

Apoptotic cell death in the mammalian central nervous system during development and in pathological conditions

I. DORI (I. ΔΩΦΗ), T. ZACHARAKI (Θ. ΖΑΧΑΡΑΚΗ)

doi: [10.12681/jhvms.14945](https://doi.org/10.12681/jhvms.14945)

Copyright © 2018, I. DORI (I. ΔΩΦΗ), T. ZACHARAKI (Θ. ΖΑΧΑΡΑΚΗ)



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

To cite this article:

DORI (I. ΔΩΦΗ) I., & ZACHARAKI (Θ. ΖΑΧΑΡΑΚΗ) T. (2018). Apoptotic cell death in the mammalian central nervous system during development and in pathological conditions. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 59(1), 29–39. <https://doi.org/10.12681/jhvms.14945>

■ Apoptotic cell death in the mammalian central nervous system during development and in pathological conditions

Dori I., BSc, MSc, PhD, Zacharaki T., DVM, PhD

*Department of Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine,
Aristotle University of Thessaloniki, 541 24 Thessaloniki, Greece*

■ Απόπτωση στο κεντρικό νευρικό σύστημα των θηλαστικών κατά την ανάπτυξη και σε παθολογικές καταστάσεις

Ι. Δωρή, BSc, MSc, PhD, Επίκουρη Καθηγήτρια, Κτηνιατρικής Σχολής, Α.Π.Θ.

Θ. Ζαχαράκη, DVM, PhD, Κτηνίατρος ΥΑΑΤ/ΚΚΙΑ

*Εργαστήριο Ανατομικής, Ιστολογίας και Εμβρυολογίας, Κτηνιατρική Σχολή,
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 541 24 Θεσσαλονίκη*

ABSTRACT. Mammalian central nervous system (CNS) development involves genetically controlled, opposing processes, such as neuronal proliferation, migration, differentiation and death. The natural, developmental cell death is a ubiquitous phenomenon and is referred to as «programmed cell death» (PCD). Apoptosis, a type of PCD, is a central event in normal development of the CNS, playing an important role in the control of cell numbers and the establishment of neuronal circuitry. During embryogenesis, apoptosis takes place in proliferating cell populations and is involved in CNS morphogenesis. At later stages of development, apoptosis occurs in postmitotic neurons, because of the competition for limited supply of neurotrophic factors, that originally suppress the endogenous genetic death programme. Data concerning apoptotic cell death during normal CNS development of domestic mammals is lacking, therefore information about the developmental pattern of this phenomenon is restricted to rodents and rabbits. In these animals it has been suggested that apoptosis follows a mono- or biphasic time course and is completed during an early, critical period of CNS development, that is characterized by morphological and functional neuronal maturation and synapse formation. Apart from its role in CNS development, apoptosis has also been implicated in neuronal loss accompanying neurodegenerative diseases and traumatic brain injuries in humans and animals. In the domestic canine brain, it has been shown that neurons die via apoptosis in Alzheimer's-like dementia, cerebellar abiotrophy, global and focal ischemia and virus-induced encephalopathies. In addition, cell death in ruminants with transmissible spongiform encephalopathy has been reported to be apoptotic in nature. A plethora of studies using animal models have been employed to elucidate the mechanisms that govern cell loss in neurological disorders. These studies provided strong evidence that experimental lesions of the connections between CNS areas and withdrawal of neurotrophic factors result in an increase of apoptosis, that is age-dependent. Specifically, developing neurons are more dependent on the integrity of their connections than mature ones. In addition, the response of neurons to apoptotic stimuli shows regional specificity. According to epidemiologic studies, CNS disorders are of major concern for animal and human public health, with a high socioeconomic impact. A major goal of neuroscientists is the development of therapeutic approaches for CNS repair. Contemporary strategies that are under trial include neurotrophic factor substitution and transplantation of stem cells. Investigation of the principles and mechanisms controlling cell loss in neurodegenerative diseases and traumatic brain injuries are universally considered of high priority and hopefully will lead to novel therapeutic approaches,

Correspondence: Dori I.

Department of Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, 541 24 Thessaloniki, Greece, Tel. 2310 999884, Fax: 2310 999842
Email: idori@vet.auth.gr

Αλληλογραφία: Ι. Δωρή

Εργαστήριο Ανατομικής, Ιστολογίας και Εμβρυολογίας, Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 541 24 Θεσσαλονίκη, Τηλ. 2310 999884, Φαξ: 2310 999842,
Email: idori@vet.auth.gr

Submission date: 22.02.2008

Approval date: 15.04.2008

Ημερομηνία υποβολής: 22.02.2008

Ημερομηνία εγκρίσεως: 15.04.2008

with encouraging outcome. The present review summarises recent data on the molecular mechanisms and factors controlling neuronal apoptosis during development and in pathological conditions, describes popular animal models used in lesion studies and discusses therapeutic approaches aiming at preventing or restricting apoptotic cell death.

Key words: apoptosis, development, neurodegenerative diseases

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Η ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) περιλαμβάνει γενετικά ελεγχόμενες, ανταγωνιστικές διεργασίες, όπως είναι, αφενός, ο πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση και η διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων, αφετέρου, ο κυτταρικός θάνατος. Ο κυτταρικός θάνατος, που παρατηρείται κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη σε όλες τις περιοχές του ΚΝΣ, ορίζεται ως «προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος» (Programmed Cell Death, PCD). Η απόπτωση είναι ένας μορφολογικός τύπος PCD, ο οποίος θεωρείται ως η θεμελιώδης διεργασία της ανάπτυξης και παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του τελικού αριθμού των κυττάρων και στην εδραίωση των νευρωνικών δικτύων του ΚΝΣ. Κατά την εμβρυογένεση, η απόπτωση παρατηρείται σε πολλαπλασιαζόμενους κυτταρικούς πληθυσμούς και συμμετέχει στη μορφογένεση του ΚΝΣ. Σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια, η απόπτωση εμφανίζεται σε μεταμωτωτικούς νευρώνες που ανταγωνίζονται μεταξύ τους για τη δέσμευση νευροτροφικών παραγόντων, οι οποίοι βρίσκονται σε περιορισμένη διαθεσιμότητα. Οι παράγοντες αυτοί καταστέλλουν τον ενδογενή μηχανισμό γενετικού ελέγχου του κυτταρικού θανάτου. Σύμφωνα με τη νευροτροφική θεωρία, οι νευρώνες που προσλαμβάνουν επαρκείς ποσότητες νευροτροφικών παραγόντων επιβιώνουν, ενώ οι υπόλοιποι απομακρύνονται μέσω του PCD. Οι πληροφορίες για το χρονικό πρότυπο που ακολουθεί το φαινόμενο της απόπτωσης στο αναπτυσσόμενο ΚΝΣ προέρχονται από μελέτες σε τρωκτικά και κουνέλια, καθώς δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα για κατοικίδια θηλαστικά. Στα πειραματόζωα αυτά αναφέρεται ότι η απόπτωση ακολουθεί ένα μονοφασικό ή διφασικό χρονικό πρότυπο και ολοκληρώνεται κατά την πρώιμη, κρίσιμη περίοδο της ανάπτυξης του ΚΝΣ, η οποία χαρακτηρίζεται από τη μορφολογική και λειτουργική ωρίμανση των νευρώνων και το σχηματισμό συνάψεων. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι εκτός από το ρόλο της στην ανάπτυξη, η απόπτωση σχετίζεται και με την απώλεια κυττάρων που παρατηρείται σε νευροεκφυλιστικές νόσους και τραυματικές βλάβες του ΚΝΣ στον άνθρωπο και στα ζώα. Ποικίλες μελέτες καταδεικνύουν ότι η εκφύλιση νευρώνων σε εγκεφάλους σαρκοφάγων με νόσο τύπου Alzheimer, αβιοτροφία της παρεγκεφαλίδας και εστιακή ή γενικευμένη εγκεφαλική ισχαιμία οφείλεται σε κυτταρικό θάνατο αποπτωτικού τύπου. Επιπλέον, αποπτωτικοί δείκτες έχουν ανιχνευθεί σε εγκεφάλους σαρκοφάγων και μηρυκαστικών με εγκεφαλοπάθειες που οφείλονται σε ιούς ή πρόιον πρωτεΐνες. Η χρήση πειραματόζωων-μοντέλων έχει αποδειχθεί πολύτιμο εργαλείο για τη διερεύνηση των μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για την απώλεια κυττάρων σε νευρικές παθήσεις. Από τις μελέτες αυτές προκύπτει ότι πειραματικές βλάβες σε συνδέσεις μεταξύ περιοχών του ΚΝΣ, με επακόλουθη αποστέρωση των νευρώνων από νευροτροφικούς παράγοντες, έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της απόπτωσης, η οποία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ηλικία που γίνονται οι βλάβες. Επιπλέον, η απόκριση των νευρώνων σε αποπτωτικά ερεθίσματα εμφανίζει ετερογένεια, η οποία σχετίζεται με την περιοχή στην οποία απαντούν οι νευρώνες και το είδος των συνδέσεων που καταστρέφονται. Σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες, οι νόσοι του ΚΝΣ αποτελούν παγκοσμίως μείζον πρόβλημα για την υγεία των ζώων και του ανθρώπου με σοβαρές κοινωνικο-οικονομικές επιπτώσεις. Κεντρικό στόχο των νευροεπιστημόνων αποτελεί η ανάπτυξη θεραπευτικών προσεγγίσεων για την αποκατάσταση βλαβών του ΚΝΣ. Ανάμεσα στις σύγχρονες θεραπευτικές στρατηγικές, οι οποίες βρίσκονται υπό πειραματική και κλινική δοκιμή, περιλαμβάνεται η υποκατάσταση των νευροτροφικών παραγόντων και η μεταμόσχευση στελεχιαίων κυττάρων. Η έρευνα των αρχών και των μηχανισμών που διέπουν την απώλεια κυττάρων σε νευροεκφυλιστικές νόσους και τραυματικές βλάβες του ΚΝΣ χαρακτηρίζεται διεθνώς ως τομέας υψηλής προτεραιότητας και εκφράζονται ελπίδες από την επιστημονική κοινότητα ότι θα οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών μέσων με θετικά αποτελέσματα. Σκοπός της παρούσας ανασκόπησης είναι η σύνοψη των πιο πρόσφατων ερευνητικών δεδομένων που προκύπτουν από τις μελέτες των μοριακών μηχανισμών της απόπτωσης των νευρώνων και των παραγόντων που τη ρυθμίζουν κατά την ανάπτυξη και σε παθολογικές καταστάσεις, η παρουσίαση των κύριων πειραματικών μοντέλων που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες αυτές, καθώς και η περιγραφή των θεραπευτικών στρατηγικών που εστιάζουν στην παρεμπόδιση ή στον περιορισμό του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου.

Λέξεις ευρετηρίασης: απόπτωση, ανάπτυξη, νευροεκφυλιστικές νόσοι

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανάπτυξη του ΚΝΣ περιλαμβάνει πολύπλοκες διεργασίες, όπως είναι ο πολλαπλασιασμός των πρόδρομων νευρικών κυττάρων, η μετανάστευση στις τελικές τους θέσεις, η μορφολογική και λειτουργική διαφοροποίησή τους και η εδραίωση των συνάψεών τους. Οι διεργασίες αυτές είναι άμεσα συνδεδεμένες με τον κυτταρικό κύκλο και πραγματοποιούνται με τη συντονισμένη και ιεραρχημένη ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων, που θεωρούνται υπεύθυνα για τη διεκπεραίωση των μοριακών και κυτταρικών φαινομένων που οδηγούν στη μορφογένεση του ΚΝΣ. Κατά την ανάπτυξη του ΚΝΣ, οι διεργασίες αυτές συνυπάρχουν με τον PCD. Ο PCD είναι ένας τρόπος «αυτοκτονίας» των κυττάρων, που ακολουθεί ένα γονιδιακά ελεγχόμενο πρόγραμμα βιοχημικών και μορφολογικών μεταβολών (Krantic et al. 2005). Ο PCD αποτελεί σημαντικό μηχανισμό φυσικής επιλογής, που διατηρήθηκε στη φυλογενετική εξέλιξη των ειδών. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και ο PCD είναι φαινομενικά αντίθετες διεργασίες, υπάρχουν, όμως, ισχυρές ενδείξεις ότι οι διεργασίες αυτές συνδέονται άμεσα μέσω των γονιδίων που τις ρυθμίζουν και των μηχανισμών που τις διέπουν. Σε αρχικά στάδια της ανάπτυξης, η διατήρηση της ισορροπίας ανάμεσα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον PCD παίζει καθοριστικό ρόλο στη μορφογένεση του ΚΝΣ και στη ρύθμιση του τελικού αριθμού των κυττάρων του. Σε μεταγενέστερα στάδια της ανάπτυξης, ο PCD μετέχει στην οργάνωση και την εδραίωση των συνδέσεων διαφόρων περιοχών του ΚΝΣ (Buss et al. 2006). Ο PCD θεωρείται θεμελιώδης αναπτυξιακή διεργασία, παρατηρείται σε μεγάλη έκταση σε όλες σχεδόν τις περιοχές του ΚΝΣ και αφορά σε όλους τους τύπους των νευρικών και των νευρογλοιακών κυττάρων (Yuan and Yankner 2000).

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΙ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΙ ΤΥΠΟΙ PCD

Ποικίλες μελέτες πιστοποιούν την ύπαρξη δύο λειτουργικά διαφορετικών τύπων PCD κατά την ανάπτυξη του ΚΝΣ, ανάλογα με το εάν παρατηρείται σε πληθυσμούς ενεργά πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων ή σε πληθυσμούς μεταμιτωτικών νευρώνων. Ο πρώτος τύπος ή «πολλαπλασιαστικός» PCD παρατηρείται στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης σε μη διαφοροποιημένους νευρωνικούς πληθυσμούς που βρίσκονται στο στάδιο της μίτωσης (de la Rosa and de Pablo

2000). Υποστηρίζεται ότι ο «πολλαπλασιαστικός» PCD εξυπηρετεί κυρίως δύο σκοπούς. Πρώτον, καθορίζει το μέγεθος των πρόδρομων νευρωνικών πληθυσμών και δεύτερον, ευνοεί την επιβίωση των υγιών νευρώνων με την απομάκρυνση των κυττάρων που φέρουν μεταλλάξεις, έχουν μεταναστεύσει σε λάθος θέση ή είναι αποτέλεσμα αρνητικής επιλογής (Yeo and Gautier 2004, Buss et al. 2006).

Ο δεύτερος τύπος ή «νευροτροφικός» PCD παρατηρείται σε μεταγενέστερα στάδια της ανάπτυξης σε πλήρως διαφοροποιημένους νευρωνικούς πληθυσμούς, στους οποίους έχουν ολοκληρωθεί οι διεργασίες της γέννησης και της μετανάστευσης. Ο «νευροτροφικός» PCD εμφανίζεται σε νευρώνες κυρίως κατά τη διάρκεια της εδραίωσης των προσαγωγών και των απαγωγών συνδέσεών τους (Burek and Oppenheim 1996), γεγονός που υποδηλώνει ότι η επιβίωση ή ο κυτταρικός θάνατος των νευρώνων εξαρτάται από τις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των περιοχών που συνδέονται μεταξύ τους. Σύμφωνα με τη θεωρία της «ποσοτικής αντιστοίχισης», ο μηχανισμός που διαθέτει το ΚΝΣ, με στόχο να αντιστοιχίσει ορθά τους νευρώνες μεταξύ των περιοχών που συνδέονται μεταξύ τους, είναι η αρχική υπερπαραγωγή και ο επακόλουθος θάνατος των νευρώνων. Κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης, οι νευρώνες ανταγωνίζονται μεταξύ τους για τη δέσμευση ικανής ποσότητας παραγόντων επιβίωσης, οι οποίοι μεταφέρονται στους νευρώνες μέσω των συνδέσεών τους. Λόγω της περιορισμένης διαθεσιμότητας των παραγόντων αυτών, επιβιώνουν μόνο οι νευρώνες εκείνοι που προσλαμβάνουν επαρκείς ποσότητες, ενώ οι υπόλοιποι απομακρύνονται μέσω της διεργασίας του PCD (Oppenheim, 1991, Burek and Oppenheim 1996). Στις περισσότερες περιπτώσεις, η σχέση μεταξύ του αριθμού των προσυναπτικών νευρώνων που επιβιώνουν κατά την περίοδο του PCD και των μετασυναπτικών κυττάρων είναι αναλογική και γραμμική (Herrup et al. 1996).

Αν και δεν υπάρχει ομοφωνία μεταξύ των ερευνητών σχετικά με την ταξινόμηση των μορφολογικών τύπων του PCD, έχει παρατηρηθεί ότι οι μορφολογικές αλλοιώσεις του πυρήνα των κυττάρων που πεθαίνουν μέσω του PCD διαφέρουν ανάλογα με τους βιοχημικούς μηχανισμούς που ενεργοποιούνται σε κάθε περίπτωση (Leist and Jäättelä 2001, Jäättelä 2002). Συγκεκριμένα, με βάση το βαθμό κατακερματισμού της χρωματίνης, έχουν περιγραφεί τρεις τύποι PCD: α) η

απόπτωση, β) ο παρόμοιος με απόπτωση PCD και γ) ο παρόμοιος με νέκρωση PCD. Η παρούσα ανασκόπηση εστιάζεται αποκλειστικά στην περιγραφή της απόπτωσης.

Η απόπτωση χαρακτηρίζεται μορφολογικά από τη συμπύκνωση και τον κατακερματισμό της χρωματίνης σε ομοιογενείς σφαιρικές ή δρεπανοειδείς μάζες που κατανέμονται στην περιφέρεια του πυρήνα και αποτελούνται από διαμεσονουκλεοσωματικά θραύσματα DNA 180-200 ζευγών βάσεων. Τα θραύσματα αυτά του DNA έχουν χαρακτηριστική «βαθμιδωτή» εμφάνιση όταν αναλυθούν ηλεκτροφορητικά σε γέλη αγαρόζης (Häcker 2000). Ο πυρήνας και το κυτταρόπλασμα συρρικνώνονται, το πυρηνικό περίβλημα διασπάται και ο κυτταροσκελετός αποδομείται. Η κυτταρική μεμβράνη, αν και ακέραιη, σχηματίζει εκκολπώματα, με αποτέλεσμα την αποκόλληση του κυττάρου από το περιβάλλον νευροπύλημα. Η δομή των υπόλοιπων κυτταρικών οργανιδίων διατηρείται άθικτη. Σε μεταγενέστερα στάδια, ο πυρήνας κατακερματίζεται. Κατά τα τελικά στάδια της απόπτωσης, σχηματίζονται τα αποπτωτικά σωματίδια, τα οποία είναι κυτταρικά θραύσματα που περιβάλλονται από κυτταρική μεμβράνη και περιέχουν οποιοδήποτε τμήμα του κυττάρου. Τα αποπτωτικά σωματίδια απομακρύνονται στο τέλος της αποπτωτικής διεργασίας με κυτταροφαγία από γειτονικά μικρονευρογλοιακά κύτταρα χωρίς την πρόκληση φλεγμονώδους αντίδρασης (Kerr et al. 1972, Bredesen 2000). Η ενεργοποίηση μιας οικογένειας κυστεϊνικών πρωτεολυτικών ενζύμων, των κασπασών, αποτελεί τη βιοχημική σφραγίδα της απόπτωσης (Stefanis 2005).

ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

Οι πολύπλοκοι μοριακοί μηχανισμοί που οδηγούν στην απόπτωση των κυττάρων ελέγχονται από παράγοντες που κατατάσσονται σε δύο γενικές κατηγορίες: 1) παράγοντες που συνιστούν τους ενδογενείς μηχανισμούς επιβίωσης ή απόπτωσης των νευρικών κυττάρων, δηλαδή συγκεκριμένα γονίδια των οποίων η έκφραση οδηγεί στην πραγματοποίηση των φαινομένων αυτών και 2) νευροτροφικούς παράγοντες που συνιστούν τους εξωγενείς παράγοντες επιβίωσης, οι οποίοι τροφοδοτούν τα νευρικά κύτταρα και προέρχονται από άλλα κύτταρα.

1) Η απόπτωση διεκπεραιώνεται μέσω της έκφρασης ειδικών γονιδίων

Το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει εστιαστεί τα

τελευταία χρόνια στη μελέτη γονιδίων που ελέγχουν τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο και έχουν διατηρηθεί στη φυλογενετική εξέλιξη των ειδών. Γενετικές μελέτες στο νηματώδη σκώληκα *Caenorhabditis elegans* οδήγησαν στην ταυτοποίηση 4 γονιδίων, των *ced-3*, *ced-4*, *ced-9* και *egl-1* και των προϊόντων τους, που ρυθμίζουν τους μοριακούς μηχανισμούς της απόπτωσης και αντιπροσωπεύονται από αντίστοιχα ομόλογα στα θηλαστικά (για βιβλιογραφικές αναφορές βλ. Horvitz, 2003).

Οι κασπάσες αντιπροσωπεύουν για τα θηλαστικά τα ομόλογα προϊόντα του γονιδίου *ced-3* του *C. elegans* και είναι οι κύριοι εκτελεστές της απόπτωσης, ανεξάρτητα από το ερέθισμα που ενεργοποιεί τον αποπτωτικό μηχανισμό (Hengartner 2000, Becker and Bonni 2004). Συντίθενται στο κυτταρόπλασμα με τη μορφή ενζυματικώς ανενεργών ζυμογόνων, των προκασπασών, και για την ενεργοποίησή τους απαιτείται η πρωτεολυτική τους διάσπαση από τα ίδια ή άλλα μέλη της οικογένειας. Φυλογενετικές αναλύσεις απέδειξαν ότι 7 από τα 14, έως σήμερα, ταυτοποιημένα μέλη της οικογένειας, οι κασπάσες -2, -3, -6, -7, -8, -9 και -10, αποτελούν τους κύριους ρυθμιστές του αποπτωτικού μηχανισμού (Denault and Salvesen 2002, Yakovlev and Faden 2004). Οι κασπάσες -2, -8, -9 και -10 χαρακτηρίζονται ως «εναρκήτριες», διότι προκαλούν τη διέγερση του αποπτωτικού μηχανισμού μέσω της ενεργοποίησης των κασπασών -3, -6 και -7. Οι τελευταίες αποτελούν τις «δραστικές» κασπάσες και ευθύνονται για τις χαρακτηριστικές μορφολογικές αλλοιώσεις της απόπτωσης. Η κασπάση-3 χαρακτηρίζεται ως πρωτεύουσα ειδική της απόπτωσης (Porter and Jänicke 1999, Fischer et al. 2003), διότι τα βιοχημικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης προκύπτουν μετά την πρωτεολυτική διάσπαση πληθώρας πρωτεϊνών, βασικών για την επιβίωση του κυττάρου από αυτήν. Υποστηρίζεται ότι υπάρχουν δύο διαφορετικές οδοί δράσης των κασπασών. Στην πρώτη ή «εξωτερική» οδό ενεργοποιούνται οι ειδικοί υποδοχείς επιφάνειας της οικογένειας του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF) TNF-RI και Fas/Apo-1/CD95 από τα αποπτωτικά σηματοδοτικά μόρια TNF-2 και FasL, αντίστοιχα (Fan et al. 2005). Στη δεύτερη ή «εσωτερική» οδό καθοριστικό ρόλο παίζουν τα μιτοχόνδρια. Τα αποπτωτικά ερεθίσματα μεταβάλλουν τη διαπερατότητα της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, γεγονός που χαρακτηρίζεται ως το «σημείο χωρίς επιστροφή» για την απόπτωση (Chipuk et al. 2006), διό-

τι προκαλεί την έκλυση διαφόρων πρωτεϊνικών παραγόντων από τον διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων στο κυτταρόπλασμα. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται παράγοντες που επάγουν την απόπτωση, όπως είναι το κυτόχρωμα *c*, ο παράγοντας *Smac/DIABLO* και ο *HtrA2/OMI*, και παράγοντες που επάγουν τον παρόμοιο με απόπτωση τύπο *PCD*, όπως είναι ο *AIF* και η ενδονουκλεάση *G* (Shiozaki and Shi 2004, Armstrong 2006). Η ενεργοποίηση της *κασπάσης-3* αποτελεί το σημείο σύγκλισης των δύο οδών.

Σημαντικό ρόλο στην αποπτωτική διεργασία παίζουν, επίσης, τα μέλη της πρωτεϊνικής οικογένειας *Bcl-2*, τα οποία αντιπροσωπεύουν τα ομόλογα προϊόντα των γονιδίων *ced-9* και *egl-1* του *C. Elegans* και διακρίνονται σε δύο λειτουργικές κατηγορίες, ανάλογα με το εάν αναστέλλουν ή προάγουν την απόπτωση. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι πρωτεΐνες *Bcl-2* και *Bcl-xL*, οι οποίες εντοπίζονται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, συντελώντας στη διατήρηση της ακεραιότητάς της. Αντίθετα, οι δύο σημαντικότερες πρωτεΐνες που προάγουν την απόπτωση, οι *Bax* και *Bak*, προκαλούν μεταβολές στη μιτοχονδριακή μεμβράνη, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του κυτοχρώματος *c* στο κυτταρόπλασμα, την ενεργοποίηση των *κασπασών* και τον επακόλουθο θάνατο του κυττάρου (Lindsten et al. 2005). Η οικογένεια *Bcl-2* περιλαμβάνει, επίσης, ένα μεγάλο αριθμό από τις *BH3* πρωτεΐνες που προάγουν την απόπτωση, όπως είναι οι *Bid*, *Bad*, *Bik*, *Bim*, *Bmf*, *Noxa*, *Puma* και *BNip3* (Danial and Korsmeyer, 2004). Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, οι *Bcl-2* και *Bcl-xL* προστατεύουν τη μιτοχονδριακή μεμβράνη από τη δράση των *Bax* και *Bad*. Παρουσία, όμως, ενός αποπτωτικού ερεθίσματος προκαλείται έκφραση μιας *BH3* πρωτεΐνης, η οποία προσδέεται στις *Bcl-2* και *Bcl-xL* απελευθερώνοντας, με αυτόν τον τρόπο, τη δράση των *Bax* και *Bad*, με στόχο την ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού (Lindsten et al. 2005).

2) Οι νευρώνες χρειάζονται νευροτροφικούς παράγοντες για την επιβίωσή τους

Οι νευροτροφικοί παράγοντες αποτελούν κατηγορία πολυπεπτιδικών αυξητικών παραγόντων που προάγουν τις διεργασίες της ανάπτυξης και της ωρίμανσης του ΝΣ, συμβάλλουν στην επιβίωση των κυτταρικών πληθυσμών και στην εδραίωση και διατήρηση των συνδέσεών τους και, τέλος, στην αναδιοργάνωση και επιδιόρθωση των νευρωνικών δικτύων σε παθολογικές καταστάσεις (Chao et al. 2006, Cui 2006). Πει-

ραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η έλλειψη των παραγόντων αυτών έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του γενετικού προγράμματος της απόπτωσης.

Η ταυτοποίηση του πρώτου νευροτροφικού παράγοντα, του αυξητικού παράγοντα των νεύρων (NGF), από τη Rita Levi-Montalcini στις αρχές της δεκαετίας του 1950 (για βιβλιογραφικές αναφορές βλ. Levi-Montalcini 1987), αποτέλεσε ορόσημο στην ανάπτυξη των νευροεπιστημών, διότι έθεσε τις βάσεις για τη διατύπωση της «νευροτροφικής θεωρίας». Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, οι νευροτροφικοί παράγοντες συντίθενται στα μετασυναπτικά κύτταρα των περιοχών-στόχων, εκλύονται σε ποσότητες ανάλογες με την πυκνότητα εννεύρωσης της περιοχής και δεσμεύονται από τους αντίστοιχους υποδοχείς στις απολήξεις των προσυναπτικών κυττάρων. Στη συνέχεια, μεταφέρονται ανάδρομα κατά μήκος του νευράξονα των νευρώνων αυτών στο περικάρυο, όπου ασκείται η βιολογική τους δράση. Επιβιώνουν μόνο οι νευρώνες που δεσμεύουν και μεταφέρουν αποτελεσματικά επαρκείς ποσότητες νευροτροφικών παραγόντων (Clarke 1985, Oppenheim 1991). Η κλασική αυτή άποψη ενισχύθηκε από νεότερα πειραματικά δεδομένα, σύμφωνα με τα οποία οι νευροτροφικοί παράγοντες μπορούν να μεταφερθούν και ορθόδρομα από τα προσυναπτικά προς τα μετασυναπτικά κύτταρα (Linden 1994), αλλά και μέσω παρακρινικών και αυτοκρινικών μηχανισμών (Davies 2003).

Ο NGF ανήκει στην οικογένεια των νευροτροφικών, την ευρύτερα μελετημένη από τις οικογένειες των νευροτροφικών παραγόντων. Στις νευροτροφίνες ανήκουν, επίσης, ο προερχόμενος από τον εγκέφαλο νευροτροφικός παράγοντας (BDNF) (Barde et al. 1982), η νευροτροφίνη 3 (NT-3) (Ernfors et al. 1990) και η νευροτροφίνη 4/5 (NT-4/5) (Hallbook et al. 1991) στα θηλαστικά.

Στην κατηγορία των νευροτροφικών παραγόντων ανήκουν και άλλες οικογένειες πρωτεϊνών που προάγουν την επιβίωση των νευρώνων τόσο κατά την ανάπτυξη όσο και σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Σε αυτές περιλαμβάνονται: η οικογένεια των προερχόμενων από τα νευρογλοιακά κύτταρα νευροτροφικών παραγόντων (*GDNF*), η οικογένεια του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (*FGF*), η οικογένεια των νευροτροφικών κυτοκινών, στην οποία ανήκουν ο ακτινοειδής νευροτροφικός παράγοντας (*CNTF*), ο ανασταλτικός παράγοντας της λευχαιμίας (*LIF*), η καρδιοτροφίνη-1 (*CT-1*), η ογκοστατίνη-Μ

(OSM) και η ιντερλευκίνη-6 (IL-6), η *οικογένεια των ηπατοκυτταρικών αυξητικών παραγόντων*, εκπρόσωποι της οποίας είναι ο ηπατικός αυξητικός παράγοντας (HGF) και ο παράγοντας ενεργοποίησης των μακροφάγων (MSP), η *οικογένεια των παρόμοιων με την ινσουλίνη αυξητικών παραγόντων (IGF)* και των *αυξητικών παραγόντων μεταμόρφωσης βήτα (TGF-β)*, και, τέλος, οι αιμοπετάλιακοί αυξητικοί παράγοντες AA, AB και BB (Abe 2000, Davies 2003).

ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Η απόπτωση αποτελεί τον επικρατέστερο τύπο PCD κατά την ανάπτυξη του ΚΝΣ (Los et al. 1999). Η υπόθεση ότι η απόπτωση παίζει καθοριστικό ρόλο στη μορφογένεση του ΚΝΣ και ευθύνεται για αναπτυξιακές ανωμαλίες, οδήγησε σε εντατικές μελέτες της διεργασίας αυτής στο αναπτυσσόμενο ΚΝΣ. Οι μελέτες αυτές περιορίστηκαν κυρίως σε τρωκτικά, ενώ δεν υπάρχουν, μέχρι σήμερα, βιβλιογραφικά δεδομένα για κατοικίδια θηλαστικά. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στις παραπάνω μελέτες περιελάμβαναν την *in situ* σήμανση των διαμεσονουκλεοσωματικών θραυσμάτων του DNA των αποπτωτικών κυττάρων (μέθοδος TUNEL, Gavrieli et al. 1992), σε συνδυασμό με ανοσοϊστοχημικές τεχνικές, για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με την απόπτωση. Σημαντική είναι και η εξέταση των υπερμικροσκοπικών μορφολογικών χαρακτηριστικών των αποπτωτικών κυττάρων με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών αποδεικνύουν ότι η απόπτωση ολοκληρώνεται κατά τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης. Κατά τα στάδια αυτά, η απόπτωση εμφανίζει μία κορυφή σε ορισμένες περιοχές του εγκεφάλου, ενώ σε άλλες παρουσιάζει δύο αλληλοδιάδοχες φάσεις. Παραδείγματος χάριν, στην παρεγκεφαλίδα του επίμυος και του κουνελιού, η απόπτωση παρουσιάζει δύο φάσεις, μία κατά τη διάρκεια της νευρογένεσης και μία κατά τη συναπτογένεση (Lossi and Gambino, 2008). Στο βασικό πρόσθιο εγκέφαλο του επίμυος, ο αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων κορυφώνεται στην αρχή και στο τέλος της πρώτης μεταγεννητικής εβδομάδας (Sophou et al. 2006). Παρομοίως, στη μέλαινα ουσία η απόπτωση παρουσιάζει δύο κορυφές, στην αρχή της πρώτης και στην αρχή της δεύτερης μεταγεννητικής εβδομάδας (Oo and Burke 1997, Burke 2004), ενώ στο ραβδωτό σώμα η απόπτωση μεγιστοποιείται τη μεταγεννητική ημέρα (M) 5 και ολοκληρώνεται την τέταρτη μετα-

γεννητική εβδομάδα (Mellios et al. 2005). Στο φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων η πυκνότητα των αποπτωτικών κυττάρων αυξάνεται σταδιακά από την ημέρα της γέννησης και κορυφώνεται μεταξύ της μεταγεννητικής ημέρας (M) 5 και της M7 (Ferrer et al. 1994, Nunez et al. 2001). Σε πυρήνες του θαλάμου, ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος εξελίσσεται, επίσης, από τη γέννηση έως το τέλος της πρώτης μεταγεννητικής εβδομάδας (Spreafico et al. 1995, Zacharaki et al. 2005). Τέλος, αποπτωτικά κύτταρα στον ιπλόκαμπο και στον οσφρητικό βολβό παρατηρήθηκαν κυρίως προς το τέλος της πρώτης μεταγεννητικής εβδομάδας (Ferrer et al. 1990, Fiske and Brunjes 2001).

Μελέτες σε κασπάση-3 +/- μως, κατά τις οποίες παρατηρήθηκαν σημαντικές ανωμαλίες στην ανάπτυξη του εγκεφάλου, διέγερση της παραγωγής νευρικών κυττάρων και αυξημένη θνησιμότητα των ζώων, απέδειξαν τον σημαντικό ρόλο της απόπτωσης στην ανάπτυξη του εγκεφάλου (Kuida et al. 1996). Επιπλέον, η έκφραση της ενεργοποιημένης κασπάσης-3, η οποία χαρακτηρίζει την απόπτωση, διαπιστώθηκε στους αναπτυσσόμενους νευρώνες διαφόρων περιοχών του εγκεφάλου, παραδείγματος χάριν στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες της μέλαινας ουσίας του επίμυος (Jeon et al. 1999) και του μυός (Jackson-Lewis et al. 2000), στους χολινεργικούς νευρώνες του βασικού πρόσθιου εγκεφάλου (Sophou et al. 2006), στους νευρώνες του ραβδωτού σώματος (Mellios et al. 2005) και στους κοκκοειδείς νευρώνες της εξωτερικής κοκκώδους στιβάδας του φλοιού της παρεγκεφαλίδας του επίμυος (Tanaka et al. 2000).

Η αναπτυξιακή περίοδος κατά την οποία παρατηρείται η απόπτωση στις περιοχές του εγκεφάλου που μελετήθηκαν συμπίπτει χρονικά με την κρίσιμη περίοδο της μορφολογικής και νευροχημικής διαφοροποίησης των νευρώνων, της οργάνωσης των προσαγωγών και απαγωγών τους συνδέσεων και της έντονης συναπτογένεσης. Το γεγονός αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με τη θεωρία της «ποσοτικής αντιστοίχισης» και ενισχύει την υπόθεση ότι η απόπτωση παίζει ουσιαστικό ρόλο στην ανάπτυξη των περιοχών του εγκεφάλου και στην εδραίωση των λειτουργικών νευρωνικών δικτύων. Είναι αξιοσημείωτο ότι στο κρίσιμο αυτό διάστημα της μεταγεννητικής ανάπτυξης η απόπτωση είναι έντονη στις περιοχές του εγκεφάλου που συνδέονται μεταξύ τους, γεγονός που υποδηλώνει ότι το χρονικό πρότυπο της απόπτωσης δεν ακολουθεί τυ-

χαία πορεία, αλλά φαίνεται να εξαρτάται από τις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις στις περιοχές αυτές.

ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ ΣΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ. Η ΣΠΟΥΔΑΙΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ-MONTEΛΩΝ.

Πολλές μελέτες την τελευταία δεκαετία παρέχουν ισχυρές ενδείξεις ότι στα ζώα και στον άνθρωπο η απώλεια των νευρικών κυττάρων σε νευροεκφυλιστικές νόσους, σε τραυματικές βλάβες του ΚΝΣ και σε λοιμώδεις εγκεφαλοπάθειες οφείλεται κυρίως στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. Οι μελέτες αυτές αποκάλυψαν ότι οι μοριακοί και κυτταρικοί μηχανισμοί που οδηγούν στην απόπτωση των κυττάρων κατά την ανάπτυξη σχετίζονται με τους μηχανισμούς που ευθύνονται για την εκφύλιση των νευρώνων στις παθολογικές αυτές καταστάσεις (Mattson 2000).

Στον άνθρωπο, η νόσος Alzheimer χαρακτηρίζεται από άνοια, η οποία αποδίδεται σε απόπτωση των χολινεργικών νευρώνων του βασικού πρόσθιου εγκεφάλου, που σχετίζεται άμεσα και γραμμικά με ατροφία του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων (Behl 2000). Σε ασθενείς με νευροεκφυλιστικές αλλοιώσεις στα βασικά γάγγλια, όπως είναι οι νόσοι Parkinson και Huntington, παρατηρείται απώλεια των ντοπαμινεργικών μελαινοραβδωτών νευρώνων και των προβλητικών νευρώνων του ραβδωτού σώματος, αντίστοιχα, η οποία πιστεύεται ότι οφείλεται σε απόπτωση (Honig and Rosenberg 2000, Ferrer et al. 2000).

Σε σύγκριση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα που υπάρχουν για τον άνθρωπο, οι πληροφορίες που αφορούν στη διερεύνηση κλινικών περιστατικών ζώων με νευροεκφυλιστικές νόσους είναι περιορισμένες και εστιάζονται κυρίως στα κατοικίδια σαρκοφάγα και στα τρωκτικά. Σε εγκεφάλους σκύλων με νόσο τύπου Alzheimer εντοπίστηκαν αποπτωτικά κύτταρα, η παρουσία των οποίων συσχετίστηκε με την ποσότητα εναπόθεσης του β-αμυλοειδούς (Anderson et al. 2000). Επιπλέον, ο δείκτης της άνοιας ήταν ανάλογος του βαθμού της απόπτωσης των νευρώνων του εγκεφάλου (Kiatipattanasakul et al. 1996). Μελέτες σε εγκεφάλους υπερήλικων σκύλων έδειξαν αύξηση της απόπτωσης σε νευρώνες και νευρογλοιακά κύτταρα, παρόμοια με εκείνη που παρατηρείται σε ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο Alzheimer, σε σύγκριση με φυσιολογικούς ενήλικες (Kiatipattanasakul et al. 1996). Σε σκύλους με αβιοτροφία της παρεγκεφαλίδας

παρατηρείται πρόωμη και σταδιακή εκφύλιση των κυττάρων Purkinje, η οποία επηρεάζει με τη σειρά της την επιβίωση των κοκκοειδών νευρώνων του φλοιού της παρεγκεφαλίδας. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι οι αναπτυσσόμενοι κοκκοειδείς νευρώνες σταματούν τον κυτταρικό τους κύκλο και αποπίπτουν πριν ή μετά τη μετανάστευσή τους (Sandy et al. 2002). Τέλος, σε τρωκτικά με νόσο τύπου Huntington διαπιστώθηκε ενεργοποίηση των κασπασών-3, -8 και -9 και απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, γεγονότα που χαρακτηρίζουν τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο (Kiechle et al. 2002).

Κυτταρικός θάνατος αποπτωτικού τύπου έχει διαπιστωθεί και σε εγκεφάλους κατοικίδιων θηλαστικών με εγκεφαλίτιδες, οι οποίες οφείλονται σε ιούς ή σε πρωτεΐνες πρίον. Συγκεκριμένα, σε σκύλους που έπασχαν από τη νόσο Carré, και παρουσίαζαν χρόνια εγκεφαλομυελίτιδα, παρατηρήθηκαν νευρογλοιακά κύτταρα, κυρίως στη φαϊά ουσία της παρεγκεφαλίδας, με κατακερματισμό του DNA και μορφολογικά χαρακτηριστικά τυπικά της απόπτωσης (Moro et al. 2003). Έχει, επίσης, παρατηρηθεί μαζική απόπτωση στον εγκέφαλο ζώων που έχουν μολυνθεί από τον νευροτροπό ιό της λύσσας (Theerasurakarn and Ubol 1998). Τέλος, αύξηση των αποπτωτικών δεικτών έχει παρατηρηθεί σε εγκεφάλους βοοειδών με σπογγώδη εγκεφαλοπάθεια (BSE) και αιγοπροβάτων με τρομώδη νόσο (scrapie) (Ferrer 2002).

Η πληθώρα των πληροφοριών σχετικά με το ρόλο της απόπτωσης στον νοσούντα εγκέφαλο, των παραγόντων που τη ρυθμίζουν και των μηχανισμών που τη διέπουν, προέρχεται κυρίως από πειραματικές έρευνες. Ανεκτίμητο εργαλείο αποτέλεσε η χρήση πειραματόζωων-μοντέλων, στα οποία προκλήθηκαν βλάβες σε περιοχές ή σε συνδέσεις μεταξύ περιοχών του εγκεφάλου, σε διαφορετικά στάδια της ανάπτυξής τους. Οι βλάβες αυτές αποτελούν ισχυρά αποπτωτικά ερεθίσματα για τους νευρώνες που χάνουν την τροφική τους υποστήριξη.

Το γενικό συμπέρασμα που προέκυψε από το σύνολο των μελετών αυτών είναι ότι η απόπτωση των νευρώνων ως συνέπεια της καταστροφής των συνδέσεών τους σε πρώιμα στάδια της ανάπτυξης παρατηρείται νωρίτερα και σε μεγαλύτερο βαθμό συγκριτικά με εκείνη που παρατηρείται όταν οι βλάβες πραγματοποιούνται σε μεταγενέστερα στάδια.

Παραδείγματος χάριν, η έγχυση διεγερτικών αμι-

νοξέων στον ιππόκαμπο επιμύων, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν ως μοντέλα της νόσου Alzheimer, οδήγησε σε απόπτωση των χολινεργικών νευρώνων του πυρήνα του έσω διαφράγματος, η οποία ήταν σημαντική στα αναπτυσσόμενα, αλλά όχι στα ενήλικα πειραματόζωα (Plaschke et al. 1994, Burke et al. 1994). Εντούτοις, η αφαίρεση του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, περιοχής-στόχου των χολινεργικών νευρώνων του βασικού πρόσθιου εγκεφάλου, δεν επηρέασε την επιβίωση των νευρώνων αυτών, αλλά προκάλεσε καταστολή του φαινοτύπου τους (Sophou et al. 2006). Σε πειραματικά πρότυπα νεογέννητων και ενήλικων επίμυων με νόσο τύπου Parkinson, έγχυση της κατεχολαμινεργικής νευροτοξίνης 6-OHDA στο ραβδωτό σώμα προκάλεσε την απόπτωση των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας (Marti et al. 1997, 2002). Χειρουργικές ή φαρμακογενείς βλάβες των φλοιοραβδωτών ή των μελαινοραβδωτών συστημάτων ινών προκάλεσαν αύξηση της απόπτωσης και καταστολή του φαινοτύπου των GABAεργικών και των χολινεργικών νευρώνων του ραβδωτού σώματος του επίμυος, γεγονότα τα οποία ήταν περισσότερο έντονα μετά από βλάβες κατά τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης (Mellios et al. 2005). Μικρότερης έκτασης βλάβη των φλοιοραβδωτών συνδέσεων σε νεογέννητες γάτες δεν προκάλεσε μεταβολές στον αριθμό των νευρώνων του κερκοφόρου πυρήνα (Looruijt et al. 1997). Πειραματικές καταστροφές συνδέσεων σε νεογέννητους επίμυς, οι οποίες περιελάμβαναν διατομή των νευραξόνων ή ήταν ανάλογες μιας τραυματικής βλάβης στο φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, προκάλεσαν άμεση και δραματική αύξηση του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου σε πυρήνες του θαλάμου, σε αντίθεση με επίμυς μεγαλύτερης ηλικίας, στους οποίους η απώλεια των νευρώνων ήταν αργή και μικρότερης έκτασης (Bittigau et al. 1999, Baldi et al. 2000, Repici et al. 2003, Zacharaki et al., 2005). Σε μελέτες στις οποίες έγινε πρόκληση εστιακής ισχαιμικής βλάβης του εγκεφάλου σε νεογέννητους επίμυς, αναφέρθηκε ότι ο δευτερογενής κυτταρικός θάνατος, ο οποίος εκδηλώνεται σε απομακρυσμένες περιοχές που συνδέονται με την περιοχή της άμεσης προσβολής, είναι αποπτωτικού τύπου (Northington et al. 2001). Ενεργοποίηση των αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας των κασπασών και των Bcl-2 παρατηρήθηκε σε εγκεφάλους σκύλων, στους οποίους καρδιακή ανακοπή είχε ως αποτέλεσμα την πρόκληση γενικευμένης εγκεφαλικής ισχαιμίας (Krajewska et al. 2004).

Από τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι ανώριμοι νευρώνες είναι πιο ευάλωτοι σε αποπτωτικά ερεθίσματα από τους ώριμους νευρώνες και ότι η επιβίωση των νευρώνων πριν από την περάτωση σημαντικών αναπτυξιακών διεργασιών εξαρτάται από την τροφική υποστήριξή τους μέσω των αμέραιων συνδέσεών τους. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην ύπαρξη μιας «κρίσιμης» αναπτυξιακής περιόδου, κατά την οποία ο εγκέφαλος εμφανίζει πλαστικότητα, με στόχο την ολοκλήρωση των νευρωνικών του δικτύων.

Επιπλέον, φαίνεται ότι υπάρχει ετερογένεια στην «απόκριση» των διαφόρων περιοχών του αναπτυσσόμενου εγκεφάλου στις βλάβες των συνδέσεών τους. Η ετερογένεια αυτή ενδεχομένως να σχετίζεται με τη διαφορετική φύση, οργάνωση και έκταση των συνδέσεων που καταστρέφονται, καθώς και με την ικανότητα των νευρώνων να αντισταθμίζουν την απώλεια της νευροτροφικής υποστήριξης μέσω πολυπαραγοντικών νευροτροφικών μηχανισμών.

ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

Η μελέτη των μοριακών και των κυτταρικών μηχανισμών που ρυθμίζουν την απόπτωση έχει μεγάλη σημασία για την κατανόηση της λειτουργίας του φυσιολογικού και του νοσούντος εγκεφάλου. Η γνώση που παράγεται μπορεί να αποτελέσει εργαλείο για τη θεραπευτική αντιμετώπιση των νευροεκφυλιστικών νόσων και των συνεπειών των τραυματικών βλαβών του εγκεφάλου.

Οι στρατηγικές που έχουν αναπτυχθεί με στόχο την προστασία των νευρώνων ή/και τη διάσωσή τους από τον κυτταρικό θάνατο εστιάζονται στην ανεύρεση παραγόντων που προάγουν και διατηρούν την κυτταρική επιβίωση και λειτουργικότητα. Οι πειραματικές δοκιμές για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητάς τους γίνονται *in vitro*, σε κυτταρικές καλλιέργειες, ή *in vivo*, σε ζώα-μοντέλα νευροεκφυλιστικών νόσων και τραυματικών βλαβών του εγκεφάλου. Ανάμεσα στις στρατηγικές αυτές, οι ελπιδοφόρες είναι η χορήγηση εξωγενών νευροτροφικών παραγόντων και η μεταμόσχευση στελεχιαίων κυττάρων.

Νευροτροφικοί παράγοντες

Το ευρύ φάσμα των βιολογικών δράσεων των νευροτροφικών παραγόντων αποτέλεσε ισχυρό κίνητρο για ενδελεχή έρευνα, με αντικείμενο τη χρήση τους ως θεραπευτικών παραγόντων σε παθολογικές καταστάσεις. Ουσιαστική ώθηση στην έρευνα αυτή έδω-

σαν πειραματικές μελέτες που απέδειξαν ότι μετά από βλάβη του εγκεφάλου αυξάνεται η συγκέντρωση νευροτροφικών παραγόντων στην περιοχή της βλάβης, οι οποίοι προάγουν την επιβίωση των νευρώνων (Nieto-Sampedro et al. 1983). Έκτοτε, πληθώρα μελετών έχει δείξει την ευεργετική δράση των γνωστών μέχρι σήμερα νευροτροφικών παραγόντων σε πειραματικές ισχαιμικές βλάβες του εγκεφάλου (Abe 2000) και σε πρότυπα νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως είναι οι νόσοι Alzheimer, Parkinson και Huntington (Alexi et al. 2000, Thoenen and Sendtner 2002). Με βάση τα αισιόδοξα ευρήματα των πειραματικών μελετών, οι νευροτροφικοί παράγοντες αποτέλεσαν το επίκεντρο πολλών θεραπευτικών προσεγγίσεων με τη χρήση ποικίλων σκευασμάτων, με στόχο την παρεμπόδιση ή τον περιορισμό της απόπτωσης στις νόσους του ΚΝΣ, όμως, έως σήμερα, η εφαρμογή τους στην κλινική πράξη δεν έχει δώσει ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Alexi et al. 2000).

Μεταμόσχευση στελεχιαίων κυττάρων

Η επαναστατική ιδέα, η οποία ωρίμασε τις τελευταίες δεκαετίες, αφορά στην «επιδιόρθωση» συγκρομένων βλαβών του εγκεφάλου μέσω της μεταμόσχευσης κυττάρων, τα οποία θα είχαν τη δυνατότητα να αποκαταστήσουν τα κατεστραμμένα νευρωνικά δίκτυα. Τα κύτταρα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σε ποικίλες μελέτες, ήταν αδιαφοροποίητα πολυδύναμα κύτταρα που προέρχονταν από τον εμβρυϊκό κόμβο της βλαστοκύστης, τους αιμοποιητικούς ιστούς, τον ομφά-

λιο λώρο, το μεσέγγυμα ή το ίδιο το ΚΝΣ. Οι πειραματικές δοκιμές έδειξαν ότι, σε πολλές περιπτώσεις, τα μεταμοσχευμένα στελεχιαία κύτταρα μεταναστεύουν στην περιοχή της βλάβης, διαφοροποιούνται, παράγουν τροφικούς παράγοντες και συμβάλλουν στην επιβράδυνση των νευροεκφυλιστικών διεργασιών, χωρίς όμως να αναγεννούν κατεστραμμένα νευρωνικά δίκτυα. Ωστόσο, πριν να μεταφερθεί η τεχνογνωσία της μεταμόσχευσης στελεχιαίων κυττάρων στην κλινική πράξη, είναι αναγκαίο να επιλυθούν διάφορα πρακτικά προβλήματα και να διερευνηθούν σε βάθος οι βιολογικοί μηχανισμοί της λειτουργίας τους (για βιολογικές αναφορές βλ. Zietlow et al. 2008).

Ο τομέας της ανάπτυξης «νευροπροστατευτικών στρατηγικών» για τη θεραπευτική αντιμετώπιση των νόσων του ΚΝΣ είναι ελπιδοφόρος. Οι ερευνητές εκφράζουν ελπίδες ότι σύντομα θα ξεπεραστούν τα προβλήματα που δυσχεραίνουν τη μεταφορά των δεδομένων της βασικής έρευνας στην κλινική εφαρμογή, γεγονός που ίσως επιτρέψει την ανάπτυξη πιο ολοκληρωμένων και αποτελεσματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστούμε τον Ομότιμο Καθηγητή της Κτηνιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ., Α. Καραμανλίδη και τον Καθηγητή της Κτηνιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ., Α. Ντινόπουλο, για τη συμβολή τους στις διορθώσεις του κειμένου. ■

REFERENCES - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abe K (2000) Therapeutic potential of neurotrophic factors and neural stem cells against ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 20:1393-1408.
- Alexi T, Borlongan CV, Faulk RL, Williams CE, Clark RG, Gluckman PD, Hughes PE (2000) Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Prog Neurobiol*, 60:409-470.
- Anderson AJ, Ruehl WW, Fleischmann LK, Stenstrom K, Entriken TL, Cummings BJ (2000) DNA damage and apoptosis in the aged canine brain: relationship to Abeta deposition in the absence of neuritic pathology. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 24:787-799.
- Armstrong JS (2006) Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *Bioessays*, 28:253-260.
- Baldi A, Calia E, Ciampini A, Riccio M, Vetusch A, Persico AM, Keller F (2000) Deafferentation-induced apoptosis of neurons in thalamic somatosensory nuclei of the newborn rat: critical period and rescue from cell death by peripherally applied neurotrophins. *Eur J Neurosci*, 12:2281-2290.
- Barde YA, Edgar D, Thoenen H (1982) Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J*, 1:549-553.
- Behl C (2000) Apoptosis and Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, 107:1325-1344.
- Becker EB, Bonni A (2004) Cell cycle regulation of neuronal apoptosis in development and disease. *Prog Neurobiol*, 72:1-25.
- Bittigau P, Siffringer M, Pohl D, Stadthaus D, Ishimaru M, Shimizu H, Ikeda M, Lang D, Speer A, Olney JW, Ikonomidou C (1999) Apoptotic neurodegeneration following trauma is markedly enhanced in the immature brain. *Ann Neurol*, 45:724-735.
- Bredesen DE (2000) Apoptosis: overview and signal transduction pathways. *J Neurotrauma*, 17:801-810.
- Burek MJ, Oppenheim RW (1996) Programmed cell death in the developing nervous system. *Brain Pathol*, 6:427-446.
- Burke RE, Franklin SO, Inturrisi CE (1994) Acute and persistent suppression of preproenkephalin mRNA expression in the striatum following developmental hypoxic-ischemic injury. *J Neurochem*, 62:1878-1886.
- Burke RE (2004) Ontogenic cell death in the nigrostriatal system. *Cell Tissue Res*, 318:63-72.

- Buss RR, Sun W, Oppenheim RW (2006) Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development. Ann Rev Neurosci, 29:1-35.
- Chao MV, Rajagopal R, Lee FS (2006) Neurotrophin signalling in health and disease. Clin Sci (Lond), 110:167-173.
- Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR (2006) Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. Cell Death Differ, 13:1396-1402.
- Clarke PG (1985) Neuronal death in the development of the vertebrate nervous system. Trends Neurosci, 8:345-349.
- Cui Q (2006) Actions of neurotrophic factors and their signaling pathways in neuronal survival and axonal regeneration. Mol Neurobiol, 33:155-179.
- Daniel NN, Korsmeyer SJ (2004) Cell death: critical control points. Cell, 116:205-219.
- Davies AM (2003) Regulation of neuronal survival and death by extracellular signals during development. EMBO J, 22:2537-2545.
- de la Rosa EJ, de Pablo F (2000) Cell death in early neural development: Beyond the neurotrophic theory. Trends Neurosci, 23:454-458.
- Denault JB, Salvesen GS (2002) Caspases: keys in the ignition of cell death. Chem Rev, 102:4489-4500.
- Ernfors P, Ibanez CF, Ebendal T, Olson L, Persson H (1990) Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to nerve growth factor: developmental and topographical expression in the brain. Proc Natl Acad Sci, 14:5454-5458.
- Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J (2005) Caspase family proteases and apoptosis. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 37:719-727.
- Ferrer I, Serrano T, Soriano E (1990) Naturally occurring cell death in the subicular complex and hippocampus in the rat during development. Neurosci Res, 8:60-66.
- Ferrer I, Tortosa A, Blanco R, Martin F, Serrano T, Planas A, Macaya A (1994) Naturally occurring cell death in the developing cerebral cortex of the rat. Evidence of apoptosis-associated internucleosomal DNA fragmentation. Neurosci Lett, 182:77-79.
- Ferrer I, Blanco R, Cutillas B, Ambrosio S (2000) Fas and Fas-L expression in Huntington's disease and Parkinson's disease. Neuropathol Appl Neurobiol, 26:424-433.
- Ferrer I (2002) Synaptic pathology and cell death in the cerebellum in Creutzfeldt-Jakob disease. Cerebellum, 3:213-222.
- Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. Cell Death Differ, 10:76-100.
- Fiske and Brunjes (2001) Cell death in the developing and sensory-deprived rat olfactory bulb. J Comp Neurol, 431:311-319.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol, 119:493-501.
- Häcker G (2000) The morphology of apoptosis. Cell Tissue Res, 301:5-17.
- Hallbook F, Ibanez CF, Persson H (1991) Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. Neuron, 5:845-858.
- Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. Nature, 407:770-776.
- Herrup K, Shojacian-Zanjani H, Panzini L, Sunter K, Mariani J (1996) The numerical matching of source and target populations in the CNS: the inferior olive to Purkinje cell projection. Brain Res Dev Brain Res, 96:28-35.
- Honig LS, Rosenberg RN (2000) Apoptosis and neurologic disease. Am J Med, 108:317-330.
- Horvitz HR (2003) Nobel lecture. Worms, life and death. Biosci Rep, 23:239-303.
- Jäättelä M (2002) Programmed cell death: many ways for cells to die decently. Ann Med, 34:480-488.
- Jackson-Lewis V, Vila M, Djaldetti R, Guegan C, Liberatore G, Liu J, O'Malley KL, Burke RE, Przedborski S (2000) Developmental cell death in dopaminergic neurons of the substantia nigra of mice. J Comp Neurol, 424:476-488.
- Jeon BS, Kholodilov NG, Oo TF, Kim SY, Tomaselli KJ, Srinivasan A, Stefanis L, Burke RE (1999) Activation of caspase-3 in developmental models of programmed cell death in neurons of the substantia nigra. J Neurochem, 73:322-333.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer, 26:239-257.
- Kiatipattanasakul W, Nakamura S, Hossain MM, Nakayama H, Uchino T, Shumiya S, Goto N, Doi K (1996) Apoptosis in the aged dog brain. Acta Neuropathol, 92:242-248.
- Kiechle T, Dedeoglu A, Kubilus J, Kowall NW, Beal MF, Friedlander RM, Hersch SM, Ferrante RJ (2002) Cytochrome C and caspase-9 expression in Huntington's disease. Neuromolecular Med, 1:183-195.
- Krajewska M, Rosenthal RE, Mikolajczyk J, Stennicke HR, Wiesenthal T, Mai J, Naito M, Salvesen GS, Reed JC, Fiskum G, Krajewski S (2004) Early processing of Bid and caspase-6, -8, -10, -14 in the canine brain during cardiac arrest and resuscitation. Exp Neurol, 189:261-279.
- Krantic S, Mechawar N, Reix S, Quirion R (2005) Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. Trends Neurosci, 28:670-676.
- Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA (1996) Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. Nature, 384:368-372.
- Leist M, Jäättelä M (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. Nat Rev Mol Cell Biol, 2:589-598.
- Levi-Montalcini R (1987) The nerve growth factor: thirty-five years later. EMBO J, 6:1145-1154.
- Linden R (1994) The survival of developing neurons: a review of afferent control. Neuroscience, 58:671-682.
- Lindsten T, Zong WX, Thompson CB (2005) Defining the role of the Bcl-2 family of proteins in the nervous system. Neuroscientist, 11:10-15.
- Loopuijt LD, Villablanca JR, Hovda DA, Huang E, Mancuso S (1997) The effect of neocortical lesions on the number of cells in neonatal or adult feline caudate nucleus: comparison to fetal lesions. Neuroscience, 77:403-418.
- Los M, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K (1999) The role of caspases in development, immunity and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. Immunity, 10:629-639.
- Lossi L, Gambino G (2008) Apoptosis of the cerebellar neurons. Histol Histopathol, 23:367-380.
- Marti MJ, James CJ, Oo TF, Kelly WJ, Burke RE (1997) Early developmental destruction of terminals in the striatal target induces apoptosis in dopamine neurons of the substantia nigra. J Neurosci, 17:2030-2039.
- Marti MJ, Saura J, Burke RE, Jackson-Lewis V, Jiménez A, Bonastre M, Tolosa E (2002) Striatal 6-hydroxydopamine induces apoptosis of nigral neurons in the adult rat. Brain Res, 958:185-191.
- Mattson MP (2000) Apoptosis in neurodegenerative disorders. Nat Rev Mol Cell Biol, 1:120-129.

- Mellios K, Sophou S, Latsari M, Dinopoulos A, Antonopoulos J, Parnavelas JG, Dori I (2005) Apoptosis in the rat striatum during development and following lesions of afferent and efferent connections. In: Abstract Viewer/Itinerary Planner Society for Neuroscience, 35th Annual Meeting, (Washington DC) U.S.A., Program No. 250.11. 2005.
- Moro L, Martins AS, Alves CM, Santos FG, Del Puerto HL, Vasconcelos AC (2003) Apoptosis in the cerebellum of dogs with distemper. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 50:221-225.
- Nieto-Sampedro M, Manthorpe M, Barbin G, Varon S, Cotman CW (1983) Injury-induced neuronotrophic activity in adult rat brain: correlation with survival of delayed implants in the wound cavity. *J Neurosci*, 3:2219-2229.
- Northington FJ, Ferriero DM, Flock DL, Martin LJ (2001) Delayed neurodegeneration in neonatal rat thalamus after hypoxia-ischemia is apoptosis. *J Neurosci*, 21:1931-1938.
- Nunez JL, Lauschke DM, Juraska JM (2001) Cell death in the development of the posterior cortex in male and female rats. *J Comp Neurol*, 436:32-41.
- Oo TF, Burke RE (1997) The time course of developmental cell death in phenotypically defined dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Brain Res Dev Brain Res*, 98:191-196.
- Oppenheim RW (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 14:453-501.
- Plaschke M, Kasper EM, Naumann T, Frotscher M (1994) Survival and transmitter expression of rat cholinergic medial septal neurons despite removal of hippocampus in the early postnatal period. *Neurosci Lett*, 176:243-246.
- Porter AG, Jänicke RU (1999) Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*, 6:99-104.
- Repici M, Atzori C, Migheli A, Vercelli A (2003) Molecular mechanisms of neuronal death in the dorsal lateral geniculate nucleus following visual cortical lesions. *Neuroscience*, 117:859-867.
- Sandy JR, Slocombe RE, Mitten RW, Jedwab D (2002) Cerebellar abiotrophy in a family of Border Collie dogs. *Vet Pathol*, 39:736-738.
- Shiozaki EN, Shi Y (2004) Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends Biochem Sci*, 29:486-494.
- Sophou S, Dori I, Antonopoulos J, Parnavelas JG, Dinopoulos A (2006) Apoptosis in the rat basal forebrain during development and following lesions of connections. *Eur J Neurosci*, 24:573-585.
- Spreatico R, Frassoni C, Arcelli P, Selvaggio M, DeBaisi S (1995) In situ labelling of apoptotic cell death in the cerebral cortex and thalamus of rats during development. *J Comp Neurol*, 363:281-295.
- Stefanis L (2005) Caspase-dependent and -independent neuronal death: two distinct pathways to neuronal injury. *Neuroscientist*, 11:50-62.
- Tanaka M, Momoi T, Marunouchi T (2000) In situ detection of activated caspase-3 in apoptotic granule neurons in the developing cerebellum in slice cultures and in vivo. *Brain Res Dev Brain Res*, 121:223-228.
- Theerasurakarn S, Ubol S (1998) Apoptosis induction in brain during the fixed strain of rabies infection correlates with onset and severity of illness. *J Neurovirol*, 4:407-414.
- Thoenen H, Sendtner M (2002) Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. *Nat Neurosci*, 5 (Suppl):1046-1050.
- Yakovlev AG, Faden AI (2004) Mechanisms of neural cell death: implications for development of neuroprotective treatment strategies. *NeuroRx*, 1:5-16.
- Yeo W, Gautier J (2004) Early neural cell death: dying to become neurons. *Dev Biol*, 274:233-244.
- Yuan J, Yankner BA (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature*, 407:802-809.
- Zacharaki T, Sophou S, Dinopoulos A, Antonopoulos J, Parnavelas JG, and Dori I, (2005). Apoptosis following deafferentation and target deprivation in the immature rat dorsal lateral geniculate nucleus. In: Abstracts of the 19th Meeting of the Hellenic Society for Neuroscience, (Patra) Greece, pp.93-95.
- Zietlow R, Lane EL, Dunnett SB, Rosser AE (2008) Human stem cells for CNS repair. *Cell Tissue Res*, 331:301-322.