



Πανεπιστήμιο
Ιωαννίνων



ΙΑΤΡΙΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
1977-2017

ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟ ΤΗΣ ΣΠΟΝΔΥΛΙΚΗΣ ΣΤΗΛΗΣ:

**ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΟΥΣ ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΠΟΥ ΡΥΘΜΙΖΟΥΝ ΤΗΝ
ΑΞΟΝΙΚΗ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΣΤΟ ΚΝΣ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
«Βασικών Βιοϊατρικών Επιστημών»

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στη
«Μοριακή και Εφαρμοσμένη Φαρμακολογία»

Τμήμα Ιατρικής
Σχολή Επιστημών Υγείας
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ ΕΙΡΗΝΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Επιβλέπων καθηγητής:
Γεώργιος Λεονταρίτης

ΙΩΑΝΝΙΝΑ | 2020

Εικόνα εξωφύλλου:

"Colorpong.com - Neuronas vector bundle" by Karol Gadzala
Colorpong.com is licensed under CC BY-NC-ND 4.0

ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟ ΤΗΣ ΣΠΟΝΔΥΛΙΚΗΣ ΣΤΗΛΗΣ:

ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΟΥΣ ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΠΟΥ ΡΥΘΜΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΞΟΝΙΚΗ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΣΤΟ ΚΝΣ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών στις Βιοϊατρικές Επιστήμες

Ειδίκευση Μοριακής και Εφαρμοσμένης Φαρμακολογίας

Τμήμα Ιατρικής

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Πανεπιστημιούπολη, 451 10, Ιωάννινα

Φοιτήτρια

Ειρήνη Παπανικολάου

Επιβλέπων Καθηγητής

Γεώργιος Λεονταρίτης

Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας

Τμήμα Ιατρικής

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Τριμελής Επιτροπή

Μαρία Κωσταντή, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας

Περικλής Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας

Γεώργιος Λεονταρίτης, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας

Η έγκριση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Παπανικολάου Ειρήνη

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών στις Βιοϊατρικές Επιστήμες
Ειδίκευση Μοριακής και Εφαρμοσμένης Φαρμακολογίας

Τμήμα Ιατρικής

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Πανεπιστημιούπολη, 451 10, Ιωάννινα

Ημερομηνία παρουσίασης

Επιβλέπων Καθηγητής

Γεώργιος Λεονταρίτης
Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας
Τμήμα Ιατρικής
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Τριμελής Επιτροπή

Μαρία Κωσταντή
Καθηγήτρια Φαρμακολογίας

Περικλής Παππάς
Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας

Γεώργιος Λεονταρίτης
Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο: «Στρατηγικές νευροπροστασίας και αποκατάστασης μετά από τραυματισμό της σπονδυλικής στήλης: έμφαση στους ενδογενείς μηχανισμούς που ρυθμίζουν την αξονική αναγέννηση στο ΚΝΣ», εκπονήθηκε στα πλαίσια της ειδίκευσης «Μοριακής και Εφαρμοσμένης Φαρμακολογίας» του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες» του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Πρόκειται για μία βιβλιογραφική μελέτη στην οποία συγκεντρώνονται όλοι οι ενδογενείς μηχανισμοί που εμποδίζουν τη νευρική αύξηση και αναγέννηση στο ΚΝΣ και τα πιο σημαντικά πειράματα των τελευταίων ετών, που έχουν ως αντικείμενο τη φαρμακολογική στόχευση των μηχανισμών αυτών, με απώτερο σκοπό την σχεδίαση στρατηγικών για την αντιμετώπιση των τραυμάτων της σπονδυλικής στήλης.

Η εργασία αυτή αποτελεί την επισφράγιση των μεταπτυχιακών μου σπουδών που είχα την τύχη να πραγματοποιήσω στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, συνεχίζοντας τον προπτυχιακό κύκλο σπουδών που ολοκλήρωσα στο ίδιο πανεπιστήμιο. Στην πορεία αυτή πολύτιμη στάθηκε η συμβολή αρκετών μελών της πανεπιστημιακής κοινότητας.

Πρώτα από όλα, καθοριστική υπήρξε η συμβολή του επιβλέποντα καθηγητή μου, Επίκουρου Καθηγητή Φαρμακολογίας κ. Γεωργίου Λεονταρίτη, ο οποίος ήταν παρών καθ' όλη την διάρκεια της συγγραφής της διπλωματικής μου εργασίας. Ήταν πάντα πρόθυμος να με καθοδηγεί, να με συμβουλεύει και προπαντός να κινητοποιεί την σκέψη μου δίνοντας συνεχώς νέα ερεθίσματα για περαιτέρω έρευνα και επιστημονική ακρίβεια.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άλλα μέλη της τριμελούς επιτροπής και συγκεκριμένα την Καθηγήτρια Φαρμακολογίας κ. Μαρία Κωσταντή και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακολογίας κ. Περικλή Παππά για τις υποδείξεις τους και την γόνιμη συνεργασία μας.

Ακόμη, ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια Φυσιολογίας κ. Πατρώνα Βεζυράκη, για την εμπιστοσύνη και την συμπαράστασή της κάθε φορά που υπήρχε ανάγκη.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια και τους φίλους μου για τη συνεχή και σταθερή υποστήριξή τους καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	7
ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	12
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ	12
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	13
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	17
1.1 Η σπονδυλική στήλη και οι τραυματισμοί της	17
1.1.1 Η μορφολογία της ανθρώπινης σπονδυλικής στήλης	17
1.1.2 Τραύματα στη σπονδυλική στήλη	20
1.1.3 Η κλίμακα AIS.....	22
1.1.4 Επιδημιολογικά στοιχεία	23
1.2 Τι συμβαίνει σε ιστικό επίπεδο κατά τον τραυματισμό	24
1.2.1 Αρχικός τραυματισμός.....	26
1.2.2 Οξεία φάση.....	26
1.2.3 Υποξεία Φάση.....	27
1.2.4 Χρόνια φάση.....	28
1.3 Θεραπευτικές- φαρμακολογικές προσεγγίσεις αμέσως μετά τον τραυματισμό.....	29
1.4 Γιατί δεν υπάρχει ακόμα αποτελεσματική θεραπεία;.....	32
1.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την αναγεννητική ικανότητα των νευρώνων του ΚΝΣ ...	33
1.5.1 Εξωτερικοί παράγοντες που αναστέλλουν την νευρωνική αναγέννηση	33
ΜΑIs	33
Ουλή και CSPGs.....	35
Μόρια που παίζουν ρόλο στην καθοδήγηση των αξόνων.....	35
2 ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ ΑΞΟΝΙΚΗΣ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗΣ ΣΤΟ ΚΝΣ.....	37
2.1 Οι ενδογενείς παράγοντες που επηρεάζουν τη νευρική αναγέννηση μετά από τραύμα στη Σπονδυλική Στήλη	37
2.2 Σηματοδοτικά μονοπάτια- Δεύτερα μηνύματα.....	38
2.2.1 cAMP.....	38
Το κυκλικό AMP	38
Το cAMP στη νευρική αναγέννηση	39
Πειράματα με Ρολιπράμη	40
2.2.2 PTEN/PI3K/ AKT/ mTOR και AKT/ GSK3/ CRMP-2	44

Το μονοπάτι PI3K/ AKT/ mTOR.....	44
Ενεργοποίηση του μονοπατιού μετά από τραύμα στη σπονδυλική στήλη..	45
Πειράματα με απαλοιφή (conditional deletion) του PTEN	45
Φαρμακολογικές προσεγγίσεις.....	46
Πεπτιδικοί αναστολείς της PTEN (PAPs).....	47
Δράσεις ανεξάρτητες του mTOR- Απενεργοποίηση του GSK3.....	47
Το παράδοξο αποτέλεσμα της Ραπαμυκίνης.....	49
2.2.3 JAK/ STAT/ SOCS3	50
Το σηματοδοτικό μονοπάτι JAK/ STAT.....	50
Ενεργοποίηση του μονοπατιού μετά από τραύμα στη σπονδυλική στήλη..	51
Πειράματα με τον αναστολέα της JAK ₂ ή με απαλοιφή του SOCS ₃	52
Αλληλεπιδράσεις με άλλα μονοπάτια.....	53
Μελλοντικά πειράματα	54
2.2.4 RhoA/ROCK.....	54
Το μονοπάτι RhoA/ ROCK.....	54
Ενεργοποίηση της RhoA μετά από τραύμα στη σπονδυλική στήλη	55
Πρώτα πειράματα.....	56
Από το C3 στο VX-210.....	57
Άλλα πειραματικά φάρμακα- μελλοντικές ιδέες.....	59
2.3 Σταθεροποίηση μικροσωληνίσκων.....	60
Ο διττός ρόλος των μικροσωληνίσκων μετά από τραύμα στο ΚΝΣ.....	61
Χορήγηση ταξόλης σε τραύματα της σπονδυλικής στήλης.....	62
Η δυναμική της ακτίνης στη νευρική αναγέννηση	64
2.4 Νέοι ενδογενείς μηχανισμοί	65
2.4.1 Επιγενετική Ρύθμιση.....	65
KLFs	65
APC/ Cdh1.....	66
Κινάσες DLK και LZK	66
Sox11	67
2.4.2 Sac2.....	68
2.4.3 LPAR1- LPPR1 (PRG3).....	69
2.4.4 KCC2.....	70
2.4.5 Μεταφορά μιτοχονδρίων	71

3	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	73
	Δυσκολίες στην θεραπευτική αντιμετώπιση των τραυμάτων της σπονδυλικής στήλης.....	73
	Σηματοδοτικά μονοπάτια που ευοδώνουν τη νευρική αναγέννηση	74
	Ο έλεγχος του κυττοσκελετού της τουμπουλίνης και της ακτίνης στην ενίσχυση των νευρικών αυξητικών κώνων κατά την αναγέννηση.....	75
	Η στόχευση του μονοπατιού της RhoA αποτελεί πολλά υποσχόμενη στρατηγική για την αποκατάσταση των τραυμάτων της ΣΣ.....	75
	Προβλήματα στην μετάφραση των αποτελεσμάτων των προκλινικών μελετών σε κλινικό επίπεδο.....	76
	Άλλες μελλοντικές κατευθύνσεις στην έρευνα της νευρικής αναγέννησης.	77
	Η επιτυχής αναγέννηση του ΚΝΣ απαιτεί συνέργεια θεραπευτικών προσεγγίσεων.....	78

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1. Σχηματική αναπαράσταση των τμημάτων της σπονδυλικής στήλης. Τροποποίηση από (Ahuja, Wilson et al. 2017).	17
Εικόνα 1.2. Σχηματική απεικόνιση της δομής ενός σπονδύλου της σπονδυλικής στήλης. Τροποποίηση από (Ahuja, Wilson et al. 2017).	18
Εικόνα 1.3. Τα ανοδικά και καθοδικά δίκτυα πληροφορίας μεταξύ κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος. Τροποποίηση από www.spinal.research.org	20
Εικόνα 1.4. Τετραπληγία και παραπληγία/ ατελής και πλήρης τραυματισμός της σπονδυλικής στήλης.	22
Εικόνα 1.5. Οι συχνότερες αιτίες πρόκλησης τραυμάτων της σπονδυλικής στήλης	24
Εικόνα 1.6. Σχηματική απεικόνιση των γεγονότων που συμβαίνουν σε μοριακό επίπεδο μετά από τον τραυματισμό της σπονδυλικής στήλης (Thuret, Moon et al. 2006).	25
Εικόνα 1.7. Παρουσίαση των πιο σημαντικών γεγονότων που συμβαίνουν σε κάθε στάδιο μετά τον αρχικό τραυματισμό της ΣΣ.	26
Εικόνα 1.8. Ενδογενείς και εξωγενείς μηχανισμοί επηρεάζουν την αναγέννηση νευραξόνων στο ΚΝΣ.....	33
Εικόνα 2.1. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από επίμυες που έλαβαν Ρολιπράμη στο βέλτιστο τρόπο χορήγησης. (Τροποποίηση από Schaal et al., 2012).	43
Εικόνα 2.2. Αποτελέσματα μελέτης Φάσης I/IIa του φαρμάκου VX-210.	58
Εικόνα 2.3. Σχηματική αναπαράσταση της δημιουργίας ανακλητικών κεφαλών μετά από τραυματισμό στο ΚΝΣ (A-C) (Erturk, Hellal et al. 2007).	61

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1. Η κλίμακα AIS. Οι ομάδες στις οποίες κατατάσσεται ο ασθενής με βάση την βαρύτητα των συμπτωμάτων του.....	23
Πίνακας 1.2. Φάρμακα και τεχνικές που δοκιμάζονται τη δεδομένη χρονική στιγμή σε κλινικές δοκιμές για την πιθανή νευροπροστατευτική ή/και νευροαναγεννητική τους δράση	31
Πίνακας 1.3. Εξωγενή μόρια που επηρεάζουν τη νευρωνική αναγέννηση στο ΚΝΣ	36

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

- AIS: American Spinal Injury Association (ASIA) Impairment Scale
- APC, APC/C: Anaphase- promoting complex, Κυκλώσωμα
- APS: Adenosine 5- phosphosulfate
- ASIA: American Spinal Injury Association
- ATP: Adenosine Triphosphate, Τριφωσφορική Αδενοσίνη
- BBB: Basso, Beattie, and Bresnahan Locomotor Rating Scale
- Bcl2: B- cell lymphoma 2
- BDNF: Brain- derived neurotrophic factor
- BMS: Basso Mouse Scale
- cAMP: cyclic AMP, κυκλικό AMP, 3'-5'-κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
- CCC: Cation Chloride Co- transporter
- Cdc14: Cell- division cycle protein 14
- Cdc20: Cell-division cycle protein 20
- Cdc42: Cell division cycle protein 42
- CNS, ΚΝΣ: Central Nervous System, Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
- CNTF: Ciliary Neurotrophic factor
- CSPGs: Chondroitin sulfate proteoglycan, Πρωτεογλυκάνες θειϊκής χονδροϊτίνης
- DLK: Dual Leucine Zipper Kinase, MAP3K12
- DNA: Deoxyribonucleic acid, Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
- DRG: Dorsal Root Ganglia
- Erk: Extracellular signal- regulated kinase
- FDA: Food and Drug Administration
- GAP: GTPase activated protein, Πρωτεΐνη ενεργοποίησης GTPασών
- GDP: Guanosine diphosphate, Διφωσφορική γουανοσίνη
- GEF: Guanine Exchange Factor, Παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης
- GSK3, GSK-3: Glycogen Synthase Kinase, Κινάση της συνθετάσης του γυκογόνου
- GTP: Guanosine triphosphate, Τριφωσφορική γουανοσίνη
- INPP5F: Inositol polyphosphate-5-phosphatase F, Sac2
- JAK: Janus Kinase, Κινάση Janus
- JNKs: c-Jun N-terminal kinases
- KCC2: Potassium-chloride transporter member 5, SLC12A5
- KLFs: Krüppel- like factors
- LIF: Leukemia inhibitory factor
- LPA: Lysophosphatidic acid, λυσοφωσφατιδικό οξύ
- LPAR1, LPA1: Lysophosphatidic acid receptor 1
- LPPR1: Lipid phosphate phosphatase- related protein type 1

- LZK: Leucine Zipper- bearing Kinase, MAP3K13
- MAG: Myelin- Associated Glycoprotein, Γλυκοπρωτεΐνη σχετιζόμενη με τη Μυελίνη
- MAIs: Myelin Associated- Inhibitors,
- MAPK: Mitogen- activated protein kinase
- MAP2K, MAPKK: Mitogen- activated protein kinase kinase
- MAP3K, MAPKKK: Mitogen- activated protein kinase kinase kinase
- mTOR: mammalian Target Of Rapamycin, Στόχος της ραπαμυκίνης στα θηλαστικά
- NGF: nerve growth factor
- Nogo: Neurite outgrowth inhibitor, Reticulon 4
- NSCs: Neural Stem cells, Νευρικά βλαστικά κύτταρα
- OMgp: Oligodendrocyte-myelin glycoprotein, Γλυκοπρωτεΐνη ολιγοδενδροκυττάρων μυελίνης
- OPCs: Oligodendrocyte progenitor cells
- PI3K: Phosphoinositide 3- Kinase,
- PIP2, PI(4,5)P₂: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PtdIns(4,5)P₂,
- PIP3: Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate, PtdIns(3,4,5)P₃
- PKB: Protein Kinase B, Πρωτεϊνική Κινάση Β ή Akt
- PKI: Protein Kinase Inhibitor
- PNS, ΠΝΣ: Peripheral Nervous System, Περιφερικό Νευρικό Σύστημα
- PTEN: Phosphatase and Tensin Omolog, Φωσφατάση Ομόλογης της Τενσίνης
- Rac1: Ras- related C3 botulinum toxin substrate 1
- RGC: Retinal ganglion cell
- RhoA: Ras homologue family member A
- SOCS3, SOCS-3: Suppressor of cytokine signaling 3
- SOX2: SRY (sex determining region Y)-box 2
- SOX9: SRY (sex determining region Y)-box 9
- SOX11: SRY (sex determining region Y)-box 11
- STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3

*"In adult centers the nerve paths are something fixed, ended, immutable.
Everything may die, nothing may be regenerated.
It is for the science of the future to change, if possible, this decree.."¹*

Santiago Ramon y Cajal (1852- 1934)

¹ Μτφ: Στα ενήλικα κέντρα τα νευρικά μονοπάτια είναι σταθερά, τελειωμένα, αμετάβλητα. Όλα θα πεθάνουν, τίποτα δεν θα αναγεννηθεί. Είναι χρέος της επιστήμης του μέλλοντος να το αλλάξει αυτό, εάν είναι εφικτό.

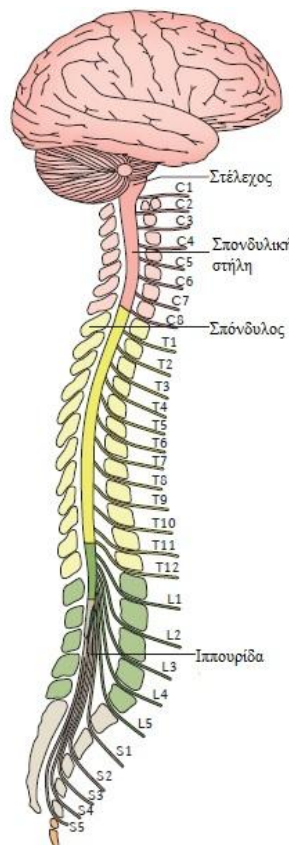
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η σπονδυλική στήλη και οι τραυματισμοί της

1.1.1 Η μορφολογία της ανθρώπινης σπονδυλικής στήλης

Η σπονδυλική στήλη (*Columna vertebralis*), είναι η πιο πολύπλοκη και πιο σημαντική υποστηρικτική δομή του ανθρώπινου σώματος. Το μήκος της είναι περίπου 43- 45 εκατοστά και το πάχος της 1- 1,5 εκατοστά. Πρόκειται για ένα σύνολο 33 σπονδύλων και των αντίστοιχων μεσοσπονδύλιων δίσκων τους, που έχουν παρόμοια δομή και περιβάλλουν το νωτιαίο μυελό, ο οποίος μαζί με τον εγκέφαλο αποτελεί το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Ανάλογα με τη θέση τους στη σπονδυλική στήλη, οι σπόνδυλοι έχουν διαφορετικό μέγεθος και οργανώνονται στις εξής πέντε, μοίρες (από άνω προς τα κάτω) (Εικόνα 1.1):

- αυχενική μοίρα (*cervical vertebrae*) : 7 σπόνδυλοι (C₁-C₇)
- θωρακική μοίρα (*thoracic vertebrae*): 12 σπόνδυλοι (T₁- T₁₂)
- οσφυϊκή μοίρα (*lumbar vertebrae*): 5 σπόνδυλοι (L₁-L₅)
- ιερό οστό (*sacrum*): 5 συνοστεωμένοι σπόνδυλοι (S₁-S₅)
- κόκκυγας (*coccyx*): 1 σπόνδυλος (Co₁)

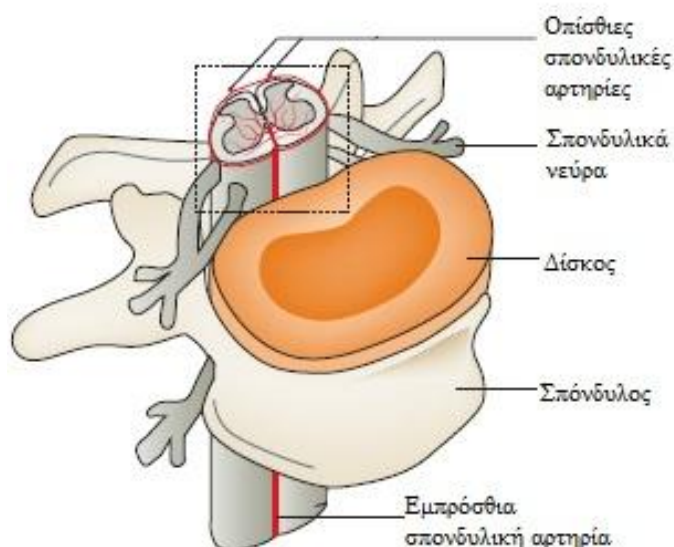


Εικόνα 1.1. Σχηματική αναπαράσταση των τμημάτων της σπονδυλικής στήλης. Τροποποίηση από (Ahuja, Wilson et al. 2017).

Στην πραγματικότητα η αυχενική μοίρα διακρίνεται σε οχτώ τμήματα (C₁-C₈), αλλά το όγδοο τμήμα δεν διαθέτει σπόνδυλο παρά μόνο σπονδυλικά νεύρα. Επίσης, ο κόκκυγας αποτελείται από τέσσερις σπονδύλους (C₀₁-C₀₄) οι οποίοι είναι συνοστεωμένοι και για λόγους ευκολίας θεωρείται ότι αποτελούν μία ενιαία δομή (Tracey 2015).

Κάθε σπόνδυλος περιλαμβάνει ένα συμπαγές κυλινδρικό σπονδυλικό σώμα στην κοιλιακή πλευρά και ένα οπίσθιο πεταλοειδές σπονδυλικό τόξο. Με τα σπονδυλικά σώματα, επιτυγχάνεται ο στηρικτικός ρόλος της σπονδυλικής στήλης. Στο μέσο του σπονδυλικού τόξου, σχηματίζεται μία κοιλότητα, το σπονδυλικό τρήμα (Εικόνα 1.2). Οι επιμέρους σπόνδυλοι διαρθρώνονται με τέτοιο τρόπο ο ένας πάνω στον άλλο ώστε τα επιμέρους σπονδυλικά τρήματά τους να διαμορφώνουν μία ενιαία οπή μέσω της οποίας διέρχεται και συγκρατείται ο σπονδυλικός σωλήνας. Στο εσωτερικό του σπονδυλικού σωλήνα βρίσκεται προστατευμένος ο νωτιαίος μυελός μαζί με τις μήνιγγες και τα αγγεία. Κάθε σπόνδυλος συνδέεται με τον γειτονικό του με μεσοσπονδύλιες διαρθρώσεις προσδίδοντας στη σπονδυλική στήλη την εύκαμπτη και ευλύγιστη δομή της που είναι απαραίτητη για την ορθή στάση και την κίνηση του σώματος.

Η αιμάτωση της σπονδυλικής στήλης και του νωτιαίου μυελού, πραγματοποιείται μέσω ενός συστήματος αρτηριών. Πιο συγκεκριμένα, μία μονή εμπρόσθια αρτηρία παρέχει τα 2/3 του απαιτούμενου αίματος και ένα ζεύγος οπίσθιων αρτηριών, το υπολειπόμενο 1/3. Και οι τρεις αρτηρίες προέρχονται από καθοδικές διακλαδώσεις των σπονδυλικών αρτηριών του αυχένα (Tracey 2015).



Εικόνα 1.2. Σχηματική απεικόνιση της δομής ενός σπονδύλου της σπονδυλικής στήλης. Στην εικόνα διακρίνονται τα σπονδυλικά νεύρα και οι σπονδυλικές αρτηρίες. Τροποποίηση από (Ahuja, Wilson et al. 2017).

Εκτός από το στηρικτικό και τον προστατευτικό της ρόλο η σπονδυλική στήλη λειτουργεί και ως αγωγός της πληροφορίας μεταξύ του εγκεφάλου και της περιφέρειας. Για τον σκοπό αυτό, κάθε επιμέρους σπόνδυλος διαθέτει ένα ζευγάρι ριζών, την κοιλιακή (κινητική) και την ραχιαία (αισθητική) ρίζα, οι οποίες καταλήγουν σε ένα ζεύγος σπονδυλικών νεύρων. Εξαίρεση αποτελεί ο πρώτος αυχενικός σπόνδυλος (C₁ ή άτλας), ο οποίος έχει μόνο κοιλιακή ρίζα, καθώς είναι υπεύθυνος μόνο για την κίνηση της κεφαλής.

Η κοιλιακή και η ραχιαία ρίζα κάθε σπονδύλου ενώνονται στη μεσοσπονδύλια οπή προκειμένου να σχηματίσουν ένα ζεύγος σπονδυλικών νεύρων. Μέσω της μεσοσπονδύλιας οπής, τα σπονδυλικά νεύρα εξέρχονται από την σπονδυλική στήλη και καταλήγουν στην περιφέρεια. Κοντά στην οπή, και έξω από το νωτιαίο μυελό, η ραχιαία ρίζα παρουσιάζει έναν ωοειδή σχηματισμό, τα γάγγλια της ραχιαίας ρίζας. Εκεί βρίσκονται τα σώματα των ψευδομονόπολων αισθητικών νευρώνων, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τη μετάδοση της αισθητικής πληροφορίας. Στα γάγγλια της ραχιαίας ρίζας δεν υπάρχουν συνάψεις. Από τα σώματα των αισθητικών κυττάρων εξέρχονται μακριές προσαγωγές νευρικές ίνες (νευράξονες) διαφόρων ειδών. Σε αυτές περιλαμβάνονται οι μεγάλες εμμύελες ίνες Ια και Ιβ, οι οποίες μεταφέρουν πληροφορίες από τις μυϊκές ατράκτους και τα τενόντια όργανα του Golgi. Υπάρχουν επίσης οι μεσαίου μεγέθους ίνες Αβ οι οποίες μεταφέρουν ερεθίσματα από μηχανοϋποδοχείς στο δέρμα και τις αρθρώσεις. Τέλος, οι μικρές ίνες Αδ που έχουν λίγη μυελίνη, και οι αμύελες ίνες C, είναι υπεύθυνες για τη μεταφορά επιβλαβών και θερμικών ερεθισμάτων (Bican, Minagar et al. 2013).

Η κοιλιακή ρίζα αποτελείται από νευρικούς κινητικούς άξονες μέσω των οποίων μεταφέρεται η κινητική πληροφορία από τη σπονδυλική στήλη προς την περιφέρεια. Τα σώματα των κινητικών κυττάρων βρίσκονται εντός του νωτιαίου μυελού στα πρόσθια κέρατα της φαιάς ουσίας και από εκεί εξέρχονται διαφόρων ειδών κινητικοί νευράξονες. Πρόκειται για τους κινητικούς νευρικούς άξονες α, οι οποίοι έχουν μεγάλη διάμετρο και καταλήγουν στις εξωτερικές ίνες των μυϊκών ατράκτων και τους κινητικούς νευρικούς άξονες γ οι οποίοι υποστηρίζουν τις εσωτερικές μυϊκές ίνες.

Η μετάδοση της αισθητικής πληροφορίας από την περιφέρεια προς τα ανώτερα εγκεφαλικά κέντρα και της κινητικής πληροφορίας από τον εγκέφαλο προς τους μυς και τα όργανα, πραγματοποιείται μέσα από ένα σύνολο ανοδικών και καθοδικών δικτύων. Τα ανοδικά και καθοδικά δίκτυα πληροφορίας βρίσκονται στη λευκή ουσία της σπονδυλικής στήλης και αποτελούνται από νευρικά κύτταρα διαφόρων ειδών.

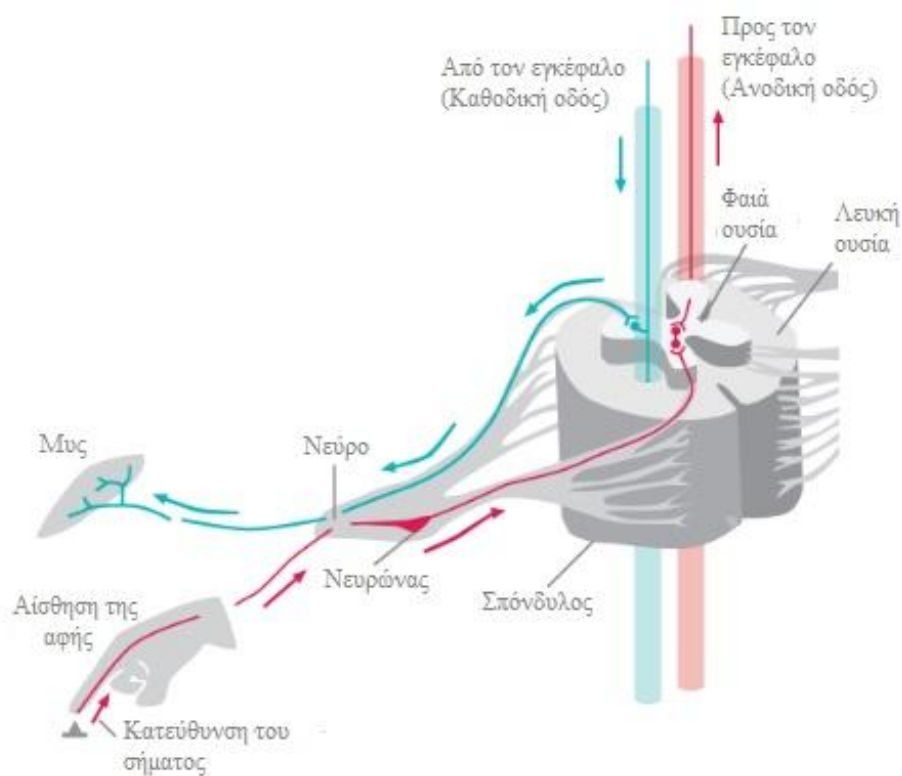
Ανοδική οδός

Τα ανοδικά δίκτυα ξεκινούν είτε από αισθητικούς νευρώνες που βρίσκονται στα γάγγλια της ραχιαίας ρίζας είτε από ενδογενείς νευρώνες της φαιάς ουσίας και

καταλήγουν μέσω της σπονδυλικής στήλης στο στέλεχος, την παρεγκεφαλίδα, το μεσεγκέφαλο, το διεγκέφαλο ή τον τελεγκέφαλο. Κάποιοι άξονες καταλήγουν κατευθείαν σε υπερσπονδυλικά κέντρα χωρίς να κάνουν συνάψεις, ενώ άλλοι συνάπτονται με ενδονευρώνες οι οποίοι τελικά καταλήγουν στα ανώτερα κέντρα. Τα μονοπάτια του ανοδικού δικτύου βρίσκονται στο κοιλιακό και το ραχιαίο σύστημα και στις δύο πλευρές του σώματος. Μέσω των ανοδικών δικτύων μεταφέρονται πληροφορίες πόνου, αίσθησης, θερμοκρασίας, πίεσης, αίσθησης θέσης και αφής.

Καθοδική Οδός

Τα καθοδικά δίκτυα της πληροφορίας ξεκινούν από διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου και καταλήγουν στην περιφέρεια μέσω της σπονδυλικής στήλης. Τα καθοδικά δίκτυα μεταφέρουν πληροφορίες για τον έλεγχο της κίνησης, ρυθμίζουν αντανακλαστικούς μηχανισμούς και ελέγχουν τη διαβίβαση των αισθητικών πληροφοριών.



Εικόνα 1.3. Τα ανοδικά και καθοδικά δίκτυα πληροφορίας μεταξύ κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος. Τροποποίηση από www.spinal.research.org

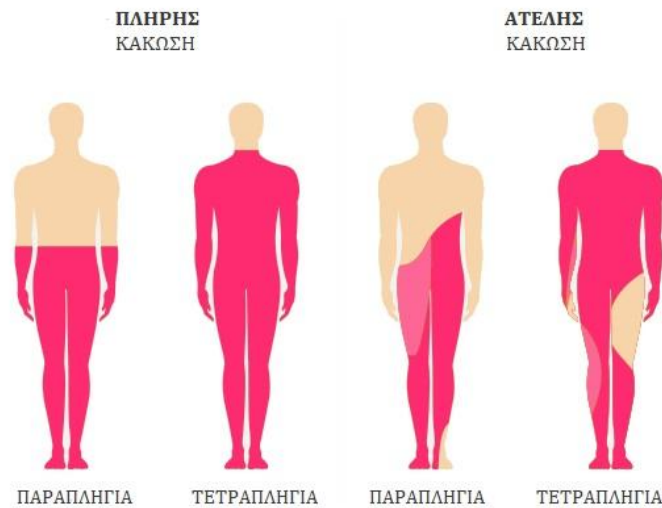
1.1.2 Τραύματα στη σπονδυλική στήλη

Τραυματισμοί μπορούν να συμβούν σε οποιοδήποτε τμήμα της σπονδυλικής στήλης. Εάν λόγω του τραυματισμού προκληθεί μερική ή ολική λύση της συνέχειας του οστού, τότε πρόκειται για κάταγμα. Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες

καταγμάτων και ανάλογα με το σημείο, τη φορά και τη βαρύτητα του τραυματισμού προκαλούνται διαφορετικού βαθμού κινητικές ή/ και αισθητικές δυσλειτουργίες και παράλυση. Επίσης, είναι σύνηθες τέτοιου είδους τραυματισμοί να διαταράσσουν τη λειτουργία του συμπαθητικού νευρικού συστήματος, οδηγώντας σε ανισορροπία της συμπαθητικής/ παρασυμπαθητικής διέγερσης στο αυτόνομο νευρικό σύστημα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα πλήθος διαταραχών, όπως απώλεια του βασικού αγγειακού και μυϊκού τόνου, διαταραχές στη λειτουργία της κύστης και του εντέρου καθώς και αυτόνομη δυσρεφλεξία (Ahuja, Wilson et al. 2017). Ακόμη, είναι πιθανό να εμφανιστούν σοβαρά αναπνευστικά προβλήματα, όπως υποξαιμία και υπερκαπνία και εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος, καθιστώντας το άτομο ευαίσθητο σε λοιμώξεις. Τέλος, την πλειοψηφία αυτών των τραυματισμών συνοδεύει το νευρογενές σοκ, μία τρομερά δυσάρεστη κατάσταση που χαρακτηρίζεται από σοβαρή υπόταση και βραδυκαρδία (Ruiz, Squair et al. 2018). Σε κάθε περίπτωση τέτοιου είδους τραυματισμοί ακολουθούνται από καταστάσεις χρόνιου πόνου και επηρεάζουν την καθημερινότητα, την ψυχολογία και το προσδόκιμο ζωής του πάσχοντος.

Όσο πιο ψηλά στη σπονδυλική στήλη συμβεί ο τραυματισμός τόσο πιο σοβαρή είναι η κατάσταση, καθώς διακόπτεται η επικοινωνία μεταξύ κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος από το σημείο του τραυματισμού και κάτω. Έτσι, τέτοιου είδους τραυματισμοί μπορεί να οδηγήσουν σε τετραπληγία ή παραπληγία. Η τετραπληγία είναι η σοβαρότερη μορφή, η οποία προκαλείται από τραύματα στα τμήματα της αυχενικής μοίρας (C₁-C₈) και επηρεάζει τόσο το άνω όσο και το κάτω μέρος του σώματος. Παραπληγία προκαλείται από τραυματισμούς στους θωρακικούς ή/ και τους οσφυϊκούς σπονδύλους (T₁- L₅). Στην περίπτωση αυτή, το άνω μέρος του σώματος και τα δύο άκρα κινούνται φυσιολογικά αλλά παραλύει το κάτω μέρος.

Επιπλέον ο τραυματισμός μπορεί να είναι ατελής ή πλήρης. Ατελής θεωρείται ένας τραυματισμός όταν διατηρείται μερική αισθητική ή/και κινητική λειτουργικότητα κάτω από το σημείο του τραυματισμού, συμπεριλαμβανομένου και του κατώτατου ιερού σπονδύλου (S₅). Πλήρης καλείται ένας τραυματισμός όταν δεν υπάρχει καθόλου αισθητική ή κινητική λειτουργικότητα στο κατώτατο τμήμα του ιερού οστού (Ditunno, Young et al. 1994)(*Εικόνα 1.4*).



Εικόνα 1.4. Τετραπληγία και παραπληγία/ ατελής και πλήρης τραυματισμός της σπονδυλικής στήλης.

Οι πιο κοινές περιοχές που πλήττονται και εμφανίζουν συγκεκριμένες κινητικές ανωμαλίες είναι: υψηλά αυχενική μοίρα (σπόνδυλοι C₁-C₄), χαμηλά αυχενική μοίρα (σπόνδυλοι C₅-T₁), θωρακική (σπόνδυλοι T₁-T₁₂) και οσφυϊκή/ ιερή μοίρα (σπόνδυλοι L₁-S₃) (Figueiredo 2017).

1.1.3 Η κλίμακα AIS

Ακριβώς επειδή οι κινητικές και αισθητικές δυσλειτουργίες ποικίλουν σημαντικά ανάλογα με το σημείο του τραυματισμού, είναι σημαντικό για την κλινική πρακτική να υπάρχει ένας τρόπος διάκρισης των ασθενών σε ομάδες, με βάση τα συμπτώματά τους. Ο καθιερωμένος πλέον τρόπος ομαδοποίησης των ασθενών είναι η κλίμακα AIS της ASIA [American Spinal Injury Association (ASIA) Impairment Scale]. Η κλίμακα δημιουργήθηκε το 1973 και έκτοτε ανανεώθηκε πολλές φορές. Σκοπός της είναι να καταγράψει λεπτομερώς τη βαρύτητα και τα συμπτώματα των τραυματισμών, να καθοδηγήσει περαιτέρω εκτιμήσεις και θεραπευτικές προσεγγίσεις και να καθορίσει κατά πόσο οι τραυματισμοί είναι πλήρεις ή ατελείς (van Middendorp, Goss et al. 2011), (Roberts, Leonard et al. 2017). Για το σκοπό αυτό, ο ασθενής υπόκειται σε τρεις εξετάσεις:

- κινητική, με εξέταση των μυοτομικών χαρακτηριστικών,
- αισθητική, με χρήση δερματοαισθητήρων και
- ορθική εξέταση,

οι οποίες ανιχνεύουν τη βαρύτητα του τραυματισμού. Με βάση τα αποτελέσματα αυτών των εξετάσεων ο ασθενής κατατάσσεται σε μία από τις πέντε κατηγορίες: Βαθμός A, B, C, D και E (από τον πιο σοβαρό τραυματισμό στον πιο ελαφρύ). Ο βαθμός A αναφέρεται σε πλήρη τραυματισμό, ενώ οι βαθμοί B, C, D και E σε ατελή (Roberts, Leonard et al. 2017) (Πίνακας:1.1)

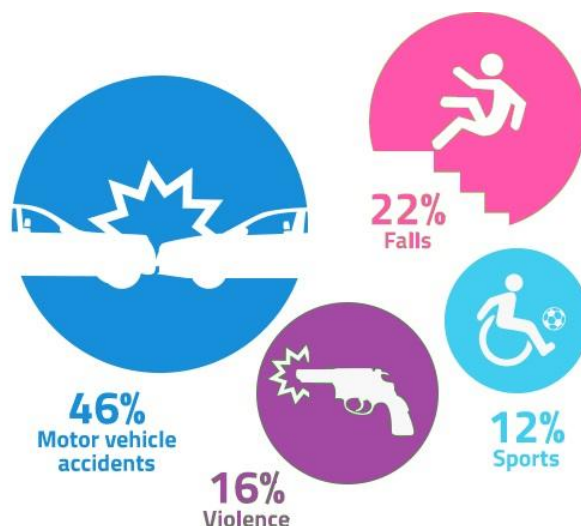
Πίνακας 1.1. Η κλίμακα AIS. Οι ομάδες στις οποίες κατατάσσεται ο ασθενής με βάση την βαρύτητα των συμπτωμάτων του.

Βαθμός A	Πλήρης τραυματισμός. Πλήρης αισθητικοκινητική παράλυση.
Βαθμός B	Ατελής αισθητική λειτουργία. Ανιχνεύεται κάποια αισθητική αλλά καθόλου κινητική λειτουργία κάτω από το σημείο του τραυματισμού, συμπεριλαμβανομένου των κατώτατων σπονδύλων του ιερού οστού.
Βαθμός C	Ατελής κινητική λειτουργία. Οι περισσότεροι σπόνδυλοι της ιεράς μοίρας διατηρούν μία ατελή μη ικανοποιητική εκούσια κινητική λειτουργικότητα ή ο πάσχων έχει ατελή αισθητική λειτουργία (Βαθμός B) και πραγματοποιεί κάποιες σποραδικές κινήσεις (υποτυπώδης μυϊκή ισχύς)
Βαθμός D	Ατελής κινητική λειτουργία. Παρατηρείται μία ατελής εκούσια κινητικότητα κάτω από το επίπεδο της βλάβης (μέτρια έως ικανοποιητική μυϊκή ισχύς)
Βαθμός E	Φυσιολογική αίσθηση και κίνηση. Οι αισθητικές και κινητικές λειτουργίες του ασθενή είναι φυσιολογικές σε όλους τους σπονδύλους

1.1.4 Επιδημιολογικά στοιχεία

Σύμφωνα με στατιστικές έρευνες που έγιναν σχετικά με τα περιστατικά τραυματισμού της σπονδυλικής στήλης παγκοσμίως από το 1959 έως και το 2011, υπολογίζεται ότι συμβαίνουν περίπου 133- 226 χιλιάδες περιστατικά κάθε χρόνο από ατυχήματα ή βίαιες καταστάσεις. Ο επιπολασμός των εν λόγω τραυματισμών είναι μεταξύ 236 και 4187 συμβάντων ανά χίλια άτομα. Στις ανεπτυγμένες χώρες οι τραυματισμοί πλήττουν κυρίως άντρες ηλικίας 18-32 ετών ή άντρες και γυναίκες άνω των 65 ετών (Fitzharris, Cripps et al. 2014).

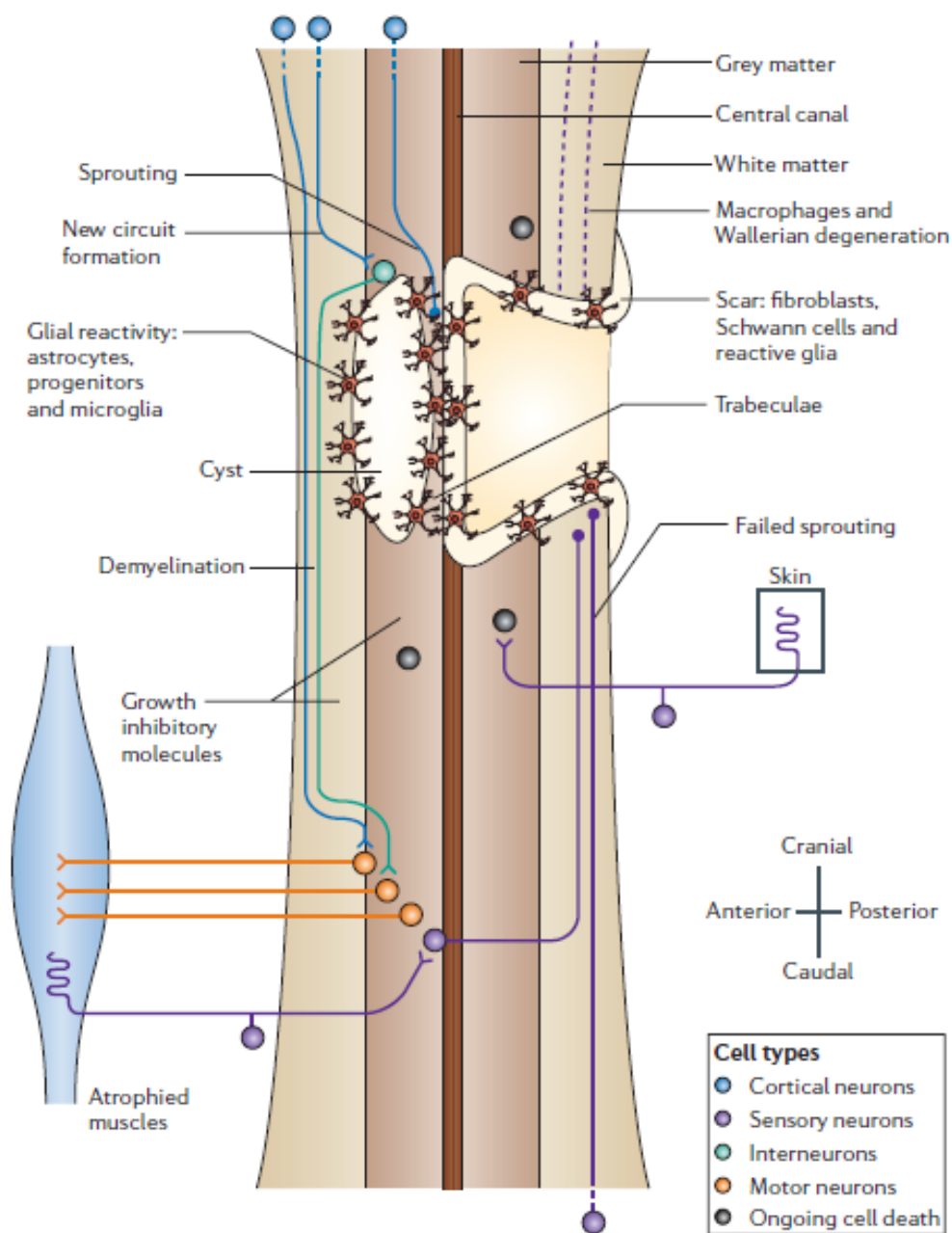
Όσον αφορά την αιτιολογία των τραυματισμών, φαίνεται ότι οι συχνότερες αιτίες είναι ατυχήματα με μοτοσυκλέτα και πτώσεις (Εικόνα: 1.5).



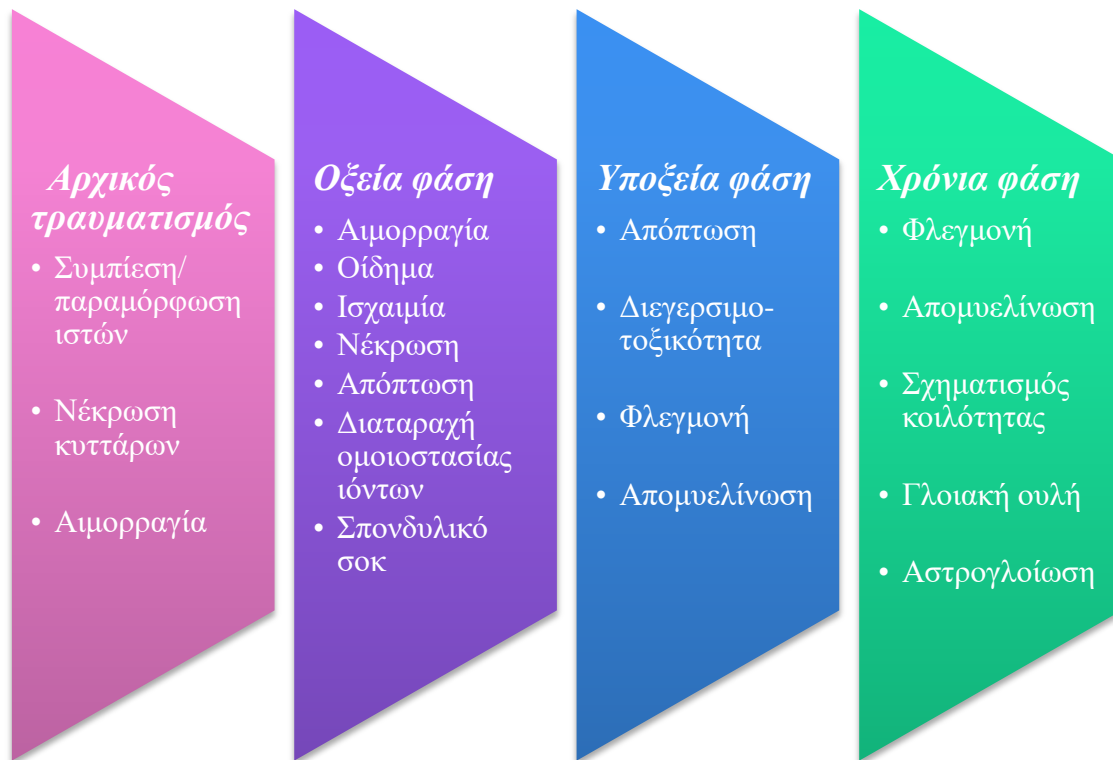
Εικόνα 1.5. Οι συχνότερες αιτίες πρόκλησης τραυμάτων της σπονδυλικής στήλης

1.2 Τι συμβαίνει σε ιστικό επίπεδο κατά τον τραυματισμό

Οι τραυματισμοί της σπονδυλικής στήλης προκαλούν αλλαγή όχι μόνο στη δομή αλλά και στη φυσιολογία της (Thuret, Moon et al. 2006) (Εικόνα 1.6.). Ο αρχικός μηχανικός τραυματισμός (primary injury) πυροδοτεί μία σειρά δευτερευόντων συμβάντων (δευτερογενής τραυματισμός- secondary injury) βιοχημικών, κυτταρικών και κυκλοφορικών, τα οποία δυσχεραίνουν επιπλέον την κατάσταση, καθώς συμβάλουν στην καταστροφή των ιστών και το θάνατο των κυττάρων. Μάλιστα, ο δευτερογενής τραυματισμός καταλήγει να είναι πιο σοβαρός από το μηχανικό και επηρεάζει περισσότερο το προσδόκιμο και την ποιότητα ζωής του τραυματία (Oyinbo 2011). Ο δευτερογενής τραυματισμός διακρίνεται σε 3 στάδια: την οξεία, την υποξεία και τη χρόνια φάση (Εικόνα 1.7). Κάποια από τα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα στην οξεία φάση συνεχίζονται και στην υποξεία και κάποια της υποξείας διαρκούν μέχρι και τη χρόνια φάση. Σε κάθε φάση συμμετέχουν διαφορετικά είδη κυττάρων και μορίων από το νευρικό, το ανοσοποιητικό και το κυκλοφορικό σύστημα.



Εικόνα 1.6. Σχηματική απεικόνιση των γεγονότων που συμβαίνουν σε μοριακό επίπεδο μετά από τον τραυματισμό της σπονδυλικής στήλης (Thuret, Moon et al. 2006).



Εικόνα 1.7. Παρουσίαση των πιο σημαντικών γεγονότων που συμβαίνουν σε κάθε στάδιο μετά από τον αρχικό τραυματισμό της ΣΣ.

1.2.1 Αρχικός τραυματισμός

Ο αρχικός τραυματισμός διαταράσσει την αρχιτεκτονική των ιστών, προκαλεί άμεσα αιμορραγία και οδηγεί σε ακαριαίο ή σταδιακό θάνατο διαφόρων ειδών κυττάρων, νευρικών και μη, όπως ολιγοδενδροκυττάρων (Beattie, Hermann et al. 2002) αστροκυττάρων και προδρομικών κυττάρων (Horky, Galimi et al. 2006). Αυτός ο μαζικός θάνατος οδηγεί σε διάρρηξη των ανοδικών και καθοδικών δικτύων νευραξόνων και διακοπή της επικοινωνίας μεταξύ του κεντρικού και του περιφερικού νευρικού συστήματος. Ωστόσο κάποιοι νευρώνες καταφέρνουν να επιβιώσουν μέχρι και μήνες ή χρόνια μετά το ατύχημα, ειδικά αν οι άξονές τους έχουν τραυματιστεί σε σημείο μακριά από το νευρικό σώμα. Συνήθως όμως ακόμα και τα κύτταρα που επιβιώνουν από το αρχικό τραύμα θα πεθάνουν τελικά μετά από μερικούς μήνες ή χρόνια (Oyinbo 2011).

1.2.2 Οξεία φάση

Η οξεία φάση ξεκινάει μερικά δευτερόλεπτα ή λεπτά μετά τον τραυματισμό. Χαρακτηρίζεται από ένα πλήθος παθοφυσιολογικών αλλαγών που συμβαίνουν παράλληλα. Αρχικά, τα τραυματισμένα νευρικά κύτταρα απαντούν με ένα καταγισμό δυναμικών ενεργείας το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τη διατάραξη της ομοιόστασης των ιόντων εντός και εκτός της κυτταρικής μεμβράνης και τη συσσώρευση νευροδιαβιβαστών. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται αύξηση των

ενδοκυττάρων ιόντων Na^+ και Ca^{++} καθώς επίσης και των εξωκυττάρων ιόντων K^+ σε σχεδόν τοξικά επίπεδα. Αυτό οδηγεί σε σπονδυλικό σοκ, δηλαδή αποτυχία της νευρωνικής λειτουργίας και γενικότερα κατάρρευση του σπονδυλικού νευρικού δικτύου, το οποίο διαρκεί έως 24 ώρες (Κο 2018).

Επίσης, πέρα από τη νέκρωση των κυττάρων που προκαλείται από τον αρχικό μηχανικό τραυματισμό, τα γεγονότα της οξείας φάσης και ειδικότερα η αύξηση Ca^{++} στο εσωτερικό των κυττάρων, οδηγούν σε απόπτωση νευρώνες, ολιγοδενδροκύτταρα και κύτταρα γλοίας.

Παράλληλα, παρατηρείται έντονη αιμορραγία με τοπικό οίδημα, αγγειακό σπασμό, θρόμβωση και τελικά ισχαιμία τα οποία δυσχεραίνουν επιπλέον την νευρική λειτουργία.

1.2.3 Υποξεία Φάση

Η επόμενη φάση ξεκινάει από μερικά λεπτά έως εβδομάδες μετά τον τραυματισμό. Σε αυτή την περίοδο κάποια γεγονότα της οξείας φάσης όπως η ισχαιμία, η διαταραχή της ομοιόστασης των ιόντων και το οίδημα συνεχίζονται, ενώ παρατηρούνται και νέα. Ένα από αυτά αφορά την αύξηση των εξωκυττάρων συγκεντρώσεων γλουταμικού σε κυτταροτοξικά επίπεδα, ως αποτέλεσμα της έντονης κυτταρικής λύσης (Liu, Xu et al. 1999). Οι τοξικές συγκεντρώσεις γλουταμικού, οδηγούν σε δημιουργία ελεύθερων ριζών οξυγόνου και αζώτου και τελικά σε δεύτερο ισχαιμικό επεισόδιο.

Ακόμη, λόγω του οιδήματος δημιουργείται φλεγμονή και κύτταρα από το ανοσοποιητικό σύστημα μεταναστεύουν στο σημείο του τραύματος. Η φλεγμονή διαρκεί αρκετές εβδομάδες ή μήνες μετά τον τραυματισμό. Από τη μία πλευρά, η φλεγμονή είναι απαραίτητη για την κάθαρση των κυτταρικών θραυσμάτων τα οποία εμποδίζουν την νευρωνική αναγέννηση των τραυματισμένων νευραξόνων. Ωστόσο, αν διαρκέσει αρκετά, πιθανόν να βλάψει τους υγιείς ιστούς και να επιδεινώσει το τραύμα (Fehlings and Nguyen 2010), (Oyinbo 2011). Η φλεγμονή προσελκύει κύτταρα από το ανοσοποιητικό σύστημα, όπως: ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, μικρογλοία και T-λεμφοκύτταρα (Bareyre and Schwab 2003), (David and Kroner 2011). Πρώτα καταφθάνουν στο σημείο του τραύματος τα ουδετερόφιλα και απελευθερώνουν κιτοκίνες, πρωτεάσες και ελεύθερες ρίζες οι οποίες με την σειρά τους ενεργοποιούν άλλα κύτταρα της φλεγμονής και της γλοίας. Ο συνδυασμός όλων αυτών των γεγονότων οδηγεί σε επιπλέον τραυματισμό ή/και θάνατο νευρώνων και προκαλεί μεγάλη αύξηση στο μέγεθος του τραύματος.

Ένα άλλο κρίσιμο συμβάν που λαμβάνει χώρα σε αυτό το στάδιο αφορά την απομυελίνωση των αξόνων που επιβιώνουν από το αρχικό τραύμα. Η απομυελίνωση ξεκινά περίπου δύο μέρες μετά τον αρχικό τραυματισμό, λόγω της καταστροφής των ολιγοδενδροκυττάρων και περιλαμβάνει διόγκωση, σχηματισμό

κυψελών και τελικά αποσύνθεση του στρώματος μυελίνης από τους άξονες (Totou and Keirstead 2005), (Alizadeh, Dyck et al. 2015). Οι απομυελινωμένοι άξονες είναι πλέον απροστάτευτοι απέναντι στις χημειοκίνες, τις κυτοκίνες και τις ελεύθερες ρίζες και σύντομα οι νευρώνες αυτοί θα νεκρωθούν.

1.2.4 Χρόνια φάση

Η τελευταία φάση ξεκινάει μερικούς μήνες ή χρόνια μετά τον τραυματισμό και ακολουθεί τον ασθενή μέχρι το τέλος της ζωής του. Η απόπτωση των κυττάρων συνεχίζεται και εξαπλώνεται μέχρι τα κύτταρα του εγκεφάλου.

Επίσης, στο σημείο του τραύματος και λόγω της έντονης φλεγμονής, ξεκινάει η δημιουργία της γλοιακής ουλής. Πρόκειται για μία ενεργή κυτταρική διαδικασία στην οποία συμμετέχουν κατά κύριο λόγο τα αντιδραστικά αστροκύτταρα. Μετά από τον τραυματισμό, τα αστροκύτταρα μέσω παθοφυσιολογικών αλλαγών και πιθανόν εξαιτίας της μικρογλοίας (Shinozaki, Shibata et al. 2017) αποκτούν διαφορετικό φαινότυπο και ονομάζονται αντιδραστικά αστροκύτταρα (RAS-Reactive astrocytes) μέσω μίας διαδικασίας που καλείται αστρογλοίωση. Κάποια από τα αντιδραστικά αστροκύτταρα μετατρέπονται τελικώς σε αστροκύτταρα της γλοιακής ουλής (SAs-Scar-forming astrocytes) και παίζουν κρίσιμο ρόλο στον σχηματισμό της ουλής (Okada, Hara et al. 2018). Η γλοιακή ουλή εμποδίζει την εξάπλωση του τραύματος, προστατεύει τα γειτονικά του τραυματισμού κύτταρα, περιορίζει την φλεγμονή και εκκινεί διαδικασίες επούλωσης (Sofroniew 2015). Εδώ και πολλά χρόνια είχε καθιερωθεί η άποψη ότι παρά τα πλεονεκτήματά της, η ουλή αποτελεί έναν μηχανικό και βιοχημικό φραγμό στην αναγέννηση των τραυματισμένων νευραξόνων (Silver and Miller 2004). Πρόσφατες έρευνες τείνουν να καταρρίψουν αυτή τη θεωρία, υποστηρίζοντας ότι τα στοιχεία της γλοιακής ουλής συμβάλλουν στη νευρική αύξηση (Anderson, Burda et al. 2016). Είναι αναγκαίο να διεξαχθεί περαιτέρω έρευνα προς αυτή την κατεύθυνση, ώστε να αποσαφηνιστεί ο ρόλος της αστρογλοίωσης και της γλοιακής ουλής στις διαδικασίες αύξησης και αναγέννησης των νευρώνων.

Ακόμη, στη χρόνια φάση η απομυελίνωση των αξόνων φτάνει σε κρίσιμα επίπεδα. Μερικοί τραυματισμένοι άξονες μπορεί να εκβλαστήσουν νέους ή να αναγεννηθούν· το μήκος τους όμως δεν καταφέρνει να ξεπεράσει το 1 χιλιοστό.

Όπως προαναφέρθηκε, η χρόνια φάση συνοδεύει τον πάσχοντα καθ' όλη την διάρκεια της ζωής του. Σε αντίθεση λοιπόν με τις άλλες φάσεις που διαρκώς εξελίσσονται, η χρόνια φάση αποτελεί μία πιο σταθερή κατάσταση και γι' αυτό, πέρα από τη συμπτωματική θεραπεία της οξείας φάσης, είναι η πιο κατάλληλη για την εφαρμογή φαρμακολογικών στρατηγικών. Έτσι, είναι σκόπιμο η βασική έρευνα να στραφεί προς την αντιμετώπιση των κρίσιμων γεγονότων της χρόνιας φάσης, δηλαδή:

- την απόπτωση,

- την αστρογλοΐωση
- το σχηματισμό της γλοιακής ουλής και
- την απομυελίνωση,

προκειμένου να σχεδιαστεί μία αποτελεσματική φαρμακολογική στρατηγική για την αντιμετώπιση των τραυμάτων της σπονδυλικής στήλης.

1.3 Θεραπευτικές- φαρμακολογικές προσεγγίσεις αμέσως μετά τον τραυματισμό

Δυστυχώς ακόμα δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία για την αντιμετώπιση των καταστρεπτικών γεγονότων που ακολουθούν τα τραύματα της σπονδυλικής στήλης. Μέχρι στιγμής η αντιμετώπιση μίας τέτοιας κατάστασης είναι συμπτωματική και αποσκοπεί στην ανακούφιση του πόνου του ασθενούς και την πρόληψη της επιδείνωσης του τραυματισμού.

Οι πρώτες 24 ώρες μετά το ατύχημα είναι πολύ κρίσιμες για την εξέλιξη του τραύματος. Εάν το τραύμα έχει οδηγήσει σε αναπνευστική ανεπάρκεια, είναι απαραίτητη η άμεση διασωλήνωση και ο μηχανικός αερισμός του τραυματία. Σημαντική είναι επίσης η συνεχής παρακολούθηση του πάσχοντος καθώς μπορεί να προκληθούν αναπνευστικές διαταραχές αργότερα, λόγω του μετατραυματικού οιδήματος.

Μετά την αποκατάσταση της αναπνευστικής λειτουργίας του πάσχοντος, και κατά προτίμηση τις πρώτες 24 ώρες μετά το ατύχημα, είναι αναγκαία η διεξαγωγή χειρουργικής αποσυμπίεσης, η οποία αποσκοπεί στην αναδιάταξη και διεύρυνση του σπονδυλικού σωλήνα και στην «ανακούφιση» των σπονδύλων από την πίεση (Jalan, Saini et al. 2017), (Wilson, Tetreault et al. 2017).

Ακόμη, συνήθως τις πρώτες 7-10 ημέρες μετά τον τραυματισμό, εμφανίζονται φαινόμενα έντονης υπότασης, πνευμονικής δυσλειτουργίας και καρδιαγγειακής αστάθειας. Τα φαινόμενα αυτά συμβάλλουν στην πρόκληση ισχαιμίας στη σπονδυλική στήλη και στην έναρξη του δευτερογενούς τραυματισμού και επομένως είναι απαραίτητη η διατήρηση της μέσης αρτηριακής πίεσης (MAP) μεταξύ 85 και 90 mmHg (Hawryluk, Whetstone et al. 2015). Για το σκοπό αυτό, συνίσταται η καθημερινή παρακολούθηση της πίεσης του πάσχοντος τουλάχιστον για τις πρώτες επτά ημέρες και η χορήγηση καρδιοτονωτικών όπου κρίνεται απαραίτητο.

Η μοναδική φαρμακολογική επιλογή που υπάρχει αυτή τη στιγμή για την αντιμετώπιση των τραυμάτων της σπονδυλικής στήλης είναι το συνθετικό κορτικοστεροειδές, μεθυλπρεδνιζολόνη (MPSS). Αν και πολλές μελέτες έχουν αναδείξει τις ισχυρές αντιφλεγμονώδεις και νευροπροστατευτικές δράσεις του μετά από τέτοιες καταστάσεις, υπάρχουν ανησυχίες ως προς τον αυξημένο κίνδυνο

μολύνσεων που πιθανόν να επιφέρει. Για αυτούς τους λόγους, ακόμα διερευνώνται σε κλινικές δοκιμές η βέλτιστη δόση, η αποτελεσματικότητα και οι ανεπιθύμητες ενέργειες του φαρμάκου (UIndreaj, Badner et al. 2017). Ωστόσο, σύμφωνα με την παγκόσμια πρακτική καθοδήγηση (AOSspine) συνίσταται η 24ώρη έγχυση υψηλής συγκέντρωσης MPSS εντός 8 ωρών από τον τραυματισμό, ανεξαρτήτως από τον βαθμό του τραύματος.

Πολλά νευροπροστατευτικά και νευροαναγεννητικά μόρια καθώς και πειραματικές τεχνικές δοκιμάζονται αυτή τη στιγμή σε κλινικές δοκιμές προκειμένου να διαπιστωθεί ή να αξιολογηθεί η πιθανή θεραπευτική τους δράση σε ασθενείς με τραύματα στη σπονδυλική στήλη. Στους παράγοντες αυτούς ανήκουν γνωστά εγκεκριμένα από τον FDA φάρμακα, όπως η ριλουζόλη, η γλιβενκλαμίδα και η μινοκυκλίνη τα οποία ενδείκνυται για άλλες παθολογίες αλλά και μονοκλωνικά αντισώματα ειδικά σχεδιασμένα για τους εξωγενείς αναστολείς της νευρικής αναγέννησης. Επίσης διερευνώνται πειραματικές τεχνικές όπως η εφαρμογή συστημικής υποθερμίας, η ηλεκτρική διέγερση στον επισκληρίδιο χώρο αλλά και η μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων μετά το τραύμα, ως στρατηγικές για την προστασία των άθικτων νευρώνων και την επαγωγή της νευρικής αναγέννησης. Τα φάρμακα και οι τεχνικές αυτές με την πιθανή τους δράση καθώς και το στάδιο των δοκιμών στο οποίο βρίσκονται παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 1-2.

Πίνακας 1.2. Φάρμακα και τεχνικές που δοκιμάζονται τη δεδομένη χρονική στιγμή σε κλινικές δοκιμές για την πιθανή νευροπροστατευτική ή/και νευροαναγεννητική τους δράση

Ουσία/ τεχνική	Δράση	Κλινική δοκιμή
Ριλουζόλη	Ρύθμιση διεγερσιμοτοξικότητας	Φάση II/III NCT01597518
Συστημική Υποθερμία	Μείωση μεταβολικού ρυθμού Περιορισμός κυτταρικού θανάτου Αντιφλεγμονώδης δράση Σταθεροποίηση ΑΕΦ	Υποψήφια για Φάση I NCT02991690
Γλιβενκλαμίδα	Μείωση του όγκου της κάκωσης Διατήρηση λευκής ουσίας	Φάση I/II NCT02524379
Μινοκυκλίνη	Αντιφλεγμονώδης δράση Νευροπροστασία	Φάση III NCT01828203
VX- 210	Επαγωγή αξονικής αναγέννησης	Φάση IIb/III NCT02669849- Τερματίστηκε πρόωρα
Anti- Nogo- A (ATI-355)	Επαγωγή αξονικής εκβλάστησης	Φάση I NCT00406016
Intravenous Immunoglobulin B (IVIg)	Αντιφλεγμονώδης δράση	Φάση II NCT00001287
Αυτόλογα βλαστικά μεσεγχυματικά κύτταρα	Μείωση φλεγμονής Ρύθμιση ανοσιακής απάντησης Νευροπροστασία	Φάση II NCT01694927
Βλαστικά μεσεγχυματικά κύτταρα του λιπώδους ιστού	Νευροπροστασία	Φάση I NCT03308565
Ηλεκτρική διέγερση στον επισκληρίδιο χώρο	Επαγωγή αξονικής αναγέννησης	Υποψήφια για Φάση I NCT02936453

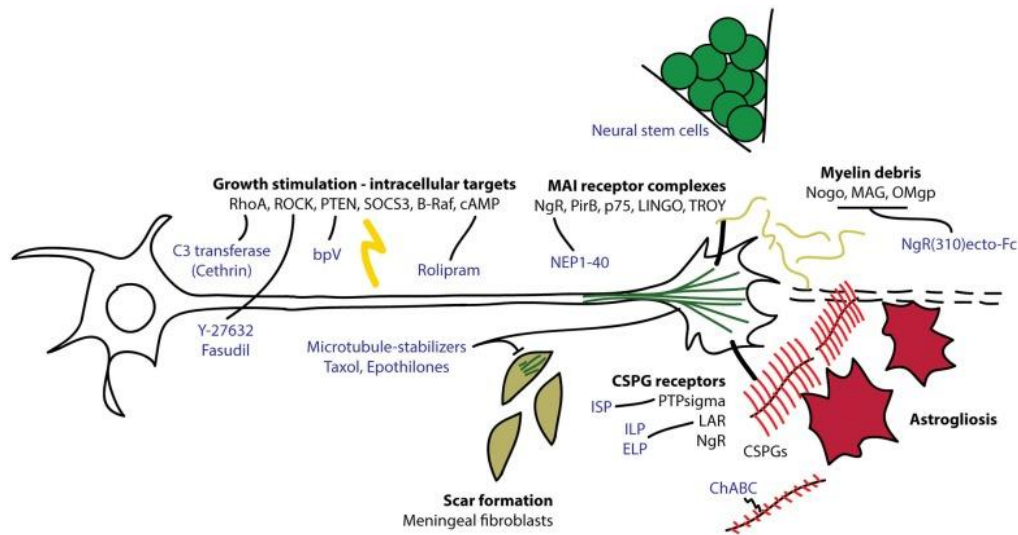
1.4 Γιατί δεν υπάρχει ακόμα αποτελεσματική θεραπεία;

Ένας από τους σημαντικότερους λόγους για τους οποίους δεν υπάρχει ακόμα κατάλληλη θεραπεία έγκειται στο γεγονός ότι δεν έχουν βρεθεί κατάλληλα ζωικά μοντέλα για τη μελέτη τέτοιου είδους τραυματισμών. Η ανθρώπινη σπονδυλική στήλη είναι μία εξαιρετικά σύνθετη δομή αντίστοιχη της οποίας δεν συναντάται στο ζωικό βασίλειο. Μέχρι στιγμής έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα ζωικά μοντέλα όπως γάτες, σκύλοι, ινδικά χοιρίδια (Blight, Saito et al. 1993), πίθηκοι, αρουραίοι (Crowe, Bresnahan et al. 1997) και ποντίκια (Beattie, Hermann et al. 2002) στη βασική έρευνα. Η χρήση κάθε μοντέλου προσφέρει διαφορετικά πλεονεκτήματα και περιορισμούς. Το ζωικό μοντέλο το οποίο χρησιμοποιείται ευρύτατα για τη μελέτη των τραυμάτων της σπονδυλικής στήλης, είναι οι αρουραίοι καθώς είναι φτηνό το κόστος συντήρησής τους, παρουσιάζουν μεγάλη ανθεκτικότητα και διαθεσιμότητα και έχουν αναπτυχθεί πολλές τεχνικές για την πρόκληση και την έρευνα των τραυμάτων σε αυτά τα ζώα (Silva, Sousa et al. 2014). Για την πρόκληση του τραύματος χρησιμοποιούνται κυρίως τρεις τεχνικές: διατομή (transaction), δημιουργία μωλώπων (contusion) και συμπίεση (compression) (Rosenzweig and McDonald 2004). Ωστόσο, κανένα μοντέλο δεν έχει καταφέρει ακόμη να αναπαραστήσει πιστά την κλινική πραγματικότητα μετά από τέτοιους τραυματισμούς. Η στροφή της βασικής έρευνας προς την εύρεση νέων, πιο κατάλληλων πειραματόζωων, είναι αναγκαία προκειμένου να «μεταφραστούν» τα πειραματικά αποτελέσματα σε θεραπευτικές προσεγγίσεις για τους ασθενείς με τραύματα στη σπονδυλική στήλη.

Ένα άλλο εμπόδιο στην εξέλιξη της έρευνας αποτελεί η ιδιότητα του ίδιου του κεντρικού νευρικού συστήματος, να μην αναγεννάται με την ίδια ταχύτητα και ευκολία, όπως το περιφερικό νευρικό σύστημα. Μετά από τραυματισμό στο περιφερικό νευρικό σύστημα, οι περισσότεροι νευρώνες καταφέρνουν να αναγεννηθούν και να συνδεθούν επιτυχώς με τους στόχους τους. Αντιθέτως, στο κεντρικό νευρικό σύστημα, η αναγέννηση είναι αργή και μη αποδοτική. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι πολλοί νευρώνες του ΠΝΣ οι οποίοι διαθέτουν και άξονες στο ΚΝΣ, καταφέρνουν μετά από τραυματισμό να αναγεννηθούν μόνο στα σημεία τα οποία βρίσκονται στο περιφερικό και όχι σε αυτά που βρίσκονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει πως το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται ο νευρώνας επηρεάζει την αναγέννησή του και επιπλέον, ότι στο κεντρικό νευρικό σύστημα, μία σειρά από εξωτερικές και εσωτερικές παρεμβάσεις αναστέλλει την αναγέννηση των νευραξόνων (Kaplan, Ong Tone et al. 2015), (Curcio and Bradke 2018).

1.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την αναγεννητική ικανότητα των νευρώνων του ΚΝΣ

Η αναγεννητική ικανότητα των νευρώνων του κεντρικού νευρικού συστήματος επηρεάζεται από διάφορα ερεθίσματα, εξωτερικά και ενδογενή. Μια δυναμική ισορροπία μεταξύ αυτών των παραγόντων καθώς και η χωρο-χρονική έκφρασή τους ρυθμίζουν τελικά την αναγέννηση των νευραξόνων (Tedeschi and Bradke 2017).



Εικόνα 1.8. Ενδογενείς και εξωγενείς μηχανισμοί επηρεάζουν την αναγέννηση νευραξόνων στο ΚΝΣ.

1.5.1 Εξωτερικοί παράγοντες που αναστέλλουν την νευρωνική αναγέννηση

MAIs

Ήδη από το 1989 άρχισε να αποδεικνύεται η γενικότερη άποψη πολλών ερευνητών ότι η μυελίνη και τα ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα εμποδίζουν την νευρική αύξηση στο ΚΝΣ (Savio and Schwab 1989). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη δημιουργία του ειδικού αντισώματος IN-1 (Caroni and Schwab 1988) οδήγησε στη σταδιακή ανακάλυψη τριών αναστολέων της νευρικής αύξησης οι οποίοι σχετίζονται με την μυελίνη (Myelin-associated inhibitors ή MAIs): της Nogo, της σχετιζόμενης με την μυελίνη γλυκοπρωτεΐνης MAG και της γλυκοπρωτεΐνης της μυελίνης των ολιγοδενδροκυττάρων (OMGp). Η οργάνωση των τριών αυτών πρωτεϊνών σε μία ομάδα έγινε μόλις επιβεβαιώθηκε το γεγονός ότι παρά την τρομερά διαφορετική δομή τους, δένονται και οι τρεις σε κοινούς υποδοχείς, όπως ο NgR₁ (ή RTN₄R) (Domeniconi, Cao et al. 2002, Hirokawa, Zou et al. 2017) και ο PirB (Atwal, Pinkston-Gosse et al. 2008).

Η γλυκοπρωτεΐνη MAG είναι η πρώτη πρωτεΐνη σχετική με τη μυελίνη που βρέθηκε ότι αναστέλλει την αύξηση των αξόνων (McKerracher, S. David et al. 1994). Πρόκειται για μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη 100 kDa η οποία ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών SIGLEC που δένουν το σιαλικό οξύ. Φυσιολογικά, συναντάται στις μεμβράνες των κυττάρων Schwann του περιφερικού νευρικού συστήματος και στα ολιγοδενδροκύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος. Ειδικά για το κεντρικό νευρικό σύστημα, η MAG βρίσκεται στο εσωτερικό στρώμα μυελίνης, γύρω από τον άξονα και παίζει σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση της ένωσης άξονα- μυελίνης. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η MAG έχει διττό ρόλο στη νευρική αύξηση: στο ενήλικο νευρικό σύστημα λειτουργεί ως αναστολέας της νευρωνικής αναγέννησης, ενώ σε νεαρούς νευρώνες επάγει την αύξηση και την αναγέννηση. Σε ενήλικους νευρώνες, η MAG δένεται ειδικά και με υψηλή συγγένεια στον υποδοχέα NgR₁ και αναστέλλει την αναγέννηση των αξόνων.

Η Nogo ή Rtn4, είναι η δεύτερη κατά σειρά μυελινική πρωτεΐνη που ανακαλύφθηκε χάρη στο αντίσωμα IN-1 (GrandPre, Nakamura et al. 2000). Ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών Reticulon και ο φυσιολογικός της ρόλος είναι η διατήρηση του κυλινδρικού σχήματος του ενδοπλασματικού δικτύου. Έχει τρεις ισομορφές οι οποίες προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα: τη Nogo A, τη B και τη C. Η Nogo A βρίσκεται αποκλειστικά στο κεντρικό νευρικό σύστημα, και πιο συγκεκριμένα, στην εξωτερική και την εσωτερική επιφάνεια του στρώματος μυελίνης των ολιγοδενδροκυττάρων. Οι άλλες δύο ισομορφές εκφράζονται κυρίως σε περιοχές έξω από το κεντρικό νευρικό σύστημα. Και οι τρεις ισομορφές διαθέτουν μία κοινή περιοχή 66 αμινοξέων, τη Nogo 66, που είναι υπεύθυνη για την ανασταλτική τους δράση, ενώ η Nogo A περιέχει επιπλέον ένα ανασταλτικό N-αμινοτελικό άκρο. Μέσω της περιοχής Nogo 66 οι πρωτεΐνες συνδέονται με τον υποδοχέα NgR₁ και αναστέλλουν τη νευρωνική αύξηση. Η Nogo A, μέσω του N-αμινοτελικού άκρου εκτός από την αναστολή της νευρωνικής αύξησης, αποτρέπει επίσης την μετανάστευση και την εξάπλωση μη νευρικών κυττάρων (Fournier, GrandPre et al. 2001).

Η OMgp, είναι η τρίτη MAI που ανακαλύφθηκε και ήταν ήδη γνωστή και μελετημένη προτού συσχετιστεί με την αναστολή της νευρικής αύξησης. (Kottis, Thibault et al. 2002). Είναι επίσης μία γλυκοπρωτεΐνη, 110-120 KDa η οποία εντοπίζεται στη μυελίνη των ολιγοδενδροκυττάρων. Εκφράζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε νευρικά κύτταρα τόσο στο κεντρικό όσο και στο περιφερικό νευρικό σύστημα. Διαθέτει μία περιοχή πλούσια σε επαναλαμβανόμενες λευκίνες (LRR) μέσω της οποίας συνδέεται με υψηλή συγγένεια στον υποδοχέα NgR₁. Όπως και οι δύο άλλες MAIs, η OMgp δρα αναστέλλοντας τη νευρωνική αύξηση και προκαλώντας ρήξη στους νευρωνικούς αυξητικούς κώνους.

Ουλή και CSPGs

Κατά τη δημιουργία της ουλής, τα αντιδραστικά αστροκύτταρα προκαλούν έντονη αύξηση της παραγωγής πρωτεογλυκανών θειικής χονδροϊτίνης- CSPGs (Silver 2016). Πρόκειται για μία πολύ μεγάλη οικογένεια αρνητικά φορτισμένων μορίων τα οποία αποτελούνται από έναν πρωτεϊνικό πυρήνα συνδεδεμένο με μία αλυσίδα θειικής γλυκοσαμινογλυκάνης (GAG) που περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενες δισακχαρδικές μονάδες. Οι CSPGs διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μέγεθος του πρωτεϊνικού πυρήνα και το μήκος και το μοτίβο σουλφίδωσης στην αλυσίδα γλυκοσαμινογλυκάνης. Οι πιο καλά χαρακτηρισμένες CSPGs είναι οι: aggrecan, brevican, neurocan, NG2, versican και phosphacan.

Φυσιολογικά, οι CSPGs εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα σε όλο το κεντρικό νευρικό σύστημα ενηλίκων και συμβάλλουν στην σταθεροποίηση των συνάψεων και την αποτροπή της αφύσικης εκβλάστησης των νευραξόνων (Carulli, Laabs et al. 2005) (Galtrey and Fawcett 2007). Ωστόσο, μετά από τον τραυματισμό της σπονδυλικής στήλης, η παραγωγή των CSPGs αυξάνεται υπερβολικά και τα μόρια αυτά συνεισφέρουν στη δημιουργία της ουλής. Πειράματα *in vivo* και *ex vivo* έχουν δείξει ότι οι εν λόγω πρωτεογλυκάνες ασκούν αρνητική επίδραση στην αναγέννηση των νευραξόνων. Επίσης, πειράματα με χορήγηση του ενζύμου χονδροϊτινάσης (ChABC), το οποίο παράγεται από το βακτήριο *Proteus vulgaris* και «αφαιρεί» το μεγαλύτερο τμήμα της γλυκοζαμινικής αλυσίδας των CSPGs, σε κύτταρα έδειξε ότι υπεύθυνη για αυτή τους την δράση είναι η αλυσίδα γλυκοζαμινογλυκάνης που περιέχουν (Suzuki, Ahuja et al. 2017).

Μόρια που παίζουν ρόλο στην καθοδήγηση των αξόνων

Εκτός από τις παραπάνω πρωτεΐνες, μόρια-συνδέτες που σχετίζονται με την καθοδήγηση των νευραξόνων κατά τη νευρική ανάπτυξη, φαίνεται να επηρεάζουν εξίσου και τη νευρωνική αναγέννηση. Ένα τέτοιο μόριο είναι η νετρίνη-1, μία πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης η οποία έχει διττό ρόλο στην καθοδήγηση των αξόνων (Boyer and Gupton 2018). Η νετρίνη-1 εκφράζεται φυσιολογικά στο ενήλικο νευρικό σύστημα και μετά από τραυματισμό φαίνεται πως συμβάλει στην αναστολή της νευρωνικής αναγέννησης (Dun and Parkinson 2017). Άλλο μόριο που συμβάλει στην καθοδήγηση αξόνων είναι η Sema3A της μεγάλης οικογένειας των σεμαφορινών. Πρόσφατα πειράματα έδειξαν ότι η Sema3A ευνοεί τη νευρωνική αναγέννηση τόσο στο περιφερικό όσο και στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Xu, Wang et al. 2018). Τέλος, οι πρωτεΐνες Ephrin μαζί με τους υποδοχείς τους Eph, προκαλούν ρήξη των αυξητικών κώνων και συμβάλουν στην αναστολή της αναγέννησης μετά από τραυματισμό (Yang, Wei et al. 2018).

Υπάρχουν και άλλα μόρια που έχουν συσχετιστεί με τη νευρωνική ανάπτυξη-αναγέννηση στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Στον Πίνακα 1-3. παρουσιάζονται συνοπτικά οι πιο σημαντικοί εξωγενείς παράγοντες καθώς και η σύνδεση που πιθανόν έχουν με ενδογενείς παράγοντες που επηρεάζουν τη νευρογένεση.

Πίνακας 1.3. Εξωγενή μόρια που επηρεάζουν τη νευρωνική αναγέννηση στο ΚΝΣ

Κατηγορία μορίων	Μόριο	Υποδοχείς	Τρόπος δράσης	Αλληλεπίδραση με ενδογενείς παράγοντες
MAIs	Nogo- A	NgR	Αναστολή νευρικής αύξησης	RhoA (μέσω του <i>NgR</i>)
		PirB	Ανάκληση αυξητικού κώνου Περιορισμός συναπτικής πλαστικότητας	
	MAG	NgR PirB	Αναστολή νευρικής αύξησης Ανάκληση αυξητικού κώνου	
	OMGp	NgR PirB	Αναστολή νευρικής αύξησης Αναστολή εκβλάστησης	RhoA (μέσω του <i>NgR</i>)
Πρωτεογλυκάνες γλοιακής ουλής	CSPG		Περιορισμός επαναμυελίνωσης	
Γλυκοπρωτεΐνες γλοιακής ουλής	Tenascin- R	contactin-1	Αναστολή νευρικής αύξησης (Χημειοαπόθεση)	
	Tenascin- C	υποδοχείς ιντεγκρίνης	Επαγωγή νευρικής αύξησης (Χημειοέλξη)	
Μόρια καθοδήγησης αξόνων	Netrin-1	DCC/unc5 Neogenin	Κατάρρευση αυξητικών κώνων	JNK1/c-Jun
	Sema 3A	Neuropilin1 Plexin-A1	Κατάρρευση νευρικού αυξητικού κώνου Ενίσχυση απομυελίνωσης	
	Sema 4D	Plexin- B ₁	Κατάρρευση αυξητικών κώνων	
	Ephrin	Eph	Κατάρρευση αυξητικών κώνων	Rac Cdc42

2 ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ ΑΞΟΝΙΚΗΣ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗΣ ΣΤΟ ΚΝΣ

2.1 Οι ενδογενείς παράγοντες που επηρεάζουν τη νευρική αναγέννηση μετά από τραύμα στη Σπονδυλική Στήλη

Ένα από τα σημαντικότερα εμπόδια στην αποκατάσταση της κινητικής και της αισθητικής λειτουργίας μετά από τραύματα στη σπονδυλική στήλη, έγκειται στην ανικανότητα των αξόνων του ώριμου ΚΝΣ να αναγεννώνται.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, πλήθος εξωγενών παραγόντων ασκούν αρνητική επίδραση στη νευρική αύξηση και αναγέννηση και δημιουργούν ένα εχθρικό περιβάλλον μετά από τραυματισμό του ΚΝΣ. Ωστόσο, ακόμα και όταν οι παράγοντες αυτοί αποσιωποηθούν ή ανασταλούν, η αναγέννηση που πραγματοποιείται είναι πολύ ασθενής και μικρή σε έκταση. Επιπλέον, οι νευρώνες του εμβρυϊκού ΚΝΣ, έχουν μεγάλη ικανότητα να αναπτύσσονται και η τοποθέτησή τους στο ώριμο ΚΝΣ, επάγει έντονη αξονική αύξηση ακόμα και σε αυτό το εχθρικό περιβάλλον.

Τα γεγονότα αυτά σε συνδυασμό με την έντονη διαφορά στην αναγεννητική ικανότητα μεταξύ των νευρώνων του κεντρικού και του περιφερικού νευρικού συστήματος, οδήγησαν στην διαπίστωση ότι οι ίδιοι οι νευρώνες διαθέτουν μία ενδογενή αναγεννητική ικανότητα ανεξάρτητη του εξωτερικού περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται.

Σήμερα είναι πλέον γνωστό ότι η αύξηση και η αναγέννηση των νευραξόνων επηρεάζεται έντονα από σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία ενεργοποιούνται από μόρια προσκόλλησης, υποδοχείς αυξητικών παραγόντων και άλλα μόρια και ρυθμίζουν κρίσιμες διεργασίες όπως η οργάνωση του κυτταροσκελετού, η μεταφορά πρωτεϊνών και η πρωτεϊνική σύνθεση. Στα μονοπάτια αυτά ανήκουν το σηματοδοτικό μονοπάτι της JAK/STAT, το επαγόμενο από την PI3K μονοπάτι της AKT/ mTOR αλλά και το μονοπάτι της RhoA/ROCK. Επίσης, απαραίτητη στην αναγέννηση φαίνεται να είναι και η σηματοδότηση μέσω κινασών, όπως η DLK και η LZK.

Εκτός από τα σηματοδοτικά μονοπάτια, η δυναμική του κυτταροσκελετού είναι ένας άλλος παράγοντας που έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με την ικανότητα των αξόνων να αναγεννώνται. Πιο συγκεκριμένα, ο αποπολυμερισμός της τουμπουλίνης δρα ανασταλτικά στην αξονική αύξηση και επηρεάζει την αναγέννηση μετά από τραυματισμό στο ΚΝΣ. Μόρια που επάγουν την σταθεροποίηση της τουμπουλίνης αλλά και φαρμακολογική στόχευση των μικρών GTPασών Rho, Rac και Cdc42 έχουν δείξει θετικά αποτελέσματα στην αποκατάσταση μετά από τραύμα στο ΚΝΣ (Fawcett and Verhaagen 2018).

Τέλος, πρόσφατα έχουν ανακαλυφθεί και νέοι ενδογενείς παράγοντες ο τρόπος δράσης των οποίων δεν είναι πλήρως εξακριβωμένος, οι οποίοι φαίνεται να παίζουν κάποιο ρόλο στην αναγεννητική ικανότητα των αξόνων του ώριμου ΚΝΣ. Όλα τα παραπάνω, αναλύονται εκτενώς στα επόμενα κεφάλαια.

2.2 Σηματοδοτικά μονοπάτια- Δεύτερα μηνύματα

2.2.1 cAMP

Το κυκλικό AMP

Το κυκλικό AMP (cAMP ή 3'-5' κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη) είναι ο πρώτος δευτερογενής αγγελιοφόρος που ανακαλύφθηκε. Συντίθεται από το ATP με τη δράση της αδενυλικής κυκλάσης (AC) και συμμετέχει σε πλήθος βιολογικών διεργασιών, όπως είναι η έκκριση ορμονών, η διαπερατότητα καναλιών, η γονιδιακή έκφραση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η επιβίωση.

Όσον αφορά το νευρικό σύστημα, το cAMP αποτελεί ισχυρό τροφικό σήμα για τους νευρώνες και ρυθμίζει την επιβίωση, την διαφοροποίησή τους και την ικανότητά τους να κατευθύνουν και να επιμηκύνουν τους άξονές τους. Στο εμβρυϊκό κεντρικό νευρικό σύστημα, τα επίπεδα του cAMP είναι υψηλά και σχετίζονται με την έντονη αξονική αύξηση που συμβαίνει κατά την ανάπτυξη. Τα επίπεδα του cAMP ελαττώνονται καθώς το νευρικό σύστημα ωριμάζει με αποτέλεσμα να μειώνονται και οι αυξητικές του ιδιότητες (Batty, Fenrich et al. 2017).

Τα ενδοκυττάρια επίπεδα του cAMP ρυθμίζονται από την ισορροπία δύο παραγόντων: της αδενυλικής κυκλάσης (AC) και της φωσφοδιεστεράσης κυκλικών νουκλεοτιδίων PDE. Η αδενυλική κυκλάση επάγει τη σύνθεση του cAMP από ATP ενώ αντίθετα, η PDE συμβάλλει στην υδρόλυση του cAMP σε AMP.

Οι περισσότερες αδενυλικές κυκλάσεις (AC) ενεργοποιούνται από υποδοχείς GPCRs και επάγουν την σύνθεση του cAMP. Το cAMP με την σειρά του ενεργοποιεί πλήθος μορίων. Τα πιο σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζονται από το cAMP είναι: το μονοπάτι της PKA, του παράγοντα GEF, του Erac και των ιοντικών καναλιών κυκλικών νουκλεοτιδίων.

Το καλύτερα μελετημένο μονοπάτι σηματοδότησης, είναι το εξαρτώμενο από την PKA (Pierce, Premont et al. 2002). Το cAMP δένεται στις δυο ρυθμιστικές υπομονάδες της PKA και την ενεργοποιεί. Η PKA με την σειρά της συμμετέχει σε πλήθος διεργασιών μέσω της φωσφορυλίωσης μεταβολικών ενζύμων, την απενεργοποίηση της PLC β2 και την ενεργοποίηση των MAP κινασών. Επίσης, μειώνει την ενεργότητα των μικρών πρωτεϊνών Raf και Rho, ελέγχει την διαπερατότητα ιοντικών καναλιών και ρυθμίζει την έκφραση και την δραστηριότητα πολλών αδενυλικών κυκλασών και φωσφοδιεστερασών.

Το cAMP στη νευρική αναγέννηση

Ένα από τα γεγονότα- κλειδιά που συμβαίνουν αμέσως μετά από τραυματισμό στο ΚΝΣ είναι η δραματική μείωση των επιπέδων του cAMP στο εσωτερικό των κυττάρων. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τις γνωστές ιδιότητες του cAMP στην νευρική αύξηση, έστρεψαν την έρευνα για την αναγέννηση των νευρώνων του ΚΝΣ στην μελέτη του εν λόγω σηματοδοτικού μονοπατιού.

Ήδη από το 2001 έγινε γνωστό ότι το cAMP σχετίζεται με την απώλεια αναγεννητικής ικανότητας των ενήλικων αξόνων του νευρικού συστήματος. Πιο συγκεκριμένα, αποδείχθηκε ότι το cAMP μετατρέπει τις ιδιότητες των αναστολέων μυελίνης (MAIs) από επαγωγικές στο εμβρυικό νευρικό σύστημα, σε ανασταλτικές στο ώριμο νευρικό σύστημα (Cai, Qiu et al. 2001). Επίσης, αύξηση των επιπέδων του cAMP σε νευρώνες τροποποιεί τις φυσιολογικές απαντήσεις των αυξητικών κώνων στα ανασταλτικά υποστρώματα MAG και μυελίνης (Song, Ming et al. 1998) και επάγει την επιβίωση των σπονδυλικών κινητικών νευρώνων (Hanson, Shen et al. 1998), (Meyer-Franke, Kaplan et al. 1995).

Την περίοδο 1999-2002 ιδιαίτερο ενδιαφέρον είχε στραφεί στη μελέτη της αναγέννησης των DRG- νευρώνων, δηλαδή των γαγγλίων της ραχιαίας ρίζας. Οι εν λόγω νευρώνες είναι περιφερειακοί αλλά διαθέτουν δύο διακλαδώσεις (άξονες) που ξεκινούν από το ίδιο κυτταρικό σώμα και στην πορεία διαχωρίζονται και η μία καταλήγει στην περιφέρεια, ενώ η άλλη εισέρχεται στην σπονδυλική στήλη, σχηματίζει τη ραχιαία στήλη και ανεβαίνει προς τον εγκέφαλο. Έχει αποδειχθεί ότι αν τραυματιστεί ο περιφερειακός άξονας, πραγματοποιείται αναγέννηση ενώ αντιθέτως, αν στον άξονα που ξεκινάει από το ίδιο κυτταρικό σώμα συμβεί τραυματισμός σε σημείο μετά από την ραχιαία στήλη, δεν πραγματοποιείται αναγέννηση. Ωστόσο, αν προηγηθεί κάκωση στο περιφερειακό τμήμα 1-2 εβδομάδες πριν τον τραυματισμό του κεντρικού άξονα, ο τελευταίος πλέον αναγεννάται και μάλιστα σε σημαντική έκταση (Neumann and Woolf 1999). Η ομάδα των Qiu κ.α. (Qiu, McAtee et al. 2002) απέδειξε ότι η αναγέννηση που ακολουθεί την κάκωση του περιφερειακού τμήματος οφείλεται στο cAMP και στην ενεργοποίηση της PKA. Επιπλέον, η αύξηση του cAMP είναι αρχικά PKA εξαρτώμενη (μία μέρα μετά την κάκωση) και ακολούθως γίνεται PKA- ανεξάρτητη (μία εβδομάδα μετά την κάκωση).

Παρόμοια πειράματα με χρήση αναλόγων του cAMP (Neumann, Bradke et al. 2002) (Lu, Yang et al. 2004) επιβεβαίωσαν ότι η αύξηση των επιπέδων του cAMP, επάγει την αξονική αύξηση και αποκαθιστά την νευρική λειτουργία μετά από τραύματα της Σ.Σ., οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι το cAMP από μόνο του μπορεί να επάγει τη νευρική αναγέννηση στο ΚΝΣ.

Το cAMP εκτελεί τον ρόλο του στην αναγέννηση των νευρώνων μέσω δύο διαδοχικών φάσεων: μίας εξαρτώμενης από την PKA και μίας ανεξάρτητης αυτής (Qiu, McAtee et al. 2002) (Gao, Deng et al. 2004). Η πρώτη φάση ξεκινάει αμέσως

μετά το τραύμα και την αύξηση των επιπέδων του cAMP και διαρκεί επτά ημέρες. Στην περίοδο αυτή, η ενεργοποιημένη PKA ενεργοποιεί την πρωτεΐνη CREB. Η δεύτερη φάση, η ανεξάρτητη της PKA, αρχίζει επτά ημέρες μετά το τραύμα, όπου τα ενδοκυττάρια επίπεδα του cAMP έχουν επανέλθει στις φυσιολογικές τιμές (δηλαδή τα επίπεδα που υπήρχαν πριν τον τραυματισμό). Η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη CREB επάγει την μεταγραφή πλήθους γονιδίων πολλά από τα οποία φαίνεται να σχετίζονται με την αναγέννηση των νευρώνων.

Μέχρι σήμερα, δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί εάν η πρωτεΐνη CREB είναι η μόνη υπεύθυνη για την αναγέννηση που επάγεται μέσω της αύξησης των επιπέδων του cAMP και επίσης δεν έχουν βρεθεί όλα τα γονίδια- καθοδικοί στόχοι του CREB που σχετίζονται με την ικανότητα των αξόνων να αναγεννώνται.

Τα τέσσερα καλύτερα μελετημένα γονίδια που επηρεάζουν τη νευρική αναγέννηση και η μεταγραφή των οποίων επάγεται από το CREB είναι η αργινάση I (ArgI), η ιντερλευκίνη 6 (IL)-6, ο αναστολέας έκκρισης της λευκοκυτταρικής πρωτεάσης (SLPI), και η μεταλοθειονίνη (MT) (Siddiq and Hannila 2015).

Τέλος, μια πολύ πρόσφατη θεωρία, συνδέει το μονοπάτι cAMP/ PKA με την κινάση DLK και υποστηρίζει ότι η αναγέννηση σε τραυματισμένους νευρώνες των ραχιαίων γαγγλίων, πραγματοποιείται μέσω ενεργοποίησης της κινάσης DLK από την ενεργοποιημένη PKA (Hao, Frey et al. 2016).

Πειράματα με Ρολιπράμη

Σύντομα μετά την ανακάλυψη του cAMP, η έρευνα οδήγησε στην ταυτοποίηση των φωσφοδιεστερασών (Butcher and Sutherland 1962), μιας μεγάλης οικογένειας ενζύμων που έχουν την ιδιότητα να υδρολύουν τον 3' φωσφοδιεστερικό δεσμό των cAMP και cGMP και να παράγουν AMP και GMP αντίστοιχα. Οι PDEs είναι οι μόνοι γνωστοί αρνητικοί ρυθμιστές των επιπέδων του cAMP και διακρίνονται σε 11 υπο-οικογένειες πρωτεϊνών οι οποίες χωρίζονται σε 3 κατηγορίες ανάλογα με την καταλυτική τους εξειδίκευση: στις ειδικές για το cGMP (PDE5, PDE6 και PDE9), στις ειδικές για το cAMP (PDE4, PDE7 και PDE8) και σε αυτές που υδρολύουν τόσο το cAMP όσο και το cGMP (PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 και PDE11) (Knott, Assi et al. 2017). Από τις παραπάνω υπο-οικογένειες, η καλύτερα μελετημένη και αυτή που φαίνεται να σχετίζεται περισσότερο με τα τραύματα της σπονδυλικής στήλης, είναι η PDE4 καθώς αποτελεί τον κύριο αρνητικό ρυθμιστή του cAMP σε νευρώνες και κύτταρα γλοίας (Kleppisch 2009).

Όπως προαναφέρθηκε, μετά από τραύμα στη Σ.Σ. και κατά την έναρξη του δευτερογενούς τραυματισμού, οι κατεστραμμένοι νευρώνες, τα αστροκύτταρα και η ενεργοποιημένη μικρογλοία παράγουν κυτοκίνες φλεγμονής, όπως ο TNFα και η IL-1β, οι οποίες με την σειρά τους επάγουν την αύξηση της έκφρασης και της δραστηριότητας των ειδικών για το cAMP φωσφοδιεστερασών. Αυτό επιφέρει μείωση στα ενδοκυττάρια επίπεδα του cAMP, ιδιαίτερα στην περιοχή της

μικρογλοίας, και διαταραχή στην κυτταρική ομοιόσταση (Ghosh, Garcia-Castillo et al. 2012), (Knott, Assi et al. 2017). Η άναρχη ενεργοποίηση των PDEs έχει συσχετιστεί επίσης και με την ενεργοποίηση της κυκλίνης C1, την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C και την αναστολή των PI3K και AKT. Επομένως, η εύρεση των εκλεκτικών αναστολέων ειδικών για το cAMP, φωσφοδιεστερασών, φάνηκε από νωρίς ότι αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη θεραπευτική στρατηγική για την αποκατάσταση της νευρικής λειτουργίας μετά από τραυματισμό της Σ.Σ.

Ένας τέτοιος αναστολέας που δοκιμάστηκε σε πειράματα με τραύματα στη ΣΣ, είναι η Ρολιπράμη (Rolipram) η οποία αναστέλλει εκλεκτικά την φωσφοδιεστεράση 4 (PDE4). Το φάρμακο αρχικά σχεδιάστηκε για την θεραπεία της κατάθλιψης αλλά κρίθηκε ακατάλληλο λόγω του στενού θεραπευτικού του εύρους. Έκτοτε δοκιμάστηκε σε κλινικές μελέτες που αφορούσαν πλήθος ασθενειών όπως άσθμα, αρθρίτιδα, πολλαπλή σκλήρυνση και νόσος Αλτσχάιμερ.

Ένας από τους κύριους λόγους για τους οποίους η Ρολιπράμη κρίθηκε ως πολλά υποσχόμενο φάρμακο για την διεξαγωγή προκλινικών μελετών σε ασθενείς με τραύματα στη Σ.Σ. είναι η ικανότητά της να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, επιτρέποντας την από του στόματος και υποδόρια χορήγησή της (Krause, Ktthne et al. 1990).

Πρώιμα πειράματα σε ενήλικους αρουραίους με θωρακική κάκωση έδειξαν ότι η χορήγηση Ρολιπράμης μετά το τραύμα, σε συνδυασμό με μεταμόσχευση κυττάρων Schwann διευκολύνει την αξονική αύξηση, συμβάλλει στην διατήρηση της αρχιτεκτονικής των ιστών, και βελτιώνει την κινητική λειτουργικότητα (Pearse, Pereira et al. 2004). Αντίστοιχα αποτελέσματα φάνηκαν και σε πειράματα με τραυματικό ατύχημα εγκεφάλου. Χορήγηση διαλύματος Ρολιπράμης- DMSO 30 λεπτά πριν τον τραυματισμό και μετά καθημερινά για τρεις ημέρες, αποκατέστησε τα επίπεδα του cAMP και μείωσε την φλεγμονή (Atkinsa, Oliva et al. 2007).

Βασιζόμενη στα παραπάνω αποτελέσματα μία ερευνητική ομάδα (Schaal, Garg et al. 2012), προσπάθησε να σχεδιάσει το θεραπευτικό προφίλ του φαρμάκου, ως νευροπροστατευτικό μετά από τραύματα στη Σ.Σ. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν θηλυκοί, ενήλικοι επίμυες, στους οποίους προκλήθηκε μέσω κρούσης τραύμα στη θωρακική μοίρα, και στη συνέχεια χορηγήθηκαν διαφορετικές δόσεις Ρολιπράμης ή διαλύματος 10% αιθανόλης (vehicle) σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα.

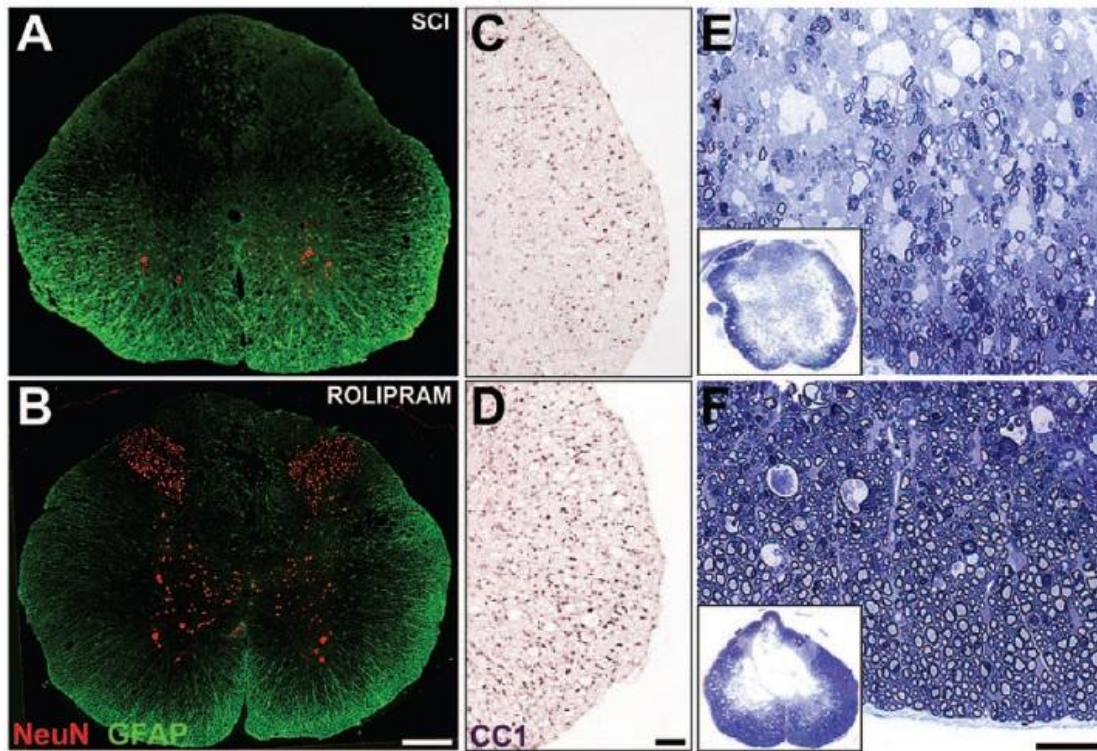
Οι ερευνητές παρατήρησαν ότι η βέλτιστη δόση για την προστασία νευρώνων, ολιγοδενδροκυττάρων και κεντρικών εμμύλων αξόνων (CMAs) ήταν 1mg/ kg, χορηγούμενο για πρώτη φορά μία ώρα μετά τον τραυματισμό και έπειτα καθημερινά για δύο εβδομάδες. Επίσης, ως βέλτιστες οδοί χορήγησης του φαρμάκου κρίθηκαν η ενδοφλέβια και η υποδόρια, με την πρώτη να συνίσταται για μελλοντικές κλινικές δοκιμές λόγω της ευκολίας χορήγησής της σε ασθενείς με

τραύματα στο νοσοκομείο, οι οποίοι πιθανότατα ήδη δέχονται κάποια θεραπεία μέσω αυτής της οδού.

Ακόμη, αν και η βέλτιστη νευροπροστατευτική δράση της Ρολιπράμης παρατηρείται όταν χορηγείται για πρώτη φορά μία έως δύο ώρες μετά το τραύμα, το φάρμακο φαίνεται να είναι αποτελεσματικό (ειδικά όσον αφορά την διατήρηση της λευκής ουσίας) ακόμα και όταν χορηγείται για πρώτη φορά στις 48 ώρες μετά το ατύχημα. Το τελευταίο εύρημα είναι σημαντικό για την κλινική πρακτική καθώς είναι δύσκολη η εφαρμογή θεραπείας στις δύο ώρες μετά το ατύχημα λόγω της αναγκαιότητας μεταφοράς του ασθενούς στο νοσοκομείο και της χειρουργικής αποσυμφόρησης που επιβάλλεται να λάβει χώρα αμέσως μετά τον τραυματισμό. Αξίζει να σημειωθεί ότι η Ρολιπράμη εκτός από τη δράση της στην διατήρηση της αρχιτεκτονικής των ιστών, επέφερε σημαντικά αποτελέσματα και σε επίπεδο λειτουργίας. Πιο συγκεκριμένα οι επίμυες που είχαν λάβει Ρολιπράμη, εμφάνισαν βελτιωμένες αισθητικοκινητικές λειτουργίες, στην κλίμακα BBB στις τέσσερις εβδομάδες μετά το ατύχημα, όταν δοκιμάστηκαν σε δοκιμασίες ανοιχτού πεδίου.

Εκτός των άλλων, η Ρολιπράμη παρουσιάζει και ισχυρή ανοσορυθμιστική δράση. Η χορήγηση του φαρμάκου επιφέρει αλλαγές στον ρυθμό παραγωγής κυτοκινών και χημειοκινών το οποίο εξασθενεί σημαντικά το επίπεδο ενεργοποίησης μακροφάγων και μικρογλοίας στο σημείο της ουλής.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα εντυπωσιακά αποτελέσματα της έρευνας των Schaal κ.α., όσον αφορά την προστατευτική δράση της Ρολιπράμης, πιθανόν να οφείλονται εν μέρει στην χρήση αιθανόλης 10% ως μέσο διάλυσης (vehicle) του φαρμάκου, έναντι του οργανικού διαλύτη DMSO που είχε χρησιμοποιηθεί σε προηγούμενες μελέτες. Η ενδοφλέβια χορήγηση σκέτου διαλύματος αιθανόλης 10%, εμφάνισε κυτταροπροστατευτική δράση μετά τον τραυματισμό και η περαιτέρω διερεύνηση της συνέργειας αιθανόλης και PDE αναστολέων ίσως ανοίξει νέους δρόμους στην έρευνα για την εύρεση θεραπευτικών προσεγγίσεων μετά από τραυματισμό της Σ.Σ.



Εικόνα 2.1. Το βέλτιστο θεραπευτικό προφίλ της Ρολιπράμης παρέχει σημαντική νευρο- και αξονοπροστασία. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από επίμυες που έλαβαν Ρολιπράμη στο βέλτιστο τρόπο χορήγησης. 1.0 mg/kg χορηγήθηκε ενδοφλεβίως στις 2h μετά τον τραυματισμό (κάτω στήλη) ή control μόνο με το τραύμα (άνω στήλη). A-B: Σε τομές 2mm ουριαία (caudal to) του τραύματος, σημαντικά περισσότεροι νευρώνες Neu+ διατηρήθηκαν στη φαιά ουσία στη Ρολιπράμη (B) σε σχέση με το control (A). Ανοσοϊστοχημεία των τομών με αντισώματα έναντι της GFAP αποκαλύπτει την αρχιτεκτονική της Σ.Σ. C-D: Σε τομές 2mm ουριαία του τραύματος σημαντικά περισσότερα APC-CC1+ ολιγοδενδροκύτταρα διατηρήθηκαν σε στιβάδες της λευκής ουσίας στη Ρολιπράμη (D) σε σχέση με το control (C). E-F: Με μπλε χρώση τολουϊδίνης σε λεπτές τομές 1μm από το επίκεντρο του τραύματος, περισσότεροι κεντρικοί εμμύελοι άξονες (CMAAs) βρέθηκαν στην περιφερική λευκή ουσία σε επίμυες που έλαβαν ρολιπράμη (F) σε σχέση με το control (E). (Τροποποίηση από (Schaal, Garg et al. 2012).

Παρά τα ελπιδοφόρα αποτελέσματα των μελετών σε πειραματικά μοντέλα τραυμάτων της Σ.Σ., δεν έχουν ακόμη σχεδιαστεί ανθρώπινες κλινικές δοκιμές για τη διερεύνηση των νευροπροστατευτικών και αναγεννητικών δράσεων της Ρολιπράμης. Η ευκολία χορήγησης του εν λόγω φαρμάκου μέσω της ενδοφλέβιας οδού, του προσδίδει σημαντικό πλεονέκτημα έναντι άλλων ειδικά σε ασθενείς με τραύματα της Σ.Σ. και η περαιτέρω διερεύνηση των ιδιοτήτων του σε κλινικές δοκιμές κρίνεται αναγκαία.

2.2.2 PTEN/PI3K/ AKT/ mTOR και AKT/ GSK3/ CRMP-2

Το μονοπάτι PI3K/ AKT/ mTOR

Οι κινάσες PI3K αποτελούν μία οικογένεια λιπιδικών ενζύμων που ρυθμίζουν πλήθος κρίσιμων κυτταρικών διαδικασιών όπως αύξηση, μετανάστευση, πολλαπλασιασμός και απόπτωση. Η οικογένεια των κινασών PI3K αποτελείται από 8 ισομορφές οι οποίες διακρίνονται σε 3 κλάσεις (I, II και III) ανάλογα με τα δομικά χαρακτηριστικά και την ειδικότητα των υποστρωμάτων τους (Jean and Kiger 2014). Η καλύτερα μελετημένη κλάση είναι η I στην οποία ανήκουν ετεροδιμερείς κινάσες που αποτελούνται από μία καταλυτική (p110) και μία ρυθμιστική (p85) υπομονάδα. Η καταλυτική υπομονάδα έχει επίσης 4 ισομορφές (p110α, β, γ και δ). Στους περισσότερους νευρώνες του ιππόκαμπου, του φλοιού και της παρεγκεφαλίδας εκφράζονται όλες οι ισομορφές της p85 καθώς και η p110 σε υψηλά επίπεδα. Διαφορετικοί συνδυασμοί ισομορφών συνήθως έχουν διαφορετική λειτουργία και επηρεάζουν διαφορετικά συστήματα.

Μιτογόνα σήματα και αυξητικοί παράγοντες ενεργοποιούν υποδοχείς τυροσινικών κινασών της κυτταρικής μεμβράνης οι οποίοι επάγουν την ενεργοποίηση των PI3Ks (κλάσης I). Οι ενεργοποιημένες PI3Ks επάγουν την μετατροπή της PIP2 σε PIP3 και η PIP3 με την σειρά της επάγει την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης B (PKB ή AKT) από την PDK1. Η ενεργοποιημένη AKT, απενεργοποιεί την TSC, ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από την TSC1 και την TSC2, μέσω φωσφορυλίωσης της TSC2. Η TSC2 δρα ως GAP για την μικρή GTPάση Rheb και την ενεργοποιεί. Ακολουθώντας, η Rheb επάγει την ενεργοποίηση του mTOR. Το mTOR φτιάχνει δύο διακριτά συμπλέγματα, το mTORC1 και το mTORC2. Τα δύο συμπλέγματα μετά την ενεργοποίησή τους φωσφορυλιώνουν διαφορετικούς καθοδικούς στόχους και ρυθμίζουν σημαντικές βιολογικές διεργασίες. Το ενεργοποιημένο σύμπλεγμα mTORC1, ρυθμίζει κυρίως τις διαδικασίες μεταγραφής, μετάφρασης και αυτοφαγίας των κυττάρων ενώ το mTORC2 συμμετέχει στην κυτταρική επιβίωση και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης (Ma and Blenis 2009).

Ένας από τους σημαντικότερους αρνητικούς ρυθμιστές του μονοπατιού PI3K/ AKT/ mTOR είναι η φωσφατάση ομόλογης της τενσίνης (PTEN). Πρόκειται για μία ογκοκατασταλτική φωσφατάση η οποία δρα ανταγωνιστικά στην PI3K και επάγει την μετατροπή της PIP3 σε PIP2, αποτρέποντας έτσι την ενεργοποίηση της AKT και των καθοδικών της στόχων (Song, Salmena et al. 2012). Αναστολή του μονοπατιού της AKT από την PTEN έχει ως αποτέλεσμα μείωση της κυτταρικής αύξησης (Park, Liu et al. 2010). Η PTEN αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της ανάπτυξης του νευρικού συστήματος σε πολλαπλά επίπεδα (Kreis, Leonarditis et al. 2014) ενώ μεταλλάξεις στο γονίδιο PTEN έχουν συσχετισθεί με νευρολογικές ανωμαλίες όπως μακροκεφαλία και αυτισμό σε ανθρώπους (Goffin, Hoefsloot et al. 2001, Gutilla and Steward 2016).

Στο νευρικό σύστημα, το σηματοδοτικό μονοπάτι του mTOR παίζει σημαντικό ρόλο σε κρίσιμες κυτταρικές διαδικασίες όπως στη ρύθμιση της ανάπτυξης και επιβίωσης των νευρικών κυττάρων, τη διαφοροποίηση των αξόνων και την πλαστικότητα των συνάψεων. Επίσης, το mTOR ρυθμίζει το μέγεθος του κυτταρικού σώματος των νευρώνων, συμμετέχει στις διαδικασίες πρωτεϊνικής σύνθεσης των αξόνων και είναι απαραίτητο σήμα για τη δημιουργία νέων αυξητικών κόνων (Don, Tsang et al. 2012).

Ανωμαλίες στη ρύθμιση του μονοπατιού PI3K/ AKT/ mTOR έχουν συσχετιστεί με σοβαρές παθολογίες όπως επιληψία, νευροεκφυλιστικές ασθένειες και καρκίνο του εγκεφάλου (Sanchez-Alegria, Flores-Leon et al. 2018).

Αξίζει να σημειωθεί ότι το μονοπάτι της PI3K αλληλεπιδρά έντονα με το μονοπάτι των MAPK κινασών. Οι PI3Ks κλάσης I διαθέτουν περιοχή σύνδεσης με τις πρωτεΐνες Ras (RBD domain) στο N-τελικό άκρο τους. Οι ισομορφές p110α, γ και δ είναι ενεργοποιητές του Ras, ενώ η p110β συνδέεται με την πρωτεΐνη Rab5 και μέλη της οικογένειας των Rho GTPασών (Jean and Kiger 2014). Επιπλέον, η ενεργοποίηση του mTORC1 επάγεται και μέσω του μονοπατιού Ras- Erk.

Ενεργοποίηση του μονοπατιού μετά από τραύμα στη σπονδυλική στήλη

Μετά από εγκεφαλικό ή τραύμα στη σπονδυλική στήλη, παρατηρείται αύξηση της ενεργοποίησης της AKT σε νευρώνες κοντά στο σημείο του τραύματος (Yune, Park et al. 2008, Howitt, Lackovic et al. 2012). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τον ρόλο του μονοπατιού PI3K/ AKT/ mTOR σε διαδικασίες νευρικής αύξησης και ανάπτυξης, οδήγησε στην υπόθεση ότι η ενεργοποίηση του εν λόγω μονοπατιού μετά από τραύμα αποτελεί έναν ενδογενή τρόπο νευροπροστασίας του οργανισμού, ο οποίος όμως δεν έχει μεγάλη διάρκεια (Walker, Walker et al. 2012).

Πράγματι, η ενεργοποίηση της AKT και του mTOR μετά από ατύχημα στο ΚΝΣ, εμφάνισε νευροπροστατευτικές ιδιότητες και έστρεψε την έρευνα για τη νευρική αναγέννηση στην επαγωγή του μονοπατιού PI3K/ AKT/ mTOR.

Πειράματα με απαλοιφή (conditional deletion) του PTEN

Από τα πρώτα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν ήταν αυτά που αφορούσαν απενεργοποίηση της φωσφατάσης PTEN. Όπως προαναφέρθηκε, η PTEN αποτελεί τον σημαντικότερο αρνητικό ρυθμιστή του μονοπατιού της PI3K. Απενεργοποίηση λοιπόν της PTEN οδηγεί σε συσσώρευση της PIP3 και ενεργοποίηση των AKT και mTOR οι οποίοι επάγουν την κυτταρική αύξηση.

Η ερευνητική ομάδα των Park κ.α. (Park, Liu et al. 2008) απέδειξε ότι η γενετική απαλοιφή της φωσφατάσης PTEN στο οπτικό νεύρο επάγει την επιβίωση των τραυματισμένων γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς καθώς και την αναγέννηση των νευρικών αξόνων.

Επίσης, γενετική απαλοιφή της PTEN στον αισθητικοκινητικό φλοιό νεογέννητων ποντικών, μία ημέρα μετά την γέννηση, επιτρέπει σε άξονες CST να αναγεννώνται μετά από τραύμα στους θωρακικούς σπονδύλους (Liu, Lu et al. 2010).

Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρούνται και όταν η απαλοιφή του γονιδίου της φωσφατάσης PTEN πραγματοποιείται μετά το τραύμα. Πιο συγκεκριμένα, σε ενήλικες επίμυες στους οποίους είχε προηγηθεί τραύμα στη σπονδυλική στήλη, απαλοιφή του γονιδίου της PTEN είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της αναγέννησης των CST αξόνων και τη βελτίωση της λειτουργικής αποκατάστασης των ζώων (Danilov and Steward 2015).

Φαρμακολογικές προσεγγίσεις

Μόλις επιβεβαιώθηκε ο ρόλος της PTEN στην αναστολή της νευρικής αναγέννησης μετά από κάκωση στο ΚΝΣ, άρχισαν να δοκιμάζονται σε ζωικά μοντέλα με τραύμα της σπονδυλικής στήλης, πειραματικά φάρμακα που στοχεύουν την εν λόγω φωσφατάση.

Από τις πιο γνωστές συνθετικές ενώσεις που δοκιμάζονται μέχρι σήμερα σε τραύματα του ΚΝΣ, είναι τα σύμπλοκα υπεροξοβαναδίου (Bisperoxovanadium-brV). Ιδιαίτερα χρησιμοποιείται το Bisperoxovanadium (phen) [brV (phen)] [(Potassium Bisperoxo(1,10-phenanthroline) oxovanadate (V))]. Πρόκειται για έναν σταθερό, ισχυρό αναστολέα πρωτεϊνικών τυροσινικών φωσφατασών (PTPs) ο οποίος στοχεύει και την PTEN.

Ενδορραχιαία χορήγηση brV (phen) σε ενήλικες αρουραίους με τραύμα στον θωρακικό σπόνδυλο T9, παρουσίασε νευροπροστατευτική δράση και βελτίωσε την αισθητικοκινητική λειτουργικότητα των ζώων. Αντίστοιχα θετικά αποτελέσματα παρατηρούνται και όταν το brV (phen) χορηγείται για πρώτη φορά στις τέσσερις ώρες μετά το ατύχημα, γεγονός το οποίο έχει ιδιαίτερη σημασία για την κλινική πρακτική (Nakashima, Arnold et al. 2008).

Επίσης, χορήγηση brV για πρώτη φορά αμέσως μετά τον τραυματισμό και έπειτα καθημερινά για επτά ημέρες, αύξησε τον αριθμό των ολιγοδενδροκυττάρων και βελτίωσε την λειτουργική αποκατάσταση σε αρουραίους με αυχενικό τραύμα (Walker, Walker et al. 2012),(Walker and Xu 2014). Ακόμα, ένα πολύ πρόσφατο πείραμα έδειξε ότι το brV μειώνει τον κυτταρικό θάνατο μετά το ατύχημα τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Walker, Wu et al. 2019).

Δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί ο τρόπος με τον οποίο το brV δρα στους τραυματισμένους άξονες, καθώς στοχεύει και άλλες φωσφατάσες πέρα από την PTEN. Για παράδειγμα, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι το brV ενεργοποιεί εκτός από το μονοπάτι της AKT/ mTOR και το μονοπάτι της Erk, πιθανόν με τρόπο εξαρτώμενο από το mTOR, επομένως η νευρική αναγέννηση που παρατηρείται ίσως να μην οφείλεται αποκλειστικά στην αναστολή της PTEN (Walker, Wu et al. 2019).

Οι ενώσεις βαναδίου μπορεί να φαίνονται πολλά υποσχόμενες ως θεραπευτικές προσεγγίσεις μετά από τραύματα της ΣΣ, ωστόσο καθώς στοχεύουν πολλές φωσφατάσες, μπορεί να προκαλέσουν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως μείωση της γλυκόζης του αίματος.

Πεπτιδικοί αναστολείς της PTEN (PAPs)

Πρόσφατα σχεδιάστηκαν ειδικά ανταγωνιστικά πεπτίδια για την φωσφατάση PTEN, τα οποία στοχεύουν περιοχές της PTEN που είναι κρίσιμες για την λειτουργία της όπως η περιοχή δέσμευσης της PIP2, το μοτίβο σύνδεσης του ATP και περιοχές στο C- καρβοξυτελικό άκρο (PDZ και θέσεις φωσφορυλίωσης). Η ερευνητική ομάδα του Ohtake (Ohtake, Park et al. 2014) κατασκεύασε πέντε ειδικά ανταγωνιστικά πεπτίδια για τις περιοχές αυτές (PAP1-5) τα οποία έχουν τη δυνατότητα να διεισδύουν στα κύτταρα της τραυματισμένης σπονδυλικής στήλης μέσω μίας αλληλουχίας TAT που διαθέτουν.

Σε *in vitro* πειράματα με DRG-νευρώνες, χορήγηση χαμηλών δόσεων των PAP1-4 (αλλά όχι του PAP5) επέφερε σημαντική αξονική αύξηση σε ανασταλτικά υποστρώματα μέσω απενεργοποίησης της PTEN. Θετικά αποτελέσματα φάνηκαν και σε ενήλικες επίμυες με ραχιαία τομή στον θωρακικό σπόνδυλο T7. Χορήγηση των PAPs 1-4, για πρώτη φορά στις δύο μέρες μετά το ατύχημα και έπειτα καθημερινά για δύο εβδομάδες, οδήγησε σε ενεργοποίηση των AKT και mTOR και επιπλέον, τα PAP2 και PAP4 βελτίωσαν σημαντικά την ανάπτυξη των καθοδικών σεροτονινεργικών δικτύων και την αποκατάσταση της κινητικής λειτουργίας των ζώων (Ohtake, Park et al. 2014).

Σήμερα, πολλά φάρμακα τα οποία έχουν εγκριθεί από τον FDA για χορήγηση σε ανθρώπους και αφορούν σοβαρές παθολογίες, αποτελούν πεπτίδια. Επομένως, ο σχεδιασμός αυτών των ειδικών ανταγωνιστικών πεπτιδίων για την PTEN και τα ελπιδοφόρα αποτελέσματά τους σε *in vivo* πειράματα ανοίγουν τον δρόμο για την κατασκευή νέων πεπτιδικών φαρμάκων που πιθανόν θα συμβάλουν στην αντιμετώπιση των τραυμάτων της σπονδυλικής στήλης.

Δράσεις ανεξάρτητες του mTOR- Απενεργοποίηση του GSK3

Απαλοιφή του γονιδίου TSC1 σε γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς μετά από ατύχημα στο οπτικό νεύρο, οδηγεί σε σημαντική αύξηση της επιβίωσης και αναγέννησης των αξόνων. Ωστόσο η έκταση της αναγέννησης είναι ασθενέστερη από αυτή που παρατηρείται με απαλοιφή της PTEN στα ίδια κύτταρα (Park, Liu et al. 2008). Το αποτέλεσμα αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πιθανόν άλλοι καθοδικοί στόχοι της PTEN, πλην του mTOR, εμπλέκονται στην αξονική αναγέννηση (Park, Liu et al. 2010).

Ένας τέτοιος σημαντικός καθοδικός στόχος της φωσφατάσης PTEN είναι η κινάση GSK-3. Η GSK-3 είναι μία πρωτεϊνική κινάση σερίνης/ θρεονίνης η οποία διαθέτει πλήθος υποστρωμάτων και συμμετέχει σε κρίσιμες κυτταρικές διαδικασίες όπως

είναι η ρύθμιση της απόπτωσης. Στα θηλαστικά εμφανίζεται σε δύο ισομορφές, την GSK-3α και την GSK-3β. Η ενεργοποιημένη από την PI3K, AKT επάγει την φωσφορυλίωση της GSK-3 και με αυτό τον τρόπο την απενεργοποιεί. Η GSK-3 μπορεί να φωσφορυλιώσει και να ενεργοποιήσει πολλά μόρια τα οποία συμμετέχουν στο μονοπάτι PI3K/ AKT/ mTOR όπως την TSC2, την PTEN αλλά και την ίδια την AKT (Hermida, Dinesh Kumar et al. 2017). Απαλοιφή της PTEN, οδηγεί σε υπερενεργοποίηση της AKT και επομένως απενεργοποίηση της GSK3.

Πράγματι, απενεργοποίηση της GSK-3β, οδήγησε σε εκβλάστηση νευρώνων σε ανασταλτικά υποστρώματα μυελίνης και CSPGs *in vitro* και ενίσχυσε την δημιουργία και επιμήκυνση DRG- αξόνων σε ενήλικες επίμυες (Dill, Wang et al. 2008).

Αντίστοιχα αποτελέσματα φάνηκαν και σε ζωικά μοντέλα τραύματος της σπονδυλικής στήλης. Χορήγηση λιθίου, ενός γνωστού αναστολέα της GSK3-β, συστηματικά για τρεις εβδομάδες σε αρουραίους με τραύμα στη σπονδυλική στήλη, οδήγησε σε αξονική αύξηση των CST- ινών και βελτίωση της κινητικότητας των ζώων, όπως μετρήθηκε σε τεστ BBB. Επειδή το λίθιο αναστέλλει και άλλα ένζυμα πέραν της GSK-3, τα ίδια πειράματα πραγματοποιήθηκαν και με τον ειδικό αναστολέα της GSK-3, SB415286, και έδωσαν αντίστοιχα αποτελέσματα (Dill, Wang et al. 2008).

Το λίθιο μέσω αναστολής της κινάσης GSK-3 ενισχύει τη δράση της χονδροϊτινάσης ChABC στην αναγέννηση (Yick, So et al. 2004). Ωστόσο, καθώς στοχεύει και άλλα ένζυμα πέρα από την κινάση GSK-3, δεν μπορεί να εξακριβωθεί απολύτως ο τρόπος με τον οποίο δρα μετά από τραύματα στο ΚΝΣ. Πρόσφατα πειράματα έδειξαν ότι ασκεί νευροπροστατευτική δράση και μέσω επαγωγής της αυτοφαγίας των κυττάρων μετά από το τραύμα (Zhang, Wang et al. 2018).

Το ανθρακικό λίθιο (Li_2CO_3) δοκιμάστηκε σε κλινική μελέτη Φάσης I, χορηγούμενο από του στόματος και αποδείχθηκε ασφαλές και καλά ανεκτό, με ήπιες ανεπιθύμητες ενέργειες, σε άτομα με χρόνιο τραυματισμό στη σπονδυλική στήλη (Wong, Tam et al. 2011). Αργότερα ελέγχθηκε και η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου σε διπλά τυφλή, τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη Φάσης II, με χρήση placebo ως δείκτη. Ωστόσο, τα αποτελέσματα της μελέτης δεν ήταν ενθαρρυντικά. Συγκεκριμένα χορήγηση ανθρακικού λιθίου για έξι εβδομάδες σε ασθενείς με χρόνια τραύματα στη σπονδυλική στήλη, δε βελτίωσε την κινητική και αισθητική λειτουργικότητα, μείωσε όμως τον νευροπαθητικό πόνο των ασθενών (Yang, Li et al. 2012).

Να σημειωθεί ότι ο ρόλος της GSK-3 στη νευρική αναγέννηση είναι αμφιλεγόμενος. Σε αντίθεση με το ΚΝΣ, ενεργοποίηση της GSK-3 στο ΠΝΣ, φαίνεται πως επάγει τη νευρική αναγέννηση και επιβίωση μετά από τραυματισμό (Diekmann and Fischer 2015) (Leibinger, Andreadaki et al. 2017).

Το παράδοξο αποτέλεσμα της Ραπαμυκίνης

Η Ραπαμυκίνη (Rapamycin ή Sirolimus) είναι μία ουσία που παράγεται από το βακτήριο *Streptomyces hygroscopicus* και παρουσιάζει ισχυρή ανοσοκατασταλτική δράση. Χρησιμοποιείται κυρίως για την αποφυγή της απόρριψης μοσχευμάτων του νεφρού. Επίσης αποτελεί ισχυρό ειδικό αναστολέα του συμπλέγματος mTORC1 και για το λόγο αυτό δοκιμάζεται σε πειράματα για τη μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/ AKT/ mTOR.

Πολλά πειράματα δείχνουν ότι η χορήγηση Ραπαμυκίνης μετά από τραύμα στην ΣΣ έχει νευροπροστατευτική δράση. Πιο συγκεκριμένα, η Ραπαμυκίνη μέσω αναστολής του μονοπατιού του mTOR, επάγει την αυτοφαγία των κυττάρων και περιορίζει την ιστική καταστροφή. Επίσης, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* η Ραπαμυκίνη μειώνει την φλεγμονή και τον πολλαπλασιασμό των αστροκυττάρων και βελτιώνει την αξονογένεση στο σημείο του τραύματος (Goldshmit, Kanner et al. 2015).

Συνολικά, τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η απενεργοποίηση του mTOR έχει νευροπροστατευτική δράση και αντικρούουν τα πειράματα που προαναφέρθηκαν τα οποία αποδεικνύουν ότι η ενεργοποίηση του mTOR επάγει την αξονική αναγέννηση! Πιθανόν μία λεπτή ισορροπία μεταξύ ενεργοποίησης και αναστολής του μονοπατιού να είναι απαραίτητη προκειμένου να διατηρηθεί η νευρωνική επιβίωση και να επαχθεί η νευρωνική αναγέννηση. Είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθούν περαιτέρω μελέτες με αναστολή και επαγωγή του mTOR προκειμένου να εξακριβωθεί ο ρόλος του στα γεγονότα που ακολουθούν τα τραύματα της σπονδυλικής στήλης και να σχεδιαστούν αποτελεσματικές θεραπευτικές προσεγγίσεις (Don, Tsang et al. 2012).

2.2.3 JAK/ STAT/ SOCS3

Το σηματοδοτικό μονοπάτι JAK/ STAT

Το μονοπάτι JAK/ STAT είναι ένα ενδοκυττάριο σηματοδοτικό μονοπάτι, υπεύθυνο για την μεταφορά πληροφορίας από το εξωτερικό περιβάλλον σε επαγωγείς γονιδιακής έκφρασης στον πυρήνα. Στο μονοπάτι εμπλέκονται δυο σημαντικές οικογένειες πρωτεϊνών: οι κινάσες JAK (Janus Kinases) και οι πρωτεΐνες STAT (Signal Transducer and Activators of Transcription). Στα θηλαστικά, η οικογένεια των κινασών Janus αποτελείται από 4 κυτοπλασματικές τυροσινικές κινάσες (JAK₁, JAK₂, JAK₃ και TYK₂) και η οικογένεια STAT από 7 μεταγραφικούς παράγοντες (STAT₁, STAT₂, STAT₃, STAT₄, STAT_{5a}, STAT_{5b} και STAT₆).

Το μονοπάτι ξεκινά με την ενεργοποίηση ενός υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης από ορμόνες, κυτοκίνες ή αυξητικούς παράγοντες και την επακόλουθη ενεργοποίηση των κινασών Janus. Οι ενεργοποιημένες JAKs, επάγουν την φωσφορυλίωση καθοδικών στόχων, συμπεριλαμβανομένων και των παραγόντων STAT που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Μόλις φωσφορυλιωθούν, οι μεταγραφικοί παράγοντες STAT διμερίζονται και μεταφέρονται στον πυρήνα όπου επιδρούν στην μεταγραφή διαφόρων γονιδίων.

Εκτός από τις οικογένειες JAK και STAT, στο μονοπάτι συμμετέχει πλήθος άλλων μορίων, τα οποία ασκούν είτε θετική είτε αρνητική δράση στη σηματοδότηση. Οι πιο γνωστοί επαγωγείς του μονοπατιού είναι τα μόρια STAMs (Signal- Transducing Adapter Molecules), οι πρωτεΐνες StIPs (STAT- Interacting Proteins) και μέλη της οικογένειας SH2B/ Lnk/ APS. Εξίσου σημαντικοί στη ρύθμιση της σηματοδότησης είναι και οι αναστολείς του μονοπατιού, όπως οι πρωτεΐνες SOCS (Suppressors Of Cytokine Signaling), οι PIAS (Protein Inhibitors of Activated STAT) και οι PTPs (Protein Tyrosine Phosphatases) (Rawlings, Rosler et al. 2004).

Από τα παραπάνω μόρια, οι πρωτεΐνες SOCS ή SSIs (STAT- Induced STAT Inhibitors) φαίνεται να σχετίζονται περισσότερο με τα γεγονότα που ακολουθούν τα τραύματα της σπονδυλικής στήλης και έχουν μελετηθεί εκτενώς σε σχετικές προκλινικές μελέτες. Η οικογένεια SOCS αποτελείται από 8 μέλη (SOCS₁₋₇ και CIS) τα οποία αναστέλλουν το μονοπάτι JAK/ STAT μέσω μίας αρνητικής ανατροφοδότησης. Πιο συγκεκριμένα, οι ενεργοποιημένες STATs επάγουν τη μεταγραφή των γονιδίων των πρωτεϊνών SOCS και αυτές με τη σειρά τους δένονται στις ενεργοποιημένες JAKs και τους υποδοχείς τους, ασκώντας ανασταλτική δράση στο μονοπάτι (Rawlings, Rosler et al. 2004).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το εν λόγω σηματοδοτικό μονοπάτι αλληλεπιδρά με άλλα σημαντικά μονοπάτια, σε διάφορα στάδια και με ποικίλους τρόπους. Η καλύτερα μελετημένη αλληλεπίδραση είναι αυτή με το μονοπάτι των MAP κινασών. Οι ενεργοποιημένες JAKs, μπορούν να ενεργοποιήσουν το μονοπάτι Ras/ MAPK, τόσο άμεσα, μέσω των επαγωγέων SHP-2 και Shc όσο και έμμεσα, μέσω της πρωτεΐνης SOCS₃. Αντίστοιχα, τυροσινικοί

υποδοχείς του μονοπατιού RTK/ Ras/ MAPK μπορούν να ενεργοποιήσουν τους παράγοντες STAT, με τρόπο ανεξάρτητο από τις JAKs και επιπλέον, οι κινάσες MAPK αυξάνουν δραστικά τη μεταγραφική ιδιότητα κάποιων STATs.

Άλλη σημαντική αλληλεπίδραση του μονοπατιού JAK/ STAT αποτελεί αυτή με την πρωτεΐνη PI3K. Πιο συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες JAK μπορούν να ενεργοποιήσουν το μονοπάτι της PI3K μέσω των μορίων IRS (Insulin Receptor Substrate) και p85. Τέλος, δεδομένα αποδεικνύουν και την αλληλεπίδραση του JAK/STAT με το μονοπάτι του TGF-β αλλά και με μεταγραφικούς παράγοντες από άλλα μονοπάτια. (Rawlings, Rosler et al. 2004).

Το μονοπάτι έχει κρίσιμο ρόλο σε πολλά είδη κυττάρων και συμμετέχει ενεργά σε διαδικασίες κυτταρικού πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης, μετανάστευσης και απόπτωσης. Ανωμαλίες στη ρύθμιση του μονοπατιού έχουν συσχετιστεί με παθολογικές καταστάσεις όπως νευροεκφυλιστικές και καρδιαγγειακές παθήσεις, ανωμαλίες του ανοσοποιητικού συστήματος και ογκογένεση (Rawlings, Rosler et al. 2004, Nicolas, Amici et al. 2013).

Στο ΚΝΣ, η έκφραση των JAKs και των STATs είναι αρκετά ασθενής σε σχέση με άλλα συστήματα, ωστόσο εμφανίζονται σε μικρή ποσότητα σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου, όπως ο ιππόκαμπος, ο υποθάλαμος, ο φλοιός και η παρεγκεφαλίδα. Το μονοπάτι συμμετέχει στον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση των νευρικών κυττάρων, ρυθμίζει την έκκριση ορμονών και πεπτιδίων από δομές του ΚΝΣ και παίζει ρόλο σε διαδικασίες που αφορούν τη συναπτική πλαστικότητα και τη λειτουργία υποδοχέων (Nicolas, Amici et al. 2013).

Μετά από τραύματα στο ΚΝΣ, έχει αποδειχθεί ότι το εν λόγω μονοπάτι σχετίζεται με τον σχηματισμό της ουλής στο σημείο του τραύματος και επηρεάζει την αναγέννηση των κατεστραμμένων αξόνων.

Ενεργοποίηση του μονοπατιού μετά από τραύμα στη σπονδυλική στήλη

Ένα από τα σημαντικά γεγονότα που ακολουθούν τον τραυματισμό της ΣΣ είναι η δραστική αύξηση της έκκρισης κυτοκινών (IL-6, IL-11, OSM, LIF, TNF-a, TNF-b1 κ.α.) και τροφικών παραγόντων (BDNF, NGF, CTNF κ.α.). Όπως προαναφέρθηκε, πολλοί από τους παράγοντες αυτούς ενεργοποιούν το μονοπάτι JAK/ STAT στα κύτταρα. Το γεγονός αυτό οδήγησε πολλούς ερευνητές στη μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού και στη διερεύνηση του πιθανού ρόλου του στις διαδικασίες αναγέννησης των νευρώνων του ΚΝΣ.

Ιδιαίτερα μελετήθηκε η ενεργοποίηση του μονοπατιού από την Ιντερλευκίνη 6 (IL-6), καθώς ήταν γνωστή η έντονη αύξηση της έκφρασής της μετά από τραύματα της ΣΣ και επίσης, πειράματα σε DRG-νευρώνες έδειξαν ότι η αναγέννηση των τραυματισμένων νευραξόνων αποτυγχάνει απουσία της IL-6 (Cafferty, Gardiner et al. 2004). Η IL-6, ενεργοποιεί την κινάση JAK₁, η οποία με τη σειρά της

φωσφορυλιώνει τους παράγοντες STAT₁ και STAT₃. Ωστόσο η έρευνα επικεντρώθηκε κυρίως στη μελέτη του STAT₃, καθώς μετά το ατύχημα παρουσιάζει μεγαλύτερη διάρκεια ενεργοποίησης, συγκριτικά με τον STAT₁ και επιπλέον, η ενεργοποιημένη μορφή του (pSTAT₃), εντοπίζεται στον πυρήνα μετά το ατύχημα ενώ ο pSTAT₁ μόνο στο κυτταρόπλασμα (Yamauchi, Osuka et al. 2006), (Osuka, Watanabe et al. 2011), (Tapia, Herrera-Rojas et al. 2017).

Ο STAT₃ εκφράζεται φυσιολογικά σε νευρώνες και κύτταρα γλοίας στη σπονδυλική στήλη (Cattaneo, Conti et al. 1999) αλλά κατά το μεγαλύτερο ποσοστό του δεν είναι ενεργός (φωσφορυλιωμένος). Ωστόσο, μετά από τραύμα στον εγκέφαλο ή την σπονδυλική στήλη, ο παράγοντας φωσφορυλιώνεται στο κατάλοιπο Tyr705 (Yamauchi, Osuka et al. 2006) και συμμετέχει ενεργά στο σχηματισμό της ουλής και στη μείωση της φλεγμονής (Herrmann, Imura et al. 2008). Απαλοιφή του παράγοντα STAT₃ μετά από τραύματα της ΣΣ οδηγεί σε μειωμένη μετανάστευση αστροκυττάρων, επέκταση της φλεγμονής, έντονη απομυελίνωση και δραστική μείωση της κινητικής λειτουργικότητας (Okada, Nakamura et al. 2006).

Πειράματα με τον αναστολέα της JAK₂ ή με απαλοιφή του SOCS₃

Ο σημαντικός ρόλος του ενεργοποιημένου παράγοντα STAT₃ στα γεγονότα που ακολουθούν τα τραύματα της ΣΣ, επιβεβαιώθηκε με πειράματα με τον αναστολέα της κινάσης JAK₂, AG-490. Αυτά τα πειράματα επιβεβαίωσαν τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* ότι ο pSTAT₃, επάγει την αναγέννηση των τραυματισμένων νευραξόνων (Qiu, Cafferty et al. 2005) και συμβάλλει στη βελτίωση της κινητικής λειτουργικότητας μετά από τον τραυματισμό, όπως μετριέται στην κλίμακα BBB (Yamauchi, Osuka et al. 2006).

Αντίστοιχα αποτελέσματα φάνηκαν και με πειράματα απαλοιφής (deletion) της πρωτεΐνης SOCS₃. Όπως προαναφέρθηκε, η πρωτεΐνη SOCS₃ ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών SOCS οι οποίες αναστέλλουν το μονοπάτι JAK/ STAT. Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση της SOCS₃ επάγεται από κυτοκίνες (όπως η IL-6 και η IL-10) και η SOCS₃ με τη σειρά της αναστέλλει την κινάση JAK₂ και επομένως εμποδίζει την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης STAT₃.

Απαλοιφή λοιπόν της SOCS₃ έχει ως αποτέλεσμα την παρατεταμένη έκφραση της STAT₃ στα αντιδραστικά αστροκύτταρα, γεγονός που οδηγεί σε σημαντική επούλωση της ουλής και βελτίωση της κινητικής λειτουργικότητας (Leung, Pankhurst et al. 2010).

Επίσης, *in vivo* πειράματα σε ποντίκια με τραύματα οπτικών νεύρων, αποκάλυψαν ότι η διαγραφή του παράγοντα SOCS₃ μέσω knock-out σε ενήλικα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς συμβάλλει στη νευρωνική επιβίωση και επάγει έντονη αναγέννηση των τραυματισμένων νευρώνων, με τρόπο εξαρτώμενο από το

gp-130. Ταυτόχρονη χορήγηση του τροφικού παράγοντα CNTF αυξάνει περαιτέρω την αναγέννηση αυτή (Smith, Sun et al. 2009).

Αλληλεπιδράσεις με άλλα μονοπάτια

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το μονοπάτι JAK/ STAT έχει την ιδιαιτερότητα να αλληλεπιδρά έντονα με άλλα μονοπάτια. Μόλις επιβεβαιώθηκε ο ρόλος του ενεργοποιημένου παράγοντα STAT₃ στην αναγέννηση των νευρώνων μετά από τραυματισμό, διερευνήθηκε πιθανή συνέργεια του παράγοντα αυτού με άλλα μόρια που εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια με τα οποία αλληλεπιδρά το μονοπάτι JAK/ STAT.

Πράγματι, διαπιστώθηκε ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων αυτών. Μετά από ατύχημα σε οπτικό νεύρο πειράματα με ταυτόχρονη απαλοιφή των παραγόντων SOCS₃ και PTEN δείχνουν ότι υπάρχει συνέργεια των δύο παραγόντων, καθώς παρατηρείται αυξημένος αριθμός αξόνων που αναγεννώνται και μάλιστα σε μεγαλύτερη απόσταση από το τραύμα σε σχέση με απαλοιφή μόνο του PTEN ή μόνο του SOCS₃ (και στις δυο μεμονωμένες απαλοιφές, η αναγέννηση που επιτυγχάνεται έχει περίπου την ίδια έκταση). Σε γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς στα οποία είχε πραγματοποιηθεί απαλοιφή του παράγοντα PTEN, η έκφραση του φωσφορυλιωμένου pSTAT₃ ήταν σχεδόν ανύπαρκτη, ακριβώς όπως είναι και φυσιολογικά. Επίσης η έκταση της αναγέννησης ήταν ίδια σε ζώα με απαλοιφή PTEN, με απαλοιφή PTEN/ STAT₃ και PTEN/ gp130, πράγμα που σημαίνει ότι μάλλον ο παράγοντας STAT₃ δεν είναι σημαντικός ρυθμιστής στην απαλοιφή του PTEN. Επιπλέον, χορήγηση Ραπαμυκίνης, του ειδικού αναστολέα του mTOR, δεν επηρέασε τη νευρική αναγέννηση σε RGCs με SOCS₃ απαλοιφή. Τα αποτελέσματα αυτά συλλογικά δείχνουν ότι τα δυο σηματοδοτικά μονοπάτια ρυθμίζουν τη νευρική αναγέννηση με ανεξάρτητο τρόπο (Sun, Park et al. 2011).

Επίσης, άλλα πειράματα έδειξαν ότι ο μεταγραφικός παράγοντας KLF₄ είναι ένας ενδογενής αναστολέας του ενεργοποιημένου STAT₃, καθώς αλληλεπιδρά ειδικά με τη φωσφορυλιωμένη μορφή του STAT₃ τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα και επηρεάζει την ικανότητά του τελευταίου να δένεται στο DNA. Πειράματα με μοντέλο τραύματος σε οπτικό νεύρο έδειξαν ότι απαλοιφή του παράγοντα KLF₄, επάγει τη νευρωνική αναγέννηση και επιβίωση των τραυματισμένων RGCs, μέσω του μονοπατιού JAK/ STAT₃. Επιπλέον, ταυτόχρονη απαλοιφή των παραγόντων KLF₄ και SOCS₃ προκαλεί αυξημένη αξονική αναγέννηση (Qin, Zou et al. 2013).

Τέλος, όσον αφορά την αλληλεπίδραση με το μονοπάτι των MAP κινασών, φαίνεται ότι η αστρογλοίωση η οποία επάγεται από το μονοπάτι JAK/ STAT, είναι ωφέλιμη στην αναγέννηση και συμβάλλει στην αποκατάσταση, ενώ η αστρογλοίωση που επάγεται από τη δράση του μονοπατιού των MAPK- κινασών,

αναστέλλει την αναγέννηση των κατεστραμμένων αξόνων (Leung, Pankhurst et al. 2010).

Μελλοντικά πειράματα

Το μονοπάτι JAK/ STAT, έχει συσχετιστεί με πλήθος σοβαρών παθολογικών καταστάσεων και για το λόγο αυτό πολλοί αναστολείς των κινασών Janus έχουν δοκιμαστεί σε κλινικές δοκιμές. Μάλιστα πολλοί από αυτούς έχουν εγκριθεί (Jakinibs) και κυκλοφορούν στην αγορά για την αντιμετώπιση ασθενειών όπως ο καρκίνος, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ατοπική δερματίτιδα, η αλωπεκία, η λεύκη κ.α.

Ωστόσο, ακόμα δεν έχει σχεδιαστεί κλινική μελέτη που να αφορά επαγωγείς του μονοπατιού ή αναστολείς των αναστολέων του. Δεδομένου ότι, πλήθος προκλινικών μελετών έχουν αποδείξει ότι η επαγωγή του μονοπατιού JAK/ STAT από κυτοκίνες έχει θετικά αποτελέσματα στη νευρική αναγέννηση μετά από τραύματα της ΣΣ, κρίνεται αναγκαίος ο σχεδιασμός κλινικών δοκιμών με μόρια-επαγωγείς των κινασών Janus ή αναστολείς των αναστολέων τους, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν τα ελπιδοφόρα αυτά πειραματικά αποτελέσματα «μεταφράζονται» στην κλινική πρακτική.

2.2.4 RhoA/ROCK

Το μονοπάτι RhoA/ ROCK

Η οικογένεια των πρωτεϊνών Rho, αποτελείται από μικρές GTPάσες (μοριακού βάρους περίπου 21 kDa) και ανήκει στην υπεροικογένεια των πρωτεϊνών Ras. Στα θηλαστικά έχουν ταυτοποιηθεί 20 πρωτεΐνες Rho, οι οποίες διακρίνονται σε 8 υποοικογένειες: Rho (RhoA, RhoB, RhoC), Rac (Rac1, Rac2, Rac3, RhoG), Cdc42 (Cdc42, RhoQ, RhoJ), Rnd (Rnd1, Rnd2, Rnd3), RhoF (RhoD, RhoF), RhoBTB (RhoBTB1, RhoBTB2), RhoUV (RhoU, RhoV) και RhoH.

Οι πρωτεΐνες Rho διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πλήθος διαδικασιών όπως: μεταγραφή γονιδίων, κυτταρική επιβίωση και απόπτωση. Οι καλύτερα μελετημένες πρωτεΐνες είναι οι Cdc42, Rac1 και RhoA και είναι διάσημες για τη δράση τους στην ρύθμιση της δυναμικής του κυτταροσκελετού. Πιο συγκεκριμένα, η Rac1 επάγει το σχηματισμό των λαμελιποδίων, η Cdc42, τη δημιουργία φιλοποδίων και η RhoA ρυθμίζει τη διαμόρφωση των ινιδίων τάσης ακτίνης (stress fibers). Οι ιδιότητές τους αυτές, καθιστούν τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες σημαντικούς ρυθμιστές της νευρικής μορφολογίας. Πράγματι παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία νευρικών αυξητικών κώνων, στο σχηματισμό δενδριτικών ακάνθων (dendritic spines) και στην καθοδήγηση των νευραξόνων. Πολλές μελέτες έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες RhoA και Rac1 συμμετέχουν σε διαδικασίες που αφορούν την επιβίωση και την ανάπτυξη των νευρικών κυττάρων και μάλιστα φαίνεται πως δρουν ανταγωνιστικά στις διαδικασίες αυτές. Ακόμα, μέλη των υποοικογενειών Rho και Rac, έχουν συσχετιστεί με την ανικανότητα των

νευρώνων να αναγεννώνται μετά από τραύματα στο ΚΝΣ (Stankiewicz and Linseman 2014). Από τα τρία μέλη της υποοικογένειας πρωτεϊνών Rho η έρευνα σχετικά με την αναγέννηση των νευραξόνων επικεντρώθηκε στην RhoA, καθώς στους νευρώνες η έκφρασή της είναι υψηλότερη συγκριτικά με τους άλλους υποτύπους, RhoB και RhoC (Lehmann, Fournier et al. 1999).

Πέρα από τα τραύματα του ΚΝΣ, ανωμαλίες στη ρύθμιση των πρωτεϊνών Rho οδηγούν σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις όπως νόσος Αλτσχάιμερ, νόσος Huntington, Αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση, νόσος Parkinson, εγκεφαλικό, φλεγμονές κ.α. (Mueller, Mack et al. 2005).

Όπως όλες οι μικρές GTPάσες, οι πρωτεΐνες Rho βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα σε δύο μορφές: μία ενεργή συνδεδεμένη με GTP μορφή (Rho-GTP) και μία ανενεργή μορφή στην οποία φτιάχνουν σύμπλεγμα με το GDP (Rho-GDP). Στην ενεργή τους μορφή οι πρωτεΐνες Rho αλληλεπιδρούν με άλλα μόρια- τελεστές και τα ενεργοποιούν. Από τους πιο σημαντικούς καθοδικούς στόχους της πρωτεΐνης Rho, είναι οι κινάσες ROCK (Rho- associated protein kinases). Πρόκειται για κινάσες σερίνης- θρεονίνης οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια κινασών AGC και δρουν κυρίως στον κυτταροσκελετό. Στα θηλαστικά έχουν ταυτοποιηθεί δύο κινάσες ROCK, η ROCK1 και η ROCK2. Η έκφραση της ROCK1 είναι μεγαλύτερη σε μη νευρικούς ιστούς, όπως η καρδιά και οι πνεύμονες, ενώ η ROCK2 συναντάται κυρίως στον εγκέφαλο και τη σπονδυλική στήλη.

Η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών Rho και επομένως και η δράση τους, ρυθμίζεται από μόρια τα οποία επηρεάζουν τον κύκλο GTP/ GDP. Σε αυτά ανήκουν οι παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης- GEFs (guanine nucleotide exchange factors), οι οποίοι διευκολύνουν τη σύνδεση του GTP έναντι του GDP, οι πρωτεΐνες που ενεργοποιούν τις GTPάσες- GAPs (GTPase- activating proteins), οι οποίες συμμετέχουν στην υδρόλυση του GTP και οι ανασταλτικοί παράγοντες αποδέσμευσης νουκλεοτιδίων γουανίνης- GDIs (guanine nucleotide dissociation inhibitors) που εμποδίζουν τη σύνδεση του GTP και επιπλέον μεταφέρουν τις πρωτεΐνες Rho από τη μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα.

Ενεργοποίηση της RhoA μετά από τραύμα στη σπονδυλική στήλη

Μετά από τραυματισμό της σπονδυλικής στήλης παρατηρείται σημαντική αύξηση των επιπέδων της RhoA τόσο σε νευρώνες όσο και σε κύτταρα γλοίας. Υπεύθυνοι για αυτή την αύξηση είναι οι γνωστοί ανασταλτικοί εξωγενείς παράγοντες της μυελίνης, Nogo, MAG και OMGPs, οι οποίοι μέσω του κοινού υποδοχέα τους NgR, μεταβάλλουν τα επίπεδα της Rho με τρόπο εξαρτώμενο από τον νευροτροφικό υποδοχέα p75 (p75^{NTR}) (Winton, Dubreuil et al. 2002, Yamashita, Higuchi et al. 2002). Στο σύμπλεγμα NgR-p75^{NGR} συμμετέχει και ο υποδοχέας Lingo-1. Ο p75 επάγει την απελευθέρωση της RhoA από το RhoGDI και επομένως την ενεργοποίησή της. Η ενεργοποιημένη RhoA δένεται στην αλληλουχία RBD (Rho Binding Domain) της κινάσης ROCK και την ενεργοποιεί. Η ROCK με τη σειρά της

επάγει την ενεργοποίηση μέσω φωσφορυλίωσης της κινάσης LIM, η οποία απενεργοποιεί την κοφιλίνη, της MLC και του παράγοντα CRMP-2, ο οποίος αναστέλλει τον πολυμερισμό της τουμπουλίνης. Η ROCK2 επάγει επίσης τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών ERM που λειτουργούν σαν «γέφυρες» μεταξύ της πλασματικής μεμβράνης και του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Συνολικά αυτά τα γεγονότα οδηγούν σε αναστολή της αξονικής αύξησης (Fujita and Yamashita 2014).

Ενεργοποίηση της RhoA από τα ανασταλτικά υποστρώματα παρατηρείται επίσης και από άλλους παράγοντες όπως οι σεμαφορίνες και οι εφρίνες, αλλά με μηχανισμό ανεξάρτητου του p75 και καταλήγουν πάλι σε ενεργοποίηση της κινάσης ROCK και αναστολή της αξονικής αύξησης (Shirvan, Kimron et al. 2002).

Πρώτα πειράματα

Η πεποίθηση ότι οι πρωτεΐνες Rho σχετίζονται με την αναστολή της αξονικής αύξησης άρχισε να σχηματίζεται με πειράματα που έδειξαν ότι το λυσοφωσφατιδικό οξύ (LPA), το οποίο ενεργοποιεί τις Rho, προκαλεί ανάκληση (retraction) των νευρώνων και κατάρρευση του νευρικού αυξητικού κώνου (Jalink, Corven et al. 1994),(Kato, Aoki et al. 1998). Βασιζόμενη σε αυτά τα αποτελέσματα, η ερευνητική ομάδα των Lehmann και Fournier (Lehmann, Fournier et al. 1999), πραγματοποίησε πειράματα ανάπτυξης νευρώνων σε ανασταλτικά υποστρώματα. Τα πειράματα αυτά απέδειξαν τόσο *in vitro* -σε PC12 κύτταρα και πρωτογενείς νευρώνες- όσο και *in vivo* -σε ενήλικες αρουραίους με τραύματα στο οπτικό νεύρο- ότι απενεργοποίηση της Rho επάγει την αναγέννηση των νευραξόνων σε ανασταλτικά υποστρώματα MAG και μυελίνης. Η αναστολή της Rho πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του ενζύμου C3 τρανσφεράση (C3), το οποίο προέρχεται από το βακτήριο *Clostridium botulinum*. Το C3 είναι ικανό να αναστέλλει μέσω ADP-ριβοζυλίωσης αποκλειστικά την υποοικογένεια πρωτεϊνών Rho, δηλαδή τις RhoA, RhoB και RhoC. Εντυπωσιακό είναι το γεγονός ότι η C3 καταφέρνει να επαναπροσλαμβάνεται από τα ευκαρυωτικά κύτταρα χωρίς να διαθέτει αλληλουχία σύνδεσης και επαναπρόσληψης. Πλέον είναι γνωστό ότι υπεύθυνη για την κυτταρική σύνδεση της C3 και την επαναπρόσληψή της από τους νευρώνες είναι η μικρή πρωτεΐνη βιμεντίνη που ανήκει στα ενδιάμεσα ινίδια (Rohrbeck, Schroder et al. 2014), (Adolf, Leondaritis et al. 2016).

Σε επόμενα πειράματα, χρησιμοποιήθηκε εκτός από την C3 τρανσφεράση και ο παράγοντας Y-27632 ο οποίος ανταγωνίζεται τη θέση πρόσδεσης του ATP και προκαλεί με τον τρόπο αυτό αναστολή των κινάσεων ROCK. Ένα από αυτά τα πειράματα έδειξε *in vivo* σε ενήλικα ποντίκια με κάκωση στον T7 σπόνδυλο, ότι θεραπεία με C3 ή Y-27632 προκαλεί εκβλάστηση (sprouting) αξόνων στο σημείο της ουλής και στη ραχιαία λευκή ουσία. Η θεραπεία με C3 φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματική από αυτή με Y-27632, καθώς οι αναγεννημένοι άξονες επεκτείνονται σε μεγαλύτερη έκταση. Αυτό υποδηλώνει ότι ο C3 πιθανώς απενεργοποιεί και άλλους επαγωγείς του Rho. Εντυπωσιακά αποτελέσματα

φάνηκαν και σε δοκιμασίες ανοιχτού πεδίου, καθώς τα ποντίκια που είχαν δεχτεί θεραπεία με κάποιον από τους δύο αναστολείς εμφάνισαν καλύτερη κινητική λειτουργικότητα (στην κλίμακα BBB) από τις πρώτες 24 ώρες, η οποία βελτιωνόταν συνεχώς κατά τον πρώτο μήνα μετά το ατύχημα (Dergham, Ellezam et al. 2002).

Συνολικά τα πειράματα αυτά επιβεβαίωσαν ότι η αναστολή είτε της Rho είτε της ROCK είναι επαρκής συνθήκη για την ανάπτυξη αξόνων σε ανασταλτικά υποστρώματα και προκαλεί βελτίωση της νευρολογικής λειτουργίας μετά από τραυματισμό της σπονδυλικής στήλης.

Από το C3 στο VX-210

Τα τελευταία χρόνια πραγματοποιήθηκαν πολλά πειράματα με ανασυνδυασμένες χημικικές πρωτεΐνες που μοιάζουν με την C3, ικανές να διαπερνούν το κυτταρικό τοίχωμα. Όλες οι πρωτεΐνες αυτές κατάφεραν να αναστείλουν την RhoA-GTP και βελτίωσαν τη νευρωνική εκβλάστηση και την αύξηση των αξόνων (Winton, Dubreuil et al. 2002).

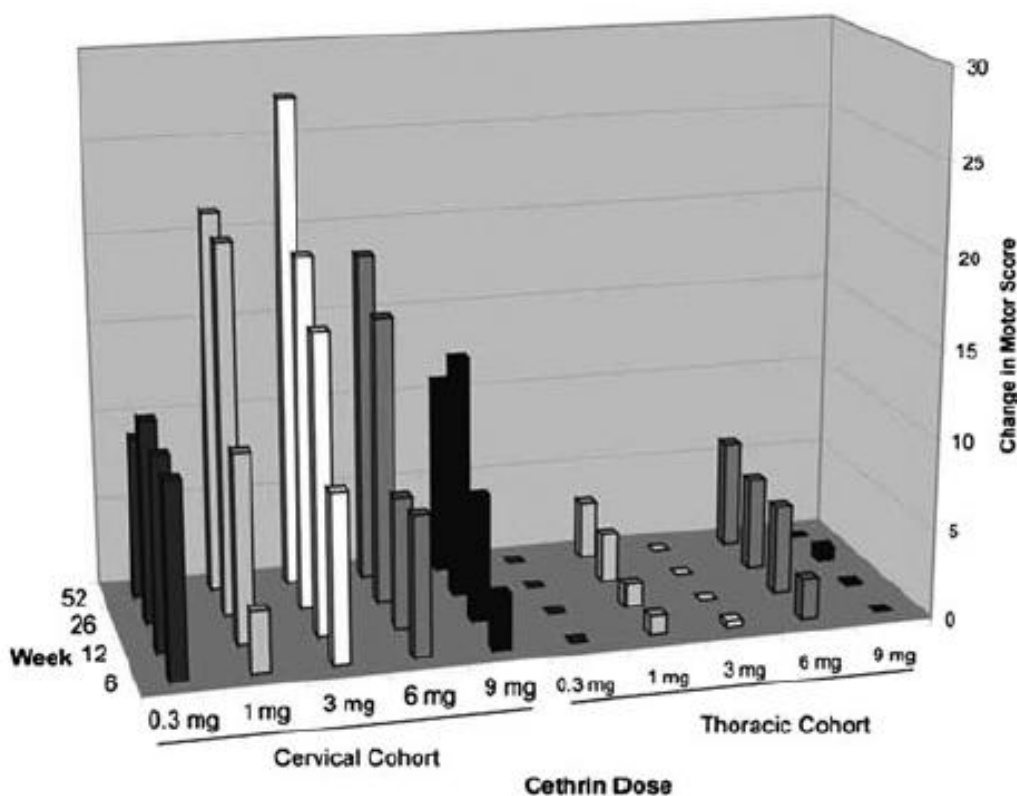
Η ερευνητική ομάδα των Lord- Fontaine κ.α. (Lord-Fontaine, Yang et al. 2008) επικεντρώθηκε στην κατασκευή τεχνητών ανασυνδυασμένων ισομορφών της C3 και κατασκεύασε τελικά την BA-210, μία τεχνητή, ανασυνδυασμένη μορφή της τρανσφεράσης C3 η οποία ήταν ικανή να διαπερνά την επισκληρίδιο μεμβράνη της σπονδυλικής στήλης και την κυτταρική μεμβράνη μέσω ενός μηχανισμού ανεξάρτητου του υποδοχέα. Η ανασυνδυασμένη αυτή πρωτεΐνη εξελίχθηκε στο φάρμακο Cethrin, το πρώτο πειραματικό φάρμακο που στοχεύει ειδικά την πρωτεΐνη Rho. Την πατέντα του φαρμάκου καθιέρωσε η ερευνήτρια Mc Kerracher και το φάρμακο πλέον έχει μετονομαστεί σε VX-210. Σε προκλινικές μελέτες το VX-210, χορηγούμενο επισκληριδίως σε τρωκτικά κατάφερε μέσω απενεργοποίησης της πρωτεΐνης RhoA να μειώσει την έκταση της ουλής και επιπλέον να βελτιώσει την κινητική λειτουργικότητα των ζώων. Ιδιαίτερη εντύπωση προκάλεσε το γεγονός ότι το φάρμακο όταν χορηγήθηκε στη ραχιαία πλευρά της ΣΣ κατάφερε να εισχωρήσει και στην κοιλιακή πλευρά της ΣΣ των ζώων (Lord-Fontaine, Yang et al. 2008).

Τα εντυπωσιακά αυτά προκλινικά αποτελέσματα οδήγησαν στο σχεδιασμό ανοιχτής, πολύκεντρης κλινικής μελέτης Φάσης I/ IIa (NCT00500812) για το VX-210 προκειμένου να ελεγχθεί η ασφάλεια, η ανεκτικότητα και τα νευρολογικά αποτελέσματα του φαρμάκου σε ανθρώπους με τραύματα στη σπονδυλική στήλη. Αρχικά το φάρμακο ελέγχθηκε διεξοδικά σε επτά τοξικολογικές μελέτες σε αρουραίους, σκύλους και χοίρους προκειμένου να καθοριστούν οι ασφαλείς δόσεις που θα μπορούσαν να χορηγηθούν σε ανθρώπους. Έπειτα αποφασίστηκε ότι ο καλύτερος τρόπος χορήγησης του φαρμάκου θα ήταν επισκληριδίως μέσω της μορφής fibrin sealant. Στη μελέτη συμμετείχαν 48 άτομα, ηλικίας 16-70 ετών. Οι 32 από αυτούς είχαν θωρακική κάκωση σε κάποιον από τους σπονδύλους T2-T12 και

οι 16, αυχενική κάκωση στους σπονδύλους C4-T1. Όλοι οι ασθενείς υπέφεραν από οξεία κάκωση της σπονδυλικής στήλης, εμφάνιζαν πλήρη παράλυση επιπέδου A της λίστας ASIA και επρόκειτο να υποβληθούν σε χειρουργείο αποκατάστασης μέσα στις επτά ημέρες μετά το ατύχημα. Κατά τη διάρκεια του χειρουργείου στους ασθενείς χορηγήθηκε μία δόση του φαρμάκου VX-210 τοπικά στην επισκληρίδιο επιφάνεια πάνω από την τραυματισμένη ΣΣ. Οι ασθενείς έλαβαν διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου: 0,3 mg, 1 mg, 3 mg, 6 mg και 9 mg.

Η μελέτη έδειξε ότι όλες οι δόσεις που χορηγήθηκαν (0,3- 9mg) ήταν ασφαλείς και καλά ανεκτές από τους συμμετέχοντες και δεν προκάλεσαν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες.

Όσον αφορά την κινητική λειτουργικότητα, οι ασθενείς με αυχενική κάκωση που έλαβαν VX-210 εμφάνισαν μεγάλη βελτίωση σε δοκιμές ελέγχου κινητικότητας, στους 12 μήνες, ειδικά όσοι έλαβαν δόσεις 1 και 3 mg. Ωστόσο οι ασθενείς με θωρακική κάκωση παρουσίασαν ελάχιστη βελτίωση της νευρολογικής λειτουργικότητάς τους (Εικόνα 2.2). Μεταφράζοντας τα αποτελέσματα των δοκιμών κινητικότητας στην κλίμακα ASIA, διαπιστώθηκε ότι στους 12 μήνες, το 31% των ατόμων με αυχενική κάκωση και το 6% με θωρακική, μεταπήδησαν από το επίπεδο ASIA A σε επίπεδο ASIA C ή ASIA D (Fehlings, Theodore et al. 2011).



Εικόνα 2.2. Αποτελέσματα μελέτης Φάσης I/IIa του φαρμάκου VX-210. Οι ασθενείς με αυχενική κάκωση παρουσίασαν μεγάλη βελτίωση σε δοκιμές ελέγχου κινητικότητας, από τις 6 έως τις 52 εβδομάδες, ειδικά όσοι έλαβαν δόσεις 1 και 3 mg,

Μετά από τα ελπιδοφόρα αποτελέσματα της κλινικής μελέτης Φάσης I και προκειμένου να ελεγχθούν περαιτέρω η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια του φαρμάκου, σχεδιάστηκε μία πολύκεντρη, τυχαιοποιημένη, διπλά τυφλή, κλινική μελέτη Φάσης IIb/III, με χρήση placebo (NCT02669849: SPinal cord injury Rho INhibition investiGation- SPRING trial). Στη μελέτη συμμετείχαν εκατό ασθενείς, ηλικίας 14-75 ετών, όλοι με οξεία αυχενική κάκωση σπονδυλικής στήλης και επίπεδο ASIA A ή B. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο ομάδες: την ομάδα control/placebo, στους οποίους χορηγήθηκε διάλυμα buffer και στην ομάδα φαρμάκου στους οποίους χορηγήθηκαν 9mg του VX-210. Όπως και στη μελέτη I/IIa τόσο το placebo όσο και το VX-210, χορηγήθηκαν στον επισκληρίδιο χώρο κατά τη διάρκεια της χειρουργικής αποσυμφόρησης των ασθενών, εντός 72 ωρών από το ατύχημα. Η δόση των 9mg είχε αποδειχθεί ασφαλής και καλά ανεκτή στη μελέτη Φάσης I/IIa και επιλέχθηκε προκειμένου να διασφαλιστεί μεγαλύτερη δέσμευση του φαρμάκου με το συνδέτη του.

Δυστυχώς τον Οκτώβριο του 2018 η εταιρεία Vertex σε συνεργασία με την BioAxxon Bioservices Inc., υπεύθυνες για την ανάπτυξη του VX-210, ανακοίνωσαν τη διακοπή της ανάπτυξης του φαρμάκου και τερμάτισαν πρόωρα την κλινική μελέτη IIb/III, κρίνοντάς την μάταιη, βασιζόμενοι σε δεδομένα από το Data Safety Monitoring Board της κλινικής μελέτης (VertexPharmaceuticalsIncorporated 2018). Η ολοκληρωμένη αναφορά της μελέτης αναμένεται να δημοσιευτεί εντός του 2020 και θα βοηθήσει στη διαμόρφωση ξεκάθαρης γνώμης σχετικά με το αν το μονοπάτι Rho αποτελεί τελικά καλό φαρμακολογικό στόχο για την αντιμετώπιση των τραυμάτων της σπονδυλικής στήλης.

Άλλα πειραματικά φάρμακα- μελλοντικές ιδέες

Εκτός από το VX-210, άλλο πειραματικό φάρμακο το οποίο στοχεύει εκλεκτικά την πρωτεΐνη Rho και δοκιμάζεται από ερευνητές είναι το Rhosin. Το Rhosin είναι ένα μικρό μόριο που έχει την ικανότητα να δένεται σε δύο πλευρές της επιφάνειας της RhoA εμποδίζοντας αποτελεσματικά την αλληλεπίδρασή της με τις RhoA- GEFs. Σε *in vitro* πειράματα φάνηκε να επάγει την νευρική εκβλάστηση σε κύτταρα PC12 (Shang, Marchioni et al. 2012). Το Rhosin φαίνεται πολλά υποσχόμενο καθώς, όπως και το VX-210, διαπερνά επιτυχώς το κυτταρικό τοίχωμα και στοχεύει αποκλειστικά την πρωτεΐνη RhoA χωρίς να επηρεάζει τις Rac1 και Cdc42. Σήμερα δοκιμάζεται σε *in vivo* μοντέλα από ερευνητικές ομάδες για την πιθανή αποτελεσματικότητά του στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού αλλά και σε τραύματα σπονδυλικής στήλης

Επίσης, σε προκλινικές μελέτες δοκιμάζονται και μόρια- αναστολείς των κινασών ROCK. Ένας από τους πιο γνωστούς αναστολείς που μελετάται είναι το φάρμακο Fasudil (HA-1077). Πρόκειται για έναν ισχυρό εκλεκτικό αναστολέα της κινάσης ROCK2 ο οποίος αρχικά σχεδιάστηκε ως αναστολέας του ενδοκυττάριου ασβεστίου και ενδείκνυται ως αγγειοδιασταλτικό. Το φάρμακο είναι διαθέσιμο στην Ιαπωνία και την Κίνα, αλλά δεν έχει πάρει έγκριση από τον FDA και τον EMA.

Σε *in vivo* πειράματα με ποντίκια στα οποία είχε προκληθεί τραύμα μέσω λαμινεκτομής στους θωρακικούς σπονδύλους T5 με T7, χορήγηση του Fasudil, 1-6 ώρες μετά το τραύμα, μείωσε την ιστική καταστροφή και βελτίωσε την κινητική λειτουργικότητα των ζώων. Επίσης παρατηρήθηκε μείωση και της φλεγμονής (Impellizzeri, Mazzon et al. 2012).

Αναμένονται περισσότερα αποτελέσματα από *in vivo* μελέτες που αφορούν τραύματα της ΣΣ ώστε να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια των πειραματικών φαρμάκων Fasudil και Rhosin και να κριθεί αν είναι σκόπιμο και ασφαλές να δοκιμαστούν σε κλινικές μελέτες.

2.3 Σταθεροποίηση μικροσωληνίσκων

Τα τελευταία χρόνια η φαρμακολογική σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων έχει χαρακτηριστεί ως πολλά υποσχόμενη στρατηγική για την αντιμετώπιση νευρικών τραυμάτων, νευροεκφυλιστικών ασθενειών αλλά και καρκίνων του νευρικού συστήματος. Ο σχεδιασμός αυτής της στρατηγικής στηρίχθηκε στην υπόθεση ότι η σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων θα αποτρέπει τον εκφυλισμό τους σε ασθένεια ή ατύχημα και πιθανόν θα ευνοεί την νευρική επιδιόρθωση και αναγέννηση (Baas and Ahmad 2013).

Οι μικροσωληνίσκοι είναι δυναμικές σωληνοειδείς δομές από ετεροδιμερή των πρωτεϊνών α - και β - τουμπουλίνης και αποτελούν τις μεγαλύτερες δομές του κυτταροσκελετού. Ένα από τα χαρακτηριστικά τους είναι ότι εμφανίζουν πολικότητα, με το θετικό (+) άκρο να καθορίζει την κατεύθυνση της επιμήκυνσης του μικροσωληνίσκου καθώς στην περιοχή αυτή η προσθήκη διμερών τουμπουλίνης γίνεται με γρηγορότερο ρυθμό από ό,τι στο αρνητικό (-) άκρο. Επίσης οι πληθυσμοί μικροσωληνίσκων ελέγχονται από έναν μηχανισμό που καλείται «δυναμική αστάθεια», σύμφωνα με τον οποίο διαφορετικοί μικροσωληνίσκοι στον ίδιο πληθυσμό μπορούν να πολυμερίζονται και να αποπολυμερίζονται ταυτόχρονα (Mitchison and Kirschner 1984). Η ιδιότητά τους αυτή τους καθιστά ιδιαίτερα σημαντικούς κατά τη διαδικασία της μίτωσης, καθώς επιτρέπουν στο κύτταρο να αλλάζει ταχύτατα μορφή.

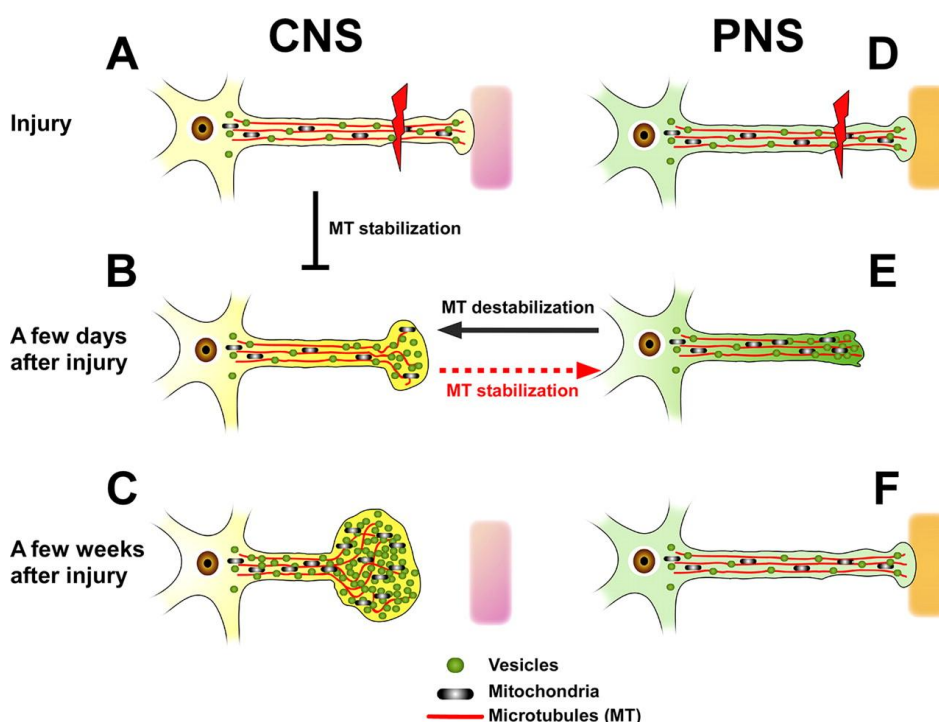
Εκτός από το βασικό στηρικτικό τους ρόλο και τη δράση τους στην κυτταρική διαίρεση, οι μικροσωληνίσκοι συμμετέχουν σε πλήθος άλλων διεργασιών του κυττάρου.

Στο νευρικό σύστημα, οι μικροσωληνίσκοι μαζί με την ακτίνη του κυτταροσκελετού των αυξητικών κώνων, ρυθμίζουν την επιμήκυνσή και την πλοήγηση των αξόνων κατά την ανάπτυξη. Πιο συγκεκριμένα ο αυξητικός κώνος περιλαμβάνει μία περιφερειακή περιοχή (P-domain) πλούσια σε ακτίνη και μία κεντρική περιοχή (C-domain) με μικροσωληνίσκους. Κατά την ωρίμανση των νευρώνων δημιουργούνται «αξονικές σχεδίες» που αποτελούνται από οργανωμένους και σταθερούς μικροσωληνίσκους. Στο κέντρο του αυξητικού

κώνου, οι μικροσωληνίσκοι προεκβάλλουν από τις αξονικές σχεδίες, ενώ στην περιφέρεια σχηματίζονται φιλοπόδια ακτίνης. Η επιμήκυνση των αξόνων πραγματοποιείται όταν πολυμερισμένοι μικροσωληνίσκοι εισέρχονται στην περιφερειακή περιοχή (P-domain) των αποπολυμερισμένων ινιδίων ακτίνης και επεκτείνονται (Blanquie and Bradke 2018).

Ο διττός ρόλος των μικροσωληνίσκων μετά από τραύμα στο ΚΝΣ

Σε αντίθεση με τους άξονες του ΠΝΣ, οι άξονες του ΚΝΣ, δε σχηματίζουν αυξητικούς κώνους μετά από τραυματισμό. Αντίθετα στο σημείο της τομής εμφανίζουν μεγάλες οβάλ δομές στις οποίες οι μικροσωληνίσκοι είναι διασκορπισμένοι και αποπροσανατολισμένοι. Οι δομές αυτές ονομάζονται ανακλητικές κεφαλές (retraction bulbs) και εμποδίζουν την επιμήκυνση των αξόνων (Cajal 1930), (Erturk, Hellal et al. 2007).



Εικόνα 2.3. Σχηματική αναπαράσταση της δημιουργίας ανακλητικών κεφαλών μετά από τραυματισμό στο ΚΝΣ (Α-Σ) σε αντίθεση με την δημιουργία αυξητικών κώνων μετά από ατύχημα στο ΠΝΣ (Δ-Σ) (Erturk, Hellal et al. 2007).

Ο σχηματισμός των ανακλητικών κεφαλών αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα εμπόδια στην αναγέννηση του ΚΝΣ. Χορήγηση Νοκοδαζόλης (Nocodazole), η οποία προκαλεί αποπολυμερισμό των μικροσωληνίσκων, σε νευρώνες ραχιαίων γαγγλίων, επάγει τη μετατροπή των αυξητικών κώνων στην άκρη των αξόνων σε ανακλητικούς, παρόμοιους με αυτούς που εμφανίζονται μετά από τομή των νευραξόνων (Erturk, Hellal et al. 2007). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η οργάνωση των μικροσωληνίσκων σχετίζεται με τη δημιουργία των ανακλητικών κεφαλών και την αναστολή της νευρικής αναγέννησης μετά από ατύχημα στο ΚΝΣ.

Εκτός από το ρόλο τους στην ενδογενή ικανότητα των νευρώνων να αναγεννώνται, η οργάνωση των μικροσωληνίσκων φαίνεται να παίζει ρόλο και στο σχηματισμό της γλοιακής ουλής μετά το τραύμα (Hellal, Hurtado et al. 2011). Επομένως η φαρμακολογική σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων μπορεί να δράσει ευεργετικά μετά από τραυματισμό στο ΚΝΣ με διττό ρόλο.

Χορήγηση ταξόλης σε τραύματα της σπονδυλικής στήλης

Ήδη από το 1991 (Jacob and Quarrie 1991), είχε γίνει αναφορά στο ρόλο της οργάνωσης του κυτταροσκελετού στη νευρωνική αναγέννηση, όμως τα αποτελέσματα των πειραμάτων εκείνης της εποχής δεν ήταν δυνατόν «μεταφραστούν» σε θεραπεία και η έρευνα οδηγήθηκε σε αδιέξοδο. Ωστόσο, πρόσφατα πειράματα με χρήση ταξόλης, έστρεψαν ξανά την έρευνα για την νευρική αναγέννηση του ΚΝΣ, στη μελέτη των μικροσωληνίσκων (Baas and Ahmad 2013).

Η ταξόλη είναι ένα φυσικό διτερπένιο αλκαλοειδές το οποίο εντοπίζεται στο φλοιό του Ελάτου του Ειρηνικού (*Taxus bevilfolia*) και έχει πολύ ισχυρή αντικαρκινική δράση. Χορηγείται εδώ και πολλά χρόνια ως φάρμακο εκλογής σε καρκίνους, ειδικά σε περιπτώσεις καρκίνου του μαστού.

Οι θεραπευτικές ιδιότητες της ταξόλης οφείλονται στην ικανότητά της να συνδέεται με την β- τουμπουλίνη και να επάγει τον πολυμερισμό της ανεξάρτητα από την GTP. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την υπερβολική σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων και κατά συνέπεια τη διακοπή της διαίρεσης των κυττάρων, τα οποία τελικά πεθαίνουν. Επιπλέον, η ταξόλη είναι ικανή να συνδέεται και με την πρωτεΐνη Bcl-2, επάγοντας την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων.

Δυστυχώς πέρα από το πλήθος των ευεργετικών της ιδιοτήτων, η θεραπεία με ταξόλη προκαλεί πλήθος εξαιρετικά σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών όπως τριχόπτωση, αιμορραγία, αναιμία, πόνους σε αρθρώσεις και μυς, διάρροια και έμετο και γι' αυτό η χρήση της είναι ελεγχόμενη και απαγορεύεται σε παιδικούς καρκίνους.

Επιπλέον η συστηματική χορήγηση ταξόλης ή/και των παράγωγων της σε περιπτώσεις καρκίνου, επιφέρει επίπονες περιφερικές νευροπάθειες (Reyes-Gibby et al., 2009). Για το λόγο αυτό έχει σχηματιστεί η πεποίθηση ότι η χρήση ταξόλης για την αντιμετώπιση νευρικών τραυμάτων ή ασθενειών μπορεί να έχει σοβαρές επιπτώσεις στο νευρικό ιστό ακόμη και αν στην αρχή φαίνεται πως δρα ευεργετικά (Baas and Ahmad 2013).

Ένα από τα σημαντικότερα πειράματα που απέδειξαν την αποτελεσματικότητα της εν λόγω ουσίας στην αποκατάσταση μετά από τραύμα στο ΚΝΣ, αφορούσε χορήγηση χαμηλών δόσεων ταξόλης σε καλλιέργεια γαγγλιακών κυττάρων αμφιβληστροειδούς. Η ταξόλη προκάλεσε άμεση σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων και οδήγησε σε αυξημένη επιμήκυνση των αξόνων και νευρική

ανάπτυξη σε ανασταλτικά υποστρώματα μυελίνης και CSPGs. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και *in vivo*, σε πειράματα με αρουραίους στους οποίους είχε προηγηθεί τραύμα στο οπτικό νεύρο. Χαμηλές δόσεις ταξόλης, προκάλεσαν αύξηση της νευρωνικής αναγέννησης, μείωση των μακροφάγων και επιβράδυνση του πολλαπλασιασμού των αστροκυττάρων μετά το τραύμα. Ωστόσο, υψηλές δόσεις ταξόλης, οι οποίες ενδείκνυνται σε περιπτώσεις καρκίνου, είχαν αντίθετο αποτέλεσμα καθώς επέφεραν μείωση της νευρικής αναγέννησης (Sengottuvel, Leibinger et al. 2011).

Η επίδραση της ταξόλης στη νευρική αύξηση και αναγέννηση αποδείχθηκε και σε *in vivo* ζωικά μοντέλα με τραύμα στη σπονδυλική στήλη. Χορήγηση χαμηλών δόσεων ταξόλης σε ενήλικες αρουραίους με τομή στο σπόνδυλο C8, περιόρισε την γλοιακή ουλή, με μηχανισμούς ανεξάρτητους του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης. Επίσης παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης των γλυκοπρωτεϊνών CSPGs και άλλων παραγόντων της εξωκυττάριας μήτρας στο σημείο του τραύματος. Τέλος σημειώθηκε αύξηση των σεροτονινεργικών αξόνων και βελτίωση της λειτουργικής αποκατάστασης των ζώων (Hellal, Hurtado et al. 2011).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η ταξόλη είχε δοκιμαστεί από το 1996 σε ζωικά μοντέλα με τραύμα στη σπονδυλική στήλη και φάνηκε να προκαλεί βελτίωση της κινητικής λειτουργικότητας των ζώων. Ωστόσο, δεν ήταν γνωστό ότι η βελτίωση αυτή οφειλόταν σε αύξηση της νευρικής αναγέννησης των αξόνων (Perez-Espejo, Haghghi et al. 1996).

Παρά τα θετικά αποτελέσματα της ταξόλης, η ουσία δεν είναι χρήσιμη για κλινική παρέμβαση στο ΚΝΣ, καθώς δεν καταφέρνει να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Για το λόγο αυτό, πρόσφατες έρευνες έχουν επικεντρωθεί στη μελέτη των εποθηλώνων (epothilones) ως πιθανά φάρμακα για την αντιμετώπιση των τραυμάτων του ΚΝΣ. Οι εποθηλώνες είναι μία ομάδα αντικαρκινικών φαρμάκων εγκεκριμένα από τον FDA, τα οποία διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και συντονίζουν τον πολυμερισμό και την οργάνωση των μικροσωληνίσκων, αλληλεπιδρώντας με την τουμπουλίνη, ακριβώς όπως οι ταξάνες.

Συστηματική χορήγηση εποθηλόνης Β (EpoB) ενδοπεριτοναϊκά, σε ενήλικες αρουραίους με τραύμα στους θωρακικούς σπονδύλους, περιόρισε το σχηματισμό της γλοιακής ουλής και μείωσε τα επίπεδα των πρωτεϊνών CSPGs. Επιπλέον, η εποθηλόνη Β, προκάλεσε μείωση των ανακλητικών κεφαλών, αύξηση της αναγέννησης των τραυματισμένων νευραξόνων και βελτίωση της κινητικής λειτουργικότητας των ζώων (Ruschel, Hellal et al. 2015). Αντίστοιχα αποτελέσματα ως προς την βελτίωση της κινητικής λειτουργίας παρουσιάστηκαν και με χορήγηση εποθηλόνης D, ενός αναλόγου της EpoB σε αρουραίους με τραύμα στη ΣΣ (Sandner, Puttagunta et al. 2018).

Τα παραπάνω αποτελέσματα σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι εποθελόνες καταφέρνουν να διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να απορροφώνται από το ΚΝΣ, τις καθιστούν ιδανικά φάρμακα για την αντιμετώπιση των τραυμάτων της σπονδυλικής στήλης. Ωστόσο, όπως και οι ταξόλες, οι εποθελόνες φαίνεται πως παράλληλα με τις ευεργετικές τους δράσεις προκαλούν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες, οι οποίες εμποδίζουν την αποκατάσταση. Πιο συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί σε ζωικά μοντέλα με τραύμα στη ΣΣ, ότι χορήγηση εποθελόνης μετά το ατύχημα αυξάνει την έκκριση του M-CSF και άλλων κυτοκινών οι οποίες δρουν συνεργιστικά με την εποθελόνη Β και καταστέλλουν τη λειτουργική αποκατάσταση, μέσω ενεργοποίησης της μικρογλοίας, καταστροφής των BMDMs (bone marrow-derived macrophages) και επιδείνωσης της φλεγμονής (Mao, Gao et al. 2017).

Επιπλέον η υπερβολική σταθεροποίηση μικροσωληνίσκων οδηγεί σε αναστολή της νευρικής αναγέννησης (Erturk, Hellal et al. 2007), (Sengottuvel, Leibinger et al. 2011). Τα παραπάνω διφορούμενα αποτελέσματα, οδηγούν στην υπόθεση ότι διαφορετικοί βαθμοί σταθεροποίησης των μικροσωληνίσκων απαιτούνται για την καλύτερη αξονική αύξηση σε διαφορετικά είδη αξόνων (Sandner, Puttagunta et al. 2018). Είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθούν περαιτέρω πειράματα, ώστε να εξακριβωθεί η αποτελεσματικότητα των εποθελονών στην αποκατάσταση μετά από τραύματα στη ΣΣ.

Συνολικά πάντως τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων δείχνουν ότι η στόχευση ενός μόνο μοριακού στόχου, είναι ικανή να ξεπεράσει πολλά εμπόδια της νευρικής αναγέννησης του ΚΝΣ και καθιστούν τη φαρμακολογική στόχευση της οργάνωσης του κυτταροσκελετού μετά από τραυματισμό της ΣΣ πολλά υποσχόμενη στρατηγική.

Η δυναμική της ακτίνης στη νευρική αναγέννηση

Εκτός από τους μικροσωληνίσκους, για τη δημιουργία των αυξητικών κώνων είναι απαραίτητα και τα ινίδια της ακτίνης. Ωστόσο ο ρόλος τους στο σχηματισμό ανακλητικών κεφαλών και στην αναστολή της νευρικής αναγέννησης, δεν έχει διερευνηθεί αρκετά.

Μετά από τραύμα στο ΚΝΣ προκαλείται αποσταθεροποίηση της F- ακτίνης στους τραυματισμένους άξονες. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να αναιρεθεί με υπερέκφραση των κινασών DCLKs (Doublecortin like kinases). Οι κινάσες DCLKs, ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνών DCX και έχουν την ικανότητα να συνδέονται τόσο με τους μικροσωληνίσκους όσο και με την ακτίνη. Πρόσφατα πειράματα έδειξαν ότι μετά από τομή σε γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, η έκφραση των DCLK1 και DCLK2 μειώνεται απότομα και η πειραματική υπερέκφρασή τους μετά από τον τραυματισμό επάγει την επιβίωση και την αναγέννηση των κυττάρων μέσω αναδιαμόρφωσης του αυξητικού κώνου (Nawabi, Belin et al. 2015).

Η περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού με τον οποίο δρα η ακτίνη μετά από τραύμα στο ΚΝΣ κρίνεται αναγκαία, καθώς η στόχευσή τους μπορεί να χαράξει νέα μονοπάτια στην αποκατάσταση μετά από τραύμα στο ΚΝΣ (Blanquie and Bradke 2018).

2.4 Νέοι ενδογενείς μηχανισμοί

2.4.1 Επιγενετική Ρύθμιση

KLFs

Η οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων KLF (Krüppel- like family of transcription factors), αποτελείται από 17 μεταγραφικούς παράγοντες που διαθέτουν ομόλογες περιοχές σύνδεσης με το DNA. Πρόκειται για πρωτεΐνες οι οποίες ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων και επηρεάζουν κρίσιμες κυτταρικές διαδικασίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση. Στους ανθρώπους ανωμαλίες στη ρύθμιση των KLFs έχουν συσχετισθεί με σοβαρές ασθένειες και δημιουργία καρκίνου (McConnell and Yang 2010).

Ο καλύτερα μελετημένος παράγοντας της οικογένειας KLF, είναι ο KLF-4 ο οποίος δρα ανασταλτικά στην αύξηση και την αναγέννηση του ΚΝΣ. Υπερέκφραση του KLF-4 σε εμβρυικούς νευρώνες ιπποκάμπου και εμβρυϊκά RGCs, οδηγεί σε μειωμένη επιμήκυνση των αξόνων και καταστέλλει το σχηματισμό δενδριτών *in vitro*, χωρίς ωστόσο να επηρεάζει την κυτταρική επιβίωση. Ακόμα, *in vivo* πειράματα με απαλοιφή του KLF-4 σε ποντίκια μέσω της τεχνικής knock-out κατά την εμβρυική ανάπτυξη είχε ως αποτέλεσμα αυξημένη αξονική αναγέννηση μετά από τραύμα στο οπτικό νεύρο στην ενήλικη ζωή (Moore, Blackmore et al. 2009).

Εκτός από τον παράγοντα KLF-4, σε *in vitro* πειράματα αποδείχθηκε ότι και άλλοι παράγοντες της ίδιας οικογένειας δρουν στη νευρική αύξηση, είτε κατασταλτικά, όπως ο KLF-9 είτε επαγωγικά, όπως ο KLF-6 και ο KLF-7. Σε όλους αυτούς τους μεταγραφικούς παράγοντες υπεύθυνη για τη δράση τους αυτή φαίνεται να είναι η περιοχή σύνδεσης με το DNA στο C- καρβοξυτελικό τους άκρο (Moore, Blackmore et al. 2009), ωστόσο ακόμα δεν έχει αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός μέσω του οποίου δρουν. Ειδικά για τον παράγοντα KLF-6 πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι επάγει τη νευρική αναγέννηση των τραυματισμένων CST αξόνων της ΣΣ μέσω συνεργείας με τον μεταγραφικό παράγοντα STAT-3 (Wang, Mehra et al. 2018).

Περαιτέρω πειράματα απαιτούνται προκειμένου να εξακριβωθεί ο ρόλος των παραγόντων αυτών στη νευρική αύξηση και την αναγέννηση καθώς ο χειρισμός και η τροποποίηση της έκφρασής τους, μπορεί να αποτελέσουν μία χρήσιμη στρατηγική για την αύξηση της ενδογενούς αναγεννητικής ικανότητας των κεντρικών νευρώνων μετά από τραύμα στη ΣΣ.

APC/ Cdh1

Το σύμπλεγμα πρωτεϊνών APC ή κυκλώσωμα (Anaphase- promoting complex) είναι ένα μεγάλο σύνολο διαφορετικών υπομονάδων πρωτεϊνών που αποτελούν την Ε3 λιγάση ουβικιτινιλίωσης η οποία συμμετέχει ενεργά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων. Το σύμπλεγμα APC είναι απαραίτητο για τον διαχωρισμό των αδερφών χρωματίδων κατά την ανάφαση και την έξοδο των κυττάρων από τη μίτωση, αλλά παίζει σημαντικό ρόλο και σε διάφορα γεγονότα της μείωσης. Οι κύριοι ενεργοποιητές του κυκλοσώματος είναι οι πρωτεΐνες Cdh1 και Cdc20 οι οποίες δρουν σε διαφορετικές χρονικές περιόδους του κυτταρικού κύκλου και στοχεύουν διαφορετικές υπομονάδες του APC. Η Cdh1 αποφωσφορυλιώνεται από την κινάση Cdc14 και μπορεί πλέον να συνδεθεί με το APC και να το ενεργοποιήσει, φτιάχνοντας την ενεργή λιγάση APC^{Cdh1} (Peters 2006).

Εκτός από τον ρόλο της στην κυτταρική διαίρεση, η λιγάση APC^{Cdh1} συμμετέχει ενεργά και σε άλλες διεργασίες του κυττάρου. Όσον αφορά το ΚΝΣ, τόσο η Cdh1 όσο και το APC εντοπίζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στον φλοιό, τον ιππόκαμπο και την παρεγκεφαλίδα των ενήλικων θηλαστικών και επηρεάζουν την αξονική αύξηση, την μορφολογία και την πλαστικότητα των συνάψεων καθώς επίσης και διαδικασίες μάθησης και μνήμης.

Πειράματα που έγιναν *in vivo* σε αρσενικούς αρουραίους έδειξαν ότι μετά από τραυματισμό της σπονδυλικής στήλης αυξάνεται σημαντικά η έκφραση της Cdh1 στον αισθητικοκινητικό φλοιό. Αποσιώπηση της έκφρασής της επτά ημέρες μετά το τραύμα μέσω της τεχνολογίας παρέμβασης στο RNA (*RNAi interference*), οδήγησε σε αύξηση της αξονογένεσης και βελτίωση της κινητικότητας των ζώων, όπως μετρήθηκε με τεστ BBB, στις έξι εβδομάδες μετά τον τραυματισμό (Qi, Yao et al. 2014). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι το σύμπλεγμα APC^{Cdh1} δρα ανασταλτικά στη λειτουργική αποκατάσταση μετά από τραύμα στη σπονδυλική στήλη. Περαιτέρω πειράματα θα συμβάλουν στη δημιουργία πιο ξεκάθαρης άποψης σχετικά με τον ρόλο του κυκλοσώματος στη νευρική αύξηση και αναγέννηση του ΚΝΣ.

Κινάσες DLK και LZK

Η DLK ή MAP3K12 ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών σερίνης-θρεονίνης MAP3K και ενεργοποιείται από μιτογόνα σήματα. Μετά την ενεργοποίησή της, μπορεί να ενεργοποιήσει μονοπάτια τόσο των κινασών JNK όσο και των p38. Κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος συμμετέχει σε διαδικασίες αξονικής αύξησης, απόπτωσης και εκφύλισης (Tedeschi and Bradke 2013). Παλιότερες μελέτες απέδειξαν ότι η DLK ρυθμίζει την αναγέννηση στους ασπόνδυλους οργανισμούς και μετά από τραύμα στο ΠΝΣ (Hammarlund, Nix et al. 2009) και σχηματίστηκε η υπόθεση ότι η εν λόγω κινάση σχετίζεται επίσης με την αξονική αναγέννηση στο ΚΝΣ.

Μετά από τραύμα στο οπτικό νεύρο παρατηρείται σημαντική αύξηση των επιπέδων της κινάσης DLK στους άξονες των RGCs η οποία εκκινεί την μεταγραφική γονιδίων που ρυθμίζουν τόσο την απόπτωση όσο και την αναγέννηση των νευρώνων. Απαλοιφή της έκφρασης της DLK σε διαγονιδιακά ποντίκια με τραύμα στον αμφιβληστροειδή, οδήγησε σε αυξημένη επιβίωση των νευρώνων αλλά μείωσε την αναγέννηση των τραυματισμένων αξόνων (Watkins, Wang et al. 2013). Φαίνεται λοιπόν πως η DLK έχει διττό ρόλο μετά από τραύμα στο ΚΝΣ. Από τη μια πλευρά δρα νευροπροστατευτικά συμβάλλοντας στην αξονική αναγέννηση και από την άλλη επάγει την απόπτωση των τραυματισμένων κυττάρων. Ωστόσο απαιτούνται και άλλα πειράματα με μοντέλα τραυματισμού του οπτικού νεύρου και της ΣΣ προκειμένου να επαληθευθεί αυτή η θεωρία.

Εκτός από την DLK, άλλη μία MAP3K κινάση συμμετέχει στα γεγονότα που ακολουθούν τους τραυματισμούς του ΚΝΣ. Πρόκειται για την LZK ή MAP3K13, η οποία εμπλέκεται σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια.

Όμοια με την DLK, η έκφραση της LZK αυξάνεται επίσης μετά από τραύμα στο ΚΝΣ και ιδιαίτερα στα αστροκύτταρα. Σε ποντίκια στα οποία είχε πραγματοποιηθεί απαλοιφή του γονιδίου της LZK, μέσω της τεχνικής knockout, και ακολούθως προκλήθηκε τραύμα στη ΣΣ, περιορίστηκε η αστρογλοίωση και ο σχηματισμός της γλοιακής ουλής και μειώθηκε ο πολλαπλασιασμός των αστροκυττάρων. Επιπλέον στην ίδια μελέτη, αποδείχθηκε ότι η δράση της LZK στην αστρογλοίωση πραγματοποιείται μέσω ενεργοποίησης της STAT3 και της SOX9. Το εύρημα αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό, καθώς σε άλλες *in vitro* μελέτες φάνηκε ότι η LZK επάγει την αξονική αύξηση στο ΚΝΣ μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού της JNK (Chen, Geoffroy et al. 2018). Πιθανότατα η LZK δρα με έναν κυτταρο-ειδικό τρόπο. Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες προκειμένου να διευκρινιστεί ο ρόλος της κινάσης αυτής στους τραυματισμούς των κεντρικών νευρώνων και να εξετασθεί η πιθανή αλληλεπίδρασή της με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια.

Η σουνιτινίμπη (sunitinib) είναι ένα αντικαρκινικό φάρμακο εγκεκριμένο από τον FDA το οποίο δρα ως PKI μπλοκάροντας τόσο την DLK όσο και την LZK. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι χορήγηση σουνιτινίμπης σε τραυματισμένους άξονες RGC κυττάρων δρα νευροπροστατευτικά, επάγοντας την επιβίωση των κυττάρων αυτών (Welsbie, Mitchell et al. 2017). Αξίζει να πραγματοποιηθούν κι άλλα πειράματα με το εν λόγω φάρμακο καθώς μπορεί να αποκαλύψουν νέα στοιχεία για την δράση των DLK και LZK στους τραυματισμούς του ΚΝΣ.

Sox11

Η οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων Sox (Sry HMG-box), αποτελείται από είκοσι μέχρι στιγμής χαρακτηρισμένα μέλη, τα οποία φαίνεται να δρουν με παρόμοιο μηχανισμό. Ωστόσο οι πρωτεΐνες Sox εκφράζονται σε διαφορετικά στάδια κατά την ανάπτυξη στα διάφορα είδη κυττάρων. Ο παράγοντας Sox11 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στο εμβρυϊκό κεντρικό και περιφερικό νευρικό

σύστημα και εμπλέκεται κυρίως σε διαδικασίες που αφορούν την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων. Κατά την ενηλικίωση η έκφρασή του μειώνεται ραγδαία (Penzo-Mendez 2010).

Αρκετές μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση του Sox11 αυξάνεται σημαντικά μετά από τραυματισμό του περιφερικού, αλλά όχι του κεντρικού, τμήματος των DRG-νευρώνων. Επίσης, η υπερέκφραση του Sox11 επιταχύνει την αύξηση των αξόνων στο ΠΝΣ (Jing, Wang et al. 2012). Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στην υπόθεση ότι, η επαγόμενη αύξηση του Sox11 μετά από τραυματισμό στο ΚΝΣ, πιθανόν θα συμβάλει στην αξονική αναγέννηση.

Πράγματι, εισαγωγή λεντι-ϊικών φορέων (*lentiviral vectors, LV*) οι οποίοι εκφράζουν το γονίδιο Sox11, σε τραυματισμένες σπονδυλικές στήλες θηλυκών ποντικών, οδήγησε σε αυξημένη νευρική αναγέννηση στις τρεις εβδομάδες μετά τον τραυματισμό. Επιπλέον, η υπερέκφραση του Sox11 αύξησε την έκφραση του νευροτροφικού παράγοντα BDNF και βελτίωσε την κινητική λειτουργία των ζώων τις πρώτες τρεις εβδομάδες μετά το τραύμα. Η δράση αυτή του Sox 11 φαίνεται πως οφείλεται στην επαγωγή της νευρικής διαφοροποίησης των ενδογενών νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs) μετά τον τραυματισμό, τα οποία φυσιολογικά βρίσκονται σε αδρανή κατάσταση στην ενήλικη ΣΣ (Guo, Liu et al. 2014). Απαιτούνται περισσότερα πειράματα προκειμένου να εξακριβωθεί ο τρόπος δράσης και η αποτελεσματικότητα του παράγοντα Sox11 στη νευρική αναγέννηση μετά από τραυματισμό της ΣΣ.

Πιθανότατα και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας Sox να σχετίζονται με τα γεγονότα που ακολουθούν τον τραυματισμό του ΚΝΣ. Για παράδειγμα η έκφραση του παράγοντα Sox2 αυξάνεται σημαντικά μετά από τραύμα στην ΣΣ, στα προγονικά κύτταρα ολιγοδενδροκυττάρων (OPCs) και τα επενδυματικά κύτταρα, στο σημείο του τραύματος και γύρω από αυτό, οπότε πιθανόν να σχετίζονται με την ενδογενή ικανότητα των κεντρικών νευρώνων να αναγεννώνται (Lee, Wu et al. 2013).

2.4.2 Sac2

Εκτός από την PTEN, πρόσφατα ανακαλύφθηκαν μέσω της τεχνικής RNAi-mediated functional screening, 17 άλλες φωσφατάσες, οι οποίες φαίνεται να σχετίζονται με την αναστολή της νευρικής αναγέννησης μετά από τραυματισμό του ΚΝΣ. Από αυτές η καλύτερα μελετημένη είναι η φωσφατάση Sac2.

Η Sac2 ή Inpp5f ανήκει στην οικογένεια φωσφατασών ινοσιτόλης Sac και δρα ως 4-φωσφατάση με κύριο υπόστρωμά της την PI4P (Nakatsu, Messa et al. 2015). Στους ανθρώπους η έκφρασή της είναι ιδιαίτερα υψηλή στον εγκέφαλο συγκριτικά με τους άλλους ιστούς. Η εγκεφαλο-εκλεκτική αυτή έκφρασή της, καθιστά την Sac2 πολλά υποσχόμενο φαρμακολογικό στόχο καθώς μειώνεται η πιθανότητα

πρόκλησης σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών από την περιφέρεια, σε περίπτωση αποσιώπησής της (Zou, Stagi et al. 2015).

Η έκφραση της Sac2 αυξάνεται μετά από τραύμα στη ΣΣ και διατηρείται σε υψηλά επίπεδα έως επτά ημέρες μετά τον τραυματισμό. Επίσης σε καλλιέργειες φλοιϊκών νευρώνων ποντικού, αποσιώπηση του γονιδίου της Sac2 οδηγεί σε αύξηση της πυκνότητας των αυξητικών κώνων και της αναγέννησης των αξόνων μετά από σχάση (scraping) των κυττάρων. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν έναν ανασταλτικό ρόλο της Sac2 στη νευρική αναγέννηση του ΚΝΣ. Η ανασταλτική αυτή δράση της Sac2 επιβεβαιώθηκε και *in vivo*, με πειράματα σε ποντίκια με πλήρη έλλειψη του γονιδίου της *Inpp5f* (*Inpp5f* null mice). Πιο συγκεκριμένα, μετά από τραύμα στον θωρακικό σπόνδυλο T7, τα εν λόγω ποντίκια, παρουσίασαν αυξημένη αναγέννηση και εκβλάστηση των σεροτονινεργικών ινών κάτω από το σημείο του τραύματος και αυξημένη εκβλάστηση των CST ινών πάνω από το επίπεδο του τραυματισμού, σε σχέση με τα φυσιολογικά ποντίκια- κοντρόλ. Επιπλέον τα ζώα εμφάνισαν βελτιωμένη λειτουργική αποκατάσταση στις επτά ημέρες μετά το τραύμα, όπως μετρήθηκε σε δοκιμασίες ανοιχτού πεδίου και τεστ rotarod (rotarod performance test) (Zou, Stagi et al. 2015).

Να σημειωθεί ότι η ενδογενής Sac2 δρα ανεξάρτητα από το μονοπάτι της PI3K/mTORC1 και τη φωσφατάση PTEN στην αναστολή της νευρικής αναγέννησης, όπως αποδείχθηκε σε *in vitro* πειράματα με χορήγηση ραπαμυκίνης. Ακόμα, τα ποντίκια με πλήρη απαλοιφή του γονιδίου της Sac2 αναπτύσσονται και αναπαράγονται φυσιολογικά χωρίς να εμφανίζουν σοβαρές παρενέργειες. Αντιθέτως, τα ενήλικα ποντίκια με πλήρη απαλοιφή της PTEN, εμφανίζουν 100% θνησιμότητα τις πρώτες είκοσι οκτώ ημέρες. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η φαρμακολογική στόχευση της Sac2 αποτελεί καλύτερη στρατηγική για την βελτίωση της αποκατάστασης μετά από ατύχημα της ΣΣ (Zou, Stagi et al. 2015). Ωστόσο, περαιτέρω πειράματα απαιτούνται προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο ρόλος της Sac2 και να διερευνηθεί και ο πιθανός ρόλος άλλων φωσφατασών στην αναγέννηση του ΚΝΣ.

2.4.3 LPAR1- LPPR1 (PRG3)

Το λυσοφωσφατιδικό οξύ (LPA) είναι ένα μικρό γλυκεροφωσφολιπίδιο το οποίο δρα εξωκυττάρια ως σηματοδοτικό μόριο ενεργοποιώντας υποδοχείς GPCRs. Μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί 5 τέτοιοι υποδοχείς, οι LPA1-5, οι οποίοι στους ανθρώπους κωδικοποιούνται από τα αντίστοιχα γονίδια LPAR1-5. Κάθε ένας από τους υποδοχείς αυτούς εμφανίζει διαφορετική κατανομή στους ιστούς και ενεργοποιεί διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Ο LPA1 είναι ο πρώτος υποδοχέας του LPA που αναγνωρίστηκε και εκφράζεται έντονα στον ανθρώπινο εγκέφαλο. Μόλις συνδεθεί με το LPA, ο LPA1 ενεργοποιεί G πρωτεΐνες και συμμετέχει σε σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες, όπως είναι ο πολλαπλασιασμός, η επιβίωση, η μετανάστευση και οι αλλαγές του κυτταροσκελετού (Choi, Herr et al. 2010). Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι η σύνδεση του LPA στον LPA1, επάγει την

ενεργοποίηση της RhoA, καταλήγοντας σε κατάρρευση των νευρικών αυξητικών κώνων *in vitro* (Kranenburg, Poland et al. 1997).

Η πρωτεΐνη LPPR1 ή PRG3 (plasticity- related gene 3) είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών LPPRs (lipid phosphate phosphatase- related proteins) και εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στο ΚΝΣ και ιδιαίτερα στους νευρώνες. Η LPPR1 είναι ένας σημαντικός αρνητικός ρυθμιστής του LPA και συμμετέχει ενεργά στο σχηματισμό φιλοποδίων και την αξονική αύξηση.

Πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι μετά από τραύμα στη ΣΣ παρατηρείται σημαντική αύξηση του LPA και του LPA1 και ότι η αύξηση αυτή συμβάλλει στον δευτερογενή τραυματισμό που ακολουθεί (Santos-Nogueira, Lopez-Serrano et al. 2015). Επιπλέον μετά από ατελές τραύμα στη ΣΣ παρατηρείται μείωση της έκφρασης του υποδοχέα LPA1 και ταυτόχρονη αύξηση της έκφρασης του LPPR1 στους άθικτους νευρώνες γύρω από το τραύμα. Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στη διερεύνηση της πιθανής σχέσης του LPA με τη μειωμένη αναγέννηση που παρατηρείται στο ΚΝΣ.

Σε πειράματα *in vitro* σε φλοιϊκούς νευρώνες ενήλικων ποντικών, υπερέκφραση του LPPR1 οδήγησε σε αυξημένη διακλάδωση των νευρώνων και αύξησε σημαντικά τη δημιουργία αυξητικών κώνων και τη νευρική αναγέννηση μετά από σχάση (scrape) των κυττάρων. Τα θετικά αποτελέσματα της υπερέκφρασης του LPPR1 σε ακέραιους νευρώνες αποδείχθηκαν και *in vivo*, σε ποντίκια με ατελές σπονδυλικό τραύμα. Υπερέκφραση του LPPR1 βελτίωσε την αποκατάσταση της κινητικής λειτουργίας των ζώων κατά τις ημέρες 14-28 μετά το τραύμα. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και με αναστολή της έκφρασης του LPA1, *in vivo* (Fink, Lopez-Giraldez et al. 2017).

Συνολικά τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν έναν ανασταλτικό ρόλο του LPA στη νευρική αύξηση και αναγέννηση μετά από ατελή τραυματισμό της ΣΣ. Ωστόσο, νέα πειράματα απαιτούνται προκειμένου να εξακριβωθεί αυτή η θεωρία.

2.4.4 KCC2

Ο KCC2 ή SLC12A5, είναι μία μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που δρα ως συµμεταφορέας K^+-Cl^- και ανήκει στην οικογένεια συµμεταφορέων CCC (Cation Chloride Co transporters). Σε αντίθεση με τα άλλα μέλη της οικογένειας CCC, ο KCC2 εκφράζεται αποκλειστικά σε νευρώνες του ΚΝΣ και είναι υπεύθυνος για τη διατήρηση της ομοιοστασίας του χλωρίου στο εσωτερικό των κυττάρων. Ανεξάρτητα από τη δράση του στη μεταφορά ιόντων, ο KCC2 παρουσιάζει και ένα μορφογενετικό ρόλο καθώς συμμετέχει ενεργά στο σχηματισμό των δενδριτικών ακάνθων (Blaesse, Airaksinen et al. 2009).

Μετά από τραύμα στη ΣΣ τα επίπεδα του KCC2 μειώνονται σημαντικά και για το λόγο αυτό πολλές πρόσφατες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη διερεύνηση του

πιθανού ρόλου του KCC2 στη μειωμένη αναγεννητική ικανότητα των τραυματισμένων κεντρικών νευρικών αξόνων. Η δράση του KCC2 μελετάται πειραματικά κυρίως με χρήση του φαρμακολογικού αγωνιστή του, CLP290. Πρόκειται για ένα μικρό μόριο το οποίο διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και έχει δοκιμαστεί ευρέως σε ζωικά μοντέλα για τη μείωση του νευροπαθητικού πόνου.

Καθημερινή χορήγηση του CLP290 σε ποντίκια με ατελή διπλό τραυματισμό στους σπονδύλους T7 και T10 και σχεδόν πλήρη παράλυση των άκρων, οδήγησε σε μερική βελτίωση της λειτουργικής αποκατάστασης τις πρώτες τέσσερις έως έξι εβδομάδες και αυξήθηκε σημαντικά στις επτά εβδομάδες μετά την πρώτη δόση. Η βελτίωση αυτή παρέμεινε για άλλες μία με δύο εβδομάδες μετά τη διακοπή της θεραπείας, όπως μετρήθηκε με τεστ BMS. Αντίστοιχα αποτελέσματα φάνηκαν και σε πειράματα υπερέκφρασης του KCC2 σε ποντίκια με ατελές θωρακικό τραύμα. Ωστόσο σε ποντίκια με πλήρη τραυματισμό στο σπόνδυλο T8 (όπου δηλαδή κανένας άξονας δεν διαπερνούσε το σημείο του τραύματος), ο CLP290 δεν επέφερε κάποια σημαντική αλλαγή στη λειτουργική αποκατάσταση των ζώων. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι ο CLP290 δρα στις ανενεργές καθοδικές συνδέσεις (spared connections) της ΣΣ και τις ενεργοποιεί εκ νέου. Περαιτέρω πειράματα έδειξαν ότι ο KCC2 και ο αγωνιστής του CLP290 δρουν σε ανασταλτικούς ενδονευρώνες μεταξύ και παρακείμενα των δύο θωρακικών τραυμάτων και αποκαθιστούν την επικοινωνία με τους οσφυϊκούς σπονδύλους επιφέροντας έτσι αποκατάσταση της λειτουργίας των άκρων (Chen, Li et al. 2018).

Ο CLP290 διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και δεν παρουσιάζει σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες ακόμα και όταν χορηγείται σε μεγάλες δόσεις. Δεδομένου ότι οι περισσότεροι ασθενείς με τραύμα στη ΣΣ έχουν διατηρήσει κάποιους άθικτους αλλά ανενεργούς άξονες, συνδυαστική χορήγηση του CLP290 με άλλες θεραπείες θα μπορούσε να αποτελέσει μία καλή στρατηγική για την αντιμετώπιση τέτοιων τραυμάτων η οποία αξίζει να διερευνηθεί σε μελλοντικά πειράματα.

2.4.5 Μεταφορά μιτοχονδρίων

Τα μιτοχόνδρια είναι δυναμικά κυτταρικά οργανίδια και αποτελούν την πηγή ενέργειας των νευρώνων, παρέχοντας το ATP που είναι απαραίτητο για τις διαδικασίες αύξησης, επιβίωσης αλλά και αναγέννησης των νευρικών κυττάρων.

Η μεταφορά των εν λόγω οργανιδίων κατά μήκος του άξονα είναι σημαντική για τη διατήρηση της ομοιοστασίας των νευρώνων και πραγματοποιείται με τη βοήθεια δύο ειδών κινητικών πρωτεϊνών: της οικογένειας πρωτεϊνών κινεσίνης που καταλύουν τη μεταφορά των μιτοχονδρίων από το σώμα προς τον άξονα και τους δενδρίτες, και του συμπλέγματος δυνεΐνης- δυνακτίνης (dynein- dynactin complex) που μεταφέρει μιτοχόνδρια από την περιφέρεια προς το σώμα του νευρώνα. Η μεταφορά των μιτοχονδρίων είναι πολύ έντονη κατά την ανάπτυξη των αξόνων και μειώνεται σταδιακά καθώς ο νευρώνας ωριμάζει (Zhou, Yu et al.

2016) (Patron and Zinsmaier 2016). Υπεύθυνη για αυτή την μείωση που ακολουθεί την ανάπτυξη των αξόνων φαίνεται να είναι η πρωτεΐνη συνταφιλίνη (syntaphilin, SNPH), η οποία δρα ειδικά στα αξονικά μιτοχόνδρια και εμποδίζει τη μετακίνησή τους (Zhou, Yu et al. 2016).

Τα σημαντικότερα γεγονότα της αξονικής αναγέννησης, όπως είναι η δημιουργία των αυξητικών κώνων και η σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων, απαιτούν τεράστια ποσά ενέργειας τα οποία μπορούν να προμηθευτούν από τα μιτοχόνδρια. Επομένως η μεταφορά μιτοχονδρίων σε περιοχές κρίσιμες για τη νευρική αύξηση και αναγέννηση, πιθανότατα αποτελεί μία καλή στρατηγική για την αποκατάσταση των τραυματισμένων αξόνων (Patron and Zinsmaier 2016).

Πειράματα με ποντίκια στα οποία είχε γίνει απαλοιφή του γονιδίου της συνταφιλίνης, μέσω της τεχνικής knockout, η υψηλή αξονική μεταφορά μιτοχονδρίων οδήγησε σε αυξημένη αξονική αναγέννηση *in vitro* (Zhou, Yu et al. 2016). Επιπλέον, σε τραυματισμένους νευρώνες ποντικών στα οποία είχε προηγηθεί ταυτόχρονη απαλοιφή (co-deletion) των γονιδίων της PTEN και του SOCS3, παρατηρήθηκε παράλληλα με την αυξημένη αναγεννητική ικανότητα, δραστική αύξηση τόσο στο ρυθμό μεταφοράς των μιτοχονδρίων όσο και στην πυκνότητά τους, στις είκοσι ώρες μετά το τραύμα (Cartoni, Pekkurnaz et al. 2017). Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι μετά από τραυματισμό του ΚΝΣ, η μεταφορά μιτοχονδρίων συμβάλλει πράγματι στη νευρική αναγέννηση.

Ωστόσο ακόμα δεν έχει διευκρινιστεί ο τρόπος με τον οποίο αυξάνεται ο ρυθμός μεταφοράς μιτοχονδρίων στους τραυματισμένους άξονες ώστε να επέλθει η αποκατάσταση. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι πιθανόν η κινάση DLK-1 (Han, Baig et al. 2016) και το γονίδιο *Armcx1* (Cartoni, Norsworthy et al. 2016) είναι υπεύθυνοι για αυτό το αποτέλεσμα. Μελλοντικά πειράματα θα συμβάλουν στην διαμόρφωση πιο ξεκάθαρης γνώμης σχετικά με τον τρόπο αύξησης του ρυθμού μετακίνησης των μιτοχονδρίων και τον ρόλο τους στην αναγέννηση ΚΝΣ.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι έχει διερευνηθεί και η μεταφορά άλλων φορτίων όπως τα συναπτικά κυστίδια (synaptic vesicles) και τα ώριμα ενδοσώματα (late endosomes) αλλά δεν παρατηρήθηκε κάποια αύξηση στον ρυθμό μεταφοράς τους μετά από τραύμα και επομένως δε συσχετίστηκαν με την αναγεννητική ικανότητα των νευρώνων του ΚΝΣ (Cartoni, Pekkurnaz et al. 2017).

3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Δυσκολίες στην θεραπευτική αντιμετώπιση των τραυμάτων της σπονδυλικής στήλης

Τραυματισμοί μπορούν να συμβούν σε οποιαδήποτε μοίρα της σπονδυλικής στήλης και οδηγούν σε δυσλειτουργία του κινητικού, αισθητικού και αυτόνομου (καρδιοαναπνευστικού, ουροποιητικού, γαστρεντερικού, κλπ) συστήματος. Η σοβαρότητα της δυσλειτουργίας εξαρτάται από τη βαρύτητα και από το σημείο του τραύματος. Οι τραυματισμοί αυτοί συνοδεύονται συνήθως από νευρογενές σοκ και χρόνιο πόνο και ακολουθούν τον ασθενή εφ' όρου ζωής επηρεάζοντας την ψυχολογική, κοινωνική και οικονομική του κατάσταση. Ο πρωτογενής τραυματισμός διαταράσσει την αρχιτεκτονική των ιστών, προκαλεί τομή στους άξονες των νευρώνων και διακόπτει την επικοινωνία μεταξύ του εγκεφάλου και της περιφέρειας οδηγώντας σε διαφορετικού βαθμού κινητικές και αισθητικές δυσλειτουργίες ή/ και παράλυση του σώματος. Μετά από τον αρχικό τραυματισμό ακολουθεί ο δευτερογενής τραυματισμός ο οποίος διακρίνεται σε φάσεις που διαρκούν από ώρες έως χρόνια μετά την έναρξή τους. Τα σημαντικότερα γεγονότα του δευτερογενούς τραυματισμού περιλαμβάνουν την έναρξη της φλεγμονής και το σχηματισμό της ουλής από την μικρογλοία και τα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα.

Δυστυχώς ακόμη δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία για την αντιμετώπιση των τραυμάτων της ΣΣ. Αμέσως μετά τον τραυματισμό πραγματοποιείται χειρουργική αποσυμφόρηση του ασθενούς και χορηγείται φαρμακευτική αγωγή η οποία έχει ως πρωταρχικό στόχο τη μείωση του πόνου και την σταθεροποίηση της κατάστασης. Ένας προφανής λόγος για την έλλειψη αποτελεσματικής θεραπείας είναι η εγγενής πολυπλοκότητα των τραυμάτων και οι πολλές χρονικές φάσεις εξέλιξης της παθογένειας. Ωστόσο, στην βάση της επιτυχούς αποκατάστασης σε αυτούς τους ασθενείς επιδιωκόμενη είναι η ικανοποιητική αναγέννηση των κατεστραμμένων νευρικών κυκλωμάτων.

Ένας κύριος λόγος για τον οποίο δεν έχει βρεθεί ακόμα κατάλληλη θεραπεία είναι η μειωμένη αναγεννητική ικανότητα των νευρώνων του ΚΝΣ. Σε αντίθεση με το ΠΝΣ, οι άξονες του ΚΝΣ δεν μπορούν εύκολα να αναγεννηθούν μετά από τραύμα, καθώς επιδρά σε αυτούς πλήθος εξωγενών και ενδογενών ανασταλτικών παραγόντων. Οι παράγοντες αυτοί έχουν αρχίσει να διερευνώνται εντατικά τα τελευταία χρόνια.

Στους εξωγενείς παράγοντες ανήκουν οι MAIs, μόρια- αναστολείς που σχετίζονται με την μυελίνη, οι οποίοι περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες Nogo, MAG και OMGPs. Επίσης ανασταλτική δράση στην αναγέννηση ασκεί και η ουλή η οποία επάγει αύξηση της έκφρασης των πρωτεογλυκανών θειικής χονδροϊτίνης, CSPGs που εμποδίζουν την αναγέννηση μέσω των αλυσίδων γλυκοζαμινογλυκάνης που διαθέτουν. Τέλος, μόρια- συνδέτες τα οποία φυσιολογικά συμμετέχουν στην

καθοδήγηση των αξόνων κατά την ανάπτυξη, ασκούν είτε ανασταλτική είτε επαγωγική δράση στην αναγέννηση των τραυματισμένων αξόνων. Στα μόρια αυτά ανήκουν μέλη των οικογενειών πρωτεϊνών των νετρινών, εφρινών και σεμαφορινών.

Σηματοδοτικά μονοπάτια που ευοδώνουν τη νευρική αναγέννηση

Οι ενδογενείς παράγοντες είναι πολλοί περισσότεροι από τους εξωγενείς και δρουν πιο πολύπλοκα. Σε αυτούς ανήκουν γνωστά σηματοδοτικά μονοπάτια και μόρια τα οποία φυσιολογικά ρυθμίζουν κρίσιμες κυτταρικές διαδικασίες, καθώς επίσης και μεταγραφικοί παράγοντες. Ένα από τα πιο γνωστά σηματοδοτικά μονοπάτια που επηρεάζουν την αναγέννηση των νευρώνων του ΚΝΣ, είναι αυτό του κυκλικού AMP. Τα ενδοκυττάρια επίπεδα του cAMP μειώνονται σημαντικά μετά από τραύμα και συμβάλλουν στην μειωμένη αναγεννητική ικανότητα των κατεστραμμένων αξόνων. Χορήγηση του φαρμάκου Ρολιπράμη, το οποίο αναστέλλει εκλεκτικά την φωσφοδιεστεράση 4 (PDE4) μετά από τραυματισμό του ΚΝΣ, δρα νευροπροστατευτικά και συμβάλλει στη διατήρηση της αρχιτεκτονικής των ιστών. Επίσης σε προκλινικά πειράματα αποδείχθηκε ότι η Ρολιπράμη βελτιώνει την κινητική λειτουργικότητα των ζώων μετά από τραυματισμό στη ΣΣ. Ο σχεδιασμός Κλινικής Μελέτης για την Ρολιπράμη κρίνεται σκόπιμος και πιθανόν να ανοίξει νέους δρόμους στην εύρεση αποτελεσματικής θεραπείας.

Εκτός από το cAMP, πολλά υποσχόμενο φαρμακολογικό στόχο αποτελεί και η φωσφατάση PTEN. Η PTEN εμπλέκεται σε πολλά μονοπάτια δύο από τα οποία σχετίζονται έντονα με την νευρική αναγέννηση του ΚΝΣ. Το πρώτο και σημαντικότερο σηματοδοτικό μονοπάτι που σχετίζεται με την αναγέννηση το οποίο αναστέλλει η PTEN είναι το μονοπάτι των PI3K/ AKT/ mTOR. Η φαρμακολογική απενεργοποίηση της PTEN μέσω ενώσεων βαναδίου (brV), έχει νευροπροστατευτική δράση σε ζωικά μοντέλα με τραύμα στη ΣΣ και βελτιώνει την αισθητικοκινητική λειτουργία. Άλλο μονοπάτι που επηρεάζει την αναγέννηση των κεντρικών νευρώνων στο οποίο εμπλέκεται η PTEN είναι αυτό της GSK-3. Η αναστολή της PTEN οδηγεί σε αναστολή της GSK-3, βελτιώνοντας την αποκατάσταση των ζώων με τραύμα στο ΚΝΣ. Η ταυτόχρονη εμπλοκή της PTEN σε δύο σηματοδοτικά μονοπάτια είναι αυτή που την καθιστά τόσο ιδιαίτερο φαρμακολογικό στόχο. Ωστόσο οι ενώσεις brV θεωρούνται γενικά μη εκλεκτικές και δυνητικά μπορεί να επιφέρουν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες. Καλύτερη προσέγγιση αποτελούν τα ειδικά ανταγωνιστικά πεπτίδια για την PTEN τα οποία δοκιμάζονται σήμερα σε ζωικά μοντέλα με τραύμα στη ΣΣ και δίνουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Πιθανότατα οι μελέτες αυτές να οδηγήσουν στη δημιουργία πεπτιδικών φαρμάκων ειδικών για την φωσφατάση PTEN που θα δρουν αποτελεσματικά στα τραύματα της ΣΣ. Να τονιστεί ωστόσο ότι το γονίδιο PTEN είναι ογκοκατασταλτικό και επομένως η φαρμακολογική αναστολή του αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο ογκογένεσης. Επομένως ο σχεδιασμός των εν λόγω φαρμάκων και η φαρμακολογική στόχευση της PTEN γενικότερα, απαιτούν

ιδιαίτερη προσοχή και συνεχή διερεύνηση για πιθανή εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών.

Τρίτο σηματοδοτικό μονοπάτι που επηρεάζει την ενδογενή ικανότητα των κεντρικών αξόνων να αναγεννώνται είναι αυτό της JAK/ STAT. Ενεργοποίηση του μονοπατιού μετά από τραύμα στη ΣΣ, οδηγεί σε σημαντική επούλωση της ουλής και βελτίωση της κινητικής λειτουργίας σε ζωικά μοντέλα. Ωστόσο το μονοπάτι αυτό δεν έχει διερευνηθεί ακόμη διεξοδικά και περαιτέρω πειράματα απαιτούνται προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο ρόλος των κινασών Janus στα τραύματα του ΚΝΣ και να κριθεί αν αξίζει η φαρμακολογική στόχευσή τους.

Ακόμα, πρόσφατα μελετάται η επιγενετική ρύθμιση παραγόντων που επηρεάζουν την αύξηση και αναγέννηση των αξόνων, ως στρατηγική για την αποκατάσταση μετά από τραύμα στο ΚΝΣ. Στους παράγοντες αυτούς ανήκουν μέλη της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων KLF, το σύμπλεγμα πρωτεϊνών APC/ Cdh1, οι κινάσες DLK και LZK, η πρωτεΐνη Sox11, ο συμμεταφορέας KCC2, ο υποδοχέας LPA1 και η πρωτεΐνη PRG3. Επίσης, διερευνάται και η μεταφορά μιτοχονδρίων κατά μήκος των αξόνων η οποία μπορεί να προμηθεύσει στους νευρώνες την ενέργεια που απαιτείται για τη διεκπεραίωση της αναγέννησης. Ωστόσο η μελέτη των παραπάνω παραγόντων είναι ακόμα σε πρώιμη φάση και περαιτέρω πειράματα απαιτούνται προκειμένου να διευκρινιστεί ο τρόπος δράσης τους και ο ρόλος τους στην προστασία και την αναγέννηση των κεντρικών αξόνων.

Ο έλεγχος του κυτταροσκελετού της τουμπουλίνης και της ακτίνης στην ενίσχυση των νευρικών αυξητικών κώνων κατά την αναγέννηση

Άλλη στρατηγική που μελετάται ευρέως σήμερα για την αποκατάσταση μετά από τραύμα στη ΣΣ αφορά την σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων. Οι εν λόγω δομές του κυτταροσκελετού έχουν διττό ρόλο στην αναγέννηση των νευρώνων. Από την μία πλευρά, είναι υπαίτιες για την δημιουργία των ανακλητικών κεφαλών έναντι των αυξητικών κώνων εμποδίζοντας έτσι την αναγέννηση των τραυματισμένων αξόνων. Από την άλλη, φαίνεται ότι σχετίζονται με τον σχηματισμό της γλοιακής ουλής. Χορήγηση χαμηλών δόσεων ταξόλης και εποθελόνης σε ζωικά μοντέλα με τραύμα στη ΣΣ, οδηγεί σε περιορισμό της γλοιακής ουλής, μείωση της έκφρασης των CSPGs, αύξηση της αναγέννησης των αξόνων και λειτουργική αποκατάσταση. Ωστόσο, η χρήση των ουσιών αυτών είναι εξαιρετικά επικίνδυνη και απαιτείται προσοχή σε μελλοντικά πειράματα.

Η στόχευση του μονοπατιού της RhoA αποτελεί πολλά υποσχόμενη στρατηγική για την αποκατάσταση των τραυμάτων της σπονδυλικής στήλης

Κατόπιν όλων τούτων η καλύτερα μελετημένη μέχρι στιγμής και πιο αποτελεσματική στρατηγική για την αποκατάσταση των τραυμάτων της ΣΣ είναι η στόχευση του σηματοδοτικού μονοπατιού της RhoA. Τα επίπεδα της RhoA αυξάνονται σημαντικά μετά από τραύμα στο ΚΝΣ σε νευρώνες και κύτταρα γλοίας και εμποδίζουν τη νευρική αύξηση και αναγέννηση. Πειράματα αναστολής της

RhoA μέσω του ενζύμου C3 οδήγησαν στη δημιουργία του πρώτου φαρμάκου ειδικού για τραύματα της ΣΣ. Πρόκειται για το φάρμακο VX-210 το οποίο αποτελεί μία τεχνητή ανασυνδυασμένη μορφή της C3 τρανσφεράσης η οποία διαπερνά την επισκληρίδιο μεμβράνη της ΣΣ και στοχεύει ειδικά την πρωτεΐνη RhoA. Η δημιουργία του VX-210, γέμισε ελπίδα την ερευνητική κοινότητα καθώς αποτελεί το πρώτο φάρμακο που στοχεύει ειδικά ένα μόριο το οποίο επηρεάζει ταυτόχρονα πολλά διακριτά συστήματα που σχετίζονται με την μειωμένη αναγεννητική ικανότητα στο ΚΝΣ. Επιπλέον, το VX-210 είναι το μόνο φάρμακο μέχρι στιγμής το οποίο έχει σαν πρωταρχική δράση την αναγέννηση των νευρώνων και όχι την προστασία τους. Το φάρμακο δοκιμάστηκε σε κλινικές μελέτες Φάσης I/IIa και έδωσε ελπιδοφόρα αποτελέσματα. Ωστόσο η μελέτη Φάσης IIb/ III του φαρμάκου τερματίστηκε πρόωρα και διέκοψε την έρευνά του. Τα αποτελέσματα της Κλινικής Μελέτης Φάσης III αναμένεται να δημοσιευτούν εντός του 2020 και θα καθορίσουν αν αξίζει η στόχευση του εν λόγω μονοπατιού για την αποκατάσταση μετά από τραύμα στη ΣΣ.

Προβλήματα στην μετάφραση των αποτελεσμάτων των προκλινικών μελετών σε κλινικό επίπεδο

Η αποτυχία του VX-210 να αντεπεξέλθει στην κλινική μελέτη Φάσης IIb/III, επιβεβαιώνει για άλλη μία φορά τη δυσκολία «μετάφρασης» των προκλινικών αποτελεσμάτων στην κλινική πραγματικότητα. Είναι συχνό φαινόμενο στην έρευνα, μελέτες να δίνουν εντυπωσιακά αποτελέσματα σε ζωικά μοντέλα και να μην δρουν το ίδιο αποτελεσματικά όταν δοκιμάζονται σε ανθρώπους. Όσον αφορά τα πειράματα για τους τραυματισμούς του ΚΝΣ, πιθανόν η αδυναμία «μετάφρασης» των αποτελεσμάτων να οφείλεται σε δύο παράγοντες. Πρώτα από όλα, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, είναι πολύ δύσκολη η εύρεση κατάλληλων πειραματόζων για τη μελέτη των τραυμάτων της ΣΣ. Μέχρι στιγμής έχουν χρησιμοποιηθεί αρουραίοι, ποντίκια, γάτες, σκύλοι και χοίροι για τη μελέτη τέτοιων τραυματισμών, χωρίς ωστόσο να καταφέρνουν να αναπαραστήσουν πιστά την κλινική πραγματικότητα. Η ανθρώπινη ΣΣ είναι εξαιρετικά πολύπλοκη δομή και όμοιά της δεν απαντάται στο ζωικό βασίλειο. Επίσης η πρόκληση τραυμάτων στα πειραματόζωα δεν έχει ουδεμία σχέση με την ζημιά που προκαλείται από ατυχήματα στην πραγματική ζωή. Ο τρόπος, η δύναμη, το μέσο και η γωνία με την οποία θα τραυματιστεί η ΣΣ επηρεάζουν τη βαρύτητα και την εξέλιξη του τραυματισμού, καθώς επίσης και την πορεία αποκατάστασης του ασθενούς.

Άλλος λόγος ο οποίος πιθανότατα επηρεάζει τη «μετάφραση» των αποτελεσμάτων στην κλινική πραγματικότητα, είναι ότι στην πλειοψηφία των πειραμάτων για τη μελέτη των τραυμάτων του ΚΝΣ χρησιμοποιούνται θηλυκά ζώα καθώς είναι πιο ανθεκτικά στον πόνο και έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα επιβίωσης μετά από τραύμα. Το γεγονός αυτό ίσως οδηγεί τους ερευνητές σε λανθασμένα συμπεράσματα καθώς υπάρχουν παράγοντες που σχετίζονται με το φύλο οι οποίοι

πιθανόν να επηρεάζουν την αποκατάσταση των ζώων. Για παράδειγμα, πρόσφατη μελέτη αποκάλυψε ότι τα οιστρογόνα μειώνουν την ιστική καταστροφή μετά από τραύμα στη ΣΣ. Οι θηλυκοί αρουραίοι παρουσιάζουν καλύτερη αποκατάσταση της κινητικής λειτουργίας και της διατήρησης της λευκής και της φαιάς ουσίας μετά από το τραύμα σε σχέση με τα αρσενικά ζώα (Datto, Bastidas et al. 2015). Ακόμα είναι γνωστό ότι ο κύκλος της έμμηνου ρήσης επηρεάζει τις απαντήσεις του ανοσοποιητικού συστήματος (Krzych, Strausser et al. 1978) και πιθανόν μετά από τραυματισμό τα θηλυκά ζώα να παρουσιάζουν βελτιωμένη αποκατάσταση από τα αρσενικά λόγω της μειωμένης φλεγμονής. Να σημειωθεί ότι μέχρι στιγμής δεν έχουν βρεθεί διαφορές στην αποκατάσταση μετά από τραύμα στη ΣΣ μεταξύ των δύο φύλων στους ανθρώπους (Kaminski, Cordemans et al. 2017). Ωστόσο, είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθούν επιπλέον πειράματα προς αυτή την κατεύθυνση προκειμένου να αποσαφηνιστούν οι διαφορές θηλυκών και αρσενικών ζώων στους τραυματισμούς ώστε οι ερευνητές να οδηγούνται σε πιο ασφαλή συμπεράσματα και να γίνεται πιο αξιόπιστη «μετάφραση» των αποτελεσμάτων στην κλινική πρακτική.

Εκτός από την ενδογενή ικανότητα του ΚΝΣ να μην αναγεννάται εύκολα μετά από τραύμα και τη δυσκολία μετάφρασης των πειραματικών αποτελεσμάτων στην κλινική πραγματικότητα, άλλος λόγος για τον οποίο δεν υπάρχει ακόμα αποτελεσματική θεραπεία για την αντιμετώπιση τέτοιων τραυμάτων είναι η πολυπλοκότητα των συνδέσεων του ΚΝΣ. Μέσω της φαρμακολογικής στόχευσης των παραπάνω μονοπατιών και μορίων πράγματι είναι πιθανό να επιτευχθεί προστασία των νευρώνων και επιμήκυνση των τραυματισμένων αξόνων. Ωστόσο η νευρική αύξηση δεν οδηγεί απαραίτητα σε αποκατάσταση της κινητικοαισθητικής λειτουργίας. Η ανθρώπινη ΣΣ είναι εξαιρετικά πολύπλοκη και περιλαμβάνει καθοδικά και ανοδικά δίκτυα που μεταφέρουν την πληροφορία από τον εγκέφαλο προς την περιφέρεια και αντίθετα. Ακόμα λοιπόν και αν οι νευράξονες καταφέρουν να αναγεννηθούν, δεν είναι σίγουρο ότι θα επιμηκυνθούν σε τέτοια έκταση ώστε να ξεπεράσουν το σημείο του τραύματος και να φτάσουν τους στόχους τους. Επιπλέον, ακόμα και αν καταφέρουν να καλύψουν την απόσταση κατά μήκος του τραύματος, δεν είναι βέβαιο ότι θα καταφέρουν να συνδεθούν με τους στόχους τους καθώς πολλά άλλα μόρια απαιτούνται για την επιτυχή σύνδεση τα οποία μπορεί να έχουν χάσει τη δραστηριότητά τους μετά το τραύμα.

Άλλες μελλοντικές κατευθύνσεις στην έρευνα της νευρικής αναγέννησης

Με βάση όσα συζητήθηκαν παραπάνω, δοκιμάζονται σε προκλινικά πειράματα και άλλες προσεγγίσεις όπως η μεταμόσχευση κυττάρων μετά από τραύμα στο ΚΝΣ. Κυρίως μελετάται η μεταμόσχευση κυττάρων Schwann, νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs), ολιγοδενδροκυττάρων και μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων. Η μεταμόσχευση αυτών των κυττάρων είναι πλέον εύκολο να πραγματοποιηθεί ωστόσο δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί κατά πόσο είναι

αποτελεσματική και ασφαλής σε βάθος χρόνου. Σε προκλινικά πειράματα, φαίνεται ότι μεταμόσχευση νευρικών βλαστικών κυττάρων βελτιώνει την νευρική αύξηση μετά από το τραύμα. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα αυτά φτιάχνουν «γέφυρες» ή «σχεδίες» κατά μήκος του τραύματος, παρέχοντας στους νευρώνες ένα «υπόστρωμα» πάνω στο οποίο μπορούν να αυξηθούν και να επιμηκυνθούν ώστε να φτάσουν επιτυχώς στους στόχους τους και να αποκατασταθεί η επικοινωνία μεταξύ του εγκεφάλου και της περιφέρειας. Επιπλέον, τα κύτταρα αυτά εκκρίνουν τροφικούς παράγοντες και κυτοκίνες οι οποίοι δρουν προστατευτικά και ρυθμίζουν τις απαντήσεις του ανοσοποιητικού συστήματος (Assinck, Duncan et al. 2017).

Η επιτυχής αναγέννηση των νευρώνων μετά από τραύμα στη σπονδυλική στήλη απαιτεί την συνέργεια ποικίλων θεραπευτικών στρατηγικών

Εν κατακλείδι, ακριβώς επειδή το τραύμα στη ΣΣ επηρεάζει ταυτόχρονα πολλά συστήματα, η καλύτερη στρατηγική για την θεραπεία τέτοιων τραυματισμών φαίνεται πως είναι μία «συνεργιστική στρατηγική». Προκειμένου να επιτευχθεί επιτυχής αποκατάσταση μετά από τον τραυματισμό, είναι αναγκαία η ταυτόχρονη στόχευση όλων των παραγόντων που επηρεάζουν την πλαστικότητα και την ενδογενή ικανότητα των νευρώνων του ΚΝΣ να αναγεννώνται. Αυτό απαιτεί σταθεροποίηση της κατάστασης, προστασία των άθικτων νευρώνων, αναγέννηση των τραυματισμένων αξόνων και επιτυχή σύνδεσή τους με τους στόχους τους και τελικά «επανεκκίνησης» της νευρικής λειτουργίας. Για το σκοπό αυτό είναι απαραίτητη η συνέργεια όλων των τεχνικών που χρησιμοποιούνται σήμερα στην κλινική πρακτική ή δοκιμάζονται πειραματικά, όπως η χειρουργική αποσυμφόρηση, η σταθεροποίηση του εξωτερικού περιβάλλοντος των νευρώνων, η στόχευση των σηματοδοτικών μονοπατιών και των ενδογενών παραγόντων που αναστέλλουν την αναγέννηση, η ικανότητα επανασύνδεσης των τραυματισμένων αξόνων μέσω νευρικών βλαστικών κυττάρων και η αποκατάσταση της νευρικής δραστηριότητας. Μπορεί όλα αυτά να ακούγονται αρκετά σύνθετα και να αποθαρρύνουν τους ερευνητές, αλλά δεν πρέπει να ξεχνάμε την πρόοδο που έχει γίνει σε αυτό τον τομέα. **Η αναγέννηση του ΚΝΣ παλιότερα φάνταζε απίθανη ωστόσο πλέον έχει ταυτοποιηθεί πλήθος παραγόντων που επηρεάζουν την αναγέννηση και έχουν σχεδιαστεί αρκετά φάρμακα τα οποία δοκιμάζονται σε προκλινικές μελέτες δίνοντας ελπιδοφόρα αποτελέσματα.** Η συνεχής προσπάθεια των ερευνητών σε αυτό το πεδίο σε συνδυασμό με τη χρήση της ολοένα και πιο καινοτόμου τεχνολογίας και την εύρεση κατάλληλων πειραματόζων, θα οδηγήσουν σίγουρα στην εύρεση της κατάλληλης στρατηγικής και θα γεφυρώσουν το χάσμα μεταξύ των προκλινικών αποτελεσμάτων και της κλινικής πραγματικότητας. Κάποια στιγμή στο μέλλον η αποκατάσταση μετά από τραύμα στο κεντρικό νευρικό σύστημα θα είναι τόσο εύκολη όσο η αποκατάσταση στο περιφερικό νευρικό σύστημα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα βιβλιογραφική εργασία παρουσιάζονται στρατηγικές νευροπροστασίας και νευρικής αναγέννησης για την αποκατάσταση των τραυμάτων της σπονδυλικής στήλης. Τραυματισμοί μπορούν να συμβούν κατά μήκος της σπονδυλικής στήλης σε οποιοδήποτε μοίρα της και η βαρύτητα των συμπτωμάτων ποικίλει ανάλογα με το βαθμό και το σημείο του τραύματος. Ένας από τους βασικότερους λόγους για τους οποίους δεν υπάρχει ακόμα θεραπεία για την αντιμετώπιση των τραυμάτων αυτών είναι η μειωμένη ικανότητα των νευρώνων του ΚΝΣ να αναγεννώνται καθώς ασκούνται σε αυτούς πλήθος ανασταλτικών εξωγενών και ενδογενών παραγόντων. Στην εν λόγω διπλωματική εργασία δίνεται έμφαση στους ενδογενείς παράγοντες που αναστέλλουν την αξονική αναγέννηση στο ΚΝΣ και παρουσιάζονται οι σημαντικότερες μέχρι σήμερα μελέτες που αφορούν την φαρμακολογική στόχευσή τους με σκοπό την αποκατάσταση των τραυμάτων της σπονδυλικής στήλης. Στους παράγοντες αυτούς ανήκουν γνωστά σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία φυσιολογικά ρυθμίζουν κρίσιμες κυτταρικές διαδικασίες, όπως το μονοπάτι του κυκλικού AMP, της PI3K, της RhoA και των κινασών JAK. Επίσης την ενδογενή ικανότητα των κεντρικών νευρώνων να αναγεννώνται επηρεάζουν και τα δομικά στοιχεία του κυτταροσκελετού, δηλαδή η τουμπουλίνη και η ακτίνη. Τέλος, η επιγενετική ρύθμιση μορίων και μεταγραφικών παραγόντων, όπως οι KLF, Sox11, LPAR1 κ.α. καθώς και η μεταφορά μιτοχονδρίων κατά μήκος του άξονα, φαίνεται πως έχει νευροπροστατευτική δράση και επάγει την αξονική αναγέννηση μετά από τραύμα στο ΚΝΣ. Η φαρμακολογική στόχευση των παραπάνω ενδογενών παραγόντων, σε συνδυασμό με τη ρύθμιση των εξωκυττάρων σημάτων που αναστέλλουν την αναγέννηση, τις θεραπείες αποκατάστασης που χρησιμοποιούνται ήδη στην κλινική πρακτική αλλά και καινούργιες πειραματικές θεραπείες που δοκιμάζονται αυτή τη στιγμή προκλινικά, πιθανόν θα οδηγήσουν στη δημιουργία κατάλληλης στρατηγικής για την αντιμετώπιση τέτοιων τραυματισμών

SUMMARY

In the present bibliographic review, we present strategies to enhance neuroprotection and nerve regeneration after spinal cord injury (SCI). Injury can occur at any level of the spinal cord and the severity of the symptoms varies depending on the location and severity of the damage. One of the main reasons that there is still no cure for SCI is the poor ability of the adult CNS to regenerate and restore function after injury. The failure of central axons to regenerate after damage is attributed to the presence of a growth inhibitory extrinsic environment and the loss of intrinsic growth capacity of these axons. This study focuses on the intrinsic regulators of neural repair of the CNS and summarizes the most important findings to date, regarding the pharmacological targeting of these factors. Intrinsic influences of neural repair include signaling pathways such as the cyclic AMP, PI3K, RhoA and JAK kinases. The endogenous ability of central neurons to regenerate is also affected by the structural elements of the cytoskeleton, namely tubulin and actin. Finally, the epigenetic regulation of molecules and transcription factors such as KLF, Sox11, LPAR1, etc. as well as the axonal transport of mitochondria appear to have a neuroprotective effect and induce axonal regeneration after SCI. Pharmacological targeting of the above intrinsic factors, in combination with the regulation of extracellular signals that inhibit regeneration, rehabilitation treatments already used in clinical practice and new experimental techniques currently being tested, may lead to a successful treatment for spinal cord injury.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adolf, A., G. Leondaritis, A. Rohrbeck, B. J. Eickholt, I. Just, G. Ahnert-Hilger and M. Holtje (2016). "The intermediate filament protein vimentin is essential for axonotrophic effects of Clostridium botulinum C3 exoenzyme." J Neurochem **139**(2): 234-244.
- Ahuja, C. S., J. R. Wilson, S. Nori, M. R. N. Kotter, C. Druschel, A. Curt and M. G. Fehlings (2017). "Traumatic spinal cord injury." Nat Rev Dis Primers **3**: 17018.
- Alizadeh, A., S. M. Dyck and S. Karimi-Abdolrezaee (2015). "Myelin damage and repair in pathologic CNS: challenges and prospects." Front Mol Neurosci **8**: 35.
- Anderson, M. A., J. E. Burda, Y. Ren, Y. Ao, T. M. O'Shea, R. Kawaguchi, G. Coppola, B. S. Khakh, T. J. Deming and M. V. Sofroniew (2016). "Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration." Nature **532**(7598): 195-200.
- Assinck, P., G. J. Duncan, B. J. Hilton, J. R. Plemel and W. Tetzlaff (2017). "Cell transplantation therapy for spinal cord injury." Nature Neuroscience **20**: 637-647.
- Atkinsa, C. M., A. A. Oliva, O. F. Alonso, D. D. Pearsea, H. M. Bramletta and W. D. Dietricha (2007). "Modulation of the cAMP signaling pathway after traumatic brain injury." Exp Neurol. **208**: 145- 158.
- Atwal, J. K., J. Pinkston-Gosse, J. Syken, S. Stawicki, Y. Wu, C. Shatz and M. Tessier-Lavigne (2008). "PirB is a Functional Receptor for Myelin Inhibitors of Axonal Regeneration " SCIENCE **322**.
- Baas, P. W. and F. J. Ahmad (2013). "Beyond taxol: microtubule-based treatment of disease and injury of the nervous system." Brain **136**(Pt 10): 2937-2951.
- Bareyre, F. M. and M. E. Schwab (2003). "Inflammation, degeneration and regeneration in the injured spinal cord: insights from DNA microarrays." Trends Neurosci **26**(10): 555-563.
- Batty, N. J., K. K. Fenrich and K. Fouad (2017). "The role of cAMP and its downstream targets in neurite growth in the adult nervous system." Neurosci Lett **652**: 56-63.
- Beattie, M. S., G. E. Hermann, R. C. Rogers and J. C. Bresnahan (2002). "Cell death in models of spinal cord injury " Progress in Brain Research **137**.
- Bican, O., A. Minagar and A. A. Pruitt (2013). "The spinal cord: a review of functional neuroanatomy." Neurol Clin **31**(1): 1-18.

Blaesse, P., M. S. Airaksinen, C. Rivera and K. Kaila (2009). "Cation-chloride cotransporters and neuronal function." Neuron **61**(6): 820-838.

Blanquie, O. and F. Bradke (2018). "Cytoskeleton dynamics in axon regeneration." Curr Opin Neurobiol **51**: 60-69.

Blight, A. R., K. Saito and M. P. Heyes (1993). "Increased levels of the excitotoxin quinolinic acid in spinal cord following contusion injury." Brain Research **632**: 314-316.

Boyer, N. P. and S. L. Gupton (2018). "Revisiting Netrin-1: One Who Guides (Axons)." Front Cell Neurosci **12**: 221.

Butcher, R. W. and E. W. Sutherland (1962). "Adenosine 3', 5'- Phosphate in Biological Materials " The Journal of Biological Chemistry **237**.

Cafferty, W. B., N. J. Gardiner, P. Das, J. Qiu, S. B. McMahon and S. W. Thompson (2004). "Conditioning injury-induced spinal axon regeneration fails in interleukin-6 knock-out mice." J Neurosci **24**(18): 4432-4443.

Cai, D., J. Qiu, Z. Cao, M. McAtee, B. S. Bregman and M. T. Filbin1 (2001). "Neuronal Cyclic AMP Controls the Developmental Loss in Ability of Axons to Regenerate." The Journal of Neuroscience **21**: 4731-4739.

Cajal, S. R. y. (1930). "Degeneration and Regeneration of the Nervous System." Nature **125**: 230-231.

Caroni, P. and M. E. Schwab (1988). "Antibody Against Myelin- Associated Inhibitor of Neurite Growth Neutralizes Nonpermissive Substrate Properties of CNS White Matter." Neuron **1**.

Cartoni, R., M. W. Norsworthy, F. Bei, C. Wang, S. Li, Y. Zhang, C. V. Gabel, T. L. Schwarz and Z. He (2016). "The Mammalian-Specific Protein *Armcx1* Regulates Mitochondrial Transport during Axon Regeneration." Neuron **92**(6): 1294-1307.

Cartoni, R., G. Pekkurnaz, C. Wang, T. L. Schwarz and Z. He (2017). "A high mitochondrial transport rate characterizes CNS neurons with high axonal regeneration capacity." PLoS One **12**(9): e0184672.

Carulli, D., T. Laabs, H. M. Geller and J. W. Fawcett (2005). "Chondroitin sulfate proteoglycans in neural development and regeneration." Curr Opin Neurobiol **15**(1): 116-120.

Cattaneo, E., L. Conti and C. De-Fraja (1999). "Signalling through the JAK-STAT pathway in the developing brain." Trends in Neuroscience **22**: 365-369.

Chen, B., Y. Li, B. Yu, Z. Zhang, B. Brommer, P. R. Williams, Y. Liu, S. V. Hegarty, S. Zhou, J. Zhu, H. Guo, Y. Lu, Y. Zhang, X. Gu and Z. He (2018). "Reactivation of

Dormant Relay Pathways in Injured Spinal Cord by KCC2 Manipulations." Cell **174**(3): 521-535 e513.

Chen, M., C. G. Geoffroy, J. M. Meves, A. Narang, Y. Li, M. T. Nguyen, V. S. Khai, X. Kong, C. L. Steinke, K. I. Carolino, L. Elziere, M. P. Goldberg, Y. Jin and B. Zheng (2018). "Leucine Zipper-Bearing Kinase Is a Critical Regulator of Astrocyte Reactivity in the Adult Mammalian CNS." Cell Rep **22**(13): 3587-3597.

Choi, J. W., D. R. Herr, K. Noguchi, Y. C. Yung, C. W. Lee, T. Mutoh, M. E. Lin, S. T. Teo, K. E. Park, A. N. Mosley and J. Chun (2010). "LPA receptors: subtypes and biological actions." Annu Rev Pharmacol Toxicol **50**: 157-186.

Crowe, M. J., J. S. Bresnahan, S. I. Shuman, J. N. Masters and M. S. Beattie (1997). "Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys " Nature Medicine **3**.

Curcio, M. and F. Bradke (2018). "Axon Regeneration in the Central Nervous System: Facing the Challenges from the Inside." Annu Rev Cell Dev Biol **34**: 495-521.

Danilov, C. A. and O. Steward (2015). "Conditional genetic deletion of PTEN after a spinal cord injury enhances regenerative growth of CST axons and motor function recovery in mice." Exp Neurol **266**: 147-160.

Datto, J. P., J. C. Bastidas, N. L. Miller, A. K. Shah, K. L. Arheart, A. E. Marcillo, W. D. Dietrich and D. D. Pearse (2015). "Female Rats Demonstrate Improved Locomotor Recovery and Greater Preservation of White and Gray Matter after Traumatic Spinal Cord Injury Compared to Males." J Neurotrauma **32**(15): 1146-1157.

David, S. and A. Kroner (2011). "Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury." Nat Rev Neurosci **12**(7): 388-399.

Dergham, P., B. Ellezam, C. Essagian, H. Avedissian, W. D. Lubell and L. McKerracher (2002). "Rho Signaling Pathway Targeted to Promote Spinal Cord Repair " The Journal of Neuroscience **22**(15): 6570-6577.

Diekmann, H. and D. Fischer (2015). "Role of GSK3 in peripheral nerve regeneration." Neural Regen Res **10**(10): 1602-1603.

Dill, J., H. Wang, F. Zhou and S. Li (2008). "Inactivation of glycogen synthase kinase 3 promotes axonal growth and recovery in the CNS." J Neurosci **28**(36): 8914-8928.

Ditunno, J. F., W. Young, W. H. Donovan and G. Creasey (1994). "The International Standards Booklet for Neurological and Functional Classification of Spinal Cord Injury." Spinal Cord **32**(2): 70-80.

- Domeniconi, M., Z. Cao, T. Spencer, R. Sivasankaran, K. C. Wang, H. Cai, E. Nikulina, K. Deng, Z. He and M. T. Filbin (2002). "Myelin-Associated Glycoprotein Interacts with the Nogo66 Receptor to Inhibit Neurite Outgrowth." Neuron **35**.
- Don, A. S., C. K. Tsang, T. M. Kazdoba, G. D'Arcangelo, W. Young and X. F. Zheng (2012). "Targeting mTOR as a novel therapeutic strategy for traumatic CNS injuries." Drug Discov Today **17**(15-16): 861-868.
- Dun, X. P. and D. B. Parkinson (2017). "Role of Netrin-1 Signaling in Nerve Regeneration." Int J Mol Sci **18**(3).
- Erturk, A., F. Hellal, J. Enes and F. Bradke (2007). "Disorganized microtubules underlie the formation of retraction bulbs and the failure of axonal regeneration." J Neurosci **27**(34): 9169-9180.
- Fawcett, J. W. and J. Verhaagen (2018). "Intrinsic Determinants of Axon Regeneration." Dev Neurobiol **78**(10): 890-897.
- Fehlings, M. G. and D. H. Nguyen (2010). "Immunoglobulin G: a potential treatment to attenuate neuroinflammation following spinal cord injury." J Clin Immunol **30 Suppl 1**: S109-112.
- Fehlings, M. G., N. Theodore, J. Harrop, G. Maurais, C. Kuntz, C. I. Shaffrey, B. K. Kwon, J. Chapman, A. Yee, A. Tighe and L. McKerracher (2011). "A phase I/IIa clinical trial of a recombinant Rho protein antagonist in acute spinal cord injury." J Neurotrauma **28**(5): 787-796.
- Figueiredo, N. (2017). "Motor exam of patients with spinal cord injury: a terminological imbroglio." Neurol Sci **38**(7): 1159-1165.
- Fink, K. L., F. Lopez-Giraldez, I. J. Kim, S. M. Strittmatter and W. B. J. Cafferty (2017). "Identification of Intrinsic Axon Growth Modulators for Intact CNS Neurons after Injury." Cell Rep **18**(11): 2687-2701.
- Fitzharris, M., R. A. Cripps and B. B. Lee (2014). "Estimating the global incidence of traumatic spinal cord injury." Spinal Cord **52**(2): 117-122.
- Fournier, A. E., T. GrandPre and S. M. Strittmatter (2001). "Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration " Nature **409**.
- Fujita, Y. and T. Yamashita (2014). "Axon growth inhibition by RhoA/ROCK in the central nervous system." Front Neurosci **8**: 338.
- Galtrey, C. M. and J. W. Fawcett (2007). "The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system." Brain Res Rev **54**(1): 1-18.

Gao, Y., K. Deng, J. Hou, J. B. Bryson, A. Barco, E. Nikulina, T. Spencer, W. Mellado, E. R. Kandel and M. T. Filbin (2004). "Activated CREB is sufficient to overcome inhibitors in myelin and promote spinal axon regeneration in vivo." Neuron **44**(4): 609-621.

Ghosh, M., D. Garcia-Castillo, V. Aguirre, R. Golshani, C. M. Atkins, H. M. Bramlett, W. D. Dietrich and D. D. Pearse (2012). "Proinflammatory cytokine regulation of cyclic AMP-phosphodiesterase 4 signaling in microglia in vitro and following CNS injury." Glia **60**(12): 1839-1859.

Goffin, A., L. H. Hoefsloot, E. Bosgoed, A. Swillen and J.-P. Fryns (2001). "PTEN mutation in a family with Cowden syndrome and autism " American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics) 521- 524

Goldshmit, Y., S. Kanner, M. Zacs, F. Frisca, A. R. Pinto, P. D. Currie and R. Pinkas-Kramarski (2015). "Rapamycin increases neuronal survival, reduces inflammation and astrocyte proliferation after spinal cord injury." Mol Cell Neurosci **68**: 82-91.

GrandPre, T., F. Nakamura, T. Vartanian and S. M. Strittmatter (2000). "Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein." Nature **403**.

Guo, Y., S. Liu, X. Zhang, L. Wang, X. Zhang, A. Hao, A. Han and J. Yang (2014). "Sox11 promotes endogenous neurogenesis and locomotor recovery in mice spinal cord injury." Biochem Biophys Res Commun **446**(4): 830-835.

Gutilla, E. A. and O. Steward (2016). "Selective neuronal PTEN deletion: can we take the brakes off of growth without losing control?" Neural Regen Res **11**(8): 1201-1203.

Hammarlund, M., P. Nix, L. Hauth, E. M. Jorgensen and M. Bastiani (2009). "Axon Regeneration Requires A Conserved MAP Kinase Pathway " Science **323**: 802–806.

Han, S. M., H. S. Baig and M. Hammarlund (2016). "Mitochondria Localize to Injured Axons to Support Regeneration." Neuron **92**(6): 1308-1323.

Hanson, M. G., S. Shen, A. P. Wiemelt, F. A. McMorris and B. A. Barres (1998). "Cyclic AMP Elevation Is Sufficient to Promote the Survival of Spinal Motor Neurons In Vitro " The Journal of Neuroscience **18**: 7361–7371.

Hao, Y., E. Frey, C. Yoon, H. Wong, D. Nestorovski, L. B. Holzman, R. J. Giger, A. DiAntonio and C. Collins (2016). "An evolutionarily conserved mechanism for cAMP elicited axonal regeneration involves direct activation of the dual leucine zipper kinase DLK." Elife **5**.

Hawryluk, G., W. Whetstone, R. Saigal, A. Ferguson, J. Talbott, J. Bresnahan, S. Dhall, J. Pan, M. Beattie and G. Manley (2015). "Mean Arterial Blood Pressure Correlates

with Neurological Recovery after Human Spinal Cord Injury: Analysis of High Frequency Physiologic Data." J Neurotrauma **32**(24): 1958-1967.

Hellal, F., A. Hurtado, J. Ruschel, K. C. Flynn, C. J. Laskowski, M. Umlauf, L. C. Kapitein, D. Strikis, V. Lemmon, J. Bixby, C. C. Hoogenraad and F. Bradke (2011). "Microtubule stabilization reduces scarring and causes axon regeneration after spinal cord injury." Science **331**(6019): 928-931.

Hermida, M. A., J. Dinesh Kumar and N. R. Leslie (2017). "GSK3 and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signalling network." Adv Biol Regul **65**: 5-15.

Herrmann, J. E., T. Imura, B. Song, J. Qi, Y. Ao, T. K. Nguyen, R. A. Korsak, K. Takeda, S. Akira and M. V. Sofroniew (2008). "STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury." J Neurosci **28**(28): 7231-7243.

Hirokawa, T., Y. Zou, Y. Kurihara, Z. Jiang, Y. Sakakibara, H. Ito, K. Funakoshi, N. Kawahara, Y. Goshima, S. M. Strittmatter and K. Takei (2017). "Regulation of axonal regeneration by the level of function of the endogenous Nogo receptor antagonist LOTUS." Sci Rep **7**(1): 12119.

Horky, L. L., F. Galimi, F. H. Gage and P. J. Horner (2006). "Fate of endogenous stem/progenitor cells following spinal cord injury." J Comp Neurol **498**(4): 525-538.

Howitt, J., J. Lackovic, L. H. Low, A. Naguib, A. Macintyre, C. P. Goh, J. K. Callaway, V. Hammond, T. Thomas, M. Dixon, U. Putz, J. Silke, P. Bartlett, B. Yang, S. Kumar, L. C. Trotman and S. S. Tan (2012). "Ndfip1 regulates nuclear Pten import in vivo to promote neuronal survival following cerebral ischemia." J Cell Biol **196**(1): 29-36.

Impellizzeri, D., E. Mazzon, I. Paterniti, E. Esposito and S. Cuzzocrea (2012). "Effect of fasudil, a selective inhibitor of Rho kinase activity, in the secondary injury associated with the experimental model of spinal cord trauma." J Pharmacol Exp Ther **343**(1): 21-33.

Jacob, J. M. and I. G. M. Quarrie (1991). "Axotomy Accelerates Slow Component b of Axonal Transport." J Neurobiol.: 570-582.

Jalan, D., N. Saini, M. Zaidi, A. Pallottie, S. Elkabes and R. F. Heary (2017). "Effects of early surgical decompression on functional and histological outcomes after severe experimental thoracic spinal cord injury." J Neurosurg Spine **26**(1): 62-75.

Jalink, K., E. J. v. Corven, T. Hengeveld, N. Morii, S. Narumiya and W. H. Moolenaar (1994). "Inhibition of Lysophosphatidate- and Thrombin-induced Neurite Retraction and Neuronal Cell Rounding by ADP Ribosylation of the Small GTP-binding Protein Rho." The Journal of Cell Biology **126**.

- Jean, S. and A. A. Kiger (2014). "Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance." J Cell Sci **127**(Pt 5): 923-928.
- Jing, X., T. Wang, S. Huang, J. C. Glorioso and K. M. Albers (2012). "The transcription factor Sox11 promotes nerve regeneration through activation of the regeneration-associated gene Sprr1a." Exp Neurol **233**(1): 221-232.
- Kaminski, L., V. Cordemans, E. Cernat, K. I. M'Bra and J. M. Mac-Thiong (2017). "Functional Outcome Prediction after Traumatic Spinal Cord Injury Based on Acute Clinical Factors." J Neurotrauma **34**(12): 2027-2033.
- Kaplan, A., S. Ong Tone and A. E. Fournier (2015). "Extrinsic and intrinsic regulation of axon regeneration at a crossroads." Front Mol Neurosci **8**: 27.
- Katoh, H., J. Aoki, Y. Yamaguchi, Y. Kitano, A. Ichikawa and M. Negishi (1998). "Constitutively Active G α 12, G α 13, and G α q Induce Rho-dependent Neurite Retraction through Different Signaling Pathways." The Journal of Biological Chemistry **273**: 28700–28707.
- Kleppisch, T. (2009). Phosphodiesterases in the Central Nervous System. Berlin.
- Knott, E. P., M. Assi, S. N. Rao, M. Ghosh and D. D. Pearse (2017). "Phosphodiesterase Inhibitors as a Therapeutic Approach to Neuroprotection and Repair." Int J Mol Sci **18**(4).
- Ko, H. Y. (2018). "Revisit Spinal Shock: Pattern of Reflex Evolution during Spinal Shock." Korean J Neurotrauma **14**(2): 47-54.
- Kottis, V., P. Thibault, D. Mikol, Z.-C. Xiao, R. Zhang, P. Dergham and P. E. Braun (2002). "Oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) is an inhibitor of neurite outgrowth." Journal of Neurochemistry **82**: 1566-1569.
- Kranenburg, O., M. Poland, M. Gebbink, L. Oomen and W. H. Moolenaar (1997). "Dissociation of LPA-induced cytoskeletal contraction from stress fiber formation by differential localization of RhoA." Journal of Cell Science **110**: 2417-2427
- Krause, W., G. Ktthne and N. Sauerbrey (1990). "Pharmacokinetics of (+)-rolipram and (-)-rolipram in healthy volunteers." Eur J Clin Pharmacol **38**.
- Kreis, P., G. Leondaritis, I. Lieberam and B. J. Eickholt (2014). "Subcellular targeting and dynamic regulation of PTEN: implications for neuronal cells and neurological disorders." Front Mol Neurosci **7**: 23.
- Krzych, U., H. R. Strausser, J. P. Bressler and A. L. Goldstein (1978). "Quantitative Differences in Immune Responses during the Various Stages of the Estrous Cycle in Female BALB/c Mice." The Journal of Immunology **121**.

Lee, H. J., J. Wu, J. Chung and J. R. Wrathall (2013). "SOX2 expression is upregulated in adult spinal cord after contusion injury in both oligodendrocyte lineage and ependymal cells." J Neurosci Res **91**(2): 196-210.

Lehmann, M., A. Fournier, I. Selles-Navarro, N. Leclerc, G. Tigyi and L. McKerracher¹ (1999). "Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration " The Journal of Neuroscience **19**(17):7537-7547.

Leibinger, M., A. Andreadaki, R. Golla, E. Levin, A. M. Hilla, H. Diekmann and D. Fischer (2017). "Boosting CNS axon regeneration by harnessing antagonistic effects of GSK3 activity." Proc Natl Acad Sci U S A **114**(27): E5454-E5463.

Leung, Y. K., M. Pankhurst, S. A. Dunlop, S. Ray, J. Dittmann, E. D. Eaton, P. Palumaa, R. Sillard, M. I. Chuah, A. K. West and R. S. Chung (2010). "Metallothionein induces a regenerative reactive astrocyte phenotype via JAK/STAT and RhoA signalling pathways." Exp Neurol **221**(1): 98-106.

Liu, D., G.-Y. Xu, E. Pan and D. J. M. Adoo (1999). "Neurotoxicity of Glutamate at the Concentration Released Upon Spinal Cord Injury." Neuroscience **93**.

Liu, K., Y. Lu, J. K. Lee, R. Samara, R. Willenberg, I. Sears-Kraxberger, A. Tedeschi, K. K. Park, D. Jin, B. Cai, B. Xu, L. Connolly, O. Steward, B. Zheng and Z. He (2010). "PTEN deletion enhances the regenerative ability of adult corticospinal neurons." Nat Neurosci **13**(9): 1075-1081.

Lord-Fontaine, S., F. Yang, Q. Diep, P. Dergham, S. Munzer, P. Tremblay and L. McKerracher (2008). "Local inhibition of Rho signaling by cell-permeable recombinant protein BA-210 prevents secondary damage and promotes functional recovery following acute spinal cord injury." J Neurotrauma **25**(11): 1309-1322.

Lu, P., H. Yang, L. L. Jones, M. T. Filbin and M. H. Tuszynski (2004). "Combinatorial therapy with neurotrophins and cAMP promotes axonal regeneration beyond sites of spinal cord injury." J Neurosci **24**(28): 6402-6409.

Ma, X. M. and J. Blenis (2009). "Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(5): 307-318.

Mao, L., W. Gao, S. Chen, Y. Song, C. Song, Z. Zhou, H. Zhao, K. Zhou, W. Wang, K. Zhu, C. Liu and X. Mei (2017). "Epothilone B impairs functional recovery after spinal cord injury by increasing secretion of macrophage colony-stimulating factor." Cell Death Dis **8**(11): e3162.

McConnell, B. B. and V. W. Yang (2010). "Mammalian Kriippel-Like Factors in Health and Diseases." Physiol Rev **90**: 1337-1381.

McKerracher, L., S. David, D. L. Jackson, V. Kottis, R. j. Dunn and P. E. Braunt (1994). "Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth " Neuron **13**: 805-811.

Meyer-Franke, A., M. R. Kaplan, F. W. Pfrieger and B. A. Barres (1995). "Characterization of the Signaling Interactions That Promote the Survival and Growth of Developing Retinal Ganglion Cells in Culture " Neuron **15**: 805-819.

Mitchison, T. and M. Kirschner (1984). "Dynamic instability of microtubule growth." Nature **312**.

Moore, D. L., M. G. Blackmore, Y. Hu, K. H. Kaestner, J. L. Bixby, V. P. Lemmon and J. L. Goldberg (2009). "KLF family members regulate intrinsic axon regeneration ability." Science **326**(5950): 298-301.

Mueller, B. K., H. Mack and N. Teusch (2005). "Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders." Nat Rev Drug Discov **4**(5): 387-398.

Nakashima, S., S. A. Arnold, E. T. Mahoney, S. D. Sithu, Y. P. Zhang, S. E. D'Souza, C. B. Shields and T. Hagg (2008). "Small-molecule protein tyrosine phosphatase inhibition as a neuroprotective treatment after spinal cord injury in adult rats." J Neurosci **28**(29): 7293-7303.

Nakatsu, F., M. Messa, R. Nandez, H. Czapla, Y. Zou, S. M. Strittmatter and P. De Camilli (2015). "Sac2/INPP5F is an inositol 4-phosphatase that functions in the endocytic pathway." J Cell Biol **209**(1): 85-95.

Nawabi, H., S. Belin, R. Cartoni, P. R. Williams, C. Wang, A. Latremoliere, X. Wang, J. Zhu, D. G. Taub, X. Fu, B. Yu, X. Gu, C. J. Woolf, J. S. Liu, C. V. Gabel, J. A. Steen and Z. He (2015). "Doublecortin-Like Kinases Promote Neuronal Survival and Induce Growth Cone Reformation via Distinct Mechanisms." Neuron **88**(4): 704-719.

Neumann, S., F. Bradke, M. Tessier-Lavigne and A. I. Basbaum (2002). "Regeneration of Sensory Axons within the Injured Spinal Cord Induced by Intraganglionic cAMP Elevation " Neuron **34**: 885-893.

Neumann, S. and C. J. Woolf (1999). "Regeneration of Dorsal Column Fibers into and beyond the Lesion Site following Adult Spinal Cord Injury." Neuron **23**: 83-91.

Nicolas, C. S., M. Amici, Z. A. Bortolotto, A. Doherty, Z. Csaba, A. Fafouri, P. Dournaud, P. Gressens, G. L. Collingridge and S. Peineau (2013). "The role of JAK-STAT signaling within the CNS." JAKSTAT **2**(1): e22925.

Ohtake, Y., D. Park, P. M. Abdul-Muneer, H. Li, B. Xu, K. Sharma, G. M. Smith, M. E. Selzer and S. Li (2014). "The effect of systemic PTEN antagonist peptides on axon growth and functional recovery after spinal cord injury." Biomaterials **35**(16): 4610-4626.

- Okada, S., M. Hara, K. Kobayakawa, Y. Matsumoto and Y. Nakashima (2018). "Astrocyte reactivity and astrogliosis after spinal cord injury." Neurosci Res **126**: 39-43.
- Okada, S., M. Nakamura, H. Katoh, T. Miyao, T. Shimazaki, K. Ishii, J. Yamane, A. Yoshimura, Y. Iwamoto, Y. Toyama and H. Okano (2006). "Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury." Nat Med **12**(7): 829-834.
- Osuka, K., Y. Watanabe, N. Usuda, K. Atsuzawa, M. Yasuda, C. Aoshima, T. Wakabayashi and M. Takayasu (2011). "Activation of STAT1 in neurons following spinal cord injury in mice." Neurochem Res **36**(12): 2236-2243.
- Oyinbo, C. A. (2011). "Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injuries: a nugget of this multiple cascade " Acta Neurobiologiae Experimentalis **71**: 281-299.
- Oyinbo, C. A. (2011). "Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade." Acta Neurobiologiae Experimental **71**: 281-299.
- Park, K. K., K. Liu, Y. Hu, J. L. Kanter and Z. He (2010). "PTEN/mTOR and axon regeneration." Exp Neurol **223**(1): 45-50.
- Park, K. K., K. Liu, Y. Hu, P. D. Smith, C. Wang, B. Cai, B. Xu, L. Connolly, I. Kramvis, M. Sahin and Z. He (2008). "Promoting Axon Regeneration in the Adult CNS by Modulation of the PTEN-mTOR Pathway " Science **322**: 963-966.
- Patron, L. A. and K. E. Zinsmaier (2016). "Mitochondria on the Road to Power Axonal Regeneration." Neuron **92**(6): 1152-1154.
- Pearse, D. D., F. C. Pereira, A. E. Marcillo, M. L. Bates, Y. A. Berrocal, M. T. Filbin and M. B. Bunge (2004). "cAMP and Schwann cells promote axonal growth and functional recovery after spinal cord injury." Nat Med **10**(6): 610-616.
- Penzo-Mendez, A. I. (2010). "Critical roles for SoxC transcription factors in development and cancer." Int J Biochem Cell Biol **42**(3): 425-428.
- Perez-Espejo, M.-A., S. S. Haghghi, E. H. Adelstein and R. Madsen (1996). "The effects of taxol, methylprednisolone, and 4- aminopyridine in compressive spinal cord injury: A qualitative experimental study." Surgical Neurology **46**: 350-367.
- Peters, J. M. (2006). "The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(9): 644-656.
- Pierce, K. L., R. T. Premont and R. J. Lefkowitz (2002). "Seven-transmembrane receptors." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(9): 639-650.

- Qi, Y. H., W. L. Yao, C. H. Zhang and Y. Q. Guo (2014). "Effect of lentivirus-mediated RNA interference of APC-Cdh1 expression on spinal cord injury in rats." Genet Mol Res **13**(1): 1366-1372.
- Qin, S., Y. Zou and C. L. Zhang (2013). "Cross-talk between KLF4 and STAT3 regulates axon regeneration." Nat Commun **4**: 2633.
- Qiu, J., W. B. Cafferty, S. B. McMahon and S. W. Thompson (2005). "Conditioning injury-induced spinal axon regeneration requires signal transducer and activator of transcription 3 activation." J Neurosci **25**(7): 1645-1653.
- Qiu, J., M. McAtee, D. Cai, H. Dai, P. N. Hoffman, B. S. Bregman and M. T. Filbin (2002). "Spinal Axon Regeneration Induced by Elevation of Cyclic AMP " Neuron **34**: 895-903.
- Rawlings, J. S., K. M. Rosler and D. A. Harrison (2004). "The JAK/STAT signaling pathway." J Cell Sci **117**(Pt 8): 1281-1283.
- Roberts, T. T., G. R. Leonard and D. J. Cepela (2017). "Classifications In Brief: American Spinal Injury Association (ASIA) Impairment Scale." Clin Orthop Relat Res **475**(5): 1499-1504.
- Rohrbeck, A., A. Schroder, S. Hagemann, A. Pich, M. Holtje, G. Ahnert-Hilger and I. Just (2014). "Vimentin mediates uptake of C3 exoenzyme." PLoS One **9**(6): e101071.
- Rosenzweig, E. S. and J. W. McDonald (2004). "Rodent models for treatment of spinal cord injury: research trends and progress toward useful repair." Curr Opin Neurol **17**.
- Ruiz, I. A., J. W. Squair, A. A. Phillips, C. D. Lukac, D. Huang, P. Oxciano, D. Yan and A. V. Krassioukov (2018). "Incidence and Natural Progression of Neurogenic Shock after Traumatic Spinal Cord Injury." J Neurotrauma **35**(3): 461-466.
- Ruschel, J., F. Hellal, K. C. Flynn, S. Dupraz, D. A. Elliott, A. Tedeschi, M. Bates, C. Sliwinski, G. Brook, K. Dobrindt, M. Peitz, O. Brustle, M. D. Norenberg, A. Blesch, N. Weidner, M. B. Bunge, J. L. Bixby and F. Bradke (2015). "Axonal regeneration. Systemic administration of epothilone B promotes axon regeneration after spinal cord injury." Science **348**(6232): 347-352.
- Sanchez-Alegria, K., M. Flores-Leon, E. Avila-Munoz, N. Rodriguez-Corona and C. Arias (2018). "PI3K Signaling in Neurons: A Central Node for the Control of Multiple Functions." Int J Mol Sci **19**(12).
- Sandner, B., R. Puttagunta, M. Motsch, F. Bradke, J. Ruschel, A. Blesch and N. Weidner (2018). "Systemic epothilone D improves hindlimb function after spinal cord contusion injury in rats." Exp Neurol **306**: 250-259.

Santos-Nogueira, E., C. Lopez-Serrano, J. Hernandez, N. Lago, A. M. Astudillo, J. Balsinde, G. Estivill-Torres, F. R. de Fonseca, J. Chun and R. Lopez-Vales (2015). "Activation of Lysophosphatidic Acid Receptor Type 1 Contributes to Pathophysiology of Spinal Cord Injury." J Neurosci **35**(28): 10224-10235.

Savio, T. and M. E. Schwab (1989). "Rat CNS White Matter, But Not Gray Matter, Is Nonpermissive for Neuronal Cell Adhesion and Fiber Outgrowth " The Journal of Neuroscience **9**: 1126-1133.

Schaal, S. M., M. S. Garg, M. Ghosh, L. Lovera, M. Lopez, M. Patel, J. Louro, S. Patel, L. Tuesta, W. M. Chan and D. D. Pearse (2012). "The therapeutic profile of rolipram, PDE target and mechanism of action as a neuroprotectant following spinal cord injury." PLoS One **7**(9): e43634.

Sengottuvel, V., M. Leibinger, M. Pfreimer, A. Andreadaki and D. Fischer (2011). "Taxol facilitates axon regeneration in the mature CNS." J Neurosci **31**(7): 2688-2699.

Shang, X., F. Marchioni, N. Sipes, C. R. Evelyn, M. Jerabek-Willemsen, S. Duhr, W. Seibel, M. Wortman and Y. Zheng (2012). "Rational design of small molecule inhibitors targeting RhoA subfamily Rho GTPases." Chem Biol **19**(6): 699-710.

Shinozaki, Y., K. Shibata, K. Yoshida, E. Shigetomi, C. Gachet, K. Ikenaka, K. F. Tanaka and S. Koizumi (2017). "Transformation of Astrocytes to a Neuroprotective Phenotype by Microglia via P2Y1 Receptor Downregulation." Cell Rep **19**(6): 1151-1164.

Shirvan, A., M. Kimron, V. Holdengreber, I. Ziv, Y. Ben-Shaul, S. Melamed, E. Melamed, A. Barzilai and A. S. Solomon (2002). "Anti-semaphorin 3A antibodies rescue retinal ganglion cells from cell death following optic nerve axotomy." J Biol Chem **277**(51): 49799-49807.

Siddiq, M. M. and S. S. Hannila (2015). "Looking downstream: the role of cyclic AMP-regulated genes in axonal regeneration." Front Mol Neurosci **8**: 26.

Silva, N. A., N. Sousa, R. L. Reis and A. J. Salgado (2014). "From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury." Prog Neurobiol **114**: 25-57.

Silver, J. (2016). "The glial scar is more than just astrocytes." Exp Neurol **286**: 147-149.

Silver, J. and J. H. Miller (2004). "Regeneration beyond the glial scar." Nat Rev Neurosci **5**(2): 146-156.

Smith, P. D., F. Sun, K. K. Park, B. Cai, C. Wang, K. Kuwako, I. Martinez-Carrasco, L. Connolly and Z. He (2009). "SOCS3 deletion promotes optic nerve regeneration in vivo." Neuron **64**(5): 617-623.

- Sofroniew, M. V. (2015). "Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation." Nat Rev Neurosci **16**(5): 249-263.
- Song, H.-j., C.-L. Ming, Z. He, M. Lehmann, L. McKerracher, M. Tessier-Lavigne and M.-m. Poo (1998). "Conversion of Neuronal Growth Cone Responses from Repulsion to Attraction by Cyclic Nucleotides." Science **281**: 1515-1518.
- Song, M. S., L. Salmena and P. P. Pandolfi (2012). "The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(5): 283-296.
- Stankiewicz, T. R. and D. A. Linseman (2014). "Rho family GTPases: key players in neuronal development, neuronal survival, and neurodegeneration." Front Cell Neurosci **8**: 314.
- Sun, F., K. K. Park, S. Belin, D. Wang, T. Lu, G. Chen, K. Zhang, C. Yeung, G. Feng, B. A. Yankner and Z. He (2011). "Sustained axon regeneration induced by co-deletion of PTEN and SOCS3." Nature **480**(7377): 372-375.
- Suzuki, H., C. S. Ahuja, R. P. Salewski, L. Li, K. Satkunendrarajah, N. Nagoshi, S. Shibata and M. G. Fehlings (2017). "Neural stem cell mediated recovery is enhanced by Chondroitinase ABC pretreatment in chronic cervical spinal cord injury." PLoS One **12**(8): e0182339.
- Tapia, V. S., M. Herrera-Rojas and J. Larrain (2017). "JAK-STAT pathway activation in response to spinal cord injury in regenerative and non-regenerative stages of *Xenopus laevis*." WILEY Regeneration.
- Tedeschi, A. and F. Bradke (2013). "The DLK signalling pathway--a double-edged sword in neural development and regeneration." EMBO Rep **14**(7): 605-614.
- Tedeschi, A. and F. Bradke (2017). "Spatial and temporal arrangement of neuronal intrinsic and extrinsic mechanisms controlling axon regeneration." Curr Opin Neurobiol **42**: 118-127.
- Thuret, S., L. D. Moon and F. H. Gage (2006). "Therapeutic interventions after spinal cord injury." Nat Rev Neurosci **7**(8): 628-643.
- Totoiu, M. O. and H. S. Keirstead (2005). "Spinal cord injury is accompanied by chronic progressive demyelination." J Comp Neurol **486**(4): 373-383.
- Tracey, C. A. (2015). "Spinal Cord Functional Anatomy " Continuum **21**: 13-35.
- Ulundreaj, A., A. Badner and M. G. Fehlings (2017). "Promising neuroprotective strategies for traumatic spinal cord injury with a focus on the differential effects among anatomical levels of injury." F1000Res **6**: 1907.

van Middendorp, J. J., B. Goss, S. Urquhart, S. Atresh, R. P. Williams and M. Schuetz (2011). "Diagnosis and prognosis of traumatic spinal cord injury." Global Spine J **1**(1): 1-8.

VertexPharmaceuticalsIncorporated (2018). Vertex Reports Third-Quarter 2018 Financial Results.

Walker, C. L., M. J. Walker, N. K. Liu, E. C. Risberg, X. Gao, J. Chen and X. M. Xu (2012). "Systemic bisperoxovanadium activates Akt/mTOR, reduces autophagy, and enhances recovery following cervical spinal cord injury." PLoS One **7**(1): e30012.

Walker, C. L., X. Wu, N. K. Liu and X. M. Xu (2019). "Bisperoxovanadium Mediates Neuronal Protection through Inhibition of PTEN and Activation of PI3K/AKT-mTOR Signaling after Traumatic Spinal Injuries." J Neurotrauma **36**(18): 2676-2687.

Walker, C. L. and X.-M. Xu (2014). "PTEN inhibitor bisperoxovanadium protects oligodendrocytes and myelin and prevents neuronal atrophy in adult rats following cervical hemicontusive spinal cord injury." Neuroscience Letters **573**: 64-68.

Wang, Z., V. Mehra, M. T. Simpson, B. Maunze, A. Chakraborty, L. Holan, E. Eastwood, M. G. Blackmore and I. Venkatesh (2018). "KLF6 and STAT3 co-occupy regulatory DNA and functionally synergize to promote axon growth in CNS neurons." Sci Rep **8**(1): 12565.

Watkins, T. A., B. Wang, S. Huntwork-Rodriguez, J. Yang, Z. Jiang, J. Eastham-Anderson, Z. Modrusan, J. S. Kaminker, M. Tessier-Lavigne and J. W. Lewcock (2013). "DLK initiates a transcriptional program that couples apoptotic and regeneration responses to axonal injury." PNAS **110**: 4039-4044.

Welsbie, D. S., K. L. Mitchell, V. Jaskula-Ranga, V. M. Sluch, Z. Yang, J. Kim, E. Buehler, A. Patel, S. E. Martin, P. W. Zhang, Y. Ge, Y. Duan, J. Fuller, B. J. Kim, E. Hamed, X. Chamling, L. Lei, I. D. C. Fraser, Z. A. Ronai, C. A. Berlinicke and D. J. Zack (2017). "Enhanced Functional Genomic Screening Identifies Novel Mediators of Dual Leucine Zipper Kinase-Dependent Injury Signaling in Neurons." Neuron **94**(6): 1142-1154 e1146.

Wilson, J. R., L. A. Tetreault, B. K. Kwon, P. M. Arnold, T. E. Mroz, C. Shaffrey, J. S. Harrop, J. R. Chapman, S. Casha, A. C. Skelly, H. K. Holmer, E. D. Brodt and M. G. Fehlings (2017). "Timing of Decompression in Patients With Acute Spinal Cord Injury: A Systematic Review." Global Spine J **7**(3 Suppl): 95S-115S.

Winton, M. J., C. I. Dubreuil, D. Lasko, N. Leclerc and L. McKerracher (2002). "Characterization of new cell permeable C3-like proteins that inactivate Rho and stimulate neurite outgrowth on inhibitory substrates." J Biol Chem **277**(36): 32820-32829.

Wong, Y. W., S. Tam, K. F. So, J. Y. Chen, W. S. Cheng, K. D. Luk, S. W. Tang and W. Young (2011). "A three-month, open-label, single-arm trial evaluating the safety and pharmacokinetics of oral lithium in patients with chronic spinal cord injury." Spinal Cord **49**(1): 94-98.

Xu, Z., W. Wang, Y. Ren, W. Zhang, P. Fang, L. Huang, X. Wang and P. Shi (2018). "Regeneration of cortical tissue from brain injury by implantation of defined molecular gradient of semaphorin 3A." Biomaterials **157**: 125-135.

Yamashita, T., H. Higuchi and M. Tohyama (2002). "The p75 receptor transduces the signal from myelin-associated glycoprotein to Rho." J Cell Biol **157**(4): 565-570.

Yamauchi, K., K. Osuka, M. Takayasu, N. Usuda, A. Nakazawa, N. Nakahara, M. Yoshida, C. Aoshima, M. Hara and J. Yoshida (2006). "Activation of JAK/STAT signalling in neurons following spinal cord injury in mice." J Neurochem **96**(4): 1060-1070.

Yang, J. S., H. X. Wei, P. P. Chen and G. Wu (2018). "Roles of Eph/ephrin bidirectional signaling in central nervous system injury and recovery." Exp Ther Med **15**(3): 2219-2227.

Yang, M. L., J. J. Li, K. F. So, J. Y. Chen, W. S. Cheng, J. Wu, Z. M. Wang, F. Gao and W. Young (2012). "Efficacy and safety of lithium carbonate treatment of chronic spinal cord injuries: a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial." Spinal Cord **50**(2): 141-146.

Yick, L.-W., K.-F. So, P.-T. Cheung and W.-T. Wu (2004). "Lithium Chloride Reinforces the Regeneration-Promoting Effect of Chondroitinase ABC on Rubrospinal Neurons after Spinal Cord Injury." JOURNAL OF NEUROTRAUMA **21**: 932-943.

Yune, T. Y., H. G. Park, J. Y. Lee and T. H. Oh (2008). "Estrogen-induced Bcl-2 expression after spinal cord injury is mediated through phosphoinositide-3-kinase/Akt-dependent CREB activation." J Neurotrauma **25**(9): 1121-1131.

Zhang, D., F. Wang, X. Zhai, X. H. Li and X. J. He (2018). "Lithium promotes recovery of neurological function after spinal cord injury by inducing autophagy." Neural Regen Res **13**(12): 2191-2199.

Zhou, B., P. Yu, M. Y. Lin, T. Sun, Y. Chen and Z. H. Sheng (2016). "Facilitation of axon regeneration by enhancing mitochondrial transport and rescuing energy deficits." J Cell Biol **214**(1): 103-119.

Zou, Y., M. Stagi, X. Wang, K. Yigitkanli, C. S. Siegel, F. Nakatsu, W. B. Cafferty and S. M. Strittmatter (2015). "Gene-Silencing Screen for Mammalian Axon Regeneration Identifies Inpp5f (Sac2) as an Endogenous Suppressor of Repair after Spinal Cord Injury." J Neurosci **35**(29): 10429-10439.

