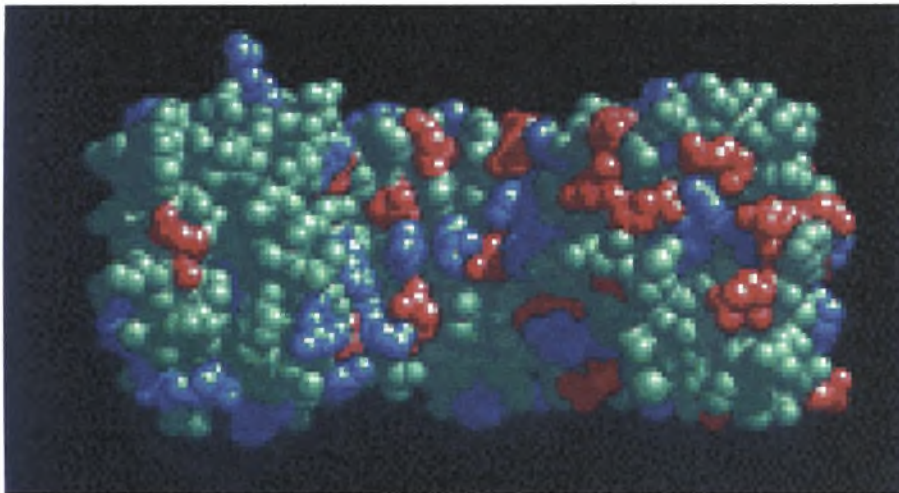


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΜΗΜΑ Π.Σ.Ε. ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΤΗΣ ΕΛΛΗΣ ΚΑΡΑΜΟΣΧΟΥ**

ΘΕΜΑ:

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ
ΝΤΕΚΟΡΙΝΗΣ ΣΕ ΙΣΧΑΙΜΙΚΟ-ΥΠΟΞΙΚΟ ΕΓΚΕΦΑΛΟ
ΕΠΙΜΥΩΝ**



ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: κ. ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ ΚΡΙΤΗΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 2848/1
Ημερ. Εισ.: 23/06/2003
Δωρεά:
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΠΣΕ-ΙΒ
2003
ΚΑΡ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



004000103189

2

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

ΠΡΟΛΟΓΟΣσελ. 2	σελ. 2
ABSTRACTσελ. 4	σελ. 4
ΕΙΣΑΓΩΓΗσελ. 5	σελ. 5
❖ Η ΝΤΕΚΟΡΙΝΗ.....σελ. 5	σελ. 5
❖ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΝΤΕΚΟΡΙΝΗΣ.....σελ. 6	σελ. 6
❖ ΠΟΥ ΚΑΙ ΠΟΤΕ ΕΚΦΡΑΖΕΤΑΙ Η ΝΤΕΚΟΡΙΝΗ.....σελ. 8	σελ. 8
❖ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΝΤΕΚΟΡΙΝΗΣ ΜΕ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ.....σελ. 9	σελ. 9
❖ ΥΠΟΞΙΚΟΣ ΕΓΚΕΦΑΛΟΣ.....σελ. 12	σελ. 12
❖ ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΤΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ ΣΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ.....σελ. 18	σελ. 18
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑσελ. 22	σελ. 22
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑσελ. 29	σελ. 29
ΣΥΖΗΤΗΣΗσελ. 38	σελ. 38
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑσελ. 43	σελ. 43

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η πτυχιακή μου εργασία πραγματοποιήθηκε κατά το διάστημα Μαΐου 2002-Ιανουαρίου 2003 στο Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Η εργασία μου δεν θα ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθεί χωρίς την πολύτιμη βοήθεια και συμβολή των καθηγητών και συνεργατών της Ιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, τους οποίους αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω:

- ❖ Την κα Ολυμπία Γκίμπα-Τζιαμπίρη, Καθηγήτρια Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής, διευθύντρια του Εργαστηρίου Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής και αντιπρύτανη του Α.Π.Θ., η οποία με φιλοξένησε στο εργαστήριο καθ' όλη διάρκεια του πειραματικού μέρους της εργασίας μου, θέτοντας στη διάθεσή μου τον απαραίτητο επιστημονικό εξοπλισμό, συμβάλλοντας καθοριστικά στην εκπαίδευσή μου και στην εκπόνηση της εργασίας μου.
- ❖ Την κα. Σοφία Μπονάνου- Τζεδάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Πρόεδρο του Π.Σ.Ε. Ιατρική Βιοχημεία, για τη βοήθεια, τη συμπαράσταση και την εξαιρετική διδακτική της παρουσία όλα τα χρόνια των σπουδών μου στην Ιατρική Βιοχημεία, καθώς και για τη συγκατάθεσή της για την πραγματοποίηση της εργασίας μου στη Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ.
- ❖ Την κα Εύα Σπάνδου, Λέκτορα του τμήματος Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ., η οποία μας εισήγαγε στο πειραματικό μοντέλο

πρόκλησης ισχαιμίας-υποξίας σε επίμυες, μας προμήθευσε με ιστοτεμάχια των εγκεφάλων που μελετήσαμε και μας παραχώρησε ευγενικά φωτογραφικό υλικό, το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην εργασία.

- ❖ Την κα. Ελένη Παπακωσταντίνου, Λέκτορα του τμήματος Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ. για τη βοήθειά της στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων, χωρίς την οποία δεν θα ήταν δυνατή η ανάλυση και στοιχειοθέτηση των αποτελεσμάτων μας.
- ❖ Τον κ. Γεώργιο Τζημαγιώργη, Λέκτορα του τμήματος Βιοχημείας του Α.Π.Θ. για τη βοήθειά του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας μου.
- ❖ Την κα. Χρυσάνθη Πεσιτζάκη, τεχνικό εργαστηρίων του τμήματος Φαρμακολογίας, για τη βοήθειά της σε εργαστηριακά ζητήματα
- ❖ Τους γραμματείς του Π.Σ.Ε. Ιατρική Βιοχημεία, κα Ευαγγελία Νούσιου και κ. Ηλία Βαλιάκο για τη βοήθειά τους στα διαδικαστικά θέματα που αφορούσαν την πτυχιακή μου εργασία

Θα ήθελα, τέλος, να ευχαριστήσω ξεχωριστά τον κ. Αριστείδη Κριτή, Λέκτορα του τμήματος Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ., για τη συνεχή καθοδήγηση, συμπαράσταση και βοήθεια που μου προσέφερε αφειδώς, τόσο ως προς την πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους, όσο και ως προς τη συγγραφή της εργασίας μου. Τον ευχαριστώ για τις πολύτιμες συμβουλές του, τη διόρθωση των λαθών μου και γενικότερα για τον καθοριστικό του ρόλο στη διεξαγωγή της παρούσας εργασίας.

ABSTRACT

In the present study we investigate the expression of decorin gene in neonatal rat brain during ischemic and hypoxic conditions. Decorin is a protein molecule which belongs to the family of small rich in leucine proteoglycans (SLRPs) and it is present in several cells through maturation process. Decorin interacts with important factors that influence the cellular cycle as TGF- β (transformer growth factor β) and the receptor of EGF (epidermic growth factor) and with elements of extra cellular matrix as collagen. Those properties of decorin conduct us to the suspicion that it plays an important role in the control of cellular cycle and the process of maturation and proliferation.

For the experiment procedure we used seven-day-old wistar rat pups that were exposed in hypoxic conditions (8% oxygen –92% nitrogen mixture for 60 min), two or three hours after permanent occlusion of their left common carotid. We isolated RNA from the brain of rats who were sacrificed at 0h, 2h, 24h, 48h, 72h and 7 days after the ischemic and hypoxic conditions. The RNA was subjected to reverse transcription and competitive PCR amplification under standard conditions including b-actin as internal control for gene expression.

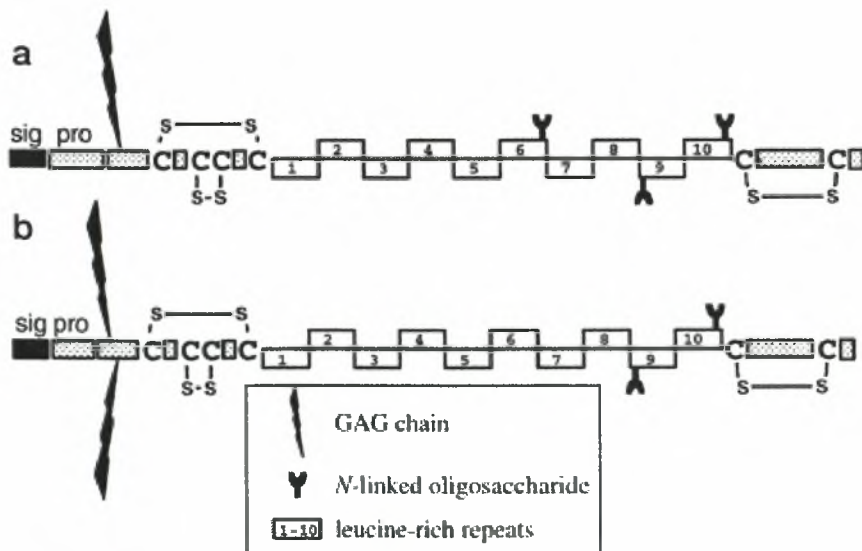
Our results demonstrated an initial diminution both in the right and the left hemisphere of decorin gene expression due in the cell death during ischemia / hypoxia and a tension of return in normal levels from 48h. After seven days decorin gene expression seems to increase up to normal levels. This results support previous studies, which correlate the increased levels of decorin during angiogenesis, with the formation of capillaries.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ΝΤΕΚΟΡΙΝΗ

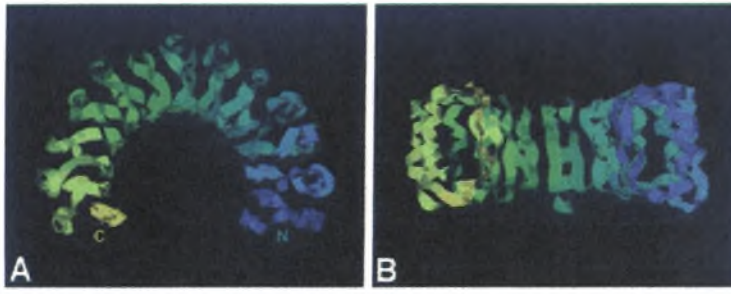
Η ντεκορίνη είναι μια πρωτεΐνη του εξωκυττάριου χώρου που ανήκει στην οικογένεια των πρωτεογλυκανών. Οι πρωτεογλυκάνες είναι γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες παίζουν βασικό ρόλο στην οργάνωση και λειτουργία των ιστών και είτε δομούν τη βασική μεμβράνη, στην οποία συνδέονται τα κύτταρα (περλεκάνη, αγγρίνη, μπαμακάνη), είτε αντιδρούν με το υαλουρονικό οξύ (υαλεκτάνες, όπως βερσικάνη, αγγρικάνη, νευρικάνη, μπρεβκάνη), είτε ενέχονται σε πολύπλοκες βιολογικές διαδικασίες, όπως οι μικρές πλούσιες σε λευκίνη πρωτεογλυκάνες (SLRPs), οι οποίες μπορεί να περιέχουν N-συνδεδεμένους ολιγοσακχαρίτες, αλυσίδες θεικής χονδροϊτίνης, θεικής κερατάνης ή θεικής δερματάνης.

Η ντεκορίνη μαζί με τη διγλυκάνη ανήκει στην πρώτη τάξη των SLRPs πρωτεογλυκανών. Στα θηλαστικά αποτελείται από έναν πυρήνα 40KDa, ο οποίος συνδέεται με μια μονή αλυσίδα χονδροϊτίνης- θεικής δερματάνης και αποτελείται από χαρακτηριστικές επαναλαμβανόμενες ακολουθίες 24 αμινοξέων, πλούσιες σε λευκίνη και κατάλοιπα ασπαραγίνης. Είναι μια πρωτεΐνη 332 αμινοξέων που περιέχει δισουλφιδικές έλικες, καλά διατηρημένες κατά την εξέλιξη των ειδών.



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της πρωτοταγούς δομής της ντεκορίνης από το άρθρο των Priya Krishnan et al. (50)

Προσεγγίσεις για την τρισδιάστατη αναπαράσταση της πρωτεΐνης έγιναν κατά αναλογία με ένα γνωστό μόριο, το οποίο διαθέτει επίσης επαναλήψιμες αλληλουχίες, πλούσιες σε λευκίνη. Έτσι, δημιουργήθηκε ένα υποθετικό μοντέλο της στερεοδιάταξης της ντεκορίνης, η οποία παρουσιάζεται σε αψιδωτή μορφή, με μια εσωτερική κοίλη επιφάνεια, διαμορφωμένη από δομές β πτυχώσεων (περιοχές πλούσιες σε λευκίνη) και με μία εξωτερική κυρτή επιφάνεια που αποτελείται από α-έλικες. (48)



Εικόνα 2: Μοντέλο στερεοδιάταξης της ντεκορίνης από το άρθρο των I.T.Weber et al. (48).

ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΝΤΕΚΟΡΙΝΗΣ

Στον άνθρωπο η ντεκορίνη εκφράζεται σε 293 διαφορετικά είδη κυττάρων. Τα επίπεδα μεταγραφής εξαρτώνται από το είδος του κυττάρου, τη φάση του κυτταρικού κύκλου και τη φάση της ανάπτυξης του οργανισμού. Η περιοχή ελέγχου της μεταγραφής του γονιδίου (υποκινητής) εντοπίζεται στο 5' άκρο μεταξύ των νουκλεοτιδίων -983 ως -222. Οι παράγοντες επαγωγής της μεταγραφής περιλαμβάνουν την IL-1, και τον TGF-β, ενώ ανασταλτικοί παράγοντες περιλαμβάνουν την INF-γ και τον TNF-α. Ο TNF-α αν και έχει παρόμοιες βιολογικές δράσεις με την IL-1, όσον αφορά την ανοσοποίηση, τη φλεγμονή και την ιστική αναδιαμόρφωση, έχει αντίθετη δράση μ' αυτή ως προς τη μεταγραφή του γονιδίου της ντεκορίνης. (10)

Έχειδειχθεί ότι ο TGF-β επάγει την ανάπτυξη των μεσεγχυματικών κυττάρων και δρα ως ανασταλτικός παράγοντας για την ανάπτυξη των επιθηλιακών κυττάρων. Επάγει τη σύνθεση της ντεκορίνης και η ντεκορίνη δεσμεύει τον TGF-β, δρώντας ως μηχανισμός αρνητικής επανατροφοδότησης στη δραστηριότητά του. Έχουν γίνει πειράματα τα οποία δείχνουν αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου της ντεκορίνης κατά το διάστημα λίγο πριν τη φάση της διαφοροποίησης των ινοβλαστών που βρίσκονται σε καλλιεργητικό μέσο. Αύξηση της πρωτεΐνης της ντεκορίνης κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαφοροποίησης, κατά την οποία παρατηρείται παύση του κυτταρικού κύκλου και παραμονή του κυττάρου στη φάση G1, εμπλέκει την πρωτεΐνη αυτή στις διαδικασίες ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, πιθανότατα μέσω της δέσμευσης και αναστολής της δράσης του TGF-β. (10, 19)

Ο TNF-α έχει άλλοτε διεγερτική και άλλοτε ανασταλτική δράση για την μεταγραφή των γονιδίων. Στην περίπτωση του γονιδίου της ντεκορίνης συνδέεται στην περιοχή του υποκινητή, μειώνοντας σημαντικά τη δραστηριότητά του. Η σύνδεσή του όμως με ρυθμιστικές περιοχές άλλων γονιδίων έχει διεγερτική δράση. Επάγει τη σύνθεση πρωτεϊνών που ενέχονται στην απάντηση του οργανισμού σε καταστάσεις φλεγμονής. Παράδειγμα τέτοιων πρωτεϊνών, αποτελούν οι προσταγλανδίνες, οι οποίες παράγονται από τα κύτταρα του συνδετικού ιστού, η IL-8, η κολλαγενάση, η στρωμολυσίνη και οι μεταλλοπρωτεάσες. (10)

Η INF-γ επιδρά στην έκφραση των πρωτεογλυκανών με διάφορους τρόπους. Μελέτες που έγιναν σε ανθρώπινα χονδροκύτταρα, τα οποία βρίσκονταν σε καλλιεργητικό μέσο, έδειξαν ότι η INF-γ αναστέλλει τη μεταγραφή των γονιδίων της αγγρεκάνης, της διγλυκάνης και της ντεκορίνης, μέσω της σύνδεσής της με τις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων αυτών. Ειδικότερα, μειώνει τη μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου της ντεκορίνης κατά 17% και ελαττώνει τα επίπεδα του mRNA κατά 23%. (13)

Αξίζει να σημειωθεί επίσης, ότι αυξημένη έκφραση του γονιδίου της ντεκορίνης βρέθηκε στον εξωκυττάριο χώρο των καρκινικών κυττάρων (όπως αυτών του παχέος εντέρου), χρησιμεύοντας, πιθανότατα ως μεταφορέας μηνύματος ανάμεσα στα νεοπλασματικά κύτταρα και στα μόρια που αποτελούν τη θεμέλια ουσία. (10)

ΠΟΥ ΚΑΙ ΠΟΤΕ ΕΚΦΡΑΖΕΤΑΙ Η ΝΤΕΚΟΡΙΝΗ

Σε πειράματα που έγιναν σε επίμυες, βρέθηκε ότι η έκφραση του γονιδίου της ντεκορίνης εξαρτάται από τη φάση ανάπτυξης του οργανισμού. Κατά την περίοδο P1 στο εμβρυϊκό στάδιο, τα ποσοστά του mRNA της ντεκορίνης που ανιχνεύονται στον εγκέφαλο είναι περιορισμένα, ενώ τρεις μέρες μετά, όταν το έμβρυο εισέρχεται στην P4 φάση το mRNA που ανιχνεύεται, φτάνει στο μέγιστο της τιμής του και διατηρείται σ' αυτά τα επίπεδα μέχρι τον τοκετό. Σε νεογέννητα ποντίκια το mRNA βρίσκεται στα μέγιστα επίπεδα στον εγκέφαλο την τρίτη μέρα μετά τον τοκετό και στη συνέχεια παρουσιάζουν πτώση, μέχρι να φτάσει στην τιμή που παρατηρείται κατά την ενήλικη ζωή. Σε ενήλικα ζώα παραμένουν ανιχνεύσιμα ποσοστά mRNA στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα. (9)

Η αναγκαιότητα της αυξημένης μεταγραφικής δραστηριότητας του γονιδίου της ντεκορίνης που παρατηρείται στις διάφορες αναπτυξιακές φάσεις του επίμυος, εξηγείται από την επίδρασή της στους εγκεφαλικούς νευρώνες ως προς την προαγωγή της επιβίωσης, της ρύθμισης της πολικότητας των κυττάρων και την απομόνωση των νευρικών οδών, ιδιότητες που αποδίδονται κυρίως στην αλυσίδα θειικής δερματάνης/χονδροϊτίνης που περιέχει. (9)

Το mRNA της ντεκορίνης εκφράζεται τόσο στο περιφερικό (ΠΝΣ) όσο και στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) του ποντικού, φυσιολογικά κατά την περίοδο της ανάπτυξης και παθολογικά (υπερεκφράζεται) μετά από τραυματισμούς αυτών των περιοχών. Στον εγκέφαλο των ενήλικων επίμυων εντοπίζεται στα νευρικά κύτταρα του φλοιού και ειδικότερα περιφερικά του νεοφλοιού, στη φαιά ουσία του υπόκαμπου, του θαλάμου, στα αστροκύτταρα, στα κύτταρα του μοριακού στρώματος της παρεγκεφαλίδας, τα κύτταρα του Purkinje, στους νευρώνες του οσφρητικού φλοιού, και στις εμμύελες νευρικές οδούς της λευκής ουσίας. Εκφράζεται επίσης σε μεσεγχοματικές δομές όπως αγγεία, θεμέλια ουσία και χοριώδη πλέγματα. (9)

In situ υβριδοποίηση και ανοσοπροσδιορισμός αποκάλυψε την ύπαρξη πολύ υψηλότερων επιπέδων ντεκορίνης, στα περιφερικά νεύρα απ' ότι στο ΚΝΣ ή σε άλλους ιστούς (σκελετικούς, καρδιά, παχύ έντερο, νεφρά). Σημαντική έκφραση του γονιδίου

ανιχνεύτηκε στα κύτταρα Schwann των περιφερικών νεύρων (εμμέλων) και στα αγγεία που τα αιματώνουν. Επιπλέον, μέσα στη σπονδυλική στήλη, ανιχνεύονται σήματα υβριδοποίησης με τα ειδικά για την ντεκορίνη αντισώματα, στους πρόσθιους κινητικούς νευρώνες, καθώς και σε άλλα νευρικά κύτταρα της φαιάς ουσίας του νωτιαίου μυελού.(12)

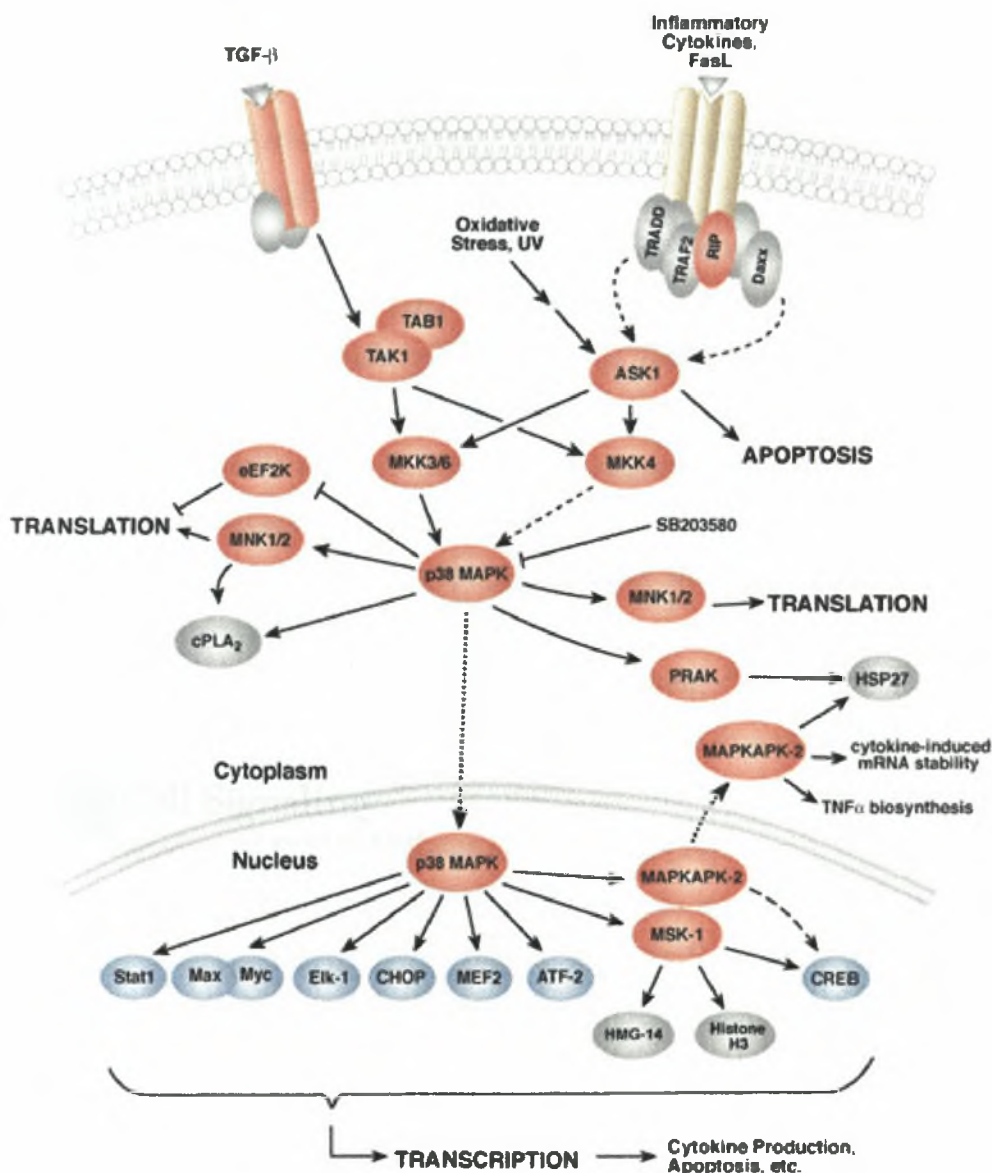
ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΝΤΕΚΟΡΙΝΗΣ ΜΕ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

Η ντεκορίνη αποτελεί μέρος ενός εξωκυττάριου συνόλου που επηρεάζει έμμεσα και άμεσα την κυτταρική συμπεριφορά, μέσω αλληλεπιδράσεών της με μεμβρανικούς υποδοχείς (όπως ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGF α) και μέσω της σύνδεσής της με παράγοντες ελέγχου όπως ο αναπτυξιακός παράγοντας TGF- β ή με στοιχεία της θεμέλιας ουσίας, όπως είναι η κυτταρική σύνδεση, ινιδογένεση και μεταφορά μηνυμάτων που αφορούν την ανάπτυξη του κυττάρου. (17, 15)

Η ντεκορίνη συνδέεται ειδικά με διαφορετικά μακρομόρια, όπως με ινιδια κολλαγόνου (τύπου I, II και IV) προσδίδοντάς τους αυξημένη σταθερότητα και μεταβάλλοντας τη διαλυτότητάς τους. Συνδέεται επίσης με τη φμπρονεκτίνη και την πρωτεΐνη του β -αμυλοειδούς. (9)

Σημαντική είναι και η αλληλεπίδραση της ντεκορίνης με τον αναπτυξιακό παράγοντα μετασχηματισμού TGF- β . Οι SLRPs σχηματίζουν συμπλέγματα με τον TGF- β , παρεμποδίζοντας τη δράση του. Ειδικότερα, η ντεκορίνη συνδέεται ισχυρά με τον TGF- β 2, μέσω των πεπτιδικών περιοχών Asp45-Lys359 και Leu 155-Val260 και ασθενέστερα μέσω των πεπτιδικών περιοχών Asp45-Leu155 και Arg63-Gly190. Οι περιοχές αυτές είναι ανεξάρτητες απ' τις πεπτιδικές περιοχές που αλληλεπιδρούν με το κολλαγόνο. (18)

Η σύνδεση της πρωτεΐνης που μελετάμε με τον TGF-β, έχει ως αποτέλεσμα τη δέσμευση και αποθήκευσή του στην εξωκυττάρια ουσία και ως εκ τούτου τη ρύθμιση της δράσης του. Αυξημένα επίπεδα της ντεκορίνης αναστέλλουν τη δράση του, δεσμεύοντάς τον. Λόγω των πολλαπλών λειτουργιών του, η δέσμευσή του αυτή, επηρεάζει την έκφραση πολλών παραγόντων που αφορούν την κυτταρική ανάπτυξη, τη νευροπροστασία και τη φλεγμονή και την ενδοκυττάρια συγκέντρωση ιόντων. (24, 25, 27)



Εικόνα 3: Επίδραση του TGF-β σε σηματοδοτικά μονοπάτια που αφορούν την κυτταρική ανάπτυξη. (www.cellsignal.com)

Πιο συγκεκριμένα, στους νευρώνες, ο TGF-β επάγει την παραγωγή νευροτροφικών παραγόντων όπως είναι ο NGF και παρεμποδίζει τη διαφοροποίηση (παραμονή στη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου) των αστροκυττάρων, αναστέλλοντας τη δράση μακρομορίων όπως ο b-FGF, ο EGF και ο PDGF. In vitro μελέτες του TGF-β ως μεμονωμένης κυτοκίνης έδειξαν ότι προκαλεί υπερτροφία των αστροκυττάρων, καθώς και αλλαγές στην κινητικότητα και τη μορφολογία τους. Σε αυτόν έχει αποδοθεί και η μειωμένη διακυτταρική τους σύνδεση, καθώς και η αυξημένη εστιακή σύνδεση, τα οποία αποτελούν πρωταρχικά στάδια της κυτταρικής μετακίνησης. (34)

Μελέτες που διεξήχθησαν ως προς τα νευροτροφικά αποτελέσματα του TGF-β σε διάφορα είδη νευρώνων έδειξαν επαγωγή αυξημένης παραγωγής σεροτονίνης και ιδιαίτερη νευροπροστατευτική δράση, στους ντοπιμινεργικούς νευρώνες που είναι ανθεκτικοί στην υδροξυλάση της τυροσίνης. (34)

Η νευροπροστατευτική δράση του TGF-β, συνίσταται σε αναστολή των ανακατατάξεων στην ενδοκυτταρική ομοιόσταση του ασβεστίου, αναστολή παραγωγής NO και ιόντων σουπεροξειδίου στα κύτταρα της γλοίας, που παράγεται σε αυτά ως απάντηση στον TNF-α και την INF-γ σε φλεγμονώδεις καταστάσεις. Σε φλεγμονές, ο TGF-β επάγεται από τα μικρογλοιακά κύτταρα ως απάντηση της ενεργοποίησής τους από μια σειρά προφλεγμονωδών παραγόντων όπως IL1-α, IL-β, INF-γ, TNF-α, LPS, PMA) και δρα ως χημειοτακτικός παράγοντας για τα μονοκύτταρα, εμπλεκόμενος κατ' αυτόν τον τρόπο στην προφλεγμονώδη κυτταροτοξικότητα. Παράλληλα, διεγείρει την παραγωγή ενός καταστολέα πρωταεσών, της κυστατίνης C και φαίνεται να δρα ως εν δυνάμει καταστολέας των μικρογλοιακών λειτουργιών, έχοντας έτσι σπουδαίο ρόλο στις τραυματικές και νευροεκφυλιστικές ασθένειες του ΚΝΣ, όπως στην ισχαιμία, στη νόσο του Parkinson και στη σκλήρυνση κατά πλάκας. (34)

Στη νευραπροστατευτική δράση του TGF-β, θα πρέπει να συμπεριλάβουμε και την επαγωγή ενός παράγοντα αγγειογένεσης, του VEGF, εμπλέκοντας έτσι τον TGF-β σε λειτουργίες που αφορούν την αιμάτωση του εγκεφάλου, αν και τα δεδομένα ως προς την αγγειογενετική του δράση είναι αντιφατικά (32). Πρέπει ν' αναφέρουμε ακόμα ότι, στα αστροκύτταρα, επάγεται η μεταγραφή του mRNA για τον TGF-β, ως απάντηση και στη δράση του EGF, όταν αυτός δεσμεύεται με τον υποδοχέα του, ο οποίος αναγνωρίζεται και από τη ντεκορίνη. (20)

Εκτός από την εξωκυττάρια δέσμευση παραγόντων, η εξωγενής ντεκορίνη μπορεί να αλληλεπιδράσει με μεμβρανικούς υποδοχείς, προκαλώντας την κινητοποίηση ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Χαρακτηριστική είναι η ενεργοποίηση του EGF υποδοχέα. Η σύνδεση της πρωτεογλυκάνης αυτής με τον υποδοχέα προκαλεί το διμερισμό του και μπορεί να επηρεάσει το ενδοκυτταρικό περιβάλλον με δύο τρόπους: Ο πρώτος συνίσταται στην παρατεταμένη φωσφορυλίωση των MAP κινασών, μέσω ενός καταρράχτη φαινομένων και έχει ως τελική συνέπεια την επαγωγή της πρωτεΐνης p21, η οποία είναι ένας αναστολέας των εξαρτώμενων από τις κυκλίνες κινασών, οι οποίες είναι απαραίτητες για την προαγωγή του κυτταρικού κύκλου. Έτσι, η ντεκορίνη προκαλεί έμμεσα την καταστολή της κυτταρικής ανάπτυξης, όπως προκύπτει μελέτες που έγιναν σε επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα. (20)

Ο δεύτερος τρόπος με τον οποίο η ντεκορίνη επιδρά στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον, μέσω της ενεργοποίησης του EGF είναι η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου. Ο συζευγμένος με την ντεκορίνη υποδοχέας, συνδέεται με τη φωσφολιπάση C, η οποία, μέσω της τριφωσφορικής ινοσιτόλης, ενεργοποιεί τους διαύλους ιόντων ασβεστίου στην πλασματική μεμβράνη, με αποτέλεσμα την εισροή Ca^{2+} στο κύτταρο. Παράλληλα, διεγείρεται ο μηχανισμός απελευθέρωσης ιόντων ασβεστίου από τις ενδοκυττάρια αποθήκες. (21, 22, 23)

Αξίζει επίσης ν' αναφέρουμε ότι σε μελέτες που έγιναν σε απομονωμένο EGFr βρέθηκε ότι η ντεκορίνη επάγει την αυτοφωσφορυλίωσή του, ενεργοποιώντας την τυροσινική κινάση του υποδοχέα στην οποία μπορεί να δράσει ως υπόστρωμα. (20, 46)

ΥΠΟΞΙΚΟΣ ΕΓΚΕΦΑΛΟΣ

Η ισχαιμία συνίσταται σε μείωση της αιματικής ροής σ' ένα επίπεδο, ανεπαρκές για να καλύψει τις μεταβολικές ανάγκες των κυττάρων. Επακόλουθο της ισχαιμίας αποτελεί η παρατεταμένη έλλειψη οξυγόνου, που οδηγεί σε ανεπάρκεια των αποθηκών ενέργειας των νευρικών και μικρογλοιακών κυττάρων του εγκεφάλου, με αποτέλεσμα

τον περιορισμό της λειτουργικότητας των ενεργο-εξαρτώμενων ιοντικών καναλιών και ως εκ τούτου, απώλεια του δυναμικού ηρεμίας των νευρώνων. Στον υποξικό εγκέφαλο, πρώτα απ' όλα επέρχεται καταστολή λειτουργιών, όπως της σύνθεσης πρωτεϊνών και της αυτόματης ηλεκτρικής δραστηριότητας. Ακολουθούν μειωμένα επίπεδα μεταβίβασης ηλεκτρικών ερεθισμάτων εξαιτίας των μειωμένων ενεργειακών επιπέδων και της αποπόλωσης των κυτταρικών μεμβρανών. Η παροχή οξυγόνου περιορίζεται στις περιοχές που ελέγχουν τις ζωτικές λειτουργίες του οργανισμού. (3, 14)

Σε κυτταρικό επίπεδο, οι μεταβολές που παρατηρούνται κατά την υποξία στον εγκέφαλο συνίσταται σε αύξηση της συγκέντρωσης του γλουταμινικού οξέος και των ιόντων ασβεστίου, αποπόλωση των κυτταρικών μεμβρανών και κυτταρική νέκρωση, ενώ σε ιστοπαθολογικό επίπεδο παρατηρούνται εκτεταμένες ιστικές αλλοιώσεις (ως αποτέλεσμα της κυτταρικής νέκρωσης) και εγκεφαλικό οίδημα.

Ειδικότερα, η προσυναπτική αποπόλωση που δημιουργείται από τη μειωμένη προσφορά ενέργειας στα νευρικά κύτταρα, συνεπάγεται την έκκριση του γλουταμινικού οξέος (διεγερτικός νευροδιαβιβαστής), κατά έναν μη ελεγχόμενο και συνεχή τρόπο και την αυξημένη διέγερση των μετασυναπτικών γλουταμινικών υποδοχέων. Η υπερδιέγερση αυτών οδηγεί σε παθολογική αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου, λόγω αλληλεπίδρασής τους με ιονοστρούπους υποδοχείς, προκαλώντας κυτταροτοξική διέγερση και κυτταρικό θάνατο. Ο βαθμός της κυτταροτοξικότητας εξαρτάται από τον χρόνο έκθεσης των κυττάρων σε γλουταμινικό οξύ και τη συγκέντρωση αυτού. Βραχεία έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις προκαλεί κυτταρική νέκρωση που χαρακτηρίζεται από λύση της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ βραχεία έκθεση σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, προκαλεί κυτταρική απόπτωση, πύκνωση του πυρήνα και τεμαχισμό του γονιδιώματος. Παράγοντες που επηρεάζουν την ευαισθησία των νευρώνων στη δράση του γλουταμινικού οξέος είναι το εξωκυττάριο pH (το οποίο μειώνεται σε υποξικές συνθήκες), η γλυκόζη, τα επίπεδα του οξυγόνου, οι εξωκυττάρια συγκεντρώσεις ιόντων, συμπεριλαμβανομένου των ιόντων νατρίου, ασβεστίου, μαγνησίου και ψευδαργύρου καθώς και οι συγκεντρώσεις των συμπαραγόντων, όπως είναι η γλυκίνη και οι πολυαμίνες. (1, 14)

Η έκκριση γλουταμινικού οξέος από τις τελικές νευρικές απολήξεις, οδηγεί σε αύξηση του ενδοκυττάριου Ca^{2+} στους γειτονικούς νευρώνες, που έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των διαύλων καλίου και την ανταλλαγή ιόντων νατρίου /καλίου, η

οποία εκπολώνει την κυτταρική μεμβράνη και προκαλεί μια δευτερογενή ενεργοποίηση των γλουταμινικών υποδοχέων και ακόμα μεγαλύτερη εισροή ασβεστίου. (28)

Άμεση έγχυση γλουταμινικού σε καλλιέργειες είναι ιδιαίτερα τοξική για τους νευρώνες και η έγχυσή του σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου, *in vivo*, προκαλεί νευρικές βλάβες παρόμοιες μ' αυτές που προκαλούνται σε συνθήκες υποξίας και ισχαιμίας. Ο ανώριμος εγκέφαλος είναι ιδιαίτερα επιρρεπής στις επιδράσεις του γλουταμινικού οξέος ενώ ειδικοί ανταγωνιστές του (όπως ιόντα μαγνησίου που μπλοκάρουν τους υποδοχείς του), μπορούν να βελτιώσουν σημαντικά τις υποξικές και ισχαιμικές βλάβες του εγκεφάλου *in vivo*.(28)

Αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου, προκαλείται, εκτός από την επίδραση του γλουταμινικού οξέος και από την οφειλόμενη στην έλλειψη οξυγόνου, αναστολή της υδρόλυσης του ATP από την Ca^{2+} -ATPase του ενδοπλασματικού δικτύου, η οποία επηρεάζει άμεσα την ομοιόσταση του ασβεστίου. Η αναστολή της Ca^{2+} -ATPase, συνεπάγεται τη μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του ATP εξαιτίας της καταστολής της αερόβιας αναπνοής.(29)

Η μείωση της παροχής οξυγόνου στον εγκέφαλο προκαλεί αρχικά την ενεργοποίηση των οξυγονοευαίσθητων διαύλων καλίου που ανταποκρίνονται θετικά σε υψηλές ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις ιόντων ασβεστίου, όμως μετά τη στιγμιαία διέγερση ακολουθεί σημαντική μείωση της αγωγιμότητας των διαύλων ασβεστίου, που οφείλεται στην οξονοποίηση (μείωση του pH) του κυττάρου. Ο βαθμός αναστολής των διαύλων καλίου, εξαρτάται από τον ανταγωνισμό ανάμεσα στα ιόντα H^+ και Ca^{2+} ως προς τη σύνδεσή τους στον διάυλο και την επαγωγή διαφορετικών αποτελεσμάτων στη διεγερσιμότητά του (αρνητικών και θετικών αντίστοιχα). Αυτοί οι διάυλοι καλίου έχουν ταυτοποιηθεί ως ενεργοποιούμενοι από μεγάλη αγωγιμότητα ασβεστίου. Σε φυσιολογικές συνθήκες χρειάζονται μεγάλο δυναμικό ηλεκτρικού ρεύματος για να διεγερθούν και εμπλέκονται στη διαδικασία επαναπόλωσης και ταχείας υπερπόλωσης των νευρώνων, μετά από δυναμικό ενέργειας. Σε υποξικές καταστάσεις, όμως διαταράσσεται η ισορροπία και αδυνατούν να διατηρήσουν το δυναμικό ηρεμίας των κυτταρικών μεμβρανών των νευρώνων.(30)

Μετά από μερικά λεπτά από την έκθεση του κυττάρου σε κατάσταση ανοξίας, παρατηρείται απώλεια του δυναμικού ηρεμίας της κυτταρικής μεμβράνης, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση των ελεύθερων ενδοκυττάρων ιόντων ασβεστίου, το οποίο με τη

σειρά του, είναι υπεύθυνο για έναν αριθμό κυτταρικών λειτουργιών. Πιο συγκεκριμένα, η αύξηση των ιόντων Ca^{2+} μέσα στους νευρώνες διεγείρει την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών και ενεργοποιεί δευτερογενείς οδούς μεταβίβασης μηνύματος μέσα στο κύτταρο. Παράλληλα, η υπερβολική αύξηση της συγκέντρωσής του, διεγείρει μια σειρά από αυτοτοξικές κυτταρικές αντιδράσεις, οι οποίες προάγουν έναν ανώμαλο κυτταρικό κύκλο και τελικά τον κυτταρικό θάνατο. Οι αντιδράσεις αυτές συμπεριλαμβάνουν τη διέγερση διαφόρων λιπασών, πρωτεασών ή ενδονουκλεασών που καταστρέφουν τη δομική ακεραιότητα του κυττάρου. (28)

Η απορύθμιση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου στα ενδοθηλιακά κύτταρα που δομούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, έχει επιπτώσεις στη φυσιολογική λειτουργία τους, η οποία συνίσταται στον έλεγχο τη αιματικής ροής (επηρεάζοντας τον τόνο των λείων μυικών ινών στα αρτηριόλια που συνδέονται με τα τριχοειδή αγγεία) και τη μεταφορά των ενδοαγγειακών στοιχείων στον εγκέφαλο. Η αύξηση των Ca^{2+} συνδέεται με την αυξημένη διαπερατότητα των τριχοειδών αγγείων, η οποία αποτελεί παθοφυσιολογικό αίτιο του εγκεφαλικού οιδήματος, μιας δηλαδή, από τις κυριότερες επιπλοκές των ισχαιμικών εγκεφαλικών επεισοδίων. (29)

Τα επίπεδα του ασβεστίου, αυξάνονται γρήγορα μέσα στα κύτταρα κατά την περίοδο της υποξίας-ισχαιμίας, αλλά τα ιόντα Ca^{2+} διασκορπίζονται γρήγορα κατά τη φάση της επανάκαμψης. Ωστόσο, σε συγκεκριμένους νευρώνες, in vivo, εμφανίζεται μια καθυστερημένη νευροτοξικότητα, η οποία εντοπίζεται ιδιαίτερα στον υπόκαμπο τόσο των ανώριμων όσο και των ενήλικων ζώων και σχετίζεται με τη δράση του ασβεστίου. Εκτός από τον υπόκαμπο, εγκεφαλικές περιοχές, που παρουσιάζουν ιδιαίτερη ευαισθησία στις λειτουργικές και μεταβολικές επιπλοκές, τις οποίες προκαλεί η μεγάλη ενδοκυττάρια συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου, είναι ο δικτυωτός πυρήνας του θαλάμου και ο κερκοφόρος πυρήνας. Οι καθυστερημένες βλάβες οφείλονται κυρίως στις διαταραχές μεταβίβασης των διαφόρων μηνυμάτων στις ανωμαλίες που δημιουργούνται κατά τη γονιδιακή έκφραση και πρωτεϊνοσύνθεση, καθώς και στις αλλοιώσεις που άπτονται της δράσης των ελεύθερων ριζών. (28)

Ο όγκος των βλαβών που προκαλούνται από παρατεταμένη υποξία και ισχαιμία (περίοδος μιας ώρας, περίπου), συνίστανται σε κυτταρική νέκρωση, επιλεκτική απώλεια νευρώνων στις περιοχές που περιβάλλουν τον ισχαιμικό πυρήνα και στους οδοντωτούς κοκκώδεις νευρώνες των κοιλιών. Είναι γνωστό, ότι οι συνέπειες ενός

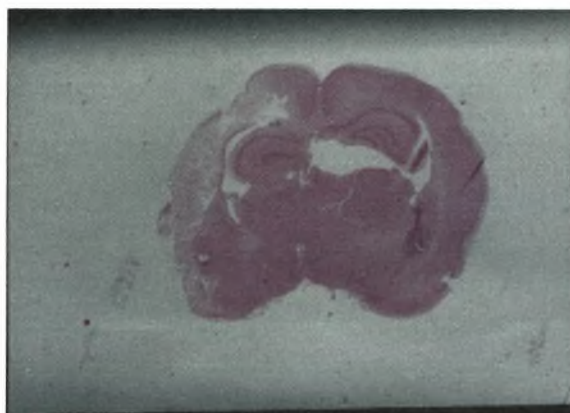
υποξικού/ ισχαιμικού επεισοδίου, δεν καθορίζονται μόνο από τη σοβαρότητα και τη διάρκεια της ανοξίας και της έλλειψης θρεπτικών ουσιών, αλλά εξαρτώνται και από τις ιδιότητες των κυττάρων του εγκεφάλου (είδος νευρώνων, μικρογλοιακά κύτταρα και κύτταρα των ενδοθηλίων των τριχοειδών αγγείων). Τα μικρογλοιακά κύτταρα, που βρίσκονται στο χώρο της βλάβης ή γύρω απ' αυτόν, ενεργοποιούνται ταχύτατα, μεταβάλλοντας τη μορφολογία και τη λειτουργία τους. Τα κύτταρα της γλοίας, απελευθερώνουν διάφορα κυτταροτοξικά μόρια, συμπεριλαμβανομένου πρωτεολυτικών ενζύμων, κυτταροκινών, πρωτεϊνικών συμπλόκων και δραστικών ελευθέρων ριζών οξυγόνου (όπως είναι το ιόν σουπεροξειδίου που παράγεται από τα κύτταρα της γλοίας ως απάντηση στον TNF-α και την IFN-γ), αλλά και αναπτυξιακών παραγόντων που προάγουν την κυτταρική επιβίωση. Η αστρογλοίωση, που παρατηρείται γύρω από τον κατεστραμμένο ιστό, χαρακτηρίζεται από κυτταρική υπερτροφία, η οποία οφείλεται σε κυτταροπλασματική υπερπλασία. Μεταβολές στα αστρογλοιακά κύτταρα παρατηρήθηκαν μόνο περιφερειακά της προσβεβλημένης περιοχής, η οποία συμπίπτει με την περιοχή εμφάνισης οιδήματος. (2, 39, 45)

Όσον αφορά τους νευρώνες, η κατάσταση υποξίας-ισχαιμίας επάγει αλλοιώσεις στα επιρρεπή κύτταρα, δηλαδή σε συγκεκριμένους νευρώνες του φλοιού (των περιοχών I, III και V), στα νευρικά κύτταρα του υποκάμπτου, στα κύτταρα του Purkinje στην παρεγκεφαλίτιδα και σε κάποια βασικά γάγγλια. Οι αλλοιώσεις που παρατηρούνται σε κυτταρικό επίπεδο συνίστανται σε πύκνωση του πυρήνα, συρρίκνωση του κυτταροπλάσματος, κυτταροσκελετικές παραμορφώσεις, κυρίως στους μικροσωληνίσκους και βασεοφιλία. Οι μεταβολές των πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού αρχίζουν σε πολύ πρώιμο στάδιο μετά την ισχαιμία και οδηγούν σε καθυστερημένες επιπλοκές. Κατεστραμμένοι, «μαύροι» νευρώνες βρέθηκαν με τη μέθοδο της αργυροφιλίας στο φλοιό, στο δικτυωτό θάλαμο, στην αμυγδαλή, στον υποθάλαμο και στα βασικά γάγγλια του ισχαιμικού ημισφαιρίου. Καθυστερημένη νέκρωση των γαγγλοιακών κυττάρων παρατηρείται στην περιοχή CA1 του υποκάμπτου, του οποίου τα κύτταρα δεν επηρεάζονται αμέσως, αλλά βρίσκονται τελείως κατεστραμμένα την έκτη μέρα μετά την πρόκληση της ισχαιμίας. (4, 8,40)

Στα ολιγοδεντροκύτταρα, παρατηρείται υπερέκφραση των υποδοχέων του γλουταμινικού οξέος. Παράλληλα τα πρόδρομα κύτταρα των ολιγοδεντροκυττάρων είναι επίσης επιρρεπή στην ισχαιμία/ υποξία, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η

αναγέννηση των ώριμων ολιγοδεντροκοκυττάρων και της μυελίνης που περιβάλλει νεύρα του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Σημαντική ποικιλομορφία των βλαβών παρατηρούνται ανάμεσα στα ζώα που υποβάλλονται σε κατάσταση υποξίας/ ισχαιμίας. Κάποιες έρευνες έδειξαν ότι έκθεση των ισχαιμικών ζώων σε υποξικό περιβάλλον για περίοδο μιας ώρας προκάλεσε σοβαρή αποπτωτική κυτταρική απώλεια στον ιππόκαμπο του ετερόπλευρου ημισφαιρίου, ενώ εικάζεται ότι οι αμφίπλευρες βλάβες που εντοπίστηκαν πιθανόν να οφείλονται σε μετασφυκτικές προσβολές. Ωστόσο, άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι μετρήσεις που έκαναν στα τριχοειδή αγγεία του εγκεφάλου μετά από καρωτιδικό αποκλεισμό, έδειξαν μεγαλύτερη μείωση στον αριθμό των β-αδρενεργικών υποδοχέων του αριστερού ημισφαιρίου, ανεξάρτητη από το αν ο αποκλεισμός έγινε στην αριστερή ή τη δεξιά καρωτίδα. Το γεγονός αυτό, υποδηλώνει ότι το αριστερό ημισφαίριο είναι περισσότερο επιρρεπές στην υποξία. (6)



Εικόνα5: Εκτεταμένες βλάβες του αριστερού ημισφαιρίου εγκεφάλου ποντικού, μετά από υποβολή του σε ισχαιμία-υποξία. Τη φωτογραφία προσέφερε η κα. Εύα Σπάνδου, Λέκτορας του τμήματος Φυσιολογίας της Ιατρικής σχολής του Α.Π.Θ.

Στον άνθρωπο, η εγκεφαλική υποξία και ισχαιμία στα νεογέννητα έχει συχνότητα 4/1000 γεννήσεις και παραμένει η κύρια αιτία εγκεφαλικής παράλυσης, επιληψίας και νοητικής καθυστέρησης. Η ανικανότητα κυτταρικής ανάπλασης των νευρικών κυττάρων κι ιδιαίτερα των ολιγοδεντροκυττάρων, μπορεί να οδηγήσει σε

γενετική και κινητική δυσλειτουργία, φαινόμενο που παρατηρείται, συχνά σε νεογνά που έχουν περάσει κατάσταση ασφυξίας. Σ' αυτά, βλάβες που έχουν προκληθεί από υποξικές και ισχαιμικές καταστάσεις, αφορούν εκλεκτικά τη λευκή ουσία, προκαλώντας περικολιακή λευκομαλακία με ελάχιστη παθολογία του εγκεφάλου. Αντίθετα αν η κατάσταση ισχαιμίας-υποξίας προκληθεί σε βρεφική ηλικία, παρατηρούνται και αλλοιώσεις του εγκεφαλικού φλοιού, που αφορούν τη φαιά ουσία. Αν και έχουν γίνει πρόοδοι στον τομέα της διερεύνησης και κατανόησης της παθογένεσης των υποξικών και ισχαιμικών βλαβών, τα δεδομένα που υπάρχουν για την παθολογία των μόνιμων βλαβών είναι ελάχιστα. (5)

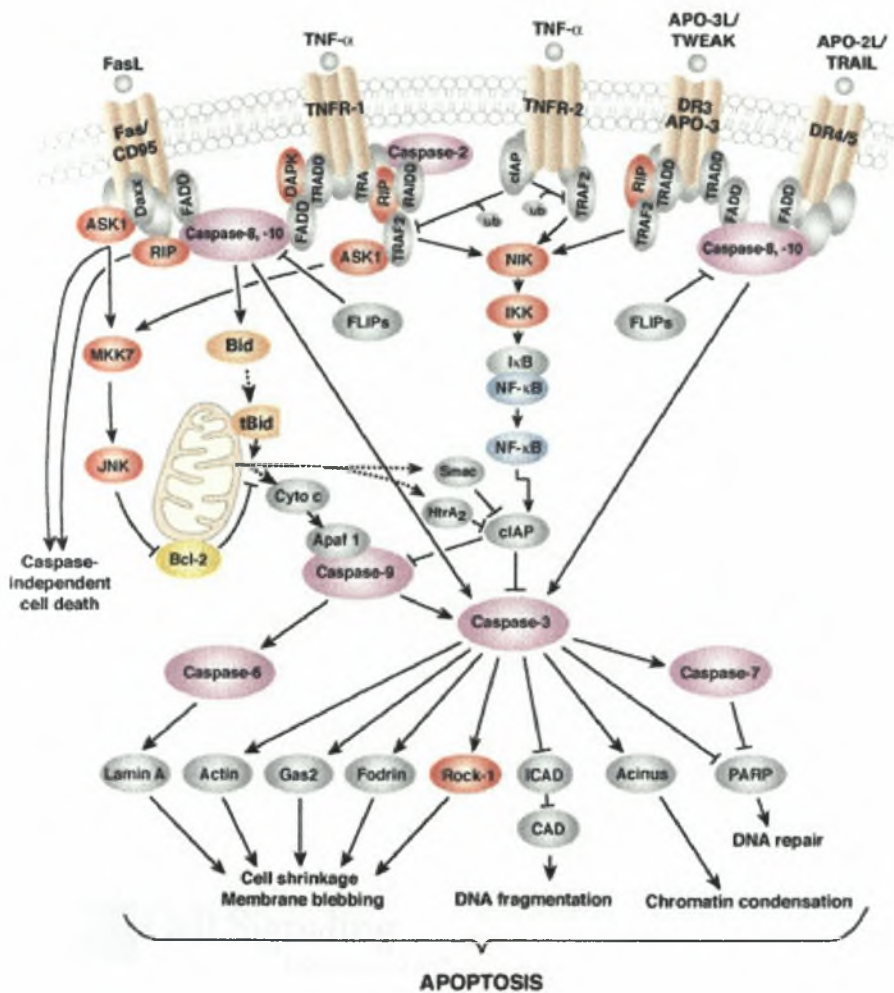
ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΤΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ ΣΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ / ΙΣΧΑΙΜΙΑ

Η απάντηση του εγκεφάλου στην ισχαιμία συνίσταται σε μια ισορροπία ανάμεσα στην ενεργοποίηση ενδογενών νευροπροστατευτικών μηχανισμών και νευροκαταστρεπτικών μεταβολών που οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο. Η ρύθμιση αυτών των φαινομενικά αντίθετων μηχανισμών εξαρτάται από την έκφραση ορισμένων γονιδίων που επάγονται από την υποξία. Τα επίπεδα συγκεκριμένων πρωτεϊνών, όπως αυξητικών παραγόντων, αυξάνονται με σκοπό να περιορίσουν τον κυτταρικό θάνατο μέσω της ενεργοποίησης επιδιορθωτικών μηχανισμών που συντελούν στην μετατραυματική επανάκαμψη του εγκεφάλου. (2)

Εικοσιτέσσερις ώρες μετά την πρόκληση ισχαιμίας, βρέθηκε ότι το 10% των γονιδίων που εκφράζονται στο φυσιολογικό φλοιό αύξησαν τη μεταγραφική τους δραστηριότητα (415 από τα 4000), ενώ μετά από υποβολή των πειραματοζώων σε υποξικό περιβάλλον αυξήθηκε η μεταγραφική δραστηριότητα του 3,6% των γονιδίων (15 από τα 4000). Παραδείγματα γονιδίων που αυξάνουν τη μεταγραφική τους δραστηριότητα μετά την ισχαιμία, αποτελούν τα γονίδια των νευροτροφικών παραγόντων NGF και BDNF, του BNGF που διεγείρει τις αποπτωτικές διαδικασίες και

του TNF- α . Αύξηση των επιπέδων του mRNA του TNF- α παρατηρείται μετά από εγκεφαλική ισχαιμία, αλλά ο ρόλος του TNF- α σε αυτές τις συνθήκες δεν είναι σαφώς καθορισμένος. Πιστεύεται ότι ενεργοποιεί τα μικρογλοιακά κύτταρα και προστατεύει τους νευρώνες έναντι εξωτοξινών και οξειδωτικών επιθέσεων. Επίσης, διεγείρει τη δράση του TGF- β .

Death Receptor Signaling



Εικόνα 3: Κυτταροτοξική δράση του προφλεγμονώδους παράγοντα TNF- α (www.cellsignal.com)

Ο οργανισμός των θηλαστικών που βρίσκονται σε συνθήκες μειωμένης παροχής οξυγόνου, ανταποκρίνεται με διαφορετικούς τρόπους τόσο σε επίπεδο συστήματος, όσο και σε τοπικό και κυτταρικό επίπεδο. Προσαρμογές σε επίπεδο συστήματος περιλαμβάνουν αύξηση στον αερισμό και τη μεταφορά του οξυγόνου μέσω

της κυκλοφορίας καθώς και επαγωγή της ερυθροποίησης, η οποία εξαρτάται από τη συγκέντρωση της ερυθροποιητίνης στο αίμα. Τοπικές προσαρμογές που αφορούν την αιμάτωση, συμβαίνουν και στον εγκέφαλο ως μέσο προστασίας του νευρικού και επιθηλιακού ιστού. Αυτές οι προσαρμογές, συνίστανται στην επαγωγή διαφόρων γονιδίων που αφορούν την αγγειογένεση, όπως είναι τα γονίδια της αγγειοποιητίνης-2 (Ang2), της ερυθροποιητίνης (Epo) και του υποδοχέα της (Epo-R) του FGF-2 και του VEGF. (2, 7,16)

Η Ang-2 είναι υπεύθυνη τόσο για την αγγειογένεση, όσο κατά την καταστροφή των τριχοειδών αγγείων κατά τη διάρκεια της επαναπροσαρμογής του εγκεφάλου μετά από υποξικό ισχαιμικό επεισόδιο, η οποία περιλαμβάνει αγγειογενετικές και αποπτωτικές διαδικασίες. Η έκφραση του γονιδίου της αγγειοποιητίνης-2 στο ενδοθήλιο των τριχοειδών αγγείων του εγκεφάλου, επάγεται ανάμεσα στο χρονικό διάστημα των 6 ωρών ως 14 ημερών μετά την υποξία και επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα την 21^η ημέρα. (43)

Κατά τη διάρκεια εγκεφαλικού επεισοδίου μετά από εντοπισμένη και μόνιμη πρόκληση ισχαιμίας στον ποντικό, συμβαίνει παροδική έκφραση της ερυθροποιητίνης και του υποδοχέα της από έναν αριθμό κυττάρων, όπως νευρώνων, αστροκυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων. Σχετικές μελέτες αποκάλυψαν μεταϊσχαιμική έκφραση του γονιδίου της Epo από ενδοθηλιακά κύτταρα (μια μέρα μετά τον καρωτιδικό αποκλεισμό), από τα μικρογλοιακά κύτταρα και τα μακροφάγα (τρεις μέρες μετά τον αποκλεισμό) και από τα δραστικά αστροκύτταρα (εφτά μέρες μετά τον αποκλεισμό). (38)

Η έκφραση του EpoR ακολουθεί την έκφραση της Epo. Έτσι το σύστημα Epo/EpoR είναι ένας ενδογενής μηχανισμός που προστατεύει τον εγκέφαλο από τις βλάβες που προκαλούνται από τη μείωση της αιματικής ροής και εμπλέκεται στην προσπάθεια του εγκεφάλου για επανάκαμψη από την ισχαιμία, η οποία περιλαμβάνει φαινόμενα, όπως την αγγειογένεση και τη γλοίωση. (38)

Σε ενήλικα άτομα, η δράση του VEGF είναι συνδεδεμένη με τη δημιουργία διασυνδέσεων μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων και με την αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα. Φυσιολογικά, επαγωγή του VEGF κατά την ενήλικη ζωή, έχουμε μόνο κατά τον εμμηνορυσιακό κύκλο των θηλυκών ή κατά την ίαση τραυμάτων. Παθολογικά, αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα του VEGF παρουσιάζεται σε

ισχαιμικές καταστάσεις, στην φάση της ανάπτυξης όγκων και σε ρευματικές παθήσεις ή ασθένειες των οφθαλμών. Η υποξία είναι ένας ισχυρός επαγωγέας της έκφρασης του VEGF mRNA σε μια ποικιλία φυσιολογικών ή και μεταμορφωμένων (καρκινικών) κυττάρων *in vivo*. Στον εγκέφαλο, φυσιολογικά, δεν βρίσκονται παρά ίχνη του VEGF, ενώ η υποξία οδηγεί στην υπερέκφρασή του. Ειδικότερα, τα επίπεδα του mRNA του VEGF αυξάνονται περιφερειακά της πληγείσας από την ισχαιμία και υποξία, περιοχής, αρχίζοντας την αύξησή τους 3 ώρες μετά τον αποκλεισμό της μέσης καρωτιδικής αρτηρίας. (21, 43)

Η παραγωγή του VEGF διεγείρεται από τον TNF- α (ο οποίος επάγει και την αγγειογένεση *in vitro*). Η αυξημένη έκφραση του VEGF έχει αποδειχθεί με ποικίλους τρόπους στον ισχαιμικό εγκέφαλο *in vivo*. Επομένως, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα μειωμένα επίπεδα οξυγόνου, επάγουν την αγγειογένεση στον εγκέφαλο ενήλικων ατόμων μέσω της υπερέκφρασης του VEGF, η οποία παρατηρείται κυρίως στα αστροκύτταρα, της νευρογλοία, στο οσφρητικό νεύρο, στην παρεγκεφαλίδα και γενικότερα στις περιοχές που βρίσκονται γύρω από τις νεκρωτικές ζώνες. (32, 41, 44)

Η χρόνια υποξία οδηγεί σε αυξημένη αγγειακή πυκνότητα στον εγκέφαλο. Εν γένει, η επαγωγή του VEGF από την υποξία/ ισχαιμία είναι μεγαλύτερη στον εγκέφαλο, αλλά παρατηρείται επίσης στα νεφρά (από τα κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων), στους όρχεις (από τα κύτταρα του Sertoli) στην καρδιά και στο ήπαρ, όπως έχει αποδειχθεί με τη μέθοδο της *in situ* υβριδοποίησης. (21)

Η καθυστερημένη απάντηση του εγκεφάλου στην ισχαιμική και υποξική προσβολή, αποδίδεται στον FGF-2 και στις γνωστές μιτογενητικές του ιδιότητες. Η εμφάνιση του FGF-2 ακολουθείται από αγγειογένεση, γλοίωση καθώς και διαφοροποίηση και συγκέντρωση των μακροφάγων και των κυττάρων της μικρογλοίας γύρω από την πληγείσα περιοχή. Ο παράγοντας αυτός είναι καθοριστικός για την αγγειογένεση, λόγω του ότι διεγείρει το σχηματισμό και την επιβίωση των προσεκβολών των ενδοθηλιακών κυττάρων για τη δημιουργία σωληνίσκων, οι οποίοι θα αποτελέσουν τα να τριχοειδή αγγεία. Τα τριχοειδή που διαμορφώνονται και τα μακροφάγα μεταναστεύουν στη νεκρωτική περιοχή, αποσκοπώντας στην αποβολή των κατεστραμμένων κυττάρων και των νεκρωτικών υπολειμμάτων. (40, 47)

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε εγκεφαλικός ιστός επίμυων του γένους wistar οι οποίοι είχαν προηγουμένως υποβληθεί σε συνθήκες υποξίας και ισχαιμίας. Για την πρόκληση ισχαιμίας υπέστησαν μόνιμη απολίνωση της αριστερής κοινής καρωτίδας. Η επέμβαση πραγματοποιήθηκε σε πειραματόζωα ηλικίας 7 ημερών, με χρήση αιθέρα ως αναισθητικό μέσο και είχε διάρκεια μικρότερη των τεσσάρων λεπτών. Δύο έως τρεις ώρες μετά την εγχείρηση οι επίμυες τοποθετήθηκαν σε υποξικό περιβάλλον (8% O₂ και 92% N₂), για μία ώρα.

Τα ζώα θανατώθηκαν διαδοχικά σε χρόνους 0, 2, 24, 48 και 72 ωρών, καθώς και 7 ημερών από την υποβολή τους σε κατάσταση ισχαιμίας- υποξίας και παρελήφθησαν ιστοτεμάχια από το δεξί και τον αριστερό εγκεφαλικό φλοιό ξεχωριστά με τη χρήση στερεοσκοπίου και νυστεριού. Η διαδικασία δεν διήρκησε πάνω από ένα λεπτό και τα δείγματα τοποθετήθηκαν αμέσως σε χωριστούς δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν RNA-protect solution της Qiagen και φυλάχτησαν στους -60°C, μέχρι την επεξεργασία των ιστών.

Για κάθε χρονική στιγμή χρησιμοποιήθηκαν 16 δείγματα από τέσσερα ζώα, δύο από κάθε ζώο που είχε υποβληθεί σε ισχαιμία-υποξία (ένα από το δεξιό κι ένα από το αριστερό ημισφαίριο του εγκεφάλου) και αντίστοιχα δείγματα ελέγχου από υγιή ζώα, τα οποία παρελήφθησαν με τον ίδιο τρόπο και χρησίμευσαν ως ιστοί αναφοράς.

Στη συνέχεια ομογενοποιήσαμε 30mg ιστού από το κάθε δείγμα και απομονώσαμε RNA, από το οποίο παρασκευάστηκε cDNA και ακολούθως πραγματοποιήθηκε η αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης, PCR, με ειδικούς εκκινητές για την ακτίνη και την ντεκορίνη. Τα αποτελέσματά μας βασίστηκαν στη σύγκριση των ζωνώσεων των ηλεκτροφορήσεων που έγιναν για τα RNA που απομονώσαμε και για τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR.

1. Ομογενοποίηση ιστοτεμαγίων: χρησιμοποιήθηκε ο ομογενοποιητής ιστών της HEIDOLPH και ειδικά έμβολα μίας χρήσεως. Τα ιστοτεμάχια αμέσως μετά την απόψυξή τους, τοποθετήθηκαν σε σωλήνες eppendorf των 2 ml που περιείχαν διάλυμα 600μl RLT Buffer της Qiagen (ισοθειοκυανική γουανιδίνη)

και 6ml μερκαπταιθανόλη έκαστο, το οποίο είναι απαραίτητο για την ταχεία απενεργοποίηση RNAασών που πιθανόν να υπήρχαν στον ιστό.

2. Απομόνωση RNA: χρησιμοποιήθηκε το RNA-easy kit της Qiagen και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του κατασκευαστή για την απομόνωση RNA ζωικών ιστών:

- Φυγοκεντρήσαμε τον ομογενοποιημένο ιστό για 3min στην υψηλή ταχύτητα (20000g) της μικροφυγόκεντρου HETTICH EBA-12 και μεταφέραμε προσεκτικά το υπερκείμενο σε καινούργιο σωλήνα erppendorf με τη χρήση πιπέτας. Το ίζημα, το οποίο περιέχει DNA και πρωτεΐνες απομακρύνθηκε.
- Προσθέσαμε 600μl αιθανόλης 70% σε κάθε σωλήνα για τη διεκόλυνση της δέσμευσης του RNA από την στήλη.
- Τοποθετήσαμε ποσότητα δείγματος 700μl κάθε φορά στις στήλες δέσμευσης που παρέχει το kit και φυγοκεντρήσαμε για 15sec στα 8000g, ώστε να δεσμευτεί το RNA στη μεμβράνη της στήλης. Το διάλυμα που πέρασε από τη μεμβράνη, αποχύθηκε. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η μεμβράνη (silica gel, δηλαδή διοξειδίου του πυριτρίου) δεσμεύει επιλεκτικά, μόρια RNA μεγέθους μεγαλύτερου των 200 νουκλεοτιδίων, γεγονός που σημαίνει, ότι τελικά, το RNA που θα παραλάβουμε θα αντιστοιχεί στο mRNA των κυττάρων (διότι τα μόρια των tRNA, 5,8S rRNA και 5S rRNA, έχουν μικρότερο μέγεθος και απομακρύνονται). Η διαδικασία επαναλήφθηκε δυο φορές, έτσι ώστε να περάσει όλη η ποσότητα του κάθε δείγματος από την αντίστοιχη στήλη.
- Προσθέσαμε 700μl Buffer RW1 για να ξεπλύνουμε τη στήλη και φυγοκεντρήσαμε για 15sec στα 10000g και αποχύσαμε το διάλυμα που πέρασε τη στήλη.
- Μεταφέραμε την κάθε στήλη σε νέο σωλήνα και προσθέσαμε από 500μl Buffer RPE (στο οποίο είχε προηγουμένως προστεθεί αιθανόλη

100%) και αφού φυγοκεντρήσαμε για 15sec στα 10000g αποχύσαμε πάλι το υγρό που συλλέχθηκε. Στη συνέχεια, προσθέσαμε άλλα 500μl RPE και φυγοκεντρήσαμε στα 10000g για 2min.

- Μεταφέραμε τη στήλη σε καινούργιο σωλήνα συλλογής και φυγοκεντρήσαμε στα 10000g για 1min, αφού προσθέσαμε 50μl RNA free water κατευθείαν πάνω σε αυτή, για να παραλάβουμε το RNA που απομονώσαμε. Το RNA που συλλέχθηκε ήταν σε όγκο διαλύματος 50μl και αποθηκεύτηκε στους -30°C .

3. Ανάλυση RNA : Το RNA που παραλήφθηκε ηλεκτροφορήθηκε σε συσκευή οριζοντίου ηλεκτροφόρησης HORIZON 11.14 της GIBCO-BRL. Για την ηλεκτροφόρηση, χρησιμοποιήσαμε 15μl από κάθε δείγμα το οποίο αναλύθηκε σε πηκτή αгарόζης 2% σε 1X TAE (TAE: 10 mM Tris-acetate pH 7, 1mM EDTA pH 8. Το 1X TAE παρασκευάστηκε με αραιώση 1:50 από διάλυμα 50X TAE, το οποίο είχε προκύψει από την ανάμειξη 242g Tris base, 57,1 ml glacial acetic acid, 100 ml 0,5 EDTA και απιονισμένο νερό μέχρι τα 1000ml.). Για τον χρωματισμό των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε βρωμιούχο αιθίδιο και η φωτογράφιση έγινε με μηχανή Kodak σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).

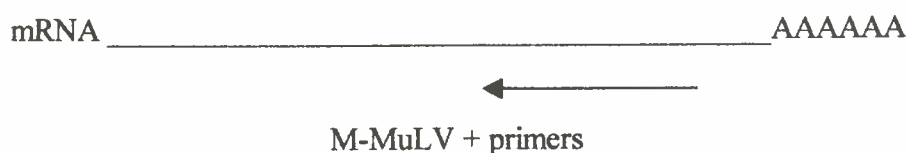
Ο ποσοτικός προσδιορισμός του mRNA έγινε με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 260nm και 280nm. Η τιμή στα 260nm επιτρέπει τον υπολογισμό της ποσότητας του RNA, αφού μια απορρόφηση $OD=1$ στα 260nm αντιστοιχεί σε συγκέντρωση RNA της τάξεως των 40μg/ml. Ο λόγος της απορρόφησης στα 260nm, προς την απορρόφηση στα 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) μας επιτρέπει να ελέγξουμε την καθαρότητα του RNA. Σε καθαρά δείγματα RNA ο λόγος αυτός ισούται με 2. Αν η απομόνωση δεν ήταν επιτυχής και υπήρχαν μόρια πρωτεΐνης και DNA, ο λόγος θα ήταν σημαντικά μικρότερος και ο προσδιορισμός της ποσότητας του RNA δεν θα ήταν εφικτή.

4. Αντίστροφη Μεταγραφή (Reverse Transcription)

Στη συνέχεια μετατρέψαμε το RNA που απομονώσαμε σε cDNA με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε είναι η αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase), η οποία είναι μια DNA πολυμεράση εξαρτώμενη από το RNA, η οποία επιπλέον, έχει την ιδιότητα να διασπά και να καταστρέφει τα υβρίδια RNA-DNA, χωρίς να επηρεάζει τα μεμονωμένα μόρια. Χρησιμοποιήσαμε την αντίστροφη μεταγραφάση M-MuLV της Invitrogen. Οι αντιδράσεις έγιναν σε συνολικό όγκο 100μl για το κάθε δείγμα, εκ των οποίων τα 10μl ήταν από το RNA που απομονώσαμε. Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μη ειδικοί. Οι όγκοι και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων αναφέρονται κάτωθι:

αντιδραστήριο	όγκος/αντίδραση	συγκέντρωση στο διάλυμα
10X Buffer RT	10μl	1X
Random primers 30ng/ml	5μl	1,5 ng/ml
DNTPs 10mM each	5μl	0,5mM
M-MuLV	2,5μl	50 units
H ₂ O	67,5μl	
ΣΥΝΟΛΟ	90μl	

Η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής μπορεί να περιγραφεί ως εξής:



mRNA _____ AAAAAA

cDNA _____

(Διάσπαση υβριδίου mRNA-DNA)

cDNA _____

cDNA _____

(Δημιουργία δίκλωνου μορίου DNA)

Η αντίδραση έχει ως εξής:

65°C : 5min (αποδιάταξη του RNA)

25°C : 5min (primers annealing, δηλαδή ανώπτηση των εκκινητών)

Προσθήκη του ενζύμου

37°C : 1h 10min (πολυμερισμός της τρανσκριπτάσης)

65°C : 10 min (αποδιάταξη του ενζύμου)

5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για τη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου της ντεκορίνης πραγματοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, ώστε να επιτευχθεί πολλαπλασιασμός των cDNA του γονιδίου που μας ενδιαφέρει και του γονιδίου της β-ακτίνης

(εσωτερικός μάρτυρας), που χρησιμοποιήσαμε ως μέτρο σύγκρισης της μεταγραφικής δραστηριότητας της ντεκορίνης. Οι εκκινητές (primers) που μεταχειριστήκαμε ήταν ειδικοί για τα γονίδια της ντεκορίνης και της β-ακτίνης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν εξίσου για τα αντίστοιχα γονίδια του ανθρώπου και του ποντικού. Η επιλογή τους έγινε με τη μέθοδο της πολλαπλής αντιστοίχισης ακολουθιών, από το Εργαστήριο Μικροχημείας του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας του Πανεπιστημίου Κρήτης, από όπου και παραγγέλθηκαν. Οι ακολουθίες που επιλέχθηκαν είναι οι εξής:

- ❖ Για την ακτίνη: B-ACTINUP: 5' ACACTGTGCCCATCTACGAGG 3'
B-ACTINDN: 5' AGGGGCCGGACTCGTCATACT 3'
- ❖ Για την ντεκορίνη: DECUP: 5' ATGATTGTCATAGAACTGGGC 3'
DECDN: 5' ATTGTTGTTATGAAGGTAGAC 3'

Ο αριθμός των κύκλων της PCR και οι συγκεντρώσεις των εκκινητών καθορίστηκαν πειραματικά, λόγω της διαφορετικής αντιπροσώπευσης των μηνυμάτων των δύο γονιδίων στα κύτταρα (η αντίδραση είναι ανταγωνιστική και ημιποσοτική). Για το λόγο αυτό κατασκευάστηκε καμπύλη ενίσχυσης των δύο μηνυμάτων στους 15, 20, 25, 30, 35, 40 κύκλους με στόχο η ενίσχυση να βρίσκεται στη γραμμική περιοχή και για τις δύο παράλληλες αντιδράσεις.

Οι αντιδράσεις έγιναν σε τελικό όγκο 25μl για κάθε δείγμα και χρησιμοποιήθηκαν 10μl cDNA. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε είναι η Hot Start DNA Polymerase και η ενεργοποίησή του (απελευθέρωσή του από τα αντισώματα που το δεσμεύουν) έγινε στους 95°C για 15min. Καταλήξαμε να πραγματοποιούμε την PCR σε 40 κύκλους, που είχαν ως εξής έκαστος:

- ❖ 94°C : 1min (αποδιάταξη)
- ❖ 57°C : 1min (ανώπτηση εκκινητών)
- ❖ 72°C : 1min (πολυμερισμός)

Ο τελικός πολυμερισμός έγινε στους 72°C για 10min. Η συσκευή είναι προγραμματισμένη, ώστε να διατηρεί τα δείγματα στους 4°C.

Οι όγκοι των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται κάτωθι:

αντιδραστήριο	όγκος/αντίδραση	τελική συγκέντρωση
10X PCR Buffer	2,5μl	1X
50mM MgCl ₂	1μl	2mM
dNTPs 2mM	2,5μl	200mM
primers decorin 25pmoles each	1μl	25 pmoles each/ αντίδραση
primers β-actin 1,25 pmoles each	1μl	1,25 pmoles each/ αντίδραση
Hot start Taq polymerase	0,25μl	5 units/αντίδραση
H ₂ O	6,75μl	
ΣΥΝΟΛΟ	15μl	

6. Ανάλυση των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Στη συνέχεια, έγινε ανάλυση των προϊόντων της PCR σε πηκτή αγαρόζης 1,5% σε 1X TAE. Ηλεκτροφορήθηκαν 5μl από το κάθε δείγμα, τα οποία χρωματίστηκαν με βρωμιούχο αιθίδιο και φωτογραφήθηκαν με μηχανή Kodak, σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας. Η ποσοτικοποίηση έγινε με το πρόγραμμα Kodak Digital Science 1D™ και τα αποτελέσματα ύστερα υπέστησαν επεξεργασία στο Microsoft Excel με τη μορφή πινάκων και γραφημάτων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Λήψη ιστοτεμαχίων

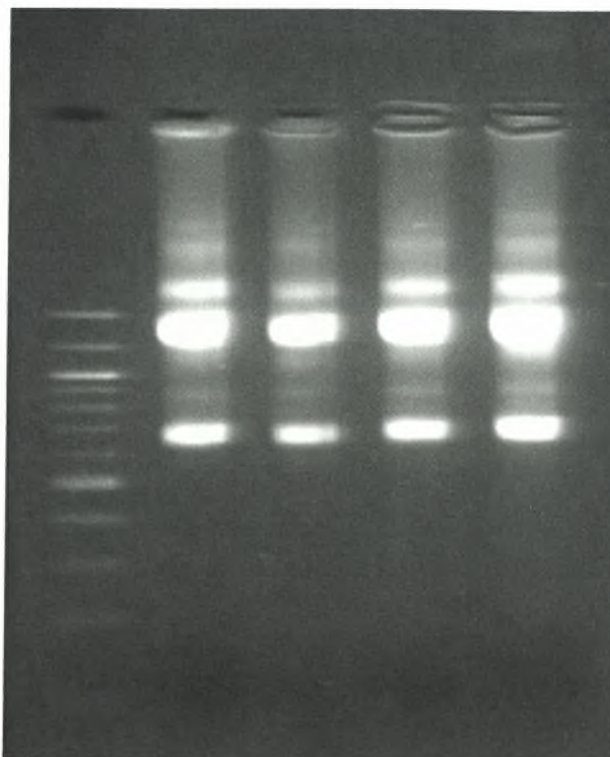
Εκτεταμένες ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις παρατηρήθηκαν στα εγκεφαλικά ημισφαίρια των ζώων που θυσιάστηκαν από 48 ώρες μέχρι και 7 μέρες μετά την υποβολή τους σε συνθήκες υποξίας. Ειδικότερα, το αριστερό ημισφαίριο παρουσίασε σοβαρότερες μορφολογικές ανωμαλίες συγκριτικά με το δεξιό ημισφαίριο του ίδιου ζώου.

2. Απομόνωση και ανάλυση RNA

Απομονώσαμε RNA σε παρόμοιες ποσότητες από όλα τα δείγματα. Δεδομένου του ότι λάβαμε ιστοτεμάχια 30mg, από κάθε ημισφαίριο των ζώων που χρησιμοποιήσαμε για το πείραμα, η θεωρητική ποσότητα του RNA που αναμέναμε να παραλάβουμε ήταν 25μg σε κάθε δείγμα (8μg ανά 10mg ιστού, όπως αναφέρεται στο RNeasy Mini Handbook της Quiagen). Το τελικό διάλυμα που προέκυψε από τη διαδικασία απομόνωσης είχε όγκο 50μl και επομένως, η θεωρητική του συγκέντρωση ήταν 0,5μg/μl.

Η φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 260 nm επιβεβαίωσε κατά προσέγγιση τους υπολογισμούς μας για την τελική συγκέντρωση του RNA σε κάθε δείγμα. Η τιμή της απορρόφησης ήταν σε όλες τις μετρήσεις περίπου 0,06.

Στην εικόνα 7 φαίνεται μια τυπική ανάλυση RNA σε πηκτή αγαρόζης 2% για 4 δείγματα. Εμφανίζονται δύο διακριτές ζώνες που αντιστοιχούν στα θραύσματα 28S και 18S. Η εικόνα αυτή μας δίνει πληροφορίες για την κατάσταση του RNA που παραλάβαμε, ως προς την καθαρότητα και την ακεραιότητά του. Δεν παρατηρήθηκαν προϊόντα υδρόλυσης.

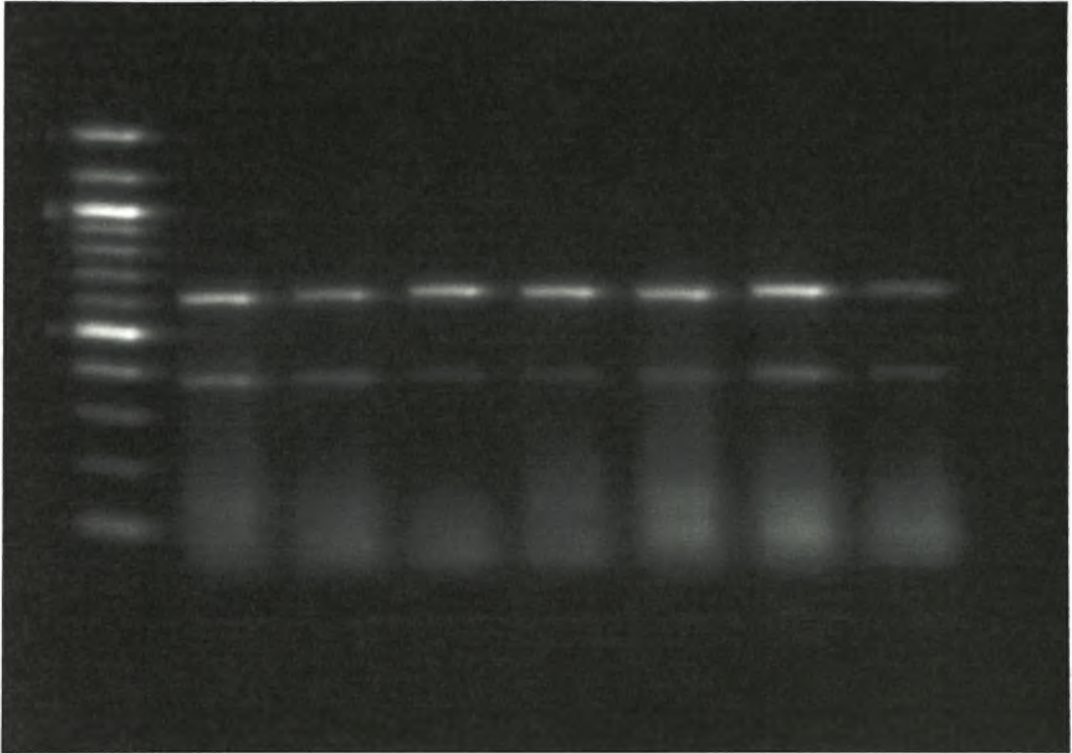


Εικόνα 7:Ανάλυση RNA σε πηκτή αγαρόζης 2%

3. Ανάλυση cDNA

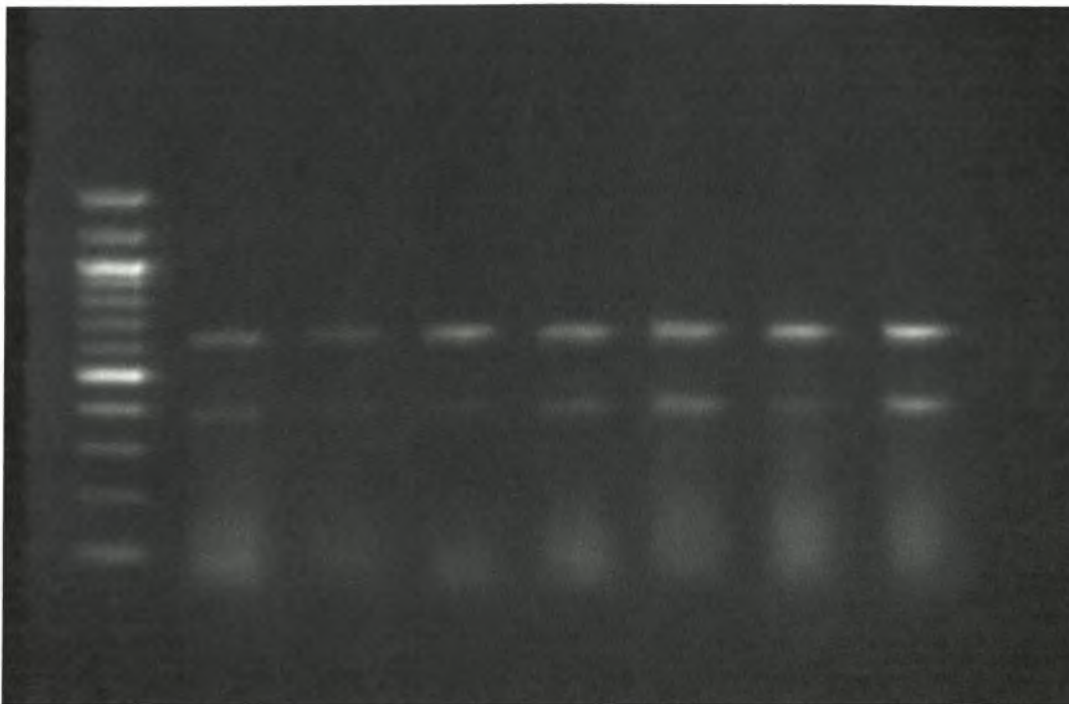
Στις εικόνες 8 και 9 παρουσιάζεται μια τυπική εμφάνιση ανάλυσης των προϊόντων της PCR, σε πηκτή αγαρόζης 1,5%. Η ζώνη των 383 ζευγών βάσεων αντιστοιχεί στο cDNA της ντεκορίνης, ενώ η ζώνη των 621 bp αντιστοιχεί στο cDNA της β-ακτίνης.

Στην εικόνα 8 φαίνεται η ηλεκτροφόρηση χαρακτηριστικών δειγμάτων που απομονώθηκαν από το δεξί ημισφαίριο του κάθε ζώου. Στη διαδρομή 1 έτρεξε ένας DNA μάρτυρας με κλίμακα 100 ζευγών βάσεων (100 bp ladder της Invitrogen), στη διαδρομή 2 έτρεξε δείγμα από φυσιολογικό ζώο 7 ημερών, ενώ στις διαδρομές 3, 4, 5, 6, 7, 8 έτρεξαν δείγματα του δεξιού ημισφαιρίου ζώων που θανατώθηκαν αντίστοιχα στις 0, 2, 24, 48, 72 ώρες και 7 ημέρες μετά την υποβολή τους σε κατάσταση ισχαιμίας – υποξίας.



Εικόνα8: Ανάλυση cDNA δεξιού ημισφαιρίου σε πηκτή αγαρόζης 2%

Στην εικόνα 9 φαίνεται η ηλεκτροφόρηση χαρακτηριστικών δειγμάτων που απομονώθηκαν από το αριστερό ημισφαίριο του κάθε ζώου. Στη διαδρομή 1 έτρεξε ένας DNA μάρτυρας με κλίμακα 100 ζευγών βάσεων (100 bp ladder της Invitrogen), στη διαδρομή 2 έτρεξε δείγμα από φυσιολογικό ζώο 7 ημερών, ενώ στις διαδρομές 3, 4, 5, 6, 7, 8 έτρεξαν δείγματα του αριστερού ημισφαιρίου ζώων που θανατώθηκαν αντίστοιχα στις 0, 2, 24, 48, 72 ώρες και 7 ημέρες μετά την υποβολή τους σε κατάσταση ισχαιμίας – υποξίας.



Εικόνα 9: Ανάλυση cDNA αριστερού ημισφαιρίου σε πηκτή αγαρόζης 2%

Οι φωτογραφίες των ηλεκτροφορήσεων χρησίμευσαν για τη μέτρηση της μεταβολής της ποσότητας του mRNA για τη ντεκορίνη σε σχέση με το mRNA για την β- ακτίνη ανά χρονική στιγμή. Πρώτα, μετρήθηκαν οι απόλυτες φωτεινότητες της ντεκορίνης και της β-ακτίνης για όλα τα δείγματα. Στη συνέχεια υπολογίστηκε ο λόγος της απόλυτης φωτεινότητας της ντεκορίνης προς την απόλυτη φωτεινότητα της β-ακτίνης και ο λόγος που βρέθηκε για τα φυσιολογικά ζώα, ορίστηκε ως 100%. Κατόπιν, συγκρίναμε τις τιμές που βρέθηκαν για τους ιστούς των ζώων που μελετήσαμε με αυτές των φυσιολογικών ζώων και βρήκαμε το ποσοστό της επί της % μεταβολής του cDNA της ντεκορίνης.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια υπολογιστή, καταγράφηκαν σε πίνακες, συγκρίθηκαν μεταξύ τους, ελήφθησαν οι μέσοι όροι και κατασκευάστηκαν γραφήματα που δείχνουν τις μεταβολές της έκφρασης του γονιδίου της ντεκορίνης ανά χρονική στιγμή που μελετήθηκε μετά την υποβολή των πειραματοζώων σε κατάσταση υποξίας – ισχαιμίας. Στη συνέχεια παραθέτουμε πίνακες με ενδεικτικές τιμές για κάθε ημισφαίριο. Στα γραφήματα και τους πίνακες γίνεται σύγκριση με τα

δείγματα, τα οποία ελήφθησαν από φυσιολογικά ζώα. Οι τιμές της % μεταβολής για το normal ορίστηκαν αυθαίρετα 100%

Πίνακας 1: Μεταβολές του mRNA της ντεκορίνης για το δεξί ημισφαίριο

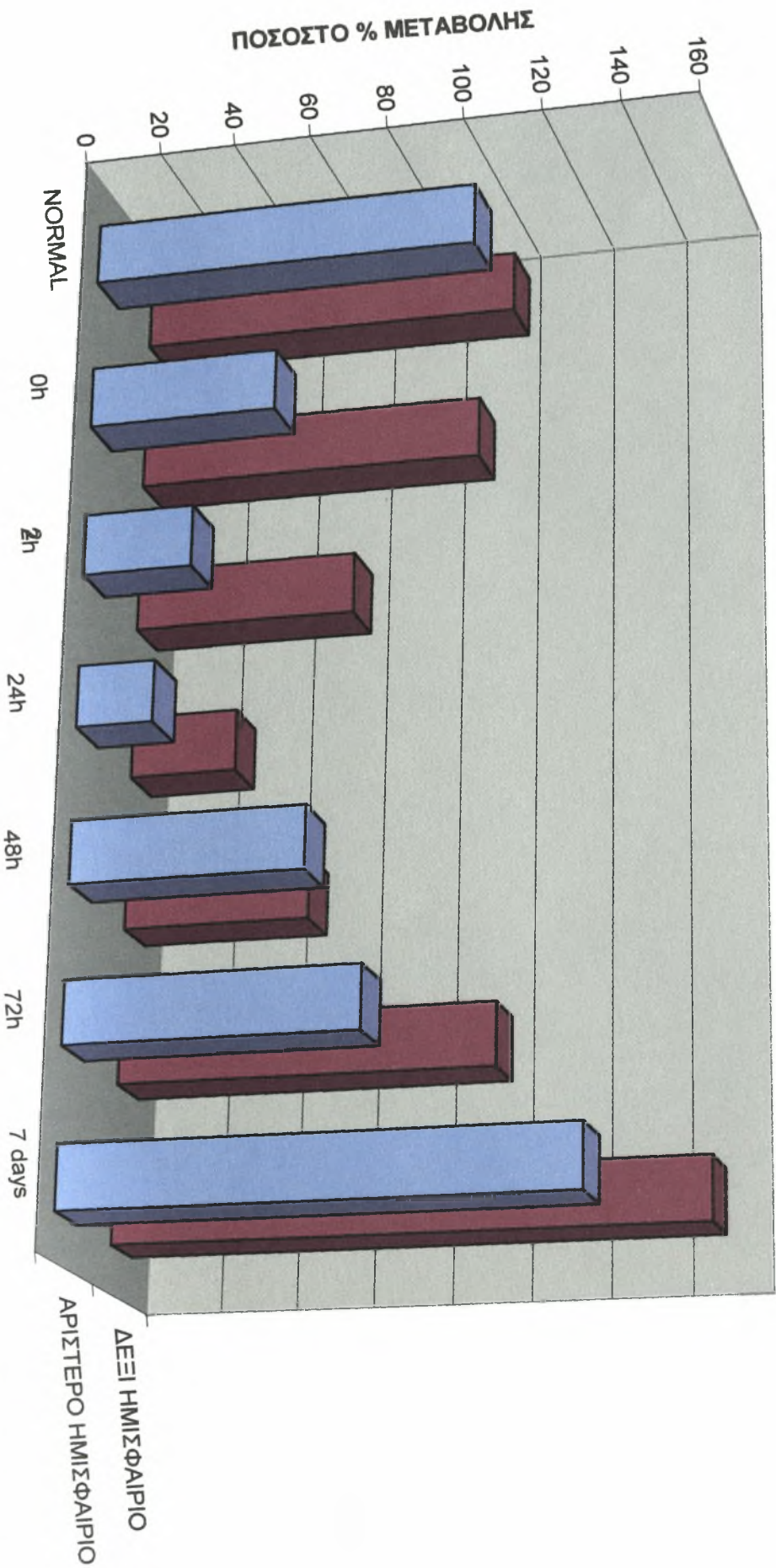
	normal	0h	2h	24h	48h	72h	7days
Φωτεινότητα ακτίνης	15178	11398	13238	14413	15345	15935	4793
Φωτεινότητα ντεκορίνης	7373	5045	3783	1970	3653	7550	3508
Λόγος ντεκορίνης/ακτίνης	0,486	0,443	0,286	0,137	0,238	0,474	0,732
% μεταβολή	100	91,12	58,83	28,14	49,01	97,54	150,52

Πίνακας 2: Μεταβολές του mRNA της ντεκορίνης για το αριστερό ημισφαίριο

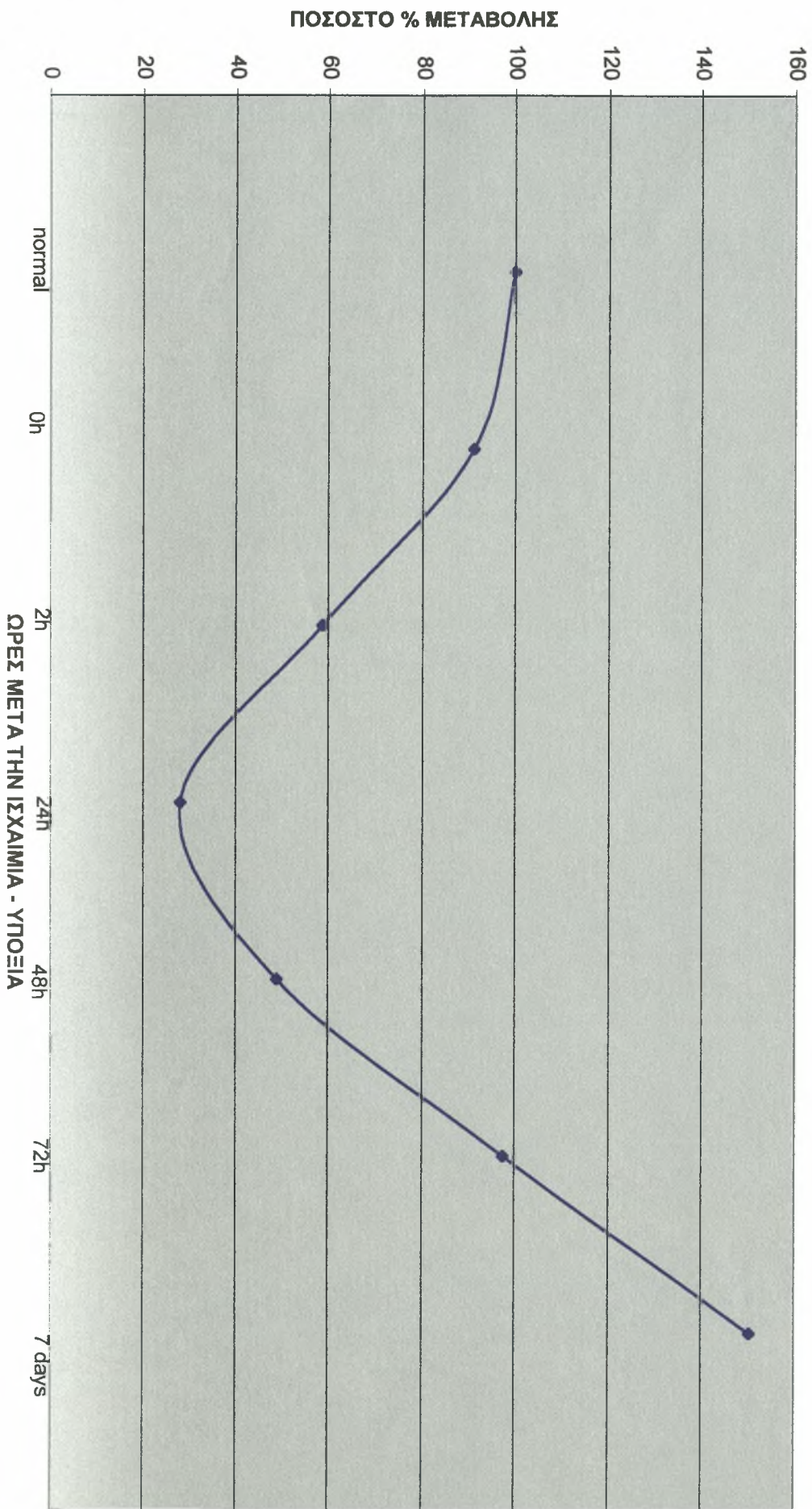
	normal	0h	2h	24h	48h	72h	7days
Φωτεινότητα ακτίνης	26750	12970	20290	14529	26126	27121	35820
Φωτεινότητα ντεκορίνης	15668	3740	3373	1694	9245	11831	27011
Λόγος ντεκορίνης/ακτίνης	0,586	0,288	0,166	0,117	0,354	0,436	0,754
% μεταβολή	100	49,23	28,32	19,90	60,41	75,31	128,74

Από τους πίνακες και τα διαγράμματα, τα οποία είναι τυπικά αυτής της σειράς πειραμάτων, είναι εμφανές ότι από τις 0 ώρες έχουμε μία μείωση του μηνύματος της ντεκορίνης στα δύο ημισφαίρια υποξικού – ισχαιμικού εγκεφάλου νεογέννητων επίμυων. Η μεγαλύτερη πτώση εμφανίζεται στις 24 ώρες, ενώ από τις 48 ώρες εμφανίζεται μια σαφής τάση για ανάκαμψη. Στις 7 ημέρες το mRNA που ανιχνεύεται ξεπερνάει τα φυσιολογικά επίπεδα.

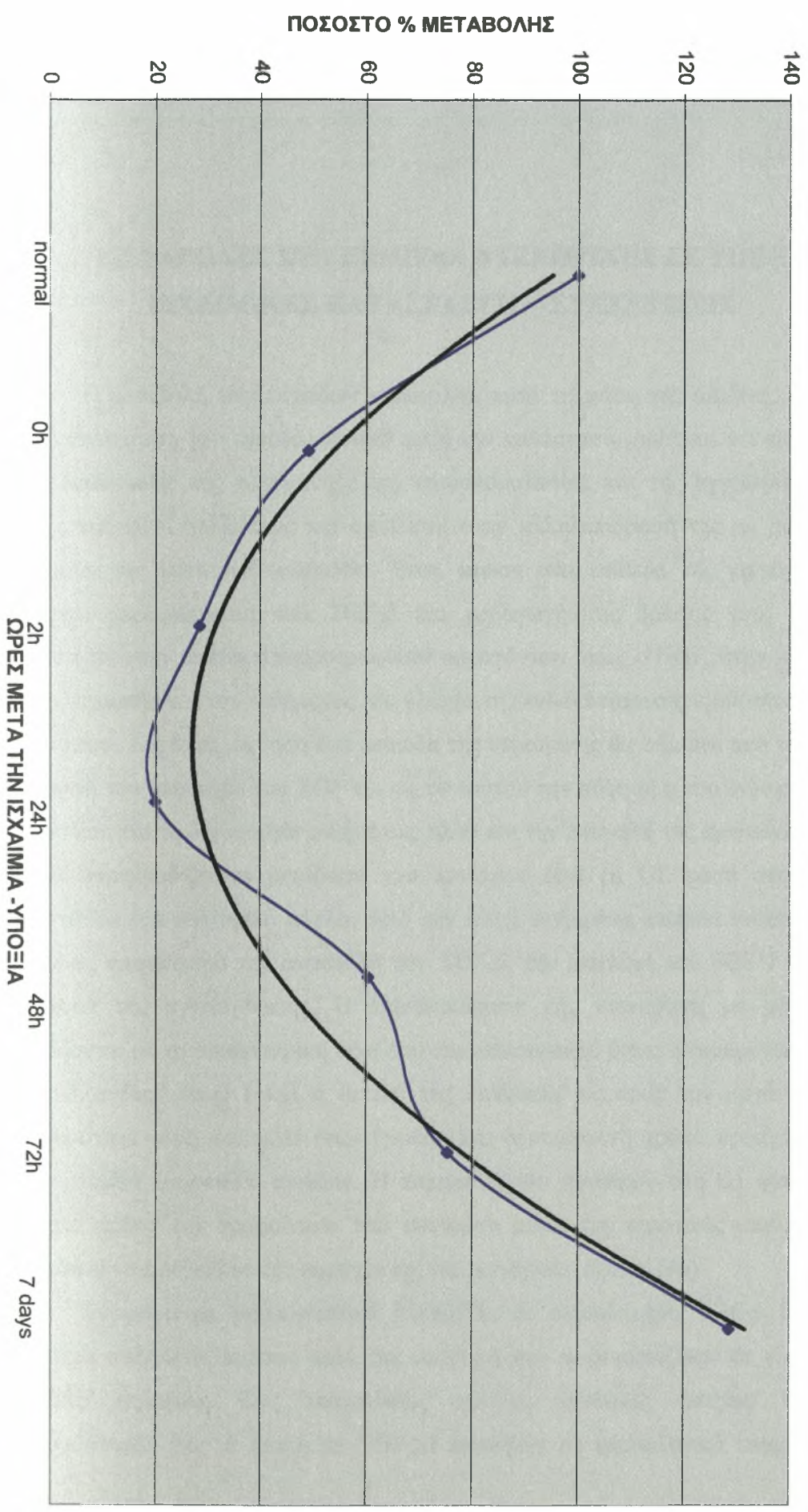
ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΟΥ mRNA ΤΗΣ ΝΤΕΚΟΡΙΝΗΣ ΣΤΑ ΔΥΟ ΗΜΙΣΦΑΙΡΙΑ



ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΟΥ mRNA ΤΗΣ ΝΤΕΚΟΡΙΝΗΣ ΣΤΟ ΔΕΞΙ ΗΜΙΣΦΑΙΡΙΟ



ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΟΥ mRNA ΤΗΣ ΝΤΕΚΟΡΙΝΗΣ ΣΤΟ ΑΡΙΣΤΕΡΟ ΗΜΙΣΦΑΙΡΙΟ



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΝΤΕΚΟΡΙΝΗΣ ΣΕ ΥΠΟΞΙΕΣ/ ΙΣΧΑΙΜΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ – ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ

Η μεταβολή των επιπέδων ντεκορίνης κατά τη φάση της υποξίας, και κατά την επανάκαμψη του εγκεφάλου από αυτή την κατάσταση, φαίνεται ότι εμπλέκεται στις διαδικασίες της φλεγμονής, της νευροπροστασίας και της αγγειογένεσης. Ο ρόλος της είναι πολλαπλός και οφείλεται στην αλληλεπίδρασή της με μόρια που αφορούν την κυτταρική επιβίωση. Έτσι, πτώση στα επίπεδα της ντεκορίνης θα σήμαινε απελευθέρωση του TGF-β και προαγωγή της δράσης του, η οποία συνίσταται στην επαγωγή νευροτροφικών παραγόντων όπως ο NGF, στην προαγωγή της φλεγμονής και του οιδήματος και έλεγχο της ενδοκυτταρικής ομοιόστασης του ασβεστίου. Αντίθετα, αύξηση στα επίπεδα της ντεκορίνης θα σήμαινε από τη μια, τη διέγερση του υποδοχέα του EGF και ως εκ τούτου την αύξηση η του ενδοκυττάριου ασβεστίου και τη δημιουργία οιδήματος, αλλά και την επαγωγή της πρωτεΐνης p21, η οποία παρεμποδίζει τη μετάβαση του κυττάρου από τη G1 φάση στην S και αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο. Από την άλλη, αυξημένα επίπεδα ντεκορίνης θα είχαν ως αποτέλεσμα την αναστολή του TGF-β, την επαγωγή του FGF-2 και κατά συνέπεια της αγγειογένεσης. Η αλληλεπίδραση της ντεκορίνης με μόρια που σχετίζονται με τη διακυτταρική σύνδεση και επικοινωνία, όπως η φιμπρονεκτίνη και το κολλαγόνο τύπου I και η θετική της επίδραση ως προς την οργάνωση και σταθερότητά τους, αποτελεί έναν έμμεσο και δευτερογενή τρόπο προαγωγής του σχηματισμού τριχοειδών αγγείων. Η παραμονή του κυττάρου στη G1 φάση (Go), απαιτεί επίσης την τροφοδοσία του κυττάρου μέσω της αιματικής κυκλοφορίας, δηλαδή είναι ένας εκλυτικός παράγοντας για την αγγειογένεση. (46)

Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, τα επίπεδα του TGF-β βρέθηκαν ιδιαίτερα αυξημένα, αμέσως μετά την υποβολή των πειραματόζωων σε κατάσταση υποξίας/ ισχαιμίας. Στις περιπτώσεις που οι συνθήκες υποξίας/ ισχαιμίας εφαρμόστηκαν για 15 λεπτά το TGF-β1 επανήλθε σε φυσιολογικά επίπεδα στον

υπόκαμφο πέντε μέρες μετά την υποξία. Αντίθετα, μετά από μόνιμο καρωτιδικό αποκλεισμό, τα επίπεδα του TGF-β1 παρέμειναν υψηλά τουλάχιστον για 15 ημέρες μετά την επέμβαση. Αξίζει να σημειωθεί επίσης ότι τα υψηλότερα επίπεδα του TGF-β1 συμπίπτουν χρονικά με την ενεργοποίηση της νευρογλοίας. (14)

Σε τραυματισμούς του εγκεφάλου, στον ποντικό, τα επίπεδα της ντεκορίνης αρχικά βρέθηκαν να μειώνονται τοπικά, ενώ σταδιακά αρχίζουν να εμφανίζονται θετικά για την ντεκορίνη κύτταρα στα τριχοειδή αγγεία που περιβάλλουν την πληγείσα περιοχή σε απόσταση 800μm από το κέντρο του τραύματος. Έως και την τρίτη ημέρα μετά τον τραυματισμό, τα επίπεδα της ντεκορίνης αυξάνονται σταδιακά και φτάνουν να ξεπεράσουν τη φυσιολογική έκφρασή της. Κατά τη διάρκεια της δεύτερης εβδομάδας, τα θετικά για την ντεκορίνη αστροκύτταρα διασκορπίζονται στην πληγείσα περιοχή. Τότε εμφανίζεται κι ένας δεύτερος τύπος κυττάρων που παράγουν ντεκορίνη, τα οποία ταυτοποιήθηκαν ως μακροφάγα. Μέσα στις επόμενες εβδομάδες, παρατηρείται συσσώρευση των θετικών για την ντεκορίνη κυττάρων, στην πληγείσα περιοχή, όπου και συνεχίζουν ν' ανιχνεύονται ως και 6 μήνες μετά τον τραυματισμό. Τα κύτταρα τα οποία συμμετέχουν στην παραγωγή της ντεκορίνης εντοπίζονται ιδιαίτερα σε σημεία του εγκεφάλου που βρίσκονται δίπλα στην τραυματισμένη περιοχή και συνίστανται σε ενδοθηλιακά κύτταρα, κύτταρα που συνδέονται στις εμμύελες νευρικές ίνες και τα κύτταρα των λείων μυϊκών ινών των αγγείων. (31)

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα ως προς την αρχική μείωση του μηνύματος της ντεκορίνης, λόγω των τραυματικών συνεπειών της ισχαιμίας και της υποξίας στα εγκεφαλικά κύτταρα και της ακολουθούμενης αύξησης του mRNA για τη συγκεκριμένη γλυκοπρωτεΐνη, ως αποτέλεσμα της αντίδρασης του εγκεφάλου σε αυτές τις στρεσογόνες συνθήκες.

Η αρχική μείωση μπορεί να συσχετιστεί με τις λειτουργίες που της αποδίδονται ως διαμορφωτή του εξωκυττάρου χώρου, αλλά και ως ρυθμιστή της ενεργότητας αυξητικών παραγόντων, όπως του TGF-β και του EGF, μέσω της σύνδεσής της με τον υποδοχέα του. Η πτώση των επιπέδων της ντεκορίνης θα μπορούσε να αποδοθεί στην κυτταρική καταστροφή που παρατηρείται στην άμεσα προσβεβλημένη από την ισχαιμία περιοχή του εγκεφάλου, αλλά και στην απελευθέρωση του TGF-β. Όπως έχουμε αναφέρει παραπάνω, έχει προταθεί ότι η ντεκορίνη λειτουργεί ως εξωκυττάρια αποθήκη αυτού του μετασχηματιστικού παράγοντα και παρεμποδίζει τη δράση του σε φυσιολογικές συνθήκες. Όμως, στην

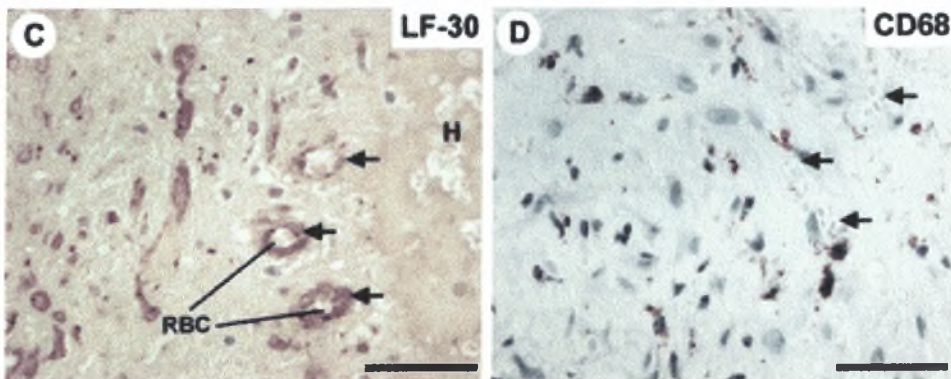
κατάσταση ισχαιμίας - υποξίας, απαιτείται η αυξημένη δράση του, ώστε να προαχθεί η νευροπροστασία, μέσω της επαγωγής του NGF και του ελέγχου της ενδοκυττάριας ομοιόστασης του ασβεστίου, το οποίο αυξάνεται ανεξέλεγκτα, λόγω της απώλειας της φυσιολογικής λειτουργίας των μεμβρανικών υποδοχέων. Για να επιτευχθεί αυτό, χρειάζεται να μειωθεί η μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου της ντεκορίνης, γεγονός που καθορίζεται από τους παράγοντες ελέγχου της μεταγραφής, όπως είναι ο TNF- α και η INF- γ , των οποίων η δράση είναι έντονη κατά τη φλεγμονή, που ως γνωστόν, δημιουργείται από τις ισχαιμικές και υποξικές συνθήκες.

Στον άνθρωπο, τα μοναδικά δεδομένα για τα επίπεδα του TGF- β 1 (ως το 1997) προέρχονται από τις παρατηρήσεις του Krupinski σε άτομα τα οποία υπέφεραν από ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια. Αυξημένα επίπεδα του TGF- β mRNA και της αντίστοιχης πρωτεΐνης, παρατηρήθηκαν σε νευρώνες, στα μικρογλοιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα και στα μακροφάγα που βρίσκονταν γύρω από τις πληγείσες περιοχές. Έχουν προταθεί μάλιστα, (από τον Gluckman και τους συνεργάτες του) θεραπευτικές προσεγγίσεις που βασίζονται στα αποτελέσματα του TGF- β 1 ως προς τη νευρωνική επιβίωση και τη μικρογλοιακή ενεργοποίηση (ρύθμιση οξειδωτικού stress, διατήρηση της ομοιόστασης του ασβεστίου και την επαγωγή της έκφρασης ενός αντιαπτωτικού γονιδίου, του bcl-2). Η θεραπευτική δόση που προτάθηκε ήταν της τάξεως των 10ng και είχε ως αποτέλεσμα τη νευροπροστασία περιοχών όπως του εγκεφαλικού φλοιού, του θαλάμου και του προμήκη, η ένταση της οποίας βρέθηκε να εξαρτάται από την ώρα χορήγησης του TGF- β . (14)

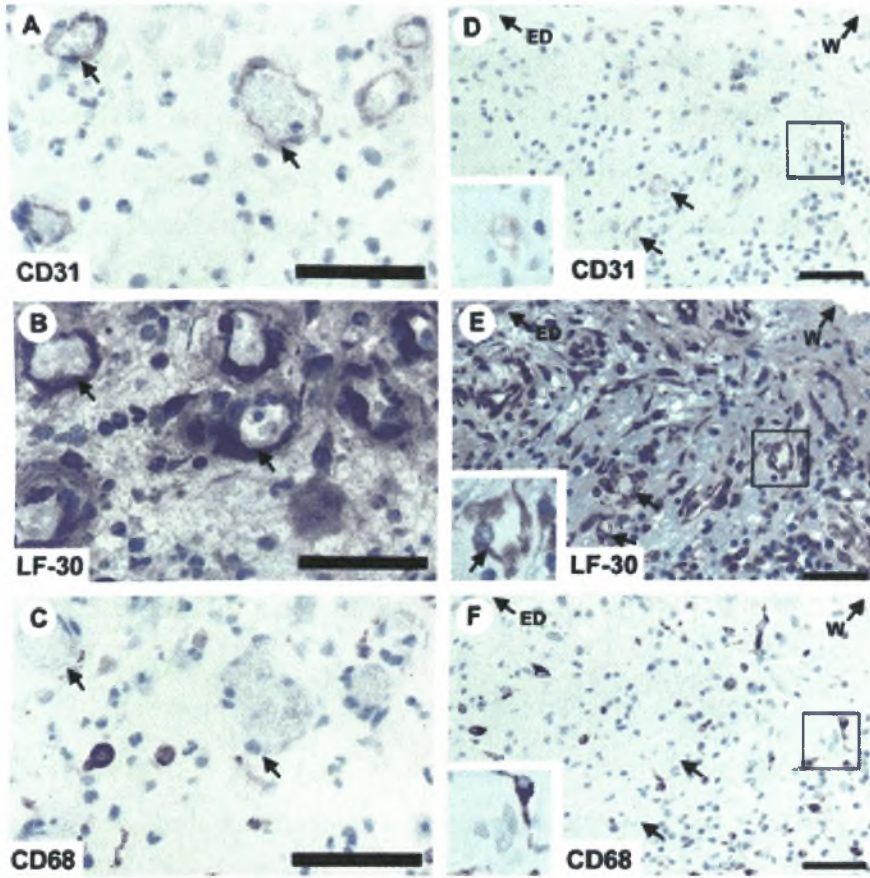
Μετά το πρώτο ισχαιμικό-υποξικό σοκ του εγκεφάλου και την αρχική ενεργοποίηση των διαθέσιμων μηχανισμών για την προαγωγή της κυτταρικής επιβίωσης, απαιτείται προσαρμογή του εγκεφάλου στις νέες συνθήκες, γεγονός που συνίσταται κυρίως στην αύξηση της αιμάτωσής του, μέσω της αγγειογένεσης. Η δημιουργία νέων αγγείων, εμπλέκει την κινητοποίηση πολλών πρωτεϊνών, όπως της αγγειοποιητίνης και της ερυθροποιητίνης καθώς και παραγόντων όπως ο VEGF. Ο ρόλος της ντεκορίνης σε αυτή τη διαδικασία φαίνεται να είναι πολλαπλός. Για το σχηματισμό των νέων αγγείων χρειάζεται αφενός να υπάρχουν οι κατάλληλοι παράγοντες στο κυτταρικό περιβάλλον και αφετέρου τα κύτταρα που συμμετέχουν να βρίσκονται σταθεροποιημένα στη φάση G₀ του κυτταρικού κύκλου. Η δέσμευση και ο διμερισμός του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGF από τη ντεκορίνη προκαλεί την παραμονή του κυττάρου σε αυτή τη φάση, λόγω της επαγωγής της πρωτεΐνης p21. Επιπλέον αύξηση των επιπέδων της ντεκορίνης

αναστέλλει τη δράση του TGF- β , αποδεσμεύοντας έτσι τον FGF-2, του οποίου η εμφάνιση συνοδεύεται από το φαινόμενο της αγγειογένεσης. Τα βιβλιογραφικά δεδομένα συμφωνούν με το συσχετισμό αυτό, επιβεβαιώνοντας από τη μια την επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου του FGF-2 κατά την επανάκαμψη του εγκεφάλου από την ισχαιμία και την υποξία (2, 7, 16, 40, 47) και παράλληλα την αύξηση των επιπέδων της ντεκορίνης κατά την ίαση εγκεφαλικών τραυμάτων.

Άλλες έρευνες έδειξαν ότι η ντεκορίνη εμπλέκεται στην αγγειογένεση *in vivo*, ιδιαίτερα όταν αυτή συνδέεται με φλεγμονή, η οποία επάγει, μέσω των προφλεγμονωδών παραγόντων, την έκφραση της ντεκορίνης. Υπάρχουν δεδομένα, μάλιστα, που υποστηρίζουν ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τόσο του ποντικού, όσο και του ανθρώπου δεν εκφράζουν το γονίδιο της ντεκορίνης, παρά μόνο κατά την περίοδο της αγγειογένεσης. Σύμφωνα με πειραματικές προσεγγίσεις, βρέθηκε ότι η παραγωγή ντεκορίνης αυξάνεται επίσης κατά την ίαση δερματικών βλαβών στα επιθηλιακά κύτταρα των νεοσχηματιζομένων τριχοειδών αγγείων. Η παρουσία δε των μακροφάγων, γύρω από την περιοχή συνδέει την επαγωγή της ντεκορίνης με παράγοντες που εκκρίνονται απ' αυτά, καθώς και με την παρουσία μιας εν των βάθει φλεγμονής. Έχει αποδειχθεί, ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα που συνθέτουν ντεκορίνη διαφεύγουν από τις αποπτωτικές διαδικασίες και διαφοροποιούνται. Οι SLRPs, γενικότερα, υπερεκφράζονται στην πληγείσα περιοχή, μετά από επέμβαση στο ΚΝΣ, ενώ ακόμα και το λειτουργικό επίπεδο των ενδοθηλιακών κυττάρων έχει άμεση σχέση με την έκφραση ορισμένων SLRPs. (23, 27, 33, 37)



Εικόνα 5: Νεοσχηματιζόμενα τριχοειδή αγγεία που περιβάλλουν περιοχή αιματώματος, γύρω από φλεγμόντα αρτηριόλια και βράθηκαν ανθετικά στη ντεκορίνη. Η εικόνα είναι από το άρθρο των Lassi Nelimarka et al. (33)



Εικόνα 6: Η ντεκορίνη παράγεται από νεοσχηματιζόμενα τριχοειδή αγγεία κατά την ίαση δερματικών τραυμάτων. Η εικόνα είναι από το άρθρο των Lassi Nelimarkka et al. (33)

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Evangelia Spandou, George Karkavelas, Vassiliki Soubasi, Persephone Avgoustides-Savvopoulou, Theodoros Loizidis, Olympia Guiba-Tziampiri. Brain Research: 819, Effect of ketamine on hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats, Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, Greece.
2. Marshall Walton, Bronwen Connor, Patricia Lawlor, Deborah Young, Ernest Sirimanne, Peter Gluckman, Gregory Cole, Michael Dragunow. Brain Research Reviews 1999: 29. Neuronal death and survival in two models of hypoxic-ischemic brain damage, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Health Science, University of Auckland, Auckland, New Zealand.
3. Max-Planck. Adv Exp Med Biol 1999: 474, The hypoxic brain. Insights from ischemia research, Department of Experimental Neurology, Cologne, Germany.
4. Mennel HD, Sauer D, Rossberg C, Bielenberg GW, Krieglstein J. Morphology of tissue damage due to experimental cerebral ischemia in rats, Abteilung Neuropathologie, Universitat Marburg, F.R.G.
5. Levison SW, Rothstein RP, Romanko MJ, Snyder MJ, Meyers RL, Vannucci SJ. Hypoxia/schemia depletes the rat perinatal subventricular zone of oligodendrocyte progenitors and neural stem cells, Department of Neuroscience and Anatomy, Pennsylvania State University, College of Medicine, Hershey.
6. Magnoni MS, Kobayashi H, Frattola L, Spano PF, Trabucchi M. Stroke 1985, Effect of common carotid occlusion on beta-adrenergic receptor function in cerebral microvessels.

7. Tang Y, Lu A, Aronow BJ, Wagner KR, Sharp Fr. *Eur J Neurosci* 2002, Genomic responses of the brain to ischemic stroke, intracerebral haemorrhage, kainite seizures, hypoglycemia, and hypoxia, Department of Neurology and Neuroscience Program, University of Cincinnati, 3125 Eden Avenue, Cincinnati, USA.
8. Onzuka K, Fukuda A, Kunimatsu A, Kumazaki M, Sasaki M, Takaku A, Nishino H. *Exp. Neurol* 1996, Early cytopathic features in rat ischemia model and reconstruction by neural graft, Department of Physiology and Biochemistry, Nagoya City University Medical School, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Japan.
9. Joachim Kappler, Christine C Stichel, Marc Gleichmann, Clemens Gillen, Ulrich Junghans, Hans Kresse, Hans Werner Muller. *Brain Research* 1998: 793, Developmental regulation of decorin expression in postnatal rat brain, Labor für molekulare Neurobiologie, Neurologische Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Morrenstraße 5, D-40225 Düsseldorf, Germany.
10. Alain Mauviel, Manoranjan Santra, Yue Qiu Chen, Jouni Uitto and Renato V. Lozzo. Transcriptional Regulation of Decorin Gene Expression, Department of Dermatology, Biochemistry and Molecular Biology, and Pathology and Cell Biology, Jefferson Medical College and The Jefferson Cancer Institute, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania 19107.
11. Kappler J, Stichel CC, Gleichmann M, Gillen C, Junghans U, Kresse H, Muller HW. *Brain Res* 1998: 793, Developmental regulation of decorin expression in postnatal rat brain, Labor für molekulare Neurobiologie, Neurologische Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Moorenstrasse 5, S-40225 Düsseldorf, Germany.
12. Hanemann CO, Kujn G, Lie A, Gillen C, Bosse F, Spreyer P, Muller HW. *Histochem Cytochem* 1993: 41, Expression of decorin mRNA in the nervous system of rat, Department of Neurology, University of Düsseldorf, Germany.

13. Dodge GR, Diaz A, Sanz-Rodriguez C, Reginato AM, Jimenez SA. Effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor alpha on the expression of the genes encoding aggrecan, biglycan, and decorin core proteins in cultured human chondrocytes, Jefferson Medical College, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania 19107-5541, USA.
14. Bruce M Pratt and John M. McPherson. TGF- β in the Central Nervous System: Potential Roles in Ischemic Injury and Neurodegenerative Diseases.
15. Stander M, Naumann U, Wick W, Weller M. Transforming growth factor-beta and p-21: multiple molecular targets of decorin-mediated suppression of neoplastic growth, Department of Neurology, University of Tübingen, Medical School, Germany.
16. Papakonstantinou E, Roth M, Tamm E, Eickelberg O, Perruchoud AP, Karakiulakis G. Pharmacol Exp Ther 2002; 301, Hypoxia differentially enhances the effects of transforming growth factor-beta isoforms in the synthesis and secretions of glycosaminoglycans by human lung fibroblasts, Department of Pharmacology, School of Medicine, Aristotle University, 54006 Thessaloniki, Greece.
17. Schaefer L, Macakova K, Raslik I, Micegova M, Grone HJ, Schonherr E, Robenek H, Echtermeyer FG, Grassel S, Bruckner P, Schaefer RM, Lozzo RV, Kresse H, Absence of decorin adversely influences tubulointerstitial fibrosis of the obstructed kidney by enhanced apoptosis and increased inflammatory reaction Department of Internal Medicine D, Physiological Chemistry and Pathobiochemistry, and Arteriosclerosis Research, University of Münster, Münster, Germany.
18. Schonherr E, Broszat m, Brandan E, Bruckner P, Kresse H. Arch Biochem Biophys 1998; 355, Decorin core protein fragment Leu155-Val260 interacts

with TGF-beta but does not compete for decorin binding to type I collagen, Institute of Physiological Chemistry and Pathobiochemistry, University of Munster, Waldeyerstrasse 15, Munster, D-48149, Germany.

19. Asakura S, Kato H, Fujino S, Konishi T, Tezuka N, Mori A. Hum Pathol 1999: 30, Role of transforming growth factor-beta and decorin in development of central fibrosis in pulmonary adenocarcinoma, Second Department of Surgery, Shiga University of Medical Science, Japan.
20. Renato V. Iozzo, David K. Moscatello, David J. McQuillan and Inge Eichstetter. Biological Chemistry 1999:m8, Decorin is a Biological Ligand for the Epidermal Growth Factor Receptor, Department of Pathology, Anatomy, and Cell Biology and Kimmel Cancer Center, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania 19107 and Center for Extracellular Matrix Biology, Institute of Biosciences and Technology, Texas A & M University, Houston, Texas 77030.
21. Sandip Patel, Manoranjan Santra, David j McQuillan, Renato V. Iozzo, and Andrew P. Thomas. Biological Chemistry 1998: 6, Decorin Activates the Epidermal Growth Factor Receptor and Elevates Cytosolic Ca in A431 Carcinoma Cells, Department of Pathology, Anatomy and Cell Biology, Jefferson Medical College, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania 19107, the Center for Extracellular Matrix Biology, Institute of Biosciences and Technology, Texas A &M University, Houston, Texas 77030, and the Kimmel Cancer Center, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania 19107.
22. Hans Krese and Elke Schönherr. Cellular Physiology 2001: 189, Proteglycans of the Extracellular Matrix and Growth Control, Institute of Physiological Chemistry and Pathobiochemistry, University of Münster, Münster, Germany.

23. Sheau Hu Hsu, Shan-Guang Liang, and Aaron J.W. Hsueh, Characterization of Two LGR Genes Homologous to Gonadotropin and Thyrotropin Receptors with Extracellular Leucine-Rich Repeats and a G Protein-Coupled, Seven-Transmembrane Region, Department of Gynecology and Obstetrics Stanford University Medical School Stanford, California 94305-5317.

24. Manoranjan Santra, Tomasz Skorski, Bruno Calabretta, Edmund C. Lattime, and Renato V. Iozzo. *Biochemistry* 1995; 92, De novo decorin gene expression suppresses the malignant phenotype in human colon cancer cells, Department of Pathology, Anatomy and Cell Biology.

25. Hauser H, Schonherr E, Muller M, Liszio C, Bin Z, Fischer LW, Kresse H, Receptor-mediated endocytosis of decorin: involvement of leucine-rich repeat structures, Institute of Physiological Chemistry and Pathobiochemistry, University of Muenster, Germany.

26. Chia Soo, F4ei-Ya Ju, Xinli Zhang, Yubert Wang, Steven R. Beanes, H. Peter Lorenz, Marc H. Hedrick, Richard J. Mackool, Ana Plaas, Soo-Jin Kim, Michael T. Longaker, Earl Freymiller and Kang Ting. *Investigative Pathology* 2000: 157, Department of Surgery.

27. Robert C. Vannucci. *Pediatric Research* 1990, Experimental Biology of Cerebral Hypoxia –Ischemia: Relation to Perinatal Brain Damage, Division of Pediatric Neurology, The Milton S. Hershey Medical Center, The Pennsylvania State University, Hershey, Pennsylvania 17033.

28. Chiwaka Kimura, masahiro Oike, Yushi Ito. *Physiol* 2000: 279, Hypoxia-induced alterations in Ca²⁺ mobilization in brain microvascular endothelial cells, Department of Pharmacology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan.

29. Huajun Liu, Edward Moczydlowski, Gabriel G. Haddad. *Clinical Investigation* 1999: 104, O₂ deprivation inhibits Ca²⁺-activated K⁺ channels via cytosolic factors in mice neocortical neurons, Department of Pediatrics, Section of Respiratory Medicine.
30. Christine C. Stichel, Joachim Kappler, Ulrich Junghans, Antje Koops, Hans Kresse, Hans Werner Müller. *Brain Research* 1995: 704, Differential expression of the small chondroitin/ dermatan sulfate proteoglycans decorin and biglycan after injury of the adult rat brain, Molecular Neurobiology Laboratory, Department of Neurology, University of Düsseldorf, Germany.
31. Elisabeth Tarkowski, Razao Issa, Magnus Sjogren, Anders Wallin, Kaj Blennow, Andrej Tarkowski, Pat Kumar. *Neurobiology of Aging* 2002: 23, Increased intrathecal levels of the angiogenic factors VEGF and TGF- β in Alzheimer's disease and vascular dementia, Department of Rheumatology, University of Göteborg, Sweden.
32. Lassi Nelimarkka, Heli Salminen, Teijo Kuopio, Seppo Nikkari, Tauno Ekfors, Jukka Laine, Lauri Pelliniemi, Hannu Järveläinen. *Pathology* 2001: 158, Decorin is produced by Capillary Endothelial Cells in Inflammation-Associated Angiogenesis, Department of Medical Biochemistry.
33. Hugo H Marti, Werner Risau. *Physiology* 1998: 95, Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors, Department of Molecular Cell Biology, Germany.
34. Rosenberg GA, Cunningham LA, Wallace J, Alexander S, Estrada EY, Grossetete M, Razhagi A, Miller K, Gearing A. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases in reperfusion injury to rat brain: activation of MMP-9 linked to stromelysin-1 and microglia in cell cultures, Department of Neurology, University of New Mexico, Albuquerque, USA.

35. Petito CK, Olarte JP, Roberts B, Nowak TS Jr, Pulsinelli WA. *Neuropathol* 1998: 57, Selective glial vulnerability following transient global ischemia in rat brain, Department of Pathology, The University of Miami School of Medicine, USA.

36. Stichel CC, Kappler J, Junghans U, Koops A, Kresse H, Muller HW. *Brain Research* 1995: 704, Differential expression of the small chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans decorin and biglycan after injury of the adult rat brain, Department of Neurology, University of Dusseldorf, Germany.

37. Bernaudin M, MartiHH, Rouyssel S, Divoux D, Noubvelot A, MacKenzie ET, Petit E. *Blood Flow metab* 1999: 19, A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice, Universite de Caen, France.

38. peitot Ck, Pulsinelli WA, Jacobson G, Plum F. *Neuropathol* 1982 : 41, Edema and vascular permeability in cerebral ischemia : comparison between ischemic neuronal damage and infarction.

39. Liu HM, Correlation between proto-oncogene, fibroblast growth factor and adaptive response in brain infarct, national Cheng Kung University, Medical College, Tainan, Taiwan Republic of China.

40. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E., Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis, Department of Molecular Biology, Hebrew University-Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel.

41. Plate KH, Beck H, Danenr S, Allegrini PR, Wiessner C, Cell type specific upregulation of vascular endothelial growth factor in an MCA-occlusion model of cerebral infarct, Neurocenter, Department of Neuropathology, Freiburg University medical School, Germany.

42. Pichiule P, La Manna JC, Angiopoietin-2 and rat brain capillary remodeling during adaptation and deadaptation to prolonged mild hypoxia, Department of Anatomy and Neurology, Case Western Reserve University, School of Medicine, Cleveland, Ohio, USA.
43. Ogunshola OO, Stewart WB, Mihalcik V, Solli T, Madri JA, Ment LR, Neuronal VEGF expression correlates with angiogenesis in postnatal developing rat brain, Department of Pediatrics, University School of Medicine, USA.
44. Elke Schonherr, Bodo Levkau, Liliana Schaefer, Hans Kresse, Kenneth Walsh. Biological Chemistry 2001: 276, Decorin-mediated Signal Transduction in Endothelial Cells, Institute of Physiological Chemistry.
45. Blood 2001: 97, Differential regulation of the fibroblast growth factor (FGF) family by α -2macroglobulin: evidence for selective modulation of FGF-2 induced angiogenesis.
46. Irene T. Weber, Robert W. Harrison, Renato V. Iozzo. Biological Chemistry 1996: 271, Model Structure of Decorin and Implications for Collagen Fibrillogenesis, Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Jefferson Medical College, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania.