

Εισαγωγή

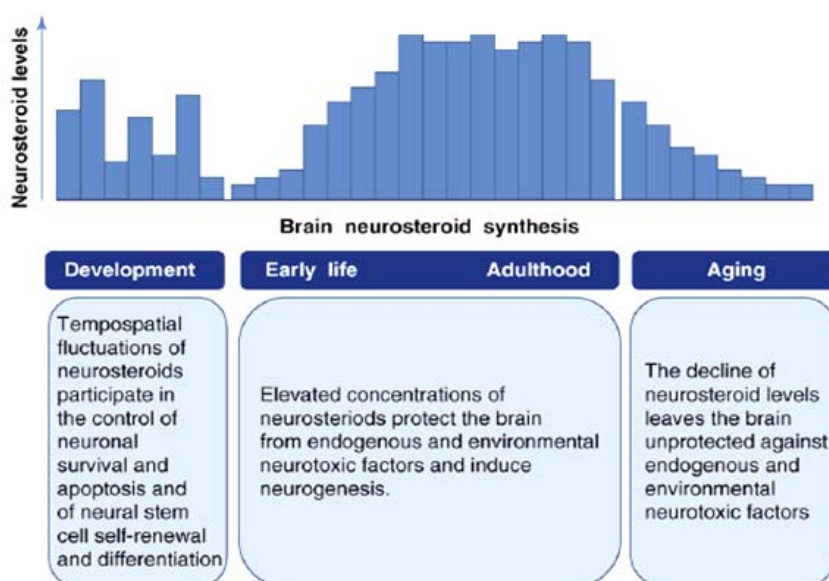
Τι είναι τα Νευροστεροειδή

Ως νευροστεροειδή ορίζονται συγκεκριμένα είδη στεροειδών ορμονών που εκτός της πρωτογενούς τους σύνθεσης σε περιφερικά όργανα όπως ο φλοιός των επινεφριδίων (zona reticulata) αλλά και οι γονάδες, έχουν την ιδιότητα να συντίθενται και στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα *in situ*, μετά από μεταβολισμό (καθώς τόσο τα νευρικά όσο και τα γλοιακά κύτταρα του νευρικού συστήματος διαθέτουν όλα τα απαραίτητα μεταβολικά ένζυμα) πρόδρομων ορμονών που φτάνουν εκεί μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, αλλά και εκ νέου (de novo) από χοληστερόλη (1). Με αυτό τον τρόπο τα νευροστεροειδή είναι δυνατόν να συσσωρεύονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο νευρικό σύστημα ανεξάρτητα από το ρυθμό βιοσύνθεσης και έκκρισής τους από τα επινεφρίδια, ακόμα και μετά από γοναδεκτομή ή αδρενεκτομή (2,3). Κατόπιν, στο σημείο παραγωγής τους δρουν με τρόπο αυτοκρινικό ή παρακρινικό, επηρεάζοντας ποικίλα νευροδιαβιβαστικά συστήματα μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων και καναλιών ιόντων καθώς και την έκφραση γονιδίων μέσω των κλασσικών πυρηνικών υποδοχέων των στεροειδών.

Βιοσύνθεση

Στη κατηγορία των νευροστεροειδών ανήκουν η Διϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA), η προγεστερόνη (PROG), η πρεγνενολόνη (PREG) καθώς και τα θειϊκά παράγωγα τους. Η πρεγνενολόνη είναι η πρώτη ορμόνη που βιοσυντίθεται από τη χοληστερόλη παρουσία του ενζύμου P450_{sc} (CYP11A1) που εντοπίζεται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και ανήκει στην οικογένεια του κυτοχρώματος P450. Το ένζυμο αυτό έχει την ιδιότητα να διασπά τη πλευρική αλυσίδα της χοληστερόλης σε τρεις διαδοχικές αντιδράσεις: υδροξυλίωση στη θέση 22α, υδροξυλίωση στη θέση 22 και διάσπαση της ανθρακικής αλυσίδας στη θέση 20-22. Η ύπαρξη του ενζύμου αυτού σε ένα κύτταρο προσδιορίζει το στεροειδογενή του χαρακτήρα. Η PREG έπειτα μπορεί να μετατραπεί σε όλες τις υπόλοιπες στεροειδείς ορμόνες μέσω άλλων ενζύμων. Συγκεκριμένα η PREG μετατρέπεται σε PROG μέσω του ενζύμου 3βHSD (3β-υδροξυστεροειδοαναγωγή) ενώ υδροξυλίωση στη θέση 17 από το ένζυμο P450_{c17} είτε της PREG ή της PROG θα δώσει τα υδροξυλιωμένα ενδιάμεσα αυτών που μπορούν να μετατραπούν από το ίδιο ένζυμο σε DHEA ή ανδρογόνα (ανδροστενδιόνη) αντίστοιχα. Ακολούθως στο βιοσυνθετικό μονοπάτι, η DHEA μετατρέπεται αρχικά σε ανδροστενδιόνη και έπειτα σε τεστοστερόνη μέσω των 3β-HSD (3β-

υδροξυστεροειδοαφυδρογονάση) και 17β-HSOR (17β-υδροξυστεροειδο οξυδοαναγωγή) αντίστοιχα. Η τεστοστερόνη τελικά μετατρέπεται μέσω της αρωματάσης στο οιστρογόνο οιστραδιόλη. Επίσης η DHEA μπορεί να μετατραπεί όπως και η PROG στη πιο σταθερή μορφήθειϊκού εστέρα (DHEA Sulfate ή DHEAS), μέσω της σουλφοτρανσφεράσης, μορφή που επίσης χαρακτηρίζεται στο νευρικό σύστημα ως νευροστεροειδές. Έχει παρατηρηθεί ότι στα τρωκτικά το ένζυμο 3βHSD προτιμά ως υπόστρωμα την προγεστερόνη με ακόλουθο σχηματισμό Δ4 στεροειδών (προγεστερόνη, ανδροστενδιόνη) ενώ στους ανθρώπους ενισχύεται το μονοπάτι σχηματισμού 3β-υδρόξυ-Δ5-στεροειδών, όπως η DHEA και η τελευταία αποτελεί απαραίτητο ενδιάμεσο για το σχηματισμό ανδρογόνων (5). Επίσης το ένζυμο P450c17 εκφράζεται μόνο στις γονάδες των τρωκτικών και όχι στον μυελό των επινεφριδίων, γεγονός που δικαιολογεί τα χαμηλά επίπεδα DHEA στην περιφέρεια και καταδεικνύει πως τα ποσά της DHEA που ανιχνεύονται στον εγκέφαλο προέρχονται από τοπική σύνθεση αυτής. Στον άνθρωπο, κατά τη περίοδο της κύησης εκκρίνονται μεγάλα ποσά DHEA από την εμβρυϊκή φλοιώδη μοίρα των επινεφριδίων η οποία ατροφεί μετά τη γέννηση (5). Τα ποσά αυτά μειώνονται στους πρώτους 6μηνες μετά τη γέννηση και αρχίζουν να αυξάνονται ξανά μετά την ανάπτυξη της δικτυωτής μοίρας του φλοιού των επινεφριδίων οπότε και αρχίζει η παραγωγή και των υπόλοιπων ανδρογόνων, περίπου στην ηλικία των 6-8 χρόνων. Περίπου στα μισά της δεύτερης δεκαετίας παρατηρείται η υψηλότερη συγκέντρωση της DHEA στη κυκλοφορία του αίματος αλλά και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, ενώ αργότερα αρχίζει να μειώνεται σταδιακά έως ότου φτάσει το χαμηλότερο όριο (περίπου 20% της αρχικής συγκέντρωσης) γύρω στην ηλικία των 65-70 χρονών.



TRENDS in Endocrinology & Metabolism

Charalampopoulos I. et al 2008

Ο συσχετισμός αυτός της χαμηλής ποσότητας DHEA κατά τη γήρανση με την εμφάνιση των περισσότερων νευρολογικών ασθενειών τη περίοδο αυτή, όπως και τα μειωμένα επίπεδα της ορμόνης σε παθολογικές καταστάσεις όπως το χρόνιο στρες ή η νευρική εκφύλιση κατά την γήρανση ή σε νευροεκφυλιστικές νόσους, εγείρει το ερώτημα αν η DHEA έχει την ιδιότητα να προάγει την νευροπροστασία και την νευρογένεση, και να προστατεύει/επιδιορθώνει το νευρικό ιστό από τη δράση τοξικών παραγόντων (6).

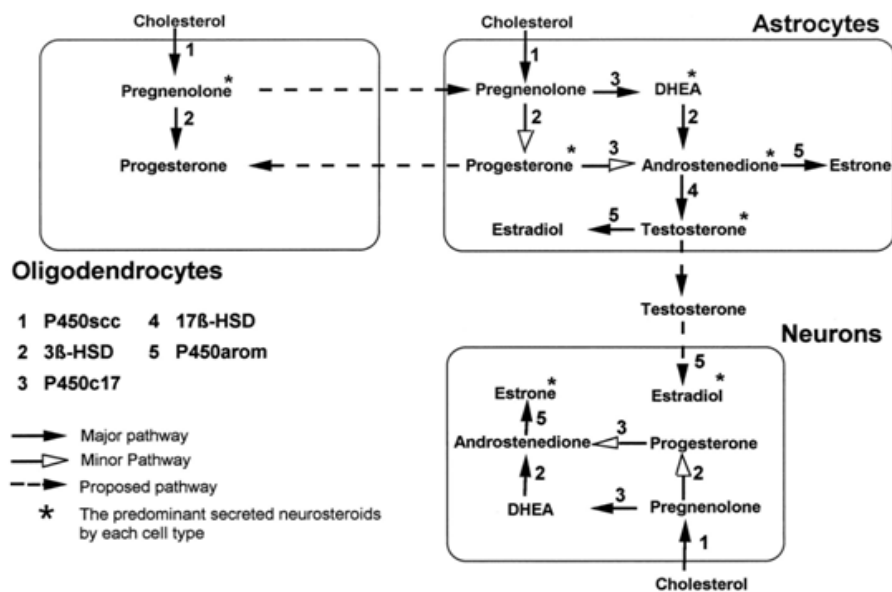
Όπως προαναφέρθηκε, το ένζυμο παραγωγής της DHEA από πρεγνενολόνη, CYPc17α, υπάρχει στα επινεφρίδια, στις γονάδες και στο νευρικό σύστημα. Παρόλο που η DHEA είναι το στεροειδές με την υψηλότερη συγκέντρωση στη συστηματική κυκλοφορία των θηλαστικών συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου (500 φορές υψηλότερα από τη τεστοστερόνη) οι συγκεντρώσεις αυτής στο πλάσμα είναι πολύ μικρές σε σύγκριση με αυτές στον εγκέφαλο αλλά όχι και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Συγκεκριμένα περίπου 6.5 φορές αυξημένη βρέθηκε η συγκέντρωση της DHEA στον εγκέφαλο εν συγκρίσει με αυτή στο πλάσμα του αίματος, από μεταθανάτια μελέτη 9 γυναικών και ενός άντρα ηλικίας 65-73 ετών (7). Και μέσα στον ίδιο τον νευρικό ιστό παρόλα αυτά, η κατανομή των ενζύμων διαφέρει τόσο ανάμεσα στις ανατομικές περιοχές του εγκεφάλου όσο και στους διάφορους κυτταρικούς τύπους (π.χ. νευρώνες ή γλοία) αλλά ακόμα και σε υποκυτταρικό επίπεδο. Επιπλέον, η δραστηριότητα των προαναφερθέντων ενζύμων μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης επηρεάζοντας τα επίπεδα των νευροστεροειδών στις διάφορες περιοχές του νευρικού συστήματος κατά τη διάρκεια της ζωής ενός οργανισμού(4).

Έκφραση των ενζύμων σύνθεσης των νευροστεροειδών στον εγκέφαλο ενήλικου μυ.

Το ένζυμο P450c17 έχει δειχθεί ότι εκφράζεται κατά την εμβρυϊκή περίοδο σε μεσεγκέφαλο, προμήκη και σπονδυλική στήλη (13) όπως επίσης και στο εγκεφαλικό στέλεχος ενήλικων τρωκτικών (14), αλλά και σε αστροκύτταρα και νευρώνες απομονωμένα από το φλοιό (16). Σε άλλη έρευνα όπου έχει γίνει υβριδισμός για μετάγραφα αγγελιοφόρου RNA που κωδικοποιεί το προαναφερθέν ένζυμο έχει βρεθεί έκφραση αυτού ειδικά στον μεσεγκέφαλο που διατηρείται σταθερή σε νεογέννητους και ενήλικους αρουραίους, εν αντιθέσει με την έκφραση του ενζύμου 3β-HSD που δείχνει διαφορετικά μοτίβα έκφρασης στο φλοιό και την παρεγκεφαλίδα στις διάφορες ηλικίες που εξετάστηκαν (15).

Πιο πρόσφατα, η πρωτεΐνη εντοπίστηκε ανοσοϊστοχημικά σε ολόκληρο τον εγκέφαλο και ενήλικου βατράχου (45). Επίσης, μικροσκοπική και ανοσοϊστοχημική ανάλυση έχει δείξει τη

παρουσία του ενζύμου βιοσύνθεσης της DHEA όπως και της μετατροπής της σε οιστραδιόλη, στα πυραμιδικά κύτταρα της περιοχής CA1-CA3 και στα κοκκιώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας του ιππόκαμπου ενήλικων αρουραίων. Ο υποκυτταρικός εντοπισμός των ενζύμων αυτών έγινε στο ενδοπλασματικό δίκτυο καθώς και στις δενδριτικές άκανθες και συναπτικές απολήξεις των αξόνων. Η τοπική παραγωγή οιστρογόνων στη περιοχή αυτή έχει συνδεθεί με ρύθμιση της συναπτικής πλαστικότητας. Το ένζυμο P450c17 δεν έχει βρεθεί να εκφράζεται από τα ολιγοδενδροκύτταρα ή τα μικρογλοιακά κύτταρα όπου εκφράζονται άλλα ένζυμα όπως το 3βHSD που μετατρέπει τη DHEA σε οιστρογόνα και ανδρογόνα. Ένας πιθανός μηχανισμός σύμφωνα με τον οποίο νευρώνες και κύτταρα της γλοίας αλληλεπιδρούν ώστε να ρυθμίσουν τη τοπική παραγωγή νευροστεροειδών στον εγκέφαλο προτείνεται σχηματικά παρακάτω:



Zwain H. I et al.1999

Επίσης το ένζυμο υδροξυστεροειδο-θειοτρανσφεράση που καταλύει την προσθήκη μιας θειϊκής ομάδας στο μόριο της DHEA έχει δειχθεί ότι εκφράζεται στον εγκέφαλο του αρουραίου και του βατράχου (8,9). Επίσης, αναμένεται οι θειικοί αυτοί εστέρες να μην εισέρχονται μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού αφού είναι υδρόφιλα μόρια όπως έχει δειχθεί και από μελέτες ανίχνευσης ραδιοσημασμένης ³[H]-DHEA στον εγκέφαλο μετά από χορήγηση στη περιφέρεια (10). Μικρές ποσότητες εισέρχονται από τη περιφέρεια ενώ μεγαλύτερα ποσά εξέρχονται μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού από τους μεταφορείς οργανικών ανιόντων (organic anion transporting peptides – OATP) (11).

Μηχανισμοί δράσης της Διϋδροεπιανδροστερόνης.

Αν και δεν έχει ταυτοποιηθεί ειδικός υποδοχέας για την DHEA στο κεντρικό νευρικό σύστημα, είναι πλέον γνωστό ότι μπορεί να επηρεάσει διάφορα νευροδιαβιβαστικά συστήματα μέσω πρόσδεσης σε μια πληθώρα διαμεμβρανικών και ενδοκυττάρων υποδοχέων. Συγκεκριμένα οι πιθανοί υποδοχείς που διαμεσολαβούν τις δράσεις της DHEA είναι οι ακόλουθοι:

1. AR και ER πυρηνικοί υποδοχείς.

Πολλές στεροειδείς ορμόνες έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων μέσω πυρηνικών υποδοχέων με τους οποίους αρχικά προσδέονται στο κυτταρόπλασμα και εν συνεχεία προκαλούν τη μεταφορά τους στο πυρήνα. Εκεί οι τελευταίοι δρύνε ως μεταγραφικοί παράγοντες. Μέχρι στιγμής δεν έχει βρεθεί κάποιος πυρηνικός υποδοχέας που να διαμεσολαβεί τις δράσεις της DHEA και έτσι πολλοί ερευνητές θεωρούν πως οι δράσεις της οφείλονται σε μετατροπή αυτής σε ανδρογόνα και οιστρογόνα όπως και σε άλλα παράγωγα όπως την 7α-υδροξυ-διϋδροεπιανδροστερόνη. Η DHEA δείχνει συνάφεια με τον υποδοχέα των ανδρογόνων (AR), όπου κύριος προσδέτης είναι η τεστοστερόνη ($K_i = 1.1\mu\text{M}$), αλλά και με τον υποδοχέα των οιστρογόνων (ER) όπου προσδέεται η οιστραδιόλη ($K_i = 0.5$ για τον ARβ) (12).

2. GABA_A υποδοχείς.

Στον ιοντοτροπικό υποδοχέα του γ-αμινοβουτυρικού οξέος οι DHEA και DHEAS προσδέονται στο σημείο πρόσδεσης της πικροτοξίνης, δρώντας ως μη συναγωνιστικοί ανταγωνιστές του GABA_A με τη μορφή του θειικού εστέρα να έχει καλύτερες ανταγωνιστικές ιδιότητες (20,21). Σε αυτή την ικανότητα πρόσδεσης της DHEA οφείλεται εν μέρει η νευροπροστατευτική δράση της (22,23), ενώ μέσω ρύθμισης του GABA μπορεί να επηρεάζει την σεροτονινεργική δραστηριότητα στο πυρήνα της ραφής προκαλώντας αλλαγές στη συμπεριφορά (24). Σε έρευνες σε τρωκτικά όπου προκλήθηκε απόπτωση σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες της μελανοραβδωτής οδού με τη νευροτοξίνη MPTP (η οποία προσομοιάζει την εκφύλιση που παρατηρείται στη νόσο του Πάρκινσον) διαπιστώθηκε ότι η DHEA είναι ικανή να περιορίσει την απώλεια νευρώνων στο ραβδωτό και τη μέλανα ουσία μετά από χορήγηση της τοξίνης. Επίσης αύξησε τα επίπεδα ντοπαμίνης και των μεταβολιτών της (DOPAC, HVA) (35,36). Όταν η ίδια βλάβη προκλήθηκε σε πιθήκους η DHEA βελτίωσε σημαντικά τη κλινική τους εικόνα όσον αφορά τη κινητική δραστηριότητα

(37). Οι δράσεις αυτές ίσως διαμεσολαβούνται από την αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα GABA. Ζώα στα οποία προκλήθηκε νέκρωση νευρικού ιστού είτε μετά από τραυματισμό της σπονδυλικής στήλης είτε με πρόκληση χημικής ισχαιμίας στον πρόσθιο εγκέφαλο, έδειξαν βελτίωση της συμπτωματολογίας μετά από χορήγηση του νευροστεροειδούς, ενώ ιστολογικά εξακριβώθηκε μείωση της περιοχής της βλάβης, καλύτερη μυελίνωση στο σημείο αυτό και μειωμένη αστρογλοίωση (32,33). Η δράση αυτή αναιρέθηκε με συγχορήγηση ανταγωνιστών του υποδοχέα GABA_A. Περισσότερα δεδομένα όμως, υπάρχουν για τις νευροπροστατευτικές και αντιαποπτωτικές δράσεις της DHEA από *in vitro* πειράματα όπου και γίνεται προσπάθεια να αποσαφηνιστούν οι μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων διαμεσολαβούνται αυτές οι δράσεις. Οι DHEA(S) προστατεύουν από απόπτωση προκαλούμενη από αποστέρηση οξυγόνου και γλυκόζης πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων παρεγκεφαλίδας και φλοιού με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (38,39). Η δράση αυτή αναστέλλεται παρουσία αγωνιστών και ανταγωνιστών του GABA_A υποδοχέα.

3. NMDA και Σίγμα-1 υποδοχείς.

Η DHEA δρα ως θετικός αλλοστερικός ρυθμιστής του μεταβολοτροπικού NMDA, υποδοχέα του γλουταμινικού, παρόλο που το σημείο πρόσδεσης δεν έχει εξακριβωθεί (25). Στον ιππόκαμπο οι DHEA(S) φαίνεται να ενισχύουν τη νευροδιαβίβαση μέσω του NMDA δρώντας αγωνιστικά στον Σίγμα-1 (σ1), έναν τροποποιητή του μεταβολοτροπικού υποδοχέα του γλουταμινικού, ενώ σε άλλες περιοχές όπως το ραβδωτό μειώνει την έκκριση ντοπαμίνης που προκαλείται από διέγερση του NMDA υποδοχέα (26). Οι δράσεις αυτές εξουδετερώνονται με προσθήκη ανταγωνιστών του σ1 όπως η αλοπεριδόλη (27). Μέσω σ1 έχει δείχθει ότι διαμεσολαβείτε και η αύξηση της χολινεργικής δραστηριότητας στον ιππόκαμπο μετά από χορήγηση DHEAS αλλά όχι DHEA, και η δράση αυτή σχετίσθηκε με βελτίωση των ελλειμμάτων μνήμης που προκαλούνται από χορήγηση ενός χολινεργικού ανταγωνιστή όπως η σκοπολαμίνη (28,29). Νευροπροστατευτικές δράσεις έχουν αποδοθεί και μέσω αυτών των υποδοχέων σε μια σειρά ερευνών όπου προκαλείται τοξικότητα λόγω υπερδιέγερσης από αγωνιστές των υποδοχέων του γλουταμινικού (NMDA και AMPA) σε νευρώνες του ιππόκαμπου αλλά και σε παρεγκεφαλιδικούς μετά από υπερβολική αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων Ca²⁺ (34, 40, 41, 42). Σε μία από τις μελέτες αυτές δείχθηκε εμπλοκή του υποδοχέα σ1 στο μηχανισμό προστασίας από τη DHEAS.

Όπως προαναφέρθηκε το απαραίτητο ενζυμο για τη βιοσύνθεση της DHEA εντοπίζεται σε πολλές περιοχές του ενήλικου εγκεφάλου ενώ κατά την ανάπτυξη ανιχνεύθηκε κυρίως στον φλοιό εγκεφάλου αρουραίου κατά τις εμβρυικές μέρες E10-E14 (47) και συνδέθηκε με την

ανάπτυξη των θαλαμοφλοιικών συνδέσεων (48). Στη συγκεκριμένη έρευνα χρησιμοποιήθηκαν νευρώνες από φλοιό εμβρύων ποντικών (E16) σε καλλιέργεια στους οποίους η DHEA αύξησε την εμφάνιση και επιμήκυνση νευριτών με δοσοεξαρτώμενο τρόπο όταν μετρήθηκαν τα επίπεδα πρωτεϊνών Tau 1 και MAP2. Επίσης προκάλεσε μορφολογικές αλλαγές στα κύτταρα και αύξησε την ενδοκυττάρια συγκέντρωση ca^{2+} την οποία ανέστειλαν ανταγωνιστές του NMDAR.

4. Υποδοχείς του νευροτροφικού παράγοντα NGF, TrkA και p75NTR.

Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα της ερευνητικής μας ομάδας, δεικνύουν ότι η DHEA προστατεύει από απόπτωση σε συγκεντρώσεις της τάξης του nM κύτταρα φαιοκυτοχρώματος του μυελού των επινεφριδίων, αλληλεπιδρώντας με κάποιον διαμεμβρανικό υποδοχέα στον οποίο προσδέεται με μεγάλη συγγένεια ($K_d=0.9nM$). Η δράση αυτή είναι ανεξάρτητη από τους GABA_A, Σίγμα-1 και NMDA υποδοχείς, ενώ η τεστοστερόνη και κορτικοστερόνη είχαν την ικανότητα να ανταγωνίζονται πλήρως την νευροπροστατευτική δράση της DHEA καθώς και την πρόσδεση με τον υποδοχέα της (19). Επιπρόσθετα δεδομένα επιβεβαιώνουν την ικανότητα της DHEA, και όχι κάποιου άλλου νευροστεροειδούς, να επάγει την επιμήκυνση του άξονα σε αισθητικούς νευρώνες που έχουν καλλιεργηθεί μαζί με κερατινοκύτταρα της επιδερμίδας τα οποία είναι γνωστό ότι παράγουν DHEA ενώ αυτή όπως και η DHEAS δρα αντιαποπτωτικά για το είδος αυτό των κυττάρων με μηχανισμό παρόμοιο με αυτόν που έχει διαπιστωθεί στα επινεφριδιακά PC12 κύτταρα (52). Οι νευρώνες των αισθητικών γαγγλίων, από την άλλη μεριά, εκφράζουν τους υποδοχείς των νευροτροφικών παραγόντων NGF και BDNF (TrkA, TrkB αντίστοιχα και εξαρτούν την επιβίωση τους αλλά και την επιμήκυνση των νευραξόνων τους από την παρουσία αυτών. Η DHEA επανέφερε το μέγεθος των νευριτών που είχε μειωθεί μετά από χορήγηση του ανταγωνιστή των υποδοχέων των νευροτροφικών K252a (51) δρώντας ως τροφικός παράγοντας για το είδος αυτό των νευρώνων. Τελικά, λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω καθώς και το γεγονός ότι η DHEA έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί τα ίδια σηματοδοτικά μονοπάτια με την πρότυπη νευροτροφίνη τον νευροτροφικό αυξητικό παράγοντα (NGF), το εργαστήριό μας ταυτοποίησε την ειδική (με σταθερά σύνδεσης της τάξης του nM) πρόσδεση του νευροστεροειδούς DHEA με τους υποδοχείς του NGF, τον TrkA και τον p75NTR. Συγκεκριμένα η DHEA προσδέεται στους υποδοχείς αυτούς με μεγάλη συνάφεια (IC_{50} : 7.8 και 5.9 nM αντίστοιχα για τον TrkA και τον p75NTR) όπως διαπιστώθηκε από μελέτες πειραμάτων πρόσδεσης (ανταγωνισμού του ραδιοσημασμένου αναλόγου της DHEA από το μη σημασμένο στεροειδές), ενώ επίσης συνεντοπίζεται με αυτούς σε

πειράματα κυτταρομετρίας ροής και ανοσοϊστοχημείας. Στη συγκεκριμένη μελέτη η DHEA εμφάνισε νευροπροστατευτική δράση μέσω του TrkA, μειώνοντας τον αποπτωτικό θάνατο συμπαθητικών και αισθητικών νευρώνων σε *ex vivo* και *in vivo* πειράματα, αντισταθμίζοντας την έλλειψη του NGF (Iazaridis et al.2010).

Οι δράσεις των υποδοχέων του NGF.

Ο NGF είναι η πρώτη νευροτροφίνη που ανακαλύφθηκε ως ένα πεπτίδιο με την ιδιότητα να επηρεάζει καθοριστικά την ανάπτυξη του περιφερικού νευρικού συστήματος σε έμβρυα όρνιθας (54). Δρα κυρίως στους συμπαθητικούς νευρώνες, έναν υποπληθυσμό αισθητικών νευρώνων, και στους χολινεργικούς νευρώνες του βασικού πρόσθιου εγκέφαλου επηρεάζοντας την επιβίωσή τους, τη διαφοροποίηση και την ανάπτυξη των νευραξόνων τους (55). Στην ενήλικη ζωή παρ' όλα αυτά οι νευρώνες αυτοί σταματούν να αποκρίνονται στον NGF για την επιβίωσή και ο ρόλος του είναι πλέον να ρυθμίζει την ομοίωση του κυττάρων και την αναγεννητική ικανότητα του νευρικού ιστού μετά από τραύμα. Αργότερα ανακαλύφθηκαν και άλλες νευροτροφίνες της ίδιας οικογένειας, όπως οι BDNF και NT3/4, με μεγάλη ομολογία με τον NGF, που εντοπίζονται όμως σε διαφορετικά είδη νευρώνων και προσδένονται εκλεκτικά σε διαφορετικούς υποδοχείς, τον TrkB και TrkC αντίστοιχα. Οι δράσεις του NGF διαμεσολαβούνται μέσω της εκλεκτικής του πρόσδεσης στον υποδοχέα TrkA ($K_d=0.01\text{nM}$) και στον p75NTR ($K_d=1.1\text{nM}$), στον οποίο προσδένονται όλες οι νευροτροφίνες της υπεροικογένειας του NGF, όπως και η πρόδρομη μορφή του NGF (pro-NGF) με μεγαλύτερη μάλιστα συνάφεια.

Σηματοδότηση μέσω TrkA

Ο TrkA είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας με ενεργότητα κινάσης της τυροσίνης, ικανός να αυτοφωσφορυλιώνεται μετά από ενεργοποίηση. Συγκεκριμένα, ο NGF στη μορφή διμερούς προσδένεται με ένα ομοδιμερές του TrkA υποδοχέα. Η πρόσδεση του NGF προκαλεί φωσφορυλίωση πέντε καταλοίπων τυροσίνης στη περιοχή της κινάσης. Οι κινάσες αυτές φωσφορυλιώνουν άλλα κατάλοιπα τυροσίνης έξω από τη περιοχή της κινάσης όπως στη υπομεμβρανική περιοχή όπου βρίσκεται το σημείο πρόσδεσης της κινάσης Shc, και στο καρβοξυτελικό άκρο όπου συνδέεται η φωσφολιπάση PLC γ 1. Με αυτό το τρόπο επάγεται ένα καταρράκτης αντιδράσεων με αποτέλεσμα την διαδοχική ενεργοποίηση ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών όπως Ras/Raf/MAPKs, PI3K/Akt και PLC- γ 1 που επάγουν με τη σειρά τους την έκφραση μεταγραφικών παραγόντων όπως NF-kB και CREB ελέγχοντας την ικανότητα επιβίωσης και διαφοροποίησης του κυττάρου (117). Η DHEA όπως και ο NGF

προάγει φωσφορυλίωση του TrkA και ακολούθως της Shc, ERK1/2 και των κινασών Akt (Iazaridis et al. 2010).

Σηματοδότηση μέσω p75^{NTR}.

Αντιθέτως ο p75^{NTR} που ανήκει στην υπερικογένεια του υποδοχέα του TNF αν και είναι και αυτός μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, δεν έχει ενζυμική δραστηριότητα αλλά μεταφέρει σήματα με τροποποίηση της δομής του και αλληλεπίδραση με πολλές ενδοκυττάρια πρωτεΐνες (sortilin, TRAF4–6, RIP2, Bex1, Rho-GDI κ.α.). Ο p75^{NTR} απουσία προσδέτη αλληλεπιδρά με τη RhoGDI ενεργοποιώντας τη RhoAGTPase. Ο NGF όπως και η DHEA προκαλούν την αποδέσμευση της RhoGDI μετά από πρόσδεση με τον υποδοχέα ενώ προάγουν την αλληλεπίδραση με τους τελεστές TRAF6 και RIP2 (Iazaridis et al. 2010). Οι δράσεις μέσω του p75^{NTR} έχουν κυρίως σχετισθεί με επαγωγή του κυτταρικού θανάτου που επάγεται μετά από ενεργοποίηση του μονοπατιού της c-Jun κινάσης. Τελικά, ενεργοποιείται ένας μεταγραφικός παράγοντας ο p53 που ελέγχει την απόπτωση μέσω της ρύθμισης έκφρασης διαφόρων προαποπτωτικών γονιδίων όπως το *bax*. Ο p75^{NTR} επιπλέον δύναται να αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα του NOGO και μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, την LINGO1, εμποδίζοντας την επιμήκυνση των νευραξόνων παρουσία των γλυκοπρωτεϊνών της μυελίνης: MAG (myelin associated glycoprotein), Nogo και oligodendrocyte-myelin glycoprotein (57,58). Ακολούθως στο συγκεκριμένο σηματοδοτικό μονοπάτι, ο σχηματισμός του ετεροτριμερούς συμπλόκου υποδοχέων επιφέρει ενεργοποίηση της RhoA μέσω απελευθέρωσης από την Rho-GDI (Rho GDP dissociation inhibitor) η οποία με τη σειρά της ελέγχει τη δομή του κυτταροσκελετού της ακτίνης με τρόπο που προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης του άξονα. Η πρόσδεση του NGF ανταγωνίζεται τη δράση που προκαλείται μετά από δέσμευση της MAG στο σύμπλοκο p75^{NTR}/NOGO-R/LINGO1 εμποδίζοντας την καταστροφή των νευραξόνων (59).

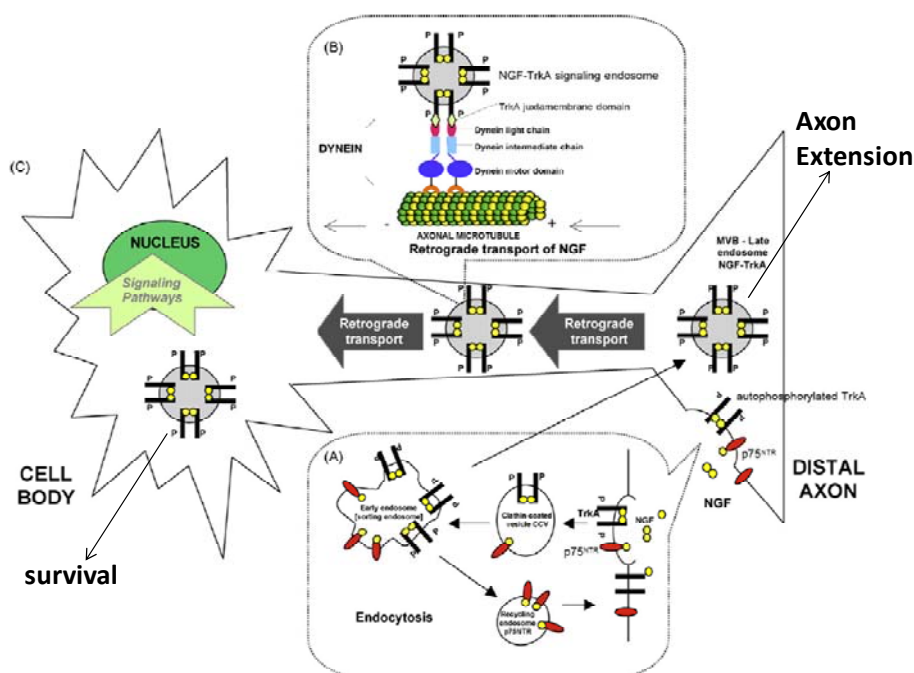
Αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο υποδοχέων του NGF.

Ο NGF στην ώριμη μορφή του σχηματίζει ομοδιμερή. Η δομή αυτή αλληλεπιδρά με ομοδιμερή του TrkA υποδοχέα ενεργοποιώντας τα προαναφερθέντα προ-επιβιωτικά μονοπάτια. Πρόσφατα, κρυσταλλογραφική απεικόνιση της σύνδεσης του p75^{NTR} με ένα διμερές NT3/4 (μια άλλη νευροτροφίνη) κατέδειξε ότι απαιτείται διμερισμός του υποδοχέα p75^{NTR} για την επιτυχή πρόσδεση και ενεργοποίησή του, ενώ βιοχημικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι με παρόμοιο τρόπο αλληλεπιδρά και ο NGF με στοιχειομετρία 2:2 για να ενεργοποιήσει τον υποδοχέα (63,64). Τα παραπάνω δεδομένα αντικρούουν τα

αποτελέσματα προηγούμενης κρυσταλλογραφικής απεικόνισης του $p75^{NTR}$ να αλληλεπιδρά ασύμμετρα σαν μονομερές με ένα διμερές NGF. Πιθανώς, το σύμπλοκο αυτό να αντιστοιχεί στην μη ενεργοποιημένη μορφή του υποδοχέα μιας και η συγκεκριμένη μελέτη αναφέρεται στη μη γλυκοσυλιωμένη μορφή (60). Όσον αφορά στην αλληλεπίδραση του υποδοχέα TrkA και $p75^{NTR}$, φαίνεται να αλληλεπιδρούν σε δομικό επίπεδο (65), και η παρουσία του $p75^{NTR}$ είναι απαραίτητη για τη δημιουργία θέσεων πρόσδεσης υψηλής συνάφειας για τον NGF στο μόριο του TrkA και την εμφάνιση των αντι-αποπτωτικών δράσεων (61). Απουσία του TrkA, ο $p75^{NTR}$ οδηγεί σε απόπτωση. Επίσης έχει βρεθεί ότι ο $p75^{NTR}$ μειώνει την ουβικουτίνιωση του TrkA υποδοχέα και συνεπώς το ρυθμό ενδοκύττωσης και αποδόμησής του (61), παρατείνοντας επομένως τον χρόνο δράσης του.

Ανάδρομη σηματοδότηση του NGF.

Για να επιτελέσει τις δράσεις του ο NGF ενδοκυτταρώνεται μαζί με τους υποδοχείς μέσω κυστιδίων καλλυμένων με κλαθρίνη και μεταφέρεται μέσα σε πρώιμα ενδοσωμάτια. ο $p75^{NTR}$ στη συνέχεια ανακυκλώνεται στη μεμβράνη μέσα σε κυστίδια μεταφοράς ενώ ο trkA στη φωσφορυλιωμένη του μορφή μεταφέρεται σε όψιμα ενδοσωμάτια τα οποία, με τη βοήθεια της δυνείνης και πάνω στο κυτταροσκελετό της ακτίνης, φτάνουν στο κυτταρικό σώμα όπου προσελκύουν και ενεργοποιούν μόρια όπως η πρωτεΐνη Shc, τα οποία εμπλέκονται στα σηματοδοτικά μονοπάτια της PI3K και ERK5 στο πυρήνα. Η μεταφορά του σήματος από τους απομακρυσμένους άξονες στο κυτταρικό σώμα φαίνεται να προάγει την επιβίωση του κυττάρου, όχι όμως, και την επιμήκυνση του άξονα (66,67).



ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΗΣ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ NGF ΣΤΗΝ ΑΝΑΓΓΕΝΙΣΗ ΤΩΝ ΝΕΥΡΑΞΟΝΩΝ.

Βαλεριανη εκφυλιση

Απαλοιφή ενός άξονα συμβαίνει σε μεγάλο βαθμό κατά τη περίοδο του προγραμματισμένου θανάτου στην αναπτυξιακή διαδικασία, οπότε και ανταγωνισμός μεταξύ νευρώνων για τον ίδιο στόχο έχει ως αποτέλεσμα την επικράτηση του ενός και την εκφύλιση των υπολοίπων, ώστε μόνο οι λειτουργικές συνδέσεις να παραμείνουν στο διαμορφωμένο ώριμο νευρικό σύστημα. Κατά την ενήλικη ζωή παρ' όλα αυτά εμφανίζεται απαλοιφή νευραξόνων σε ένα ευρύ φάσμα νευρολογικών παθήσεων όπως στην πλάγια αμυοτροφική σκλήρυνση, νωτιαία μυϊκή δυστροφία, σε νωτιαιοπαρεγκεφαλιδικές διαταραχές και λοιμώξεις όπως AIDS, αλλά και ως αποτέλεσμα τραύματος στο νευρικό ιστό. Οποιαδήποτε προέλευσης βλάβη που έχει σαν συνέπεια τη διακοπή του άξονα είτε στο ΠΝΣ είτε στο ΚΝΣ, καταλήγει στην ενεργοποίηση μιας διαδικασίας που είναι γνωστή από τον Βάλερ ως Βαλλεριανή εκφύλιση (Wallerian degeneration), ο οποίος την παρατήρησε για πρώτη φορά το 1860. Σε μια κατάσταση που προσομοιάζει τη βαλλεριανή εκφύλιση, τουλάχιστον σε μορφολογικό επίπεδο, επέρχονται οι νευρώνες και μετά από αποστέρηση από νευροτροφικούς παράγοντες. Αρχικά ο Campenot έδειξε ότι παρουσία NGF στο απομακρυσμένο άκρο του άξονα νευρώνων συμπαθητικών γαγγλίων σε καλλιέργεια είναι απαραίτητη για τη διατήρηση των αξόνων (89). Η βαλλεριανή εκφύλιση λοιπόν, ξεκινά από το πιο απομακρυσμένο σημείο από τη διατομή του άξονα σε διάστημα 24 – 36 ωρών (στο ΠΝΣ) και προοδευτικά προχωράει προς αυτό (ανάδρομη εκφύλιση). Μέχρι εκείνη τη στιγμή το κομμένο κομμάτι που έχει αποκοπεί από το σώμα διατηρεί την ικανότητα να διεγείρεται. Στα πολύ αρχικά στάδια (εντός 30 λεπτών) μετά από βλάβη, συμβαίνει ένα διαφορετικό είδος εκφύλισης που ονομάζεται οξεία αξονική εκφύλιση (Acute axonal degeneration) και έχει ως αποτέλεσμα τη ταυτόχρονη οπισθοχώρηση και των δύο άκρων αντιδιαμετρικά της βλάβης (90). Το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρείται μετά από χρήση αναστολέων της καλπαΐνης, μία πρωτεΐνης εξαρτώμενης από το Ca^{++} , τα ενδοκυττάρια ποσά του οποίου αυξάνονται μετά από διατομή του νευράξονα. Η εκφύλιση συνεχίζεται με διόγκωση της κυτταρικής μεμβράνης γύρω από τον άξονα και τη δημιουργία σφαιρικών άκρων. Ακολουθεί αποδιάταξη των στοιχείων του κυτταροσκελετού σε κοκκία, αρχικά με αποπολυμερισμό των μικροσωληνίσκων και αργότερα με αποδιάταξη των νευροϊνιδίων. Από τα πρώιμα στάδια επίσης, έχουμε συγκέντρωση των μιτοχονδρίων και των οργανιδίων του ενδοπλασματικού δικτύου στις παρακομβικές περιοχές στην περιοχή της βλάβης, ενώ έπειτα αυτά διογκώνονται και αποδομούνται με τρόπο που θυμίζει τον αποπτωτικό

κυτταρικό θάνατο καταδεικνύοντας πως και η διαδικασία της νευροεκφύλισης είναι μια ενεργητική διαδικασία στην εξέλιξη της οποίας λαμβάνουν μέρος το σύστημα αποδόμησης των πρωτεϊνών (ουβικουΐτινης – προτεασώματος) καθώς και οι καλπαΐνες.

Ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια της νευροεκφύλισης.

Τα ενδοκυττάρια μονοπάτια που συνδέθηκαν με το μηχανισμό της ανάκλησης του άξονα κατά τη διαδικασία της βαλλεριανής εκφύλισης είναι αυτά που έχουν να κάνουν με τη διατήρηση της ακεραιότητας του κυτταροσκελετού και της αξονικής μεταφοράς μέσω αυτού. Το πιο καλά μελετημένο μονοπάτι είναι αυτό της RhoA, μιας GTPάσης της οικογένειας των προτεΐνων RAS, η οποία ρυθμίζει τον κυτταροσκελετό της ακτίνης ενεργοποιώντας καθοδικά την κινάση ROCK. Η ενεργοποίηση του συγκεκριμένου μονοπατιού προκαλεί ανάκληση των δενδριτικών αποφυάδων τόσο σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων όσο και *in vivo*, ενώ επίσης φαίνεται να διαμεσολαβεί την εξαρτώμενη από μυελίνη αναστολή της νευρωνικής αναγέννησης (92). Παρόλο που όπως έχει αναφερθεί η εκφύλιση του νευράξονα που ακολουθεί μία βλάβη στον νευρικό είτε την αποστέρηση από νευροτροφικούς παράγοντες, είναι μία κυτταρικά προγραμματισμένη διαδικασία όπως αυτή της απόπτωσης, δεν φαίνεται να διαμεσολαβεί από ενεργοποίηση των κασπασών, πρωτεϊνών που φέρουν λύση του κυττάρου κατά τον αποπτωτικό θάνατο (93), ούτε αναστέλλεται από την υπερέκφραση αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών όπως η BCL .

Ο ρόλος της κυττάρων της μυελίνης.

Ο ρυθμός με τον οποίο εκπίπτουν σε βαλλεριανή εκφύλιση οι νευρώνες στο περιφερικό νευρικό σύστημα και στο κεντρικό διαφέρει σημαντικά. Η διαφορά αυτή φαίνεται να οφείλεται κυρίως στην ικανότητα των κυττάρων Schwann να απομακρύνουν πολύ γρήγορα και αποτελεσματικά τα θραύσματα μυελίνης σε σχέση με τα ολιγοδενδροκύτταρα που έχουν περιορισμένη δυνατότητα.

Αυτό λοιπόν που ακολουθεί την εκφύλιση του άξονα κατά τη διαδικασία της βαλλεριανής εκφύλισης είναι μία ραγδαία αύξηση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων Schwann, τα οποία έχουν την ικανότητα να αντιλαμβάνονται τη βλάβη στο νευρικό ιστό με ένα μηχανισμό που δεν είναι ακόμα πλήρως αποσαφηνισμένος. Αρχικά αυτά φαίνεται να ενεργοποιούνται από εκκρινόμενες *neuregulins* μέσω του υποδοχέα τους ErbB2 πάνω στα Schwann κύτταρα ενεργοποιώντας παραπέρα την MAPK κινάση. Τα κύτταρα Schwann της

περιοχής σταματούν να εκφράζουν μυελίνη μέσα στις πρώτες 12 ώρες μετά από διατομή του νευράξονα ενώ καταστρέφουν την ήδη υπάρχουσα και καθαρίζουν τα θραύσματα του ιστού μέσω φαγοκυττάρωσης, ενώ παραπέρα εκκρίνουν χυμοκίνες (LIF – leukemia inhibitor factor) και κυτοκίνες (TNF α) διεγείροντας τη μετανάστευσή μακροφάγων στη περιοχή για να βοηθήσουν στην απομάκρυνση της μυελίνης, παρόλο που η διαδικασία αυτή καθυστερεί τρεις με τέσσερις μέρες. Ο προσβεβλημένος άξονας επίσης εκκρίνει χυμοτακτικούς παράγοντες των μακροφάγων της περιφέρειας. Για τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης των κυτταρικών υπολειμμάτων στα τελευταία στάδια της εκκαθάρισης της μυελίνης απαιτείται αρχικά οψονινωποίηση των θραυσμάτων, μια διαδικασία στην οποία φαίνεται να εμπλέκονται πρωτεΐνες του συμπληρώματος (C3) ενεργοποιώντας μετέπειτα τους υποδοχείς C3R στην επιφάνεια των μακροφάγων. Η αυξημένη διαπερατότητα του αιματο-νευρικού φραγμού στο ΠΝΣ, σε σχέση με αυτή του αιματεγκεφαλικού φραγμού, από στοιχεία του ορού του αίματος διευκολύνει τη διήθηση των οψονινών της περιφέρειας και δικαιολογεί τους γρήγορους ρυθμούς βαλεριανής εκφύλισης στη περιφέρεια.

Νευραξονική αναγέννηση

Όπως αναλύθηκε παραπάνω κατόπιν προσβολής του άξονα από κάποιο τοξικό παράγοντα ή μηχανική διατομή αυτού, ακολουθεί βαλεριανή εκφύλιση στο αποκομμένο από το σώμα κομμάτι του άξονα. Το κομμάτι που παραμένει συνδεδεμένο με το σώμα στη συνέχεια μπορεί να ακολουθήσει δύο δρόμους: είτε θα συνεχίσει να εκφυλίζεται οπισθοχωρώντας προς τα πίσω (dying back mode) είτε θα προσπαθήσει να ενωθεί πάλι με το στόχο του μέσω νευραξονικής αναγέννησης. Στον άνθρωπο και άλλα θηλαστικά οι περιφερικοί νευρώνες έχουν μερική αναγεννητική ικανότητα μετά από τραύμα ενώ δε συμβαίνει το ίδιο στο ΚΝΣ. Απαραίτητη προϋπόθεση για αναγέννηση του άξονα είναι να υπάρχει υποστηρικτικό περιβάλλον για την ανάπτυξή του καθώς και οι κατάλληλοι εσωτερικοί παράγοντες στο νευρώνα.

Ο ρόλος του NGF

Ενώ ο NGF ασθενώς μόνο εκφράζεται στα ώριμα νευρικά κύτταρα της περιφέρειας, μετά από διατομή του νευράξονα παρατηρείται ραγδαία αύξηση της έκφρασής του στα κύτταρα Schwann αλλά και στους ινοβλάστες, έως και 7 φορές μέσα σε διάστημα δύο εβδομάδων. Τα μακροφάγα που έλκονται επίσης στη περιοχή, αν και εκκρίνουν NGF σε μικρά ποσά φαίνεται να διεγείρουν τη παραγωγή NGF από τα κύτταρα Schwann μέσω έκκρισης IL – 1

(95). Πολλοί ακόμα νευροτροφικοί παράγοντες απελευθερώνονται από τα παραπάνω κύτταρα στο αποκομμένο άκρο του άξονα όπως BDNF, GDNF, CNTF, LIF, IGF, FGF και osteonectin, δημιουργώντας τις κατάλληλες συνθήκες για ανάπτυξη του νευρώνα. Σημαντικές αλλαγές στην έκφραση γονιδίων στα κύτταρα Schwann, από την άλλη μεριά, προκαλούν ταχεία αύξηση στην έκφραση του υποδοχέα p75^{NTR} σε αυτά. Ενεργοποίηση του p75^{NTR} από τον NGF έχει σχετισθεί με αυξημένη μετανάστευση κυττάρων Schwann μετά από τραύμα (96). Τα κύτταρα αυτά προάγουν την μυελίνωση, διασφαλίζοντας επίσης την καθοδήγηση του νεοσχηματιζόμενου άξονα με το να δημιουργούν ένα υπόστρωμα για την ανάπτυξή του. Μετά από πολλαπλασιασμό τους σχηματίζουν τη λεγόμενη “band of burger” πάνω στη βασική μεμβράνη και εκκρίνουν λαμινίνη, ένα συστατικό της εξωκυττάριας ουσίας που βοηθά στην προσκόλληση του άξονα με τα στοιχεία της βασικής μεμβράνης. Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι ο p75^{NTR} αλληλεπιδρά με την RhoA ρυθμίζοντας τη δομική σταθερότητα του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Παρουσία προσδέτη ο p75^{NTR} μειώνει την ενεργοποίηση της RhoA και επιτρέπει την επιμήκυνση του άξονα (96). Αντίστοιχα, η έκφραση του TrkA και p75^{NTR} μειώνεται στους αισθητικούς νευρώνες μετά από τραύμα και επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα μετά από αναγέννηση. Παρ’ όλα αυτά, η έκφραση του TrkA αυξάνεται στον εκφυτικό κώνο αισθητικών νευρώνων των DRGs σε πρόσφατη έρευνα, που έδειξε ότι ο NGF είναι ικανός να οδηγήσει τον αναπτυσσόμενο νευράξονα μέσω αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα του. Ίσως και σε αυτή τη περίπτωση ο NGF δρα αναστέλλοντας τη δράση της Rho GTPase.

Γνωρίζουμε πως η DHEA συνδέεται με τους υποδοχείς του NGF ενεργοποιώντας κάποια τουλάχιστον από τα ενδοκυττάρια μονοπάτια του. Έχοντας κατά νού τις πλειοτροφικές δράσεις του NGF στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος καθώς και τη διατήρησή του καθώς και στην αναγέννησή του μετά από τραύμα, θα θέλαμε να αποσαφηνίσουμε περετέρω αν είναι δυνατόν η DHEA να μιμηθεί και τις άλλες δράσεις του NGF εκτός της αντιαποπτωτικής χρησιμοποιώντας ως σύστημα νευρώνες του ΠΝΣ, όπως τους αισθητικούς νευρώνες της ραχιαίας ρίζας, που εξαρτούν την επιβίωσή τους από τον NGF κατά την εμβρυική περίοδο. Επίσης, θα μελετηθεί ο μοριακός μηχανισμός μέσω του οποίου η DHEA επιτελεί τις δράσεις αυτές.

Ανατομική εντόπιση των αισθητικών νευρώνων.

Οι αισθητικοί νευρώνες που μεταφέρουν τη πληροφορία από το δέρμα, τους μύες και τις αρθρώσεις του κορμού και των άκρων είναι συγκεντρωμένοι σε γάγγλια (Dorsal root ganglia, DRGs) που βρίσκονται μέσα στη σπονδυλική στήλη ακριβώς δίπλα στο μυελό των οστών. Τα ερεθίσματα που μεταφέρονται με αυτό τον τρόπο έχουν να κάνουν με την αίσθηση της αφής, του πόνου, της θέσης των άκρων και τη θερμοκρασία. Οι νευρώνες αυτοί είναι ψευδομονόπολα κύτταρα με ένα διακλαδισμένο άξονα που περιλαμβάνει ένα κεντρικό μέρος και περιφερικές διακλαδώσεις οι οποίες καταλήγουν στο δέρμα, τους μύες και άλλους ιστούς ως ελεύθερα άκρα. Το κεντρικό κομμάτι του άξονα εισέρχεται στον νωτιαίο μυελό από τη περιοχή της οπίσθιας ρίζας. Αφού εισέλθει της σπονδυλικής στήλης, η κεντρική αποφυάδα διακλαδίζεται και σε περιφερικές που είτε καταλήγουν στη φαιά ουσία είτε φτάνουν μέχρι το σημείο διασταύρωσης του νωτιαίου μυελού με τον προμήκη. Οι τοπικές διακλαδώσεις ενεργοποιούν τα νωτιαία ανακλαστικά συνδεδεμένες απ' ευθείας με τους κινητικούς νευρώνες, ενώ οι ανιούσες μεταφέρουν τα αισθητικά σήματα στον εγκέφαλο για περαιτέρω επεξεργασία (Kandel E. 2004) .

Υπότυποι αισθητικών νευρώνων των γαγγλίων της ραχιαίας ρίζας.

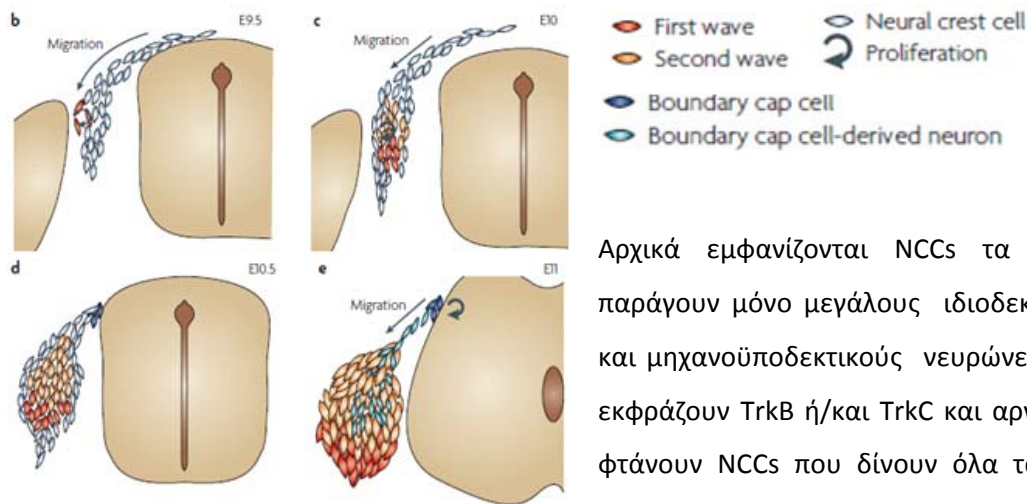
Όσον αφορά στη μορφολογία τους, τα νευρικά κύτταρα των αισθητικών γαγγλίων εμπίπτουν σε δύο κατηγορίες. Στο γενικό πληθυσμό εντοπίζονται μεγάλοι νευρώνες με μεγάλης διαμέτρου εμμέλους άξονες που φτάνουν ως το πυρήνα της ραχιαίας στήλης στο εγκεφαλικό στέλεχος και μεταφέρουν την αίσθηση της αφής, όπως επίσης και πληροφορίες για τη θέση του σώματος, και μικροί νευρώνες με μικρής διαμέτρου αμύελους άξονες που καταλήγουν στο ραχιαίο κέρασ και μεταφέρουν την αίσθηση του πόνου. Τα δύο είδη νευρώνων παρουσιάζουν επίσης διαφορετική έκφραση υποδοχέων (valinoid και G-protein coupled receptors), καναλιών ιόντων, νευροπεπτιδίων (substance P, CGRP – calcitonin gene related protein) καθώς και στοιχείων του κυτταροσκελετού.

Οι μικροί και μεγάλοι νευρώνες διαφέρουν κυρίως μεταξύ τους στην έκφραση υποδοχέων των νευροτροφινών. Στους νευρώνες μικρής διαμέτρου εντοπίζεται mRNA για τον TrkA, όπου επίσης εκφράζεται το νευροπεπτίδιο CGRP (σε 92% των νευρώνων) δίνοντάς στα κύτταρα αυτά ταυτότητα μεταφορέων του πόνου. Αντίστοιχα, μεγάλα κύτταρα εκφράζουν TrkC και συμβάλλουν στην αντίληψη της θέσης του σώματος. Επίσης, η πλειοψηφία των Trk θετικών DRG νευρώνων που νευρώνουν το δέρμα εκφράζουν TrkA, ενώ το μεγαλύτερο

μέρος των νευρώνων του μυός εκφράζει TrkC. Η έκφραση του TrkB περιορίζεται σε μια μικρή αναλογία DRG νευρώνων του δερματικού σαφηνούς νεύρου και στο σύνολο σχεδόν αυτών που προβάλλουν στο σπλαγχνικό πυελικό νεύρο. Ένα υψηλό ποσοστό των τελευταίων συνεκφράζουν TrkA, γεγονός που δείχνει ότι οι Trk υποδοχείς μπορούν να συνεδράζονται σε επιλεγμένους υποπληθισμούς νευρώνων των DRGs (75). Συγκεκριμένα στο ενήλικο τρωκτικό ένα 40% των νευρώνων εκφράζει TrkA και όπως είπαμε είναι μικρού μεγέθους νευρώνες ενώ ένα 20%, μεγαλύτερου σε μέγεθος νευρώνων, περιλαμβάνει τους TrkB και TrkC θετικούς νευρώνες που αποκρίνονται στις νευροτροφίνες BDNF και NT3, αντίστοιχα. Όπως διαπιστώνεται δεν εκφράζει όλο το σύνολο των νευρώνων των ραχιαίων γάγγλια κάποιον από τους υποδοχείς νευροτροφινών, αφού ένα μέρος αυτών μειώνει την έκφραση του TrkA και αυξάνει αυτή του Ret, ένα συνυποδοχέα του GDNF (Glia Derived Neurotrophic Factor) κατά τη 2η και 3η εβδομάδα μετά τη γέννηση (76).

Προέλευση αισθητικών νευρώνων και καθορισμός φαινοτύπου.

Κατά τη περίοδο της εμβρυϊκής ανάπτυξης και πριν το σχηματισμό του νωτιαίου μυελού, πολυδύναμα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας (NCC – neural crest cells) που βρίσκονται στο ραχιαίο κομμάτι του νευρικού σωλήνα μεταναστεύουν κοιλιακά ανάμεσα στους σωμαίτες και τον νευρικό σωλήνα έως ότου συγκεντρωθούν πλευρικά αυτού, προς σχηματισμό διακριτών γαγγλίων. Επίσης, από τα προγονικά αυτά κύτταρα προέρχονται και οι συμπαθητικοί νευρώνες αλλά και τα κύτταρα της γλοίας των DRGs. Η διαφοροποίηση των κυττάρων του νευρικού σωλήνα εξαρτάται από την αλληλεπίδραση σημάτων από το ραχιαίο κομμάτι αυτού (Wnt) και μορφογόνων που προέρχονται από την κοιλιακή περιοχή του νευρικού σωλήνα (Bone Morphogenetic Proteins, BMPs). Υπό την επίδραση αυτών των σημάτων γίνεται αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και μείωση της έκφρασης των N-cadherin και cadherin-6 που επηρεάζουν τις προσκολλητικές ιδιότητες των κυττάρων και επιτρέπουν την μετακίνησή τους. Η μετανάστευση των πρώιμων νευρικών κυττάρων γίνεται σε τρία διαδοχικά στάδια, το καθένα από τα οποία περιλαμβάνει κύτταρα με διαφορετική αναγεννητική ικανότητα και προκαθορισμένη μοίρα.



Marmigère and Ernfors et al. 2007

Αρχικά εμφανίζονται NCCs τα οποία παράγουν μόνο μεγάλους ιδιοδεκτικούς και μηχανοϋποδεκτικούς νευρώνες που εκφράζουν TrkB ή/και TrkC και αργότερα φτάνουν NCCs που δίνουν όλα τα είδη νευρώνων των DRGs.

Όπως προαναφέρθηκε, από τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας προέρχονται όχι μόνο οι αισθητικοί αλλά και συμπαθητικοί νευρώνες και τα κύτταρα της γλοίας. Η θέση στην οποία θα βρεθούν τα πολυδύναμα αυτά κύτταρα τα οποία εκφράζουν SOX10 καθώς και ο βαθμός πρόσβασης σε σήματα Wnt και BMPs, θα καθορίσει τον φαινότυπο τους. Ενεργοποίηση του μονοπατιού της β-catenin μέσω Wnt οδηγεί σε αύξηση έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων όπως οι neurogenins (NGN). Παρουσία NGN2 ή NGN1 τα κύτταρα υπόκεινται σε διαφοροποίηση προς αισθητικούς νευρώνες. Όταν τελειώσει η μετανάστευσή των NCC αυτά εκφράζουν Brn3a, έναν μεταγραφικό παράγοντα που αρχίζει να εκφράζεται σε όλους τους αισθητικούς νευρώνες από τα αρχικά στάδια της διαφοροποίησής τους και παραμένει καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Αυτός ευθύνεται ως ένα βαθμό για την έκφραση των υποδοχέων των νευροτροφινών αλλά και για την επιμήκυνση του άξονα και την εννεύρωση των οργάνων. Στα τελικά στάδια της διαφοροποίησης, ανάλογα με το βαθμό έκφρασης των Runx1 ή Runx3 έχουμε έκφραση των TrkA ή TrkC, αντίστοιχα.

Ο ρολος των νευροτροφινών

Οι νευροτροφίνες όπως έχει αναφερθεί συντηρούν την επιβίωση των νευρικών κυττάρων. Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης τα προγονικά νευρικά κύτταρα της περιοχής του νευρικού σωλήνα πολλαπλασιάζονται πριν δώσουν ώριμα διαφοροποιημένα κύτταρα. Από τα κύτταρα που χάνουν πλέον την ικανότητα πολλαπλασιασμού (post mitotic) ένας μεγάλος αριθμός πεθαίνει με προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Η διαδικασία αυτή ρυθμίζεται από σήματα που προέρχονται από το όργανο στόχο και καθορίζουν τον απαραίτητο πληθυσμό νευρώνων που απαιτούνται καθώς και το λειτουργικό τους χαρακτήρα. Κατά τη διάρκεια αυτής της κρίσιμης περιόδου διαφορετικοί υποπληθυσμοί

νευρώνων των DRGs αποκρίνονται διαφορετικά στα διάφορα μέλη της οικογένειας των νευροτροφινών. Προσαγωγές ίνες του πόνου και της θερμοκρασίας απαιτούν NGF για την επιβίωσή τους ενώ ιδιοδεκτικοί υποδοχείς απαιτούν NT3. Οι υποδοχείς αυτών, TrkA, TrkC καθώς και ο υποδοχέας όλων των νευροτροφινών $p75^{NTR}$ εκφράζονται από πολύ νωρίς στη ζωή των νευρικών κυττάρων ελέγχοντας την επιβίωσή τους (78). Ποντίκια στα οποία έχει γίνει απαλοιφή των γονιδίων που κωδικοποιούν τους TrkA και TrkC υποδοχείς, παρουσιάζουν απώλεια αισθητικών (~80%) και συμπαθητικών νευρώνων και εμφανίζουν σοβαρές νευρολογικές ανωμαλίες. Παρ' αυτά έχει διαπιστωθεί ένας επιπρόσθετος ρόλος των νευροτροφινών στην επιμήκυνση του νευράξονα (77) και στο καθορισμό του φαινοτύπου των κυττάρων καθώς αυτά διαφοροποιούνται. Ταυτόχρονη απενεργοποίηση των υποδοχέων των νευροτροφινών και του προ-αποπτωτικού γονιδίου *bax* βοήθησε στη μελέτη της δράσης των νευροτροφινών στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των συγκεκριμένων υποτύπων νευρώνων ανεξάρτητα από την δράση που αφορά στην επιβίωσή τους (70 – 74). Στις έρευνες αυτές διαπιστώθηκε ότι η παρουσία NGF κατά τα πρώτα στάδια την ανάπτυξης του νευρικού ιστού είναι απαραίτητη για την απόκτηση πεπτιδεργικού φαινότυπου (έκφραση CGRP και substance) στους TrkA καθώς και για την σωστή νεύρωση των περιφερικών ιστών από τους βλαβούποδοχείς.

Μετά από αναπτυξιακές μελέτες βρέθηκε ότι ο πρώτος Trk υποδοχέας που εκφράζεται στα νεοσχηματισμένα γάγγλια των αισθητικών νευρώνων είναι ο TrkC μετά τη δεύτερη εμβρυϊκή μέρα (E2.5) σε τρωκτικά. Ανάμεσα στη 3η και 5η εμβρυϊκή μέρα έχουμε μια ραγδαία μεταβολή στην έκφραση του TrkA (εως 30% την E4.5), ο οποίος δεν είναι ανιχνεύσιμος μέχρι τότε. Ωστόσο, κανένα προγονικό νευρικό κύτταρο προερχόμενο από τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας δεν είναι TrkA θετικό, ενώ όλα τα προγονικά κύτταρα της περιοχής εκφράζουν $p75^{NTR}$, ενώ ένα 20% εκφράζει TrkC. Τελικά, μετά την E6 έχει γίνει χωρική διαφοροποίηση των αισθητικών νευρώνων, αρχίζει η προβολή των αξόνων προς τα σημεία νεύρωσης και η πλειοψηφία αυτών εκφράζει πλέον μόνο έναν από τους υποδοχείς της οικογένειας κινάσης της τυροσίνης (79). Κατά τα τελευταία στάδια του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και αφού οι περισσότεροι άξονες των αισθητικών νευρώνων έχουν φτάσει το στόχο τους στη περιφέρεια, ένα μεγάλο μέρος των κυττάρων των αισθητικών γαγγλίων έχει παύσει να εξαρτά την επιβίωσή του από την παρουσία NT3 ενώ αρχίζει να εξαρτάται πλέον από NGF. Το γεγονός αυτό που συμβαίνει ανάμεσα στην εμβρυϊκή μέρα 11 και 13 συμβαδίζει με αλλαγή στην έκφραση των υποδοχέων από TrkC σε TrkA στα περισσότερα κύτταρα. Έτσι δικαιολογείται επίσης η μεγάλη απώλεια νευρώνων σε ποσοστό περίπου 80% των αισθητικών γαγγλίων στα *ngf* -/-

και *trkA*^{-/-} ζώα. Όταν χορηγήθηκε DHEA σε ετερόζυγη μητέρα για το εξουδετερωμένο γονίδιο του NGF η οποία διασταυρώθηκε με επίσης ετερόζυγο αρσενικό, η DHEA ανέστειλε μερικώς την απώλεια αισθητικών νευρώνων που εισέρχονται στο πρόσθιο κέρασ του νωτιαίου μυελού κατά την 14η εμβρυϊκή μέρα, αναπληρώνοντας την έλλειψη NGF (Izardidis et al. 2010). Ένα μέρος αυτών των νευρώνων σε ποσοστό περίπου 20% αποκρίνεται ακόμα σε NT3 στον ενήλικο οργανισμό. Μία δεύτερη μεταβολή στην έκφραση των υποδοχέων συμβαίνει, όπως προαναφέρθηκε τις πρώτες εβδομάδες μετά τη γέννηση (έως P21), οπότε και έχουμε μείωση στην ρύθμιση του TrkA και αύξηση του υποδοχέα Ret στο μισό περίπου πληθυσμό των ώριμων πλέον αλγοδεκτικών κυττάρων. Τα κύτταρα που εκφράζουν Ret αντιστοιχούν στο μη πεπτιδεργικό τύπο βλαβοϋποδοχέων που αντίθετα με αυτούς που εκφράζουν TrkA στην ενήλικη ζωή, δεν εκφράζουν CGRP και Substance P, ενώ είναι υπεύθυνοι για την αντίληψη του φλεγμονώδη πόνου και όχι του νευροπαθητικού. Η αλλαγή του φαινοτύπου των κυττάρων, από TrkA θετικούς σε Ret θετικούς σε ένα υποπληθυσμό κυττάρων των αισθητικών γαγγλίων φαίνεται να ελέγχεται ως ένα μεγάλο βαθμό σε σήματα από την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Runx1 οποίος με τη σειρά του υπόκειται σε έλεγχο από τον NGF τουλάχιστον κατά το διάστημα όπου εκφράζεται ακόμα ο TrkA (80,81).

Όπως προαναφέρθηκε ο υποδοχέας όλων των νευροτροφινών εκφράζεται καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης από τα προγονικά νευρικά κύτταρα των αισθητικών νευρώνων έως και τους ώριμους αλγοδεκτικούς νευρώνες των αισθητικών γαγγλίων που εκφράζουν CGRP. Ο p75^{NTR} επίσης κατέχει σημαντικό ρόλο στην σωστή εννεύρωση των περιφερικών ιστών αλλά και στην ανάπτυξη των κεντρικών αξόνων που προβάλλουν στις στιβάδες I και II του ραχιαίου κέρατος του νωτιαίου μυελού (85,86,87). Στη τελευταία μελέτη δείχθηκε ότι παρόλο που ο αριθμός των νευρώνων στα αισθητικά γάγγλια είναι σημαντικά μειωμένος σε ποντίκια που φέρουν μια μη λειτουργική μορφή του υποδοχέα, η πυκνότητα των νευρώνων που εισέρχονται στο ραχιαίο κέρασ δε διαφέρει συγκριτικά με αυτή στα αγρίου τύπου ζώα. Πιθανότατα άλλοι μηχανισμοί είναι υπεύθυνοι για την επιμήκυνση του κεντρικού άξονα και δρουν αντιροπιστικά στην απώλεια νευρώνων στη περιοχή.

Αντίθετα με τα συμπαθητικά γάγγλια τα οποία εξαρτούν την επιβίωσή τους από τον NGF καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους τα TrkA + αισθητικά νεύρα σταματούν να αποκρίνονται στον NGF μόνο κατά τη πρώτη μεταγεννητική περίοδο παρόλο που παρατηρείται μεταφορά NGF από τις τελικές απολήξεις στο σώμα μέσω ανάδρομης μεταφοράς (75, 83). Σε *in vitro* καλλιέργεια οι νευρώνες φαίνεται να χάνουν την ευαισθησία τους σε NGF, όσον

αφορά στην επιβίωσή τους, μετά την ημέρα P5 ανεξάρτητα από το χρονικό διάστημα που κρατήθηκαν σε καλλιέργεια (82). Η αντίσταση που επιδεικνύουν αυτοί οι νευρώνες σε αποστέρηση από NGF πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι οι ώριμοι νευρώνες χάνουν την ικανότητα επαγωγής της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα cFOS και την επακόλουθη ενεργοποίηση του αποπτωτικού μονοπατιού που περιλαμβάνει το cFOS και την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη BAX. Παρόλο όμως, που δεν εμφανίζεται μείωση του αριθμού των αισθητικών νευρώνων ελλείψει σηματοδότησης από NGF σε *in vivo* και *in vitro* πειράματα, αυτός φαίνεται να είναι απαραίτητος για τη διατήρηση της μορφολογικής και βιοχημικής ταυτότητας του κυττάρου μιας και μετά από αποστέρηση από τον NGF ακολουθεί μείωση της ποσότητας της ουσίας P και του πεπτιδίου CGRP στα DRG's, καθώς και μια γενικότερη ατροφία των αισθητικών νευρώνων η οποία χαρακτηρίζεται από μείωση του μεγέθους του σώματος (84). Τέλος, μετά από αποστέρηση του NGF επάγεται η έκφραση δύο νευροπεπτιδίων (*vasoactive intestinal peptide and galanin*) τα οποία έχουν συνδεθεί με αύξηση επιβίωσης των περιφερικών νευρώνων και επιμήκυνση του άξονα (91). Οι βιοχημικές αυτές αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των νευροπεπτιδίων προσομοιάζουν αυτές που ακολουθούν σε περιπτώσεις βλάβης του άξονα. Το γεγονός επίσης της σημαντικής έκφρασης NGF από τα κύτταρα της γλοίας όπως επίσης και από μη νευρικά κύτταρα όπως αυτά του ανοσοποιητικού, υποστηρίζει τη θεωρία ο ρόλος του NGF στον ενήλικο οργανισμό είναι πλειοτροπικός: ρυθμίζει σύνθετες αποκρίσεις σε καταστάσεις φλεγμονής και τραύματος του κεντρικού νευρικού συστήματος εκτός του ότι συμβάλει στην επιβίωση/διαφοροποίηση των νευρώνων. Τέλος, ο NGF ρυθμίζει τη πλαστικότητα του περιφερικού και κεντρικού νευρικού συστήματος μέσω της ρύθμισης γονιδίων ελέγχοντας τελικά την διακλάδωση των νευριτών στον ενήλικο οργανισμό. Παρατεταμένη χορήγηση αντισωμάτων έναντι του NGF εξουδετερώνουν τη δράση του, μειώνοντας το μήκος των διακλαδώσεων στους ήδη υπάρχοντες δενδρίτες κι επιφέροντας μικρή μείωση του συνολικού αριθμού νευρώνων και του μεγέθους του σώματος στα αισθητικά γάγγλια νεαρών και γηρασμένων ποντικών (88).

Άλλα μόρια που συμβάλουν στην ανάπτυξη των αισθητικών νευρώνων.

Αν και η δράση του NGF ως μορίου καθοδήγησης των αναπτυσσόμενων νευραξόνων τόσο κατά την εμβρυϊκή περίοδο όσο και μετά από τραύμα (118,119) έχει επισημανθεί πολλές φορές, υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν πως σηματοδότηση μέσω TrkA δεν είναι απαραίτητη για να καθοδηγήσει τους άξονες στο στόχο τους. Όταν έγινε απαλοιφή του προ-αποπτωτικού γονιδίου *bax* καθώς και αυτού που κωδικοποιεί τον TrkA υποδοχέα, οι

αισθητικοί νευρώνες των DRGs επέζησαν και έφτασαν στο στόχο τους, στη φαιά ουσία του νωτιαίου μυελού, υπακούοντας προφανώς σε άλλα καθοδηγητικά σήματα του περιβάλλοντος. Εξ' άλλου ήδη ήταν γνωστό ότι το Slit2-N, ένα αμινοτελικό θραύσμα του Slit, προάγει τη επιμήκυνση του άξονα και αυξάνει τον αριθμό των διακλαδώσεων στις κεντρικές προβολές των αισθητικών νευρώνων, αντίθετα μάλιστα με την ολοκληρωμένη μορφή του Slit (120). Η κύρια δράση του Slit είναι να δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξη των διακλαδώσεων μέσω υποδοχέων ROBO στους αναπτυσσόμενους νευρίτες. Οι Slit1, Slit2 πρωτεΐνες εκφράζονται στον ραχιαίο τμήμα του νωτιαίου μυελού τις μέρες E14 και E17 ενώ από τη μέρα E27 εκφράζονται και από τα ίδια τα DRGs γεγονός που υποδηλώνει ότι ίσως δρουν με έναν αυτοκρινικό ή παρακρινικό τρόπο.

Οι νετρίνες είναι μία κατηγορία μορίων που κατέχουν σημαντικό ρόλο στη καθοδήγηση των αξόνων στη μετανάστευση αυτών και τη μορφογένεση. Κατά την E11 όπου τα DRG φτάνουν στο σημείο εισόδου τους στον νωτιαίο μυελό (DREZ – dorsal root entry zone) η έκφραση της Netrin 1 αυξάνεται στη περιοχή του κοιλιακού χώρου (Floor Plate) του εμβρύου που βρίσκεται κοιλιακά στη σπονδυλική στήλη, και δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξη των νευραξόνων στη περιοχή αυτή. Επίσης, εκφράζεται κατά μήκος της σπονδυλικής στήλης ραχαιοπλευρικά εμποδίζοντας την ανάπτυξη πλάγιων συνδέσεων στο ραχιαίο τμήμα του νωτιαίου μυελού κατά τη περίοδο αναμονής. Έτσι, η Netrin 1 μέσω υποδοχέων της πάνω στους αναπτυσσόμενους νευρώνες (Unc5c) δρα απωθητικά σε αυτούς καθορίζοντας χωροχρονικά την ανάπτυξη των αισθητικών νευρώνων και την εννεύρωση των στόχων τους. Ένα άλλο μόριο με παρόμοια λειτουργία είναι η Semaphorin3 (Sema3) της οικογένειας των Semaphorines, η οποία δρα χυμο-απωθητικά στους νευρώνες των DRGs, εκκρινόμενη από το κοιλιακό τμήμα του νωτιαίου μυελού κατά την ανάπτυξη. Τα ίδια μόρια δρουν ανασταλτικά στην αναγέννηση των νευραξόνων και αναστολείς αυτών έχουν χρησιμοποιηθεί πειραματικά για τη θεραπεία τραύματος στο ΚΝΣ (121).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ήδη έχει διαπιστωθεί σε πρόσφατη δουλειά του εργαστηρίου η ικανότητα της DHEA να προστατεύει από απόπτωση συμπαθητικούς νευρώνες των ανώτερων αυχενικών γαγγλίων μέσω πρόσδεσης με τους υποδοχείς TrkA και p75^{NTR} αντισταθμίζοντας την έλλειψη NGF. Ο τελευταίος δρά ως τροφικός παράγοντας για τους νευρώνες, εκκρινόμενος από το όργανο στόχο, προάγοντας την επιβίωσή τους και την επιμήκυνση των νευραξόνων τους στο σωστό σημείο κατά την ανάπτυξη, ενώ στην ενήλικη ζωή έχει ρόλο στη σωστή λειτουργία των νευρώνων καθώς και στη διατήρηση των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών και των συνάψεων τους. Απουσία αυτού λοιπόν ενεργοποιείται ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος στους εξαρτώμενους από αυτόν νευρώνες και μία παράλληλη διαδικασία ανάκλησης του άξονα που προσομοιάζει αυτή που συμβαίνει μετά από τραυματισμό και διακοπή της συνέχειας του. Οι καταστάσεις αυτές φαίνεται να οφείλονται σε ελλατωματική ανάδρομη σηματοδότηση από τα περιφερικά σημεία του νευράξονα προς το κυτταρικό σώμα. Ο NGF, αφού συνδεθεί με το διαμεμβρανικό υποδοχέα TrkA σε ένα απομακρυσμένο σημείο του άξονα ενδοκυτταρώνεται και είτε δρα τοπικά, είτε μεταφέρεται ανάδρομα μέσα σε κυστίδια στο κυτταρικό σώμα για να ενεργοποιήσει άλλα ενδοκυττάρια μονοπάτια κοντά στο πυρήνα. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η τοπική ενεργοποίηση του μονοπατιού των PI3K και MEK κινασών τοπικά στον εκφυτικό κώνο, ευθύνεται για την επιμήκυνση του άξονα, ενώ η ενεργοποίηση των ίδιων μονοπατιών στο πυρήνα προάγει την επιβίωση του νευρώνα (98).

Αντίθετα με τους συμπαθητικούς νευρώνες που εξαρτούν την επιβίωση τους εξ ολοκλήρου από NGF, τα γάγγλια της ραχιαίας ρίζας του νωτιαίου μυελού, περιέχουν διαφορετικούς υποπληθυσμούς νευρώνων όσον αφορά στη λειτουργία τους και τους υποδοχείς που εκφράζουν. Ένα μεγάλο ποσοστό (40-50%) εκφράζουν TrkA και είναι υπεύθυνοι για την μεταφορά της αίσθησης του πόνου. Η DHEA μείωσε την προκαλούμενη απόπτωση απουσία ενδογενούς NGF σε E14 *ngf* ^{-/-} είτε *ngf* ^{+/-} ποντικούς σε TrkA θετικούς νευρώνες και την πυκνότητα των ινών τους στη περιοχή εισόδου τους στον νωτιαίο μυελό.

Για να εξακριβώσουμε αν η DHEA ασκεί νευροπροστατευτική δράση στα αισθητικούς νευρώνες όπως και στους αισθητικούς μέσω των υποδοχέων του NGF, καλλιεργήθηκαν αισθητικοί νευρώνες από αποδιατεταγμένα έκφυτα γαγγλίων της ραχιαίας ρίζας και μετρήθηκαν τα ποσοστά απόπτωσης νευρώνων στη καλλιέργεια μετά από αποστέρηση NGF παρουσία της DHEA και μετά από αναστολή των δύο υποδοχέων του.

Εφόσον, η DHEA συνδέεται με μεγάλη συνάφεια και ενεργοποιεί τους υποδοχείς του NGF, θέλαμε να αποσαφηνίσουμε εάν αυτή έχει και την ιδιότητα να προάγει, την επιμήκυνση των νευραξόνων και να συνεισφέρει στη διατήρησή τους σε συνθήκες αποστέρησης από νευροτροφικό παράγοντα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οργανοτυπικές καλλιέργειες εκφύτων ανώτερων αυχενικών και ραχιαίων γαγγλίων. Στα πειράματα αυτά ολόκληρα συμπαθητικά γάγγλια καλλιεργήθηκαν μαζί με μη-νευρικά υποστηρικτικά κύτταρα καλλιεργήθηκαν απ' αυθείας παρουσία του NGF είτε της DHEA και αξιολογήθηκε η ικανότητα της τελευταίας να επάγει την έκφυση νευραξόνων καθώς και η δράση της στα μη νευρικά κύτταρα της καλλιέργειας. Στη συνέχεια, αισθητικά γάγγλια της ραχιαίας ρίζας καλλιεργήθηκαν παρουσία NGF και έπειτα αποστερήθηκαν αυτού και αξιολογήθηκε η ικανότητα της DHEA να αποτρέψει την ανάκλιση του άξονα απουσία του NGF.

Τελος, θέλησαμε να μελετήσουμε διεξοδικότερα τον μοριακό μηχανισμό μέσω του οποίου η DHEA επιτελεί τις δράσεις της. Για να διαπιστωθεί αν αντιστοίχως με τον NGF απαιτείται ενδοκυττάρωση του TrkA και επακόλουθη μεταφορά του συμπλόκου TrkA – DHEA στο σώμα μετά από πρόσδεση της τελευταίας σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς στον άξονα ώστε να επιτελεσθούν οι δράσεις της, δημιουργήθηκαν διαμερισματοποιημένες καλλιέργειες αισθητικών νευρώνων. Έτσι, μπορούν να επιτευχθούν επιδράσεις με τα υπό μελέτη μόρια σε διαφορετικά τμήματα ενιαίων νευρώνων. Συγκεκριμένα, η DHEA θα χορηγηθεί απουσία NGF σε διαφορετικά διαμερίσματα της καλλιέργειας, που περιλαμβάνουν το σώμα ή το νευράξονα και θα αξιολογηθεί η δράση της στην επιβίωση του νευρώνα και την διατήρηση των νευραξόνων του.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πρωτογενής καλλιέργεια αισθητικών νευρώνων

Αφαιρέθηκαν γάγγλια της ραχιαίας ρίζας από νεογέννητους αρουραίους P0-P1 (Sprague dawley) και αποδιατάχθηκαν σε μονήρη νευρικά κύτταρα με χρήση πιπέτας παστέρ μειούμενης διαμέτρου στομίου, μέσα σε διάλυμα θρυψίνης 0.25% (Gibco, 15090) για 30' στους 37°C. Οι νευρώνες παρέμειναν στο σωληνάριο της αποδιάταξης για 2 ώρες ώστε να διαχωριστούν από άλλα είδη κυττάρων που πιθανόν βρίσκονται αναμειγμένα. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε με προσοχή και μετά από φυγοκέντρηση τα εναπομείναντα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε θρεπτικό που περιέχει 1% FBS, 100 units/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, anti-mitotic 100nM and 100ng/ml NGF (Millipore, 01-125). Τα κύτταρα τελικά στρώθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας 96 οπών που είχαν ήδη καλυφθεί με στρώμα κολλαγόνου. Οι απομονωμένοι αισθητικοί νευρώνες κρατήθηκαν σε καλλιέργεια με θρεπτικό υλικό RPMI στους 37°C, CO₂ 5% παρουσία 100ng/ml NGF, FBS 5% και αντιμιτοτικού σε συγκέντρωση 100nM. Κάθε 2 μέρες γινόταν αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού με καινούριο έως ότου είχε σχηματισθεί ικανοποιητικό δίκτυο μεταξύ των απομονωμένων νευρώνων. Τα κύτταρα συνήθως επιβίωνανε για λίγες ημέρες και το δίκτυο δεν διατηρούνταν έως ότου γίνουν οι επιδράσεις. Δοκιμάστηκαν έτσι διαφορετικές συνθήκες κυρίως με αλλαγή της συγκέντρωσης του ορού (10% αρχικά, 5% τις επόμενες μέρες ή 1% από την αρχή). Τελικά η αρχική συγκέντρωση του ορού σε 5% διατηρήθηκε έως ότου γινόταν οι επιδράσεις την 5^η ή 7^η μέρα οπότε και η συγκέντρωση άλλαζε σε 1%.

Για τα πειράματα αποστέρησης από NGF, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με θρεπτικό Neurobasal που περιέχει 1% FBS, και έπειτα προστέθηκε καινούριο θρεπτικό υλικό χωρίς NGF που περιέχει αντίσωμα έναντι του NGF σε αραιώση 1:50 (Millipore, AB1526). Η DHEA, ο αναστολέας του TrkA, TrkA-inhibitor (Calbiochem, 648450) και το αντίσωμα για τον p75^{NTR}, anti-p75^{NTR} (mouse, MAB365R Millipore) χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 100nM, 100nM και αραιώση 1:50 αντίστοιχα.

Ξεχωριστά διατηρήθηκαν καλλιέργειες από ολόκληρα γάγγλια στα οποία δεν έγινε αποδιάταξη σε απλούς νευρώνες και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία.

Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις κυττάρων.

Πριν τη χρώση τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με επίδραση παραφορμαλδεύδης 4% για 20 λεπτά. Έπειτα ξεπλύθηκαν με PBS (phosphate buffer saline) 0.1M και επώαστηκαν στους -20°C για 20 λεπτά προς αύξηση της διαπερατότητας των μεμβρανών τους. Αφού ξεπλύθηκαν και πάλι με TBS (Tris Base saline), αφέθηκαν σε ορό (horse serum) 5% για

μισή ώρα, ο οποίος δεσμεύει όλες τις μη ειδικές θέσεις για το δεύτερο αντίσωμα. Στη συνέχεια έγινε επώαση με το πρώτο αντίσωμα σε TBS (tris buffer saline) για μία ώρα. Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με TBS και έγινε επώαση με το δεύτερο αντίσωμα έναντι του πρώτου για άλλη μια ώρα. Μετά από πλύσιμο τα κύτταρα παρέμειναν σε PBS και μελετήθηκαν σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο φθορισμού.

Χρώση TUNEL.

Τα κύτταρα πλύθηκαν δύο φορές με παγωμένο PBS (4 °C). Έπειτα, έγινε μια πλύση με PBS και τα κύτταρα αφέθηκαν σε PBS 0.1% Triton για ένα τέταρτο προς αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης. Έπειτα, ξεπλύθηκαν με PBS και επωάστηκαν στο μίγμα της αντίδρασης Tunel (100μl/ σπή) σε συνθήκες 37°C / 5% CO₂ μέσα σε μεταλλική κασετίνα με απιονισμένο νερό για μία ώρα. Έπειτα, έγιναν δύο ακόμα πλύσεις με PBS και τα κύτταρα εξετάστηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο φθορισμού.

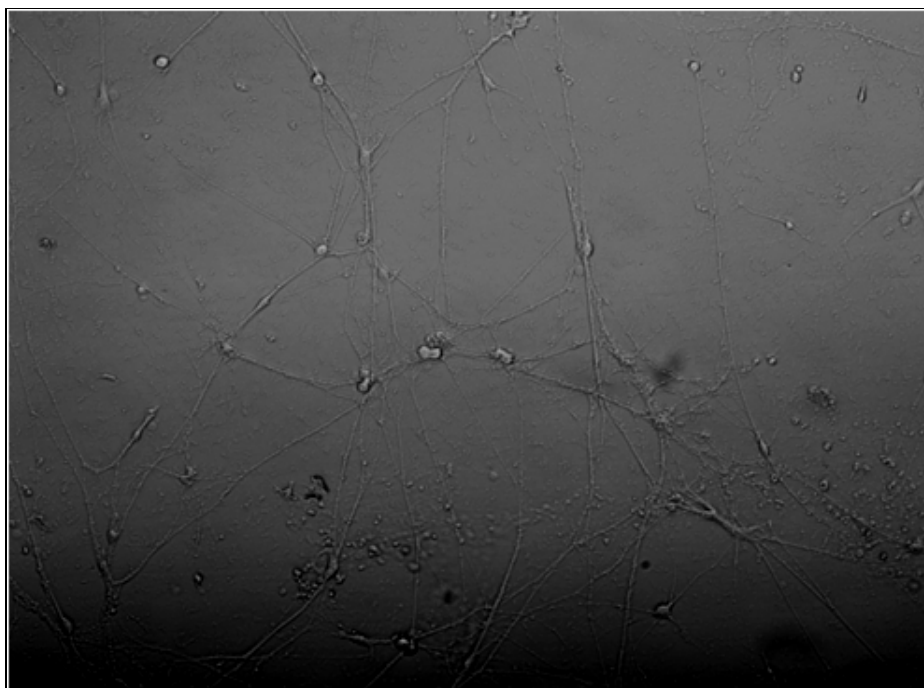
Διαμερισματοποιημένη καλλιέργεια.

Χρησιμοποιήθηκαν πιάτα καλλιέργειας P35 επικαλυμένα με στρώμα κολλαγόνου, η τελική συγκέντρωση του οποίου ήταν 0.7mg/ml σε 0.001N HCl. Αφού έγινε η επικάλυψη το πιάτο έμεινε στους 37°C για 2 μέρες. Η κάτω επιφάνεια του πιάτου έπειτα, χαράχθηκε με μεταλλικό πινέλο από τη μία άκρη στην άλλη, στη μέση της επιφάνειας. Στο κέντρο της χάραξης προστέθηκε ένα στρώμα N-μεθυλοκυτταρίνης (3mg/ml) και επάνω σε αυτή την επιφάνεια τοποθετήθηκε προσεκτικά το τεφλόν διαχωριστικό που απεικονίζεται παρακάτω αφού πρώτα όλες του οι ακμές καλύφθηκαν με σιλικονούχο υγρό με τη βοήθεια γυάλινης σύριγγας που είχε προηγουμένως αποστειρωθεί. Στα πλαϊνά διαμερίσματα προστέθηκε 100ng/ml NGF σε DMEM θρεπτικό που περιέχει 1% στρεπτομυκίνη και ARA C αντιμιτωτικό (DRGN media), και στο κεντρικό διαμέρισμα προστέθηκαν 100.000 κύτταρα αναδιατεταγμένων γαγγλίων της ραχιαίας ρίζας που απομονώθηκαν από νεογέννητους αρουραίους P0. Τη δεύτερη μέρα προστέθηκε στο έξω τμήμα του διαχωριστικού 10ng/ml DRGN media τόσο ώστε να υπερχειλίσει από το τοίχωμα σιλικόνης και να συνδεθεί με το κεντρικό κομμάτι. Τη τρίτη μέρα γίνεται αλλαγή θρεπτικού με 100ng/ml DRGN media για τα πλαϊνά διαμερίσματα και 10ng/ml για έξω και το κεντρικό χωρίς ωστόσο να έχουμε προσθέσει ARA C. Την έκτη μέρα γίνεται αλλαγή με 1ng/ml για τα πλαϊνά και DRGN media για το κεντρικό διαμέρισμα. Την ένατη μέρα μπορεί να ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

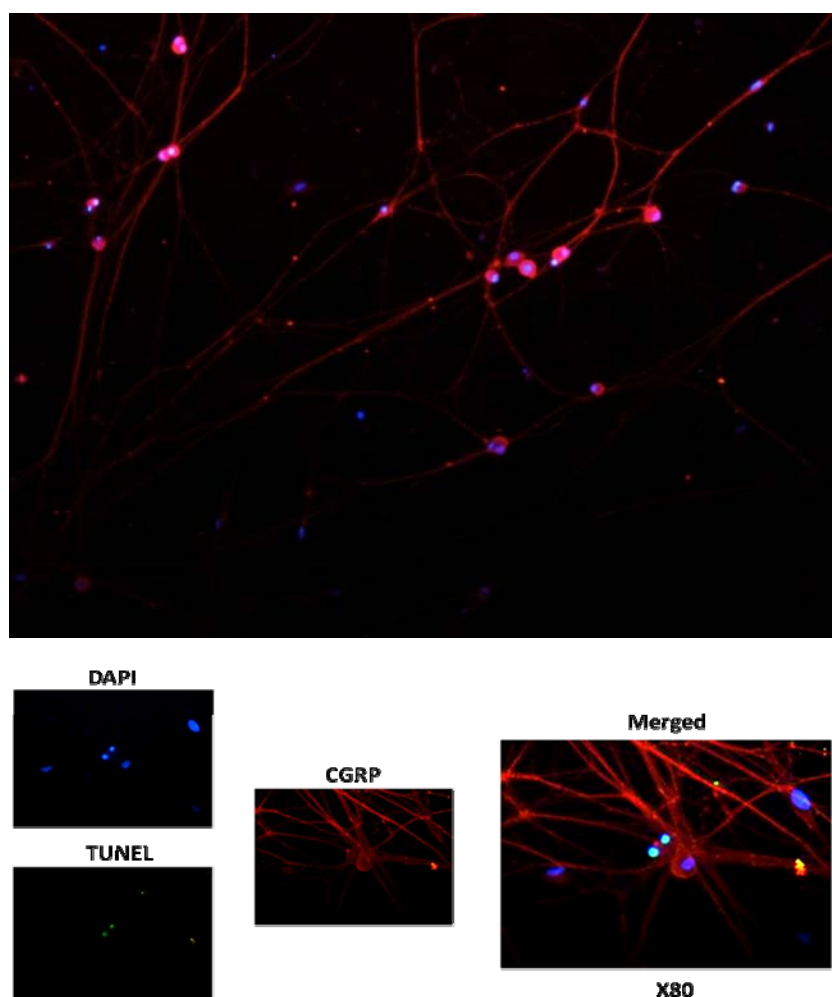
Η DHEA αναστέλλει την απόπτωση προκαλούμενη από έλλειψη NGF σε πρωτογενείς καλλιέργειες αισθητικών νευρώνων μέσω της ενεργοποίησης του TrkA.

Προηγούμενα αποτελέσματα έχουν δείξει την ικανότητα της DHEA να αναστρέφει την απόπτωση συμπαθητικών νευρώνων των ανώτερων αυχενικών γαγγλίων σε καλλιέργεια μετά από αποστέρηση από των NGF. Η πλειοψηφία του πληθυσμού των κυττάρων αυτών εκφράζουν TrkA και χρειάζονται τον NGF για την ανάπτυξη και την επιβίωση τους κατά την διάρκεια την εμβρυική και πρώτη μεταγεννητική περίοδο. Τα γάγγλια της ραχιαίας ρίζας αποτελούνται από ένα πιο ετερογενή πληθυσμό αισθητικών νευρώνων ένα 80% των οποίων εκφράζουν TrkA ενώ τη πρώτη μεταγεννητική περίοδο αυτό μειώνεται σε 40%. Για να εξετάσουμε αν η DHEA είναι ικανή να αναστρέψει την αποπτωση που προκαλείται σε συνθήκες αποστέρησης από τον NGF, σε TrkA θετικούς νευρώνες των DRGs, γάγγλια της ραχιαίας ρίζας απομονώθηκαν από νεογέννητους αρουραίους P1, αποδιατάχθηκαν σε μονήρη κύτταρα και κρατήθηκαν σε καλλιέργεια για 5 μέρες παρουσία 100ng/ml NGF με ενδιάμεση αλλαγή θρεπτικού κάθε δύο μέρες έως ότου δημιουργηθεί εκτενές δίκτυο μεταξύ των νευρώνων (**Εικόνα 1**).

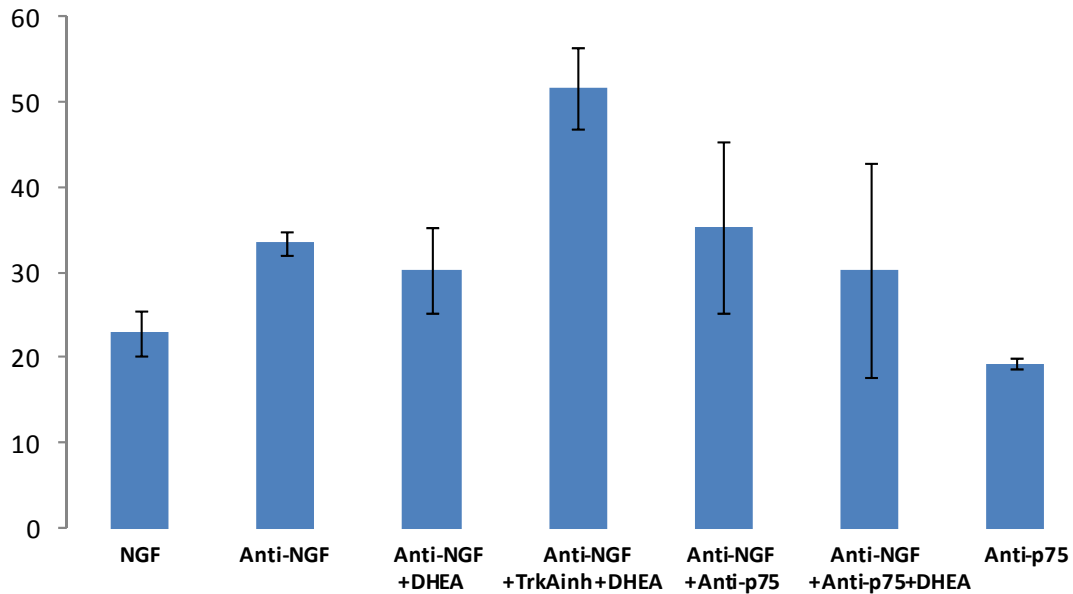


Εικόνα 1. Οργανοτυπική καλλιέργεια αισθητικών νευρώνων σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης.

Την 6^η μέρα τα κύτταρα επώαστηκαν για 48 ώρες είτε παρουσία 100ng/ml NGF είτε απουσία αυτού και παρουσία πολυκλωνικού αντισώματος εξουδετέρωσης για τον NGF (goat Anti-Rat NGF) με ή χωρίς τη προσθήκη 100nM DHEA. Οι συνθήκες αυτές επαναλήφθηκαν παρουσία αναστολέα του TrkA υποδοχέα και/ή μόνο αντισώματος εξουδετέρωσης για τον p75^{NTR} . Μετά από την επώαση έγινε χρώση των κυττάρων με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού για την παρουσία του νευροπεπτιδίου CGRP που εκφράζεται μόνο στους TrkA θετικούς μικρούς μεγέθους αμύελους αισθητικούς νευρώνες και χρώση TUNEL για αποπτωτικά κύτταρα (**Εικόνα 2**). Διαπιστώσαμε ότι το σύνολο των νευρώνων αντιστοιχούσε στους TrkA θετικούς νευρώνες μετά από μία βδομάδα σε καλλιέργεια παρουσία μόνο NGF. Έπειτα, υπολογίστηκαν τα ποσοστά απόπτωσης μετρώντας τα θετικά σε TUNEL χρώση κύτταρα από 5 οπτικά πεδία σε κάθε συνθήκη.



Εικόνα 2. Φωτογραφίες από μικροσκόπιο φθορισμού, αισθητικών νευρώνων μετά απο χρώση με CGRP (κόκκινο), DAPI (μπλε) και TUNEL (πράσινο) για αποπτωτικούς πυρήνες.



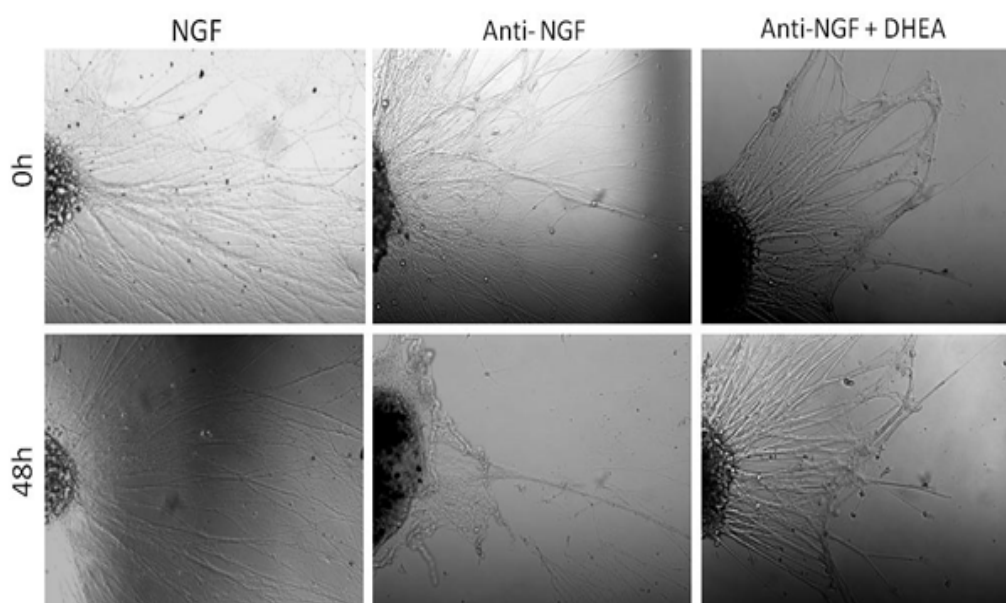
Εικόνα 3. Ποσοστά αποπτωτικών κυττάρων μετά από 48 ώρες στις ακόλουθες συνθήκες.

Το ποσοστά που εμφανίζονται αφορούν στη μέση τιμή από 5 οπτικά πεδία για τη κάθε συνθήκη και αντιστοιχούν συνολικά σε 300 περίπου νευρώνες.

Η DHEA δεν φαίνεται να μειώνει στατιστικά σημαντικά το ποσοστό απόπτωσης μετά από αποστέρηση από NGF. Αν και η παρατήρηση αυτή έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενα αποτελέσματα από πρωτογενείς καλλιέργειες συμπαθητικών νευρώνων δε μπορούμε να βγάλουμε σαφή συμπεράσματα, μιας και το εξουδετερωτικό αντίσωμα για τον NGF δε μπόρεσε από μόνο του να αυξήσει την απόπτωση σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο. Με αυτό συνάδει το αυξημένο ποσοστό απόπτωσης που βλέπουμε παρουσία αναστολέα του TrkA. Τέλος, η επιπρόσθετη αναστολή του p75^{NTR} δεν επηρέασε το το ποσοστό απόπτωσης του Anti-NGF, ενώ μόνο ο NGF και όχι η DHEA μείωσε την απόπτωση σε επίπεδα χαμηλότερα της συνθήκης ελέγχου παρουσία του αναστολέα του p75^{NTR} αλλά όχι σε στατιστικά σημαντικό βαθμό.

Η DHEA καθυστερεί την εκφύλιση μετά από αποστέρηση NGF.

Γάγγλια της ραχιαίας ρίζας απομονωμένα από νεογνήτους αρουραίους P1, κρατήθηκαν σε καλλιέργεια παρουσία 100ng/ml NGF για 5 μέρες. Έπειτα τα κύτταρα επώασθησαν στο ίδιο θρεπτικό παρουσία NGF είτε απουσία αυτού και παρουσία εξουδετερωτικού αντισώματος για αυτόν (Polyclonic Rabbit, Anti- Rat NGF) με ή χωρίς τη προσθήκη 100nM DHEA. Στις 48 ώρες από την έναρξη του πειράματος παρατηρήθηκε σημαντική ανάκληση των νευραξόνων στη συνθήκη όπου έγινε αποστέρηση από τον νευροτροφικό παράγοντα την οποία ανέστειλε η DHEA.

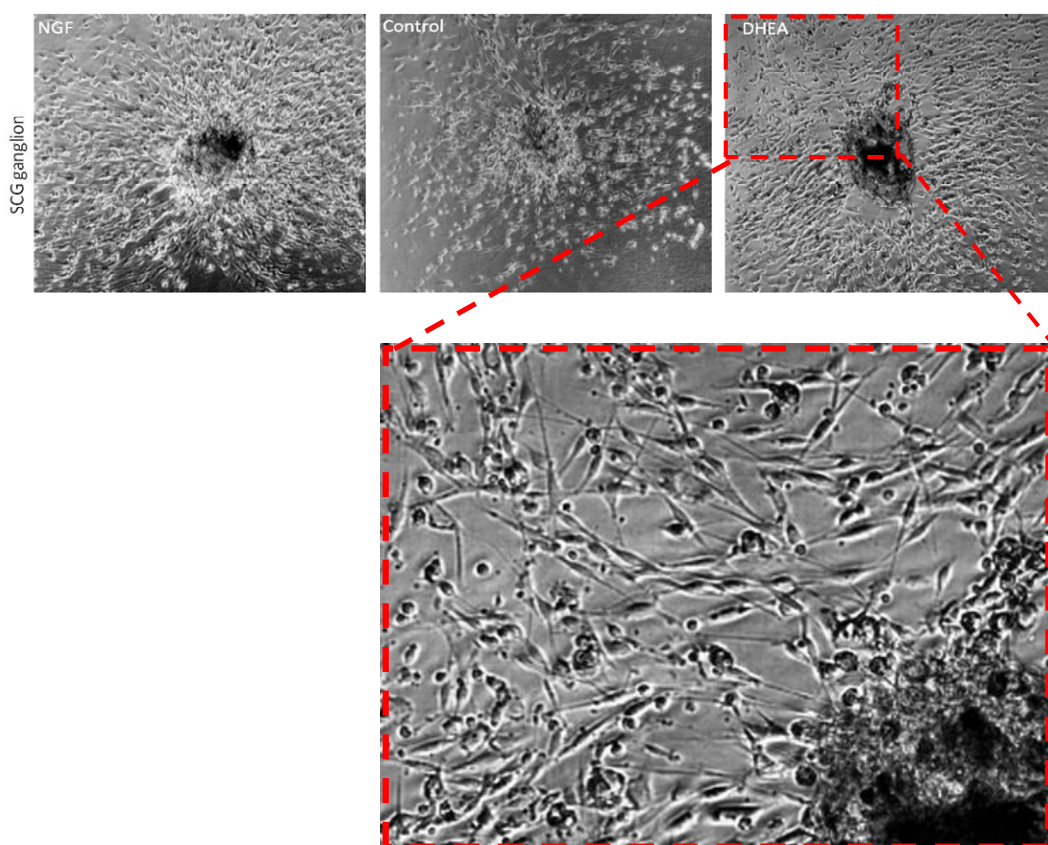


Εικόνα 4. Φωτομικρογραφίες γαγγλίων της ραχιαίας ρίζας τη στιγμή της επίδρασης με τους παράγοντες που αναγράφονται και έπειτα από 48ώρες.

Όπως προαναφέρθηκε ο NGF κατά την ενήλικη ζωή έχει ρόλο στην διατήρηση των υπάρχοντων συνδέσεων TrkA θετικών νευρώνων αφού ήδη έχει ολοκληρωθεί η ανάπτυξη του νευράξονα προς το στόχο του. Απουσία νευροτροφικής στήριξης ο άξονας εκπίπτει σε ανάδρομη εκφύλιση και αποσύρεται σταδιακά προς το σώμα του νευρώνα. Έχοντας δείξει σε προηγούμενες μελέτες μας ότι η DHEA είναι ικανή να αναστρέψει τον απόπτωτικό κυτταρικό θάνατο προκαλούμενο από αποστέρηση NGF σε νευρώνες που εξαρτώνται από αυτόν θελήσαμε να εξετάσουμε το ρόλο της στη διατήρηση των αξόνων σε συνθήκες έλλειψης νευροτροφικού παράγοντα. Στην οργανοτυπική μας καλλιέργεια η απουσία του NGF από το θρεπτικό υλικό προκάλεσε πλήρη απόσυρση των νευράξονα μέσα σε δύο μέρες. Η DHEA φάνηκε να αντισταθμίζει την έλλειψη NGF και να αναστέλλει την ανάκληση του νευράξονα. Εν τούτοις το πείραμα πραγματοποιήθηκε μόνο μία φορά και χρειάζεται επανάληψη προς επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.

Η DHEA αυξάνει την μετανάστευση των κυττάρων της μυελίνης σε μικτή καλλιέργεια αισθητικών νευρώνων με γλοιακά κύτταρα.

Έκφυτα ανώτερων αυχενικών γαγγλίων απομονωμένα από νεογέννητους αρουραίους καλλιεργήθηκαν απ' ευθείας παρουσία είτε 100ng/ml NGF, είτε εξουδετερωτικού αντισώματος για τον NGF ή 10nM DHEA.

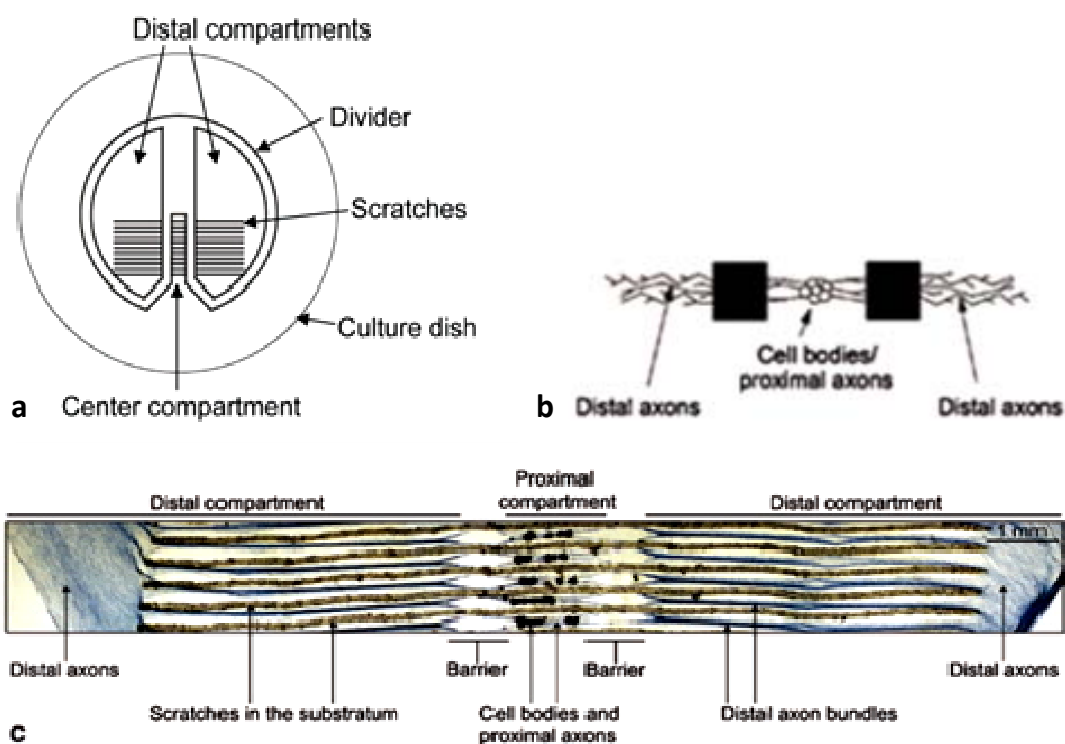


Εικόνα 5. Φωτομικρογραφίες καλλιέργειας εκφύτων ανώτερων αυχενικών γαγγλίων παρουσία των παραγόντων που αναγράφονται.

Ο NGF, όπως αναμενόταν, προκάλεσε την έκφυση νευριτών από το έκφυτο γαγγλίου, ενώ αυτό δε συνέβει στη συνθήκη όπου προστέθηκε DHEA. Πάραυτα, η DHEA όπως και ο NGF διέγειρε τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των προϋπαρχόντων μη νευρικών κυττάρων, που έχουν μορφολογία κυττάρων Schwann, προς τη περιοχή γύρω από όπου τοποθετήσαμε το γάγγλιο. Αν και υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν την ικανότητα της DHEA να επάγει την επιμήκυνση νευραξόνων αυτό δε παρατηρήθηκε στα δικά μας πειράματα πιθανώς λόγω μη ικανοποιητικής συγκέντρωσης αυτής είτε ανασταλτικής δράσης των γλοιακών κυττάρων. Τα πειράματα θα επαναληφθεί με διαφορετικές συγκεντρώσεις DHEA καθώς και απουσία προσμίξεων από μη νευρικά κύτταρα.

Διαμερισματοποιημένη καλλιέργεια αισθητικών νευρώνων.

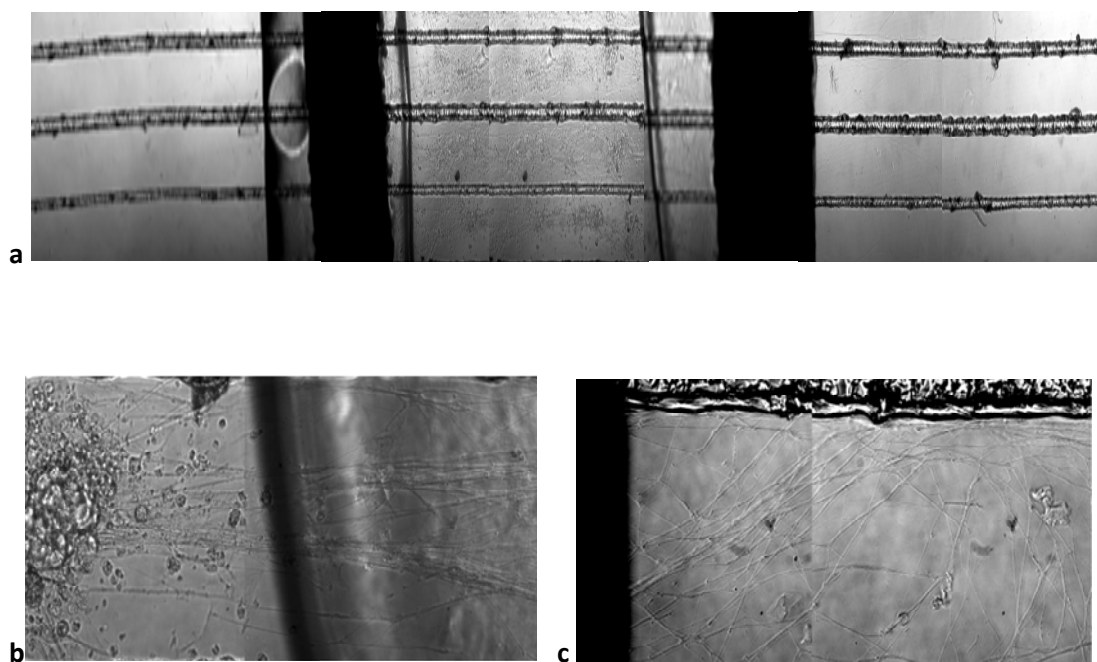
Προς διερεύνηση της ικανότητας της DHEA για ανάδρομη μεταγωγή σήματος μετά από πρόσδεση με τους TrkA υποδοχείς χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο διαμερισματοποιημένης καλλιέργειας που εγκαθίδρυσε πρώτος ο Campenot (Εικόνα6). Η αρχή λειτουργίας αυτού έγκειται στο διαχωρισμό των νευραξόνων από το κυτταρικό σώμα μέσω ενός διαχωριστικού από υλικό Teflon το οποίο δεν επιτρέπει την ανταλλαγή του μέσου καλλιέργειας μεταξύ των διαφορετικών διαμερισμάτων και επομένως επιτρέπει να επιδράσουμε ξεχωριστά με κάποιο παράγοντα σε αυτά. Το σύστημα αυτό μας δίνει τη δυνατότητα να επιδράσουμε με κάποιο παράγοντα ή διαφορετικές συγκεντρώσεις αυτού στο διαμέρισμα όπου βρίσκονται τα κυτταρικά σώματα είτε οι νευράξονες.



Campenot et al.2003

Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση της διαμερισματοποιημένης καλλιέργειας νευρώνων (a,b) και φωτομικρογραφία μετά από χρώση με τη χρωστική Dil (c).

Τη πρώτη μέρα της καλλιέργειας τοποθετήθηκαν 10^6 αισθητικοί νευρώνες στο ενδιάμεσο διαμέρισμα και τη δεύτερη και τρίτη μέρα ακολούθησαν οι επιδράσεις όπως αναφέρονται στις μεθόδους. Έως την έκτη μέρα στη καλλιέργεια οι νευράξονες είχαν αναπτυχθεί ικανοποιητικά μέχρι το τέλος των χαράξεων (Εικόνα 7). Παρ' όλα αυτά, όταν η αλλαγή του θρεπτικού έγινε με 1ng/ml NGF άρχισε μια σταδιακή ανάδρομη εκφύλιση του άξονα και η ανάκληση αυτών ήταν πλήρης έως την 9^η μέρα οπότε και δεν ήταν δυνατόν να γίνουν οι πειραματικές επιδράσεις. Σκοπός μας ήταν να επιδράσουμε με DHEA ή DHEA προσδεσμένη με αλβουμίνη ορού βοός που δε διαπερνά τη κυτταρική μεμβράνη (DHEA-BSA) αντί του NGF, στον εγγύ ή στον απομακρυσμένο άξονα, και να μελετήσουμε την ικανότητα αυτής να διατηρήσει τον άξονα ή να προάγει την επιβίωση του σώματος. Επίσης, θα εξετάζαμε τη φωσφορυλίωση προ-επιβιωτικών κινασών, όπως Akt, ERK1/2, Src, και την επαγωγή της έκφρασης προ-επιβιωτικών μεταγραφικών παραγόντων όπως οι NFκB και CREB, στο σώμα ή τη περιοχή των απομακρυσμένων νευραξόνων. Οι καλλιέργειες θα πραγματοποιηθούν ξανά στο μέλλον έως ότου κριθούν ικανοποιητικές για την επίτευξη των προαναφερθέντων πειραμάτων.



Εικόνα 7. Φωτομικρογραφίες από τη διαμερισματοποιημένη καλλιέργεια νευρώνων των γαγγλίων της ραχιαίας ρίζας (a) όπου διακρίνεται το διαμέρισμα των κυτταρικών σωμάτων (b) και των νευραξόνων (c).

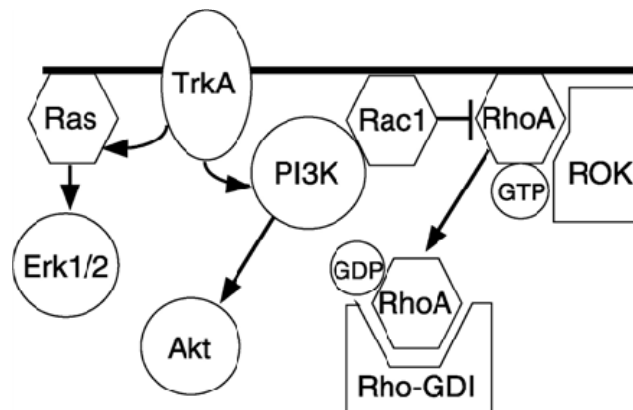
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.

Στην καλλιέργεια αισθητικών νευρώνων μετά από χρώση με CGRP /DAPI διαπιστώσαμε πως το σύνολο σχεδόν των κυττάρων αντιστοιχούσε στους αμύελους αλγοδεκτικούς νευρώνες οι οποίοι εκφράζουν TrkA, αφού ο μόνος νευροτροφικός παράγοντας που παρεχόταν σε αυτά ήταν ο NGF. Στη συνέχεια έγινε χρώση TUNEL και μετρήθηκε το ποσοστό αποπτωτικών κυττάρων για τις διάφορες συνθήκες στις 48 ώρες. Από τα αποτελέσματά μας δεν επιβεβαιώνεται προηγούμενη παρατήρηση, ότι η DHEA έχει την ικανότητα να αναστρέφει την απόπτωση προκαλούμενη από αποστέρηση NGF. Ωστόσο, η διαφορά στην απόπτωση μεταξύ της συνθήκης ελέγχου και αυτής όπου είχαμε αφαιρέσει τον NGF και είχαμε προσθέσει αντίσωμα έναντι αυτού δεν ήταν σημαντική εξαρχής. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται σε μειωμένη ικανότητα του αντισώματος να μπλοκάρει τη δράση του NGF. Εξ άλλου όταν χρησιμοποιήθηκε αναστολέας του TrkA το ποσοστό απόπτωσης αυξήθηκε σημαντικά σε επίπεδα παρόμοια με αυτά που παρατηρήθηκαν σε καλλιέργεια συμπαθητικών νευρώνων σε προηγούμενη μελέτη, είτε παρουσία αντισώματος για τον NGF είτε χρήση του αναστολέα του TrkA (Iazaridis et al. 2010). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η δράση της DHEA διαμεσολαβεί από τον ειδικό υποδοχέα του NGF. Στη συγκεκριμένη μελέτη όταν χρησιμοποιήθηκε επιπρόσθετα εξουδετερωτικό αντίσωμα για τον $p75^{NTR}$ απουσία του NGF τα επίπεδα απόπτωσης δεν επηρεάστηκαν ενώ η επίδραση της DHEA στη συγκεκριμένη συνθήκη επέφερε σημαντική μείωση. Επομένως, υποτέθηκε ότι ενεργοποίηση του $p75^{NTR}$ προάγει το κυτταρικό θάνατο το οποίο συνάδει με την αυξημένη απόπτωση που παρατηρήθηκε στη συνθήκη όπου διακόπηκε η σηματοδότηση μέσω του TrkA. Προς επιβεβαίωση του παραπάνω στη καλλιέργεια των αισθητικών νευρώνων αναστείλαμε τον $p75^{NTR}$ απουσία NGF, παρουσία αυτού ή παρουσία DHEA. Η DHEA δεν μείωσε ικανοποιητικά το ποσοστό απόπτωσης σε σχέση με τη συνθήκη αποστέρησης από τον NGF παρουσία αντισώματος για τον $p75^{NTR}$, το οποίο όμως δικαιολογείτε αν λάβουμε υπόψη μας τη μειωμένη ικανότητα του αντισώματος του NGF να μπλοκάρει τη δράση του ενδογενούς NGF που υπάρχει στη καλλιέργεια και να ανεβάσει σημαντικά τα ποσοστά απόπτωσης στις προηγούμενες συνθήκες. Αντιθέτως, ο NGF παρουσία αναστολέα του $p75^{NTR}$ μείωσε την απόπτωση σε επίπεδα κατώτερα της συνθήκης όπου και οι δύο υποδοχείς ήταν ενεργοί. Για να αποσαφηνιστούν περαιτέρω οι παραπάνω ενδείξεις όσον αφορά στη δράση της DHEA, είναι απαραίτητο τα πειράματα να επαναληφθούν επιτυγχάνοντας αρχικά ικανοποιητικό αριθμό κυττάρων στη καλλιέργεια ώστε να επιτρέπεται στατιστικά σημαντική ανάλυση καθώς επίσης και να γίνει επιλογή του

κατάλληλου αντισώματος για τον NGF, ικανό να αυξήσει σημαντικά τη διαφορά στην απόπτωση σε σχέση με τη συνθήκη ελέγχου.

Όπως αναφέραμε η εκφύλιση του άξονα μέσω ανάκλησης είναι μια προγραμματισμένη διαδικασία του νευρώνα, όπως και η απόπτωση, ενώ και οι δύο αναστέλλονται μετά από σηματοδότηση από νευροτροφικούς παράγοντες. Αυτοί επηρεάζουν τη μορφολογία του νευρώνα και τη δυναμική του κυτταροσκελετού μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών που περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες της οικογένειας RhoGTPases (Rac1, cdc42 και RhoA) μετά από ενεργοποίηση των υποδοχέων τους Trk και p75^{NTR} (99) (Εικόνα 8). Οι Rac1 και RhoA φαίνεται να έχουν ανταγωνιστικές δράσεις, με την πρώτη να θεωρείται θετικός ρυθμιστής της ανάπτυξης των νευραξόνων και τη δεύτερη ως αναστολέας αυτής, ενώ και οι δύο ενεργοποιούνται από cdc42. Πράγματι ο NGF δείχθηκε να διεγείρει μέσω του TrkA την PI3K που περαιτέρω προκαλεί ενεργοποίηση του Rac1. Αυτός με τη σειρά του επάγει την απενεργοποίηση της RhoA στα πρώτα στάδια της διαφοροποίησης και έκφυσης νευραξόνων σε κύτταρα φαιοκυτοχρώματος (PC12) (100). Η ενεργοποιημένη μορφή της Rho (GTP-bound) εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα όπου αλληλεπιδρά με την Rho kinase, ROCK, προκαλώντας ανάκληση των νευραξόνων στα ίδια κύτταρα ενώ αναστολή της αλληλεπίδρασης με το συγκεκριμένο τελεστή ευθύνεται για την επιμήκυνση των αξόνων στα ίδια κύτταρα και σε *in vivo* μοντέλα (101). Από την άλλη μεριά ο p75^{NTR} ρυθμίζει τη δυναμική των φιλοπόδιων μειώνοντας την ενεργότητα της RhoA μετά από πρόσδεση κάποιας νευροτροφίνης σε αυτόν. Επίσης, ο NGF είναι ικανός να αναστείλει την κατάρρευση του εκφυτικού κώνου αισθητικών νευρώνων, από την Sema3A η οποία μειώνει την αναγεννητική ικανότητα του άξονα μετά από διατομή αυτού.

Εικόνα 8. Σχηματική απεικόνιση των σηματοδοτικών μονοπατιών που συνδέουν τον TrkA με την αναστολή της RhoA.



Nusser N et al. J. Biol. Chem. 2002;277:35840-35846.

Τα κύτταρα της σειράς PC12 παρουσία του NGF εκφύουν νευρίτες και αποκτούν φαινότυπο συμπαθητικών νευρώνων πιθανώς μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού της PI3K-Akt, η οποία ευθύνεται για την αναδιοργάνωση της ακτίνης (F-actin) και το σχηματισμό φιλοποδίων (104-106). Η DHEA, όπως προαναφέρθηκε, ενεργοποιεί τα παραπάνω μονοπάτια μέσω πρόσδεσης στον TrkA ενώ είναι γνωστό από προηγούμενη δουλειά του εργαστηρίου μας ότι αυξάνει την έκφραση της υδροξυλάσης της τυροσίνης και την έκκριση κατεχολαμινών από τα PC12 κύτταρα, όπως εξάλλου και ο NGF, επιταχύνοντας τον πολυμερισμό της ακτίνης (107, 108). Στη παρούσα μελέτη δείξαμε ότι η DHEA είναι ικανή να εμποδίσει την ανάκληση του νευράξονα στους αισθητικούς νευρώνες μετά από αποστέρηση από τον NGF ενώ επίσης έχει δειχθεί από το εργαστήριό μας ότι αυτή επάγει την διαφοροποίηση PC12 κυττάρων και την ανάπτυξη νευραξόνων σε PC12. Σε προηγούμενες εργασίες έχει αναφερθεί ότι οι DHEA και DHEA-S μπορούν να επάγουν την επιμήκυνση των νευριτών μέσω του δικτύου των μικροσωληνίσκων, αυξάνοντας την έκφραση των δεικτών Tau1 στους άξονες και MAP2 στους δενδρίτες αντίστοιχα. Είναι γνωστό ότι η DHEA προσδέεται ειδικά στην ισομορφή MAP2C των MAP's (Microtubule associated protein's), σταθεροποιώντας τους μικροσωληνίσκους (48). Φωσφορυλίωση της MAP2c από τη PKA ίσως να ευθύνεται για τη δράση της DHEA στη σταθεροποίηση της δομής του κυτταροσκελετού (102). Αντιθέτως, αποστέρηση από NGF προκάλεσε υπερφωσφορυλίωση της Tau, μίας άλλης πρωτεΐνης της οικογένειας των MAP's, και ανάκληση των νευραξόνων σε διαφοροποιημένα κύτταρα PC12 (103), φαινόμενο που παρατηρείται κατά τη διαδικασία της νευροεκφύλισης στη νόσο Alzheimer's.

Για να επιβεβαιωθεί αν η DHEA μπορεί να αποτρέψει την ανάκληση των αξόνων απουσία του NGF το συγκεκριμένο πείραμα πρέπει να επαναληφθεί όπως επίσης και να χρησιμοποιηθούν αναστολείς των υποδοχέων TrkA και $p75^{NTR}$ ώστε να διαπιστωθεί αν οι δράσεις της διαμεσολαβούνται μέσα από αυτούς. Επίσης, η χρήση διαμερισματοποιημένων καλλιιεργειών αισθητικών νευρώνων θα συμβάλει περαιτέρω στην αποσαφήνιση του μηχανισμού μέσω του οποίου η DHEA συμβάλει στην διατήρηση των αξόνων.

Η ομάδα του Campenot πρόσφατα διατύπωσε την θεωρία ότι ο NGF στις απολήξεις των αξόνων προάγει την επιβίωση του νευρώνα καταστέλλοντας τα ανάδρομα σήματα θανάτου που δημιουργούνται εκεί απουσία NGF. Η απουσία NGF στο απομακρυσμένο άκρο του άξονα σε διαμερισματοποιημένη καλλιέργεια νευρώνων προκαλεί ανάκλησή του και κυτταρικό θάνατο. Έχει προταθεί στο παρελθόν ότι για να επιτελέσει ο NGF τις δράσεις του απαιτείται ενδοκυττάρωση αυτού στις απολήξεις των νευραξόνων μαζί με τον υποδοχέα του και αναδρομη μεταφορά του προς το σώμα. Στη πορεία αυτή ενεργοποιούνται

σηματοδοτικά μονοπάτια υπεύθυνα για την επιβίωση του κυττάρου και τη διατήρηση των μορφολογικών του χαρακτηριστικών. Εντούτοις, άλλα δεδομένα υποστηρίζουν πως η ενδοκυττάρωση του υποδοχέα δεν είναι απαραίτητη για την επαγωγή των σημάτων επιβίωσης. Μόρια NGF προσδεμένα με σφαίρες που δε διαπερνούν τη κυτταρική μεμβράνη όταν χορηγήθηκαν στο διαμέρισμα των απομακρυσμένων αξόνων, σε διαμερισματοποιημένη καλλιέργεια συμπαθητικών νευρώνων, ήταν δυνατόν να προάγουν την επιβίωση των νευρώνων ενώ επίσης αναστολή της φωσφορυλίωσης του TrkA στο διαμέρισμα των εγγύς αξόνων και του σώματος δεν κατέστειλαν την επιβίωση που προκλήθηκε από τη χορήγηση NGF στις απολήξεις των απομακρυσμένων νευραξόνων ούτε κατέστειλαν την ενεργοποίηση μορίων που συμμετέχουν στο προ-επιβιωτικό μονοπάτι (Akt, CREB). Εως τώρα δεν είναι γνωστό αν η αντι-αποπτωτική δράση της DHEA καθώς και η ικανότητα αυτής να διατηρεί τους άξονες ζωντανούς υπό συνθήκες εκφύλισης διαμεσολαβεί με τον ίδιο τρόπο, ενεργοποιώντας τους TrkA υποδοχείς στις απολήξεις των νευρώνων και σταματώντας με αυτό το τρόπο τα ανάδρομα σήματα θανάτου μετά την αποστέρωση του νευροτροφικού παράγοντα. Η χρήση του μοντέλου της διαμερισματοποιημένης καλλιέργειας θα μας δώσει τη δυνατότητα να διερευνήσουμε αν η DHEA επάγει προ-επιβιωτικά σήματα στο απομακρυσμένο τμήμα του άξονα ή αν αυτή δρά ενεργοποιώντας τους TrkA υποδοχείς απευθείας στο σώμα του νευρώνα. Επίσης, θα απαντήσει στο ερώτημα αν αυτή είναι ικανή να προκαλέσει ενδοκυττάρωση του TrkA μετά από πρόσδεση με αυτόν και ακόλουθη μεταφορά του στο σώμα μέσω ενδοσωμάτων παρόλο που δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα αν η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη για την προεπιβιωτική δράση του NGF.

Όταν εκφύματα ανώτερων αυχενικών γαγγλίων καλλιεργήθηκαν απ'ευθείας παρουσία DHEA αυτή δεν ήταν ικανή να επάγει την έκφυση νευραξόνων όπως ο NGF. Παρ' όλα αυτά, παρουσία της DHEA παρατηρήθηκε αυξημένη μετανάστευση του πληθυσμού των μη νευρικών κυττάρων από το σημείο όπου βρισκόταν συγκεντρωμένα τα κυτταρικά σώματα των νευρώνων προς την περιφέρεια, συγκρίσιμη με τη συνθήκη όπου είχε προστεθεί NGF. Οι νευροτροφίνες της οικογένειας του NGF είναι γνωστοί ρυθμιστές της ωρίμανσης και μετανάστευσης των κυττάρων μυελίνωσης συνεισφέροντας στην επικοινωνία των νευρώνων με τα κύτταρα της γλοίας. Κατά την διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης και σε καταστάσεις αναγέννησης των νευραξόνων μετά από τομή, τη περίοδο δηλαδή που εξελίσσεται η διαδικασία της μυελίνωσης, αυξάνει ραγδαία η παραγωγή νευροτροφικών παραγόντων από τα νευρικά κύτταρα καθώς και η έκφραση του υποδοχέα p75^{NTR} από τα

κύτταρα Schwann. Σε ένα μοντέλο μελέτης της επαναμυελίνωσης *in vivo*, αυτό της καταστροφής του ισχιακού νεύρου, καθώς και σε μικτή καλλιέργεια αισθητικών νευρώνων μαζί με κύτταρα Schwann, δείχθηκε ότι οι NGF και BDNF διεγείρουν τη μετανάστευση των Schwann μέσω του υποδοχέα p75^{NTR}, ενώ η NT3 την αναστέλλει μέσω του TrkC (110, 111). Όταν μάλιστα έγινε απαλοιφή του p75^{NTR} φάνηκε ελαττωματική μυελίνωση και ανάπτυξη νευρώνων του ΠΝΣ σε *in vivo* και *in vitro* πειράματα (112). Στη καλλιέργειά μας τα μη νευρικά κύτταρα που περιέβαλαν το συσσωμάτωμα νευρώνων είχαν τη μορφολογία κυττάρων Schwann παρόμοια με αυτή που παρατηρήθηκε σε οργανοτυπική καλλιέργεια αισθητικών νευρώνων σε παλαιότερη εργασία. Κάποια από τα κύτταρα αυτά, μάλιστα, τα οποία εκφράζουν τον ειδικό υποδοχέα του NGF συνεχίζουν να επιβιώνουν παρουσία αντιμιτωτικού παράγοντα (ARA-C). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι τα κύτταρα αυτά που χαρακτηρίζονται ως δευτερογενή κύτταρα Schwann αφορούν στα ήδη διαφοροποιημένα κύτταρα που παράγουν μυελίνη (116). Κατά την αναγέννηση ενός τραυματισμένου άξονα τα κύτταρα αυτά μεταναστεύουν κατά μήκος αυτού και σχηματίζουν ένα υπόστρωμα που βοηθά στην καθοδήγηση και σωστή ανάπτυξη του άξονα. Η παραγωγή NGF από τα κύτταρα Schwann που βρίσκονται σε στενή επαφή με τον νευράξονα θεωρήθηκε πως ευθύνεται για την ανάπτυξη του τελευταίου (115). Η DHEA μετά από πρόσδεση με τους υποδοχείς του NGF πιστεύουμε πως φέρει ρόλο στη μετανάστευση των κυττάρων Schwann και στη διαδικασία της επαναμυελίνωσης τραυματισμένων νευραξόνων στο περιφερικό νευρικό σύστημα ενώ ταυτόχρονα προάγει την επιβίωσή τους. Το γεγονός ότι δεν αποδείχθηκε ικανή να επάγει την αύξηση του νευράξονα στις καλλιέργειες μας ίσως να οφείλεται στη χρήση εξουδετερωτικού αντισώματος για τον NGF που εκκρίνεται από τα κύτταρα Schwann αφού η ίδια δεν δρα ως στοχευμένος χημειοτακτικός παράγοντας .

ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ.

Η DHEA μέσω των παραπάνω δράσεων της στην ανάπτυξη, διατήρηση και ανάπλαση του νευρικού συστήματος έχει θεωρηθεί ως ένα πολλά υποσχόμενο μόριο για τη θεραπεία πλήθους νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως οι ασθένειες Αλζχέιμερς, Πάρκινσον και πολλαπλή σκλήρυνση, καθώς και τραύματος του νευρικού ιστού (spinal cord injury, cerebral ischemia, stroke). Οι δράσεις αυτές φαίνεται να οφείλονται εν μέρει τουλάχιστον στην εκλεκτική της πρόσδεση με τον υποδοχέα του NGF καθώς και με τον χαμηλής συνάφειας υποδοχέα όλων των νευροτροφινών, p75^{NTR}. Η DHEA εν συγκρίσει με τον πεπτιδικής φύσεως NGF είναι ένα μικρό λιπόφιλο μόριο που προέρχεται από μεταβολισμό της χοληστερόλης και έχει την ικανότητα να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό με μεγάλη ευκολία και να διαχέεται στο περιφερικό και κεντρικό νευρικό σύστημα. Ωστόσο, η χρήση αυτής για κλινικές εφαρμογές έχει κριθεί ακατάλληλη, λόγω του μεταβολισμού της στον οργανισμό σε ανδρογόνα και οιστρογόνα, η υπερβολική συγκέντρωση των οποίων είναι ικανή να προκαλέσει νεοπλασίες και ενδοκρινολογικής φύσεως προβλήματα. Το εργαστήριό μας έχει συνθέσει χημικά ανάλογα της DHEA τα οποία έχουν υποστεί τροποποιήσεις στον C17 ώστε να μη καθίσταται δυνατός ο περαιτέρω μεταβολισμός τους. Τα μόρια αυτά αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να προστατεύουν από απόπτωση επαγόμενη από τροφική στέρηση, κύτταρα PC12, καταστέλλοντας την έκφραση προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών (BCL-2), μιμούμενα τη δράση της DHEA (113). Μελλοντικοί στόχοι του εργαστηρίου είναι να μελετηθεί η δράση των μορίων αυτών σε ζωικά μοντέλα νευροεκφυλιστικών νόσων, καθώς και κατά την ανάπτυξη όσον αφορά την απόπτωση των νευρώνων και την νευρογένεση.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Baulieu EE: Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent Prog Horm Res*, 1997, 52, 1–32.
2. Corpechot C., Robel P., Axelson M., Sjoval J., Baulieu E.E., Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in ventromedial hypothalamic nucleus of rat brain *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1981)
3. Corpechot C., Synguelakis M., Talha S., Axelson M., Sjoval J., Vihko R., Baulieu E.E., Robel P., Pregnenolone and its sulfate ester in biosynthesis of pregnenolone and progesterone in primary cultures of the rat brain, *Brain Res.*, (1983)
4. Mellon SH., Griffin LD., Compagnone NA. Biosynthesis and action of neurosteroids. *Brain Research Reviews* (2001)
5. Conley A.J., Bird I.M., The role of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the delta 5 and delta 4 pathways of steroidogenesis in mammals, *Biol. Reprod.* (1997)
6. Charalampopoulos I, Remboutsika E, Margioris A N. and Gravanis A. Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival. *Trends in Endocrinology and Metabolism* (2008).
7. Lacroix C., Fiet J., Benais J.P., Gueux B., Bonete R., Villette J.M., Gourmel B., Dreux C., Simultaneous radioimmunoassay of progesterone, androst-4-enedione, pregnenolone, dehydroepiandrosterone and 17- hydroxyprogesterone in specific regions of human brain, *J. Steroid Biochem.* (1987)
8. Kimoto T., Tsurugizawa T., Ohta Y., Makino J., Tamura H., Hojo Y., Takata N., Kawato S., Neurosteroid synthesis by cytochrome p450-containing systems localized in the rat brain

hippocampal neurons: N-methyl-D-aspartate and calcium-dependent synthesis, *Endocrinology* (2001)

9. Beaujean D., Mensah-Nyagan A.G., Do-Rego J.L., Luu-The V., Pelletier G., Vaudry H., Immunocytochemical localization and biological activity of hydroxysteroid sulfotransferase in the frog brain, *J. Neurochem.* (1999)
10. Kishimoto Y., Hoshi M., in: Dehydroepiandrosterone sulphate in rat brain: incorporation from blood and metabolism in vivo, *J. Neurochem.* (1972)
11. Asaba H., Hosoya K., Takanaga H., Ohtsuki S., Tamura E., Takizawa T., Terasaki T., Blood-brain barrier is involved in the efflux transport of a neuroactive steroid, dehydroepiandrosterone sulfate, via organic anion transporting polypeptide 2, *J. Neurochem.* (2000)
12. Fang C, Knecht K, Birzin E, Fisher J, Wilkinson H, Mojena M, Tudela MC, Schmidt A, Harada S, Freedman LP. and Reszka A. Alfred. Direct Agonist/Antagonist Functions of Dehydroepiandrosterone. *Endocrinology* (2005).
13. Compagnone N.A., Bulfone A., Rubenstein J.L.R. and Mellon S.H., Steroidogenic enzyme P450c17 is expressed in the embryonic central nervous system. *Endocrinology* (1995).
14. Strfmstedt M., Waterman M.R. Messenger RNAs encoding steroidogenic enzymes are expressed in rodent brain. *Molecular Brain Research* 34 (1995).
15. Kohchi C, Ukena K, Tsutsui K. Age and region specific expressions of the messenger RNAs encoding for steroidogenic enzymes P450scc, P450c17 and 3 β -HSD in the postnatal rat brain. *Brain Research* (1998).
16. Zwain IH, Yen SS. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology.* (1999)
17. Hojo Y, Hattori TA, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii HT, Mukai H, Morrison JH, Janssen WG, Kominami S, Harada N, Kimoto T, Kawato S. Adult male rat hippocampus

- synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons. Proc Natl Acad Sci U S A. (2004)
18. Liu D, Dillon JS. Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to Galpha(i2,3). J. Biol. Chem. (2002)
 19. Charalampopoulos I, Alexaki VI, Lazaridis I, Dermitzaki E, Avlonitis N, Tsatsanis C, Calogeropoulou T, Margioris N. A, Castanas E and Gravanis A. G protein-associated, specific membrane binding sites mediate the neuroprotective effect of dehydroepiandrosterone. The FASEB Journal (2006).
 20. A. Sousa, M.K. Ticku, Interactions of the neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate with the GABA(A) receptor complex reveals that it may act via the picrotoxin site, J. Pharmacol. Exp. Ther. (1997)
 21. Majewska M.D., Neurosteroids : endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance, Prog. Neurobiol. 38 (1992)
 22. Kaminski R.M., Marini H., Kim W.J, Rogawski M.A., Anticonvulsant activity of androsterone and etiocholanolone, Epilepsia 46 (2005).
 23. Kaasik A., Kalda A., Jaako K., Zharkovsky A. Dehydroepiandrosterone sulphate prevents oxygen-glucose deprivation-induced injury in cerebellar granule cell culture, Neuroscience 102 (2001).
 24. Gartside S, Griffith N, Kaura V, Ingram C. The neurosteroid dehydroepiandrosterone (DHEA) and its metabolites alter 5-HT neuronal activity via modulation of GABAA receptors. J Psychopharmacol (2009).
 25. Baulieu E.E., Neurosteroids: a novel function of the brain, Psychoneuroendocrinology (1998)
 26. Gonzalez-Alvear G.M., Werling L.L., Regulation of [3H] dopamine release from rat striatal slices by sigma receptor ligands, J. Pharmacol. Exp. Ther. (1994) .

27. Bergeron R., de Montigny C., Debonnel G., Potentiation of neuronal NMDA response induced by dehydroepiandrosterone and its suppression by progesterone: effects mediated via sigma receptors, *J. Neurosci.* (1996).
28. Urani A., Privat A., Maurice T., The modulation by neurosteroids of the scopolamine-induced learning impairment in mice involves an interaction with sigma1 (sigma1) receptors, *Brain Res.* (1998).
29. Rhodes M.E., Li P.K., Burke A.M., Johnson D.A., Enhanced plasma DHEAS, brain acetylcholine and memory mediated by steroid sulfatase inhibition, *Brain Res.* (1997).
30. Laurine E., Lafitte D., Gregoire C., Seree E., Loret E., Douillard S., Michel B., Briand C., Verdier J.M., Specific binding of dehydroepiandrosterone to the N terminus of the microtubule-associated protein MAP2, *J. Biol. Chem.* (2003)
31. Fontaine-Lenoir V, Chambraud B, Fellous A, David S, Duchosoy Y, Baulieu EE, Robel P. Microtubule-associated protein 2 (MAP2) is a neurosteroid receptor. *P.Proc Natl Acad Sci U S A.* (2006)
32. Li H., Klein G., Sun P., Buchan A.M., Dehydroepiandrosterone (DHEA) reduces neuronal injury in a rat model of global cerebral ischemia, *Brain Res.* (2001)
33. Fiore C., Inman D.M., Hirose S., Noble L.J., Igarash T., Compagnone N.A, Treatment with the neurosteroid dehydroepiandrosterone promotes recovery of motor behavior after moderate contusive spinal cord injury in the mouse, *J. Neurosci. Res.* 75 (2004).
34. Kimonides V.G., Khatibi N.H., Svendsen C.N., Sofroniew M.V., Herbert J., Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEAS) protect hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced neurotoxicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998).

35. D'Astous M, Morissette M, Tanguay B, Callier S, Di Paolo T. Dehydroepiandrosterone (DHEA) such as 17beta-estradiol prevents MPTP-induced dopamine depletion in mice. *Synapse*. (2003).
36. Camardiel TM, Sanchez-Hidalgo MC, Sanchez del Pino MJ, Navarro A, Machado A, Cano J. Comparative study of the neuroprotective effect of dehydroepiandrosterone and 17beta-estradiol against 1-methyl-4-phenylpyridium toxicity on rat striatum. *Neuroscience*.(2002)
37. Belanger N, Gregoire L, Bedard PJ., and Therese DP. Estradiol and Dehydroepiandrosterone Potentiate Levodopa-Induced Locomotor Activity in 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine Monkeys *Endocrine*, (2003).
38. Marx C.E., Jarskog L.F., Lauder J.M., Gilmore J.H., Lieberman J.A., Morrow A.L., Neurosteroid modulation of embryonic neuronal survival in vitro following anoxia, *Brain Res*. (2000).
39. Kaasik A., Kalda A., Jaako K., Zharkovsky A., Dehydroepiandrosterone sulphate prevents oxygen-glucose deprivation-induced injury in cerebellar granule cell culture, *Neuroscience* (2001).
40. Kimonides V.G., N.H. Khatibi, C.N. Svendsen, M.V. Sofroniew, J. Herbert, Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEAS) protect hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced neurotoxicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 1852–1857.
41. Kurata K., Takebayashi M., Morinobu S., Yamawaki S., Beta-estradiol, dehydroepiandrosterone, and dehydroepiandrosterone sulfate protect against N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons by different mechanisms, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2004).
42. Kaasik A., D. Safiulina, A. Kalda, A. Zharkovsky, Dehydroepiandrosterone with other neurosteroids preserve neuronal mitochondria from calcium overload, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 87 (2003).

43. Cardounel A., Regelson W., Kalimi M., Dehydroepiandrosterone protects hippocampal neurons against neurotoxin-induced cell death: mechanism of action, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1999).
44. Liang L, Bingzhong X, Ying Z, Lei C, Masahiro S, Ling C. DHEA Prevents A β 25–35-Impaired Survival Of Newborn Neurons In The Dentate Gyrus Through A Modulation Of PI3K-Akt-MTOR Signaling. *Neuropharmacology* (2010).
45. Rego JLD, Tremblay Y, Luu V, Repetto E, Castel H, Vallarino M, Belanger A, Pelletier G and Hubert V. Immunohistochemical localization and biological activity of the steroidogenic enzyme cytochrome P450 17 α -hydroxylase/C17, 20-lyase (P450C17) in the frog brain and pituitary. *Journal of Neurochemistry*, (2007).
46. Charalampopoulos I, Alexaki VI, Tsatsanis C, Minas V, Dermitzaki E, Lasaridis I, Vardouli L, Stournaras C, Margioris AN, Castanas E, Gravanis A. Neurosteroids as endogenous inhibitors of neuronal cell apoptosis in aging. *Ann N Y Acad Sci.* (2006).
47. Compagnone NA., Bulfone A., Rubenstein JLR. & Mellon SH. Expression of the steroidogenic enzyme P450scc in the central and peripheral nervous systems during rodent embryogenesis *Endocrinology.* (1995).
48. Compagnone NA. and Synthia HM. Dehydroepiandrosterone: A potential signalling molecule for neocortical organization during development. *Natl. Proc. natl. Acad. Sci. USA* (1998)
49. Bair R. Susanna and Mellon H. Synthia. Deletion of the Mouse P450c17 Gene Causes Early Embryonic Lethality. *Molecular and Cellular Biology*, 2004.
50. Charalampopoulos I, Dermitzaki E, Vardouli L, Tsatsanis C, Stournaras C, Margioris AN, Gravanis A. Dehydroepiandrosterone sulfate and allopregnanolone directly stimulate catecholamine production via induction of tyrosine hydroxylase and secretion by affecting actin polymerization. *Endocrinology.* 2005.

51. Ulmann L, Rodeau JL, Danoux L, Contet-Audonneau JL, Pauly G, Schlichter R. Dehydroepiandrosterone and neurotrophins favor axonal growth in a sensory neuron-keratinocyte coculture model. *Neuroscience*. (2009).
52. Alexaki VI, Charalampopoulos I, Panayotopoulou M, Kampa M, Gravanis A, Castanas E. Dehydroepiandrosterone protects human keratinocytes against apoptosis through membrane binding sites. *Exp Cell Res*. (2009).
53. Schumacher M., Guennoun R., Mercier G., Desarnaud F., Lacor P., Benavides J., Ferzaz B., Robert F. and Baulieu E.E., Progesterone synthesis and myelin formation in peripheral nerves, *Brain Res Brain Res Rev* (2001).
54. Montalcini RL, Hamburger V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool* (1951)
55. Levi-Montalcini, R. The nerve growth factor 35 years later. *Science*. (1987)
56. Lutherand J. A. Birren S. J. p75 and TrkA Signaling Regulates Sympathetic Neuronal Firing Patterns via Differential Modulation of Voltage-Gated Currents. *J. Neurosci*. (2009)
57. Shao, Z. TAJ/TROY, an orphan TNF receptor family member, binds Nogo-66 receptor 1 and regulates axonal regeneration. *Neuron*. (2005).
58. Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, Christ F, Schwab ME. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature*. (2000).
59. Yamashita T, Tuckerand KL, Barde YA. Neurotrophin Binding to the p75 Receptor Modulates Rho Activity and Axonal Outgrowth. *Neuron* (1999).
60. Zampieri N and Chao MV. The p75 NGF Receptor Exposed. *Science*. (2004).

61. Segal, Rosalind A. Selectivity in Neurotrophin Signalling: Theme and Variations. Annual Review of Neuroscience (2003).
62. Makkerh, J. P., Ceni, C., Auld, D. S., Vaillancourt, F., Dorval, G., Barker, P. A. p75 neurotrophin receptor reduces ligand-induced Trk receptor ubiquitination and delays Trk receptor internalization and degradation. EMBO (2005).
63. Aurikko, J. P. Characterization of symmetric complexes of nerve growth factor and the ectodomain of the pan-neurotrophin receptor, p75NTR. J. Biol.Chem. (2005).
64. Gong Y, Cao P, Yu H & Jiang T. Crystal structure of the neurotrophin-3 and p75NTR symmetrical complex.Nature. (2008)
65. Wehrman, T. et al. Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors. Neuron, (2007).
66. David D Ginty and Rosalind A Segal. Retrograde neurotrophin signaling: Trk-ing along the axon. Current Opinion in Neurobiology. (2002)
67. Louis F Reichardt. Neurotrophin-regulated signalling pathways.Phil. Trans. R. Soc. B (2006)
68. Anne M. Fagan, Hong Zhang, Story Landis, Richard J. Smeyne, Inmaculada Silos-Santiago, and Mariano Barbacid TrkA, But Not TrkC, Receptors Are Essential for Survival of Sympathetic Neurons In Vivo.The Journal of Neuroscience, (1996)
69. Underwood CK, Coulson EJ.The p75 neurotrophin receptor.Int J Biochem Cell Biol. (2008).
70. Deckwerth TL, Elliott JL, Knudson CM et al. BAX is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. Neuron., (1996).
71. Lentz SI, Knudson CM, Korsmeyer SJ et al. Neurotrophins support the development of diverse sensory axon morphologies. J Neurosci (1999).

72. Patel TD, Jackman A, Rice FL et al. Development of sensory neurons in the absence of NGF/ TrkA signaling in vivo. *Neuron.*, (2000).
73. Patel TD, Kramer I, Kucera J et al. Peripheral NT3 signaling is required for ETS protein expression and central patterning of proprioceptive sensory afferents. *Neuron.*, (2003).
74. Gene B, Ozdinler PH, Mendoza AE et al. A chemoattractant role for NT-3 in proprioceptive axon guidance. *PLoS Biol.*, (2004).
75. Ernsberger U. Role of neurotrophin signalling in the differentiation of neurons from dorsal root ganglia and sympathetic ganglia. *Cell Tissue Res.*, (2009)
76. Ibanez CF, Ernfors P. Hierarchical control of sensory neuron development by neurotrophic factors. *Neuron.* (2007).
77. Kerry Lee Tucker Michael Meyer and Yves-Alain Barde. Neurotrophins are required for nerve growth during development. *nature neuroscience*, (2001).
78. W.D Snider and I Silos-Santiago, Dorsal root ganglion neurons require functional neurotrophin receptors for survival during development, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* (1996)
79. Jason T. Rifkin, Valerie J. Todd, Lawrence W. Anderson, and Frances Lefcort. Dynamic Expression of Neurotrophin Receptors during Sensory Neuron Genesis and Differentiation. *Developmental Biology* (2000)
80. Ibanez CF., and Patrik E. Hierarchical Control of Sensory Neuron Development by Neurotrophic Factors. *Neuron*, (2007)
81. Molliver DC, Snider WD. Nerve growth factor receptor TrkA is down-regulated during postnatal development by a subset of dorsal root ganglion neurons. *Comp Neurol.* 1997.

82. Eichler ME. and Rich KM.. Death of sensory ganglion neurons after acute withdrawal of nerve growth factor in dissociated cell cultures. *Brain Research*, (1989).
83. Stöckel K, Schwab M, Thoenen H. Comparison between the retrograde axonal transport of nerve growth factor and tetanus toxin in motor, sensory and adrenergic neurons. *Brain Res.* (1975)
84. Johnson EM., Rich KM. and Yip HK. The role of NGF in sensory neurons in vivo. *Trends in neuroscience.*, (1986).
85. Lee, K.F., Li, E., Huber, J., Landis, S.C., Sharpe, A.H., Chao, M.V. & Jaenisch,R. Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system. *Cell*, (1992).
86. Kawaja, M.D. Sympathetic and sensory innervation of the extracerebral vasculature: roles for p75NTR neuronal expression and nerve growth factor. *J. Neurosci. Res.*, (1998).
87. Sari S. Hannila and Michael D. Kawaja Distribution of central sensory axons in transgenic mice overexpressing nerve growth factor and lacking functional p75 neurotrophin receptor expression. *European Journal of Neuroscience*, (2003).
88. KG Ruit, PA Osborne, RE Schmidt, EM Johnson Jr and WD Snider. Nerve growth factor regulates sympathetic ganglion cell morphology and survival in the adult mouse *Journal of Neuroscience*, *J Neurosci.* 1990
89. Campenot RB. Development of sympathetic neurons in compartmentalized cultures. II. Local control of neurite survival by nerve growth factor. *Dev. Biol.* (1982).
90. Martin Kerschensteiner, Martin E Schwab, Jeff W Lichtman & Thomas Misgeld. In vivo imaging of axonal degeneration and regeneration in the injured spinal cord. *Nature Medicine*(2005).
91. Zigmond RE LIF, NGF, and the cell body response to axotomy. *The Neuroscientist.* (1997).

92. Liqun Luo and Dennis D.M. O'Leary. Axon Retraction and Degeneration in Development and Disease. *Annu. Rev. Neurosci.* (2005).
93. John T. Finn, Miguel Weil, Fabienne Archer, Robert Siman, Anu Srinivasan, and Martin C. Raff Evidence That Wallerian Degeneration and Localized Axon Degeneration Induced by Local Neurotrophin Deprivation Do Not Involve Caspases. *The Journal of Neuroscience*, (2000).
94. Martinou JC, Dubois-Dauphin M, Staple JK, Rodriguez I, Frankowski H, Missotten M, Albertini P, Talabot D, Catsicas S, Pietra C. Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* .(1994).
95. Rolf Heumann DL, Meyer M & Thoenen H. Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve *Nature*.(1987).
96. Anton ES, Weskamp G, Reichardt LF, Matthew WD. Nerve growth factor and its lowaffinity receptor promote Schwann cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1994).
97. Yamashita T, Tucker KL and Barde YA. Neurotrophin Binding to the p75 Receptor Modulates Rho Activity and Axonal Outgrowth. *Neuron*. (1999).
98. Ginty D and Segal RA. Retrograde neurotrophin signaling: Trk-ing along the axon. *Current Opinion in Neurobiology* (2002)
99. Letourneau PC.. Neurotrophins and the Dynamic Regulation of the Neuronal Cytoskeleton. *J Neurobiol* (2000).
100. Nusser N, Gosmanova E, Zheng Y, Tigyi G. Nerve growth factor signals through TrkA, phosphatidylinositol 3-kinase, and Rac1 to inactivate RhoA during the initiation of neuronal differentiation of PC12 cells. *J Biol Chem.* (2002).
101. Hironori K, Junko A, Atsushi I, Manabu N. p160 RhoA-binding Kinase ROK α Induces Neurite Retraction. *The Journal of Biological Chemistry* (1998).

102. Alexa A., Schmidt G., Tompa P., Ogueta S., Vazquez J., Kulcsar P., Kovacs J., Dombradi V., and Friedrich P. The Phosphorylation State of Threonine-220, a Uniquely Phosphatase-Sensitive Protein Kinase A Site in Microtubule-Associated Protein MAP2c, Regulates Microtubule Binding and Stability. *Biochemistry*, (2002).
103. Nuydens R, Dispersyn G, de Jong M, van den Kieboom G, Borgers M, Geerts H. Aberrant tau phosphorylation and neurite retraction during NGF deprivation in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun*.(1997).
104. Paves H., Neuman T., Metsis M. and Saarma M., Nerve growth factor induces rapid redistribution of F-actin in PC12 cells, *FEBS Lett*.(1988).
105. Jeon S, Park JK, Bae CD, Park J. NGF-induced moesin phosphorylation is mediated by the PI3K, Rac1 and Akt and required for neurite formation in PC12 cells. *Neurochem Int*. (2010).
106. Ketschek A and Gallo G. Nerve Growth Factor Induces Axonal Filopodia through Localized Microdomains of Phosphoinositide 3-Kinase Activity That Drive the Formation of Cytoskeletal Precursors to Filopodia. *J Neurosci*.(2010)
107. Lloyd A. G and Glen R. Release, storage and uptake of catecholamines by a clonal cell line of nerve growth factor (NGF) responsive pheochromocytoma cells. *Brain Research* (1977).
108. Charalampopoulos I., Dermizaki E., Vardouli L., Tsatsanis C., Stournaras C., Margioris A. N. and Gravanis A.. Dehydroepiandrosterone Sulfate and Allopregnanolone Directly Stimulate Catecholamine Production Via Induction of Tyrosine Hydroxylase and Secretion by Affecting Actin Polymerization. *Endocrinology*.(2005)
109. Nathalie A. Compagnone and Mellon HS. Dehydroepiandrosterone: A potential signalling molecule for neocortical organization during development. *Proc Natl Acad Sci* (1998).

110. Chan JR., Miguel J., Wu CUJ, and Shooter EM.. Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci* (2001).
111. Anton E S, Weskamp G, Reichardt L F, Matthew W D. Nerve growth factor and its low-affinity receptor promote Schwann cell migration. *Proc.Nucl AS* (1994).
112. Bentley CA. and Kuo-Fen L.p75 Is Important for Axon Growth and Schwann Cell Migration during Development. *J Neuroscience*, (2000)
113. Calogeropoulou T, Avlonitis N, Minas V, Alexi X, Pantzou A, Charalampopoulos I, Zervou M, Vergou V, Katsanou ES, Lazaridis I, Alexis MN, Gravanis A. Novel dehydroepiandrosterone derivatives with antiapoptotic, neuroprotective activity. *J Med Chem.* (2009).
114. Zimmermann A and Sutter A. f-Nerve growth factor (3NGF) receptors on glial cells. Cell-cell interaction between neurones and Schwann cells in cultures of chick sensory ganglia. *The EMBO Journal* (1983)
115. John D. Houle. Regeneration of dorsal root axons is related to specific non-neuronal cells lining NGF-treated intraspinal nitrocellulose implants. *Experimental Neurology* (1992).
116. Wood PM. Separation of functional Schwann cells and neurons from normal peripheral nerve tissue. *Brain Res.* (1976).
117. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* (2006).
118. Paves H, Saarma M. Neurotrophins as in vitro growth cone guidance molecules for embryonic sensory neurons. *Cell Tissue Res.* (1997).

119. Gallo G, Lefcort FB, Letourneau PC. The trkA receptor mediates growth cone turning toward a localized source of nerve growth factor. *J Neurosci.* (1997).

120. Nguyen Ba-Charvet KT, Brose K, Ma L, Wang KH, Marillat V, Sotelo C, Tessier-Lavigne M, Chédotal A. Diversity and specificity of actions of Slit2 proteolytic fragments in axon guidance. *J Neurosci.* (2001).

121. Masuda T, Sakuma C, Yaginuma H. Role for netrin-1 in sensory axonal guidance in higher vertebrates. *Fukushima J Med Sci.* (2009).