



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Θέμα: Φλεγμονώδεις αποκρίσεις των μακροφάγων και σχηματισμός
αφρωδών κυττάρων στη νόσο του Parkinson**

Γεωργούλα Μαρία

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Καλαλά Φανή, Επίκουρος Καθηγήτρια Ιατρικής Ανοσολογίας, Επιβλέπουσα
- Παπουτσοπούλου Σταματία, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Ανοσοβιολογίας
- Μπόγδανος Δημήτριος, Καθηγητής, Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στις Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής.

Λάρισα, Ιανουάριος, 2025



UNIVERSITY OF THESSALY



**SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE**

**MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”**

MASTER THESIS

**Title: Macrophage inflammatory responses and foam cell formation in
Parkinson's disease**

By

Georgoula Maria

Three members of Examination Committee:

- Kalala Fani, Assistant Professor of Medical Immunology, Supervisor
- Papoutsopoulou Stamatia, Assistant Professor of Molecular Immunology
- Bogdanos Dimitrios, Professor of Pathology and Autoimmune Diseases

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Clinical Applications of Molecular Medicine

Larissa, January, 2025

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Γενικά χαρακτηριστικά της νόσου του Parkinson.....	8
1.2 Λιπίδια, Λιποπρωτεΐνες και καρδιαγγειακή νόσος	8
1.2.1 Λιπίδια και Λιποπρωτεΐνες	8
1.2.2 Λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL)	9
1.2.3 Παθογένεση αθηροσκλήρωσης	9
1.2.4 Δυσλειτουργία ενδοθηλίου.....	10
1.2.5 Διέλευση, υπενδοθηλιακή κατακράτηση και οξείδωση LDL	10
1.2.6 Προσκόλληση μονοκυττάρων και μετατροπή σε μακροφάγα	11
1.2.7 Απόπτωση αφρωδών κυττάρων-Δημιουργία νεκρωτικού πυρήνα	11
1.2.8 Λεία μυϊκά κύτταρα.....	12
1.3 Μονοκύτταρα και μακροφάγα: Βασικά στοιχεία της ανοσολογικής απόκρισης.....	13
1.3.1 Μονοκύτταρα.....	13
1.3.2 Μακροφάγα.....	14
1.3.3 Πόλωση μακροφάγων – Μακροφάγα και αθηροσκλήρωση.....	15
1.4 Ρόλος της σερτιλίνης στη νόσο του Parkinson και στην αθηροσκλήρωση.....	16
1.5 LRH-1: Ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα στην αθηροσκλήρωση	18
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	20
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	21
3.1 Κυτταροκαλλιέργειες.....	21
3.1.1 Καλλιέργεια και ανακαλλιέργεια κυττάρων	21
3.1.2 Κατάψυξη και απόψυξη κυττάρων.....	23
3.2 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από ολικό περιφερικό αίμα και <i>in vitro</i> διαφοροποίηση τους σε μακροφάγα.....	23
3.3 Αποκόλληση κυττάρων	24

3.4 Μέτρηση κυττάρων.....	25
3.5 Σχηματισμός αφρωδών κυττάρων	25
3.6 Κυτταρομετρία ροής.....	26
3.7 Παροδική διαμόλυνση 293T κυττάρων με τη μέθοδο της πολυαιθυλενιμίνης και παραγωγή λεντικών σωματιδίων.....	28
3.8 Μεταγωγή J774A.1 και Hela κυττάρων με λεντιό	30
3.9 Έλεγχος για ενδογενή αντοχή στη νεομυκίνη.....	30
3.10 Μέτρηση κυττάρων με τη χρήση της χρωστικής Trypan Blue.....	31
3.11 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από κυτταρικές σειρές.....	31
3.12 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR).....	32
4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	34
Α. ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ (PBMCs) ΚΑΙ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ (PBMDMs)	34
4.1 Φαινοτύπιση μακροφάγων PBMDMs σε <i>in vitro</i> καλλιέργειες	34
4.2 Προσδιορισμός των επιπέδων του αντιγόνου HLA-DR στην επιφάνεια μακροφάγων	35
4.3 Προσδιορισμός των επιπέδων σορτιλίνης και του δείκτη κυτταρικής επιφάνειας CD11b στην επιφάνεια μακροφάγων	37
4.4 Προσδιορισμός ποσοστού σχηματισμού αφρωδών κυττάρων	38
Β. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ J774A.1	39
4.5 Καθορισμός βέλτιστων συνθηκών σχηματισμού αφρωδών κυττάρων που επάγονται από την oxLDL.....	39
4.6 Ποσοτικός προσδιορισμός των εκκρινόμενων φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-6 και TNF	41
Γ. ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ ΚΑΙ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	43
4.7 Δημιουργία διαγονιδιακών κυτταρικών σειρών και έλεγχος ενδογενούς ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό G418	43
4.8 Επιβεβαίωση θετικών κλώνων με τη βοήθεια μικροσκοπίας φθορισμού	44
4.9 Επιβεβαίωση θετικών κλώνων με τη βοήθεια qPCR.....	45
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	47
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	52

Πρόλογος-Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των απαιτήσεων του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών “Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής” του τμήματος Ιατρικής κατά το ακαδημαϊκό έτος 2023 – 2024, υπό την επίβλεψη της Επίκουρου Καθηγήτριας κυρία Παπουτσοπούλου Σταματίας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής μου εργασίας, Επίκουρο Καθηγήτρια Καλαλά Φανή για τη σημαντική συμβολή της στην περάτωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια κυρία Παπουτσοπούλου Σταματία, για τη σημαντική συμβολή της στην περάτωση της διπλωματικής μου εργασίας καθώς και για τη στήριξη και εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Ευχαριστώ επίσης τον Καθηγητή Μπόγδανο Δημήτριο, για την συμμετοχή του στην επιτροπή, καθώς και για τον χρόνο που διέθεσε και την υποστήριξη κατά τη διάρκεια της πραγματοποίησης των πειραμάτων.

Ευχαριστώ τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας, Καθηγητή κ. Σπελέτα Ματθαίο, που δέχτηκε να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία στο συγκεκριμένο εργαστήριο. Επιπλέον, ευχαριστώ ιδιαίτερα την τεχνολόγο του εργαστηρίου κα. Φουσίκα Νάνσυ, για την άριστη συνεργασία και την πολύτιμη βοήθεια της, όπως επίσης και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Barry J. Campbell στο Πανεπιστήμιο του Λίβερπουλ, για τη φιλοξενία του στο εργαστήριό του κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών (Ελληνο-Βρετανικό πρόγραμμα υποτροφιών βραχείας διάρκειας 2024) καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσε να έρθω σε επαφή με ενδιαφέρουσες εργαστηριακές τεχνικές.

Αναμφίβολα, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένεια μου και τους φίλους μου, που είναι πάντα δίπλα μου και με στηρίζουν σε κάθε μου βήμα και απόφαση, παρέχοντας μου τα απαραίτητα εφόδια για να επιτύχω τους στόχους μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νόσος του Parkinson (Parkinson's Disease, PD) είναι μια σύνθετη νευροεκφυλιστική διαταραχή που πλήττει κυρίως τον ηλικιωμένο πληθυσμό και χαρακτηρίζεται από κινητικά και μη κινητικά συμπτώματα. Ένα κοινό παθολογικό χαρακτηριστικό πολυπαραγοντικών ασθενειών, όπως η PD και η αθηροσκλήρωση, είναι η εκτεταμένη φλεγμονή, η οποία εμπλέκει πολύπλοκους μηχανισμούς της έμφυτης και της προσαρμοστικής ανοσίας. Η σορτιλίνη, μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου I και μέλος της οικογένειας υποδοχέων με VPS10P επικράτεια, έχει ερευνηθεί για τη σύνδεσή της με τη νόσο του Parkinson και την αθηροσκλήρωση. Η αθηροσκλήρωση είναι μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος που σχετίζεται με τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, τη συσσώρευση οξειδωμένων LDL και το σχηματισμό αθηρωματικών πλακών, με σοβαρές καρδιαγγειακές επιπλοκές. Η αναζήτηση νέων θεραπευτικών στόχων και η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών της αθηροσκλήρωσης έχουν εστιάσει το ενδιαφέρον στον μεταγραφικό παράγοντα LRH-1 (Liver Receptor Homolog-1), ο οποίος ρυθμίζει τον λιπιδικό μεταβολισμό, τη φλεγμονή και την ομοιοστάση της χοληστερόλης.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι τριπλός, εστιάζοντας σε τρεις βασικούς άξονες. Στο συσχετισμό των επιπέδων της σορτιλίνης σε μακροφάγα και δεικτών ενεργοποίησης με το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, στην ανάλυση των επιπέδων σορτιλίνης και του σχηματισμού αφρωδών κυττάρων στη κυτταρική σειρά μακροφάγων ποντικού J774A.1 και στην ανάπτυξη εργαλείων έρευνας και συγκεκριμένα κυτταρικών σειρών αναφοράς που εκφράζουν ενισχυμένη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (eGFP) και λουσιφεράση πυγολαμπίδας υπό τον έλεγχο του υποκινητή του LRH-1.

ABSTRACT

Parkinson's Disease (PD) is a complex neurodegenerative disorder that primarily affects the elderly population and is characterized by motor and non-motor symptoms. A common pathological feature of multifactorial diseases, such as PD and atherosclerosis, is extensive inflammation, which involves intricate mechanisms of innate and adaptive immunity. Sortilin, a type I transmembrane glycoprotein and a member of the VPS10P domain receptor family, has been investigated for its association with Parkinson's Disease and atherosclerosis.

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease linked to endothelial dysfunction, the accumulation of oxidized LDL, and the formation of atheromatous plaques, leading to severe cardiovascular complications. The search for new therapeutic targets and the understanding of the molecular mechanisms of atherosclerosis have focused attention on the transcription factor LRH-1 (Liver Receptor Homolog-1), which regulates lipid metabolism, inflammation, and cholesterol homeostasis.

The aim of the present study is threefold, focusing on three main axes: the correlation of sortilin levels in macrophages and activation markers with foam cell formation; the analysis of sortilin levels and foam cell formation in the mouse macrophage cell line J774A.1; and the development of research tools, specifically reference cell lines expressing enhanced green fluorescent protein (eGFP) and firefly luciferase under the control of the LRH-1 promoter.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά χαρακτηριστικά της νόσου του Parkinson

Η νόσος του Parkinson (Parkinson's disease – PD) αποτελεί μία προοδευτική νευρολογική διαταραχή η οποία χαρακτηρίζεται από διαδοχικό εκφυλισμό ντοπαμινεργικών νευρώνων που προεκβάλλουν από την συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας (Substantia Nigra, SNc) στο ραβδωτό σώμα, από νευροφλεγμονή και από εγκλείσματα πλούσια σε α-συνουκλεΐνη (alpha synuclein, a-syn), τα σωμάτια Lewy (Lewy bodies) [1]. Πρόκειται για ένα από τα πιο συχνά νευροεκφυλιστικά νοσήματα που χαρακτηρίζεται τόσο από κινητικά όσο και μη συμπτώματα και πλήττει τον ανθρώπινο πληθυσμό παγκοσμίως αλλά κυρίως άτομα άνω των 65 ετών [2,3]. Αποτελεί μία πολυπαραγοντική νόσο ως προς την παθογένεση της η οποία μπορεί να συνδυάζει διάφορους γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως επίσης το βιολογικό φύλο και την ηλικία [2,4,5]. Επίσης, η μοριακή της βάση εντοπίζεται σε μία πληθώρα γεγονότων όπως η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και η μιτοφαγία, η λανθασμένη αναδίπλωση και συσσώρευση α συνουκλεΐνης και το οξειδωτικό στρες.

1.2 Λιπίδια, Λιποπρωτεΐνες και καρδιαγγειακή νόσος

Η αθηροσκλήρωση μία από τις πιο διαδεδομένες καρδιαγγειακές παθήσεις παγκοσμίως διακρίνεται από την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας, μιας διαδικασίας που χαρακτηρίζεται τόσο από την εναπόθεση λιπιδίων όσο και από την παρουσία αφρωδών κυττάρων (foam cells) στον έσω χιτώνα των αρτηριών [6]. Η αθηροσκλήρωση όπως και η νόσος του Parkinson, αν και διαφορετικές παθολογικές καταστάσεις, μοιράζονται κοινούς μηχανισμούς παθογένεσης όπως η χρόνια φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες [7]. Αντίστοιχα, παράγοντες κινδύνου όπως η ηλικία συνδέουν περαιτέρω τις δύο νόσους, προσφέροντας νέες προοπτικές για κοινές θεραπευτικές προσεγγίσεις [7,8].

1.2.1 Λιπίδια και Λιποπρωτεΐνες

Τα λιπίδια αποτελούν μία σημαντική τάξη μορίων με ποικίλους βιοχημικούς ρόλους. Κυρίως, χρησιμεύουν ως αποθήκες ενέργειας και ως καύσιμα μόρια. Επίσης λειτουργούν ως ορμόνες, αποτελούν συστατικά των μεμβρανών και δρουν ως αγγελιοφόροι στη μεταγωγή σήματος [9]. Ορισμένες από τις κύριες κατηγορίες λιπιδίων είναι τα λιπαρά οξέα, τα φωσφολιπίδια, οι τρακυλογλυκερόλες ή τριγλυκερίδια και τα στεροειδή, μία κατηγορία στην οποία ανήκει η

χοληστερόλη. Τα λιπίδια λόγω του γεγονότος ότι δεν είναι υδατοδιαλυτά, μεταφέρονται σε ένα υδατικό διάλυμα όπως είναι το πλάσμα συνδεδεμένα με πρωτεΐνες, σχηματίζοντας έτσι ένα σύμπλοκο, τις λιποπρωτεΐνες. [10]. Ένα τυπικό λιποπρωτεϊνικό σωματίδιο αποτελείται από ένα πυρήνα μη πολικών λιπιδίων με εστέρες χοληστερόλης και τριγλυκερίδια και στην εξωτερική επιφάνεια αποτελείται από μία στοιβάδα χοληστερόλης, φωσφολιπιδίων και απολιποπρωτεϊνών [11]. Οι λιποπρωτεΐνες χαρακτηρίζονται με υπερφυγοκέντρωση και ταξινομούνται με βάση την πυκνότητά τους. Ειδικότερα, διακρίνονται σε χυλομικρά με την πυκνότητα να αυξάνεται καθώς προχωράμε στις λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (Very Low-Density Lipoproteins, VLDL), στις λιποπρωτεΐνες ενδιάμεσης πυκνότητας (Intermediate-Density Lipoproteins, IDL) και στις λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (Low-Density Lipoproteins, LDL) και τέλος στις λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (High-Density Lipoproteins, HDL) [12].

1.2.2 Λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL)

Οι λιποπρωτεΐνες LDL αποτελούν τους κύριους μεταφορείς της χοληστερόλης στον οργανισμό (και ιδιαίτερα στο αρτηριακό τοίχωμα,) κυρίως υπό την μορφή εστέρων χοληστερόλης [13]. Τα σωματίδια LDL σχηματίζονται από τις λιποπρωτεΐνες VLDL μέσω μίας διαδικασίας που περιλαμβάνει τη μετατροπή των VLDL σωματιδίων σε IDL και αυτά με τη σειρά τους τελικά σε LDL με τη βοήθεια της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (Lipoprotein lipase, LPL) που απομακρύνει τριγλυκερίδια και βρίσκεται στην προς τον αυλό επιφάνεια του ενδοθηλίου των τριχοειδών του λιπώδους ιστού, του γαλακτοφόρου μαστού και του καρδιακού και σκελετικού μυός, της μεταφέρουσας εστέρες χοληστερόλης πρωτεΐνης (Cholesteryl ester transfer protein, CETP) και της ηπατικής τριγλυκεριδικής λιπάσης (Hepatic triglyceride lipase, HTGL) [14, 15]. Όσον αφορά τη σύνθεση των λιποπρωτεϊνών, μπορεί η σύνθεση σε κάθε τάξη να είναι σχετικά ίδια ωστόσο τα σωματίδια είναι ετερογενή. Ειδικότερα, η LDL περιέχει ένα ποσοστό της τάξης των 50% χοληστερόλη, 20% ποσοστό φωσφολιπιδίων και πρωτεΐνης και 10% ποσοστό τριγλυκεριδίων [16, 17]. Η απολιποπρωτεΐνη που χαρακτηρίζει τη συγκεκριμένη λιποπρωτεΐνη είναι η apoB-100. Αναδυόμενα στοιχεία που προκύπτουν από μελέτες, υποστηρίζουν πως οι λιποπρωτεΐνες που περιέχουν την απολιποπρωτεΐνη B σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση.

1.2.3 Παθογένεση αθηροσκλήρωσης

Υψηλές συγκεντρώσεις λιπιδίων στο πλάσμα και ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα LDL, τροποποιήσεις αυτών των λιποπρωτεϊνών και ιδιαίτερα οξειδωση (oxidized LDL, oxLDL), διαβήτης, κάπνισμα,

υπέρταση και οξειδωτικό στρες (ROS ελεύθερες ρίζες O₂) αποτελούν ορισμένους από τους παράγοντες που σχετίζονται με την παθογένεση της αθηροσκλήρωσης μίας πάθησης που πλήττει τον ανθρώπινο πληθυσμό παγκοσμίως [6]. Η αθηροσκλήρωση αποτελεί μία χρόνια φλεγμονώδη νόσο η οποία χαρακτηρίζεται κυρίως από εναποθέσεις λιπιδίων στον έσω χιτώνα των αρτηριών και από αφρώδη κύτταρα (foam cells). Πολυάριθμες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη σειρά των γεγονότων, δηλαδή στα στάδια που περιλαμβάνει η αθηρογένεση οδηγώντας στο συμπέρασμα πως πρόκειται για ένα σύστημα που ξεκινάει με τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και καταλήγει στο σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας και αργότερα στο σχηματισμό θρόμβου θέτοντας σε κίνδυνο την ανθρώπινη ζωή (Εικόνα 1).

1.2.4 Δυσλειτουργία ενδοθηλίου

Οι διάφοροι προαναφερθέντες βλαπτικοί παράγοντες (αυξημένη συγκέντρωση LDL, κάπνισμα, διαβήτης, υπέρταση), όπως και πολλοί άλλοι, είτε μεμονωμένα είτε συνδυαστικά έχει αποδειχθεί πως είναι υπεύθυνοι για την δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, οδηγώντας στην απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, κυρίως έπειτα από χρόνια δράση τους [18]. Αυτή η δυσλειτουργία συνεπάγεται με μεταβολή των φυσιολογικών ομοιοστατικών ιδιοτήτων του ενδοθηλίου όπως για παράδειγμα είναι φανερό η αυξημένη διαπερατότητα του ενδοθηλίου στις λιποπρωτεΐνες, η θρόμβωση και η άυξηση της προσκολλητικότητας του τόσο για λευκοκύτταρα κυρίως για μονοκύτταρα όσο και για αιμοπετάλια [19,20,21].

1.2.5 Διέλευση, υπενδοθηλιακή κατακράτηση και οξείδωση LDL

Υπό φυσιολογικές συνθήκες οι LDL μπορούν να διαπεράσουν τις διασυνδέσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων μέσω της αναγνώρισης τους από ειδικούς υποδοχείς LDL. Μελέτες που εστίαζαν σε μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούσαν αυτούς τους υποδοχείς έδειξαν συσχέτιση τους με την αθηρογένεση [22]. Επίσης όπως έχει ήδη αναφερθεί, λόγω της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και της αυξημένης διαπερατότητας του ενδοθηλίου στις λιποπρωτεΐνες, τα σωματίδια LDL διαπερνάνε τον ενδοθηλιακό φραγμό στα σημεία εκείνα που το ενδοθήλιο έχει υποστεί τη βλάβη με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται και να κατακρατούνται υπενδοθηλιακά. Στη συνέχεια, οι λιποπρωτεΐνες LDL μπορούν να υποστούν διάφορες τροποποιήσεις αλλά κυρίως υφίστανται οξείδωση. Η ολική οξείδωση πραγματοποιείται σε δύο στάδια και έχει παρατηρηθεί πως σημαντικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία διαδραματίζουν τα υψηλά επίπεδα των ελεύθερων ριζών [23]. Η οξειδωμένη πλέον LDL στη συνέχεια, μπορεί να

αναγνωριστεί από ειδικούς υποδοχείς, τους υποδοχείς εκκαθαριστές των μακροφάγων όπως είναι ο CD36 και ο LOX-1 και όχι από τους υποδοχείς LDL [24,25].

1.2.6 Προσκόλληση μονοκυττάρων και μετατροπή σε μακροφάγα

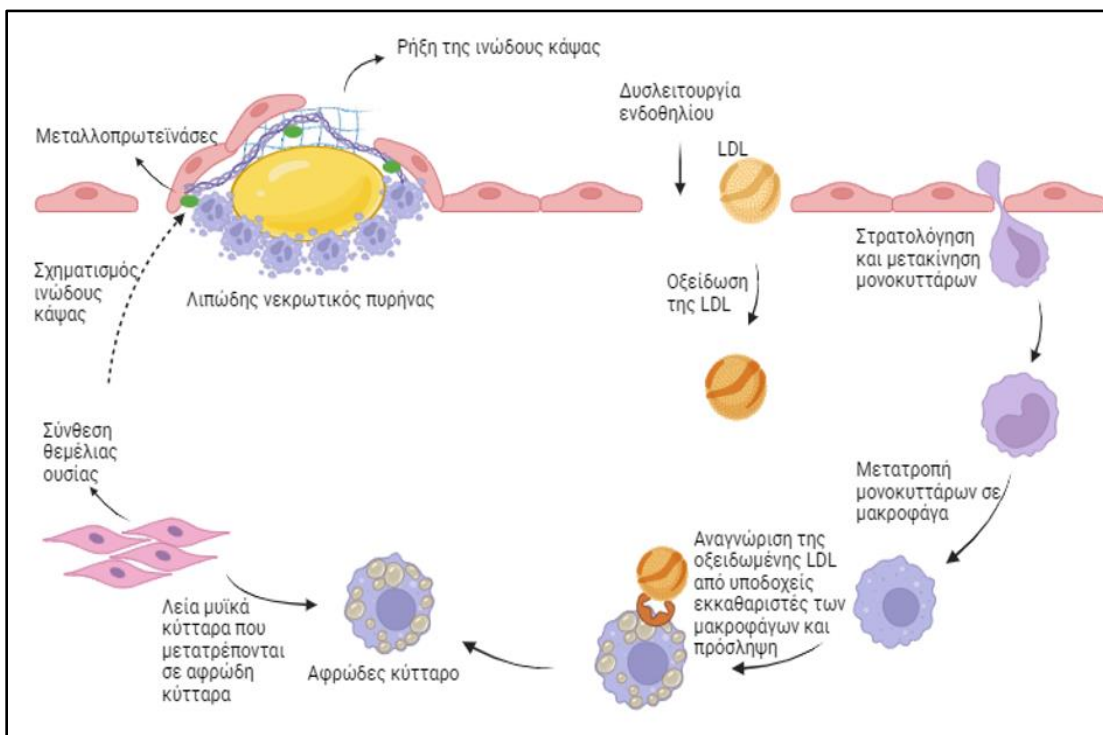
Η οξείδωση της LDL όπως και η φωσφατιδυλοχολίνη ένα από τα συστατικά της oxLDL έχει αποδειχθεί πως επάγουν κυρίως τα ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά και άλλους τύπους κυττάρων όπως τα λεία μυϊκά κύτταρα, να παράγουν ουσίες που διευκολύνουν τη μετακίνηση και στρατολόγηση των κυκλοφορούντων μονοκυττάρων στο ενδοθήλιο και στον υπενδοθηλιακό χώρο [26]. Πιο συγκεκριμένα, σε αυτές τις ουσίες περιλαμβάνονται χημειοτακτικοί παράγοντες όπως η χημειοτακτική πρωτεΐνη μονοκυττάρων 1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1), μόρια προσκόλλησης που εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων του ενδοθηλίου όπως το διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1, ICAM-1), η E-σελεκτίνη και το αγγειακό ενδοθηλιακό μόριο προσκόλλησης (Vascular Cell Adhesion Molecule-1, VCAM-1) [27,28]. Μετά την εισχώρηση τους στο ενδοθήλιο, τα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα με τη βοήθεια αυξητικών παραγόντων όπως είναι ο M-CSF, τα οποία αρχίζουν να προσλαμβάνουν αναγνωρίζοντας μέσω των υποδοχέων εκκαθαριστών μεγάλα φορτία oxLDL και με αυτό τον τρόπο τα μακροφάγα μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα (foam cells) [29,30]. Ο σχηματισμός των αφρωδών κυττάρων, τόσο μέσω της υπερσυσσώρευσης εστέρων χοληστερόλης από τα μακροφάγα όσο και από τα λεία μυϊκά κύτταρα αποτελεί δείκτη προόδου της αθηροσκλήρωσης. Εκτός από τη συνεχή ενδοκυττάρωση οξειδωμένων λιποπρωτεϊνών, τα μακροφάγα μετά τη μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα προάγουν τη φλεγμονώδη αντίδραση αφού απελευθερώνουν δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και διάφορες κυτταροκίνες όπως είναι ο παράγοντας νέκρωσης όγκων άλφα (Tumor Necrosis Factor, TNF-α) και η IL-1β (interleukin-1β) [31]. Επίσης, εκκρίνουν και μεταλλοπρωτεϊνάσες (matrix metalloproteinases, MMPs) που αποτελούν πρωτεολυτικά ένζυμα και με αυτό τον τρόπο αποδομούν την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, ωθώντας στην λέπτυνση της ινώδους αθηρωματικής πλάκας και ουσιαστικά στην αποσταθεροποίηση της καθιστώντας την επιρρεπή σε ρήξη [30]. Το γεγονός αυτό μπορεί να οδηγήσει σε εγκεφαλικό επεισόδιο, έμφραγμα και αιφνίδιο θάνατο. Η αθηρωματική πλάκα χαρακτηρίζεται από λιπώδη νεκρωτικό πυρήνα και από ινώδη κάψα.

1.2.7 Απόπτωση αφρωδών κυττάρων-Δημιουργία νεκρωτικού πυρήνα

Όσο τα αφρώδη κύτταρα εσωτερικεύουν μεγάλα ποσά oxLDL ωθούνται σε σημείο κορεσμού με αποτέλεσμα την αδυναμία φαγοκυττάρωσης περαιτέρω οξειδωμένης LDL και απόπτωσης [32]. Τα αφρώδη κύτταρα που υφίστανται απόπτωση, στη συνέχεια φαγοκυτταρώνονται. Ωστόσο, ο συνδυασμός τόσο της απόπτωσης των αφρωδών κυττάρων όσο και της αδυναμίας ή της μειωμένης δράσης των φαγοκυττάρων να εκκαθαρίσουν τα νεκρά κύτταρα οδηγεί στον σχηματισμό νεκρωτικών εστιών και ουσιαστικά στη δημιουργία του λιπιδικού νεκρωτικού πυρήνα (necrotic core) της πλάκας [33]. Ο πυρήνας αυτός δημιουργείται σταδιακά, αποτελείται από λιπίδια και υπολείμματα νεκρών κυττάρων και σχετίζεται τόσο με την πρόοδο της φλεγμονής, με την αποσταθεροποίηση της πλάκας όσο και με τη θρόμβωση λόγω του ιστικού παράγοντα (Tissue Factor, TF) που απελευθερώνεται από τα νεκρά αφρώδη κύτταρα [34,35,36].

1.2.8 Λεία μυϊκά κύτταρα

Πολλά στοιχεία από διάφορες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ποντίκια, υποδεικνύουν πως πέρα από τα μακροφάγα, και τα λεία μυϊκά κύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αθηροσκλήρωση. Τα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων υποδεικνύεται πως μέσω των διαφορετικών φαινοτύπων που μπορούν να αποκτήσουν, μπορούν να συμβάλλουν τόσο στο σχηματισμό του νεκρωτικού πυρήνα όσο και στη δημιουργία μιας ινώδους κάψας η οποία περιβάλλει αυτό τον πυρήνα [37,38]. Τα κύτταρα αυτά μπορούν να παράγουν συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας, όπως ελαστίνη και κολλαγόνο, ή να εναποθέτουν ασβέστιο, επηρεάζοντας τη σταθερότητα της πλάκας [39,40]. Επιπλέον, μπορούν να μετατραπούν σε αφρώδη κύτταρα λόγω της πρόσληψης λιπιδίων, συμβάλλοντας στη διεύρυνση του νεκρωτικού πυρήνα [41,42]. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, τα μετατρεπόμενα σε μακροφάγα λεία μυϊκά κύτταρα αδυνατούν σε σχέση με τα φυσιολογικά μακροφάγα να εκκαθαρίσουν τα νεκρά κύτταρα με αποτέλεσμα όχι μόνο να εξελίσσεται η πλάκα αλλά να αυξάνεται και ο λιπώδης νεκρωτικός πυρήνας [43].



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση της αθηρογένεσης

1.3 Μονοκύτταρα και μακροφάγα: Βασικά στοιχεία της ανοσολογικής απόκρισης

1.3.1 Μονοκύτταρα

Το ανοσοποιητικό σύστημα, ένα υψηλής προσαρμοστικότητας αμυντικό σύστημα, αναπτύχθηκε προκειμένου να προστατέψει τους πολυκύτταρους οργανισμούς από τα παθογόνα. Οι ανοσοαποκρίσεις των θηλαστικών απαρτίζονται από ένα πολύπλοκο δίκτυο μορίων, κυττάρων και οργάνων ικανό να μας προστατέψει από ένα διαρκώς διαφοροποιούμενο πλήθος εισβολέων. Η ανοσολογική απόκριση σε ένα παθογόνο εξαρτάται από αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε διάφορους τύπους κυττάρων. Ουσιαστικά, αποτελείται από δύο διαπλεκόμενους κλάδους: την έμφυτη και την προσαρμοστική ανοσία. Τόσο τα μονοκύτταρα όσο και τα μακροφάγα αποτελούν σημαντικούς παράγοντες της έμφυτης ανοσίας αφού συνιστούν τη δεύτερη γραμμή άμυνας του συστήματος αυτού μετά τους ανατομικούς φραγμούς είτε τους φυσικούς είτε τους χημικούς [44]. Τα μονοκύτταρα προέρχονται από ένα αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο (Hemopoietic Stem Cell, HSC) το οποίο επιλέγει να κατευθυνθεί προς μυελοειδές προγονικό κύτταρο και μετά την παραγωγή τους από τον μυελό των οστών εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος [45,46]. Πρόκειται για κύτταρα που αποτελούν το 2-12% των λευκοκυττάρων του αίματος και παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ομοιόστασης σε περιπτώσεις φλεγμονής και μόλυνσης

[44,47,48]. Ουσιαστικά τα μονοκύτταρα περιπολούν ενδελεχώς για παθογόνα και συντονίζουν την ανοσιακή απόκριση [45]. Πρόκειται για ένα κυτταρικό πληθυσμό ο οποίος χαρακτηρίζεται από ετερογένεια και από τρεις διαφορετικούς υποπληθυσμούς με διακριτές λειτουργίες [46]. Πιο συγκεκριμένα, στο περιφερικό αίμα του ανθρώπου έχουν ταυτοποιηθεί τρία υποσύνολα μονοκυττάρων τα οποία παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1** και διακρίνονται από την έκφραση των CD14 και CD16 δεικτών στην επιφάνεια τους [49].

Πίνακας 1: Παρατίθενται τα υποσύνολα των ανθρώπινων μονοκυττάρων και οι διάφορες διακριτές λειτουργίες τους [50].

Υποσύνολα μονοκυττάρων	Λειτουργικός ρόλος
Classical	• Φαγοκυττάρωση • Ανοσολογική απόκριση
Intermediate	• Προφλεγμονώδη δράση • Έκκριση κυτταροκινών • Αντιγονοπαρουσίαση
Nonclassical	• Περιπολία ενδοθηλίου

Μία από τις κύριες λειτουργίες των μονοκυττάρων είναι η διαφοροποίησή τους προς ένα τύπο κυττάρων που ονομάζονται μακροφάγα [51]. Αναλυτικότερα, η διαφοροποίηση αυτή πραγματοποιείται όταν τα μονοκύτταρα επιστρατεύονται στους ιστούς.

1.3.2 Μακροφάγα

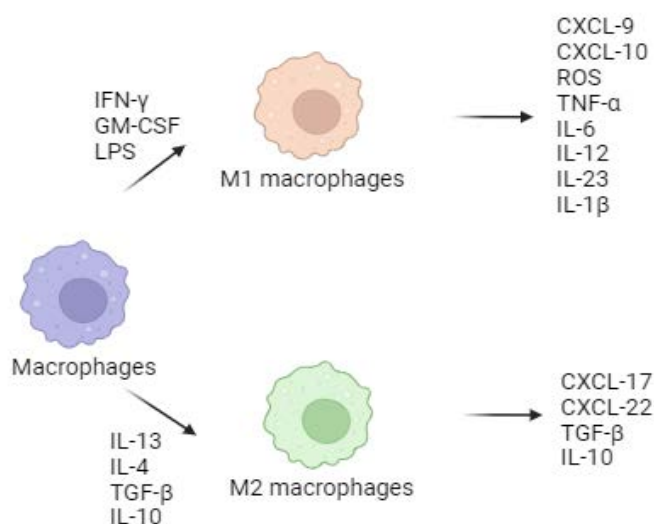
Τα μακροφάγα ως βασικά συστατικά της έμφυτης ανοσίας παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσοαπόκριση. Αρχικά, διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη φαγοκυττάρωση, όπου φαγοκυτταρώνουν μικροοργανισμούς προκειμένου να τους καταστρέψουν ενδοκυττάρια καθώς επίσης κατεστραμμένα και νεκρά κύτταρα και κυτταρικά υπολείμματα, τα οποία αναγνωρίζουν με τη βοήθεια υποδοχέων όπως είναι οι υποδοχείς εκκαθαριστές, οι Fc και Toll-like υποδοχείς (TLRs) [52,53]. Πέρα από το ρόλο τους στην φαγοκυττάρωση, εκτελούν και άλλες λειτουργίες όπως είναι η παραγωγή κυτταροκινών ως απόκριση σε λοιμώξεις. Ο TNF-α, η IL-6 και η IL-1 είναι τρεις από τις κυτταροκίνες που εκκρίνουν τα μακροφάγα όταν αναγνωρίζουν επιβλαβείς παράγοντες [54]. Τα μακροφάγα χαρακτηρίζονται και ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα αφού παρουσιάζουν αντιγόνα σε T λεμφοκύτταρα μέσω μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας [55]. Ωστόσο όπως έχει ήδη αναφερθεί τα κύτταρα αυτά σχετίζονται και με παθολογικές καταστάσεις όπως είναι η αθηροσκλήρωση και η ανάπτυξη όγκων.

1.3.3 Πόλωση μακροφάγων – Μακροφάγα και αθηροσκλήρωση

Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά των μακροφάγων είναι η πλαστικότητα που εμφανίζουν, μεταβάλλοντας τον φαινότυπό τους ως απόκριση σε περιβαλλοντικά σήματα. Ειδικότερα, έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν σε δύο κύριους φαινοτύπους: στον φλεγμονώδη M1 φαινότυπο ή αλλιώς στα κλασικά ενεργοποιημένα μακροφάγα και στον αντιφλεγμονώδη M2 φαινότυπο ή αλλιώς στα εναλλακτικά ενεργοποιημένα μακροφάγα [56]. Τα M1 μακροφάγα εμπλέκονται στην έναρξη και διατήρηση της φλεγμονής και στην ιστική βλάβη, σε αντίθεση με τα M2 που ουσιαστικά τη μειώνουν και σχετίζονται με την επιδιόρθωση ιστών. Ο φλεγμονώδης φαινότυπος διεγείρεται από μια σειρά παραγόντων όπως για παράδειγμα από την παραγόμενη από Th1 λεμφοκύτταρα και από φυσικά φονικά κύτταρα (Natural Killer Cell, NK cell) κυτταροκίνη ιντερφερόνη-γ (interferon-γ, IFN-γ), από τον παράγοντα διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων και μακροφάγων (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)) όπως επίσης και από μικροβιακά στοιχεία όπως το LPS [57]. Με την πόλωση προς την M1 κατάσταση και την ενεργοποίηση ορισμένων σηματοδοτικών μονοπατιών και μεταγραφικών παραγόντων, τα μακροφάγα εκκρίνουν χημειοκίνες όπως CXCL-9 και CXCL-10, παράγουν ROS καθώς και κυτταροκίνες όπως TNF-α, IL-6, IL-12, IL-23, IL-1β [55]. Αντίθετα, ο M2 φαινότυπος ενεργοποιείται κυρίως από παραγόμενες από Th2 λεμφοκύτταρα κυτταροκίνες όπως είναι η IL-13 και IL-4 αλλά και γενικότερα από άλλα ερεθίσματα όπως ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας-β (transforming growth factor-β, TGF-β), η IL-10 και οι γλυκοκορτικοειδείς ορμόνες [58]. Τα ενεργοποιημένα M2 μακροφάγα εκκρίνουν διάφορες χημειοκίνες όπως CXCL-17 και CXCL-22, και αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως ο TGF-β και η IL-10 [56]. Επίσης, τα M2 μακροφάγα αποτελούν έναν ετερογενή πληθυσμό όπου διακρίνεται σε τέσσερις διακριτούς υποπληθυσμούς όπου ο καθένας επάγεται από διαφορετικά ερεθίσματα. Πιο συγκεκριμένα, οι υποπληθυσμοί αυτοί των μακροφάγων είναι οι εξής: M2α, M2β, M2γ και M2δ [59]. Ευρήματα από μελέτες υποδεικνύουν πως η πόλωση των μακροφάγων σχετίζεται στενά με την αθηροσκλήρωση και ειδικότερα η ανισορροπία στο ποσοστό των δύο φαινοτύπων M1/M2 φαίνεται πως καθορίζει την πρόοδο αυτής της φλεγμονώδους νόσου [60].

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα μακροφάγα παίζουν σημαντικό ρόλο σε όλα τα στάδια της αθηροσκλήρωσης από το αρχικό μέσω της μετατροπής τους σε αφρώδη κύτταρα έως την αποσταθεροποίηση και ρήξη της αθηρωματικής πλάκας στο τελικό στάδιο της νόσου. Επίσης, και οι δύο φαινότυποι των μακροφάγων εντοπίζονται κατά τη διάρκεια της νόσου αλλά σε διαφορετικά σημεία αποδεικνύοντας έτσι πως η εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας σχετίζεται με τη παρουσία τόσο των M1 όσο και των M2 μακροφάγων. Αναλυτικότερα, σε ApoE knockout ποντίκια τα οποία αποτελούν πανίσχυρα εργαλεία στην έρευνα της αθηροσκλήρωσης,

παρατηρήθηκε πως στα αρχικά στάδια της νόσου κυριαρχούν τα M2 μακροφάγα τα οποία προάγουν τη σταθερότητα της πλάκας αφού συμβάλλουν στην κάθαρση των αποπτωτικών κυττάρων ενισχύοντας τη δράση αυτή [61]. Παρόλα αυτά όσο προχωρούσε η βλάβη διαπιστώθηκε πως ο αριθμός των M2 μακροφάγων μειωνόταν ενώ αυτός των M1 αυξανόταν [62]. Είναι αντιληπτό επομένως πως αυτή η αύξηση ωθεί στην παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών και μεταλλοπρωτεϊνών με αποτέλεσμα η πλάκα να καθίσταται επιρρεπής σε ρήξη [60,63]. Ωστόσο, παρά τη φαινοτυπική εναλλαγή που παρατηρήθηκε στο μοντέλο ποντικού, δεν υπάρχουν παρόμοιες ενδείξεις που να αποδεικνύουν το ίδιο στον άνθρωπο. Καθ' όλη τη διάρκεια ανάπτυξης της ανθρώπινης αθηρωματικής πλάκας και οι δύο φαινότυποι των μακροφάγων χαρακτηρίζονται από συνεχή παρουσία. Αυτό που παρατηρήθηκε όμως είναι πως τα μακροφάγα M1 εντοπίζονται κατά κύριο λόγο σε σημεία ρήξης της πλάκας ενώ τα M2 μακροφάγα έχουν τη τάση να διεισδύουν στον έξω χιτώνα των αγγείων [64]. Επίσης, η αθηρωματική πλάκα πέρα από τα M1 και M2 μακροφάγα διακρίνεται και από την παρουσία άλλων μακροφάγων όπως είναι τα Mox και Mhem [65].



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της πόλωσης των μακροφάγων καθώς και των παραγόντων που διεγείρουν τον κάθε φαινότυπο και οι αποκρίσεις τους.

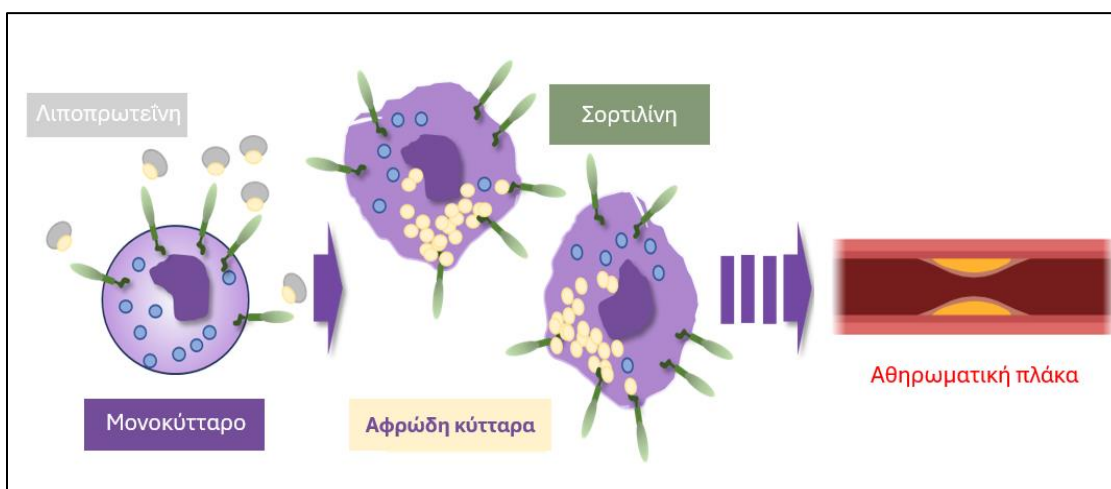
1.4 Ρόλος της σορτιλίνης στη νόσο του Parkinson και στην αθηροσκλήρωση

Είναι γνωστό, πως στην συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων, η νόσος είναι σποραδική και οφείλεται στον συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Στον αντίποδα, στην μειοψηφία της, δηλαδή στο 5-10% των περιπτώσεων η νόσος είναι κληρονομική. Πράγματι, έχουν εντοπιστεί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) που μπορούν να αποτελέσουν παράγοντες κινδύνου ή να επάγουν τον παθολογικό φαινότυπο της νόσου του Parkinson [66]. Πιο συγκεκριμένα, αρκετοί ερευνητές τα τελευταία χρόνια εστιάζουν

τη προσοχή τους στην εμπλοκή συγκεκριμένων πρωτεϊνών, που ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων με VPS10P (Vacuolar Protein Sorting 10 Protein) επικράτεια, με τη νόσο. Η οικογένεια αυτή περιέχει πέντε μέλη: την σορτιλίνη, τη SorLA, τη SorCS1, τη SorCS2 και την SorCS3 [67]. Όλα τα μέλη της οικογένειας έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό τους την επικράτεια VPS10P στο Ν-τελικό άκρο και είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς τύπου I [68]. Μέσω των μελετών συσχέτισης σε ολόκληρο το γονιδίωμα (GWAS) έχουν βρεθεί SNPs στο γονίδιο SORL1, που κωδικοποιεί τη πρωτεΐνη SorLA και το ενοχοποιούν για τη νόσο [69]. Με το πέρασμα των χρόνων ολοένα και περισσότερες μελέτες προσπαθούν να συσχετίσουν και τη σορτιλίνη με την ανάπτυξη αυτού του νευροεκφυλιστικού νοσήματος. Υποστηρίζεται πως παρατηρείται υπερέκφραση της στη νόσο του Parkinson [70]. Η σορτιλίνη ή αλλιώς gp95 (glycoprotein of 95 kDa), γνωστή και ως υποδοχέας νευροτενσίνης 3 (Neurotensin Receptor-3, NTR3), εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1p13.3 και κωδικοποιείται από το γονίδιο *SORT1* [71]. Πρόκειται για μία πρωτεΐνη που εντοπίζεται σε δύο μορφές στην μεμβρανική και στη διαλυτή, η οποία διαθέτει ικανότητες ταξινόμησης και ενδοκυτταρικής διακίνησης σημαντικών μορίων και δρα ως υποδοχέας παραδείγματος χάριν λιπιδίων και ως συνυποδοχέας [72].

Η απορρύθμιση της σορτιλίνης φαίνεται πως συμβάλλει σε αρκετές παθοφυσιολογίες συμπεριλαμβανομένων των καρδιαγγειακών νόσων όπως είναι η αθηροσκλήρωση, των νευρολογικών παθήσεων όπως το Parkinson, το μεταβολικό σύνδρομο και τον σακχαρώδη διαβήτη II [73,74,75]. Η εμπλοκή της σορτιλίνης στην ανάπτυξη πολλών ασθενειών ίσως να οφείλεται και στην ευρεία κατανομή της σε ιστούς και όργανα όπως για παράδειγμα είναι ο ιππόκαμπος και ο φλοιός όπως επίσης ο νωτιαίος μυελός, οι όρχεις και το ήπαρ. Σε κυτταρικό επίπεδο, η σορτιλίνη εκφράζεται σε αρκετά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος αλλά σε μεγαλύτερο βαθμό στα μακροφάγα, στα CD4⁺ T και CD8⁺ T κύτταρα, στα δενδριτικά κύτταρα και στα B λεμφοκύτταρα [76]. Δεδομένα από έρευνες υποδεικνύουν πως η συγκεκριμένη πρωτεΐνη επάγει τη πρόσληψη της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (Low-Density Lipoprotein, LDL) από τα μακροφάγα με αποτέλεσμα το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων και κατ' επέκταση τη δημιουργία αθηρωματικών πλακών, ωθώντας έτσι στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης (**Εικόνα 3**) [77]. Γενικότερα, μελέτες συσχέτισης σε όλο το γονιδίωμα συνέδεσαν το γονιδιακό τόπο 1p13.3 που εδράζεται το γονίδιο *SORT1* και ειδικότερα το συγκεκριμένο γονίδιο με τις καρδιαγγειακές παθήσεις και με τις αλλαγές στα επίπεδα της LDL χοληστερόλης στο πλάσμα [78]. Ωστόσο, δεν είναι ξεκάθαρη ακόμη η ακριβής επίδραση της σορτιλίνης στα επίπεδα της χοληστερόλης τόσο στο πλάσμα όσο και στο ήπαρ αφού τα αποτελέσματα είναι αντιφατικά [78]. Φαίνεται πως ο ρόλος της σορτιλίνης στο μεταβολισμό λιπιδίων είναι πολύπλοκος και με βάση ένα μικρό αριθμό νέων ερευνών αμφιλεγόμενος. Παρόλα αυτά η επικρατέστερη άποψη είναι πως η σορτιλίνη αποτελεί δείκτη κινδύνου για την υπερλιπιδαιμία ωθώντας με αυτό τον τρόπο στην

ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης [79]. Επιπρόσθετα, έχειδειχθεί ότι η σορτιλίνη αλληλοεπιδρά με το ένζυμο PCSK9 (proprotein convertase subtilisin-kexin type 9) που όταν απελευθερωθεί από τη σορτιλίνη συνδέεται με τον υποδοχέα της LDL όπου επάγει τη λυσοσωμική του αποικοδόμηση με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της LDL στο αίμα [80].



Εικόνα 3: Παρουσίαση του ρόλου της σορτιλίνης ως επαγωγέα σχηματισμού αφρώδων κυττάρων.

1.5 LRH-1: Ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα στην αθηροσκλήρωση

Τα τελευταία χρόνια η ανάγκη εύρεσης θεραπευτικών στόχων και η αποκάλυψη νέων μοριακών μηχανισμών που σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση οδήγησε στη μελέτη ενός μεταγραφικού παράγοντα, του LRH-1 (Liver receptor homolog 1). Οι πυρηνικοί υποδοχείς αποτελούν μία από τις μεγαλύτερες οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες βιολογικές διεργασίες. Ο LRH-1 ή NR5A2 (Nuclear receptor subfamily 5 group A member 2) αποτελεί πυρηνικό υποδοχέα ο οποίος εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ και στο έντερο, στις ωοθήκες και στο εξωκρινές πάγκρεας. Παρόλο που η παρουσία του είναι πιο εμφανής σε αυτούς τους ιστούς, η έκφρασή του παραμένει ανιχνεύσιμη και σε ανοσοποιητικά κύτταρα, όπως τα Τ-λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα, όπου προωθεί κυρίως τον αντιφλεγμονώδη M2 φαινότυπο με ελάχιστες αναφορές στην προώθηση του φλεγμονώδη M1 φαινοτύπου [81,82,83,84]. Ο LRH-1 αποτελεί επίσης σημαντικό παράγοντα ρύθμισης τόσο του μεταβολισμού της γλυκόζης όσο και των λιπιδίων [85]. Εστιάζοντας στον εντεροηπατικό άξονα όπου και παρατηρούνται τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα LRH-1, διαπιστώνεται πως στο έντερο, ο συγκεκριμένος παράγοντας ελέγχει την τοπική σύνθεση αντιφλεγμονωδών γλυκοκορτικοειδών, ενώ στο ήπαρ ελέγχει την αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης μία αντιαθηρογόνο διαδικασία όπως επίσης και τη de novo λιπογένεση [86,87]. Περαιτέρω μελέτες αποκάλυψαν ότι ο LRH-1

ρυθμίζει γονίδια-στόχους που εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία, όπως τα *Abca1*, *Abcg5*, *Abcg8* και *Scarb1*, τα οποία διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη μεταφορά χοληστερόλης και την προστασία από τη δημιουργία πλακών [86]. Επίσης, έχει παρατηρηθεί πως ο LRH1 προάγει την έκφραση του *CYP7A1*, ενός βασικού ενζύμου στη βιοσύνθεση των χολικών οξέων [88,89]. Η αυξημένη βιοσύνθεση χολικών οξέων μειώνει τα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα, περιορίζοντας τον σχηματισμό αθηρωματικών πλακών. Εκτός αυτών ο LRH1 έχει φανεί να διασταυρώνεται με τα μονοπάτια του PPARγ και του LXRα, δύο άλλων υποδοχέων που εμπλέκονται στον έλεγχο της φλεγμονής και του μεταβολισμού της χοληστερόλης, μέσω των οποίων μπορεί έμμεσα να επηρεάζει γονίδια που σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση όπως το *Abca1* [90]. Τα μέχρι τώρα δεδομένα που να συνδέουν τον LRH-1 με την αθηροσκλήρωση είναι ελάχιστα. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε πως ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα σε παχύσαρκα ποντίκια ώθησε στη μείωση του σχηματισμού αθηροσκλήρωσης [91]. Επίσης, σε μία μελέτη με ποντίκια που έφεραν μετάλλαξη που μπορούσε να καταργήσει τη σουμοϋλίωση σε συγκεκριμένο αμινοξύ του LRH-1, διαπιστώθηκε μείωση σχηματισμού πλακών και παράλληλα προστασία έναντι της ανάπτυξης χρόνιων μεταβολικών ασθενειών όπως είναι και η αθηροσκλήρωση [86]. Αυτό που υποστηρίζεται από τη συγκεκριμένη μελέτη, είναι πως η ευεργετική δράση του μεταγραφικού παράγοντα στην αθηροσκλήρωση οφείλεται στην ενίσχυση της μεταγραφής ηπατικών γονιδίων συσχετιζόμενων με την αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης, μιας διαδικασίας κατά την οποία η υπερβολική χοληστερόλη από τους περιφερικούς ιστούς μεταφέρεται στο ήπαρ για αποβολή μέσω της χολής. Το γεγονός αυτό υποστηρίχθηκε και από μία πρόσφατη μελέτη στη *Drosophila* όπου η σουμοϋλίωση ενός ομολόγου του LRH-1 επηρέασε την έκφραση ενός υποδοχέα κατάλληλου για την πρόσληψη χοληστερόλης [92]. Ωστόσο, αναγκαία κρίνεται η περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου του LRH-1 στην αθηροσκλήρωση λόγω του μικρού αριθμού ερευνών.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Η νόσος του Parkinson αναδεικνύεται ως η ταχύτερα αναπτυσσόμενη νευρολογική πάθηση διεθνώς. Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν τη σημαντική συμβολή του οξειδωτικού στρες και της χρόνιας φλεγμονής στην εκδήλωση και την πρόοδο της νόσου, μηχανισμοί παθογένεσης που είναι κοινοί και με την αθηροσκλήρωση.

Δεδομένων των αυξανόμενων ενδείξεων που υποδεικνύουν τη συμμετοχή του ανοσοποιητικού συστήματος στην παθογένεση της νόσου του Parkinson, η κατανόηση της έκφρασης και της λειτουργίας της σορτιλίνης στα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας μπορεί να προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες για τους μηχανισμούς της νόσου και να ανοίξει τον δρόμο για νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις μέσω της εμπλοκής της στη νόσο της αθηροσκλήρωσης.

Στο πλαίσιο αυτό, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας, αποτέλεσε η διερεύνηση των επιπέδων σορτιλίνης σε μακροφάγα προερχόμενα από μονοπύρρηνα κύτταρα ολικού περιφερικού αίματος τόσο από υγιείς δότες όσο και από ασθενείς με νόσο Parkinson. Επίσης πραγματοποιήθηκε στα απομονωμένα αυτά κύτταρα ανάλυση για την έκφραση δεικτών ενεργοποίησης και τον σχηματισμό αφρωδών κυττάρων. Εκτός αυτών διερευνήθηκε ο ρόλος της σορτιλίνης και ο σχηματισμός αφρωδών κυττάρων και σε ένα άλλο πειραματικό μοντέλο την κυτταρική σειρά μακροφάγων ποντικού J774A1. Τέλος, έγινε προσπάθεια δημιουργίας νέων κυτταρικών σειρών αναφοράς που να εκφράζουν ενισχυμένη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (eGFP), καθώς και λουσιφεράση της πυγολαμπίδας υπό τον έλεγχο του υποκινητή του LHR-1, ενός μεταγραφικού παράγοντα καθοριστικού για τη θεραπεία της αθηροσκλήρωσης.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Κυτταροκαλλιέργειες

Για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας και για ένα μεγάλο μέρος των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά μακροφάγων ποντικού **J774A.1**. Πρόκειται για μία κυτταρική σειρά που απομονώθηκε από τον ασκίτη ενός θηλυκού ενήλικου ποντικού το 1968, που χαρακτηριζόταν από σάρκωμα δικτυοερυθροκυττάρων και η οποία αποκτήθηκε από την ATCC (TIB-67) εταιρία για την πραγμάτωση των πειραμάτων. Τα κύτταρα J774A.1 έχουν ως χρόνο διπλασιασμού τις 17 ώρες και ως μια καρκινική κυτταρική σειρά μπορούν να πολλαπλασιάζονται συνεχώς κάτω από τις ιδανικές συνθήκες. Επίσης, αποτελούν ιδανικό πειραματικό μοντέλο για τη μελέτη της λειτουργίας των μακροφάγων εστιάζοντας τόσο στην απόκριση τους σε ερεθίσματα όσο και στη σύνθεση κυτταροκινών. Εκτός από αυτή την κυτταρική σειρά χρησιμοποιήθηκαν και οι κυτταρικές σειρές Lenti-X 293T και Hela για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Όσον αφορά την Lenti-X 293T κυτταρική σειρά, προέρχεται από την HEK293T κυτταρική σειρά, η οποία με τη σειρά της προέρχεται από την HEK293, δηλαδή από ανθρώπινα κύτταρα εμβρυϊκού νεφρού που έχουν μετασχηματιστεί με το SV-40 Large T-αντιγόνο που επιτρέπει την αντιγραφή των πλασμιδίων που φέρουν SV-40. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά αποτελεί βασικό εργαλείο σε πειράματα διαμόλυνσης λόγω της εξαιρετικής επιδεκτικότητας που εμφανίζει σε ξένο γενετικό υλικό. Τα κύτταρα Hela είναι επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας τα οποία προήλθαν από Αφροαμερικανή γυναίκα 31 ετών (Henrietta Lacks) και αποτελούν το συνηθέστερο ερευνητικό εργαλείο.

3.1.1 Καλλιέργεια και ανακαλλιέργεια κυττάρων

Όλες οι πειραματικές διεργασίες εκτελέστηκαν σε άσηπτες συνθήκες σε θάλαμο κάθαρσης νηματικής ροής προκειμένου να αποφευχθούν τυχόν μολύνσεις. Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε τόσο σε αποστειρωμένα πλαστικά πιάτα καλλιέργειας των 90 mm όσο και σε αποστειρωμένες φλάσκες T25, T75 και T175 (ANADΡΑΣΗ) τα οποία μετά την προσθήκη κατάλληλου θρεπτικού υλικού τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37°C και σε περιβάλλον με 5% CO₂ και υγρασία. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία φιλτραρισμένου πλήρους θρεπτικού υλικού RPMI (Roswell Park Memorial Institute)1640 (SIGMA) το οποίο περιείχε:

- 10% v/v εμβρυϊκό ορό βοοειδών (FBS) (SIGMA)
- 1% μη απαραίτητα αμινοξέα (GIBCO)
- 10 U/ml πενικιλίνη
- 10 mg/mL στρεπτομυκίνη (GIBCO)

Το θρεπτικό μέσο των καλλιιεργειών ανανεωνόταν κάθε 48-72 ώρες.

Προκειμένου να εξασφαλίζεται συνεχώς η ομαλή ανάπτυξη των κυττάρων και να απομακρύνονται τα τοξικά παράγωγα τους, λόγω της γρήγορης ικανότητάς τους να πολλαπλασιάζονται, απαραίτητη ήταν η ανακαλλιέργεια τους. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιούνταν όταν τα κύτταρα είχαν καλύψει περίπου το 80-100% του μέσου/πιάτου καλλιέργειάς τους. Η ακόλουθη διαδικασία η οποία αφορά κυρίως την J774A.1 κυτταρική σειρά και την αποκόλληση των κυττάρων από πιάτο καλλιέργειας και όχι φλάσκα περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Αφαίρεση προϋπάρχοντος θρεπτικού μέσου και πλύση των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων PBS και αφαίρεση αυτού
- Προσθήκη 10 ml φρέσκου PBS και απόξεση των κυττάρων με τη χρήση ειδικής ξύστρας (scraper). Παρατήρηση αποκόλλησης των κυττάρων με τη βοήθεια ανάστροφου μικροσκοπίου
- Μεταφορά του κυτταρικού εναιωρήματος σε αποστειρωμένο σωλήνα falcon 15 ml και φυγοκέντρωση στα 1300 rpm για 5' σε θερμοκρασία δωματίου
- Αφαίρεση υπερκειμένου και επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος σε φρέσκο θρεπτικό υλικό
- Μεταφορά συγκεκριμένης ποσότητας σε νέο πιάτο καλλιέργειας, προσθήκη επιπλέον θρεπτικού υλικού ($V_{TEA} = 10\text{ml}$) και μεταφορά στον επωαστικό κλίβανο

Η ανακαλλιέργεια των HEK293T και Hela κυτταρικών σειρών τόσο σε πιάτο όσο και σε φλάσκα πραγματοποιήθηκε με τη διαδικασία της θρυψινοποίησης. Αρχικά, αφαιρέθηκε το προϋπάρχον θρεπτικό μέσο και έγινε πλύση των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων PBS το οποίο στη συνέχεια αφαιρέθηκε. Προστέθηκε διάλυμα θρυψίνης (Girco) το οποίο διασπά τις συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων, καθώς και μεταξύ των κυττάρων και του στερεού υποστρώματός τους και αφέθηκαν τα κύτταρα στον επωαστικό κλίβανο για 4-5' έως ότου παρατηρηθεί με τη βοήθεια του ανάστροφου μικροσκοπίου η αποκόλλησή τους. Ακολούθησε η μεταφορά του κυτταρικού εναιωρήματος σε αποστειρωμένο σωλήνα falcon 15 ml, προστέθηκε PBS και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στα 1300 rpm για 5' σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και επαναιωρήθηκε το κυτταρικό ίζημα σε φρέσκο θρεπτικό υλικό. Τέλος, μεταφέρθηκε συγκεκριμένη ποσότητα σε νέο πιάτο ή φλάσκα καλλιέργειας στα οποία προστέθηκε επιπλέον θρεπτικό υλικό και αφέθηκαν στον επωαστικό κλίβανο.

3.1.2 Κατάψυξη και απόψυξη κυττάρων

Για τη φύλαξη των κυττάρων για μεγάλο διάστημα αυτά καταψύχονταν σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των -80°C ακολουθώντας ορισμένα κοινά βήματα με τη διαδικασία της ανακαλλιέργειας:

- Αφαίρεση προϋπάρχοντος θρεπτικού μέσου και πλύση των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων PBS και αφαίρεση αυτού
- Προσθήκη 10 ml φρέσκου PBS και απόξεση των κυττάρων με τη χρήση ειδικής ξύστρας (scraper). Παρατήρηση αποκόλλησης των κυττάρων με τη βοήθεια ανάστροφου μικροσκοπίου
- Μεταφορά του κυτταρικού εναιωρήματος σε αποστειρωμένο σωλήνα falcon 15 ml και φυγοκέντρηση στα 1300 rpm για 5' σε θερμοκρασία δωματίου
- Αφαίρεση υπερκειμένου και επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος σε 1 ml διαλύματος που περιέχει 90% FBS και 10% v/v DMSO (διμεθυσουλφοξείδιο)
- Μεταφορά του διαλύματος σε κρυοφιαλίδια (cryovials) των 2 ml
- Τοποθέτηση των κρυοφιαλιδίων σε ισοθερμικό δοχείο που περιέχει ισοπροπανόλη και μεταφορά αυτού στους -80°C

Για την απόψυξη των κυττάρων ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- Απομάκρυνση των cryovial από τους -80°C και τοποθέτηση τους σε υδατόλουτρο στους 37°C μέχρι να παρατηρηθεί πως ξεπαγώνουν
- Μεταφορά του διαλύματος σε αποστειρωμένο σωλήνα falcon 15 ml που περιέχει 10 ml PBS και φυγοκέντρηση στα 1300 rpm για 5' σε θερμοκρασία δωματίου
- Αφαίρεση υπερκειμένου και επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος σε φρέσκο θρεπτικό υλικό
- Μεταφορά συγκεκριμένης ποσότητας σε νέο πιάτο καλλιέργειας, προσθήκη επιπλέον θρεπτικού υλικού ($V_{\text{TEA}} = 10\text{ml}$) και μεταφορά στον επωαστικό κλίβανο

3.2 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από ολικό περιφερικό αίμα και *in vitro* διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα

Εκτός από τις κυτταρικές σειρές που αναφέρθηκαν, για την εκπόνηση ορισμένων πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος από υγιείς δότες, τα οποία προήλθαν από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας. Τα δείγματα αίματος τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια με EDTA και διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Όλα τα δείγματα επεξεργάστηκαν την ίδια μέρα που συλλέχθηκαν.

Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από ολικό περιφερικό αίμα

Για την απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από το ολικό περιφερικό αίμα (PBMCs) ακολουθήθηκαν τα παρακάτω στάδια:

- Αραίωση (1:1) 10 ml δείγματος αίματος με 10 ml PBS το οποίο περιέχεται σε αποστειρωμένο σωλήνα falcon 50 ml
- Προσθήκη 20 ml φικόλης (Cytiva) σε έναν άλλο αποστειρωμένο σωλήνα falcon των 50 ml και επίστρωση πάνω σε αυτή του δείγματος αίματος με τη βοήθεια πλαστικής πιπέτας τύπου Pasteur
- Φυγοκέντρηση στα 300×g για 30' σε θερμοκρασία δωματίου, με επιβράδυνση/φρένα στην φυγόκεντρο
- Ακριβώς πάνω από το στρώμα φικόλης (Sigma) και ανάμεσα από αυτό το στρώμα και αυτό του πλάσματος υπάρχει ένα γαλακτόχρωμο δαχτυλίδι/θολό στρώμα που περιέχει τα μονοπύρηνια κύτταρα του περιφερικού αίματος. Με τη βοήθεια πλαστικής πιπέτας τύπου Pasteur απομακρύνθηκε αυτό το δαχτυλίδι και τοποθετήθηκε σε έναν άλλο αποστειρωμένο σωλήνα falcon 15 ml στον οποίο προστέθηκε αποστειρωμένο PBS
- Φυγοκέντρηση στα 1300 rpm για 5' σε θερμοκρασία δωματίου

***In vitro* διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα**

Τα απόμονωμένα λευκοκύτταρα επαναιωρήθηκαν σε θρεπτικό υλικό διαφοροποίησης των μονοκυττάρων σε μακροφάγα το οποίο αποτελούνταν από RPMI 1640 και από 50 ng/mL παράγοντα διέγερσης αποικιών ανθρώπινων μακροφάγων (M-CSF) (Abcam). Αφού έγιναν οι απαραίτητες μετρήσεις 10^6 κύτταρα/well κάθε δείγματος επιστρώθηκαν σε διαφορετικά φρεάτια 1 πιάτου καλλιέργειας 6 φρεατίων (6-well plate). Την ημέρα 1 αφαιρέθηκαν τα μη προσκολλημένα κύτταρα μέσω της αφαίρεσης του θρεπτικού μέσου και προστέθηκε 1 ml φρέσκου μέσου διαφοροποίησης/well. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και την ημέρα 4. Την 7^η μέρα τα κύτταρα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την διεξαγωγή πειραμάτων αφού περίπου το 70-80% των προσκολλημένων κυττάρων είχε διαφοροποιηθεί σε μακροφάγα (μακροφάγα από μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος, PBMDMs) αφού εξέφραζαν ειδικούς δείκτες κυτταρικής επιφάνειας όπως είναι το CD11b⁺.

3.3 Αποκόλληση κυττάρων

Διατηρήθηκε το θρεπτικό υλικό από κάθε well-plate και προστέθηκε σε διαφορετικούς αποστειρωμένους σωλήνες falcon των 15 ml. Σε κάθε well προστέθηκε διάλυμα PBS/ EDTA και πραγματοποιήθηκε επώαση στους 4°C για 5'. Στη συνέχεια με τη βοήθεια cell scraper απομακρύνθηκαν όσο περισσότερα κύτταρα γινόταν και το κυτταρικό εναίωρημα πλέον τοποθετήθηκε στο αντίστοιχο falcon που περιείχε το θρεπτικό υλικό του αντίστοιχου well. Τα

δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 1300 rpm για 5', το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε φρέσκο θρεπτικό υλικό. Ακολούθησε η μέτρηση του συνόλου των κυττάρων προκειμένου να γίνει το στρώσιμο.

3.4 Μέτρηση κυττάρων

Απαραίτητο για τη διεξαγωγή όλων των πειραματικών διεργασιών και προκειμένου να διασφαλιστεί η επιθυμητή και ισόποση τοποθέτηση του κυτταρικού πληθυσμού σε κάθε well-plate, ήταν η καταμέτρηση του συνόλου των κυττάρων που περιείχονταν σε ένα κυτταρικό εναιώρημα. Η διαδικασία μέτρησης του κυτταρικού πληθυσμού περιελάμβανε την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια του πιάτου, τη φυγοκέντρησή τους, την επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος σε φρέσκο θρεπτικό υλικό και την απομόνωση 10 μl με τη χρήση κατάλληλης πιπέτας από το κυτταρικό εναιώρημα. Η ποσότητα αυτή εισήχθη εντός της καλυπτρίδας στο αιμοκυτταρόμετρο Neubauer το οποίο τοποθετήθηκε στο ανάστροφο μικροσκόπιο. Το αιμοκυτταρόμετρο ή αλλιώς η πλάκα Neubauer, αποτελεί μια ειδικά κατασκευασμένη αντικειμενοφόρο πλάκα η οποία διαθέτει τη δική της καλυπτρίδα και χρησιμοποιείται για τη μέτρηση τόσο των στερεών συστατικών του αίματος όπως τα λευκοκύτταρα αλλά και κυττάρων μιας κυτταροκαλλιέργειας ή μικροσκοπικών δομών. Περιλαμβάνει 2 περιοχές μέτρησης κάθε μία από τις οποίες χαρακτηρίζεται από 9 κύρια τετράγωνα πλάτους 1 mm. Η κεντρική περιοχή χωρίζεται σε 25 τετράγωνα, τα οποία με τη σειρά τους διαχωρίζονται περαιτέρω σε 16 μικρότερα τετράγωνα που συνιστούν τις θέσεις μέτρησης των κυττάρων. Αυτό που υπολογίστηκε ήταν ο αριθμός των κυττάρων που υπάρχουν ανά mL κυτταρικού εναιωρήματος και πιο συγκεκριμένα αυτό που προκύπτει είναι $N \times 10^4$ κύτταρα/ml όπου N συμβολίζει το συνολικό αριθμό των ζωντανών κυττάρων.

3.5 Σχηματισμός αφρωδών κυττάρων

Ο σχηματισμός αφρωδών κυττάρων προσδιορίστηκε μέσω της χρώσης με Oil Red διάλυμα και αντίστοιχα το ποσοστό των θετικών κυττάρων υπολογίστηκε με τη βοήθεια μικροσκοπικής εξέτασης.

Αφού έγινε αποκόλληση και μέτρηση των διαφοροποιημένων από μονοπύρρηνα κύτταρα μακροφάγων, στρώθηκαν 1×10^4 κύτταρα/well σε 48-well plate ή 96-well plate στα οποία προστέθηκαν 500 και 200 μl θρεπτικού υλικού RPMI 1640 αντίστοιχα και αφέθηκαν όλη τη νύχτα στον επωαστικό κλίβανο για να μειωθεί η μεταβολική δραστηριότητα. Την επόμενη μέρα ορισμένα κύτταρα διεγέρθηκαν με 10 μg/mL oxidized LDL (oxLDL, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) για 24 ώρες. Στη συνέχεια, 24 ώρες μετά η διαδικασία ήταν η εξής:

- Αφαίρεση θρεπτικού υλικού και ξέπλυμα των κυττάρων 2 φορές με PBS

- Μονιμοποίηση κυττάρων με ειδικό διάλυμα μονιμοποίησης (fixation buffer, Invitrogen) για 30' σε θερμοκρασία δωματίου και αφαίρεση
- Πλύση των κυττάρων 1 φορά με PBS για 1' και αφαίρεση
- Προσθήκη 60% ισοπροπανόλη για 15'' προκειμένου να διευκολυνθεί η χρώση των ουδέτερων λιπών
- Χρώση με φιλτραρισμένο Oil Red O διάλυμα (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) για 1' στους 37° C
- Προσθήκη 60% ισοπροπανόλη για 15'' προκειμένου να αποχρωματιστούν τα κύτταρα
- Ξέπλυμα των κυττάρων 3 φορές με PBS

Τα κύτταρα στη συνέχεια παρατηρήθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο (Axiovert 40 CFL inverted microscope, ZEISS, Oberkochen, Germany).

3.6 Κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μία τεχνική μέτρησης και πολυπαραμετρικής ανάλυσης μικρών σωματιδίων όπως είναι τα κύτταρα καθώς αυτά αιωρούνται σε ένα υγρό το οποίο διέρχεται από ένα μηχάνημα ηλεκτρονικής ανίχνευσης. Πρόκειται για μία ποσοτική και ποιοτική μέθοδο προσδιορισμού η οποία συνδυάζει την σκέδαση και τον φθορισμό. Στην παρούσα εργασία, εκτελέστηκε κυτταρομετρία ροής: (Α) για την ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης της σορτιλίνης, του δείκτη κυτταρικής επιφάνειας CD11b και του αντιγόνου HLA-DR σε μακροφάγα προερχόμενα από μονοπύρρηνα κύτταρα ανθρώπινου περιφερικού αίματος τόσο υγιών ατόμων όσο και ασθενών με νόσο του Parkinson και για (Β) τον ποσοτικό προσδιορισμό των εκκρινόμενων φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-6 και TNF από τα κύτταρα J774A.1. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την διεξαγωγή του πειράματος ήταν τα εξής:

Αρχικά, τα κύτταρα, είτε πρόκειται για J774A.1 είτε για μακροφάγα προερχόμενα από μονοπύρρηνα κύτταρα ανθρώπινου περιφερικού αίματος, επιστρώθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας 6 ή 12 φρεατίων (6, 12-well plate) αφέθηκαν για επώαση για τουλάχιστον μια ημέρα πριν από την διεξαγωγή της μεθόδου και τα οποία περιείχαν τουλάχιστον 10^6 κύτταρα/well αν πρόκειται για J774A.1 και 10^5 κύτταρα/well αν πρόκειται για μακροφάγα. Την επόμενη μέρα τα δείγματα προετοιμάστηκαν κατάλληλα με μία διαδικασία η οποία περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω:

- (Α) Πραγματοποιήθηκε αφαίρεση του μέσου καλλιέργειας, προσθήκη 700μl PBS/EDTA σε κάθε well και ακολούθησε επώαση στους 4°C για 5' προκειμένου να αποκολληθούν τα κύτταρα. Το κυτταρικό εναιώρημα τοποθετήθηκε στο κατάλληλο eppendorf, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 1300 rpm για 5', το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και προστέθηκαν 90μl από το 1^ο κοκτέιλ PBS/BSA/FcR blocking antibody (Immunostep).

Μετά το πέρας των 15' επώασης των δειγμάτων στον πάγο προστέθηκαν 10μl από το 2^ο κοκτέιλ σε κάθε eppendorf.

Πίνακας 2: Περιγραφή του 2^{ου} κοκτέιλ που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή της κυτταρομετρίας ροής.

Περιεχόμενο	Αναλογίες
anti-human sortilin unconjugated d (R&DSYSTEMS, Abingdon, UK)	1:100
anti-human CD11b PE (eBioscience, Hatfield, UK)	1:100
Anti-human HLA-DR PE (eBioscience, Hatfield, UK)	1:100
PBS	70 μl

Αφού αφέθηκαν τα δείγματα για 30' στον πάγο, προστέθηκαν 500μl PBS και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 1300 rpm για 5'. Στη συνέχεια, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 100μl από το 3^ο κοκτέιλ σε κάθε eppendorf.

Πίνακας 3: Περιγραφή του 3^{ου} κοκτέιλ που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή της κυτταρομετρίας ροής.

Περιεχόμενο	Αναλογίες
Mouse anti-h sortilin (R&DSYSTEMS, Abingdon, UK)	1:100
PBS/BSA	100μl

Τα δείγματα επώαστηκαν για 20' στον πάγο στο σκοτάδι, προστέθηκαν 500μl PBS για την πραγματοποίηση της πλύσης και φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης απορρίφθηκε το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 300 μl PBS προκειμένου να ακολουθήσει η κυτταρομετρία και η ανάλυση στο κυτταρόμετρο (Cytomics FC 500 Beckman Coulter).

- (B) Τα κύτταρα επώαστηκαν με το αντιδραστήριο BFA (brefeldin A) (1 μg/mL) (Abcam) 4 ώρες πριν ολοκληρωθούν 24 ώρες από τη διέγερση των κυττάρων με oxLDL και LPS με στόχο την παρεμπόδιση έκκρισης τόσο της IL-6 όσο και του TNF από τα κύτταρα. Στη συνέχεια, ακολούθησε η μονιμοποίηση των κυττάρων.

Μονιμοποίηση κυττάρων

Αφαιρέθηκε το μέσο καλλιέργειας και προστέθηκαν 1 ml PBS/1% BSA. Ακολούθησε απόξεση των κυττάρων από το κάθε well, μεταφορά του εναιωρήματος σε eppendorf και φυγοκέντρηση

στα 1500 rpm για 3'. Ακολούθησε η απόρριψη του υπερκείμενου, η προσθήκη 100 µl Fixation buffer A (Invitrogen) και επώαση για 15' στους 4°C. Τέλος πραγματοποιήθηκε πλύση των δειγμάτων με PBS/1% BSA (περίπου 500µl), και φυγοκέντρωση στα 1500 rpm για 3'.

Το επόμενο στάδιο μετά τη μονιμοποίηση των κυττάρων ήταν η διάτρησή τους.

Διάτρηση κυττάρων

Απορρίφθηκε το υπερκείμενο, προστέθηκαν 500µl παγωμένης αιθανόλης (70% σε νερό / -20°C) και τα δείγματα επώαστηκαν στους 4°C για 20'. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 1500 rpm για 3' και έπειτα απόρριψη του υπερκείμενου. Τέλος, τα δείγματα πλύθηκαν με PBS/1% BSA (περίπου 500µl) και φυγοκεντρήθηκαν στα 1500 rpm για 3'.

Το τελευταίο βήμα για την περάτωση της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας ήταν η ενδοκυτταρική χρώση.

Ενδοκυτταρική χρώση

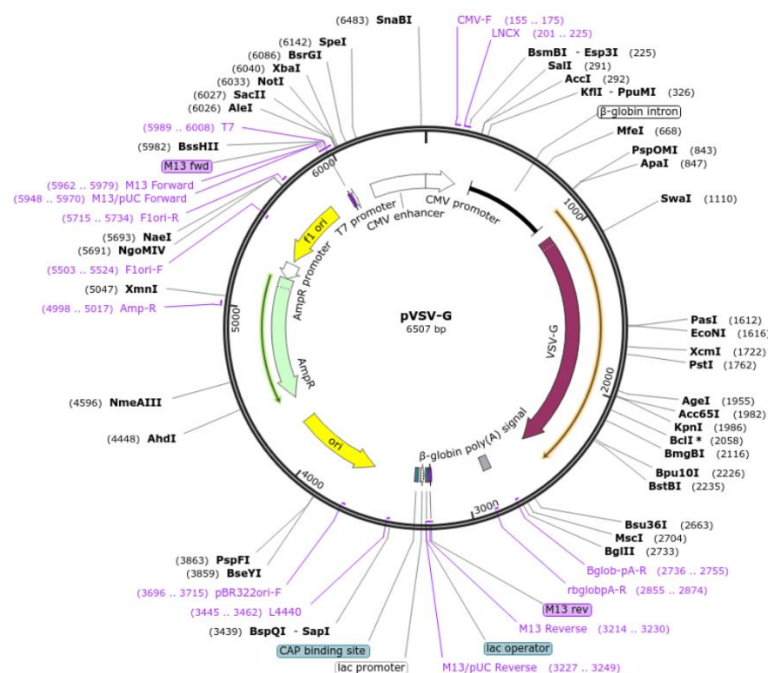
Απορρίφθηκε το υπερκείμενο, προστέθηκαν τα αντισώματα: 1) anti-IL6 PE (1:100, Biolegend) 2) anti-TNF-PE (1:100, Biolegend) και επώαστηκαν τα δείγματα για 30' σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Ακολούθησε πλύση των δειγμάτων με PBS/1% BSA (περίπου 500µl) και φυγοκέντρωση στα 1500rpm για 3'. Τέλος, απορρίφθηκε το υπερκείμενο, επαναιωρήθηκαν τα δείγματα σε 300µl PBS/1% BSA και μεταφέρθηκαν σε κατάλληλους σωλήνες για φυγοκέντρωση. Τα δείγματα ήταν πλέον έτοιμα για ανάλυση στο κυτταρόμετρο (Cytomics FC 500 Beckman Coulter).

3.7 Παροδική διαμόλυνση 293T κυττάρων με τη μέθοδο της πολυαιθυλενιμίνης και παραγωγή λεντυκών σωματιδίων

Ως διαμόλυνση (transfection) χαρακτηρίζεται η διαδικασία εισαγωγής ξένου DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Υπάρχουν αρκετές διαθέσιμες τεχνικές διαμόλυνσης αλλά στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο της πολυαιθυλενιμίνης (Polyethylenimine, PEI). Πρόκειται για ένα κατιονικό πολυμερές που σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με τα πλασμιδιακά DNA και έτσι διευκολύνουν την είσοδο τους στο ευκαρυωτικό κύτταρο. Η μέθοδος PEI χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση των 293T κυττάρων.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Μια μέρα πριν τη διαμόλυνση τοποθετήθηκαν $0,5 \times 10^6$ κύτταρα σε 6 well-plate με 2 ml θρεπτικού υλικού DMEM το οποίο περιείχε 10% εμβρυικό ορό μόσχου (Fetal Calf Serum, FCS), 1% μη απαραίτητα αμινοξέα και 1% αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη. Για κάθε αντίδραση διαμόλυνσης ετοιμάστηκαν 2 μείγματα:



Εικόνα 5: Πλασμιδιακός χάρτης pVSVG (Plasmid #138479, addgene)

3.8 Μεταγωγή J774A.1 και HeLa κυττάρων με λεντιού

Την ημέρα που συλλέχθηκε το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των κυττάρων που περιείχε τον παραγόμενο λεντιού, τόσο η J774A.1 όσο και η HeLa κυτταρική σειρά, τέθηκαν σε καλλιέργεια με αναλογία 4×10^3 κύτταρα ανά well. Έγινε προσθήκη Polybrene, ενός κατιονικού πολυμερούς το οποίο αυξάνει την αποτελεσματικότητα μεταγωγής του λεντιού και στη συνέχεια έγινε η μεταγωγή των κυττάρων με τον κατάλληλο λεντιού σε διαφορετικές ποσότητες: 0, 2.5 μl, 5 μl, 10 μl και 25 μl. Επίσης προστέθηκε θρεπτικό υλικό μέχρι τελικού όγκου 200 μl. Φυγοκεντρήθηκαν τα δείγματα για 60' στα 800g και σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε 96 well-plate τα οποία αφέθηκαν για επώαση για 3 μέρες χωρίς προσθήκη αντιβιοτικού. Μια μέρα μετά την τοποθέτηση τους στο plate έγινε αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης ξεκίνησε η επιλογή των κυττάρων που έλαβαν το πλασμίδιο για 10 μέρες προσθέτοντας στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης το αντιβιοτικό G418 που συνεπάγεται αντίσταση στη νεομυκίνη.

3.9 Έλεγχος για ενδογενή αντοχή στη νεομυκίνη

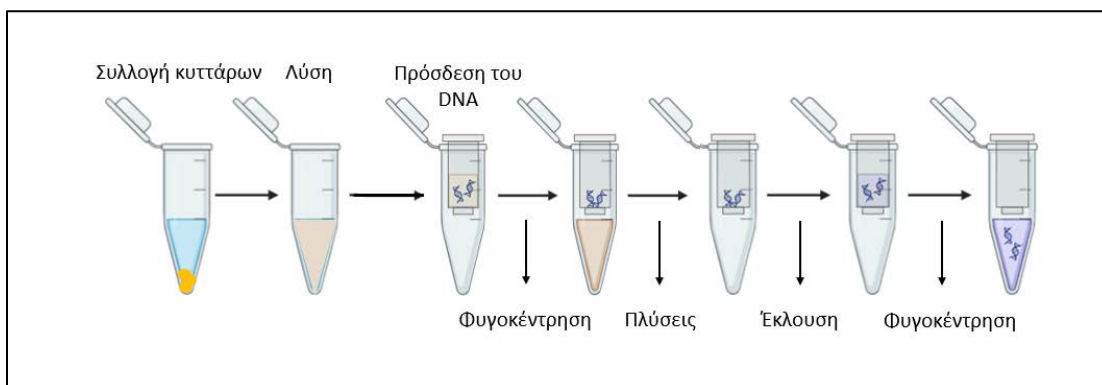
Αρχικά τόσο η J774A.1 όσο και η HeLa κυτταρική σειρά ελέγχθηκαν για ενδογενή αντοχή στη νεομυκίνη χρησιμοποιώντας δόσεις μεταξύ 0,2 και 1,0 mg/ml. Μετά από 10 ημέρες επιλογής, αξιολογήθηκε ότι 0,4 mg/ml νεομυκίνης ήταν αρκετά για να σκοτώσουν τα κύτταρα σε αρχική πυκνότητα 1.250 και 2000 κυττάρων/πηγαδάκι.

3.10 Μέτρηση κυττάρων με τη χρήση της χρωστικής Trypan Blue

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος βιωσιμότητας κυττάρων και μέτρηση του αριθμού τους μέσω trypan blue που ενσωματώνεται μόνο στα νεκρά κύτταρα και αφού βάφει επιλεκτικά τα νεκρά κύτταρα ως μπλε διακρίνονται από τα ζωντανά κύτταρα. Αρχικά, διάλυμα 0,4% Trypan Blue φιλτραρίστηκε καθώς η χρωστική έχει την τάση να καθιζάνει. Στη συνέχεια, έγινε αραίωση 1:1 του διαλύματος 0,4% Trypan blue με PBS. Ακολούθησε η απομάκρυνση του υπερκειμένου από τα well και προστέθηκαν 100μl /well διαλύματος. Τα δείγματα αφέθηκαν για επώαση για 5' σε θερμοκρασία δωματίου, αφαιρέθηκε το διάλυμα χρωστικής και τέλος πραγματοποιήθηκε πλύση με 100μl PBS. Η μέτρηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε ανάστροφο μικροσκόπιο (Axiovert 40 CFL inverted microscope, ZEISS, Oberkochen, Germany).

3.11 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από κυτταρικές σειρές

Η απομόνωση γενωμικού DNA από τις κυτταρικές σειρές έγινε με τη βοήθεια του DNA mini kit (Qiagen). Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, 5×10^6 κύτταρα από κάθε κυτταρική σειρά αποκολλήθηκαν είτε με τη βοήθεια θρυψίνης (Hela) είτε με τη βοήθεια cell scraper (J774A.1) και τοποθετήθηκαν σε σωλήνα μικροφυγοκέντρου των 1,5 ml. Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στα 300g για 5', το υπερκείμενο απομακρύνθηκε με ιδιαίτερη προσοχή και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 200 μl PBS. Ακολούθησε προσθήκη 20 μl πρωτεάσης και 200 μl διαλύματος λύσης (AL buffer) για τη λύση των κυττάρων και την απομάκρυνση των πρωτεϊνών, γρήγορη ανάδευση μέσω vortex και επώαση στους 56° C για 10'. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε γρήγορη φυγοκέντρωση για την απομάκρυνση οποιασδήποτε σταγόνας παρέμεινε στο καπάκι και προστέθηκε ίσος όγκος, δηλαδή 200 μl 97% αιθανόλης. Έγινε ξανά γρήγορη ανάδευση του δείγματος μέσω vortex όπως επίσης και γρήγορη φυγοκέντρωση. Το μείγμα μεταφέρθηκε σε ειδική στήλη (QIAamp Mini spin column) και φυγοκεντρήθηκε στις 8000 στροφές για 1'. Η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο καθαρό σωλήνα 2 ml όπου και έγινε η προσθήκη του 1^{ου} διαλύματος πλύσης (Buffer AW1) και φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες με πριν. Ακολούθησε 2^η πλύση με μεταφορά πάλι της στήλης σε νέο σωλήνα, προσθήκη 2^{ου} διαλύματος πλύσης (Buffer AW2) και φυγοκέντρωση στις 14000 στροφές για 3'. Οι διαδοχικές πλύσεις και ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις πραγματοποιήθηκαν για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών και των αδιάλυτων συστατικών. Τέλος, για την εκχύλιση του DNA προστέθηκαν 200 μl διαλύματος έκλουσης (Buffer AE), ακολούθησε επώαση για 1' σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση 1' για τη συλλογή του καθαρού γενωμικού DNA.



Εικόνα 6: Διαδοχικά στάδια απομόνωσης γενωμικού DNA από κύτταρα

3.12 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR) η οποία αναφέρεται αλλιώς και ως ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) ή ποσοτική PCR αποτελεί μια παραλλαγή της συμβατικής PCR και χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό και ταυτόχρονα την ποσοτικοποίηση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA. Ουσιαστικά, το προϊόν ανιχνεύεται σε πραγματικό χρόνο καθώς δηλαδή εξελίσσεται η αντίδραση σε αντίθεση με τη συμβατική PCR, είτε με φθορίζοντα ολιγονουκλεοτίδια, που επιτρέπουν την ανίχνευση μόνο του συμπληρωματικού DNA στόχου είτε με μη ειδικές φθορίζουσες χρωστικές που ενσωματώνονται στη διπλή έλικα του DNA

Τρία είναι τα βασικά βήματα που πραγματοποιούνται σε κάθε κύκλο αντιγραφής σε μία αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου, όπως ακριβώς συμβαίνει και στην περίπτωση της συμβατικής PCR. Ειδικότερα:

1. Πραγματοποιείται αποδιάταξη του δίκλωνου τμήματος DNA σε υψηλή θερμοκρασία (94 ή 95 °C)
2. Υβριδισμός των εκκινητών με τα άκρα του μονόκλωνου συμπληρωματικού τους DNA-στόχου σε θερμοκρασία που εξαρτάται από τους εκκινητές
3. Επιμήκυνση των εκκινητών με κατεύθυνση 5' → 3', με τη δράση πολυμεράσης στους 72°C.

Κατά την παρούσα πειραματική διαδικασία, πραγματοποιήθηκε συγκριτική Real Time PCR (comparative quantitation) προκειμένου να διαπιστωθεί αν τα δείγματα είχαν λάβει το ένθεμα. Συγκεκριμένα, η συγκριτική real-time PCR πραγματοποιήθηκε σε σύστημα (Roche Lightcycler LC480, Roche UK) με τη χρήση Taqman Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) το οποίο περιέχει την Taq πολυμεράση, dNTPs, MgCl₂. Επίσης, η αντίδραση περιείχε FAM ανιχνευτές λουσιφεράσης (Mr03987587_mr), DNA και νερό μέχρι τελικό όγκο 10μl.

Πίνακας 4:

qPCR	Ποσότητες (μl)
------	----------------

H ₂ O	3,5
Mix (2X)	5
DNA	1
Probe (20X)	0,5

Το DNA από καθε δειγμα (J774A.1, NF-kB/Luc HeLa, LRH-1/Luc Hela), ήταν σε συγκεντρωση + Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η αντίδραση στην οποία προστέθηκε H₂O αντί για δείγμα DNA. Ακολούθησε real-time PCR σε σύστημα Roche Lightcycler LC480 (Roche UK) με τη χρήση Taqman Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) που περιείχε FAM ανιχνευτές λουσιφεράσης (Mr03987587_mr).

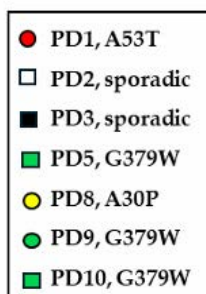
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Προηγούμενη προπτυχιακή μελέτη έδειξε αυξημένη έκφραση της σορτιλίνης στην επιφάνεια μονοκυττάρων περιφερικού αίματος ασθενών με νόσο Πάρκινσον (Α. Ανδρουτσοπούλου (2022)). Επιπρόσθετα, στα ίδια άτομα παρατηρήθηκε μικρότερο ποσοστό μονοκυττάρων σε σύγκριση με τους υγιείς. Οι παρατηρήσεις αυτές συνετέλεσαν στην περαιτέρω διερεύνηση που αποτέλεσε και κύριο θέμα της συγκεκριμένη διπλωματικής εργασίας.

Α. ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ (PBMCs) ΚΑΙ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ (PBMDMs)

4.1 Φαινοτύπιση μακροφάγων PBMDMs σε *in vitro* καλλιέργειες

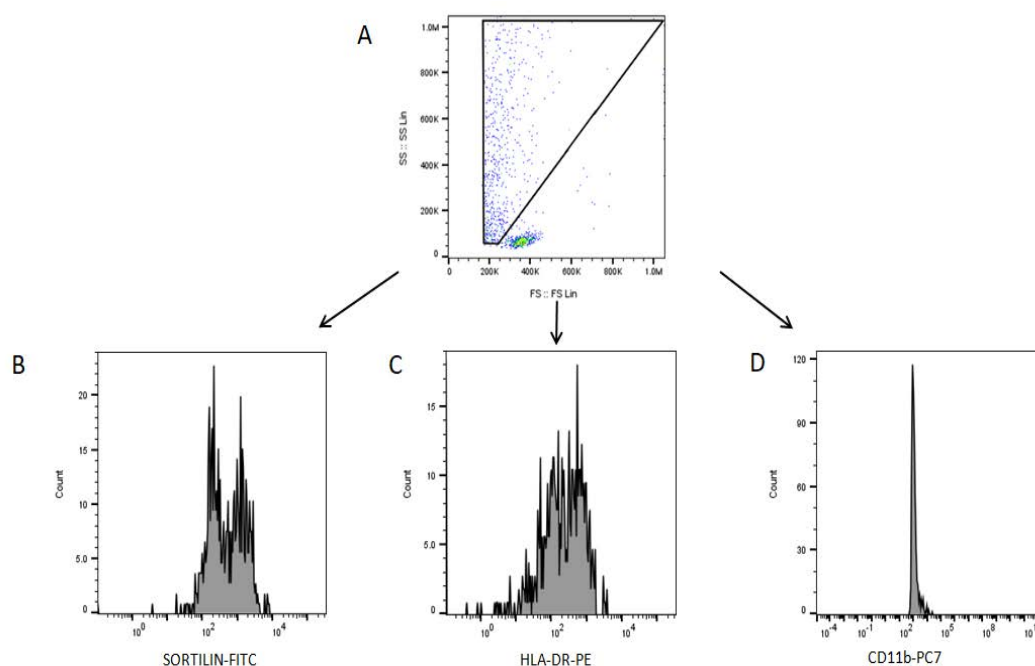
Για τη φαινοτύπιση των PBMDMs, αρχικά απομονώθηκαν λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος υγείων και ασθενών δοτών (N=7-10) όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μεθόδους στην παράγραφο 3.2. Ακολούθησε *in vitro* καλλιέργεια παρουσία του παράγοντα διέγερσης αποικιών ανθρώπινων μακροφάγων (M-CSF), όπου τα μονοκύτταρα διαφοροποιήθηκαν σε μακροφάγα. Ειδικότερα, για την επίτευξη του στόχου, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα από ασθενείς με Parkinson στα οποία παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σορτιλίνης (N=7) (**Εικόνα 7**). Όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα οι ασθενείς PD2, PD3 είναι ασθενείς με τη σποραδική μορφή της νόσου δηλαδή οφείλονται στον συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Ο ασθενής PD1 φέρει γνωστή μετάλλαξη στο γονίδιο *SNCA*, που κωδικοποιεί την α συνουκλεΐνη, την A53T ενώ ο ασθενής PD8 φέρει μετάλλαξη στο ίδιο γονίδιο την μετάλλαξη A30P. Οι υπόλοιποι τρεις ασθενείς φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο *SORLA*, που είναι μέλος της οικογένειας των υποδοχέων με VPS10P επικράτεια, την G379W. Οι πέντε αυτοί ασθενείς ανήκουν στο 5-10% των περιπτώσεων όπου η νόσος είναι κληρονομική.



Εικόνα 7: Ασθενείς με Parkinson στους οποίους παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σορτιλίνης.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα πειράματα της κυτταρομετρίας ροής παριστάνονται στα παρακάτω γραφήματα και ιστογράμματα κατανομής συχνοτήτων (**Εικόνα 8**). Πιο

συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν τα βιώσιμα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και ειδικότερα προσδιορίστηκε ο πληθυσμός των μακροφάγων. Ανιχνεύθηκαν τα μεμβρανικά επίπεδα της σορτιλίνης, του δείκτη κυτταρικής επιφάνειας CD11b και του αντιγόνου HLA-DR στον συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο.



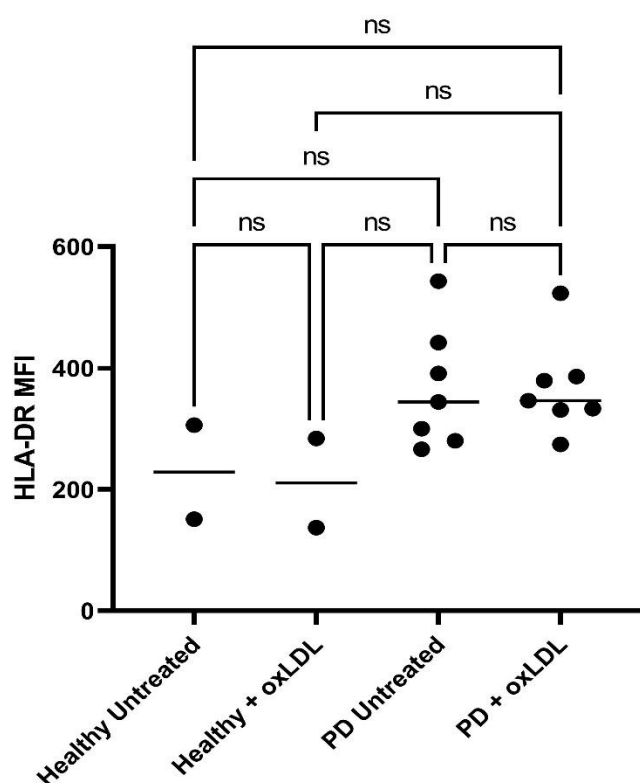
Εικόνα 8: Αναπαράσταση κυτταρομετρία ροής σε μακροφάγα για σορτιλίνη, HLA-DR και του CD11b, ενδεικτικά σε έναν ασθενή με νόσο του Parkinson. Α. Επιλογή των βιώσιμων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος με βάση την πλάγια και πρόσθια σκέδαση **Β.** Απεικόνιση έντασης έκφρασης της σορτιλίνης στον πληθυσμό των μακροφάγων σε ασθενή με Parkinson **Γ.** Απεικόνιση έντασης έκφρασης του αντιγόνου HLA-DR στον πληθυσμό των μακροφάγων σε ασθενή με Parkinson **Δ.** Απεικόνιση έντασης έκφρασης του δείκτη κυτταρικής επιφάνειας CD11b στον πληθυσμό των μακροφάγων σε ασθενή με Parkinson.

Τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν, είτε αφέθηκαν σε ηρεμία, είτε ενεργοποιήθηκαν με οξειδωμένη μορφή της LDL (oxLDL) για 24 ώρες, προκειμένου να μιμηθούν συνθήκες επαγωγής αθηρωματικής πλάκας.

4.2 Προσδιορισμός των επιπέδων του αντιγόνου HLA-DR στην επιφάνεια μακροφάγων

Τα ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα (Human Leukocyte Antigens, HLA) ή αλλιώς αντιγόνα ιστοσυμβατότητας, αποτελούν πρωτεΐνες που εντοπίζονται στην επιφάνεια κάθε κυττάρου επιτρέποντας την αναγνώριση εαυτών ή ξένων πρωτεϊνικών πεπτιδίων από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα αντιγόνα αυτά χωρίζονται σε δύο τάξεις: 1) στα Αντιγόνα

Ιστοσυμβατότητας Τάξης I και 2) στα Αντιγόνα Ιστοσυμβατότητας Τάξης II χαρακτηριστικό παράδειγμα της οποίας αποτελεί το αντιγόνο HLA-DR (Human leukocyte antigen – antigen D related). Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό για τα μόρια της τάξης II είναι το γεγονός πως εκφράζονται ειδικά σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα όπως σε δενδριτικά κύτταρα, Β λεμφοκύτταρα και σε μακροφάγα. Επίσης, η oxLDL μπορεί να επηρεάσει τα επίπεδα έκφρασης του HLA-DR αντιγόνου. Για το λόγο αυτό και προκειμένου να ελεγχθεί η εμπλοκή της oxLDL στα επίπεδα έκφρασης του HLA-DR σε μακροφάγα ασθενών (N=7) και υγείων δοτών (N=2), πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής.



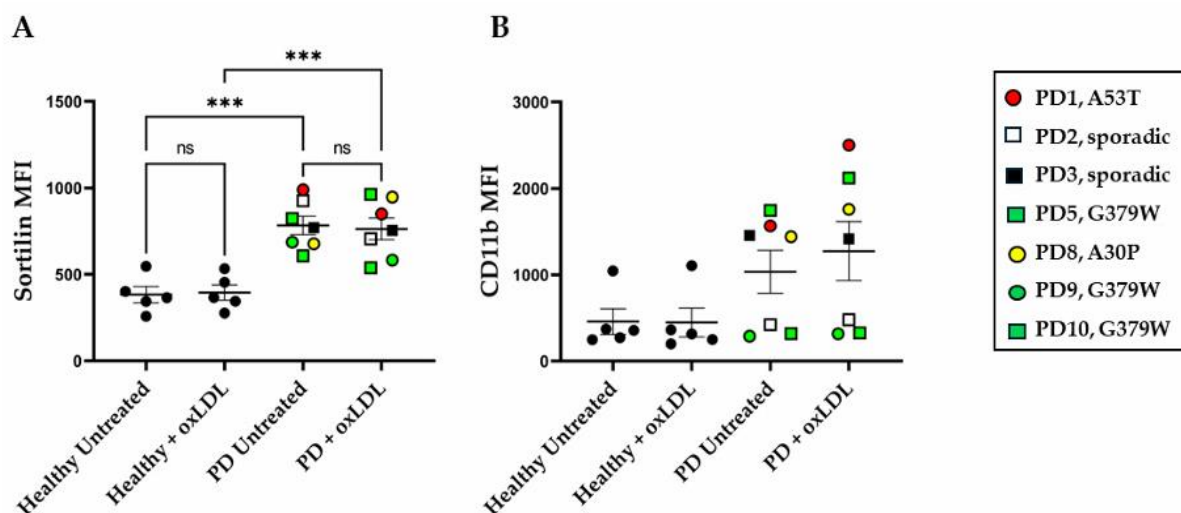
Εικόνα 9: Κυτταρομετρική ανάλυση σε *in vitro* διαφοροποιημένα από μονοκύτταρα, ανθρώπινα μακροφάγα. Μακροφάγα προερχόμενα από μονοπύρηνια κύτταρα ολικού περιφερικού αίματος τόσο από υγιείς δότες όσο και από ασθενείς με νόσο Parkinson καλλιεργήθηκαν και είτε διεγέρθηκαν είτε όχι με 10 µg/mL oxidized LDL για 24 ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέχθηκαν και πραγματοποιήθηκε χρώση με κατάλληλο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του HLA-DR αντιγόνου, σημασμένο με φθοριόχρωμα.

Μετά την ανάλυση των δειγμάτων με το κυτταρόμετρο ροής, δημιουργήθηκε το παραπάνω διάγραμμα για κάθε συνθήκη στο οποίο απεικονίζεται η μέση ένταση φθορισμού (MFI) για το HLA-DR αντιγόνο. Σύμφωνα λοιπόν με την **Εικόνα 9** φαίνεται πως υπάρχει μία τάση προς υψηλότερα επίπεδα HLA-DR στην κυτταρική επιφάνεια μακροφάγων προερχόμενων από

ασθενείς με τη νόσο διεγερμένων ή μη με oxLDL σε σύγκριση με τα επίπεδα του σε μακροφάγα υγείων ατόμων που είτε είχαν διεγερθεί είτε όχι με oxLDL, με τα αποτελέσματα όμως να κρίνονται μη στατιστικώς σημαντικά ($p > 0.05$).

4.3 Προσδιορισμός των επιπέδων σορτιλίνης και του δείκτη κυτταρικής επιφάνειας CD11b στην επιφάνεια μακροφάγων

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος της σορτιλίνης στα μακροφάγα και να εξεταστεί η επίδραση της oxLDL στα επίπεδα της πραγματοποιήθηκαν *in vitro* πειράματα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, απομονώθηκαν κύτταρα και ειδικότερα μονοκύτταρα από ασθενείς με Parkinson στα οποία παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σορτιλίνης καθώς και μονοκύτταρα υγείων δοτών, διαφοροποιήθηκαν *in vitro* σε μακροφάγα, καλλιεργήθηκαν και διεγέρθηκαν ή όχι με oxLDL για 24 ώρες. Στη συνέχεια, διεξήχθη κυτταρομετρία ροής για την εύρεση των επιπέδων της σορτιλίνης καθώς και του δείκτη κυτταρικής επιφάνειας CD11b στα συγκεκριμένα κύτταρα. Η oxLDL πέρα από το γεγονός ότι μπορεί να επηρεάσει τα επίπεδα έκφρασης του HLA-DR αντιγόνου μπορεί επιπλέον να αλλάξει και τα επίπεδα έκφρασης του δείκτη κυτταρικής επιφάνειας CD11b όπως έχει περιγραφεί σε καλλιέργεια μονοκυττάρων από ολικό αίμα [93].

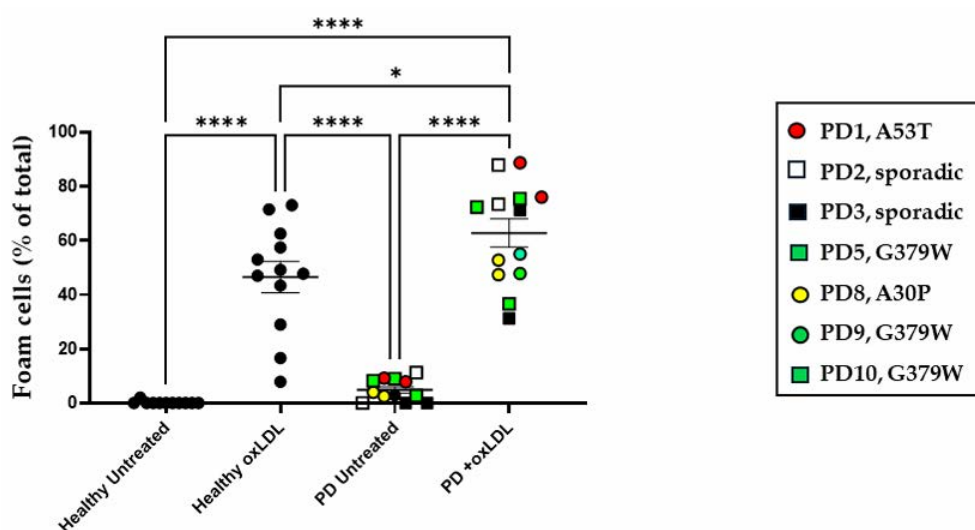


Εικόνα 10: Κυτταρομετρική ανάλυση σε *in vitro* διαφοροποιημένα από μονοκύτταρα, ανθρώπινα μακροφάγα. Μακροφάγα προερχόμενα από μονοπύρηνια κύτταρα ολικού περιφερικού αίματος τόσο από υγιείς δότες όσο και από ασθενείς με νόσο Parkinson ($n=57$) καλλιεργήθηκαν και είτε διεγέρθηκαν είτε όχι με 10 $\mu\text{g/mL}$ oxidized LDL για 24 ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέχθηκαν και πραγματοποιήθηκε χρώση με κατάλληλο αντίσωμα σημασμένο με φθοριόχρωμα έναντι **A.** της σορτιλίνης και **B.** του δείκτη κυτταρικής επιφάνειας CD11b. (***) $p < 0.001$)

Όπως παρατηρείται στην **Εικόνα 10Α** τα επίπεδα της σορτιλίνης ήταν υψηλότερα στην κυτταρική επιφάνεια, των προερχόμενων από ασθενείς με τη νόσο, μακροφάγων διεγερμένων ή μη με oxLDL σε σύγκριση με τα επίπεδα της σε μακροφάγα υγείων ατόμων που είτε είχαν διεγερθεί είτε όχι με oxLDL. Δεν υπήρχαν διαφορές στα επίπεδα της σορτιλίνης στην κυτταρική επιφάνεια των μακροφάγων μεταξύ των δύο διαφορετικών τάξεων ασθενών με τη νόσο του Parkinson, δηλαδή μεταξύ ασθενών με σποραδική νόσο και κληρονομική/γενετική νόσο. Από την ανάλυση των στοιχείων που απεικονίζονται στην **Εικόνα 10Β** προέκυψε πως τα επίπεδα του δείκτη κυτταρικής επιφάνειας CD11b ήταν παρόμοια σε όλες τις καλλιέργειες και συνθήκες και δεν επηρεάστηκαν από την oxLDL.

4.4 Προσδιορισμός ποσοστού σχηματισμού αφρωδών κυττάρων

Η αθηροσκλήρωση η οποία αποτελεί μία χρόνια φλεγμονώδη νόσο χαρακτηρίζεται κυρίως από την παρουσία αφρωδών κυττάρων (foam cells). Υπό παθολογικές καταστάσεις και ενώ έχει υποστεί βλάβη το ενδοθήλιο, τα εισερχόμενα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα με τη βοήθεια αυξητικών παραγόντων όπως είναι ο M-CSF, και στη συνέχεια αρχίζουν να προσλαμβάνουν μέσω ειδικών υποδοχέων μεγάλα φορτία oxLDL ωθώντας στη μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα. Προκειμένου να ελεγχθεί αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των υψηλών επιπέδων σορτιλίνης που εντοπίζονται σε μονοκύτταρα ασθενών με νόσο Parkinson με το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων και μετέπειτα με την αθηροσκλήρωση, πραγματοποιήθηκαν in vitro μελέτες.



Εικόνα 11: Σχηματισμός αφρωδών κυττάρων σε in vitro διαφοροποιημένα από μονοκύτταρα, ανθρώπινα μακροφάγα. Μακροφάγα προερχόμενα από μονοπύρηνια κύτταρα

ολικού περιφερικού αίματος τόσο από υγιείς δότες (N=7, n= 12) όσο και από ασθενείς με νόσο Parkinson (N=7, n=13) καλλιεργήθηκαν και είτε διεγέρθηκαν είτε όχι με 10 µg/mL oxidized LDL για 24 ώρες. Στη συνέχεια, έγινε χρώση των κυττάρων με διάλυμα Oil Red και υπολογίστηκε το ποσοστό των αφρωδών κυττάρων. (* $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$).

Αυτό που παρατηρήθηκε είναι πως απουσία oxLDL, τα κύτταρα υγείων ατόμων δεν οδήγησαν στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, σε αντίθεση με τα προερχόμενα από ασθενείς με νόσο Parkinson κύτταρα τα οποία μετατράπηκαν *in vitro* σε μακροφάγα που παρουσίασαν ένα ποσοστό περίπου 4,8% αφρωδών κυττάρων. Το αποτέλεσμα όμως αυτό δε διαφέρει σημαντικά με αυτό που παρατηρήθηκε στην περίπτωση των υγείων μη διεγερμένων με oxLDL μακροφάγων. Όταν τα κύτταρα διεγέρθηκαν με oxLDL για 24 ώρες διαπιστώθηκε και στις δύο περιπτώσεις υψηλότερος σχηματισμός αφρωδών κυττάρων σε σύγκριση με τα μη διεγερμένα κύτταρα. Υψηλότερα επίπεδα αφρωδών κυττάρων παρατηρήθηκαν σε καλλιέργειες κυττάρων ασθενών με νόσο Parkinson (62.7%, $p < 0.05$) σε αντίθεση με τις καλλιέργειες κυττάρων υγείων (43.6%).

B. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ J774A.1

4.5 Καθορισμός βέλτιστων συνθηκών σχηματισμού αφρωδών κυττάρων που επάγονται από την oxLDL

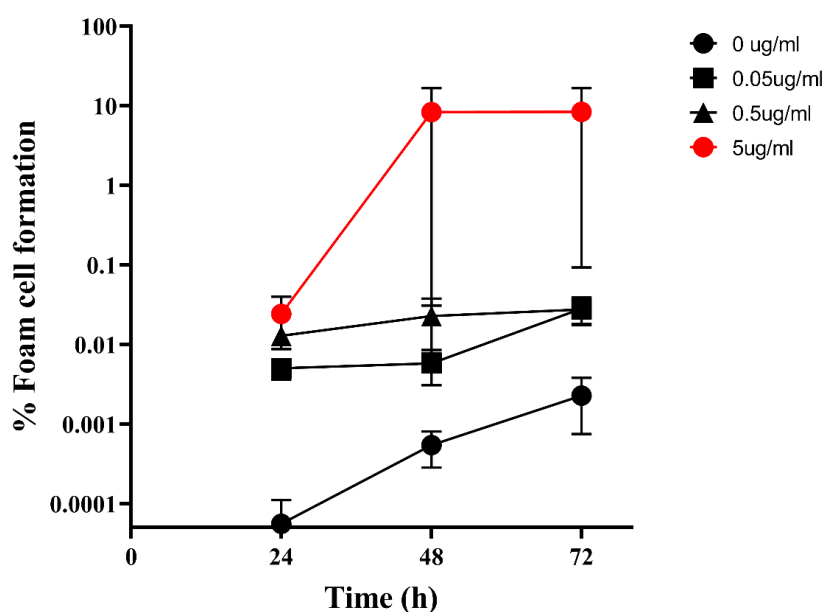
Προκειμένου να υπάρχει μία μεγαλύτερη και πολυκεντρική μελέτη παρατήρησης, η οποία θα επιτρέψει μία πιο άρτια αξιολόγηση της συσχέτισης της σορτιλίνης με τη νόσο του Parkinson και την αθηροσκλήρωση πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω *in vitro* πειράματα σε κυτταρική σειρά μακροφάγων ποντικού, τη J774A.1. Η ανάγκη διερεύνησης του ρόλου της σορτιλίνης στις αποκρίσεις των μακροφάγων έναντι σε φλεγμονώδεις παράγοντες καθώς και η εμπλοκή των μακροφάγων στη φλεγμονή ώθησαν στη χρήση της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς. Επιπλέον η επιτακτική ανάγκη χρήσης μεγάλου αριθμού κυττάρων για τη μελέτη μοριακών μηχανισμών οδήγησε στην πραγμάτωση πειραμάτων με τη χρήση της J774A.1 κυτταρικής σειράς αφού προσφέρει πλεονέκτημα στον αριθμό κυττάρων έναντι ανθρώπινων κυττάρων. Τα πρώτα στάδια για την επίτευξη των πειραμάτων περιελάμβαναν τον καθορισμό των κατάλληλων συνθηκών όπως α) η βέλτιστη συγκέντρωση της oxLDL β) ο χρόνος επώασης με oxLDL και γ) η αρχική πυκνότητα κυττάρων J774A.1 που αποδίδει σαφή και επαναλήψιμα αποτελέσματα.

Πίνακας 5: Σύνοψη των τιμών που χρησιμοποιήθηκαν για τον καθορισμό των βέλτιστων συνθηκών

Χρόνος (Ωρες)	Δόση oxLDL (µg/ml)
---------------	--------------------

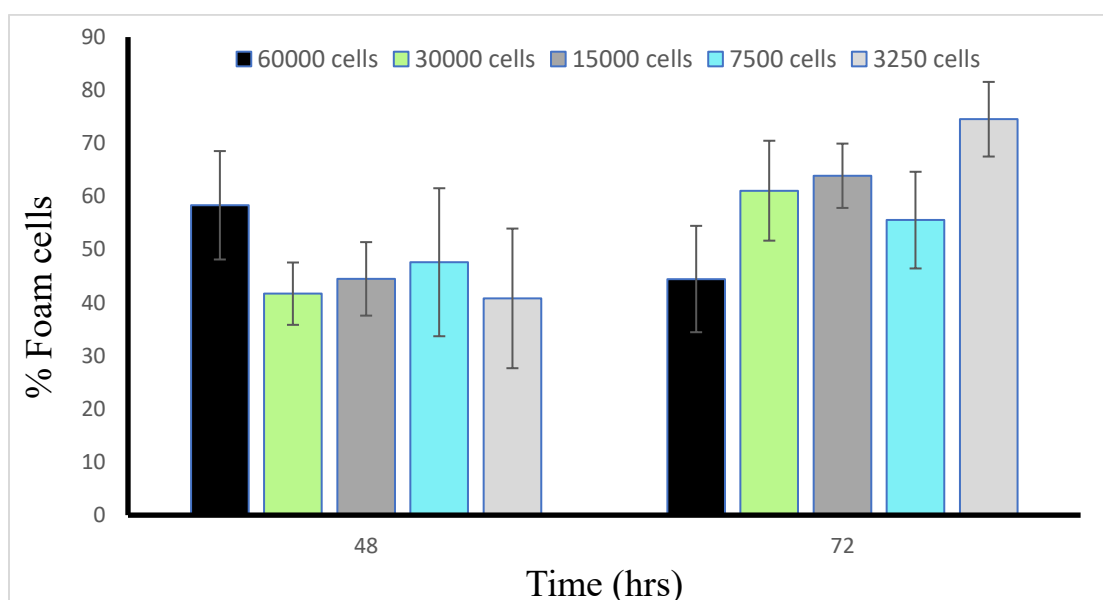
24	0
48	0,05
72	0,5
	5

Στην **Εικόνα 12** συσχετίζεται η δόση oxLDL με τον λογάριθμο του ποσοστού σχηματισμού αφρωδών κυττάρων και το χρόνο. Για την έναρξη των πειραμάτων τα κύτταρα J774A.1 τέθηκαν σε καλλιέργεια με αναλογία $1,2 \cdot 10^5$ κύτταρα ανά well σε 48-well plate ποσοστό το οποίο καθορίστηκε με βάση το επιθυμητό ποσοστό κάλυψης (confluency) της συγκεκριμένης επιφάνειας. Η αρχική αυτή πυκνότητα κυττάρων J774A.1 διεγέρθηκε με διάφορες δόσεις oxLDL σε 3 διαφορετικές χρονικές στιγμές (**Πίνακας 5**). Δεδομένων των αποτελεσμάτων που παρατηρήθηκαν μετά τη διέγερση των J774A.1 κυττάρων με oxLDL η βέλτιστη συγκέντρωση της oxLDL που χρησιμοποιήθηκε για την επανάληψη του πειράματος ήταν 5 $\mu\text{g/ml}$. Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη συγκέντρωση παρατηρήθηκε αυξημένο ποσοστό αφρωδών κυττάρων στις 48 και 72 ώρες.



Εικόνα 12: Καθορισμός βέλτιστων συνθηκών σχηματισμού αφρωδών κυττάρων που επάγονται από την oxLDL. J774A.1 κύτταρα καλλιεργήθηκαν και διεγέρθηκαν με 0, 0,05 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ και 5 $\mu\text{g/ml}$ oxLDL για 24, 48 και 72 ώρες. Στη συνέχεια, έγινε χρώση των κυττάρων με διάλυμα Oil Red και υπολογίστηκε το ποσοστό των αφρωδών κυττάρων.

Αφού καθορίστηκαν η βέλτιστη συγκέντρωση της oxLDL και ο χρόνος, επόμενος στόχος ήταν ο προσδιορισμός της αρχικής πυκνότητας κυττάρων J774A1 κατά την οποία παρατηρείται αυξημένο ποσοστό αφρωδών κυττάρων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο γράφημα της **Εικόνας 13**, 6×10^4 κύτταρα έδωσαν το μέγιστο αριθμό αφρωδών κυττάρων στις 48 ώρες ενώ περίπου 4×10^3 κύτταρα έδειξαν σαφή και επαναλήψιμα αποτελέσματα δίνοντας το μέγιστο αριθμό αφρωδών κυττάρων στις 72 ώρες. Για την διεξαγωγή περαιτέρω πειραμάτων επιλέχθηκε ως αρχική πυκνότητα κυττάρων J774A1 τα 4×10^3 κύτταρα. Αποτελεί την πιο σωστή αρχική πυκνότητα καθώς διαπιστώθηκε πως είναι ικανή να ωθήσει στην επίτευξη ισορροπίας μεταξύ της βέλτιστης κυτταρικής ανάπτυξης και των συνθηκών καλλιέργειας, ώστε να αποφευχθούν προβλήματα που μπορεί να εμποδίσουν την απόδοση και τη βιωσιμότητα των κυττάρων.

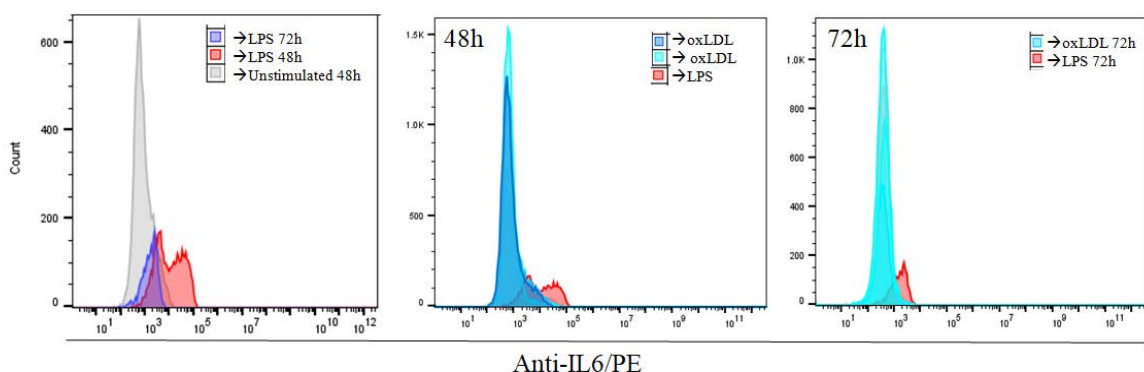


Εικόνα 13: Καθορισμός βέλτιστων συνθηκών σχηματισμού αφρωδών κυττάρων που επάγονται από την oxLDL. J774A.1 κύτταρα καλλιεργήθηκαν και διεγέρθηκαν με 5 $\mu\text{g/ml}$ oxLDL για 48 και 72 ώρες. Στη συνέχεια, έγινε χρώση των κυττάρων με διάλυμα Oil Red και υπολογίστηκε το ποσοστό των αφρωδών κυττάρων.

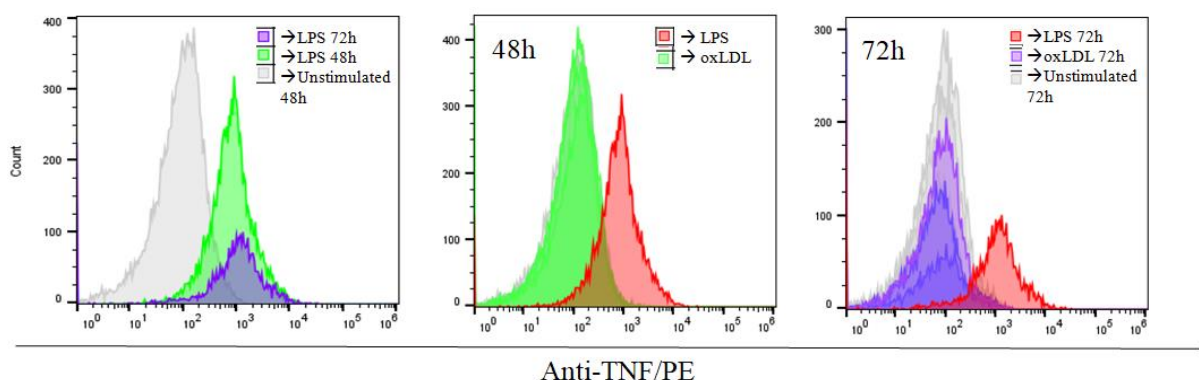
4.6 Ποσοτικός προσδιορισμός των εκκρινόμενων φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-6 και TNF

Στη συνέχεια εφαρμόστηκε κυτταρομετρία ροής προκειμένου να ελεγχθεί αν η oxLDL μπορούσε να επάγει την απελευθέρωση των φλεγμονωδών κυτταροκινών IL6 και TNF σε χρονικό διάστημα έως και 72 ώρες. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που είχαν διεγερθεί με λιποπολυσακχαρίτη (LPS), που αποτελεί συστατικό της πλασματικής μεμβράνης των Gram-βακτηρίων και γνωστό ενεργοποιητή των μακροφάγων.

Από την ανάλυση των στοιχείων που απεικονίζονται στα γραφήματα της **Εικόνας 14** και **Εικόνας 15**, προκύπτει ότι η διέγερση με LPS προκάλεσε την επαγωγή απελευθέρωσης τόσο της IL-6 όσο και του TNF με μέγιστη συγκέντρωση στις 48 ώρες. Αντίθετα, η oxLDL δεν φάνηκε να επάγει την παραγωγή της IL6 και του TNF σε αυτή την κυτταρική σειρά υπό τις πειραματικές συνθήκες που εξετάστηκαν.



Εικόνα 14: Προσδιορισμός των επιπέδων της εκκρινόμενης φλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-6. J774A.1 κύτταρα καλλιεργήθηκαν και ορισμένα διεγέρθηκαν με 10 $\mu\text{g/ml}$ oxLDL ή 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 48 και 72 ώρες. Στη συνέχεια, επώαστηκαν με το αντιδραστήριο BFA με στόχο την παρεμπόδιση έκκρισης της IL-6 από τα κύτταρα και ακολούθησε μονιμοποίηση και διάτρηση των κυττάρων. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ενδοκυτταρική χρώση των κυττάρων με τη χρήση του anti-IL6 PE αντισώματος και ανάλυση των δειγμάτων

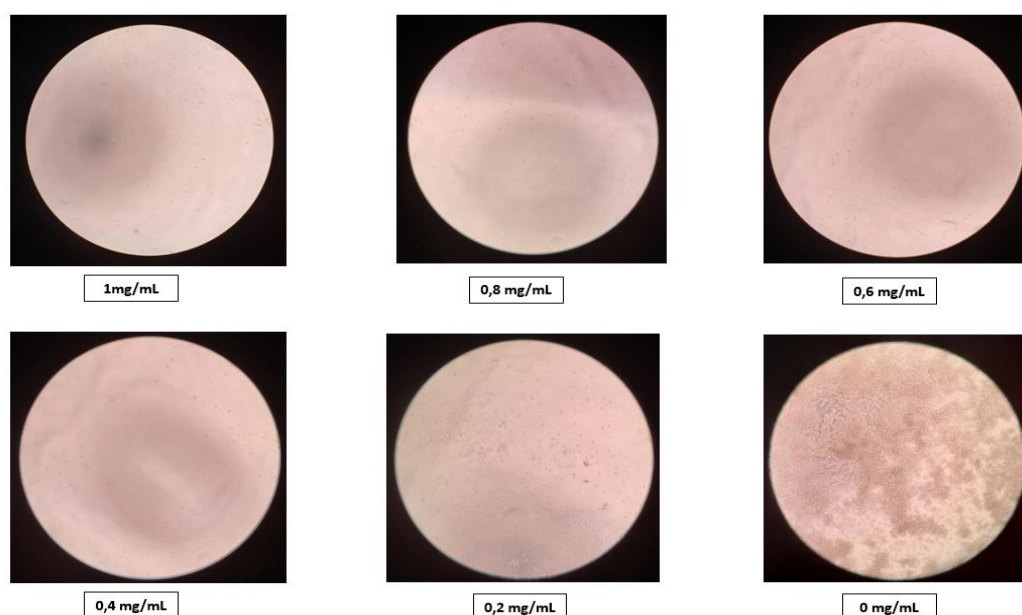


Εικόνα 15: Προσδιορισμός των επιπέδων της εκκρινόμενης φλεγμονώδους κυτταροκίνης TNF. J774A.1 κύτταρα καλλιεργήθηκαν και ορισμένα διεγέρθηκαν με 10 $\mu\text{g/ml}$ oxLDL ή 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 48 και 72 ώρες. Στη συνέχεια, επώαστηκαν με το αντιδραστήριο BFA με στόχο την παρεμπόδιση έκκρισης του TNF από τα κύτταρα και ακολούθησε μονιμοποίηση και διάτρηση των κυττάρων. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ενδοκυτταρική χρώση των κυττάρων με τη χρήση του anti-TNF PE αντισώματος και ανάλυση των δειγμάτων

4.7 Δημιουργία διαγονιδιακών κυτταρικών σειρών και έλεγχος ενδογενούς ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό G418

Στόχος της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η δημιουργία γενετικά τροποποιημένων μακροφάγων και επιθηλιακών κυττάρων με τη χρήση πλασμιδίων λεντιϊού έτσι ώστε να αναπτυχθούν μοριακά εργαλεία για την αξιολόγηση του μεταγραφικού παράγοντα LRH-1 στη ρύθμιση της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου και της αθηροσκλήρωσης. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν ανασυνδυασμένοι λεντιϊοί για τη δημιουργία νέων κυτταρικών σειρών αναφοράς που εκφράζουν ενισχυμένη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (eGFP), καθώς και λουσιφεράση της πυγολαμπίδας υπό τον έλεγχο του υποκινητή του LRH-1 (J774A.1) ή λουσιφεράση της πυγολαμπίδας υπό τον έλεγχο του υποκινητή του LRH-1 (Hela).

Αρχικά, αφού πραγματοποιήθηκε η παραγωγή του λεντιϊού σε ειδικά 293T κύτταρα, έγινε μεταγωγή του λεντιϊού τόσο στην κυτταρική σειρά μακροφάγων ποντικού J774A.1 όσο και στην κυτταρική σειρά επιθηλιακών κυττάρων Hela. Στη συνέχεια, και οι δύο κυτταρικές σειρές ελέγχθηκαν για ενδογενή αντοχή στη νεομυκίνη χρησιμοποιώντας δόσεις μεταξύ 0,2 και 1,0 mg/ml αλλά και με διαφορετικές αρχικές πυκνότητες κυττάρων από 625-5000 κύτταρα/well. Πραγματοποιήθηκε δηλαδή καλλιέργεια κυττάρων για να επιτευχθεί πολλαπλασιασμός των κυττάρων με αντιβιοανθεκτικότητα. Στην **Εικόνα 16** παρατηρούνται ενδεικτικά τα βιώσιμα κύτταρα σε όλες τις πιθανές δόσεις νεομυκίνης όταν η αρχική πυκνότητα κυττάρων J774A.1 ήταν περίπου 3×10^3 κύτταρα/πηγαδάκι.



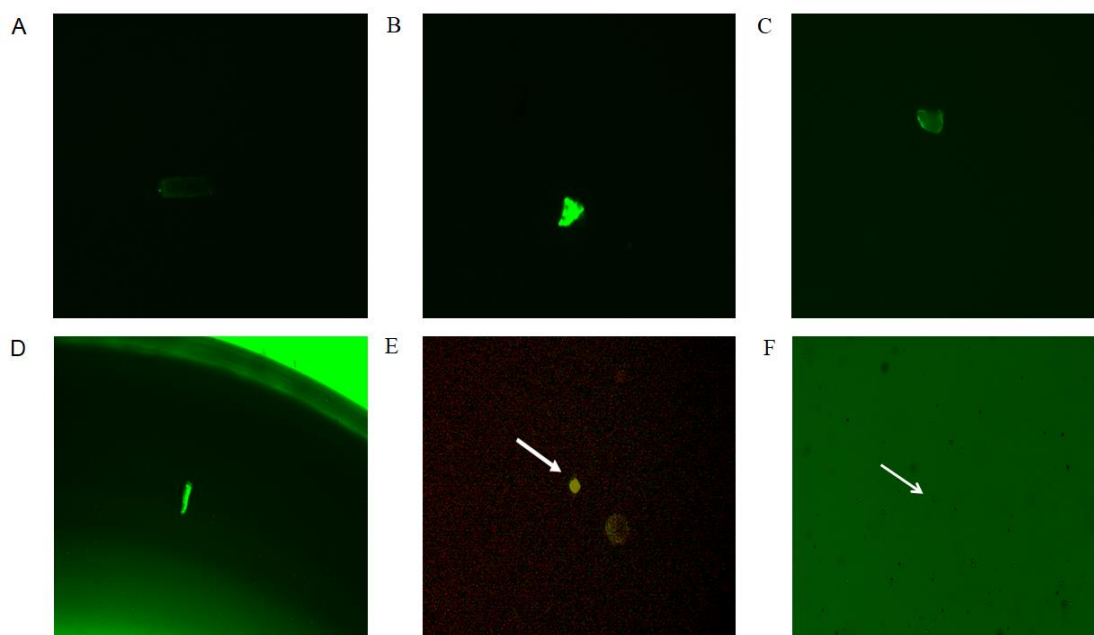
Εικόνα 16: Έλεγχος ενδογενούς ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό G418. J774A.1 κύτταρα καλλιεργήθηκαν, ελέγχθηκαν για ενδογενή αντοχή στη νεομυκίνη χρησιμοποιώντας δόσεις

μεταξύ 0,2 και 1,0 mg/ml αλλά και με διαφορετικές αρχικές πυκνότητες κυττάρων από 625-5000 κύτταρα/well.

Μετά από 10 ημέρες επιλογής, αξιολογήθηκε ότι 0,4 mg/ml νεομυκίνης ήταν αρκετά για να σκοτώσουν τόσο τα J774A.1 όσο και τα HeLa κύτταρα σε αρχική πυκνότητα 4×10^3 κυττάρων/πηγαδάκι.

4.8 Επιβεβαίωση θετικών κλώνων με τη βοήθεια μικροσκοπίας φθορισμού

Καθώς καθορίστηκε ο βέλτιστος αριθμός κυττάρων για την αρχική μόλυνση και η βέλτιστη συγκέντρωση του αντιβιοτικού G418 προκειμένου να επιτευχθεί η επιλογή θετικών κλώνων δηλαδή αυτών που έχουν λάβει και ενσωματώσει το ένθεμα, χρησιμοποιήθηκε μικροσκοπία φθορισμού για τα κύτταρα J774A.1 με στόχο την απεικόνιση των θετικών κλώνων που είναι ανθεκτικοί στο αντιβιοτικό.

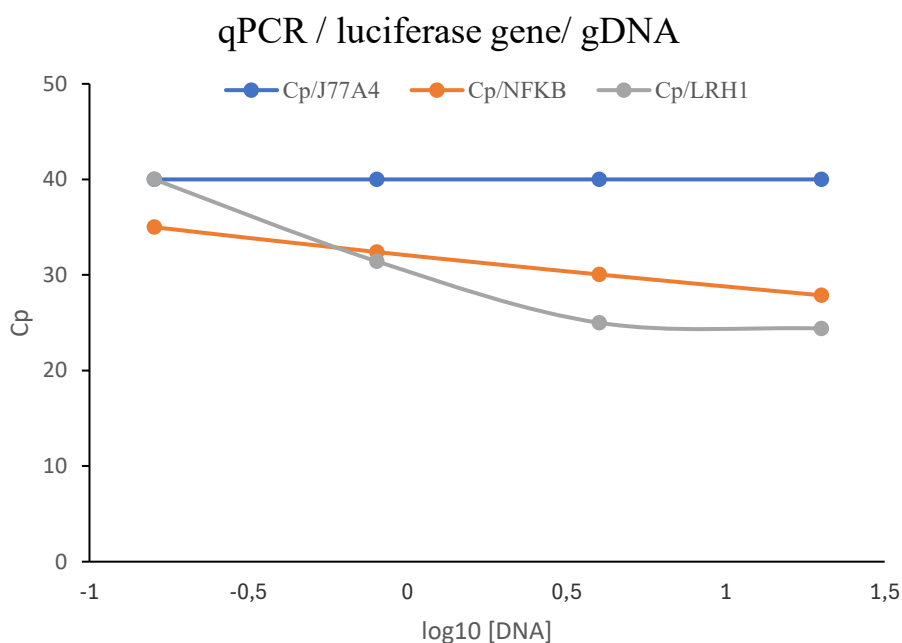


Εικόνα 17: Επιλογή θετικών κλώνων. A, B, C, D. Απεικόνιση μη φυσιολογικών ως προς τη μορφολογία γενετικά τροποποιημένων μακροφάγων **E, F.** Απεικόνιση φυσιολογικών ως προς τη μορφολογία γενετικά τροποποιημένων μακροφάγων

Στην **Εικόνα 17** παρατηρούνται ορισμένα κύτταρα J774A.1 τα οποία εκφράζουν ενισχυμένη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (eGFP) υπό τον έλεγχο του υποκινητή του LRH-1. Πρόκειται για γενετικά τροποποιημένα μακροφάγα τα οποία όμως όπως φαίνεται δεν εμφανίζουν στη πλειονότητά τους στη συγκεκριμένη πτυχιακή το τυπικό στρογγυλό σχήμα τους όπως παρατηρείται στην **Εικόνα 17 A, B, C, D.**

4.9 Επιβεβαίωση θετικών κλώνων με τη βοήθεια qPCR

Η επικύρωση των θετικών κλώνων δηλαδή των LRH-1/Luc HeLa κυττάρων που έχουν λάβει το ένθεμα, πραγματοποιήθηκε με qPCR σε πραγματικό χρόνο για συγκεκριμένες αλληλουχίες των λεντιϊών. Ως αρνητικός μάρτυρας (Negative control) χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά J774A.1 η οποία δεν περιείχε το γονίδιο της λουσιφεράσης. Ως θετικός μάρτυρας (positive control) χρησιμοποιήθηκαν τα NF-kB/Luc HeLa κύτταρα, τα οποία αποτελούν κύτταρα που από την προέλευση τους περιέχουν το γονίδιο της λουσιφεράσης. Ως negative PCR control χρησιμοποιήθηκε το νερό.



Εικόνα 18: Επικύρωση θετικών κλώνων, LRH-1/Luc HeLa, με qPCR σε πραγματικό χρόνο. Απομονώθηκε χρωμοσωμικό DNA από κυτταρικό ιζήμα από 3 κυτταρικές σειρές: J774A.1, NF-kB/Luc HeLa, LRH-1/Luc HeLa και πραγματοποιήθηκαν 3 διαδοχικές 1:5 αραιώσεις για το κάθε δείγμα.

Μετά το πέρας των 40 κύκλων και από την παρατήρηση της **Εικόνας 18**, γίνεται αντιληπτό ότι τα J774A.1 κύτταρα δεν έδωσαν καθόλου σήμα ($C_p=40$) σε καμία ποσότητα DNA, γεγονός αναμενόμενο διότι δε διαθέτουν το γονίδιο της λουσιφεράσης. Ισχύει ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μορίων DNA στο αρχικό δείγμα τόσο μικρότερος είναι ο αριθμός των κύκλων πολλαπλασιασμού που χρειάζονται για να παραχθεί ικανός αριθμός προϊόντων ώστε ο φθορισμός του δείγματος να ξεπεράσει το επίπεδο ανίχνευσης. Επομένως, δείγματα τα οποία έχουν πολλά αντίγραφα του γονιδίου στόχου στη συγκεκριμένη περίπτωση του γονιδίου της λουσιφεράσης έχουν μικρότερο C_p από δείγματα με λιγότερα αντίγραφα. Συνεπώς, το γεγονός πως τόσο τα NF-

kB/Luc HeLa κύτταρα όσο και τα LRH-1/Luc HeLa εμφάνισαν παρόμοια εικόνα ωθεί στο συμπέρασμα πως πράγματι τα LRH-1/Luc HeLa κύτταρα έχουν ενσωματωμένο το ένθεμα και πως δημιουργήθηκε επιτυχώς μία νέα διαγονιδιακή κυτταρική σειρά επιθηλιακών κυττάρων η οποία εκφράζει το γονίδιο της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο του υποκινητή του LRH-1.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η νόσος του Parkinson αποτελεί μία από τις συχνότερες παθήσεις που αφορούν την γήρανση και επηρεάζει κυρίως άτομα άνω των 65 ετών [3]. Πρόκειται για μια από τις πιο κοινές νευροεκφυλιστικές διαταραχές για την οποία ο ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος αναγνωρίζεται ολοένα και περισσότερο ως κρίσιμος παράγοντας τόσο στην εμφάνιση όσο και στην εξέλιξη της νόσου και αυτό αποτελεί το πεδίο έρευνας της συγκεκριμένης μελέτης. Με χρήση κυτταρομετρίας ροής παρατηρήθηκαν μειωμένος αριθμός Β λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων στο περιφερικό αίμα ασθενών συγκριτικά με υγιή άτομα. Θέλοντας να δούμε αν υπάρχει συσχετισμός του περιφερικού ανοσοποιητικού συστήματος με πρωτεΐνες γνωστού ρόλου στη νόσο PD, αποφασίσαμε να μελετήσουμε την πρωτεΐνη σορτιλίνη. Ανίχνευση μεμβρανικής σορτιλίνης σε λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα περιφερικού αίματος, έδειξε αυξημένα επίπεδα σορτιλίνης στα μονοκύτταρα ασθενών [Α. Ανδρουτσοπούλου (2022), 94]. Τα αυξημένα επίπεδα σορτιλίνης μπορεί να σχετίζονται με συνοσηρότητες, όπως καρδιαγγειακά νοσήματα. Μελέτες συσχέτισης σε ολόκληρο το γονιδίωμα (GWAS), υποδεικνύουν ότι το γονίδιο *SORT1*, που κωδικοποιεί τη σορτιλίνη, παρουσιάζει τη στενότερη συσχέτιση με τη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας χοληστερόλη (LDL-C) από όλους τους γονιδιακούς τόπους, υποδηλώνοντας την εμπλοκή της σορτιλίνης και στην ανάπτυξη καρδιαγγειακών νόσων [75,95].

Η αθηροσκλήρωση συγκαταλέγεται στις πιο διαδεδομένες καρδιαγγειακές παθήσεις παγκοσμίως και, παρά τις διαφορές της από τη νόσο του Parkinson, παρουσιάζει κοινά χαρακτηριστικά παθογένεσης, όπως η χρόνια φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες. [7]. Η επικινδυνότητα της αθηροσκλήρωσης και η ανάγκη εύρεσης θεραπειών που είτε θα αναστρέφουν τη νόσο είτε θα αποτρέπουν την εξέλιξή της, έχει ωθήσει την επιστημονική κοινότητα τα τελευταία χρόνια να εστιάσει στην ανακάλυψη νέων θεραπευτικών στόχων και μοριακών μηχανισμών που να εμπλέκονται στην παθογένεσή της δείχνοντας ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη μελέτη του μεταγραφικού παράγοντα LRH-1. Στη συγκεκριμένη μελέτη καλλιεργήθηκαν μακροφάγα προερχόμενα από μονοπύρρηνα κύτταρα ολικού περιφερικού αίματος ασθενών με νόσο του Parkinson και παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σορτιλίνης σε μη διεγερμένες συνθήκες, σε σύγκριση με αυτά που προήλθαν από υγιείς δότες [94]. Αντίστοιχα υπό συνθήκες διέγερσης με oxidized LDL για 24 ώρες, τα μακροφάγα τόσο των υγιεινών δοτών όσο και των ασθενών με τη νόσο ανταποκρίθηκαν με παρόμοιο τρόπο όπως και στις μη διεγερμένες συνθήκες χωρίς να εμφανίζουν περαιτέρω αύξηση της έκφρασης της σορτιλίνης [94]. Αξίζει να σημειωθεί πως αυτή η παρατήρηση διαφέρει από εκείνη μιας προηγούμενης μελέτης σε ηπατικά ημιτονοειδή ενδοθηλιακά κύτταρα, σύμφωνα με την οποία, μετά από διέγερση των κυττάρων με οξειδωμένη LDL (oxLDL), παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης σορτιλίνης [96]. Επιπρόσθετα, ελέγχθηκε

πιθανή συσχέτιση μεταξύ των υψηλών επιπέδων σορτιλίνης που εντοπίστηκαν σε μονοκύτταρα ασθενών με νόσο Parkinson με το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων και μετέπειτα με την αθηροσκλήρωση. Παρατηρήθηκε ότι *in vitro* διαφοροποιημένα από μονοκύτταρα, που εξέφραζαν υψηλά επίπεδα σορτιλίνης, ανθρώπινα μακροφάγα ασθενών τα οποία στη συνέχεια διεγέρθηκαν με oxLDL, οδήγησαν στο σχηματισμό υψηλότερου ποσοστού αφρωδών κυττάρων σε σύγκριση με τα διεγερμένα μακροφάγα υγείων. Είναι αδιαμφισβήτητο πως χαρακτηριστικό γνώρισμα της αθηροσκλήρωσης αποτελεί η παρουσία αφρωδών κυττάρων (foam cells) [97]. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η υπερέκφραση της σορτιλίνης στα μονοκύτταρα ασθενών με νόσο του Parkinson πιθανόν να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον αυξημένο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση πως η σορτιλίνη δύναται να λειτουργεί ως γέφυρα ανάμεσα στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες και τις καρδιαγγειακές νόσους [98]. Επιπρόσθετα, διερευνήθηκαν και προσδιορίστηκαν τόσο τα επίπεδα του δείκτη κυτταρικής επιφάνειας CD11b στην επιφάνεια μακροφάγων όσο και τα επίπεδα του αντιγόνου HLA-DR προκειμένου να ελεγχθεί η εμπλοκή της oxLDL στα επίπεδα έκφρασης τους. Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν πως τα επίπεδα έκφρασης του δείκτη CD11b στα μακροφάγα που είχαν διεγερθεί με oxLDL παρέμειναν αμετάβλητα χωρίς να διαπιστώνεται μείωση. Πράγματι το συγκεκριμένο εύρημα συμβαδίζει με μία μελέτη από τα δεδομένα της οποίας προέκυψε πως η θεραπεία μονοκυττάρων με oxLDL και όχι διέγερση τους, φάνηκε να μην επηρεάζει τα επίπεδα του CD11b [99]. Ωστόσο, το εύρημα που προέκυψε από την παρούσα διπλωματική εργασία, έρχεται σε αντιδιαστολή με μια προηγούμενη μελέτη, η οποία ανέφερε μείωση της έκφρασης του CD11b σε καλλιέργειες μονοκυττάρων ολικού αίματος που είχαν διεγερθεί με oxLDL [93]. Η διαφορά αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί σε διαφορές στις πειραματικές συνθήκες, όπως η χρήση διαφορετικών κυτταρικών τύπων ή οι συνθήκες διέγερσης όπως για παράδειγμα η διάρκεια διέγερσης και η συγκέντρωση της oxLDL. Όσον αφορά τα επίπεδα του αντιγόνου HLA-DR στην επιφάνεια των μακροφάγων και την επίδραση της oxLDL, παρόλο που τα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικώς σημαντικά, χρήζουν ανάλυσης και συζήτησης. Ειδικότερα, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα HLA-DR στα μακροφάγα ασθενών με νόσο Parkinson σε σύγκριση με υγιή άτομα, ανεξάρτητα από τη διέγερση με oxLDL. Γενικότερα οι ερευνητές έχουν παρατηρήσει πως η oxLDL εκτός του ότι μπορεί να μεταβάλλει τα επίπεδα της πρωτεΐνης CD11b σε κύτταρα της έμφυτης ανοσίας μπορεί να επηρεάσει και τα επίπεδα του HLA-DR [93, 100]. Πιο συγκεκριμένα, με βάση τις υπάρχουσες βιβλιογραφικές αναφορές, υποστηρίζεται πως ανώριμα δενδριτικά κύτταρα (immature Dendritic Cells, iDCs) που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με oxLDL εμφάνισαν υψηλά επίπεδα HLA-DR με δόσοεξαρτώμενο τρόπο [100,101]. Επίσης σε μία άλλη μελέτη προτάθηκε ότι η oxLDL αυξάνει έμμεσα την έκφραση του HLA-DR σε μακροφάγα [102]. Ωστόσο, τα δεδομένα της παρούσας διπλωματικής εργασίας φαίνεται να έρχονται σε αντίθεση με αυτά τα ευρήματα. Κατ' επέκταση

απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για διευκρίνιση των παραγόντων που επηρεάζουν τα επίπεδα του HLA-DR εστιάζοντας και σε αυτή την περίπτωση σε διαφορές στις πειραματικές συνθήκες.

Η ανάγκη περαιτέρω διερεύνησης της εμπλοκής της σορτιλίνης στη νόσο του Parkinson και στην αθηροσκλήρωση, καθώς και η κατανόηση του ρόλου της στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις των μακροφάγων, οδήγησε στη διεξαγωγή *in vitro* πειραμάτων με τη χρήση της κυτταρικής σειράς J774A.1. Αφού μελετήθηκαν και προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες σχηματισμού αφρωδών κυττάρων που προκαλούνται από oxLDL, ελέγχθηκε ο ρόλος της oxLDL στην επαγωγή απελευθέρωσης των φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-6 και TNF, δύο κυρίαρχων μορίων που συμμετέχουν σε παθοφυσιολογικές διεργασίες όπως η αθηροσκλήρωση. Τα ενδοκυτταρικά επίπεδα τόσο της IL-6 όσο και του TNF, ποσοτικοποιήθηκαν με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής στην κυτταρική σειρά μακροφάγων ποντικού J774A.1 και ελέγχθηκαν για ένα χρονικό διάστημα έως και 72 ώρες. Αυτό έγινε μετά από επώαση με Brefeldin A, το οποίο αναστέλλει την έκκριση της IL-6 και του TNF από τα κύτταρα, εξασφαλίζοντας την ακριβή μέτρηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων τους [103]. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο αγωνιστής LPS, ενός ισχυρού διεγέρτη της ανοσολογικής απόκρισης των μακροφάγων, που εμπλέκεται και στη χρόνια φλεγμονή, στην έκφραση των κυτταροκινών IL-6 και TNF. Η διέγερση των κυττάρων με LPS έδειξε να αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης και των δύο φλεγμονωδών κυτταροκινών με τις μέγιστες τιμές να καταγράφονται στις 48 ώρες. Αντίθετα, τα κύτταρα που διεγέρθηκαν με oxLDL δεν παρουσίασαν κάποια αύξηση στην παραγωγή των φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-6 και TNF, γεγονός που υποδηλώνει ότι η oxLDL δεν επηρεάζει την επαγωγή τους υπό τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. Αυτό το αποτέλεσμα έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες που υποστηρίζουν ότι η oxLDL επάγει την παραγωγή IL-6 και TNF σε μακροφάγα. [104]. Η διεθνής βιβλιογραφία υποστηρίζει ότι η oxLDL μπορεί να επάγει την παραγωγή των φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-6 και TNF σε μακροφάγα [105,106]. Πιο συγκεκριμένα, ορισμένες μελέτες έχουν εστιάσει στους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην αύξηση αυτών των μορίων, καταδεικνύοντας την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ [107,108]. Ωστόσο, υπάρχουν επίσης δεδομένα που δείχνουν ότι ο συνδυασμός οξειδωμένης LDL με διαφορετικές ισομορφές της C- αντιδρώσας πρωτεΐνης (C-reactive protein, CRP) μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης των φλεγμονωδών κυτταροκινών TNF και IL-6 σε μακροφάγα που προήλθαν από την κυτταρική σειρά U937 [109]. Η διαφοροποίηση αυτών των αποτελεσμάτων υπογραμμίζει την ανάγκη περαιτέρω διερεύνησης, λαμβάνοντας υπόψη τις πειραματικές συνθήκες, τη συγκέντρωση της oxLDL και την αλληλεπίδραση με άλλους παράγοντες.

Η υψηλή συγκέντρωση λιπιδίων, και ειδικότερα της LDL, αποτελεί βασικό παράγοντα που συμβάλλει στη συσσώρευση λιπιδίων στα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων, οδηγώντας στον

σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας, ενός χαρακτηριστικού της χρόνιας φλεγμονώδους νόσου της αθηροσκλήρωσης. Ο πυρηνικός υποδοχέας LRH-1 έχει αποδειχθεί ότι διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση γονιδίων που εμπλέκονται στον λιπιδιακό μεταβολισμό και την ομοιόσταση της χοληστερόλης. Επομένως, η διερεύνηση του ρόλου του LRH-1 σε κυτταρικό επίπεδο, μέσω της δημιουργίας διαγονιδιακής κυτταρικής σειράς, μπορεί να προσφέρει πολύτιμες γνώσεις για τη σύνδεσή του με την παθογένεια της αθηροσκλήρωσης. Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης έγινε ακόμη με τη χρήση πλασμιδίων λεντιού, προσπάθεια δημιουργίας διαγονιδιακής κυτταρικής σειράς μακροφάγων και επιθηλιακών κυττάρων προκειμένου να εκφράζεται το γονίδιο της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο του υποκινητή του LRH-1. Εξ όσων είναι γνωστά από την διεθνή βιβλιογραφία, δεν έχουν πραγματοποιηθεί αντίστοιχα πειράματα. Με τη βοήθεια qPCR επικυρώθηκαν οι θετικοί κλώνοι, διαπιστώθηκε δηλαδή η επιτυχής δημιουργία μίας νέας διαγονιδιακής κυτταρικής σειράς επιθηλιακών κυττάρων. Αντίστοιχα με τη βοήθεια μικροσκοπίας φθορισμού επιβεβαιώθηκαν οι θετικοί κλώνοι, δηλαδή δημιουργήθηκαν γενετικά τροποποιημένα μακροφάγα. Ωστόσο στην περίπτωση των γενετικά τροποποιημένων μακροφάγων παρατηρήθηκε απουσία του τυπικού σχήματος των κυττάρων. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες. Ειδικότερα, είναι πιθανό η διαδικασία γενετικής τροποποίησης να μην ήταν απόλυτα επιτυχής και αυτό να επηρέασε το σχήμα των μακροφάγων. Αυτό ίσως να οφείλεται σε μερική έκφραση του construct ή στην πιθανότητα ύπαρξης λαθών στο construct που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της έκφρασης του eGFP ή τη ρύθμιση της έκφρασής του από τον υποκινητή LRH-1 ή ακόμα στην πιθανότητα ύπαρξης προβλήματος στη μέθοδο μεταφοράς του. Μία άλλη πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι το ένθεμα προκαλεί κυτταροτοξικότητα, επηρεάζοντας τη μορφολογία των κυττάρων. Αυτό μπορεί να συμβαίνει για διάφορους λόγους όπως είναι η υπερέκφραση της eGFP προκαλώντας τοξικότητα και στρες στο κύτταρο. Μια άλλη πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι η απώλεια γενετικής σταθερότητας. Επομένως, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν περαιτέρω μελέτες, όπως γονιδιωματική ή μορφολογική ανάλυση, προκειμένου να προσδιοριστεί η αιτία της απουσίας του τυπικού σχήματος στα γενετικά τροποποιημένα μακροφάγα.

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι το περιφερικό ανοσοποιητικό σύστημα παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της νόσου του Parkinson. Αυτό που διαπιστώθηκε από τη συγκεκριμένη εργασία είναι πως μακροφάγα προερχόμενα από μονοπύρηνια κύτταρα ολικού περιφερικού αίματος ασθενών με νόσο του Parkinson εκφράζουν υψηλά επίπεδα σορτιλίνης, γεγονός που σχετίζεται με υψηλό σχηματισμό αφρωδών κυττάρων *in vitro*. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η σορτιλίνη μπορεί να αποτελεί πιθανό βιοδείκτη για τη νόσο του Parkinson και πιθανό θεραπευτικό στόχο για την αναστολή του σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας που παρατηρείται στους ασθενείς με Parkinson. Είναι απαραίτητο μελλοντικά όμως να αυξηθεί ο αριθμός των δοτών/δειγμάτων προς

μελέτη προκειμένου να βελτιστοποιηθούν τα πειράματα. Επίσης, απαιτείται περαιτέρω έρευνα και πιο συγκεκριμένα πολυδιάστατες προσεγγίσεις που να συνδυάζουν ανοσολογία, νευροβιολογία και βιοπληροφορική προκειμένου να αποδοθούν καρποφόρα αποτελέσματα σχετικά με την περίπλοκη σχέση μεταξύ του ανοσοποιητικού συστήματος, της νόσου του Parkinson και της αθηροσκλήρωσης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Pike, A. F., et al., (2022), Dopamine signaling modulates microglial NLRP3 inflammasome activation: implications for Parkinson's disease, *Journal of Neuroinflammation*
2. Kouli, A., et al., (2018), *Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis*, Brisbane: Stoker TB, Greenland JC
3. Church, F. C., (2021). Treatment Options for Motor and Non-Motor Symptoms of Parkinson's Disease. *Biomolecules* , 11(4): p. 612
4. Reeve, A., et al., (2014). Ageing and Parkinson's disease: Why is advancing age the biggest risk factor? *AgeingResearchReviews* , 14(100): p. 19–30
5. Cerri, S., Mus, L., Blandini, F., (2019), Parkinson's Disease in Women and Men: What's the Difference? *J Parkinsons Dis*, 9(3): p. 501-515
6. Fan J, Watanabe T. Atherosclerosis: Known and unknown. *Pathol Int*. 2022 Mar;72(3):151-160
7. Leyane TS, Jere SW, Houreld NN. Oxidative Stress in Ageing and Chronic Degenerative Pathologies: Molecular Mechanisms Involved in Counteracting Oxidative Stress and Chronic Inflammation. *Int J Mol Sci*. 2022 Jun 30;23(13):7273
8. Wang Q, Xue Q. Bioinformatics analysis of potential common pathogenic mechanism for carotid atherosclerosis and Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci*. 2023 Aug 15;15:1202952
9. Martin-Perez M, Urdiroz-Urricelqui U, Bigas C, Benitah SA. The role of lipids in cancer progression and metastasis. *Cell Metab*. 2022 Nov 1;34(11):1675-1699
10. Feingold KR, Grunfeld C. Introduction to lipids and lipoproteins. South Dartmouth (MA:): Endotext, 2018.
11. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC Jr, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res*. 1984 Dec 1;25(12):1277-94
12. Cox RA, García-Palmieri MR. Cholesterol, Triglycerides, and Associated Lipoproteins. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW, editors. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd ed. Boston: Butterworths; 1990. Chapter 31
13. Vance JE. Cellular itinerary of LDL cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022 Feb 8;119(6):e2122584119
14. Khosravi M, Hosseini-Fard R, Najafi M. Circulating low density lipoprotein (LDL). *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2018 Jul 31;35(2)
15. Borén J, Chapman MJ, Krauss RM, Packard CJ, Bentzon JF, Binder CJ, Daemen MJ, Demer LL, Hegele RA, Nicholls SJ, Nordestgaard BG, Watts GF, Bruckert E, Fazio S, Ference BA, Graham I, Horton JD, Landmesser U, Laufs U, Masana L, Pasterkamp G, Raal FJ, Ray KK, Schunkert H, Taskinen MR, van de Sluis B, Wiklund O, Tokgozoglu L, Catapano AL, Ginsberg HN. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J*. 2020 Jun 21;41(24):2313-2330

16. Rajman I, Eacho PI, Chowienczyk PJ, Ritter JM. LDL particle size: an important drug target? *Br J Clin Pharmacol.* 1999 Aug;48(2):125-33
17. Hevonoja T, Pentikäinen MO, Hyvönen MT, Kovanen PT, Ala-Korpela M. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Nov 15;1488(3):189-210
18. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999 Jan 14;340(2):115-26
19. Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995 May;15(5):551-61
20. Johnson-Tidey RR, McGregor JL, Taylor PR, Poston RN. Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques: coexpression with intercellular adhesion molecule-1. *Am J Pathol.* 1994;144:952-961
21. Gimbrone MA Jr, García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016 Feb 19;118(4):620-36
22. Mineo C. Lipoprotein receptor signalling in atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2020 Jun 1;116(7):1254-1274
23. Jiang H, Zhou Y, Nabavi SM, Sahebkar A, Little PJ, Xu S, Weng J, Ge J. Mechanisms of Oxidized LDL-Mediated Endothelial Dysfunction and Its Consequences for the Development of Atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med.* 2022 Jun 1;9:925923
24. Wang D, Yang Y, Lei Y, Tzvetkov NT, Liu X, Yeung AWK, Xu S, Atanasov AG. Targeting Foam Cell Formation in Atherosclerosis: Therapeutic Potential of Natural Products. *Pharmacol Rev.* 2019 Oct;71(4):596-670
25. Levitan I, Volkov S, Subbaiah PV. Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal.* 2010 Jul 1;13(1):39-75
26. Kita T, Kume N, Ishii K, Horiuchi H, Arai H, Yokode M. Oxidized LDL and expression of monocyte adhesion molecules. *Diabetes Res Clin Pract.* 1999 Sep;45(2-3):123-6
27. Chen JH, Riaz M, Wang SW, Dai JM, Duronio V, Steinbrecher UP. Sphingosine kinase regulates oxidized low density lipoprotein-mediated calcium oscillations and macrophage survival. *J Lipid Res.* 2010 May;51(5):991-8
28. Li D, Mehta JL. Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL-mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells. *Circulation.* 2000 Jun 27;101(25):2889-95
29. Tabas I, García-Cardena G, Owens GK. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J Cell Biol.* 2015 Apr 13;209(1):13-22
30. Newby AC, George SJ, Ismail Y, Johnson JL, Sala-Newby GB, Thomas AC. Vulnerable atherosclerotic plaque metalloproteinases and foam cell phenotypes. *Thromb Haemost.* 2009 Jun;101(6):1006-11

31. Gruber EJ, Aygun AY, Leifer CA. Macrophage uptake of oxidized and acetylated low-density lipoproteins and generation of reactive oxygen species are regulated by linear stiffness of the growth surface. *PLoS One*. 2021 Dec 16;16(12):e0260756
32. Tabas I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25:2255–2264
33. Puylaert P, Zurek M, Rayner KJ, De Meyer GRY, Martinet W. Regulated Necrosis in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2022 Nov;42(11):1283-1306
34. Fok PW. Growth of necrotic cores in atherosclerotic plaque. *Math Med Biol*. 2012 Dec;29(4):301-27
35. Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med*. 2014 Dec;276(6):618-32
36. Owens AP 3rd, Mackman N. Role of tissue factor in atherothrombosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2012 Oct;14(5):394-401
37. Grootaert MOJ, Bennett MR. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis: time for a re-assessment. *Cardiovasc Res*. 2021 Sep 28;117(11):2326-2339
38. Barallobre-Barreiro J, Loeys B, Mayr M, Rienks M, Verstraeten A, Kovacic JC. Extracellular Matrix in Vascular Disease, Part 2/4: JACC Focus Seminar. *J Am Coll Cardiol*. 2020 May 5;75(17):2189-2203
39. Woo SH, Kyung D, Lee SH, Park KS, Kim M, Kim K, Kwon HJ, Won YS, Choi I, Park YJ, Go DM, Oh JS, Yoon WK, Paik SS, Kim JH, Kim YH, Choi JH, Kim DY. TXNIP Suppresses the Osteochondrogenic Switch of Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res*. 2023 Jan 6;132(1):52-71
40. Alexopoulos N, Raggi P. Calcification in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2009 Nov;6(11):681-8
41. Shankman LS, Gomez D, Cherepanova OA, Salmon M, Alencar GF, Haskins RM, Swiatlowska P, Newman AA, Greene ES, Straub AC, Isakson B, Randolph GJ, Owens GK. KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nat Med*. 2015 Jun;21(6):628-37
42. Jacobsen K, Lund MB, Shim J, Gunnarsen S, Füchtbauer EM, Kjolby M, Carramolino L, Bentzon JF. Diverse cellular architecture of atherosclerotic plaque derives from clonal expansion of a few medial SMCs. *JCI Insight*. 2017 Oct 5;2(19):e95890
43. Kojima Y, Weissman IL, Leeper NJ. The Role of Efferocytosis in Atherosclerosis. *Circulation*. 2017 Jan 31;135(5):476-489
44. Austermann J, Roth J, Barczyk-Kahlert K. The Good and the Bad: Monocytes' and Macrophages' Diverse Functions in Inflammation. *Cells*. 2022 Jun 20;11(12):1979
45. Yáñez A, Coetzee SG, Olsson A, Muench DE, Berman BP, Hazelett DJ, Salomonis N, Grimes HL, Goodridge HS. Granulocyte-Monocyte Progenitors and Monocyte-Dendritic Cell Progenitors

- Independently Produce Functionally Distinct Monocytes. *Immunity*. 2017 Nov 21;47(5):890-902.e4
46. Sprangers S, de Vries TJ, Everts V. Monocyte Heterogeneity: Consequences for Monocyte-Derived Immune Cells. *J Immunol Res*. 2016;2016:1475435
 47. Garré JM, Yang G. Contributions of monocytes to nervous system disorders. *J Mol Med (Berl)*. 2018 Sep;96(9):873-883
 48. Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol*. 2014 Oct 17;5:514
 49. Kapellos TS, Bonaguro L, Gemünd I, Reusch N, Saglam A, Hinkley ER, Schultze JL. Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Front Immunol*. 2019 Aug 30;10:2035
 50. Sampath P, Moideen K, Ranganathan UD, Bethunaickan R. Monocyte Subsets: Phenotypes and Function in Tuberculosis Infection. *Front Immunol*. 2018 Jul 30;9:1726
 51. Andoh M, Koyama R. Comparative Review of Microglia and Monocytes in CNS Phagocytosis. *Cells*. 2021 Sep 27;10(10):2555
 52. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008 Dec;8(12):958-69
 53. Fu YL, Harrison RE. Microbial Phagocytic Receptors and Their Potential Involvement in Cytokine Induction in Macrophages. *Front Immunol*. 2021 Apr 29;12:662063
 54. Sica A, Erreni M, Allavena P, Porta C. Macrophage polarization in pathology. *Cell Mol Life Sci*. 2015 Nov;72(21):4111-26
 55. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaceli SA, Mardani F, Seifi B, Mohammadi A, Afshari JT, Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*. 2018 Sep;233(9):6425-6440
 56. Poznyak AV, Nikiforov NG, Starodubova AV, Popkova TV, Orekhov AN. Macrophages and Foam Cells: Brief Overview of Their Role, Linkage, and Targeting Potential in Atherosclerosis. *Biomedicines*. 2021 Sep 14;9(9):1221
 57. Wang N, Liang H, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front Immunol*. 2014 Nov 28;5:614
 58. Pérez S, Rius-Pérez S. Macrophage Polarization and Reprogramming in Acute Inflammation: A Redox Perspective. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Jul 19;11(7):1394
 59. Han HI, Skvarca LB, Espiritu EB, Davidson AJ, Hukriede NA. The role of macrophages during acute kidney injury: destruction and repair. *Pediatr Nephrol*. 2019 Apr;34(4):561-569
 60. Wu J, He S, Song Z, Chen S, Lin X, Sun H, Zhou P, Peng Q, Du S, Zheng S, Liu X. Macrophage polarization states in atherosclerosis. *Front Immunol*. 2023 May 3;14:1185587

61. Khallou-Laschet J, Varthaman A, Fornasa G, Compain C, Gaston AT, Clement M, Dussiot M, Levillain O, Graff-Dubois S, Nicoletti A, Caligiuri G. Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PLoS One*. 2010 Jan 25;5(1):e8852
62. Farahi L, Sinha SK, Lusis AJ. Roles of Macrophages in Atherogenesis. *Front Pharmacol*. 2021 Nov 26;12:785220
63. Seifert R, Kuhlmann MT, Eligehausen S, Kiefer F, Hermann S, Schäfers M. Molecular imaging of MMP activity discriminates unstable from stable plaque phenotypes in shear-stress induced murine atherosclerosis. *PLoS One*. 2018 Oct 10;13(10):e0204305
64. Stöger JL, Gijbels MJ, van der Velden S, Manca M, van der Loos CM, Biessen EA, Daemen MJ, Lutgens E, de Winther MP. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2012 Dec;225(2):461-8
65. Hou P, Fang J, Liu Z, Shi Y, Agostini M, Bernassola F, Bove P, Candi E, Rovella V, Sica G, Sun Q, Wang Y, Scimeca M, Federici M, Mauriello A, Melino G. Macrophage polarization and metabolism in atherosclerosis. *Cell Death Dis*. 2023 Oct 20;14(10):691
66. Mullin, S., Day, J. O., (2021). The Genetics of Parkinson's Disease and Implications for Clinical Practice. *Genes*, 12(7): p. 1006
67. Mitok, K. A., et.al., (2022), Sorting through the extensive and confusing roles of sortilin in metabolic disease, *journal of lipid research*, 63(8): p. 100243
68. Hermey, G., The Vps10p-domain receptor family. *Cell Mol Life Sci*, 2009. 66(16): p. 2677- 89.
69. Wang, Y., et al., (2022), Evaluation of the relationship between SORL1 gene polymorphism and Parkinson's disease in the Chinese population. *NeurosciLett*, 778: p. 136602
70. Szegő, É. M., et.al., (2013), Impairment of the septal cholinergic neurons in MPTP-treated A30P α -synuclein mice, *Neurobiology of Aging*, 34(2): p. 589-601
71. Petersen, C.M., et al., (1997), Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *J Biol Chem.*, 272(6): p. 3599-605.
72. Talbot. H., et.al., (2019), Regulatory Roles of Sortilin and SorLA in Immune-Related Processes, *Front Pharmacol*. P. 1507
73. Saadipour, K., et.al., (2013), Amyloid beta1–42 (A β 42) up-regulates the expression of sortilin via the p75NTR/RhoA signaling pathway, *Journal of Neurochemistry*, 127(2): p. 152-162
74. Oh T.J., et.al., (2017), Circulating sortilin level as a potential biomarker for coronary atherosclerosis and diabetes mellitus. *CardiovascDiabetol*. 16(1): p. 92
75. Goettsch, C., Kjolby, M., Aikawa E., (2018), Sortilin and its Multiple Roles in Cardiovascular and Metabolic Diseases, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 38(1): p. 19–25
76. Reuter E, Weber J, Paterka M, Ploen R, Breiderhoff T, van Horssen J, Willnow TE, Siffrin V, Zipp F. Role of Sortilin in Models of Autoimmune Neuroinflammation. *J Immunol*. 2015 Dec 15;195(12):5762-9

77. Patel KM, Strong A, Tohyama J, Jin X, Morales CR, Billheimer J, Millar J, Kruth H, Rader DJ. Macrophage sortilin promotes LDL uptake, foam cell formation, and atherosclerosis. *Circ Res*. 2015 Feb 27;116(5):789-96
78. Zhong LY, Cayabyab FS, Tang CK, Zheng XL, Peng TH, Lv YC. Sortilin: A novel regulator in lipid metabolism and atherogenesis. *Clin Chim Acta*. 2016 Sep 1;460:11-7
79. Namitokov A. Sortilin and its potential role in cardiovascular pathology. *Egypt Heart J*. 2024 Jun 24;76(1):78
80. Sparks RP, Arango AS, Jenkins JL, Guida WC, Tajkhorshid E, Sparks CE, Sparks JD, Fratti RA. An Allosteric Binding Site on Sortilin Regulates the Trafficking of VLDL, PCSK9, and LDLR in Hepatocytes. *Biochemistry*. 2020 Nov 17;59(45):4321-4335
81. Ahmed A, Schmidt C, Brunner T. Extra-Adrenal Glucocorticoid Synthesis in the Intestinal Mucosa: Between Immune Homeostasis and Immune Escape. *Front Immunol*. 2019 Jun 25;10:1438
82. Lefevre, L., et al., LRH-1 mediates anti-inflammatory and antifungal phenotype of IL-13-activated macrophages through the PPARgamma ligand synthesis. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 6801.
83. Ghosh, S., et al., LRH-1 agonist DLPC through STAT6 promotes macrophage polarization and prevents parenteral nutrition-associated cholestasis in mice. *Hepatology*, 2024. **79**(5): p. 986-1004.
84. Cobo-Vuilleumier, N., et al., LRH-1 agonism favours an immune-islet dialogue which protects against diabetes mellitus. *Nat Commun*, 2018. **9**(1): p. 1488.
85. Wu X, Zhang Y, Xu Y. Discovery of the First Low Nanomolar Liver Receptor Homolog-1 (LRH-1) Agonist. *J Med Chem*. 2019 Dec 26;62(24):11019-11021
86. Stein S, Oosterveer MH, Matakis C, Xu P, Lemos V, Havinga R, Dittner C, Ryu D, Menzies KJ, Wang X, Perino A, Houten SM, Melchior F, Schoonjans K. SUMOylation-dependent LRH-1/PROX1 interaction promotes atherosclerosis by decreasing hepatic reverse cholesterol transport. *Cell Metab*. 2014 Oct 7;20(4):603-13
87. Lee JM, Lee YK, Mamrosh JL, Busby SA, Griffin PR, Pathak MC, Ortlund EA, Moore DD. A nuclear-receptor-dependent phosphatidylcholine pathway with antidiabetic effects. *Nature*. 2011 May 25;474(7352):506-10
88. Zhang T, Zhao M, Lu D, Wang S, Yu F, Guo L, Wen S, Wu B. REV-ERB α Regulates CYP7A1 Through Repression of Liver Receptor Homolog-1. *Drug Metab Dispos*. 2018 Mar;46(3):248-258
89. Wagner M, Choi S, Panzitt K, Mamrosh JL, Lee JM, Zaufel A, Xiao R, Wootton-Kee R, Ståhlman M, Newgard CB, Borén J, Moore DD. Liver receptor homolog-1 is a critical determinant of methyl-pool metabolism. *Hepatology*. 2016 Jan;63(1):95-106

90. Stein S, Lemos V, Xu P, Demagny H, Wang X, Ryu D, Jimenez V, Bosch F, Lüscher TF, Oosterveer MH, Schoonjans K. Impaired SUMOylation of nuclear receptor LRH-1 promotes nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest.* 2017 Feb 1;127(2):583-592
91. Mays SG, Okafor CD, Tuntland ML, Whitby RJ, Dharmarajan V, Stec J, Griffin PR, Ortlund EA. Structure and Dynamics of the Liver Receptor Homolog 1-PGC1 α Complex. *Mol Pharmacol.* 2017 Jul;92(1):1-11
92. Talamillo A, Herboso L, Pirone L, Pérez C, González M, Sánchez J, Mayor U, Lopitz-Otsoa F, Rodriguez MS, Sutherland JD, Barrio R. Scavenger receptors mediate the role of SUMO and Ftz-fl in *Drosophila* steroidogenesis. *PLoS Genet.* 2013 Apr;9(4):e1003473
93. Lehr HA, Krombach F, Münzing S, Bodlaj R, Glaubitt SI, Seiffge D, Hübner C, von Andrian UH, Messmer K. In vitro effects of oxidized low density lipoprotein on CD11b/CD18 and L-selectin presentation on neutrophils and monocytes with relevance for the in vivo situation. *Am J Pathol.* 1995 Jan;146(1):218-27
94. Georgoula M, Ntavaroukas P, Androutsopoulou A, Xiomerisiou G, Kalala F, Speletas M, Asprodini E, Vasilaki A, Papoutsopoulou S. Sortilin Expression Levels and Peripheral Immunity: A Potential Biomarker for Segregation between Parkinson's Disease Patients and Healthy Controls. *Int J Mol Sci.* 2024 Feb 1;25(3):1791. doi: 10.3390/ijms25031791. PMID: 38339069; PMCID: PMC10855941.
95. Mitok, K.A.; Keller, M.P.; Attie, A.D. Sorting through the extensive and confusing roles of sortilin in metabolic disease. *J. Lipid Res.* 2022, 63, 100243
96. Zhang, Q.; Lin, W.; Tian, L.; Di, B.; Yu, J.; Niu, X.; Liu, J. Oxidized low-density lipoprotein activates extracellular signal-regulated kinase signaling to downregulate sortilin expression in liver sinusoidal endothelial cells. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2021, 36, 2610–2618.
97. Xiang, P.; Blanchard, V.; Francis, G.A. Smooth Muscle Cell-Macrophage Interactions Leading to Foam Cell Formation in Atherosclerosis: Location, Location, Location. *Front. Physiol.* 2022, 13, 921597
98. Carlo AS, Nykjaer A, Willnow TE. Sorting receptor sortilin-a culprit in cardiovascular and neurological diseases. *J Mol Med (Berl).* 2014 Sep;92(9):905-11
99. Han KH, Chen Y, Chang MK, Han YC, Park JH, Green SR, Boullier A, Quehenberger O. LDL activates signaling pathways leading to an increase in cytosolic free calcium and stimulation of CD11b expression in monocytes. *J Lipid Res.* 2003 Jul;44(7):1332-40
100. Zaguri R, Verbovetski I, Atallah M, Trahtemberg U, Krispin A, Nahari E, Leitersdorf E, Mevorach D. 'Danger' effect of low-density lipoprotein (LDL) and oxidized LDL on human immature dendritic cells. *Clin Exp Immunol.* 2007 Sep;149(3):543-52
101. Frostegård J, Zhang Y, Sun J, Yan K, Liu A. Oxidized Low-Density Lipoprotein (OxLDL)-Treated Dendritic Cells Promote Activation of T Cells in Human Atherosclerotic Plaque and Blood,

Which Is Repressed by Statins: microRNA let-7c Is Integral to the Effect. *J Am Heart Assoc.* 2016 Sep 20;5(9):e003976

102. Maaninka K, Neuvonen M, Kerkelä E, Hyvärinen K, Palviainen M, Kamali-Moghaddam M, Federico A, Greco D, Laitinen S, Öörni K, Siljander PR. OxLDL sensitizes platelets for increased formation of extracellular vesicles capable of finetuning macrophage gene expression. *Eur J Cell Biol.* 2023 Jun;102(2):151311
103. Chardin P, McCormick F. Brefeldin A: the advantage of being uncompetitive. *Cell.* 1999 Apr 16;97(2):153-5.
104. Bekkering S, Quintin J, Joosten LA, van der Meer JW, Netea MG, Riksen NP., (2014), Oxidized low-density lipoprotein induces long-term proinflammatory cytokine production and foam cell formation via epigenetic reprogramming of monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 34(8): p. 1731-8
105. van Tits LJ, Stienstra R, van Lent PL, Netea MG, Joosten LA, Stalenhoef AF. Oxidized LDL enhances pro-inflammatory responses of alternatively activated M2 macrophages: a crucial role for Krüppel-like factor 2. *Atherosclerosis.* 2011 Feb;214(2):345-9
106. Hsu HY, Chiu SL, Wen MH, Chen KY, Hua KF. Ligands of macrophage scavenger receptor induce cytokine expression via differential modulation of protein kinase signaling pathways. *J Biol Chem.* 2001 Aug 3;276(31):28719-30
107. Wang YC, Hu YW, Sha YH, Gao JJ, Ma X, Li SF, Zhao JY, Qiu YR, Lu JB, Huang C, Zhao JJ, Zheng L, Wang Q. Ox-LDL Upregulates IL-6 Expression by Enhancing NF- κ B in an IGF2-Dependent Manner in THP-1 Macrophages. *Inflammation.* 2015 Dec;38(6):2116-23
108. Zhong Y, Liu C, Feng J, Li JF, Fan ZC. Curcumin affects ox-LDL-induced IL-6, TNF- α , MCP-1 secretion and cholesterol efflux in THP-1 cells by suppressing the TLR4/NF- κ B/miR33a signaling pathway. *Exp Ther Med.* 2020 Sep;20(3):1856-1870
109. Krayem I, Bazzi S, Karam M. The combination of CRP isoforms with oxLDL decreases TNF- α and IL-6 release by U937-derived macrophages. *Biomed Rep.* 2017 Sep;7(3):272-276.