

Μοριακοί μηχανισμοί που ενέχονται στην απάντηση του εγκεφαλικού ιστού στο τραύμα

ΣΚΟΠΟΣ Οι κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις συνιστούν σημαντικό ιατρικό πρόβλημα. Αποτελούν βασική αιτία θανάτου καθώς και μακροχρόνιων σωματικών, αλλή και κοινωνικών και οικονομικών επιπλοκών. Η διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών που ενέχονται στην καταστροφή του εγκεφαλικού ιστού μετά από τραυματισμό και στην επαγωγή μόνιμων αλλοιώσεων στη λειτουργία του, είναι απαραίτητη για την ορθολογική θέσπιση θεραπευτικών στρατηγικών. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Εφαρμόστηκε ένα μοντέλο εστιακού, μηχανικού, διεισδυτικού τραυματισμού σε ενήλικους επίμυς. Στο μοντέλο αυτό μελετήθηκε η έκφραση συγκεκριμένων πρωτεϊνών, με στόχο τη διερεύνηση της απόκρισης του εγκεφαλικού ιστού στο τραύμα. Μελετήθηκε ανοσοϊστοχημικά η έκφραση της θερμοεπαγόμενης πρωτεΐνης 70 (Heat shock protein-70, Hsp-70), των νευροτροφινών Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) και Neurotrophin-3 (NT-3), καθώς και της όξινης ινώδους γλοιακής πρωτεΐνης (Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP), που είναι ειδικός δείκτης των αστρογλοιακών κυττάρων. Μελετήθηκε, ακόμη, η έκφραση της πρωτεΐνης του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα (Insulin-like Growth Factor I, IGF-I). Τέλος, διερευνήθηκε το φαινόμενο του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου, με την αντίδραση TUNEL. Περαιτέρω, χορηγήθηκε σε τραυματισμένους επίμυς IGF-I και εξετάστηκαν οι νευροπροστατευτικές ιδιότητές του. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** 4 και 12 ώρες μετά τον τραυματισμό, παρατηρήθηκε αύξηση στην έκφραση της πρωτεΐνης Hsp-70 γύρω από την εστία της βλάβης, περιορισμένη επαγωγή της πρωτεΐνης του IGF-I και ενεργοποίηση αστρογλοιακών κυττάρων. Από την άλλη μεριά, εντοπίστηκε εκτεταμένη μείωση στην έκφραση των νευροτροφινών σε μια βραχεία περιτραυματική ζώνη. Τέλος, διάσπαρτα αποπτωτικά κύτταρα παρατηρήθηκαν κυρίως στο τραυματισμένο ημισφαίριο, αλλή και σε μικρότερη ένταση στο αντιδιαμετρικό. Μία εβδομάδα μετά, το τραύμα είχε επουλωθεί με τη συμμετοχή αστρογλοιακών κυττάρων και η έκφραση της Hsp-70 ήταν πιο περιορισμένη. Αντίθετα, ο IGF-I και ο αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων παρουσίαζαν περαιτέρω αύξηση. Τα επίπεδα του BDNF συνέχιζαν να είναι εξαιρετικά μειωμένα, η μείωση όμως της NT-3 δεν παρατηρείτο πλέον. Η τοπική χορήγηση IGF-I, μετατραυματικά, επανέφερε σε μεγάλο βαθμό την εικόνα στα φυσιολογικά πρότυπα. Κυρίαρχο φαινόμενο υπήρξε η διατήρηση της ισορροπίας της έκφρασης των νευροτροφινών και η μείωση, στο ημισφαίριο του τραυματισμού, του φαινομένου της απόπτωσης. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Ο μηχανικός, εστιακός τραυματισμός του εγκεφάλου επιφέρει σημαντικές τοπικές αλλαγές στην έκφραση των BDNF, NT-3 και IGF-I, οι οποίες εκτείνονται, χρονικά τουλάχιστον, μία εβδομάδα μετά. Τα εκφυλιστικά κυτταρικά φαινόμενα, όπως αντανakλώνται στην έκφραση της Hsp-70 και στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο, με το χρόνο εξαπλώνονται και πέραν της εστίας της ιστικής βλάβης. Η χορήγηση IGF-I, μετά τον τραυματισμό, είναι δυνατό να αναστρέψει κάποια από αυτά τα φαινόμενα και να συμβάλει στη διατήρηση της ομοιόστασης του εγκεφαλικού ιστού.

Η. Καζάνης,
Ε. Φιλιππίδου,
Φ. Στυλιανοπούλου

Τμήμα Νοσηλευτικής,
Εργαστήριο Βιολογίας-Βιοχημείας,
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

Molecular mechanisms involved
in the response of brain tissue
to trauma

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Απόπτωση
Εγκεφαλικός τραυματισμός
Νευροτροφίνες
Hsp-70
IGF-I

Το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για τη μελέτη των κρανιοεγκεφαλικών κακώσεων είναι διαχρονικό και έντονο, καθώς αποτελούν σημαντικό πρόβλημα, όχι μόνο λόγω του υψηλού δείκτη θνητότητας που τις συνοδεύει, αλλά και λόγω της επέκτασης των κλινικών (και, παράλληλα, των κοινωνικών και οικονομικών) συνεπειών, ακόμη και μετά την πάροδο μεγάλου χρονικού διαστήματος. Οι μισοί περίπου από τους συνολικούς θανάτους από τραυματισμούς οφείλονται σε τραυματισμούς του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ),¹ ενώ από το σύνολο των ατόμων που υφίστανται κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις (στις ΗΠΑ περίπου 1.500.000 άτομα ετησίως), το 25% πεθαίνει σχεδόν άμεσα, το 40% υποφέρει από μακροχρόνιες επιπλοκές (από πολύ σοβαρές, π.χ. κωματώδη κατάσταση, έως ελαφρύτερες κινητικές ή ψυχολογικές διαταραχές) και σχεδόν το σύνολό τους απαιτεί νοσοκομειακή περίθαλψη.^{2,3} Τα δεδομένα από την κλινική εμπειρία, εφόσον ακόμα δεν υπάρχουν επαρκή πειραματικά δεδομένα, υποδεικνύουν ότι η άμεση αντιμετώπιση των κρανιακών τραυματισμών είναι δυνατό να περιορίσει τις επιπλοκές, αλλά και τις μακροχρόνιες συνέπειές τους.⁴⁻⁶

Στα πειράματά μας εφαρμόστηκε ένα πρωτόκολλο εστιασμένου, διεξοδικού τραυματισμού σε επίμυς, με στόχο τη διερεύνηση συγκεκριμένων πτυχών της αντίδρασης του εγκεφάλου στο τραύμα. Πιο συγκεκριμένα, διερευνήθηκε: (α) η έκφραση της θερμοεπαγόμενης πρωτεΐνης με μοριακό βάρος 70 kDa (Heat shock protein-70, Hsp-70), η οποία είναι μια πρωτεΐνη-μοριακός συνοδός, με λειτουργία την επικάλυψη και μεταφορά πρωτεϊνών και χρησιμοποιείται ευρέως ως δείκτης κυτταρικού τραυματισμού και stress,^{7,8} (β) η έκφραση των νευροτροφινών Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) και νευροτροφίνης-3 (Neurotrophin-3, NT-3), οι οποίες διαθέτουν νευροπροστατευτική δράση που μεσολαβείται από τους αντίστοιχους υποδοχείς, τους trkB και trkC, οι οποίοι είναι κινάσες τυροσίνης,⁹ (γ) η έκφραση της πρωτεΐνης του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα I (Insulin-like Growth Factor I, IGF-I), η δράση του οποίου (σε συνδυασμό με τον IGF-II) επιτυγχάνεται με τη διαμεσολάβηση συγκεκριμένων υδατοδιαλυτών, δεσμευτικών πρωτεϊνών (των IGFBPs) και ειδικών υποδοχέων, με ιδιότητες κινάσης τυροσινών¹⁰ και (δ) ο αποπτωτικός θάνατος των κυττάρων, όπως αυτός εντοπίζεται με την αντίδραση TUNEL. Ακόμη, ερευνήθηκε η επίδραση της χορήγησης του IGF-I, μετά τον τραυματισμό, στην έκφραση όλων των παραπάνω παραγόντων και οι πιθανές νευροπροστατευτικές του ιδιότητες.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Πειραματόζωα

Χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί επίμυς, βάρους 250–350 g. Κρατήθηκαν σε κλουβιά υπό σταθερές συνθήκες θερμοκρα-

σίας (25 °C) και φωτισμού (κύκλοι φωτός-σκοταδιού 12:12 ώρες) και με ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό. Μετά τον τραυματισμό, κάθε πειραματόζωο ετοποθετείτο μόνο του σε ξεχωριστό κλουβί.

Μοντέλο τραυματισμού-χορήγηση IGF-I

Τα πειραματόζωα αναισθητοποιούνταν με ενδοπεριτοναϊκή ένεση ένυδρης κλωράλης (400 mg/kg βάρους σώματος). Στη συνέχεια, τοποθετούνταν σε στερεοταξική διάταξη. Αφού γινόταν επιμήκης τομή του δέρματος της κεφαλής, ανοιγόταν, με οδοντιατρικό τρυπάνι, οπή διαμέτρου 2 mm στο κρανίο, στις συντεταγμένες -3,4 mm στον προσθιοπίσθιο άξονα και -2,0 mm στον εγκάρσιο (ως σημείο μηδέν καθοριζόταν το βρέγμα). Ακολουθούσε ο τραυματισμός του εγκεφάλου με την αργή είσοδο σε αυτόν μιας βελόνας 21 G και σε βάθος 4,0 mm, μέχρι και τον υποκείμενο ιππόκαμπο. Στη συνέχεια, η βελόνα αποσυρόταν αργά και η διαδικασία επαναλαμβανόταν τρεις φορές. Τέλος, η τομή καθαριζόταν και κλεινόταν με ειδικά clips. Τα πειραματόζωα θανατώνονταν 4 (n=7) και 12 (n=6) ώρες μετά τον τραυματισμό, καθώς και μία εβδομάδα μετά (n=5). Ως πειραματόζωα-μάρτυρες (n=4) χρησιμοποιήθηκαν επίμυς, στους οποίους, μετά την τομή του δέρματος, δεν ακολουθούσε τραυματισμός αλλά συρραφή του δέρματος. Τα ζώα-μάρτυρες θανατώνονταν, αφού συνέρχονταν πλήρως από την αναισθησία (περίπου 3 ώρες μετά). Η ομάδα των επιμύων στην οποία χορηγήθηκε IGF-I, μετά τον τραυματισμό διατηρείτο στη στερεοταξική διάταξη. Η χορήγηση του IGF-I [10 μg/10 μL IGF-I σε Phosphate Buffered Saline (PBS) ανά δόση] έγινε τοπικά, με σύριγγα στο σημείο της βλάβης. Η χορήγηση πραγματοποιήθηκε σε τρεις δόσεις, 15, 45 και 75 min μετά τον τραυματισμό. Οι επίμυς της ομάδας αυτής θανατώθηκαν 4 (n=6) και 12 (n=6) ώρες μετά. Στους αντίστοιχους μάρτυρες χορηγήθηκε, με τον ίδιο τρόπο, τρεις φορές PBS και τα ζώα θανατώθηκαν μετά την ανάνησή τους από την αναισθησία. Για τη θανάτωσή τους, οι επίμυς αναισθητοποιούνταν με αιθέρα και ακολουθούσε ενδοκαρδιακή έγχυση διαλύματος 0,4% παραφορμαλδεΐδης σε 0,1 M διάλυμα φωσφορικών, pH=7,4. Ακολουθούσε η περαιτέρω μονιμοποίηση των εγκεφάλων στο διάλυμα της παραφορμαλδεΐδης και, τελικώς, ο εγκλεισμός τους σε κύβους παραφίνης.

Ανοσοϊστοχημεία

Οι κλεισμένοι σε παραφίνη κύβοι κόβονταν σε μετωπιαίες τομές πάχους 5 μm και τοποθετούνταν σε σιλανιοποιημένες αντικειμενοφόρους. Ακολουθούσε η αποπαραφινολοποίηση και ενυδάτωση των τομών και η αποκάλυψη των αντιγονικών θέσεων με την τοποθέτησή τους σε φούρνο μικροκυμάτων, για 15 min, σε διάλυμα κιτρικού οξέος (10 mM, pH=6,0). Στη συνέχεια, πλένονταν σε διάλυμα Tris Buffered Saline (TBS: 25 mM Tris, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl) που περιείχε 0,4% Triton X-100 και μετά επωάζονταν με 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 δωμάτιου. Έπειτα επωάζονταν στους 4 °C με το διάλυμα του αντίστοιχου αντισώματος για μία νύκτα: [anti-Hsp-70 (10 μg/mL) (ευγενική παραχώρηση από το ΕΙΕ),

anti-BDNF (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), της SANTA CRUZ, anti-NT-3 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), της SANTA CRUZ, anti-GFAP (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), της DAKO] ή για 72 ώρες [anti-IGF-I (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), της SANTA CRUZ]. Ακολουθούσε η επώαση των τομών με το αντίστοιχο δεύτερο βιοπυλινωμένο αντίσωμα (της DAKO), σε αραιώση 1/200 για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου, μαζί με 2% αντίστοιχο ορό και η περαιτέρω επώαση σε διάλυμα αβιδίνης-βιοτίνης (ABC Reagent, DAKO), για 30 min. Τέλος, η χρώση επιτυχανόταν με την αντίδραση της υπεροξειδάσης με υπόστρωμα DAB (3,3-diaminobenzidine). Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές, στις οποίες δεν τοποθετήθηκε το ειδικό, πρώτο αντίσωμα.

(TdT-mediated dUTP Nick End Labeling) TUNEL

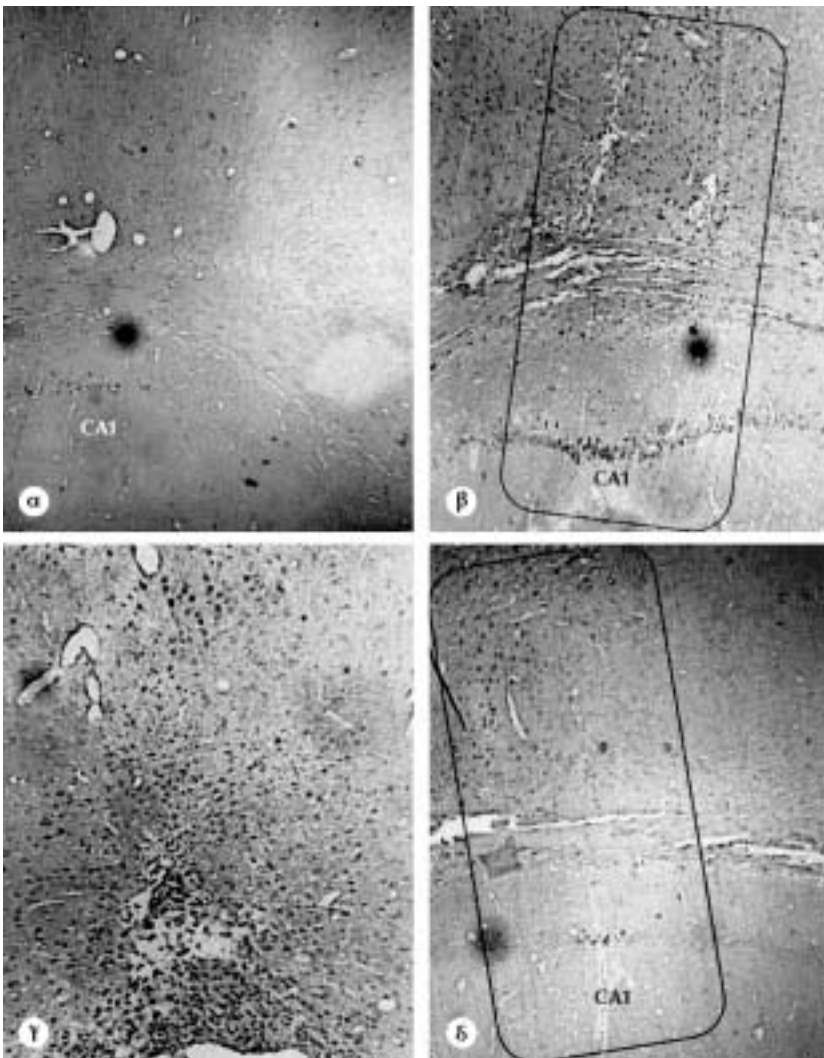
Χρησιμοποιήσαμε τα αντιδραστήρια της Boehringer Mannheim (*In situ* Cell Death Detection, POD) και ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο που προτείνει η εταιρεία. Μετά την αποπαραφινολογία και ενυδάτωση των τομών, ακολούθησε η επώασή τους, για μία ώρα, στους 37 °C, με το ειδικό μίγμα που περιείχε το ένζυμο τελική δεοξυνουκλεοτιδική μεταφοράση και νουκλεοτίδια, μέσα στα οποία περιλαμβάνονταν σημασμένη με φλουορεσκήνη ουρακίλη. Στη συνέχεια, οι τομές καλύφθηκαν

με διάλυμα γλυκερόλης-PBS 9:1 και ακολούθησε η παρατήρησή τους σε ειδικό μικροσκόπιο φθορισμού.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Φυσιολογικοί επίμυς

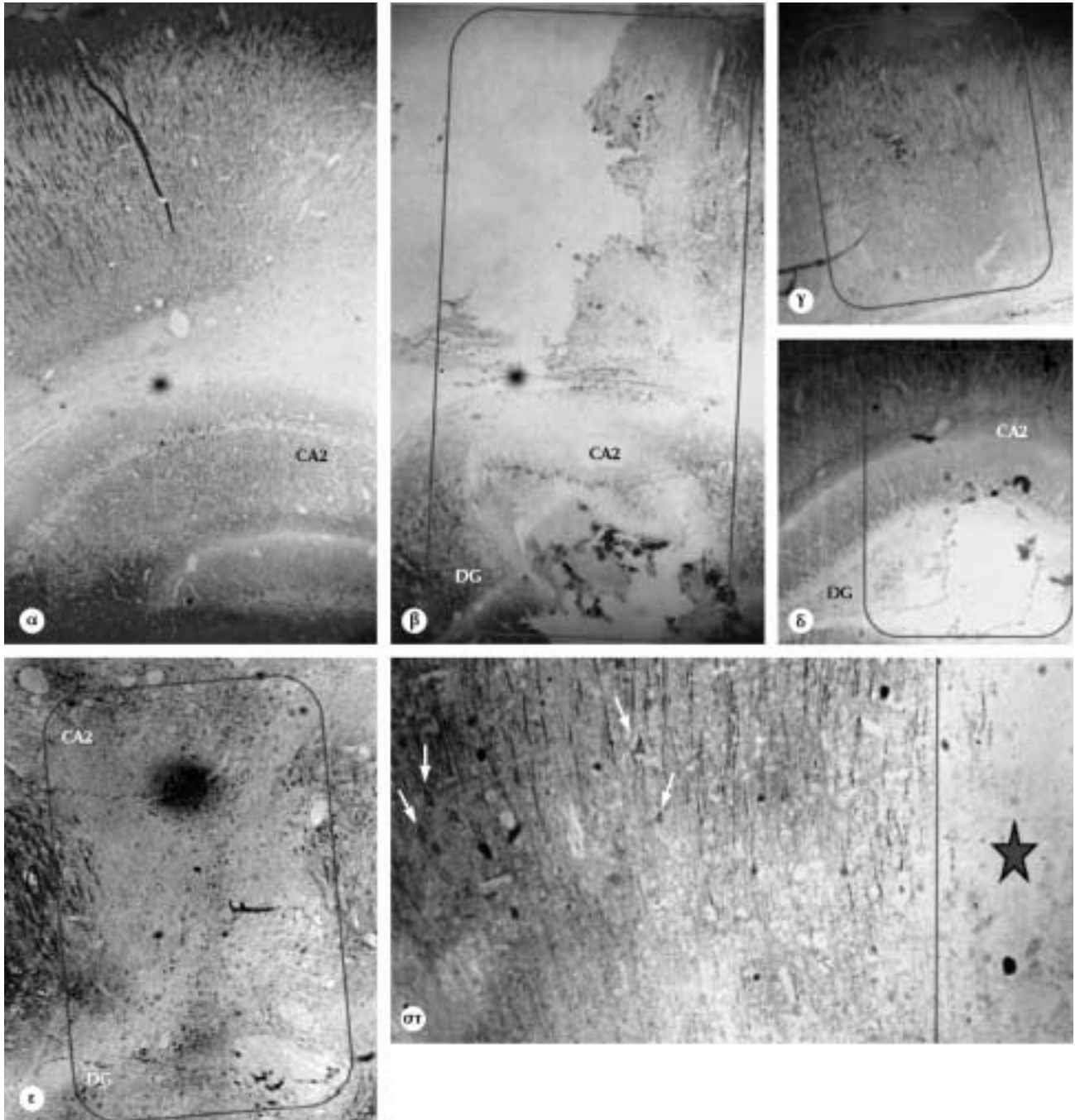
Στην ομάδα των ζώων-μαρτύρων, η ανοσοϊστοχημική εντόπιση της πρωτεΐνης Hsp-70 ήταν πολύ σπάνια, τόσο στο φλοιό των ημισφαιρίων όσο και στις υπόλοιπες δομές (ιππόκαμπος, ραβδωτό, υποθάλαμος). Εντοπίζονταν, σποραδικά, νευρικά κυτταρικά σώματα, κυρίως στη σιβάδα IV του φλοιού, καθώς και στα ενδιάμεσα κύτταρα του ιπποκάμπου (εικ. 1α). Από την άλλη μεριά, η πρωτεΐνη GFAP, η οποία αποτελεί ειδικό δείκτη των αστρογλοϊακών κυττάρων, εντοπιζόταν σε όλο το εύρος του εγκεφαλικού ιστού, με ιδιαίτερη ένταση στον ιπποκάμπειο σχηματισμό και τα τοιχώματα των κοιλιών. Η εντόπισή της ήταν κυρίως κυτταροπλασματική και τα αστροκύτταρα εμφάνιζαν τη χαρακτηριστική ακτινωτή διαμόρφωση (η α-



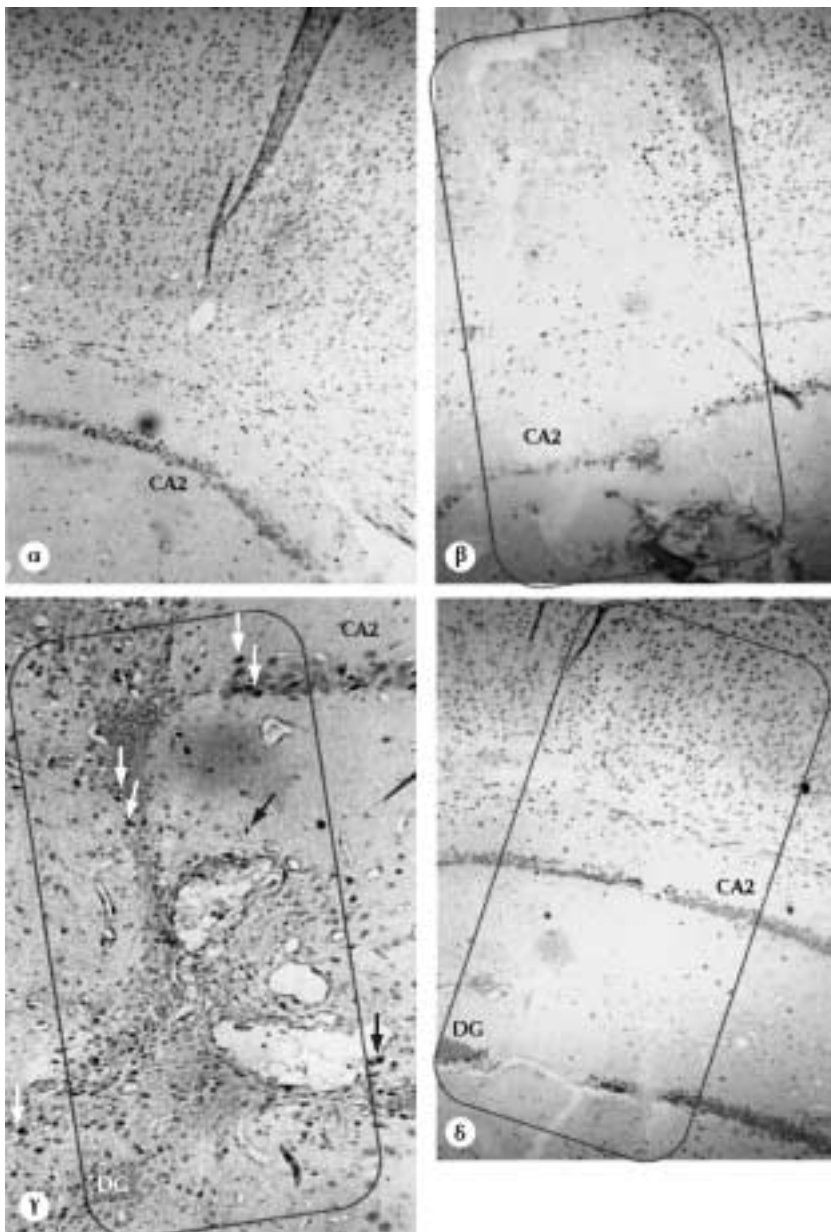
Εικόνα 1. Ανοσοϊστοχημική εντόπιση Hsp-70. Στο φυσιολογικό επίμυ δεν εντοπίζονται θετικά κύτταρα (α). 4 ώρες μετά τον τραυματισμό, η έκφραση της Hsp-70 είναι πολύ έντονη στην περιτραυματική περιοχή (πλαίσιο) (β). Μία εβδομάδα μετά, η παρουσία της Hsp-70 είναι ακόμη έντονη (γ, μεγαλύτερη μεγέθυνση). Η χορήγηση IGF-I επιφέρει μείωση της έκφρασης αυτής 12 ώρες μετά τον τραυματισμό, ιδίως στον ιπποκάμπο (CA1 περιοχή) (δ).

ντίστοιχη εικόνα δεν παρουσιάζεται). Οι νευροτροφίνες BDNF και NT-3 εμφάνιζαν εκτεταμένη έκφραση στον ενήλικο επίμυ. Ο BDNF εντοπιζόταν σε σημαντικές ποσότητες στο φλοιό των ημισφαιρίων, κατά κύριο λόγο στους νευράξονες (εικ. 2α), αλλά σποραδικά και σε κυτ-

ταρικά σώματα. Στον ιππόκαμπο, η εντόπιση εστιαζόταν σε νευρικές ίνες και σε νευρικές απολήξεις στη στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων, καθώς και σε κυτταρικά σώματα στην περιοχή της οδοντωτής έλικας. Η νευροτροφίνη NT-3 (εικ. 3α) βρισκόταν σε όλες τις δομές του ε-



Εικόνα 2. Ανοσοϊστοχημική εντόπιση BDNF. Στο φυσιολογικό επίμυ, η παρουσία του BDNF ήταν έντονη, κυρίως σε νευρικές ίνες στο φλοιό και τον ιππόκαμπο (α). 4 ώρες μετά τον τραυματισμό παρουσιάστηκε δραματική μείωση στην ανοσοεντόπισή του στην περιτραυματική περιοχή (πλαίσιο) (β). Παράλληλα, εντοπίστηκε αύξηση σε κυτταρικά σώματα, παραπλεύρως της περιτραυματικής περιοχής (αστεράκι) στο φλοιό (στ, βέ- λη, μεγαλύτερη μεγέθυνση). Μία εβδομάδα μετά τον τραυματισμό, η περιτραυματική περιοχή παρέμεινε φτωχή σε BDNF [ε, μεγαλύτερη μεγέ- θυνση από τμήμα του ιππόκαμπου, μεταξύ CA2 περιοχής και οδοντωτής έλικας (DG)]. Η χορήγηση IGF-I διέσσωσε την πλειοψηφία των θετικών νευρικών ινών, τόσο στο φλοιό (γ), όσο και στον ιππόκαμπο (δ).



Εικόνα 3. Ανοσοϊστοχημική εντόπιση NT-3. Στο φυσιολογικό επίμυ, εντοπίζεται έντονη παρουσία της NT-3 στον ιππόκαμπο και το φλοιό (α). 4 ώρες μετά τον τραυματισμό εμφανίζεται σαφής μείωση του αριθμού των θετικών κυττάρων στο φλοιό και τον ιππόκαμπο (κυρίως CA2 περιοχή), στην περιτραυματική ζώνη (πλαίσιο) (β). Μία εβδομάδα μετά τον τραυματισμό, η NT-3 επανεκφράζεται στην περιοχή επουλώσης της καταστροφής (γ, τα βέλη υποδεικνύουν χαρακτηριστικά θετικά κύτταρα, μεγαλύτερη μεγέθυνση). Η χορήγηση IGF-I επιφέρει αναστροφή της μείωσης στον αριθμό των θετικών κυττάρων, 12 ώρες μετά τον τραυματισμό (δ).

γκεφάλου, τόσο σε νευρικά όσο και σε γλοία κύτταρα, ενώ στον ιππόκαμπο η έκφρασή της περιοριζόταν στα κοκκιώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας. Τα επίπεδα του αυξητικού παράγοντα IGF-I ήταν χαμηλά στον εγκέφαλο του επίμυος (εικ. 4α). Η εντόπισή του περιοριζόταν σε κύτταρα με νευρογλοιακή μορφολογία, διάσπαρτα σε όλο τον εγκέφαλο. Τέλος, με την αντίδραση TUNEL δεν ανιχνεύονταν θετικά κύτταρα (εικ. 5α).

Συνέπειες του τραυματισμού

Στην ομάδα των πειραματοζώων που θανατώθηκαν τέσσερις ώρες μετά τον τραυματισμό τους, διακρινόταν σα-

φής διαφοροποίηση στην εικόνα όλων των παραπάνω κυτταρικών δεικτών μεταξύ του ημισφαιρίου, στο οποίο έγινε η εστιακή βλάβη, και του αντιδιαμετρικού ημισφαιρίου. Σε γενικές γραμμές, το αντιδιαμετρικό ημισφαίριο παρουσίαζε εικόνα όμοια με αυτή του φυσιολογικού εγκεφάλου, με εξαίρεση την αύξηση του αριθμού των θετικών κυττάρων στην Hsp-70 στο φλοιό, στον ιππόκαμπο και στο μεσολόβιο. Στην περιοχή του τραυματισμού εντοπίζονταν σημαντικές διαφοροποιήσεις στην έκφραση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Στην κύρια εστία της καταστροφής του ιστού εμφανιζόταν πυκνή εντόπιση κυττάρων θετικών στην Hsp-70 (εικ. 1β), των οποίων το μεγαλύτερο ποσοστό, με βάση τη μορφολογία τους, πρέπει

να ήταν νευρικά, τα οποία εξαπλώνονταν κατά μήκος του τραυματισμένου φλοιού και του ιπποκάμπου. Στα όρια της καταστροφής εντοπιζόνταν επίσης ορισμένα θετικά στην GFAP κύτταρα, με μεγάλους και έντονα ανοσοθετικούς πυρήνες, αλλά και καλά διαγραφόμενο κυτταρόπλασμα (εικ. 6α). Επρόκειτο μάλλον για υπερτροφικά, ενεργοποιημένα αστρογλοιακά κύτταρα.¹¹ Η επίδραση του τραυματισμού ήταν πολύ έντονη και σαφώς ορατή στο επίπεδο της εντόπισης των νευροτροφινών BDNF και NT-3, τόσο στην εστία της καταστροφής, όσο και σε μια βραχεία περιπρωματική περιοχή. Όσον αφορά τον BDNF, παρατηρήθηκε δραματική μείωση των ανοσοθετικών νευρικών ινών. Η περιπρωματική περιοχή εμφανιζόταν τελείως κενή σε θετικούς άξονες (εικ. 2β). Σε ορισμένες περιπτώσεις, παρατηρούνταν εντόνως θετικά κυτταρικά σώματα, με νευρική μορφολογία, των οποίων όμως η διάμετρος και το σχήμα διέφεραν από τα φυσιολογικά. Τα κύτταρα αυτά εμφανίζονταν συρρικνωμένα και ήταν συχνά θετικά και στην Hsp-70. Στα εξωτερικά όρια της περιπρωματικής περιοχής διακρίνονταν έντονα θετικές νευρικές ίνες και ανοσοθετικά κυτταρικά σώματα φυσιολογικής μορφολογίας. Όσον αφορά τη NT-3, αν και η μείωση στην εστία της βλάβης και την περιπρωματική περιοχή δεν ήταν τόσο δραματική, εντούτοις ήταν εμφανής (εικ. 3β). Παρέμεναν ανοσοθετικά ορισμένα μικρού μεγέθους κύτταρα, ενώ και πάλι παρατηρήθηκε πιο έντονη χρώση των κυττάρων που βρίσκονταν στην περιφέρεια του τραύματος. Επιπροσθέτως, στην εστία του τραύματος άρχιζε να εμφανίζεται επαγωγή του IGF-I σε κύτταρα του φλοιού και του ιπποκάμπου, τα οποία ήταν μάλλον νευρικά (εικ. 4β). Θετικά όμως κύτταρα, που ήταν μάλλον γλοιακά, εντοπιζόνταν και στο τμήμα του μεσολοβίου που είχε διατηρηθεί κατά τον τραυματισμό. Τέλος, παρατηρούνταν θετικά στην αντίδραση TUNEL κύτταρα στην εστία της ιστικής βλάβης, κυρίως στο φλοιό, στα πυραμιδικά κύτταρα του ιπποκάμπου, στην περιοχή όπου το ίχνος του τραύματος διατάρασε τη δομή αυτής της κυτταρικής σιβάδας, όπως επίσης και σε σημαντικό αριθμό στη σιβάδα των κοκκιωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας και στα δύο ημισφαίρια.

Δώδεκα ώρες μετά τον τραυματισμό η εικόνα ήταν σχεδόν η ίδια. Ως σημαντικές διαφοροποιήσεις θα μπορούσαν να αναφερθούν η αύξηση του αριθμού των θετικών στον BDNF κυτταρικών σωμάτων παραπλεύρως της καταστροφής στο φλοιό και κυρίως η εξαπλώση των ανοσοθετικών στην Hsp-70 κυττάρων τόσο στο φλοιό, εκατέρωθεν του σημείου τραυματισμού, όσο και εγκάρσια στο επίπεδο του μεσολοβίου, στο τραυματισμένο μόνο ημισφαίριο. Ακόμη πιο εκτεταμένη ήταν η εντόπιση θετικών στην αντίδραση TUNEL κυττάρων στον ιπποκάμπο (εικ. 5β, 5γ), ενώ θετικά κύτταρα εμφανίζονταν και στην περιοχή του αποιεστικού φλοιού και της τρίτης κοιλίας.

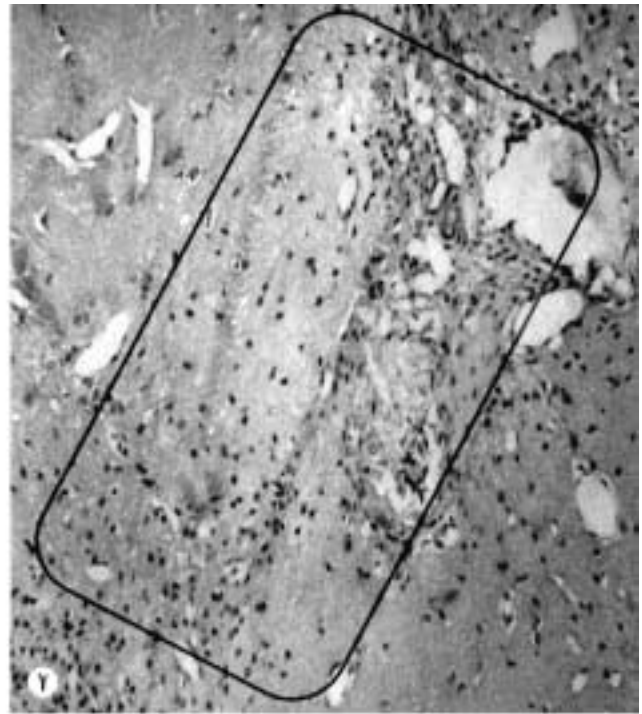
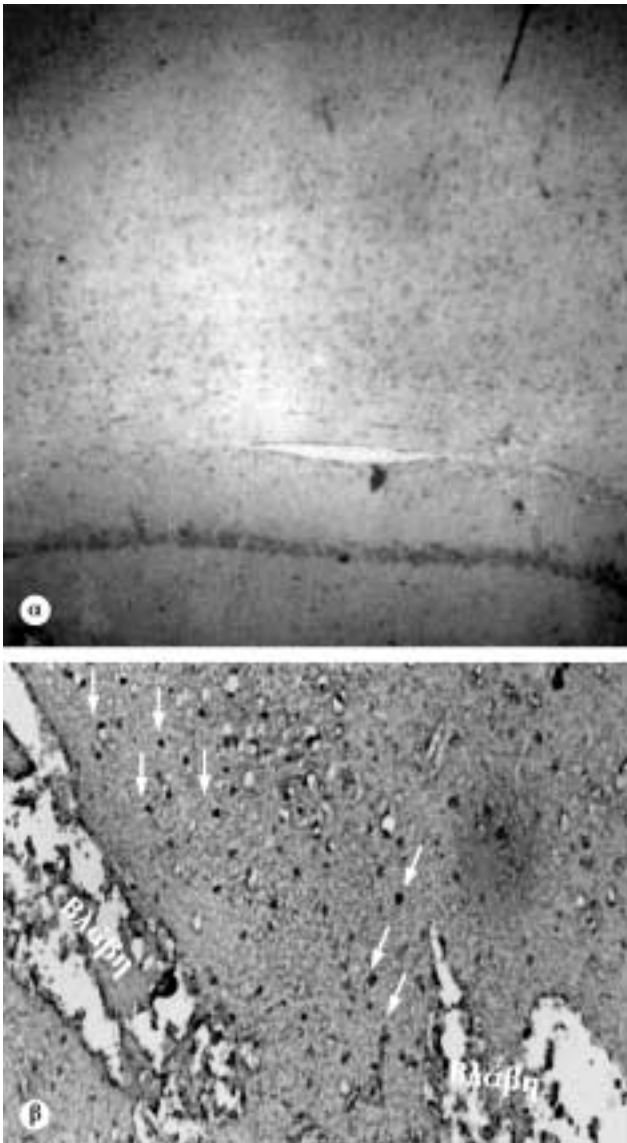
Μία εβδομάδα μετά τον τραυματισμό ήταν ορατή η επώλωση του τραύματος, με τη συμμετοχή πολυάριθμων

αστρογλοιακών κυττάρων, έντονα θετικών στην GFAP, αλλά με την τυπική ακτινωτή μορφολογία (εικ. 6β). Η Hsp-70 εντοπιζόταν ακόμη ιδιαίτερα αυξημένη στην περιπρωματική περιοχή (εικ. 1γ), αλλά σε πιο περιορισμένο εύρος εξαπλώσεως, με την εξαίρεση και πάλι του τραυματισμένου μεσολοβίου. Τα επίπεδα του BDNF παρέμεναν πολύ χαμηλά (εικ. 4ε), χωρίς να περιορίζεται χωροταξικά το εύρος της περιπρωματικής ζώνης, από την οποία απουσίαζαν οι θετικές νευρικές ίνες. Επίσης, δεν εντοπιζόνταν τα διάσπαρτα ανοσοθετικά κυτταρικά σώματα ούτε η αύξηση των ανοσοθετικών ινών στην παράπλευρη της περιπρωματικής περιοχή. Αντίθετα, η NT-3 εμφανιζόταν ιδιαίτερα αυξημένη, με σαφή εντόπιση στην πλειοψηφία των κυττάρων που συμμετείχαν στην επώλωση του τραύματος (εικ. 3γ). Σημαντικά αυξημένη ήταν και η έκφραση της πρωτεΐνης του IGF-I, στα όρια του τραύματος (εικ. 4γ) και στο μεσολόβιο. Τέλος, αποπτωτικά κύτταρα εντοπιζόνταν κατά μήκος της επώλωσης του τραύματος, σε όλο το εύρος των δύο αντιδιαμετρικών ιπποκάμπων και στον τραυματισμένο φλοιό. Τα θετικά στην αντίδραση TUNEL κύτταρα δεν περιορίζονταν στη σιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων του ιπποκάμπου, αλλά εκτείνονταν και στα ενδιάμεσα κύτταρα, ενώ αρκετά έντονη ήταν η εντόπιση θετικών κυττάρων γύρω από την τρίτη κοιλία και στην περιοχή του αποιεστικού φλοιού.

Χορήγηση IGF-I

Η επαναλαμβανόμενη τρεις φορές εξωγενής, τοπική χορήγηση, σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά από τον τραυματισμό (15, 45 και 75 min), του αυξητικού παράγοντα IGF-I επέφερε διαφορετικά αποτελέσματα σε κάθε έναν από τους παράγοντες που μελετήθηκαν.

Όσον αφορά στην εντόπιση της GFAP και της πρωτεΐνης του IGF-I, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις. Η χορήγηση IGF-I περιόρισε την αύξηση της πρωτεΐνης Hsp-70 που παρατηρήθηκε μετά τον τραυματισμό. Πιο αξιοπρόσεκτες ήταν οι διαφορές όσον αφορά τις νευροτροφίνες. Μετά τη χορήγηση του IGF-I, τόσο στις 4 όσο και στις 12 ώρες, ο ιστός εμφάνιζε εικόνα παρεμφερή με αυτή των φυσιολογικών ζώων. Το φαινόμενο της μείωσης του αριθμού των θετικών στον BDNF νευρικών ινών, καθώς και των θετικών στη NT-3 κυττάρων, ήταν σαφώς ανεστραμμένο, ενώ σε ορισμένα πειραματόζωα ήταν σχεδόν αδύνατη η εντόπιση της περιπρωματικής περιοχής (εικόνες 2γ, 2δ, 3γ, 3δ). Ταυτόχρονα, απουσίαζαν τα έντονα ανοσοθετικά στον BDNF κυτταρικά σώματα στο φλοιό ή τον ιπποκάμπο εκατέρωθεν του τραύματος. Τέλος, όσον αφορά τον εντοπισμό αποπτωτικών κυττάρων, με την αντίδραση TUNEL, και στα δύο χρονικά σημεία μελέτης ήταν εμφανής μια σαφής μείωση στον αριθμό των θετικών κυττάρων στον τραυματισμένο ιπποκάμπο, ακόμη και πολύ κοντά στην καταστροφή (εικ. 5n). Αντί-



Εικόνα 4. Ανοσοϊστοχημική εντόπιση IGF-I. Στο φυσιολογικό επίμυ δεν εντοπίζονται πολλά κύτταρα θετικά στον IGF-I (α). 4 ώρες μετά τον τραυματισμό εμφανίζονται ορισμένα ανοσοθετικά κύτταρα, ακριβώς δίπλα στην εστία του τραύματος (β, βέλη, μεγαλύτερη μεγέθυνση). Μία εβδομάδα μετά τον τραυματισμό, η έκφραση του IGF-I στην περιτραυματική περιοχή (πλαίσιο) είναι σημαντικά αυξημένη (γ, μεγαλύτερη μεγέθυνση).

στοιχη μείωση δεν παρατηρήθηκε στο φλοιό, καθώς και στον αντιδιαμετρικό ιππόκαμπο, ο οποίος πλέον εμφάνιζε περισσότερα TUNEL-θετικά κύτταρα σε σχέση με τον τραυματισμένο (εικ. 5z).

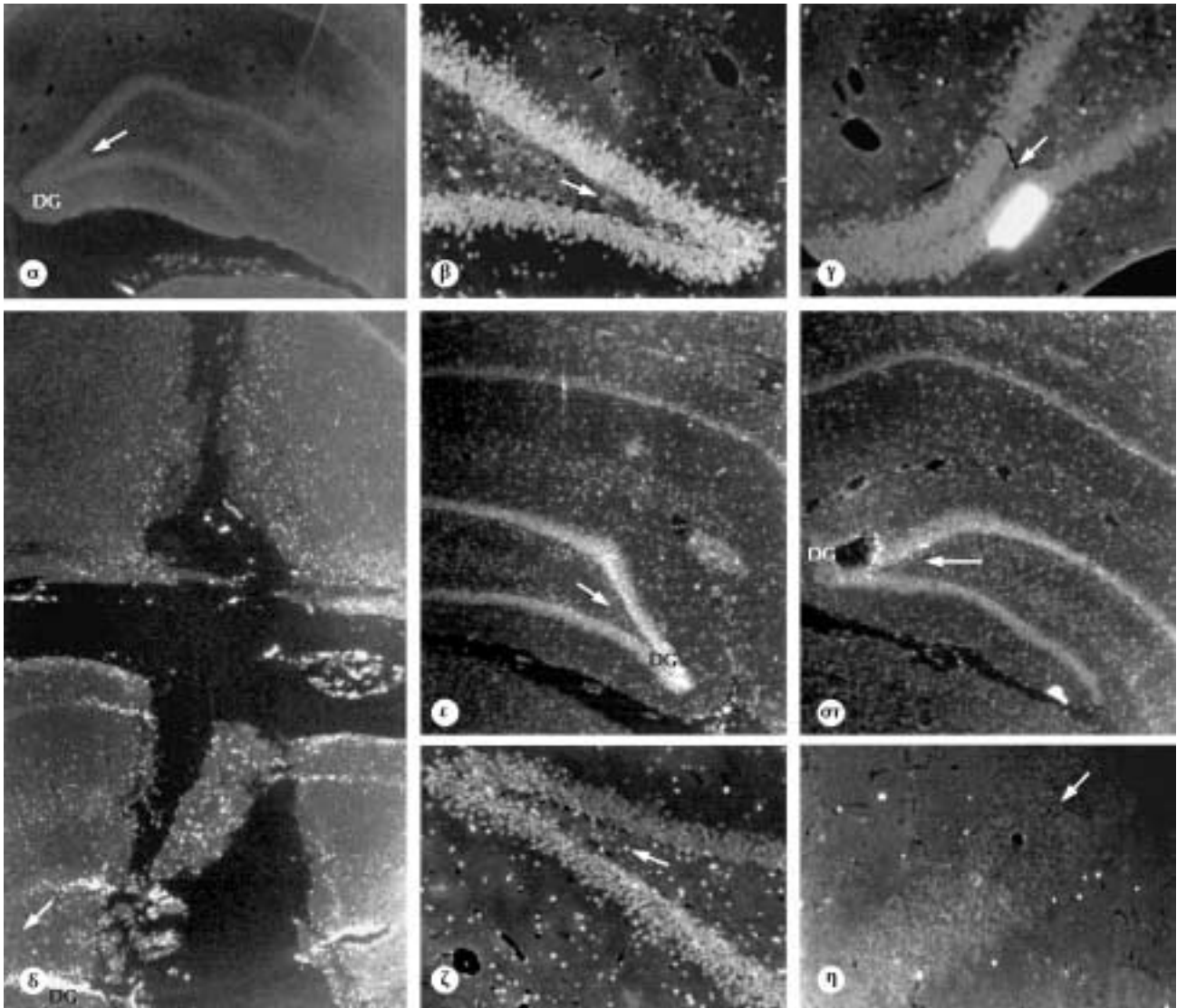
ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι εστιακοί, διεισδυτικοί τραυματισμοί, όταν δεν επιφέρουν τον άμεσο θάνατο, συνδέονται με μακροχρόνια προβλήματα υγείας, τα οποία εκτείνονται από το επίπεδο της κινητικότητας των ασθενών μέχρι την εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων και δυσλειτουργιών στη μνήμη και τη μάθηση. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται σε αυτά τα φαινόμενα δεν είναι ακόμη γνωστοί. Η μελέτη, στο επίπεδο των μοριακών μηχανισμών, του μοντέλου του εστιακού διεισδυτικού τραυματισμού, που εφαρμόζεται

στο εργαστήριό μας, επικεντρώθηκε σε συγκεκριμένες πτυχές της αντίδρασης του ιστού.

Hsp-70

Η Hsp-70 είναι μια πρωτεΐνη-μοριακός συνοδός, η οποία συμμετέχει στην επικάλυψη και μεταφορά των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα είτε την αποκατάστασή τους, είτε την αποδόμησή τους. Η έκφραση της πρωτεΐνης Hsp-70 αποτελεί δείκτη τραυματισμού/stress του κυττάρου.^{7,8} Έχει παρατηρηθεί ότι η περιοχή στην οποία εκτείνεται η επαγωγή της έκφρασής της αποτελεί την περιοχή όπου αναμένεται η κύρια εντόπιση νεκρωτικών και αποπτωτικών κυττάρων και γενικότερα εκφυλιστικών φαινομένων. Η έκφραση της Hsp-70 εμφανίζεται μέγιστη στις 12–24 ώρες μετά τον τραυματισμό και στη συνέχεια επιστρέφει σε φυ-

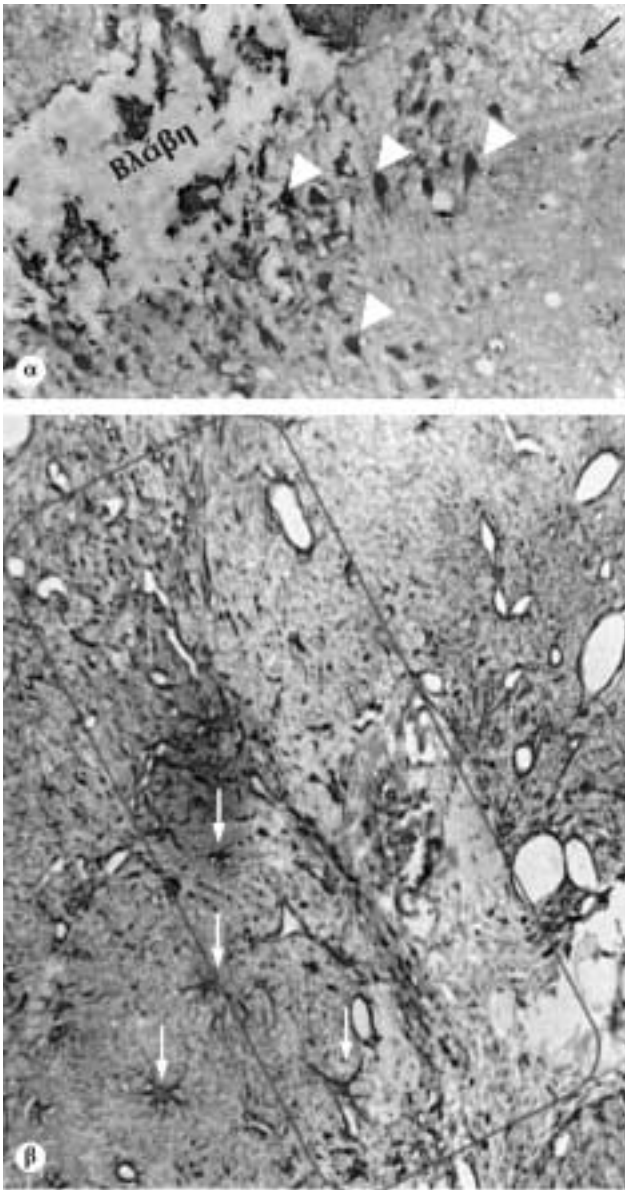


Εικόνα 5. Εντόπιση αποπτωτικών κυττάρων με την αντίδραση TUNEL. Στο φυσιολογικό επίμυ δεν εντοπίζονται αποπτωτικά κύτταρα (α). 12 ώρες μετά τον τραυματισμό εμφανίζονται πολυάριθμα αποπτωτικά κύτταρα εκατέρωθεν του τραύματος (δ) και ιδιαίτερα στη σιβάδα των κοκκιωδών κυττάρων (υποδεικνύεται από το βέλος) της οδοντωτής έλικας (DG), τόσο στον ιππόκαμπο του τραυματισμένου ημισφαιρίου (γ), όσο και στον αντιδιαμετρικό (β). Μία εβδομάδα μετά τον τραυματισμό, τα αποπτωτικά κύτταρα εντοπίζονται σε όλο το εύρος του ιπποκάμπου και στα δύο ημισφαίρια, τραυματισμένο (στ) και αντιδιαμετρικό (ε). Η χορήγηση του IGF-I επιφέρει σαφή μείωση των αποπτωτικών κυττάρων στον τραυματισμένο ιππόκαμπο -12 ώρες μετά τον τραυματισμό- (η), αλλά όχι και στον αντιδιαμετρικό (ζ).

σιολογικά επίπεδα.^{7,8} Τα αποτελέσματά μας συμβαδίζουν με τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα. Το γεγονός ότι η έκφραση της Hsp-70 παραμένει υψηλή γύρω από την περιοχική επουλώση της καταστροφής μία εβδομάδα μετά τον τραυματισμό, υποδεικνύει ότι νευροεκφυλιστικά φαινόμενα συνεχίζουν να υφίστανται, υπόθεση που επιβεβαιώνεται από την εκτεταμένη συνεντόπιση αποπτωτικών κυττάρων. Ακόμη, η ανοσοεντόπιση κυττάρων μακριά από το σημείο του τραύματος, κυρίως στο μεσολόβιο, συμφωνεί με κλινικά δεδομένα, τα οποία δείχνουν ότι η δομή αυτή είναι ιδιαίτερα ευάλωτη στους τραυματισμούς.¹²⁻¹⁴

Απόπτωση

Κυρίαρχο φαινόμενο, σε κυτταρικό επίπεδο, μετά από τραυματισμό είναι ο κυτταρικός θάνατος. Βραχυπρόθεσμα, στην εστία της καταστροφής του ιστού παρατηρείται εκτεταμένη νέκρωση, η οποία οφείλεται στα άμεσα μηχανικά φαινόμενα και στη μαζική απελευθέρωση γλουταμικού. Παράλληλα, δευτερογενείς μηχανισμοί επάγουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (ΠΚΘ), φαινόμενο που αυξάνεται σε ένταση μεταξύ των πρώτων



Εικόνα 6. Ανοσοϊστοχημική εντόπιση GFAP. 4 ώρες μετά τον τραυματισμό, στην εστία της καταστροφής του ιστού εντοπίζονται αστρογλοϊκά κύτταρα με τυπική μορφολογία (βέλη), καθώς και υπερμεγέθη, υπερτροφικά αστροκύτταρα (τρίγωνα) (α). Μία εβδομάδα αργότερα είναι εμφανής η συμμετοχή τυπικών αστρογλοϊκών κυττάρων (βέλη) στη διαδικασία επούλωσης της βλάβης (β, το πλαίσιο ορίζει την περιτραυματική περιοχή).

24–72 ωρών.^{15–18} Ακολουθεί μείωση της έντασης του ΠΚΘ και επανεμφάνισή του αργότερα, περίπου μετά από μία εβδομάδα, σε πολύ πιο απομακρυσμένες ανατομικά περιοχές. Το δεύτερο αυτό κύμα κυτταρικού θανάτου ενοχοποιείται για πολλές από τις δευτερογενείς, μακροχρόνιες επιπλοκές των εγκεφαλικών τραυματισμών και γι' αυτό αποτελεί στόχο των διαφόρων θεραπευτι-

κών στρατηγικών. Στα πειράματά μας, παρατηρείται σαφώς το φαινόμενο της επέκτασης της εντόπισης αποπτωτικών κυττάρων, τόσο ανατομικά, όσο και σε επίπεδο κυτταρικών τύπων. Μεγάλος αριθμός αποπτωτικών κυττάρων εντοπίζεται στον ιππόκαμπο, ο οποίος είναι δομή πολύ ευάλωτη στον τραυματισμό. Η σταδιακή εξάπλωση των αποπτωτικών φαινομένων και σε δομές ανατομικά πολύ απομακρυσμένες από το σημείο τραυματισμού (απιοειδής φλοιός, περιοχή τρίτης κοιλίας) είναι ένα ενδιαφέρον φαινόμενο, το οποίο οφείλεται στην πιθανή ενεργοποίηση συγκεκριμένων παραγόντων (π.χ. του μονοξειδίου του αζώτου) και νευρικών μονοπατιών. Τέλος, η παρουσία TUNEL-θετικών κυττάρων στην περιοχή επούλωσης του ιστού πιθανώς οφείλεται στα φαινόμενα ανάπλασης και στη δυναμική ισορροπία των διαφόρων κυτταρικών πληθυσμών που εντοπίζονται εκεί.

Νευροτροφίνες και IGF-I

Τέσσερις ώρες μετά τον τραυματισμό, η φυσιολογική ισορροπία στην έκφραση των νευροτροφινών και του IGF-I εμφανίστηκε έντονα διαταραγμένη. Παρατηρήθηκε δραματική μείωση των θετικών στον BDNF νευρικών ινών στο φλοιό και στον ιππόκαμπο, στην περιοχή του τραύματος, ενώ, αντίθετα, εμφανίστηκε αυξημένη παρουσία της πρωτεΐνης σε ίνες και σώματα στην παράπλευρη περιοχή. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με αυτά άλλων ερευνητικών ομάδων, στα οποία εμφανίζεται αύξηση, κυρίως στο επίπεδο του mRNA, μετά από αντίστοιχους, αλλά και άλλων τύπων, τραυματισμούς στην περιτραυματική περιοχή^{19–24} και μείωση στην εστία της βλάβης.²² Υπάρχουν πειραματικά δεδομένα που υποστηρίζουν την ύπαρξη τόσο ορθοδρομικής, όσο και αντιδρομικής²⁵ μεταφοράς του BDNF. Έχει δειχθεί δε ότι σε ορισμένες περιπτώσεις ο τραυματισμός οδηγεί σε αύξηση της ορθοδρομικής²⁶ και σε άλλες της αντιδρομικής²⁷ μεταφοράς. Συνεπώς, η έντονη παρουσία της πρωτεΐνης, παραπλεύρως του τραύματος, μπορεί να οφείλεται στην αύξηση είτε της αντιδρομικής μεταφοράς, είτε της παραγωγής και ορθοδρομικής μεταφοράς της. Η παρουσία ισχυρά ανοσοθετικών κυτταρικών σωμάτων και ινών στην παραπάνω περιοχή μπορεί να υποδηλώνει έναν αντιρροπιστικό, νευροπροστατευτικό μηχανισμό του ιστού στη βλάβη, αφού ο BDNF είναι γνωστό ότι διαθέτει προστατευτικές ιδιότητες.^{28,29} Σε ορισμένες περιπτώσεις, όμως, παρατηρήθηκε έντονη παρουσία BDNF-πρωτεΐνης σε μερικά κύτταρα στην εστία της βλάβης. Η μορφολογία των κυτταρικών τους σωμάτων θύμιζε κύτταρα που έχουν εισέλθει στη διαδικασία κυτταρικού θανάτου (εμφανίζονταν συρρικνωμένα σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά κύτταρα). Υπάρχουν πειραματικά δεδομένα που αποδεικνύουν ότι η είσοδος ιόντων α-

σβεστίου στο κυτταρόπλασμα επάγει την έκφραση του BDNF.³⁰ Όταν η εισροή ιόντων ασβεστίου είναι πολύ μεγάλης κλίμακας, όπως συμβαίνει στην περιοχή του τραυματισμού, κυρίως λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης εξωκυττάριου γλουταμικού, τότε επέρχεται υπερέκφραση του BDNF. Ο νεοσυντεθείς BDNF, με τη σειρά του, επάγει την περαιτέρω είσοδο ιόντων ασβεστίου στο κύτταρο,³⁰ με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός φαινομένου θετικής ανατροφοδότησης, το οποίο έχει νευροτοξικά αποτελέσματα, όπως ο κυτταρικός θάνατος. Τα παραπάνω αποτελούν πιθανή εξήγηση για την παρουσία των κυττάρων αυτών 4 ώρες μετά τον τραυματισμό και την απουσία των αντίστοιχων κυττάρων μία εβδομάδα μετά. Η μείωση των επιπέδων του BDNF στην περιοχή του τραύματος παρατείνεται τουλάχιστον για μία εβδομάδα μετά τον τραυματισμό και μάλιστα στην ίδια έκταση και ένταση. Δηλαδή, ο ιστός στερείται της νευροπροστατευτικής δράσης του για όλο αυτό το χρονικό διάστημα. Το φαινόμενο, μάλιστα, είναι έντονο στον ιππόκαμπο, στον οποίο ο BDNF συμμετέχει στο φαινόμενο της πλαστικότητας των συνάψεων.³¹ Η παρατήρηση αυτή πιθανώς συνδέεται με τις δευτερογενείς διαταραχές των γνωστικών ικανοτήτων των ασθενών μετά από τραυματισμό.

Όσον αφορά τη νευροτροφίνη NT-3, η αρχική (στις 4 και 12 ώρες) μείωση των επιπέδων της, η οποία είναι σαφώς μικρότερης έντασης σε σχέση με αυτή του BDNF, εμφανίζεται να έχει τελείως αναστραφεί μία εβδομάδα αργότερα. Η εντόπιση της NT-3 στην περιοχή επούλωσης του τραυματισμού είναι πολύ έντονη και σαφώς υποδεικνύει πιθανό ρόλο της στη διαδικασία αποκατάστασης της ιστικής βλάβης. Η NT-3 έχει βρεθεί να διαθέτει νευροτροφικές και νευροαναγεννητικές ιδιότητες.^{28,32} Σε αντίθεση με τα δικά μας αποτελέσματα, σε άλλες μελέτες δεν αναφέρονται σημαντικές τροποποιήσεις στην έκφραση της NT-3, κυρίως στο επίπεδο του mRNA της,^{20,21,23} μετά από τραυματισμό. Η αντίθεση αυτή πιθανώς να οφείλεται στη χρήση διαφορετικών μοντέλων τραυματισμού. Είναι, μάλιστα, ήδη κλινικά αποδεδειγμένο ότι οι διεισδυτικοί τραυματισμοί παρουσιάζουν διαφορετικά κλινικά στοιχεία σε σχέση με τους γενικευμένους και απαιτούν διαφορετικές θεραπευτικές προσεγγίσεις. Για παράδειγμα, η εμφανής αστροκυτταρική αντίδραση του ιστού, που παρατηρείται στο μοντέλο μας, καθώς και οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ των ποικίλων κυτταρικών πληθυσμών (π.χ. ενεργοποιημένα μακροφάγα του αίματος, αλλά και τοπικά του ιστού, ενδοθηλιακά και επενδυματικά κύτταρα)³³ και διαμεσολαβούνται από την αθρόα έκκριση κυτταροκινών,³⁴ πιθανόν να μη συμβαίνουν σε άλλου τύπου εγκεφαλικούς τραυματισμούς.

Ένας σημαντικός τροφικός και αυξητικός παράγοντας, με δράση στο νευρικό σύστημα, είναι ο IGF-I. Λειτουργεί

τόσο με αυτοκρινή όσο και με παρακρινή τρόπο.³⁵ Παράγεται από αρκετούς κυτταρικούς τύπους μετά από τραυματισμό (νευρικά και γλοία κύτταρα) και επιδρά επίσης σε πολλούς διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς, ιδιαίτερα στα ολιγοδενδρογλοιακά και αστρογλοιακά κύτταρα. Πολλές εργασίες έχουν δείξει αύξηση στην έκφραση του IGF-I μετά από τραυματισμό του εγκεφάλου, τόσο στο επίπεδο του mRNA όσο και της πρωτεΐνης, καθώς και αλλαγές και στα υπόλοιπα στοιχεία του άξονα δράσης του IGF.^{36,37} Στο μοντέλο μας, επιβεβαιώνονται τα παραπάνω δεδομένα. Η αρχική (4 και 12 ώρες) επαγωγή της έκφρασης του IGF-I φαίνεται να περιορίζεται κυρίως σε νευρικά κύτταρα. Μία εβδομάδα όμως αργότερα 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. Τα στοιχεία αυτά ενισχύουν την υπόθεση, σύμφωνα με την οποία η επαγωγή του IGF-I αποτελεί –πιθανώς– νευροπροστατευτική αντίδραση του ιστού. Με βάση τα παραπάνω, μελετήθηκε η προστατευτική επίδραση της τοπικής χορήγησης IGF-I βραχέως μετά τον τραυματισμό, δηλαδή σε ένα χρονικό διάστημα κατά το οποίο ο ενδογενής IGF-I δεν έχει προλάβει να επαχθεί σε σημαντικό βαθμό.

Χορήγηση IGF-I

Τα πειράματά μας αποκαλύπτουν ότι η χορήγηση IGF-I έχει ως αποτέλεσμα την αναστροφή συγκεκριμένων φαινομένων και τελικά τη διατήρηση της φυσιολογικής εικόνας του ιστού, κυρίως μέσω της διαφύλαξης της ισορροπίας στην έκφραση των νευροτροφινών. Μετά τη χορήγηση του IGF-I δεν παρατηρείται η μείωση του αριθμού των θετικών σε BDNF νευρικών ινών, όπως επίσης και η μείωση στην έκφραση της NT-3. Ο IGF-I είναι γνωστό ότι παρουσιάζει προστατευτική δράση στα ολιγοδενδρογλοιακά κύτταρα,³⁸ έναν κυτταρικό πληθυσμό ιδιαίτερα ευαίσθητο στους τραυματισμούς^{39,40} (η απομυελινοποίηση είναι βασικό εύρημα σε περιπτώσεις τραυματισμού, αλλά και άλλων νευροπαθολογικών περιπτώσεων). Είναι, συνεπώς, πιθανό η διατήρηση σε μεγάλο βαθμό των θετικών στον BDNF νευρικών ινών, μετά τη χορήγηση IGF-I, να οφείλεται στην ενισχυμένη αντίσταση των ολιγοδενδρογλοιακών κυττάρων στις συνέπειες του τραύματος και, επομένως, στη διατήρηση του ελύτρου μυελίνης γύρω από τους νευρικούς άξονες. Το γεγονός ότι και η επαγωγή της Hsp-70 φαίνεται να μειώνεται μετά τη χορήγηση IGF-I, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο παράγοντας αυτός συμβάλλει στη διατήρηση της ομοιόστασης του ιστού, τουλάχιστον για τις πρώτες 12 ώρες. Σαφής ήταν επίσης η επίδραση του IGF-I στην ένταση και έκταση του φαινομένου της απόπτωσης, καθώς οδήγησε στη μείωση του αριθμού των αποπτωτικών

κυττάρων. Τα αποτελέσματά μας τεκμηριώνουν τις νευροπροστατευτικές ιδιότητες του IGF-I και αναδεικνύουν τον παράγοντα αυτόν ως ένα καλό υποψήφιο θεραπευτικό μέσο. Η δυνατότητα θεραπευτικής χρήσης του IGF-I ενισχύεται και από το δεδομένο ότι μπορεί να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό^{41,42} και συνεπώς να χορηγηθεί περιφερικά. Αξίζει να αναφερθεί ότι έχουν ήδη ξεκινήσει προσπάθειες κλινικής δοκιμής του.⁴³

Η δυνατότητα θεραπευτικής χρήσης του IGF-I ενισχύεται και από προκαταρκτικά πειράματά μας, στα οποία η χορήγηση IGF-I φαίνεται να οδηγεί στη γενικότερη βελτίωση της φυσιολογικής κατάστασης των τραυματισμένων

επιμύων (βάρος σώματος, πρόσληψη τροφής), τουλάχιστον για μία εβδομάδα μετά τον τραυματισμό.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία αφιερώνεται στην αγαπητή συνάδελφο Αγγέλα Κλαυδιανού. Ευχαριστούμε θερμώς τον καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Παναγιώτη Δάβαρη και τον αναπληρωτή καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής κ. Ευστράτιο Πατσούρη για τη στήριξή τους στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας και τις χρήσιμες υποδείξεις τους.

ABSTRACT

Molecular mechanisms involved in the response of brain tissue to trauma

E. KAZANIS, H. FILIPPIDOU, F. STYLIANOPOULOU

Faculty of Nursing, Laboratory of Biology-Biochemistry, University of Athens, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2001, 18(4):363-374

OBJECTIVE Brain trauma is a major medical problem. It is a primary cause of death, and in the event of survival it leads to long-term ill-health, as well as social and economic problems. The elucidation of the molecular mechanisms involved in the destruction of brain tissue after trauma and in the induction of permanent changes in brain function is necessary for the development of rational therapeutic approaches. **METHOD** A model of focal, mechanical, penetrating injury was employed in adult rats. In this model the expression of certain proteins was studied in order to investigate the response of the brain tissue to trauma. The expression of Heat-shock protein-70 (Hsp-70), Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), Neurotrophin-3 (NT-3), the astrocytic marker Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) and Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) were studied immunohistochemically. The occurrence of apoptotic cell death was investigated by the TUNEL reaction. In addition, IGF-I was administered to the injured rats and its neuroprotective properties were determined. **RESULTS** 4 and 12 hours after the injury, an increase in Hsp-70 expression, limited induction of IGF-I and activation of astroglia around the core of the injury were observed. Neurotrophin expression was severely reduced in a restricted peritraumatic zone and scattered apoptotic cells were detected, mainly in the injured hemisphere but to a lesser degree in the contralateral hemisphere. One week later, an astroglial scar had been formed at the site of the injury and Hsp-70 expression was limited. BDNF levels remained low, while the reduction in NT-3 was no longer visible. IGF-I expression as well as the number of apoptotic cells were further increased. The local administration of IGF-I following the injury restored the normal tissue patterns to a significant degree, as evidenced by the maintenance of normal neurotrophin expression and the reduction of the apoptosis in the injured hemisphere. **CONCLUSIONS** Focal mechanical injury of the brain induces significant local changes in BDNF, NT-3 and IGF-I expression, which remain detectable at least one week after the injury. With time, degenerative cellular phenomena, as reflected by Hsp-70 expression and apoptotic cell death, spread beyond the site of tissue damage. Administration of IGF-I after the injury reverses some of these phenomena and is able to help maintain homeostasis of the brain tissue.

Key words: Apoptosis, Brain trauma, Hsp-70, Neurotrophins, IGF-I

Βιβλιογραφία

1. ACOSTA JA, YANG JC, WINCHELL RJ, SIMONS RK, FORTLAGE DA, HOLLINGSWORTH-FRIDLUND P ET AL. Lethal injuries and time to death in a level I trauma centre. *J Am Coll Surg* 1998, 186:528-533
2. MURRAY GD, TEASDALE GM, BRAAKMAN R, COHADON F, DEARDEN M, IANOTTI F ET AL. The European Brain Injury Consortium Survey of Head Injuries. *Acta Neurochir (Wien)* 1999, 141:223-236
3. THURMAN DJ, ALVERSON C, DUNN KA, GUERRERO J, SNIEZEK JE. Traumatic brain injury in the United States: A public health perspective. *J Head Trauma Rehabil* 1999, 14:602-615
4. ECKSTEIN M. The prehospital and emergency department management of penetrating head injuries. *Neurosurg Clin North Am* 1995, 6:741-751

5. AMIRJAMSHIDI A, ABBASSIOUN K, ROOSBEH H. Air-gun pellet injuries to the head and neck. *Surg Neurol* 1997, 47:331–338
6. ANSARI SA, PANEZAI AM. Penetrating injuries: an escalating problem in Pakistan. *Br J Neurosurg* 1998, 12:340–343
7. DUTCHER SA, UNDERWOOD BD, WALKER PD, DIAZ FG, MICHAEL DB. Patterns of heat-shock protein 70 biosynthesis following human traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 1998, 15:411–420
8. RAJDEV S, SHARP FR. Stress proteins as molecular markers of neurotoxicity. *Toxicol Pathol* 2000, 28:105–112
9. EDABI M, BASHIR RM, HEIDRICK ML, HAMADA FM, EL RAFAEY H, HAMED A ET AL. Neurotrophins and their receptors in nerve injury and repair. *Neurochem Int* 1997, 30:347–174
10. BASKIN DG, WILCOX BJ, FIGLEWICZ DP, DORSA DM. Insulin and insulin-like growth factors in the CNS. *Trends Neurosci* 1988, 11:107–111
11. RIDET JL, MALHOTRA SK, PRIVAT A, CAGE FH. Reactive astrocytes: Cellular and molecular cues to biological function. *TINS* 1997, 20:570–577
12. CHRISTIAENS JL, BLOND S. Acquired lesions of the corpus callosum. *Neurochirurgie* 1998, 44:116–124
13. PARIZEL PM, OSZARLAK, VAN GOETHEM JW, VAN DE HAUWE L, DILLEN C, VERLOOY J ET AL. Imaging findings in diffuse axonal injury after closed head trauma. *Eur Radiol* 1998, 8:960–965
14. GENTRY LR, GODERSKY JC, THOMPSON B. MR imaging of head trauma: review of the distribution and radiopathologic features of traumatic lesions. *Am J Roentgenol* 1988, 150:663–672
15. KHARLAMOV A, TOLG U, JOO J-X, MANEV H. Pharmacological characterization of apoptotic cell death in a model of photothrombotic brain injury in rats. *Brain Res* 1996, 734:1–9
16. RINK A, FUNG K-M, TROJANOWSKI JQ, LEE VM-Y, NEUGEBAUER E, MACINTOSH TK. Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat. *Am J Pathol* 1995, 147:1575–1583
17. PORTERA-CAILLIAU C, HEDREEN JC, PRICE DL, KOLIATSOS VE. Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. *J Neurosci* 1995, 15:3775–3787
18. CONTI AC, RAGHUPATHI R, TROJANOWSKI JQ, MACINTOSH TK. Experimental brain injury induces regionally distinct apoptosis during the acute and delayed post-traumatic period. *J Neurosci* 1998, 18:5663–5672
19. ZHOU X-F, CHIE ET, DENG Y-S, ZHONG JH, QING X, RUSH RA ET AL. Injured primary sensory neurons switch phenotype for brain-derived neurotrophic factor in the rat. *Neuroscience* 1999, 92:841–853
20. HICKS RR, MARTIN VB, ZHANG L, SEROOGY KB. Mild experimental brain injury differentially alter the expression of neurotrophin and neurotrophin receptor mRNAs in the hippocampus. *Exp Neurol* 1999, 160:469–478
21. HICKS RR, NUMAN S, DHILLON HS, PRASAD MR, SEROOGY KB. Alterations in BDNF and NT-3 mRNAs in rat hippocampus after experimental brain trauma. *Brain Res Mol Brain Res* 1997, 48:401–406
22. HUGHES PE, ALEXI T, WALTON M, WILLIAMS CE, DRAGUNOW M, CLARK RG ET AL. Activity and injury-dependent expression of inducible transcription factors, growth factors and apoptosis-related genes within the central nervous system. *Prog Neurobiol* 1999, 57:421–450
23. YANG K, PEREZ-POLO JR, MU XS, YAN HQ, XUE JJ, IWAMOTO Y ET AL. Increased expression of brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin-3 mRNA in rat brain after cortical impact injury. *J Neurosci Res* 1996, 44:157–164
24. TRUETTNER J, SCHMIDT-KASTNER R, BUSTO R, ALONSO OF, LOOR JY, DIETRICH WD ET AL. Expression of brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, and heat shock protein HSP-70 following fluid percussion brain injury in rats. *J Neurotrauma* 1999, 16:471–486
25. MUFSON EJ, KROIN JS, SENDERA TJ, SOBREVIELA T. Distribution and retrograde transport of trophic factors in the central nervous system: functional implications for the treatment of neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol* 1999, 57:451–484
26. TONRA JR, CURTIS R, WONG V, CLIFFER KD, PARK JS, TIMMES A ET AL. Axotomy upregulates the anterograde transport and expression of brain-derived neurotrophic factor by sensory neurons. *J Neurosci* 1998, 18:4374–4383
27. CURTIS R, TONRA JR, STARK JL, ADRYAN KM, PARK JS, CLIFFER KD ET AL. Neuronal injury increases retrograde axonal transport of neurotrophins to spinal sensory neurons and motor neurons via multiple receptor mechanisms. *Mol Cell Neurosci* 1998, 12:105–118
28. BURKE MA, BOBLEY WC, CHO J, WIEGAND SJ, LINDSAY RM, MUFSON EJ ET AL. Loss of developing cholinergic basal forebrain neurons following excitotoxic lesions of the hippocampus: rescue by neurotrophins. *Exp Neurol* 1994, 130:178–195
29. FRIEDMAN B, KLEINFELD D, IP NY, VERGE VM, MOULTON R, BOLAND P ET AL. BDNF and NT-4/5 exert neurotrophic influences on injured adult spinal motor neurons. *J Neurosci* 1995, 15:1044–1056
30. LIPTON P, KALIL R. Neurotrophic factors—Their role in development, trauma and disease. *Neural Notes* 1995, 1:3–10
31. BOLTON MM, LO DC, SHERWOOD NT. Long-term regulation of excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal cultures by brain-derived neurotrophic factor. *Prog Brain Res* 2000, 128:203–218
32. ROSENTHAL A, GOEDDEL DV, NGUYEN T, LEWIS M, SHIH A, LARAMEE GR ET AL. Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor. *Neuron* 1990, 4:767–773
33. LOTAN M, SCHWARTZ M. Cross talk between the immune system and the nervous system in response to injury: implications for regeneration. *FASEB J* 1994, 8:1026–1033
34. FUERSTEIN GZ, WANG X, BARONE FC. Inflammatory gene expression in cerebral ischemia and trauma. Potential new therapeutic targets. *Ann NY Acad Sci* 1997, 15:179–193
35. LINDHOLM D, CAROLL P, TZIMAGIOGIS G, THEONEN H. Autocrine-paracrine regulation of hippocampal neuron survival by IGF-I and the neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4. *Eur J Neurosci* 1996, 8:1452–1460
36. NORDQVIST A-CS, VON HOLST H, HOLMIN S, SARA VR, BELLANDER B-M, SCHALLING M. Increase of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF binding protein-2 and -4 mRNAs following cerebral contusion. *Mol Brain Res* 1996, 38:285–293
37. LI X, WILLIAMS M, BARTLETT WP. Induction of IGF-1 mRNA expression following traumatic injury to the postnatal brain. *Mol Brain Res* 1998, 57:92–96
38. MASON JL, YE P, SUZUKI K, D'ERCOLE AJ, MATSUSHIMA GK. Insulin-like growth factor-1 inhibits mature oligodendrocyte apoptosis during primary demyelination. *J Neurosci* 2000, 20:5703–5708
39. SHIBATA M, HISAHARA S, HARA H, YAMAWAKI T, FUKUUCHI Y, YUAN J. Caspases determine the vulnerability of oligodendrocytes in the ischemic brain. *J Clin Invest* 2000, 106:643–653
40. PAN W, KASTIN AJ. Interactions of IGF-I with the blood-brain barrier *in vivo* and *in situ*. *Neuroendocrinology* 2000, 72:171–178
41. REINHARDT RR, BONDY CA. Insulin-like growth factors cross the blood-brain barrier. *Endocrinology* 1994, 135:1753–1761
42. HATTON J, RAPP RP, KUDSK KA, BROWN RO, LUER MS, BUKAR JG ET AL. Intravenous insulin-like growth factor-I (IGF-I) in moderate-to-severe head injury: a phase II safety and efficacy trial. *J Neurosurg* 1997, 86:779–786

Corresponding author:

E. Kazanis, 123 Papadiamantopoulou street, GR-115 27 Goudi, Athens, Greece