη διατήρηση από το κύτταρο της δυνατότητας άμεσης εξωκυττάρωσης BDNF, για παράδειγμα μετά από έντονη διέγερση του κυττάρου (εικ. 5.4.2.α). Η κύρια οδός μεταγωγής σήματος που έχει αποκαλυφθεί να ενεργοποιείται μετά την πρόσδεση του BDNF στους υποδοχείς του είναι τα Ras-εξαρτώμενα μονοπάτια (McDonald and Chao 1995). Τα στοιχεία αυτά προσθέτουν στο ρεπερτόριο της δράσης του BDNF



Εικ:5.4.2.α. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού απελευθέρωσης BDNF από τις απολήξεις των νευρικών κυττάρων.

[Προσαρμογή σχήματος από Altar and DiStefano (1998)]

και αυτοκρινή ή παρακρινή δραστηριότητα καθώς και ιδιότητες τροποποιητή της συναπτικής δραστηριότητας (πλαστικότητα) (Conner et al. 1998, Altar and DiStefano 1998).

Η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου του BDNF εξαρτάται από τη δράση πολλών παραγόντων. Ένας από αυτούς είναι τα γλυκοκορτικοειδή και συνεπώς το stress. Η δράση των γλυκοκορτικοειδών μειώνει τη μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου (Smith et al. 1995, Schaaf et al. 1997), και οδηγεί στη συσσώρευση του πεπτιδίου στο περικάρυο των νευρικών κυττάρων, εμποδίζοντας την είσοδό του στον πυρήνα (Nitta et al. 1997). Ο κυριότερος όπως παράγοντας ρύθμισης της μεταγραφής του γονιδίου του BDNF θεωρείται πως είναι η νευρική δραστηριότητα (Zafra et al. 1990, Lauterborn et al. 2000). Μάλιστα, η ισορροπία στη δράση μεταξύ του (διεγερτικού) γλουταμινεργικού και του (ανασταλτικού) GABAεργικού συστήματος είναι εκείνη που ρυθμίζει τα βασικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου υπό φυσιολογικές συνθήκες (Zafra et al. 1991). Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα η φαρμακολογική επίδραση σε κάποιο στοιχείο των παραπάνω συστημάτων (π.χ. η χορήγηση του αναστολέα των NMDA υποδοχέων MK- 801) να επιφέρει διαφορετικά αποτελέσματα σε διακριτές περιοχές του εγκεφάλου, ακολουθώντας την αναλογία συμμετοχής του κάθε νευροδιαβιβαστικού συστήματος στη λειτουργία τους (Castren et al. 1993). Πειράματα σε καλλιέργειες νευρικών και γλοιακών κυττάρων έχουν δείξει πως το γονίδιο του BDNF ελέγχεται, στο επίπεδο της μεταγραφής, από πολλούς υποκινητές (Tabuchi et al. 2000, Sano et al. 1996). Το ερέθισμα το οποίο είναι κυρίως υπεύθυνο για την ενεργοποίηση του γονιδίου, είναι η είσοδος ιόντων ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα. Τα ιόντα ασβεστίου επάγουν τη δραστηριοποίηση συγκεκριμένων μονοπατιών (όπως του CREB) και τελικώς τη μεταγραφή του γονιδίου του BDNF (Shieh and Ghosh 1999).

Η νευροτροφική και διαφοροποιητική, κυρίως κατά την πρόιμη μεταγενετική περίοδο, δράση του BDNF αλλά και η δράση του ως παράγοντα τροποποίησης της συναπτικής λειτουργίας στον ενήλιο εγκέφαλο, επιτυγχάνονται μέσω της ενεργοποίησης συγκεκριμένων μορίων και μηχανισμών. Για παράδειγμα, η επίδραση του BDNF στο φαινόμενο της ενδυνάμωσης των συνάψεων επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της ενίσχυσης της λειτουργίας των NMDA υποδοχέων του γλουταμικού (Song et al. 1998), αλλά και της αύξησης της απελευθέρωσης γλουταμικού από τα προσυναπτικά στοιχεία (Lessman 1998). Στο επίπεδο των οδών ενδοκυττάριας μεταγωγής σήματος, η δράση του BDNF διαμεσολαβείται από την οδό του κυκλικού AMP (cAMP) και επηρεάζει τη μεταγραφική δραστηριότητα των AP-1 και CRE- εξαρτώμενων στοιχείων (Gaiddon et al. 1996).

Η δράση του BDNF κατά την ανάπτυξη είναι ζωτικής σημασίας όπως προκύπτει από πειράματα σε γενετικά τροποποιημένους μύς με απενεργοποιημένο το γονίδιο του BDNF, οι οποίοι δεν επιβιώνουν μέχρι τη γέννηση. Στους ελίμους, η μέγιστη δραστηριότητα του BDNF παρατηρείται αρκετές μέρες μετά τη γέννηση και φαίνεται πως αφορά την πλαστικότητα των συνάψεων (Korte et al. 1995) και τη διαφοροποίηση συγκεκριμένων ομάδων νευρικών κυττάρων, όπως οι ενδιάμεσοι GABAεργικοί νευρώνες του ιπποκάμπτου (Murphy et al. 1998).

5.4.3. Το σύστημα BDNF/ trkB σε παθολογικές καταστάσεις του Κ.Ν.Σ.

Στις αρχές της δεκαετίας του '80 προτάθηκε η θεωρία της απόκρισης των νευροτροφικών στο τραύμα. Ο Nieto-Samperdo το 1982 ανέφερε πως 3 έως 5 ημέρες μετά από εγκεφαλικό τραυματισμό παρατηρείται έντονη δραστηριότητα των νευροτροφικών (Nieto-Samperdo et al. 1982). Η θεωρία αυτή διερευνήθηκε από πολλές ερευνητικές ομάδες, σε ποικίλα μοντέλα τραυματισμών και άλλων παθολογικών καταστάσεων, αρχικά για τον NGF και στη συνέχεια για τον BDNF. Η γενική εικόνα, από τη συγκέντρωση των διαθέσιμων αποτελεσμάτων, είναι πως το γονίδιο του BDNF είναι ένα άμεσα επαγόμενο γονίδιο (Immediate Early Gene) όχι μόνο μετά από καταστροφή νευρικού ιστού, αλλά και μετά από φυσιολογικά φαινόμενα έντονης νευρικής δραστηριότητας όπως κατά τη διάρκεια σωματικών και νοητικών ασκήσεων (Hughes et al. 1999) Ένα σταθερό εύρημα είναι η επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου του BDNF και του υποδοχέα trkB (η μεγάλη πλειοψηφία των πειραμάτων αφορά μελέτη της σύνθεσης του mRNA και όχι της πρωτεΐνης) μετά από τραυματισμό. Ποικίλλουν όμως τα χαρακτηριστικά αυτής της επαγωγής, όπως η διάρκεια του φαινομένου και η ανατομική εξάπλωσή του.

Πιο συγκεκριμένα, μετά από υποξικά/ ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια εντοπίζεται επαγωγή του mRNA του BDNF στα όρια και έξω από την κατεστραμμένη περιοχή (Kokaia et al. 1995), στον ιππόκαμπο (Lindvall et al. 1992), αλλά και στο αντίπλευρο ημισφαίριο, όταν η ισχαιμία αφορά το ένα από τα δύο (Dragunow et al. 1994). Σε μοντέλα μηχανικού τραυματισμού, η επαγωγή του BDNF (μεταγράφου και πεπτιδίου) είναι επίσης πολύ έντονη. Μετά από διεισδυτικό τραυματισμό του ραβδωτού αυξάνεται η έκφραση του BDNF για μία εβδομάδα (Wong et al. 1997), ενώ τα μετάγραφα του BDNF (Ballarin et al. 1991, Hughes et al. 1993) και του υποδοχέα του (Mudo et al. 1993, Hughes and Dragunow 1995) επάγονται σε τραυματισμένο ιππόκαμπο, με βραχεία όμως χρονική διάρκεια (έως

και 24 ώρες). Σε μοντέλα μηχανικού διάχυτου τραυματισμού, όπως ο πιεστικός τραυματισμός του φλοιού (cortical contusion/ CC) και ο τραυματισμός με εφαρμογή υψηλής πίεσης υδάτινου ρεύματος (fluid percussion/ FP), επίσης παρατηρείται επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου του BDNF, με ποικιλία όμως χαρακτηριστικών. Η εξάπλωση της περιοχής επαγωγής του γονιδίου φαίνεται πως εξαρτάται από την έκταση του τραύματος (Hicks et al. 1999a) αλλά και τις συγκεκριμένες συνθήκες. Οι Hicks et al. (1999b) εντοπίζουν μείωση του mRNA του BDNF στα όρια της βλάβης μετά από FP τύπο τραυματισμού και επαγωγή μόνο σε απομακρυσμένες από την καταστροφή περιοχές του φλοιού. Άλλες ομάδες (Truettner et al. 1999, Skoglosa et al. 1999, Yang et al. 1996, Oyesiku et al. 1999, Hicks et al. 1997) παρατηρούν αυξημένη έκφραση του συστήματος BDNF/ trkB κοντά στον τραυματισμένο φλοιό, αλλά και σε δομές όπως ο ιππόκαμπος και ο απιοειδής φλοιός τόσο στο τραυματισμένο ημισφαίριο όσο και στο αντίθετο, σε πολλές διαφορετικές χρονικές στιγμές. Ακόμα, σε μοντέλα χημικού τραυματισμού παρατηρείται επαγωγή του γονιδίου του BDNF (Yrek and Fletcher-Turner 2001), όπως επίσης και σε μοντέλα εκλεκτικής τομής νευρικών αξόνων -κινητικών ή αισθητικών (Zhou et al. 1999). Η σαφής επαγωγή της έκφρασης του άξονα BDNF/ trkB εντοπίζεται και εκτός εγκεφαλικού ιστού, σε μοντέλα τραυματισμού του νωτιαίου μυελού, με όμοια μάλιστα χαρακτηριστικά (Scarlsbrick et al. 1999). Επιπροσθέτως, μετά από επιληπτικές κρίσεις παρατηρείται εκτεταμένη χρονικά και ανατομικά επαγωγή του BDNF και του υποδοχέα του (Merlio et al. 1993, Hughes et al. 1998, Revuelta et al. 2001, Gall 1993). Τέλος, μία ακόμη αξιοπρόσεκτη παρατήρηση είναι πως ο τραυματισμός νευραξόνων οδηγεί, κατά περίπτωση, στην ενίσχυση τόσο της ορθοδρομικής (Tonra et al. 1998), όσο και της αντιδρομικής (Curtis et al. 1998) μεταφοράς του μορίου του BDNF. Πρέπει πάντως να σημειωθεί πως υπάρχει έλλειψη δεδομένων όσον αφορά στην έκφραση του πεπτιδίου του BDNF μετά από τραυματισμούς, σε αντίθεση με δεδομένα σχετικά με την επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου.

Η ενεργοποίηση του άξονα BDNF/ trkB σε παθολογικές καταστάσεις, όπως στοιχειοθετείται από τα παραπάνω δεδομένα, είναι πιθανόν να αποτελεί μία νευροπροστατευτική απόκριση του εγκεφάλου των θηλαστικών. Η υπόθεση αυτή φαίνεται να επιβεβαιώνεται και στον ανθρώπινο οργανισμό (Korhonen et al. 1998). Πολλά επιπλέον στοιχεία συνηγορούν σε αυτήν την υπόθεση. Πρώτον, οι νευροπροστατευτικές ιδιότητες που παρουσιάζει η εξωγενής χορήγηση BDNF σε καλλιέργειες κυττάρων (Ebadi et al. 1996) αλλά και μετά από τραυματισμούς του εγκεφάλου πειραματόζωων (Burke et al. 1994, Kirschner et al. 1997, Houle and Ye 1999, Sharma et al. 2000). Δεύτερον οι πιθανές νευροαναγεννητικές ιδιότητες που έχει ο BDNF όπως υποδεικνύει η χορήγησή του μετά από καταστροφή νευρικών αξόνων (Friedman et al. 1995).

Οι προσπάθειες κλινικής χρήσης του BDNF (Walsh 1995) δεν έχουν δώσει μέχρι τώρα συγκεκριμένα θετικά αποτελέσματα. Ίσως αυτό να οφείλεται στο γεγονός πως η διείσδυση του BDNF στον εγκέφαλο μετά από περιφερική χορήγηση δεν είναι μεγάλη και απαιτείται η τροποποίηση του μορίου έτσι ώστε να διευκολύνεται η μεταφορά του μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Podulso and Curran 1996). Ακόμη και μετά από τοπική ενδοκρανιακή χορήγηση, η διείσδυση

του BDNF στο εγκεφαλικό παρέγχυμα είναι πολύ περιορισμένη, πιθανώς λόγω της δέσμευσής του από τους πολυάριθμους υποδοχείς του (Mufson et al. 1999).

5.4.4. NT-3

Η νευροτροφίνη NT-3 απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε μετά από τον BDNF (Maisonpierre et al. 1990). Οι δύο αυτές νευροτροφίνες αφενός εμφανίζουν μεγάλη δομική ομοιότητα (η NT-3 αποτελείται επίσης από 119 αμινοξέα) και αφετέρου έχουν κοινά χαρακτηριστικά δράσης. Κατά την ανάπτυξη, η μέγιστη δραστηριότητα της NT-3 εντοπίζεται στην εμβρυική περίοδο και κυρίως στη διαδικασία διαφοροποίησης των κινητικών νευρώνων. Γενετικός τροποποιημένος μύς, στους οποίους δεν εκφράζεται το γονίδιο NT-3, επιβιώνουν μέχρι τη γέννηση και πολλές φορές έως και 30 ημέρες μετά. Εμφανίζουν όμως σοβαρές κινητικές δυσκολίες και προβλήματα στις ωτιαίες αισθητικές οδούς (Emfors et al. 1994).

Η NT-3 παράγεται σε ποικίλους νευρικούς και γλοιακούς κυτταρικούς τύπους στο ενήλικο ΚΝΣ (Soderstrom and Ebendal 1995), όπως σε πυραμιδικούς νευρώνες του φλοιού και στη CA2 περιοχή του ιπόκαμπτου. Η παραγωγή και η αποθήκευσή της ακολουθεί το πρότυπο που ισχύει για τον BDNF, δηλαδή εντοπίζεται τόσο αντιδρομική μεταφορά της NT-3 -κυρίως κατά την ανάπτυξη- όσο και ορθοδρομική μεταφορά στον ενήλικο εγκέφαλο (Altar and DiStefano 1998). Η δράση της σε πολλές περιπτώσεις φαίνεται να αλληλεπικαλύπτει αυτήν του BDNF, όπως στις περιπτώσεις της ενδυνάμωσης των γλουταμινεργικών συνάψεων (Lessman 1998), της δράσης της ως αναστολέα του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Ebadi et al. 1996) και της αυξημένης αντιδρομικής μεταφοράς της μετά από τραυματισμό των κινητικών νευρώνων (Curtis et al. 1998). Χαρακτηρίζεται όμως και από αρκετές ανεξάρτητες λειτουργίες όπως οι τροφικές ιδιότητες της NT-3 προς τις πρόδρομες μορφές των νευρικών και γλοίων κυττάρων (Ebadi et al. 1996). Πολλές φορές επίσης έχει παρατηρηθεί ανταγωνιστική δράση των δύο νευροτροφινών. Για παράδειγμα, η επαγομένη από τον BDNF ανάπτυξη των δενδριτών των πυραμιδικών νευρώνων της 4^{ης} στιβάδας του φλοιού, αναστέλλεται από την NT-3 και αντίστροφα, η τροφική δράση της NT-3 στους πυραμιδικούς νευρώνες της 6^{ης} στιβάδας του φλοιού αναστέλλεται από τον BDNF (McAllister et al. 1997). Πρέπει τέλος να σημειωθεί πως η NT-3 δεν εντοπίζεται μόνο στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα, αλλά και σε άλλα περιφερικά όργανα, όπως ο θύμος αδένας, η καρδιά, το ήπαρ, ο σπλήνας και οι νεφροί στα οποία δεν μπορεί να λειτουργεί ως κλασσικός νευροτροφικός παράγοντας (Katoh-Semba et al. 1996).

5.4.5. Το σύστημα NT-3/trkC σε παθολογικές καταστάσεις του Κ.Ν.Σ.

Η ανασκόπηση των πειραματικών δεδομένων όσον αφορά στην αντίδραση του άξονα NT-3/trkC μετά από τραυματισμούς συνοψίζεται σε δύο κυρίως στοιχεία. Πρώτον, το γονίδιο της NT-3 αντιδρά πιο αργά από αυτό άλλων νευροτροφινών στο τραύμα και στις περισσότερες περιπτώσεις δεν εντοπίζεται σημαντική μεταβολή στην έκφρασή του. Όπου παρατηρείται μεταβολή, αυτή είναι προς την κατεύθυνση της μείωσης της μεταγραφικής του δραστηριότητας. Δεύτερον, το γονίδιο του

υποδοχέα της NT-3 επάγεται σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις καταστροφής νευρικού ιστού, με διάφορα όμως πρότυπα χρονικής και ανατομικής επέκτασης του φαινομένου.

Πιο συγκεκριμένα, μείωση στο mRNA της NT-3 έχει παρατηρηθεί μετά από διάχυτους ή και εστιασμένους εγκεφαλικούς τραυματισμούς (Hicks et al. 1999a, Hicks et al. 1997), ενώ υπάρχουν αντίστοιχες περιπτώσεις στις οποίες δεν εντοπίζεται καμία μεταβολή στην έκφρασή του (Yang et al. 1996). Σε μοντέλα χημικών τραυματισμών εντοπίζεται κατά κύριο λόγο διατήρηση σταθερών επιπέδων του mRNA της NT-3 (Scarisbrick et al. 1999, Yrek and Fletcher-Turner 2001), ενώ η υποξία- ισχαιμία του εγκεφάλου επιδρά προς την κατεύθυνση της μείωσης του mRNA της NT-3 (Kokaia et al. 1995, Lindvall et al. 1992). Ενιαία είναι τα αποτελέσματα που προκύπτουν μετά από επιληπτικές κρίσεις, αφού στη βιβλιογραφία αναφέρεται μείωση της NT-3 (Benzon et al. 1993, Hughes et al. 1998, Gall 1993).

Στο επίπεδο της έκφρασης των υποδοχέων της NT-3, σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις εντοπίζεται επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου μετά από μηχανικό τραυματισμό (Mudo et al. 1993, Hughes and Dragunow 1995). Το στοιχείο αυτό αποκαλύπτει πως ο εγκεφαλικός ιστός είναι «δεκτικός» στη δράση της NT-3 μετά από τραυματισμό, γεγονός που υποδεικνύει τη δυνατότητα θεραπευτικής της χρήσης. Πράγματι, η εξωγενής χορήγηση NT-3 έχει αποδειχθεί νευροπροστατευτική σε ορισμένες περιπτώσεις τραυματισμού του ΚΝΣ (Ebadí et al. 1996), η δυναμικότητά της όμως δεν είναι του επιπέδου του BDNF (Kirschner et al. 1996), ενώ ταυτόχρονα εμφανίζει τις ίδιες δυσκολίες διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Podulso and Curran 1996).

5.5. ΤΟ ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ (NO) ΚΑΙ Η ΝΕΥΡΩΝΙΚΗ ΣΥΝΘΕΤΑΣΗ ΤΟΥ NO.

5.5.1. Μονοξείδιο του Αζώτου (NO).

Το Μονοξείδιο του Αζώτου είναι ένα πολύ απλό μόριο, γνωστό στους χημικούς πάνω από έναν αιώνα. Στα τέλη της δεκαετίας του '80 άρχισαν να εμφανίζονται οι πρώτες εργασίες οι οποίες διερευνούσαν τους πιθανούς φυσιολογικούς ρόλους του NO. Περίπου 15 χρόνια μετά, είναι πλέον γνωστό πως το εύκολα διαχεόμενο αυτό μόριο χαρακτηρίζεται από έντονα πλειοτροπική δράση και όχι μόνο στο νευρικό σύστημα. Η πρώτη ιδιότητα του NO που περιγράφηκε, ήδη από τα μέσα της δεκαετίας του '70, όταν ακόμη δεν ήταν γνωστή η ενδογενής παραγωγή του, ήταν η πρόκληση αγγειοδιαστολής μέσω της χάλασης των λείων μυϊκών ινών των αγγείων (Arnold et al. 1977). Η βασική αυτή λειτουργία του NO επάγεται συνήθως από τη δράση ενός αγγειοδιασταλτικού νευροδιαβιβαστή (π.χ. της ακετυλοχολίνης) στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο νευροδιαβιβαστής ενεργοποιεί την παραγωγή του NO από το ενδοθήλιο. Ακολουθεί η τοπική διάχυση του μορίου και η ενεργοποίηση της γουανυλικής κυκλάσης και συνεπώς της σύνθεσης κυκλικού GMP. Τελικό αποτέλεσμα των παραπάνω αντιδράσεων είναι η αλλαγή του βαθμού συστολής των μυϊκών ινών (Dawson and Snyder 1994).

Τα τελευταία χρόνια συνεχώς συσσωρεύονται δεδομένα τα οποία αποδεικνύουν πως το NO εμφανίζει μεγάλη ποικιλία δράσεων στο νευρικό σύστημα. Πρώτη βασική ιδιότητά του είναι η τροποποίηση της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών στις συνάψεις. Υπάρχουν πειραματικά αποτελέσματα που δείχνουν τη θετική τροποποιητική δράση του NO στο διαβιβαστικό σύστημα της ακετυλοχολίνης (Sandberg et al. 1989) και την αρνητική δράση του στο σύστημα του γλουταμικού οξέος. Μία δεύτερη ιδιότητα που χαρακτηρίζει το NO είναι η αυτούσια δράση του ως νευροδιαβιβαστή. Παρά το γεγονός πως δεν έχουν εντοπισθεί υποδοχείς του NO, υπάρχουν ενδείξεις από τη δράση του στο μυεντερικό πλέγμα του γαστρεντερικού συστήματος οι οποίες υποστηρίζουν την υπόθεση πως το NO λειτουργεί και ως νευροδιαβιβαστής (Bredt et al. 1990). Επιπροσθέτως, το NO επηρεάζει τη διαπερατότητα των χασματοσυνδέσεων μεταξύ των κυττάρων του ραβδωτού σώματος, ιδιότητα η οποία χαρακτηρίζει τη δράση νευροδιαβιβαστών (O'Donnel and Grace 1997).

Η δράση του NO στον εγκέφαλο είναι σημαντική και κατά τη διαδικασία της διαφοροποίησης. Τα πειραματικά δεδομένα από την αρκετά έντονη ανοσοϊστοχημική εντόπιση της συνθετάσης του NO (Nitric Oxide Synthase/ NOS) κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου, σε συνδυασμό με την παρατηρούμενη μείωσή της μετά τη γέννηση, υποδεικνύουν πως το NO εμπλέκεται στις διαδικασίες της διαφοροποίησης και της κυτταρικής μετανάστευσης (Moritz et al. 1999, Santacana et al. 1998). Τα πειραματόζωα στα οποία έχει, με γενετική τροποποίηση, απαλειφθεί το γονίδιο της νευρωνικής συνθετάσης του NO αναπτύσσονται παρόλα αυτά φυσιολογικά, χωρίς εμφανείς λειτουργικές και ιστολογικές διαταραχές, με εξαίρεση προβλήματα στο νευρομυϊκό πλέγμα του γαστρεντερικού συστήματος (Huang et al. 1993).

Μία ακόμη παράμετρος της αναπτυξιακής δράσης του NO στο ΚΝΣ είναι η συμμετοχή του στη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου και οι κυτταροστατικές του ιδιότητες. Σύμφωνα με πειραματικά δεδομένα, το NO επάγει την παύση του κυτταρικού κύκλου σε συγκεκριμένα κύτταρα, δημιουργεί δηλαδή την απαραίτητη συνθήκη για την έναρξη των διαδικασιών διαφοροποίησης (Peunova and Epikolopov 1995). Επιπροσθέτως, μεγάλος όγκος συχνά αντικρουόμενων αποτελεσμάτων υπάρχει όσον αφορά στη συμμετοχή του NO στο φαινόμενο του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωσης). Φαίνεται πως μικρές ποσότητες NO έχουν νευροπροστατευτική δράση, ενώ μεγαλύτερου βαθμού απελευθέρωση NO οδηγεί σε απόπτωση (Brune et al. 1997). Ο βαθμός συμμετοχής του NO στο φαινόμενο της απόπτωσης υπό φυσιολογικές συνθήκες και ιδιαίτερα κατά την ανάπτυξη δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος.

Μία εξαιρετικά σημαντική και ενδιαφέρουσα πτυχή της λειτουργίας του NO στο φυσιολογικό εγκέφαλο είναι η συμμετοχή του στο φαινόμενο της πλαστικότητας των συνάψεων. Τα περισσότερα δεδομένα έχουν προκύψει από πειράματα με αναστολές της σύνθεσης του NO, στα οποία παρατηρήθηκε αναστολή της επαγωγής του φαινομένου της μακρόχρονης ενδυνάμωσης (Long Term Potentiation/ LTP) συνάψεων του υπόκαμπτου (Haley et al. 1992, Schuman and Madison 1991, Williams et al. 1993). Ανάλογα, άλλες ερευνητικές ομάδες έδειξαν πως το NO παίζει ρόλο και στο έτερο φαινόμενο πλαστικότητας των συνάψεων, την μακρόχρονη καταστολή (Long Term Depression/ LTD) (Calabresi et

al. 1999, Boulton et al. 1994, Shibuki and Okada 1991). Η επίδραση του NO στην πλαστικότητα των συνάψεων πιθανώς επιτυγχάνεται με την επίδρασή του σε ιοντικά κανάλια των νευρικών κυττάρων. Έχει αποδειχθεί πως το NO επιφέρει αλλαγές στα ηλεκτροχημικά χαρακτηριστικά των κυτταρικών μεμβρανών (Garthwaite and Boulton 1995), ίσως μέσω της επίδρασής του σε ασβέστιο-εξαρτώμενα κανάλια. Επίσης, ενδείξεις υπάρχουν για την επίδραση του NO στη λειτουργία των υποδοχέων των νευροδιαβιβαστών και ιδίως του γλουταμικού. Συγκεκριμένα, πειραματικά αποτελέσματα δείχνουν πως το NO αναστέλλει τη λειτουργικότητα των NMDA υποδοχέων, κυρίως επιδρώντας στα ενδοκυτταρικά γεγονότα που ακολουθούν τη σύνδεση του νευροδιαβιβαστή στους υποδοχείς του (Manzoni and Bockaert 1993, Kato Zornmski 1993).

Για την επαγωγή όλων των προαναφερθέντων φαινομένων, το NO πρέπει να ενεργοποιεί ορισμένες ενδοκυτταρικές βιοχημικές αντιδράσεις. Τα πρώτα στοιχεία για τις πιθανές αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχει το NO προέκυψαν από τη γνώση των απλών χημικών ιδιοτήτων του. Για παράδειγμα, το NO –καθώς και οι ελεύθερες ρίζες που προκύπτουν από αυτό- μπορεί να αντιδρά με το σίδηρο. Πράγματι, γνωρίζουμε πως το NO συμμετέχει στη ρύθμιση των αποθεμάτων σιδήρου στον οργανισμό επιδρώντας στο μόριο της φερριτίνης (Reif and Simons 1990). Επίσης, έχει βρεθεί πως το NO είναι ισχυρός αναστολέας της μιτοχονδριακής αναπνοής, επιδρώντας στα άτομα σιδήρου πολλών αναπνευστικών ενζύμων (Nathan 1992). Ακόμη, το μόριο του NO αντιδρά με αμίνες, σχηματίζοντας νιτρωδοαμίνες, ουσίες με ιδιαίτερα καρκινογόνες ιδιότητες (Nguyen et al. 1992).

Στο επίπεδο της μοριακής βιολογίας, η κύρια οδός διαμεσολάβησης της δράσης του NO είναι η ενεργοποίηση της διαλυτής γουανυλικής κυκλάσης και η επακόλουθη παραγωγή του κυκλικού GMP. Το συμπέρασμα αυτό έχει προκύψει από την παρατήρηση πως η κατανομή του πεπτιδίου της γουανυλικής κυκλάσης και της συνθετάσης του NO είναι σχεδόν ταυτόσημη, τουλάχιστον στον εγκέφαλο (Taylor and Sharma 1992, Southam and Garthwaite 1993). Επιπροσθέτως, υπάρχουν ενδείξεις για την ενεργοποίηση συγκεκριμένων G πρωτεϊνών, όπως η G α 1 GTPase (Lander et al. 1993), από το NO καθώς και για τη συμμετοχή του στη ρύθμιση του μονοπατιού ενδοκυττάριας μεταγωγής σήματος του p21Ras (Dawson et al. 1998). Τέλος, έχει πολλαπλώς δειχθεί πως η δράση του NO επηρεάζει τη λειτουργία διαφόρων μορφών κυκλοοξυγενασών (cox), πιθανότατα μέσω μεταγραφικών παραγόντων όπως ο NF-kappa B και ο AP-1 (von Knethen et al. 1999).

5.5.2. Συνθετάση του NO (NOS).

Οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί έχουν τη δυνατότητα παραγωγής NO χάρη στην καταλυτική δράση ενός ενζύμου, το οποίο καλείται συνθετάση του NO. Πρόκειται για διμερές ένζυμο, με μοναδικά χαρακτηριστικά, όπως η ύπαρξη επιτόπου με ενεργότητα οξυγενάσης ή αναγωγάσης, ο οποίος είναι εξαρτώμενος από την καλμοντουλίνη και περιέχει κυτόχρωμα τύπου P450. Η NOS καταλύει την οξειδωση (με μεταφορά 5 ηλεκτρονίων) ενός αμινοξέος, της L-αργινίνης, σε L-

κιτρουλίνη, με τη συμμετοχή της τετραυδροβιοπτερίνης και των συνενζύμων FAD και FMN (Nathan and Xie 1994).

Μέχρι τώρα έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί τρεις ισομορφές της NOS. Δύο από αυτές εμφανίζουν συνεχή και σταθερή κυτταρική έκφραση και η λειτουργία τους εξαρτάται από την καλμοντουλίνη. Η μία εντοπίζεται αποκλειστικά στο ενδοθήλιο και καλείται ενδοθηλιακή NOS (endothelial NOS/ eNOS). Η δεύτερη εντοπίζεται κυρίως στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα, σε σκελετικούς μύς και σε επιθηλιακά κύτταρα του στομάχου, της μήτρας και άλλων οργάνων. Η ισομορφή αυτή αποκαλείται νευρωνική NOS (neuronal ή brain NOS /nNOS ή bNOS). Η τρίτη ισομορφή της NOS εμφανίζει επαγόμενη έκφραση (inducible NOS/ iNOS), συνήθως μετά από ανοσολογικό ερεθισμό ή φλεγμονές, και δρα ανεξάρτητα της καλμοντουλίνης. Σε γενικές γραμμές οι nNOS και eNOS ενεργοποιούνται μετά από αυξήσεις της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου και επιφέρουν μικρής έντασης και διάρκειας παραγωγή NO. Από την άλλη μεριά, η επαγωγή της iNOS ακολουθείται από μεγαλύτερης έντασης και χρονικής διάρκειας παραγωγή NO.

Παρά το γεγονός πως όλες οι ισομορφές της NOS εντοπίζονται στον εγκέφαλο των θηλαστικών και εμφανίζονται να συμμετέχουν στην απόκριση του εγκεφαλικού ιστού στους τραυματισμούς, στην παρούσα εργασία θα αναλυθεί κυρίως η νευρωνική NOS, η οποία αποτελεί την βασική ισομορφή του ενζύμου που εκφράζεται στο ΚΝΣ.

Η ανθρώπινη nNOS κωδικοποιείται από ένα γονίδιο το οποίο βρίσκεται στο δωδέκατο χρωμόσωμα, στη θέση 12q24.2. Περιλαμβάνει 29 εξόνια και έχει μέγεθος μεγαλύτερο από 240 kb (Fujisawa et al. 1994, Wang et al. 1999b). Η παρουσία του πεπτιδίου της nNOS στους επίμυες αρχίζει στην εμβρυϊκή περίοδο και φτάνει στο μέγιστο την 16^η εμβρυϊκή μέρα. Στη συνέχεια ελαττώνεται σταδιακά και αποκτά ένα σταθερό πρότυπο έκφρασης, στον ενήλικο οργανισμό. Στον εγκέφαλο των επίμυων δεν παρατηρούνται δομές ιδιαίτερα πλούσιες σε nNOS. Διάσπαρτα νευρικά -αλλά και λίγα γλοιακά- κύτταρα που περιέχουν nNOS εντοπίζονται σε όλο το εύρος του ιστού (Egberongbe et al. 1994). Τέτοια κύτταρα είναι τα μη πυραμιδικά κύτταρα του φλοιού των ημισφαιρίων, τα πυραμιδικά κύτταρα του ιπόκαμπου, οι μη ακανθώδεις νευρώνες του ραβδώτου, τα καλαθωτά, κοκκιώδη και Purkinje κύτταρα της παρεγκεφαλίδας και κυτταρικές ομάδες σε πολλούς πυρήνες του στελέχους (Endoh et al. 1994, Bidmon et al. 1997, Moritz et al. 1999). Η υποκυτταρική κατανομή της nNOS χαρακτηρίζεται ως κυτταροπλασματική, ενώ συχνά παρατηρούνται και νευρικές απολήξεις που είναι ανοσοθετικές στο ένζυμο. Είναι εξάλλου γνωστό πως το πολυπεπτίδιο της nNOS περιλαμβάνει έναν επίτοπο αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη μεταφορά της σε συναπτικά κυστίδια (Brennan et al. 1995, Stricker et al. 1997).

Η σημαντική και πλειοτροπική δράση του NO στον εγκέφαλο οδήγησε τους επιστήμονες στην προσπάθεια να διερευνηθούν πώς επιτυγχάνεται η ρύθμιση της παραγωγής του. Η ρύθμιση αυτή βέβαια είναι σχεδόν ταυτόσημη με τη ρύθμιση της δρατικότητας των ισομορφών της συνθετάσης του NO. Όσον αφορά τη νευρωνική NOS, η ρύθμισή της εντοπίζεται σε επίπεδο μεταγραφής, μετάφρασης, μετα-μεταφραστικό, υποστρώματος και συνενζύμων. Από το γονίδιο της nNOS παράγονται πολλαπλές μορφές μεταγράφων, μέσω ποικίλων μηχανισμών όπως το

διαφορικό μάτισμα και η ενεργοποίηση διαφορετικών υποκινητών (Wang et al. 1999b). Η μετάφραση των διαφόρων μεταγράφων δεν καταλήγει στη σύνθεση του ίδιου πολυπεπτιδίου. Έχουν περιγραφεί μορφές της nNOS στις οποίες λείπουν συγκεκριμένοι επίτοποι πρόσδεσης σε πρωτεΐνες (π.χ. τμήμα σύνδεσης με την καλμοντουλίνη), χωρίς όμως να έχει διευκρινισθεί εάν πρόκειται για σπάνιες περιπτώσεις, οι οποίες συνδέονται με παθολογικές καταστάσεις ή φυσιολογική ποικιλότητα στην έκφραση και λειτουργία του ενζύμου (Brenman et al. 1997, Beckman et al. 1990).

Στο επίπεδο των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, η πρόσδεση της καλμοντουλίνης είναι βασική παράμετρος ρύθμισης της ενεργότητας της nNOS. Φαίνεται πως η πρόσδεση αυτή επιφέρει μεταβολές στη στερεοδομή του ενζύμου, με αποτέλεσμα το πλησίασμα του C-τελικού άκρου (στο οποίο δεσμεύεται η αργινίνη) με το N-τελικό άκρο (που φέρει μόριο αίμης). Με αυτόν τον τρόπο γίνεται δυνατή η μεταφορά ηλεκτρονίων (Nathan and Xie 1994). Μία ακόμη συχνή τροποποίηση του μορίου είναι η φωσφορυλίωση. Ορισμένες σερίνες μπορούν να φωσφορυλιωθούν σε όλες τις ισομορφές της NOS (Michel et al. 1993). Η φωσφορυλίωση της nNOS δεν έχει αποδειχθεί σαφώς ότι μεταβάλλει σημαντικά την ενεργότητα της (Bredt et al. 1992). Άλλες παράμετροι που πιθανώς να επηρεάζουν τη δραστηριότητα του ενζύμου είναι η διαθεσιμότητα υποστρώματος, οξυγόνου και τετραϋδροβιοπτερίνης, καθώς και η αρνητική ανατροφοδότηση του ίδιου του παραγόμενου NO (Nathan and Xie 1994). Τέλος, σε επίπεδο λειτουργίας του ιστού, είναι αποδεδειγμένη η επαγωγή της έκφρασης της nNOS μετά από αύξηση των επιπέδων των ιόντων ασβεστίου, όπως για παράδειγμα μετά από τη μετασυναπτική δέσμευση γλουταμικού σε NMDA υποδοχείς (Baader and Schilling 1996). Επίσης, υπάρχουν δεδομένα σύμφωνα με τα οποία η τεστοστερόνη επάγει την έκφραση της nNOS σε ορισμένες δομές του εγκεφάλου (Du and Hull 1999).

5.5.3. nNOS και NO μετά από τραυματισμούς του εγκεφάλου.

Το NO έχει κυτταροτοξικές ιδιότητες, κυρίως λόγω της δράσης του ως ελεύθερης ρίζας, τις οποίες χρησιμοποιεί, με εκλεκτικό βέβαια τρόπο, ο οργανισμός των θηλαστικών κατά την ανοσολογική απόκρισή του σε εισβολές παθογόνων παραγόντων (απελευθέρωση NO στις φλεγμονές). Το παραπάνω δεδομένο, σε συνδυασμό με την παραγωγή NO μετά από ενεργοποίηση του γλουταμινεργικού νευροδιαβιβαστικού συστήματος, οδήγησε στη διατύπωση της υπόθεσης πως το NO ευθύνεται για κυτταροτοξικά φαινόμενα σε περιπτώσεις εγκεφαλικών τραυματισμών. Πολλές ερευνητικές ομάδες απέδειξαν πως η χορήγηση χημικών ουσιών με αντιοξειδωτικές ιδιότητες επιφέρει βελτίωση της καταστροφής του εγκεφαλικού ιστού μετά από διάφορα είδη τραυματισμού (Ekert et al. 1997, Goldberg and Choi 1993).

Ειδικότερα για το NO παρά το γεγονός πως η νευροτοξική δράση του είναι καλά στοιχειοθετημένη υπάρχουν αρκετές ερευνητικές εργασίες που αποδεικνύουν πως η επίδραση του NO στο νευρικό ιστό, υπό συγκεκριμένες συνθήκες, μπορεί να λειτουργεί νευροπροστατευτικά (Zhang et al. 1995, Brune et al. 1997). Η αύξηση στην παρουσία του NO και των παραγώγων του (NO₂⁻, NO₃⁻) μετά από

τραυματισμό του εγκεφαλικού ιστού έχει μετρηθεί τόσο μέσα στο ίδιο το ΚΝΣ, όσο και στο πλάσμα (Malinski et al. 1993, Kumura et al. 1994, Yamanaka et al. 1995).

Όσον αφορά στην έκφραση του γονιδίου και την παρουσία του πεπτιδίου της nNOS μετά από εγκεφαλικούς τραυματισμούς, οι υπάρχουσες μελέτες δεν είναι πολλές. Οι περισσότερες ερευνητικές ομάδες έχουν αναφέρει αυξημένη έκφραση της nNOS είτε σε μοντέλα ισχαιμίας (Zhang et al. 1994), είτε μετά από εστιασμένο (Stojkovic et al. 1998) αλλά και διάχυτο τραυματισμό (Rao et al. 1999, Park and Yi 2001). Μάλιστα, υπάρχουν ενδείξεις πως η έκφραση της nNOS χαρακτηρίζει κυτταρικούς πληθυσμούς με μειωμένη ανθεκτικότητα σε κυτταροτοξικές καταστάσεις (Black et al. 1995). Από την άλλη μεριά υπάρχουν αναφορές απουσίας μεταβολής των επιπέδων της nNOS μετά από τραυματισμό του εγκεφάλου (Cobbs et al. 1997). Επίσης σε μία μελέτη μέτρησης της δραστηριότητας της nNOS μετά από τραυματισμό, δεν βρέθηκε αύξηση (Alagarsamy et al. 1998). Συνεπώς εγείρονται ερωτηματικά σχετικά με το εάν η αύξηση στην έκφραση της nNOS συνοδεύεται απαραίτητα από αντίστοιχη αύξηση στην παραγωγή NO.

Πρέπει πάντως να σημειωθεί πως η αυξημένη παρουσία NO μετά από εγκεφαλικούς τραυματισμούς μπορεί να οφείλεται στη δράση των άλλων δύο μορφών NOS. Η eNOS έχει βρεθεί αυξημένη μετά από μηχανικό τραυματισμό του εγκεφάλου επίμυων (Cobbs et al. 1997). Επίσης, η iNOS εκφράζεται στον εγκεφαλο μετά από ισχαιμικό (Iadecola et al. 1995) αλλά και μηχανικό τραυματισμό (Clark et al. 1996, Grzybicki et al. 1998), κυρίως σε λευκοκύτταρα τα οποία είχαν εισέλθει στο παρέγχυμα από την περιφερική κυκλοφορία.

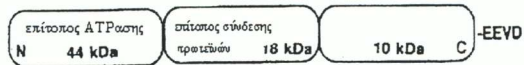
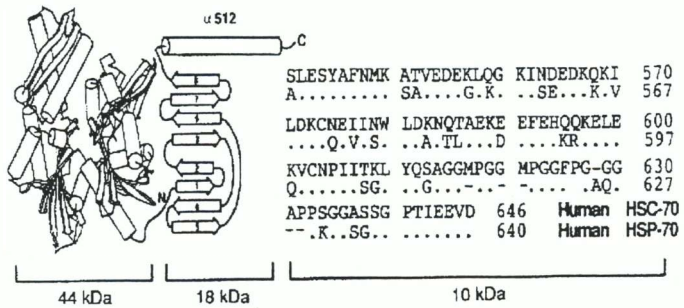
5.6. ΘΕΡΜΟΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ 70 (HEAT SHOCK PROTEIN 70/ HSP70)

Η στρατηγική που ακολουθούν τα κύτταρα για να αντιμετωπίσουν ακραίες καταστάσεις, όπως η αύξηση της θερμοκρασίας, η ανοξία και η επίδραση τοξικών παραγόντων, εμφανίζει κοινά σημεία σε όλες τις εξελικτικές βαθμίδες. Ένας πολύ συντηρημένος εξελικτικά μηχανισμός, ο οποίος ενεργοποιείται σε τέτοιες καταστάσεις, είναι η επαγωγή της έκφρασης των αποκαλούμενων θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών. Πρόκειται για μία οικογένεια πρωτεϊνών που υφίσταται τόσο σε προκαρυωτικούς όσο και σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η έκφρασή τους επάγεται από την παρουσία στο κύτταρο μετουσιωμένων πρωτεϊνών και έχει ως στόχο την αποκατάσταση της λειτουργίας τους.

Η πρώτη αναφορά σε αυτές τις πρωτεΐνες εντοπίζεται το 1962, σε πειράματα θέρμανσης των σιελογόνων αδένων της *Drosophila* (Ritossa, 1962). Η οικογένεια των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών περιλαμβάνει πολλά μέλη, τα οποία ονοματίζονται ανάλογα με το μοριακό βάρος τους, το πρότυπο έκφρασής τους και τη δομή τους. Έτσι, έχουν αναγνωρισθεί οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες (Heat shock proteins/ HSPs) 60, 70, 90 και 110, οι πρωτεΐνες που επάγονται μετά από στέρηση γλυκόζης (Glucose-regulated proteins/GRPs) 34, 47, 56, 75, 78, 94 και 174 και μία ομάδα HSPs με μικρό μοριακό βάρος (γύρω στα 20kDa), όπως η ομπικτινίνη και οι HSPs 10 και 20 (Kiang and Tsokos 1998). Ενώ πολλά μέλη αυτής της υπέρ-

οικογένειας πρωτεϊνών εκφράζονται υπό φυσιολογικές συνθήκες (Heat shock cognate proteins/ HSCs) εντούτοις η έκφρασή τους αυξάνεται μετά από κυτταροτοξικά επεισόδια (π.χ η Hsc70, Aoki et al. 1993). Η υπό-οικογένεια των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών με βάρος περίπου στα 70 kDa περιλαμβάνει κυρίως την συνεχώς εκφραζόμενη Hsc70, η οποία είναι η πιο διαδεδομένη πρωτεΐνη μοριακός συνοδός στη φύση, την επαγόμενη Hsp70 (στην πραγματικότητα Hsp72) και την Grp78 (μία συνεχώς εκφραζόμενη, ρυθμιζόμενη από τη γλυκόζη, πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού δικτύου) (Yenari et al. 1999). Στην εργασία μας θα εστιαστούμε σε αυτήν την ομάδα HSPs και πιο ειδικά στην Hsp70.

Οι Hsp-70s εμφανίζουν ομολογία 60-78% στα διάφορα ευκαρυωτικά κύτταρα και 40-60% μεταξύ ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών οργανισμών. Περιλαμβάνουν τέσσερις επιτόπους: έναν 44kDa ο οποίος περιέχει τη θέση με ενεργότητα ΑΤΡάσης, έναν επίτοπο 18kDa στον οποίον προσδένονται τα πεπτίδια με στόχο την επίτευξη της σωστής στερεοδιάταξής τους και έναν επίτοπο 10kDa ο οποίος καταλήγει στην πολύ συντηρημένη αλληλουχία EEVD (εικ. 5.6.α) Η αλληλουχία αυτή είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση της ποσότητας του mRNA που θα μεταφραστεί και εντοπίζεται σε όλες τις Hsp70 και Hsp90 (Denisenko and Yarchuk, 1990, Kiang and Tsokos 1998).

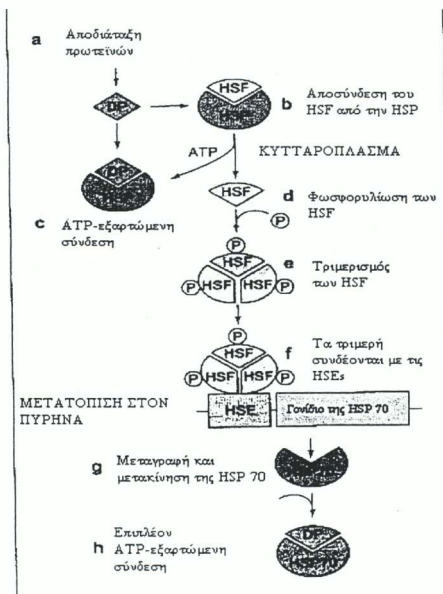


Εικ:5.6.α. Σχηματική παράσταση της δομής των Hsc70 και Hsp70.

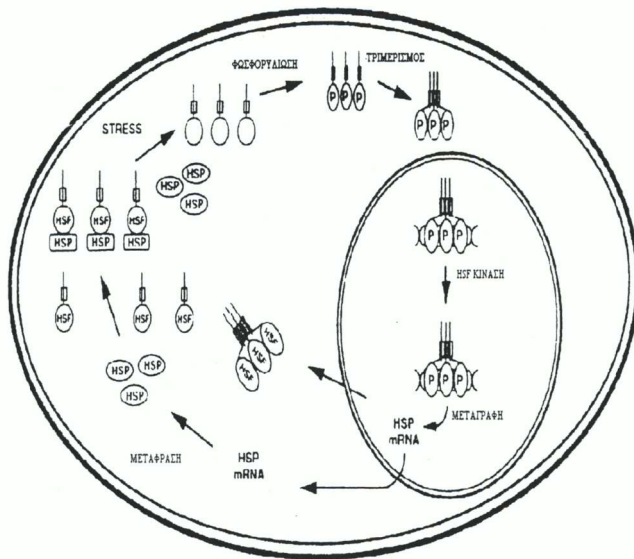
[Προσαρμογή σχήματος από Kiang and Tsokos (1998)]

Η ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων των Hsp70s επιτυγχάνεται μέσω της σύνδεσης ορισμένων ειδικών παραγόντων ρύθμισης της μεταγραφής (Heat shock Factors/ HSFs) σε περιοχές των υποκινητών τους που ονομάζονται Heat Shock Elements/ HSEs. Είναι περιοχές του DNA που περιλαμβάνουν πέντε

επαναλήψεις της αλληλουχίας nGAAn. Στα θηλαστικά, οι HSFs δεν είναι προσδεσμένοι υπό φυσιολογικές συνθήκες στα ρυθμιστικά στοιχεία. Όταν προκληθεί κάποιο stress, οι HSFs οι οποίοι βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα πιθανώς εναμφέροι με HSPs, αποδεσμεύονται, φωσφορυλιώνονται από κινάσες σερινών/θρεονινών ή κινάσες PKC, δημιουργούν ομοτριμερή και εισέρχονται στον πυρήνα. Η ακολουθούμενη έναρξη της μεταγραφής οδηγεί στη σύνθεση πολυάριθμων μορίων HSPs οι οποίες δεσμεύουν τους HSFs και οδηγούν στη μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας των γονιδίων τους (εικ. 5.6.β και 5.6.γ). Οι Li et al. (1995) έδειξαν πως μία πρωτεΐνη Ku είναι δεσμευμένη στα HSEs αναστέλλοντας τη μεταγραφή τους. Μέχρι τώρα έχουν ταυτοποιηθεί τέσσερις διαφορετικοί HSFs στα σπονδυλωτά (HSF1, HSF2, HSF3, HSF4). Στα θηλαστικά οι σημαντικότεροι είναι οι HSF1 και HSF2. Περιλαμβάνουν έναν επίτοπο πρόσδεσης, στον οποίον δεσμεύονται πρωτεΐνες και τα ρυθμιστικά στοιχεία του υποκινητή, έναν επίτοπο τριμερισμού, ο οποίος έχει τη μορφή «φερμουάρ λευκίνη» και ευθύνεται για το σχηματισμό των τριμερών των HSFs και ένα μικρό συντηρημένο τμήμα (Kiang and Tsokos 1998). Το μονομερές των HSFs στον άνθρωπο έχει βάρος 57 kDa. Η μετακίνηση των HSFs προς τον πυρήνα ρυθμίζεται από τα επίπεδα των ιόντων Ca^{++} στο κυτταρόπλασμα, από τη φωσφορυλίωσή τους και από τα επίπεδα της κυτταροπλασματικής συγκέντρωσης των HSPs (Ding et al. 1998). Η ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του γονιδίου της Hsp70 είναι πάντα παροδική, με διάρκεια και ένταση που καθορίζονται από τα χαρακτηριστικά του



Εικ: 5.6.β. Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας των HSEs και HSFs. [Προσαρμογή σχήματος από Yenari et al. (1999)]



Εικ: 5.6.γ. Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας των HSEs και HSFs.
 [Προσαρμογή σχήματος από Kiang and Tsokos (1998)]

ερεθίσματος που την προκάλεσε. Αντίστοιχα παροδική είναι και η σύνθεση του πεπτιδίου της Hsp70, με χρονική διάρκεια όμως πολύ πιο εκτεταμένη. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τον υψηλό χρόνο ημιζωής της (σε ανθρώπινα κύτταρα της επιδερμίδας περίπου 48 ώρες) επιτρέπει την μακρόχρονη παρουσία της στα κύτταρα.

Η λειτουργία των HSPs περιγράφεται από τον όρο «μοριακοί συνοδοί» (molecular chaperons). Για τις Hsp70 η δραστηριότητα αυτή επιτυγχάνεται με δύο κυρίως τρόπους. Πρώτον, προσδένουν τις πρωτεΐνες που μόλις έχουν συντεθεί και τις μεταφέρουν στις Hsp60, στα πλαίσια μίας διαδικασίας η οποία καταλήγει στην τελική στερεοδιαμόρφωσή τους. Δεύτερον, βοηθούν στη μεταφορά των πρωτεϊνών στα διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα και οργανίδια (Kiang and Tsokos 1998). Οι δράσεις αυτές εξαρτώνται από την ύπαρξη συγκεκριμένων αμινοξικών αλληλουχιών αναγνώρισης στις πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρούν και όχι σε απλούς υδρόφοβους δεσμούς. Για παράδειγμα η αμινοξική αλληλουχία PKKKRKV επιτρέπει τη μεταφορά του T αντιγόνου του ιού SV40 στον πυρήνα (Shi and Thomas 1992). Οι Hsp70 φαίνεται πως έχουν τη δυνατότητα άμεσης αλληλεπίδρασης με τα λιπαρά οξέα, ιδιότητα που τους επιτρέπει να προσδένονται στις μεμβράνες (Guidon and Hightower 1986). Η ιδιότητά τους αυτή παίζει σημαντικό ρόλο στη δράση τους ως μεταφορέων των πρωτεϊνών από το κυτταρόπλασμα στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων και του ενδοπλασματικού

δικτύου. Επιπροσθέτως, οι Hsp70 χρειάζονται τη βοηθητική δράση άλλων πρωτεϊνών, όπως οι Sec63, Scj1, Ydj1 και Sis1, χωρίς όμως να είναι ακόμη γνωστή η λειτουργία των πρωτεϊνών αυτών. Είναι εξάλλου γνωστό πως ορισμένες θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες, όπως οι Hsp90 και Hsp60, χρειάζονται τη συνοδευτική δράση άλλων HSPs για να λειτουργήσουν. Ακόμη, οι Hsp70 μπορούν να λειτουργούν βοηθητικά προς άλλες πρωτεΐνες, όπως τα πολυπεπτιδικά σύμπλοκα που είναι υπεύθυνα για τις γλοιο-αζονικές μεταφορές.

Η ενεργοποίηση του συστήματος των Hsp70 (μεταγραφή, μετάφραση, ενεργότητα) ρυθμίζεται από συγκεκριμένους παράγοντες. Οι πιο σημαντικοί από αυτούς είναι η τιμή του ενδοκυττάριου pH (κυρίως η μείωσή του, φαινόμενο το οποίο συνδέεται με τη μείωση της κυτταροπλασματικής συγκέντρωσης Ca^{++}), το κυκλικό AMP, η ισορροπία στη δράση μεταξύ της πρωτεϊνικής κινάσης C και των φωσφατασών των πρωτεϊνών και πρωτίστως η 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP3) (Kiang and Tsokos 1998). Στους παράγοντες επαγωγής της έκφρασης της Hsp70 πρέπει να συμπεριληφθεί και η παρουσία μετουσιωμένων πρωτεϊνών χωρίς όμως να είναι σαφής η οδός που ευθύνεται για το συγκεκριμένο φαινόμενο (Sharp et al. 1999). Μία εκδοχή είναι η ακόλουθη: οι μετουσιωμένες πρωτεΐνες αναγνωρίζονται και συνδεόνται από μέλη της οικογένειας των HSPs (π.χ. την Hsp90), τα οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι συνδεδεμένα με τους παράγοντες HSFs, απενεργοποιώντας τους. Η αποδέσμευση των HSFs από τις HSPs επιτρέπει τη φωσφορυλίωσή τους, τον τριμερισμό τους και τελικά τη μετακίνησή τους στον πυρήνα στον οποίο επάγουν την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων των HSPs (Yenari et al. 1999).

Οι Hsp70 διαθέτουν προστατευτικές (και νευροπροστατευτικές) ιδιότητες όπως διαφαίνεται από πληθώρα *in vitro* και *in vivo* πειραμάτων (ανασκοπήσεις: Yenari et al. 1999, Sharp et al. 1999). Η θέρμανση διαφόρων ιστών έχει αποδειχθεί προστατευτική σε επακόλουθες επιβλαβείς καταστάσεις (ανοξία, δράση τοξικών ουσιών). Επιπροσθέτως, κυτταρικοί πληθυσμοί στους οποίους επάγεται πειραματικά (όχι με θέρμανση) η έκφραση των Hsp70 χαρακτηρίζονται από αυξημένη ανθεκτικότητα σε ποικίλλα κυτταροτοξικά ερεθίσματα (Takano et al. 1998), όπως επίσης και οι ιστοί γενετικώς τροποποιημένων μιών με υπερέκφραση του γονιδίου της Hsp70 (Marber et al. 1995).

Οι Hsp70 έχουν την ιδιότητα να διακρίνουν τη στερεοδομή πολλών πρωτεϊνών και η πρόσδεση με αυτές οδηγεί είτε στη διαφύλαξη της δομής τους είτε στη διόρθωσή της. Έχει επίσης περιγραφεί η συμμετοχή των Hsp70 στη ρύθμιση του μηχανισμού προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, είτε θετικά είτε αρνητικά (Fuqua et al. 1994, Samali and Cotter 1996). Υπάρχουν ενδείξεις για τη δυνατότητα της Hsp70 να αποτρέπει την προκαλούμενη από ανοξία ή υπερθέρμανση απόπτωση σε καλλιέργειες νευρικών κυττάρων, όχι όμως και μετά από άλλα ερεθίσματα (Wagstaff et al. 1998). Ακόμη, οι Hsp70 φαίνεται πως συμβάλλουν στη «καθήλωση» των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών στο κυτταρόπλασμα, διαδικασία η οποία οδηγεί στην απενεργοποίηση της δυνατότητάς τους να εισέρχονται στον πυρήνα και να δρουν ως ρυθμιστές της μεταγραφής (Edwards et al. 1992). Ορισμένες ακόμη ιδιότητες των Hsp70 είναι η μείωση του ενδοκυττάριου pH και η αναστολή της εισόδου ιόντων Ca^{++} πιθανώς μέσω της απενεργοποίησης των ιοντικών καναλιών ανταλλαγής Na^+/Ca^{++} . Τέλος, η νευροπροστατευτική δράση

της Hsp70 μπορεί να οφείλεται στην αναστολή της ενεργότητας της σύνθεσής του NO και στην απομάκρυνση του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB από τον πυρήνα (Feinstein et al. 1997, Heneka et al. 2000). Παρόλο που δεν έχει ακόμη αποδειχθεί αν η παραγωγή της Hsp70 έχει νευροπροστατευτικές ή όχι ιδιότητες, ήδη έχουν γίνει προσπάθειες για τη παρασκευή φαρμάκων που επάγουν τη σύνθεσή της, όπως ο μη συναγωνιστικός ανταγωνιστής των NMDA υποδοχέων του γλουταμικού φενκυκλιδίνη (phencyclidine), χωρίς όμως ιδιαίτερη επιτυχία (στην περίπτωση της φενκυκλιδίνης λόγω σοβαρών ψυχωτικών παρενεργειών).

Η επαγωγή της έκφρασης της Hsp70 έχει μελετηθεί κυρίως μετά από ισχαιμικά τραυματικά επεισόδια και λιγότερο μετά από μηχανικούς εγκεφαλικούς τραυματισμούς. Η γενική εικόνα που παρατηρείται μετά από καταστροφή εγκεφαλικού ιστού είναι η άμεση επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου της Hsp70 (Sharp et al. 1993, Brown 1990, Dutcher et al. 1998, Truettner et al 1999, Plumier et al. 1997, Planas 1997a) η οποία ακολουθείται από παραγωγή του πεπτιδίου (Plumier et al. 1997, Hoshino 1995, Dutcher et al. 1998, Zhou et al. 2001), με αποτέλεσμα στα κύτταρα που έχουν υποστεί stress η Hsp70 να είναι η κύρια κυταροπλασματική πρωτεΐνη (Sharp et al. 1999). Η επαγωγή της Hsp70 παρατηρείται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους (νευρικά, αστρογλοιακά και ολιγοδενδρογλοιακά κύτταρα). Στις δομές που βρίσκονται πολύ κοντά στον τραυματισμό εντοπίζεται συνήθως μόνο αύξηση στη σύνθεση του mRNA, ενώ η σύνθεση της πρωτεΐνης παρατηρείται στις παράπλευρες του τραύματος περιοχές. Πρέπει πάντως να τονισθεί πως η κατανομή των κυττάρων στα οποία εκφράζεται η Hsp70 εξαρτάται και από τον τύπο του τραυματισμού. Στους χημειοτοξικούς τραυματισμούς η επαγωγή της Hsp70 εντοπίζεται μόνο στον πυρήνα της καταστροφής, ενώ σε μηχανικούς τραυματισμούς επεκτείνεται και σε πιο απομακρυσμένες δομές (Dutcher et al. 1998). Η παρουσία του mRNA της Hsp70 απουσία του πεπτιδίου εξηγείται από ορισμένες ομάδες ως αποτέλεσμα της αναστολής της πρωτεϊνσύνθεσης στα τραυματισμένα κύτταρα και θεωρείται πως χαρακτηρίζει τα κύτταρα τα οποία δεν πρόκειται να επιβιώσουν (Planas et al. 1997a-b, Massa et al. 1996, Nowak et al. 1993). Από την άλλη μεριά, η έκφραση τόσο του μεταγράφου όσο και του πεπτιδίου από το ίδιο κύτταρο ερμηνεύεται ως μάρτυρας ανθεκτικότητας. Πρέπει πάντως να σημειωθεί πως έχει καταγραφεί η δυνατότητα μεταφοράς της Hsp70 από γλοιακά κύτταρα σε νευρικά, πιθανώς στα πλαίσια της νευροπροστατευτικής δράσης των γλοιακών κυττάρων (Sharp et al. 1999).

Πέρα όμως από οποιαδήποτε άλλη ερμηνεία, η παρουσία της Hsp70 στα κύτταρα μετά από τραυματισμό σαφώς συνδέεται με την εντόπιση ελαττωματικών πρωτεϊνών. Σε ερευνητικό επίπεδο, η Hsp70 χρησιμοποιείται ευρέως ως δείκτης κυττάρων τα οποία βρίσκονται σε κατάσταση stress (Motte et al. 1998) και περιγράφει την περιοχή εκείνη του ιστού στην οποία είναι πολύ πιθανό να παρατηρηθεί εκτεταμένος κυτταρικός θάνατος. Ορισμένες ομάδες προτείνουν μάλιστα τη χρησιμοποίηση της εντόπισης της Hsp70 στην κλινική και ιατροδικαστική πράξη (Kubo et al. 1998, Radjev and Sharp 2000), καθώς φαίνεται πως μπορεί να αποτελέσει αξιόπιστο στοιχείο για προηγηθείσες τοξικές καταστάσεις και να βοηθήσει στον ανατομικό προσδιορισμό της έκτασης της ιστικής καταστροφής.

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια να μελετηθεί ένας συνδυασμός παραγόντων, μετά από διεισδυτικό, μηχανικό εγκεφαλικό τραυματισμό.

Επιλέχθηκε το συγκεκριμένο μοντέλο τραύματος διότι χαρακτηρίζεται από ορισμένα πλεονεκτήματα:

- Όταν ακολουθείται το συγκεκριμένο πρωτόκολλο με προσοχή, διακρίνεται από μεγάλη επαναληψιμότητα, γεγονός που επιτρέπει την εξαγωγή συμπερασμάτων με τη χρήση του μικρότερου δυνατού αριθμού πειραματόζωων.
- Δεν προκαλείται μαζική και διάχυτη καταστροφή του εγκεφαλικού ιστού, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η εντόπιση και μελέτη συγκεκριμένων μηχανισμών απόκρισης του ιστού στο τραύμα.
- Δεν επιφέρει άμεσα το θάνατο του πειραματοζώου και επομένως επιτρέπει τη μελέτη των δευτερευόντων χρονικά φαινομένων που συνοδεύουν τον τραυματισμό του εγκεφαλικού ιστού και τα οποία ευθύνονται για σημαντικές μακροχρόνιες επιπλοκές των ΚΕΚ. Πρέπει να τονισθεί πως οι μακροχρόνιες επιπλοκές των ΚΕΚ εμφανίζονται με τα ίδια ποσοστά σε τραυματίες που έχουν ανταπεξέλθει σε βαριάς μορφής ΚΕΚ και σε ασθενείς με μέτριους τραυματισμούς. Επίσης δίνεται η δυνατότητα να δοκιμασθούν οι νευροπροστατευτικές και νευροαναγεννητικές ιδιότητες συγκεκριμένων παραγόντων.
- Επιτρέπει την επιλογή της περιοχής που τραυματίζεται και συνεπώς δίνεται η δυνατότητα να μελετηθούν τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της απόκρισης συγκεκριμένων δομών του εγκεφάλου και η σύγκρισή τους με άλλες.
- Εμφανίζονται ορισμένα χαρακτηριστικά τα οποία παραπέμπουν σε κλινικές παρατηρήσεις που αφορούν την πλειοψηφία των ΚΕΚ (αποδιοργάνωση του μεσολόβιου, σχηματισμός αστρογλοιακής ουλής, ενδοκοιλιακές αιμορραγίες).
- Δεν απαιτείται εξοπλισμός του εργαστηρίου με ειδικά μηχανήματα παρακολούθησης των ζωτικών λειτουργιών του πειραματοζώου κατά την επέμβαση και μετά από αυτήν.

Το μοντέλο τραύματος που εφαρμόστηκε στα πειράματά μας προσομοιάζει σε τραυματισμούς από βλήματα και γενικώς ξένα σώματα, αλλά και σε πτυχές της κλινικής εικόνας ενός πολυτραυματία (για παράδειγμα από τροχαίο ατύχημα). Ούτως ή άλλως πρέπει να αναφερθεί πως οι διεισδυτικοί εγκεφαλικοί τραυματισμοί είναι πολύ συχνοί σε ορισμένες ομάδες του πληθυσμού, όπως τα θύματα πολεμικών συγκρούσεων και γενικότερα ως αποτέλεσμα της χρήσης όπλων (Salazar et al. 1995, Ansari and Panezai 1998), τα παιδιά (κυρίως λόγω ατυχημάτων πάνω στο παιχνίδι) (Amirjamshidi et al. 1997), σε θύματα εργατικών ατυχημάτων και τέλος προσομοιάζει στον τραυματισμό του ιστού κατά την διάρκεια χειρουργικών επεμβάσεων στον εγκέφαλο (Christiaens and Blond 1998).

Επιπροσθέτως, η επιλογή της περιοχής που τραυματίστηκε (ιππόκαμπος) δεν ήταν τυχαία. Ο ιππόκαμπος σχηματισμός είναι μία από τις καλύτερα μελετημένες δομές του ΚΝΣ. Ανήκει οντογενετικά και μορφολογικά στο παλαιοφλοιό του

εγκεφάλου και θεωρείται ως το κέντρο της βραχυπρόθεσμης μνήμης. Ο υπόκαμπος των τρωκτικών είναι ένας κυλινδρικός σχηματισμός ο οποίος διαγράφει ημικύκλιο γύρω από το θάλαμο. Το κυρίως τμήμα του διακρίνεται σε τέσσερις περιοχές CA1-CA4 (από το λατινικό Cornu Ammon) και συνδέεται προσθίως με την οδοντωτή έλικα/OE (Dentate Gyrus /DG) και πίσω με την παραιπιποκάμπειο έλικα (subiculum). Κάθε τμήμα του υπόκαμπου και της OE έχει τριστοιβή κυτταρική δομή. Εξωτερικά εντοπίζεται η μοριώδης στιβάδα (stratum radiatum, stratum lanucosum-moleculare), ενδιάμεσα η στιβάδα των πυραμοειδών ή αλλού των κοκκιωδών κυττάρων (stratum pyramidale) και εσωτερικά η στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων (stratum oriens). Οι κύριες προσαγωγές νευρικές οδοί του υπόκαμπου προέρχονται από τους διαφραγματικούς πυρήνες (μέσω της ψαλίδας), από τον ενδορινικό φλοιό (entorhinal cortex) και από τον αντίπλευρο υπόκαμπο, μέσω του συνδέσμου των υπόκαμπων (hippocampal commissure). Οι κύριες απαγωγές νευρικές οδοί κατευθύνονται στα βαθύτερα στρώματα του ενδορινικού φλοιού και στον αντίπλευρο υπόκαμπο.

Ο υπόκαμπος, όπως επίσης και η OE, δομείται από νευρικά κύτταρα τα οποία περιγράφονται ως ευάλωτα σε τραυματισμούς (Lowenstein et al. 1992, D'Ambrosio et al. 1998). Από την άλλη μεριά, ο υποκάμπειος σχηματισμός είναι μία από τις ελάχιστες δομές στις οποίες έχουν εντοπιστεί πρόδρομα νευρικά κύτταρα, με δυνατότητα πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης ακόμη και στον ενήλικο εγκέφαλο (Ray et al. 1993). Τα παραπάνω δεδομένα σε συνδυασμό με την υψηλή συχνότητα δυσλειτουργιών της μνήμης μετά από ΚΕΚ (Salazar et al. 1995) καθιστούν τη μελέτη των συνεπειών του τοπικού άμεσου τραυματισμού του υπόκαμπου απαραίτητη.

Η έκφραση των πρωτεϊνών που επιλέχθηκαν να μελετηθούν παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον (όπως περιγράφηκε στο γενικό μέρος), καθώς κάθε μία αποκαλύπτει μία ιδιαίτερη πτυχή της απόκρισης του εγκεφαλικού ιστού στο τραύμα. Επιπρόσθετα όμως, η συνολική εικόνα που προκύπτει από τη συνδυασμένη μελέτη τους στον ίδιο ιστό, και μάλιστα σε διαδοχικές τομές, επιτρέπει αφενός τη διαμόρφωση μίας αθροιστικής εικόνας της ομοιοστάσης του εγκεφαλικού ιστού και αφετέρου τη δυνατότητα να προταθούν πιθανά μοντέλα αλληλεπίδρασης μεταξύ των συγκεκριμένων παραγόντων (για παράδειγμα η ανατομική κατανομή του φαινομένου του κυτταρικού θανάτου σε σχέση με την έκφραση νευροτροφικών παραγόντων).

Η όσο το δυνατόν πιο λεπτομερής και πολυδιάστατη μελέτη της απόκρισης του εγκεφαλικού ιστού στο συγκεκριμένο μοντέλο τραυματισμού αποτελούσε από μόνη της ένα βήμα στην αποκρυπτογράφηση των μηχανισμών που ενεργοποιούνται ύστερα από τον τραυματισμό. Ήταν όμως ακόμη περισσότερο απαραίτητη στην προσπάθειά να εντοπισθεί κάποιος παράγοντας με πιθανή νευροπροστατευτική δράση έτσι ώστε στη συνέχεια να μελετηθούν και να αξιολογηθούν τα αποτελέσματα της εξωγενούς χορήγησής του.

Για να γίνουν πιο κατανοητά τα αποτελέσματά μας, πρέπει να αναφερθεί η διαδοχή των σταδίων/βημάτων της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας. Σε πρώτο στάδιο μελετήθηκε η ιστολογία του εγκεφάλου σε τέσσερα χρονικά σημεία (4, 12, 24 και 48 ώρες) μετά από τον τραυματισμό. Στα ίδια αυτά χρονικά σημεία μελετήθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης nNOS (Giannakopoulou et al. 2000) η οποία

αποτελέσει τον πρώτο στόχο της παρούσας εργασίας. Τα δεδομένα που προέκυψαν οδήγησαν στο συμπέρασμα πως, τις πρώτες δώδεκα ώρες μετά τον τραυματισμό, ενεργοποιούνται σημαντικοί μηχανισμοί απόκρισης του ιστού και πιθανώς αυτό το χρονικό διάστημα αποτελεί την χρονική περίοδο στην οποία εμφανίζονται οι σημαντικότερες επιπτώσεις σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο. Τα βιβλιογραφικά δεδομένα υποδεικνύουν πως οι πρώτες ώρες μετά τον τραυματισμό αποτελούν κρίσιμο διάστημα. Τότε εξελίσσονται τα υπεύθυνα για τις μακροχρόνιες βλάβες δευτερογενή εκφυλιστικά φαινόμενα. Φαίνεται πως για κάποιες ώρες μετά τον τραυματισμό υφίσταται ένα «χρονικό παράθυρο» στα πλαίσια του οποίου πρέπει να εφαρμοσθεί η όποια προσπάθεια αναστροφής των επιπτώσεων της εγκεφαλικής καταστροφής. Με βάση αυτό το δεδομένο αλλά και για πρακτικούς λόγους, η μελέτη των επομένων πρωτεϊνών περιορίστηκε στα δύο πρώτα χρονικά σημεία (4 και 12 ώρες). Προστέθηκε επίσης ένα ακόμη χρονικό σημείο, που ήταν μία εβδομάδα μετά τον τραυματισμό, το οποίο θα μας έδινε τη δυνατότητα καλύτερης εκτίμησης των μακροχρόνιων συνεπειών του τραύματος. Συνεπώς η μελέτη της έκφρασης όλων των άλλων πεπτιδίων (Hsp70, BDNF, NT-3, IGF-I, GFAP) καθώς και του αποπτωτικού θανάτου περιορίστηκε σε αυτά τα τρία χρονικά σημεία (4 και 12 ώρες, 1 εβδομάδα). Από τη συνολική εικόνα του ιστού μετά τον τραυματισμό, όπως περιγράφηκε με την έκφραση των συγκεκριμένων πεπτιδίων, προέκυψε η υπόθεση πως η σύνθεση του παράγοντα IGF-I επάγεται μετά το τραύμα ως μία νευροπροστατευτική αντίδραση του ιστού. Η υπόθεση αυτή στηριζόταν και σε βιβλιογραφικά δεδομένα και έτσι αποφασίστηκε, σε ένα τρίτο στάδιο, να μελετηθεί η επίδραση της τοπικής έγχυσης του IGF-I ύστερα από τον τραυματισμό ως προς την έκφραση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών και το φαινόμενο του κυτταρικού θανάτου.

ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΣ

1. Πειραματόζωα

Χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί επίμυς Wistar, βάρους 250-350 gr, οι οποίοι διέμεναν σε κλουβιά, υπό σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (25°C) και φωτισμού (κύκλοι φωτός-σκότους 12:12 ώρες) και με ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό. Μετά τον τραυματισμό κάθε πειραματόζωο τοποθετούνταν μόνο του σε ξεχωριστό κλουβί.

2. Μοντέλο τραυματισμού- χορήγηση IGF-I.

2.1. Αναισθησία.

Για την αναισθητοποίηση των πειραματόζωων χρησιμοποιήθηκε ένυδρος χλωράλη. Η χορήγηση του αναισθητικού γινόταν με ενδοπεριτοναϊκή ένεση διαλύματος ένυδρου χλωράλης (400 mg/ kg βάρους σώματος) σε φυσιολογικό ορό, με συνολικό όγκο ένεσης περίπου 1 ml. Συνήθως η αναισθησία επιτυγχανόταν μέσα σε 3 έως 5 λεπτά, ήταν βαθιά και η διάρκειά της κυμαινόταν από δύο έως τρεις ώρες. Στις περιπτώσεις που με την παραπάνω δόση ένυδρου χλωράλης δεν επερχόταν βαθιά αναισθησία ακολουθούσε επαναληπτική χορήγηση 1/5 της αρχικής δόσης. Εάν και αυτή η δόση ήταν αναποτελεσματική δε γινόταν καθόλου χρήση του πειραματόζωου. Δεν παρατηρήθηκε κανένας θάνατος από την αναισθησία και δεν εντοπίστηκε καμία ιδιαίτερη παρενέργεια με εξαίρεση τον ερεθισμό της κοιλιακής χώρας στη θέση της ένεσης, όπως φάνηκε από την αντίδραση των επίμυων σε ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις αντιβιοτικού τις επόμενες μετά τον τραυματισμό ημέρες.

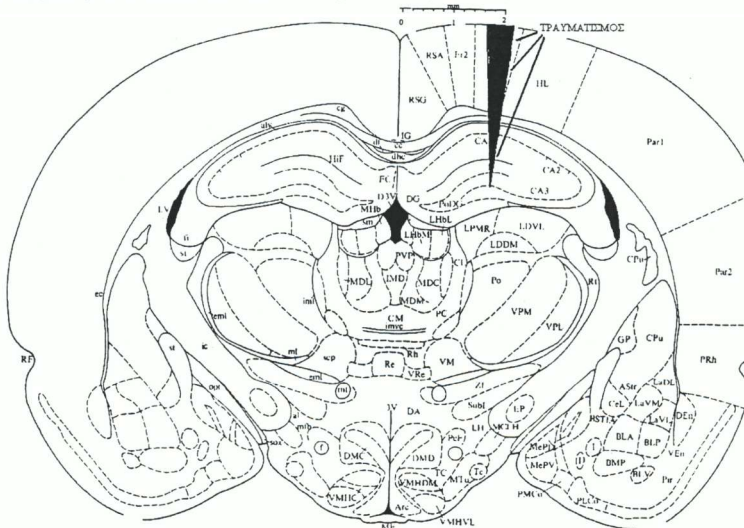
2.2. Τραυματισμός πειραματόζωων και χορήγηση έκδοχου/ IGF-I.

Αφού το πειραματόζωο βρισκόταν σε βαθιά αναισθησία τοποθετούνταν σε στερεοτακτική διάταξη (συσκευή Kupfer). Μετά τη σταθεροποίηση του ζώου ακολουθούσε η επιμήκης διατομή του δέρματος της κεφαλής και η αποκάλυψη του κρανίου. Στη συνέχεια με τη βοήθεια στερεοσκοπίου εντοπιζόταν το σημείο του βρέγματος, το οποίο αυθαίρετα οριζόταν ως σημείο μηδέν. Με βάση το βρέγμα και με οδηγό τον στερεοταξικό άτλαντα των Paxinos et al. (1986) καθοριζόταν το σημείο στο οποίο θα γινόταν ο τραυματισμός. Στην παρούσα εργασία οι συντεταγμένες του σημείου αυτού ήταν $-3,4$ mm στον προσθιοπίσθιο άξονα και $-2,0$ mm στον εγκάρσιο (Εικόνα 2.2.1). Στην παραπάνω θέση ανοιγόταν στο κρανίο, με οδοντιατρικό τρυπάνι, οπή (burr hole) διαμέτρου 4 mm. Για να επιτυγχάνεται η μέγιστη επαναληψιμότητα της διαδικασίας γινόταν προσπάθεια να μην τραυματιστεί η υποκείμενη σκληρή μήνιγγα και η οπή καθαριζόταν από τυχόν υπολείμματα οστού. Σε καμία περίπτωση δεν παρουσιάστηκε σε αυτό το σημείο έντονη αιμορραγία. Ακολούθως, ο εγκεφαλικός ιστός τραυματιζόταν με την αργή διεύδυση μίας βελόνας 21G και μέχρι του βάθους των 4,0 mm από τη σκληρή

μήνιγγα. Η βελόνα αποσυρόταν αργά και η διαδικασία επαναλαμβανόταν τρεις φορές. Υπήρξαν περιπτώσεις κατά τις οποίες η είσοδος της βελόνας συνοδεύτηκε από μικρής διάρκειας και έντασης αιμορραγία.

Μετά την τελευταία απόσυρση της βελόνας η περιοχή του κρανίου καθαριζόταν αλλά τα ζώα παρέμεναν στη στεροταξική διάταξη για τα επόμενα 75 λεπτά ούτως ώστε να επιτευχθεί η τοπική χορήγηση του παράγοντα IGF-I (n=8) ή του εκδόχου (n=19). Η χορήγηση του IGF-I/εκδόχου γινόταν με μία σύριγγα ινσουλίνης απευθείας στο σημείο τραυματισμού, μέσα στο εγκεφαλικό παρέγχυμα. Η δόση ήταν 10μg IGF-I σε 10μl Phosphate Buffered Saline (PBS: NaCl 0,13M, KCl 2,5mM, Na₂HPO₄ 13mM, KH₂PO₄ 1,7mM pH=7,4) και επαναλαμβανόταν -σε κάθε ζώο- σε τρεις χρονικές στιγμές μετά τον τραυματισμό: 15, 45 και 75 λεπτά. Η χορήγηση εκδόχου περιλάμβανε την ένεση 10 μl PBS. Ο IGF-I ήταν ανασυνδυασμένος ανθρώπινος αυξητικός παράγοντας (recombinant human IGF-I/rhIGF-I) της εταιρείας Chemicon (ΗΠΑ).

Τέλος, η τομή του δέρματος έκλεινε με ειδικά clips. Κατά τη διάρκεια της επέμβασης τα πειρατόζωα διατηρούνταν σε σταθερή θερμοκρασία και δεν παρατηρήθηκε σε καμία περίπτωση κάποια ιδιαίτερη επιπλοκή, με την εξαίρεση της περιορισμένης αύξησης του ρυθμού της αναπνευστικής και καρδιακής λειτουργίας κατά τη διάνοιξη της σπής στο κρανίο και του τραυματισμού. Οι επίμυς μετά την επέμβαση τοποθετούνταν σε καινούριο, καθαρό κλουβί.



Εικ:2.2.1. Σχηματική παράσταση μετωπιαίας τομής εγκεφάλου επίμυς της περιοχής στην οποία έγινε ο τραυματισμός.

[Προσαρμογή σχήματος από Paxinos and Watson (1996)]

Στα ζώα τα οποία θανατώθηκαν για τα πειράματα στα οποία μελετήθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης nNOS (n= 20) έγινε απλός τραυματισμός χωρίς να

ακολουθήσει χορήγηση εκδόχου ή IGF-I για αυτό και δεν αναφέρονται αποτελέσματα χορήγησης IGF-I.

2.3. Ζώα Μάρτυρες.

Ως ζώα μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν επίμυς οι οποίοι αναισθητοποιήθηκαν με ένυδρο χλωράλη, τοποθετήθηκαν στη συνέχεια στη στερεοταξική διάταξη αλλά μετά τη διατομή του δέρματος της κεφαλής και την αποκάλυψη του κρανίου δεν ακολούθησε διάνοιξη οπής στο οστό και τραυματισμός. Η τομή του δέρματος κλείστηκε με clips και τα ζώα αφέθηκαν να συνέλθουν σε καθαρό κλουβί. Μία ομάδα ζώων (n=5) χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα μελέτης της έκφρασης της pNOS. Μία άλλη ομάδα (n=10) χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα μελέτης των πρωτεϊνών GFAP, BDNF, NT-3, IGF-I, Hsp70 και της αντίδρασης TUNEL.

3. Θανάτωση πειραματόζωων και επεξεργασία του ιστού.

Ύστερα από την ολοκλήρωση των επεμβάσεων τα ζώα θανατώθηκαν μετά από 4 ώρες, 12 ώρες, 24 ώρες, 48 ώρες και μία εβδομάδα.

Η θανάτωση των πειραματόζωων επιτυγχανόταν με την ενδοκαρδιακή έγχυση διαλύματος παραφορμαλδεΐδης (in vivo perfusion). Πιο συγκεκριμένα, οι επίμυς αναισθητοποιούνταν με αιθέρα. Ακολουθούσε διατομή του δέρματος στην κοιλιακή χώρα και με ψαλίδι ανοιγόταν, με δύο επιμήκεις πλάγιες τομές, ο θώρακας, έτσι ώστε να αποκαλυφθεί η καρδιά. Όσο ακόμη συνεχιζόταν η καρδιακή λειτουργία γινόταν έγχυση, με σύριγγα 20G, κρύου διαλύματος φυσιολογικού ορού και ηπαρίνης στην αριστερή κοιλία της καρδιάς. Ταυτόχρονα, με μικρό ψαλίδι γινόταν τομή του αριστερού καρδιακού κόλπου, με αποτέλεσμα να ανοίγει το κύκλωμα της κυκλοφορίας του αίματος. Μετά την αργή και σταθερή έγχυση 30 ml ηπαρίνης/φυσιολογικού ορού είχε ήδη απομακρυνθεί η μεγαλύτερη ποσότητα αίματος από την κυκλοφορία και είχε επέλθει ακαριαία ο θάνατος του πειραματόζωου. Στη συνέχεια γινόταν έγχυση με τον ίδιο τρόπο περίπου 120 ml διαλύματος παραφορμαλδεΐδης (0,4%) σε διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 0,1M και pH=7,4 (Phosphate Buffer: 0,08M Na₂HPO₄ και 0,02M NaH₂PO₄). Με αυτήν τη διαδικασία απομακρυνόταν όσον το δυνατόν περισσότερο το αίμα από τους ιστούς και ξεκινούσε η μονιμοποίησή τους. Η ολοκλήρωση της διαδικασίας χαρακτηριζόταν από την ακαμψία του σώματος του ζώου.

Μετά την έγχυση του διαλύματος παραφορμαλδεΐδης, ακολουθούσε η απομόνωση του εγκεφάλου από το κρανίο, η κατάτμησή του και η περαιτέρω μονιμοποίησή του για περίπου 20 ώρες στο ίδιο διάλυμα παραφορμαλδεΐδης. Στη συνέχεια ακολουθούσε αφυδάτωση του ιστού μέσω της εμβάπτισής του σε διαδοχικά διαλύματα αιθανόλης, με αυξανόμενη συγκέντρωση (2 φορές από 90 λεπτά σε αιθανόλη 80%, 2 φορές από 60 λεπτά σε αιθανόλη 90%, 2 φορές από 90 λεπτά σε αιθανόλη 100%), σε ξυλόλη (2 φορές από 30 λεπτά) και τέλος σε υγρή παραφίνη στους 60°C (αρχικώς 2 ώρες και στη συνέχεια για τουλάχιστον 10 ώρες). Τέλος, ακολουθούσε ο εγκλεισμός του ιστού σε κύβους παραφίνης, στους οποίους μπορούσε να διατηρηθεί για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

4. *Ανοσοϊστοχημεία*

Οι κλεισμένοι σε παραφίνη ιστοί κόβονταν με μικροτόμο Leica σε μετωπιαίες (coronal) τομές πάχους 5μ και τοποθετούνταν σε σιλανιοποιημένες αντικειμενοφόρους πλάκες. Ο εγκλεισμός των ιστών είχε γίνει με τέτοιο τρόπο ώστε σε κάθε τομή να περιλαμβάνονται και τα δύο ημισφαίρια του εγκεφάλου.

Το πρώτο στάδιο της ανοσοϊστοχημείας περιλάμβανε τη θέρμανση των τομών στους 60°C για μία ώρα και την αποπαραφινοποίηση και ενυδάτωσή τους μέσω της διαδοχικής εμβάπτισής τους σε ξυλόλη (4 δεκαπεντάλεπτα), απόλυτη αιθανόλη (2 και 4 λεπτά), 95% αιθανόλη (4 λεπτά), 70% αιθανόλη (20 λεπτά), 50% και 25% αιθανόλη (από 2 λεπτά αντίστοιχα) και τέλος 2 λεπτά σε αποσταγμένο νερό. Ακολουθούσε η επώαση των τομών σε φούρνο μικροκυμάτων για 15 λεπτά, σε διάλυμα κιτρικού οξέος (10 mM, pH=6,0) με στόχο την αποκάλυψη των αντιγονικών θέσεων. Στη συνέχεια οι τομές πλένονταν σε διάλυμα Tris Buffered Saline (TBS: 25 mM Tris, 137mM NaCl, 2,7 mM KCl) που περιείχε 0,4% Triton X-100 για τη αύξηση της διεισδυτικότητας των αντισωμάτων. Το επόμενο στάδιο ήταν η επώαση με ένα διάλυμα παρεμπόδισης της μη ειδικής σύνδεσης των αντισωμάτων στον ιστό (διάλυμα TBS το οποίο περιείχε τον απαιτούμενο, κατά περίπτωση, ορό, είτε κουνελιού, είτε κατσίκας, σε συγκέντρωση 10%, καθώς και 0,4% Triton X-100), για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

Χωρίς να μεσολαβήσει πλύσιμο των τομών, αυτές επωάζονταν με το διάλυμα που περιείχε το πρώτο αντίσωμα στους 4°C, καθώς και τον απαραίτητο ορό (κατσίκας ή κουνελιού) σε συγκέντρωση 4% καθώς και Triton X-100 (0,4%). Η επώαση με τα παρακάτω αντισώματα: αντι- Hsp70 κουνελιού έναντι επίμυος (10μgr/ml), αντι-BDNF κουνελιού έναντι επίμυος (1μgr/ml), αντι-NT-3 κουνελιού έναντι επίμυος (1μgr/ml), αντι-nNOS κουνελιού έναντι επίμυος (1μgr/ml) και αντι-GFAP κουνελιού έναντι επίμυος (1μgr/ml), διαρκούσε μία νύχτα ενώ με το αντι-IGF-I αντίσωμα κατσίκας έναντι επίμυος (10 μgr/ml), για 72 ώρες. Μετά την επώαση αυτή οι τομές πλένονταν σε TBS (3 φορές από 5 λεπτά) και ακολουθούσε η επώασή τους με το αντίστοιχο δεύτερο βιοτινυλιωμένο αντίσωμα (IgG κουνελιού έναντι αντισωμάτων κατσίκας ή IgG κατσίκας έναντι αντισωμάτων κουνελιού), σε αραιώση 1/200 για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου, μαζί με 2% αντίστοιχο ορό. Η περίπτωση του αντισώματος ξεπλενόταν με TBS (3 φορές από 5 λεπτά) και ακολουθούσε η περαιτέρω επώαση σε διάλυμα Αβιδίνης-Βιοτίνης συνδεδεμένης με υπεροξειδάση, για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η περίσσεια του προηγούμενου διαλύματος απομακρυνόταν με πλύσιμο με TBS (3 φορές από 5 λεπτά). Τέλος, η χρώση επιτυγχάνονταν με την αντίδραση της υπεροξειδάσης με χρωμογόνο υπόστρωμα DAB (3,3-diaminobenzidine). Για τη διατήρηση, αποθήκευση και παρατήρηση των τομών ακολουθούσε σταδιακή αφυδάτωσή τους και τοποθέτηση καλυπτρίδων. Ως μάρτυρες της διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν τομές οι οποίες δεν επωάστηκαν με το ειδικό, πρώτο αντίσωμα και οι οποίες δεν έδωσαν σε καμία περίπτωση έντονο χρώμα.

Τα αντι-BDNF, αντι-NT-3, αντι-nNOS και αντι-IGF-I ήταν της Santa Cruz (ΗΠΑ), το αντι-GFAP της DAKO (Δανίας, ευγενική παραχώρηση της Δρ. Ρεβέκκας Μάτσα) και το αντι-Hsp70 ευγενική παραχώρηση από τον Δρ. Μ. Αλέξη. Τα

δευτερογενή αντισώματα και το διάλυμα αβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης ήταν προϊόντα της DAKO (Δανίας). Το χρωμογόνο DAB ήταν της SERVA (ΗΠΑ).

5. Αντίδραση TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling).

Χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια της Boehringer Mannheim (In situ Cell Death Detection, POD) και ακολουθήθηκε σε γενικές γραμμές το πρωτόκολλο που προτείνει η εταιρεία. Τα πρώτα βήματα είναι όμοια με αυτά της ανοσοϊστοχημείας (αποπαραφινποίηση, ενυδάτωση και επεξεργασία των τομών σε φούρνο μικροκυμάτων σε διάλυμα κιτρικού οξέος). Στη συνέχεια οι τομές επωάζονταν για μία ώρα στους 37 °C στο σκοτάδι, με το διάλυμα που περιείχε το ένζυμο τελική δεόξυνουκλεοτιδική τρανσφεράση (TdT) και μίγμα νουκλεοτιδίων στα οποία περιλαμβάνονταν σημασμένη με φλουορεσκίνη ουρακίλη. Ακολουθούσε πλύσιμο των τομών με PBS (3 φορές για πέντε λεπτά) και έπειτα κάλυψή τους με διάλυμα γλυκερόλης/PBS (9:1). Η παρατήρησή τους γινόταν σε ειδικό μικροσκόπιο φθορισμού Nikon.

Σε ορισμένες τομές μετά από την παρατήρησή τους με το μικροσκόπιο φθορισμού ακολουθούσε ανοσοϊστοχημική εντόπιση της φθορίζουσας χρωστικής (φλουορεσκίνη), με ειδικό αντίσωμα αντι-φλουορεσκίνης (Boehringer Mannheim), το οποίο έφερε υπεροξειδάση. Η διαδικασία αυτή δεν επέτρεπε τη σαφή οριοθέτηση των αποπτωτικών κυττάρων καθώς έδινε υψηλά επίπεδα μη ειδικής χρώσης. Έδινε όμως τη δυνατότητα παρατήρησης ορισμένων χαρακτηριστικών αποπτωτικών κυττάρων, με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά (αποπτωτικά σωμάτια).

6. Μετρήσεις- Στατιστική ανάλυση.

Ως περιτραυματική περιοχή ορίστηκε η περιοχή 1mm εκατέρωθεν του σημείου του τραυματισμού, όπως αυτό καθοριζόταν από αμιγώς ιστολογικά χαρακτηριστικά. Το βάθος της περιτραυματικής περιοχής ήταν τα 4mm, ακολουθώντας το βάθος εισόδου της βελόνας (συνεπώς συνολικός όγκος περιτραυματικής περιοχής: 2mmX2mmX4mm). Πρέπει να σημειωθεί πως η περιοχή όπως ορίστηκε με τις παραπάνω διαστάσεις περιλάμβανε: α)την περιοχή με σαφή ιστολογικά γνωρίσματα χαρακτηριστικά της μηχανικής διαταραχής του ιστού (περιοχές μειωμένου αριθμού κυττάρων με βάση χρώση με αιματοξυλίνη, αιματώματα και σπογγώδη μορφολογία) β)τη μέγιστη περιοχή εξάπλωσης των ανοσοθετικών στην Hsp70 κυττάρων μέχρι και τις 12 ώρες γ)τη μέγιστη περιοχή μειωμένης εντόπισης των νευροτροφικών BDNF και NT-3 μέχρι και τις 12 ώρες. Η περιοχή αυτή αποτελεί την περιτραυματική περιοχή όσον αφορά τις μετρήσεις, διότι ήταν απαραίτητο να υπάρχει ένας κοινός παρανομαστής σε όλα τα χρονικά σημεία και σε όλες τις ομάδες των ζώων. Όπου η περιτραυματική πραγματική περιοχή διέφερε σημαντικά από το μέσο όρο, όπως αυτός περιγράφηκε, το εύρημα ανφέρεται ως επιπλέον αποτέλεσμα (π.χ. η εξάπλωση των θετικών στην Hsp70 κυττάρων γύρω από το τραύμα 1 εβδομάδα μετά τον τραυματισμό).

Η παρατήρηση των ιστών μετά από τα πειράματα ανοσοϊστοχημείας έγινε με οπτικό μικροσκόπιο. Οι μετρήσεις του αριθμού των ανοσοθετικών κυττάρων για τις πρωτεΐνες nNOS, BDNF, Hsp70, NT-3, IGF-1 και GFAP έγιναν με τη βοήθεια ειδικού προγράμματος ανάλυσης εικόνας (ImagePro). Τα κύτταρα που έδωσαν

σήμα μετά την αντίδραση TUNEL εντοπίστηκαν με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού. Το μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το μοντέλο Eclipse E400 της εταιρείας NIKON, η φωτογραφική μηχανή ήταν το μοντέλο FDX-35 της NIKON και η κάμερα το μοντέλο TK-C1381 της JVC.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της πρωτεΐνης pNOS είναι ο μέσος όρος του αριθμού των θετικών κυττάρων που μετρήθηκαν σε τουλάχιστον τέσσερις διαφορετικές τομές από κάθε εγκέφαλο και από τρία οπτικά πεδία για κάθε περιοχή. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με την ανάλυση κατά Student (t-test) και με στατιστικά σημαντικό επίπεδο $p < 0,05$.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της πρωτεΐνης Hsp70 είναι ο μέσος όρος του απόλυτου αριθμού των κυττάρων της περιτραυματικής περιοχής ή της αντίστοιχης περιοχής στο αντίπλευρο ημισφαίριο ή της περιοχής του κοκκιώδους φλοιού πίσω από το σπλήνιο του μεσολοβίου, που μετρήθηκαν σε τουλάχιστον έξι τομές από κάθε πειραματόζωο. Η στατιστική ανάλυση των μετρήσεων έγινε με την ανάλυση two-way ANOVA με ανεξάρτητες μεταβλητές το χρόνο και την «ομάδα» των ζώων (μάρτυρες, τραυματισμένα+έκδοχο, τραυματισμένα+IGF-I). Στη συνέχεια ακολούθησε *post-hoc* ανάλυση κατά Scheffe με όριο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0,05$.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της αντίδρασης TUNEL είναι ο μέσος όρος του αριθμού των θετικών κυττάρων που μετρήθηκαν σε τουλάχιστον τέσσερις διαφορετικές τομές από κάθε εγκέφαλο και από τρία οπτικά πεδία για κάθε περιοχή. Η στατιστική ανάλυση των μετρήσεων έγινε με την ανάλυση two-way ANOVA με ανεξάρτητες μεταβλητές το χρόνο και την «ομάδα» των ζώων ακολουθούμενη από *post-hoc* ανάλυση κατά Scheffe με όριο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0,05$.

Στην περίπτωση του BDNF, της NT-3 και -για ορισμένες περιοχές- της Hsp70, οι μετρήσεις που έγιναν ήταν ήμι-ποσοτικές καθώς η ένταση, η υφή της χρώσης (π.χ. αζονική) και η ανομοιογένεια μεταξύ των ζώων δεν επέτρεπαν ποσοτικοποίηση. Αναφέρονται κυρίως διαφορές οι οποίες είναι σαφώς διακριτές με τα μάτια των παρατηρητών (BDNF, NT-3) ή διαφορές οι οποίες παρατηρήθηκαν σε ορισμένα από τα τραυματισμένα ζώα αλλά ποτέ στα ζώα μάρτυρες (περίπτωση Hsp70 Πίνακα 2).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Ζώα Μάρτυρες (Φυσιολογικοί επίμους).

1.1.nNOS.

Η ανοσοϊστοχημική εντόπιση της nNOS στον ενήλικο φυσιολογικό εγκέφαλο περιοριζόταν σε διάσπαρτα νευρικά κύτταρα σε όλο το εύρος του ιστού χωρίς να εντοπίζεται κάποια δομή στην οποία να συγκεντρώνεται ιδιαίτερα υψηλός αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων. Τα ανοσοθετικά κύτταρα ήταν περισσότερα στο ραβδωτό σώμα και σε ορισμένους πυρήνες του υποθαλάμου. Στο φλοιό θετικά στη nNOS ήταν ορισμένα μεγάλα πυραμιδικά κύτταρα, κυρίως στις στιβάδες III και IV, με έντονη κυτταροπλασματική εντόπιση της πρωτεΐνης στο σώμα και τους άξονες (εικ. 2A). Στον υπόκαμπο η εντόπιση ανοσοθετικών κυττάρων ήταν σπάνια, τόσο στη στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων των περιοχών CA1-CA4, όσο και στα κοκκιώδη κύτταρα της OE (εικ. 2B), αλλά και στη στιβάδα των διάμεσων νευρώνων (interneurons).

1.2. Hsp70.

Στην ομάδα των πειραματόζωνων μαρτύρων, η ανοσοϊστοχημική εντόπιση της πρωτεΐνης Hsp70 ήταν ιδιαίτερος περιορισμένη (εικ. 3 A). Διάσπαρτα ανοσοθετικά κύτταρα υπήρχαν στο φλοιό των ημισφαιρίων (κυρίως στις στιβάδες III και IV), σε πυρήνες του θαλάμου και του υποθαλάμου (παρακοιλιακοί υποθαλαμικοί πυρήνες) καθώς και στο μεσολόβιο (εικ.3 A3). Η εντόπιση της Hsp70 ήταν κυρίως κυτταροπλασματική (κυρίως στο κυτταρικό σώμα) και σε ορισμένες περιπτώσεις και πυρηνική. Στον υπόκαμπο παρατηρήθηκε έλλειψη της Hsp70.

1.3.GFAP.

Στο φυσιολογικό εγκέφαλο η παρουσία των αστρογλοιακών κυττάρων είναι ευρεία εφόσον αποτελούν βασικό κυτταρικό τύπο του ΚΝΣ. Ανοσοϊστοχημική εντόπιση της πρωτεΐνης GFAP παρατηρήθηκε σε πολυάριθμα αστροκύτταρα, με καλά διαγραφόμενο κυτταρικό σώμα και έντονα ανοσοθετικές αποφυάδες οι οποίες προσέδιδαν στα κύτταρα αυτά τη χαρακτηριστική αστερόμορφη εικόνα. Η πυκνότητα των αστρογλοιακών κυττάρων ήταν ιδιαίτερα αυξημένη στον υποκάμπειο σχηματισμό και στα τοιχώματα των κοιλιών (εικ. 4-1 έως 4-4).

1.4.BDNF.

Η έκφραση της νευροτροφίνης BDNF ήταν εκτεταμένη στον εγκέφαλο του ενήλικου επίμους. Η παρουσία της πρωτεΐνης ήταν ορατή σε πολυάριθμες νευρικές ίνες σε όλο το πάχος του φλοιού των ημισφαιρίων (εικ. 5 A1), πολλές από τις οποίες ξεκινούσαν ως νευράξονες από έντονα ανοσοθετικά σώματα των πυραμιδικών κυττάρων που βρίσκονται στις στιβάδες III και V. Τα κύτταρα αυτά είχαν σαφώς τη μορφολογία νευρικών κυττάρων και η χρώση ως προς το BDNF ήταν

κυτταροπλασματική (εικ. 5 A2). Έντονα ανοσοθετικοί άξονες ήταν εμφανείς και σε όλη την περιοχή του υποκάμπειου σχηματισμού (εικ. 5 A1) (με κατεύθυνση εγκάρσια και επιμήκη ως προς τον προσθοπίσθιο άξονα) καθώς και ορισμένα θετικά κυτταρικά σώματα στην περιοχή της ΟΕ και σποραδικά στη στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων. Στην περιοχή του θαλάμου, του ραβδωτού και των υποθαλαμίων πυρήνων η έκφραση του BDNF ήταν πολύ πιο περιορισμένη και περιοριζόταν μόνο σποραδικά σε κυτταρικά σώματα.

1.5.NT-3.

Η παρουσία της νευροτροφίνης NT-3 ήταν ιδιαίτερα έντονη σε όλη την έκταση του ενήλικου εγκεφάλου των φυσιολογικών επίμυων (εικ. 6 A2). Στο φλοιό ανευρισκόταν σε διάσπαρτα κύτταρα σε όλες τις στιβάδες, με πυρηνική και κυτταροπλασματική εντόπιση (εικ. 6 A1). Η εντόπιση της NT-3 αφορούσε αφενός πολυάριθμα, μεγάλου μεγέθους κυτταρικά σώματα, συχνά με ανοσοθετικούς δενδρίτες και άξονες, στις στιβάδες III και IV, όπως επίσης και μικρότερα κύτταρα, πιθανώς κάποια από αυτά γλοία, σε όλο το πάχος του φλοιού. Έντονη ήταν επίσης η ανοσοεντόπιση της NT-3 στα ολιγοδενδρογλοιακά κύτταρα του μεσολόβιου, του συνδέσμου των υπόκαμπων και άλλων δομών λευκής ουσίας. Όσον αφορά στον θάλαμο, το ραβδωτό και τους πυρήνες του υποθαλάμου ήταν ορατή η έκφραση της NT-3 σε πολυάριθμα, ποικίλης μορφολογίας κύτταρα, κάποια από τα οποία ήταν σαφώς πιο έντονα χρωσμένα. Στον υποκάμπειο σχηματισμό παρατηρήθηκε μία χαμηλού επιπέδου έκφραση της πρωτεΐνης της NT-3 σε μεγάλο αριθμό πυραμιδικών κυττάρων της CA2 περιοχής και κοκκιωδών κυττάρων της ΟΕ. Πιο έντονη ήταν η έκφραση της NT-3 σε κύτταρα της υποκοκκιώδους στιβάδας της ΟΕ (subgranular layer) και σε ενδιάμεσους νευρώνες.

1.6.IGF-I.

Η έκφραση του αυξητικού, τροφικού παράγοντα IGF-I στο φυσιολογικό εγκέφαλο ήταν πολύ περιορισμένη. Υπήρχαν λίγα ανοσοθετικά κύτταρα, διάσπαρτα σε όλο το εύρος του φλοιού και του υποκάμπου (εικ. 7-1,2). Τα κύτταρα αυτά είχαν πολύ μικρό μέγεθος και ήταν πιθανώς γλοία. Αντίστοιχου μεγέθους θετικά κύτταρα υπήρχαν και στο μεσολόβιο υποδεικνύοντας πιθανή ολιγοδενδρογλοιακή ταυτότητα. Η ίδια εικόνα ήταν εμφανής και στις υπόλοιπες δομές του εγκεφάλου.

1.7.αντίδραση TUNEL.

Η αντίδραση TUNEL δεν έδωσε θετικά κύτταρα στον εγκέφαλο του φυσιολογικού ενήλικου επίμυος (εικ. 8 A1,2).

2. Συνέπειες του τραυματισμού.

Γενική εικόνα, ιστολογία.

Η μακροσκοπική παρατήρηση των εγκεφάλων των πειραματόζωων μετά την απομόνωσή τους από το κρανίο, δεν αποκάλυψε (εκτός μίας περιπτώσεως σε πειραματόζωο το οποίο θυσιάστηκε 4 ώρες μετά τον τραυματισμό) σημαντικά επισκληρίδια ή υποσκληρίδια αιματώματα, ακόμα και στα ζώα τα οποία πέθαναν πριν τη διέλευση μίας εβδομάδας μετά τον τραυματισμό (4 στα 9). Μάλιστα, στα ζώα τα οποία θανατώθηκαν σε αυτό το χρονικό σημείο η περιοχή του τραυματισμού ήταν δύσκολο να εντοπισθεί δια γυμνού οφθαλμού λόγω της απουσίας συγκέντρωσης αίματος. Η διαδικασία της *in vivo* ενδοκαρδιακής έγχυσης, με την οποία απομακρύνεται ο μεγαλύτερος όγκος αίματος από την κυκλοφορία, φαίνεται πως δεν ήταν υπεύθυνη για το φαινόμενο αυτό όπως απέδειξε η εντόπιση ενδοεγκεφαλικών αιματωμάτων στη θέση του τραύματος στους εγκεφάλους των ζώων που θυσιάστηκαν τις πρώτες 48 ώρες.

Παρά την έλλειψη επισκληρίδιων ή άλλων επιφανειακών αιματωμάτων, συχνή ήταν η εντόπιση ενδοκοιλιακών αιμορραγιών, ορισμένες φορές ακόμη και στο αντίπλευρο ημισφαίριο. 4 ώρες μετά τον τραυματισμό χαρακτηριστική ήταν η εντόπιση ενδοκοιλιακής αιμορραγίας στο ραχιαίο τμήμα της τρίτης κοιλίας [6/7 ζώα] (εικ. 1Α). 12 ώρες μετά το τραύμα η κύρια συγκέντρωση του αίματος δεν εστιαζόταν πλέον στην τρίτη κοιλία αλλά κατά μήκος του μεσολόβιου [5/7 ζώα] και σε ορισμένες περιπτώσεις στις πλάγιες κοιλίες και των δύο ημισφαιρίων [3/7 ζώα] (εικ. 1Β). Μία εβδομάδα μετά δεν εντοπίστηκε καμία περίπτωση ενδοκοιλιακής αιμορραγίας (εικ. 1Γ). Η έντονα αιμορραγική εικόνα του μεσολόβιου ίσως οφείλοταν στη μετακίνηση του αρχικά συγκεντρωμένου στην τρίτη κοιλία αίματος προς τις πλάγιες κοιλίες, μέσω των τρημάτων του Μονρο, ακολουθώντας τη φυσιολογική ροή του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY). Μία εβδομάδα μετά πιθανώς να είχε ολοκληρωθεί η αποχέτευση του μεγαλύτερου μέρους του αιμορραγικού ENY. Εξίσου πιθανό όμως είναι η συγκέντρωση αίματος στο ύψος του μεσολόβιου να οφείλοταν σε επέκταση του αιματώματος του εγκεφαλικού παρεγχύματος, το οποίο δημιουργήθηκε σε όλα τα πειραματόζωα κατά τη διάρκεια του διεισδυτικού μηχανικού τραυματισμού.

Η απλή ιστολογική παρατήρηση των τομών από τους εγκεφάλους των τραυματισμένων ζώων έως και 48 ώρες μετά τον τραυματισμό αποκάλυψε την εικόνα του κωνικού τούνελ (εικ. 1Δ) η οποία είναι χαρακτηριστική για τα τραύματα από πυροβόλα όπλα (Κάτσαλης 1996). Η χρώση με αιματοξυλίνη-εωσίνη ανέδειξε την ύπαρξη μίας περιτραυματικής περιοχής, τόσο στο φλοιό όσο και στον υπόκαμπο, η οποία χαρακτηριζόταν από έντονη διατάραξη της συνέχειας του ιστού και μείωση του αριθμού των κυττάρων. Συχνή ήταν επίσης η παρατήρηση σπογγώδους μορφολογίας του παρεγχύματος. Ακόμη όμως και σε αυτές τις περιοχές οι οποίες είχαν εμφανή σημάδια εκφύλισης συνέχιζαν να υπάρχουν πολυάριθμα κύτταρα με φυσιολογική μορφολογία. Στον υπόκαμπο για παράδειγμα, η περιτραυματική περιοχή δε χαρακτηριζόταν από έλλειψη κυττάρων εκατέρωθεν του ίχνους του τραύματος, αλλά από πλήρη αποδιοργάνωση της δομής της στιβάδας των πυραμιδικών κυττάρων (εικ. 1ΣΤ).

Μία εβδομάδα μετά τον τραυματισμό η υφή του ιστού γύρω από το τραύμα φαινόταν ομαλή. Δεν υπήρχε πλέον ρήξη της συνέχειας του ιστού καθώς ο κενός χώρος είχε πληρωθεί από πολυάριθμα κύτταρα και η παρουσία αιματομάτων στο παρέγχυμα ήταν πολύ περιορισμένη (εικόνα 1Γ). Στην περιτραυματική περιοχή ήταν ορατό ένα μίγμα αστρογλοιακών κυττάρων (ανοσοθετικών στη πρωτεΐνη GFAP) και κυττάρων άλλου τύπου (αρνητικών στη GFAP) πιθανώς ινοβλαστών που εισχώρησαν στο εγκεφαλικό παρέγχυμα από τις μήνιγγες (εικ 2Γ). Τα αστροκύτταρα συγκεντρώνονταν γύρω από το ίχνος του τραύματος, ουσιαστικά δημιουργώντας ένα περίβλημα. Το περίβλημα αυτό των αστροκυττάρων δημιουργούσε ένα φραγμό ο οποίος πιθανότατα εμποδίζει τη διαδικασία ανάπλασης του ιστού. Για παράδειγμα, η στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων του ιππόκαμπου, της οποίας η συνέχεια είχε διακοπεί από τον τραυματισμό, δεν εμφάνιζε σημεία επαναδιάταξης.

Μία δομή η οποία εμφανιζόταν με στοιχεία εκφύλισης σταθερά σε όλες τις περιπτώσεις, σε σχέση με το φυσιολογικό εγκέφαλο, ήταν το μεσολόβιο (εικ 3Γ,Δ). Παρά το γεγονός πως σε καμία τομή του ιστού δεν παρατηρήθηκε πλήρης διακοπή της συνέχειας των νευρικών ινών του μεσολόβιου, αυτό χαρακτηριζόταν -εκατέρωθεν της βλάβης- από διόγκωση (πιθανώς λόγω τοπικού οιδήματος) και σπογγώδη μορφολογία. Με την πάροδο του χρόνου η μορφολογία αυτή επεκτεινόταν πλαγίως και σε ορισμένες περιπτώσεις, ήδη από τις 4 ώρες μετά το τραύμα, είχε επεκταθεί και στο αντίπλευρο ημισφαίριο.

Ενδιαφέρον παρουσίασε επίσης η εντόπιση με αιματοξυλίνη ορισμένων χαρακτηριστικών κυττάρων με συμπαγείς σφαιρικούς πυρήνες στη στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων του ιππόκαμπου, αλλά κυρίως ανάμεσα στα ερυθρά αιμοσφαίρια (εικ. 1Ε). Τα κύτταρα αυτά θα μπορούσαν να είναι λευκά αιμοσφαίρια τα οποία εισήλθαν στον ιστό μετά τη βίαιη διάρρηξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού εξαιτίας του τραυματισμού. Τα βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν σε αντίστοιχες περιπτώσεις την είσοδο τέτοιων κυττάρων το πρώτο εικοσιτετράωρο μετά τον τραυματισμό.

2.1. nNOS (Πίνακας 1).

2.1.1. 4 ώρες (n=5).

Ήδη από το πρώτο χρονικό σημείο μελέτης μετά τον τραυματισμό άρχισε να γίνεται φανερή μία αύξηση του αριθμού των ανοσοθετικών στη nNOS κυττάρων κυρίως στον ιππόκαμπο. Η αύξηση αυτή εντοπιζόταν τόσο στην ΟΕ (24%) όσο και στην περιοχή CA3 (27%) και εκτεινόταν όχι μόνο περιτραυματική περιοχή αλλά και σε ένα μεγάλο μέρος ολόκληρης της δομής του ραχιαίου ιππόκαμπου. Τα κύτταρα στα οποία εμφανίστηκε έκφραση της πρωτεΐνης βρίσκονταν κυρίως στην υποκοκκιδώδη στιβάδα και την κεντρική περιοχή της ΟΕ (εικ 2) και στον πληθυσμό των ενδιάμεσων νευρώνων της CA3 περιοχής. Αύξηση στον αριθμό των θετικών κυττάρων εμφανιζόταν και στην ΟΕ του αντίπλευρου ιππόκαμπου, χωρίς να είναι στατιστικά σημαντική. Αντίστοιχη αύξηση στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων στη πρωτεΐνη nNOS εμφανιζόταν στο φλοιό αλλά περιοριζόταν στο κέντρο της περιτραυματικής περιοχής.

2.1.2. 12 ώρες (n=5).

12 ώρες μετά τον τραυματισμό ο αριθμός των κυττάρων στα οποία εκφραζόταν η nNOS, σε σχέση με τα ζώα μάρτυρες, αυξήθηκε (εικ. 2Γ,Δ). Η αύξηση παρέμεινε στατιστικά σημαντική στην ΟΕ του τραυματισμένου υπόκαμπου (32%) και στην περιοχή CA3, αν και με τάσεις μείωσης στη δεύτερη (19%). Ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός πως στις 12 ώρες και ο αντίπλευρος υπόκαμπος εμφάνιζε την ίδια εικόνα με πιο μεγάλη αύξηση στην ΟΕ (35%) και μικρότερη (αλλά στατιστικά σημαντική) στην περιοχή CA3 (19%). Η εικόνα στον υπόλοιπο εγκέφαλο παρέμεινε ίδια με αυτήν που είχε στις 4 ώρες, δηλαδή υπήρχε αυξημένος αριθμός θετικών κυττάρων στην περιτραυματική περιοχή του φλοιού και καμία μεταβολή στην έκφραση της nNOS σε άλλες δομές του εγκεφάλου.

2.1.3. 24 ώρες (n=5).

Μία ημέρα μετά τον τραυματισμό, ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων παρέμεινε αυξημένος, σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο, στις ΟΕ και των δύο υπόκαμπων (28% στο τραυματισμένο ημισφαίριο και 22% στο αντίπλευρο). Η εικόνα όμως είχε μεταβληθεί όσον αφορά τις CA3περιοχές, στις οποίες ο αριθμός των κυττάρων είχε επανέλθει σε φυσιολογικά επίπεδα. Επιπροσθέτως, στο φλοιό δεν ήταν πλέον εμφανής η αύξηση του αριθμού των ανοσοθετικών κυττάρων στην περιτραυματική περιοχή.

2.1.4. 48 ώρες (n=5).

Οι 48 ώρες ήταν το τελευταίο χρονικό σημείο στο οποίο μελετήθηκε η έκφραση της nNOS μετά τον τραυματισμό. Η εικόνα του υπόκαμπου ήταν παρόμοια με αυτή των ζώων μαρτύρων, δηλαδή το φαινόμενο της επαγωγής της έκφρασης της nNOS που παρατηρήθηκε μετά το τραύμα είχε πλήρως αναστραφεί.

2.2. Hsp70 (Γραφήματα 1,2, Πίνακας 2).

2.2.1. 4 ώρες (n=7).

Στις 4 ώρες μετά τον τραυματισμό παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης της Hsp70 στην περιτραυματική περιοχή τόσο στο φλοιό, όσο και στον υπόκαμπο (γράφημα 1) ($F=54,459$ και $P<0,001$ χρησιμοποιώντας ανάλυση two-way ANOVA). Μία δομή στην οποία επίσης παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης της Hsp70 ήταν το τραυματισμένο μεσολόβιο. Σε ορισμένα ζώα (3/7) η αύξηση αυτή επεκτεινόταν στο αντίπλευρο ημισφαίριο. Σε αυτές τις περιπτώσεις η περιοχή έκφρασης της Hsp70 ταυτιζόταν με την περιοχή του μεσολόβιου η οποία εμφάνιζε χαρακτηριστικά εκφύλισης. Στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του πεπτιδίου μετρήθηκε επίσης στην περιοχή του κοκκιώδους φλοιού πίσω από το σπλήνιο του μεσολόβιου και στα δύο ημισφαίρια (γράφημα 2) ($F=27,466$ και $P<0,001$ για το τραυματισμένο ημισφαίριο, $F=4,896$ και $P<0,05$ για το αντίπλευρο με ανάλυση two-way ANOVA). Άλλες περιοχές του εγκεφάλου με αυξημένη, αν και όχι στατιστικά σημαντική, έκφραση της Hsp70 ήταν ο απιοειδής φλοιός του

ημισφαιρίου στο οποίο έγινε ο τραυματισμός καθώς και οι παρακοιλιακοί πυρήνες του υποθαλάμου και ορισμένα κοκκιώδη κύτταρα της ΟΕ και των δύο ημισφαιρίων (πίνακας 2). Πρέπει να αναφερθεί πως ορισμένα από τα ανοσοθετικά στην πρωτεΐνη Hsp70 κύτταρα της περιτραυματικής περιοχής είχαν χαρακτηριστική μορφολογία κυττάρων τα οποία έχουν εισέλθει στη διαδικασία κυτταρικού θανάτου, δηλαδή συμπυκνωμένο κυτταρόπλασμα και τριγωνικό σχήμα (εικ 3 B3).

Στα ανοσοθετικά κύτταρα όλων των προαναφερθείσων περιοχών η εντόπιση της πρωτεΐνης Hsp70 ήταν κυρίως κυτταροπλασματική και σε ορισμένα κύτταρα και πυρηνική. Τα θετικά κύτταρα ήταν στην πλειοψηφία τους ευμεγέθη με μορφολογία νευρικών κυττάρων (εικ. 3 B2,6), με εξαίρεση τα ανοσοθετικά κύτταρα του μεσολόβιου τα οποία είχαν μικρότερο μέγεθος και σφαιρικό σχήμα (εικ 3 B4).

2.2.2. 12 ώρες (n=7).

12 ώρες μετά τον τραυματισμό ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων στην Hsp70 παρέμενε στατιστικά σημαντικά αυξημένος στην περιτραυματική περιοχή (γράφημα 1) τόσο στο φλοιό (εικ. 3 B1) όσο και στον ιπλόκαμπο (εικ. 3 B5). Μάλιστα στα περισσότερα ζώα εντοπιζόταν αφενός μικρή αύξηση του αριθμού των κυττάρων και επέκταση της περιοχής έκφρασης της πρωτεΐνης γύρω από τον τραυματισμό προς τον προσθοπίσθιο και τον πλάγιο άξονα, κυρίως στον ιπλόκαμπο και στο μεσολόβιο (εικ. 3 B4), χωρίς να αλλάζουν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των ανοσοθετικών κυττάρων. Επίσης, αυξημένη ήταν πλέον η παρουσία της Hsp70 και στο αντίπλευρο μεσολόβιο (6/7 ζώα), γεγονός που υποδείκνυε επέκταση της εκφύλισης των νευρικών ινών του μεσολόβιου σε περιοχές πιο απομακρυσμένες από το τραύμα. Αντιθέτως, η αύξηση του αριθμού των ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή του κοκκιώδους φλοιού πίσω από το σπλήνιο του μεσολόβιου δεν ήταν πλέον ορατή σε κανένα από τα δύο εγκεφαλικά ημισφαίρια (γράφημα 2) (στατιστικά σημαντική επίδραση του παράγοντα χρόνου: $F=11,331$ και $P=0,001$ για το τραυματισμένο ημισφαίριο και $F=5,616$ και $P<0,02$ για το αντίπλευρο με ανάλυση two-way ANOVA).

2.2.3. 1 εβδομάδα (n=5).

Η έκφραση της Hsp70 στην περιτραυματική περιοχή παρέμενε στατιστικά σημαντικά αυξημένη ακόμη και μία εβδομάδα μετά τον τραυματισμό αλλά με τάσεις μείωσης (γράφημα 1) (εικ. 3 B7). Ως σημαντικές μεταβολές σε σχέση με τις 12 ώρες μπορούν να σημειωθούν η σαφής εντόπιση ανοσοθετικών κυττάρων σε όλη την έκταση του μεσολόβιου (και στο αντίπλευρο ημισφαίριο), καθώς και ο περιορισμός της περιοχής αυξημένης έκφρασης της Hsp70 εκατέρωθεν του τραύματος. Πιο συγκεκριμένα, ενώ ο συνολικός αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων στην περιτραυματική περιοχή δε διέφερε στατιστικά σημαντικά από τις 12 ώρες, τα κύτταρα συγκεντρώνονταν κοντά στο κέντρο της περιοχής (περίπου σε απόσταση 0,5mm εκατέρωθεν) χωρίς να είναι ομοιόμορφα διασπαρμένα σε όλο το εύρος της (2mm).

Επιπλέον επανεμφανίστηκε σημαντική αύξηση των ανοσοθετικών στην Hsp70 κυττάρων στην περιοχή του κοκκιώδους φλοιού πίσω από το σπλήνιο του μεσολοβίου και στα δύο ημισφαίρια (γράφημα 2).

2.3.GFAP.

2.3.1. 4 και 12 ώρες (n=7 και n=7 αντίστοιχα).

Η γενική παρουσία των αστροκυττάρων δεν επηρεάστηκε από τον τραυματισμό. Με εξαίρεση την περιτραυματική περιοχή, στον υπόλοιπο εγκέφαλο δεν εντοπίστηκε μεταβολή στον αριθμό των αστρογλοιακών κυττάρων.

Μέσα στην περιτραυματική περιοχή αφενός παρατηρήθηκε μείωση του αριθμού τους, ανάλογη με τη μείωση σε όλους τους τύπους κυττάρων εξαιτίας της καταστροφής τμήματος του ιστού και αφετέρου εμφανίστηκαν ορισμένα ευμεγέθη κύτταρα χωρίς τυπική αστεροειδή μορφή, με έντονη χρώση για την GFAP (εικ. 4-5). Όμοι ανοσοθετικά κύτταρα ήταν επίσης εμφανή στη στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων του υπόκαμπου. Το πιθανότερο ενδεχόμενο είναι πως επρόκειτο για υπερμεγέθη, ευτροφικά ενεργοποιημένα αστρογλοιακά κύτταρα

2.3.2. 1 εβδομάδα (n=5).

Μία εβδομάδα μετά τον τραυματισμό δεν υπήρχαν πλέον τα υπερτροφικά αστρογλοιακά κύτταρα τα οποία ήταν ορατά στις πρώτες 12 ώρες. Αντιθέτως, αυξημένος αριθμός αστρογλοιακών κυττάρων τυπικής μορφολογίας εντοπιζόταν κατά μήκος του ίχνους του τραυματισμού (εικ. 4-6). Τα αστρογλοιακά κύτταρα σχημάτιζαν, όπως αποκάλυψε πολύ ευκρινώς η ανοσοϊστοχημική εντόπιση της πρωτεΐνης GFAP, τη χαρακτηριστική «ουλή» του ιστού, ενώ διατάσσονταν γύρω από συγκεκριμένες εστίες ερυθρών αιμοσφαιρίων και άλλων τύπων κυττάρων αρνητικών για την πρωτεΐνη GFAP (πιθανότατα ινοβλαστών).

2.4.BDNF (Πίνακας 3).

2.4.1. 4 ώρες (n=7).

4 ώρες μετά τον τραυματισμό ήταν εμφανής σημαντική μείωση του αριθμού των ανοσοθετικών στον BDNF νευρικών ινών και κυτταρικών σωμάτων στην περιτραυματική περιοχή (εικ. 5 B3). Στην ουσία, στη συγκεκριμένη μελέτη η περιτραυματική περιοχή μπορούσε σε μεγάλο βαθμό να οριστεί ως η περιοχή του ιστού γύρω από τον τραυματισμό στην οποία εντοπιζόταν έλλειψη έκφρασης του συγκεκριμένου πεπτιδίου. Εξαίρεση αποτελούσε η εντόπιση μέσα στην περιτραυματική περιοχή του φλοιού λιγοστών κυττάρων με έντονη έκφραση του BDNF. Η μορφολογία των κυττάρων αυτών δεν ήταν φυσιολογική (εικ. 5 B1). Είχαν σώμα τριγωνικού σχήματος με συρρικνωμένο και συμπαγές κυτταρόπλασμα χαρακτηριστικά που υποδήλωναν κύτταρα που έχουν εισέλθει στη διαδικασία κυτταρικού θανάτου. Η παρουσία αποφύδων καθώς και το μέγεθός τους συνέτειναν στην ταυτοποίησή τους ως νευρικών. Επίσης, μικρός αριθμός πυραμιδικών κυττάρων της CA1 περιοχής του υπόκαμπου -μέσα στην περιτραυματική περιοχή- εμφάνιζε περιορισμένη έκφραση του BDNF. Στις όμορες

στην περιτραυματική περιοχές του φλοιού παρατηρούνταν κυτταρικά σώματα με εντονότερη έκφραση του BDNF (στις στιβάδες IV και V), ενώ στον υπόκαμπο εντοπιζόταν αυξημένη παρουσία του BDNF κυρίως σε ίνες. Καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στην έκφραση του BDNF στο αντίπλευρο ημισφαίριο.

2.4.2. 12 ώρες (n=7).

Η εικόνα της έκφρασης του πεπτιδίου της νευροτροφίνης BDNF 12 ώρες μετά τον τραυματισμό ήταν ίδια με αυτή των 4 ωρών (εικ. 5 B4,5). Η περιτραυματική περιοχή ήταν κενή από άξονες και κυτταρικά σώματα ανοσοθετικά στη νευροτροφίνη, ενώ οι όμορες περιοχές διακρίνονταν από αυξημένη συγκέντρωση BDNF (εικ. 5 B2). Αρόντα ήταν και τα λιγοστά θετικά κυτταρικά σώματα μέσα στην περιτραυματική περιοχή που περιγράφηκαν και στις 4 ώρες (εικ. 5 B1). Αυξημένος αριθμός ανοσοθετικών κυτταρικών σωμάτων παρατηρήθηκε επίσης στον αποιεδή φλοιό του τραυματισμένου ημισφαιρίου. Στο αντίπλευρο ημισφαίριο δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά.

2.4.3. 1 εβδομάδα (n=5).

Μία εβδομάδα μετά τον τραυματισμό, το πρότυπο έκφρασης του BDNF δεν είχε μεταβληθεί σημαντικά. Στην περιτραυματική περιοχή, γύρω από το ίχνος του τραύματος, εκεί όπου είχε συσσωρευτεί συνδετικός ιστός και γλοία κύτταρα, παρέμενε μία, μικρότερου από ότι στις 12 ώρες, μεγέθους περιοχή κενή από θετικούς άξονες και κυτταρικά σώματα (εικ. 5 B6). Ως διαφορές πρέπει να σημειωθούν: πρώτον, η απουσία ακόμα και σποραδικών κυττάρων με υψηλά επίπεδα BDNF, είτε μέσα στην περιτραυματική περιοχή είτε στις όμορες περιοχές και δεύτερον, η ανοσοεντόπιση του πεπτιδίου στο εγκεφαλικό παρέγχυμα, με τη μορφή διάχυτης εξωκυττάριας χρώσης στην περιτραυματική περιοχή (εικ. 5 B7). Δεν ήταν δυνατό να αποσαφηνιστεί εάν η χρώση οφειλόταν στην ανοσοεντόπιση BDNF συγκεντρωμένου σε τελικές απολήξεις νευρικών κυττάρων ή σε υψηλά επίπεδα εξωκυττάρια BDNF.

2.5.NT-3 (Πίνακας 4).

2.5.1. 4ώρες (n=7).

Ο τραυματισμός επέφερε σημαντική μείωση στην έκφραση της νευροτροφίνης NT-3 στην περιτραυματική περιοχή. Η έκφρασή της μειώθηκε σημαντικά σε σχέση με το φυσιολογικό εγκέφαλο, τόσο σε αριθμό κυττάρων, όσο και σε ποσότητα πεπτιδίου, στο βαθμό που αυτή ήταν δυνατόν να εκτιμηθεί ως συνάρτηση της έντασης της χρώσης (εικ. 6 B1). Σε ορισμένες περιπτώσεις οι όμορες στην περιτραυματική περιοχές χαρακτηρίζονταν από εντόπιση κυττάρων με αυξημένη συσσώρευση πεπτιδίου, χωρίς όμως η ένταση του φαινομένου αυτού να είναι τόσο μεγάλη όσο στον BDNF. Αυξημένη ήταν επίσης η παρουσία θετικών στη NT-3 κυττάρων στο τραυματισμένο μεσολόβιο. Τα κύτταρα αυτά ήταν όμοια με τα κύτταρα του μεσολόβιου που ήταν ανοσοθετικά για την Hsp70 και ήταν μάλλον

ολιγοδενδρογλοιακά, με βάση το μέγεθός και την ανατομική θέση τους. Ορισμένα από τα θετικά κύτταρα στη NT-3 μέσα στην περιτραυματική περιοχή είχαν μορφολογία κυττάρων που βρίσκονται στη διαδικασία κυτταρικού θανάτου (συμπυκνωμένο κυτταροπλάσμα και έντονα τριγωνικό σχήμα). Τα κύτταρα αυτά ήταν όμοια με αντίστοιχα κύτταρα ανοσοθετικά στην πρωτεΐνη Hsp70 και στη νευροτροφίνη BDNF. Τέλος, λιγιστά θετικά κύτταρα της περιοχής CA1 του τραυματισμένου ιπλόκαμπου ήταν μάλλον θετικά (σύγκριση σε διαδοχικές τομές) και για την πρωτεΐνη GFAP.

2.5.2. 12 ώρες (n=7).

Το πρότυπο της έκφρασης της NT-3 12 ώρες μετά τον τραυματισμό δεν ήταν ιδιαίτερα διαφοροποιημένο από αυτό των 4 ωρών (εικ. 6 B3). Θα μπορούσε να αναφερθεί μόνο η επέκταση του αυξημένου αριθμού θετικών κυττάρων κατά μήκος του μεσολόβιου και η εντόπιση σε ορισμένες περιπτώσεις ανοσοθετικών κυττάρων στον απιοειδή φλοιό. Επιπροσθέτως μειωμένη ήταν η έκφραση της NT-3 σε πυρήνες όμορους στην ραχιαία τρίτη κοιλία (οπίσθιοι και μεσαίοι ηνιακοί πυρήνες/ Lateral and Medial Habenular nuclei).

2.5.3. 1 εβδομάδα (n=5).

Μετά από μία εβδομάδα η έκφραση της NT-3 στην περιοχή του τραύματος ήταν αρκετά έντονη. Τα κύτταρα τα οποία βρίσκονταν στη θέση του τραυματισμού («γεμίζοντας») τον κατεστραμμένο ιστό ήταν στην πλειοψηφία τους θετικά στη NT-3 (εικ. 6 B4,5). Τα θετικά κύτταρα είχαν ποικίλη μορφολογία και μάλλον ήταν μικτά νευρικά και γλοία.

2.6. IGF-I.

2.6.1. 4 και 12 ώρες (n=7 και n=7 αντίστοιχα).

Τις πρώτες δώδεκα ώρες μετά τον τραυματισμό εντοπίστηκε περιορισμένη αύξηση των επιπέδων του πεπτιδίου του IGF-I στην περιτραυματική περιοχή. Τόσο στις 4 όσο και στις 12 ώρες, εμφανίστηκαν κύτταρα θετικά στον IGF-I ακριβώς δίπλα στις θέσεις όπου ο ιστός είχε σχιστεί κατά τον τραυματισμό, κυρίως στο φλοιό (εικ. 7-3). Τα κύτταρα αυτά ήταν μεγάλου μεγέθους με κυτταροπλασματική εντόπιση της πρωτεΐνης. Επίσης η έκφραση του IGF-I εμφανίστηκε αυξημένη σε κύτταρα του μεσολόβιου, κοντά στην περιοχή του τραύματος.

2.6.2. 1εβδομάδα (n=5).

Μετά τη πάροδο μίας εβδομάδας από τον τραυματισμό, η έκφραση του IGF-I εμφανίστηκε να έχει επαχθεί σε όλο το εύρος της περιτραυματικής περιοχής, τόσο στο φλοιό όσο και στον ιπλόκαμπο (εικ. 7-4, 7-5). Η εντόπιση του IGF-I αφορούσε κυρίως μικρού μεγέθους κύτταρα και ήταν τόσο κυτταροπλασματική όσο και πυρηνική. Τα ανοσοθετικά κύτταρα εντοπιζόνταν σχεδόν αποκλειστικά στο κέντρο του τραύματος, στη θέση όπου αναπτύσσονταν οι διαδικασίες επούλωσης της

καταστροφής. Μόνη εξαίρεση αποτελούσε το μεσολόβιο στο οποίο η παρουσία του IGF-I επεκτεινόταν πλάγιως πέραν της περιτραυματικής περιοχής. Στο μεσολόβιο τα θετικά στον IGF-I κύτταρα ήταν πολυάριθμα και εντοπιζόνταν σε όλο το μήκος της δομής στο τραυματισμένο ημισφαίριο. Ο IGF-I ήταν η μόνη πρωτεΐνη η οποία δε βρέθηκε να αυξάνεται σε περιοχές ανατομικά απομακρυσμένες από τον τραυματισμό.

2.7. Αντίδραση TUNEL (Γράφημα 3).

2.7.1. 4 ώρες (n=7).

Πολυάριθμα κύτταρα θετικά στην αντίδραση TUNEL ήταν ορατά κατά μήκος του τραύματος στο φλοιό (εικ. 8 B1) και στον υπόκαμπο μετά τις πρώτες 4 ώρες από τον τραυματισμό. Η αύξηση του αριθμού των θετικών κυττάρων ήταν στατιστικά σημαντική τόσο στο φλοιό όσο και στον υπόκαμπο ($F=101,405$ και $P<0,001$ για το φλοιό και $F=221,333$ και $P<0,001$ για τον υπόκαμπο με ανάλυση Two-way ANOVA). Ιδιαίτερα όσον αφορά στον υπόκαμπο, επρόκειτο κυρίως για θετικά πυραμιδικά κύτταρα (εικ. 8 B7) κοντά στο σημείο που ο μηχανικός τραυματισμός είχε προκαλέσει τη διάρρηξη της συνέχειας της στιβάδας αυτών των κυττάρων. Επιπροσθέτως, στατιστικά σημαντική αύξηση του αριθμού των αποπτωτικών κυττάρων παρατηρήθηκε και στη στοιβάδα των κοκκιωδών κυττάρων της ΟΕ στο τραυματισμένο ημισφαίριο ($F=148,196$ και $P<0,001$ με ανάλυση two-way ANOVA).

2.7.2. 12 ώρες (n=7).

Ο αριθμός των κυττάρων που είχαν εισέλθει στη διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου είχε αυξηθεί στατιστικά σημαντικά από τις 4 έως τις 12 ώρες τόσο στον τραυματισμένο φλοιό ($F=36,237$ και $P<0,001$), όσο και στον τραυματισμένο υπόκαμπο ($F=145,793$ και $P<0,001$) αλλά και στην γειτονική στην περιτραυματική περιοχή ΟΕ (εικ. 8 B3-5) ($F=148,074$ και $P<0,001$). Ταυτόχρονα στατιστικά σημαντική αύξηση του αριθμού των θετικών κυττάρων στην αντίδραση TUNEL παρατηρήθηκε στον υπόκαμπο ($F=70,809$ και $P<0,001$) και στα κοκκιώδη κύτταρα της ΟΕ ($F=91,098$ και $P<0,001$) του αντίπλευρου ημισφαιρίου. Επιπροσθέτως, θετικά κύτταρα εμφανίζονταν στην περιοχή του αποϊειδούς φλοιού και στους παρακοιλιακούς υποθαλαμικούς πυρήνες (εικ. 8 B6).

2.7.3. 1 εβδομάδα (n=5).

Η ανατομική εντόπιση των θετικών στην αντίδραση TUNEL κυττάρων δεν ήταν ιδιαίτερα διαφοροποιημένη μία εβδομάδα μετά τον τραυματισμό. Η περιτραυματική περιοχή στο φλοιό και τον υπόκαμπο, ο αντίπλευρος φλοιός και υπόκαμπος, ο αποϊειδής φλοιός και οι παρακοιλιακοί υποθαλαμικοί πυρήνες εξακολουθούσαν να είναι οι περιοχές στις οποίες κυρίως εντοπιζόνταν τα TUNEL θετικά κύτταρα. Όσον αφορά στον υπόκαμπο, τα θετικά κύτταρα δεν περιορίζονταν μόνο στη στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων, αλλά εκτεινόταν και

στους ενδιάμεσους νευρώνες. Η εικόνα μάλιστα ήταν παρόμοια και στους δύο υπόκαμπους (εικ. 8 B9-12). Πολυάριθμα θετικά κύτταρα εντοπιζόνταν ακόμη και κατά μήκος της επούλωσης του τραύματος στο φλοιό και τον υπόκαμπο (εικ. 8 B11,12).

2.8. Συνοπτική συγκριτική περιγραφή των χρονικών σημείων.

2.8.1. 4 ώρες (Σχήμα Α).

4 ώρες μετά τον μηχανικό, διεισδυτικό τραυματισμό ο εγκέφαλος του ενήλικου επίμυος είχε ήδη αρχίσει να αντιδρά. Μεγάλος αριθμός νευρικών και γλοιϊκών κυττάρων παρήγαγαν τη θερμοεπαγόμενη, προστατευτική πρωτεΐνη Hsp70 στην περιτραυματική περιοχή, στο μεσολόβιο και στην περιοχή του κοκκιώδους φλοιού πίσω από το σπλήνιο του μεσολοβίου. Το κυριότερο χαρακτηριστικό του ιστού ήταν η σημαντική μείωση (σχεδόν έλλειψη) θετικής χρώσης των νευραξόνων και των κυτταρικών σωμάτων για τη νευροτροφίνη BDNF στην περιτραυματική περιοχή. Το ίδιο φαινόμενο, αλλά όχι με την ίδια ένταση παρατηρήθηκε και για την έκφραση της νευροτροφίνης NT-3. Εξάιρεση αποτελούσε ένας μικρός αριθμός, έντονα θετικών για τον BDNF και σε μικρότερο βαθμό για τη NT-3 κυτταρικών σωμάτων, που βρίσκονταν στην περιτραυματική περιοχή τα οποία είχαν συρρικνωμένο κυτταρόπλασμα και ήταν θετικά και για την Hsp70 (χρώση σε διαδοχικές τομές). Επιπροσθέτως, ο αυξητικός παράγοντας IGF-I άρχιζε να συντίθεται σε μικρό αριθμό κυττάρων ακριβώς στα όρια της βλάβης, ενώ η pNOS εμφανιζόταν στατιστικά σημαντικά αυξημένη σε όλον τον τραυματισμένο υπόκαμπο. Στα όρια του τραύματος άρχιζαν επίσης να εμφανίζονται μερικά υπερτροφικά αστρογλοϊκά κύτταρα, ορισμένα εκ των οποίων, στη στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων, ήταν θετικά και για τις νευροτροφίνες BDNF και NT-3. Τέλος, το φαινόμενο του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου εμφανιζόταν σε ομάδες κυττάρων της περιτραυματικής περιοχής στο φλοιό και λίγο πιο εκτεταμένα στον υπόκαμπο.

Στο αντίπλευρο ημισφαίριο δεν εντοπίστηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στην έκφραση των παραπάνω παραγόντων. Εξάιρεση αποτελούσε η στατιστικά σημαντική αύξηση του αριθμού των θετικών κυττάρων στην Hsp70 στην περιοχή του κοκκιώδους φλοιού πίσω από το σπλήνιο του μεσολοβίου και στο μεσολόβιο σε ορισμένα μόνο ζώα (3/7).

2.8.2. 12 ώρες (Σχήμα Β).

12 ώρες μετά τον τραυματισμό τα μοριακά και κυτταρικά φαινόμενα τα οποία εμφανίστηκαν στις 4 ώρες ήταν ακόμη ορατά και ορισμένα πιο έντονα. Η εξάπλωση της έκφρασης της Hsp70 στο μεσολόβιο είχε ξεπεράσει σχεδόν σε όλα τα ζώα (6/7) τα όρια του ενός ημισφαιρίου και εντοπιζόταν και στο αντίπλευρο ημισφαίριο. Πολύ πιο έντονη ήταν η επέκταση που παρατηρήθηκε στο φαινόμενο του κυτταρικού θανάτου. Εκτός της περιτραυματικής ζώνης του φλοιού και του υπόκαμπου, κύτταρα θετικά στην αντίδραση TUNEL εντοπιζόνταν επιπλέον στον αντίπλευρο υπόκαμπο, στον αποιεϊδή φλοιό του τραυματισμένου ημισφαιρίου και

γύρω από την τρίτη κουλία. Ιδιαίτερη εξάπλωση χαρακτήριζε όμως και την έκφραση της pNOS, η οποία επεκτεινόταν και στους δύο αντίπλευρους ιππόκαμπους. Η σημαντική μείωση στην έκφραση των νευροτροφινών BDNF και NT-3 στην περιτραυματική περιοχή παρέμενε. Παρατηρήθηκε όμως περιορισμένη αλλά διακριτή αύξηση της έκφρασής τους στις όμορες περιοχές, όπως και σε ανατομικά απομακρυσμένες δομές όπως ο απιοειδής φλοιός. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μείωση στην έκφραση της NT-3 στους μεσαίους και οπίσθιους ηνιακούς πυρήνες του θαλάμου. Τέλος, η αύξηση της έκφρασης του IGF-I και η εντόπιση υπερτροφικών αστρογλοιακών κυττάρων δίπλα στον κατεστραμμένο ιστό παρέμεινε περιορισμένη. Αξίζει να σημειωθεί πως στον απιοειδή φλοιό του τραυματισμένου ημισφαιρίου και στους παρακλιμακούς υποθαλαμικούς πυρήνες βρέθηκε -σε λίγα ζώα- ταυτόχρονα αυξημένος αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων στις πρωτεΐνες Hsp70, NT-3 και BDNF καθώς και θετικών στην αντίδραση TUNEL κυττάρων.

2.8.3. 1 εβδομάδα (Σχήμα Γ).

1 εβδομάδα μετά τον τραυματισμό ήταν εμφανείς ορισμένες μεταβολές στην παραπάνω περιγραφείσα εικόνα του ιστού. Το φαινόμενο του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου παρέμενε εκτεταμένο και στα δύο ημισφαίρια στην περιοχή του ιππόκαμπου και του φλοιού. Η έκφραση της Hsp70 ήταν ακόμη έντονη αλλά με τάσεις μείωσης και συγκέντρωσης στο κέντρο της περιτραυματικής περιοχής. Η απουσία του BDNF από την περιτραυματική περιοχή παρέμενε έντονη αν και μία διάχυτη χρώση του παρεγχύματος ίσως υποδήλωνε την επανέναρξη της τοπικής σύνθεσής του. Από την άλλη μεριά, η έκφραση της NT-3 είχε αποκατασταθεί στο μεγαλύτερο μέρος της περιτραυματικής περιοχής και ήταν έντονη στα κύτταρα που είχαν μεταναστεύσει στην περιοχή του κατεστραμμένου ιστού (στην «ουλή»). Αντίστοιχα έντονη, και ίσως σε μεγαλύτερο βαθμό, ήταν η έκφραση του IGF-I, σε περιορισμένο όμως ανατομικά χώρο, στα όρια της περιτραυματικής περιοχής και του μεσολόβιου. Τέλος, η παρουσία τυπικών αστρογλοιακών κυττάρων στην περιοχή της «ουλής» ήταν έντονη και ουσιαστικά αυτά διαμόρφωναν την κυτταρική αρχιτεκτονική του τραυματισμένου ιστού.

3. Μετατραυματική χορήγηση IGF-I (Σχήματα Δ-Ε).

Η τοπική χορήγηση του IGF-I σε τρεις δόσεις, 15, 45 και 75 λεπτά μετά τον τραυματισμό, επέφερε ορισμένες μεταβολές στην έκφραση ορισμένων από τις πρωτεΐνες που μελετήθηκαν 4 (n=4) και 12 (n=4) ώρες αργότερα. Η κυριότερη διαφορά, η οποία έγινε ορατή σε όλα τα πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε, ήταν ο περιορισμός της περιτραυματικής ζώνης, έτσι όπως αυτή ορίστηκε από τα πρότυπα έκφρασης συγκεκριμένων πεπτιδίων (αύξηση της Hsp70, μείωση των BDNF και NT-3). Πιο αναλυτικά:

3.1. Hsp70 (Γραφήματα 1,2, Πίνακας 2).

Η αύξηση της έκφρασης της Hsp70 στην περιτραυματική περιοχή παρέμεινε στατιστικά σημαντική σε σχέση με τα ζώα μάρτυρες αλλά ήταν στατιστικά

σημαντικά μειωμένη σε σχέση με τα τραυματισμένα ζώα τα οποία είχαν πάρει έκδοχο (γράφημα 1). Η επίδραση αυτή του IGF-I ήταν σαφής και στα δύο χρονικά σημεία που μελετήθηκαν (εικ. 3 Γ1). Επίσης, ο IGF-I οδήγησε στην απόπτωση της περιτομής (στις 4 ώρες μετά τον τραυματισμό) αύξησης του αριθμού των θετικών στην Hsp70 κυττάρων στον κοκκιώδη φλοιό πίσω από το σπλήνιο του μεσολοβίου και στα δύο ημισφαίρια (γράφημα 2). Ενδιαφέρον επίσης παρουσίασε η εντόπιση, σε ορισμένα ζώα, περισσότερων ανοσοθετικών κυττάρων στον αντίπλευρο φλοιό και κυρίως στον ιπλόκαμπο -από ό,τι στην περιτραυματική περιοχή- μετά τη χορήγηση του IGF-I.

3.2. BDNF (Πίνακας 3).

Η πιο διακριτή ίσως επίδραση της χορήγησης του IGF-I ήταν η αναστροφή του φαινομένου της δραματικής μείωσης των επιπέδων του BDNF στην περιτραυματική περιοχή. Στην ομάδα των πειραματόζων στα οποία ενέθηκε IGF-I ήταν σαφής η παραμονή θετικών στον BDNF νευρικών ινών και κυτταρικών σωμάτων σε επαφή με τον πυρήνα του τραύματος, 4 και 12 ώρες μετά τον τραυματισμό (εικ. 5 Γ1-3). Επιπροσθέτως, όπου διαμορφώνονταν περιτραυματικός χώρος με μειωμένη έκφραση του BDNF, η αύξηση της παρουσίας της πρωτεΐνης στις αμέσως όμορες περιοχές ήταν έντονη. Πιο έντονη από την αντίστοιχα παρατηρούμενη αύξηση στην ομάδα των τραυματισμένων ζώων, χωρίς χορήγηση IGF-I.

3.3. NT-3 (Πίνακας 4).

Η χορήγηση του IGF-I οδήγησε σε μεγάλο βαθμό στη διατήρηση της έκφρασης του πεπτιδίου της NT-3 στην περιτραυματική περιοχή. Ιδιαίτερα στο φλοιό η ανοσοϊστοχημική εντόπιση της NT-3 4 και 12 ώρες μετά το τραύμα, μετά τη χορήγηση IGF-I, σε πολλές τομές εμφανίστηκε σχεδόν όμοια με του φυσιολογικού εγκεφάλου, με αποτέλεσμα να υπάρχει δυσκολία να διακριθεί ο τραυματισμός (εικ. 6 Γ1,3). Επιπλέον, σε αρκετές περιπτώσεις βρέθηκε αύξηση στα επίπεδα της NT-3 στις 12 ώρες μετά τον τραυματισμό, σε πυρήνες του θαλάμου, στο τραυματισμένο ημισφαίριο (εικ. 6 Γ2). Η αύξηση αυτή αφορούσε την έκφραση της νευροτροφίνης σε κυτταρικούς πληθυσμούς στους οποίους δεν εκφραζόταν στο φυσιολογικό εγκέφαλο ούτε και στο αντίπλευρο ημισφαίριο.

3.4. GFAP.

Η χορήγηση IGF-I μετά τον τραυματισμό δεν επηρέασε την ανοσοϊστοχημική εντόπιση της πρωτεΐνης GFAP. Δεν παρατηρήθηκε μεταβολή ούτε του αριθμού των ανοσοθετικών κυττάρων ούτε της συνολικής ποσότητας της πρωτεΐνης. Η παρουσία των ευτροφικών, ευμεγεθών αστρογλοϊακών κυττάρων παρέμεινε ως σταθερό μετατραυματικό εύρημα στα δύο χρονικά σημεία στα οποία μελετήθηκε.

3.5.IGF-I.

Η έκφραση του τροφικού παράγοντα IGF-I δεν μεταβλήθηκε από την εξωγενή χορήγηση του ίδιου του παράγοντα. Στον πυρήνα του τραύματος, λίγα ανοσοθετικά κυτταρικά σώματα ήταν εμφανή τόσο στις 4 όσο και στις 12 ώρες.

3.6.Αντίδραση TUNEL (Γράφημα 3).

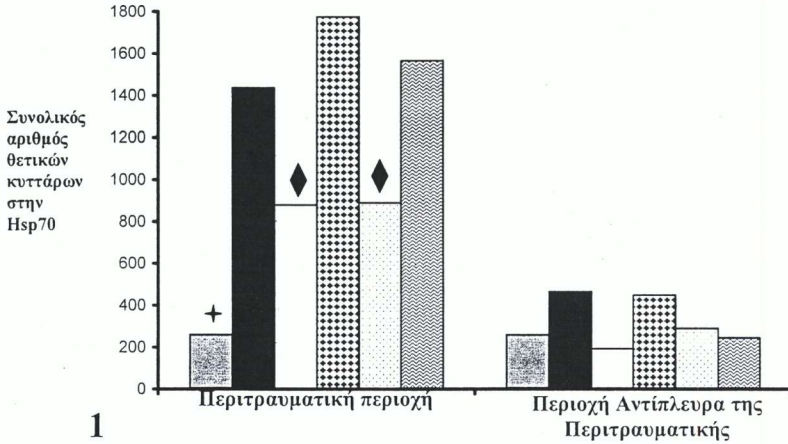
Η χορήγηση του IGF-I είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του αριθμού των θετικών στην αντίδραση TUNEL κυττάρων στην περιοχή του τραύματος (γράφημα 3). Το φαινόμενο ήταν εμφανές ήδη από τις 4 ώρες. Η επίδραση του IGF-I ήταν όμως πιο έντονη 12 ώρες μετά τον τραυματισμό. Στην περιτραυματική περιοχή, τόσο στο φλοιό όσο και στον ιπόκαμπο, η παρουσία θετικών στην αντίδραση TUNEL κυττάρων ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένη. Χαρακτηριστική της δράσης του IGF-I ήταν η εντυπωσιακή μείωση των αποπτωτικών κυττάρων στην κοκκιώδη στιβάδα της OE (εικ. 8 Γ2-4), μία περιοχή με μεγάλο αριθμό θετικών κυττάρων 12 ώρες μετά το τραύμα στα τραυματισμένα ζώα στα οποία είχε χορηγηθεί μόνο έκδοχο. Η μείωση αυτή δεν επεκτεινόταν στην αντίπλευρη OE, στην οποία παρέμενε έντονο το φαινόμενο της απόπτωσης στα κοκκιώδη κύτταρα. Επιπροσθέτως, στους εγκεφάλους των πειραματόζωων στα οποία χορηγήθηκε μετατραυματικά IGF-I δεν εντοπίστηκε μεγάλος αριθμός κυττάρων θετικών στη αντίδραση TUNEL σε πιο απομακρυσμένες από το τραύμα περιοχές του εγκεφάλου, όπως ο απιοειδής φλοιός και οι υποθαλαμικοί παρακοιλιακοί πυρήνες.

ΠΙΝΑΚΕΣ-ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ-ΕΙΚΟΝΕΣ

	ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΕΝΟ ΗΜΙΣΦΑΙΡΙΟ		ΑΝΤΙΘΕΤΟ ΗΜΙΣΦΑΙΡΙΟ	
	ΟΕ	ΠΕΡΙΟΧΗ CA3	ΟΕ	ΠΕΡΙΟΧΗ CA3
ΖΩΑ ΜΑΡΤΥΡΕΣ (n=5)	14,5±	13,9±	14,5±	13,9±
4 ΏΡΕΣ (n=5)	18±2,9*	18±2,8*	17,33±2,3	15,8±4,3
12 ΏΡΕΣ (n=5)	19,11±4,6*	16,55±3,2*	19,63±3,7*	16,5±3,2*
24 ΏΡΕΣ (n=5)	18,5±3,2*	15,88±2,1	17,63±2,5*	15,86±2.4
48 ΏΡΕΣ (n=5)	17,29±2,4	14±1,3	13,6±2,6	14±2,8

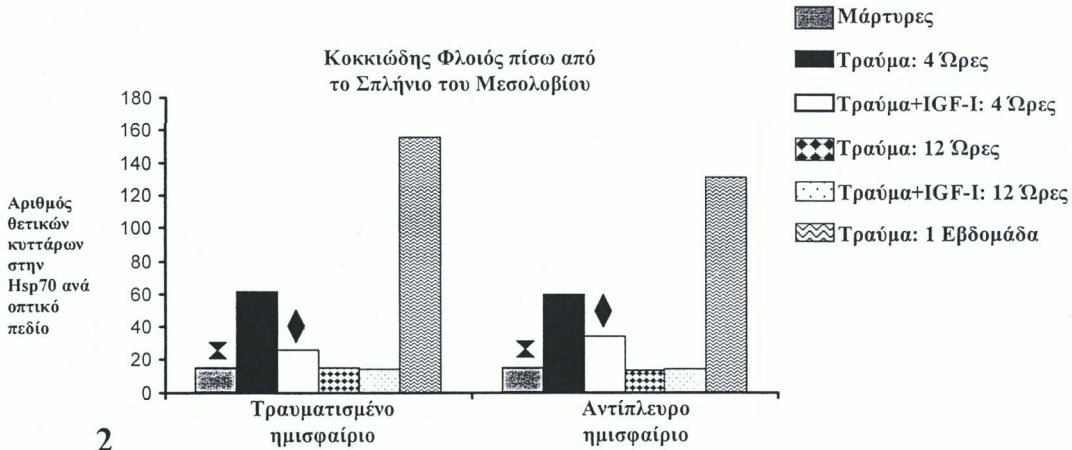
ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Αριθμός ανοσοθετικών για τη πρωτεΐνη **nNOS** κυττάρων στον υπόκαμπο. Οι μετρήσεις έγιναν στην Οδοντωτή Έλικα (ΟΕ) και στην περιοχή CA3 του τραυματισμένου και του αντίπλευρου του υπόκαμπου. Οι συγκρίσεις σε κάθε ένα χρονικό σημείο έγιναν μεταξύ της κάθε περιοχής σε σχέση με την αντίστοιχη περιοχή στα ζώα μάρτυρες. Με έντονο χρώμα και αστερίσκο επισημαίνονται οι τιμές που είναι στατιστικά σημαντικές μετά από ανάλυση κατά Student (t-test) και με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,05$. (Σε κάθε κατηγορία έχουν χρησιμοποιηθεί εγκέφαλοι από 5 πειραματόζωα.)

Γραφήματα Hsp70



1

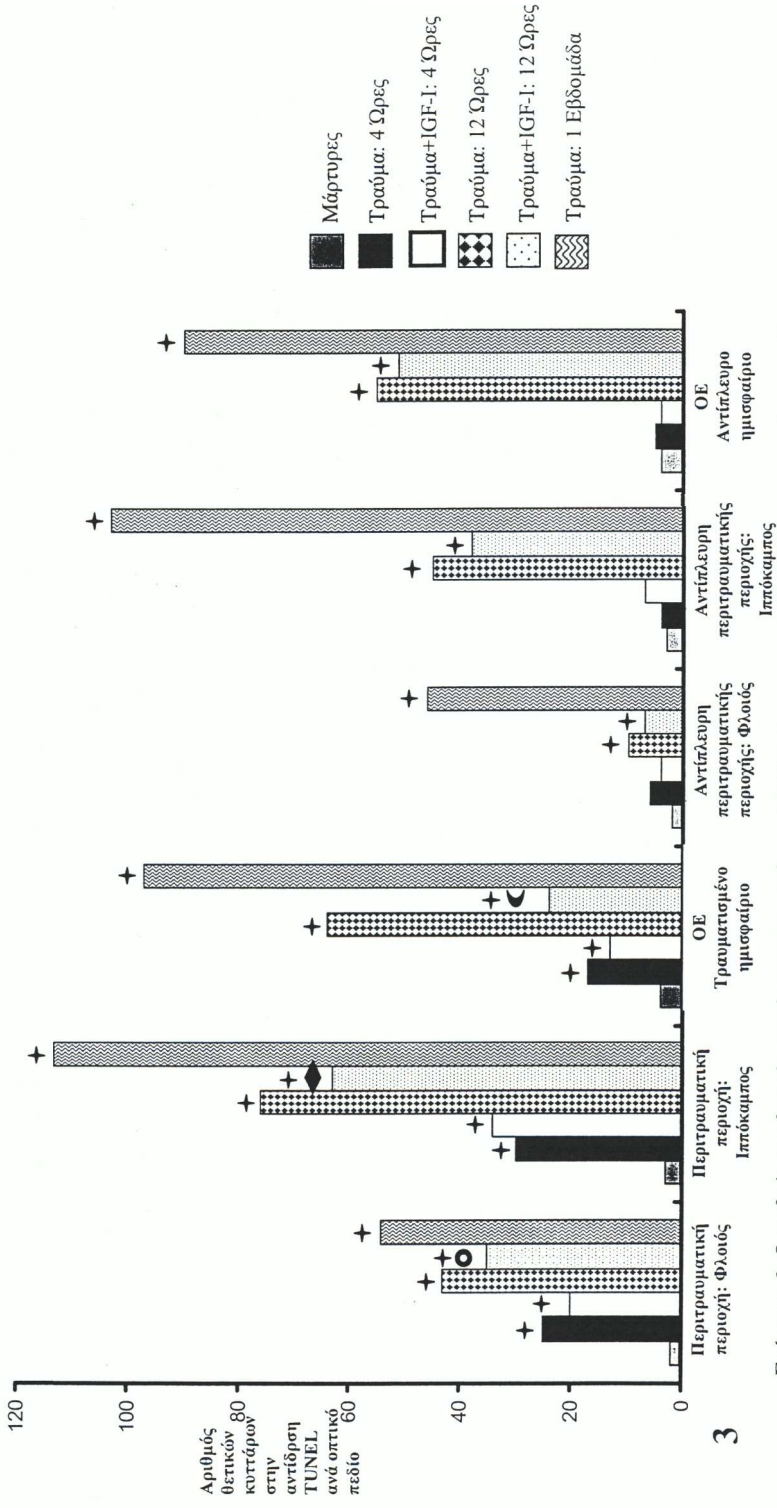
Γράφημα 1: Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων στην Hsp70 είναι στατιστικώς σημαντικά μικρότερος στα ζώα μάρτυρες σε σχέση τόσο με τα τραυματισμένα ζώα όσο και με τα ζώα στα οποία χορηγήθηκε IGF-I (+ : $P < 0,001$). Παρόλα αυτά η χορήγηση IGF-I μείωσε σημαντικά τον αριθμό των θετικών κυττάρων σε σχέση με τα τραυματισμένα ζώα στα οποία χορηγήθηκε έκδοχο (♦ : $P < 0,001$).



2

Γράφημα 2. Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων στην Hsp70 είναι στατιστικώς σημαντικά μικρότερος στα ζώα μάρτυρες σε σχέση με τα τραυματισμένα ζώα στα οποία χορηγήθηκε έκδοχο 4 ώρες και μία εβδομάδα μετά τον τραυματισμό (X : $P < 0,001$). Η χορήγηση IGF-I οδήγησε στη στατιστικώς σημαντική μείωση του αριθμού των θετικών κυττάρων 4 ώρες μετά τον τραυματισμό (♦ : $P < 0,001$) με αποτέλεσμα ο αριθμός των κυττάρων να μη διαφέρει από τα ζώα μάρτυρες.

Γράφημα TUNEL



Γράφημα 3. Ο αριθμός των θετικών κυττάρων στην αντίδραση TUNEL ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένος στα ζώα μάρτυρες σε σχέση είτε με τα τραυματισμένα ζώα στα οποία χορηγήθηκε έκδοχο είτε με τα τραυματισμένα ζώα στα οποία χορηγήθηκε IGF-I, στα περισσότερα χρονικά σημεία που μελετήθηκαν και στις περισσότερες περιοχές (+: P<0,001). Η χορήγηση του IGF-I οδήγησε σε ορισμένες περιπτώσεις σε στατιστικές σημαντική μείωση του αριθμού των αποπτωτικών κυττάρων (◀: P<0,05 ●: P<0,01 ◐: P<0,001)

Hsp70	ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΕΝΟ ΗΜΙΣΦΑΙΡΙΟ						ΑΝΤΙΠΛΕΥΡΟ ΗΜΙΣΦΑΙΡΙΟ						ΜΑΡ-ΤΥΡΕΣ
	ΕΚΛΟΧΟ			IGF-I			ΕΚΛΟΧΟ			IGF-I			
	4	12	1 Εβδ.	4	12	1 Εβδ.	4	12	1 Εβδ.	4	12	1 Εβδ.	
	Ωρες	Ωρες	Ωρες	Ωρες	Ωρες	Ωρες	Ωρες	Ωρες	Ωρες	Ωρες	Ωρες	Ωρες	
ΜΕΣΟΛΟΒΙΟ	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	+
ΑΠΟΕΙΔΗΣ ΦΛΟΙΟΣ	--	+	+	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
ΠΑΡΑΚΟΙΛΙΑΚΟΙ ΥΠΟΘΑΛΑΜΙΚΟΙ ΠΥΡΗΝΕΣ	--	++	++	--	+	++	--	++	++	++	++	+	--

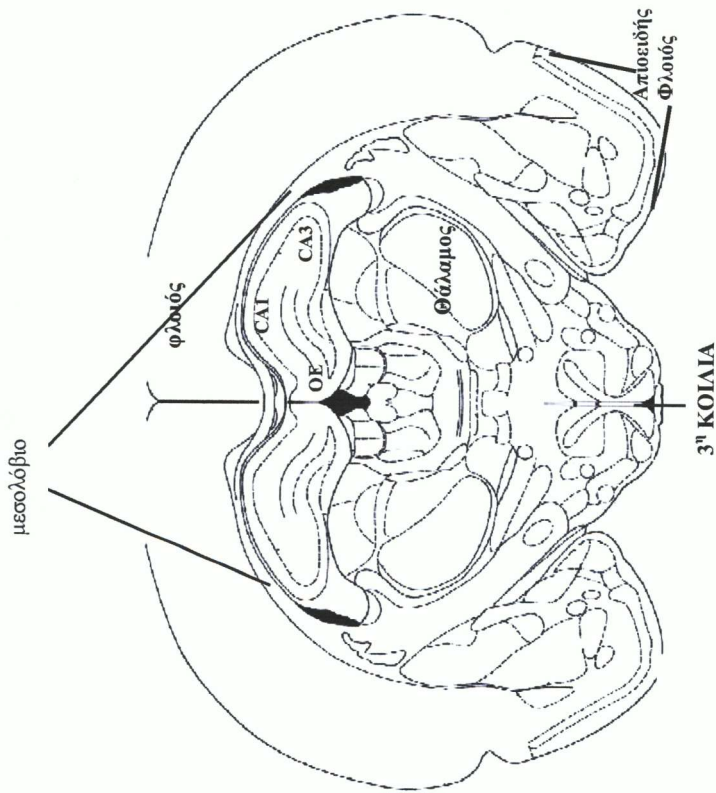
ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Ημι-ποσοτική μέτρηση των ανοσοθετικών στην Hsp70 κυττάρων σε περιοχές του εγκεφάλου έξω από την περιτραυματική και τον κοκκώδη φλοιό πίσω από το σπλήνιο του μεσολοβίου.








BDNF	ΖΩΑ ΜΑΡΤΥΡΕΣ (n=10)	ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟΣ+ ΕΚΛΟΧΟ				ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟΣ+ IGF-1					
		4 ΩΡΕΣ (n=7)		12 ΩΡΕΣ (n=7)		1 ΕΒΔΟΜ. (n=5)		4 ΩΡΕΣ (n=4)		12 ΩΡΕΣ (n=4)	
		άξιονες	σόμ.	άξιονες	σόμ.	άξιονες	σόμ.	άξιονες	σόμ.	άξιονες	σόμ.
ΦΛΟΙΟΣ	ΠΕΡΙΤΡΑΥΜ.	+++	±	-	±	-	-	-	++	++	+
	ΟΜΟΡΕΣ	+++	++	+++	++	+++	+	+++	++	+++	++
	ΑΠΟΕΙΔΗΣ	++	+	++	++	++	+	++	++	++	+
ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΣ	ΠΕΡΙΤΡΑΥΜ.	+++	±	-	-	-	-	-	++	++	+
	ΟΜΟΡΕΣ	+++	±	+++	++	+++	±	+++	++	+++	++
ΦΛΟΙΟΣ	ΑΝΤΙΣΤ. ΠΕΡ.	+++	±	+++	±	+++	±	+++	+++	±	±
	ΑΠΟΕΙΔΗΣ	++	+	++	+	++	+	++	++	++	+
ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΣ	ΑΝΤΙΣΤ. ΠΕΡ.	+++	±	+++	±	+++	±	+++	+++	±	±

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Ημι-ποσοτικές μετρήσεις του αριθμού των ανοσοθετικών κυτταρικών σομιτών και αξόνων στην πρωτεΐνη **BDNF**, σε διάφορες περιόδους του εγκεφάλου των επιμύων, σε επλεγμένα χρονικά σημεία μετά από τραυματισμό, με ή χωρίς τη χορήγηση IGF-1, καθώς και στις αντίστοιχες περιόδους από εγκεφάλους ζώων μωρτώνων. [ΠΕΡΙΤΡΑΥΜ= Περικρανιατική περιοχή, ΑΝΤΙΣΤ. ΠΕΡ.= Αντίστοιχη της περιτραυματικής περιοχής. Με κόκκινο χρώμα τονίζονται οι διαφορές σε σχέση με τα ζώα μάρτυρες. Με τα πλαίσια τονίζονται οι διαφορές από τη χορήγηση του IGF-1 (σύγκριση ομάδας τραυματισμός και έκδοχο) με ομάδα «τραυματισμός+ IGF-1»]

ΝΤ-3		ΖΩΑ ΜΑΡΤΥΡΕΣ (n=10)	ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟΣ+ ΕΚΔΟΧΟ			ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟΣ+ IGF-I	
			4 ΩΡΕΣ (n=7)	12 ΩΡΕΣ (n=7)	1 ΕΒΔΟΜ. (n=5)	4 ΩΡΕΣ (n=4)	12 ΩΡΕΣ (n=4)
ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΕΝΟ ΗΜΙΣΦΑΙΡΙΟ	ΦΛΟΙΟΣ	+++	+±	+±	+++	+++	+++
		+++	+++++	+++++	+++	+++	+++
	ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΣ	+±	+±	++	++	+±	+±
		++	±	++	++	++	++
	ΠΡΟΣΦ. + ΟΠΣΦ. ΗΝΙΑΚΟΙ ΠΥΡΗΝΕΣ	++	+++	+++	+++	++	±
		++	++	±	++	++	+++
	ΜΕΣΟΛΟΒΙΟ	+	++	++	++	++	++
		+++	+++	+++	+++	+++	+++
	ΕΤΕΡΟΠΛΕΥΡΟ ΗΜΙΣΦΑΙΡΙΟ	ΦΛΟΙΟΣ	+±	+±	+±	+±	+±
		ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΣ	++	++	++	++	++
ΠΡΟΣΦ. + ΟΠΣΦ. ΗΝΙΑΚΟΙ ΠΥΡΗΝΕΣ		++	++	++	++	++	
ΜΕΣΟΛΟΒΙΟ		+	+±	+±	+	+	

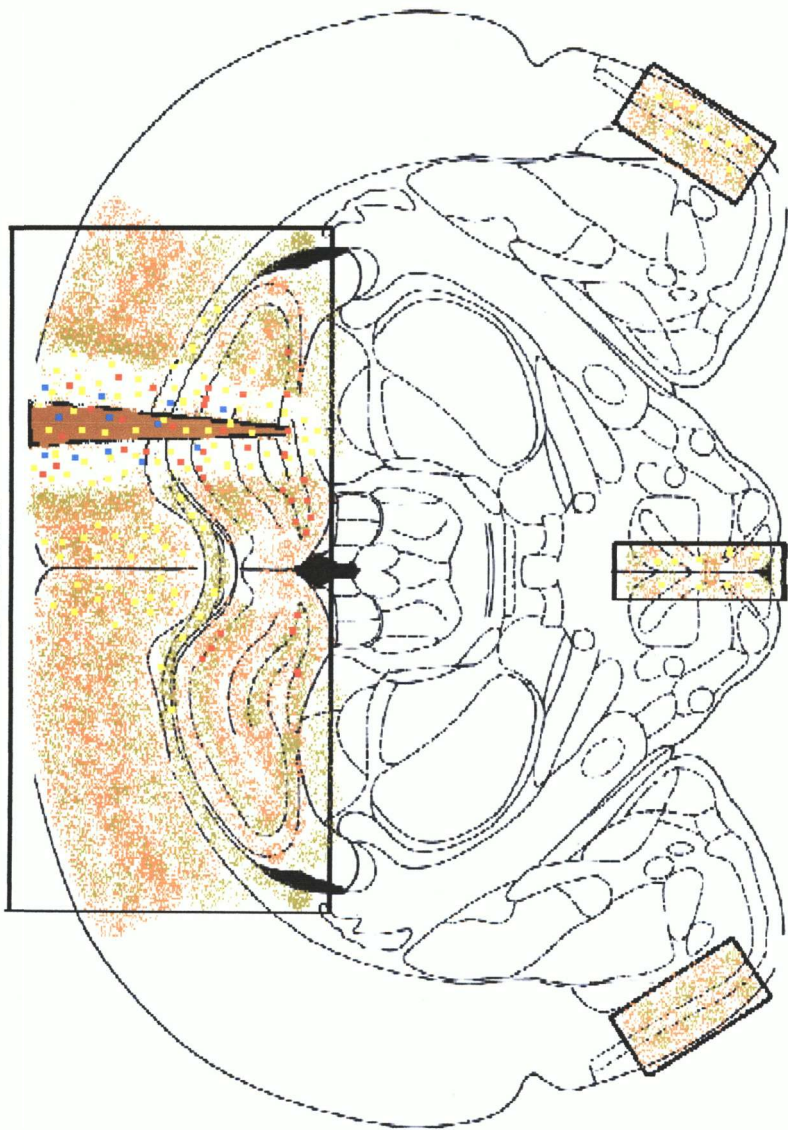
ΠΙΝΑΚΑΣ 4. Ημι-ποσοτικές μετρήσεις του αριθμού των ανοσοθετικών κυττάρων στην πρωτεΐνη **NT-3**, σε διάφορες περιοχές του εγκέφαλου των επιμύων, σε επλεγμένα χρονικά σημεία μετά από τραυματισμό, με ή χωρίς τη χορήγηση IGF-I, καθώς και στις αντίστοιχες περιοχές από εγκέφαλους ζώων μαρτύρων. [ΠΕΡΙΤΡΑΥΜ= Περιτραυματική περιοχή, ΑΝΤΙΣ.Τ. ΠΕΡ.= Αντίστοιχη της περιτραυματικής περιοχή. Με κόκκινο χρώμα τονίζονται οι διαφορές σε σύγκριση με τα ζώα μάρτυρες. Με τα ~~πράσινα~~ τονίζονται οι διαφορές από τη χορήγηση του IGF-I (σύγκριση ομάδας «τραυματισμός και έκδοχο» με την ομάδα «τραυματισμός και IGF-1»)]



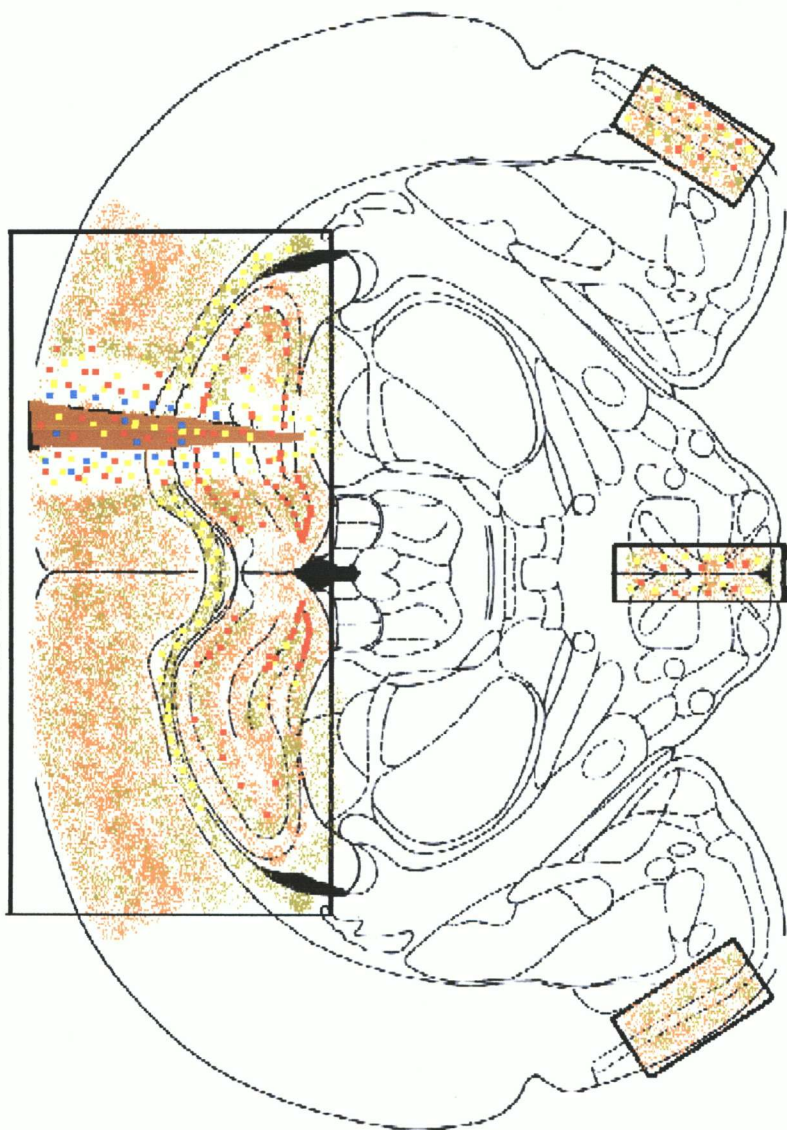
- BDNF:** Διάχυτη χρώση θετικών αξόνων κυτταρικών σωματίων 
- NT-3:** Διάχυτη χρώση θετικών κυτταρικών σωματίων 
- NT-3:** Ομάδες θετικών κυττάρων 
- BDNF:** Ομάδες θετικών κυττάρων 
- Hsp70:** Ομάδες θετικών κυττάρων 
- IGF-I:** Ομάδες θετικών κυττάρων 
- TUNEL:** Ομάδες θετικών κυττάρων 

Τα σχήματα είναι προσαρμογή από τον ανατομικό άτλαντα των Paxinos and Watson, 1986.

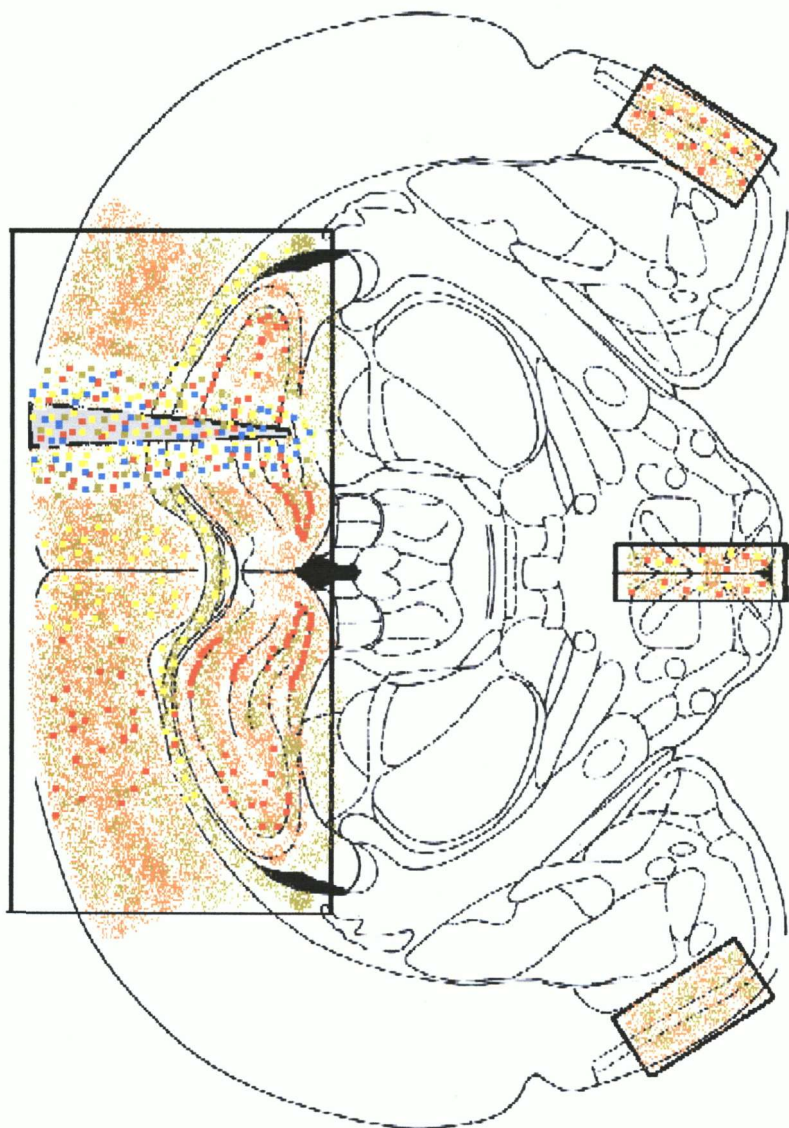
Α. 4 ΩΡΕΣ



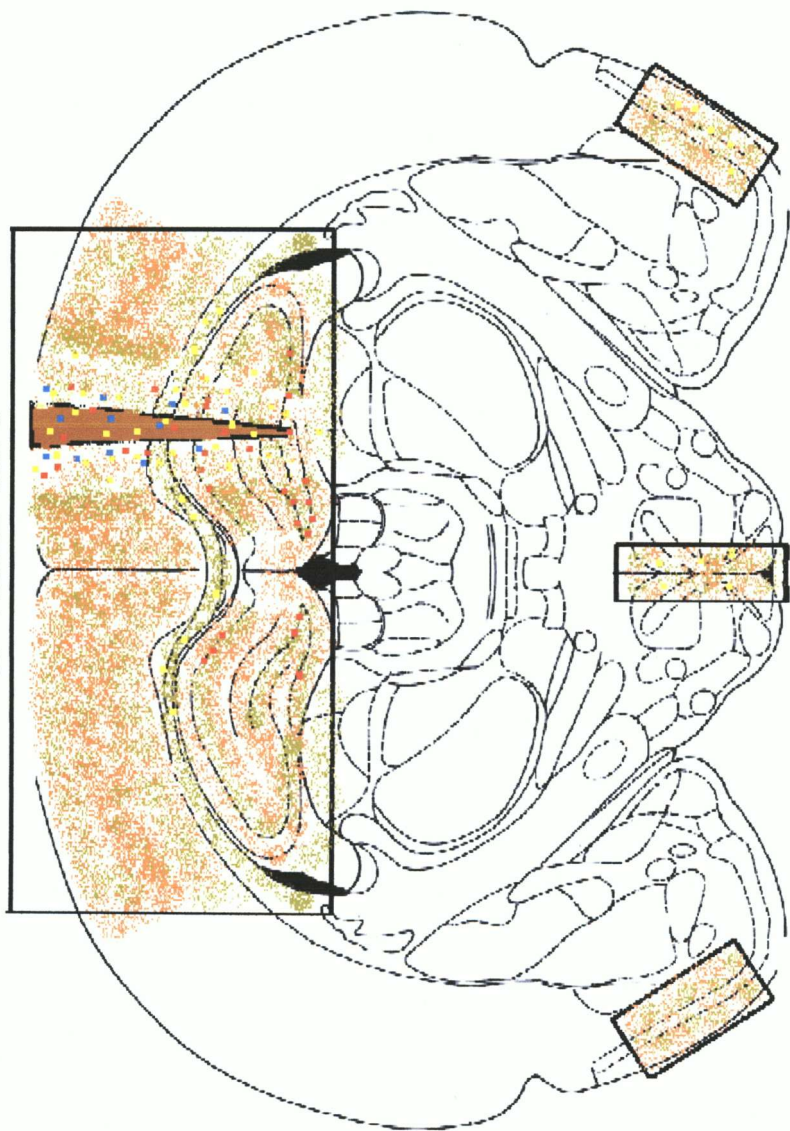
B. 12 ΩΡΕΣ



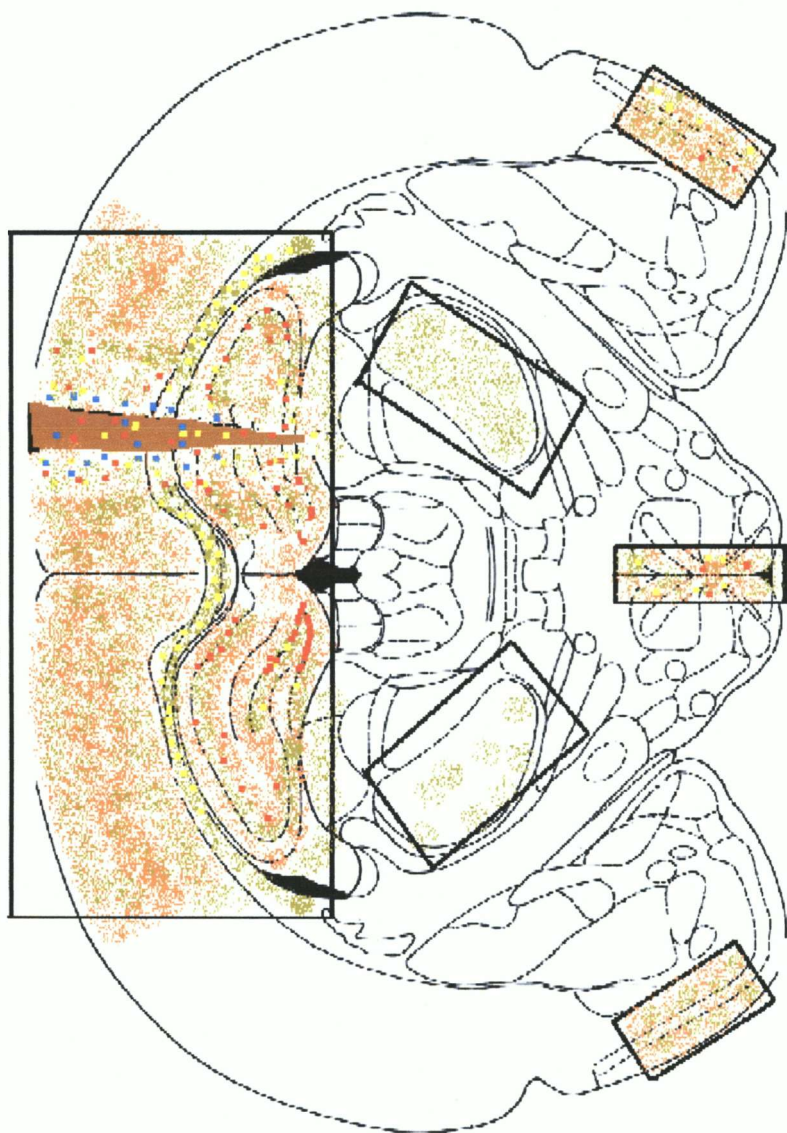
Γ. 1 ΕΒΔΟΜΑΔΑ

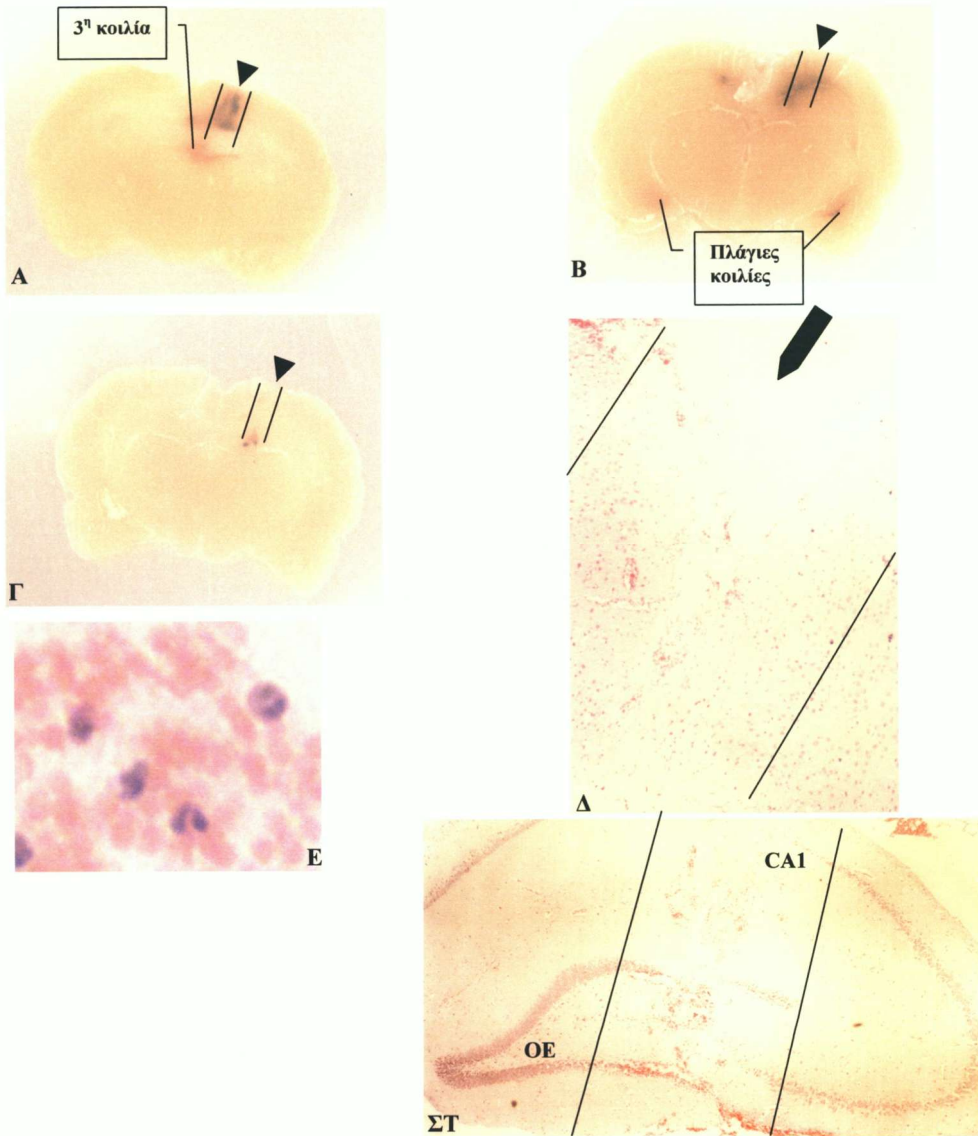


4. 4 ΩΡΕΣ + IGF-1

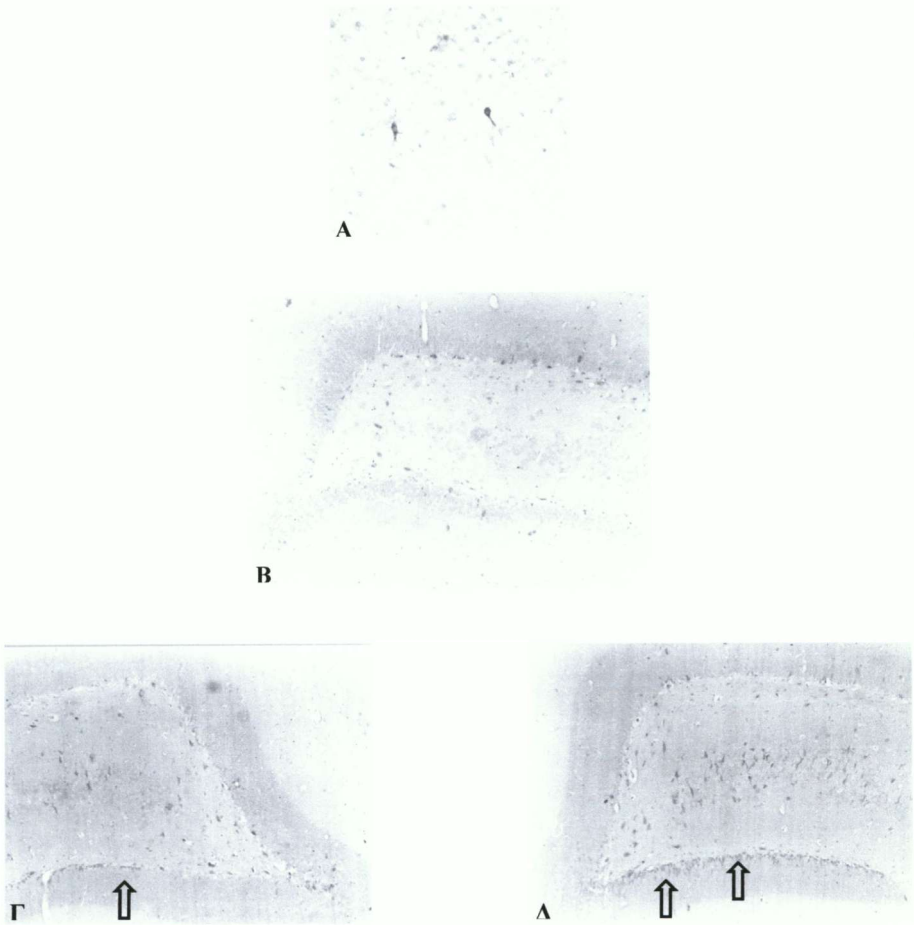


E. 12 ΩΡΕΣ +IGF-I

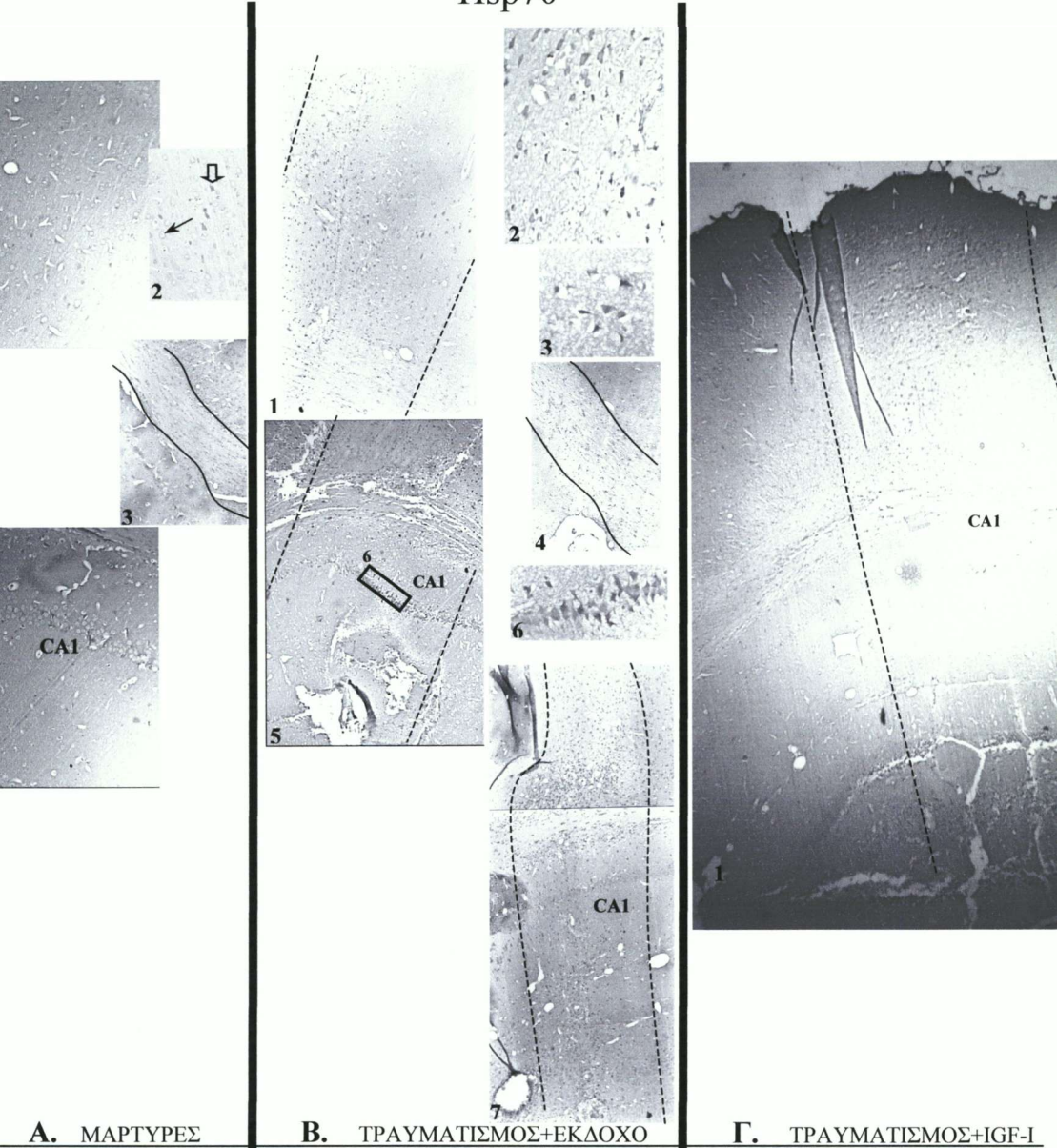




Εικόνα 1. 4 Ώρες μετά τον τραυματισμό ένα ενδοεγκεφαλικό αιμάτωμα ήταν εμφανές στο παρέγχυμα στη θέση του τραυματισμού (A, η περιτραυματική περιοχή περιλαμβάνεται μέσα στις δύο παράλληλες γραμμές, το τρίγωνο υποδεικνύει τη θέση του τραυματισμού). 12 Ώρες μετά τον τραυματισμό το αιμάτωμα στο παρέγχυμα επιμένει αλλά οι ενδοκοιλιακές αιμορραγίες έχουν μετακινηθεί στα πλάγια (B). 1 εβδομάδα μετά το τραύμα ο μεγαλύτερος όγκος αίματος έχει αποχρεωθεί και η ιστολογία φαίνεται φυσιολογική (C). Σε μεγαλύτερη μεγέθυνση και μετά από χρώση με αιματοξυλίνη/εωσίνη είναι εμφανής η ύπαρξη μίας περιοχής με εμφανείς τις επιπτώσεις από τη μηχανική διαταραχή του ιστού, συγκεντρώσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων, μείωση του αριθμού των κυττάρων (D, ΣΤ οι παράλληλες γραμμές υποδεικνύουν την περιτραυματική περιοχή 12 ώρες μετά τον τραυματισμό, έτσι όπως αυτή καθορίστηκε με βάση συνεκτίμηση των ιστολογικών χαρακτηριστικών και το πρότυπο χρωματισμού των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν). Ανάμεσα στα ερυθρά αιμοσφαίρια συχνά εντοπίζονταν κύτταρα με χαρακτηριστική μορφολογία λευκών αιμοσφαιρίων (E).



Εικόνα 2. Η ανοσοϊστοχημική εντόπιση της πρωτεΐνης nNOS ήταν κυτταροπλασματική, σε κύτταρα με παρακτινιστική νευρική μορφολογία (A). Στον υπόκαμπο των ενήλικων, φυσιολογικών ζώων εντοπίζονταν λίγα ανοσοθετικά κύτταρα κυρίως στην OE (B). Ο αριθμός των θετικών κυττάρων αυξάνονταν μετά τον τραυματισμό με μέγιστη αύξηση στις 12 ώρες μετά τη βλάβη τόσο στο τραυματισμένο ημισφαίριο (Δ) όσο και στο αντίπερο (Γ). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η αυξημένη εντόπιση ανοσοθετικών κυττάρων στην υποκοκκιδώδη περιοχή της OE (ανοιχτά βέλη), στην οποία έχει περιγραφεί η παρουσία πρόδρομων νευρικών κυττάρων.

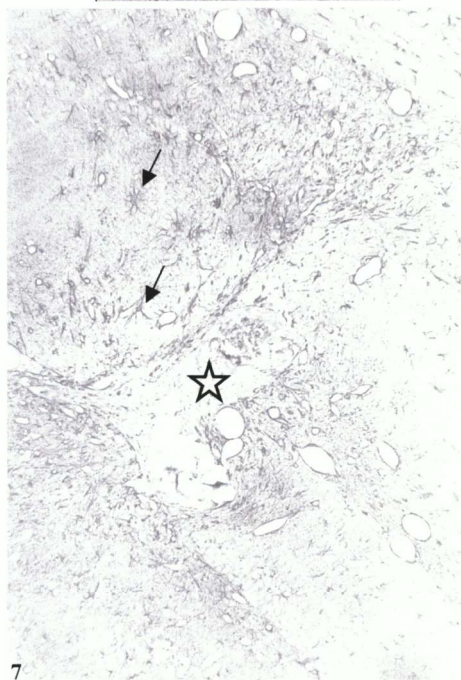
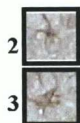
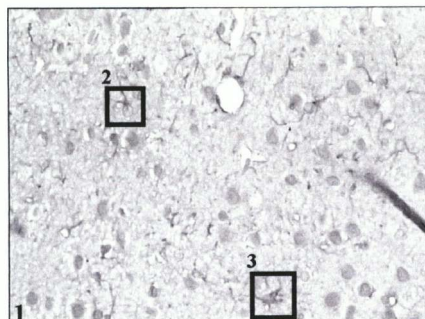


A. ΜΑΡΤΥΡΕΣ

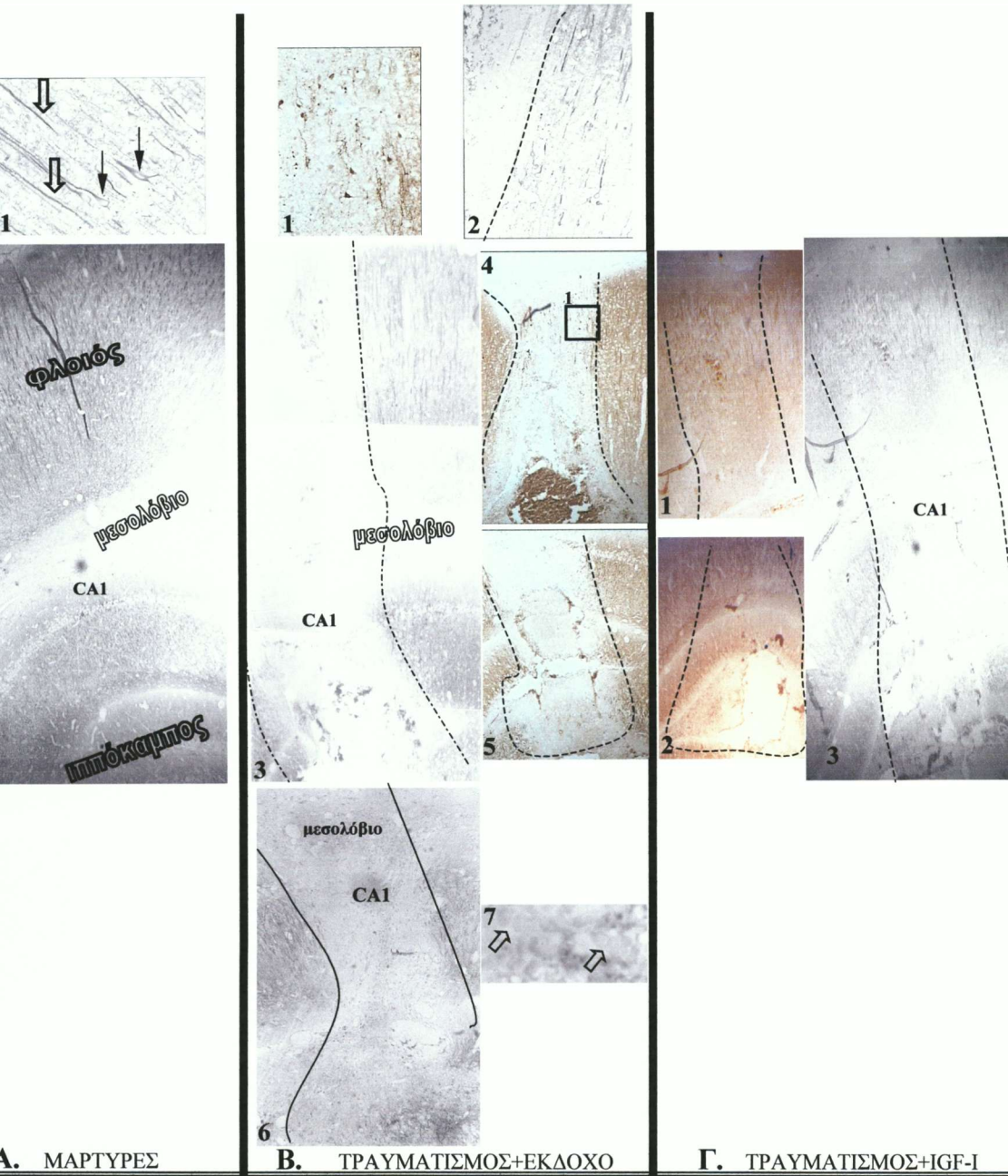
B. ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟΣ+ΕΚΔΟΧΟ

Γ. ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟΣ+IGF-I

Εικόνα 3. Η πρωτεΐνη Hsp70 εντοπίζεται στο ενήλικο φυσιολογικό εγκέφαλο σε σποραδικά κύτταρα στο φλοιό (A 2) καθώς και στο μεσολόβιο (A 3). Ο τραυματισμός (B 1-7) οδηγεί σε σημαντική αύξηση του αριθμού των ανοσοθετικών κυττάρων στην Hsp70 στην περιτραυματική περιοχή 4 (δεδομένα χωρίς εικόνα) και 12 ώρες στο φλοιό (B 1) και τον υπόκαμπο (B 5). Η αύξηση εντοπίζεται κυρίως σε νευρικής μορφολογίας κύτταρα (B 2 και 6 μεγέθυνση από την B 5) και σε κύτταρα με χαρακτηριστική αποπτωτική μορφολογία (B 3). Εκτός της περιτραυματικής περιοχής παραγωγή στην έκφραση της Hsp70 παρατηρείται στο μεσολόβιο, όπου συνεντοπίζεται με φαινόμενα εκφύλισης (ιδιωματώδης μορφή) (B 4). 1 εβδομάδα μετά τον τραυματισμό η αύξηση παραμένει σημαντική (B 7). Η χορήγηση IGF-I οδήγησε σε σημαντική μείωση του αριθμού των ανοσοθετικών κυττάρων στην Hsp70 στην περιτραυματική περιοχή (Γ 1). Το φαινόμενο ήταν πιά έντονο στο φλοιό και στην περιοχή CA1 του υπόκαμπου.



Εικόνα 4. Στον ενήλικο φυσιολογικό εγκέφαλο εμφανίζονται πολυάριθμα ανοσοθετικά στην GFAP κύτταρα (1, 2). Τα θετικά στην GFAP αστρογλοιακά κύτταρα είναι πυκνά τοποθετημένα στα τοιχώματα των κοιλιών καθώς και στην Οδοντωτή Έλικα, στην οποία η στοιβάδα των κοκκιωδών κυττάρων είναι αρνητική, ενώ πολυάριθμα θετικά κύτταρα εντοπίζονται στην υποκοκκιώδη στιβάδα με απολήξεις που εισέρχονται στη στιβάδα των κοκκιωδών κυττάρων (4). Μετά τον τραυματισμό -και έως τις 12 ώρες- ο αριθμός των αστρογλοιακών κυττάρων μειώνεται στην περιτραυματική περιοχή (βέλη στην 5) ενώ εμφανίζονται ορισμένα έντονα ανοσοθετικά κύτταρα, με ευμεγέθη κυτταρικά σώματα και λίγες απολήξεις (τρίγωνα στην 5 και μεγέθυνση στην 6) μία εβδομάδα μετά τη βλάβη έχει σχηματιστεί η αστροκυτταρική ουλή, από τυπικής μορφολογίας αστρογλοιακά κύτταρα (βέλη στην 7). Επιπροσθέτως, τα αστρογλοιακά κύτταρα περιβάλλουν περιοχές ανοσοαρνητικές στην GFAP (αστέρι στην 7), στις οποίες φαίνεται πως συγκεντρώνονται ινοβλάστες και μακροφάγα κύτταρα.



A. ΜΑΡΤΥΡΕΣ

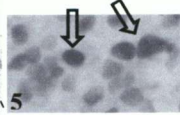
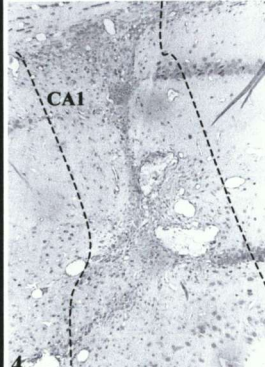
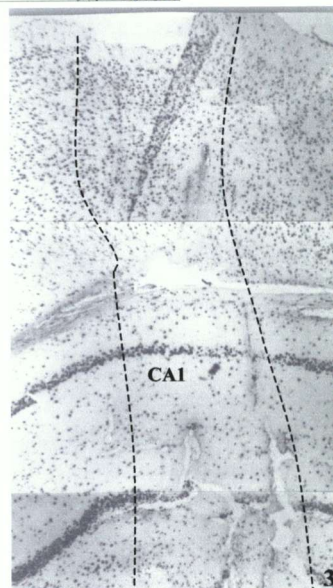
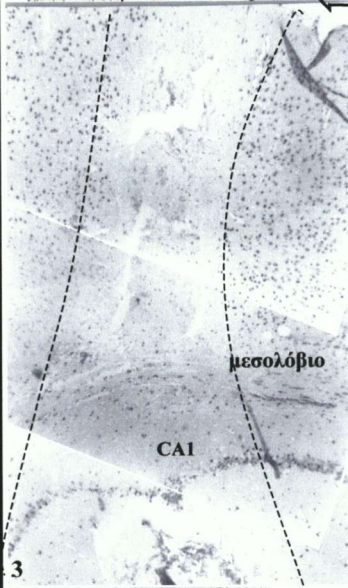
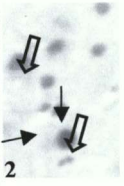
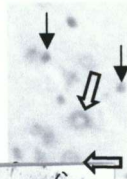
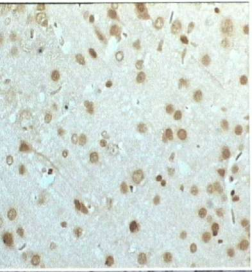
B. ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟΣ+ΕΚΔΟΧΟ

Γ. ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟΣ+IGF-I

ΕΙΚΟΝΑ 5. Ο BDNF εμφανίζει ευρεία εντόπιση στον ενήλικο φυσιολογικό εγκέφαλο (**A 1,2**), τόσο σε κυτταρικά σώματα (βέλη), όσο και σε άξονες (ανοιχτά βέλη). Ο τραυματισμός (**B 1-7**) επιφέρει μείωση της παρουσίας του πεπτιδίου στην περιτραυματική περιοχή (διακεκομμένη γραμμή) 4 ώρες (**B 3**), 12 ώρες (**B 4,5**) και 1 εβδομάδα (**B 6**) μετά. Εξάιρεση αποτελεί η παρατήρηση λίγων ανοσοθετικών κυτταρικών σωμάτων μέσα στην περιτραυματική περιοχή 4 και 12 ώρες μετατραυματικά (**B 1**, μεγέθυνση από **B 4**) και η εμφάνιση του στο παρέγχυμα 1 εβδομάδα μετά (**B 7**, τα ανοιχτά βέλη δείχνουν αρνητικά στο πεπτιδίο κύτταρα). Επίσης, αυξημένη είναι η παρουσία του πεπτιδίου στα όρια της περιτραυματικής περιοχής (**B 2**). Η χορήγηση IGF-I (**Γ 1-3**) οδηγεί σε σημαντική

NT-3

104

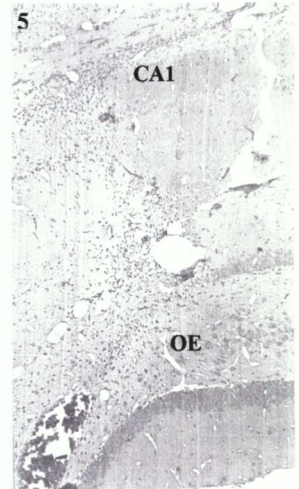
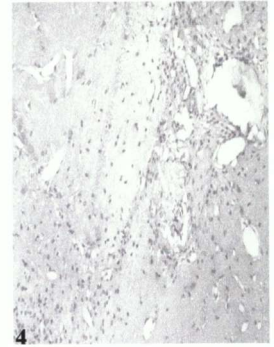
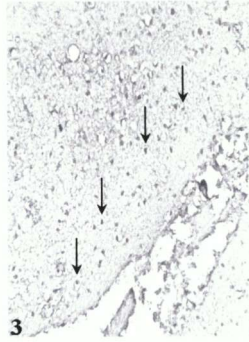
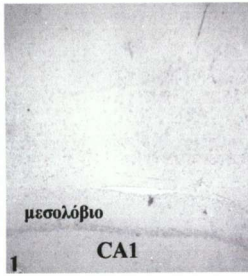


A. ΜΑΡΤΥΡΕΣ

B. ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟΣ+ΕΚΔΟΧΟ

Γ. ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟΣ+IGF-1

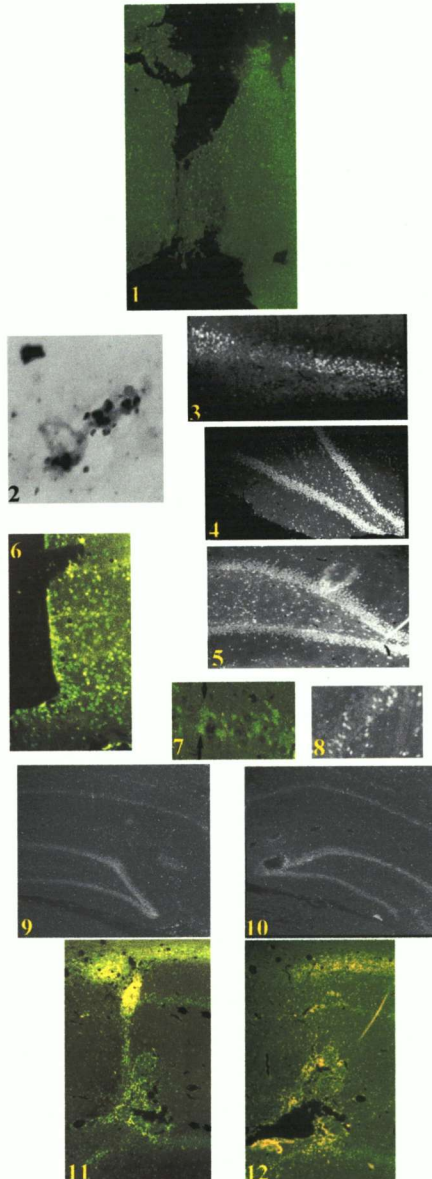
ΕΙΚΟΝΑ 6. Η NT-3 εμφανίζει υψηλή εντόπιση στο φυσιολογικό ενήλικο εγκέφαλο (A 1,2). Ο τραυματισμός (B 1-5) οδήγησε σε σημαντική μείωση του αριθμού των ανοσοθετικών κυττάρων στην περιτραυματική περιοχή (διακεκομμένη γραμμή) τόσο 4 (B 1), όσο και 2 ώρες μετά (B 3). Η έκφραση της NT-3 ήταν έντονη στην επούλωση του τραύματος 1 εβδομάδα μετά (B 4,5 τα ανοιχτά βέλη δείχνουν αμυγδαλωδών θετικά κύτταρα στην ίδια περιοχή που ο BDNF δεν εμφανίζει κυτταρική έκφραση—σύγκριση με εικόνα 4 B 7-). Η χορήγηση του IGF-1 οδήγησε σε σημαντική αναστροφή των συνεπειών του τραύματος (Γ 1,3) καθώς ο αριθμός των θετικών κυττάρων ήταν σε φυσιολογικά επίπεδα. Επιπλέον παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των θετικών στην NT-3 κυττάρων στην περιοχή του θαλάμου, κυρίως λόγω της επαγωγής της έκφρασης του πεπτιδίου σε κυτταρικούς πληθυσμούς στους οποίους δεν εκφραζόταν (σύγκριση B 2 και Γ 2, τα άνοιχτα βέλη υποδεικνύουν κύτταρα θετικά και στις δύο εικόνες ενώ τα ανοιχτά βέλη κύτταρα, διαφορετικού τύπου, θετικά μόνο μετά τη χορήγηση IGF-1).



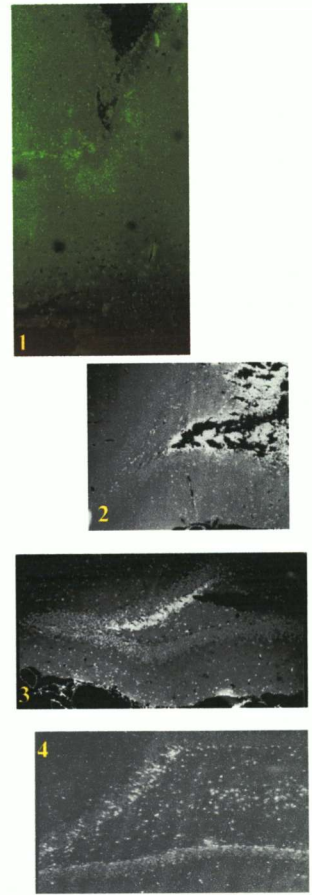
Εικόνα 7. Στον ενήλικο φυσιολογικό εγκέφαλο εντοπίζονται λιγιστά, σποραδικά ανοσοθετικά στον IGF-I κύτταρα τόσο στο φλοιό (1) όσο και στον ιππόκαμπο (2). 4 και 12 (3) ώρες μετά από τον τραυματισμό λιγιστά κύτταρα ανοσοθετικά στον IGF-I εμφανίζονται στο κέντρο της περιτραυματικής περιοχής (βέλη). Η παρουσία του πεπτιδίου του IGF-I είναι σημαντικά αυξημένη 1 εβδομάδα μετά τη βλάβη, μέσα στην περιτραυματική περιοχή, τόσο στο φλοιό (4) όσο και στον ιππόκαμπο (5).



A. ΜΑΡΤΥΡΕΣ



B. ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟΣ+ΕΚΔΟΧΟ



Γ. ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟΣ+IGF-I

Εικόνα 8. Στον ενήλικο φυσιολογικό εγκέφαλο δεν εντοπίζονται πολλά θετικά στην αντίδραση TUNEL κύτταρα (**A 1-2**). Ο τραυματισμός οδήγησε στην αυξημένη εντόπιση θετικών κυττάρων 4 (**B 1,3**) και 12 ώρες (**B 2,4-8**) μετά. Ο αριθμός των κυττάρων ήταν ιδιαίτερα αυξημένος 12 ώρες μετά τη βλάβη, στην OE του υποκόκαμπου (**B 3-5,8**) και στα δύο ημισφαίρια. Μία ακόμη περιοχή με αυξημένη παρουσία θετικών κυττάρων ήταν οι παρακοιλιακοί πυρήνες (**B 6**). Τα θετικά κύτταρα καταμετρούνταν σε συνδυασμό με μορφολογικά χαρακτηριστικά από χρώση της αντίδρασης TUNEL με τη μέθοδο της υπεροξειδάσης (**B 2**). Πολλές φορές ήταν δυνατή η αναγνώριση νευρικής μορφολογίας στα θετικά κύτταρα χάρη στην ανατομική θέση τους και το σχήμα τους (**B 7**: πυραμιδικά κύτταρα της περιοχής CA1, **B 8**: κωνοειδή κύτταρα της OE). 1 εβδομάδα μετά τον τραυματισμό η παρουσία θετικών κυττάρων ήταν εκτεταμένη στην ευρύτερη περιοχή του υποκόκαμπου και του ιππόκαμπου και στα δύο ημισφαίρια (**B 10**: τραυματισμένο ημισφαίριο, **B 9**: αντίπλευρο ημισφαίριο). Έντονη ήταν η εντόπιση θετικών κυττάρων και στο ίχνος του τραύματος, στην επισούληση του ιστού (**B 11,12**: ιππόκαμπος). Η χορήγηση IGF-I οδήγησε σε σημαντική μείωση του αριθμού των αποπτωτικών κυττάρων στο φλοιό (**Γ 1**) και κυρίως στην OE (**Γ 2-4**) μόνο του τραυματισμένου ημισφαρίου.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ.

Η απόκριση του ιστού μέχρι και τις πρώτες 48 ώρες μετά τον τραυματισμό.

Κανένα από τα πειραματόζωα ($n=30$) δεν πέθανε τις πρώτες 48 ώρες μετά τον τραυματισμό και όλα παρουσίασαν πλήρη ανάνηψη από την αναισθησία και την εγχείρηση, χωρίς εμφανείς κινητικές δυσκολίες. Η ιστολογική εικόνα του εγκεφαλικού ιστού τις πρώτες δύο ημέρες μετά τον τραυματισμό ήταν σε μεγάλο βαθμό όμοια με την εικόνα του κωνικού τούνελ η οποία χαρακτηρίζει τις ΚΕΚ από τη διεύδυση ξένου σώματος, τύπου πυροβόλου όπλου, στον άνθρωπο (Κάζδαγλης 1996). Το κέντρο της περιτραυματικής περιοχής χαρακτηριζόταν από τη συγκέντρωση ερυθρών αιμοσφαιρίων και κατεστραμμένου ιστού. Έντονη ήταν επίσης η παρουσία ενδοκοιλιακών αιμορραγιών, αρχικά στη ραχιαία περιοχή της τρίτης κοιλίας (χρονικό σημείο των 4 ωρών) και στη συνέχεια κατά μήκος του μεσολόβιου και στις πλάγιες κοιλίες.

Σαφής ήταν η εμφάνιση πολυάριθμων κυττάρων ανοσοθετικών στην πρωτεΐνη Hsp70 σε όλη την έκταση της περιτραυματικής περιοχής. Ο αριθμός τους ήταν αυξημένος στις 12 ώρες σε σχέση με τις 4, φαινόμενο το οποίο είναι σε συμφωνία με άλλα πειραματικά δεδομένα. Έχει βρεθεί πως το γονίδιο της Hsp70 αρχίζει να εκφράζεται πολύ γρήγορα μετά από εγκεφαλικό τραυματισμό, ήδη από τα 30 πρώτα λεπτά (Truettner et al. 1999), και για χρονικό διάστημα το οποίο μπορεί να φτάσει τις 3 ημέρες (Yamashita et al. 1996). Αντίστοιχα, αλλά με μικρή χρονική υστέρηση, παρατηρείται έναρξη της σύνθεσης της Hsp70 η οποία φτάνει στο μέγιστο βαθμό στο χρονικό διάστημα από τις 12 έως τις 20 ώρες (Hoshino et al. 1995, Dutcher et al. 1998). Η παρουσία της Hsp70 θεωρείται πως χαρακτηρίζει κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση stress (Motte et al. 1998, Sharp et al. 1999) και εξαπλώνεται στην περιοχή στην οποία αναμένεται η κύρια εντόπιση νεκρωτικών και αποπτωτικών κυττάρων και γενικότερα εκφυλιστικών φαινομένων (Brown 1990, Plumier et al. 1997, Kubo et al. 1998). Η υπόθεση αυτή φαίνεται να επιβεβαιώνεται στα πειράματά μας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτέλεσε η αύξηση του αριθμού των θετικών στην Hsp70 κυττάρων κατά μήκος του μεσολόβιου ανάλογα με την ένταση των φαινομένων εκφυλισμού του. Το μεσολόβιο είναι μία δομή στην οποία εκφράζεται φυσιολογικά σε χαμηλά επίπεδα η Hsp70 (Freedman et al. 1992) και η οποία είναι ιδιαίτερα εύλωτη στους τραυματισμούς (McIntosh et al. 1996, Christiaens and Blond 1998). Στα πειράματά μας το τραυματισμένο μεσολόβιο εμφάνιζε έντονα σημεία εκφύλισης (οιδηματώδης και σπογγώδης μορφολογία) ήδη από τις πρώτες 4 μετα-τραυματικές ώρες, τα οποία με την πάροδο του χρόνου επεκτάθηκαν και στο αντίπλευρο ημισφαίριο. Αντίστοιχα, 4 ώρες μετά τον τραυματισμό αυξημένος ήταν ο αριθμός των θετικών στην Hsp70 κυττάρων στο τραυματισμένο μεσολόβιο και στη συνέχεια, στις 12 ώρες, παρατηρήθηκε εξάπλωση της παρουσίας της πρωτεΐνης στο αντίπλευρο ημισφαίριο. Επιπροσθέτως, θετικά στην Hsp70 κύτταρα παρατηρήθηκαν 4 και 12 ώρες μετά τον τραυματισμό στην περιοχή του αποιειδούς φλοιού του

τραυματισμένου ημισφαιρίου καθώς και στους παρακοιλιακούς υποθαλαμικούς πυρήνες και στην περιοχή του κοκκιάδους φλοιού πίσω από το σπλήνιο του μεσολόβιου και στα δύο ημισφαίρια. Ο αποειδής φλοιός είναι μία περιοχή για την οποία έχει αναφερθεί αυξημένη έκφραση του γονιδίου της Hsp70 μετά από επιληπτική κρίση -με αρχική εστία τον υπόκαμπο- χωρίς όμως να συνδυάζεται με αυξημένη σύνθεση του πεπτιδίου (Baille-Le Crom et al. 1996, Motte et al. 1998). Με εξαίρεση το μεσολόβιο, στις περιοχές στις οποίες η παρουσία της Hsp70 ήταν αυξημένη μετά τον τραυματισμό (περιτραυματική περιοχή, αποειδής φλοιός, παρακοιλιακοί πυρήνες) παρατηρήθηκε ισχυρή εντόπιση του φαινομένου της απόπτωσης και αύξηση της ανοσοεντόπισης των νευροτροφινών BDNF και NT-3 στο χρονικό σημείο των 12 ωρών.

Ακόμα πάντως, δεν είναι ξεκάθαρο εάν η παρουσία της Hsp70 χαρακτηρίζει κύτταρα ανθεκτικά στον τραυματισμό (Kinouchi et al. 1993, Li et al. 1993, Ikeda et al. 1994, Rajdev and Sharp 2000) ή κύτταρα τα οποία δεν πρόκειται να επιβιώσουν (Passarelli et al. 1994, Soriano et al. 1995, Massa et al. 1996). Σύμφωνα με την πιο πρόσφατα διατυπωμένη θεωρία η ενεργοποίηση του γονιδίου της Hsp70 και η αυξημένη παρουσία του mRNA του -που επάγεται κυρίως από την παρουσία αποδιαταγμένων πρωτεϊνών (Sharp et al. 1999)- εντάσσεται στην προσπάθεια του κυττάρου να αντιμετωπίσει το stress. Τα κύτταρα στα οποία το mRNA μεταφράζεται θεωρείται πως έχουν τη δυνατότητα να επιβιώσουν. Αντιθέτως, όταν η σύνθεση της Hsp70 δεν είναι δυνατή θεωρείται πως τα κύτταρα δεν έχουν προοπτική επιβίωσης (Nowak et al. 1993, Massa et al. 1996, Planas et al. 1997). Πρέπει πάντως να σημειωθεί πως ορισμένα από τα νευρικά κύτταρα της περιτραυματικής περιοχής τα οποία ήταν θετικά στην Hsp70 αλλά και στις νευροτροφίνες BDNF και NT-3, είχαν μορφολογία κυττάρων που έχουν εισέλθει στη διαδικασία του κυτταρικού θανάτου (συμπυκνωμένο κυτταρόπλασμα, τριγωνικό σχήμα) και δεν παρατηρούνταν στην περιτραυματική περιοχή μία εβδομάδα μετά τον τραυματισμό.

Μέσα στις πρώτες 48 ώρες μετά τον τραυματισμό, τα πειράματά μας αποκάλυψαν μία παροδική αύξηση του αριθμού των ανοσοθετικών στη nNOS κυττάρων, στην περιτραυματική περιοχή του φλοιού και στους υπόκαμπους και των δύο ημισφαιρίων. Η αύξηση αυτή ήταν μέγιστη στις παραπάνω δομές στις 12 ώρες και είχε εξαφανισθεί στις 48. Οι μελέτες της έκφρασης της nNOS μετά από μηχανικό τραυματισμό του εγκεφάλου δεν είναι πολλές αλλά σε μεγάλο βαθμό συμβαδίζουν με τα αποτελέσματά μας. Οι Rao et al. (1999) και Park and Yi (2001) εντόπισαν αύξηση του αριθμού των θετικών στη nNOS κυττάρων στο φλοιό παροδικά από τις 3 ώρες έως τις 48, με μέγιστη αύξηση στις 12 ώρες. Και οι δύο αυτές ομάδες εφήρμοσαν μοντέλα διάχυτου τραυματισμού του φλοιού, στα οποία η αύξηση των επιπέδων της nNOS ήταν ταυτόσημη και στα δύο ημισφαίρια. Η μόνη ομάδα που μελέτησε την έκφραση της NOS ειδικά στον υπόκαμπο μετά από χειρουργικό τραυματισμό ήταν αυτή των Stojkovic et al. (1998). Στη συγκεκριμένη εργασία το πρώτο χρονικό σημείο το οποίο μελετήθηκε και στο οποίο αναφέρεται αύξηση μόνο στον τραυματισμένο υπόκαμπο, ήταν οι 48 ώρες μετά τον τραυματισμό. Επειδή

όμως χρησιμοποιήθηκε ιστοχημική χρώση για την εντόπιση της NADPH διαφοράσης και όχι άμεση ανοσοεντόπιση της pNOS η ακριβής σύγκριση των αποτελεσμάτων δεν είναι δυνατή. Τέλος, οι Zhang et al. (1994) ανέφεραν αύξηση της pNOS στο τραυματισμένο ραβδωτό σώμα μετά από ισχαιμία, με μέγιστη ένταση του φαινομένου στην χρονική περίοδο από τις 2 έως τις 48 ώρες. Συνεπώς η εργασία μας αποτελεί ουσιαστικά την πρώτη λεπτομερή μελέτη της ανοσοεντόπισης της pNOS μετά από μηχανικό εστιασμένο τραυματισμό του εγκεφάλου. Η αύξηση των επιπέδων της pNOS στην περιτραυματική περιοχή ήταν μάλλον αναμενόμενη, εφόσον τα ιόντα ασβεστίου και η ενεργοποίηση των υποδοχέων του γλουταμικού τύπου NMDA αποτελούν κύριες οδούς επαγωγής της έκφρασης του γονιδίου της pNOS (Baader and Schilling 1996). Η έντονη όμως αύξηση του αριθμού των ανοσοθετικών κυττάρων στον αντίπλευρο ιπλόκαμπο και ιδίως στην ΟΕ είναι ένα καινούριο ενδιαφέρον στοιχείο και αποτελεί ένα ακόμη παράδειγμα «μεταφοράς» των συνεπειών του τραύματος σε δομές που δεν είναι σε άμεση ανατομική συνάφεια.

Η περιτραυματική περιοχή χαρακτηριζόταν από την εντόπιση μεγάλου αριθμού θετικών στην αντίδραση TUNEL κυττάρων τις πρώτες 48 ώρες μετά τον τραυματισμό. Ο αριθμός των θετικών κυττάρων καθώς και η περιοχή εντόπισής τους αυξανόταν σταδιακά από τις 4 στις 12 ώρες. Το φαινόμενο του κυτταρικού θανάτου έχει μελετηθεί από πολλές ομάδες και σε διάφορα μοντέλα εγκεφαλικού τραυματισμού. Η μελέτη της βιβλιογραφίας αποκαλύπτει πως το βραχύτερο χρονικό σημείο μετά από τραυματισμό του εγκεφάλου στο οποίο αναφέρεται εντόπιση αποπτωτικών κυττάρων είναι οι 12 ώρες (Kharlamov et al. 1996, Conti et al. 1998) και αφορά το φλοιό, τον ιπλόκαμπο και δομές της λευκής ουσίας. Οι περισσότερες εργασίες προσδιορίζουν ως χρόνο μέγιστης εμφάνισης του ΠΚΘ τις 24 ώρες (Colicos and Dash 1996, Conti et al. 1998, Pohl et al. 1999) ή τις 48 ώρες (Rink et al. 1995, Hughes et al. 1996) σε μετρήσεις που εστιάζονται κυρίως στο φλοιό και σε μοντέλα διάχυτου εγκεφαλικού τραυματισμού. Το χρονικό σημείο των 4 ωρών είτε δεν αναφέρεται –πιθανώς διότι δεν εντοπίστηκε το φαινόμενο του ΠΚΘ- είτε αναφέρεται ως αρνητικό στην παρουσία αποπτωτικών κυττάρων (Portera-Cailliau et al. 1995). Συνεπώς η εντόπιση στα πειράματά μας πολυάριθμων θετικών στην αντίδραση TUNEL κυττάρων 4 ώρες μετά τον τραυματισμό είναι ένα ασυνήθιστο εύρημα, το οποίο ίσως υπογραμμίζει τις ιδιαιτερότητες των διεισδυτικών τραυματισμών. Η αυξημένη παρουσία αποπτωτικών κυττάρων στις 12 ώρες συμβαδίζει με τη βιβλιογραφία, ενδιαφέρον όμως παρουσιάζει η εντόπιση τέτοιων κυττάρων στο αντίπλευρο ημισφαίριο (στην ΟΕ) και σε δομές του τραυματισμένου ημισφαιρίου αρκετά απομακρυσμένες από το τραύμα (απιοειδής φλοιός και παρακοιλιακοί υποθαλαμικοί πυρήνες). Στις περισσότερες εργασίες το φαινόμενο του ΠΚΘ δε βρέθηκε να εξαπλώνεται μακριά από την ευρύτερη περιτραυματική περιοχή (Colicos and Dash 1996, Hughes et al. 1996, Kharlamov et al. 1996, Pohl et al. 1999), τουλάχιστον τις πρώτες 48 ώρες μετά τον τραυματισμό.

Κύριο χαρακτηριστικό της περιτραυματικής περιοχής τις πρώτες 12 μετα-τραυματικές ώρες ήταν η δραματική μείωση των θετικών στον BDNF

νευρικών ινών και σωμάτων στο φλοιό και στον ιππόκαμπο. Αντιθέτως, αυξημένη ήταν η παρουσία της πρωτεΐνης σε ίνες και κυρίως νευρικά σώματα στην παράπλευρη περιοχή ενώ λιγοστά ανοσοθετικά κυτταρικά σώματα εμφανίστηκαν στον απιοειδή φλοιό του τραυματισμένου ημισφαιρίου. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με αυτά άλλων ερευνητικών ομάδων στα οποία εμφανίζεται αύξηση, κυρίως στο επίπεδο του mRNA, μετά από αντίστοιχους και άλλων τύπων τραυματισμούς στην ευρύτερη περιτραυματική περιοχή (Ballarin et al. 1991, Hughes et al. 1993) και μείωση στην εστία της βλάβης (Kokaia et al. 1995, Hughes et al. 1999). Υπάρχουν όμως και αναφορές αύξησης του BDNF ακόμη και σε κύτταρα στο κέντρο της περιτραυματικής περιοχής (Wong et al. 1997). Παρόλα αυτά οι εργασίες που αναφέρονται στην έκφραση του πεπτιδίου είναι λίγες και σε καμία από αυτές δεν περιγράφεται τέτοιας έντασης μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης του BDNF στην περιτραυματική περιοχή. Πρέπει πάντως να τονιστεί πως ο ορισμός της περιτραυματικής περιοχής, του κέντρου της και των παράπλευρων περιοχών είναι σε μεγάλο βαθμό αυθαίρετος, γεγονός που δεν επιτρέπει την ακριβή σύγκριση των αποτελεσμάτων. Ακόμη, όσον αφορά τη σύνδεση των επιπέδων του mRNA του BDNF και του παραγόμενου πεπτιδίου του, οι Humpel et al. (1993) έδειξαν πως σε ένα μοντέλο επιληπτικών κρίσεων προκαλούμενων από χορήγηση pentylentetrazole, η αύξηση της σύνθεσης του mRNA συνδυαζόταν από ταυτόχρονη μείωση της ανοσοεντόπισης του πεπτιδίου, πιθανώς λόγω αυξημένης απελευθέρωσής του από τα κύτταρα.

Είναι γνωστό πως ο BDNF μεταφέρεται ενδοκυτταρικά τόσο ορθοδρομικά όσο και αντιδρομικά (Mufson et al. 1999). Επίσης, υπάρχουν πειραματικά δεδομένα τα οποία δείχνουν πως η αξονότμηση οδηγεί σε ορισμένους νευρικούς άξονες στην αύξηση της ορθοδρομικής μεταφοράς (Tonra et al. 1998) και σε άλλους της αντιδρομικής (Curtis et al. 1998). Η έντονη παρουσία της πρωτεΐνης, παραπλεύρως της περιτραυματικής περιοχής, και κυρίως σε κυτταρικά σώματα, μπορεί να οφείλεται στην αύξηση, είτε της αντιδρομικής μεταφοράς της νευροτροφίνης από την περιτραυματική περιοχή, είτε της τοπικής σύνθεσής της. Ορισμένοι από τους άξονες της περιτραυματικής περιοχής πιθανώς «ανήκουν» σε νευρώνες της παράπλευρης περιοχής. Η ταχεία μείωση του BDNF στην περιτραυματική περιοχή επομένως υποδεικνύει μία διαδικασία απομάκρυνσής του μέσω αντιδρομικής μεταφοράς του από τους τραυματισμένους νευράξονες προς τα παράπλευρα κυτταρικά σώματα. Είναι γνωστό εξάλλου πως ο BDNF διαθέτει νευροπροστατευτικές ιδιότητες οι οποίες εξαρτώνται από τη δράση του στη περιοχή του σώματος και του πυρήνα (Altar and DiStefano 1998, Reynolds et al. 2000). Μία δεύτερη πιθανότητα είναι ο τραυματισμός των αξόνων να οδήγησε στην αύξηση της ορθοδρομικής μεταφοράς του BDNF και στη συγκέντρωσή του στις απολήξεις. Στη συνέχεια μπορεί να ακολούθησε η αυξημένη απελευθέρωσή του –πιθανώς και λόγω της αυξημένης ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου- και τελικά η μαζική πρόσληψή του από προσυναπτικά στοιχεία των άθικτων νευρώνων της παράπλευρης στην περιτραυματική περιοχή. Από την άλλη μεριά, η γνωστή από άλλα μοντέλα τραυματισμού αύξηση του mRNA του BDNF στην ευρεία περιτραυματική περιοχή οδηγεί στην υπόθεση πως η

παρουσία των έντονα ανοσοθετικών κυτταρικών σωμάτων και ινών παραπλευρώς της περιτραυματικής περιοχής οφείλεται στην αύξηση της παραγωγής του BDNF σε αυτά τα κύτταρα, επίσης στα πλαίσια μίας αντιρροπιστικής νευροπροστατευτικής απόκρισης του ιστού. Εξάλλου υπάρχουν πειραματικά δεδομένα που αποδεικνύουν πως η είσοδος ιόντων ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα επάγει την έκφραση του BDNF (Lipton and Kalil 1995). Στην ευρύτερη περιοχή του τραυματισμού υπάρχει σαφής αύξηση της εισόδου ιόντων ασβεστίου στα κύτταρα, κυρίως λόγω της αυξημένης παρουσίας γλουταμικού στον εξωκυττάριο χώρο (Palmer et al. 1993). Οι Kokaiia et al. (1995), μελετώντας ένα μοντέλο ισχαιμίας, παρατήρησαν και αυτοί σημαντική αύξηση του mRNA του BDNF σε κύτταρα έξω από την ευρύτερη ισχαιμική περιοχή και σε λιγιστά κύτταρα στον πυρήνα της. Διατύπωσαν μάλιστα τη θεωρία πως η επαγωγή του γονιδίου του BDNF στις όμορες περιοχές οφείλεται σε ένα φαινόμενο εξαπλούμενης καταστολής (spreading depression), το οποίο οφείλεται κυρίως στην ενεργοποίηση υποδοχέων του γλουταμικού τύπου NMDA. Οι D'Ambrosio et al. (1998) απέδειξαν πως μετά από διάχυτο τραυματισμό του φλοιού, το φαινόμενο της μακροχρόνιας καταστολής των συνάψεων (LTD) στον ιππόκαμπο δεν αναστέλλεται αλλά αντιθέτως πιθανώς και να ενισχύεται, σε αντίθεση με το φαινόμενο της μακροχρόνιας ενδυνάμωσης των συνάψεων (LTP).

Σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρήθηκε έντονη παρουσία BDNF σε λιγιστά κύτταρα στην εστία της βλάβης. Η μορφολογία των σωμάτων των συγκεκριμένων κυττάρων θύμιζε κύτταρα που έχουν εισέλθει στη διαδικασία κυτταρικού θανάτου, καθώς εμφανίζονταν συρρικνωμένα σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά. Η εντόπιση σε αντίστοιχης μορφολογίας κύτταρα, στις ίδιες περίπου θέσεις και σε διαδοχικές τομές, της νεοσυνθεμένης πρωτεΐνης Hsp70 υποδεικνύει πως αυτά εξακολουθούσαν να διαθέτουν τη δυνατότητα πρωτεϊνοσύνθεσης και συνεπώς παραγωγής BDNF. Είναι γνωστό πως η εισροή υψηλών ποσοτήτων ιόντων ασβεστίου στο κύτταρο, όπως πιθανώς συμβαίνει στο κέντρο του τραυματισμού στον οποίον εντοπίζεται τεράστια συγκέντρωση εξωκυττάριου γλουταμικού, είναι δυνατόν να οδηγήσει στην υπερέκφραση του BDNF (Ebadí et al. 1997). Ο νεοσυνθεθείς BDNF, με τη σειρά του, επάγει την περαιτέρω είσοδο ιόντων ασβεστίου στο κύτταρο (Lipton and Kalil 1995), με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός φαινομένου θετικής ανατροφοδότησης το οποίο έχει νευροτοξικά αποτελέσματα. Ο παραπάνω μηχανισμός σε συνδυασμό με τη μορφολογία των κυττάρων αυτών αποτελούν μία πιθανή εξήγηση για την απουσία των αντίστοιχων κυττάρων μία εβδομάδα μετά τον τραυματισμό. Δεν αποκλείεται όμως και η πιθανότητα η έντονη συγκέντρωση του BDNF στο κυτταρικό σώμα να είναι αποτέλεσμα της αυξημένης αντιδρομικής μεταφοράς του από τις τραυματισμένες νευρικές ίνες στο σώμα.

Επιπροσθέτως, πολύ λίγα από τα θετικά στον BDNF κύτταρα της περιτραυματικής περιοχής και κυρίως στη στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων του ιππόκαμπου, ήταν αστρογλοιακά καθώς ήταν θετικά και για την πρωτεΐνη GFAP. Η παρατήρηση αυτή συμβαδίζει με δεδομένα σύμφωνα με τα οποία τα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα μπορεί να εκφράζουν και νευροτροφικούς

παράγοντες (Ridet et al. 1997). Επίσης, οι Daugherty et al. (2000) βρήκαν πως τα ενεργοποιημένα αστρογλοιακά κύτταρα προσλαμβάνουν τον BDNF από το μεσοκυττάριο χώρο και υπέθεσαν πως το φαινόμενο αυτό έχει αρνητικές συνέπειες για τον ιστό. Ίσως μάλιστα σε αυτό να οφείλεται ως ένα βαθμό η μείωση της παρουσίας του BDNF στην περιτραυματική περιοχή.

Όσον αφορά τη νευροτροφίνη NT-3, μέχρι και το χρονικό σημείο των 12 ωρών η παρουσία της βρέθηκε επίσης δραματικά μειωμένη σε όλο το εύρος της περιτραυματικής περιοχής, καθώς και στους οπίσθιους και μεσαίους ηνιακούς πυρήνες του θαλάμου. Μόνο στον απιοειδή φλοιό του τραυματισμένου ημισφαιρίου παρατηρήθηκε αύξηση των ανοσοθετικών στη NT-3 κυττάρων. Τα αποτελέσματά μας έρχονται σε αντίθεση με άλλες μελέτες στις οποίες δεν αναφέρονται σημαντικές μεταβολές στην έκφραση της NT-3, κυρίως στο επίπεδο του mRNA, μετά από τραυματισμό του εγκεφάλου (Scarlsbrick et al. 1999, Yrek and Fletcher-Turner 2001). Η εργασία μας αποτελεί την πρώτη αναφορά σημαντικής μείωσης της παρουσίας του πεπτιδίου της NT-3 μετά από τραυματισμό και ίσως το στοιχείο αυτό αναδεικνύει εντονότερα τις ιδιαιτερότητες των διεισδυτικών εγκεφαλικών τραυματισμών. Πρέπει να σημειωθεί πως και η NT-3 μεταφέρεται τόσο αντιδρομικά όσο και ορθοδρομικά στα νευρικά κύτταρα, αν και δεν υπάρχουν δεδομένα για πιθανή μεταβολή των φαινομένων αυτών μετά από τραυματισμό.

Στην περιτραυματική περιοχή, τόσο στις 4 όσο και στις 12 ώρες μετά τον τραυματισμό, η ανοσοεντόπιση του αυξητικού παράγοντα IGF-I ήταν περιορισμένη. Λίγα έντονα ανοσοθετικά κύτταρα ήταν ορατά σχεδόν στο κέντρο της περιτραυματικής περιοχής κυρίως στο φλοιό. Καθώς όμως η παρουσία του IGF-I στα ζώα μάρτυρες αλλά και στα μη τραυματισμένα ημισφαίρια ήταν σχεδόν ανύπαρκτη, τα λιγοστά αυτά κύτταρα μπορούν να θεωρηθούν ως μέρος της απόκρισης του εγκεφάλου στο τραύμα. Τα αποτελέσματά μας είναι σύμφωνα με την εργασία των Hughes et al. (1999), στην οποία αναφέρεται πολύ ασθενής επαγωγή της έκφρασης του IGF-I μέχρι και 5 ώρες μετά από τραυματισμό. Επιπροσθέτως, η συγκεκριμένη ομάδα έδειξε πως ο επαγόμενος IGF-I είναι της μορφής Ea η οποία συνδέεται με την αυτοκρινή/παρακρινή λειτουργία του, στοιχείο που υποδηλώνει πως η σύνθεσή του εντάσσεται στην προσπάθεια του εγκεφαλικού ιστού να αντιμετωπίσει τον τραυματισμό.

Τέλος, η ανοσοϊστοχημική μελέτη της πρωτεΐνης GFAP ανέδειξε την ύπαρξη λίγων ανοσοθετικών κυττάρων στην περιτραυματική περιοχή τα οποία δεν είχαν τη χαρακτηριστική αστρογλοιακή μορφολογία. Ήταν κύτταρα με μεγάλο μέγεθος, χωρίς πολλές αποφυάδες και έντονη χρώση. Η περιγραφή τους ταιριάζει με αυτήν των ενεργοποιημένων, ευτροφικών αστρογλοιακών κυττάρων. Τα αστρογλοιακά κύτταρα έχει βρεθεί να εισέρχονται σε μία διαδικασία ενεργοποίησης γρήγορα μετά τον τραυματισμό (Mucke et al. 1991, Yamashita et al. 1996), στα πλαίσια της οποίας συνθέτουν ποικίλα μόρια, συμπεριλαμβανομένων των νευροτροφινών (Ridet et al. 1997).

Ένα πολύ ενδιαφέρον φαινόμενο το οποίο παρατηρήθηκε στα πειράματά μας ήταν η αύξηση της παρουσίας ορισμένων από τις πρωτεΐνες που μελετήσαμε (Hsp70, nNOS, BDNF, NT-3) καθώς και του φαινομένου του

ΠΚΘ σε δομές λιγότερο ή περισσότερο απομακρυσμένες από την περιτραυματική περιοχή. Σχεδόν για όλους τους παράγοντες αυτούς, το συγκεκριμένο φαινόμενο δε φαίνεται να αναφέρεται από άλλες ερευνητικές ομάδες. Οι περιοχές στις οποίες βρέθηκε να «μεταφέρονται» οι συνέπειες του τραυματισμού ήταν ο αντίπλευρος ιππόκαμπος και κυρίως η ΟΕ, ο αποειδής φλοιός του τραυματισμένου ημισφαιρίου και οι παρακοιλιακοί υποθαλαμικοί πυρήνες.

Θα μπορούσαν να προταθούν τρεις υποθέσεις για την εξήγηση του φαινομένου της «ενεργοποίησης» περιοχών απομακρυσμένων από τον τραυματισμό: α) η ενεργοποίηση συγκεκριμένων νευρικών κυκλωμάτων, β) η δράση μορίων σινιάλων και γ) η μεταφορά των πρωτεϊνών από την περιοχή του τραύματος στις απομακρυσμένες αυτές δομές τουλάχιστον για τις περιπτώσεις που η «ενεργοποίηση» των περιοχών αυτών χαρακτηρίστηκε από την αύξηση της παρουσίας των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν. Πιο αναλυτικά:

α) Είναι σαφές πως ο τραυματισμός του εγκεφαλικού ιστού επιφέρει σημαντική τοπική διατάραξη στην εξωκυτάρια παρουσία νευροδιαβιβαστών και ιόντων (McIntosh et al. 1996). Το γεγονός αυτό είναι δυνατόν να επιφέρει την αυτόματη ενεργοποίηση ορισμένων νευρικών κυκλωμάτων (για παράδειγμα γλουταμινεργικών). Επίσης, η καταστροφή συγκεκριμένων νευρώνων αλλά και νευρικών αξόνων μέσα στην περιτραυματική περιοχή προκαλεί την αλλοίωση των απαγωγών και προσαγωγών ρδών δομών οι οποίες βρίσκονται μακριά από τη θέση του τραύματος, αλλά σε λειτουργική σύνδεση με αυτήν. Για παράδειγμα, η πιθανή καταστροφή των διεγερτικών εισόδων σε μία δομή μπορεί να οδηγήσει στην υπερίσχυση των τοπικών ανασταλτικών κυκλωμάτων, γεγονός το οποίο μπορεί να επηρεάσει την έκφραση ποικίλων γονιδίων, όπως του ρυθμιζόμενου από τη νευρική δραστηριότητα γονιδίου του BDNF (Lauterborn et al. 2000). Με βάση τα πειράματά μας η υπόθεση της ενεργοποίησης από τον τραυματισμό δομών ανατομικά απομακρυσμένων από την περιτραυματική περιοχή, αλλά σε πιθανή στενή λειτουργική σύνδεση με αυτήν, μπορεί να στηριχθεί κυρίως στην περίπτωση του φαινομένου της επέκτασης της παρουσίας της nNOS στον ιππόκαμπο. Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων στη nNOS αυξήθηκε σχεδόν ταυτόχρονα στην αντίπλευρη ΟΕ και στις CA1 και CA2 περιοχές του τραυματισμένου ιππόκαμπου. Δηλαδή βρέθηκαν να επηρεάζονται με τον ίδιο τρόπο αφενός μία περιοχή ανατομικά απομακρυσμένη από την ΟΕ του τραυματισμένου ιππόκαμπου -αλλά σε άμεση λειτουργική σύνδεση μέσω του συνδέσμου των ιππόκαμπου- και περιοχές που βρίσκονταν σε άμεση συνάφεια με τον τραυματισμό. Το ίδιο φαινόμενο καταγράφηκε και όσον αφορά την εξέλιξη του φαινομένου του ΠΚΘ. Η παρουσία θετικών κυττάρων στην αντίδραση TUNEL επεκτάθηκε ταυτόχρονα στην αντίπλευρη ΟΕ και στις όμορες στην περιτραυματική περιοχές του ιππόκαμπου.

Ο αποειδής φλοιός, στον οποίο 12 ώρες μετά τον τραυματισμό παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης των Hsp70, BDNF και NT-3 καθώς και εμφάνιση αποπτωτικών κυττάρων, είναι επίσης μία δομή η οποία συνδέεται λειτουργικά με τον ιππόκαμπο, από τον οποίο δέχεται γλουταμινεργικές νευρικές ίνες (Baillie-Le Crom et al. 1996). Τα δεδομένα από τη δουλειά των

Hughes et al. (1999) έδειξαν πως μετά από μηχανικό τραυματισμό του υπόκαμπου επάγεται στον απιοειδή φλοιό η έκφραση των γονιδίων c-fos και c-jun. Επίσης, φαρμακολογικά προκαλούμενες επιληπτικές κρίσεις με αρχική εστία τον υπόκαμπο επιφέρουν αύξηση της πρωτεΐνης C-FOS στον απιοειδή φλοιό (Baillie-Le Crom et al. 1996, Motte et al. 1998). Τα στοιχεία αυτά υποδηλώνουν πως ο τραυματισμός του υπόκαμπου οδηγεί στην ενεργοποίηση των κυττάρων του απιοειδούς φλοιού, καθώς ειδικά η έκφραση του γονιδίου c-fos θεωρείται ως δείκτης ενεργοποίησης νευρικών κυκλωμάτων (Dragunow and Faull 1989). Επίσης πρέπει να σημειωθεί πως τα προϊόντα των γονιδίων c-fos και c-jun είναι παράγοντες μεταγραφής οι οποίοι είναι δυνατόν με τη σειρά τους να επάγουν την έκφραση πολλών άλλων γονιδίων, όπως για παράδειγμα του BDNF.

β) Η πιθανή δράση μορίων σινιάλων μπορεί να χαρακτηριστεί ως πρωτογενής όταν τα μόρια αυτά παράγονται στην περιτραυματική περιοχή και στη συνέχεια μεταφέρονται στις απομακρυσμένες δομές οδηγώντας στη μεταβολή της έκφρασης συγκεκριμένων παραγόντων. Η αύξηση της παρουσίας των Hsp70, BDNF και NT-3 στον αντίπλευρο υπόκαμπο, στον απιοειδή φλοιό καθώς και στους παρακοιλιακούς υποθαλαμικούς πυρήνες δεν είναι εύκολο να εξηγηθεί από αυτήν την υπόθεση, καθώς δεν είναι γνωστά συγκεκριμένα μόρια σινιάλα τα οποία θα μπορούσαν να οδηγούν στην αυξημένη παραγωγή τους. Η συγκεκριμένη υπόθεση όμως θα μπορούσε να προταθεί για την εμφάνιση του φαινομένου του ΠΚΘ σε απομακρυσμένες δομές εξαιτίας της δράσης, ως μορίου σινιάλου, του NO. Το NO είναι γνωστό πως έχει κυτταροτοξικές ιδιότητες και συνδέεται με την επαγωγή του φαινομένου του ΠΚΘ (Zhang et al. 1995). Καθώς η παρουσία της NOS είναι αυξημένη στην περιτραυματική περιοχή και το NO είναι ένα εύκολα διαχεόμενο μόριο, θα μπορούσε να ευθύνεται για την ταυτόχρονη εξάπλωση του αριθμού των θετικών στην αντίδραση TUNEL κυττάρων στον τραυματισμένο και τον αντίπλευρο υπόκαμπο. Ακόμη όμως και αν το NO δεν είναι το μόριο «μεταφορέας» της βλάβης, θα μπορούσε να δρα δευτερογενώς. Για παράδειγμα η νευρική διέγερση μίας περιοχής μπορεί να οδηγήσει σε σύνθεση NO (Baader and Schilling 1996), δεδομένο το οποίο μπορεί να εξηγήσει την αυξημένη παρουσία της nNOS στον αντίπλευρο υπόκαμπο 12 ώρες μετά τον τραυματισμό. Επίσης, αυξημένη παραγωγή NO από μακροφάγα κύτταρα του αίματος μετά από εγκεφαλικό τραυματισμό έχει περιγραφεί από αρκετές ερευνητικές ομάδες (Clark et al. 1996, Grzybicki et al. 1998). Είναι επομένως πιθανό ο ΠΚΘ στις απομακρυσμένες δομές να οφείλεται στην τοπική δράση «δευτερογενώς» παραγόμενου NO από τα μακροφάγα που μετακινούνται μαζί με το αιμορραγικό ΕΝΥ στις κοιλίες του εγκεφάλου. Το γεγονός μάλιστα πως όλες οι απομακρυσμένες δομές στις οποίες καταγράφηκε μετατραυματική αλλαγή στην έκφραση πρωτεϊνών, βρίσκονται σε επαφή με το σύστημα των κοιλιών (οι δύο υπόκαμποι με την ραχιαία περιοχή της τρίτης κοιλίας, ο απιοειδής φλοιός με την πλάγια κοιλία και οι παρακοιλιακοί υποθαλαμικοί πυρήνες με την τρίτη κοιλία) ενισχύει την παραπάνω πιθανότητα.

γ) Η αυξημένη εντόπιση των νευροτροφινών BDNF και NT-3 12 ώρες μετά τον τραυματισμό είναι δύσκολο να ερμηνευτεί από τις δύο πρώτες

υποθέσεις, καθώς περιορίζεται επιλεκτικά στον απιοειδή φλοιό. Για αυτές τις δύο πρωτεΐνες θα μπορούσε να διατυπωθεί η υπόθεση της μεταφοράς τους απευθείας από την περιτραυματική περιοχή. Η υπόθεση αυτή μπορεί να στηριχτεί στο δεδομένο της δυνατότητας αντιδρομικής μεταφοράς τους (Altar and DiStefano 1998), διαδικασία η οποία είναι ίσως και αυξημένη λόγω του τραυματισμού (Curtis et al. 1998). Επιπροσθέτως, οι Mufson et al. (1999) έδειξαν πως οι BDNF και NT-3, όταν χορηγηθούν ενδοκρανιακά με ένεση στην περιοχή του ιππόκαμπου και του υπερκείμενου φλοιού, προσλαμβάνονται από προσυναπτικές απολήξεις νευρώνων και μεταφέρονται ακόμη και στον απιοειδή φλοιό.

Η εντόπιση στις ίδιες περιοχές αποπτωτικών κυττάρων, κυττάρων ανοσοθετικών στην Hsp70, στον BDNF και στη NT-3 δεν αποτελεί αντίφαση. Το φαινόμενο της απόπτωσης αποκαλύπτει την ύπαρξη εκφυλιστικών φαινομένων ενώ και η εντόπιση της Hsp70 υποδηλώνει κύτταρα σε κατάσταση stress τα οποία όμως μάλλον αντιμετωπίζουν τη βλάβη του ιστού (Soriano et al. 1995, Massa et al. 1996). Αντίστοιχα, η αυξημένη παρουσία των νευροτροφινών ίσως αναδεικνύει την προσπάθεια του ιστού να προστατευθεί από τις συνέπειες του τραυματισμού.

Η απόκριση του ιστού 1 εβδομάδα μετά τον τραυματισμό.

Η θνητότητα του συγκεκριμένου μοντέλου εγκεφαλικού τραυματισμού ήταν αρκετά υψηλή κατά το μέγιστο χρονικό διάστημα που αφέθηκαν να επιβιώσουν τα πειραματόζωα (μία εβδομάδα). Τέσσερα στα εννέα ζώα πέθαναν πριν περάσει μία εβδομάδα από τη στιγμή του τραυματισμού (ποσοστό 44%): δύο από αυτά τρεις ημέρες μετά το τραύμα και τα άλλα δύο την έβδομη ημέρα. Φαίνεται συνεπώς πως ο θάνατος των επίμων στις τρεις και εφτά ημέρες μετά τον τραυματισμό οφειλόταν περισσότερο σε δευτερογενή φαινόμενα κι όχι στην πρωτογενή καταστροφή του εγκεφαλικού ιστού.

Στα ζώα που επιβίωσαν για μία εβδομάδα μετά τον τραυματισμό δεν εντοπίστηκαν σημαντικά ενδοεγκεφαλικά αιματώματα και ενδοκοιλιακές αιμορραγίες. Η ιστολογική εικόνα της ανάπλασης του παρεγχύματος ήταν όμοια με τις αντίστοιχες περιγραφές άλλων μοντέλων εγκεφαλικού τραυματισμού. Υπήρχε σαφής πολλαπλασιασμός αστρογλοϊακών κυττάρων και διαμόρφωση της εικόνας της αστρογλοϊακής ουλής (Walter et al. 1997). Η ουλή αυτή θεωρείται πως αποτελεί φραγμό στην ομαλή εξέλιξη της διαδικασίας αναγέννησης των νευρικών αξόνων (Ridet et al. 1997) και πως συντείνει στην επιβάρυνση της κλινικής εικόνας των τραυματιών. Στο κέντρο της περιτραυματικής περιοχής παρατηρήθηκε επούλωση του τραύματος από πολυάριθμα αρνητικά στην πρωτεΐνη GFAP κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά μάλλον ήταν ινοβλάστες οι οποίοι μετανάστευσαν εκεί από τις τραυματισμένες μήνιγγες, αιματογενή μακροφάγα κύτταρα και μικρογλοϊακά κύτταρα (Walter et al. 1997).

Η έκφραση της Hsp70 παρέμεινε υψηλή σε περιορισμένη έκταση γύρω από την περιοχή επούλωσης της καταστροφής μία εβδομάδα μετά τον

τραυματισμό αν και με σαφείς τάσεις μείωσης. Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει τη συνεχιζόμενη ύπαρξη εκφυλιστικών φαινομένων ακόμη και μετά την πάροδο αρκετών ημερών ύστερα από την πρωτογενή καταστροφή του ιστού. Η μοναδική δομή η οποία τραυματίστηκε πρωτογενώς και στην οποία η έκφραση της Hsp70 συνέχιζε να αυξάνεται μέχρι και μία εβδομάδα μετά το τραύμα ήταν το μεσολόβιο. Αν και στα περισσότερα μοντέλα εγκεφαλικού τραυματισμού η παροδική αύξηση της παρουσίας της Hsp70 δεν ξεπερνά τις δύο ημέρες, υπάρχουν εργασίες που αναφέρουν αυξημένα επίπεδα του mRNA της έως και τρεις ημέρες μετά το τραύμα (Yamashita et al. 1996) και του πεπτιδίου μέχρι και μία εβδομάδα μετα-τραυματικά (Hoshino 1995).

Σε αυτό το χρονικό σημείο τα θετικά κύτταρα στην αντίδραση TUNEL εντοπίζονταν σε όλες τις στιβάδες του φλοιού και σε όλη την έκταση του τραυματισμένου ιπλόκαμπου. Η παρουσία θετικών κυττάρων στην περιοχή επούλωσης του ιστού πιθανώς να οφειλόταν στο φαινόμενο της δυναμικής ισορροπίας των διαφόρων κυτταρικών πληθυσμών που εντοπίζονταν εκεί. Ο ΠΚΘ παίζει κυρίαρχο ρόλο στη διαδικασία διαμόρφωσης του ιστού κατά την ανάπτυξη αλλά και στη διαδικασία αναγέννησης των κυττάρων και ανάπλασης του ιστού (Biebi et al. 2000). Πρέπει πάντως να επισημανθεί πως, σε αντίθεση με τις πρώτες μετα-τραυματικές ώρες, σε αυτό το στάδιο το φαινόμενο του ΠΚΘ δεν συνδυαζόταν με αυξημένη έκφραση της nNOS. Το στοιχείο αυτό ίσως αποκαλύπτει πως ο ΠΚΘ στην περιτραυματική και τις όμορες σε αυτήν περιοχές μία εβδομάδα μετά τον τραυματισμό αποτελεί ένα διαφορετικό φαινόμενο, ανεξάρτητο από τον ΠΚΘ των πρώτων ωρών μετά τον τραυματισμό, η επαγωγή του οποίου πιθανώς οφείλεται στη δράση διαφορετικών μηχανισμών. Στις περισσότερες μελέτες εγκεφαλικών τραυματισμών μία εβδομάδα μετά τον τραυματισμό τα θετικά κύτταρα στην αντίδραση TUNEL είναι είτε ανύπαρκτα (Portera-Cailliau et al. 1995, Rink et al. 1995), είτε ελάχιστα (Hughes et al. 1996, Kharlamov et al. 1996). Μόνο η ομάδα των Conti et al. (1998) ανέφερε ένα δεύτερο κύμα αποπτωτικού θανάτου 1 εβδομάδα μετά τον τραυματισμό στο φλοιό καθώς και σε δομές της λευκής ουσίας, ενώ στο θάλαμο η μέγιστη παρουσία αποπτωτικών κυττάρων προσδιορίστηκε στις δύο εβδομάδες. Πρέπει επίσης να σημειωθεί η μερική αποσύνδεση του φαινομένου του ΠΚΘ μία εβδομάδα μετά τον τραυματισμό από την έκφραση της Hsp70. Σε αυτό το χρονικό σημείο τα αποπτωτικά κύτταρα εντοπίζονταν και σε περιοχές του φλοιού και των ιπλόκαμπων στις οποίες η έκφραση της Hsp70 δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερα αυξημένη σε κανένα από τα αρχικά χρονικά σημεία που μελετήθηκαν, σε αντίθεση με την υπόθεση πως η περιοχή εξάπλωσης της Hsp70 ταυατίζεται με την περιοχή αναμενόμενης εντόπισης κυτταρικού θανάτου (Brown 1990, Plumier et al. 1997, Kubo et al. 1998). Εξαίρεση αποτέλεσε η ταυτόχρονη εντόπιση θετικών κυττάρων στην αντίδραση TUNEL και ανοσοθετικών κυττάρων στην πρωτεΐνη Hsp70 στο κέντρο της περιτραυματικής περιοχής και στις περιοχές του απιοειδούς φλοιού και των παρακοιλιακών υποθαλαμικών πυρήνων.

Η μείωση των επιπέδων του BDNF σε νευρικές ίνες και σώματα στην περιοχή του τραύματος ήταν ορατή και μία εβδομάδα μετά τον τραυματισμό και συνέχιζε να χαρακτηρίζεται από την ίδια έκταση και ένταση. Το εύρημα

αυτό δεν έχει περιγραφεί από άλλες ερευνητικές ομάδες, ενώ αντιθέτως οι Wong et al. (1997) ανέφεραν πως μία εβδομάδα μετά από χειρουργικό, εκτεταμένο τραυματισμό του ραβδωτού σώματος, η παρουσία του BDNF έφτασε στα μέγιστα επίπεδα ακόμη και στο κέντρο της περιτραυματικής περιοχής. Η συνεχιζόμενη απουσία του BDNF από την περιτραυματική περιοχή μπορεί να ερμηνευτεί από την αδυναμία ανάπτυξης των τραυματισμένων νευραξόνων ή/και από την αδυναμία ενεργοποίησης της έκφρασης του γονιδίου του, για λόγους που δεν είναι ακόμη διεκρινισμένοι. Μόνο η διάχυτη ανοσοθετική χρώση του παρεγχύματος, γύρω από την ομάδα των κυττάρων τα οποία αντικατέστησαν τον πρωτογενώς κατεστραμμένο ιστό, υποδήλωνε την πιθανή σταδιακή επανενεργοποίηση της τοπικής παραγωγής BDNF.

Όσον αφορά την νευροτροφίνη NT-3, η αρχική μείωση των επιπέδων της φάνηκε να έχει τελειώσει αναστραφεί μία εβδομάδα αργότερα. Η εντόπιση της NT-3 στην περιοχή επούλωσης του τραυματισμού ήταν πολύ έντονη ακόμη και σε κύτταρα που δεν ήταν νευρικά. Το στοιχείο αυτό σαφώς υποδεικνύει πιθανό ρόλο της στη διαδικασία αποκατάστασης της ιστικής βλάβης. Παρόλο που και αυτό το δεδομένο δεν έχει περιγραφεί από άλλες ομάδες συμβαδίζει με τις παλαιότερα περιγεγραμμένες νευροτροφικές και νευροαναγεννητικές ιδιότητες της NT-3 (Burke et al. 1994, Ebadi et al. 1996).

Επιπροσθέτως, μία εβδομάδα μετά τον τραυματισμό, η έκφραση του IGF-I εμφανίζεται έντονη, αν και τοπικά περιορισμένη, σε κύτταρα που συμμετέχουν στην επούλωση της καταστροφής, αλλά και σε διάσπαρτα γλοιακά κύτταρα παραπλεύρως. Ακόμη, αυξημένη ήταν η έκφραση του IGF-I σε κύτταρα του τραυματισμένου μεσολόβιου. Οι Beilharz et al. (1998) αναφέρουν έκφραση του IGF-I σε ινοβλάστες και κύτταρα του αίματος μετά από ισχαιμικό τραυματισμό του εγκεφάλου και οι Scheepens et al. (2000) σε ενεργοποιημένα μικρογλοιακά κύτταρα. Η αυξημένη παρουσία του πεπτιδίου του IGF-I στην περιτραυματική περιοχή επτά μέρες μετά το τραύμα συμβαδίζει με τα αποτελέσματα πολυάριθμων ερευνητικών ομάδων. Ως μέσος χρόνος εντόπισης της μέγιστης έκφρασης του IGF-I μετά από εγκεφαλικό τραυματισμό αναφέρεται το χρονικό διάστημα μεταξύ 3^{ης} και 5^{ης} μετατραυματικής μέρας (Guthrie et al. 1995, Breese et al. 1996, Nordqvist et al. 1996, Li et al. 1998, Woods et al. 1998). Επίσης, οι Yao et al. (1995) και Walter et al. (1997) εντοπίζουν το χρόνο μέγιστης έκφρασης του IGF-I στις επτά ημέρες μετά τον τραυματισμό. Η αύξηση της έκφρασης του IGF-I παρατηρήθηκε στην χρονική περίοδο κατά την οποία τα φαινόμενα ανάπτυξης και αναγέννησης του ιστού ήταν πιο έντονα και ήταν εντοπισμένη στις περιοχές εξέλιξης αυτών των φαινομένων, συμπεράσμα το οποίο σημειώνεται και από τους Guthrie et al. (1995) και Li et al. (1998). Αυτά τα χαρακτηριστικά της έκφρασης του IGF-I ενισχύουν την υπόθεση σύμφωνα με την οποία η παραγωγή του αποτελεί μία νευροπροστατευτική και νευροαναγεννητική αντίδραση του ιστού.

Τα παραπάνω στοιχεία τα οποία συνθέτουν την απόκριση του εγκεφαλικού ιστού στον τραυματισμό, μία εβδομάδα μετά από αυτόν και τα οποία είτε περιγράφονται πρώτη φορά από την εργασία μας, είτε έρχονται σε

αντίθεση με άλλες έρευνες, στοιχειοθετούν την ιδιαιτερότητα των διεισδυτικών τραυματισμών. Η ιδιαιτερότητα αυτή μάλιστα εκφράζεται και με την παρουσίαση διαφορετικών κλινικών στοιχείων σε σχέση με τους γενικευμένους εγκεφαλικούς τραυματισμούς, γεγονός που επιβάλλει τη διαφορετική θεραπευτική προσέγγισή τους (Κάζδαγλης 1996). Για παράδειγμα, η δημιουργία της αστροκυτταρικής ουλής καθώς και οι μετακινήσεις ποικίλων κυτταρικών πληθυσμών από την τραυματισμένη μήνιγγα ή από την αιματική κυκλοφορία στο εγκεφαλικό παρέγχυμα, είναι φαινόμενα που χαρακτηρίζουν κυρίως αυτού του τύπου τους τραυματισμούς (Walter et al. 1997). Η εξέλιξη αυτών των φαινομένων επιφέρει την ανάπτυξη ποικίλων κυτταρικών αλληλεπιδράσεων (Lotan and Schwartz 1994) και την αθρόα έκκριση κυτταροκινών (Fuerstein et al. 1997), γεγονός τα οποία επίσης προσδίδουν στους τραυματισμούς αυτούς ιδιαίτερα χαρακτηριστικά..

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αποκαλύπτουν πως στο συγκεκριμένο μοντέλο ο εγκεφαλικός τραυματισμός αν και περιορισμένου αρχικού μεγέθους, ακολουθείται από μία πλειάδα εν δυνάμει παθολογικών κυτταρικών και μοριακών φαινομένων, στα οποία ίσως οφείλεται το υψηλό ποσοστό θνητότητας που τον συνοδεύει. Οι μεσοπρόθεσμες επιπτώσεις, όπως αυτές εκφράζονται από τα φαινόμενα του ΠΚΘ και της μειωμένης παρουσίας της νευροτροφίνης BDNF στην περιτραυματική περιοχή, είναι αρκετά έντονες. Ο τραυματισμένος φλοιός και ιππόκαμπος στερούνται της δράσης του BDNF για τουλάχιστον μία εβδομάδα. Οι Horger et al. (1999) επεσήμαναν πως ακόμη και βραχύχρονες μεταβολές στην παρουσία του BDNF στον ιππόκαμπο μπορεί να επιφέρουν μακρόχρονα αποτελέσματα στις λειτουργίες της μνήμης και της μάθησης καθώς στη συγκεκριμένη δομή ο BDNF παίζει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στο φαινόμενο της πλαστικότητας των συνάψεων (Conner et al. 1998, Altar and DiStefano 1998). Γεγονός είναι πως ακόμη δεν είναι γνωστός ο πιθανός ρόλος της μείωσης των επιπέδων του BDNF στη μετατραυματική φυσιολογία του εγκεφάλου. Η φυσιολογικά όμως έντονη παρουσία του στο φλοιό και τον ιππόκαμπο υποδηλώνουν πως ο συγκεκριμένος παράγοντας είναι απαραίτητος για την ομαλή λειτουργία του ιστού και συνεπώς η παρατεταμένη μείωση της έκφρασής του έχει μάλλον αρνητικά αποτελέσματα.

Ακόμη και η μάλλον πιο βραχείας διάρκειας μείωση της παρουσίας της NT-3 στην περιοχή του ιππόκαμπου είναι πιθανώς επιβαρυντική για τη λειτουργία αυτής της δομής καθώς και η NT-3 παίζει σημαντικό ρόλο στο φαινόμενο της πλαστικότητας των συνάψεων (Kokaia et al. 1998).

Τα αποτελέσματά μας αποκαλύπτουν πως ένας μέτριος εγκεφαλικός τραυματισμός μπορεί να ακολουθείται από έντονα δευτερογενή εκφυλιστικά φαινόμενα. Συμβαδίζουν συνεπώς με τις επιδημιολογικές παρατηρήσεις σύμφωνα με τις οποίες οι μέτριοι και ελαφρείς εγκεφαλικοί τραυματισμοί επιφέρουν μακροχρόνιες επιπτώσεις σε ποσοστό περίπου ίδιο με τους σοβαρούς τραυματισμούς του εγκεφάλου (The European Brain Injury Consortium Survey of Head Injuries, Murray et al. 1999). Επίσης, αναδεικνύουν το συγκεκριμένο μοντέλο εστιασμένου, μηχανικού διεισδυτικού τραυματισμού ως ένα πολύ καλό εργαλείο, καθώς χαρακτηρίζεται από σχεδόν

μηδενική θνητότητα στα πρώτα στάδια και έντονη ανάπτυξη ποικίλων δευτερογενών διαδικασιών είτε νευροπροστατευτικών, είτε νευροτοξικών.

Χορήγηση IGF-I.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η προστατευτική επίδραση της τοπικής χορήγησης IGF-I σε σύντομο διάστημα μετά τον τραυματισμό, δηλαδή σε ένα χρονικό διάστημα κατά το οποίο ο ενδογενής IGF-I δεν είχε ακόμη αυξηθεί σε σημαντικό βαθμό. Τα πειράματά μας αποκάλυψαν πως η χορήγηση του IGF-I είχε ως αποτέλεσμα την αναστροφή συγκεκριμένων φαινομένων και τελικά τη διατήρηση της φυσιολογικής εικόνας του ιστού. Δύο ήταν τα κύρια αποτελέσματα της επίδρασης του IGF-I. Πρώτον η διαφύλαξη της ισορροπίας στην έκφραση των νευροτροφινών και δεύτερον η μείωση του αριθμού των θετικών κυττάρων στην αντίδραση TUNEL.

Μετά τη χορήγηση του IGF-I, δεν παρατηρήθηκε στην περιτραυματική περιοχή η δραματική μείωση του αριθμού των ανοσοθετικών στον BDNF νευρικών ινών, όπως επίσης και η μείωση στην έκφραση της NT-3. Το ερώτημα το οποίο προκύπτει είναι εάν ο IGF-I επέδρασε άμεσα στη ρύθμιση της έκφρασης του BDNF και της NT-3 ή επέφερε τη διατήρηση της παρουσίας τους δευτερογενώς. Μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν σαφή δεδομένα που να υποδεικνύουν την αλληλεπίδραση των μορίων αυτών στο επίπεδο της ρύθμισης της έκφρασης τους. Από την άλλη μεριά, ο IGF-I είναι γνωστό πως παρουσιάζει προστατευτική (Mason et al. 2000) αλλά και μιτογόνο (McMorris and Dubois-Dalcq 1988, McMorris et al. 1993) δράση στα ολιγοδενδρογλοιακά κύτταρα και τις πρόδρομες μορφές τους. Επιπροσθέτως, ο IGF-I είναι ένα μόριο με ιδιότητες ρυθμιστή της διαδικασίας μυελινοποίησης των νευρικών αξόνων (Komoly et al. 1992, Walter et al. 1997). Τα ολιγοδενδρογλοιακά κύτταρα εμφανίζουν ιδιαίτερη ευαισθησία στους τραυματισμούς (Pan and Kastin 2000, Shibata et al. 2000). Το φαινόμενο της απομυελινοποίησης είναι βασικό εύρημα σε περιπτώσεις τραυματισμού αλλά και άλλων νευροεκφυλιστικών παθήσεων (Ludwin 1988, Xie et al. 1995) και είναι υπεύθυνο για την εκφύλιση των νευρικών αξόνων και την εμφάνιση ποικίλων νευρολογικών διαταραχών. Μετά από μηχανικό διεισδυτικό τραυματισμό του εγκεφάλου επίμυων, έχει περιγραφεί αφενός μία σχετικά αργή σε εξέλιξη διαδικασία απομυελινοποίησης (ξεκινά άμεσα μετά τον τραυματισμό αλλά διευρύνεται σε διάστημα πολλών ημερών) και αφετέρου μία ενεργοποίηση των ολιγοδενδρογλοιακών κυττάρων που επιβιώνουν, με αποτέλεσμα την αύξηση του μεγέθους τους αλλά και τον πολλαπλασιασμό τους (Ludwin 1984, Xie et al. 1995). Αν και δε χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί ολιγοδενδρογλοιακοί δείκτες, το φαινόμενο της απομυελινοποίησης υφίστατο σίγουρα στο μοντέλο τραυματισμού που εφαρμόσαμε και ήταν εμφανές από τη μορφή του μεσολόβιου ήδη από τις 4 πρώτες μετα-τραυματικές ώρες. Είναι συνεπώς πιθανό, η διατήρηση σε μεγάλο βαθμό των θετικών στο BDNF νευρικών ινών, μετά τη χορήγηση IGF-I, να οφείλεται στην ενίσχυση της αντίστασης των ολιγοδενδρογλοιακών κυττάρων στις συνέπειες του τραύματος και στη διατήρηση του ελύτρου μυελίνης γύρω από τους νευρικούς άξονες. Με αυτόν

τον τρόπο πιθανώς αποφεύχθηκε η καταστροφή των αξόνων και επόμεως η επαγωγή των φαινομένων που αναλύθηκαν νωρίτερα (αυξημένη αντιδρομική και ορθοδρομική μεταφορά των νευροτροφινών) τα οποία ευθύνονται για τη δραματική μείωση της παρουσίας τους στην περιτραυματική περιοχή.

Το γεγονός πως η επαγωγή της Hsp 70 μειώνεται μετά τη χορήγηση IGF-I σημαίνει πως λιγότερα κύτταρα βρίσκονται σε κατάσταση stress μετά τον τραυματισμό. Το στοιχείο αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα πως τις 12 πρώτες ώρες ο IGF-I πιθανώς συμβάλλει στη διατήρηση της ομοιόστασης του ιστού και ιδίως της διαχείρισης από τα κύτταρα της υψηλής συγκέντρωσης εξωκυττάρων ιόντων ασβεστίου. Η υπόθεση αυτή έχει προταθεί και από άλλες ομάδες (Beilharz et al. 1998, Fernandez et al 1999) και ίσως εξηγεί την αναστροφή της μείωσης της έκφρασης της NT-3 και του BDNF αλλά και τη μείωση του φαινομένου του ΠΚΘ. Ένα επιπρόσθετο στοιχείο που ενισχύει την παραπάνω υπόθεση είναι πως μετά από τη χορήγηση του IGF-I δεν εντοπίζονται και τα χαρακτηριστικά ενεργοποιημένα αστροκύτταρα.

Η επίδραση της χορήγησης του IGF-I στην ένταση και έκταση του φαινομένου του ΠΚΘ ήταν σαφής καθώς οδήγησε στη μείωση του αριθμού των αποπτωτικών κυττάρων στην περιοχή έγχυσής του έως και τις 12 ώρες μετά τον τραυματισμό. Ο IGF-I έχει βρεθεί να διαθέτει αντι-αποπτωτικές ιδιότητες σε ποικίλους κυτταρικούς πληθυσμούς, τα περισσότερα στοιχεία όμως προέρχονται από σε in vitro πειράματα (Fernandez et al. 1999, Russel et al. 1998, Tamatani et al. 1998, Ryu et al. 1999). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η αδυναμία του IGF-I να επηρεάσει το φαινόμενο του ΠΚΘ στον αντίπλευρο ιππόκαμπο. Το στοιχείο αυτό υποδηλώνει πως ο IGF-I επιδρώντας άμεσα σε συγκεκριμένα κύτταρα οδήγησε στην αυξημένη ανθεκτικότητά τους, δε μπόρεσε όμως να αναστείλει την επαγωγή των δευτερογενών μηχανισμών οι οποίοι «μεταφέρουν» τα κυτταροτοξικά αποτελέσματα του τραυματισμού σε πιο απομακρυσμένες περιοχές. Οι Scheerpens et al. (2000) αναλύουν τη δράση του IGF-I σε δύο συνιστώσες. Αφενός στην άμεση επίδρασή του στα κύτταρα που έχουν επηρεασθεί από τον τραυματισμό και αφετέρου στην ιδιότητα του ως πρόδρομο μορίου του τριπεπτιδίου GPE και του desIGF-I.

Τα αποτελέσματά μας τεκμηριώνουν τις νευροπροστατευτικές ιδιότητες του IGF-I και αναδεικνύουν τον παράγοντα αυτό ως ένα καλό υποψήφιο θεραπευτικό μέσο. Η δυνατότητα θεραπευτικής χρήσης του IGF-I ενισχύεται από το δεδομένο ότι μπορεί να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Reinhardt and Bondy 1994, Pan and Kastin 2000) και συνεπώς να χορηγηθεί περιφερειακά. Ακόμη, δεδομένα από άλλες εργασίες απέδειξαν πως ο IGF-I που χορηγείται ενδοεγκεφαλικά συνδέεται πολύ γρήγορα στις πρωτεΐνες IGFBP (Guan et al. 2000) με αποτέλεσμα να παραμένει ενεργός για παρατεταμένο χρονικό διάστημα. Το γεγονός αυτό σημαίνει πως είναι δυνατή η πρόκληση παρατεταμένων αποτελεσμάτων ακόμη και με την εφάπαξ χορήγηση μικρής ποσότητας IGF-I. Οι κλινικές δοκιμές του IGF-I αν και έδωσαν αρχικά ορισμένα ενθαρρυντικά αποτελέσματα τελικά δεν είχαν θετική κατάληξη (Dore et al. 1997, Walsh 1995) χωρίς όμως να «κλείνουν» το κεφάλαιο της πιθανής κλινικής χρήσης του αυξητικού αυτού παράγοντα. Τα αποτελέσματά μας φανερώνουν πως είναι εφικτή η επιτυχής εξωγενής

παρέμβαση με στόχο τη μείωση ή και την αναστροφή των συνεπειών του εγκεφαλικού τραυματισμού, ακόμη και σε ένα ιδιόμορφο μοντέλο όπως οι διεισδυτικοί κρανιοεγκεφαλικοί τραυματισμοί.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.

ΜΕΛΕΤΗ ΙΣΤΙΚΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ ΣΕ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΕΠΙΜΥΩΝ.

Οι ΚΕΚ αποτελούν βασική αιτία θανάτου ενώ συχνά οδηγούν σε μακροχρόνια προβλήματα υγείας με σοβαρές κοινωνικές και οικονομικές προεκτάσεις. Η περιγραφή και αποκωδικοποίηση των μοριακών μηχανισμών που ενέχονται στην απόκριση του εγκεφαλικού ιστού στο τραύμα είναι απαραίτητες προϋποθέσεις στην προσπάθεια επιτυχούς κλινικής αντιμετώπισής τους.

Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκε ένα μοντέλο εστιασμένου, μηχανικού διεισδυτικού τραυματισμού σε αρσενικούς επίμυς. Ο τραυματισμός γινόταν στο ραχιαίο τμήμα του υπόκαμπου και στον υπερκείμενο φλοιό. Σε διάφορα χρονικά σημεία μετά το τραύμα, από τις 4 ώρες έως τη 1 εβδομάδα, έγινε αδρή ιστολογική αξιολόγηση των εγκεφάλων, μελετήθηκε η παρουσία ορισμένων πρωτεϊνών καθώς και το φαινόμενο του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Επiléχθηκε η μελέτη της έκφρασης της θερμοεπαγώμενης πρωτεΐνης Heat Shock protein 70 (Hsp70) διότι αποτελεί δείκτη τραυματισμού των κυττάρων. Οι νευροτροφίνες Brain Derived Neurotrophic factor (BDNF) και Neurotrophin 3 (NT-3) μελετήθηκαν καθώς αμφότερες εντοπίζονται σε υψηλά επίπεδα στον ενήλιο εγκέφαλο των επίμυων και οι τροφικές ιδιότητές τους είναι καλά στοιχειοθετημένες. Η νευρωνική ισομορφή της συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (neuronal NO Synthase/ nNOS) συμπεριελήφθη στη μελέτη διότι το NO ενδέχεται να έχει νευροτοξικές ιδιότητες και η γλοιακή όξινη ινώδης πρωτεΐνη (Glial Fibrillary Acidic Protein/ GFAP) επειδή είναι δείκτης των αστρογλοιακών κυττάρων. Επιπροσθέτως, μελετήθηκε η ανοσοεντόπιση του Ινσουλνοειδούς Αυξητικού Παράγοντα I (Insulin-like Growth Factor I/ IGF-I) ούτως ώστε να περιγραφεί η πιθανή συμμετοχή του στην απόκριση του εγκεφαλικού ιστού στο τραύμα. Η παρουσία όλων των παραπάνω πρωτεϊνών έγινε ανοσοϊστοχημικά ενώ η εντόπιση αποπτωτικών κυττάρων μέσω της αντίδρασης TUNEL. Επιπλέον, προσδιορίστηκαν οι νευροπροστατευτικές ιδιότητες της μετατραυματικής χορήγησης IGF-I.

4 και 12 ώρες μετά τον τραυματισμό παρατηρήθηκε μεγάλη αύξηση του αριθμού των ανοσοθετικών στην Hsp70 κυττάρων στην περιτραυματική περιοχή. Επίσης, εντοπίστηκε περιορισμένος αριθμός ενεργοποιημένων αστρογλοιακών κυττάρων καθώς και ανοσοθετικών για τον IGF-I κυττάρων στο κέντρο της περιτραυματικής περιοχής. Αντιθέτως, στην ίδια περιοχή η έκφραση των νευροτροφινών BDNF και NT-3 παρουσίαζε δραματική μείωση. 4 ώρες μετά τον τραυματισμό υπήρχαν διάσπαρτα αποπτωτικά κύτταρα στο φλοιό και τον υπόκαμπο εκατέρωθεν του τραύματος. Ο αριθμός των κυττάρων αυτών αυξήθηκε σημαντικά στις 12 ώρες όπως επίσης κατγράφηκε εξάπλωση της παρουσίας τους και στον αντίπλευρο υπόκαμπο. Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε μία παροδική αύξηση του αριθμού των ανοσοθετικών για τη nNOS κυττάρων και στους δύο υπόκαμπους. Ο αριθμός των κυττάρων αυτών ήταν μέγιστος στις 12 ώρες και επανήλθε στα φυσιολογικά επίπεδα 48 ώρες μετά τον τραυματισμό. Ενδιαφέρον ήταν το εύρημα της παρουσίας ανοσοθετικών κυττάρων για τις νευροτροφίνες και την Hsp70 καθώς και αποπτωτικών κυττάρων σε περιοχές απομακρυσμένες από το τραύμα, όπως ο απιοειδής φλοιός και οι παρακοιλιακοί υποθαλαμικοί πυρήνες.

Μία εβδομάδα μετά τον τραυματισμό ήταν εμφανής η διαμόρφωση της αστροκυτταρικής ουλής. Τα επίπεδα έκφρασης της Hsp70 ήταν ακόμη υψηλά στην περιτραυματική περιοχή, αλλά όχι όπως στις 12 ώρες. Σημαντικά αυξημένος ήταν

ο αριθμός των θετικών για τον IGF-I κυττάρων στην περιτραυματική περιοχή, όπως και ο αριθμός των θετικών στην αντίδραση TUNEL κυττάρων και στα δύο ημισφαίρια. Η περιτραυματική περιοχή συνέχιζε να χαρακτηρίζεται από απουσία θετικών για τον BDNF κυτταρικών σωμάτων και αξόνων και μόνο στο παρέγχυμα του πυρήνα της καταστροφής εντοπιζόταν χαμηλή παρουσία της νευροτροφίνης. Από την άλλη μεριά η εντόπιση της NT-3 είχε επιστρέψει σε φυσιολογικά επίπεδα.

Στους επόμενους οποίους χορηγήθηκε μετατραυματικά IGF-I ορισμένα από τα παραπάνω φαινόμενα είχαν αναστραφεί. Ο IGF-I οδήγησε στη διατήρηση της φυσιολογικής έκφρασης των νευροτροφινών και στη σημαντική μείωση των αποπτωτικών κυττάρων –τουλάχιστον για τις πρώτες 12 ώρες. Επίσης επέφερε μείωση του αριθμού των ανοσοθετικών για την Hsp70 κυττάρων, ενώ τα επίπεδα των πεπτιδίων GFAP και IGF-I δεν επηρεάστηκαν. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πως ο IGF-I διαθέτει προστατευτικές ιδιότητες κυρίως ως προς τα ολιγοδενδρογλοιακά κύτταρα και πως η χορήγησή του μπορεί να οδηγήσει στη διατήρηση της ομοιόστασης του ιστού στην περιτραυματική περιοχή. Συνεπώς ο IGF-I αναδεικνύεται ως ένας σημαντικός νευροπροστατευτικός παράγοντας ο οποίος μπορεί μελλοντικά να χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτικό μέσο.

SUMMARY

STUDY OF TISSUE ALTERATIONS IN TRAUMATIZED REGIONS OF THE RAT CNS

Brain trauma is a primary cause of death or may lead to long-term health, social and economic problems. The elucidation of the molecular mechanisms involved in the response of brain tissue after trauma is necessary for the development of rational therapeutic approaches.

In this project, adult male rats were traumatized using a model of focal, mechanical, penetrating injury at the dorsal hippocampus and the overlying cortex. The gross histological alterations, the expression of certain proteins, as well as the phenomenon of programmed cell death were studied on various time points after brain injury, the shortest being 4 hours and the longest 1 week. The expression of Heat-Shock protein 70 was studied as a marker of neuronal injury and stress. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and Neurotrophin 3 (NT-3) were studied because they are both highly expressed in the adult rat brain and have a well-described trophic action. The neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) was studied as NO is a potent neurotoxic molecule and the expression of Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) was chosen as a marker of astrocytes. Additionally, the expression of Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) was studied in order to evaluate the participation of this growth factor in the response of brain tissue to trauma. The expression of all of the above proteins was studied immunohistochemically and the occurrence of apoptotic cell death was observed by the TUNEL reaction. Furthermore, the neuroprotective properties of post-injury IGF-I administration were determined.

4 and 12 hours after injury, a strong increase in Hsp70 was observed in the peritraumatic area along with a moderate activation of astroglia and limited expression of IGF-I around the core of the injury. In contrast, neurotrophin expression was severely reduced in the same peritraumatic zone. Scattered apoptotic cells were detected in the peritraumatic zone at 4 hours but their number increased significantly up to 12 hours, even in the contralateral hippocampus. Additionally, a transient increase of nNOS immunoreactivity was observed in the hippocampi of both hemispheres. The number of nNOS immunopositive cells was maximal at 12 hours and had returned to normal values at 48 hours post-injury. Interestingly, expression of BDNF, NT-3 and Hsp70 as well as TUNEL positive cells were observed even in remote areas such as the piriform cortex and the paraventricular hypothalamic nuclei.

One week after the trauma, a glial scar had formed at the site of the injury. Hsp70 expression was still high but limited in comparison to 12 hours. IGF-I immunoreactivity was significantly elevated in a restricted area adjacent to the lesion site. The numbers of apoptotic cells were further increased and TUNEL positive cells were present in both hemispheres. BDNF immunoreactive cells or axons were absent in the peritraumatic zone, with the exception of the presence of low immunoreactivity in the parenchyma in the core of the lesion. The reduction NT-3 immunoreactivity was not detectable anymore.

In the rats that received locally administered IGF-I after the injury many of the above phenomena were reversed. IGF-I led to maintenance of normal neurotrophin expression and significant reduction of apoptosis in the injured hemisphere -at least for the first 12 hours. It also resulted in reduction of the numbers of Hsp70 immunopositive cells, while GFAP and IGF-I immunoreactivity was not altered. These results indicate that IGF-I may have a strong protective action mainly for oligodendroglial cells and its administration reserves the homeostasis of brain tissues in the lesion site. Thus, IGF-I emerges as a potent neuroprotective factor that may prove to be a useful therapeutic molecule.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.

Aberg MA, Aberg ND, Hedbacker H, Oscarsson J, Eriksson PS (2000) Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20: 2896- 2903.

Adams JH, Doyle D, Graham DI, Lawrence AE, McLellan DR, Gennarelli TA, Pastuszko M, Sakamoto T (1985) The contusion index: A reappraisal in human and experimental no-missile injury. *Neuropath Appl Neurobiol* 11: 299- 308.

Alagarsamy S, DeWitt DS, Johnson KM (1998) Effects of moderate, central fluid percussion traumatic brain injury on nitric oxide synthase activity in rats. *J Neurotrauma* 15: 627- 633.

Alexi T, Hughes PE, van Room-Mom WMC, Faull RLM, Williams CE, Clark RG, Gluckman PD (1999) The IGF-I amino-terminal tripeptide Glycine-Proline-Glutamate (GPE) is neuroprotective to striatum in the Quinolinic acid lesion animal model of Huntington's disease. *Exp Neurol* 159: 84- 97.

Ali Raja I, Vohra AH, Ahmed M (2001) Neurotrauma in Pakistan. *World J Surg* 25: 1230- 1237.

Altar CA, DiStefano PS (1998) Neurotrophin trafficking by anterograde transport. *TINS* 21: 433- 437.

Amirjamshidi A, Abbassioun K, Roosbeh H (1997) Air-gun pellet injuries to the head and neck. *Surg Neurol* 47: 331- 338.

Ansari SA, Panezai AM (1998) Penetrating craniocerebral injuries: an escalating problem in Pakistan. *Br J Neurosurg* 12: 340- 343.

Aoki M, Abe K, Kawagoe J, Sato S, Nakamura S, Kogure K (1993) Temporal profile of the induction of heat shock protein 70 and heat shock cognate protein 70 mRNAs after transient ischemia in gerbil brain. *Brain Res* 601: 185- 192.

Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F (1977) Nitric oxide activates guanylate cyclases and increase guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 3203- 3207.

Atkinson L, Merry G (2001) Advances in neurotrauma in Australia. *World J Surg* 25: 1224- 1229. Kelly and Becker 2001

Azcoitia I, Sierra A, Garcia- Segura LM (1999) Neuroprotective effects of estradiol in the adult rat hippocampus: interaction with insulin- like growth factor-I signaling. *J Neurosci Res* 58: 815- 822.

- Baader SL, Schilling K (1996) Glutamate receptors mediate dynamic regulation of nitric oxide synthase expression in cerebellar granule cells. *J Neurosci* 16: 1440-1449.
- Baille-Le Crom V, Collombet JM, Burckhart MF, Foquin A, Pernot-Marino I, Rondouin G, Lallement G (1996) Time course and regional expression of C-FOS and HSP70 in hippocampus and piriform cortex following soman-induced seizures. *J Neurosci Res* 45: 513- 524.
- Ballard FJ, Wallace JC, Francis GL, Read LC, Tomas FM (1996) Des(1-3)IGF-I: a truncated form of Insulin- like Growth Factor- I. *Int J Biochem Cell Biol* 28: 1085- 1087.
- Ballarin M, Ernfors P, Lindefors N, Persson H (1991) Hippocampal damage and kainic acid injection induce a rapid increase in mRNA for BDNF and GF in the rat brain. *Exo Neurol* 114: 35-43.
- Banja J, Johnston MV (1994) Outcomes evaluation in TBI rehabilitation: Ethical perspectives and social policy. *Arch Phys Med Rehabil* 75(12 Spec No): Sc19- 26.
- Barde Y-A, Edgar DJr, Throenen H: (1982) Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1: 549- 553.
- Basso A, Previgliano I, Duarte JM, Ferrari N (2001) Advances in management of neurosurgical trauma in different continents. *World J Surg* 25: 1174- 1178.
- Batchelor PE, Liberatore GT, Wong JYF, Porritt MJ, Frerichs F, Donnan GA, Howells DW (1999) Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express Brain-Derived Neurotrophic Factor and Glial cell Line-Derived Neurotrophic Factor. *J Neurosci* 19: 1708- 1716.
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshal PA, Freeman BA (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1620- 1624.
- Beilharz EJ, Russo VC, Butler G, Baker NL, Connor B, Shirimanne ES, Dragunow M, Werther GA, Gluckman PD, Williams CE, Scheepens A (1998) Co-ordinated and cellular specific induction of the components of the IGF/IGFBP axis in the rat brain following hypoxic-schemic injury. *Brain Res MolBrain Res* 59: 119-134.
- Beilharz EJ, Williams CE, Dragunow M, Sirimanne ES, Gluckman PD (1999) Mechanisms of delayed cell death following hypoxic-ischemic injury in the immature rat: evidence for apoptosis during selective neuronal loss. *Mol Brain Res* 29: 1- 14.

Beltrame F, Maryni P, Orsi G (1998) On the intergration of healthcare emergency systems in Europe: the WETS project case study. *IEEE Trans Inf Technol Biomed* 2: 89- 97.

Benavidez DA, Fletcher JM, Hannay HL, Bland ST, Caudle SE, Mendelsohn DB, Yeakley J, Brunder DG, Harward H, Song J, Perachio NA, Bruce D, Scheibel RS, Lilly MA, Verger-Maestre K, Levin HS (1999) Corpus callosum damage and interhemispheric transfer of information following closed head injury in children. *Cortex* 35: 315- 336.

Bengzon J, Kokaia Z, Ernfors P, Kokaia M, Leanza G, Nilsson OG, Persson H, Lindvall O (1993) Regulation of neurotrophin and trkA, trkB and trkC tyrosine kinase receptor mRNA expression in kindling. *Neuroscience* 53: 433- 446.

Bergstedt K, Wieloch T (1993) Changes in insulin- like growth factor 1 receptor density after transient cerebral ischemia in the rat. Lack of protection against ischemic brain damage following injection of insulin- like growth factor 1. *J Cereb Blood Flow Metab* 13: 895- 898.

Berube J (2001) The traumatic brain injury Act Amendments of 2000. *J Head Trauma Rehabil* 16: 210- 213.

Bichell DP, Kikuchi K, Rotwein P (1992) Growth hormone rapidly activates insulin- like growth factor I gene transcription in vivo. *Mol Endocrinol* 6: 1899- 1908.

Bidmon HJ, Wu J, Godecke A, Schleicher A, Mayer B, Zilles K (1997) Nitric oxide synthase-expressing neurons are area specifically distributed within the cerebral cortex of the rat. *Neuroscience* 81: 321- 330.

Biebi M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG (2000) Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 291: 17- 20.

Binder L (1986) Persistent symptoms after mild head injury: a review of the postconcussive syndrome. *J Clin Exp Neuropsychol* 8: 323- 346.

Black SM, Bedolli MA, Martinez S, Bristow JD, Ferriero DM, Soifer SJ (1995) Expression of neuronal nitric oxide synthase corresponds to regions of selective vulnerability to hypoxia-ischaemia in the developing rat brain. *Neurobiol Dis* 2: 145- 155.

Booth BA, Boes M, Dake BL (1996) Structure- function relationships in the heparin- binding C-terminal region of insulin- like growth factor binding protein-3. *Growth Regul* 6: 206-213.

- Boulton CL, Irving AJ, Southam E, Potier B, Garthwaite J, Collingridge G (1994) The nitric oxide-cyclic GMP pathway and synaptic depression in rat hippocampal slices. *Eur J Neurosci* 6: 1528- 1535.
- Brandvold B, Levi L, Feinsod M, George ED (1990) Penetrating craniocerebral injuries in the Israeli involvement in the Libanes conflict, 1982-1985. Analysis of a less aggressive surgical approach. *J Neurosurg* 72: 15- 21.
- Bredesen DE (1995) Neural apoptosis. *Ann Neurol* 38: 839- 851.
- Bredt DS, Ferris CD, Snyder SH (1992) Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *J Biol Chem* 267: 10976- 10981.
- Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH (1990) Localization of nitric oxide indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347: 768- 770.
- Breese CR, D'Costa A, Rollins YD, Adams C, Booze RM, Sonntag WE, Leonard S (1996) Expression of insulin- like growth factor- I (IGF-I) and IGF binding protein 2 (IGF-BP2) in the hippocampus following cytotoxic lesion of the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 369: 388- 404.
- Brenman JE, Xia H, Chao DS, Black SM, Bredt DS (1997) Regulation of nitric oxide synthase through alternative transcripts. *Dev Neurosci* 19: 224- 231.
- Brown IR (1990) Induction of heat shock (stress) genes in the mammalian brain by hyperthermia and other traumatic events: a current perspective. *J Neurosci Res* 27: 247- 255.
- Brune B, Sandau K, von Knethen A (1997) Apoptotic cell death and Nitric Oxide: Activating and antagonistic transducing pathways. *Biochemistry* 63: 525- 533.
- Bullock R, Teasdale G (1990) Surgical management of traumatic intracranial hematomas in: Braakman R. editor. *Handbook of clinical neurology*, vol 15. Amsterdam: Elsevier, 249- 298.
- Burke MA, Mobley WC, Cho J, Wiegand SJ, Lindsay RM, Mufson EJ, Kordower JH (1994) Loss of developing cholinergic basal forebrain neurons following excitotoxic lesions of the hippocampus: rescue by neurotrophins. *Exp Neurol* 130: 178- 195.
- Calabresi P, Gubellini P, Centonze D, Sancsario G, Morello M, Giorgi M, Pisani A, Bernardi G (1999) A critical role of the nitric oxide/ cGMP pathway in corticostriatal long- term depression. *J Neurosci* 19: 2489- 2499.

Carson MJ, Behringer RR, Brinster RL, McMoris FA. (1993) Insulin- like growth Factor I increases brain growth and central nervous system myelination in transgenic mice. *Neuron* 10: 729-740.

Castren E, da Penha Berzaghi M, Lindholm D, Thoenen H (1993) Differential effects of MK- 801 on brain- derived neurotrophic factor mRNA levels in different regions of the rat brain. *Exp Neurol* 122: 244- 252.

Cheng CM, Reinhardt RR, Lee W-H, Joncas G, Patel SC, Bondy CA (2000) Insulin- like growth factor 1 regulates developing brain glucose metabolism. *PNAS* 97: 10236- 10241.

Chernausek SD (1993) Insulin- like Growth Factor- I (IGF-I) production by astroglial cells: regulation and importance for epidermal growth factor- induced cell replication. *J Neurosci Res* 34: 189- 197.

Chopp M, Chan PH, Hsu CY, Cheung ME, Jacobs TP (1996) DNA damage and repair in Central Nervous System injury. National Institute of Neurological Disorders and Stroke Workshop summary. *Stroke* 27: 363- 369.

Chopp M, Li Y, Zhang ZG, Freytag SO (1992) p53 expression in brain after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Bioch Biophys Res Commun* 182: 1201- 1207.

Christiaens JL, Blond S (1998) Acquired lesions of the corpus callosum. *Neurochirurgie* 44: 116- 124.

Clark RSB, Chen J, Watkins SC, Kochanek PM, Chen M, Stetler RA, Loeffert JE, Graham SH (1997) Apoptosis-suppressor gene bcl-2 expression after traumatic brain injury in rats. *J Neurosci* 17: 9172- 9182.

Clark RSB, Kochanek PM, Schwarz MA, Schiding JK, Turner DS, Chen M, Carlos TM, Watkins SC (1996) Inducible Nitric Oxide Synthase expression in cerebrovascular smooth muscle and neutrophils after traumatic brain injuries in immature rats. *Pediatr Res* 39: 784- 790.

Cobbs CS, Fenoy A, Bredt DS, Noble LJ (1997) Expression of nitric oxide synthase in the cerebral microvasculature after traumatic brain injury in the rat. *Brain Res* 751: 336-338.

Coburn K (1992) Traumatic brain injury: the silent epidemic. *AACN Clin Issues Crit Care Nurs* 3: 9-18.

Colicos MA, Dash PK (1996) Apoptotic morphology of dentate gyrus granule cells following experimental cortical impact injury in rats: possible role in spatial memory deficits. *Brain Res* 739: 120- 131.

Conner JM, Lauterborn JC, Gall CM (1998) Anterograde transport of neurotrophin proteins in the CNS—a reassessment of the neurotrophic hypothesis. *Rev Neurosci* 9: 91- 103.

Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, Varon S (1997) Distribution of brain- derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J Neurosci* 17: 2295- 2313.

Connor B, Beiharz EJ, Williams C, Synek B, Gluckman PD, Faull RLM, Dragunow M (1997) Insulin- like Growth Factor- I (IGF-I) immunoreactivity in the Alzheimer's disease temporal cortex and hippocampus. *Mol Brain Res* 49: 283-290.

Conti AC, Raghupathi R, Trojanowski JQ, McIntosh TK (1998) Experimental brain injury induces regionally distinct apoptosis during the acute and delayed post-traumatic period. *J Neurosci* 18: 5663- 5672.

Corrigan JD (2001) Conducting statewide needs assessments for persons with traumatic brain injury. *J Head Trauma Rehabil* 16: 1- 19.

Curtis R, Tonra JR, Stark JL, Adryan KM, Park JS, Cliffer KD, Lindsay RM, DiStefano PS (1998) Neuronal injury increase retrograde axonal transport of the neurotrophins to spinal sensory neurons and motor neurons via multiple receptor mechanisms. *Mol Cell Neurosci* 12: 105- 118.

D'Ambrosio R, Maris DO, Grady MS, Winn HR, Janigro D (1998) Selective loss of hippocampal long-term potentiation, but not depression, following fluid percussion injury. *Brain Res* 786: 64- 79.

D'Ambrosio R, Maris DO, Grady MS, Winn HR, Janigro D (1999) Impaired K(+) homeostasis and altered electrophysiological properties of post-traumatic hippocampal glia. *J Neurosci* 19: 8152- 8162.

D'Costa AP, Xu X, Ingram RL, Sonntag WE (1995) Insulin- like growth factor –I stimulation of protein synthesis is attenuated in cerebral cortex of aging rats. *Neuroscience* 65: 805-813.

D'Mello SR, Borodezt K, Soltoff SP (1997) Insulin-like growth factor and potassium depolarization maintain neuronal survival by distinct pathways: possible involvement of PI-3 kinase in IGF-I signaling. *J Neurosci* 17: 1548- 1560.

Damon SE, Haugk KL, Swisshelm K, Quinn LS (1997) Developmental regulation of Mac 25/ insulin-like growth factor- binding protein-7 expression in skeletal myogenesis. *Exp Cell Res* 237: 192-195.

Davenport ML, Clemmons DR, Miles MV, et al (1990) Regulation of serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF binding proteins during rat pregnancy. *Endocrinology* 127: 1278- 1286.

Davenport ML, Isley WL, Pucilowska JB, et al (1992) Insulin- like growth factor- binding protein- 3 proteolysis is induced after elective surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 8: 299- 306.

Dawson TM, Sasaki M, Gonzalea-Zulueta M, Dawson VL (1998) Regulation of neuronal nitric oxide synthase and identification of novel nitric oxide signaling pathways. *Prog Brain Res* 118: 3- 11.

Dawson TM, Snyder SH (1994) Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci* 14: 147- 159.

de Pablo F, de la Rosa EJ (1995) The developing CNS : a scenario for the action of proinsulin, insulin and insulin- like growth factors. *TINS* 18: 143- 150.

Deb S, Lyons I, Koutzoukis C, Ali I, McCarthy G (1999) Rate of psychiatric illness 1 year after traumatic brain injury. *Am J Psychiatry* 156: 374- 378.

Delany AM, Canalis E (1995) Transcriptional repression of insulin like growth factor I by glucocorticoids in rat bone cells. *Endocrinology* 136: 4776- 4781.

Denisenko O, Yarchuk O (1990) Heat shock translational control in cell-free system. *Antonie van Leeuwenhoek* 58: 163- 168.

Di Giulio AM, Germani E, Lesma E, Muller E, Gorio A (2000) Glycosaminoglycans co-administration enhance Insulin- like Growth Factor –I neuroprotective and neuroregenerative activity in traumatic and genetic models of motor neuron disease: a review. *Int J Devl Neurosci* 18: 339- 346.

Ding XZ, Tsokos GC, Kiang JG (1998) Overexpression of HSP-70 inhibits the phosphorylation of HSF1 by activating protein phosphatase and inhibiting protein kinase C activity. *FASEB J* 12: 451- 459.

Dixon CE, Lyeth BG, Povlishock JT, Findling RL, Hamm RJ, Marmarou A, Young HF, Hayes RL (1987) A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. *J Neurosurg* 67: 110- 119.

Dore S (1996) Distribution and levels of insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II) and insulin receptor binding sites in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients. *Mol Brain Res* 41: 128- 133.

Dore S, Kar S, Quirion R (1997) Rediscovering an old friend, IGF-I: potential use in treatment of neurodegenerative disease. *TINS* 20: 326- 331.

Dougherty KD, Dreyfus CF, Black IB (2000) Brain- derived neurotrophic factor in astrocytes, oligodendrocytes, and microglia/macrophages after spinal cord injury. *Neurobiol Disease* 7: 574- 585.

Dragunow M, Beilharz E, Sirimanne E, Lawlor P, Williams C, Bravo R, Gluckman P (1994) Immediate early gene protein expression in neurons undergoing delayed death, but not necrosis, following hypoxic- ischemic injury to the young rat brain. *Mol Brain Res* 25: 19- 33.

Dragunow M, Faull R (1989) The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Methods* 29: 261- 265.

Drop SLS, Kortleve DJ, Guyda RJ, Posner BJ (1984) Immunoassay of somatomedin-binding protein from amniotic fluid: levels in fetal, neonatal and adult sera, *J Clin Endocrinol Metab* 59: 908-915.

Du J, Hull EM (1999) Effects of testosterone on neuronal nitric oxide synthase and tyrosine hydroxylase. *Brain Res* 836: 90- 98.

Dubinski JM, Rothman SM (1991) Intracellular calcium concentrations during "chemical hypoxia" and excitotoxic neuronal injury. *J Neurosci* 11: 2545-2551.

Dutcher SA, Underwood BD, Michael DB, Diaz FG, Walker PD (1998) Heat-shock protein 72 expression in excitotoxic versus penetrating injuries of the rodent cerebral cortex. *J Neurotrauma* 15: 421- 432.

Dutcher SA, Underwood BD, Walker PD, Diaz FG, Michael DB (1998) Patterns of heat-shock protein 70 biosynthesis following human traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 15: 411- 420.

Ebadi M, Bashir RM, Heidrick ML, Hamada FM, El Refaey H, Hamed A, Baxi MD, Cerutis DR, Lassi NK (1997) Neurotrophins and their receptors in nerve injury and repair. *Neurochem Int* 30: 347- 374.

Edwards DP, Estes PA, Fadok VA, Bona BJ, Onate S, Nordeen SK, Welch WJ (1992) Heat shock alters the composition of heteromeric steroid receptor complexes and enhances receptor activity in vivo. *Biochemistry* 31: 2482-2491.

Egberongbe YL, Gentleman SM, Falkai P, Bogerts B, Polak JM, Roberts GW (1994) The distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the human brain. *Neuroscience* 59: 561- 578.

Ekert P, McLusky N, Luo XP, Lehotay DC, Smith B, Post M, Tanswell AK (1997) Dexamethasone prevents apoptosis in an neonatal rat model of hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) by a reactive oxygen species-independent mechanism. *Brain Res* 747: 9- 17.

Endoh M, Maiese K, Wagner JA (1994) Expression of the neural form of nitric oxide synthase by CA1 hippocampal neurons and other central nervous system neurons. *Neuroscience* 63: 679- 689.

Ernfors P, Lee KF, Kucera J, Jaenisch R (1994) Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell* 75: 503- 512.

Feinstein DL, Galea E, Reis DJ (1997) Suppression of glial nitric oxide synthase induction by heat shock : effects on proteolytic degradation of I κ B α . *Nitric Oxide Biol Chem* 1: 167- 176.

Fernandez AM, de la Vega AG, Torres- Aleman I. (1998) Insulin- like Growth Factor -I restores motor coordination in a rat model of cerebellar ataxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1253- 1258.

Fernandez AM, Garcia- Estrada J, Garcia- Segura LM, Torres- Aleman I (1997) Insulin-like Growth Factor-I modulates c-Fos induction and astrocytosis in response to neurotoxic insult. *Neuroscience* 76: 117- 122.

Fernandez AM, Gonzalez de la Vega AG, Planas B, Torres- Aleman I. (1999) Neuroprotective actions of peripherally administered Insulin- like Growth Factor -I in the injured olivo-cerebellar pathway. *Eur J Neurosci* 11: 2019- 2030.

Fink KB, Andrews LJ, Butlera WE, Ona VO, Bogdanov MLM, Endres M, Khan SQ, Namura S, Stieg PE, Beal MF, Moskowitz MA, Yuan J, Friedlander RM (1999) Reduction of post-traumatic brain injury and free radical production by inhibition of the caspase-1 cascade. *Neuroscience* 94:1213-1218.

Firschning R, Woischneck D (2001) Present status of neurosurgical trauma in Germany. *World J Surg* 25: 1221- 1223.

Fowlkes JL (1997) Insulin like growth factor binding protein proteolysis: an emerging paradigm is insulinlike growth factor physiology. *Trends Endocrinol Metab* 8: 299- 306.

Freedman MS, Buu NN, Ruijs TC, Williams K, Antel JP (1992) Differential expression of heat shock proteins by human glial cells. *J Neuroimmunol* 41: 231- 238.

Friedman B, Kleinfeld D, Ip NY, Verge VM, Moulton R, Boland P, Zlotchenko E, Lindsay RM, Liu L (1995) BDNF and NT4/5 exert neurotrophic influences on injured adult spinal motor neurons. *J Neurosci* 15: 1044- 1056.

Fuerstein GZ, Wang X, Barone FC (1997) Inflammatory gene expression in cerebral ischemia and trauma. Potential new therapeutic targets. *Ann NY Acad Sci* 15: 179- 193.

Fujisawa H, Ogura T, Kurashima Y, Yokohama T, Yamashita J, Esumi H (1994) Expression of two types of nitric oxide synthase mRNA in human neuroblastoma cell lines. *J Neurochem* 63: 140- 145.

Fuqua SA, Oestarrreich S, Hilsenbeck SG, Von Hoff DD, Eckardt J, Osborne CK (1994) Heat shock proteins and drug resistance. *Breast Cancer Res Treat* 32: 67- 71.

Gaiddon C, Loeffler JP, Larmet Y (1996) Brain- derived neurotrophic factor stimulates AP-1 and cyclic AMP- responsive element dependent transcriptional activity in central nervous system neurons. *J Neurochem* 66: 2279- 2286.

Galiano RD, Zhao LL, Clemmons DR, et al (1996) Interaction between the insulin- like growth factor family and the integrin receptor family in tissue repair processes. Evidence in arabbit ear dermal ulcer model. *J Clin Invest* 98: 2462- 2468.

Gall CM (1993) Seizure- induced changes in neurotrophin expression: Implications for epilepsie. *Exp Neurol* 124: 150- 165.

Garcia- Estrada J, Garcia- Segura LM, Torres- Aleman I (1992) Expression of insulin- like growth factor by astrocytes in rsonse to injury. *Brain Res* 592: 343- 347.

Garcia- Segura LM, Perez J, Pons S, Rejas MT, Torres- Aleman I (1991) Localization of insulin- like growth factor I (IGF-I)- like immunoreactivity in the developing and adult rat brain. *Brain Res* 560: 167-174.

Garofalo RS and Rosen OM (1989) Insulin and insulinlike growth factor 1 (IGF-1) receptors during central nervous system development: expression of two immunologically distinct IGF-1 receptor beta subunits. *Mol Cell Biol* 9: 2806- 2817.

Garthwaite J, Boulton CL (1995) Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Anny Rev Physiol* 57: 683-706.

Gay E, Seurin D, Babajko S, Doublier S, Cazillis M, Binoux M (1997) Liver-specific expression of human insulin like growth factor binding protein-1 in transgenic mice: repercussions on reproduction, ante- and perinatal mortality and postnatal growth. *Endocrinology* 138: 2937-2947.

Gehrmann J (1996) Microglia: a sensor to threats in the nervous system? *Res Virol* 147: 79- 88.

Ghirnikar RS, Lee YL, He TR, Eng LF (1996) Chemokine expression in rat stab wound brain injury. *J Neurosci Res* 46: 727- 733.

Giannakopoulou M, Mansour M, Kazanis E, Bozas E, Philippidis H, Stylianopoulou F (2000) NMDA receptor mediated changes in IGF-II gene expression in the rat brain after injury and the possible role of nitric oxide. *Neuropathol Appl Neurobiol* 26: 513- 521.

Gillespie CM, Merkel AL, Martin AA (1997) Effects of insulin- like growth factor and LR³ IGF-I on regional blood flow in normal rats. *J Endocrinol* 155: 351-358.

Goldberg P, Choi DW (1993) Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci* 13: 3510- 3524.

Grzybicki D, Moore SA, Schelper R, Glabinski AR, Ransohoff RM, Murphy S (1998) Expression of monocyte chemoattractant protein (MCP-1) and nitric oxide synthase-2 following cerebral trauma (1995) *Acta Neuropathol* 95: 98 103.

Guan J, Beiharz EJ, Skinner SJM, Williams CE, Gluckman PD (2000a) Intracerebral transportation and cellular localization of insulin- like growth factor-I following central administration to rats with hypoxic- ischemic brain injury. *Brain Res* 853: 163- 173.

Guan J, Krishnamurti R, Waldvogel HJ, Faull RLM, Clark R, Gluckman P (2000b) N-terminal tripeptide of IGF-I (GPE) prevents the loss of TH positive neurons after 6-OHDA induced nigral lesion in rats. *Brain Res* 859: 286- 292.

Guan J, Williams CE, Skinner SJ, Mallard EC, Gluckman PD. (1996) The effects of Insulin- like Growth Factor (IGF)-I, IGF-II, and des-IGF-I on neuronal loss after hypoxic- ischemic brain injury in adult rats: evidence for a role for IGF binding proteins. *Endocrinology* 137: 893- 898.

Guidon PT, Hightower LE (1986) Purification and initial characterization of the 71-kilodalton rat heat-shock protein and its cognate as fatty acid binding proteins. *Biochemistry* 25: 3231- 3239.

Guler HP, Zapf J, Schmid C, Froesch ER (1989) Insulin- like growth factors I and II in healthy man. Estimations of half-lives and production rates. *Acta Endocrinol* 121: 753-758.

Guthrie KM, Nguyen T, Gall CM (1995) Insulin- like growth factor- 1 mRNA is increased in deafferented hippocampus: spatiotemporal correspondence of a trophic event with axon sprouting. *J Comp Neurol* 352: 147- 160.

Haley JE, Wlcox GL, Chapman PF (1992) The role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 8: 211- 216.

Hall KM, Karzmark P, Stevens M, Englander J, O'Hare P, Wright J (1994) Family stressors in traumatic brain injury: a two-year follow-up. *Arch Phys Med Rehabil* 75: 876- 884.

Hansson HA, Jennisch E, Skottner A (1987) Regenerating endothelial cells express insulin- like growth factor immunoreactivity after arterial injury. *Cell Tiss Res* 2503: 499- 505.

Hatton J, Rapp RP, Kudsk KA, Brown RO, Luer MS, Bukar JG, Chen SA, McClain CJ, Gesundheit N, Dempsey RJ, Young B (1997) Intravenous Insulin-like Growth Factor –I (IGF-I) in moderate-to-severe head injury: a phase II safety and efficacy trial. *J Neurosurg* 86: 779- 786.

Heath DL, Vink R (1999) Brain free magnesium concentration is predictive of motor outcome following traumatic axonal brain injury in rats. *Magnes Res* 12: 269- 277.

Heck S, Lezoualc'h F, Engert S, Behl (1999) Insulin- like Growth Factor –I mediated neuroprotection against oxidative stress is associated with activation of nuclear factor KappaB. *J Biol Chem* 274: 9828- 9835.

Henderson CE, Camu W, Mettling C, Gouin A, Poulsen K, Karihaloo M, Rullamas J, Evans T, McMahon SB, Armanini MP, Berkemeier L, Philips HS, Rosenthal A (1993) Neurotrophins promote motor neuron survival and are present in embryonic limb bud. *Nature* 363: 266- 270.

Heneka MT, Sharp A, Klockgether T, Gavrilyuk V, Feinstein DL (2000) The heat shock response inhibits NF-kappaB activation, nitric oxide synthase type 2 expression, and macrophage/microglial activation in brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 800- 811.

Hicks RR, Li C, Zhang L, Dhillon HS, Prasad MR, Seroogy KB.: 1999b. Alterations in BDNF and trkB mRNA levels in the cerebral cortex following experimental brain trauma in rats. *J Neurotrauma* 16: 501- 510.

Hicks RR, Martin VB, Zhang L, Seroogy KB.: 1999a. Mild experimental brain injury differentially alters the expression of neurotrophin and neurotrophin receptor mRNAs in the hippocampus. *Exp Neurol* 160: 469- 478.

Hicks RR, Numan S, Dhillon HS, Prasad MR, Seroogy KB (1997) Alterations in BDNF and NT-3 mRNAs in rat hippocampus after experimental brain trauma. *Mol Brain Res* 48: 401- 406.

Hill-Felberg SJ, McIntosh TK, Oliver DL, Raghupathi R, Barbarese E (1999) Concurrent loss and proliferation of astrocytes following lateral fluid percussion brain injury in the adult rat. *J Neurosci Res* 15: 271- 279.

Hogg S, Moser PC, Sanger DJ (1998) Mild traumatic lesion of the right parietal cortex of the rat: Selective behavioural deficits in the absence of neurological impairment. *Behav Brain Res* 93: 143- 155.

Holder Y, Peden M, Krug E (2001) Injury surveillance guidelines. Geneva, World Health Organization. Είναι διαθέσιμο στην ιστοσελίδα: http://www.who.int/violence_injury_prevention/index.html.

Horgrer BA, Iyasere CA, Berhow MT, Messer CJ, Nestler EJ, Taylor JR (1999) Enhancement of locomotor activity and conditioned reward to cocaine by brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 19: 4110- 4122.

Hoshino S (1995) The findings indicate that HSP70 expression is closely related to ischemic brain injury, and that HSP70 expression is not related to either breakdown of the blood-brain barrier or reactive axonal changes. *Nippon Ika Daigaku Zasshi* 62: 55- 64.

Houle JD, Ye J-H (1999) Survival of chronically- injured neurons can be prolonged by treatment with neurotrophic factors. *Neuroscience* 94: 929- 936.

Huang PL, Dawson TM, Bredt DS, Snyder SH, Fishman MC (1993) Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* 75: 1273- 1286.

Huemer G, Pernerstorfer T, Mauritz W (1994) Prehospital emergency medicine services in Europe: structure and equipment. *Eur J Emerg Med* 1: 62- 68.

Hughes P, Beilharz E, Gluckman P, Dragunow M (1993) Brain- derived neurotrophic factor is induced as an immediate early gene following N-methyl-D-aspartate receptor activation. *Neuroscience* 57: 319- 328.

Hughes P, Dragunow M (1995) TrkC may be an inducible transcription factor target gene. *NeuroReport* 6: 465- 468.

Hughes PE, Alexi T, Walton M, Williams CE, Dragunow M, Clark RG, Gluckman PD (1999) Activity and injury- dependent expression of inducible transcription factors, growth factors and apoptosis- related genes within the central nervous system. *Prog Neurobiol* 57: 421- 450.

Hughes PE, Alexi T, Yoshida T, Schreiber SS, Knusel B (1996) Excitotoxic lesion of rat brain with quinolinic acid induces expression of p53 messenger RNA and protein and p53-inducible genes BAX and GADD-45 in brain areas showing DANN fragmentation. *Neuroscience* 74: 1143- 1160.

Hughes PE, Young D, Preston KM, Qiao Y, Dragunow M (1998) Differential regulation by MK-801 of immediate early genes, brain- derived neurotrophic

factor and trk receptor mRNA induced by a kindling afterdischarge. *Mol Brain Res* 53: 138- 151.

Humpel C, Wetmore C, Olson L (1993) Regulation of brain-derived neurotrophic factor messenger RNA and protein at the cellular level in pentylentetrazole induced epileptic seizures. *Neuroscience* 53: 909- 908.

Iadecola C, Zhang F, Xu S, Casey R, Ross ME (1995) Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 15: 378- 384.

Ikeda J, Nakajima T, Osborne OC, Mies G, Nowak TJr (1994) Coexpression of c-fos and hsp-70 mRNAs in gerbil brain after ischemia: induction threshold, distribution and time course evaluated by in situ hybridization. *Mol Brain Res* 26: 249- 258.

Ip NY, Li Y, Yancopoulos GD, Lindsay RM (1993) Cultured hippocampal neurons show responses to BDNF, NT-3, NT-4, but not NGF. *J Neurosci Lett* 13: 3394- 3405.

Ivkovic S, Kanazir S, Rakic L, Ehrlich ME, Ruzdijic S (1997) Enhanced serum response element binding activity correlates with down-regulation of c-fos mRNA expression in the rat brain following repeated cortical lesions. *Mol Brain Res* 52: 62- 70.

Iwasaki Y, Ikeda K (1999) Prevention by Insulin- like Growth Factor -I and riluzole in motor neuron death after neonatal axotomy. *J Neurol Sci* 169: 148- 155.

Jacobi G (1992) Post-traumatic epilepsy. *Monatsschr Kinderheilkd* 140: 619- 623.

Jafferli S, Dumont Y, Sotty F, Robitaille Y, Quirion R, Kar S (2000) Insulin-like growth factor- I and its receptor in the frontal cortex, hippocampus, and cerebellum of normal human and Alzheimer disease brains. *Synapse* 38: 450- 459.

Jaques G, Noll K, Wegman B, Witten S, Kogan E, Radulescu RT, Havemann K (1997) Nuclear localization of insulin- like growth factor binding protein 3 in a lung cancer cell line. *Endocrinology* 138: 1767- 1770.

Jones JJ, Clemmons DR (1995) Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 16: 3-34.

Jones JJ, D'Ercole AJ, Camacho- Hubner C, Clemmons DR: 1991. Phosphorylation of insulin-like growth factor (IGF)- binding protein 1 in cell culture and *in vivo*: effects on affinity for IGF-I. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7481-7485.

Jones JJ, Gockerman A, Busby WH, Wright G, Clemmons DR (1993) Insulin-like growth factor binding protein 1 stimulates cell migration and binds to the alpha 5 beta 1 integrin by means of its Arg-Gly-Asp sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10553-10557.

Kar S, Seto D, Dore S, Chabot JG, Quirion R (1997) Systemic administration of kainic acid induces selective time dependent decrease in [125I]insulin-like growth factor I, [125I]insulin-like growth factor II and [125I]insulin receptor binding sites in adult rat hippocampal formation. *Neuroscience* 80: 1041- 1055.

Karger B (1995) Penetrating gunshots to the head and lack of immediate incapacitation. I. Wound ballistics and mechanisms of incapacitation. *Int J Legal Med* 108: 53- 61.

Kato K, Zorumski CF (1993) Nitric oxide inhibitors facilitate the induction of hippocampal long-term potentiation by modulating NMDA response. *J Neurophysiol* 70: 1260- 1263.

Kato-Semba R, Kaisho Y, Shintani A, Nagahama M, Kato K (1996) Tissue distribution and immunocytochemical localization of Neurotrophin-3 in the brain and peripheral tissues of rats. *J Neurochem* 66: 330- 337.

Kaufman HH, Levy ML, Stone JL, Masri LS, Lichtor T, Lavine SD, Fitzgerald LF, Apuzzo ML (1995) Patients with Glasgow Coma Scale scores 3,4 5 after gunshot wounds to the brain. *Neurosurg Clin N Am* 6: 701- 714.

Kawamoto Y, Nakamura S, Nakano S, Oka N, Akiguchi I, Kimura J (1996) Immunohistochemical localization of brain-derived neurotrophic factor in adult rat brain. *Neuroscience* 74: 1209- 1226.

Kay A, Teasdale G (2001) Head injury in the United Kingdom. *World J Surg* 25: 1210- 1220.

Keane JR, Baloh RW (1992) Posttraumatic cranial neuropathies. *Neurol Clin* 10 : 849- 867.

Kelly DF, Becker DP (2001) Advances in management of neurosurgical trauma: USA and Canada. *World J Surg* 25: 1179- 1185.

Kermer P, Klocker N, Labes M, Bahr M (2000) Insulin-like Growth Factor –I protects axotomized rat retinal ganglion cells from secondary death via PI3-K-dependent Akt phosphorylation and inhibition of caspase- 3 in vivo. *J Neurosci* 20: 2- 8.

Kharlamov A, Uz T, Joo J-Y, Manev H (1996) Pharmacological characterization of apoptotic cell death in a model of photothrombotic brain injury in rats. *Brain Res* 734: 1- 9.

Kiang JG, Tsokos GC (1998) Heat shock protein 70kDa: Molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther* 80: 183- 201.

Kim HS, Nagalla SR, Oh Y (1997) Identification of a family of low- affinity insulin- like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12981-12986.

Kinouchi H, Sharp FR, Koistinaho J, Hicks K, Kamii H, Chan PH (1993) Induction of heat shock hsp70 mRNA and HSP70 kDa protein in neurons in the "penumbra" following focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res* 619: 334-338.

Kirschner PB, Jenkins BG, Schulz JB, Finkelstein S, Matthews RT, Rosen BR, Beal MF (1996) NGF, BDNF and NT-5, but not NT-3 protect against MPP+ toxicity and oxidative stress in neonatal animals. *Brain Res* 713: 178- 185.

Kokaia M, Asztely F, Olofsdotter K, Sindreu CB, Kullman DM, Lindvall H (1993) Endogenous neurotrophin-3 regulates short-term plasticity at lateral perforant path granule cell synapses. *J Neurosci* 18: 8730- 8739.

Kokaia Z, Zhao Q, Kokaia M, Elmer E, Metsis M, Smith M-L, Siesjo BK, Lindvall O (1995) Regulation of brain- derived neurotrophic factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion with and without brain damage. *Exp Neurol* 136: 73- 83.

Komoly S, Hudson LD, Webster HD (1992) Insulin-like growth factor I gene expression is induced in astrocytes during experimental demyelination. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1894- 1898.

Kordestani RK, Martin NA, McBride DQ (1995) Cerebral hemodynamic disturbances following penetrating craniocerebral injury and their influence on outcome. *Neurosurg Clin N Am* 6: 657- 667.

Korhonen L, Riikonen R, Nawa H, Lindholm D (1998) Brain- derived neurotrophic factor is increased in cerebrospinal fluid of children suffering from asphyxia. *Neurosci Lett* 240: 151- 154.

Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T (1995) Hippocampal long term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8856- 8860.

Koshinaga M, Katayama Y, Fukushima M, Oshima H, Suma T, Takahata T (2000) Rapid and widespread microglial activation induced by traumatic brain injury in rat brain slices. *J Neurotrauma* 17: 185- 192.

Kotapka MJ, Graham DI, Adams JH, Gennarelli TA (1994) Hippocampal pathology in fatal human head injury without high intracranial pressure. *J Neurotrauma* 11: 317- 324.

Kubo S, Kitamura O, Orihara Y, Ogata M, Tokunaga I, Nakasono I (1998) Immunohistochemical diagnosis and significance of forensic neuropathological changes. *J Med Invest* 44: 109- 119.

Kumura E, Kosaka H, Shiga T, Yoshimine T, Hayakawa T (1994) Elevation of plasma nitric oxide end products during focal cerebral ischemia and reperfusion in the rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 14: 487- 491.

Lander HM, Sehajpal PK, Novogrodjsky A (1993) Nitric oxide signaling: a possible role for G proteins. *J Immunol* 151: 7182-7187.

Lassare C, Binoux M (1994) Insulin- like growth factor binding protein- 3 is functionally altered in pregnancy plasma. *Endocrinology* 134: 1254- 1262.

Lauterborn JC, Lynch G, Vanderklish P, Arai A, Gall CM (2000) Positive modulation of AMPA receptors increases neurotrophin expression by hippocampal and cortical neurons. *J Neurosci* 20: 8- 21.

Layton ME, Pazdernik TL, Samson FE (1997) Cerebral penetration injury leads to H₂O₂ generation in microdialysis samples. *Neurosci Lett* 236: 63- 66.

Lee WH, Wang GM, Yang XL, Seaman LB, Vannucci SI (1999) Perinatal hypoxia- ischemia decreased neuronal but increased cerebral vascular endothelial IGFBP3 expression. *Endocrine* 11: 181- 188.

Leibrock J, Lottspeich F, Hohn M, Hengerer B, Masiakowski P, Thoenen H, Barde Y-A (1989) Molecular cloning and expression of brain- derived neurotrophic factor. *Nature* 341: 149- 152.

LeRoith D, Roberts CT (1991) Insulin-like growth factor I (IGF-I): a molecular basis for endocrine vs. local action? *Mol Cell Endocrinol* 77: C57- C61.

Lesniak MA, Hill JM, Kiess W, Rojeski M, Pert CB, Roth J (1988) Receptors for insulin like growth factor-I and II: Autoradiographic localization in rat brain and comparison to receptors for insulin. *Endocrinology* 123: 2089- 2099.

Lessman V (1998) Neurotrophin- dependent modulation of glutamatergic synaptic transmission in the mammalian CNS. *Gen Pharmacol* 31: 667- 674.

Levin HS, Benavidez DA, Verger-Maestre K, Perachio N, Song J, Mendelsohn DB, Fletcher JM (2000) Reduction of corpus callosum growth after severe traumatic brain injury in children. *Neurology* 8: 647- 653.

- Li GC, Yang S-H, Kim D, Mussenweig A, Ouyang H, Wei J, Burgman P, Li L (1995) Suppression of heat- induced hsp 70 expression by the 70-kDa subunit of the human Ku autoantigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4512- 4516.
- Li W, Fawcett J, Widmer HR, Fielder PJ, Rabkin P, Keller GA (1997) Nuclear transport of insulin- like growth factor –I and insulin- like growth factor binding protein- 3 in opossum kidney cells. *Endocrinology* 138: 1763- 1766.
- Li X, Williams M, William PB (1998) Induction of IGF-I mRNA expression following traumatic injury to the postnatal brain. *Mol Brain Res* 57: 92- 96.
- Li Y, Zhang ZG, Zhang RL, Garcia JH (1993) Neuronal survival is associated with 72-kDa heat shock protein. *J Neurol Sci* 128: 134- 142.
- Lindholm D, Carroll P, Tzimagiogis G, Thoenen H, (1996) Autocrine paracrine regulation of hippocampal neuron survival by IGF-I and the neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4. *Eur J Neurosci* 8: 1452- 1460.
- Lindvall O, Ernfors P, Bengzon J, Kokaia Z, Smith ML, Siesjo BK, Persson H (1992) Differential regulation of mRNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 3 in the adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma. *Proc Natl Acad* 89: 648- 652.
- Lipton P, Kalil R (1995) Neurotrophic factors-Their role in development, trauma and disease. *Neural Notes* 1: 3- 10.
- Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A (1993) Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type I IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75: 59- 72.
- Livingston MG, Brooks DN, Bond MR (1985) Three months after severe head injury: psychiatric and social impact on relatives. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 48: 870.
- Lotan M, Schwartz M (1994) Cross talk between the immune system and the nervous system in response to injury: implications for regeneration. *FASEB J* 8: 1026- 1033.
- Lowenstein DH, Thomas MJ, Smith DH, McIntosh TK (1992) Selective vulnerability of dentate hilar neurons following traumatic brain injury: a potential mechanistic link between head trauma and disorders of the hippocampus. *J Neurosci* 12: 4846- 53.
- Ludwin SK (1984) Proliferation of mature oligodndrocytes after trauma to the central nervous system. *Nature* 308: 274- 275.
- Ludwin SK (1988) Remyelination in the central nervous system and the peripheral nervous system. *Adv Neurol* 47: 215- 254.

Lyeth BG, Hayes RL (1992) Cholinergic and opioid mediation of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 9: S463- S474.

Maisonpierre PC, Belluscio L, Squinto S, Ip NY, Furth ME, Lindsay RM, Yancopoulos GD (1990) Neurotrophin 3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* 247: 1446- 1451.

Majno G, Joris I (1995) Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. *Am J Pathology* 146: 3- 15.

Malinski T, Bailey F, Zhang ZG, Chopp M (1993) Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 13: 355- 358.

Manzoni O, Bockaert J (1993) Nitric oxide synthase activity endogenously modulates NMDA receptors. *J Neurochem* 61: 368- 370.

Marber MS, Mestrlil R, Chi SH, Sayen MR, Yellon DM, Dillman WH (1995) Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J Clin Invest* 95: 1446- 1456.

Markowska AL, Mooney M, Sonntag WE (1998) Insulin- like Growth Factor- I ameliorates age- related behavioral deficits. *Neuroscience* 87: 559- 569.

Marmarou A, Montasser A, Foda A-E, van de Brink W, Campbell J, Kita H, Demetriadou K (1994) A new model of diffuse brain injury in rats. *J Neurosurg* 80: 291- 300.

Mason JL, Ye P, Suzuki K, D'Ercole AJ, Matsushima GK (2000) Insulin-like growth factor-1 inhibits mature oligodendrocyte apoptosis during primary demyelination. *J Neurosci* 20: 5703- 5708.

Massa SM, Swanson RA, Sharp FR (1996) The stress gene response in brain. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 8: 95- 158.

McAllister AK, Katz LC, Lo DC (1997) Opposing roles for endogenous BDNF and NT-3 in regulating cortical dendritic growth. *Neuron* 18: 767- 778.

McDonald JW, Althomsons SP, Hyrc KL, Choi DW, Goldberg MP (1998) Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/Kainate receptor-mediated excitotoxicity. *Nat Med* 4: 291- 297.

McDonald NQ and Chao MV (1995) Structural determinants of neurotrophin action. *J Biol Chem* 270: 19669- 19672.

McGregor K, Pentland B (1997) Head injury rehabilitation in the U.K.: an economic perspective. *Soc Sci Med* 45: 295- 303.

McIntosh TK, Smith DH, Meaney DF, Kotapka MJ, Gennarelli TA, Graham DI (1996) Neuropathological sequelae of traumatic brain injury: relationship to neurochemical and biomechanical mechanisms. *Lab Inv* 74: 315- 342.

McIntosh TK, Yu T, Gennarelli TA (1994) Alterations in regional brain catecholamin concentrations after experimental brain injury in the rat. *J Neurochem* 63: 1426- 1433.

McMordie WR, Barker SL (1988) The financial trauma of head injury. *Brain Inj* 2: 357- 364.

McMorris FA, Dubois- Dalcq M (1988) Insulin- like growth factor I promotes cell proliferation and oligodendroglial commitment in rat glial progenitor cells developing. *J Neurosci Res* 21: 199- 209.

McMorris FA, Mozell RL, Carson MJ, Shinar Y, Meyer RD, Marchetti N (1996): Regulation of oligodendrocyte development and central nervous system myelination by insulin-like growth factors. *Ann NY Acad Sci* 692: 31- 334.

Merlio JP, Ernfora P, Kokaia Z, Middlemas DS, Bengzon J, Kokaia M, Smith ML, Siesjo BK, Hunter T, Lindvall O, et al (1993) Increased production of the TrkB protein tyrosine kinase receptor after brain insult. *Neuron* 10: 151-164.

Michel T, Li GK, Busconi L (1993) Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6252- 6256.

Mohan SM, Bautista CM, WergetalnJ, Baylinf DJ (1989) Isolation of an inhibitory Insulin like growth factor (IGF) binding protein from bone cell-conditioned medium: potential local regulator of IGF action. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 8338-8342.

Montasser A, Foda A-E, Marmarou A (1994) A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: Morphological characterization. *J Neurosurg* 80: 301-313.

Moorehead JF (1995) Cost-effective rehabilitation: Part 1—Basic principles. *Physician Exec* 21: 32- 36.

Morgan DO, Edman JC, Standring DN, Fried VA, Smith MC, Roth RA, Rutter WJ (1987) Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. *Nature* 329: 301- 307.

Moritz GC, Tenorio F, Allodi S, Mendez-Otero R (1999) Expression of nitric oxide synthase in the developing rat hippocampus. *Neurosci Lett* 263: 89- 92.

Motte J, da Silva Fernandes MJ, Baram TZ, Nehlig A (1998) Spatial and temporal evolution of neuronal activation, stress and injury in lithium-pilocarpine seizures in adult rats. *Brain Res* 793: 61- 72.

- Mottola C, MacDonald RG, Brackett JL, Mole JE, Anderson JK, Czech MP (1986) Purification and amino-terminal sequence of an insulin-like growth factor-binding protein secreted by rat liver BRL3a cells. *J Biol Chem* 261: 11180-11188.
- Mucke L, Oldstone MBA, Morris JC, Nerenberg MI (1991) Rapid activation of astrocyte-specific expression of GFAP-lacZ transgene by focal injury. *The New Biologist* 3: 465- 474.
- Mudo G, Persson H, Timmusk T, Funakoshi H, Bindoni M, Belluardo N (1993) Increased expression of trkB and trkC messenger RNAs in the rat forebrain after focal mechanical injury. *Neuroscience* 57: 901- 912.
- Mufson EJ, Kroin JS, Sendera TJ, Sobreviela T (1999) Distribution and retrograde transport of trophic factors in the central nervous system : Functional implications for the treatment of neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol* 57: 451- 484.
- Murphy DD, Cole NB, Segal M (1998) Brain-derived neurotrophic factor mediates estradiol-induced dendritic spine formation in hippocampal neurons. *Neurobiol* 95: 11412- 11417.
- Murray GD, Teasdale GM, Braakman R, Cohadon F, Dearden M, Iannotti F, Karimi A, Lapierre F, Maas A, Ohman J, Persson L, Servadei F, Stocchetti N, Trojanowski T, Uteberg A (1999) The European Brain Injury Consortium Survey of Head Injuries. *Acta Neurochir (Wien)* 141: 223- 236.
- Napieralski JA, Raghupathi R, McIntosh TK (1999) The tumor-suppressor gene, p53, is induced in injured brain regions following experimental traumatic brain injury. *Brain Res Mol Brain Res* 71: 78- 86.
- Nathan C (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6: 3051- 3064.
- Nathan C, Xie Q (1994) Regulation of Biosynthesis of Nitric Oxide. *J Biol Chem* 269: 13725- 13728.
- Ng I, Yeo TT, Tang WY, Soong R, Ng PY, Smith DR (2000) Apoptosis occurs after cerebral contusions in humans. *Neurosurg* 46: 949- 956.
- Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Renman BW, Wishnock JS, Tannenbaum SR (1992) DANN damage and mutation of human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3030- 3034.
- Niblock MM, Brunson- Bechtold JK, Riddle DR (2000) Insulin-like Growth Factor -I stimulates dendritic growth in primary somatosensory cortex. *J Neurosci* 20: 4165- 4176.

- Nitta A, Fukumitsu H, Kataoka H, Nomoto H, Furukawa S (1997) Administration of corticosterone alters intracellular localization of brain-derived neurotrophic factor-like immunoreactivity in the rat brain. *Neurosci Lett* 226: 115- 118.
- Nordqvist AC, Holmin S, Nilsson M, Mathiesen T, Schalling M (1997) MK-801 inhibits the cortical increase in IGF-I, IGFBP-2 and IGFBP-4 expression following trauma. *Neuroreport* 8: 455- 460.
- Nordqvist AC, von Holst H, Holmin S, Sara VR, Bellander B-M, Schalling M (1996) Increase of insulin-like growth factor (IGF)-1 binding protein-2 and -4 mRNAs following cerebral contusion. *Mol Brain Res* 38: 285- 293.
- Nowak TS, Osborne OC, Suga S (1993) Stress protein and proto-oncogene expression as indicators of neuronal pathophysiology after ischemia. *Prog Brain Res* 96: 195- 208.
- O'Donnel P, Grace AA (1997) Cortical afferents modulate striatal gap junction permeability via nitric oxide. *Neuroscience* 76: 1- 5.
- O'Kusky JR, Ye P, D'Ercole AJ (2000) Insulin-like growth factor-I promotes neurogenesis and synaptogenesis in the hippocampal dentate gyrus during postnatal development. *J Neurosci* 20: 8435- 8442.
- Oestern HJ (1999) Management of polytrauma patients in an international comparison. *Unfallchirurg* 102: 80- 91.
- Oka A, Belliveau MJ, Rosenberg PA, Volpe JJ (1993) Vulnerability of oligodendroglia to glutamate: pharmacology, mechanisms, and prevention. *J Neurosci* 13: 1441- 1453.
- Osberg JS, Brooke MM, Baryza MJ, Rowe K, Lash M, Kahn P (1997) Impact of childhood brain injury on work and family finances. *Brain Inj* 11: 11- 24.
- Overgaard J, Mosdal C, Tweed WA: (1981) Cerebral circulation after head injury. III. Does reduced regional cerebral blood flow determine recovery of brain function after blunt head injury? *J Neurosurg* 55: 63.
- Oyesiky NM, Evans C-O, Houston S, Darrell RS, Smith JS, Fulop ZL, Dixon CE, Stein DG (1999) Regional changes in the expression of neurotrophic factors and their receptors following acute traumatic brain injury in the adult rat brain. *Brain Res* 833: 161- 172.
- Palmer AM, Marion DW, Botscheler ML, Bowen DM, DeKosky ST (1994) Increased transmitter amino acid concentration in human ventricular CSF after brain trauma. *Neuroreport* 6: 153- 156.

Palmer AM, Marion DW, Botscheler ML, Swedlow PE, Styren SD, DeKosky ST (1993) Traumatic brain injury-induced excitotoxicity assessed in a controlled cortical impact model. *J Neurochem* 61: 2015- 2024.

Pan W, Kastin AJ (2000) Interactions of IGF-I with the blood- brain barrier in vivo and in situ. *Neuroendocrinology* 72: 171- 178.

Pardridge WM (1993) Transport of insulin-related peptides and glucose across the blood-brain barrier. *Ann NY Acad Sci* 692: 126- 137.

Park C-O, Yi H-G (2001) Apoptotic change and NOS activity in the experimental animal diffuse axonal injury model. *Yonsei Med J* 42: 518- 526.

Park HK, Fernandez I, Dujovny M, Diaz FG (1999) Experimental animal models of traumatic brain injury: medical and biomechanical mechanism. *Crit Rev Neurosurg* 9: 44- 52.

Passarelli F, Angeleti B, Orru D, Orzi F, D'Ambrosio E (1994) Effects of electroconvulsive shock on the levels of hsp70 and hsc73 mRNA in the rat brain. *Neurosci Lett* 177: 147- 150.

Paxinos G, Watson C (1986) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press Inc. 2nd Edition.

Peterson DA, Lucidi-Phillipi CA, Eagle KL, Gage FH (1994) Perforant path damage results in progressive neuronal death and somal atrophy in layer II of entorhinal cortex and functional impairment with increasing postdamage age. *J Neurosci* 14: 6872- 6885.

Peunova N, Enikolopov G (1995) Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. *Nature* 375: 68- 73.

Pierce JES, Smith DH, Trojanowski JQ, McIntosh TK (1998) Enduring cognitive, neurobehavioral and histopathological changes persist for up to one year following severe experimental brain injury in rats. *Neuroscience* 87: 359- 369.

Planas AM (1997b) Cell membrane alterations and protein synthesis in experimental models of cerebral ischemia: pharmacological implications in the treatment of ischemic disease. *Neurologia* 12: 405- 417.

Planas AM, Soriano MA, Estrada A, Sanz O, Martin F, Ferrer I (1997a) The heat shock stress response after brain lesions: induction of 72 kDa heat shock protein (cell types involved, axonal transport, transcriptional regulation) and protein synthesis inhibition. *Prog Neurobiol* 51: 607- 636.

Plumier JC, Armstrong JN, Wood NI, Babity JM, Hamilton TC, Hunter AJ, Robertson HA, Currie RW (1997) Differential expression of c-fos, Hsp70 and

Hsp27 after photothrombotic injury in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 45: 239- 246.

Podulso JF, Curran GL (1996) Permeability at the blood- brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. *Mol Brain Res* 36: 280- 286.

Pohl D, Bittigau P, Ishimaru MJ, Stadthaus D, Hubner C, Olney JW, Turski L, Ikonomidou C (1999) N-Methyl-D-aspartate antagonists and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2508- 2513.

Polvishock JT, Christman CW (1995) The pathology of traumatically induced axonal injury in animals and humans: A review. *J Neurotrauma* 12: 555- 564.

Portera-Cailliau C, Hedreen JC, Price DL, Koliatsos VE (1995) Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. *J Neurosci* 15: 3775- 3787.

Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ (1997) Non-NMDA and NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal deaths in adult rat brain are morphologically distinct: Further evidence for an apoptosis necrosis continuum. *J Comp Neurol* 378: 88- 104.

Pulford BE, Whalen LR, Ishii DN (1999) Peripherally administered Insulin-like Growth Factor -I preserves hindlimb reflex and spinal cord noradrenergic circuitry following a central nervous system lesion in rats. *Exp Neurol* 159: 114- 123.

Radjev S, Sharp FR (2000) Stress proteins as molecular markers of neurotoxicity. *Toxicol Pathol* 28: 105- 112.

Rajkumar WNK, Nagy JI, Murphy LJ (1997) Impaired brain development and reduced astrocyte response to injury in transgenic mice expressing IGF binding protein- I. *Brain Res* 769: 97- 107.

Rao VL, Dogan A, Bowen KK, Dempsey RJ (1999) Traumatic injury to rat brain upregulates neuronal nitric oxide synthase expression and L-[3H]nitroarginine binding. *J Neurotrauma* 16: 865- 877.

Ray J, Peterson DA, Schinstine M, Gage FH (1993) Proliferation, differentiation, and long-term culture of primary hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3602- 3606.

Rechler MM, Clemmons DR (1998) Regulatory actions of Insulin-like Growth Factor-binding Proteins. *TEM* 9: 176- 183.

Reider-Groswasser I, Cohen M, Costeff H, Groswasser Z (1993) Late CT findings in brain trauma: Relationship to cognitive and behavioral sequale and to vocational outcome. *AJR* 160: 147- 152.

Reif DW, Simmons RD (1990) Nitric oxide mediates iron release from ferritin. *Arch Biochem Biophys* 283: 537- 541.

Reinhardt RR, Bondy CA (1994) Insulin-like growth factors cross the blood-brain barrier. *Endocrinology* 135: 1753- 1761.

Revielta M, Castano A, Venero JL, Machado A, Cano J (2001) Long- lasting induction of brain- derived neurotrophic factor is restricted to resistant cell populations in an animal model of status epilepticus. *Neuroscience* 103: 955- 969.

Reynolds AJ, Bartlett SE, Hendry IA (2000) Molecular mechanisms regulating the retrograde axonal transport of neurotrophins. *Brain Res Rev* 33: 169- 178.

Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH (1997) Reactive astrocytes : cellular and molecular cues to biological function. *TINS* 20: 570- 577.

Rink A, Fung K-M, Trojanowski JQ, Lee VM-Y, Neugebauer E, McIntosh TK (1995) Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat. *Am J Pathol* 147: 1575- 1583.

Ritossa F (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18: 571- 573.

Roberts CT Jr (1996) Control of insulin- like growth factor (IGF) action by regulation of IGF-I receptor expression. *Endocr J* 43 Suppl: S49- S55.

Rockich KT, Hatton JC, Kryscio RJ, Young BA, Blouin RA (1999) Effect of recombinant human growth hormone and Insulin- like Growth Factor –I administration on IGF-I and IGF- binding protein- 3 levels in brain injury. *Pharmacotherapy* 19: 1432- 1436.

Rogove AD, Tsirka SE (1998) Neurotoxic response by microglia elicited by excitotoxic injury in the mouse hippocampus. *Curr Biol* 8: 19-25.

Russel JW, Windebannk AJ, Schenone A, Feldman EL (1998) Insulin- like Growth Factor –I prevents apoptosis in neurons after nerve growth factor withdrawal. *J Neurobiol* 36: 455- 467.

Ryu BR, Ko HW, Noh JS, Gwag BJ (1999) Phosphatidylinositol 3-kinase-mediated regulation of neuronal apoptosis and necrosis by insulin and IGF-I. *J Neurobiol* 39: 536- 546.

Saatman KE, Contreras PC, Smith DH, Raghupathi R, McDermott KL, Fernandez SC, Sanderson KL, Voddi M, McIntosh TK (1997) Insulin- like

Growth Factor -I (IGF-I) improves both neurological motor and cognitive outcome following experimental brain injury. *Exp Neurol* 147: 418- 427.

Salazar AM, Schwab K, Grafman JH (1995) Penetrating injuries in the Vietnam war. Traumatic unconsciousness, epilepsy, and psychosocial outcome. *Neurosurg Clin N Am* 6: 715- 726.

Samali A, Cotter TG (1996) Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Exp Cell Res* 223: 163- 170.

Sandberg K, Berry CJ, Rogers TB (1989) Studies on the intoxication pathway of tetanus toxin in the art pheochromocytoma (PC12) cell line. Binding, internalization, and inhibition of acetylcholine release. *J Biol Chem* 264: 5679- 5686.

Sandberg Nordqvist A-C, von Holst H, Holmin S, Sara VR, Bellander B-M, Scalling M (1996) Increase of insulin- like growth factor (IGF)- I, IGF binding protein- 2 and -4 mRNAs following cerebral contusion. *Mol Brain Res* 38: 285- 293.

Sano K, Nanba H, Tabuchi A, Tsuchiya T, Tsuda M (1996) BDNF gene can be activated by Ca²⁺ signals without involvement of de novo AP-1 synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 24: 788- 793.

Santacana M, Uttenthal LO, Bentura ML, Fernandez AP, Serrano J, Martinez de Velasco J, Alonso D, Martinez-Murillo R, Rodrigo J (1998) Expression of neuronal nitric oxide synthase during embryonic development of the rat cerebral cortex. *Brain Res Dev Brain Res* 111: 205- 222.

Sara VR, Carlsson-Skwirut C, Bergman T, Jornvall H, Roberts PJ, Crawford M, Hakansson LN, Civalero I, Nordberg A (1989) Identification of Gly-Pro-Glu (GPE), the aminoterminal tripeptide of insulin-like growth factor 1 which is truncated in brain, as a novel neuroactive peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 165: 766- 771.

Scarisbrick IA, Isackson PJ, Windebank AJ (1999) Differential expression of brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-3/4 in the adult rat spinal cord: regulation by the glutamate receptor agonist kainic acid. *J Neurosci* 19: 7757-7769.

Schaaf MJ, Hoetelmans RW, de Kloet ER, Vreugdenhil E (1997) Corticosterone regulates expression of BDNF and trkB but not NT-3 and trkC mRNA in the rat hippocampus. *J Neurosci Res* 48: 334- 341.

Schechterson LC and Bothwell M (1992) Novel roles for neurotrophins are suggested by BDNF and NT-3 mRNA expression in developing neurons. *Neuron* 9: 449- 463.

Scheepens A, Williams CE, Breier BH, Guan J, Gluckman PD (2000) A role for the somatotrophic axis in neural development, injury and disease. *J Pediatr Endocrinol Metab* 13 Suppl 6: 1483- 1491.

Schlessinger J, Ullrich A (1992) Growth factor signaling by receptor signaling tyrosine kinases. *Neuron* 9: 383- 391.

Schuman EM, Madison DV (1992) A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science* 254: 1503- 1506.

Shapira Y, Shohami E, Sidi A, Soffer D, Freeman S, Cotev S (1988) Experimental closed head injury in rats: Mechanical, pathophysiologic, and neurologic properties. *Crit Care Med* 16: 258- 265.

Sharma HS, Nyberg F, Gordh T, Alm P, Westman J (2000) Neurotrophic factors influence upregulation of constitutive isoform of heme oxygenase and cellular stress response in the spinal cord following trauma. *Amino Acids* 19: 351- 361.

Sharma HS, Nyberg F, Gordh T, Alm P, Westman J (1997) Topical application of Insulin-like Growth Factor-I reduces edema and upregulation of neuronal nitric oxide synthase following trauma to the rat spinal cord. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 70: 130- 133.

Sharp FR, Kinouchi H, Koistinaho J, Chan PH, Sagar SM (1993) Hsp70 heat shock gene regulation during ischemia. *Stroke* 24(12 Suppl): I72-75.

Sharp FR, Stephen M, Swanson M, Swanson RA (1999) Heat-shock protein protection. *TINS* 22: 97- 99.

Sherrard RM (1997) Insulin-like growth factor 1 induces climbing fibre re-innervation of the rat cerebellum. *Neuroreport* 8: 3225- 3228.

Shi Y, Thomas J (1992) The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol Cell Biol* 12: 2186- 2192.

Shibata M, Hisahara S, Hara H, Yamawaki T, Fukuuchi Y, Yuan JH, Miura M (2000) Caspases determine the vulnerability of oligodendrocytes in ischemic brain. *J Clin Invest* 106: 643- 653.

Shibuki K, Okada D (1991) Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in cerebellum. *Nature* 349: 326- 328.

Shieh PB, Ghosh A (1999) Molecular mechanisms underlying activity-dependent regulation of BDNF expression. *J Neurobiol* 41: 127- 134.

Shimashaki S, Shimonaka M, Ui M, Ling N (1990) Structural characterization of a follicle-stimulating hormone action inhibitor in porcine ovarian follicular

fluid. Its identification as the insulin-like growth factor – binding protein. *J Biol Chem* 265: 2198-2202.

Skoglosa Y, Lewen A, Takei N, Hillered L, Lindholm D (1999) Regulation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its receptor type 1 after traumatic brain injury: comparison with brain- derived neurotrophic factor and the induction of neuronal cell death. *Neuroscience* 90: 235- 247.

Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM (1995) Stress and glucocorticoids alter the expression of brain- derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA in the hippocampus. *J Neurosci* 13: 1768- 1777.

Soares HD, Hicks RR, Smith DH, McIntosh TK (1995) Inflammatory leukocytic recruitment and diffuse neuronal degeneration are separate pathological processes resulting from traumatic brain injury. *J Neurosci* 15: 8223- 8233.

Soderstrom S, Ebendal T (1995) The levels of neurotrophin-3 protein in the rat brain determined by enzyme immunoassay show a pattern distinct from nerve growth factor. *Neurosci Lett* 189: 5-8.

Song DK, Choe B, Bae JH, Park WK, Han IS, Ho wk, Earm YE (1998) Brain-derived neurotrophic factor rapidly potentiates synaptic transmission through NMDA, but suppresses it through non-NMDA receptors in rat hippocampal neuron. *Brain Res* 799: 176- 179.

Sonntag WE, Lynch CD, Benret SA, Khan AS, Thornton PL, Cooney PT, Ingram RL, McShane T, Brunso- Bechtold JK (1999) Alterations in insulin-like growth factor- 1 gene and protein expression and type 1 insulin- like growth factor receptors in the brain of ageing rats. *Neuroscience* 88: 269- 279.

Sonntag WE, Lynch CD, Cooney PT, Hutchins PM (1997) Decrease in cerebral microvasculature with age are associated with the decline in growth hormone and insulin- like growth factor- I. *Endocrinology* 138: 3515- 3520.

Soriano MA, Ferrer I, Rodriguez-Farre E, Planas AM (1995) Expression of c-fos and inducible hsp-70 mRNA following a transient episode of focal ischemia that had non-lethal effects on the rat brain. *Brain Res* 670: 317- 320.

Southam E, Garthwaite J (1993) The nitric oxide cyclic GMP signaling pathway in rat brain. *Neuropharmacology* 32: 1267- 1277.

Stojkovic T, Colin C, LeSaux F, Jacque C (1998) Specific pattern of nitric oxide synthase expression in glial cells after hippocampal injury. *Glia* 22: 329- 337.

Stricker NL, Christopherson KS, Yi BA, Schatz PJ, Raab RW, Dawes G, Bassett DE, Bredt DS, Li M. (1997) PDZ domain of neuronal nitric oxide

synthase recognizes novel C-terminal peptide sequences. *Nat Biotechnol* 15 : 336- 342.

Stylianopoulou F, Efstratiadis A, Herbert J, Pintar J (1988a) Pattern of insulin-like growth factor II expression during rat embryogenesis. *Development* 103: 497- 506.

Stylianopoulou F, Herbert J, Soares MB, Efstratiadis A (1988b) Expression of the insulin-like growth factor II gene in the choroid plexus and the leptomeninges of the adult rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 141- 145.

Tabuchi A, Nakaoka R, Amano K, Yukimine M, Andoh T, Kuraishi Y, Tsuda M (2000) Differential activation of BDNF gene promoters I and III by Ca(sup 2+) signals evoked via L- type- voltage dependent and NMDA-receptor Ca (sup 2+)- channels. *J Biol Chem* 22: 17269-75.

Takano M, Arai T, Hiromatsu K, Kobayashi N, Nimura Y, Yoshikai Y (1998) Dibutylryl cyclic adenosine monophosphate protects mice against tumor necrosis factor- α -induced hepatocyte apoptosis accompanied by increased heat shock protein 70 expression. *Cell Stress Chaperons* 3: 109- 117.

Tamatani M, Ogawa S, Nunez G, Tohyama M. (1998) Growth factors prevent changes in Bcl-2 and Bax expression and neuronal apoptosis induced by nitric oxide. *Cell Death Differ* 5: 911- 919.

Tapanainen PJ, Bang P, Muller HL, Wilson K, Rosenfeld RG (1997) Hypoxia-induced changes in insulin- like growth factors and their binding proteins in pregnant rats. *Horm Res* 48: 227- 234.

Taylor TG, Sharma VS (1992) Why NO? *Biochemistry* 31: 2847- 2849.

Temkin NR, Dikmen SS, Winn HR (1991) Management of head injury. Posttraumatic seizures. *Neurosurg Clin N Am* 2: 425- 435.

Thissen J-P, Ketelslegers J-M, Underwood LE (1994) Nutritional regulation of the insulin- like growth factors. *Endocrine Reviews* 15: 80-101.

Thompson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456- 1462.

Tonra JR, Curtis R, Wong V, Cliffer KD, Park JS, Timmes A, Nguyen T, Lindsay RM, Acheson A, DiStefano PS (1998) Axotomy upregulates the anterograde transport and expression of brain- derived neurotrophic factor by sensory neurons. *J Neurosci* 18: 4374- 4383.

Truettner J, Schmidt- Kastner R, Busto R, Alonso OF, Loor JY, Dietrich WD, Ginsberg MD (1999) Expression of brain- derived neurotrophic factor, nerve

growth factor, and heat shock protein HSP70 following fluid percussion brain injury in rats. *J Neurotrauma* 16: 471- 486.

Tsuiki K, Takada A, Nagahiro S, Grdisa M, Diksic M, Lappius HM (1995) Synthesis of serotonin in traumatized rat brain. *J Neurochem* 64: 1319- 1325.

Tzeng SF, Wu JP (1999) Responses of microglia and neural progenitors to mechanical brain injury. *Neuroreport* 10: 2287- 2292.

Vaughn SL, King A (2001) A survey of state programs to finance rehabilitation and community services for individuals with brain injury. *J Head Trauma Rehabil* 16: 20- 33.

Vergani L, Losa M, Lesma E, Di Giulio AM, Torsello A, Muller EE, Gorio A (1999) Glycosaminoglycans boost Insulin- like Growth Factor –I promoted neuroprotection: blockade of motor neuron death in wobbler mouse. *Neuroscience* 93: 565- 572.

Von Knethen A, Callsen D, Brune B. (1999) NF-kappaB and AP-1 activation by nitric oxide attenuated apoptotic cell death in RAW 264.7 macrophages. *Mol Biol Cell* 10: 361- 372.

Wagstaff MJ, Smith J, Collaco-Moraes Y, de Belleruche JS, Voellmy R, Coffin RS, Latchman DS (1998) Delivery of a constitutively active form of the heat shock factor using a virus vector protects neuronal cells from thermal or ischaemic stress but not from apoptosis. *Eur J Neurosci* 10: 3343- 3350.

Walsh G (1995) Nervous excitement over neurotrophic factors. *Biotechnology* 13: 1167- 1171.

Walter HJ, Berry M, Hill DJ, Logan A (1997) Spatial and temporal changes in the Insulin- like Growth Factor (IGF) axis indicate autocrine/ Paracrine actions of IGF-I within wounds of the rat brain. *Endocrinology* 138: 3024- 3034.

Wang JM, Hayashi T, Zhang WR, Sakai K, Shiro Y, Abe K (1999a) Insulin-like Growth Factor –I affects expressions of cyclin- dependent kinase 5 and its activator p35 in reperfused rat brain. *Neurosci Lett* 17: 17- 20.

Wang PH, Schaaf GJ, Chen WH, Feng J, Prins BA, Levin ER, Bahl JJ (1998) IGF I induction of p53 requires activation of MAP kinase in cardiac muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 245: 912-917.

Wang Y, Newton DC, Marsden PA (1999b) Neuronal NOS: gene structure, mRNA diversity, and functional relevance. *Crit Rev Neurobiol* 13: 21- 43.

Werther GA, Abate M, Hogg A, Cheesman H, Oldfield B, Hards D, Hudson P, Power B, Freed K, Herington AC (1990) Localization of insulin- like growth factor- I mRNA in rat brain by in situ hybridization—relationship to IGF-I receptors. *Mol Endocrinol* 4: 773- 778.

White MF and Kahn CR (1994) The insulin signaling system. *J Biol Chem* 269: 1- 4.

White RM, Nissley SP, Moses AC, Rechler MM, Johnsonbauch RE: (1981) The growth hormone dependence of a somatomedin- binding protein in human serum. *J Clin Endocrinol Metab* 53: 49-57.

Wildburger R, Zarkovic N, Leb G, Borovic S, Zarkovic K, Tetzber F (2001) Post- traumatic changes in insulin- like growth factor type I and growth hormone in patients with bone fractures and traumatic brain injury. *Wien Klin Wochenschr* 113: 119- 126.

Williams JH, Li Y-G, Nayak A, Errington ML, Murphy KPSJ, Bliss TVP (1993) The suppression of long-term potentiation in rat hippocampus by inhibitors of nitric oxide synthase is temperature and age dependent. *Neuron* 11: 877- 884.

Wong JYF, Liberatore GT, Donnan GA, Howells DW (1997) Expression of brain- derived neurotrophic factor and TrkB neurotrophin receptors after striatal injury in the mouse. *Exp Neurol* 148: 83- 91.

Wood TL, Berelowitz M, Gelato MC, Roberts Jr CT, LeRoith D, Millard WJ, McKelvy JF (1991) Hormonal regulation of rat hypothalamic neuropeptide mRNAs: effect of hypophysectomy and hormone replacement on growth hormone releasing factor, somatostatin and IGFs. *Neuroendocrinology* 53: 298-305.

Woods AG, Guthrie KM, Kurlawalla MA, Gall CM (1998) Deafferentation-induced increases in hippocampal insulin-like growth factor-I messenger RNA expression are severely attenuated in middle aged and aged rats. *Neuroscience* 83: 663- 668.

Woods KA, Camacho- Hubner C, Savage MO, Clark AJ (1996) Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med* 335: 1363- 1367.

Xie D, Schultz RL, Whitter EF (1995) The oligodendroglial reaction to brain stab wounds: an immunohistochemical study. *J Neurocytol* 24: 435- 448.

Yamanaka K, Kumura E, Iwatsuki K, Yoshimine T, Masana Y, Hayakawa T, Shiga T, Kosaka H (1995) Increase in plasma nitric oxide end products following rat cortical injury. *Neurosci Lett* 194: 124- 126.

Yamanaka Y, Wilson EM, Rosenfeld G, Oh Y (1997) Inhibition of insulin receptor activation by insulin- like growth factor binding proteins. *J Biol Chem* 272: 30729-30734.

- Yamashita K, Vogel P, Fritze K, Back T, Hossman K-A, Wiesner C (1996) Monitoring the temporal and spatial activation pattern of astrocytes in focal cerebral ischemia using in situ hybridization to GFAP mRNA: comparison with sgp-2 and hsp70 mRNA and the effect of glutamate receptor antagonists. *Brain Res* 735: 285- 297.
- Yan Q, Rosenfeld RD, Matheson CR, Hawkins N, Lopez OT, Bennet L, Welcher AA (1997) Expression of brain- derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* 78: 434- 448.
- Yang K, Perez- Polo JR, Mu XS, Yan HQ, Xue JJ, Iwamoto Y, Liu SJ, Dixon CE, Hayes RL (1996) Increased expression of brain- derived neurotrophic factor but not neurotrophin- 3 mRNA in rat brain after cortical impact injury. *J Neurosci Res* 44: 157- 164.
- Yao DL, West NR, Bondy CA, Brenner M, Hudson LD, Zhou J, Collins GH, Webster HD (1995) Cryogenic spinal cord injury induces astrocytic gene expression of insulin- like growth factor I and insulin- like growth factor binding protein 2 during myelin regeneration. *J Neurosci Res* 40: 647- 659.
- Yenari MA, Giffard RG, Sapolsky RM, Steinberg GK (1999) The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP 70). *Mol Med Today* 5: 525- 231.
- Yuan J, Horvitz HR (1990) The *Caenorhabditis elegans* genes *ced-3* and *ced-4* act cell autonomously to cause programmed cell death. *Dev Biol* 138: 33- 41.
- Yurek DM, Fletcher-Turner A (2001) Differential expression of GDNF, BDNF, and NT-3 in the aging nigrostriatal system following a neurotoxic lesion. *Brain Res* 891: 228- 235.
- Zafra F, Castren E, Thoenen H, Lindholm D (1991) Interplay between glutamate and γ -aminobutyric-acid transmitter systems in the physiological regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor synthesis in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10037- 10041.
- Zafra F, Hengerer B, Leibrock J, Thoenen H, Lindholm D (1990) Activity-dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non NMDA glutamate receptors. *EMBO J* 9: 3545- 3550.
- Zhang F, Xu S, Iadecola C (1995) Time dependence of effect of nitric oxide synthase inhibition on cerebral ischemic damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 15: 595- 601.
- Zhang ZG, Chopp M, Gautam S, Zaloga C, Zhang RL, Schmidt HH, Pollock JS, Forstermann U (1994) Upregulation of neuronal nitric oxide synthase and mRNA, and selective sparing of nitric oxide synthase-containing neurons after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res* 15: 85- 95.

Zhao Y-D, Wang W (2001) Neurosurgical trauma in People's Republic of China. *World J Surg* 25: 1202- 1204.

Zhou F, Xiang Z, Peiling L, Junjie J, Zhen LX (2001) The expression and changes of heat shock protein 70, MDA and haemorheology in rat cortex after diffuse axonal injury with secondary insults. *J Clin Neurosci* 8: 250- 252.

Zhou X-F, Chie ET, Deng Y-S, Zhong J-H, Xue Q, Rush RA, Xian CJ (1999) Injured primary sensory neurons switch phenotype for brain- derived neurotrophic factor in the rat. *Neuroscience* 92: 841- 853.

Κάζδαγλης Κ (1996) Νευροχειρουργική. Εκδ. «Γρηγόριος Παρισιάνος».

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1: ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ ΓΥΡΩ ΑΠΟ ΤΑ ΤΡΟΧΑΙΑ ΑΤΥΧΗΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ.

Αποτελεί κοινή εμπειρία για όλους τους Έλληνες η δραματική αναφορά του αριθμού των τροχαίων ατυχημάτων και αμέσως μετά του αριθμού των νεκρών και τραυματιών που προέκυψαν από αυτά, κάθε Κυριακή βράδυ, μετά από κάθε μεγάλη έξοδο ή επιστροφή στο «κλεινόν άστυ». Η ευχή πως τον επόμενο χρόνο ο αριθμός των ατυχημάτων στους δρόμους θα έχει περιορισθεί, διαψεύδεται δυστυχώς από τα στατιστικά στοιχεία που παρέχει το υπουργείο Δημόσιας Τάξης (Βλέπε Πίνακες στο τέλος) και είναι προσβάσιμα μέσω ιντερνετ στη σελίδα: <http://www.ydt.gr/traff1.htm>

Στην πραγματικότητα, οι ολοκληρωμένες (επιδημιολογικού χαρακτήρα) μελέτες που αναλύουν το φαινόμενο των τροχαίων ατυχημάτων στην Ελλάδα είναι λίγες (Lefkidis and Piperidis 1986, Kardara and Kondakis 1997). Φυσικά, η πεποίθηση πως πρόκειται για ένα σημαντικό πρόβλημα, με κοινωνικές και ιατρικές προεκτάσεις, είναι καλά εδραιωμένη στη συνείδηση των Ελλήνων. Η μελέτη όμως των παραμέτρων που το περιγράφουν είναι πάντοτε απαραίτητη στην προσπάθεια επιτυχούς αντιμετώπισης του προβλήματος, ιδίως στην χώρα μας, στην οποία παρά την έκταση του φαινομένου (δεν πρέπει να υπάρχει Έλληνας που να μην έχει χάσει κάποιον συγγενή ή φίλο σε τροχαίο ατύχημα) η ανταπόκριση του κόσμου στις υποδείξεις των αρχών παραμένει στοιχειώδης. Υπάρχουν ορισμένες πολύ ενδιαφέρουσες μελέτες οι οποίες αποκαλύπτουν μερικά χαρακτηριστικά του φαινομένου των τροχαίων ατυχημάτων στη χώρα μας, όπως το υψηλό ποσοστό εμπλοκής σε αυτά ταξιδιωτών (αλλοδαπών και ημεδαπών) που βρίσκονται σε διακοπές (Petridou et al. 1997, Petridou et al. 1999), την αυξημένη συχνότητα κατανάλωσης αλκοόλ από τα θύματα των ατυχημάτων (Petridou et al. 1998) και το προφίλ των νεαρών οδηγών που εμπλέκονται σε τροχαία ατυχήματα στην περιοχή της Αθήνας (Chliaoutakis et al. 1999).

Η ατομική ευθύνη που φέρει ο κάθε πολίτης, όταν δεν παίρνει τα στοιχειώδη μέτρα ασφαλείας (χρήση της ζώνης ασφαλείας και του προστατευτικού κράνους από τους ενήλικες, χρήση ειδικών θέσεων στο πίσω κάθισμα για τα παιδιά) δεν είναι ένα αμελητέο μέγεθος, ιδίως όταν αφορά τη ζωή ανηλίκων. Από την άλλη μεριά όμως, δραματική αποδεικνύεται και η αποτυχία της πολιτείας να εμπεδώσει ή και να επιβάλει ορισμένους κανόνες ασφαλούς οδήγησης στους πολίτες. Τα στοιχεία που προκύπτουν από την ανάλυση των τροχαίων ατυχημάτων αναδεικνύουν με σαφήνεια την αποτελεσματικότητα της χρήσης των προαναφερθέντων μέτρων ασφαλείας (Petridou et al. 1998, Petridou et al. 1998). Το 27% των θανάτων σε αυτοκινητιστικά τροχαία ατυχήματα θα μπορούσε να είχε αποφευχθεί εάν τα θύματα χρησιμοποιούσαν τη ζώνη ασφαλείας και το 38% των θανάτων σε ατυχήματα με μηχανές θα είχε αποφευχθεί εάν γινόταν χρήση του κράνους (Petridou et al. 1998) (περίπου 150 άνθρωποι μόνο το 2000).

Η περιγραφή των συμπεριφορών που οδηγούν τους πολίτες στο να αγνοούν στην πράξη, τα μέτρα ασφαλούς οδήγησης, ενώ ταυτόχρονα εκφρά-

ζουν την ανησυχία και το θυμό τους για τις «αβλεψίες και προχειρότητες», της πολιτείας, οι οποίες αφορούν την ασφαλή οδήγηση (κακή κατάσταση οδοστρώματος, ελλιπής σήμανση) είναι απαραίτητη για το σχεδιασμό μίας αποδοτικής εκστρατείας πρόληψης των τροχαίων ατυχημάτων. Μία τέτοια μελέτη (Chliaoutakis et al. 2000) αποκαλύπτει ορισμένες παραμέτρους που επιδρούν στην εκδήλωση αυτής της συμπεριφοράς, όπως το φαινόμενο της μίμησης αλλά και την αποδοτικότητα των ποινικών κυρώσεων.

Ιδιαίτερα στατιστικά στοιχεία για τους εγκεφαλικούς τραυματισμούς στον ελληνικό πληθυσμό δεν υπάρχουν, πιθανώς λόγω της ανύπαρκτης μηχανογράφησης των υπηρεσιών υγείας. Πολύ περισσότερο δεν υπάρχουν στοιχεία για τη συχνότητα εμφάνισης εγκεφαλικών τραυματισμών σε τροχαία ατυχήματα, εκτός μεμονωμένων αλλά όχι εξειδικευμένων εργασιών (Papadopoulos et al. 1996). Προφανώς τα επιδημιολογικά δεδομένα που υπάρχουν από άλλες χώρες, σύμφωνα με τα οποία τα τροχαία ατυχήματα αποτελούν την πρώτη αιτία εγκεφαλικών τραυματισμών στην Ευρώπη (δεύτερη πιθανώς στις ΗΠΑ, μετά τους τραυματισμούς από όπλα) (The European Brain Injury Consortium Survey of Head Injuries, Murgay et al. 1999), περιγράφουν αδρά και την Ελληνική πραγματικότητα.

Μία πολύ σημαντική παράμετρος του προβλήματος των τροχαίων ατυχημάτων, αλλά και γενικότερα των εγκεφαλικών τραυματισμών (ανεξαρτήτως αιτιολογίας), είναι η δυνατότητα άμεσης αντιμετώπισης των περιστατικών, η πρόσβαση σε μονάδες πρωτοβάθμιας περιθαλψης και τελικά η πρόσβαση σε εξειδικευμένα κέντρα. Η εικόνα που διαμορφώνεται για την Ελλάδα από τις λίγες μελέτες που υπάρχουν, περιγράφει την ανάγκη για αναβάθμιση των υπηρεσιών επείγουσας βοήθειας (Papadopoulos et al. 1996), αλλά και καλύτερης επάνδρωσης και οργάνωσης των περιφερειακών μονάδων πρωτοβάθμιας και δευτεροβάθμιας παροχής υπηρεσιών υγείας (Petridou et al. 2000). Σε μία συγκριτική διεθνή μελέτη με θέμα την αντιμετώπιση των πολυτραυματιών (στην οποία σημειώνεται πως παρά τον διεθνώς αυξανόμενο ετήσιο αριθμό πολυτραυματιών, οι θάνατοι των ασθενών παρουσιάζουν τάση μείωσης), η Ελλάδα, μαζί με τη Ρωσία, αναφέρονται ως οι χώρες στις οποίες οι χρόνοι διάσωσης (rescue times) και η ανεπαρκής προκλινική φροντίδα των πολυτραυματιών αποτελούν το σημαντικότερο πρόβλημα (Oestem 1999). Πρέπει πάντως να σημειωθεί πως η Ελλάδα συμμετέχει στα διεθνή προγράμματα που αποσκοπούν στην εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των υπηρεσιών υγείας όσον αφορά στην αντιμετώπιση των τροχαίων ατυχημάτων και των τραυματισμών γενικότερα και στην προσπάθεια κεντρικού συντονισμού των συστημάτων υγείας στις χώρες της Ευρώπης (π.χ. πρόγραμμα WETS- Worldwide Emergency Telemedicine Services- Beltrame et al. 1998).

ΑΝΑΦΟΡΕΣ.

Beltrame F, Maryni P, Orsi G (1998) On the intergrtion of healthcare emergency systems in Europe: the WETS project case study. *IEEE Trans Inf Technol Biomed* 2: 89- 97.

Chliaoutakis JE, Darviri C, Demakakos PT (1999) The impact of young drivers' lifestyle on their road traffic accident risk in greater Athens area. *Acc Anal Prev* 31: 771- 780.

Chliaoutakis JE, Gnardellis C, Drakou I, Darviri C, Sboukis V (2000) Modelling the factors related to the seatbelt use by the young drivers of Athens. *Acc Anal Prev* 32: 815- 825.

Kardara M, Kondakis X (1997) Road traffic accidents in Greece: recent trends (1981- 1991). *Eur J Epidemiol* 13: 765- 770.

Lefkidis CA, Piperidis NZ (1986) A statistical anlysis of road traffic accidents in Athens, 1978-82. *Med Sci Law* 26: 29- 32.

Oestern HJ (1999) Management of polytrauma patients in an international comparison. *Unfallchirurg* 102: 80- 91.

Papadopoulos IN, Bukis D, Karalas E, Katsaragakis S, Stergiopoulos S, Peros G, Androulakis G (1996) Preventable prehospital trauma deaths in a Hellenic urban region: an audit of prehospital trauma care. *J Trauma* 41: 864- 869.

Petridou E, Askitopoulou H, Vourvahakis D, Skalkidis Y, Trichopoulos D (1997) Epidemiology of road traffic accidents during pleasure travelling: the evidence from the island of Crete. *Accid Anal Prev* 29: 687- 693.

Petridou E, Dessypris N, Skalkidou A, Trichopoulos D (1999) Are traffic injuries disproportionately more common among tourists in Greece? Struggling with incomplete data. *Acc Anal Prev* 31: 611- 615.

Petridou E, Gatsoulis N, Dessypris N, Skalkidis Y, Voros D, Papadimitriou Y, Trichopoulos D (2000) Imbalance of demand and supply for regionalized injury services: a case study in Greece. *Int J Qual Health Care* 12: 105- 113.

Petridou E, Skalkidou A, Ioannou N, Trichopoulos D, Hellenic Road Traffic Police (1998) Fatalities from non-use of seat belts and helmets in Greece: a nationwide appraisal. *Acc Anal Prev* 30: 87- 91.

Petridou E, Skalkidou A, Lescohier I, Trichopoulos D (1998) Car restraints and seating position for prevention of motor vehicle injuries in Greece. *Arch Dis Child* 78: 335- 339.

Petridou E, Trichopoulos D, Sotiriou A, Athanasselis S, Kouri N, Dessypris N, Dounis E, Koutselinis A (1998) Relative and population attributable risk of traffic injuries in relation to blood-alcohol levels in am mediterranean country. Alcohol Alcoholism 33: 502- 508.

ΟΔΙΚΑ ΤΡΟΧΑΙΑ ΑΤΥΧΗΜΑΤΑ - ΠΑΘΟΝΤΕΣ ΣΤΗΝ ΑΤΤΙΚΗ

ΕΤΗ	ΑΤΥΧΗΜΑΤΑ				ΝΕΚΡΟΙ	ΠΑΘΟΝΤΕΣ		
	ΘΑΝ/ΡΑ	ΣΟΒΑΡΑ	ΕΛΑΦΡΑ	ΣΥΝ.		ΣΟΒΑΡΑ	ΕΛΑΦΡΑ	ΣΥΝ.
1986	388	801	8.415	9.580	394	985	11.401	12.780
1987	399	902	8.438	9.739	438	1.062	11.517	13.017
1988	385	720	9.041	10.146	412	857	12.453	13.722
1989	413	666	8.933	10.012	452	810	12.260	13.522
1990	450	622	8.236	9.308	485	774	11.217	12.476
1991	458	812	8.706	9.976	512	990	11.655	13.157
1992	454	893	9.181	10.528	498	1.025	12.438	13.961
1993	471	506	9.793	10.770	505	664	13.040	14.209
1994	417	408	8.831	9.656	444	539	11.645	12.626
1995	469	487	8.472	9.428	508	678	11.385	12.571
1996	472	480	9.697	10.649	501	616	12.699	13.816
1997	450	749	9.491	10.690	476	896	12.357	13.729
1998	463	915	9.481	10.859	493	1.087	12.513	14.093
1999	466	952	9.992	11.410	502	1.154	12.997	14.653
2000	482	963	10.161	11.606	513	1.208	13.450	15.171

ΟΔΙΚΑ ΤΡΟΧΑΙΑ ΑΤΥΧΗΜΑΤΑ - ΠΑΘΟΝΤΕΣ
ΣΕ ΟΛΗ ΤΗ ΧΩΡΑ

ΕΤΗ	ΑΤΥΧΗΜΑΤΑ			ΠΑΘΟΝΤΕΣ		
	ΘΑΝ/ΡΑ	ΣΩΜ. ΒΛΑΒΩΝ	ΣΥΝΟΛΟ	ΝΕΚΡΟΙ	ΤΡΑΥΜΑΤΙΕΣ	ΣΥΝΟΛΟ
		(ΣΟΒΑΡΑ- ΕΛΑΦΡΑ)			(ΣΟΒΑΡΑ- ΕΛΑΦΡΑ)	
1986	1.536	20.703	22.239	1.720	30.775	32.495
1987	1.537	21.078	22.615	1.750	31.189	32.939
1988	1.568	22.285	23.853	1.768	33.414	35.182
1989	1.730	21.962	23.692	2.012	33.355	35.367
1990	1.760	20.884	22.644	1.981	31.145	33.126
1991	1.752	21.478	23.230	2.014	31.840	33.854
1992	1.764	22.383	24.147	1.999	32.489	34.488
1993	1.759	22.511	24.270	2.002	32.489	34.491
1994	1.833	22.060	23.893	2.076	32.059	34.135
1995	1.899	21.584	23.483	2.144	31.801	33.945
1996	1.904	22.207	14.111	2.176	33.081	35.257
1997	1.892	22.789	24.681	2.141	32.849	34.990
1998	1.980	22.914	24.894	2.229	33.113	35.342
1999	1.924	22.365	24.289	2.181	32.351	34.532
2000	1.867	21.085	22.952	2.103	30.389	32.482
2001	1.322	13.823	15.145	1.483	20.132	21.615

Σημείωση: Τα στοιχεία του 2001 είναι μέχρι και τον Σεπτέμβριο.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2: ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΚΕΚ

Το σημαντικότερο ίσως εργαλείο το οποίο διαθέτουν οι γιατροί οι οποίοι καλούνται να αντιμετωπίσουν περιπτώσεις ΚΕΚ, έτσι ώστε να μπορέσουν να εκτιμήσουν τη σοβαρότητα της κατάστασης και να σχηματίσουν μία εικόνα της πρόγνωσης του ασθενούς είναι η βαθμολόγησή του με βάση την κλίμακα της Γλασκώβης (Glasgow Coma Scale από τους Teasdale and Jennet 1974). Με την κλίμακα της Γλασκώβης γίνεται εκτίμηση του επιπέδου συνείδησης του ασθενούς, ενός παράγοντα πολύ σπουδαίου για τη διαμόρφωση της κλινικής εικόνας. Μία αντίστοιχη κλίμακα έχει διαμορφωθεί στην προσπάθεια να εκτιμηθούν οι κλινικές δυσλειτουργίες και αναπηρίες του ασθενούς (Glasgow Outcome Scale από τους Jennet and Bond, 1975).

Η άμεση αντιμετώπιση του ασθενούς με ΚΕΚ περιλαμβάνει κυρίως την προσπάθεια να ελεγχθεί η ενδοκρανιακή πίεση, σε συνδυασμό με μετρήσεις της αιματικής ροής και του όγκου του αίματος. Η μηχανική υποστήριξη της αναπνευστικής λειτουργίας του τραυματία και συνήθως ο «υπεραερισμός» του είναι μία συνήθης διαδικασία, όπως επίσης η ρύθμιση της πίεσης με τη χορήγηση μαννιτόλης.

Η εξέλιξη στον τομέα της απεικονιστικής ιατρικής δίνει τη δυνατότητα άμεσης εξέτασης της κατάστασης του εγκεφάλου και της εντόπισης αιματωμάτων. Συνεπώς είναι αυξημένη η δυνατότητα εκτίμησης της ανάγκης χειρουργικής επέμβασης με στόχο την αποσυμφόρηση των πιέσεων του ιστού και την αποκατάσταση της ενδοκρανιακής πίεσης και της λειτουργίας συγκεκριμένων περιοχών (Cruz 2000, Basso et al. 2001, ενδιαφέρουσα ανασκόπηση: Gentleman 1999).

Η φαρμακολογική αντιμετώπιση των ασθενών με ΚΕΚ έγκειται στην καταστολή του ασθενούς κυρίως με τη χορήγηση βαρβιτουρικών αλλά και μορφίνης, ενώ η χρήση στεροειδών έχει μειωθεί σημαντικά. Στην Ιαπωνία αυτήν τη στιγμή χρησιμοποιούνται δύο φαρμακευτικά σκευάσματα για την αντιμετώπιση των ΕΤ. Το Nicholin (cytidine diphosphate choline (CDP)-choline) και το Hirtonin (περιέχει ένα ανάλογο της TRH). Το πρώτο φαίνεται πως ελάγει την επιδιόρθωση των μεμβρανών των νευρώνων με την ενίσχυση της αναπνευστικής λειτουργίας των μιτοχονδρίων και τη βιοσύνθεση της λεκιθίνης. Με αυτόν τον τρόπο οδηγεί στη βελτίωση του επιπέδου συνείδησης των ασθενών και τη βελτίωση της εικόνας του Ηλεκτροεγκεφαλογραφήματος. Το δεύτερο, επιδρά σε συγκεκριμένους πυρήνες του εγκεφάλου (π.χ. nucleus accumbens) και ελάγει την απελευθέρωση ντοπαμίνης. Η χορήγησή του επιφέρει βελτίωση της αντιδραστικότητας και κινητικότητας των ασθενών καθώς και της εικόνας του ΗΕΓ τους. Ταυτόχρονα, αυτήν τη στιγμή μία πλειάδα φαρμακευτικών ουσιών ελέγχεται κλινικά (κλινικές δοκιμές φάσης II και III), ως πιθανά θεραπευτικά μέσα στην αντιμετώπιση των ΚΕΚ (στοιχεία από την εργασία των Maejima and Katayama, 2001).

ΑΝΑΦΟΡΕΣ.

Basso A, Previgliano I, Duarte JM, Ferrari N (2001) Advances in management of neurosurgical trauma in different continents. *World J Surg* 25: 1174- 1178.

Cruz J (2000) Current international trends in severe acute brain trauma. *Arq Neuropsiquiatr* 58: 642- 647.

Gentleman D (1999) Improving outcome after traumatic brain injury--progresses and challenges. *Br Med Bull* 55: 910- 926.

Jennet B, Bond M (1975) Assessment of outcome after severe brain damage. *Lancet* 1: 480- 484.

Maejima S, Katayama Y (2001) Neurosurgical trauma in Japan. *World J Surg* 25: 1205- 1209.

Teasdale G, Jennet B (1974) Assessment of coma and impaired consciousness: A practical scale. *Lancet* 2: 81- 84.