

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
"CAROL DAVILA", BUCUREȘTI  
ȘCOALA DOCTORALĂ  
MEDICINĂ



*Cercetări privind consecințe ale impregnării etanolice cronice în evoluția leziunilor mielice la pacienți cu traumatisme vertebro-medulare*

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:**

**PROF.UNIV.DR. ONOSE GELU**

**Student doctorand:**

**DR. STOICA SIMONA-ISABELLE**

**2022**

***Părinților mei, cu multă dragoste și admirație!***

## CUPRINS

INTRODUCERE .....	13
I. PARTEA GENERALĂ .....	19
1. Date generale despre traumatologia vertebro-medulară.....	20
2. Alcoolismul cronic și consecințele sale fiziopatologice, respectiv complexe, în leziunile mielice traumatice .....	23
3. Mecanisme de biologie moleculară în traumatismul vertebro-medular și date privind posibilitățile terapeutice actuale .....	28
II. CONTRIBUȚII PERSONALE.....	55
4. Ipoteza de lucru și obiectivele studiului clinic doctoral.....	56
5. Metodologia generală a cercetării .....	62
6. Studiul 1: Analiza retrospectivă a datelor pe un număr de 1057 pacienți.....	68
<b>6.1. Introducere (ipoteza de lucru și obiectivele specifice)</b> .....	68
<b>6.2. Material și metodă/ Pacienți și metode</b> .....	69
<b>6.3. Rezultate</b> .....	69
<b>6.4. Discuții și concluzii parțiale (sectoriale)</b> .....	107
7. Studiul 2: Evaluarea experimentală a neuronilor din culturi celulare tumorale.....	109
<b>7.1. Introducere (ipoteza de lucru și obiectivele specifice)</b> .....	109
<b>7.2. Material și metodă/ Pacienți și metode</b> .....	109
<b>7.3. Rezultate</b> .....	112
<b>7.4. Discuții și concluzii parțiale (sectoriale)</b> .....	144
8. Studiul 3: Evaluarea celulelor neurale din culturi celulare primare.....	154
<b>8.1. Introducere (ipoteza de lucru și obiectivele specifice)</b> .....	154
<b>8.2. Materia și metodă/ Pacienți și metode</b> .....	154
<b>8.3. Rezultate</b> .....	155
<b>8.4. Discuții și concluzii parțiale (sectoriale)</b> .....	159
9. Concluzii și contribuții personale.....	162
BIBLIOGRAFIE.....	170
ANEXE .....	194

### Lista abrevierilor utilizate în text

>9w		Mai mult de 9 săptămâni
μL		Microlitru
μM		Micromolar
2w		2 săptămâni
ADAMTS	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs	Dezintegrina și metaloproteinază cu motive de trombospondină
ADN		Acid DezoxiriboNucleic
ADP	Adenosine DiPhosphat	Adenozin difosfat
AIF	Apoptosis-inducing factors	Factori inductori de apoptoză
AIM2	Absent In Melanoma 2	Absent în melanom 2
AIS	American Spinal Injury Association Impairment Scale	Scala Asociației Americane de Leziuni ale Coloanei Vertebrale
AK		Adenilat Kinază
ALDOA	ALDOlase, fructose-bisphosphate A	Aldolaza, fructozo-bisfosfat A
AMP	Adenosine Monophosphat	Adenozin monofosfat
AMPA	α Amino-3 hydroxi- 5 Metil- 4 – isoxazol Propionat	Acid α Amino-3 hidroxi- 5 Metil- 4 – isoxazol Propionic
ARE	Antioxidant Response Element	Elemente de răspuns antioxidant
AO	Acridine orange	
Apaf-1	Apoptosis protease activating factor-1	Factorul activator al proteazei apoptozei-1
ARN-m		Acidului RiboNucleic mesager
ASC	Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD	Proteină cu formă de pată asociată apoptozei ce conține CARD
ATF	Activating Transcription Factor	Factorul activator al transcripției
ATP	Adenosine TriPhosphate	Adenozin trifosfat
Bcl-2	B-cell lymphoma 2	Proteinelor familiei limfomului cu celule B- 2
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor	Factorul de creștere neurotrofic derivat din creier
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor	Factorul neurotrofic derivat din creier
BH	Bcl-2 Homology	Domeniile de organizare omoloage Bcl-2
Bid	BH3-Interacting-Domain death agonist	Domeniul morții agonist interacțiunii cu BH3
BMK	Big MAPK	
BMP4	Bone morphogenetic proteins 4	Proteinele morfogenetice osoase 4

BMPR		Receptor BMP
CA9	Carbonic Anhydrase 9	Anhidraza carbonică 9
CAD	C-terminal transactivation domain	Domeniul de transactivare c-terminal
CARD	Caspase Activation and Recruitment Domain	Domeniul de activare și recrutare al caspazei
Casp	Caspase	Caspază
Caspases	Cysteinyll, aspartate-specific proteases	Proteaze cistenil-aspartat specifice
CAT		Catalază
CBP	cAMP response element-binding protein-binding protein	Proteina de legare a proteinei de legare a elementului de răspuns AMPc
CD133		Prominina-1
CDH2		Caderina 2
CDK2	Ciclyn Dependent Kinases	Ciclin dependent kinaza 2
CHI3L1	Chitinase 3-like protein 1	Proteina 1 asemănătoare chitinazei 3
Cited2	Cbp/p300 interacting transactivator with Glu/Asp rich carboxy-terminal domain 2	Transactivatorul de interacțiune Cbp/p300 cu domeniul carboxi-terminal bogat în Glu/Asp 2
CO <sub>2</sub>		Dioxide de carbon
CoCl <sub>2</sub>		Clorură de cobalt
COX-2		Cicloxigenaza 2
CREB	cAMP response element-binding protein	Proteina de legare a elementelor de răspuns AMPc (adenozin monofosfat ciclic)
CSTB	CySTatinB	Cistatina B
CTL	C-Type Lectin	Lectinic tip C
CYLD	Cylindromatoză	Acizi grași polinesaturați
DAMP	Damage-Associated Molecular Pattern	Modele moleculare traumatice asociate
DD	Death Domain	Domenii ale morți
DFX		Deferoxamină
DISC	Death-Inducing Signalling Complex	Complexului semnalelor inductoare ale morții
Dkk	Proteinr Dickkopf	
DMEM	Dulbecco's Modified Essential Medium	Mediul de cultură
DMSO	Dimethyl Sulphoxide	Mediu de cultură celulară
EDTA		Acid etilendiaminotetraacetic
EGF-R	Epidermal-Growth Factor Receptor	Receptorul factorului de creștere epidermal
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium	Mediu de cultură celulară
EPO		Eritropoietină

Et-OH		Consum/ expunere etanolic
ERSR	Endoplasmic reticulum stress response	Răspunsul stresului reticulului endoplasmatic
FABPs	Fatty acid binding proteins	Familia proteinelor de legare ale acizilor grași
FADD	Fas-Associated Death Domain	Asociate domeniilor morții Fas, TRAILR1 și TRAILR2
FasL	Fas ligand	Ligand Fas
FBS		Ser fetal bovin inactivat
FDA	Fluorescein diacetate	Diacetat de fluorosceină
Fetu-B		Fetuin B
Fig.		Figură
FIH	Factor inhibiting HIF	Factorul inhibitor al HIF
Flk-1 (KDR)	Kinase insert domain receptor	Receptorul domeniului de inserție al kinazei
Flt	Fms related receptor tyrosine kinase	Tirozin kinaza receptorului fms
GABA	$\gamma$ -AminoButyric Acid	Acid Gama-AminoButiric
GDP	Guanin DiPhosphat	Guanin difosfat
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	Proteină acidă glială
GH18)	Glycosyl hydrolases	18 glicozil hidrolazelor
Glut	Glucose transporter	Transportorul de glucoză
GPX4	Glutathione peroxidase 4	Glutation peroxidaza 4
GSDMD	Gasdermin	Gasdermină D
GSDMD-NT	Gasdermin- N Terminal domain	Domeniu N terminal al gasderminei D
GTP	Guanin TriPhosphat	Guanin trifosfat
Hes	Hairy/enhancer of split	Factor transcriptional
Hey	Hairy Ears, Y-linked	Factor transcriptional
HIF	Hypoxia Inducible Factor	Factor inducibil al hipoxiei
HMGB1	High Mobility Group Box 1	Categoria de grup cu mobilitate ridicată 1
HMOX		Hemoxigenază
Hmsc	Human Mesenchymal Stem Cells	Celule stem mezenchimale umane
Housekeeping		Gena de referință Rt-PCR
HRE	Hypoxic Response Element	Element de răspuns hipoxic
HSP	Hat Shock Protein	Proteină de șoc termic
HSR	Heat shock response	Răspunsul proteinelor de șoc termic
HTB-11 (SK-N-SH)		Linie celulară de neuroblastoma
HTB-14	Human Tumoral Brain 14	Linie celulară de glioblastom
IAP	Inhibitor of apoptosis proteins	Proteine inhibitorii ale apoptozei
IDO	Indoleamine 2,3-DiOxygenase	Indolamin-2,3-dioxigenază

IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1	Factorul de creștere asemănător insulinei-1
IκB		Familia inhibitorilor κB
IKK	κB Inhibitor complex Kinase	Kinazei complexului inhibitor κB
IKK	κB inhibitor complex kinase	Kinaza complexului inhibitor κB
IL-		InterLeuchina -
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase	Sintetazei inductibile a oxidului nitric
IRE-1a	Inositol-requiring protein-1a	Element component ERSR
JNK	c-Jun N-terminal protein Kinase	Protein kinaza c-Jun N-terminală
KCl		Clorură de potasiu
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		Fosfat monopotasic
LAMA	Laminin	Laminină
LCN2		Lipocalina 2
LDH	Lactate DeHydrogenase	Lactat dehidrogenaza
LNGFR	Low-affinity Nerve Growth Factor Receptor	Receptorul cu afinitate scăzută pentru factorul de creșterea nervilor
LPS	Liposaccharides	Lipozaharide
LRR	Leucine Rich Repeat	repetitive bogate în leucină
LTh		Limfocite Thelper
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases	Protein kinazele activate de mitogeni
miRNA	MicroRNA	MicroARN
mM		Millimolar
MMP		Matrix metaloproteaze
MOMP	Mitochondria Outer Membrane Permeabilisation	Permeabilizarea membranei mitochondriale externe
MPT	Mitochondrial Permeability Transition pore	Porilor de tranziție ai permeabilității mitochondriale
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		Fosfat acid de sodiu
NaCl		Clorură de sodiu
NAD	Nicotinamide-Adenine Dinucleotide	Nicotinamin dinucleotid adenină
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Nicotinamidă adenin dinucleotidă fosfat,
NALP1	NACHT leucine-rich-repeat protein 1	Proteina repetitivă bogată în leucină NACHT 1
NCAM-L1	Neural cell adhesion molecule L1	Moleculele de adeziune neuronală L1
NCCD	Nomenclature Committee on Cell Death	Comitetul de nomenclatură pentru moartea celulelor
NCS	Neural stem cells	Celulelor stem neuronale
NEK7	NIMA-related kinase 7	Kinaza înrudită cu NIMA-7
Nemo		Modulatorul esențial al NF-κB

NeuroD1	Neuronal differentiation 1	Factor transcripțional
NFkB	Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	Factor nuclear kappa-amplificator de lanțuri uşoare ale celulelor B activate
NGF	Nerve Growth Factor	Factorul de creştere al nervilor
NIK		Kinaza indusă de NF-kB
NLR	The Nucleotide binding domain Leucine-rich Repeat	Domeniul nucleotidic de legare bogat în secvențe leucinice repetitive
NLRP3 (NALP3)	NLR family pyrin domain containing protein 3 (NACHT, LRR and PYD domains containing protein)	NLR și domeniul pirinic conținând Proteina 3
NLS	Nuclear localization signal	Semnalul de localizare nucleară
NMDA		N-metil D-aspartat
NOD-like receptor	Nucleotide Oligomerization Domain-like receptor	Receptori similari domeniului de oligomerizare a nucleotidelor
Non ET-OH		Fără consum/ expunere la etanol
Non TVM		Fără antecedente de TVM
Notch 1	Neurogenic locus notch homolog protein 1	Proteina omoloagă 1 a inciziei locusului neurogen
Npn		Neuropilin
Nrf2/ARE	Nuclear factor erythroid-related factor 2/ antioxidant response elements	Cale de semnalizare celulară
NT-3	NeuroTrophin-3	Neurotrofina 3
Olig2	Oligodendrocyte transcription factor 2	Factor transcripțional
OMI/ HTRA2		Familie de proteaze serinice
p38		Protein kinaza de 38 kDa
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern	Modele moleculare patogene asociate
PARP	Poly (ADP-Ribose) Polymerase	Polimeraza poli-ADP riboză
PCDH		Protocaderine
PCR	Polymerase Chain Reaction	Reacției de polimerizare în lanț
PCSK1	Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 1	Proprotein convertază subtilizină/ kexină tip 1
PEG		PoliEtilien Glicol
PERK	ERSR-activated protein kinase ribonucleic acid (RNA)(PKR)-like kinase	Element component ERSR
PFKL1	PhosphoFructoKinase, Liver Type 1	Fosfofructokinaza tip hepatic 1
PGK	PhosphoGlycerate Kinase	Fosfoglicerat kinaza
PHD	Prolin-hidroxilază	
PI	Propidium iodide	
PI-3K	Phosphoinositide 3-kinase	Fosfoinozitolkinazei 3

PMN		Polimorfonucleare
PON		Paraoxonaza
Pro-		Reziduu de prolină
PRR	Pattern Recognition Receptor	Modele de receptori de recunoaștere
PUFA	Polyunsaturated fatty acid chain	Acizi grași polinesaturați
pVHL	protein Von Hippel-Lindau	Proteina Von Hippel-Lindau
PYD	PYrin Domain	Domeniul pirinic
qRT-PCR	Quantitative RT-PCR	RT-PCR cantitativ
RCD	Regulated Cell Death	Moarte celulară programată/ reglementată
RE		Reticul endoplasmatic
RIP	Receptor interacting protein	Proteinelor de interacțiune cu receptorul
RLR	Retinoic acid– inducible gene (RIG)-I-Like Receptor	Similari receptorilor inductibili ai genelor acidului retinoic
RLU	Relative Light Unit	Unități de lumină relative, ce măsoară chemoluminiscența la citometria în flux
RNM		Recuperare Neuromusculară
ROS	Reactive Oxygen Species	Specii reactive de oxygen
RT-PCR	Real time PCR	PCR în timp real
SCP1	Synaptonemal complex protein 1	Proteinei complexului sinaptonemal 1
SCUBA		Spitalului Clinic de Urgență ”Bagdasar Arseni”
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1	Factorul 1 derivat din celulele stromale
Sema	Semaphorin	Semaforină
SHH- wnt	Sonic hedgehog signaling	Semnalizare pe calea sonic heddgehog
SIRT2		Sirtuina 2
SMAC/ DIABLO	Small mitochondria-derived activator of caspases/ direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI	Mici activatori ai caspazelor derivați din mitocondrii/ inhibitor direct al proteinei de legătură a apoptozei cu punct izoelectric (pI) scăzut
Smad1	Mothers against decapentaplegic homologue 1	Factor transcriptional
SOD1		Superoxid-dismutaza 1
Sox	Sulfur oxidation	Enzimă oxidantă a sulfului
TAD	Transactivation domain	Domeniul de transactivare
TAK-1	Transforming growth factor-β-activated kinase 1	Kinaza activată de factorul de creștere transformant-β1
TDO	Tryptophan DiOxygenase	Triptofan dioxigenază
TFS		Tampon fosfat salin

TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor beta	Factorul de creștere transformant- $\beta$
TIE1	Tyrosine kinase with immunoglobulin like and EGF like domains 1	Tirozin kinaza cu domenii asemănătoare imunoglobulinei și EGF 1
TIMP1	Tissue inhibitor of metalloproteinase-1	Inhibitorul tisular al metaloproteinazei 1
TLR	Toll-Like Receptor	Receptor Toll-asemănător
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$	Factorului de Necroză Tumorală $\alpha$
TRADD	TNF Receptor-Associated Death Domain	Proteine adaptoare asociate domeniului TNFR-1
TRAF2	TNFR-Associated Factor 2	Factorul 2 asociat TNFR
TRAIL	TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand	Ligandul corelat cu apoptoza indusă de TNF-
TrkB	Tyrosine receptor kinase B	Kinaza receptorului tirozinei B
TVM		Traumatism Vertebro-Medular
U87 MG		Linie celulară de glioblastom
UPR	Unfolded protein response	Răspunsul proteinelor neplicaturate
UV		Ultraviolete
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	Factorul de creștere endotelial vascular
VEGF-R	VEGF- Receptor	Receptor VEGF
Wnt	Wingless/Integrated	Cale de semnalizare celulară
Wnt/PCP	Wnt/Planar Cell Polarity	
XBP1	X-box binding protein 1	Element component ERSR
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein	Inhibitorii proteinelor apoptotice X-linkați

## Lista lucrărilor personale publicate

1. **Simona Isabelle Stoica**, Ioana Tănase, Vlad Ciobanu, Gelu Onose

*"Initial researches on neuro-functional status and evolution in chronic ethanol consumers with recent traumatic spinal cord injury."*

J Med Life. 2019 Apr-Jun;12(2):97-112. doi: 10.25122/jml-2019-0026. PMID: 31406510; PMCID: PMC6685305. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31406510>

2. **Simona Isabelle Stoica**, Ioana Tănase, Gelu Onose

*"Influences and consequences resulting in addictions in general and to chronic alcoholism, especially for patients with spinal cord injury"*

Balneo and PRM Research Journal. Vol.12, No.2 June 2021 p: 129–132  
<http://dx.doi.org/10.12680/balneo.2021.432>

3. **Simona Isabelle Stoica**, Coralia Bleotu, Vlad Ciobanu, Anca Mirela Ionescu, Irina Albadi, Gelu Onose, Constantin Munteanu

*"Considerations about Hypoxic Changes in Neuraxis Tissue Injuries and Recovery"*  
Biomedicines. 2022 Feb 18;10(2):481. doi: 10.3390/biomedicines10020481.  
<https://www.mdpi.com/2227-9059/10/2/481>

4. **Simona Isabelle Stoica**, Gelu Onose, Mihail Hoteteu, Constantin Munteanu

*"Effects of ethanol and deferoxamine on rat primary glial cell cultures, in regard with ischemia induced by traumatic spinal cord injury"*

Balneo and PRM Research Journal. 2022, 13(2): 502 <http://bioclima.ro/Balneo502.pd>

5. **Simona Isabelle Stoica**, Ioana Madalina Pitica, Ana Iulia Neagu, Laura Denisa Dragu, Lacramioara-Elena Radu, Lilia Matei, Mihaela Chivu-Economescu, Gabriela Ion, Laura Georgiana Necula, Constantin Munteanu, Aurelian Angheliescu, Gelu Onose, Carmen Cristina Diaconu, Coralia Bleotu

*" The hypoxic stress effect in chronic ethanol exposure of neuronal cells"*

Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, x FOR PEER REVIEW

## INTRODUCERE

Această teză de doctorat vine la întâlnirea dintre probleme ale lumii moderne (în care stilul de viață activ predispune la accidente severe în condițiile saltului tehnologic) și consecințele alegerilor alimentare adictive (care au influențat societatea umană din cele mai vechi timpuri) [1]. În aceste condiții, o patologie cu frecvența în creștere este cea a traumatologiei vertebro-medulare, care afectează toate categoriile populaționale, cu riscul apariției disfuncțiilor pe multiple paliere: individual, familial social [2] [3].

Ne-au contrariat observațiile privind cazuistica din Clinica de Recuperare Neuromusculară (RNM) a Spitalului Clinic de Urgență "Bagdasar Arseni" (SCUBA) referitoare la diferențe frecvente între starea neuro-disfuncțională obiectivă după traumatisme vertebro-medulare (TVM) între pacienți cunoscuți cu abuz cronic etanolic și cei care nu aveau astfel de tulburări comportamentale [4]. Astfel, cu avizul Comisiei de Etică a Spitalului (nr 35517/25.11.2015) am inițiat studiul clinic aferent prezentei teze doctorale cu scopul de a cerceta relația etilism-status neuro-disfuncțional și evolutiv recuperator, neuromuscular, post TVM.

***Ipoteza de lucru*** se referă la verificarea obiectiv-statistică și, în limita posibilităților, prin investigații paraclinice inclusiv la nivel intim tisular și molecular a influenței pozitive (benefice) a alcoolismului cronic asupra evoluției (acute și subacute) a statusului clinic neuro-disfuncțional la pacienții cu TVM, în condițiile în care abuzul cronic etanolic se știe că determină afectări structurale și funcționale în țesutul nervos.

***Obiectivul general*** al acestui studiu doctoral este analiza și încercarea de a explica mai sus menționata constare, oarecum surprinzătoare, în contextul verificării Ipotezei de lucru.

***Obiectivele specifice*** sunt:

- obiectivarea semnificației statistice a constatării clinice din ipoteza de lucru (prin analiza retrospectivă a cazurilor de pacienți cu TVM, internați în Secția de RNM a SCUBA în perioada 01.01.2005 până în 01.06.2022);
- încercarea prospectivă de a explica și identifica, prin demersuri de cercetare fundamentală, a mecanismelor intime posibil implicate în generarea evoluției (paradoxal) mai favorabile a țesuturilor mielice în condiții de agresiune, în culturi celulare nemuritoare tumorale;
- încercarea prospectivă de a explica și identifica, prin demersuri de cercetare fundamentală, a mecanismelor intime posibil implicate în generarea evoluției (paradoxal) mai favorabile a

țesuturilor mielice în condiții de agresiune a celulelor gliale din culturi celulare primare (de șobolan).

Lucrarea este structurată în două secțiuni:

- **Partea generală** care trece în revistă date de actualitate științifică privind domeniile cercetate (traumatologia vertebro-medulară, influențele impregnării etanolice cronice asupra organismului uman în general și asupra sistemului nervos central- cu focalizare principală pe măduva spinală- în special și o scurtă sistematizare a principalelor mecanisme ce țin de biologia moleculară a evenimentelor lezionale post TVM, și interferențe ale acestora cu evoluția clinică neurofuncțională, inclusiv recuperatorie în stadiile de la acut până la subacut).
- **Contribuțiile personale** cuprind o analiză retrospectivă clinico-statistică a problematicii studiate și o cercetare prospectivă experimentală a dinamicii la nivel intim în biologia neuronală și gliocitară, inclusiv de la nivel mielic în condiții experimentale cu elemente propensive reproducerii unor condiții asemănătoare/ parțial asemănătoare celor din leziunile mielice posttraumatice.

Primul demers a fost să ne documentăm observațiile clinice prin evaluarea stadiului cunoașterii problematicii la nivelul comunității științifice internaționale [4]; apoi am realizat un studiu clinic retrospectiv exhaustiv al pacienților internați în Secția RNM SCUBA cu diagnostice de tetraplegie sau paraplegie post-TVM (din arhiva Clinicii menționate în perioada 01.01.2005- 01.06.2022) alcătuiind o bază de date ce cuprinde 1057 astfel de cazuri, la care am efectuat analiza statistică a datelor obiective extrase din foile de observație clinică ale respectivelor persoane internate, inclusiv utilizând parametrii de evaluare clinico-funcțională cuantificați prin scalele/ grilele specifice de măsurare (AIS, Frankel). Analiza retrospectivă a datelor aferente celor 1057 pacienți ne-a dezvăluit că acestea nu prezintă o distribuție normală (având în vedere criteriile selective limitative aplicate), însă există corelații semnificative statistic între consumul abuziv cronic etanolic și statusul, precum, și evoluția favorabile, din punct de vedere motor, cât și al randamentului recuperării motorii și senzitive la astfel de traumatizați vertebro-medular.

Ulterior, am realizat un studiu prospectiv pe linii celulare tumorale neuronale și gliale (în Departamentul de Patologie Moleculară și Celulară al Institutului de Virusologie ”Ștefan S. Nicolau”) pe modele de suferință celulară (prin traumatizare mecanică și intervenții hipoxemiante) în culturi celulare neurale tumorale HTB-11 și U87 MG tratate excesiv cu

alcool etilic și coresponderent în timp ca vechime cu alcoolismul. Am observat diferențe morfologice între celulele neurale (neuroni și gliocite) crescute cu și fără tratament etanolic, precum și între celulele expuse și neexpuse condițiilor traumatice (prin zgâriere și hipoxie) însă fără ca aceste deosebiri structurale să pericliteze supraviețuirea celulară. Apoi am analizat (comparativ între celulele expuse și neexpuse la tratamentul etanolic) răspunsul molecular prin studierea cronologică a evenimentelor postraumatice celulare (după cum se cunoaște din literatură; inițial, după producerea unui traumatism vertebro-medular, au loc procese de necroză celulară, care - prin afectarea excitoconductibilității membranare - determină efluxul de potasiu în mediul extracelular- cu depolarizare de impact - și influxul de calciu, urmate de producția în exces de glutamat, care determină un status de hiperexcitabilitate locală, ce - alături de ischemie prin sângerare și tulburări vaso-spastice - determină modificări *hipoxice*, care induc rapid *disfuncții metabolice și stres oxidativ local*, cu activarea răspunsului imun înăscut la nivel de *inflamazom*, cu rol defensiv, fiind urmate de inițierea mecanismelor *apoptotice* - implicate în procese atât neuroprotective, cât și neurodegenerative - precum și de *influențarea moleculelor de semnalizare celulară*, cu reactivarea funcțională a unor *căi neurale embrionare*). Evaluarea de biologie moleculară s-a realizat în paradigmă conceptuală proteozomică, prin evaluarea expresiei genice (la nivel de ARN mesager) și de sinteză proteică, specifice etapelor cronologice postraumatice descrise mai sus. Expresia genică s-a evaluat prin reacție de polimerizare în lanț în timp real (real time polymerase chain reaction - RT PCR) iar sinteza proteică a fost cuantificată prin tehnica DotBlot, ce a folosit anticorpi specifici. A mai fost evaluat și ciclul celular prin citometrie în flux iar imaginile culturilor celulare au fost realizate la microscop cu inversie și fluorescență (după realizarea unor colorații speciale).

Celulele impregnate cu etanol (deși au o rezistență mai scăzută la stres) au prezentat capacitatea regenerativă de a reumple golurile din testul zgârierii similar cu celulele netratate cu alcool etilic.

Evaluarea răspunsului la hipoxie (obiectivat prin markerii moleculari: Hypoxia Inducible Factori-1alfa – HIF-1 $\alpha$ , Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells-beta - NFk- $\beta$ , Vascular Endothelial Growth Factor- VEGF, Fms related receptor tyrosine kinase -1 – FLT-1, Transforming Growth Factor beta - TGF- $\beta$ , Protocaderine12 - PCDH12, Hemoxigenase1 - HMOX1, Hemoxigenase2 - HMOX2, Carbonic Anhydrase 9 - CA9, Hypoxia Inducible Factori-2alfa - HIF-2 $\alpha$ , Indoleamine 2,3-DiOxygenase - IDO) al celulelor de neuroblastom expuse la tratament cronic etanolic a arătat că se produc următoarele efecte

ale alcoolului etilic: de scădere a neurodegenerării și a neurotoxicității de ameliorare funcțională a răspunsului/ rezilienței metabólico-functionale a neuronilor, deci neuroprotector, antiinflamator, antiapoptotic, de angiogeneza, de remodelare sinaptică/ neuroplasticitate.

Studiul stresului celular (prin moleculele: interleuchina-1 $\beta$  - IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  - Tumor Necrosis Factor, interleuchină-6 -IL-6, interleuchină-8 -IL-8, interleuchină-4 -IL-4, Catalază, Claspină, Clusterină, Hat Shock Protein27- HSP27, Hat Shock Protein60 - HSP60, Hat Shock Protein70 - HSP70) a arătat că expunerea cronică la etanol induce (asupra celulelor neurale tratate cu agenți hipoxemianți) următoarele efecte: antioxidant, de reglarea adaptativă a metabolismului energetic, neuroprotector, antiinflamator, antiapoptotic, anticatricial, inhibitor al regenerării nervoase ca răspuns defensiv, de refacere a terminațiilor nervoase, de inhibiție a fenomenelor de dieback axonal.

Cercetarea inflamazomului (prin moleculele: caspazei-1, interleuchinelor-1 $\beta$ , -18, NLR family pyrin domain containing protein 3 - NLRP3, kinaza Receptor Interacting Protein - RIP, Cicloxigenaza2 - COX-2, Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells - NF $\kappa$ B1, proteina p38 $\alpha$  fosforilată - Phospho-p38 $\alpha$ , Paroxonaza1 - PON1, Paroxonaza2 - PON2, Paroxonaza3 - PON3) a descoperit următoarele influențe ale consumului cronic de etanol asupra celulelor neuronale stresate hipoxic: antiinflamator, de diminuarea piroptozei, prosupraviețuire celulară/ rezistență biologică.

Tratamentul cronic cu etanol al culturilor neuronale nemuritoare (de neuroblastom), expuse la condiții experimentale hipoxemiante, a produs următoarele consecințe la nivel de metabolism glucidic celular (prin moleculele: Adenilkinaza3 - AK3, Fetuina-B - FETU-B, PhosphoGlycerate Kinase - PGK1, Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 1 - PCSK1, PhosphoFructoKinase, Liver Type 1 - PFKL1, High Mobility Group Box 1 - HMGB1, Glucose transporter 1 - GLUT1, Tyrosine kinase with immunoglobulin like and EGF like domains 1- TIE1, LactatDeHidrogenaza B - LDH B): epuizare energetică și de creștere a nivelului acidului lactic, dar și de stimulare a activității proteolitice a insulinei, îmbunătățirea randamentului utilizării glucozei, cu favorizare a pătrunderii intracelulară a acesteia, și (inclusiv) cu remodelare vasculară.

Studiul apoptozei (prin moleculele: Caspazele -3, -7, -8, -9, -10, HTRA2/Omi, Livin, p21, p27/Kip1, Phospho-p53 (S15), Phospho-p53 (S46), Phospho-p53 (S392), Phospho-Rad17 (S635), Small mitochondria-derived activator of caspases/ direct inhibitor of apoptosis-

binding protein with low pI - SMAC/Diablo, Survivin, Tumor Necrosis Factor Receptor - TNF R, X-linked inhibitor of apoptosis protein – XIAP, Bad, Bax, Bcl-2, Bcl-x, Pro-Caspaza-3, Cleaved Caspase-3, Catalază, Inhibitor of apoptosis proteins-1 - cIAP-1, Inhibitor of apoptosis proteins 2 - cIAP-2, Claspină, Clusterină, Citocrome C, TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand1 -1- TRAIL R1, TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand2 - TRAIL R2, Fas-Associated Death Domain - FADD, Fas) a arătat ca expunerea cronică la etanol determină efecte antiapoptotice (pe calea extrinsecă și cea intrinsecă), inclusiv în condiții de intervenții hipoxemiant.

Evaluarea moleculelor de semnalizare intercelulară (Laminin4 - LAMA4, Chitinase 3-like protein 1 - CHI3L1, Lipocalina2 - LCN2, Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 - TIMP1, Semaforina3 - SEMA3) și a căilor embrionare de comunicare (Sonic hedgehog signaling – SHH, Prominina-1 - CD133, Neurogenic locus notch homolog protein1 - Notch1, Hairy Ears, Y-linked – Hey, Bone morphogenetic proteins 4 - BMP4, Hairy/enhancer of split – Hes, Wingless/Integrated – WNT, Caderina 2 - CDH2, Vimentina – Vim, Nestina – Nestin, Neuronal differentiation 1 - NeuroD1, Glial fibrillary acidic protein - GFAP, Oligodendrocyte transcription factor 2 - Olig2) la neuronii (tip neuroblastom) tratați cronic cu alcool etilic a evidențiat următoarele consecințe: diminuare a cicatricilor nevraxiale; stimularea dezvoltării neuritelor, a remodelării vasculare, neurogenezei, sinaptogenezei, neuroregenerării; creșterea capacității de diferențiere către neuroni sau celule gliale.

Cum studiul pe celule tumorale prezintă marele dezavantaj al diferențelor semnificative genetice și metabolice, față de celulele mielice netumorale am realizat (în Nucleul de Cercetare RNM SCUBA) încă un studiu prospectiv asupra relației dintre expunerea etanolică și suferința (vertebro-)medulară traumatică în culturi celulare primare de șobolan nou-născut cultivate în expunere etanolică (cu încercarea de a reproduce, în limita posibilităților, corespondența temporală cu alcoolismul cronic la om). Analiza s-a realizat prin evaluarea sintezei proteice (cu ajutorul testului ELISA) la nivel de inflamazom (cu evaluarea IL-6) și a procesului de apoptoză (prin determinarea TNF- $\alpha$ ) în celulele culturilor primare gliale cerebro-spinal de la șobolan. Am observat că, în culturile primare cu astfel de celule gliale, stresul indus de tratamentul etanolic, suplimentat de hipoxie accentuează comunicarea inflamatorie intercelulară, fără însă a conduce la nivele marcate de moarte celulară programată.

Ultimul aspect al cercetării noastre a vizat analiza prospectivă a fenomenelor la nivel biologic uman, motiv pentru care am realizat analiza distribuției citochinelor (inflamatorii și proapoptotice) în lichidul cefalo-rahidian recoltat de la câțiva pacienți cu dura mater lezată în urma unui TVM (recoltare posibilă din considerente bioetice numai în astfel de situații, ceea ce explica numărul mic al acestor cazuri). Evaluarea experimentală a LCR s-a realizat prin electroforeză și metoda ELISA pentru TNF- $\alpha$  și IL-6. Analiza LCR la pacienții consumatori cronici de etanol în exces a evidențiat prezența tendințelor proinflamatorii și proapoptotice, posibil inclusiv ca mecanism de izolare și protecție a zonei medulare lezate, bineînțeles numărul cazului studiate fiind insuficiente pentru prelucrare și analiză statistică.

În ansamblu, prezenta teză de doctorat abordează un subiect considerăm deosebit de interesant și întâlnit doar tangențial – concret nu l-am regăsit studiat din perspectiva ipotezei noastre de lucru - în literatură, ceea ce, mai ales în condițiile în care, din păcate, în prezent încă nu există nici o formă de intervenție terapeutică în măsură să vindece efectiv leziunile medulare, inclusiv traumatice (consecințele neurodisfuncționale ale acestora sunt nu de puține ori devastatoare prin uriașul lor potențial invalidant, adesea pe viață), deschide o cale de explorare a unui domeniu care, în condițiile unor aprofundări suplimentare, ar putea conduce la identificarea de soluții terapeutico-recuperatorii contributive.

## **I. PARTEA GENERALĂ**

### **1. Date generale despre traumatologia vertebro-medulară**

Traumatismul vertebro-medular (TVM) „reprezintă cauza unui deficit plegic, cu pierderea temporară sau permanentă a controlului nervos asupra unui teritoriu somatic și vegetativ”, provocat prin afectarea coloanei vertebrale și măduvei spinării (și nervilor spinali), după: acte de violență, accidente rutiere, căderi, accidente sportive [4] [5] [6]. Incidența TVM este de 10.4–83 cazuri/milion de pacienți/an (adică aproximativ 768 473 de cazuri anuale), afectând mai ales pacienții din grupa de vârstă de 30 ani [7], fiind o provocare complexă (prin consecințele sale individuale, familiale și sociale) [8] [9]. Mortalitatea după TVM este direct proporțională cu înălțimea nivelului lezional (vertebro-medular), vârsta înaintată a victimelor și forța de impact traumatic [9].

În organism, TVM produce modificări variate: reprezentate de leziuni primare (consecințele forței de impact traumatic asupra coloanei vertebrale: flexie, extensie, rotație, compresiune; toate afectând măduva spinală, provocând contuzie medulară, cu disfuncții neurologice tranzitorii sau permanente, în funcție de severitatea injuriei) și secundare (în care suferința

nervoasă din zona de lezată inițial se întinde în jur, mai ales prin fenomenele ischemice produse de leziuni vasculare, tromboze capilare, vasospasm și edem; cu apariția unui dezechilibru metabolic și energetic local semnificativ) [8] [9].

Tratamentul etiologic al suferințelor vertebro-medulare traumatice este încă în stadiul de cercetare, fără să fie cunoscute molecule terapeutice apte să inducă dispariția deficitelor motorii și tulburărilor de sensibilitate consecutive TVM.

Recuperarea după traumatismle vertebro-medulare este un proces anevoios (care are la bază resursele spinale de reorganizarea structurilor nervoase ce au supraviețuit posttraumatic), de lungă durată de cele mai multe ori; fiind rezultatul muncii echipei de specialitate (formată din: medic de recuperare, kinetoterapeut, psihologul clinician, asistent medical, infirmieră, brancardier, ergoterapeut, la care se alătură membrii familiei pacientului) prin promovarea supraviețuirii pacientului, cu adoptarea unui stil de viață adaptat noii condiții [11] [12].

## **2. Alcoolismul cronic și consecințele sale fiziopatologice, respectiv complexe, în leziunile mielice traumatice**

Alcoolul (etic) este, poate, cel mai ieftin și utilizat antidepressiv de către mulți oameni de-a lungul timpului. Consecințele acestui fapt sunt multiple, căpătând dimensiuni de problemă a societății. Creierul nostru dispune de căi de recompensă și de toleranță care transformă rapid consumul ocazional de etanol în stil de viață vicios.

Alcoolul etilic afectează dezvoltarea organismului uman în toate etapele sale, începând din timpul vieții intrauterine, influențând indivizii din toate categoriile de vârstă, sex, stil de viață sau alte comorbidități.

Definim etilismul cronic drept o expunere îndelungată (mai mare de 7 zile/ două săptămâni) la doze mari de etanol: mai mult de 8 unități etanolice standard zilnice (standard drink per day= 10 mg etanol) [26] [27].

Din punct de vedere molecular, structurile etanolului și polietilen glicolului (o moleculă cercetată în tratamentul TVM) au multe cu proprietăți fizico-chimice în comun, deoarece fac parte din serii omoloage ale clasei alcoolilor.

Tabel.1. 1. Caracteristici fizico-chimice și structurale ale etanolului și PEG (preluat și tradus din articolul propriu [3]) [42,43]

<b>ALCOOLI/ POLIALCOOLI</b>	<b>ETANOL (alcool etilic, metilcarbinol, hidroxil de etil,</b>	<b>POLIETILENGLICOL (oxid de polietilenă, polioxietilenă)</b>
---------------------------------	--	---

	<b>monoxid de etan, etiol, hidroxiestan, metilcarbinol)</b>	
Modalitate de obținere	Fermentația cerealelor/ fructelor/ unor plante	Procedee de biosinteză industrială
Proprietăți fizice	Lichid, volatil, inflamabil, miros caracteristic	Variabile în funcție de greutatea moleculară: lichid sau semisolid/ solid
Structură	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -OH	H-(O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -OH
Greutate moleculară	46,076844 g/mol	18.02 + 44.05 ng/mol (300- 10000000 g/ mol)
Densitate	0.7894 g/cm (la 25 ° Celsius)	Variabilă
Punct de fierbere	78,37 ° Celsius	182 – 287 ° Celsius
Punct de îngheț	-114 ,4 ° Celsius	Variabil
Proprietăți chimice	Alcool solubil în apă.	Alcooli solubili în apă, metanol, etanol, acetonitrit, benzen, diclormetan, acetonă. Insolubili în dietileter, hexan
Efecte biologice	Traversează bariera hemato-nevrală, euforizant, sedativ, anxiolitic/ antidepresiv, antiseptic, solvent, antitusiv, antidot, combustibil (7 kcal/gram)	Laxativ osmotic, pelicule de acoperire pentru molecule de medicamente, vector în terapia genică

Tabel.1.2. Farmacocinetica etanolului și PEG (preluat și tradus din articolul propriu [3]) [43–47]

<b>ALCOOLI/ POLIALCOOLI</b>	<b>Etanol</b>	<b>Polietilenglicol (PEG 400/2000 / 5000)</b>
Absorbție	Stomac, intestin subțire Vârf al concentrației sangvine în 30-60 minute	Administrare intravenoasă
Distribuție	Distribuit oriunde în organism Rata de extracție = 0.2 Nu există proteine transportoare plasmatic Ținta: ficatul, cordul, nevralul.	0.07% pe gram de țesut nevral

Eliminare	Limitată la maxim 8.5 g/h/70 kg Metabolizare hepatică (predominantă) *alcooldehidrogenază, *aldehiddehidrogenază Expir (0.7%) - 0.16 L/h Urină (0.3%) - 0.06 L/h Transpirație (0.1%) - 0.02 L/h	PEG 2000- 1.4 ml/ min/ kg PEG 5000- 0.4 ml/min/kg
-----------	---	--

Tabel. 1.3. Farmacodinamia etanolului și a PEG (preluat și tradus din articolul propriu [2]) [43,47]

ALCOOLI/ POLIALCOOLI	Etanol	Polietilenglicol
Mecanism de acțiune	Receptor NMDA antagonist Receptor GABA- A agonist Receptor 5HT3 agonist Stimulează receptorii opioizi și producția de dopamină	Limitează leziunile membranare secundare înjuriiilor: scade eliberarea intracelulară a speciilor reactive de oxigen, a radicalilor liberi; stabilizează membranele organitelor celulare împotriva peroxidării lipidice
Efecte	Doze mici (0.33 g/kg): îmbunătățesc viteza de reacție și acuitatea vizuală, memorarea Expunere îndelungată (aprox. 2.0 g/kg) : toleranță, dependență psihică și alcoolism Antidot intoxicația cu etilenglicol, cu metanol Scăderea neurotoxicității datorată receptorilor NMDA	Fuziunea și reparația membranelor celulare lezate

### 3. Mecanisme de biologie moleculară în traumatismului vertebro-medular și date privind posibilitățile terapeutice actuale

Traumatismul vertebro-medular este definit ca un eveniment lezional acut, ce se produce la nivel medular și al structurilor sale adiacente. Modificările posttraumatice se manifestă încă din stadiul inițial, care se întinde în intervalul de 2-48 ore post lezionale [48]. Sunt descrise următoarele etape după TVM: *faza acută* (la 0-48 ore post TVM), *subacută* (între 2 zile și 2 săptămâni posttraumatice) și *cronică* (consecutivă fazei subacute) [49]. Faza acută se subîmparte într-o *fază imediată* (în primele 0-2 ore) și o *fază acută precoce* (la 2-48 ore posttraumatic). În faza acută imediată se produc rupturi axonale, hemoragii în

substanța cenușie, ischemiei locale, moarte neuronală. Acum se activează microgliile, cu eliberare de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  (chiar din primele minute de la producerea leziunii) și cu producerea de glutamat în cantități citotoxice [50]. Modificările structurale și funcționale induse de TVM își au originea în disfuncții celulare nervoase la nivele diferite, începând cu procesul de diviziune celulară (în cazul gliocitelor și celulelor stem neurale).

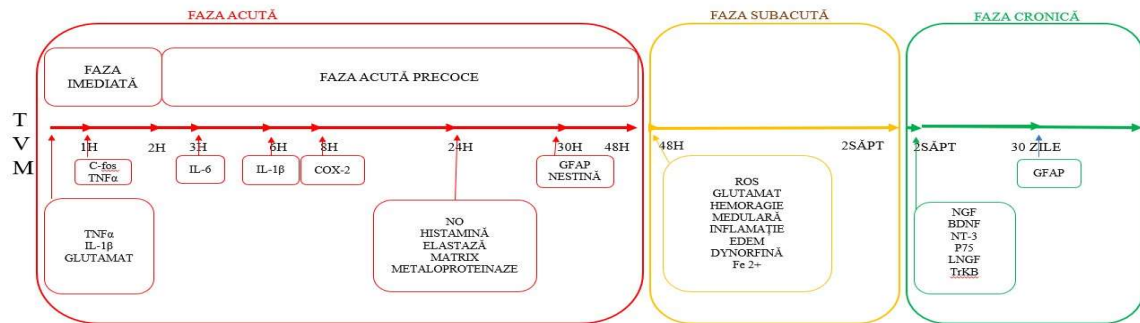


Fig. 1.1. Fazele evolutive după TVM și modificările moleculare produse în țesutul nervos. Se disting următoarele etape după TVM: faza acută (în primele 48 ore posttraumatice) este alcătuită din fazele imediată (care se petrece în primele 2 ore după TVM) și din faza acută precoce (între 2 ore și 48 ore postraumatice), faza subacută (cu o durată de 2- 14 zile după TVM) și faza cronică (care începe după primele 2 săptămâni posttraumatice). În momentul producerii TVM se eliberează (în țesutul nervos): TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , glutamat; la o oră postraumatică se eliberează: c-fos, TNF $\alpha$ ; la 3 ore după TVM se eliberează: IL-6; la 6 ore se eliberează IL-1 $\beta$ ; la 8 ore se produce: COX-2; iar la 24 ore se sintetizează: oxid nitric, histamină, elastază, matrix metaloproteinaze; în timp ce la 30 ore postraumatice se produc: GFAP și nestină; la 48 ore după TVM se produc (pe fondul sângerării spinale și a edemului local): specii reactive de oxigen, dinorfină și ioni ferici; după 28 de zile postraumatice sunt produse:NGF, BDNF, NT-3, LNFG, TrKB; iar la 30 zile după producerea TVM se sintetizează GFAP.

**Hipoxia** se definește ca diminuarea sau privarea de oxigen la nivelul organelor, țesuturilor, celulelor prin scăderea aportului de oxigen (datorată afectării rețelei vasculare, anemiei) sau prin augmentarea consumului de oxigen (ca în creșterea subită a ratei de proliferare celulară) [58].

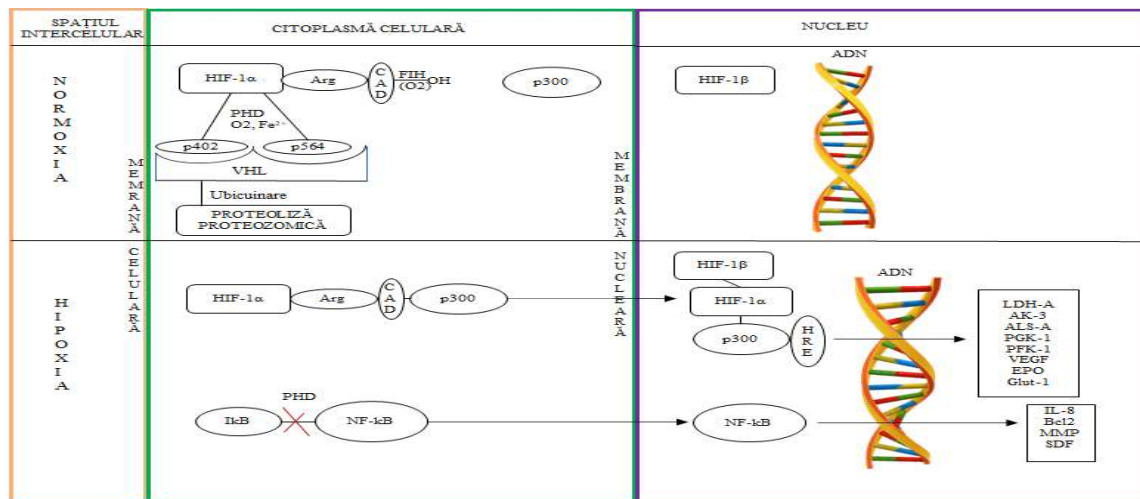


Fig. 4.1. Mecanismele celulare hipoxice cu influența presiunii parțiale a oxigenului,  $pO_2$ , asupra acidului dezoxiribonucleic, ADN, HIF, cu participarea, FIH; ARG; CAD; proteinei 300, p300, VHL și PHD. Observăm activarea (pe calea atipică) a NF- $\kappa$ B (cu implicarea I- $\kappa$ B), a HRE cu stimularea expresiei genelor: LDH-A; AK-3; ALD-A; PGK-1; PFK-L; VEGF; EPO; Glut-1; IL-8; Bcl-2; MMP; SDF (desen preluat și tradus din articolul propriu [209])

**Inflamazomul** este un complex citosolic multiproteic care funcționează ca un receptor intracelular pentru stresul celular și din mediul înconjurător [98] mediind răspunsul imun înăscut, ce poate provoca leziuni tisulare când se activează excesiv [99] [100].

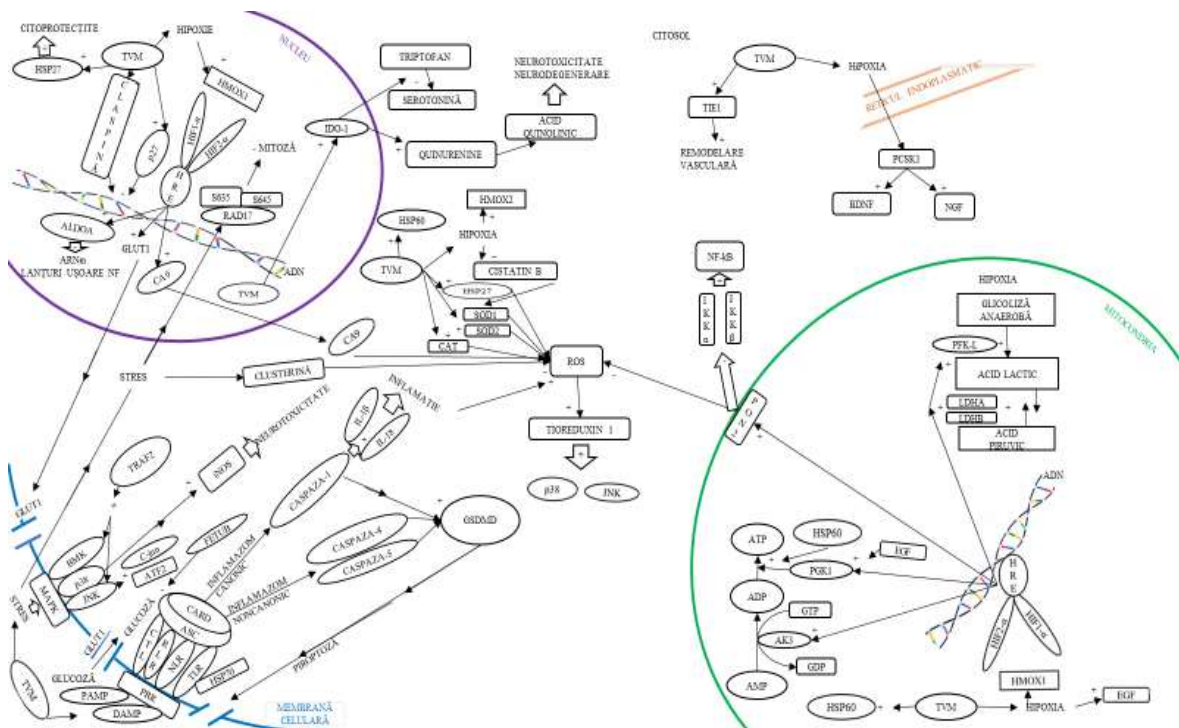


Fig. 1.2. Modificări metabolice și inflamatorii inițiale după TVM. Evenimentele din TVM duc la apariția DAMP și PAMP (în spațiul intercelular), care interacționează cu PRR, apoi cu CTL, RLR, NLR și TLR (a cărei activitate este controlată și de către HSP70), care determină activarea ASC (și a CARD din interiorul său), urmată de interacțiunea caspazică: cu caspaza-1 (ce duce la inflamație prin stimularea IL-1 $\beta$  și IL-18, pe calea canonică de activare a inflamazomului) sau cu caspazele -

4 și -5 (care stimulează GSDM și piroptoza pe calea non-canonice de activare a inflamazomului). Steresul produs de TVM poate activa și MAPK membranare, care apoi inițiază căile p38 (cu stimularea iNOS ce duce la neurotoxicitate) și căile BMK (care este stimulată de TRAF2) și JNK (activată de TRAF2, care stimulează c-Jun și ATF2). Stresul produs după TVM poate acționa și la nivel nuclear, prin intermediul RAD17 (care este fosforilată la S635 și S645, inhibând activitatea mitotică). Tot la nivel nuclear, TVM poate duce la activarea transcripțională a IDO-1 care poate inhiba sinteza serotoninei din triptofan sau poate stimula calea acidului quinerinic (cu riscul producerii neurotoxicității și a neurodegenerării). Însă stresul poate activa și clusterina citoplasmatică care poate inhiba ROS (cu rol antioxidant). ROS activate pot stimula tioredoxina1, ce poate stimula proteinele JNK și p38 din calea MAPK. TVM la nivel nuclear poate stimula și sinteza HSP27 (cu rol citoprotector), a claspinei și a p27 (care inhibă activarea ADN). Iar hipoxia consecutivă TVM influențează ADN (nuclear și mitocondrial) prin stimularea HMOX1, care determină creșterea nivelurilor HIF-1α și HIF-2α, care apoi activează HRE, determinând apoi sinteza ALDOA (cu stimularea ARNm pentru lanțurile ușoare ale neurofilamentelor), a GLUT1 (care favorizează intrarea glucozei în interiorul celulei, iar FETUB produce rezistență la acțiunea glucozei), a CA9. La nivel mitocondrial TVM stimulează HSP60, iar hipoxia consecutivă duce la stimularea HRE care controlează metabolismul energetic celular prin implicarea în fosforilarea ADP (stimulând AK3), în fosforilarea ADP (stimulând PGK1), în producerea acidului lactic (prin sinteza PFK-L), în conversia bilaterală lactat-piruvat (prin sinteza LDHA și LDHB). Hipoxia mitocondrială stimulează și EGF cu posibile consecințe în remodelarea vasculară. Iar HRE stimulează și PON2, având consecințe în activarea NF-κB (prin inhibarea IKKα și IKKβ). Pe de altă parte, TVM poate inhiba ROS prin stimularea SOD1 și a SOD2, a CAT. La nivel citosolic, SCI poate stimula TIE1 (implicată în stimularea remodelării vasculare); iar la nivelul reticulului endoplasmic, determină creșterea producerii BDNF și a NGF (prin intermediul PCSK1).

**Moartea celulară**, conform clasificării Comitetului de nomenclatură pentru moartea celulelor (Nomenclature Committee on Cell Death- NCCD) din 2018 poate fi de două tipuri: accidentală (accidental cell death- ACD) și programată/ reglementată (regulated cell death - RCD) [120][9]. ACD este o formă de moarte celulară instantanee produsă de dezintegrarea membranei celulare prin acțiunea factorilor agresivi (fizici, chimici sau mecanici), iar RCD este consecința activării unei sau mai multor căi de semnalizare celulară (putând fi influențată farmacologic) [9][120].

După TVM, moartea celulară se produce prin ambele căi: ACD și RCD [120]. Moartea celulară neurală se realizează prin: apoptoză, necroză, necroptoză, ferroptoză, piroptoză, autofagie, paratantoză, oncoză [121][122] [123] [55] [9][120][124].

**Apoptoză** este un proces foarte bine reglat, noninflamator de moarte celulară programată, esențial pentru reînnoirea permanentă (la nivel de celular și al întregului organism) [125] [124] [126].

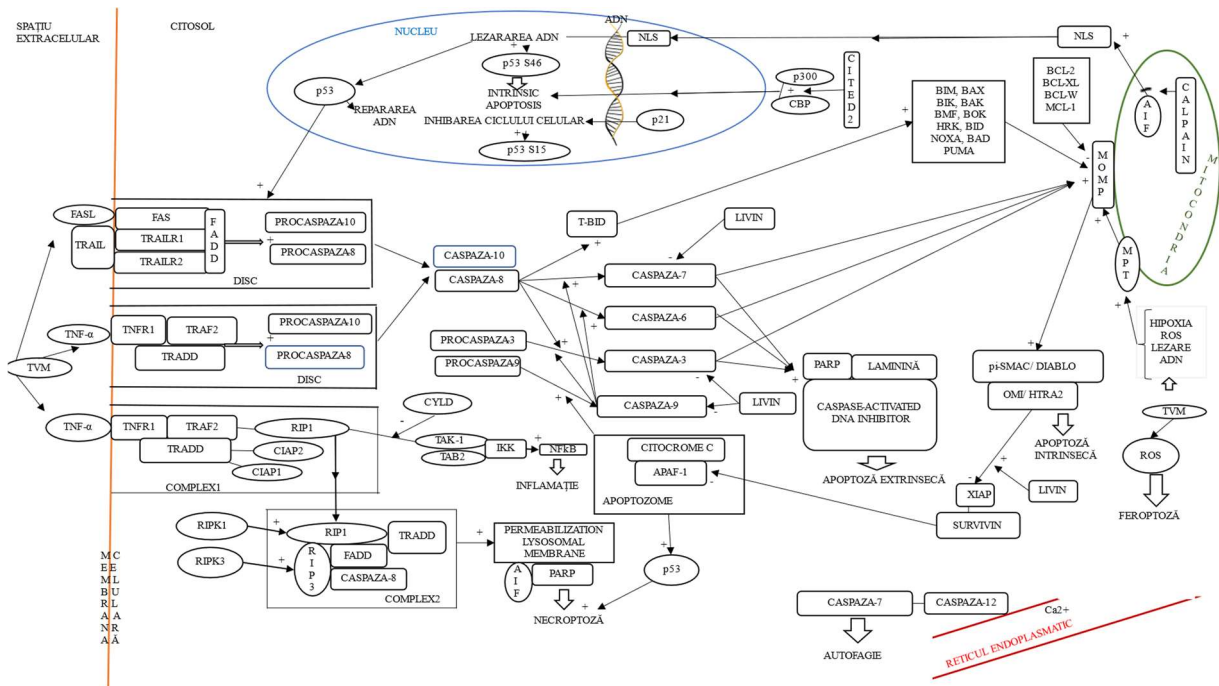


Fig. 1.3. Căi ale morții celulare în TVM. TVM activează apoptoza pe calea extrinsecă și intrinsecă. Astfel, FASL și TRAIL acționează asupra DISC (format din FAS, TRAILR1 și TRAILR2 care interacționează cu FADD, activând procaspaza-8); similar cu TNF $\alpha$  care acționează asupra DISC (format din TNFR1, TNFR2 care interacționează cu TRADD, activând procaspaza-8). DISC apoi activează caspaza-8 care stimulează caspazele efectorii (-3, -6, -7), ce acționează asupra PARP, lamininei și inhibitorului ADN activat de caspaze, declanșând apoptoza pe calea extrinsecă. Caspaza-8 (prin intermediul T-BID) stimulează genele proapoptotice (BIM, BAX, BIK, BAK, BMF, BOK, HRK, BID, NOXA, BAD, PUMA) care, împreună cu MPT (a cărei expresie este stimulată de hipoxie, ROS și leziuni ale ADN) activează MOMP care (intermediată de pi-SMAC/ DIABLO și OMI/ HTRA2) declanșează calea intrinsecă a apoptozei și inhibă XIAP care (împreună cu survin) inhibă APAF-1 (care alcătuiește apoptozomul împreună cu citocromul C). TVM, prin intermediul ROS, stimulează și ferroptoză. Apoptozomul activează necroptoză (intermediat de p53) și stimulează transformarea procaspazei-9 în caspaza-9 care stimulează caspazele efectorii ale căii apoptotice extrinsece (-3, -6, -7) care activează și MOMP (fiind implicate și în calea apoptotică intrinsecă). Echilibrul în cale apoptotică intrinsecă este menținut cu ajutorul genelor antiapoptotice (BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1) și al proteinei livin (care inhibă caspazele -3, -7, -9 și stimulează XIAP). TNF $\alpha$  activează și inflamația, acționând asupra complexului 1 al inflamazomului (format din TNFR1, TNFR2, TRADD, RIP1, CIAP1, CIAP2) care (împreună cu RIPK1 și RIPK3) acționează asupra complexului 2 al inflamazomului (format din RIP1, RIP3, FADD, TRADD și caspaza-8). Complexul 1 al inflamazomului, prin intermediul TAK-1, TAB2, IKK (inhibat de CYLD) stimulează NF-kB declanșând inflamația. Complexul 2 al inflamazomului, prin permeabilizarea membranei lizozomal și a AIF, a PARP declanșează necroptoză. AIF mitochondrial determină activarea NLS citoplasmatic (care determină leziuni ADN nuclear); iar acțiunea AIF este inhibată de calpaină. TVM poate produce leziuni ADN nuclear care stimulează expresia p53 (cu activarea reparării ADN, dar și cu activarea căii apoptotice extrinsece) și fosforilarea p53 la serina 46 (cu activarea apoptozei pe calea intrinsecă). Fosforilarea p53 la serina 15 poate fi determinată de inhibarea ciclului celular sub acțiunea p21. Calea apoptotică intrinsecă este activată și prin acțiunea la nivelul ADN al complexului p300-CBP (stimulat de cited-2). În apoptoză poate fi implicat și reticulul endoplasmatic, care poate atașa caspaza-12 și caspaza-7, cu declanșarea procesului de autofagie.

Privind **modificări structurale nevraxiale posttraumatice**, la nivel microscopic, sistemul nervos central reprezintă o structură complexă alcătuită din celule care sunt înglobate într-o

rețea moale de polizaharide (formată din proteine și glicozaminoglicani, cei mai cunoscuți fiind: laminina, fibronectina și colagenul IV) [138].

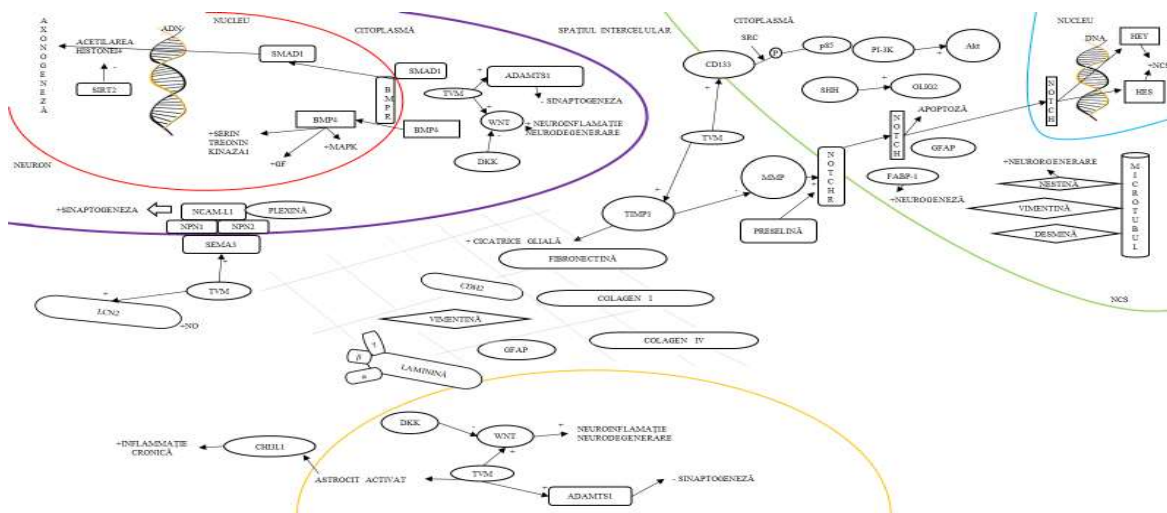


Fig. 1.4. Semnalizarea intercelulară după TVM. TVM activează celula astrocitară care: sinetizează CH13L1 (favorizând inflamația cronică în spațiul intercelular), stimulează ADAMST1 (cu inhibiția sinaptogenezei), activează calea WNT (ce duce la neuroinflamație și neurodegenerare, fiind inhibată sub acțiunea DKK). La nivel neuronal, TVM activează calea WNT, stimulează ADAMST1, reactivează calea SEMA3 (care se cuplează de receptorii NPN1, NPN2, NCAM-1 și PLEXIN, stimulând sinaptogeneza), acționează asupra receptorilor BMP prin intermediul BMP4 (cu stimularea MAPK, a factorilor de creștere și a serin treonin kinazei), a SMAD1 (cu acetilarea histonei 4 ce determină axonogeneza, proces inhibat de SIRT2). TVM influențează și celulele stem neurale prin activarea: CD133 membranar (care, alături de SRC, fosforilează p53 și PI-3K care activează Akt), a TIMP1 (care inhibă MMP, ce împreună cu preselin acționează asupra NOTCHR activând calea NOTCH care determină apoptoză sau activarea genelor Hes și Hey care determină activarea suplimentară a NCS), a interacțiunii microtubulilor cu vimentina, desmina și nestina (care favorizează neurodegenerarea), a FABP-1 (cu stimularea neurogenezei), a SHH (care activează OLIG2) și a GFAP. La nivelul spațiului intercelular, TVM stimulează formarea cicatricelor gliale (sub acțiunea TIMP1) care sunt alcătuite din: laminină (cu lanțurile  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), GFAP, collagen I și IV, fibronectină, CDH2 și vimentină; cicatrice care limitează regenerarea nervoasă posttraumatică, însă diminuează și procesul inflamator local.

Sunt studiate diferite substanțe medicamentoase și metode terapeutice cu rol potențial benefic în ameliorarea deficitelor survenite după producerea unui TVM. Se consideră favorizante procesului de neurorecuperare (inclusiv după traumatisme mielice) substanțe ca: antiinflamatorii nesteroidiene, vitamine din grupul B, litiul, molecule antioxidante (vitamine A, E, C, coenzima Q10), molecule chelatoare de fier (deferoxamina), statine, inhibitori ai fosfodiesterazei (metilxantine - teofilina), antagoniști ai acroleinei (acid acetilcisteinic), promotori ai creșterii neuritelor (Keltican), molecule neurotrofice (Cerebrolisyn, Actovegin), eritropietina, molecule antiexcitatorii neuronale (Memantina, Riluzole), blocante ale canalelor de calciu [20] [6]. În același timp, se fac cercetări despre o clasă de molecule terapeutice, cu efect pozitiv în recuperarea a T(V)-M: cea a polietilenglicolului (PEG). PEG aplicat la locul injuriei mielice (imediat și la 8 ore postleezional) în T(V)M

severe – produse prin comprimarea medulară [195]– la porcul de Guineea adult a determinat consecințe neuro-funcționale foarte bune (la 23 din 25 animale tratate intralezional, intravenos și subcutan cu PEG posttraumatic), printr-un efect protectiv împotriva leziunilor membranelor axonale la neuronii spinali ai animalelor de experiență [196–198].

## **II. CONTRIBUȚII PERSONALE**

### **4. Ipoteza de lucru și obiectivele generale**

Experiența clinică dobândită după perioade îndelungate de lucru cu pacienți traumatizați vertebro-medular ne-am făcut să constatăm diferențe clinico-evolutive post TVM (între cunoscuții cu abuz etanolic cronic și cei cu o dietă normală, ceea ce ne-a determinat să inițiem o cercetare amănunțită a problemicii (într-un studiu doctoral).

*Ipoteza de lucru* a acestei teze doctorale se referă la influența pozitivă (benefică) a alcoolismului cronic asupra evoluției (acute și subacute) a stării clinice la pacienții cu TVM, deoarece abuzul etanolic cronic determină afectări structurale și funcționale în țesutul nervos.

*Obiectivul general* al acestui studiu doctoral este analiza și demonstrarea validității Ipotezi de lucru.

*Obiectivele specifice* sunt:

- demonstrarea semnificației statistice a ipotezei de lucru (prin analiza retrospectivă a cazurilor pacienților cu TVM);
- demonstrarea prospectivă a ipotezei de lucru la nivelul celulelor neuronale din culturi celulare (nemuritoare) tumorale;
- demonstrarea prospectivă a ipotezei de lucru prin studiul celulelor gliale din culturi celulare primare (de șobolan).

### **5. Metodologia generală a cercetării**

Inițial, am realizat un studiu retrospectiv al datelor din arhiva Clinicii de Recuperare Neuro-Musculară a Spitalului Clinic de Urgență ”Bagdasa Arseni” și s-au prelucrat datele prin analiză statistică, folosind programul IBM SPSS Statistics v22. Unele grafice s-au făcut cu ajutorul programului MS Office 365 Excel.

Evaluarea ipotezei de lucru s-a realizat prospectiv pornind de la modele experimentale care au intenționat să reproducă suferința neurală produsă de TVM. Astfel, având în vedere afectarea posttraumatică (în diverse momente evolutive) a vascularizației structurilor vertebro-medulare (cu apariția fenomenelor ischemice tisulare), am considerat foarte important rolul hipoxiei celulare în evoluția lezională neurală. Hipoxia influențează atât metabolismul și structura celulelor neurale, cât și morfo-fiziologia nevraxială. De aceea, am ales să reproducem (pentru studiile prospective pe culturi celulare) suferința posttraumatică prin inducerea hipoxiei (prin tratamente cu molecule specifice: deferoxamina și clorura de cobalt). Studiul prospectiv s-a efectuat pe culturi celulare neurale tumorale și primare nevraxiale de șobolan nou-născut. S-au realizat determinări de biologie moleculară și pe probe de LCR ale pacienților cu TVM operați.

### 6. Studiul 1: Analiza retrospectivă a datelor

Am cercetat arhiva Clinicii de Recuperare Neuro-Musculară a Spitalului ”Bagdasar Arseni” în perioada 01.01.2005- 01.06.2022 și am obținut date pentru un număr de 1057, internați și tratați pe secție pentru status acut și subacut după TVM.

Studiul a arătat (cu semnificație statistică) că starea motorie după TVM este superioară pentru pacienții consumatori cronici de etanol, la fel ca și randamentul proceselor de recuperare senzitivo-motorie.

*Tabel 6.48. Rezultatul comparațiilor statistice ale datelor numerice independente Scor AIS în funcție de Consumul cronic etanolic*

		Consum cronic etanolic	N	Media	Diferența mediilor	Valoare p
Scor AIS motor	la internare	Nu	816	41.1691	8.3869	<0.0001
		Da	241	49.556		
	la externare	Nu	816	43.0294	9.3772	<0.0001
		Da	241	52.4066		
	Delta	Nu	780	4.364	3.3386	<0.0001
		Da	232	7.7026		
Scor AIS senzitiv	la internare	Nu	816	119.7868	4.1966	0.738
		Da	241	123.9834		
	la externare	Nu	816	125.6814	6.3062	0.104
		Da	241	131.9876		

Delta	Nu	814	7.8958	1.9036	<0.0001
	Da	241	9.7994		

## 7. Studiul 2: Evaluarea experimentală a neuronilor din culturi celulare tumorale

Dorința de clarificare a relației sistemului nervos cu alcoolul etilic (mai ales în condiții traumatice), ne-a îndreptat și către studiul comportamentului celulelor neuronale, pe care le-am expus timp îndelungat (cronic) la etanol. Experimental, am realizat un model de suferință neurală (prezentă și în condiții traumatice datorită fenomenele ischemice ce se produc) prin inducerea hipoxiei celulare.

Ulterior am evaluat comparativ (între celule neuronale expuse și neexpuse la etanol) comportamentul celular și modificările de biologie moleculară caracteristice. S-au realizat cercetări pe linia celulară de neuroblastom HTB-11 expusă la etanol (numită apoi SK-N-SH). Studiul viabilității a arătat că o concentrație de 50mM etanol nu afectează semnificativ viabilitatea celulară (98,7% celule fiind viabile) și din acest motiv a fost utilizată ca tratament cronic cu etanol (și realizarea de tratamente pentru 2 săptămâni și pentru mai mult de 9 săptămâni ale culturilor celulare). Tratamentul hipoxemiant a folosit inductorii de hipoxie: clorura de cobalt ( $\text{CoCl}_2$ ) și deferoxamină (DFX) în concentrații de 50 $\mu\text{M}$  și 100 $\mu\text{M}$ .

Evaluarea prin testul zgârierii este redată în Fig. 7.2.

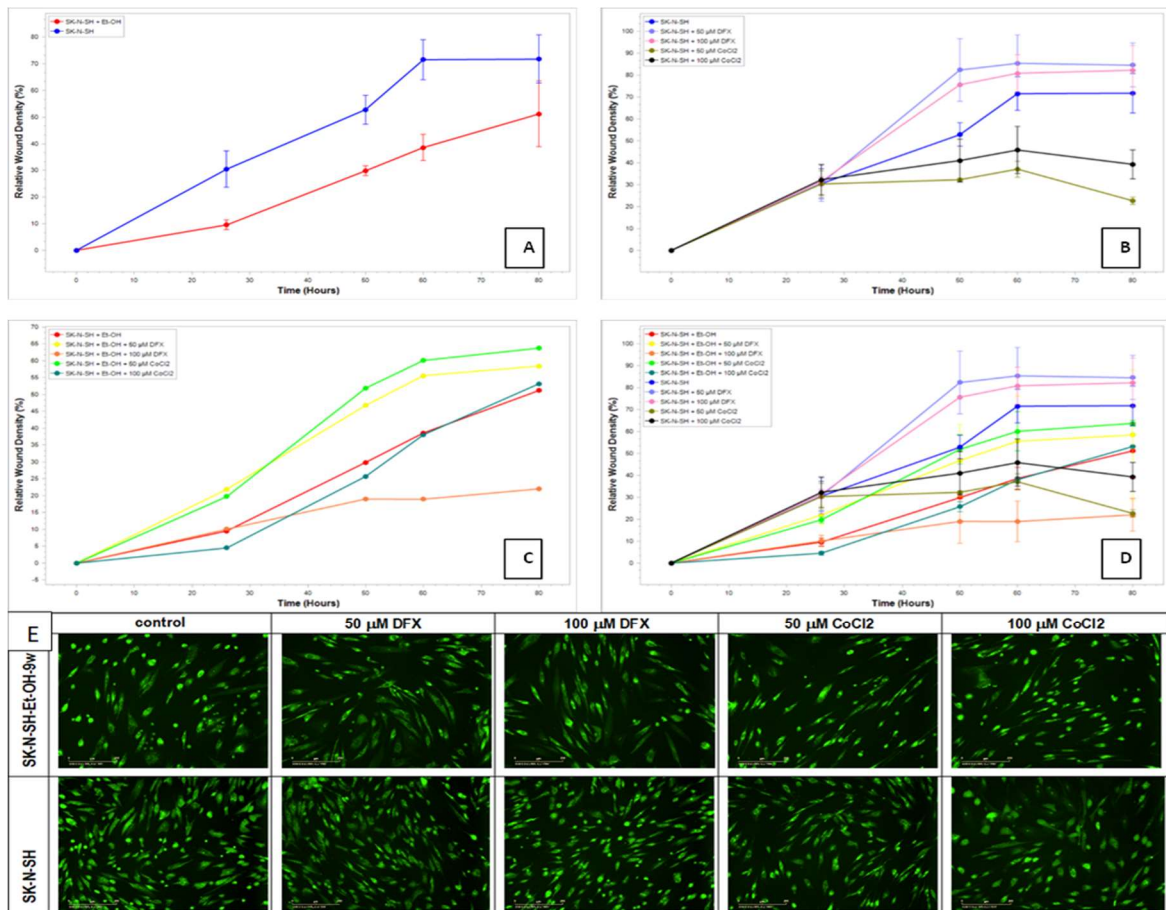


Fig. 7.2. Proliferarea și migrarea celulelor SK-N-SH: A. tratate (9w) și netratate cu etanol S-a analizat și producția speciilor reactive de oxigen (ROS), care la concentrații mici de inductori hipoxici (50μM CoCl<sub>2</sub> și DFX) au avut valori minime pentru celulele menținute în etanol mai mult de 9 săptămâni.

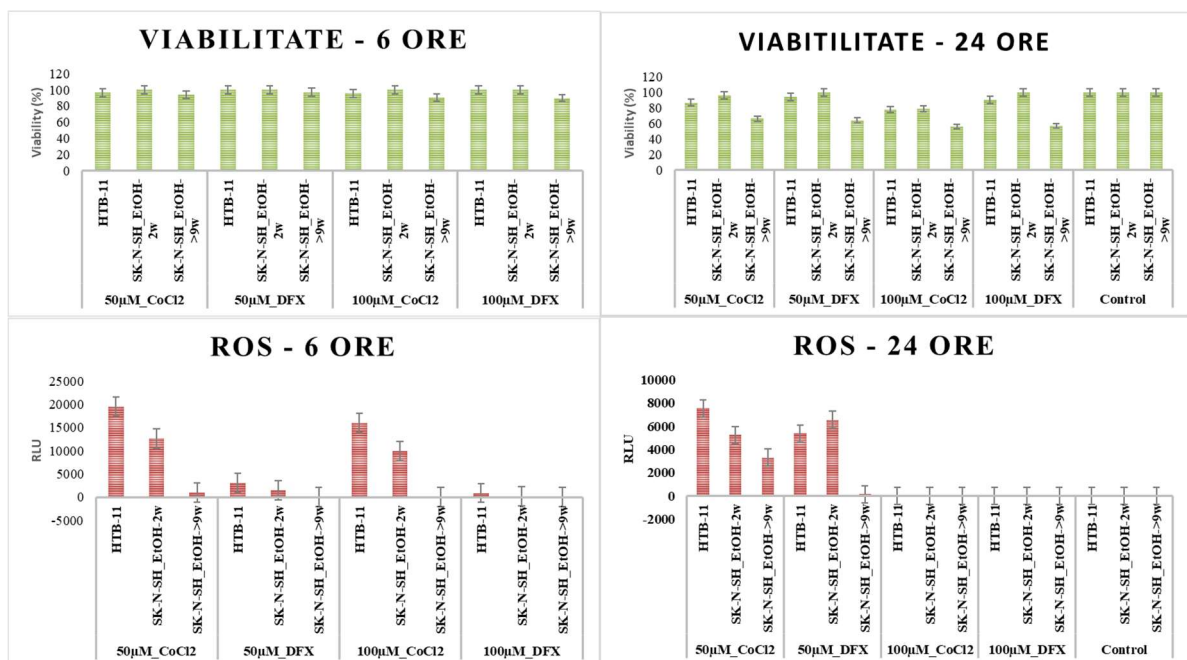


Fig. 7.6. (a, b, c, d) Cuantificarea viabilității celulare și a ROS la 6 și la 24 ore

Expresia genelor proteinelor implicate în răspunsul hipoxic este redată în Fig. 7.7.

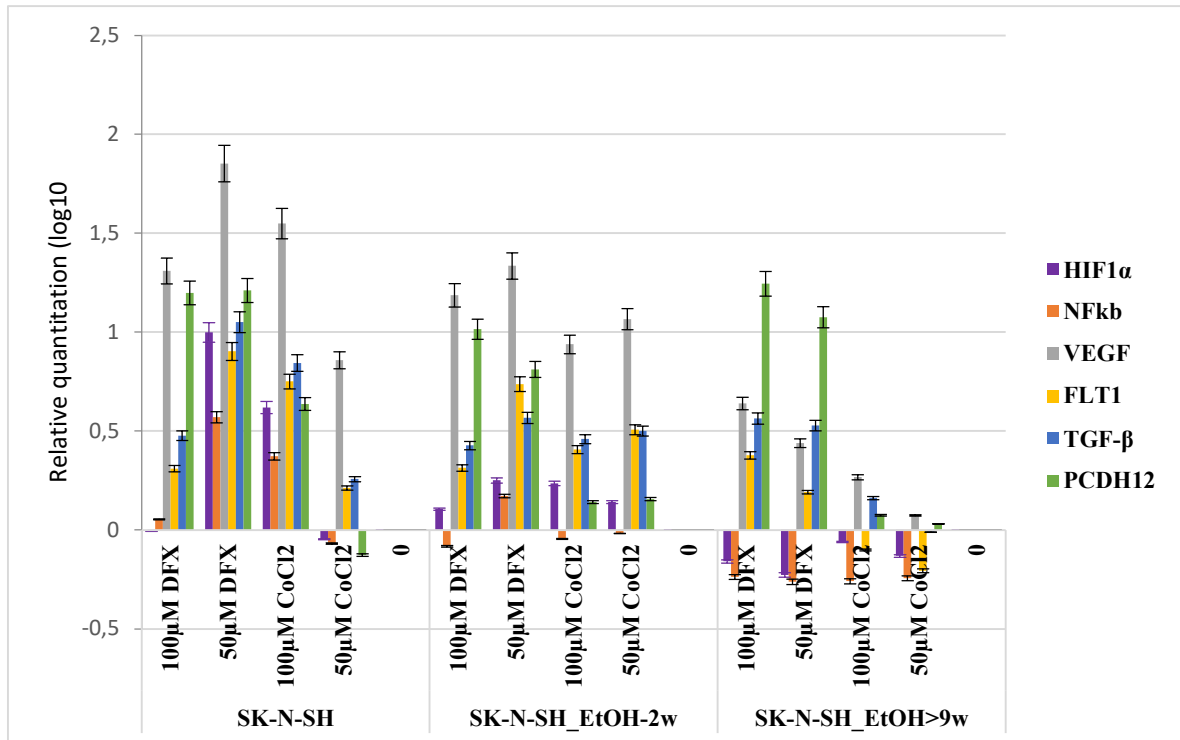


Fig. 7.7. RT PCR Hipoxie

Expresia genelor proteinelor stresului celular este redată în Fig. 7.10.

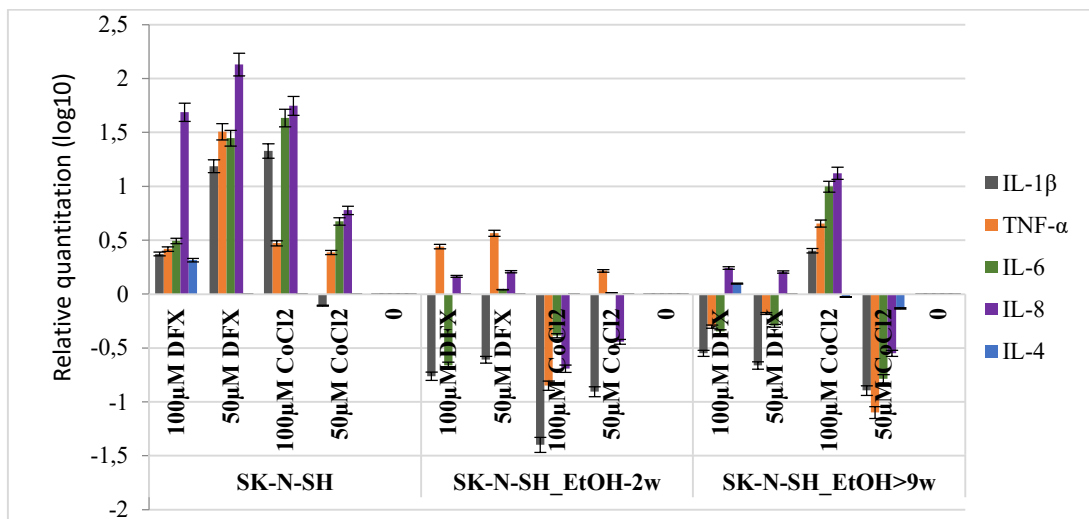


Fig. 7.10. RT PCR Stres celular

Sinteza proteinelor stresului celular este redată în Fig. 7.12.

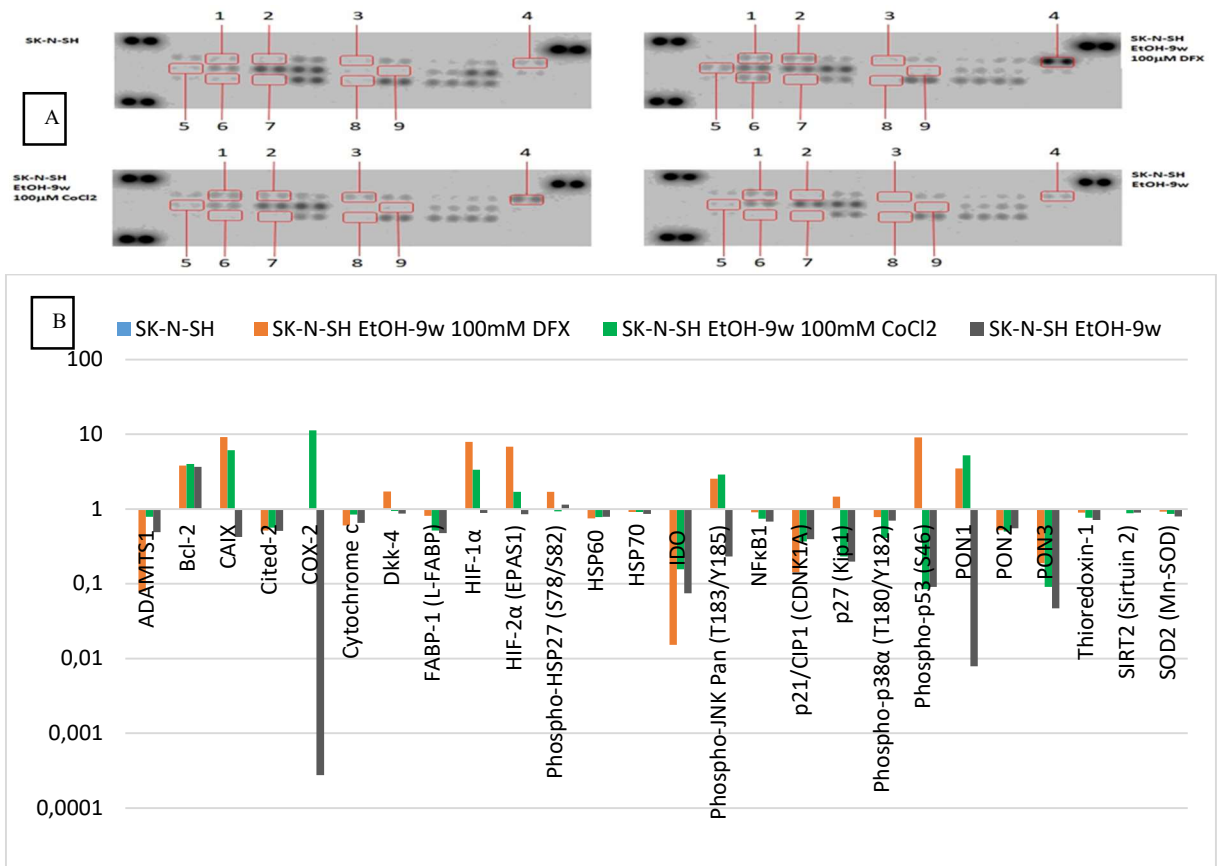


Fig. 7.12. Sinteza proteinelor de stres celular în condițiile expunerii etanolice și hipoxiei (A-aspectul gelulei DotBlot și B-reprezentarea grafică a rezultatelor logaritmice)

Expresiile genelor proteinelor implicate în inflamazom (piroptoză) sunt redată în Fig.7.13.

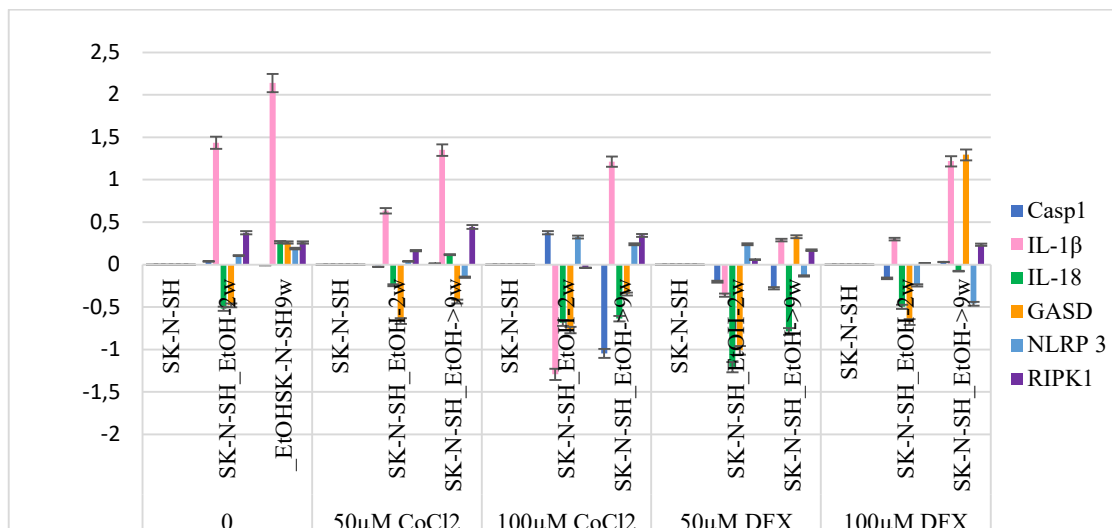


Fig. 7.13. Expresia genelor implicate în piroptoză

Expresiile genelor proteinelor metabolismului glucidic sunt redată în Fig. 7.16

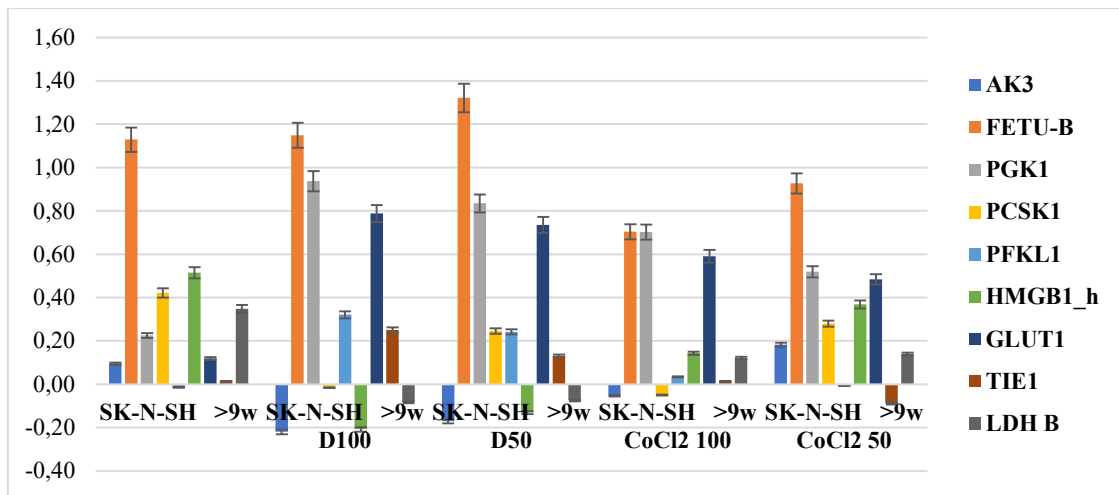


Fig. 7.16. RT PCR Metabolism glucidic

Expresia genelor proteinelor apoptotice este redată în Fig. 7.17.

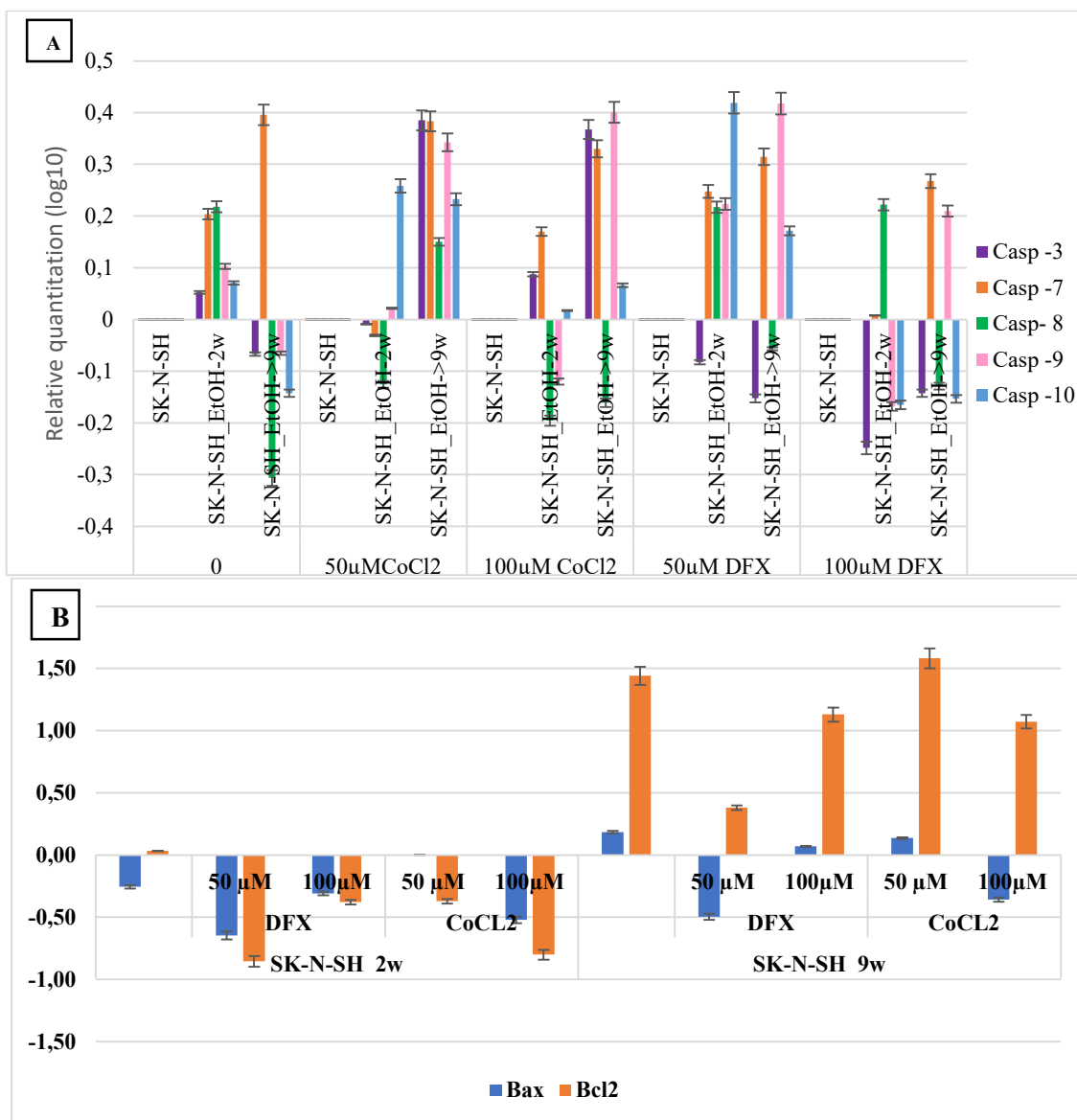


Fig. 7.17. Analiza expresiei genelor caspazelor apoptotice -3, -7, -8, -9, -10 (A) și a variației genelor BAX/Bcl-2 (proapoptotică/ antiapoptotică) (B)

Sinteza proteică apoptotică este descrisă în Fig. 7.18.

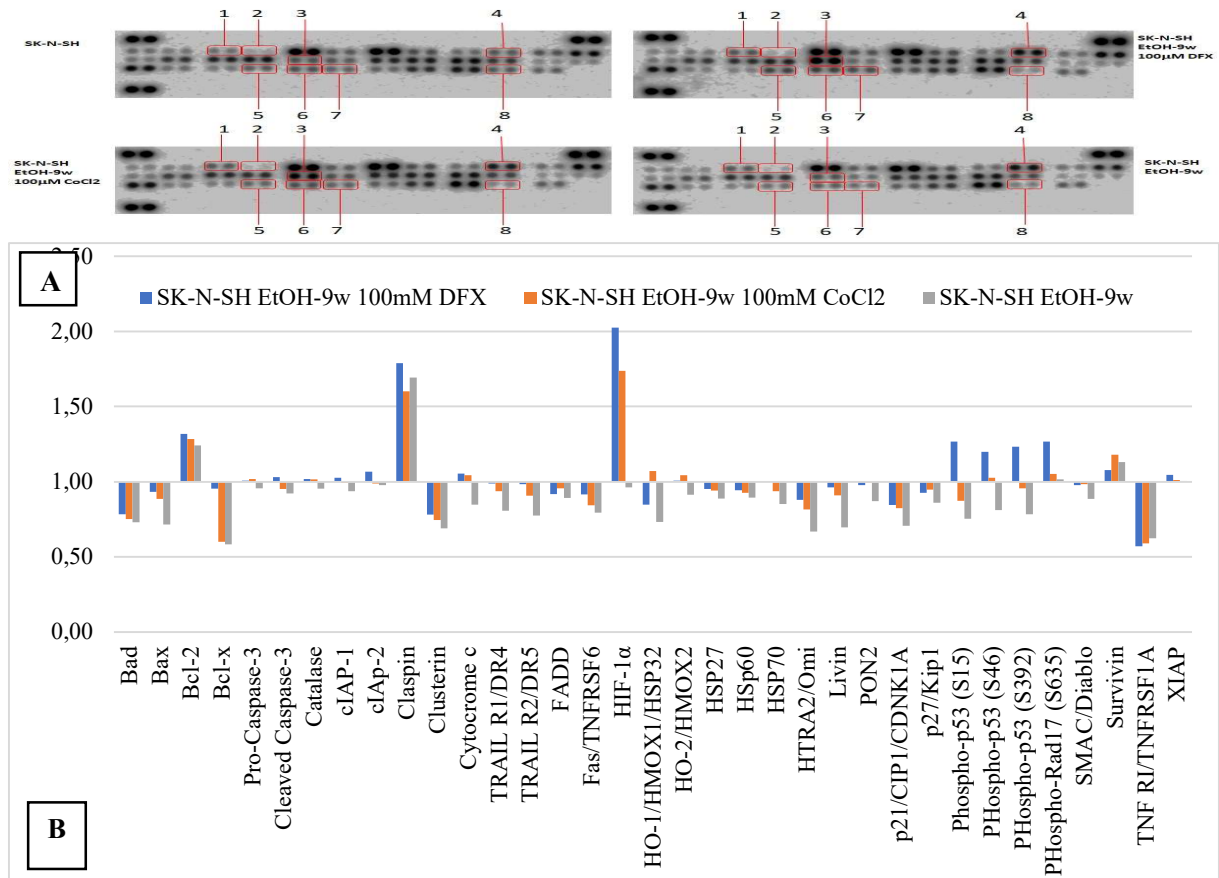


Fig. 7.18. Sinteza proteică în apoptoză: A-vizualizată pe gel DotBlot experimental și B-reprezentată grafic

Expresia genelor proteinelor implicate în căile embrionare de semnalizare este redată în Fig. 7.21.

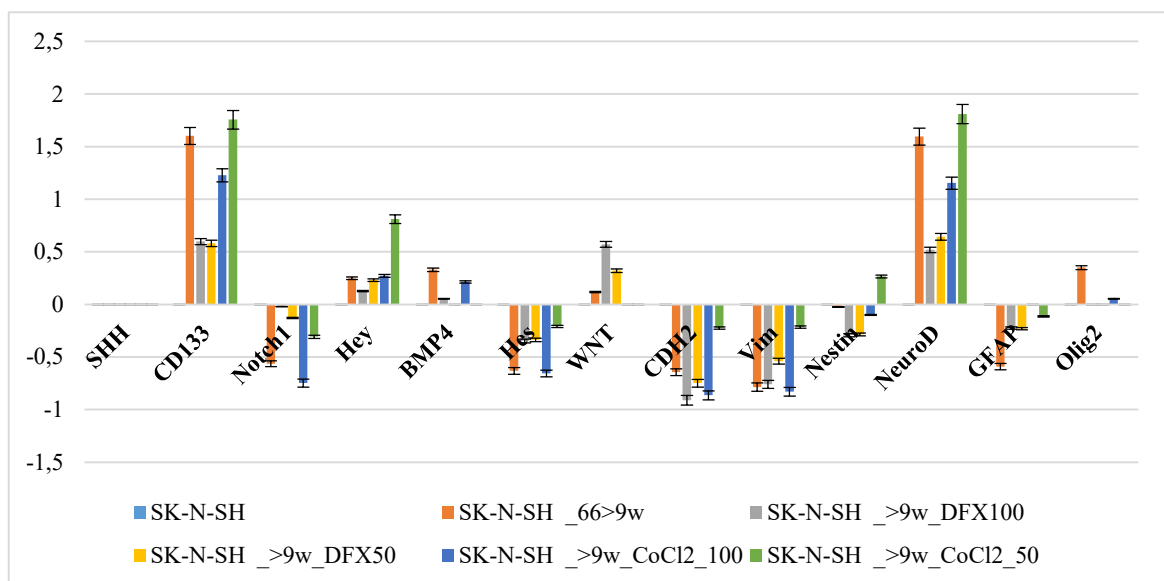


Fig. 7.21. Analiza expresiei genelor proteinelor implicate în căi de semnalizare embrionare

Evaluarea prin citometrie în flux a ciclului celular este redată în Fig. 7.23.

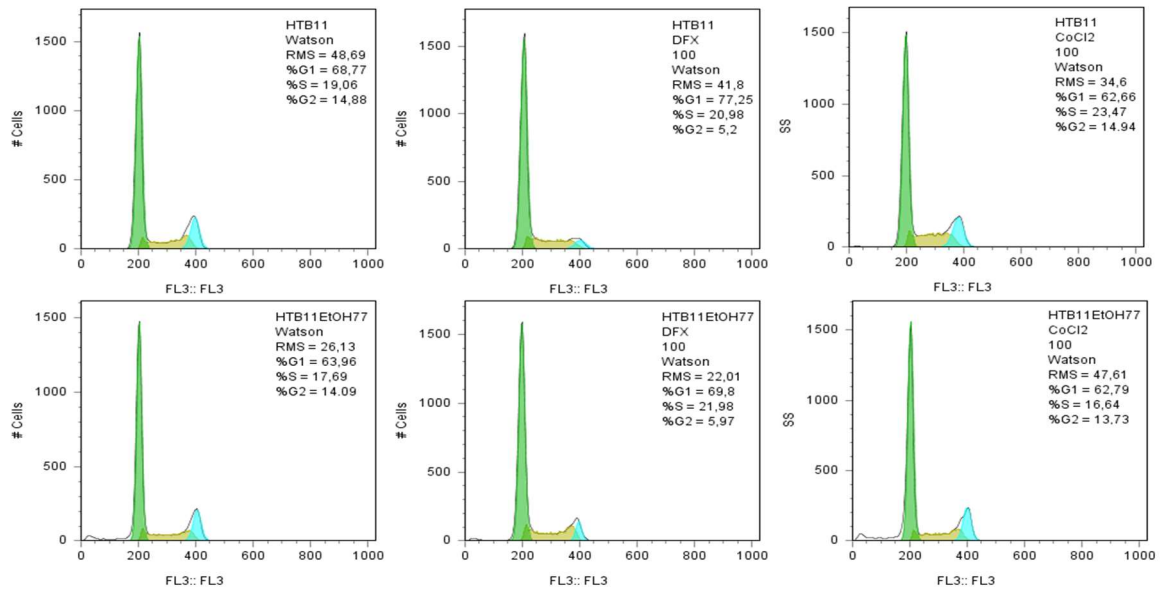


Fig.7.23. Evaluarea comparativă a ciclului celular

### 8. Studiul 3: Evaluarea celulelor neurale din culturi celulare primare

O limitare importantă a acestui doctorat este dată de imposibilitatea realizării experimentelor pe celulele nervoase umane normale, motiv pentru care am realizat modele experimentale pe celule umane din linii tumorale acreditate. Însă, din dorința de a urmări comportamentul celular în condiții de normalitate, am realizat un experiment pe celule neurale (gliale) recoltate de la șobolan nou-născut (din specia Wistar) (cu respectarea tuturor recomandărilor de lucru pe animale) în care am evaluat sinteza proteică TNF- $\alpha$  și IL-6 murine [267].

Observăm rezultatele ELISA ale sintezei proteice TNF- $\alpha$  și IL-6 în culturile celulare primare în Fig. 8.5.

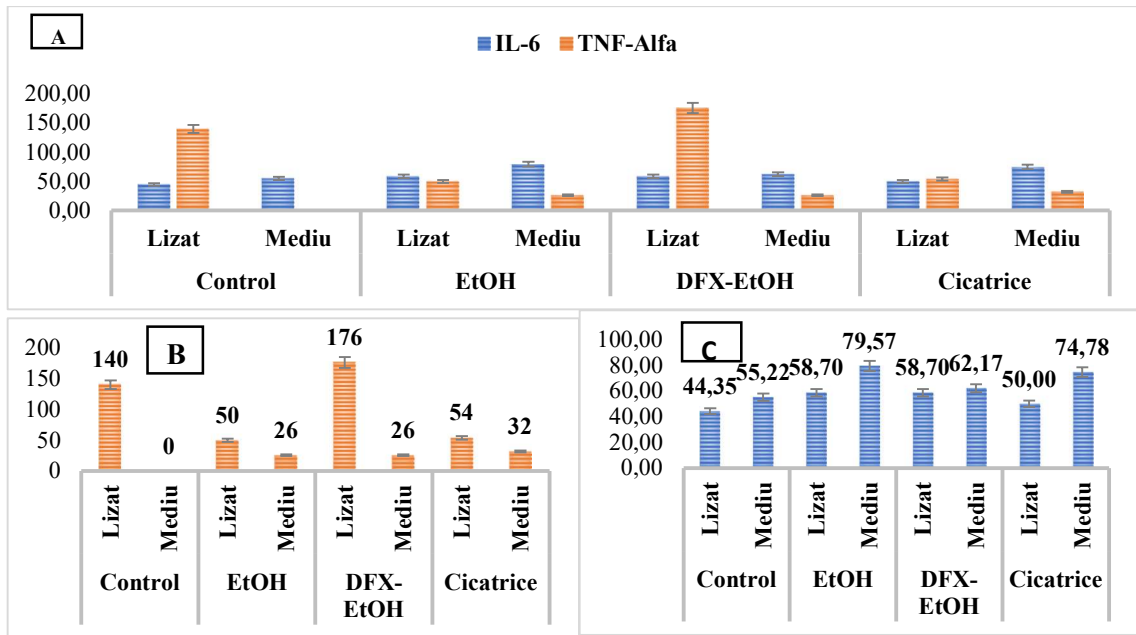


Fig. 8.5. Sinteza proteică TNF- $\alpha$  (B) și IL-6 (C) la nivelul gliocitelor (în lizatul celular și mediul de cultură) (A)

În Fig. 8.6. sunt redată valorile sintezei proteice IL-6 și TNF- $\alpha$  în probele LCR studiate.

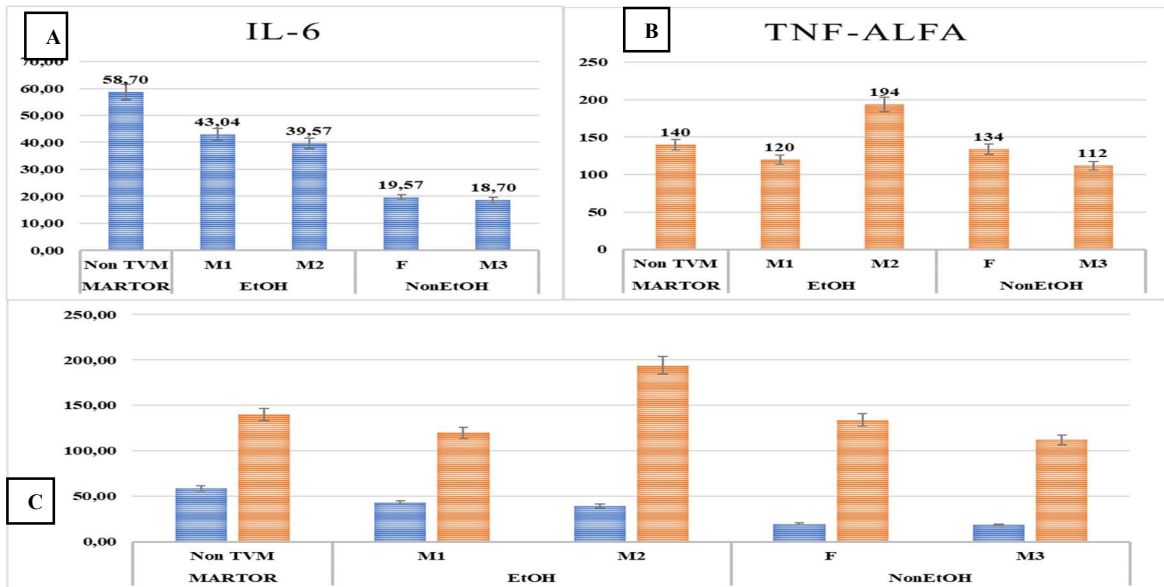


Fig. 8.6. Sinteza proteică TNF- $\alpha$  (B) și IL-6 (A) în LCR (C)

## 9. Concluzii și contribuții personale

Complexitatea reacțiilor organismului are la bază varietatea mecanismelor și proceselor de biologie moleculară ce caracterizează celulele (inclusiv) din măduva spinării. Așa încât, evoluția clinică poate fi uneori contradictorie și surprinzătoare în raport cu nivelul cunoștințelor de care dispunem la un moment dat. Astfel, putem reafirma că alcoolul etilic este un toxic ce nu trebuie neglijat, deoarece afectează organismul uman în totalitate iar relația etanolului cu sistemul nervos este complexă, ținând seama de capacitatea neuronală uriașă de adaptare [278], printr-o plasticitate care este departe de a fi clarificată [279] [280]. Așa cum arătam încă din introducere: față de diverse elemente agresoare, la nivelul nevraxului se constituie complicate și adesea interconținuate elemente (ceea ce face de foarte multe ori extrem de dificilă, dacă nu chiar imposibilă, trasarea a unei granițe clare între cele dăunătoare și cele protective) de apărare sau/ și reparatorii. Având în vedere rezultatele încă nesatisfăcătoare privind posibilitățile de vindecare a leziunilor mielice, traumatologia vertebro-medulară este în continuare o provocare pentru lumea medicală, lăsând încă un amplu loc cercetării, interpretării și progresului. Recuperarea medicală este o specialitate ce intenționează să reintegreze (familial/ social și profesional) pacientul afectat de disfuncții cu etiologii variate; iar traumatologia vertebro-medulară ocupă un loc aparte în eforturile pacientului de revenire la starea anterioară TVM.

Din toate aceste motive, am considerat utilă cercetarea (atât sub aspect statistic retrospectiv, cât și al mecanismelor intime (genomoleculare și celulare) a datelor de observație și evaluare obiectivă cuantificate, prin experiența noastră clinică, ce au arătat (mai întâi) un status neuro-disfuncțional mai puțin sever și (respectiv) un proces de recuperare în principal motorie mai bună (în stadiile acut, subacut și cronic) la pacienții cu alcoolism cronic față de cei ce nu abuzează de etanol. Concret, studiul clinic retrospectiv a 1057 pacienți cu TVM în stadiile acut, subacut internați în secția RNM a SCUBA, pe o perioadă de circa 15 ani, a arătat (cu semnificație statistică) un status motor mai bun pentru pacienții consumatori cronici de etanol, precum și un randament superior în procesele de recuperare senzitivă consecutive.

În cadrul demersului nostru doctoral, având în vedere ipoteza de lucru, am inclus și elemente prospective de cercetare fundamentală prin evaluarea impactului modelului traumatic direct și hipoxic asupra celulelor expuse la impregnare etanolică și în culturi neurale tumorale și gliale primare. În măsura posibilităților tehnice și a limitărilor inevitabile conexe, s-au efectuat studii observaționale pe culturi celulare de neuroblastom (SK-N-SH) atât supuse

impregnării etanolice cronice, cât și fără un astfel de tratament și (respectiv) comparații de biologie moleculară între reacțiilor celulelor experimentale (tratate sau nu cu alcool etilic) la condiții hipoxemice induse de DFX și  $\text{CoCl}_2$ .

Am evaluat prospectiv, deasemenea (în funcție de limitările inclusiv economice, inerente) unele molecule proinflamatorii și proapoptotice la pacienți cu dura mater lezată în urma TVM, la care a fost astfel posibilă recoltarea de LCR.

Am urmărit și dinamica moleculară după modelul de traumatism celular prin hipoxie și prin zgâriere. Analiza microscopică a statusului postlezional traumatic (prin zgâriere) a evidențiat că nu există o diferență între comportamentul rezilient și (respectiv) prin hipoxie.

Inducerea experimentală a hipoxiei celulare ca model de traumatism al neuronilor studiată a determinat scăderea proteolizei HIF-1 $\alpha$ , deși expresia sa genică nu a crescut, urmată de tendințe pentru: scăderea neurodegenerării și a neurotoxicității (prin favorizarea sintezei serotoninei produsă de inhibiția sintezei proteice IDO), ameliorare funcțională a răspunsului/rezilienței metabólico-funcționale a neuronilor (prin creșterea CA9 și HIF-1 $\beta$ ), neuroprotecție (prin inhibiția expresiei genice NF-kB), acțiune antiinflamatorie (prin stimularea expresiei genice TGF- $\beta$ ), antiapoptotice (prin stimularea sintezei proteice HMOX1 și HMOX2), regenerare și remodelare vasculară (prin stimularea expresiei genice a VEGF și FLT1), remodelare sinaptică/ neuroplasticitate (prin stimularea expresiei genice PCDH12).

Stresul celular produs de modele traumatice neuronale experimentale a determinat următoarele efecte: antioxidant (prin stimularea sintezei catalazei și prin scăderea producției ROS, a sintezei SOD<sub>2</sub> și a clusterinei), de reglarea adaptativă a metabolismului energetic (prin scăderea sintezei HSP60), neuroprotector (prin stimularea sintezei claspinei, a fosforilării HSP27), antiinflamator (prin inhibiția expresiei genice IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8), antiapoptotic (prin inhibiția expresiei genei TNF- $\alpha$  și scăderea sintezei proteice a HSP70, a clusterinei, thioredoxinei-1), anticicatriceal (prin inhibiția expresiei genei IL-6), inhibitor al regenerării nervoase ca răspuns defensiv (prin inhibiția expresiei genei IL-4), de refacere a terminațiilor nervoase (prin ameliorarea sintezei proteice a sirtuinei 2), de inhibiție a fenomenelor de dieback axonal (prin stimularea fosforilării JNK).

Modificările metabolice la celule neurale experimentale expuse modelului de traumatism hipoxic au determinat următoarele efecte: de epuizare energetică (prin inhibiția expresiei

genice a AK3) și de creștere a acidului lactic (cu scăderea dehidrogenării acestuia la acid piruvic), de creșterea activității proteolitice a insulinei (prin stimularea expresiei genice a FETU-B), de îmbunătățirea randamentului utilizării glucozei (prin stimularea expresiei TIE1), cu favorizarea pătrunderii intracelulare a glucozei (prin stimularea expresiei genei GLUT1) și remodelare vasculară (prin stimularea expresiei TIE1).

Răspunsul inflamator al neuronilor experimentali expuși modelului de traumatism celular (prin hipoxie) a determinat următoarele efecte (mediate de inflamazom): antioxidant (prin scăderea sintezei proteice a PON2 și PON3), antiinflamator (prin inhibiția expresiei genei caspazei-1, a expresiei genice NLPR3 după tratamentul cu DFX 50/100 $\mu$ M și 50 $\mu$ M ClCO<sub>2</sub>, a expresiei genice a RIPK1 în urma tratamentului cu DFX 50/100 $\mu$ M; prin scăderea sintezei COX2 și NF-kB1, PON2, PON3; a fosforilării p-38 $\alpha$ ), de diminuare a piroptozei (prin inhibiția expresia genei gasderminei), prosupraviețuire celulară/ rezistență biologică (prin inhibiția expresia genice gasderminice).

În privința morții celulare programate prin apoptoză, tratamentul culturilor celulare cu etanol determină inhibiția expresiei genei proapoptice Bax (mitochondrial toxic) într-o manieră corespunzătoare cu durata expunerii la alcool, iar inhibiția expresiei Bcl-2 pare să varieze în sens invers cu durata expunerii etanolice. Analiza sintezei proteinelor apoptotice arată o corespondență între expresia genică și sinteza proteică a Bax și Bcl-2, cu inhibiția procesului apoptotic, augmentată de stresul hipoxic adăugat suplimentar (sinteza Bcl-2 fiind mai crescută în condiții hipoxemiente). Sinteza proteică controlată de gena Bax este cel mai puternic inhibată în culturile SK-N-SH 9w, în timp ce sinteza proteică Bcl-2 este stimulată în aceste condiții; fapt care demonstrează un efect antiapoptotic al alcoolului etilic în strânsă legătură cu durata tratamentului. Dinamica sintezei proteice Bad arată cum tratamentul cronic cu etanol inhibă apoptoza mai mult decât se întâmplă în prezența hipoxiei celulare. Dinamica sintezei proteice Bcl-x arată cum afectările apoptotice (induse de expunerea celulară cronică la etanol) sunt inhibate (într-o mai mică măsură) și în cazul suferințelor hipoxice induse, cu o posibilă tendință de supraviețuire mai pronunțată în situația tratamentului îndelungat cu alcool etilic. Valorile experimentale ale procaspazei-3 arată o tendință antiapoptotică ce se manifestă la celulele crescute în medii de cultură cu adaos etanolic, tendință care se anulează în condiții hipoxice. Răspunsul celular privind sinteza caspazei-3 active, a cIAP-1 și cIAP-2 arată scăderea apoptozei în celulele tratate cronic cu etanol, diminuare apoptotică ce pare să își mențină trendul (dar într-o mai mică măsură) și în condiții hipoxice acute prin tratamentul cu clorură de cobalt. Sinteza proteică a

citocromului C, corespunde cu efectul antiapoptotic al expunerii cronice la alcool etilic, tendință care scade în condițiile hipoxice supraadăugate. Sinteza receptorilor TRAIL (membrii ai familiei TNF- $\alpha$ ): TRAILR1 (DR4) și TRAILR2 (DR5) este inhibată în culturile celulare SK-N-SH 9w, tendință care se menține și în cazul condițiilor hipoxice. Sinteza FADD este inhibată în culturile SK-N-SH 9w, fapt ce se menține (dar de manieră mai redusă) și în condițiile stresului hipoxemiant produs de deferoxamină și clorura de cobalt. Aceste constatări experimentale arată că expunerea cronică la etanol are efecte antiapoptotice, manifestate încă de la inițierea căii apoptotice extrinseci. Sinteza Fas este inhibată în culturile SK-N-SH crescute cu expunere cronică la etanol, tendință ce se menține (dar de o manieră mai redusă) și în condiții hipoxice acute produse de clorura de cobalt și deferoxamină. Sinteza OMI/ HTRA2 este inhibată în culturile celulare tratate cronic cu etanol, tendință care se menține (dar de o manieră mai redusă) și expunerii și condiții hipoxice. Livin, o proteină ce aparține familiei inhibitorilor apoptozei, este diminuată atât în culturile SK-N-SH expuse cronic la etanol, cât și în condiții hipoxice suplimentare produse prin tratament cu deferoxamină și clorură de cobalt, stimulând procesul apoptotic. Legat de sinteza proteinei P21, aceasta a fost inhibată în cazul expunerii cronice la etanol și a crescut în condiții hipoxice supraadăugate arătând că, în hipoxia culturilor celulare tratate cu etanol, ciclul celular se petrece cu viteză mai scăzută, în timp ce dinamica spațială a prelungilor celulare neuronale pare să fie mai activă. În literatură se afirmă că fosforilarea S15 a p53 arată tendința de ameliorare metabolică neuronală, cu stimularea celulelor stem neuronale, ceea ce s-a observat și în urma hipoxiei induse cu ajutorul deferoxaminei. Așa cum am arătat anterior, date din literatură afirmă că, în condiții stresante, fosforilarea S46 a p53 dovedește tendința antiapoptotică prezentă la celulele de neuroblastom experimentale și expuse la tratamente hipoxemiante. Fosforilarea la serina 392 a p53 are efect de inhibare a dezvoltării celulare (conform din datelor din literatură la care s-a făcut referire anterior), iar analiza sa în celulele tratate cronic cu etanol a evidențiat o dezvoltare celulară mai bună, comparativ inclusiv cu situațiile hipoxice acute. Fosforilarea la serina 635 a Rad17 arată că stresul expunerii îndelungate la etanol, augmentat de condițiile hipoxice încetinește diviziunea celulară, datorită unui control mai atent al ciclului celular pentru prevenirea apariției erorilor genetice. Sinteza proteică Smac/ DIABOLO arată un efect antiapoptotic mai pronunțat în culturile SK-N-SH tratate cronic etanolic, față de culturile SK-N-SH dezvoltate în mediu de cultură fără etanol; efect care se menține și în condiții hipoxice. Sinteza proteică a Survivin, arată că expunerea cronică la etanol are un efect antiapoptotic asupra culturilor SK-N-SH, efect ce se păstrează și în condiții hipoxice. Sinteza proteică TNFR-1 este inhibată

la celule SK-N-SH expuse cronic la etanol, tendință ce se menține și în condiții hipoxice. Sinteza proteinei XIAP arată un efect antiapoptotic care se manifestă în condiții hipoxice.

Căile de semnalizare intercelulară au fost cercetate la nivel de expresie genică și de sinteză proteică pentru neuronii din linia SK-H-SH tratați cu etanol și supuși modelului de traumatism celular prin hipoxie. S-au observat din această perspectivă tendințe neuroprotectoare (prin stimularea sintezei proteinei Dkk-4, de scădere a fenomenelor inflamatorii (prin inhibarea expresiei genelor CHI3L1 și LCN2), de diminuare a cicatricilor nevraxiale (prin inhibarea expresiei genelor LAMA4, TIMP1, a vimentinei, nestinei, caderinei, Olig2, GFP, SEMA3, molecule cu rol de semnalizare dar, cel puțin unele dintre ele, implicate și în dezvoltarea cicatricială), de dezvoltarea neuritelor și remodelare vasculară, de neurogeneză (prin inhibarea expresiei genei SEMA 3 și stimulării expresiei genei BMP4), de sinaptogeneză (prin scăderea sintezei proteice a ADAMTS1), de neuroregenerare (prin stimularea expresiei genei Wnt), de favorizare (teoretică) a capacității de diferențiere către neuroni sau celule gliale în linia SK-N-SH (prin stimularea expresiei genelor CD133, NeuroD, FABP-1; prin stimularea expresiei genei CD133, NeuroD, FABP-1; prin scăderea inhibiției genelor Notch, Hey și Hes). Situația favorizantă (teoretic) a capacității de diferențiere către neuroni sau celule gliale pentru linia celulară SK-N-SH (în condițiile experimentale de mai sus) nu a fost confirmată la testul de zgâriere (constatare histologică valabilă și în legătură cu observația stimulării neurogenerării experimentale descrise anterior).

Analiza ciclului celular nu a prezentat diferențe semnificative între culturile celulare studiate, deși sinteza proteică P27 arată că expunerea îndelungată la etanol și condițiile hipoxice supraadăugate, determină un răspuns favorabil în dinamica ciclului celular neuronal. Reiterăm și printre concluzii, alături de limitările tehnice propriu-zise și (respectiv) economice aferente ale acestei lucrări doctorale și pe aceea că o mare parte din demersurile din cercetarea fundamentală s-au efectuat pe linii de neuroblastom datorită necesității obiective de a putea lucra perioade îndelungate pe culturi celulare nemuritoare; pe de altă parte însă, bineînțeles că există și importante diferențe de comportament biologic, inclusiv reacționar la stres/injurii al unor astfel de celule tumorale- și neuronii sau gliocitele non-neoplazice.

Deși excesul etanolic influențează negativ sistemul nervos [281] [282] [283] inclusiv prin efect pro-oxidant [284][285] problematica relației etanol-sistem nervos uman este foarte

complexă. S-ar părea că suferința nevraxială din alcoolismul cronic determină scăderea numărului neuronilor și a capacităților lor biologice, cu limitarea hiperexcitabilității, ce poate conduce inclusiv la hiperstimulare metabolică nesustenabilă cu apoptoze extensive- apoptosis like/ bad apoptoses, procese urmate de instaurarea (prin reducerea severă de neuroni la nivel lezional și întreruperea substratului de comunicare supra/ infralezional) a deficitului neurofuncțional: tetraplegie sau paraplegiei.

Tocmai de aceea, un alt studiu l-am efectuat pe culturi celulare primare gliocitare de la șobolan nou-născut, în care s-a evaluat inflamația (IL-6) și apoptoza (TNF- $\alpha$ ) după traumatizarea hipoxică a respectivelor celule expuse la etanol în mod excesiv, cu următorul design: celule martor neexpuse la etanol și neexpuse la hipoxie, celule expuse excesiv la etanol, celule traumatizate hipoxic (doar cu deferoxamina, impregnate și neimpregnate etanolic) și traumatizate termic. În sinteză, studiul pe culturile primare nevraxiale arată (în cazul expunerii etanolice) o comunicare inflamatorie intercelulară foarte eficientă, cu un maxim apoptotic doar în cazul tratamentului combinat cu etanol și deferoxamină, însă cu un nivel scăzut al comunicării intercelulare apoptotice al celulelor tratate cu etanol (simplu sau în combinație cu deferoxamină). În cadrul unui alt studiu (pilot) foarte restrâns ca număr de participanți- din motive bioetice (recoltarea s-a făcut numai la pacienți cu dura mater ruptă și scurgere de LCR) examinarea a evidențiat: prezența tendințelor proinflamatorii și proapoptotice. Observăm cum stresul tratamentului etanolic, suplimentat de hipoxie accentuează comunicarea inflamatorie intercelulară, fără să conducă la cele mai înalte nivele de moarte celulară programată. Examinarea LCR de la pacienți cu TVM reia discuția despre efectele inflamației și morții celulare în fazele inițiale după TVM, când observăm statusuri proinflamatorii și proapoptotice mai bine reprezentate la pacienții cu alcoolism cronic, posibil și ca mecanism de izolare și protecție a zonei medulare lezate.

Rezultatele experimentelor noastre par surprinzătoare, atât în dimensiunea clinico-statistică retrospectivă, cât și în cele constatate experimental propensiv. Recapitulând rezumativ: impregnarea cronică medulară cu etanol, am constatat că are ca principale rezultate "protective" post agresiuni: o reducere a fenomenelor neuro-excitotoxice după TVM (inclusiv prin acțiune inhibitorie a receptorilor NMDA [286]), o producție diminuată de ROS (inclusiv, printr-un posibil efect mitohormesis, stimulant al efectelor antioxidante din cadrul elementelor de răspuns antioxidant: Antioxidant Response Element - ARE [287,288]) deci un stres oxidativ mai scăzut, o diminuare a mecanismelor proapoptotice.

Bineînțeles că aceste rezultate (care încearcă să explice suportul de la nivel geno-molecular și celular a statusului și evoluției, constatăte clinico-statistic a fi mai bune la bolnavii alcoolici cronici) nu epuizează, nici pe departe, vastul teren încă neexplorat în acest extrem de complex și de complicat domeniu de patologie.

Nu trebuie uitat cât de importantă este și relația doză-efect, chiar și atunci când este vorba de molecule cu rol antioxidant (un exemplu în acest sens, nelegat de subiectul nostru, este al resveratrolului: o moleculă suportivă pentru reziliența celulară la stres și apoptoză, ce poate deveni neurotoxică în cantități ce depășesc anumite limite)[289]. Totodată, este deschisă discuția asupra efectelor benefice care pot fi produse de alte molecule ce intră în compoziția băuturilor alcoolice precum și influența componentelor din aceste băuturi asupra altor căi moleculare fizio- patologice de la nivelul celulelor celulelor, inclusiv mielice.

Sistemul nervos uman deține proprietăți endogene (deocamdată foarte dificil de valorificat) de recuperare postlezională grupate în conceptul modern al activității endogene de apărare, funcție neuro-biologică sistematizată în: neurotroficitate, neuroprotecție, neuroplasticitate, neuro-/(sinapto-)geneză [290]. Având în vedere datele din literatură (confirmate și de studiile noastre actuale) putem spune că leziunile nevraxiale (inclusiv TVM) sunt unele foarte complexe (cu o demarcație fragilă între procesele ARE neuroprotective și cele deteriorative), fără să existe (până în prezent) un tratament curativ al TVM. În acest context, deocamdată decepționant, impregnarea cronică etanolică a țesutului măduvei spinării merită studiată exhaustiv pentru a încerca extragerea unor componente și căi biologice reacționale de la nivel intim care, eventual despărțite molecular de balastul nociv al ingestiei cronice de alcool, și-ar putea găsi o posibilă valoroasă contribuție terapeutică.

Nu ultimul rând, sunt de reiterat potențialele efecte terapeutice, în TVM, ale unor molecule asemănătoare structural cu alcoolul etilic (spre exemplu, polietilenglicolul), care au produs în unele studii experimentale efecte favorabile neuroprotectoare [291]: în astfel de situații, cercetările ar trebui să persevereze pentru a decanta efectele benefice de cele toxice.

Studiile din această teză doctorală au conținut elemente de originalitate, având în vedere că nu am întâlnit până în prezent cercetări focalizate pe efectele (inclusiv) favorabile ale consumului cronic de etanol asupra statusului și evoluției recuperatorii, neurofuncționale a țesutului nevraxial afectat prin TVM.

## **BIBLIOGRAFIE**

- [1] Stoica S-I, Ioana T, Gelu O. Influences and consequences resulting in addictions in general and to chronic alcoholism, especially for patients with spinal cord injury n.d. <https://doi.org/10.12680/balneo.2021.432>.
- [2] Cieza A, Kirchberger I, Biering-Srensen F, Baumberger M, Charlifue S, Post MW, et al. ICF Core Sets for individuals with spinal cord injury in the long-term context. *Spinal Cord* 2010;48:305–12. <https://doi.org/10.1038/sc.2009.183>.
- [3] Barclay L, McDonald R, Lentin P. Social and community participation following spinal cord injury: A critical review. *International Journal of Rehabilitation Research* 2015;38:1–19. <https://doi.org/10.1097/MRR.000000000000085>.
- [4] Stoica SI, Tănase I, Ciobanu V, Onose G. Initial researches on neuro-functional status and evolution in chronic ethanol consumers with recent traumatic spinal cord injury. *J Med Life* 2019;12. <https://doi.org/10.25122/jml-2019-0026>.
- [5] Kjell J, Olson L. Rat models of spinal cord injury: From pathology to potential therapies. *DMM Disease Models and Mechanisms* 2016;9:1125–37. <https://doi.org/10.1242/dmm.025833>.
- [6] Onose G, Anghelescu A, Muresanu DF, Padure L, Haras MA, Co C, et al. REVIEW A review of published reports on neuroprotection in spinal cord injury. *Spinal Cord* 2009;47:716–26. <https://doi.org/10.1038/sc.2009.52>.
- [7] He X, Li Y, Deng B, Lin A, Zhang G, Ma M, et al. The PI3K/AKT signalling pathway in inflammation, cell death and glial scar formation after traumatic spinal cord injury: Mechanisms and therapeutic opportunities. *Cell Proliferation* 2022:e13275. <https://doi.org/10.1111/CPR.13275>.
- [8] Karsy M, Hawryluk G. Modern Medical Management of Spinal Cord Injury. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 2019;19. <https://doi.org/10.1007/s11910-019-0984-1>.
- [9] Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, Beiner J, Vaccaro AR. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine Journal* 2004;4:451–64. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2003.07.007>.
- [10] Mei X, Danmeng Z, Wang H, Ru Y, Li F, Wang H, et al. Article 926780 (2022) Mechanism of Ferroptosis and Its Role in. *Frontiers in Neurology | WwwFrontiersinOrg* 2022;1:926780. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.926780>.

- [11] Ruiz IA, Squair JW, Phillips AA, Lukac CD, Huang D, Oxciano P, et al. Incidence and Natural Progression of Neurogenic Shock after Traumatic Spinal Cord Injury. *Journal of Neurotrauma* 2018;35:461–6. <https://doi.org/10.1089/neu.2016.4947>.
- [12] Dietz V, Colombo G. Recovery from spinal cord injury-underlying mechanisms and efficacy of rehabilitation. 2004.
- [13] Onose G. AA, et al. Ghid dediagnostic, tratament și reabilitare însuferințe după traumatisme vertebro-medulare. Bucharest: Ed. Universitara “CarolDavila”; 2011.
- [14] Onose G. AA, et al. „Rehabilitation inconditions following spinal cord injurues”. ”Textbookof Neurosurgery”, vol. 2. Editura Medicala, Bucharest: ISBN 978 - 973-39-0720-6; 2011.
- [15] Maynard FM, Bracken MB, Creasey G, Ditunno JF, Donovan WH, Ducker TB, et al. International Standards for Neurological and Functional Classi@cation of Spinal Cord Injury 1997.
- [16] Khorasanizadeh MH, Yousefifard M, Eskian M, Lu Y, Chalangari M, Harrop JS, et al. Neurological recovery following traumatic spinal cord injury: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurosurgery: Spine* 2019;30:683–99. <https://doi.org/10.3171/2018.10.SPINE18802>.
- [17] Tse CM, Chisholm AE, Lam T, Eng JJ. A systematic review of the effectiveness of task-specific rehabilitation interventions for improving independent sitting and standing function in spinal cord injury. *Journal of Spinal Cord Medicine* 2018;41:254–66. <https://doi.org/10.1080/10790268.2017.1350340>.
- [18] Ilha J, Meireles A, de Freitas GR, do Espírito Santo CC, Machado-Pereira NAMM, Swarowsky A, et al. Overground gait training promotes functional recovery and cortical neuroplasticity in an incomplete spinal cord injury model. *Life Sciences* 2019;232. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116627>.
- [19] Sandrow-Feinberg HR, Houlé JD. Exercise after spinal cord injury as an agent for neuroprotection, regeneration and rehabilitation. *Brain Research* 2015;1619:12–21. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.03.052>.

- [20] Maher JL, McMillan DW, Nash MS. Exercise and health-related risks of physical deconditioning after spinal cord injury. *Topics in Spinal Cord Injury Rehabilitation* 2017;23:175–87. <https://doi.org/10.1310/sci2303-175>.
- [21] Bilchak JN, Yeakle K, Caron G, Malloy D, Côté MP. Enhancing KCC2 activity decreases hyperreflexia and spasticity after chronic spinal cord injury. *Experimental Neurology* 2021;338. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113605>.
- [22] Cowan H, Lakra C, Desai M. Autonomic dysreflexia in spinal cord injury. *BMJ* 2020;371:m3596. <https://doi.org/10.1136/bmj.m3596>.
- [23] Sariyer R, De-Simone FI, Donadoni M, Hoek JB, Chang SL, Sariyer IK. Alcohol-Mediated Missplicing of Mcl-1 Pre-mRNA is Involved in Neurotoxicity. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 2017;41:1715–24. <https://doi.org/10.1111/acer.13474>.
- [24] Smith SM, Garic A, Flentke GR, Berres ME. Neural Crest Development in Fetal Alcohol Syndrome. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2014;102:210. <https://doi.org/10.1002/BDRC.21078>.
- [25] Hauser KF, Khurdayan VK, Goody RJ, Nath A, Saria A, Pauly JR. Selective vulnerability of cerebellar granule neuroblasts and their progeny to drugs with abuse liability. *Cerebellum* 2003;2:184. <https://doi.org/10.1080/14734220310016132>.
- [26] Denny L, Coles S, Blitz R. Fetal Alcohol Syndrome and Fetal Alcohol Spectrum Disorders 2017;96.
- [27] Harper C. The Neuropathology of Alcohol-Related Brain Damage. *Alcohol & Alcoholism* 2009;44:136–40. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agn102>.
- [28] Rigler SK. *Alcoholism in the Elderly*. vol. 61. 2000.
- [29] Luo J, Chen G, Wei L, Qian H, Lai X, Wang D, et al. Severe Diffuse Axon Injury in Chronic Alcoholic Rat Medulla Oblongata Following a Concussion Blow n.d. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agu009>.
- [30] Harper C, Matsumoto I. Ethanol and brain damage. *Current Opinion in Pharmacology* 2005;5:73–8. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2004.06.011>.
- [31] Sarc L, Wraber B, Lipnik-Stangelj M. Ethanol and acetaldehyde disturb TNF-alpha and IL-6 production in cultured astrocytes n.d. <https://doi.org/10.1177/0960327110388533>.

- [32] Gandhirajan A, Roychowdhury S, Kibler C, Bauer SR, Nagy LE, Vachharajani V. Ethanol Exposure Attenuates Immune Response in Sepsis via Sirtuin 2 Expression. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 2021;45:338–50. <https://doi.org/10.1111/acer.14542>.
- [33] Ann Stephens M, Wand G. Stress and the HPA Axis Role of Glucocorticoids in Alcohol Dependence. n.d.
- [34] Barr T, Helms C, Grant K, Messaoudi I. Opposing effects of alcohol on the immune system. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2016;65:242–51. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.09.001>.
- [35] Blesch A, Lu P, Tsukada S, Alto LT, Roet K, Coppola G, et al. CONDITIONING LESIONS BEFORE OR AFTER SPINAL CORD INJURY RECRUIT BROAD GENETIC MECHANISMS THAT SUSTAIN AXONAL REGENERATION: SUPERIORITY TO CAMP-MEDIATED EFFECTS. *Exp Neurol* 2012;235:162–73. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.12.037>.
- [36] Tabakoff B, Hoffman PL. The neurobiology of alcohol consumption and alcoholism: An integrative history. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2013;113:20–37. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2013.10.009>.
- [37] Altinoz MA, Elmaci İ. Targeting nitric oxide and NMDA receptor-associated pathways in treatment of high grade glial tumors. Hypotheses for nitro-memantine and nitrones. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* 2018;79:68–83. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.10.001>.
- [38] Stroud MW, Bombardier CH, Dyer JR, Rimmele CT, Esselman PC. Preinjury alcohol and drug use among persons with spinal cord injury: Implications for rehabilitation. *Journal of Spinal Cord Medicine* 2011;34:461–72. <https://doi.org/10.1179/2045772311Y.0000000033>.
- [39] Bárbara-Bataller E, Méndez-Suárez JL, Alemán-Sánchez C, Sánchez-Enríquez J, Sosa-Henríquez M. Change in the profile of traumatic spinal cord injury over 15 years in Spain. *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine* 2018;26. <https://doi.org/10.1186/s13049-018-0491-4>.
- [40] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/702> n.d.
- [41] C.Nenitescu. *Chimie organica*. București: Ed Regia Autonoma Monitorul Oficial; 2015.
- [42] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/174#section=Top> n.d.

- [43] Holford NHG. Clinical Pharmacokinetics of Ethanol. n.d.
- [44] [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1\\_2-Ethenediol](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1_2-Ethenediol) n.d.
- [45] Vincent Chen H-S, Lipton SA, or Stuart Lipton CA. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *Journal of Neurochemistry* 2006;97:1611–26. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03991.x>.
- [46] Animal Models and the Cognitive Effects of Ethanol - Animal Models of Cognitive Impairment - NCBI Bookshelf n.d. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2523/> (accessed July 10, 2022).
- [47] ALCOHOL DEPENDENCE AND HARMFUL ALCOHOL USE - Alcohol-Use Disorders - NCBI Bookshelf n.d. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65500/> (accessed July 10, 2022).
- [48] Pelham RW, Nix LC, Chavira RE, Cleveland MV, STETSON P. Clinical trial: single-and multiple-dose pharmacokinetics of polyethylene glycol (PEG-3350) in healthy young and elderly subjects n.d. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2008.03727.x>.
- [49] Hagen EM. Acute complications of spinal cord injuries. *World Journal of Orthopedics* 2015;6. <https://doi.org/10.5312/wjo.v6.i1.17>.
- [50] Yanagisawa S, Katoh H, Imai T, Nomura S, Watanabe M. The relationship between inflammasomes and the endoplasmic reticulum stress response in the injured spinal cord. *Neuroscience Letters* 2019;705:54–9. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2019.04.033>.
- [51] Rowland JW, Hawryluk GWJ, Kwon B, Fehlings MG. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: Promise on the horizon. *Neurosurgical Focus* 2008;25. <https://doi.org/10.3171/FOC.2008.25.11.E2>.
- [52] Bruce Alberts AJJLDMMRKRPW. *Molecular Biology of the Cell*. Sixth. New York : 2014.
- [53] Hayashi M, Ueyama T, Nemoto K, Tamaki T, Senba E. Sequential mRNA expression for immediate early genes, cytokines, and neurotrophins in spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma* 2000;17. <https://doi.org/10.1089/neu.2000.17.203>.
- [54] Quan HH, Kang KS, Sohn YK, Li M. Tempol reduces injury area in rat model of spinal cord contusion injury through suppression of iNOS and COX-2 expression. *Neurol Sci* 2013;34:1621–8. <https://doi.org/10.1007/S10072-013-1295-Y>.

- [55] López-Vales R, García-Alías G, Guzmán-Lenis MS, Forés J, Casas C, Navarro X, et al. Effects of COX-2 and iNOS Inhibitors Alone or in Combination With Olfactory Ensheathing Cell Grafts After Spinal Cord Injury. vol. 31. n.d.
- [56] Alizadeh A, Dyck SM, Karimi-Abdolrezaee S. Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms. *Frontiers in Neurology* 2019;10:282. <https://doi.org/10.3389/FNEUR.2019.00282>.
- [57] Hall ED, Springer JE. Neuroprotection and Acute Spinal Cord Injury: A Reappraisal n.d.
- [58] Hernandez-Gerez E, Fleming IN, Parson SH. A role for spinal cord hypoxia in neurodegeneration n.d. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2104-1>.
- [59] Wu D, Yotnda P. Induction and Testing of Hypoxia in Cell Culture. *Journal of Visualized Experiments : JoVE* 2011:2899. <https://doi.org/10.3791/2899>.
- [60] Maxwell PH, Wlesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999;399:271–5. <https://doi.org/10.1038/20459>.
- [61] Takacova M, Barathova M, Zatovicova M, Golias T, Kajanova I, Jelenska L, et al. Carbonic Anhydrase IX—Mouse versus Human. *International Journal of Molecular Sciences* 2020;21. <https://doi.org/10.3390/IJMS21010246>.
- [62] Maurer MH, Tripps WKC, Feldmann RE, Kuschinsky W. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rat neural stem cells. *Neuroscience Letters* 2003;344:165–8. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(03\)00407-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(03)00407-5).
- [63] Ratcliffe PJ. HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia? *The Journal of Clinical Investigation* 2007;117:862–5. <https://doi.org/10.1172/JCI31750>.
- [64] Peyronnard JM, Messier JP, Charron L, Lavoie J, Bergouignan FX, Dubreuil M. Carbonic anhydrase activity in the normal and injured peripheral nervous system of the rat. *Exp Neurol* 1986;93:481–99. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(86\)90169-X](https://doi.org/10.1016/0014-4886(86)90169-X).
- [65] Riley DA, Ellis S, Bain JLW. Ultrastructural cytochemical localization of carbonic anhydrase activity in rat peripheral sensory and motor nerves, dorsal root ganglia and dorsal column nuclei. *Neuroscience* 1984;13:189–206. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(84\)90269-0](https://doi.org/10.1016/0306-4522(84)90269-0).

- [66] Wang B, Samanani N, Roth SH, Archer DP. Spinal Carbonic Anhydrase Contributes to Nociceptive Reflex Enhancement by Midazolam, Pentobarbital, and Propofol. *Anesthesiology* 2003;98:921–7. <https://doi.org/10.1097/00000542-200304000-00019>.
- [67] Parfenova H, Leffler C. Cerebroprotective Functions of HO-2. *Current Pharmaceutical Design* 2008;14. <https://doi.org/10.2174/138161208783597380>.
- [68] Hanna DA, Moore CM, Liu L, Yuan X, Dominic IM, Fleischhacker AS, et al. Heme oxygenase-2 (HO-2) binds and buffers labile ferric heme in human embryonic kidney cells. *Journal of Biological Chemistry* 2022;298:101549. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101549>.
- [69] Dunn LL, Kong SMY, Tumanov S, Chen W, Cantley J, Ayer A, et al. Hmox1 (Heme Oxygenase-1) Protects against Ischemia-Mediated Injury via Stabilization of HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$ ). *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2021;41. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.315393>.
- [70] Jazwa A, Stoszko M, Tomczyk M, Bukowska-Strakova K, Pichon C, Jozkowicz A, et al. HIF-regulated HO-1 gene transfer improves the post-ischemic limb recovery and diminishes TLR-triggered immune responses - Effects modified by concomitant VEGF overexpression. *Vascular Pharmacology* 2015;71. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.02.011>.
- [71] Salminen LE, Schofield PR, Pierce KD, Bruce SE, Griffin MG, Tate DF, et al. Vulnerability of white matter tracts and cognition to the SOD2 polymorphism: A preliminary study of antioxidant defense genes in brain aging. *Behavioural Brain Research* 2017;329:111. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2017.04.041>.
- [72] Kase BA, Northrup H, Morrison AC, Davidson CM, Goiffon AM, Fletcher JM, et al. Association of Copper-Zinc Superoxide Dismutase (SOD1) and Manganese Superoxide Dismutase (SOD2) Genes with Non-syndromic Myelomeningocele. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2012;94:762. <https://doi.org/10.1002/BDRA.23065>.
- [73] Barr RK, Bogoyevitch MA. The c-Jun N-terminal protein kinase family of mitogen-activated protein kinases (JNK MAPKs). vol. 33. 2001.
- [74] Yoshimura K, Ueno M, Lee S, Nakamura Y, Sato A, Yoshimura K, et al. C-Jun N-terminal kinase induces axonal degeneration and limits motor recovery after spinal cord injury in mice. *Neuroscience Research* 2011;71:266–77. <https://doi.org/10.1016/J.NEURES.2011.07.1830>.

- [75] Kasuya Y, Umezawa H, Hatano M. Stress-Activated Protein Kinases in Spinal Cord Injury: Focus on Roles of p38. *International Journal of Molecular Sciences* 2018;19. <https://doi.org/10.3390/IJMS19030867>.
- [76] Navarro-zaragoza J, Cuenca-bermejo L, Almela P, Laorden ML, Herrero MT. Could small heat shock protein hsp27 be a first-line target for preventing protein aggregation in parkinson's disease? *International Journal of Molecular Sciences* 2021;22. <https://doi.org/10.3390/ijms22063038>.
- [77] Hecker JG, McGarvey M. Heat shock proteins as biomarkers for the rapid detection of brain and spinal cord ischemia: A review and comparison to other methods of detection in thoracic aneurysm repair. *Cell Stress and Chaperones* 2011;16. <https://doi.org/10.1007/s12192-010-0224-8>.
- [78] Rodriguez A, von Salzen D, Holguin BA, Bernal RA. Complex Destabilization in the Mitochondrial Chaperonin Hsp60 Leads to Disease. *Frontiers in Molecular Biosciences* 2020;7. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00159>.
- [79] Xie C, Shen X, Xu X, Liu H, Li F, Lu S, et al. Astrocytic YAP Promotes the Formation of Glia Scars and Neural Regeneration after Spinal Cord Injury. *The Journal of Neuroscience* 2020;40:2644. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2229-19.2020>.
- [80] Noma T. Dynamics of nucleotide metabolism as a supporter of life phenomena. *Journal of Medical Investigation* 2005;52:127–36. <https://doi.org/10.2152/JMI.52.127>.
- [81] Tamai M, Kawano T, Saito R, Sakurai K, Saito Y, Yamada H, et al. Phosphoglycerate kinase deficiency due to a novel mutation (c. 1180A>G) manifesting as chronic hemolytic anemia in a Japanese boy. *International Journal of Hematology* 2014;393–7. <https://doi.org/10.1007/S12185-014-1615-X>.
- [82] Wilson RB, Solass W, Archid R, Weinreich FJ, Königsrainer A, Reymond MA. Resistance to anoikis in transcoelomic shedding: the role of glycolytic enzymes. *Pleura Peritoneum* 2019;4. <https://doi.org/10.1515/PP-2019-0003>.
- [83] Gao L, Wang C, Qin B, Li T, Xu W, Lenahan C, et al. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase Suppresses Neuronal Apoptosis by Increasing Glycolysis and “cyclin-dependent kinase 1-Mediated Phosphorylation of p27 After Traumatic Spinal Cord Injury in Rats. *Cell Transplantation* 2020;29. <https://doi.org/10.1177/0963689720950226>.

- [84] Zheng M, Streck FD, Sc~tt FEM, Seidah ~ N G, Pintar JE. The Developmental Expression in Rat of Proteases Furin, PC1 , PC2, and Carboxypeptidase E: Implications for Early Maturation of Proteolytic Processing Capacity. *The Journal of Neuroscience* 1994;14:4858–73.
- [85] Whetstone WD, Hsu JYC, Eisenberg M, Werb Z, Noble-Haeusslein LJ. Blood-Spinal Cord Barrier After Spinal Cord Injury: Relation to Revascularization and Wound Healing. *J Neurosci Res* 2003;74:227. <https://doi.org/10.1002/JNR.10759>.
- [86] Auvin S. Abnormal white matter: Expanding the GLUT1-D phenotype. *European Journal of Paediatric Neurology* 2018;22:345. <https://doi.org/10.1016/J.EJPN.2018.03.007>.
- [87] Duka T, Anderson SM, Collins Z, Raghanti MA, Ely JJ, Hof PR, et al. SYNAPTOSOMAL LACTATE DEHYDROGENASE ISOENZYME COMPOSITION IS SHIFTED TOWARD AEROBIC FORMS IN PRIMATE BRAIN EVOLUTION. *Brain Behav Evol* 2014;83:216. <https://doi.org/10.1159/000358581>.
- [88] Lu X, Al-Aref R, Zhao D, Shen J, Yan Y, Gao Y. Astrocyte-conditioned medium attenuates glutamate-induced apoptotic cell death in primary cultured spinal cord neurons of rats. *Neurological Research* 2015;37:803–8. <https://doi.org/10.1179/1743132815Y.0000000059>.
- [89] Cañete-Soler R, Reddy KS, Tolan DR, Zhai J. Aldolases A and C Are Ribonucleolytic Components of a Neuronal Complex That Regulates the Stability of the Light-Neurofilament mRNA. *The Journal of Neuroscience* 2005;25:4353. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0885-05.2005>.
- [90] Blackmore MG, Moore DL, Smith RP, Goldberg JL, Bixby JL, Lemmon VP. High Content Screening of Cortical Neurons Identifies Novel Regulators of Axon Growth. *Mol Cell Neurosci* 2010;44:43. <https://doi.org/10.1016/J.MCN.2010.02.002>.
- [91] Ulbrich L, Cozzolino M, Marini ES, Amori I, de Jaco A, Carri MT, et al. Cystatin B and SOD1: Protein-protein interaction and possible relation to neurodegeneration. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2014;34:205–13. <https://doi.org/10.1007/s10571-013-0004-y>.
- [92] Daura E, Tegelberg S, Yoshihara M, Jackson C, Simonetti F, Aksentjeff K, et al. Cystatin B-deficiency triggers ectopic histone H3 tail cleavage during neurogenesis. *Neurobiology of Disease* 2021;156. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2021.105418>.

- [93] Okuneva O, Li Z, Körber I, Tegelberg S, Joensuu T, Tian L, et al. Brain inflammation is accompanied by peripheral inflammation in *Cstb*<sup>-/-</sup> mice, a model for progressive myoclonus epilepsy. *Journal of Neuroinflammation* 2016;13. <https://doi.org/10.1186/S12974-016-0764-7>.
- [94] Xue S, Han H, Rui S, Yang M, Huang Y, Zhan B, et al. Serum Fetuin-B Levels Are Elevated in Women with Metabolic Syndrome and Associated with Increased Oxidative Stress 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6657658>.
- [95] Karmilin K, Schmitz C, Kuske M, Körschgen H, Olf M, Meyer K, et al. Mammalian plasma fetuin-B is a selective inhibitor of ovastacin and meprin metalloproteinases. *Scientific Reports* 2019;9. <https://doi.org/10.1038/S41598-018-37024-5>.
- [96] Peter A, Kovarova M, Staiger H, Machann J, Schick F, Königsrainer A, et al. The hepatokines fetuin-A and fetuin-B are upregulated in the state of hepatic steatosis and may differently impact on glucose homeostasis in humans. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 2018;314:E266–73. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00262.2017>.
- [97] Kuniyama T, Sasaki S, Shiiya N, Ishikura H, Kawarada Y, Matsukawa A, et al. Lazaroid reduces production of IL-8 and IL-1 receptor antagonist in ischemic spinal cord injury. *The Annals of Thoracic Surgery* 2000;69:792–8. [https://doi.org/10.1016/S0003-4975\(99\)01413-7](https://doi.org/10.1016/S0003-4975(99)01413-7).
- [98] Dalkilic T, Fallah N, Noonan VK, Salimi Elizei S, Dong K, Belanger L, et al. Predicting Injury Severity and Neurological Recovery after Acute Cervical Spinal Cord Injury: A Comparison of Cerebrospinal Fluid and Magnetic Resonance Imaging Biomarkers. *Journal of Neurotrauma* 2018;35:435–45. <https://doi.org/10.1089/neu.2017.5357>.
- [99] Gordon R, Albornoz EA, Christie DC, Langley MR, Kumar V, Mantovani S, et al. Inflammasome inhibition prevents  $\alpha$ -synuclein pathology and dopaminergic neurodegeneration in mice. *Science Translational Medicine* 2018;10. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah4066>.
- [100] Mortezaee K, Khanlarkhani N, Beyer C, Zendedel A. Inflammasome: Its role in traumatic brain and spinal cord injury. *Journal of Cellular Physiology* 2018;233. <https://doi.org/10.1002/jcp.26287>.

- [101] de Vasconcelos NM, Lamkanfi M. Recent insights on inflammasomes, gasdermin pores, and pyroptosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2020;12. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036392>.
- [102] Voet S, Srinivasan S, Lamkanfi M, Loo G. Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. *EMBO Molecular Medicine* 2019;11. <https://doi.org/10.15252/emmm.201810248>.
- [103] Swanson K v., Deng M, Ting JPY. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nature Reviews Immunology* 2019;19. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>.
- [104] Lammert CR, Frost EL, Bellinger CE, Bolte AC, Mckee CA, Hurt ME, et al. AIM2 inflammasome surveillance of DNA damage shapes neurodevelopment HHS Public Access n.d. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2174-3>.
- [105] Man SM, Karki R, Kanneganti TD. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. *Immunol Rev* 2017;277:61. <https://doi.org/10.1111/IMR.12534>.
- [106] Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation. *International Journal of Molecular Sciences* 2019;20. <https://doi.org/10.3390/ijms20133328>.
- [107] Prendergast GC, Malachowski WJ, Mondal A, Scherle P, Muller AJ. Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Its Therapeutic Inhibition in Cancer. *Int Rev Cell Mol Biol* 2018;336:175. <https://doi.org/10.1016/BS.IRCMB.2017.07.004>.
- [108] Barreto FS, Filho AJMC, de Araújo MCCR, de Moraes MO, de Moraes MEA, Maes M, et al. Tryptophan catabolites along the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway as a biological link between depression and cancer. *Behavioural Pharmacology* 2018;29:165–80. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000384>.
- [109] Sakurai K, Zou J-P, Tschetter JR, Ward JM, Shearer GM. Effect of indoleamine 2,3-dioxygenase on induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. n.d.
- [110] Huang YS, Ogbechi J, Clanchy FI, Williams RO, Stone TW. IDO and Kynurenine Metabolites in Peripheral and CNS Disorders. *Frontiers in Immunology* 2020;11:388. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.00388>.

- [111] Godin-Ethier J, Hanafi LA, Duvignaud JB, Leclerc D, Lapointe R. IDO expression by human B lymphocytes in response to T lymphocyte stimuli and TLR engagement is biologically inactive. *Molecular Immunology* 2011;49:253–9. <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2011.08.017>.
- [112] Lam CS, Li JJ, Tipoe GL, Youdim MBH, Fung ML. Monoamine oxidase A upregulated by chronic intermittent hypoxia activates indoleamine 2,3-dioxygenase and neurodegeneration. *PLoS ONE* 2017;12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177940>.
- [113] Costa LG, de Laat R, Dao K, Pellacani C, Cole TB, Furlong CE. Paraoxonase-2 (PON2) in brain and its potential role in neuroprotection. *NeuroToxicology* 2014;43. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2013.08.011>.
- [114] Manco G, Porzio E, Carusone TM. Human paraoxonase-2 (Pon2): Protein functions and modulation. *Antioxidants* 2021;10. <https://doi.org/10.3390/antiox10020256>.
- [115] Fiorentino L, Stehlik C, Oliveira V, Ariza ME, Godzik A, Reed JC. A novel PAAD-containing protein that modulates NF- $\kappa$ B induction by cytokines tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$ . *Journal of Biological Chemistry* 2002;277:35333–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200446200>.
- [116] Smits VAJ, Cabrera E, Freire R, Gillespie DA. Claspin - checkpoint adaptor and DNA replication factor. *FEBS J* 2019;286:441–55. <https://doi.org/10.1111/FEBS.14594>.
- [117] Zinkie S, Gentil BJ, Minotti S, Durham HD. Expression of the protein chaperone, clusterin, in spinal cord cells constitutively and following cellular stress, and upregulation by treatment with Hsp90 inhibitor. *Cell Stress and Chaperones* 2013;18. <https://doi.org/10.1007/s12192-013-0427-x>.
- [118] Wright MC, Mi R, Connor E, Reed N, Vyas A, Alspalter M, et al. Novel roles for osteopontin and clusterin in peripheral motor and sensory axon regeneration. *Journal of Neuroscience* 2014;34. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3822-13.2014>.
- [119] Shafie INF, McLaughlin M, Burchmore R, Lim MAA, Montague P, Johnston PEJ, et al. The chaperone protein clusterin may serve as a cerebrospinal fluid biomarker for chronic spinal cord disorders in the dog. *Cell Stress and Chaperones* 2014;19. <https://doi.org/10.1007/s12192-013-0457-4>.

- [120] Fang P, Pan HC, Lin SL, Zhang WQ, Rauvala H, Schachner M, et al. HMGB1 contributes to regeneration after spinal cord injury in adult zebrafish. *Mol Neurobiol* 2014;49:472–83. <https://doi.org/10.1007/S12035-013-8533-4>.
- [121] Galluzzi L, Vitale I. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation* 2018;25:486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>.
- [122] Khoury MK, Gupta K, Franco SR, Liu B. Necroptosis in the Pathophysiology of Disease. *American Journal of Pathology* 2020;190. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.10.012>.
- [123] Fricker M, Tolkovsky AM, Borutaite V, Coleman M, Brown GC. Neuronal cell death. *Physiological Reviews* 2018;98. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2017>.
- [124] Frank D, Vince JE. Pyroptosis versus necroptosis: similarities, differences, and crosstalk. *Cell Death and Differentiation* 2019;26. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0212-6>.
- [125] Long JS, Ryan KM. New frontiers in promoting tumour cell death: Targeting apoptosis, necroptosis and autophagy. *Oncogene* 2012;31. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.7>.
- [126] Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Alessia Garufi, D’Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging* 2016;8. <https://doi.org/10.18632/aging.100934>.
- [127] Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: Disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Reports* 2019;39. <https://doi.org/10.1042/BSR20180992>.
- [128] Paul A, Krelm Y, Arif T, Jeger R, Shoshan-Barmatz V. A New Role for the Mitochondrial Pro-apoptotic Protein SMAC/Diablo in Phospholipid Synthesis Associated with Tumorigenesis. *Molecular Therapy* 2018;26. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.12.020>.
- [129] Fung S, Knoefel WT, Krieg A. Clinicopathological and prognostic significance of inhibitor of apoptosis protein (IAP) family members in lung cancer: A meta-analysis. *Cancers (Basel)* 2021;13. <https://doi.org/10.3390/cancers13164098>.
- [130] Wheatley SP, Altieri DC. Survivin at a glance. *Journal of Cell Science* 2019;132. <https://doi.org/10.1242/jcs.223826>.

- [131] Altieri B, Sbiera S, Casa S della, Weigand I, Wild V, Steinhauer S, et al. Livin/BIRC7 expression as malignancy marker in adrenocortical tumors. *Oncotarget* 2017;8:9323. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.14067>.
- [132] Gonzalez YR, Zhang Y, Behzadpoor D, Cregan S, Bamforth S, Slack RS, et al. CITED2 Signals through Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  to Regulate Death of Cortical Neurons after DNA Damage. *The Journal of Neuroscience* 2008;28:5559. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1014-08.2008>.
- [133] Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, et al. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by ser-46-phosphorylated p53. *Cell* 2000;102:849–62. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00073-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00073-8).
- [134] Domínguez-Bautista JA, Acevo-Rodríguez PS, Castro-Obregón S. Programmed Cell Senescence in the Mouse Developing Spinal Cord and Notochord. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2021;9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.587096>.
- [135] Imamura T, Uesaka M, Nakashima K. Epigenetic setting and reprogramming for neural cell fate determination and differentiation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2014;369. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0511>.
- [136] Li S, Leshchyn'ska I, Chernyshova Y, Schachner M, Sytnyk V. The Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) Associates with and Signals through p21-Activated Kinase 1 (Pak1). *The Journal of Neuroscience* 2013;33:790. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1238-12.2013>.
- [137] Liu S, Li Y, Choi HMC, Sarkar C, Koh EY, Wu J, et al. Lysosomal damage after spinal cord injury causes accumulation of RIPK1 and RIPK3 proteins and potentiation of necroptosis. *Cell Death & Disease* 2018;9. <https://doi.org/10.1038/S41419-018-0469-1>.
- [138] Hollis Ii ER. Axon Guidance Molecules and Neural Circuit Remodeling After Spinal Cord Injury. *Neurotherapeutics* 2016;13:360–9. <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0416-0>.
- [139] Li H, Zheng J, Wang H, Becker ML, Leipzig ND. Neural stem cell encapsulation and differentiation in strain promoted crosslinked polyethylene glycol-based hydrogels. *J Biomater Appl* 2018;32:1222. <https://doi.org/10.1177/0885328218755711>.
- [140] Garbuzova-Davis S, Haller E, Navarro S, Besong TE, Boccio KJ, Hailu S, et al. Transplantation of Human Bone Marrow Stem Cells into Symptomatic ALS Mice Enhanced

Structural and Functional Blood-Spinal Cord Barrier Repair HHS Public Access. *Exp Neurol* 2018;310:33–47. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.08.012>.

- [141] Aumailley M. The laminin family. *Cell Adhesion & Migration* 2013;7:48. <https://doi.org/10.4161/CAM.22826>.
- [142] Baumann HJ, Mahajan G, Ham TR, Betonio P, Kothapalli CR, Shriver LP, et al. Softening of the chronic hemi-section spinal cord injury scar parallels dysregulation of cellular and extracellular matrix content. *J Mech Behav Biomed Mater* 2020;110:103953. <https://doi.org/10.1016/J.JMBBM.2020.103953>.
- [143] Schneider R, Bellenberg B, Gisevius B, Hirschberg S, Sankowski R, Prinz M, et al. Chitinase 3-like 1 and neurofilament light chain in CSF and CNS atrophy in MS. *Neurology(R) Neuroimmunology & Neuroinflammation* 2021;8. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000906>.
- [144] Gaur N, Perner C, Witte OW, Grosskreutz J. The Chitinases as Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis: Signals From the CNS and Beyond. *Frontiers in Neurology* 2020;11:377. <https://doi.org/10.3389/FNEUR.2020.00377>.
- [145] Teshigawara K, Kuboyama T, Shigyo M, Nagata A, Sugimoto K, Matsuya Y, et al. A novel compound, denosomin, ameliorates spinal cord injury via axonal growth associated with astrocyte-secreted vimentin. *British Journal of Pharmacology* 2013;168:903. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.2012.02211.X>.
- [146] Baldwin SA, Broderick R, Blades DA, Scheff SW. Alterations in Temporal/Spatial Distribution of GFAP-and Vimentin-Positive Astrocytes After Spinal Cord Contusion With the New York University Spinal Cord Injury Device. vol. 15. Mary Ann Liebert, Inc; 1998.
- [147] Redies C, Hertel N, Hübner CA. Cadherins and neuropsychiatric disorders. *Brain Research* 2012;1470:130–44. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2012.06.020>.
- [148] Pancho A, Aerts T, Mitsogiannis MD, Seuntjens E. Protocadherins at the Crossroad of Signaling Pathways. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2020;13:117. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2020.00117/BIBTEX>.
- [149] Kim SY, Yasuda S, Tanaka H, Yamagata K, Kim H. Non-clustered protocadherin. *Cell Adhesion & Migration* 2011;5:97. <https://doi.org/10.4161/CAM.5.2.14374>.

- [150] Hara M, Kobayakawa K, Ohkawa Y, Kumamaru H, Yokota K, Saito T, et al. Interaction of reactive astrocytes with type i collagen induces astrocytic scar formation through the integrin-N-cadherin pathway after spinal cord injury. *Nature Medicine* 2017;23:818–28. <https://doi.org/10.1038/nm.4354>.
- [151] Rathore KI, Berard JL, Redensek A, Chierzi S, Lopez-Vales R, Santos M, et al. Lipocalin 2 Plays an Immunomodulatory Role and Has Detrimental Effects after Spinal Cord Injury. *The Journal of Neuroscience* 2011;31:13412. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0116-11.2011>.
- [152] Smith JA, Braga A, Verheyen J, Basilico S, Bandiera S, Alfaro-Cervello C, et al. RNA Nanotherapeutics for the Amelioration of Astroglial Reactivity. *Molecular Therapy Nucleic Acids* 2018;10:103. <https://doi.org/10.1016/J.OMTN.2017.11.008>.
- [153] Decimo I, Bifari F, Rodriguez FJ, Malpeli G, Dolci S, Lavarini V, et al. Nestin- and Doublecortin-Positive Cells Reside in Adult Spinal Cord Meninges and Participate in Injury-Induced Parenchymal Reaction. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 2011;29:2062. <https://doi.org/10.1002/STEM.766>.
- [154] Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov K v., Tarasova Y, et al. Nestin expression - A property of multi-lineage progenitor cells? *Cellular and Molecular Life Sciences* 2004;61:2510–22. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4144-6>.
- [155] Yamamoto SI, Nagao M, Sugimori M, Kosako H, Nakatomi H, Yamamoto N, et al. Transcription Factor Expression and Notch-Dependent Regulation of Neural Progenitors in the Adult Rat Spinal Cord. *The Journal of Neuroscience* 2001;21:9814. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-24-09814.2001>.
- [156] Namiki J, Tator CH. Cell Proliferation and Nestin Expression in the Ependyma of the Adult Rat Spinal Cord after Injury. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 1999;58:489–98. <https://doi.org/10.1097/00005072-199905000-00008>.
- [157] Cawsey T, Duflou J, Weickert CS, Gorrie CA. Nestin-Positive Ependymal Cells Are Increased in the Human Spinal Cord after Traumatic Central Nervous System Injury. *Journal of Neurotrauma* 2015;32:1393. <https://doi.org/10.1089/NEU.2014.3575>.
- [158] Kozlova EN. Differentiation and migration of astrocytes in the spinal cord following dorsal root injury in the adult rat. *European Journal of Neuroscience* 2003;17:782–90. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02518.x>.

- [159] Figueroa JD, Serrano-Illan M, Licero J, Cordero K, Miranda JD, de Leon M. Fatty Acid Binding Protein 5 Modulates Docosahexaenoic Acid-Induced Recovery in Rats Undergoing Spinal Cord Injury. *Journal of Neurotrauma* 2016;33:1436. <https://doi.org/10.1089/NEU.2015.4186>.
- [160] Cheng A, Jia W, Kawahata I, Fukunaga K. A novel fatty acid-binding protein 5 and 7 inhibitor ameliorates oligodendrocyte injury in multiple sclerosis mouse models. *EBioMedicine* 2021;72. <https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2021.103582>.
- [161] Peng X, Studholme K, Kanjiya MP, Luk J, Bogdan D, Elmes MW, et al. Fatty-acid-binding protein inhibition produces analgesic effects through peripheral and central mechanisms. *Molecular Pain* 2017;13. <https://doi.org/10.1177/1744806917697007>.
- [162] Wang GQ, Bonkovsky HL, de Lemos A, Burczynski FJ. Recent insights into the biological functions of liver fatty acid binding protein 1. *Journal of Lipid Research* 2015;56:2238. <https://doi.org/10.1194/JLR.R056705>.
- [163] Shin HY, Kim H, Kwon MJ, Hwang DH, Lee KY, Kim BG. Molecular and Cellular Changes in the Lumbar Spinal Cord following Thoracic Injury: Regulation by Treadmill Locomotor Training. *PLoS ONE* 2014;9. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0088215>.
- [164] Du C, Wu H, Leng RP. UBE4B targets phosphorylated p53 at serines 15 and 392 for degradation. *Oncotarget* 2016;7:2823. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.6555>.
- [165] Dashzeveg N, Taira N, Lu ZG, Kimura J, Yoshida K. Palmelphin, a novel target of p53 with Ser46 phosphorylation, controls cell death in response to DNA damage. *Cell Death and Disease* 2014;5. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.176>.
- [166] Martin LJ, Chen K, Liu Z. Adult Motor Neuron Apoptosis Is Mediated by Nitric Oxide and Fas Death Receptor Linked by DNA Damage and p53 Activation. *The Journal of Neuroscience* 2005;25:6449. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0911-05.2005>.
- [167] Loughery J, Cox M, Smith LM, Meek DW. Critical role for p53-serine 15 phosphorylation in stimulating transactivation at p53-responsive promoters. *Nucleic Acids Research* 2014;42:7666. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKU501>.
- [168] Smeenk L, van Heeringen SJ, Koeppl M, Gilbert B, Janssen-Megens E. Role of p53 Serine 46 in p53 Target Gene Regulation. *PLoS ONE* 2011;6:17574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017574>.

- [169] Castrogiovanni C, Waterschoot B, de Backer O, Dumont P. Serine 392 phosphorylation modulates p53 mitochondrial translocation and transcription-independent apoptosis. *Nature Publishing Group* 2017;25:190–203. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.143>.
- [170] Wu J, Yoo S, Wilcock D, Lytle JM, Leung PY, Colton CA, et al. Interaction of NG2+ glial progenitors and microglia/macrophages from the injured spinal cord. *Glia* 2010;58:410. <https://doi.org/10.1002/GLIA.20932>.
- [171] Buss A, Pech K, Kakulas BA, Martin D, Schoenen J, Noth J, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in human traumatic spinal cord injury. *BMC Neurology* 2007;7:17. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-7-17>.
- [172] Tang J, Kang Y, Huang L, Wu L, Peng Y. TIMP1 preserves the blood–brain barrier through interacting with CD63/integrin  $\beta$ 1 complex and regulating downstream FAK/RhoA signaling. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2020;10:987. <https://doi.org/10.1016/J.APSB.2020.02.015>.
- [173] Shifman MI, Selzer ME. Differential Expression of Class 3 and 4 Semaphorins and Netrin in the Lamprey Spinal Cord during Regeneration. *J Comp Neurol* 2007;501:631. <https://doi.org/10.1002/CNE.21283>.
- [174] Wang F, Eagleson KL, Levitt P. Positive Regulation of Neocortical Synapse Formation by the Plexin-D1 Receptor. *Brain Res* 2015;1616:157. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2015.05.005>.
- [175] Scott K, O'Rourke R, Gillen A, Appel B. Prdm8 regulates pMN progenitor specification for motor neuron and oligodendrocyte fates by modulating the Shh signaling response. *Development* 2020;147. <https://doi.org/10.1242/DEV.191023>.
- [176] Kearns CA, Walker M, Ravanelli AM, Scott K, Arzbecker MR, Appel B. Zebrafish spinal cord oligodendrocyte formation requires boc function. *Genetics* 2021;218. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/IYAB082>.
- [177] Ogura T, Sakaguchi H, Miyamoto S, Takahashi J. Three-dimensional induction of dorsal, intermediate and ventral spinal cord tissues from human pluripotent stem cells. *Development (Cambridge)* 2018;145. <https://doi.org/10.1242/DEV.162214/VIDEO-1>.

- [178] Izumi H, Li Y, Shibaki M, Mori D, Yasunami M, Sato S, et al. Recycling endosomal CD133 functions as an inhibitor of autophagy at the pericentrosomal region. *Scientific Reports* 2019;9. <https://doi.org/10.1038/S41598-019-39229-8>.
- [179] Jászai J, Graupner S, Tanaka EM, Funk RHW, Huttner WB, Brand M, et al. Spatial Distribution of Prominin-1 (CD133) – Positive Cells within Germinative Zones of the Vertebrate Brain. *PLoS ONE* 2013;8. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0063457>.
- [180] Luo Y, Coskun V, Liang A, Yu J, Cheng L, Ge W, et al. Single-Cell Transcriptome Analyses Reveal Signals to Activate Dormant Neural Stem Cells. *Cell* 2015;161:1175. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.04.001>.
- [181] Sasaki H, Ishikawa M, Tanaka N, Nakanishi K, Kamei N, Asahara T, et al. Administration of human peripheral blood-derived CD133+ cells accelerates functional recovery in a rat spinal cord injury model. *Spine (Phila Pa 1976)* 2009;34:249–54. <https://doi.org/10.1097/BRS.0B013E3181913CDE>.
- [182] Yang X, Tomita T, Wines-Samuels M, Beglopoulos V, Tansey MG, Kopan R, et al. Notch1 signaling influences V2 interneuron and motor neuron development in the spinal cord. *Developmental Neuroscience* 2006;28:102–17. <https://doi.org/10.1159/000090757>.
- [183] Jalali A, Bassuk AG, Kan L, Israsena N, Mukhopadhyay A, McGuire T, et al. HeyL promotes neuronal differentiation of neural progenitor cells. *J Neurosci Res* 2011;89:299. <https://doi.org/10.1002/JNR.22562>.
- [184] Sobrido-Cameán D, Robledo D, Romaus-Sanjurjo D, Pérez-Cedrón V, Sánchez L, Rodicio MC, et al. Inhibition of Gamma-Secretase Promotes Axon Regeneration After a Complete Spinal Cord Injury. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2020;8. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.00173/FULL>.
- [185] Duval N, Vaslin C, Barata TC, Frarma Y, Contremoulins V, Baudin X, et al. Bmp4 patterns smad activity and generates stereotyped cell fate organization in spinal organoids. *Development (Cambridge)* 2019;146. <https://doi.org/10.1242/DEV.175430/264854/AM/BMP4-PATTERNS-SMAD-ACTIVITY-AND-GENERATES>.
- [186] Farrukh F, Davies E, Berry M, Logan A, Ahmed Z. BMP4/Smad1 Signalling Promotes Spinal Dorsal Column Axon Regeneration and Functional Recovery After Injury. *Molecular Neurobiology* 2019;56:6807. <https://doi.org/10.1007/S12035-019-1555-9>.

- [187] Maxwell MM, Tomkinson EM, Nobles J, Wizeman JW, Amore AM, Quinti L, et al. The Sirtuin 2 microtubule deacetylase is an abundant neuronal protein that accumulates in the aging CNS. *Human Molecular Genetics* 2011;20:3986. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDR326>.
- [188] González P, González-Fernández C, Javier Rodríguez F. Effects of Wnt5a overexpression in spinal cord injury. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2021;25:5150. <https://doi.org/10.1111/JCMM.16507>.
- [189] Hiyama A, Yokoyama K, Nukaga T, Sakai D, Mochida J. A complex interaction between Wnt signaling and TNF- $\alpha$  in nucleus pulposus cells. *Arthritis Research & Therapy* 2013;15:R189. <https://doi.org/10.1186/AR4379>.
- [190] Krupnik VE, Sharp JD, Jiang C, Robison K, Chickering TW, Amaravadi L, et al. Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. vol. 238. 1999.
- [191] Lemarchant S, Pruvost M, Montaner J, Emery E, Vivien D, Kanninen K, et al. ADAMTS proteoglycanases in the physiological and pathological central nervous system. *Journal of Neuroinflammation* 2013;10:133. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-133>.
- [192] Post S, Weng Y-C, Cimprich K, Bo Chen L, Xu Y, Y-H Lee EP. Phosphorylation of serines 635 and 645 of human Rad17 is cell cycle regulated and is required for G 1 S checkpoint activation in response to DNA damage. 2001.
- [193] Bao S, Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Fang Y, Richardson DA, Ali A, et al. ATR/ATM-mediated phosphorylation of human Rad17 is required for genotoxic stress responses. *Nature* 2001 411:6840 2001;411:969–74. <https://doi.org/10.1038/35082110>.
- [194] Nakamura H, Hoshino Y, Okuyama H, Matsuo Y, Yodoi J. Thioredoxin 1 delivery as new therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2009;61:303–9. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2009.01.003>.
- [195] Guilcher SJT, Catharine Craven B, Bassett-Gunter RL, Cimino SR, Hitzig SL. An examination of objective social disconnectedness and perceived social isolation among persons with spinal cord injury/dysfunction: a descriptive cross-sectional study. *Disability and Rehabilitation* 2021;43:69–75. <https://doi.org/10.1080/09638288.2019.1616328>.

- [196] Onose G, Angheliescu A, Muresanu DF, Padure L, Haras MA, Co C, et al. REVIEW A review of published reports on neuroprotection in spinal cord injury. *Spinal Cord* 2009;47:716–26. <https://doi.org/10.1038/sc.2009.52>.
- [197] Onose G, Haras M, Angheliescu A, Mureșanu D, Giuglea C, Daia Chendreanu C, et al. Integrative emphases on intimate, intrinsic propensity/ pathological processes-causes of self recovery limits and also, subtle related targets for neuroprotection/ pleiotropicity/ multimodal actions, by accessible therapeutic approaches-in spinal cord injuries. vol. 3. n.d.
- [198] Onose G, Mureșanu DF, Ciurea A v, Daia Chendreanu\*’ \* C, Mihaescu AS, Mardare DC, et al. Neuroprotective and consequent neurorehabilitative clinical outcomes, in patients treated with the pleiotropic drug cerebrolysin. vol. 2. n.d.
- [199] Onose G, Haras M, Angheliescu A, Mureșanu D, Giuglea C, Daia Chendreanu C, et al. Integrative emphases on intimate, intrinsic propensity/ pathological processes-causes of self recovery limits and also, subtle related targets for neuroprotection/ pleiotropicity/ multimodal actions, by accessible therapeutic approaches-in spinal cord injuries. vol. 3. n.d.
- [200] Borgens RB, Shi R. Immediate recovery from spinal cord injury through molecular repair of nerve membranes with polyethylene glycol. vol. 14. 2000.
- [201] Luo J, Borgens R, Shi R. Polyethylene glycol immediately repairs neuronal membranes and inhibits free radical production after acute spinal cord injury. vol. 83. 2002.
- [202] Borgens RB, Bohnert D. Rapid Recovery From Spinal Cord Injury After Subcutaneously Administered Polyethylene Glycol. vol. 66. 2001.
- [203] Liu-Snyder P, Logan MP, Shi R, Smith DT, Borgens R ben. Neuroprotection from secondary injury by polyethylene glycol requires its internalization. *Journal of Experimental Biology* 2007;210:1455–62. <https://doi.org/10.1242/JEB.02756>.
- [204] Krause TL, Bittner GD. Rapid morphological fusion of severed myelinated axons by polyethylene glycol (nerve regeneration/axolemmal fusion/cytoplasmic repair/*Lumbricus terrestris*). vol. 87. 1990.
- [205] Laverty PH, Leskovar A, Breur GJ, Coates JR, Bergman RL, Widmer WR, et al. A Preliminary Study of Intravenous Surfactants in Paraplegic Dogs: Polymer Therapy in Canine Clinical SCI. *JOURNAL OF NEUROTRAUMA* 2004;21.

- [206] Rad I, Khodayari K, Alijanvand SH, Mobasheri H. Interaction of polyethylene glycol (PEG) with the membrane-binding domains following spinal cord injury (SCI): Introduction of a mechanism for SCI repair. *Journal of Drug Targeting* 2015;23:79–88. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2014.956668>.
- [207] Ahuja CS, Nori S, Tetreault L, Wilson J, Kwon B, Harrop J, et al. Traumatic spinal cord injury - Repair and regeneration. *Clinical Neurosurgery* 2017;80:S22–90. <https://doi.org/10.1093/neuros/nyw080>.
- [208] Jiang X, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2021;22:266–82. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00324-8>.
- [209] Vieira HLA, Alves PM, Vercelli A. Modulation of neuronal stem cell differentiation by hypoxia and reactive oxygen species. *Progress in Neurobiology* 2011;93:444–55. <https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2011.01.007>.
- [210] Eyrich NW, Potts CR, Robinson MH, Maximov V, Kenney AM. Reactive Oxygen Species Signaling Promotes Hypoxia-Inducible Factor 1 Stabilization in Sonic Hedgehog-Driven Cerebellar Progenitor Cell Proliferation. 2019.
- [211] Sprick JD, Mallet RT, Przyklenk K, Rickards CA. Ischemic and Hypoxic Conditioning: Potential for Protection of Vital Organs. *Exp Physiol* 2019;104:278. <https://doi.org/10.1113/EP087122>.
- [212] Wu D, Yotnda P. Induction and Testing of Hypoxia in Cell Culture. *J Vis Exp* 2011:2899. <https://doi.org/10.3791/2899>.
- [213] Stoica SI, Bleotu C, Ciobanu V, Mirela Ionescu A, Albadi I, Onose G, et al. Considerations about Hypoxic Changes in Neuraxis Tissue Injuries and Recovery 2022. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020481>.
- [214] Gregg L Semenza. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing 2001. [https://doi.org/doi:10.1016/s0955-0674\(00\)00194-0](https://doi.org/doi:10.1016/s0955-0674(00)00194-0).
- [215] Stoica SI, Bleotu C, Ciobanu V, Mirela Ionescu A, Albadi I, Onose G, et al. Considerations about Hypoxic Changes in Neuraxis Tissue Injuries and Recovery 2022. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020481>.

- [216] Stoica SI, Bleotu C, Ciobanu V, Mirela Ionescu A, Albadi I, Onose G, et al. Considerations about Hypoxic Changes in Neuraxis Tissue Injuries and Recovery 2022. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020481>.
- [217] Ratcliffe PJ. HIF-1 and HIF-2: Working alone or together in hypoxia? *Journal of Clinical Investigation* 2007;117:862–5. <https://doi.org/10.1172/JCI31750>.
- [218] Hewitson KS, McNeill LA, Riordan M v., Tian YM, Bullock AN, Welford RW, et al. Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *Journal of Biological Chemistry* 2002;277:26351–5. <https://doi.org/10.1074/JBC.C200273200>.
- [219] Stoica SI, Tănase I, Ciobanu V, Onose G. Initial researches on neuro-functional status and evolution in chronic ethanol consumers with recent traumatic spinal cord injury. *Journal of Medicine and Life* n.d.;12:97–112. <https://doi.org/10.25122/jml-2019-0026>.
- [220] Hao J, Chen X, Fu T, Liu J, Yu M, Han W, et al. The Expression of VHL (Von Hippel-Lindau) After Traumatic Spinal Cord Injury and Its Role in Neuronal Apoptosis. *Neurochemical Research* 2016;41:2391–400. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-1952-7>.
- [221] Patrick H. Maxwell\* MSW-WCSCCECVECCCWWPERMPJR. The tumour suppressorprotein VHL targetshypoxia-inducible factors foroxygen-dependent proteolysis. *NATURE* 1999.
- [222] Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:5510. <https://doi.org/10.1073/PNAS.92.12.5510>.
- [223] D'ignazio L, Rocha S. Hypoxia Induced NF-κB. *Cells* 2016;5:1–8. <https://doi.org/10.3390/CELLS5010010>.
- [224] Kerendi F, Halkos ME, Kin H, Corvera JS, Brat DJ, Wagner MB, et al. Upregulation of hypoxia inducible factor is associated with attenuation of neuronal injury in neonatal piglets undergoing deep hypothermic circulatory arrest. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2005;130:1079.e1-1079.e10. <https://doi.org/10.1016/J.JTCVS.2005.05.045>.
- [225] Yu J, Yang H, Fang B, Zhang Z, Wang Y, Dai Y. mfat-1 transgene protects cultured adult neural stem cells against cobalt chloride-mediated hypoxic injury by activating Nrf2/ARE pathways. *J Neurosci Res* 2018;96:87–102. <https://doi.org/10.1002/JNR.24096>.

- [226] Magiorkinis G, Hurst TP, Miyazawa M, Brütting C, Narasimhan H, Hoffmann F, et al. Investigation of Endogenous Retrovirus Sequences in the Neighborhood of Genes Up-regulated in a Neuroblastoma Model after Treatment with Hypoxia-Mimetic Cobalt Chloride 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00287>.
- [227] Zhong D, Cao Y, Li C-J, Li M, Rong Z-J, Jiang L, et al. Neural stem cell-derived exosomes facilitate spinal cord functional recovery after injury by promoting angiogenesis. *Experimental Biology and Medicine* 2020;245:54–65. <https://doi.org/10.1177/1535370219895491>.
- [228] Chouchay S, Noctor SC, Chutabhakdikul N. MICROGLIA ENHANCES PROLIFERATION OF NEURAL PROGENITOR CELLS IN AN IN VITRO MODEL OF HYPOXIC-ISCHEMIC INJURY. *EXCLI Journal* 2020;19:950–61. <https://doi.org/10.17179/excli2020-2249>.
- [229] Cameron NE, Cotter MA. Rapid Publication Neurovascular Dysfunction in Diabetic Rats Potential Contribution of Autoxidation and Free Radicals Examined Using Transition Metal Chelating Agents. vol. 96. 1995.
- [230] Kletkiewicz H, Klimiuk M, Woźniak AW, Mila-Kierzenkowska C, Dokładny K, Rogalska J. antioxidants How to Improve the Antioxidant Defense in Asphyxiated Newborns-Lessons from Animal Models n.d. <https://doi.org/10.3390/antiox9090898>.
- [231] Zhang R, Huang Q, Zou L, Cao X, Huang H, Chu X. Beneficial effects of deferoxamine against astrocyte death induced by modified oxygen glucose deprivation. *Brain Research* 2014;1583:23–33. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2014.08.016>.
- [232] Llorente IL, Xie Y, Mazzitelli JA, Hatanaka EA, Cinkornpumin J, Miller DR, et al. Patient-derived glial enriched progenitors repair functional deficits due to white matter stroke and vascular dementia in rodents. *Science Translational Medicine* 2021;13. [https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.AAZ6747/SUPPL\\_FILE/AAZ6747\\_SM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.AAZ6747/SUPPL_FILE/AAZ6747_SM.PDF).
- [233] David BT, Curtin JJ, Brown JL, Coutts DJC, Boles NC, Hill CE. Treatment with hypoxia-mimetics protects cultured rat Schwann cells against oxidative stress-induced cell death. *Glia* 2021;69:2215–34. <https://doi.org/10.1002/GLIA.24019>.
- [234] Chu K, Jung KH, Kim SJ, Lee ST, Kim J, Park HK, et al. Transplantation of human neural stem cells protect against ischemia in a preventive mode via hypoxia-inducible factor-1alpha

stabilization in the host brain. *Brain Res* 2008;1207:182–92. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2008.02.043>.

- [235] Tang G, Chen Y, Chen J, Chen Z, Jiang W. Deferoxamine Ameliorates Compressed Spinal Cord Injury by Promoting Neovascularization in Rats. *Journal of Molecular Neuroscience* 2020;70:1437–44. <https://doi.org/10.1007/S12031-020-01564-1/FIGURES/6>.
- [236] Li G, Zhao Y, Li Y, Lu J. Up-Regulation of Neuronal Nitric Oxide Synthase Expression by Cobalt Chloride Through a HIF-1 $\alpha$  Mechanism in Neuroblastoma Cells. *Neuromolecular Med* 2015;17:443–53. <https://doi.org/10.1007/S12017-015-8373-7>.
- [237] Milosevic J, Adler I, Manaenko A, Schwarz SC, Walkinshaw G, Arend M, et al. Non-hypoxic stabilization of hypoxia-inducible factor alpha (HIF-alpha): relevance in neural progenitor/stem cells. *Neurotox Res* 2009;15:367–80. <https://doi.org/10.1007/S12640-009-9043-Z>.
- [238] Chen XH, Chen DT, Huang XM, Chen YH, Pan JH, Zheng XC, et al. Dexmedetomidine Protects Against Chemical Hypoxia-Induced Neurotoxicity in Differentiated PC12 Cells Via Inhibition of NADPH Oxidase 2-Mediated Oxidative Stress. *Neurotox Res* 2019;35:139–49. <https://doi.org/10.1007/S12640-018-9938-7>.
- [239] Yoo SY, Yoo JY, Kim HB, Baik TK, Lee JH, Woo RS. Neuregulin-1 Protects Neuronal Cells Against Damage due to CoCl<sub>2</sub>-Induced Hypoxia by Suppressing Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  and P53 in SH-SY5Y Cells. *Int Neurol J* 2019;23:S111–8. <https://doi.org/10.5213/INJ.1938190.095>.
- [240] LI F, ZHANG J, LIAO R, DUAN Y, TAO L, XU Y, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles prevent neural stem cell hypoxia injury via promoting miR-210-3p expression. *Mol Med Rep* 2020;22:3813–21. <https://doi.org/10.3892/MMR.2020.11454>.
- [241] Li HL, Zaghoul N, Ahmed I, Omelchenko A, Firestein BL, Huang H, et al. Caffeine inhibits hypoxia-induced nuclear accumulation in HIF-1 $\alpha$  and promotes neonatal neuronal survival. *Exp Neurol* 2019;317:66–77. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2019.01.014>.
- [242] Maliha AM, Kuehn S, Hurst J, Herms F, Fehr M, Bartz-Schmidt KU, et al. Diminished apoptosis in hypoxic porcine retina explant cultures through hypothermia. *Scientific Reports* 2019 9:1 2019;9:1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41113-4>.

- [243] Crispo JAG, Ansell DR, Ubriaco G, Tai TC. Role of reactive oxygen species in the neural and hormonal regulation of the PNMT gene in PC12 cells. *Oxid Med Cell Longev* 2011;2011. <https://doi.org/10.1155/2011/756938>.
- [244] Li G, Zhao Y, Li Y, Lu J. Up-Regulation of Neuronal Nitric Oxide Synthase Expression by Cobalt Chloride Through a HIF-1 $\alpha$  Mechanism in Neuroblastoma Cells. *Neuromolecular Med* 2015;17:443–53. <https://doi.org/10.1007/S12017-015-8373-7>.
- [245] Merlo S, Luaces JP, Spampinato SF, Toro-Urrego N, Caruso GI, D'amico F, et al. SIRT1 Mediates Melatonin's Effects on Microglial Activation in Hypoxia: In Vitro and In Vivo Evidence. *Biomolecules* 2020;10. <https://doi.org/10.3390/BIOM10030364>.
- [246] Wenker SD, Chamorro ME, Vittori DC, Nesse AB. Protective action of erythropoietin on neuronal damage induced by activated microglia. *FEBS J* 2013;280:1630–42. <https://doi.org/10.1111/FEBS.12172>.
- [247] Wang P, Li L, Zhang Z, Kan Q, Chen S, Gao F. Time-dependent homeostasis between glucose uptake and consumption in astrocytes exposed to CoCl<sub>2</sub> treatment. *Mol Med Rep* 2016;13:2909–17. <https://doi.org/10.3892/MMR.2016.4873>.
- [248] Jeon ES, Shin JH, Hwang SJ, Moon GJ, Bang OY, Kim HH. Cobalt chloride induces neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells through upregulation of microRNA-124a. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;444:581–7. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2014.01.114>.
- [249] C. Cernescu SR. *Practica diagnosticului virusologic*. Ed. Concept publishing; 1997.
- [250] <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/brochures/flow-cytometry-capabilities-guide-brochure.pdf> n.d.
- [251] <https://www.flowjo.com/solutions/flowjo> n.d.
- [252] McKinnon KM. Flow cytometry: An overview. *Current Protocols in Immunology* 2018;2018:5.1.1-5.1.11. <https://doi.org/10.1002/CPIM.40>.
- [253] Murray A. Cell cycle checkpoints. *Current Opinion in Cell Biology* 1994;6:872–6. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(94\)90059-0](https://doi.org/10.1016/0955-0674(94)90059-0).
- [254] Chomczynski P, Sacchi N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. vol. 162. 1987.

- [255] [https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0017977\\_highcap\\_cDNA\\_RT\\_UG.pdf](https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0017977_highcap_cDNA_RT_UG.pdf) n.d.
- [256] Ma H, Bell KN, Loker RN. qPCR and qRT-PCR analysis: Regulatory points to consider when conducting biodistribution and vector shedding studies. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development* 2021;20:152–68. <https://doi.org/10.1016/J.OMTM.2020.11.007>.
- [257] <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4448491?SID=srch-srp-4448491> n.d.
- [258] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 2008;3:1101–8. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.
- [259] [https://www.rndsystems.com/products/proteome-profiler-human-cell-stress-array-kit\\_ary018](https://www.rndsystems.com/products/proteome-profiler-human-cell-stress-array-kit_ary018) n.d.
- [260] [https://www.rndsystems.com/products/proteome-profiler-human-apoptosis-array-kit\\_ary009](https://www.rndsystems.com/products/proteome-profiler-human-apoptosis-array-kit_ary009) n.d.
- [261] (8400-0012-D00-Migration-Invasion-User-Manual3-Protocols-1--Data n. d. ). (8400-0012-D00-Migration-Invasion-User-Manual3-Protocols-1--Data, n.d.) n.d.
- [262] Takeoka A, Arber S. Functional Local Proprioceptive Feedback Circuits Initiate and Maintain Locomotor Recovery after Spinal Cord Injury. *Cell Reports* 2019;27:71-85.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.010>.
- [263] <https://www.atcc.org/search#q=HTB%2011&sort=relevancy&numberOfResults=24> n.d.
- [264] Hari Y, Harashima N, Tajima Y, Harada M. Bcl-xL inhibition by molecular-targeting drugs sensitizes human pancreatic cancer cells to TRAIL. *Oncotarget* 2015;6:41902. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.5881>.
- [265] Jang C, Oh SF, Wada S, Rowe GC, Liu L, Chan MC, et al. A branched chain amino acid metabolite drives vascular transport of fat and causes insulin resistance HHS Public Access Author manuscript. *Nat Med* 2016;22:421–6. <https://doi.org/10.1038/nm.4057>.
- [266] Essen BioScience Inc. Scratch wound module User\_Manual. IncuCyte ZOOM® 96-Well Scratch Wound Cell Migration & Invasion Assays n.d. [https://qcri.queensu.ca/source/QCRI/Scratch%20wound%20module%20User\\_Manual.pdf](https://qcri.queensu.ca/source/QCRI/Scratch%20wound%20module%20User_Manual.pdf) (accessed June 19, 2022).

- [267] Ohri SS, Burke DA, Andres KR, Hetman M, Whittemore SR. Acute Neural and Proteostasis Messenger Ribonucleic Acid Levels Predict Chronic Locomotor Recovery after Contusive Spinal Cord Injury n.d. <https://doi.org/10.1089/neu.2020.7258>.
- [268] Halliday M, Hughes D, Mallucci GR. Fine-tuning PERK signaling for neuroprotection. *J Neurochem* 2017;142:812–26. <https://doi.org/10.1111/JNC.14112>.
- [269] Fernandez-Funez, Pedro. Cell Cycle Launching Hsp70 neuroprotection 2014. <https://doi.org/10.4161/cc.29148>.
- [270] <https://www.atcc.org/search#q=HTB%2014&sort=relevancy&numberOfResults=24> n.d.
- [271] [https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/legislation\\_en.htm](https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm) n.d.
- [272] Mizuno T, Goto Y, Baba K, Masuda K, Ohno K, Tsujimoto H. Molecular cloning of feline tumour necrosis factor receptor type I (TNFR I) and expression of TNFR I and TNFR II in lymphoid cells in cats. vol. 30. 2003.
- [273] Pennica DN; HJS; SPH; DRPMA; KWJ; ABB; GD v. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 1984.
- [274] Stoica SI, Onose G, Hoteteu M, Munteanu C. Effects of ethanol and deferoxamine on rat primary glial cell cultures, in regard with ischemia induced by traumatic spinal cord injury. *Balneo and PRM Research Journal* 2022:502. <https://doi.org/10.12680/balneo.2022.502>.
- [275] Sengupta P. *The Laboratory Rat: Relating Its Age with Human's*. vol. 4. 2013.
- [276] Foo LC, Allen NJ, Bushong EA, Ventura PB, Chung WS, Zhou L, et al. Development of a method for the purification and culture of rodent astrocytes. *Neuron* 2011;71:799–811. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2011.07.022>.
- [277] kolajaan. NB: Unofficial translation Legally binding texts are those in Finnish and Swedish Act on the Protection of Animals Used for Scientific or Educational Purposes (497/2013). n.d.
- [278] Handbook of WMA Policies World Medical Association | WMA STATEMENT ON ANIMAL USE IN BIOMEDICAL RESEARCH. n.d.
- [279] Sarc L, Wraber B, Lipnik-Stangelj M. Ethanol and acetaldehyde disturb TNF-alpha and IL-6 production in cultured astrocytes n.d. <https://doi.org/10.1177/0960327110388533>.

- [280] Luczak A, Kubo Y. Predictive Neuronal Adaptation as a Basis for Consciousness. *Frontiers in Systems Neuroscience* 2022;15. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2021.767461>.
- [281] Lebedev M, Buffo A, Mateos-Aparicio P, Rodríguez-Moreno A. The Impact of Studying Brain Plasticity. *Frontiers in Cellular Neuroscience | WwwFrontiersinOrg* 2019;13:66. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00066>.
- [282] Walker JR, Detloff MR. Plasticity in cervical motor circuits following spinal cord injury and rehabilitation. *Biology (Basel)* 2021;10. <https://doi.org/10.3390/biology10100976>.
- [283] Abrahao KP, Salinas AG, Lovinger DM. Alcohol and the Brain: Neuronal Molecular Targets, Synapses, and Circuits. *Neuron* 2017;96:1223–38. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.10.032>.
- [284] Tateno M, Saito T. Biological Studies on Alcohol-Induced Neuronal Damage Correspondence n.d.
- [285] Abrahao KP, Salinas AG, Lovinger DM. Alcohol and the Brain: Neuronal Molecular Targets, Synapses, and Circuits. *Neuron* 2017;96:1223–38. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.10.032>.
- [286] Antonio AM, Druse MJ. Antioxidants Prevent Ethanol-Associated Apoptosis in Fetal Rhombencephalic Neurons. *Brain Res* 2008;1204:16–23. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.02.018>.
- [287] Antonio AM, Druse MJ. Antioxidants prevent ethanol-associated apoptosis in fetal rhombencephalic neurons. *Brain Research* 2008;1204:16–23. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.02.018>.
- [288] PubChem Compound Summary for CID 702, Ethanol. National Center for Biotechnology Information 2022. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/702> (accessed August 4, 2022).
- [289] Yukitake H, Takizawa M, Kimura H. Macrophage Migration Inhibitory Factor as an Emerging Drug Target to Regulate Antioxidant Response Element System 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8584930>.
- [290] Cox CS, McKay SE, Holmbeck MA, Christian BE, Scortea AC, Tsay AJ, et al. Mitohormesis in Mice via Sustained Basal Activation of Mitochondrial and Antioxidant Signaling. *Cell Metabolism* 2018;28:776-786.e5. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2018.07.011>.

- [291] Wallenborg K, Vlachos P, Eriksson S, Huijbregts L, Arnér ESJ, Joseph B, et al. Red wine triggers cell death and thioredoxin reductase inhibition: Effects beyond resveratrol and SIRT1. *Experimental Cell Research* 2009;315:1360–71. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.02.022>.
- [292] MacHicao F, Muresanu DF, Hundsberger H, Pflüger M, Guekht A. Pleiotropic neuroprotective and metabolic effects of Actovegin's mode of action. *Journal of the Neurological Sciences* 2012;322:222–7. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2012.07.069>.
- [293] de Decker S, Moore SA, Tipold A, Olby NJ, Stein V, Granger N. Current Approaches to the Management of Acute Thoracolumbar Disc Extrusion in Dogs. *Frontiers in Veterinary Science* | [WwwFrontiersinOrg](http://www.frontiersin.org) 2020;1:610. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00610>.