



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**"Φαινοτυπικός προσδιορισμός της έκφρασης της πρωτεΐνης
αναστολέα των Β και Τ λεμφοκυττάρων (ΒΤΛΑ) σε λεμφοκυτταρικούς
πληθυσμούς ασθενών με νόσο Parkinson"**

Παπαβασιλείου Ευμορφία-Μαρία

Βιολόγος

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- Δαρδιώτης Ευθύμιος, (Επιβλέπων Καθηγητής) Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας
- Μπόγδανος Δημήτριος, Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων
- Σπελέτας Ματθαίος, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Νευρολογική Κλινική

Λάρισα, Οκτώβριος 2020



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

"Phenotypic determination of the B and T lymphocyte attenuator protein (BTLA) expression in lymphocyte populations from patients with Parkinson's disease"

By

Papavasileiou Evmorfia-Maria

Biologist

Three-member committee:

- Dardiotis Efthimios, Associate Professor of Neurology, supervisor
- Bogdanos Dimitrios, Professor of Pathology and Autoimmune Diseases
- Speletas Matthaios, Professor of Medical Immunology

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 Molecular Medicine in the Department of Neurology

Larissa, October 2020

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	8
1.Νόσος του Parkinson.....	11
1.1 Γενικά.....	11
1.2 Κλινική εικόνα.....	12
1.3 Επιδημιολογία της νόσου.....	17
1.4 Παράγοντες κινδύνου.....	19
1.4.1 Γενετικοί παράγοντες.....	19
1.4.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες.....	22
1.5 Παθοφυσιολογία.....	24
1.6 Θεραπευτικές προσεγγίσεις.....	27
1.7 Διαγνωστικά κριτήρια.....	30
2. Parkinson και αυτοανοσία.....	34
3. BTLA.....	37
3.1 Ρύθμιση των λεμφοκυττάρων.....	37
3.2 Δράση του BTLA.....	38
ΣΚΟΠΟΣ.....	42
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	44
1. Απομόνωση PBMCs.....	44
2. Απόψυξη των κρυοσυντηρημένων κυττάρων.....	48
3. Σήμανση με ειδικά αντισώματα.....	49
4. Κυτταρομετρία Ροής.....	50
5.Στατιστική ανάλυση.....	53
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	55
1. Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση.....	55
2. Προσδιορισμός του επιφανειακού BTLA σε κάθε υποπληθυσμό.....	60
3.Στατιστική ανάλυση.....	67

ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	78
Πηγές-Βιβλιογραφία	82

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο της Κλινικής Ρευματολογίας και κλινικής Ανοσολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας σε συνεργασία με την Νευρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος: «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής».

Με το πέρας της μελέτης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Δαρδιώτη Ευθύμιο, Αναπληρωτή Καθηγητή και Διευθυντή της Νευρολογικής Κλινικής για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την υποστήριξη καθώς και για την πολύτιμη καθοδήγησή του.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μπόγδανο Δημήτριο, Καθηγητή και Διευθυντή της Κλινικής Ρευματολογίας και κλινικής Ανοσολογίας για τις πολύτιμες συμβουλές του και την καθοδήγησή του στον σχεδιασμό της έρευνας.

Ακόμη, ευχαριστώ τον κ. Σπελέτα Ματθαίο, Διευθυντή του εν λόγω Μεταπτυχιακού Προγράμματος, που μου έδωσε την ευκαιρία να συμμετάσχω στο πρόγραμμα και να εργαστώ για το ερευνητικό αυτό θέμα.

Οφείλω μεγάλη ευγνωμοσύνη στον κ. Μαυρόπουλο Αθανάσιο, μέλος του Εργαστηρίου της Κλινικής Ρευματολογίας και κλινικής Ανοσολογίας, που με καθοδήγησε στην Κυτταρομετρία Ροής αλλά και για όλη την βοήθειά και την ενθάρρυνσή του.

Φυσικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω καθέναν από τους ασθενείς που δέχθηκαν με χαρά να συμμετάσχουν στην έρευνα, παρέχοντάς το βιολογικό υλικό και πληροφορίες για το ιστορικό τους στους θεράποντες ιατρούς που συνεργάστηκαν μαζί μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια, η φλεγμονή έχει αναδειχθεί ως ένας σημαντικός παράγοντας στην έναρξη και την εξέλιξη της νόσου του Πάρκινσον (PD). Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος των συμμετεχόντων κυτταρικών πληθυσμών και οι εκφραζόμενοι επιφανειακοί υποδοχείς τους δεν έχει διερευνηθεί επαρκώς στην εξέλιξη της φλεγμονής στην PD.

Ο σκοπός της παρούσας ερευνητικής μελέτης ήταν η διενέργεια πλήρους ανοσοφαινοτυπικής ανάλυσης και ταυτοποίησης λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών εντός περιφερικών μονοπύρηνων κύτταρων του αίματος (PBMCs) σε ασθενείς με PD. Ταυτόχρονα συλλέχθηκαν δεδομένα όσον αφορά την έκφραση της ανασταλτικής επιφανειακής πρωτεΐνης BTLA (B and T lymphocyte attenuator) στους ίδιους πληθυσμούς.

Ένα από τα κύρια ευρήματα της μελέτης ήταν η στατιστικά σημαντική έλλειψη των ολικών B (CD19+) λεμφοκυττάρων στους ασθενείς με PD. Συγκεκριμένα, το ποσοστό των B λεμφοκυττάρων στους υγιείς κυμάνθηκε κατά μέσο όρο στο $11,05 \pm 0,89$ % (mean \pm SD), ενώ στους ασθενείς δεν ξεπέρασε το $4,9 \pm 0,36$ % (mean \pm SD). Εντούτοις, η έκφραση της BTLA στον πληθυσμό των B λεμφοκυττάρων παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση στους ασθενείς, φτάνοντας στο $89 \pm 1,98$ % (mean \pm SD), επί του συνόλου των B λεμφοκυττάρων, σε σύγκριση με τους υγιείς που ανήλθε στο $73,7 \pm 4,45$ % (mean \pm SD). Τα συγκεκριμένα ευρήματα ανέδειξαν τον υποπληθυσμό των B λεμφοκυττάρων ως τον κύριο κυτταρικό πληθυσμό, όπου παρατηρήθηκε υψηλή έκφραση του BTLA.

Σε αντίθεση, τα ποσοστά των NK κυττάρων (CD56+CD3-) παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση στους ασθενείς με PD, προσεγγίζοντας το $24,7 \pm 1,9$ % (mean \pm SD), σε σύγκριση με το $15,5 \pm 1,96$ % (mean \pm SD), που παρατηρήθηκε στην ομάδα των υγιών μαρτύρων. Η έκφραση της BTLA στα NK κύτταρα δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική μεταβολή ανάμεσα στους ασθενείς και τους υγιείς.

Επίσης, αύξηση εντοπίστηκε και στα ποσοστά των NKT (CD56+CD3+) κυττάρων των ασθενών που κυμάνθηκε κατά μέσο όρο στο $7,9 \pm 0,59$ % (mean \pm SD), ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στους υγιείς άγγιξε κατά μέσο όρο το $4,9 \pm 0,65$ % (mean \pm SD). Στατιστικά σημαντική αύξηση του BTLA ανιχνεύτηκε επίσης στους ασθενείς. Συγκεκριμένα, μετά τη σήμανση με το αντίσωμα έναντι του επιτόπου CD4, ο CD4+ υποπληθυσμός των NKT κυττάρων παρουσίασε αύξηση της έκφρασης BTLA κοντά στο $57,38 \pm 1,98$ % (mean \pm SD), όπου η αντίστοιχη έκφραση στους υγιείς ήταν κατά 10 μονάδες μικρότερη.

Όσον αφορά τους υποπληθυσμούς των συμβατικών (conventional) T λεμφοκυττάρων, δηλαδή τα βοηθητικά (CD3+CD56-CD4+) και τα κυτταροτοξικά (CD3+CD56-CD4-) κύτταρα δεν παρατηρήθηκαν στατικά σημαντικές μεταβολές τόσο στα ποσοστά μεταξύ υγιών και ασθενών, όσο και στα επίπεδα έκφρασης της BTLA ανάμεσα σε αυτούς.

Επίσης, διενεργήθηκε ανάλυση και προσδιορισμός συσχέτισης μεταξύ της σοβαρότητας νόσου βάσει της κλίμακας Hoehn-Yahr και της έκφρασης της BTLA στους επιμέρους πληθυσμούς, κατά την οποία δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση.

ABSTRACT

In recent years, inflammation has emerged as an important factor in the onset and progression of Parkinson's disease (PD). However, the exact role of participating cell populations and their expressed surface receptors in the development of inflammation in PD has not been adequately investigated.

The aim of the present study was to perform a complete immunophenotypic analysis and identification of lymphocyte subpopulations within peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in patients with PD. At the same time, data were collected on the expression of the inhibitory surface protein BTLA (B and T lymphocyte attenuator) in the same populations.

One of the main findings of the study was the statistically significant deficiency of total B (CD19+) lymphocytes in patients with PD. Specifically, the percentage of B lymphocytes in healthy subjects averaged $11.05 \pm 0.89\%$ (mean \pm SD), while in patients it did not exceed $4.9 \pm 0.36\%$ (mean \pm SD). However, the expression of BTLA in the B lymphocyte population showed a statistically significant increase in patients, reaching $89 \pm 1.98\%$ (mean \pm SD), of the total B lymphocytes, compared with the healthy ones which reached $73.7 \pm 4.45\%$ (mean \pm SD).

(mean \pm SD). Our findings highlighted the B lymphocyte subpopulation as the main cell population, where high BTLA expression was observed.

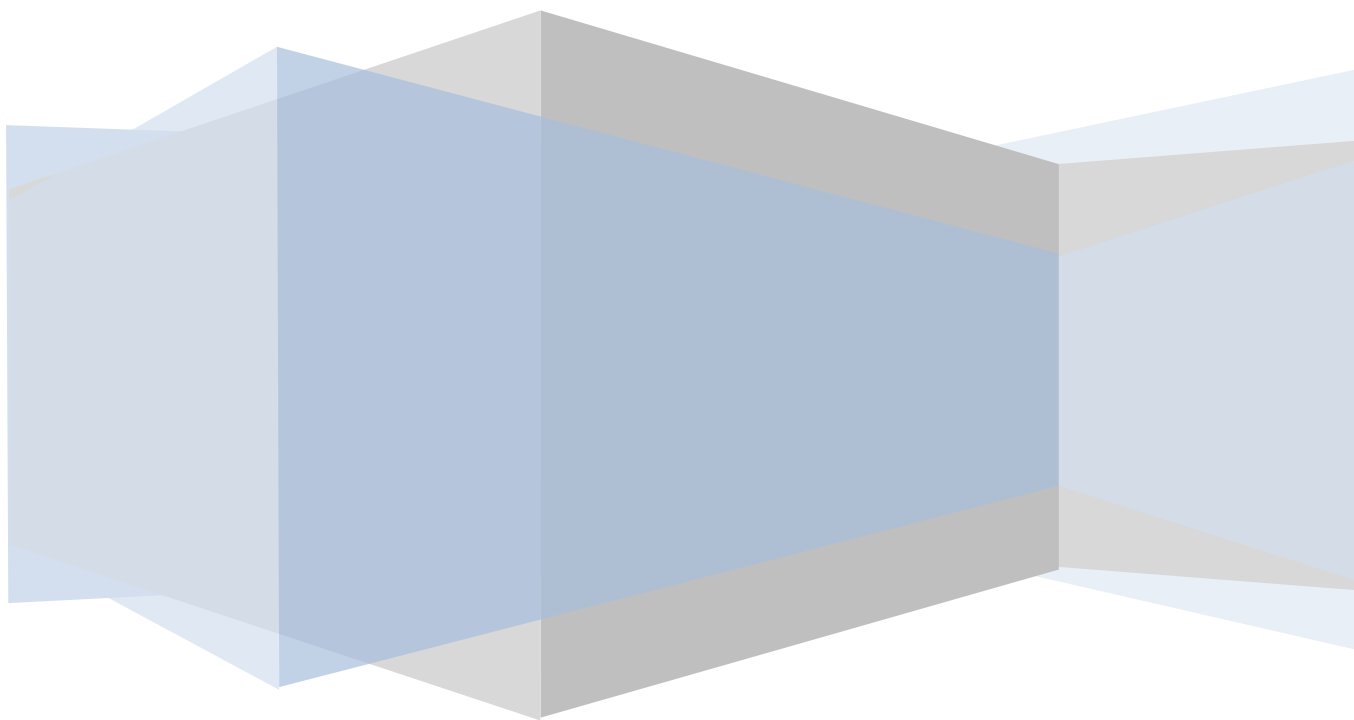
On the contrary, the percentages of NK cells (CD56 + CD3-) showed a statistically significant increase in patients with PD, reaching $24.7 \pm 1.9\%$ (mean \pm SD), compared to $15.5 \pm 1.96\%$ (mean \pm SD), observed in the group of healthy controls. The expression of BTLA in NK cells did not show a statistically significant change between patients and healthy people.

Also, an increase was found in the percentages of NKT (CD56 + CD3+) cells of patients that ranged on average to $7.9 \pm 0.59\%$ (mean \pm SD), while the corresponding percentage in healthy was on average $4.9 \pm 0.65\%$ (mean \pm SD). A statistically significant increase in BTLA was also detected in patients. Specifically, after antibody labeling against the CD4 epitope, the CD4 + NKT cell subpopulation showed an increase in BTLA expression close to $57.38 \pm 1.98\%$ (mean \pm SD), where the corresponding expression in healthy was by 10 units smaller.

Regarding the subpopulations of conventional T lymphocytes, ie helper (CD3 + CD56-CD4+) and cytotoxic (CD3 + CD56-CD4-) cells, no statistically significant changes were observed in the percentages between healthy and patients, as well as in BTLA expression levels among them.

Also, an analysis and determination of the correlation between disease severity based on the Hoehn-Yahr scale and the expression of BTLA in the individual populations was performed, during which no statistically significant differentiation was found.

Γενικό μέρος

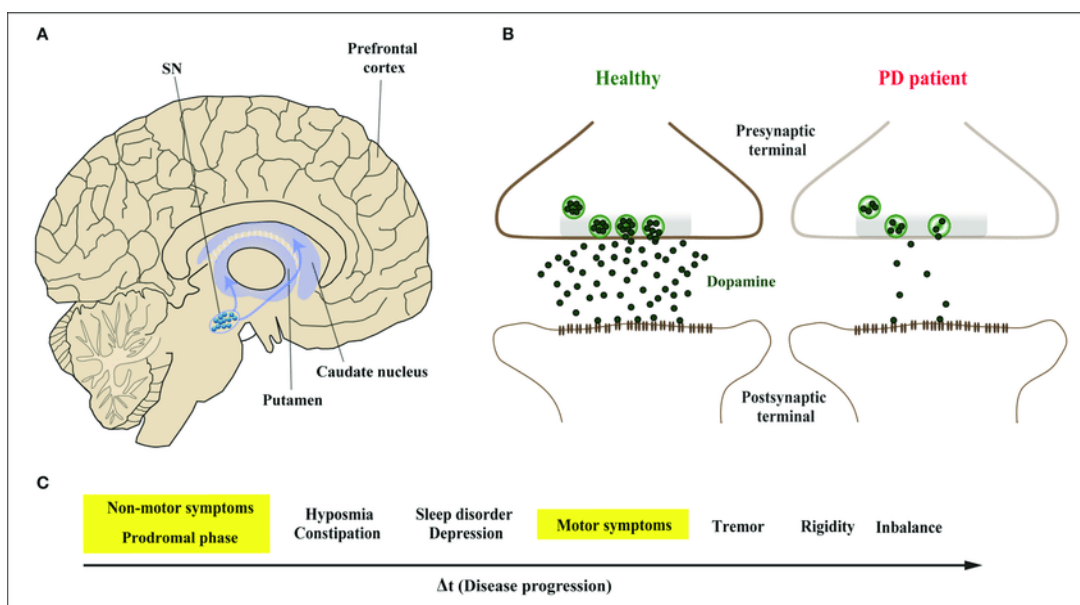


1.Νόσος του Parkinson

1.1 Γενικά

Η νόσος του Πάρκινσον περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1817 από τον ιατρό James Parkinson, από τον οποίο πήρε και το όνομά της. Συχνά αναφέρεται και ως τρομώδης παράλυση [1].

Είναι μια ιδιοπαθής νόσος του νευρικού συστήματος και η δεύτερη πιο συχνή προοδευτική νευροεκφυλιστική διαταραχή μετά τη νόσο Alzheimer. Οδηγεί στην απώλεια ή τον εκφυλισμό ντοπαμινεργικών νευρώνων στη μέλαινα ουσία του μεσεγκεφάλου και την ανάπτυξη νευρωνικών σωμάτων Lewy. Εμφανίζεται κυρίως σε άτομα τρίτης ηλικίας, αλλά μπορεί να παρουσιαστεί σπανίως και σε πολύ νεότερα άτομα ηλικίας κάτω των 40 ετών. Υπάρχουν αρκετές νευροεκφυλιστικές διαταραχές που ομοιάζουν με τη νόσο PD. Αυτές περιλαμβάνουν την άνοια με εμφάνιση σωμάτων Lewy (DLB), τον Κορτικοβασικό εκφυλισμό (CBD), την Ατροφία πολλαπλών συστημάτων (MSA) και την Προϊούσα Υπερπυρηνική Παράλυση (PSP) [2].



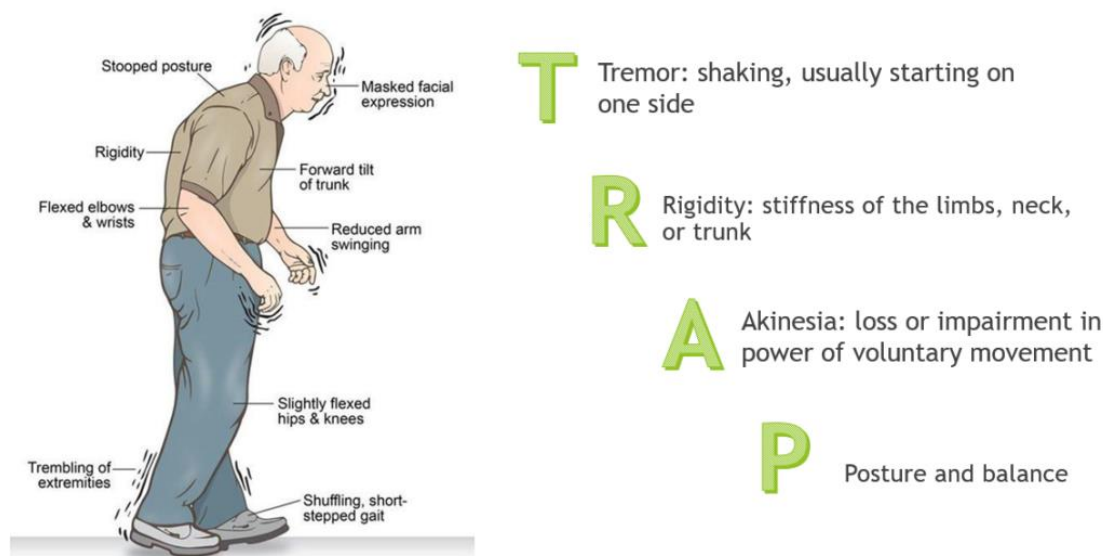
Εικόνα 1: Απεικονίζονται οι περιοχές του εγκεφάλου που πλήττονται από τη νόσο Parkinson, όπου φαίνεται η μειωμένη απελευθέρωση ντοπαμίνης από τους νευρώνες των περιοχών αυτών

(Ανατύπωση από: www.researchgate.net/figure/Midbrain-dopaminergic-neurons-are-specifically-vulnerable-in-Parkinsons-disease-A_fig1_323264412)

1.2 Κλινική εικόνα

Ο τρόμος κατά την ηρεμία, η ακαμψία, η ακινησία (βραδυκινησία) και η αστάθεια στάσης αποτελούν τα τέσσερα πρωτεύοντα χαρακτηριστικά για τη νόσο του Parkinson. Επιπλέον κοινά συμπτώματα θεωρούνται η σκυφτή στάση σώματος και το "πάγωμα" των κινήσεων (freezing). Η εξατομικευμένη αξιολόγηση των συμπτωμάτων κρίνεται απαραίτητη βάσει των αναγκών και των στόχων του κάθε ασθενή.

Ένας αριθμός κλιμάκων αξιολόγησης χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της κινητικής βλάβης και της αναπηρίας των ασθενών με PD, αλλά για τις περισσότερες δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως η εγκυρότητα, καθώς και η αξιοπιστία τους. Η κλίμακα Hoehn και Yahr χρησιμοποιείται ευρέως για την αξιολόγηση της δριμύτητας της νόσου, η οποία μπορεί να εμφανίζεται χωρίς συμπτώματα (στάδιο 0), ενώ στο στάδιο 5 ο ασθενής είναι κλινήρης ή καθηλωμένος σε αναπηρικό αμαξίδιο. [3]. Η καθολική κλίμακα εκτίμησης της νόσου του Parkinson (UPDRS) θεωρείται η πιο καθιερωμένη κλίμακα για την αξιολόγηση της αναπηρίας. Μελέτες που κάνουν χρήση της UPDRS για την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου επισημαίνουν ότι η πορεία της δεν είναι γραμμική, ενώ ο ρυθμός επιδείνωσής της είναι μεταβλητός και ταχύτερος στις αρχές της νόσου και σε ασθενείς με δυσκολία βάδισης και αστάθεια στάσης [4].



Εικόνα 2: TRAP, το ακρωνύμιο των βασικότερων χαρακτηριστικών της νόσου PD-τρόμος, ακαμψία, ακινησία, αστάθεια στάσης (Ανατύπωση από:

<https://parkinsonsnebraska.org/understanding-parkinsons-disease/>)

Βραδυκινήσια

Η βραδυκινήσια αφορά την βραδύτητα της κίνησης και αποτελεί το βασικότερο κλινικό χαρακτηριστικό της PD, αν και μπορεί να εμφανιστεί και σε άλλες διαταραχές, συμπεριλαμβανομένης της κατάθλιψης. Η βραδυκινήσια θεωρείται πρωτεύον γνώρισμα των διαταραχών των βασικών γαγγλίων και περιλαμβάνει δυσκολίες στον σχεδιασμό, την έναρξη και την εκτέλεση κίνησης, διαδοχικών και ταυτόχρονων εργασιών. Η ανάλυση των ηλεκτρομυογραφικών καταγραφών ανέδειξε ότι οι ασθενείς με βραδυκινήσια αδυνατούν να ενεργοποιήσουν τους κατάλληλους μύες που παρέχουν την απαιτούμενη δύναμη για την έναρξη και τη διατήρηση μεγάλων και γρήγορων κινήσεων [5]. Η βραδυκινήσια προκαλείται από μειωμένη ντοπαμινεργική λειτουργία και σχετίζεται με το βαθμό ανεπάρκειας ντοπαμίνης [6]. Το γεγονός αυτό αποδεικνύεται από την ύπαρξη μειωμένης νευρωνικής πυκνότητας στη μέλαινα ουσία σε ασθενείς τρίτης ηλικίας με παρκινσονισμό, ανεξάρτητα από τη διάγνωση PD [7].

Αρχικά συμπτώματα της νόσου αποτελούν συχνά η βραδύτητα στην εκτέλεση δραστηριοτήτων της καθημερινής ζωής και ο αργός χρόνος κίνησης και αντίδρασης [8]. Άλλες εκδηλώσεις περιλαμβάνουν απώλεια αυθόρμητων κινήσεων και χειρονομιών, σιελόρροια λόγω μειωμένης κατάποσης [9], μονοτονικών και υποφωνικών δυσαρθριών, απώλεια έκφρασης του προσώπου (υπομιμία) και μειωμένη ταλάντευση του βραχίονα κατά τη βάδιση. Δεδομένου ότι η βραδυκινήσια αποτελεί ένα από τα πιο κοινά αναγνωρίσιμα συμπτώματα της PD, διακρίνεται πριν από οποιαδήποτε επίσημη νευρολογική εξέταση. Από κοινού με άλλα συμπτώματα παρκινσονισμού, η βραδυκινήσια εξαρτάται από τη συναισθηματική κατάσταση του ασθενούς. Αυτό το φαινόμενο, γνωστό ως *kinesia paradoxica*, συνεπάγεται φυσιολογική ενεργοποίηση του κινητικού φλοιού μέσω εναλλακτικών, μη εξαρτώμενων από ντοπαμίνη εισροών, με επίπτωση την πρόκληση κινήσεων. Επομένως, υποδηλώνει ότι ο κινητικός φλοιός ασθενών με PD μπορεί περιστασιακά να παράγει φυσιολογικά επίπεδα δραστηριότητας έναντι μειωμένης συστηματικής λειτουργίας ντοπαμίνης [10].

Τρόμος

Ο τρόμος κατά την ηρεμία αποτελεί κοινό και εύκολα αναγνωρίσιμο σύμπτωμα της PD. Σχετίζεται με εκφυλισμό μιας υποομάδας νευρώνων του μέσου εγκεφάλου (A8). Οι τρόμοι χαρακτηρίζονται μονομερείς, εμφανίζονται σε συχνότητα μεταξύ 4 και 6 Hz, και σχεδόν πάντα αφορούν το περιφερικό μέρος ενός άκρου. Ωστόσο, μπορεί να πλήττονται τα χέρια, το πηγούνι, η γνάθος και τα πόδια με έναν εσωτερικό- μη ορατό τρόπο. Σε αντίθεση με τον βασικό τρόπο (διαφορική διάγνωση), σπάνια περιλαμβάνουν το λαιμό, το κεφάλι ή τη φωνή και εξαφανίζονται κατά τη διάρκεια του ύπνου [11]. Εκτός από τον τρόπο κατά την ηρεμία, πολλοί ασθενείς με PD

εμφανίζουν ορθοστατικό τρόμο που θεωρείται πιο εμφανής και πολλές φορές αποτελεί την πρώτη εκδήλωση της νόσου. Αναφέρεται ότι το 69% των ασθενών με PD παρουσιάζουν τρόμο κατά την ηρεμία, στην έναρξη της νόσου ενώ το 75% εμφανίζει τρόμο κατά τη διάρκεια της πορεία της νόσου. Στο 9% των ασθενών, ο τρόμος εξαφανίζεται κατά την πορεία της νόσου, ενώ το 11% δεν εμφανίζει ποτέ τρόμο [12].

Ακαμψία

Η ακαμψία αποτελεί μια από τις πιο συχνές αρχικές εκδηλώσεις της PD και χαρακτηρίζεται από αυξημένη αντίσταση της κίνησης ενός άκρου (κάμψη, επέκταση ή περιστροφή για μια άρθρωση), ακαμψία του αυχένα και του κορμού (αξονική ακαμψία), και συχνά κάμψη σε αγκώνες και γόνατα. Ωστόσο, εμφανίζεται γενικά αργά κατά την ασθένεια. Επίσης, παραμορφώσεις άκρων (π.χ. ραβδωτό χέρι) μπορεί να αναπτυχθούν σε ορισμένους ασθενείς. Στο ραβδωτό χέρι παρατηρείται απόκλιση των φαλάγγων προς τα έξω με κάμψη των μετακαρποφαλαγγικών αρθρώσεων. Συχνά εκδηλώνεται έκταση του μεγάλου δακτύλου του ποδός με νυκτερινές κράμπες ιδιαίτερα ενοχλητικές. Άλλες σκελετικές ανωμαλίες περιλαμβάνουν ακραία κάμψη του αυχένα (Πτώση κεφαλής ή λυγισμένη σπονδυλική στήλη), ακραία κάμψη της θωρακικής οσφυϊκής μοίρας και σκολίωση. [13]



Εικόνα 3: Απεικόνιση του ραβδωτού χεριού (www.thelancet.com)

Ορθοστατική αστάθεια

Η στάση του σώματος λόγω απώλειας ορθοστατικών αντανεκλαστικών αποτελεί γενικά ένα γνώρισμα της νόσου στα τελευταία στάδιά της και συνήθως εκδηλώνεται μετά την εμφάνιση άλλων κλινικών χαρακτηριστικών. Η δοκιμή έλξης, κατά την οποία ο ασθενής τραβιέται γρήγορα προς τα πίσω ή προς τα εμπρός από τους ώμους, χρησιμοποιείται για την εκτίμηση του βαθμού ανατροπής ή πρόωσης, αντίστοιχα. Απόρροια της αστάθειας αποτελεί η έναρξη των πτώσεων [14]. Η συχνότητα των πτώσεων συσχετίζεται με τη σοβαρότητα της νόσου. Η μεγάλη καθυστέρηση στην έναρξη των πτώσεων διαφοροποιεί την PD από άλλες νευροεκφυλιστικές διαταραχές, όπως την προοδευτική υπερπυρηνική παράλυση (PSP) και την ατροφία πολλαπλών συστημάτων (MSA) [15].

"Πάγωμα" (freezing)

Η αναστολή κίνησης (πάγωμα) θεωρείται μια μορφή ακινησίας και αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα της PD, αν και δεν συμβαίνει καθολικά [16]. Έχουν περιγραφεί πέντε υπότυποι παγώματος: αρχικός δισταγμός, δισταγμός στροφής, δισταγμός σε στενά σημεία, δισταγμός προορισμού και δισταγμός ανοιχτού χώρου [17]. Εμφανίζεται συχνότερα στους άνδρες παρά στις γυναίκες και λιγότερο συχνά σε ασθενείς με τρόμο [18]. Τα επεισόδια είναι πιο σοβαρά σε περιόδους ύφεσης και μετριάζονται με τη θεραπεία λεβοντόπα. Στην περίπτωση που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια έξαρσης, συνήθως δεν αποκρίνονται στη ντοπαμινεργική θεραπεία [19]. Οι ενέσεις αλλαντικής τοξίνης, αν και θεωρούνται αποτελεσματικές για μια ποικιλία παρκινσονικών συμπτωμάτων, όπως ο τρόμος και η δυστονία, δεν ενδείκνυνται στη θεραπεία του παγώματος [20].

Άλλες κινητικές ανωμαλίες

Οι ασθενείς με PD μπορεί να εμφανίσουν έναν αριθμό δευτερογενών κινητικών συμπτωμάτων που επηρεάζουν την καθημερινότητά τους. Λόγω βλάβης των μηχανισμών αναστολής του μετωπιαίου λοβού, ορισμένοι ασθενείς επανεμφανίζουν πρωτόγονα αντανακλαστικά (π.χ. αντανακλαστικό του μεσόφρυου) [21].

Σε ορισμένες περιπτώσεις, παρατηρούνται ακούσιες κινήσεις που συνοδεύουν την εκούσια δραστηριότητα σε ομόλογους μυς στην αντίθετη πλευρά του σώματος. Οι συγκεκριμένες κινήσεις του καθρέπτη μπορεί να παρατηρηθούν σε αρχικά στάδια PD με ύπαρξη ασυμμετρίας υπέρ της πλευράς έναρξης της νόσου [22].

Επίσης, συχνά παρατηρούνται δυσαρθρία, υποφωνία, δυσφαγία και σιελόρροια. Τα συμπτώματα αυτά υποστηρίζεται ότι σχετίζονται με στοματικολαρυγγική βραδυκίνηση και δυσκαμψία. Διαταραχές ομιλίας σε ασθενείς με PD χαρακτηρίζονται από μονότονο, μαλακό ήχο με μεταβλητό ρυθμό και συχνά δυσκολία στην εύρεση λέξεων [23].

Η δυσφαγία προκαλείται συνήθως από την αδυναμία έναρξης του αντανακλαστικού της κατάποσης ή από παράταση της λαρυγγικής ή οισοφαγικής κίνησης.

Ορισμένες νευροφθαλμολογικές ανωμαλίες εντοπίζονται σε ασθενείς με PD. Αυτές περιλαμβάνουν ερεθισμό της οφθαλμικής επιφάνειας, οπτικές ψευδαισθήσεις, βλεφαρόσπασμο, μειωμένη σύγκλιση [24], περιορισμό της ανοδικής ματιάς και οφθαλμολογικές κρίσεις. Οι αναπνευστικές διαταραχές σε ασθενείς με PD μπορεί να είναι περιοριστικές ή αποφρακτικές [26]. Οι επιπλοκές αυτές σχετίζονται με σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα. Το

αποφρακτικό μοτίβο αφορά ακαμψία και αυχενική αρθροπάθεια ή περιορισμένο εύρος κίνησης στον αυχένα και το περιοριστικό μοτίβο συνδέεται ακαμψία στο στήθος [27].

Μη κινητικά χαρακτηριστικά

Τα μη κινητικά συμπτώματα περιλαμβάνουν δυσλειτουργία του αυτόνομου νευρικού συστήματος, γνωστικές / νευροσυμπεριφορικές διαταραχές, αισθητικές ανωμαλίες και διαταραχές ύπνου.

Δυσλειτουργία του αυτόνομου νευρικού συστήματος

Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν ορθοστατική υπόταση, δυσλειτουργία εφίδρωσης [28], δυσλειτουργία του σφιγκτήρα και στυτική δυσλειτουργία. Συνηθέστερα συσχετίζεται με την ατροφία πολλαπλών συστημάτων [29].

Γνωστικές και νευροσυμπεριφορικές ανωμαλίες

Σύμφωνα με μελέτη που διεξήχθη στο Σίδνεϊ διαπιστώθηκε ότι το 84% των ασθενών που αξιολογήθηκαν, εμφάνιζαν γνωστική παρήκμαση, ενώ το 48% πληρούσε τα διαγνωστικά κριτήρια για την ανάπτυξη άνοιας τα επόμενα 15 χρόνια [30]. Η άνοια που σχετίζεται με την PD συνδέεται επίσης με έναν μεγάλο αριθμό άλλων νευροψυχιατρικών συννοσηροτήτων, όπως κατάθλιψη, απάθεια, άγχος και ψευδαισθήσεις [31]. Εκτός από τις γνωστικές και συναισθηματικές διαταραχές, πολλοί ασθενείς με PD εμφανίζουν χαρακτηριστικά ιδεοψυχαναγκασμού και παρορμητική συμπεριφορά, όπως η έντονη επιθυμία για φαγητό και ιδιαίτερα για γλυκά [32] και η υπερσεξουαλικότητα. Τα συγκεκριμένα συμπτώματα συμπεριφοράς έχουν αποδοθεί στο σύνδρομο διαταραχής των επιπέδων ντοπαμίνης που σχετίζεται με τη χρήση ντοπαμινεργικών φαρμάκων, ιδιαίτερα αγωνιστών ντοπαμίνης [33].

Διαταραχή ύπνου

Διαταραχές του ύπνου (π.χ. υπερβολική υπνηλία, ναρκοληψία) αποτελούν αναπόσπαστο μέρος της νόσου [34]. Αποδίδονται στην απώλεια του 50% νευρώνων που απελευθερώνουν τον νευροδιαβιβαστή-ρυθμιστή της αφύπνισης υποκριτίνη (ορεξίνης). Διαταραχές ύπνου κατά την περίοδο ταχείας κίνησης των οφθαλμών παρατηρείται στο 1/3 των ασθενών με PD και θεωρούνται προ-παρκινσονική κατάσταση, η ύπαρξη της οποίας αποτελεί επιβαρυντικό παράγοντα για την εξέλιξη της νόσου [35]. Χαρακτηριστικό των διαταραχών αυτών είναι η αύξηση του βίαιου περιεχομένου των ονείρων και της κινητική δραστηριότητα. Επίσης, η αϋπνία και ο διαλειμματικός ύπνος αποτελούν συχνά συμπτώματα της νόσου (>50%) [36].

Αισθητικές ανωμαλίες

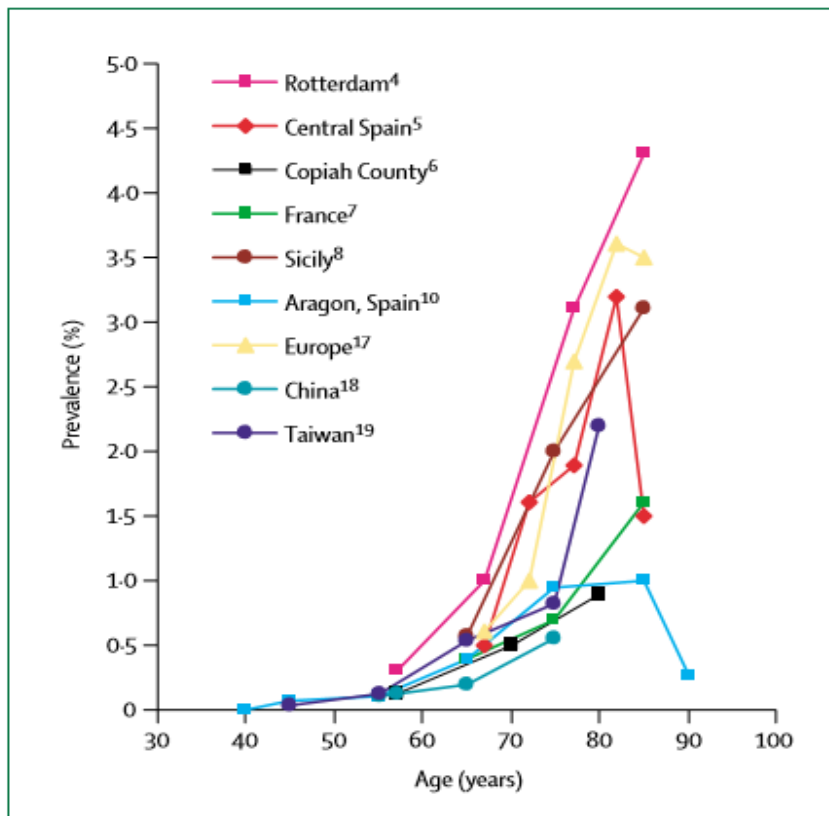
Άλλα συμπτώματα όπως η οσφρητική δυσλειτουργία, ο πόνος, η παραισθησία, η ακαθισία, ο πόνος στο στόμα και στα γεννητικά όργανα είναι συχνά, αλλά δεν αφορούν συμπτώματα της νόσου [37]. Ωστόσο, η οσφρητική δυσλειτουργία (υποσμία) έχει χαρακτηριστεί ως πρώιμος δείκτης PD και συσχετίστηκε με 10% αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της ασθένειας τα επόμενα δύο έτη [38]. Εικάζεται ότι η οσφρητική δυσλειτουργία αφορά νευρωνική απώλεια στην αμυγδαλή ή μειωμένους ντοπαμινεργικούς νευρώνες στον οσφρητικό βολβό [39].

1.3 Επιδημιολογία της νόσου

Αρκετές μελέτες αναφέρουν δεδομένα σχετικά με την επιδημιολογία της PD. Ωστόσο, οι μεταξύ τους μεθοδολογικές διαφορές (διαφορετικά διαγνωστικά κριτήρια και μη εξακριβωμένα περιστατικά) καθιστούν ιδιαίτερα δύσκολη την άμεση σύγκριση των εκτιμήσεων. Είναι γενικά αποδεκτό ότι ο επιπολασμός της νόσου κυμαίνεται από 1 έως 2 ανά 1000 άτομα σε μη επιλεγμένους πληθυσμούς [40] και ότι η ασθένεια επηρεάζει το 1% του πληθυσμού που αφορά ηλικίες άνω των 60 ετών [41].

Η νόσος θεωρείται σπάνια πριν από την ηλικία των 50 ετών, ενώ φθάνει σε επιπολασμό το 4% στις υψηλότερες ηλικιακές ομάδες [42].

Η ταχεία αύξηση του επιπολασμού με την αύξηση της ηλικίας και με κορύφωση στα 80 έτη περίπου σύμφωνα με τις περισσότερες μελέτες, πιθανώς επηρεάζεται από τη λανθασμένη διάγνωση στις μεγαλύτερες ηλικίες, η οποία συγχέεται συχνά με την άνοια [43]. Ο επιπολασμός με βάση την ηλικία, ο οποίος αντανακλά τόσο τη συχνότητα όσο και τη θνησιμότητα της νόσου, καταγράφεται χαμηλότερος στην Αφρική σε σχέση με την Ευρώπη και την Αμερική [44].



Διάγραμμα 1: Συσχέτιση επιπολασμού και ηλικίας σε διάφορους μεμονωμένους πληθυσμούς (Ανατύπωση από: De Lau, Lonneke ML, and Monique MB Breteler. "Epidemiology of Parkinson's disease." *The Lancet Neurology* 5.6 (2006): 525-535.)

Σε χώρες με υψηλό εισόδημα, η νόσος παρουσιάζει συχνότητα ανά έτος 14 ανά 100.000 άτομα στον συνολικό πληθυσμό και 160 ανά 100.000 άτομα ηλικίας 65 ετών και άνω [45]. Η συχνότητα στην Ασία είναι παρόμοια με αυτή στην Ευρώπη και την Αμερική [46].

Τα δεδομένα σχετικά με τη συχνότητα ανά φυλή ή εθνικότητα είναι περιορισμένα και δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερη συνέπεια. Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικά κάποιες μελέτες:

- Σε μια μελέτη στη Νέα Υόρκη, ΗΠΑ, η συχνότητα εντοπίστηκε υψηλότερη στους μαύρους από ότι στους λευκούς [47].
- Σε μια μελέτη στο Ηνωμένο Βασίλειο από το 1999 έως το 2009 καταγράφηκε μια ετήσια μείωση της νόσου του Parkinson κατά 6%, το οποίο θα μπορούσε να αποδοθεί στην εξειδικευμένη διάγνωση διαφορετικών συνδρόμων παρκινσονισμού, αφού η συνολική συχνότητα εμφάνισης του παρκινσονισμού παρέμεινε σταθερή [48].
- Μεταξύ 1990-2000 και 2000-2010 στο Ρότερνταμ, η νόσος του Parkinson και σύνδρομα παρκινσονισμού παρουσίασαν μείωση [49].

- Το 2000 στη Νορβηγία, αναφέρθηκε αύξηση περιστατικών νευροεκφύλισης, όπως η ALS και η PD, γεγονός που θα μπορούσε να αποδοθεί κυρίως στη γενική αύξηση της ηλικίας του πληθυσμού [50].
- Η μελέτη NYPUM στο Umea στη Σουηδία πραγματοποίησε λεπτομερή αξιολόγηση της PD στην ομάδα ατόμων τρίτης ηλικίας. Αυτή η μελέτη ανέδειξε ετήσια συχνότητα 18,8 ανά 100.000 περιπτώσεις και μια μέση ηλικία έναρξης στα 70,6 έτη [51].

Στις περισσότερες μελέτες, ο λόγος συχνότητας ανδρών / γυναικών (M:F) κυμαίνεται από 1,3-2 περίπου, ενώ στην Ασία έχουν καταγραφεί χαμηλότερες τιμές της τάξης του 0,95. Σε μια συγκεντρωτική μελέτη του Taylor και συνεργατών το 2007, καταγράφονται οι λόγοι συχνότητας M:F σε πολλές περιοχές: Σαρδηνία, Ιταλία: 1.38, το Νόρθαμπτον, UK: 1.3, Νέα Υόρκη, USA: 1.73 και Δανία: 1.79. Πτώση του λόγου συχνότητας εντοπίζεται στη Φιλανδία με 0.98 και στη Γιονάγκο, Ιαπωνία με 0.86. Εν αντιθέσει, σε πόλεις της Κίνας, ο λόγος αυτός παρουσιάζει μεγάλη αύξηση της τάξης του 3.7 [52].

1.4 Παράγοντες κινδύνου

Είναι γεγονός ότι για τις περισσότερες περιπτώσεις, η αιτία της PD παραμένει άγνωστη. Η ηλικία αποτελεί τον πιο ισχυρό παράγοντα κινδύνου [53], με μέση ηλικία έναρξης περίπου 50 έως 60 έτη. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, μελέτες έχουν αναδείξει γενετικούς παράγοντες κινδύνου. Πιο συγκεκριμένα, τα μέλη της οικογένειας των ασθενών με συγγένεια πρώτου βαθμού διαθέτουν 2 έως 3 φορές αυξημένο κίνδυνο εμφάνιση της νόσου σε σύγκριση με τον υποκείμενο γενικό πληθυσμό [54].

1.4.1 Γενετικοί παράγοντες

Σε προγενέστερες μελέτες έχουν ήδη αναγνωριστεί μονογονιδιακά αίτια που σχετίζονται με τη νόσο PD, αλλά θεωρήθηκαν πολύ σπάνια. Πλέον, έχουν ταυτοποιηθεί επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις της πλούσιας σε λευκίνη κινάσης (LRRK2, dardarin) που κωδικοποιείται από το γονίδιο PARK8 και κληρονομούνται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο. Ο ρόλος της εντοπίζεται σε ενδοκυτταρικές οδούς σηματοδότησης [55], που σε επιλεγμένους πληθυσμούς ευθύνεται έως και για το 40% των περιπτώσεων της νόσου PD [56].

Το γονίδιο εντοπίζεται σε μια γονιδιωματική περιοχή 144 Kb, περιλαμβάνει 51 εξόνια που κωδικοποιούν 2527 αμινοξέα και εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, αν και σε χαμηλά επίπεδα.

Παρόλο που η κλινική εικόνα ομοιάζει με τυπική νόσο του Parkinson, η σχετιζόμενη παθολογία αποδεικνύεται εξαιρετικά μεταβλητή. Οι παθολογικές αλλαγές περιλαμβάνουν ανωμαλίες που συνάδουν με τη νόσο Lewy body Parkinson, τη διάχυτη νόσο του Lewy, καθώς και την προοδευτική υπερπυρηνική συσσώματωση tau που ομοιάζει με παράλυση. Μελέτες έχουν εντοπίσει αρκετές μεταλλάξεις σε διάφορα κωδικόνια και σε διάφορες πληθυσμιακές ομάδες (π.χ. R1396G, Y1654C, Gly2019Ser). Στις περισσότερες οικογένειες, τόσο τα συμπτώματα όσο και τα κλινικά σημεία συμπίπτουν με τυπική σποραδική νόσο του Parkinson. Αυτό ισχύει και για την ηλικία έναρξης, η οποία κυμαίνεται κατά μέσο όρο μετά τα 50-60 έτη. Όσον αφορά τα γονίδια που σχετίζονται με τη νόσο του Parkinson, το LRRK2 αναδεικνύεται το πιο πιθανό να διαδραματίσει ρόλο στη ρύθμιση της τυπικής σποραδικής νόσου του [57].

Άλλες μεταλλάξεις που προκαλούν υποτροπιάζουσες μορφές Parkinson έχουν εντοπιστεί στα γονίδια που κωδικοποιούν την parkin (PARK2), PINK1 (PARK6) και DJ-1 (PARK7). Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο της parkin θεωρούνται οι πιο συνήθεις μεταξύ των τριών υπολειπόμενων μορφών παρκινσονισμού (>40 μεταλλάξεις) [60]. Έχει παρατηρηθεί μια αδύναμη συσχέτιση μεταξύ του τύπου της μετάλλαξης και της κλινικής εκδήλωσης. Ωστόσο, αρκετές περιπτώσεις δείχνουν ότι οι ασθενείς με σημειακές μεταλλάξεις, οι οποίες πιθανό να οδηγούν μόνο σε μερική απώλεια της λειτουργίας της parkin, τείνουν να επηρεάζονται πιο ήπια από τους ασθενείς με διαγραφές [61]. Επιπλέον, ακόμη και σε ετεροζυγωτία φαίνεται να αυξάνουν την ευαισθησία εμφάνισης της νόσου. Παρόλα αυτά, τα δεδομένα δεν επαρκούν για να διευκρινιστεί επακριβώς ο ρόλος τους [62]. Γενικά, αποτελεί μια πρωτεΐνη με λειτουργία στην ουβικιτίνωση / αποικοδόμηση πρωτεϊνών ως λιγάση ουβικιτίνης [58], στις διαδικασίες ενδοκυτταρικής σηματοδότησης, στο σχηματισμό σωμάτων Lewy και στο οξειδωτικό στρες [59].

Μεταλλάξεις στο γονίδιο της PINK1 (PARK6) έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση της νόσου του Parkinson σε πρόωμη ηλικία και κληρονομούνται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο. Η PINK1 πρωτεΐνη εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες. Ανάλογα με την parkin, το ακριβές αποτέλεσμα της ετεροζυγωτίας των μεταλλάξεων της δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως [63].

Επίσης, παρκινσονισμός πρόωμης έναρξης και με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο κληρονόμησης προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο PARK7 που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη DJ-1 [64]. Η DJ-1 εκφράζεται κυρίως στα αστροκύτταρα και συγκεκριμένα στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και σχετίζεται με τη νευροπροστασία κατά το οξειδωτικό στρες [65].

Επιπρόσθετα, έχουν ταυτοποιηθεί και δύο γονίδια που ακολουθούν τον αυτοσωμικό επικρατή τρόπο κληρονομησης της νόσου.

Είναι γνωστό ότι το πρώτο «γονίδιο της νόσου του Parkinson» που αναγνωρίστηκε ήταν η ασνουκλεΐνη (PARK1) [66]. Μεταλλάξεις ενίσχυσης (τριπλασιασμός) του γονιδίου της ασνουκλεΐνης (SNCA) οδηγούν σε παρκινσονισμό με ή χωρίς άνοια [67]. Ορισμένες μελέτες διαπίστωσαν ότι ένας πολυμορφικός επαναλαμβανόμενος πολυμορφισμός διουκλεοτιδίων (NACPRep1) που εντοπίζεται περίπου 4 Kb πριν το σημείο έναρξης της μεταγραφής του SNCA συσχετίζεται με τη σποραδική νόσο του Parkinson [68,168].

Ένας άλλος αυτοσωμικός επικρατής γονιδιακός τύπος (PARK3) χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 2p13 και ταυτοποιήθηκε σε ένα υποσύνολο οικογενειών με τυπική νόσο Parkinson και παθολογία όμοια με σωματίδια Lewy [69].

Πρόσφατα, επιπλέον γονίδια εμπλέκονται στην παθογένεση της νόσου του Parkinson. Αποτελέσματα μελετών συσχετίζουν έναν πολυμορφισμό στο γονίδιο που κωδικοποιεί το C-τελικό άκρο της λιγάσης της ουβικιτίνης 1 (UCHL1) με την εμφάνιση της νόσου, αλλά αφορούν μικρές ομάδες έρευνας [70].

Επιπλέον, SNPs στο γονίδιο που αφορά τον αυξητικό παράγοντα ινοβλαστών 20 (FGF20), που επιδρά στην επιβίωση των ντοπαμινεργικών κυττάρων, φαίνεται να διαδραματίζουν επιπρόσθετο ρόλο στην εμφάνιση της νόσου του Parkinson [71].

Τέλος, η νόσος του Parkinson έχει περιγραφεί και σε εβραϊκούς πληθυσμούς Ασκενάζι και συμβαίνει σε συνδυασμό με τη νόσο του Gaucher, μια υπολειπόμενη διαταραχή του μεταβολισμού των σφιγγολιπιδίων που προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο της γλυκοκερεβροσιδάσης (GBA) [72].

Θεωρείται γενικά αποδεκτό ότι οι κοινές γενετικές αιτίες μπορεί να σχετίζονται με περισσότερο από το 5% του συνολικού πληθυσμού PD, ενώ τα μονογονιδιακά αίτια είναι σπάνια, αν και ορισμένοι προτείνουν ότι μπορεί να εμπλέκονται στο 5-10% του πληθυσμού PD [73].

Οι μονογονιδιακές μορφές PD διαφέρουν από το σποραδικό PD τόσο παθολογικά όσο και κλινικά. Την εξαίρεση αποτελεί η μετάλλαξη LRRK2 που σε μεγάλο βαθμό προκαλεί σποραδική PD με έναρξη ασύμμετρης κατανομής και συχνό τρόμο. Για το λόγο αυτό, θεωρείται ετερογενής σε σχέση με την εξέλιξη και την εμφάνιση μη κινητικών συμπτωμάτων. Σε αντίθεση, η PD που σχετίζεται με τη μετάλλαξη SNCA χαρακτηρίζεται πιο πρώιμης έναρξης και ταχείας εξέλιξης, εμφανίζει μέτρια ανταπόκριση στη λεβοντόπα. Επίσης, τα πυραμιδικά σημάδια, τα ψυχιατρικά συμπτώματα και η γνωστική εξασθένηση είναι συχνά εμφανή.

Οι υπολειπόμενες μορφές PD αποτελούν συνήθως περιπτώσεις πρώιμης έναρξης με ικανοποιητική ανταπόκριση στη λεβοντόπα και πρώιμη ανάπτυξη δυσκινησιών. Η γνωστική έκπτωση θεωρείται σχετικά ασυνήθιστη [74].

Locus/gene	Inheritance	Age of onset (years)	Pathology	Map position	Protein/gene
<i>PARK1</i>	Dominant	40s	Nigral degeneration with Lewy-bodies	4q21	α -synuclein
<i>PARK2</i>	Recessive	20–40	Nigral degeneration without Lewy-bodies,	6q25	<i>Parkin</i>
<i>PARK3</i>	Dominant	60s	Nigral degeneration with Lewy bodies, plaques and tangles in some	2p13	Unknown
<i>PARK4</i>	Dominant	30s	Nigral degeneration with Lewy bodies, vacuoles in neurons of the hippocampus	4q21	α -synuclein triplication
<i>PARK5</i>	Dominant	Around 50	No pathology reported	4p14	Ubiquitin C-terminal hydrolase L1
<i>PARK6</i>	Recessive	30–40	No pathology reported	1p35-37	<i>PINK1</i>
<i>PARK7</i>	Recessive	30–40	No pathology reported	1p38	<i>DJ-1</i>
<i>PARK8</i>	Dominant	Around 60	Variable α -synuclein and tau pathology	12cen	<i>LRKK2</i>
<i>PARK10</i>	Dominant (possibly)	50–60	No pathology reported	1p32	Unknown
<i>PARK11</i>	Dominant (possibly)	Late	No pathology reported	2q34	Unknown

Εικόνα 4: Συνοπτική παρουσίαση των βασικότερων γονιδίων που εμπλέκονται στην εμφάνιση της νόσου του Parkinson

(Ανατύπωση από: Beilina, Alexandra, and Mark R. Cookson. "Genes associated with Parkinson's disease: regulation of autophagy and beyond." *Journal of neurochemistry* 139 (2016): 91-107.)

1.4.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Έχουν προταθεί πολλοί παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου PD, για τους οποίους όμως τα επιδημιολογικά στοιχεία δεν επαρκούν [76]. Ορισμένα δεδομένα αναδεικνύουν επίσης την επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων, αν και χαρακτηρίζεται λιγότερο σημαντική [75].

Παρακάτω, παρουσιάζονται μερικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες που δημοσιεύθηκαν στην ανασκόπηση του Ascherio και συνεργατών το 2016 [77] και φαίνεται να αυξάνουν τις πιθανότητες εμφάνισης της νόσου.

- Γαλακτοκομικά προϊόντα: ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου είναι αυξημένος σε άτομα με υψηλή κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων και ιδιαίτερα στους άντρες.

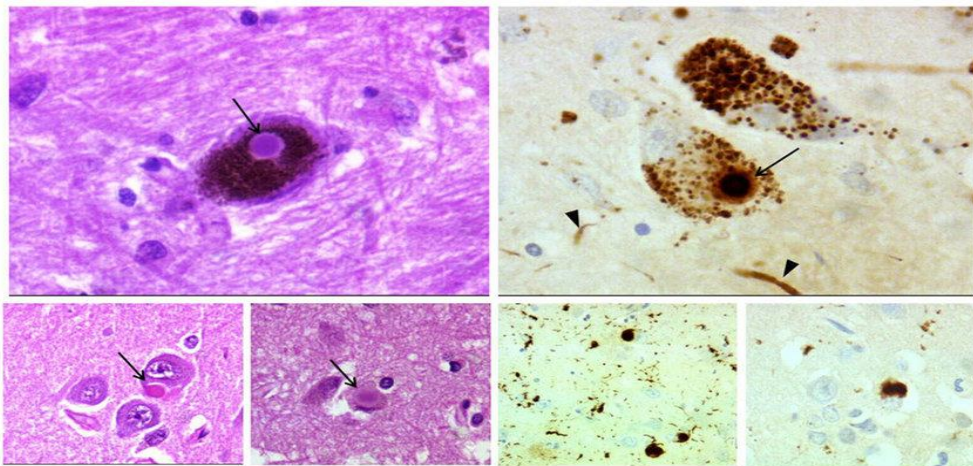
- Παρασιτοκτόνα: ευαισθησία εμφάνισης της νόσου PD μπορεί να προκληθεί από γενετική μεταβλητότητα στα ένζυμα (κυτόχρωμα CYP2D6 και τρανσφεράσες της γλουταθειόνης) που εμπλέκονται στην αποτοξίνωση των νευροτοξινών, όπως τα φυτοφάρμακα και το MPTP. Η δράση του MPTP, ως πρωτότυπη παρκινσονική νευροτοξίνη, βασίζεται στη μετατροπή του σε MPP+, το οποίο μεταφέρεται επιλεκτικά στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες της μέλαινας ουσίας. Το MPP+ αναστέλλει το σύμπλοκο I των μιτοχονδρίων που οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο συνοδευόμενο από οξειδωτική βλάβη [169].
- Μεθαμφεταμίνες: η δέσμευση τους στους προσυναπτικούς μεταφορείς ντοπαμίνης οδηγεί στην αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης ντοπαμίνης και με αποτέλεσμα την επιζήμια επίδραση στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες στη μέλαινα ουσία.
- Καρκίνος: έχει καταγραφεί αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης PD σε άτομα με μελάνωμα.
- Εγκεφαλικές κακώσεις: τραυματισμοί που προκαλούν ρήξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, φλεγμονές, διαταραχές στη μιτοχονδριακή λειτουργία και στη συσσώρευση ασυνουκλεΐνης αυξάνουν τη συχνότητα εμφάνισης της νόσου ιδιαιτέρως κατά την μετατραυματική περίοδο της κάκωσης.
- Δείκτης μάζας σώματος και διαβήτης: μεμονωμένη μελέτη στην Φινλανδία ανέδειξε συσχέτιση του αυξημένου δείκτη μάζας με τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Σε περισσότερες μελέτες, ο διαβήτης τύπου 2 φαίνεται να αυξάνει το κίνδυνο εμφάνισης PD, γεγονός που μπορεί να σχετίζεται με την ανάπτυξη ινσουλινοανοχής.
- Επίπεδα χοληστερόλης και υπέρταση: αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα οδήγησαν σε μείωση του κινδύνου εμφάνισης της νόσου.
- Αλκοόλ: σε μεμονωμένες έρευνες στη Σουηδία παρατηρήθηκε οριακή μείωση κινδύνου εμφάνισης PD σε άτομα που καταλάωναν αλκοόλ.
- Μεταεμμηνόπαυσιακές ορμόνες και αναπαραγωγικοί παράγοντες: η αυξημένη εμφάνιση της νόσου τόσο στους άντρες όσο και στις γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση, καταδεικνύει τον προστατευτικό ρόλο των οιστρογόνων. Ωστόσο, δεν επαρκούν τα περαιτέρω στοιχεία για τη σύνδεση των αναπαραγωγικών παραγόντων με την εμφάνιση της νόσου του Parkinson.
- Βιταμίνες και μικροστοιχεία: Η ανεπάρκεια της βιταμίνης D παρατηρείται συχνά στη νόσο του Parkinson και έχει προταθεί ως αξιόπιστος προγνωστικός δείκτης. Επίσης, είναι γνωστό ότι ο σίδηρος συσσωρεύεται στη μέλαινα ουσία ατόμων με νόσο του Parkinson,

ενώ η υπερφόρτωση σιδήρου δύναται να αποτελέσει σημαντικό μηχανισμό για την παθογένεση της νόσου του Parkinson.

- Λιπαρά και άλλα μακροστοιχεία : αναφέρεται ασθενής με θετική συσχέτιση μεταξύ της πρόσληψης πολυακόρεστων λιπαρών και κινδύνου εμφάνισης της νόσου. Ωστόσο, δεν υπάρχουν επαρκείς ενδείξεις ότι η ολική πρόσληψη λιπαρών ή διαφορετικών λιπαρών οξέων ή άλλων μακροθρεπτικών συστατικών σχετίζεται με τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου του Parkinson.

1.5 Παθοφυσιολογία

Η νόσος του Parkinson συνδέεται με την απώλεια ή τον εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων στην μέλαινα ουσία του εγκεφάλου και την ανάπτυξη των σωματίων Lewy στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες [78]. Οι συγκεκριμένες παθολογικές διαταραχές δύναται να προηγούνται εμφανών συμπτωμάτων δύο δεκαετίες ή και περισσότερο [79].



Εικόνα 5: Σωματία Lewy body in σε νευρώνες της μέλαινας ουσίας (A), σε πυραμιδικό κύτταρο στην CA1 περιοχή του ιπποκάμπου (B), στον φλοιό του προσαγωγίου (C)

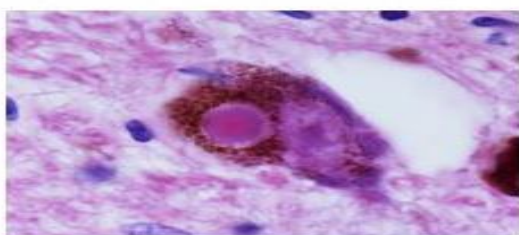
(Ανατύπωση από: www.researchgate.net/figure/Dementia-with-Lewy-bodies-neuropathology-Lewy-body-in-a-neuron-of-the-substantia-nigra_fig6_224899220)

Η απώλεια των συγκεκριμένων νευρώνων που παράγουν ντοπαμίνη οδηγεί σε σημαντική εξασθένηση του ελέγχου κίνησης. Τα σωματία Lewy, ή ανώμαλα ενδοκυτταρικά συσσωματώματα, περιέχουν διάφορες πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένης της α -συνουκλεΐνης και της ουβικιτίνης που διαταράσσουν την βέλτιστη νευρωνική λειτουργία.

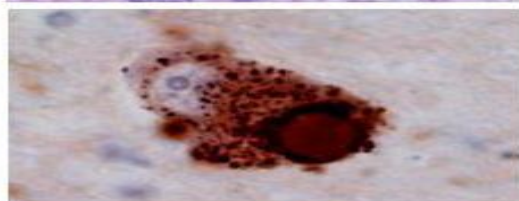
Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι το περιβαλλοντικό στρες και η γήρανση διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη νευροπαθολογία. Συγκεκριμένα, η έκθεση σε περιβαλλοντικές τοξίνες (π.χ. φυτοφάρμακα) [80], η κατάχρηση ναρκωτικών ή το άγχος μπορούν οδηγούν σε χρόνια, ήπια φλεγμονή στον εγκέφαλο, η οποία με το πέρασμα του χρόνου δημιουργεί κυτταρική γήρανση στους νευρώνες του εγκεφάλου [81].

Επιπλέον, φαίνεται ότι η συμπαγής μοίρα της μέλαινας ουσίας του εγκεφάλου και ο υπομέλας τόπος (πυρήνας στη γέφυρα του εγκεφαλικού στελέχους) εμφανίζουν τυπικές ανωμαλίες κατά την PD, που περιλαμβάνουν αποχρωματισμό, νευρωνική απώλεια και γλοιώση. Μέχρι την εκδήλωση των πρώτων συμπτωμάτων, περίπου 60-70% των νευρώνων της μέλαινας ουσίας θα έχουν υποστεί βλάβη [82].

Γενετικές μεταλλάξεις σε πρωτεΐνες του κεντρικού νευρικού συστήματος επιδρούν στο νευρωνικό θάνατο. Συγκεκριμένα, μεταλλάξεις στο γονίδιο της α-συνουκλεΐνης διαταράσσουν τη φυσιολογική έκκρισή της, με αποτέλεσμα να συσσωματώνεται. Αυτή η συσσωματωμένη, αδιάλυτη α-συνουκλεΐνη αποτελεί το κύριο συστατικό των σωμάτων Lewy, κυτταρικά έγκλειστα που είναι χαρακτηριστικά της PD. Επιπλέον, η λειτουργία των συστημάτων που ευθύνονται για την καταστροφή των ανώμαλων πρωτεϊνών, όπως το σύστημα ουβικιτίνης - πρωτεασώματος επίσης εξασθενεί. Άλλες διαδικασίες που οδηγούν σε εμφάνιση PD θεωρούνται οι μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες ή το οξειδωτικό στρες λόγω των αντιδραστικών μορφών οξυγόνου που προκαλούν νευρωνικό εκφυλισμό [83].



Lewy body, substantia nigra



Lewy body alpha-synuclein immunohistochemistry

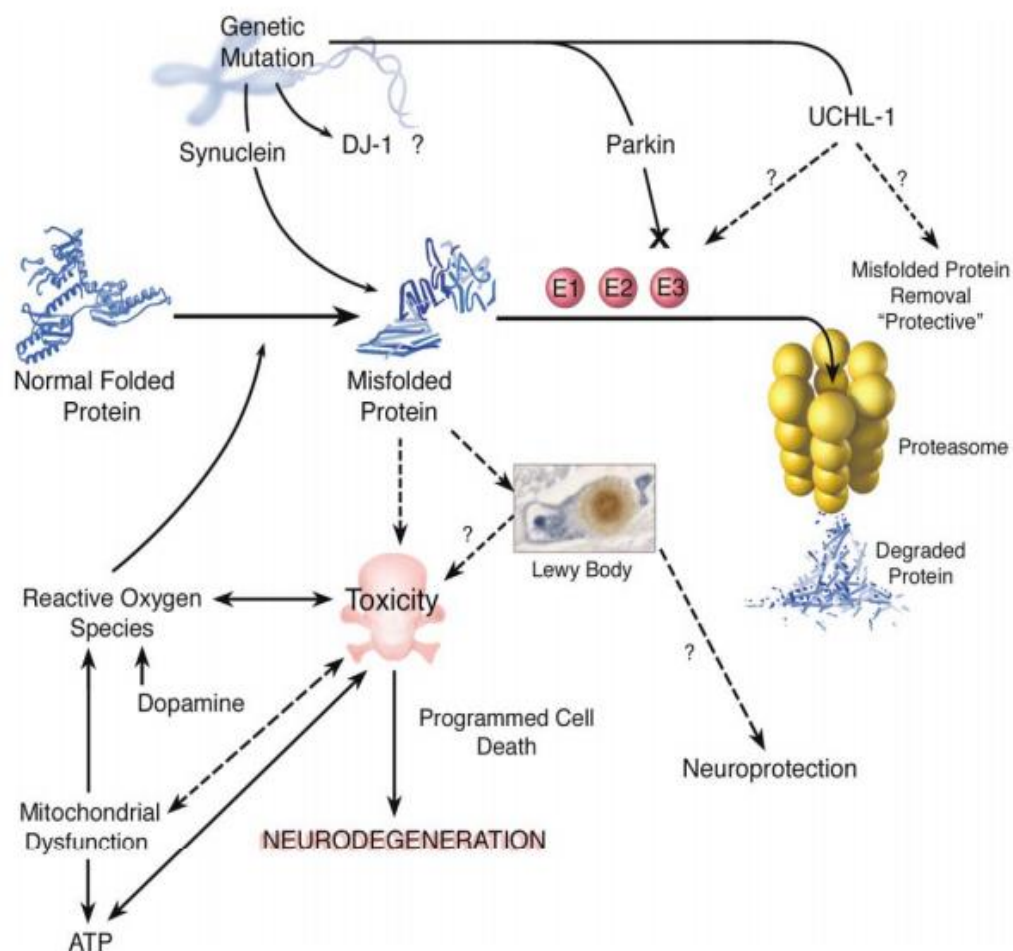
Courtesy of Dr Janice Holton

Εικόνα 6: Σωμάτια Lewy με έγκλειστα α-συνουκλεΐνης σε νευρώνες της μέλαινας ουσίας
(Ανατύπωση από: <http://www.ppu.mrc.ac.uk>)

Σε μια μελέτη του Braak και συνεργατών αναλύεται η υπόθεση του «διπλού χτυπήματος», η οποία χρησιμοποιείται για την επεξήγηση της παθοφυσιολογίας της νόσου PD [84]. Η

συγκεκριμένη άποψη υποστηρίζει ότι ένα άγνωστο, πιθανώς ιικό, παθογόνο εισέρχεται στον εγκέφαλο είτε μέσω της οσφρητικής οδού, μιας και ασθενείς με PD συχνά εκδηλώνουν πρόδρομα οσφρητικά ελλείμματα, ή μέσω της κατάποσης των ρινικών εκκρίσεων, απ' όπου καταλήγει στο έντερο και ακολούθως στα κολπικά νεύρα και στο ΚΝΣ.

Ευρήματα που αποδεικνύουν τη συγκεκριμένη θεωρία αποτελούν η ταυτοποίηση σωματίων Lewy στις εντερικές δομές, τα κολπικό νεύρο και τον εγκέφαλο [85].



Εικόνα 7: Διαγραμματική απεικόνιση των γνωστών παθογενετικών μηχανισμών της νόσου PD. Συνοπτικά, η συσσώρευση λανθασμένων πρωτεϊνών δύναται να αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό του νευροεκφυλισμού της νόσου PD. Οι παθογόνες μεταλλάξεις καταλήγουν άμεσα σε μη φυσιολογικές πρωτεϊνικές διαμορφώσεις, όπως πιστεύεται ότι συμβαίνει με την ασνουκλεΐνη, ή επηρεάζουν την ικανότητα των κυτταρικών μηχανισμών να ανιχνεύουν και να αποικοδομούν τις αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (Parkin, UCH-L1). Ο ρόλος της DJ-1 δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Η οξειδωτική βλάβη, που συνδέεται με τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και τον ανώμαλο μεταβολισμό της ντοπαμίνης, δύναται επίσης να οδηγήσει στις

παραμορφωμένες πρωτεϊνικές διαμορφώσεις. Δεν έχει διαλευκανθεί εάν οι λανθασμένες πρωτεΐνες προκαλούν άμεσα τοξικότητα ή διαταράσσουν την φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων μέσω του σχηματισμού συσσωματωμάτων πρωτεΐνης (σώμα Lewy). Υπάρχει αντιπαράθεση σχετικά με το κατά πόσον τα σώματα Lewy προωθούν την τοξικότητα ή προστατεύουν ένα κύτταρο από επιβλαβείς επιδράσεις των λανθασμένων πρωτεϊνών με δέσμευσή τους σε ένα αδιάλυτο διαμέρισμα μακριά από τα κυτταρικά στοιχεία. Εν τέλει, το οξειδωτικό στρες, η ενεργειακή κρίση (δηλαδή η εξάντληση του ATP) και η ενεργοποίηση των προγραμματισμένων μηχανισμών κυτταρικού θανάτου θεωρούνται παράγοντες που προκαλούν την απόπτωση των ντοπαμινεργικών νευρώνων στη νόσο του Parkinson.

(Ανατύπωση από: Dauer, William, and Serge Przedborski. "Parkinson's disease: mechanisms and models." *Neuron* 39.6 (2003): 889-909.)

1.6 Θεραπευτικές προσεγγίσεις

Έναρξη θεραπείας

Όσον αφορά τη θεραπεία ασθενών με PD, πρώτιστα ενδείκνυται να επιλέγεται ο χρόνος έναρξης της θεραπείας, καθώς και ο θεραπευτικός παράγοντας που θα χρησιμοποιηθεί. Η έναρξη θεραπείας αποτελεί μια εξατομικευμένη προσέγγιση και συνήθως υφίσταται όταν τα συμπτώματα της PD επηρεάζουν σημαντικά την ικανότητα του ασθενούς να πραγματοποιεί καθημερινές δραστηριότητες.

Η τυπική θεραπεία της PD περιλαμβάνει φάρμακα που μειώνουν τα επίπεδα ντοπαμίνης ή μιμούνται τη δράση της στον υποδοχέα της. Από τα πιο αποτελεσματικά φάρμακα θεωρείται η λεβοντόπα σε συνδυασμό με καρβιντόπα, έναν περιφερειακό αναστολέα της διάσπασής της, που επιτυγχάνει τη μείωση των παρενεργειών και τη μεγιστοποίηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας. Εναλλακτικοί θεραπευτικοί συνδυασμοί για την έναρξη χορήγησης λεβοντόπα περιλαμβάνουν η χρήση αγωνιστών ντοπαμίνης, αναστολέων μονοαμινοξειδάσης Β (MAO-B) και σε ορισμένες περιπτώσεις τα αντιχολινεργικά.

Φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία συμπτωμάτων κινητικών παθήσεων του Parkinson

- **Λεβοντόπα**

Η λεβοντόπα σε συνδυασμό με έναν αναστολέα αποκαρβοξυλάσης DOPA (καρβιντόπα) αποτελεί την πιο αποτελεσματική θεραπεία για PD. Η καρβιντόπα δεν διαπερνά εύκολα τον

αιματοεγκεφαλικό φραγμό, επιτρέποντας στη λεβοντόπα να μετατραπεί σε ενεργή ντοπαμίνη στο κεντρικό νευρικό σύστημα.

Κύριο μειονέκτημα της λεβαντόπα θεωρείται η συσχέτισή της με την εμφάνιση δυσκινησίας. Για το λόγο αυτό, η χορήγησή της επακολουθεί άλλων θεραπειών όπως οι αναστολείς MAO-B και αγωνιστές ντοπαμίνης σε πρώιμα στάδια της νόσου, οι οποίες δεν εμφανίζουν όμως την ίδια αποτελεσματικότητα. Με την πρόοδο της νόσου, η δοσολογία αυξάνεται τόσο σε ισχύ όσο και σε συχνότητα. Ωστόσο, η αύξηση των δόσεων οδηγεί συχνά σε άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως ψευδαισθήσεις, παραισθήσεις, κινητικές επιπλοκές και ορθοστατική υπόταση [86].

- **Αγωνιστές ντοπαμίνης**

Οι αγωνιστές ντοπαμίνης μιμούνται την επίδραση της ντοπαμίνης στον υποδοχέα της. Έχουν το πλεονέκτημα της λιγότερο συχνής χορήγησης. Περιλαμβάνουν τηπραμιπεξόλη και τη ροπινιρόλη, τη ροτιγοτίνη (διαδερμικά επιθέματα), την απομορφίνη (οξεία θεραπεία). Η χρήση τους καθυστερεί την ανάγκη για λεβοντόπα, καθώς και την έναρξη της σχετιζόμενης δυσκινησίας. Ωστόσο, δεν προσφέρουν τον ίδιο βαθμό ανακούφισης από τα συμπτώματα όπως η λεβοντόπα [87].

- **Αναστολείς της κατεχολ-Ο-μεθυλοτρανσφεράσης**

Αυτή η κατηγορία φαρμάκων αναστέλλει το μεταβολισμό τόσο της λεβοντόπα όσο και της ντοπαμίνης, παρατείνοντας συνεπώς τη δράση της καθεμιάς. Ωστόσο, με τον τρόπο αυτό αυξάνει την πιθανότητα ανεπιθύμητων ενεργειών που προκαλούνται από λεβοντόπα. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν η εντακαπόνη (ευρεία χρήση σε ΗΠΑ), η τολκαπόνη (ηπατική τοξικότητα) και η οπικαπόνη [89].

- **Αναστολείς της μονοαμινοξειδάσης Β**

Αυτά τα φάρμακα μειώνουν τον μεταβολισμό της ντοπαμίνης και περιλαμβάνουν τη σελεγιλίνη, τη ρασαγιλίνη και τη σαφιναμίδη.

- **Αμανταδίνη**

Η αμανταδίνη διαθέτει ήπια αντι-παρκινσονική δράση, αλλά χρησιμοποιείται συχνότερα για τη μείωση της δυσκινησίας που προκαλείται από τη λεβοντόπα, αν και τόσο η διάρκεια του αποτελέσματος όσο και η κατάλληλη δοσολογία αποτελούν αντικείμενο έρευνας. Οι πιο συχνές παρενέργειες περιλαμβάνουν την ψύχωση, το οίδημα, τη δυσκοιλιότητα και τη δικτυωτή πελίδνωση [90].

- **Τριεξυφαινιδύλιο**

Τα αντιχολινεργικά φάρμακα συμπεριλαμβανομένου του τριεξυφαινιδυλίου, χρησιμοποιούνται συχνότερα για τη θεραπεία του τρόμο που είναι ανθεκτικός στη λεβοντόπα. Επίσης, χορηγούνται σε ασθενείς που επιδεικνύουν ικανότητα να ανέχονται τις παρενέργειες (ξηροστομία, δυσκοιλιότητα, κατακράτηση ούρων, καταστολή, ταχυκαρδία, μειωμένη εφίδρωση, θολή όραση) [91].

Επεμβατικές θεραπείες

- **Εντερικό εναιώρημα καρβιντόπα / λεβοντόπα (Duopa)**

Ασθενείς προχωρημένου σταδίου PD όπου οι κινητικές επιπλοκές, συμπεριλαμβανομένης της ταχείας διακύμανσης κινήσεων και της δυσκινησίας, είναι ανθεκτικές στις συνήθεις θεραπείες που μπορούν να επωφεληθούν από μια συνεχή έγχυση καρβιντόπα και λεβοντόπα με τη μορφή εντερικού εναιωρήματος. Αυτή η θεραπεία περιλαμβάνει χειρουργική εμφύτευση νηστιδοστομίας συνδεδεμένης με αντλία που εγχέει φάρμακα απευθείας στην εγγύς νήστιδα όπου μεγιστοποιείται η απορρόφηση της λεβοντόπα.

Τα οφέλη αυτής της θεραπείας περιλαμβάνουν μια πιο συνεχή χορήγηση φαρμάκου που παρακάμπτει δυνητικά γαστρικά προβλήματα και με δυνατότητα αυτοχορήγησης επιπλέον δόσεων [92].

- **Εν τω βάθει εγκεφαλική διέγερση (DBS)**

Σε περιπτώσεις όπου οι κινητικές ταλαντώσεις χαρακτηρίζονται δύσκαμπτες και ο έλεγχος του τρόμου θεωρείται ανύπαρκτος, η διέγερση των εν τω βάθει δομών του εγκεφάλου προσφέρει σημαντική ανακούφιση. Αυτή η θεραπεία συνιστά την εμφύτευση ηλεκτροδίων στερεοτακτικά στον εγκέφαλο, τα οποία συνδέονται με καλωδιακή επέκταση που διοχετεύεται υποδορίως στην ενδοκοιλιακή περιοχή και καταλήγει σε μία γεννήτρια παλμού (IPG).

Η DBS ελαττώνει αποτελεσματικά τα κινητικά συμπτώματα της νόσου και την δυσκινησία, μειώνει τη φαρμακευτική αγωγή και βελτιώνει την ποιότητα ζωής του πάσχοντος [93].

Πιθανές επιπλοκές της επέμβασης περιλαμβάνουν διαταραχές στην ομιλία, τη γνωστική λειτουργία, τη βάδιση, καθώς και νευροψυχιατρικές διαταραχές. Η εμφύτευση, ανάλογα με τις κινητικές διαταραχές που πρέπει να ελεγχθούν, πραγματοποιείται στην υποθαλάμια χώρα και στην έσω ωχρά σφαίρα. Στην πρώτη στόχευση επιτυγχάνεται καλύτερος έλεγχος του τρόμου, ενώ η δεύτερη συνεπάγεται καλύτερο έλεγχο της δυσκινησίας και πιθανώς λιγότερες παρενέργειες. [94]

Σε ασθενείς με γενικευμένη παρουσία τρόμου, η στόχευση στον μεσοκοιλιακό πυρήνα του θαλάμου παρέχει σημαντική και παρατεταμένη ανακούφιση [95].

1.7 Διαγνωστικά κριτήρια

Η τελική διάγνωση της νόσου του Parkinson απαιτεί νεκροψία σε μεταθανάτιους εγκεφάλους ασθενών. Ωστόσο, η κλινική διάγνωση αυτής της διαταραχής καθορίζεται από αυστηρότατα κριτήρια, με διαβαθμίσεις διαγνωστικής βεβαιότητας, συμπεριλαμβανομένων των κλινικά δυνατών, των κλινικά πιθανών και των κλινικά καθορισμένων περιστατικών. Γενικά, η διαρκής βελτίωση των κινητικών συμπτωμάτων με χορήγηση λεβοντόπα αποτελεί ένα χαρακτηριστικό κλινικά καθορισμένο για την ασθένεια [96].

Διαφορική διάγνωση της νόσου του Parkinson

Η κλινική διάγνωση της νόσου του Parkinson βασίζεται κυρίως στο ιστορικό, στη φυσική εξέταση και στην ανταπόκριση στη ντοπαμινεργική θεραπεία με βελτίωση των συμπτωμάτων. Η διαφορική διάγνωση της νόσου περιλαμβάνει τη φυσιολογική γήρανση, τον βασικό τρόμο, τον παρκινσονισμό που προκαλείται από ναρκωτικά, τα σύνδρομα Parkinson-plus, τον αγγειακό παρκινσονισμό, το υδροκέφαλο κανονικής πίεσης, καθώς και λιγότερο κοινές διαταραχές, όπως η δυστονία που ανταποκρίνεται στη ντοπαμίνη και η νεανική μορφή της νόσου Huntington [97].

Πίνακας 2: Παρουσίαση όλων των παρκινσονικών συνδρόμων με κοινή συμπτωματολογία που χρήζουν διαφορικής διάγνωσης για την ακριβή κλινική διάγνωση της νόσου.

Primary Parkinsonism
Parkinson disease (sporadic, familial)
Secondary Parkinsonism
Drug-induced: dopamine antagonists and depletors
Hemiatrophy-hemiparkinsonism
Hydrocephalus: normal pressure hydrocephalus
Hypoxia
Infectious: postencephalitic
Metabolic: parathyroid dysfunction
Toxin: Mn, CO, MPTP, cyanide
Trauma
Tumor
Vascular: multiinfarct state
Parkinson-plus Syndromes
Cortical-basal ganglionic degeneration
Dementia syndromes: Alzheimer disease, diffuse Lewy body disease, frontotemporal dementia
Lytico-Bodig (Guamanian Parkinsonism-dementia-ALS)
Multiple system atrophy syndromes: striatonigral degeneration, Shy-Drager syndrome, sporadic olivopontocerebellar degeneration (OPCA), motor neuron disease-parkinsonism
Progressive pallidal atrophy
Progressive supranuclear palsy
Familial Neurodegenerative Diseases
Hallervorden-Spatz disease
Huntington disease
Lubag (X-linked dystonia-parkinsonism)
Mitochondrial cytopathies with striatal necrosis
Neuroacanthocytosis
Wilson disease

Φυσιολογική γήρανση

Ο ορισμός της φυσιολογικής γήρανσης δεν έχει διατυπωθεί με σαφήνεια. Η βραδυκινησία, η σκυφτή στάση του σώματος, η δυσκαμψία και η αστάθεια παρατηρούνται συχνά σε άτομα τρίτης ηλικίας. Παθολογικά, η γήρανση σχετίζεται με την απώλεια χρωματισμένων νευρώνων στη μέλαινα ουσία, αλλά το αποχρωματισμένο μοτίβο διαφέρει από το αντίστοιχο στη νόσο του Parkinson. Κινητικά συμπτώματα ασύμμετρης κατανομής και ταχύτερη εξέλιξή τους διαφοροποιεί το Parkinson από την φυσιολογική γήρανση. Μία δοκιμή με χρήση λεβοντόπα μπορεί να συμβάλει στην περαιτέρω διάκριση [98].

Βασικός τρόμος

Ο βασικός τρόμος χαρακτηρίζεται από τρόπο δράσης παρά από τρόπο ανάπαυσης. Τείνει να είναι αμφοτερόπλευρος, συχνά με ασύμμετρη κατανομή, ενώ στο ήμισυ των ασθενών προκύπτει οικογενειακό ιστορικό. Η συχνότητα του βασικού τρόμου καταγράφεται υψηλότερη (8 Hz) σε σχέση με την αντίστοιχη της νόσου του Parkinson, αλλά μειώνεται με την ηλικία. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να εμφανίζεται και ως τρόμος ανάπαυσης, καθιστώντας δύσκολη τη διαφοροποίησή του από τον παρκινσονικό τρόπο. Ο μακροχρόνιος βασικός τρόμος μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη παρκινσονισμού [99].

Παρκινσονισμός που προκαλείται από ναρκωτικά

Ο παρκινσονισμός που προκαλείται από τη χρήση ναρκωτικών εμφανίζεται συνήθως μετά την έκθεση σε νευροληπτικά. Εμφανίζονται συμπτώματα συμμετρικής κατανομής και ο παρκινσονισμός που προκαλείται υποχωρεί όταν διακοπεί η χρήση τους, αν και η διάσπασή τους μπορεί να διαρκέσει εβδομάδες έως μήνες [100].

Προοδευτική υπερπυρηνική παράλυση

Στην προοδευτική υπερπυρηνική παράλυση, καθοριστικό χαρακτηριστικό θεωρείται το βλέμμα υπερπυρηνικής παράλυσης, ο βλεφαρόσπασμος και οι οφθαλμοκινητικές διαταραχές με μετωπική άνοια. Οι ασθενείς εμφανίζουν έναρξη παρκινσονισμού συμμετρικής κατανομής, απουσία τρόμου και μειωμένη ανταπόκριση στη ντοπαμινεργική θεραπεία [101].

Κορτικοβασικός εκφυλισμός

Ο κορτικοβασικός εκφυλισμός εκδηλώνεται με παρκινσονισμό έντονης ασυμμετρίας και ενδείξεις φλοιϊκής εμπλοκής. Επίσης, μπορεί να εμφανίζεται ασύμμετρη δυστονία, απραξία των άκρων, καθώς και το φαινόμενο των εξωγήινων άκρων. Οι ασθενείς ανταποκρίνονται ελάχιστα στα ντοπαμινεργικά φάρμακα [102].

Ατροφία Πολλαπλών Συστημάτων

Εκδηλώνεται με παρκινσονισμό και παρεγκεφαλικές, αυτόνομες (ορθοστατική υπόταση, δυσλειτουργία κύστης, εντέρου και ρύθμισης θερμοκρασίας), πυραμιδικές δυσλειτουργίες σε διάφορους συνδυασμούς.

Τα σημάδια στις πυραμιδικές οδούς και ο αναπνευστικός συριγμός καταγράφεται σε όλες τις κατηγορίες ατροφίας πολλαπλών συστημάτων. Παρατηρείται μειωμένη ανταπόκριση στη ντοπαμινεργική θεραπεία [103].

Άνοια με σωμάτια Lewy

Η άνοια με σωμάτια Lewy χαρακτηρίζεται από προοδευτικό παρκινσονισμό και πρόιμη άνοια. Τα κινητικά και ψυχιατρικά συμπτώματα δεν παρουσιάζουν βελτίωση με τη χορήγηση ντοπαμινεργικής θεραπείας. Η εξασθένηση της γνωστικής λειτουργίας μπορεί να αποκατασταθεί με την χορήγηση αναστολέων χολινεστεράσης [104].

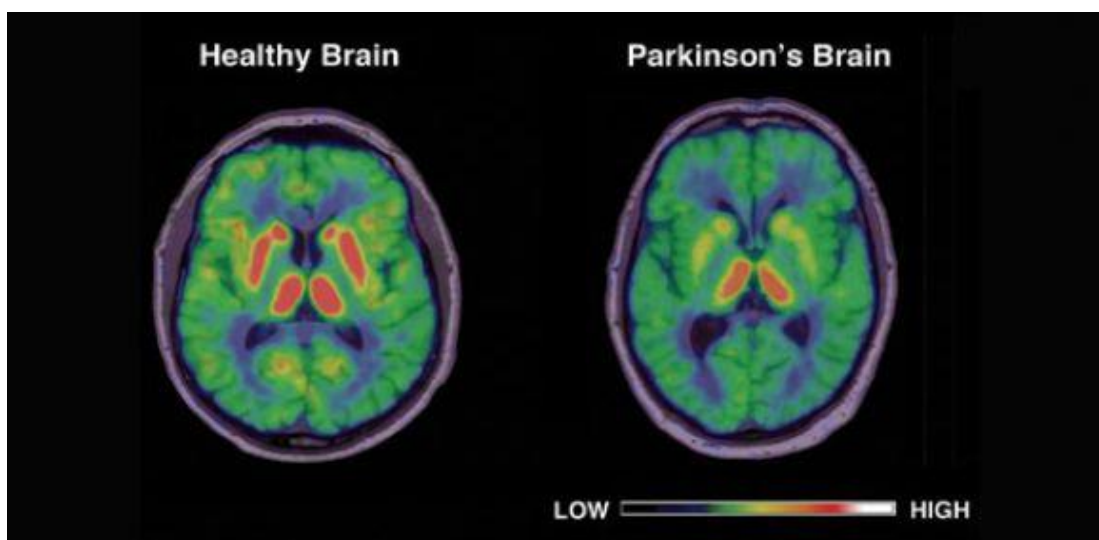
Αγγειακός παρκινσονισμός και υδροκέφαλο με φυσιολογική πίεση

Ο αγγειακός παρκινσονισμός οφείλεται σε πολλαπλή απόφραξη των βασικών γαγγλίων και σε υποφλοιώδεις πυρήνες της λευκής ουσίας [105]. Στην απεικόνιση του εγκεφάλου αναδεικνύεται εκτεταμένη νόσο μικρών αγγείων. Δεν παρατηρείται θεραπευτική απόκριση σε ντοπαμινεργική θεραπεία. Το υδροκέφαλο με κανονική πίεση μπορεί να εμφανίσει μια παρόμοια απεικόνιση [106].

Νευροαπεικόνιση

Η διάγνωση της νόσου του Parkinson επιτυγχάνεται κυρίως κλινικά και σε τυπικές περιπτώσεις η νευροαπεικόνιση και οι εργαστηριακές εξετάσεις δεν κρίνονται αναγκαίες. Ωστόσο, σε περίπτωση που το ιστορικό του ασθενούς ή τα κλινικά ευρήματα είναι άτυπα, η μαγνητική τομογραφία χρησιμεύει για την ανίχνευση άλλων νόσων, όπως ο αγγειακός παρκινσονισμός [107].

Η νόσος του Parkinson χαρακτηρίζεται από μειωμένη πρόσληψη 6- [18F] -fluoro-L-Dopa (F-DOPA) από το ραβδωτό σωματίο, κατά την εφαρμογή τομογραφίας εκπομπής ποζιτρονίων (PET) [108]. Η μείωση αυτή ανιχνεύεται πιο έντονη στο κέλυφος σε σχέση με τον κερκοφόρο πυρήνα. Η νευροαπεικόνιση χρησιμοποιείται κυρίως πειραματικά και αποτελεί τμήμα των θεραπευτικών δοκιμών. Παρόλα αυτά, δεν παρέχει σαφή ευρήματα νευροεκφύλισης, καθώς αλλαγές που τυχόν καταγράφονται πιθανό να οφείλονται σε φάρμακα που χορηγούνται για θεραπεία [109].



Εικόνα 8: PET απεικόνιση όπου ανιχνεύεται η μειωμένη πρόσληψη F-Dopa
(Ανατύπωση από: parkinsonsneurochallenge.org/)

2. Parkinson και αυτοανοσία

Η ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να διακρίνει τα εαυτά κύτταρα θεωρείται ζωτικής σημασίας για την επιβίωση οποιουδήποτε οργανισμού. Εμφανίζεται αυτοανοσία σε περίπτωση που οι μηχανισμοί ανοχής αποτυγχάνουν και τα αυτοαντιγόνα αναγνωρίζονται από αυτοαντισώματα ή αυτοαντιδραστικά λεμφοκύτταρα. Η βέβαια διάγνωση μιας αυτοάνοσης νόσου απαιτεί μεταξύ άλλων την παρουσία αυτοαντιγόνου και των σχετιζόμενων αυτοαντισωμάτων ή συγκεκριμένων αυτοαντιδραστικών κυττάρων. Επιπλέον, η συγκεκριμένη ανοσοαπόκριση ευθύνεται για την παρατηρούμενη παθολογική κλινική εικόνα. Επιβεβαίωση της αυτοανοσίας επιτυγχάνεται με τη διερεύνηση της νόσου σε ένα πειραματικό μοντέλο μετά από μεταφορά των αυτοδραστικών λεμοκυττάρων ή/και αυτοαντισωμάτων. Πιο συγκεκριμένα, η χορήγηση ειδικών για την ασθένεια αυτοαντισωμάτων ή αυτοαντιδραστικών κυττάρων που θα προκαλέσουν επακόλουθα την ανάπτυξη ασθένειας στο πειραματικό μοντέλο αποδεικνύει την αυτοάνοση φύση αυτής της νόσου [110].

Μέχρι πρότινος, επικρατούσε η άποψη ότι η PD και η αυτοανοσία δεν σχετίζονται. Ωστόσο, τα ευρήματα που προέκυψαν την τελευταία δεκαετία από μελέτες που αφορούν τις ανοσολογικές αλλοιώσεις στην PD οδήγησαν στην διερεύνηση πιθανής συσχέτισης. Μια σειρά ανεξάρτητων παρατηρήσεων ανέδειξε την άποψη ότι ο μηχανισμός του έμφυτου και του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος δύναται να διαδραματίσει ρόλο στην ανάπτυξη της PD.

Σε μια μελέτη ασθενών με PD παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των έμφυτων ανοσοποιητικών συστατικών, συμπεριλαμβανομένων του συμπληρώματος και των κυτοκινών (π.χ. IL-1, IL-2, IL-6 και TNF), εντός της μέλαινας ουσίας και του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (CSF). Τα επίπεδα τους συσχετίζονται με το κλινικό στάδιο της νόσου, αναδεικνύοντας τον ρόλο της φλεγμονής στην εξέλιξη της PD [111].

Επίσης, αναφέρθηκε αύξηση των $\gamma / \delta + T$ κυττάρων στο περιφερικό αίμα και CSF των ασθενών με PD [112]. Επιπλέον, αύξηση των κυττάρων CD8 + T και μείωση των Tregs στους πληθυσμούς των περιφερικών T λεμφοκυττάρων των ασθενών με PD έδειξαν ανεπάρκεια μηχανισμών ανοσοανοχής και στοιχεία αυτοαντιδραστικότητας, τεκμηριώνοντας περαιτέρω την πιθανή εμπλοκή της αυτοανοσίας στην εξέλιξη της PD. Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη τα Th17 CD4 + T λεμφοκύτταρα, που αποτελούν τύπο βοηθητικού κυττάρου T που εμπλέκεται στην αυτοανοσία, αυξάνονται στο αίμα των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με PD και μπορούν επίσης να αναγνωρίσουν και να καταστρέψουν τους νευρώνες του μεσεγκεφάλου. Η

καταστροφή των νευρώνων αυτών προκαλεί τη συσσώρευση τοξικών υλικών, όπως κατεστραμμένα μιτοχόνδρια και συσσωματωμένη α-συνουκλεΐνη [113].

Οι αλλοιωμένοι T λεμφοκυτταρικοί πληθυσμοί συμβάλλουν στις αλλαγές στα επίπεδα των κυκλοφορούντων κυτοκινών. Τα κύτταρα Th1 και TH17 + CD4 + επηρεάζουν τα αυξημένα επίπεδα IFN γ , TNF α και IL-17. Σε αρκετές μελέτες συγκρίνονται οι υποπληθυσμοί των κυττάρων T σε ασθενείς με PD με τους αντίστοιχους των υγιών μαρτύρων. Διαπιστώθηκε ότι οι ασθενείς με PD διαθέτουν λιγότερα παύει T κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των CD4 + Th (βοηθητικών) κυττάρων και περισσότερα ενεργοποιημένα T κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των T ρυθμιστικών T κυττάρων (Tregs), σε σχέση με τους υγιείς. Σε ορισμένες μελέτες έχει αναφερθεί μια γενική μείωση των συνολικών κυττάρων Th, Tregs και CD8 + κυτταροτοξικών T κυττάρων, ενώ σε άλλες μελέτες δεν προκύπτει καμία αλλαγή στον αριθμό Treg με αύξηση σε κύτταρα Th1, κυρίως του υποσυνόλου Th17 σε ασθενείς με PD [114].

Ο αριθμός και η αναλογία των τύπων T λεμφοκυττάρων παρέχουν ενδείξεις για τους ρόλους τους. Τα Tregs ανταποκρίνονται σε αυξημένη φλεγμονή, καταστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων και την παραγωγή κυτοκίνης, ενώ η δυσλειτουργία τους μπορεί να οδηγήσει σε αυτοάνοσες διαταραχές. Τα Tregs, που προέρχονται από ασθενείς με PD, έχει αποδειχθεί ότι διαθέτουν μειωμένη ικανότητα στην καταστολή του πολλαπλασιασμού των ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων in vitro σε σύγκριση με τα Tregs υγιών μαρτύρων [115].

Άλλες ανοσολογικές αλλοιώσεις που περιγράφονται στην PD σχετίζονται με τη χυμική ανοσοαπόκριση [116].

Τα επίπεδα του ορού των αντι-α-συνουκλεΐνης αντισωμάτων προέκυψε ότι σχετίζονται με τις παραλλαγές της νόσου, ενώ τα αντι-GM1-γαγγλιοσίδης αντισώματα συσχετίστηκαν με την επικρατούσα μορφή PD με ύπαρξη τρόμου [117]. Μια πρόσφατη μελέτη επισήμανε ότι η χορήγηση GM1-γαγγλιοσίδης μπορεί να βελτιώσει τον τρόπο [118].

Σε μια άλλη μελέτη, αυτοαντισώματα έναντι των ντοπαμινεργικών νευρώνων στην μέλαινα ουσία προερχόμενα από εγκεφαλονωτιαίο υγρό ανιχνεύθηκαν στο 78% των ασθενών με PD έναντι του 3% των μαρτύρων. Φαίνεται ότι το εγκεφαλονωτιαίο υγρό των ασθενών με PD άσκησε κυτταροτοξική δράση στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες, οι οποίοι συνέβαλαν σε αυξημένο εκφυλισμό της μέλαινας ουσίας, με δοσο- και χρονό-εξαρτώμενο τρόπο [119]. Αυτό το κυτταροτοξικό αποτέλεσμα αποδείχθηκε περαιτέρω με νευρωνική σήμανση με IgG, η οποία συσχετίστηκε με τον νευροεκφυλισμό που παρατηρείται στη νόσο PD [120].

Ο Chen και συνεργάτες πραγματοποίησαν πείραμα για την μελέτη ενός αυτοάνοσου μηχανισμού, όπου χρησιμοποίησαν αντισώματα από πέντε ασθενείς με PD και προκάλεσαν παθολογία τύπου Parkinson σε πειραματικά μοντέλα. Συγκεκριμένα, IgG από PD ασθενείς εγχύθηκε στη μέλαινα ουσία ενήλικων αρουραίων και συγκρίθηκε με μη ειδική IgG που εγχύθηκε αντιστοίχως. Τέσσερις εβδομάδες αργότερα, ήταν προφανές ότι η IgG από PD προκάλεσε εκφυλισμό νευρώνων της μέλαινας ουσίας σε αντίθεση με την μη ειδική IgG [121].

Ο θάνατος των ντοπαμινεργικών κυττάρων από αυτοαντισώματα μπορεί να προκληθεί από διάφορους μηχανισμούς, όπως η ενεργοποίηση της απόπτωσης, η ενίσχυση της λειτουργίας του συμπληρώματος και η επιταχυνόμενη επίθεση των περιβαλλόντων μικρογλοιακών κυττάρων [122].

Η μικρογλοία, που αποτελεί τον τύπο μακροφάγων του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού, δρα ως πρώτη και κύρια γραμμή ενεργού άμυνας σε καταστάσεις που μολυσματικοί παράγοντες εισάγονται απευθείας στον εγκέφαλο ή διασχίζουν το φράγμα αίματος-εγκεφάλου. Προηγούμενες μελέτες έχουν εντοπίσει αυξημένη έκφραση υποδοχέων Fc στην αντιδραστική μικρογλοία. Χορήγηση IgG ασθενών με PD μπορεί να προκαλέσει μικρογλοιακή ενεργοποίηση και βλάβη των κυττάρων της μέλαινας ουσίας, τεκμηριώνοντας την δυνητική τοξικότητα της ενεργοποιημένης μικρογλοίας προς τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες [123].

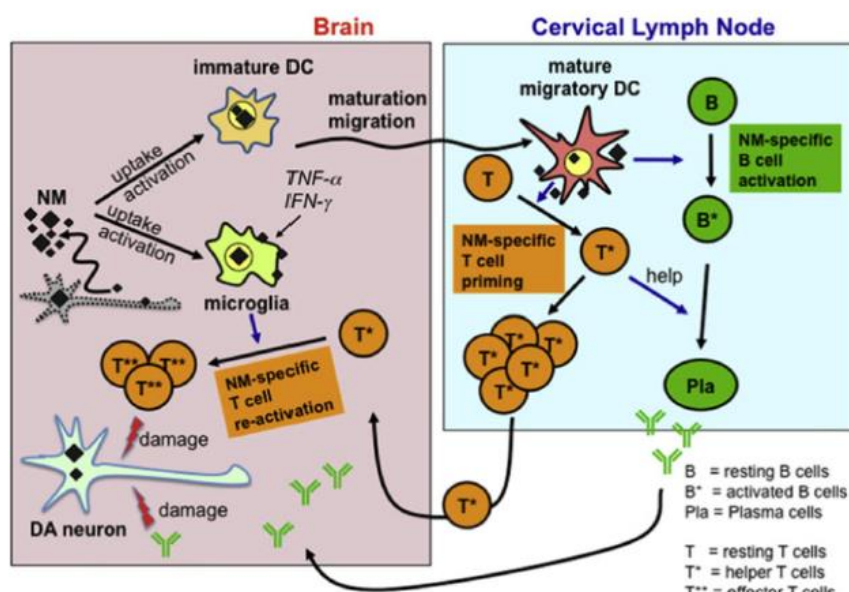
Ένας πρόσθετος μηχανισμός επίδρασης των αυτοαντισωμάτων στο ντοπαμινεργικό σύστημα επισημάνθηκε με μια σειρά *in vitro* και *in vivo* μελέτες, χρησιμοποιώντας συνθετικά αντισώματα [124].

Αυτά τα διεγερμένα αυτοαντισώματα μπόρεσαν να δεσμεύσουν τους φυσικούς υποδοχείς ντοπαμίνης, και να αναστείλουν ανταγωνιστικά την ικανότητα των υποδοχέων ντοπαμίνης να δεσμεύουν τον φυσικό αγωνιστή τους [125].

Μία πιθανή ουσία-στόχος για μια ανοσιακή απόκριση εναντίον ντοπαμινεργικών νευρώνων είναι η νευρομελανίνη (NM), μια χρωστική που συσσωρεύεται στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες ως υποπροϊόν του μεταβολισμού κατεχολαμίνης. Μια μελέτη απέδειξε ότι η NM ενεργοποιεί τη λειτουργική ωρίμανση δενδριτικών κυττάρων (DC) *in vitro*, καθώς τα συγκεκριμένα δενδριτικά κύτταρα ήταν ικανά να προκαλέσουν πολλαπλασιαστική απόκριση T λεμφοκυττάρων [126].

Οι Koutsilieris και συνεργάτες προτείνουν ότι τα ενεργοποιημένα δενδριτικά κύτταρα μεταναστεύουν από τον εγκέφαλο, όπου παρουσιάζουν τα πιθανά (αυτο-) αντιγόνα στα κύτταρα T και B. Η αναγνώριση της NM ως παθογόνου μορίου και η πρόσληψή της από δενδριτικά

κύτταρα θα τα επέτρεπε να μεταναστεύσουν στους αυχενικούς λεμφαδένες και να ενεργοποιήσουν μια αυτοάνοση απόκριση παρουσία NM-αντιδραστικών T ή B κυττάρων [127].



Εικόνα 9 : Παραστατική απεικόνιση της ενεργοποίησης των DC από τη NM, η οποία προκαλεί αυτοάνοσια που κατευθύνεται στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Η επαφή των DC με NM ενεργοποιεί την ωρίμανση αυτών των κυττάρων που μεταναστεύουν ακολούθως από τον εγκέφαλο στους αυχενικούς λεμφαδένες, όπου παρουσιάζουν NM στα B- και T-λεμφοκύτταρα [128].

3. BTLA

3.1 Ρύθμιση των λεμφοκυττάρων

Η ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων προκαλείται τόσο από αντιγονοειδικά σήματα με τους TCR όσο και από μη αντιγονοειδικά σήματα μέσω συν-υποδοχέων.

Ειδικότερα, η ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων ρυθμίζεται από διεγερτικά και ανασταλτικά σήματα που παρέχονται από την αλληλεπίδραση μεταξύ διεγερτικών και ανασταλτικών υποδοχέων με τους συγγενείς προσδέτες τους. Πολλοί από αυτούς τους υποδοχείς και τους προσδέτες ανήκουν στη CD28 και B7οικογένειες [129].

Μεταξύ αυτών των υποδοχέων, το CD28 και το ICOS (υποδοχέας δευτερογενής ενεργοποίησης T κυττάρων) παρέχουν διεγερτικό σήμα για ενεργοποίηση T λεμφοκυττάρων, ενώ το CTLA-4

(CD152, αντιγόνο κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων-4) λειτουργεί ως ανασταλτικός υποδοχέας, εξουδετερώνοντας τη δράση του CD28 στα T κύτταρα. Τόσο το CD28 όσο και το CTLA-4 αλληλεπιδρούν με το ίδιο σύνολο προσδετών B7-1 (επίσης γνωστό ως CD80) και B7-2 (CD86), οι οποίοι εκφράζονται σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC). Δύο επιπλέον ανασταλτικοί υποδοχείς, η PD-1 (πρωτεΐνη προγραμματισμένου θανάτου-1) και ο αναστολέας B και T λεμφοκυττάρων (BTLA) παρέχουν ανασταλτικό σήμα, εμποδίζοντας την ενεργοποίηση των T και B κυττάρων [130].

Φαίνεται ότι η ισορροπία μεταξύ διεγερτικών και ανασταλτικών σημάτων στα λεμφοκύτταρα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των φυσιολογικών ανοσολογικών αποκρίσεων, αλλά και στην πρόληψη της εμφάνισης αυτοάνοσων ασθενειών. Αυτό αποδεικνύεται από τους φαινοτύπους ανοσοανεπάρκειας σε ποντίκια με ανεπάρκεια σε CD28 ή ICOS και τους φαινοτύπους της αυτοανοσίας και της ανοσολογικής υπερκινητικότητας σε ποντικούς με ανεπάρκεια στο γονίδιο CTLA-4, PD-1 ή BTLA [131].

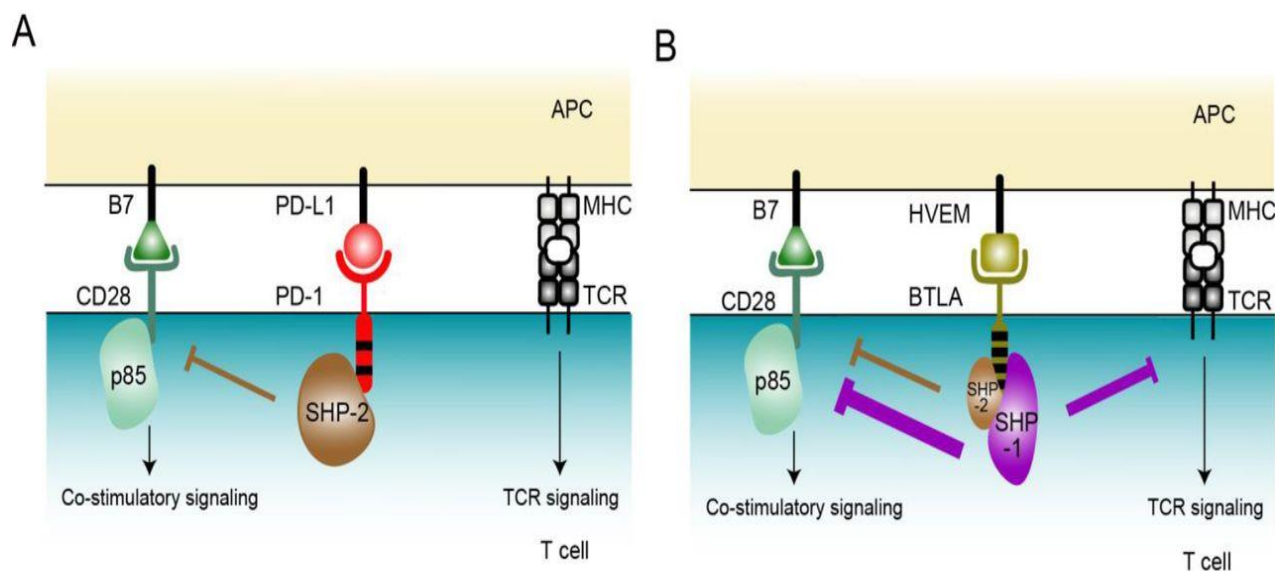
3.2 Δράση του BTLA

Το BTLA (CD272) είναι ένας υποδοχέας διαμεμβρανικής συν-σήμανσης τύπου I που ανήκει στην υπερικογένεια CD28 Ig. Το BTLA περιέχει δύο κυτταροπλασματικά ανασταλτικά μοτίβα με βάση την τυροσίνη ανοσοϋποδοχέα (ITIMs) και υφίσταται επαγωγίμη φωσφορύλιωση τυροσίνης και αλληλεπίδραση με SHP-1 και SHP-2. Το BTLA αναστέλλει εν μέρει την επαγόμενη από CD3 έκκριση της IL-2. Επίσης, T λεμφοκύτταρα με ανεπάρκεια BTLA εμφανίζουν αυξημένο πολλαπλασιασμό όταν παρουσιάζεται αντιγόνο από δενδριτικά κύτταρα, υποδηλώνοντας ότι το BTLA ασκεί ανασταλτική επιρροή στα T κύτταρα [132].

Κύτταρα παύει αβ T, κύτταρα NK, συμβατικά DCs και μακροφάγα του σπλήνα εκφράζουν BTLA σε χαμηλά επίπεδα, ενώ ανενεργά κύτταρα γδ T, ενεργοποιημένα κύτταρα αβ T και B ανενεργά κύτταρα εκφράζουν BTLA σε υψηλά επίπεδα [133].

Σε αντίθεση με τη γενική τάση δέσμευσης δομικώς παρόμοιων μελών της υπερικογένειας ανοσοσφαιρίνης και TNF, το BTLA συνδέεται με τον μεσολαβητή εισόδου ιού έρπητα της οικογένειας TNFR (HVEM) [134]. Κατά την αλληλεπίδραση με το HVEM, το BTLA προσλαμβάνει τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες τυροσίνης των SHP-1 και SHP-2, αναστέλλοντας έτσι τους καταρράκτες σηματοδότησης του TCR και BCR [135]. Είναι ενδιαφέρον ότι, μέσω ενός διαφορετικού τομέα, το HVEM μπορεί να δεσμεύσει τον συνδιεγερτικό συνδέτη LIGHT (μέλος της υπερικογένειας TNF) και να παρέχει συνδιεγερτικά σήματα [134]. Κατά συνέπεια, η απομάκρυνση της περιοχής δέσμευσης BTLA από το HVEM μετατρέπει το HVEM από έναν

κυρίαρχο συν-ανασταλτικό υποδοχέα σε έναν αποκλειστικά συνδιεγερτικό υποδοχέα. Επιπλέον, το BTLA φαίνεται να συμβάλλει στη δράση των Treg σε T κύτταρα τελεστές (Teff), καθώς τα κύτταρα Teff με ανεπάρκεια BTLA είναι ανθεκτικά στην καταστολή των Treg. Αποδεδειγμένα, κατά τη διέγερση των T-κυττάρων, το HVEM αυξάνεται στα Tregs και το BTLA στα κύτταρα Teff, αποστέλλοντας έτσι ανασταλτικά σήματα από τα Tregs στα Teff [136].



Εικόνα 12: Απεικόνιση της ενεργοποίησης των ανασταλτικών ρυθμιστών PD-1 και BTLA (Ανατύπωση από: Xu, Xiaozheng, et al. "BTLA and PD-1 employ distinct phosphatases to differentially repress T cell signaling." bioRxiv (2019): 669812.)

Όλα τα μέλη της οικογένειας CD28 χαρακτηρίζονται από έναν μοναδικό εξωκυτταρικό τομέα IgSF V και διαθέτουν, ως συνδέτες τους, μέλη της οικογένειας B7 μορίων κυτταρικής επιφάνειας. Τα CD28, CTLA-4 και ICOS εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια ως ομοδιμερή συνδεδεμένα με δισουλφίδιο. Οι κυτταροπλασματικοί τομείς τους περιέχουν το μοτίβο δέσμευσης SH2 YXXM. Αντιθέτως, τα PD-1 και BTLA είναι μονομερή των οποίων οι κυτταροπλασματικοί τομείς περιέχουν το καθένα ITIM (immunoreceptor-tyrosine-inhibitory motif) και μοτίβο αλληλουχιών αναστολής ανοσοϋποδοχέα βασισμένου στην τυροσίνη (ITSM: immunoreceptor-tyrosine-switch-motif) [137].

Το BTLA περιέχει ένα εξωκυττάριο τμήμα που μοιάζει με Ig, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και ένα ενδοκυτταρικό άκρο. Η κυτταροπλασματική ουρά του BTLA περιέχει τόσο ένα ITIM (που περιβάλλει την τυροσίνη Y257) όσο και ένα ITSM (που περιβάλλει την τυροσίνη Y282) που χωρίζονται από μια διαχωριστική περιοχή 19-aa. Το BTLA προσλαμβάνει SHP1, αλλά όχι SHP2 σε πρωτογενή κύτταρα CD4 + T που διεγείρονται από HVEM . [138]

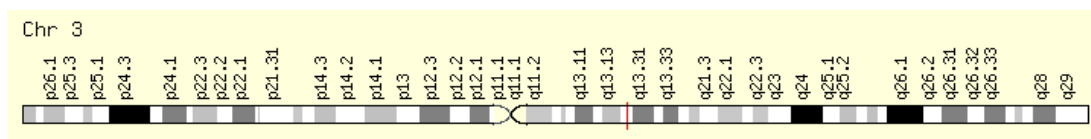
Συνοπτικά οι δράσεις του BTLA

- Το BTLA αναστέλλει την παραγωγή IL-2 από T λεμφοκύτταρα. Οι τέσσερις ενδοκυτταρικές τυροσίνες του BTLA είναι απαραίτητες για να αναστέλλει το BTLA την παραγωγή IL-2 των T κυττάρων.
- Το BTLA αναστέλλει τόσο το TCR όσο και το CD28 (CD3ζ και CD28 φωσφορυλίωση).
- Το BTLA προσλαμβάνει τόσο SHP1 όσο και SHP2. Το SHP1 αποφωσφορυλιώνει τόσο το TCR όσο και το CD28, ενώ το SHP2 αποφωσφορυλιώνει το CD28.

Το γονίδιο BTLA

Η πρωτεΐνη κωδικοποιείται από το γονίδιο BTLA, το οποίο εντοπίζεται στον μακρύ βραχίονα του 3 χρωμοσώματος (3q13.2)

Περιέχει 5 εξόνια με συνολικό μήκος 870 bp και παράγει εναλλακτικές θέσεις ματίσματος, οι οποίες κωδικοποιούν ισομορφές λειτουργικών πρωτεϊνών



Εικόνα 13: Η κόκκινη σήμανση επισημαίνει τον γενετικό τόπο του γονιδίου BTLA στο χρωμόσωμα 3 (Ανατύπωση από: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BTLA>)

Η πρωτεΐνη BTLA

Η πρωτεΐνη BTLA περιλαμβάνει δύο ισομορφές που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα. Η ακόλουθη είναι η ισομορφή 1. Περιέχει 289 αμινοξέα και το βάρος της υπολογίζεται στα 32,8kDa. Σε αντίθεση, στην ισομορφή 2 παρατηρείται έλλειμμα των αμινοξέων 135-182.

```
      10           20           30           40           50
MKTLPAMLGT  GKLFWVFFLI  PYLDIWNHIG  KESCDVQLYI  KRQSEHSILA
      60           70           80           90          100
GDPFELECPV  KYCANRPHVT  WCKLNGTTCV  KLEDRQTSWK  EEKNISFFIL
     110          120          130          140          150
HFEPVLPNDN  GSYRCSANFQ  SNLIESHSTT  LYVTDVKSAS  ERPSKDEMAS
     160          170          180          190          200
RPWLLYRLLP  LGGLPLLITT  CFCLFCCLRR  HQGKQNELSD  TAGREINLVD
     210          220          230          240          250
AHLKSEQTEA  STRQNSQVLL  SETGIYDNDP  DLCFRMQEGS  EVYSNPCLEE
     260          270          280
NKPGIVYASL  NHSVIGPNSR  LARNVKEAPT  EYASICVRS
```


Μελέτες για τον BTLA

Πολλές έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί για τον προσδιορισμό της δράσης του BTLA σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις.

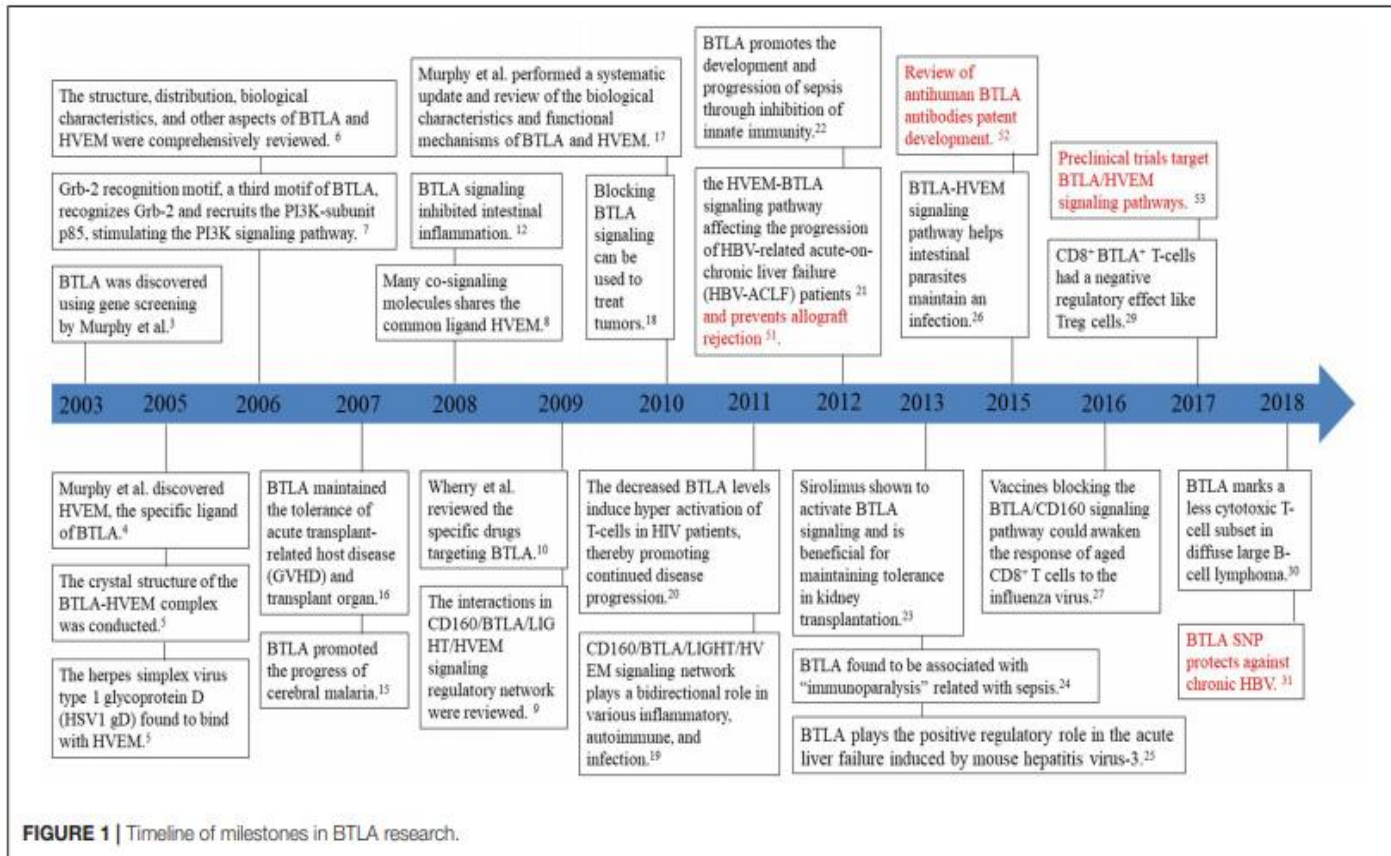
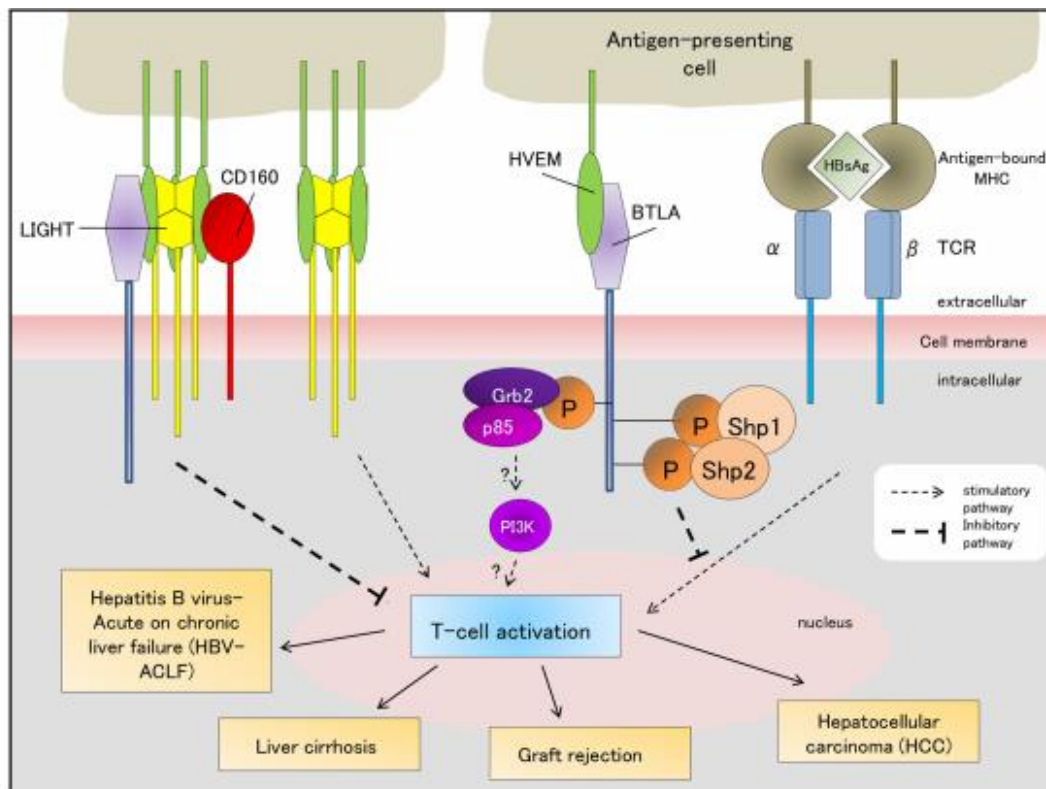


FIGURE 1 | Timeline of milestones in BTLA research.

Εικόνα 14: Το χρονοδιάγραμμα των βασικότερων ερευνών για τον BTLA (Ανατύπωση από: Yu, Xueping, et al. "BTLA/HVEM signaling: milestones in research and role in chronic hepatitis B virus infection." *Frontiers in immunology* 10 (2019): 617.)

Αναφορικά, έρευνες έχουν δείξει ότι κατέχει σημαντικό ρόλο στον καρκίνο, στην πρόληψη της εντερικής φλεγμονής, σε αυτοάνοσες νόσους, σε ιογενείς λοιμώξεις, στη μεταμόσχευση οργάνων και στη συνεχή χρόνια ηπατίτιδα Β.



Εικόνα 14: Η συμβολή του BTLA στην χρόνια ηπατίτιδα Β

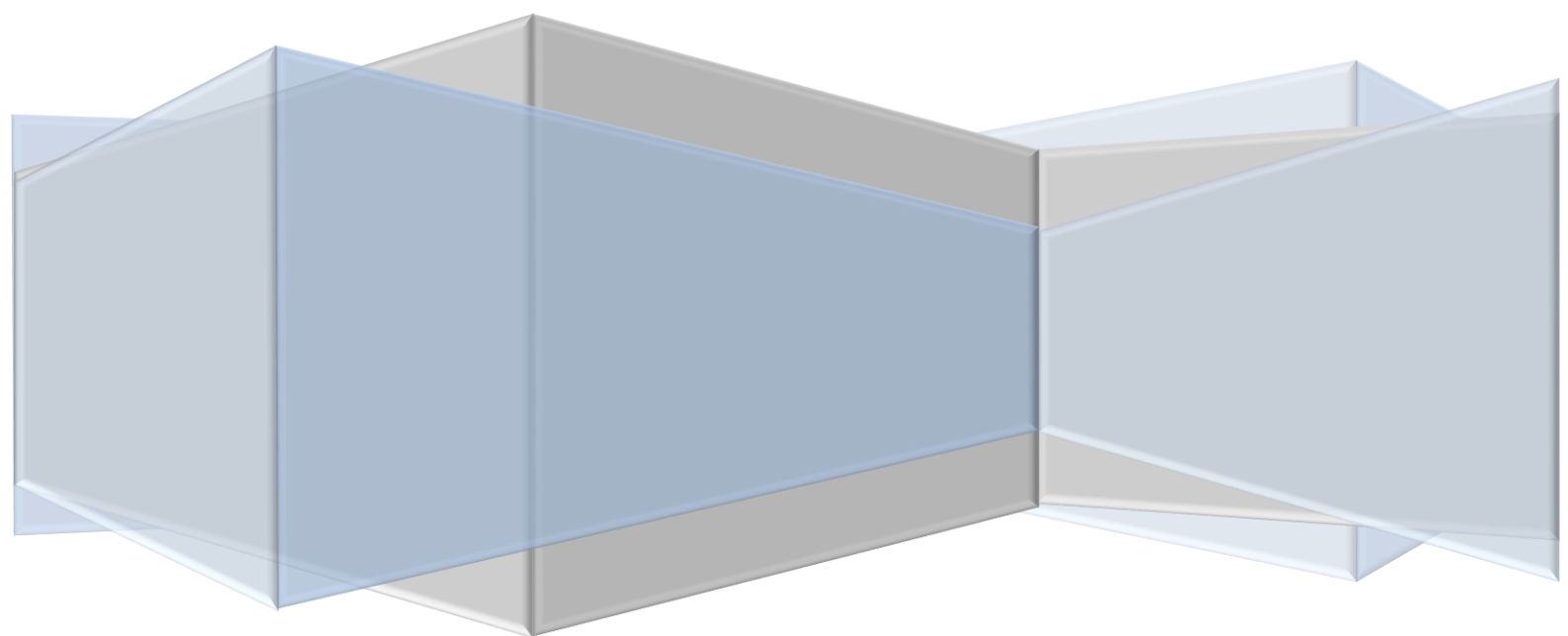
(Ανατύπωση από: Nan XP, Zhang Y, Yu HT, Li Y, Sun RL, Wang JP, et al. Circulating CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells and expression of PD-1 and BTLA on CD4⁺ T cells in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Viral Immunol.* (2010) 23:63–70. doi: 10.1089/vim. 2009.0061)

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι

1. Ο προσδιορισμός των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών και υποπληθυσμών ασθενών με PD (πχ ανοσοφαινοτυπική ανάλυση T-, B-, NK-, και NKT πληθυσμών)
2. Ο προσδιορισμός της επιφανειακής έκφρασης της πρωτεΐνης BTLA σε καθέναν από αυτούς τους πληθυσμούς με κυτταρομετρία ροής και η συσχέτιση της έκφρασης της πρωτεΐνης με την σοβαρότητα της νόσου.

Ειδικό μέρος



ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Κατά την διεκπεραίωση της παρούσας διπλωματικής πραγματοποιήθηκαν τρία διακριτά παρασκευαστικά πρωτόκολλα:

1. Απομόνωση και κρυοσυντήρηση μονοπύρηνων λευκοκυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs).
2. Απόψυξη των κρυοσυντηρημένων κυττάρων και έλεγχος ζωτικότητας με χρώση Trypan BLUE.
3. Πρωτόκολλο για τη σήμανση των κυττάρων με συζευγμένα με φθοριοχρώματα αντισώματα για τον προσδιορισμό έκφρασης της επιφανειακής πρωτεΐνης BTLA και μονιμοποίηση των κυττάρων [164,165,166,167].

1. Απομόνωση PBMCs

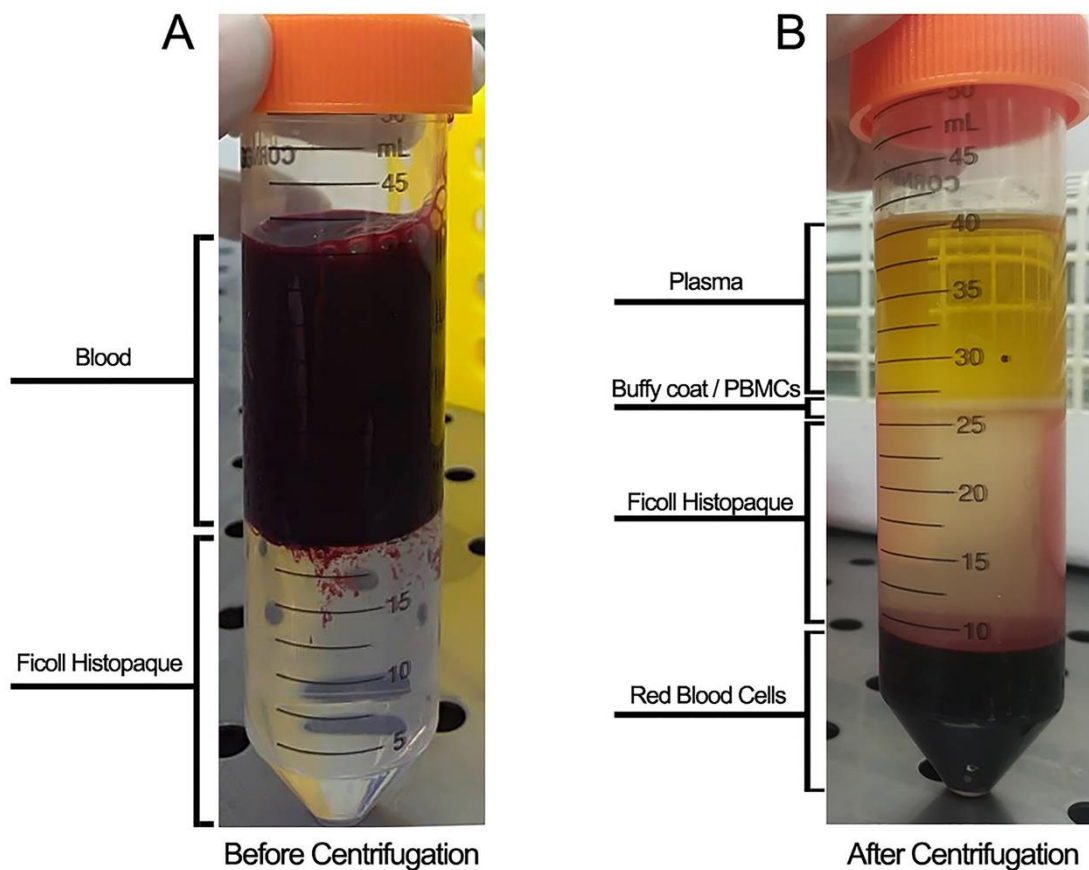
Αναλυτικότερα, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος ασθενών με PD (n=8) που συλλέχθηκαν κατά την παρακολούθησή τους στα εξωτερικά της Νευρολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, καθώς και δείγματα υγιών μαρτύρων (n=8). Κατά την αιμοληψία, συλλέχθηκαν 20 ml περιφερικού αίματος σε ηπαρινισμένη σύριγγα. Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα κύρια δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με PD και υγιών μαρτύρων που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη .

Χαρακτηριστικά	Φύλο	Ηλικία	Διάρκεια νόσου	Hohen-Yahr
Ασθενών με PD				
Ασθενής 1	APPEN	81	5	4
Ασθενής 2	APPEN	77	5	3
Ασθενής 3	ΘΗΛΥ	75	4	3
Ασθενής 4	APPEN	34	6	1
Ασθενής 5	APPEN	75	5	3
Ασθενής 6	APPEN	64	1	3
Ασθενής 7	ΘΗΛΥ	48	12	2
Ασθενής 8	APPEN	77	1	2

Χαρακτηριστικά των υγείων ατόμων (control)	Φύλο	Ηλικία	Υποκείμενες νόσοι
Control 1	ΘΗΛΥ	26	ΟΧΙ
Control 2	ΑΡΡΕΝ	22	ΟΧΙ
Control 3	ΑΡΡΕΝ	41	ΟΧΙ
Control 4	ΑΡΡΕΝ	52	ΟΧΙ
Control 5	ΑΡΡΕΝ	54	ΟΧΙ
Control 6	ΘΗΛΥ	48	ΟΧΙ
Control 7	ΑΡΡΕΝ	31	ΟΧΙ
Control 8	ΑΡΡΕΝ	22	ΟΧΙ

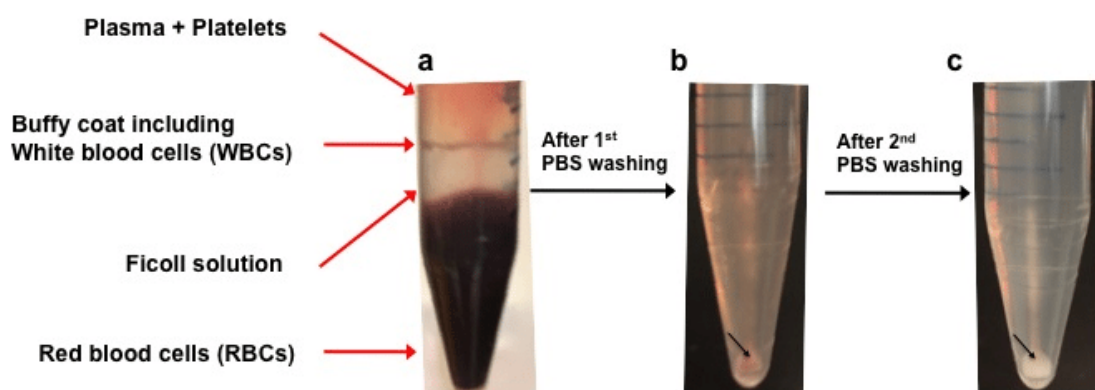
Η διαδικασία απομόνωσης πραγματοποιήθηκε σε στείρες συνθήκες. Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε falcon 50ml, όπου αρχικά προστέθηκαν 10ml διαλύματος διαβάθμισης πυκνότητας Lymphoprep και έπειτα επιστρώθηκαν τα 20 ml αίματος. Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 1800 rpm για 20 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο με ελάχιστα φρένα ώστε να μην διαταραχθεί η διαστρωμάτωση.

Μετά την φυγοκέντρηση τα δείγματα εμφανίζονται όπως στην κάτωθεν εικόνα, όπου διακρίνονται ευκρινώς τα συστατικά τους. Κάτω από το Lymphoprep βρίσκονται τα ερυθροκύτταρα και τα πολυμορφοπύρρηνα, από πάνω στη "θολερή" ζώνη σαν νεφέλωμα τα μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος και στην κορυφή το πλάσμα.



Εικόνα 15: Μετά τη φυγοκέντρηση του στρωμένου πάνω από το διαχωριστικό μέσο αίματος, εμφανίζονται οι στρωματώσεις των επιμέρους συστατικών του (Ανατύπωση από: Pissas, Georgios, and Theodoros Eleftheriadis. "Assessment of Humoral Alloimmunity in Mixed Lymphocyte Reaction." *BIO-PROTOCOL* 9.2 (2019))

Με αναρρόφηση τα συστατικά διαχωρίζονται. Τα μονοπύρηνια συλλέγονται σε falcon tubes των 15ml για να ακολουθήσουν πλύσεις για την απομάκρυνση του Lymphoprep. Οι πλύσεις πραγματοποιούνται με προσθήκη μέσου RPMI-1640 και φυγοκέντρηση στις 2200rpm για 5 λεπτά με μεγάλη επιτάχυνση και επιβράδυνση, ώστε να κύτταρα να καθιζάνουν στον πυθμένα του falcon σχηματίζοντας ίζημα (pellet).



Εικόνα 16: Το αποτέλεσμα των πλύσεων με RPMI όπου χρησιμοποιείται ισοτονικό διάλυμα PBS. Τα μονοπύρηνια του ιζήματος καθαρίζουν από το διαχωριστικό μέσο (φικόλλη, Lymphoprep) και υπολείμματα ερυθροκυττάρων απομακρύνονται (Ανατύπωση από: researchgate.net)

Με ιδιαίτερη προσοχή γίνεται απόρριψη του υπερκείμενου χωρίς να απομακρυνθεί το κυτταρικό ίζημα και πλύση με νέο RPMI-1640, το οποίο καθίσταται αναγκαίο για καλύτερη απομόνωση των λευκοκυττάρων.

Μετά την απομόνωση τα κύτταρα επαναιωρούνται σε διάλυμα FBS 60% (ορός βοειδών), RPMI-1640 30% και DMSO 10% (διμεθυλοσουλφοξείδιο, κρυσταλλικό/κρυσταλλοπροστατευτικό και ελαφρά κυτταροτοξικό). Αποθηκεύονται σε ειδικά φιαλίδια, cryovials (1-2ml Corning™), τα οποία τοποθετούνται σε δοχεία παγώματος και έπειτα σε κατάψυξη στους -80°C για τουλάχιστον 24 ώρες. Τα συγκεκριμένα δοχεία γεμίζονται με προπανόλη, μέχρι ορισμένη στάθμη. Τα cryovials ουσιαστικά καταβυθίζονται στην αλκοόλη, η οποία επιτρέπει το σταδιακό πάγωμά τους και σε συνδυασμό με το DMSO, αποτρέπει την δημιουργία κρυστάλλων και το στρεσάρισμα των κυττάρων.



Εικόνα 17: Το freezing box που χρησιμοποιείται κατά την κρυσταλλοποίηση. Φαίνεται ο κενός χώρος μέσα στο διάφανο πλέξιγκλας που γεμίζεται με προπανόλη, καθώς και οι θέσεις για τα cryovials που καταβυθίζονται στην αλκοόλη (Ανατύπωση από: labgenome.com/5100-0001-thermo-scientific-nalgene-mr-frosty-cryo-freezing-container-case-of-1)

Καταμετρούνται τα μη χρωματισμένα κύτταρα καθώς τα ζωντανά κύτταρα δεν βράφονται από Trypan Blue. Γίνεται καταμέτρηση στα τέσσερα κύρια τετράγωνα, διαίρεση του αριθμού με το 4 (μέσος όρος κυττάρων σε ένα τετράγωνο) και πολλαπλασιασμός X104 καθώς η πλευρά του κάθε "τετραγώνου" είναι 1mm και η απόσταση μεταξύ του slide και του καλύμματος της είναι 0.1mm άρα 0.1mm³. Τέλος, πολλαπλασιάζουμε με 5 λόγω της αρχικής αραιώσης 1:5 από την προσθήκη Trypan Blue. Η τελική τιμή που θα προκύψει αποτελεί τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων/ml στο αρχικό κυτταρικό εναιώρημα.

3. Σήμανση με ειδικά αντισώματα

Το επόμενο στάδιο του πρωτοκόλλου αφορά τη σήμανση των ζωντανών κυττάρων (>90% ζωτικότητα) με ειδικά συζευγμένα με φθοριοχρώματα αντισώματα έναντι επιφανειακών επιτόπων για την ταυτοποίηση επιμέρους λεμφοκυτταρικών πληθυσμών. Το ίζημα στο κάθε erppendorf επαναιωρείται σε 100 μl PBS 2% FBS. Προστίθενται ειδικά αντισώματα (Πίνακας 4) και επωάζονται για 30 min στο ψυγείο. Έπειτα ακολουθεί πλύση με 1 ml PBS 2% FBS και φυγοκέντρηση στις 4000 στροφές για 2 min με απομάκρυνση του υπερκείμενου.

Πίνακας 3: Καταγραφή των ειδικών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα από τις εταιρίες (BD Biosciences, BioLegend και Merck Millipore).

Αντισώματα έναντι επιφανειακού επιτόπου	Ποσότητα	Χρώμα
CD3	5μl	FITC
CD4	1μl	APC
CD56	1μl	PECy7
CD19	4μl	APC
BTLA	1,5μl	PE

Πίνακας 4: Καταγραφή των συνδυασμών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν

- 1) CD3/-/CD4/CD56
- 2) CD3/BTLA/CD4/CD56
- 3) CD19/-
- 4) CD19/BTLA

Μετά την σήμανση, τα κύτταρα μονιμοποιούνται με την προσθήκη 200 μl παραφορμαλδεΐδης σε κάθε erppendorf (2% PFA σε PBS) και επωάζονται για 10-15 min.

Τέλος, ακολουθεί πλύση με 1 ml PBS 2% FBS και φυγοκέντρηση στις 4000 στροφές για 2 min. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 500 μl PBS.

Το δείγμα είναι έτοιμο να αναλυθεί στο κυτταρόμετρο.

4. Κυτταρομετρία Ροής

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια αυτοματοποιημένη μέθοδο ανάλυσης των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών κυττάρων και σωματιδίων, με βάση τη σκέδαση και το φθορισμό και με την προϋπόθεση ότι το υπό έλεγχο δείγμα βρίσκεται σε μορφή εναιωρήματος. Πλεονέκτημα της συγκεκριμένης ανάλυσης αποτελεί η απομόνωση των κυττάρων χωρίς σχετική απώλεια της βιωσιμότητάς τους και η κάθαρση των σωματιδίων χωρίς απώλεια της δομής.

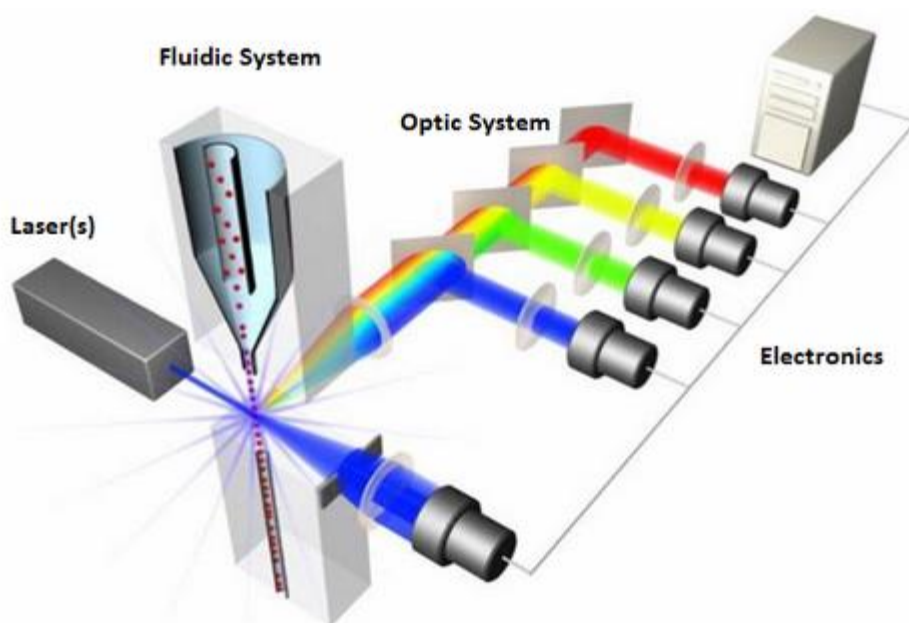
Ο κυτταρομετρητής ροής αποτελείται από 3 βασικά συστήματα 1) το υδροδυναμικό σύστημα ροής 2) το οπτικό σύστημα και 3) το ηλεκτρονικό σύστημα ανάλυσης δεδομένων.

Υδροδυναμικό σύστημα ροής: Αποτελείται από την κεντρική κυψελίδα ροής η οποία δρα ως κανάλι, μέσω της οποίας ρέει το κυτταρικό εναιώρημα περιβαλλόμενο από το αδρανές ρυθμιστικό διάλυμα. Χαρακτηριστικό του συστήματος είναι η εφαρμογή της θεωρίας της υδροδυναμικής εστίασης, που επιτυγχάνει τη ροή των κυττάρων σε μονήρη διάταξη. Η σωστή ρύθμιση των ταχυτήτων και των πιέσεων μεταξύ του ρυθμιστικού διαλύματος και του κυτταρικού εναιωρήματος επιτρέπει στα κύτταρα να διέρχονται ένα προς ένα από το ρύγχος της κυψελίδας, σημείο στο οποίο προσπίπτει κάθετα η ακτίνα laser του κυτταρομετρητή.

Οπτικό σύστημα: Στους περισσότερους κυτταρομετρητές, η ακτίνα laser που χρησιμοποιείται είναι αυτή του Αργού στα 488 nm. Τελευταία, χρησιμοποιείται ακτίνα Ζαφειρίου, η οποία επίσης εκπέμπει στα 488 nm, έχοντας το πλεονέκτημα του μεγαλύτερου χρόνου ζωής. Οι σύγχρονοι κυτταρομετρητές εφαρμόζουν πλέον και δεύτερη πηγή ακτίνας laser στα 635 nm, ενώ προβλέπεται και η χρήση ως και τρίτης πηγής. Καθώς η ακτίνα laser προσπίπτει στη μονήρη κυτταρική διάταξη, προκαλεί σκέδαση του φωτός ανάλογα με το μέγεθος των κυττάρων (πρόσθιος σκεδασμός-forward scatter) και με την πολυπλοκότητά τους, δηλαδή την κοκκίωσή τους (πλάγιος σκεδασμός- side scatter). Με αυτόν τον τρόπο, επιτυγχάνεται ο αρχικός διαχωρισμός του εναιωρήματος στους κυτταρικούς πληθυσμούς που εμπεριέχει. Επιπλέον, στο προς ανάλυση δείγμα, προηγείται επεξεργασία με αντισώματα σημασμένα με φθορίζουσες ουσίες. Η προσπίπτουσα δέσμη της ακτίνας laser προκαλεί διέγερση των φθορίζουσών ουσιών και εκπομπή σήματος σε συγκεκριμένο μήκος κύματος για κάθε φθορίζουσα ουσία. Η χρήση περισσότερων της μίας πηγής laser εξυπηρετεί τη σύγχρονη επιλογή πολλών διαφορετικών φθορίζουσών ουσιών, οι οποίες θα μπορούν να διεγείρονται και να εκπέμπουν σήματα σε διάφορες συχνότητες. Ένα ιδιαίτερα πολύπλοκο σύστημα φακών, φωτοανιχνευτών και φωτοπολλαπλασιαστών συλλέγουν τα φωτεινά σήματα και τα

διοχετεύουν στο ηλεκτρονικό σύστημα του κυτταρομετρητή ροής. Όσο περισσότερες φθορίζουσες ουσίες χρησιμοποιούνται για την κυτταρομετρική ανάλυση τόσο πιο πολύπλοκη γίνεται η διαδικασία διαχωρισμού και πιθανής επικάλυψης της εκπομπής φθορισμού των χρωστικών. Η ρύθμιση αυτή είναι γνωστή ως compensation και έχει σκοπό την αφαίρεση των κοινών τόπων μήκους κύματος εκπομπής των φθορίζουσών ουσιών.

Ηλεκτρονικό σύστημα ανάλυσης δεδομένων: Η μετατροπή των φωτεινών σημάτων σε πληροφορίες και η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιείται από τον ηλεκτρονικό υπολογιστή του κυτταρομετρητή. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι παρουσίασης των αποτελεσμάτων, όπως τα ιστογράμματα κατανομής συχνοτήτων, τα στικτογράμματα και πιο πολύπλοκα διαγράμματα, ανάλογα με τον αριθμό των παραμέτρων που αναλύονται συγχρόνως.



Εικόνα 19: Σχηματική αναπαράσταση των τριών επιμέρους συστημάτων που αποτελούν έναν κυτταρομετρητή ροής (Ανατύπωση από: labome.cn/method/Flow-Cytometry-A-Survey-and-the-Basics)

Εφαρμογές της Κυτταρομετρίας Ροής

Οι εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής ποικίλουν με ευρύτατη χρήση στην Αιματολογία και επακόλουθα στην Ανοσολογία, τη Κοινωνιολογία, την Ογκολογία, την Ουρολογία, τη Μαιευτική και τη Γυναικολογία, ενώ τα τελευταία χρόνια η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο στον τομέα των Μεταμοσχεύσεων. Επίσης, η παθολογία και η Παιδιατρική συχνά χρησιμοποιούν την ανοσολογική διαγνωστική της αξία στην κλινική ρουτίνα, ενώ για την Παθολογοανατομία με την Κυτταρολογία αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο στην διαφοροδιάγνωση πολλών νοσημάτων. Η Πνευμονολογία στην μελέτη του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος, η

Νευρολογία στη διερεύνηση του ENY, η Οφθαλμολογία στην εξέταση του υαλοειδούς και υδατοειδούς υγρού, αποτελούν τις νέες ειδικότητες που χρησιμοποιήσουν σήμερα τις τεράστιες δυνατότητες αυτής της μεθόδου.

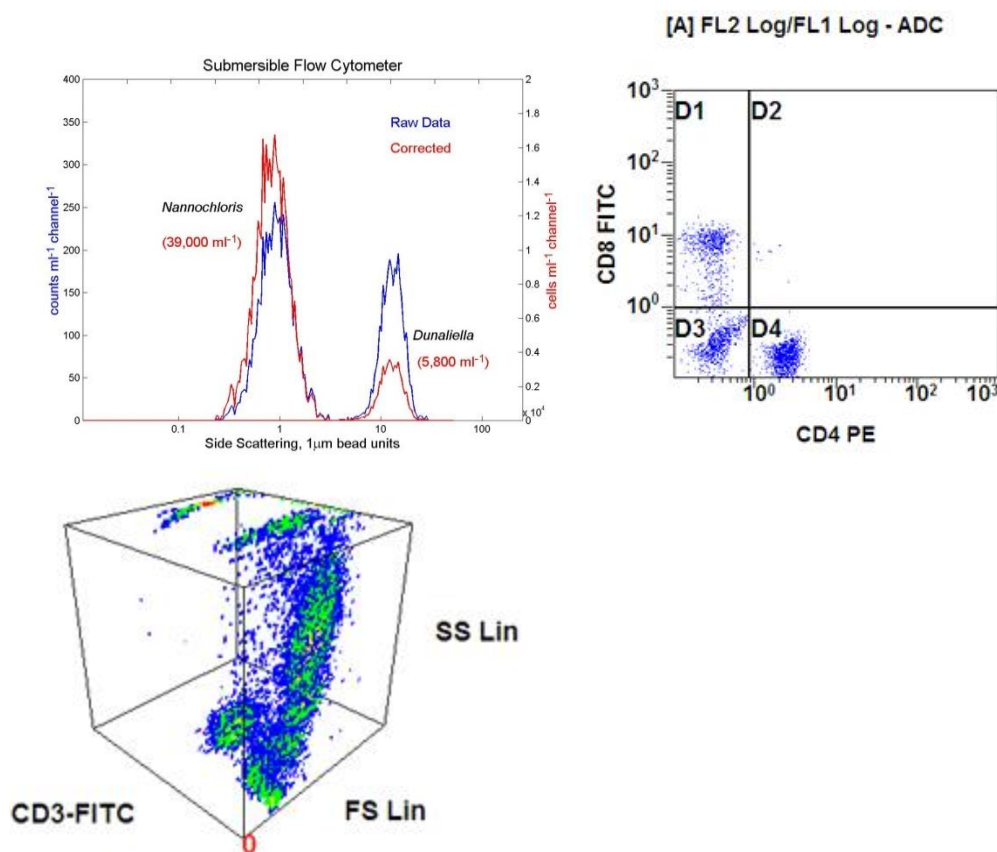
Πέραν της συμβολής της στη διάγνωση, την πρόγνωση και την πρόληψη, η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιείται και στην έρευνα τόσο σε επίπεδο φαινοτύπου, όσο και λειτουργίας κυττάρων, μικροοργανισμών, οργανιδίων κυττάρων και άλλων σωματιδίων που βρίσκονται σε εναιώρημα.

[Ανατύπωση από: Εισαγωγή στις Αρχές της Κυτταρομετρίας Ροής, Ν. Α. Μαλισσιόβας, 1ο Πανελλήνιο Συμπόσιο Κυτταρομετρίας, 1999

Εισαγωγή στις Αρχές της Κυτταρομετρίας Ροής, Μ. Γεωργίου, Ημερίδα Κυτταρομετρίας Ροής με θέμα: Η Κυτταρομετρία Ροής στη Διάγνωση Αιματολογικών Νοσημάτων, 2003

Οπτικό, Υδροδυναμικό και Λογισμικό Σύστημα του Κυτταρομετρητή Ροής, Α. Κλειδή, 3ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κυτταρομετρίας, 2004

Κυτταρομετρία Ροής, Διαγνωστική Ανοσολογία Και Ιστοσυμβατότητα, Α. Γερμενής, Εντατικό Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο, 2003]



Εικόνα 20: Α) Απεικόνιση ενός ιστογράμματος, που καταγράφει τον αριθμό των συμβάντων για κάθε τιμή SSC (<http://www.who.edu/science/B/Olsonlab/aslo.htm>) Β) Απεικόνιση στικτογράμματος με κατανομή των κυττάρων βάσει δύο παραμέτρων (αντιγόνα: CD8 και CD4) σε τέσσερα επίπεδα (D1 +/-, D2 +/+, D3 -/-, D4 -/+) Γ) Απεικόνιση διαγράμματος 3-D με τρεις παραμέτρους (Ανατύπωση από: appliedcytometry.com)

Στην παρούσα μελέτη, για την κυτταρομετρική ανάλυση των δειγμάτων εφαρμόστηκε τετραπλός άμεσος ανοσοφθορισμός. Για την πραγματοποίηση αυτού, χρησιμοποιήθηκε ο κυτταρομετρητής ροής Guava easyCyte™ της Millipore-Merck και για την επιμέρους ανάλυση των δεδομένων εφαρμόστηκαν τα λογισμικά Guava InCyte και FlowJo. Σε κάθε ανάλυση, η εγκυρότητα της λειτουργικότητας ελεγχόταν με το guava easyCheck™ Kit. Μιας και πρόκειται για κύτταρα περιφερικού αίματος, υπάρχουν διάφοροι κυτταρικοί πληθυσμοί στα δείγματα της παρούσας μελέτης, όπως ουδετερόφιλων, μονοκύτταρων, αιμοπεταλίων και συσσωματωμάτων ερυθρών. Για την διαλογή του λεμφοκυτταρικού πληθυσμού, η μελέτη βασίστηκε στις παραμέτρους πρόσθιας (forward-scattered light/FSC) και πλάγιας (side-scattered light/SSC) σκέδασης.



Εικόνα 22: Ο κυτταρομετρητής ροής Guava easyCyte™ της Millipore-Merck που χρησιμοποιήθηκε για την παρούσα εργασία.

Ο προσδιορισμός της μελέτης ανοσοφαινοτυπικών δεικτών σε ασθενείς με PD και υγιείς μάρτυρες έχει λάβει την ενδεδειγμένη άδεια από το Επιστημονικό Συμβούλιο, του ΠΓΝ Λάρισας και όλοι ανεξαιρέτως οι συμμετέχοντες έχουν δώσει την έγγραφη συγκατάθεσή τους.

5. Στατιστική ανάλυση

Για την ανάλυση των δεδομένων για κάθε άτομο, το ποσοστό των κυττάρων που φέρουν συγκεκριμένους δείκτες καθώς και το MFI (Mean Fluorescence Intensity) τους, θεωρείται ως ο μέσος όρος ή η μέση τιμή του κάθε ατόμου σε κάθε ομάδα. Η διακύμανση σε κάθε ομάδα ασθενών ορίστηκε μέσω σταθερής απόκλισης (Standard Deviation, SD) και το σφάλμα ορίστηκε μέσω της σταθερής απόκλισης λάθους (Standard Error of the Mean, SEM). Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων ασθενών και των υγιών ατόμων υπολογίστηκαν με την μονόδρομη ανάλυση διακύμανσης (analysis of variance) ANOVA- test. Στατιστικά σημαντικές τιμές

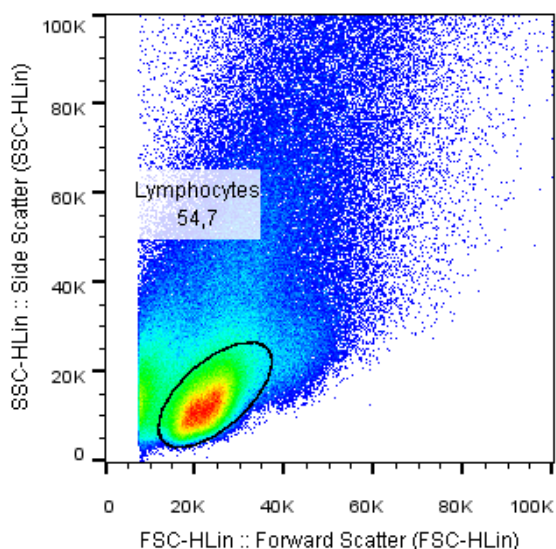
θεωρήθηκαν οι τιμές που παρουσίασαν $p \leq 0.05$. Οι στατιστικοί υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν μέσω του προγράμματος GraphPad Prism 6.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση

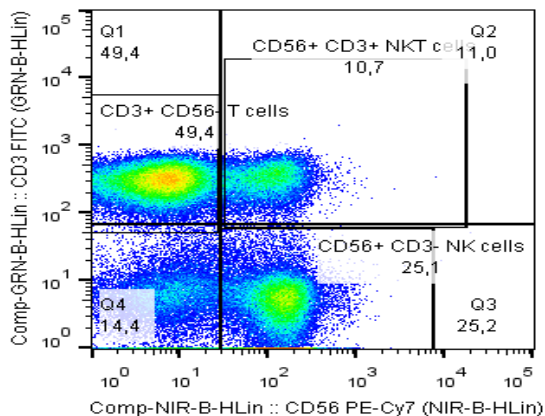
Σε πρώτη φάση, διενεργήθηκε κυτταρομετρική ανάλυση και φαινοτυπικός προσδιορισμός των δειγμάτων που συλλέχθηκαν και σημάνθηκαν με τα συζευγμένα αντισώματα, όπως περιγράφηκαν στο κεφάλαιο των μεθόδων. Μετρήθηκαν κυτταρικοί πληθυσμοί των T κυττάρων (CD3+CD56-) και ειδικότερα τα βοηθητικά (T-helper) (CD3+CD56-CD4+) και τα κυτταροτοξικά T (cytotoxic) (CD3+CD56-CD8+) λεμφοκύτταρα, τα κύτταρα φυσικής ανοσίας NKT (CD3+CD56+) και (CD4+CD56+), τα NK κύτταρα (CD56+CD3-), καθώς και τα B λεμφοκύτταρα (CD19+).

Στην εικόνα παρουσιάζεται ενδεικτική σήμανση (gating) και προσδιορισμός των λεμφοκυττάρων με βάση την πρόσθια και πλάγια σκέδαση που αποδίδουν χαρακτηριστικά του μεγέθους τους και της μικρής κοκκίωσης τους σε σχέση με τα υπόλοιπα ολικά περιφερικά λευκοκύτταρα.



Διάγραμμα 1: Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (Forward Scattering) σχετίζεται με το μέγεθος του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση "SSC" (Side Scattering) σχετίζεται με την κοκκίωσή του. Στο συγκεκριμένο gate εμφανίζονται τα λεμφοκύτταρα.

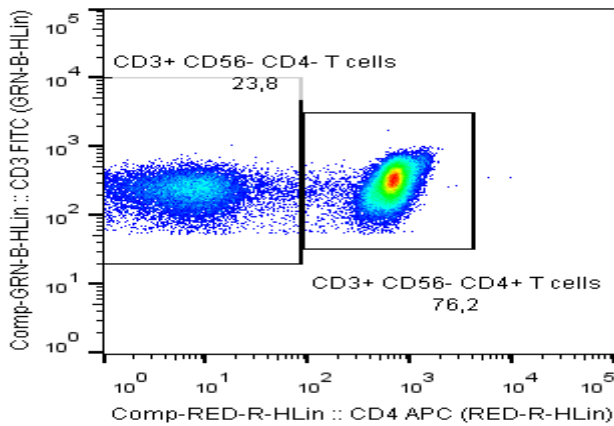
Οι επόμενες αναλύσεις που παρουσιάζονται πραγματοποιήθηκαν στον πληθυσμό των gated λεμφοκυττάρων. Χρώση των λεμφοκυττάρων με τα αντισώματα έναντι των επιφανειακών επιτόπων CD3 και CD56 (2 color experiment) επιτρέπει τον προσδιορισμό τριών βασικών λεμφοκυτταρικών πληθυσμών, των T, NK και NKT κυττάρων.



Διάγραμμα 2: Διάκριση κύριων πληθυσμών T, NKT και NK κυττάρων έπειτα από χρώση αντισωμάτων έναντι των επιφανειακών επιτόπων CD3 και CD56.

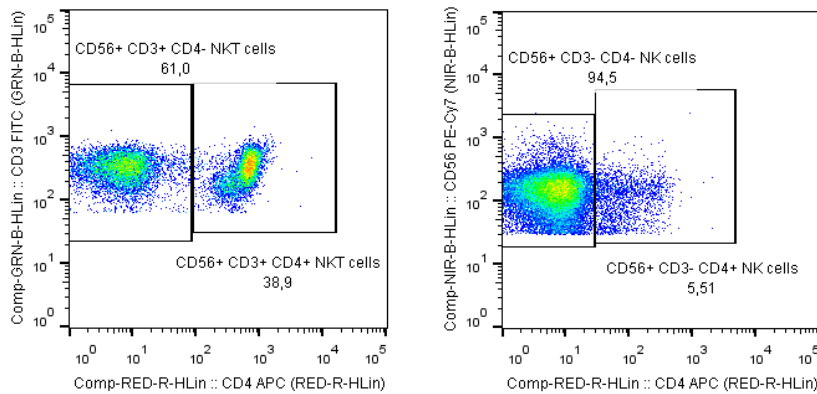
Όπως διακρίνεται στο διάγραμμα 2, χωρίζονται 4 κυτταρικοί πληθυσμοί. Ο πληθυσμός που απεικονίζεται στο πάνω αριστερά τεταρτημόριο είναι τα CD3+CD56- T λεμφοκύτταρα, ο πληθυσμός που απεικονίζεται κάτω δεξιά είναι τα CD56+CD3- NK λεμφοκύτταρα και ο διπλά θετικός πληθυσμός επάνω δεξιά (CD56+CD3+) είναι τα NKT κύτταρα.

Χρώση των λεμφοκυττάρων με το επιπλέον αντίσωμα έναντι του επιφανειακού επιτόπου CD4 σε συνδυασμό με τα αντισώματα έναντι των CD3 και CD56 επιτρέπει την διεξαγωγή πολυπαραμετρικής (3-color) κυτταρομετρικής ανάλυσης και τον προσδιορισμό CD4+ T και CD4+ CD56+ λεμφοκυτταρικών πληθυσμών. Ειδικότερα εντός του sub-gate των T λεμφοκυττάρων (CD3+ CD56-), η προσθήκη του αντισώματος έναντι του CD4 επιτρέπει τον χαρακτηρισμό του υποπληθυσμού των βοηθητικών T κυττάρων (CD3+ CD56-CD4+) (δεξιά στο διάγραμμα3) και των κυτταροτοξικών T κυττάρων (CD3+CD56-CD4-) που αποτελούνται επί το πλείστον από τα CD8 Tc κύτταρα.



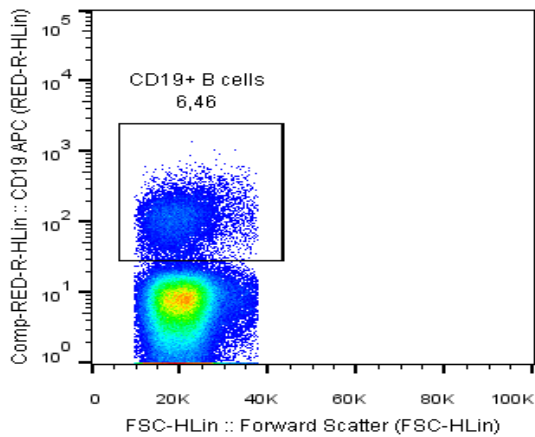
Διάγραμμα 3: Διάκριση T υποπληθυσμών έπειτα από χρώση με αντίσωμα έναντι του επιτόπου CD4.

Παρομοίως εντός του sub-gate των CD56+ λεμφοκυττάρων (CD3- CD56+), η προσθήκη του αντισώματος έναντι του CD4 επιτρέπει τον χαρακτηρισμό υποπληθυσμού των (CD56+ CD4+) (NKT) κυττάρων (δεξιά στο διάγραμμα 4) και των (CD56+CD4-) NK κυττάρων.



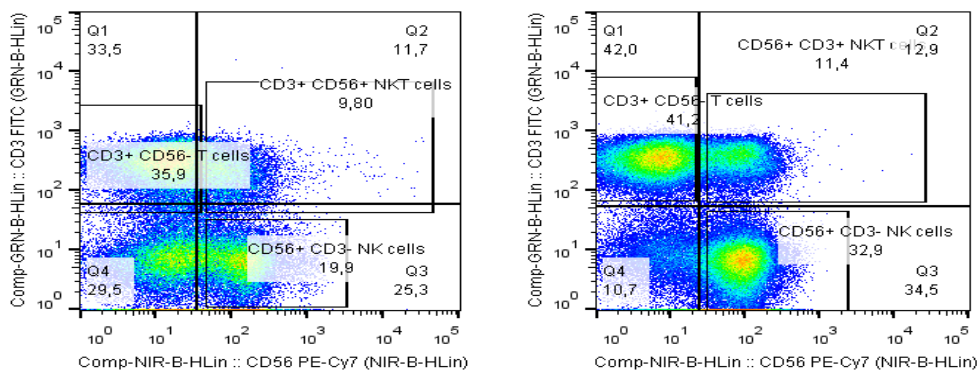
Διάγραμμα 4: Διάκριση CD4+ και CD4- υποπληθυσμών εντός των CD56+ λεμφοκυττάρων σε NKT και NK κύτταρα.

Για τον προσδιορισμό των B λεμφοκυττάρων κυττάρων διενεργήθηκε χρώση με συζευγμένο αντίσωμα έναντι του επιφανειακού επιτόπου CD19 (Διάγραμμα 5).

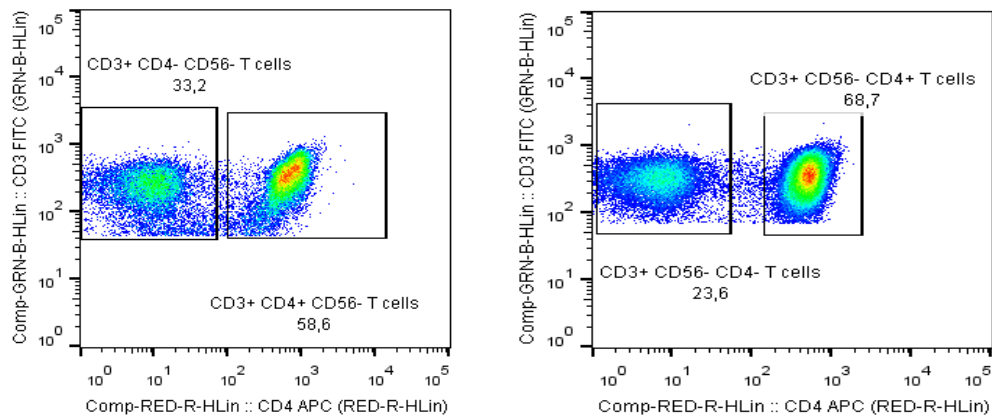


Διάγραμμα 5: Διάκριση B λεμφοκυττάρων με το CD19.

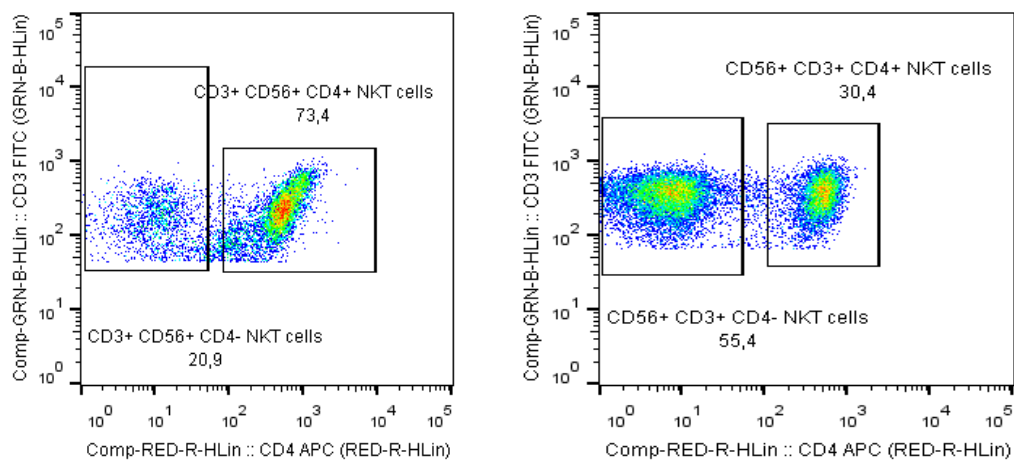
Παρακάτω παραθέτονται ενδεικτικά διαγράμματα (Διαγράμματα 6-10) προσδιορισμού επιφανειακών επιτόπων σε έναν υγιή μάρτυρα και έναν ασθενή με PD. Σε όλα τα δείγματα της μελέτης, η επιφανειακή χρώση και ο προσδιορισμός κυτταρικών υποπληθυσμών ήταν επιτυχής.



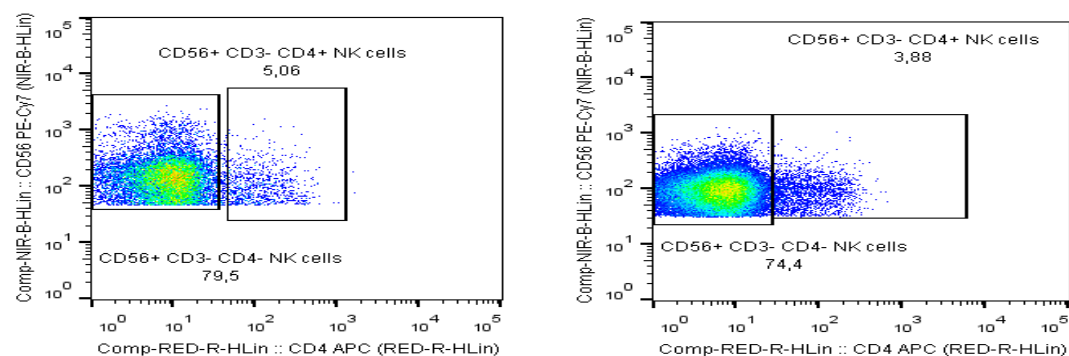
Διάγραμμα 6: Ενδεικτικός προσδιορισμός των κύριων πληθυσμών T, NKT και NK κυττάρων (αριστερά: υγιής μάρτυρας, δεξιά: ασθενής με PD)



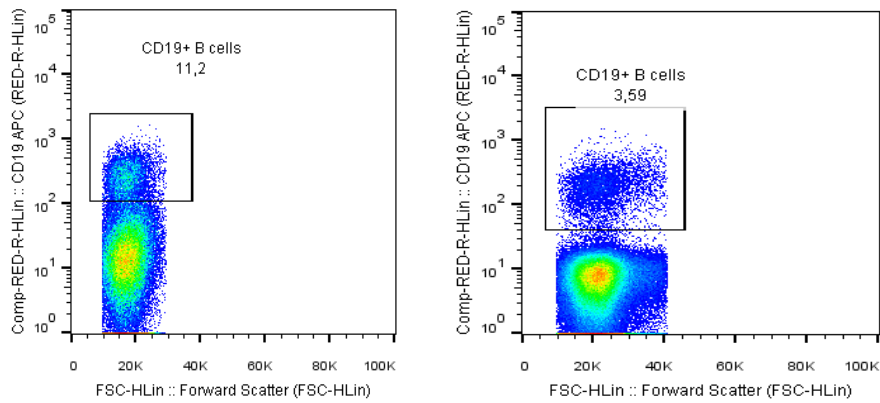
Διάγραμμα 7: Ενδεικτικός προσδιορισμός CD4+ και CD4- υποπληθυσμών T λεμφοκυττάρων (αριστερά: υγής μάρτυρας, δεξιά: ασθενής με PD)



Διάγραμμα 8: Ενδεικτικός προσδιορισμός εντός των CD56+CD3+ κυττάρων (NKT) των CD4+ και CD4- υποπληθυσμών (αριστερά: υγής μάρτυρας, δεξιά: ασθενής με PD)



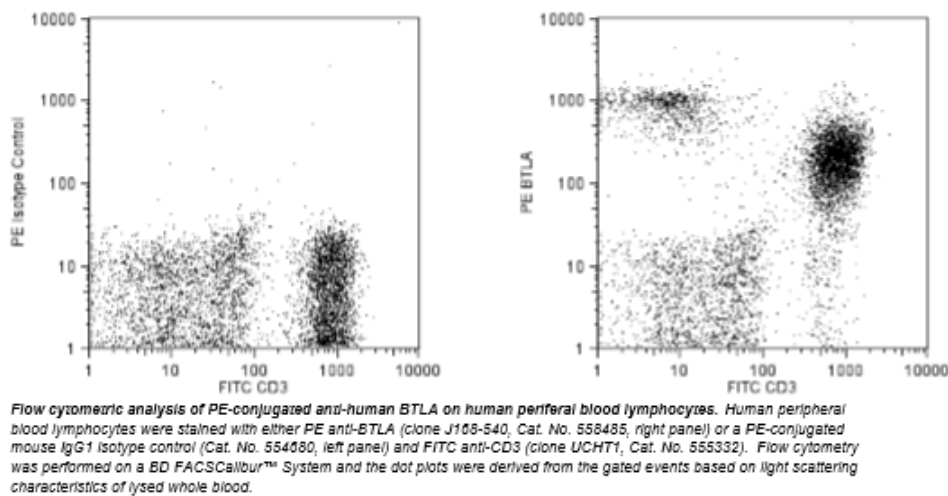
Διάγραμμα 9: Ενδεικτικός προσδιορισμός εντός των CD56+CD3- κυττάρων (NK) των CD4+ και CD4- υποπληθυσμών (αριστερά: υγής μάρτυρας, δεξιά: ασθενής με PD)



Διάγραμμα 10: Ενδεικτικός προσδιορισμός των B λεμφοκυττάρων (CD19+) (αριστερά: υγιής μάρτυρας, δεξιά: ασθενής με PD)

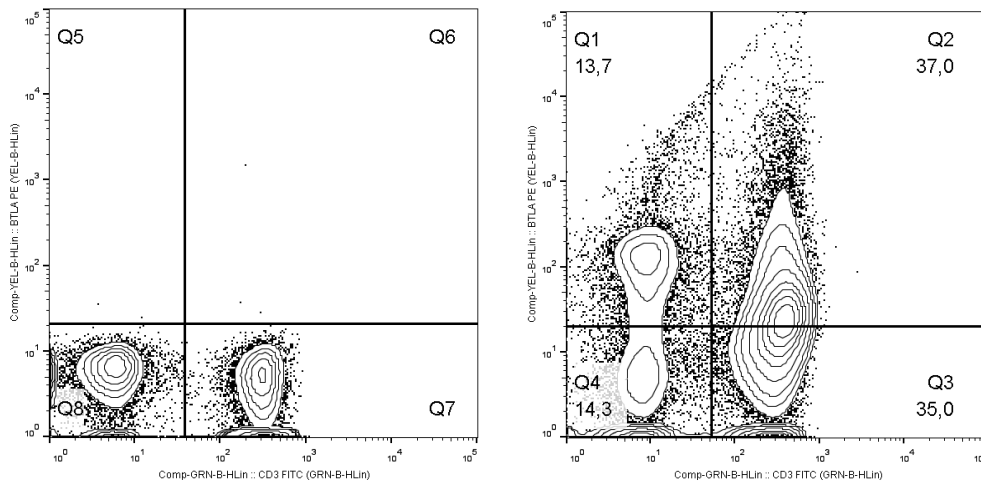
2. Προσδιορισμός του επιφανειακού BTLA σε κάθε υποπληθυσμό

Για τον επιτυχή προσδιορισμό των BTLA⁺ κυττάρων εντός των κυτταρικών υποπληθυσμών χρησιμοποιήθηκαν αρχικά αντίσωμα ισotyπου (isotype IgG control), όπως επίσης και κύτταρα χωρίς την προσθήκη αντισώματος (cells only), ώστε να διερευνηθούν τα επίπεδα μη ειδικής χρώσης (background staining) του συζευγμένου με PE αντισώματος έναντι του BTLA για τον κάθε λεμφοκυτταρικό υποπληθυσμό. Σε κάθε πείραμα, η μη ειδική πρόσδεση του BTLA αντισώματος ήταν ελάχιστη και τα BTLA⁺ κύτταρα προσδιορίστηκαν επιτυχώς. Επίσης, παρατίθεται και το ενδεικτικό υπόμνημα της εταιρείας (product insert) όσον αφορά την ορθή χρήση και αναμενόμενη χρώση του συγκεκριμένου αντισώματος.

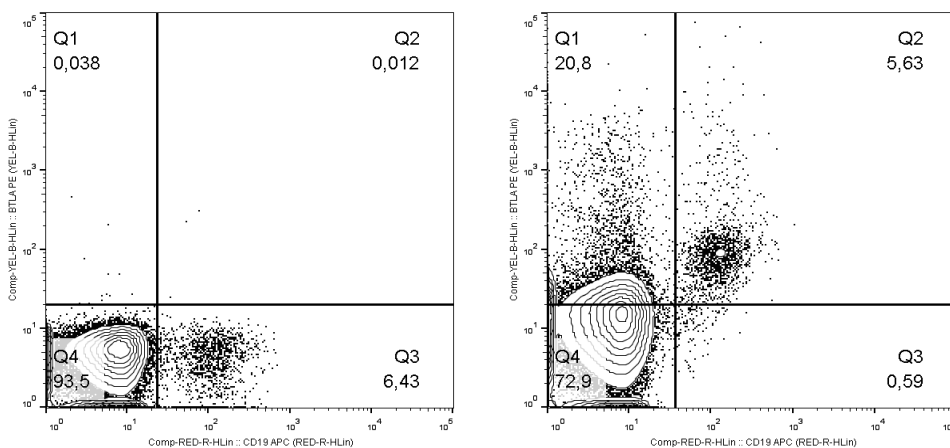


Εικόνα 23: Υπόμνημα της εταιρείας για τη χρώση του αντισώματος BTLA

Σύμφωνα και με το υπόμνημα της εταιρείας, παρουσιάζεται παρακάτω ενδεικτική εικόνα της χρώσης των CD3+ και των CD19+ κυττάρων μαζί με το αντίσωμα έναντι του BTLA.



Εικόνα 24: Στο αριστερό διάγραμμα τα κύτταρα έχουν σημασθεί με αντίσωμα έναντι των CD3 επιτόπων απουσία BTLA. Εμφανίζονται δύο πληθυσμοί. Ο πληθυσμός στο Q7 τεταρτημόριο είναι θετικός ως προς το CD3, ενώ αυτός στο Q8 είναι αρνητικός CD3. Στο δεξί διάγραμμα, τα κύτταρα έχουν σημασθεί για το CD3 και το BTLA. Διακρίνονται τέσσερις πληθυσμοί. Στο Q1 τεταρτημόριο εντοπίζονται τα CD3-BTLA+ λεμφοκύτταρα, στο Q2 τεταρτημόριο τα διπλά θετικά λεμφοκύτταρα CD3+BTLA+, στο Q3 τεταρτημόριο τα CD3+BTLA- λεμφοκύτταρα και στο Q4 τεταρτημόριο τα διπλά αρνητικά λεμφοκύτταρα CD3-BTLA-.

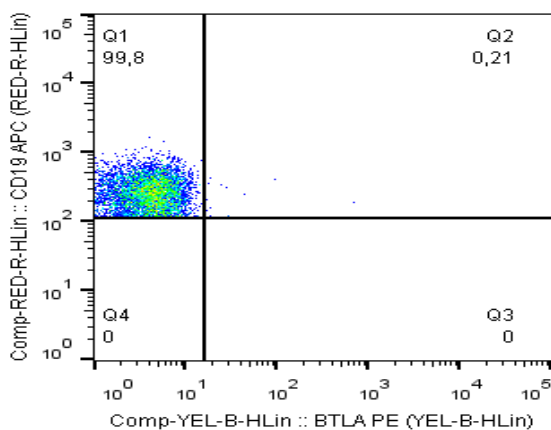


Εικόνα 25: Στο αριστερό διάγραμμα τα κύτταρα έχουν σημασθεί με αντίσωμα έναντι των CD19 επιτόπων απουσία BTLA. Εμφανίζονται δύο πληθυσμοί. Ο πληθυσμός στο Q3 τεταρτημόριο είναι θετικός ως προς το CD19, ενώ αυτός στο Q4 είναι αρνητικός CD19. Στο δεξί διάγραμμα, τα κύτταρα έχουν σημασθεί για το CD19 και το BTLA. Διακρίνονται τέσσερις πληθυσμοί. Στο Q1 τεταρτημόριο εντοπίζονται τα CD19-BTLA+ λεμφοκύτταρα, στο Q2 τεταρτημόριο τα διπλά

θετικά λεμφοκύτταρα CD19+BTLA+, στο Q3 τεταρτημόριο τα CD19+BTLA- λεμφοκύτταρα και στο Q4 τεταρτημόριο τα διπλά αρνητικά λεμφοκύτταρα CD19-BTLA-.

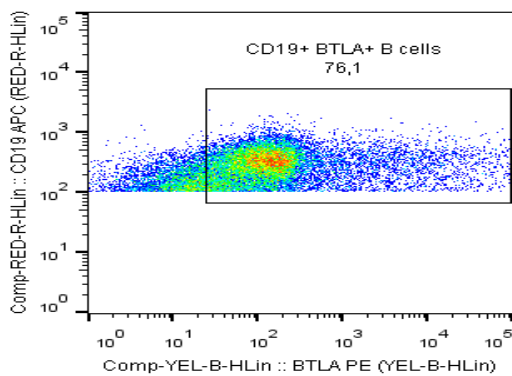
Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικές χρώσεις λεμφοκυττάρων, τα οποία επώαστηκαν με όλα τα αντισώματα έναντι των επιφανειακών επιτόπων εκτός από το BTLA και λεμφοκυττάρων με όλα τα αντισώματα επιφανειακών επιτόπων μαζί με αυτό έναντι του BTLA (four color για τα T και CD56 κύτταρα και two color για τα B κύτταρα πολυπαραμετρικές αναλύσεις). Οι επιμέρους υποπληθυσμοί διαχωρίστηκαν με sub gating ανάλογα με την έκφραση των επιφανειακών τους επιτόπων, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Η έκφραση του BTLA προσδιορίστηκε εντός κάθε υποπληθυσμού ξεχωριστά.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε διχρωματική σήμανση (2 color) κυττάρων όσον αφορά την έκφραση του BTLA στα CD19 (B λεμφοκύτταρα).



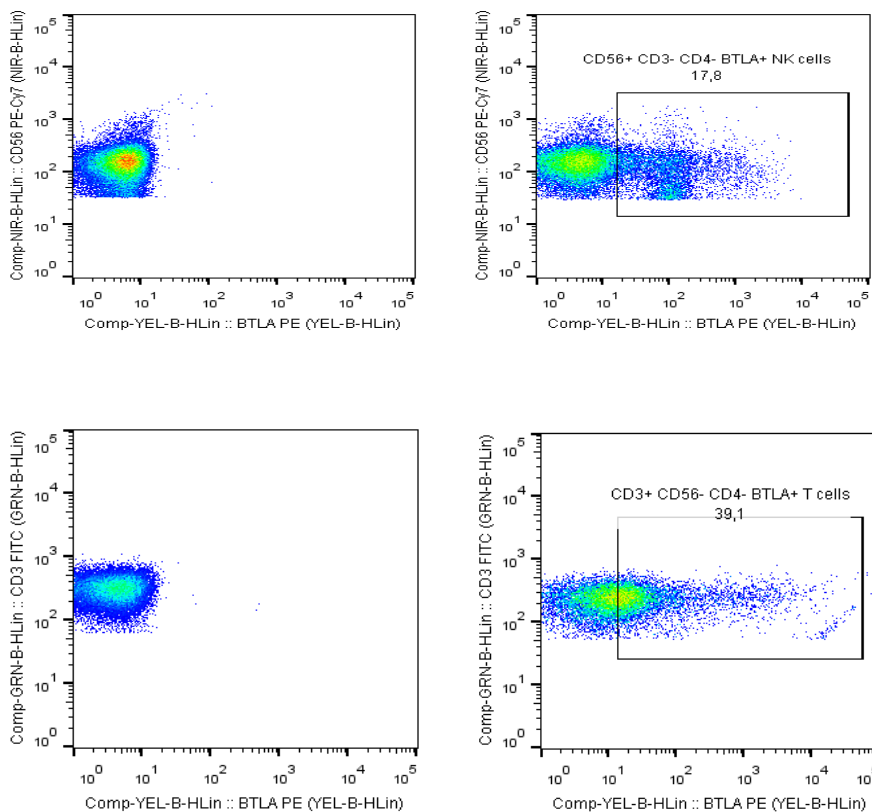
Διάγραμμα 11: Χρώση των CD19+ επιλεγμένων (gated) λεμφοκυττάρων με ισουτυπικό μάρτυρα (IgG-PE)

Προσθέτοντας το αντίσωμα έναντι του BTLA, μπορούμε πλέον να τοποθετήσουμε τους άξονες.



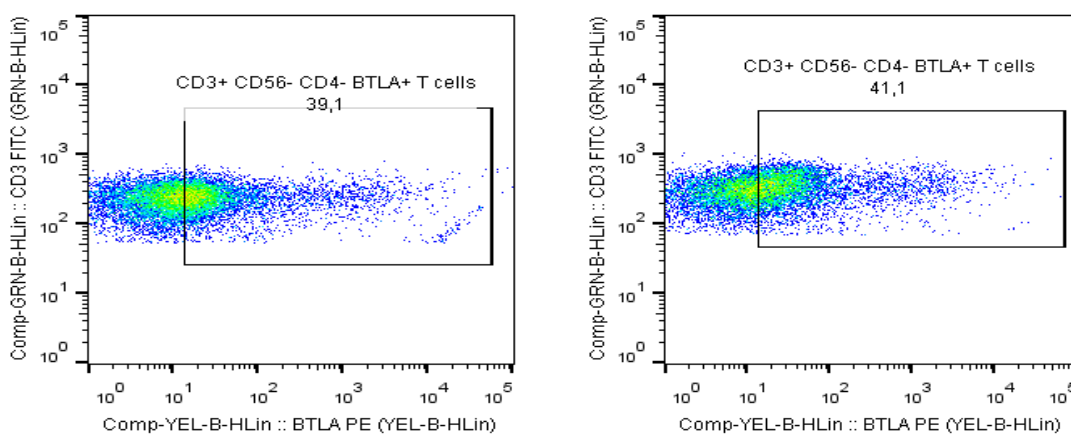
Διάγραμμα 12: Επιλογή του BTLA+ υποπληθυσμού CD19+ κύτταρων

Η ίδια διαδικασία για τον προσδιορισμό της θέσης των αξόνων με τη βοήθεια ιστοτυπικού μάρτυρα (IgG-PE) πραγματοποιήθηκε για όλους τους πληθυσμούς ξεχωριστά (Διάγραμμα 13).

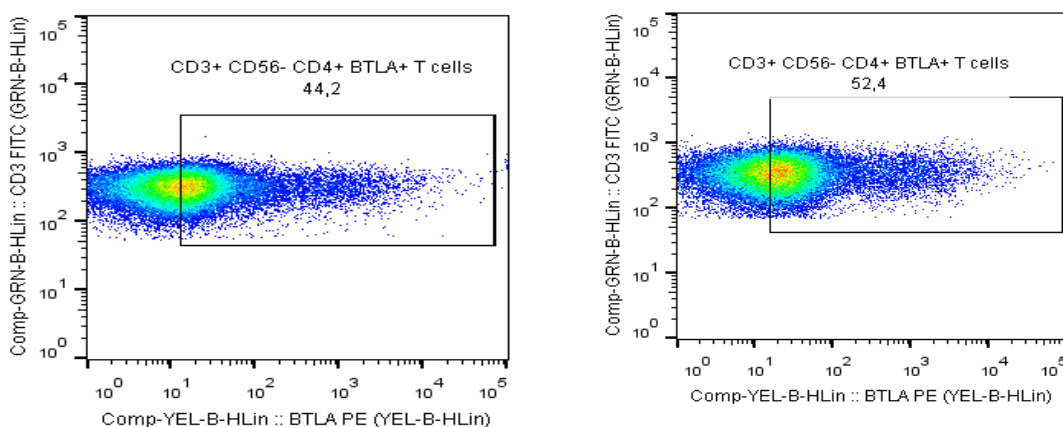


Διάγραμμα 13: Χρήση ιστοτυπικών μαρτύρων για τον ορισμό των BTLA θετικών πληθυσμών NK και T κυττάρων. Ενδεικτικά διαγράμματα BTLA θετικών υποπληθυσμών μέσα στα CD56+CD3-CD4-κύτταρα (επάνω) και στα CD3+CD56-CD4- κύτταρα (κάτω).

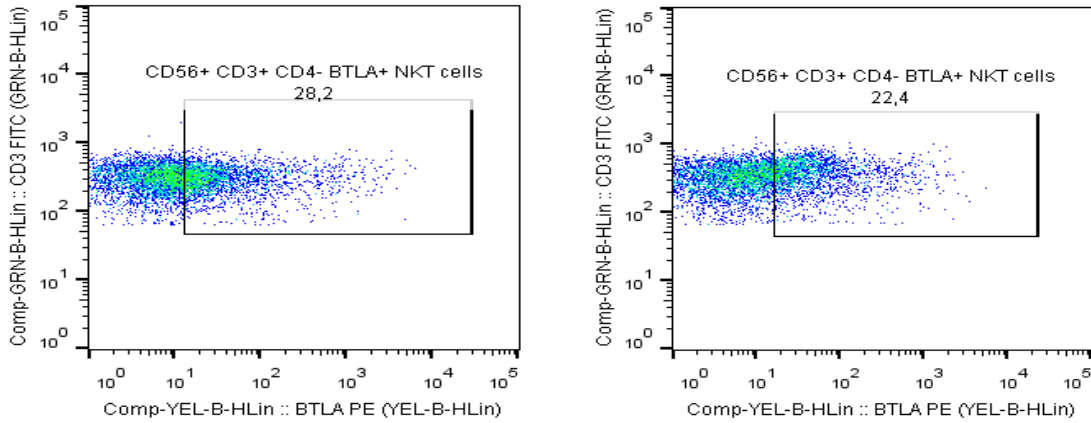
Ακολούθως, παρατίθενται διαγράμματα προσδιορισμού της έκφρασης της πρωτεΐνης BTLA στους λεμφοκυτταρικούς υποπληθυσμούς που προσδιορίστηκαν στην πρώτη φάση της εργασίας στις δύο ομάδες της μελέτης (υγιείς μάρτυρες & ασθενείς με PD).



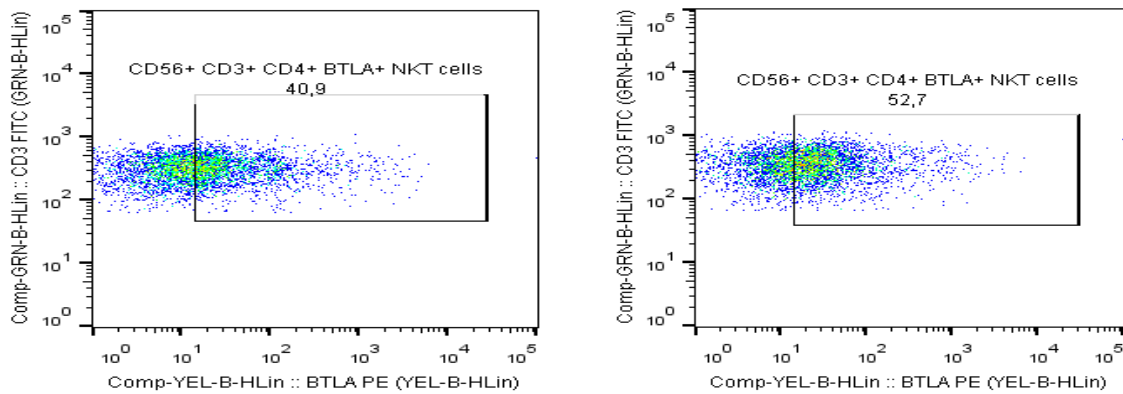
Διάγραμμα 14: Ενδεικτικός προσδιορισμός των BTLA+ υποπληθυσμών των T κυτταροτοξικών κυττάρων (CD3+CD56-CD4-) ανάμεσα στις δύο ομάδες (αριστερά: υγιής μάρτυρας, δεξιά: ασθενής με PD)



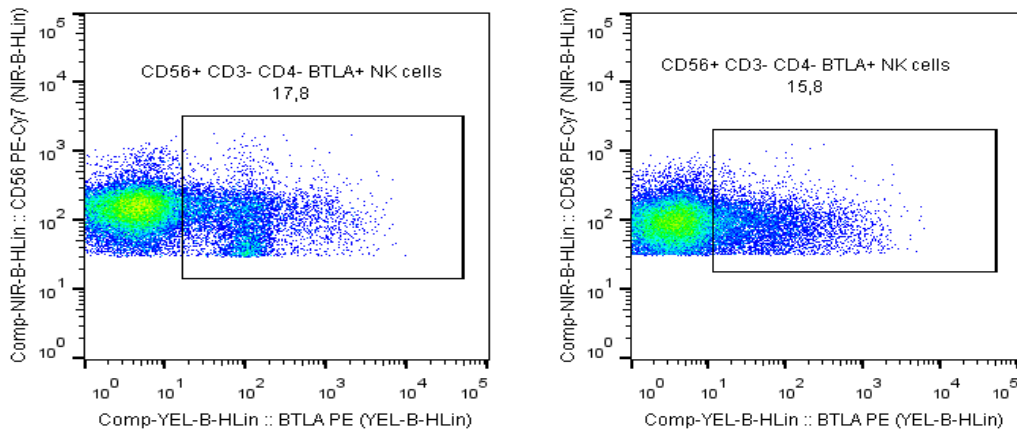
Διάγραμμα 15: Ενδεικτικός προσδιορισμός των BTLA+ υποπληθυσμών των T βοηθητικών κυττάρων (CD3+CD56-CD4+) ανάμεσα στις δύο ομάδες (αριστερά: υγιής μάρτυρας, δεξιά: ασθενής με PD).



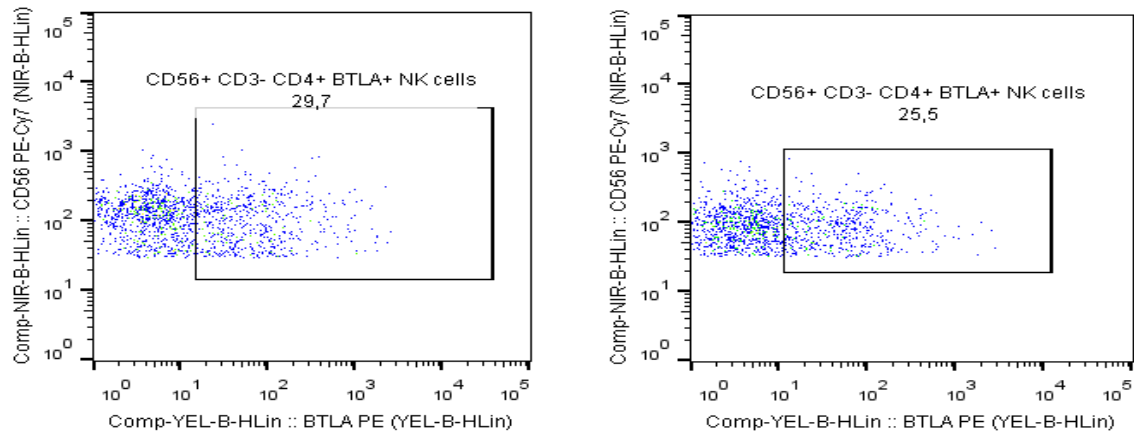
Διάγραμμα 16: Ενδεικτικός προσδιορισμός των BTLA+ υποπληθυσμών των NKT CD4- (CD3+CD56+CD4-) κυττάρων ανάμεσα στις δύο ομάδες (αριστερά: υγιής μάρτυρας, δεξιά: ασθενής με PD).



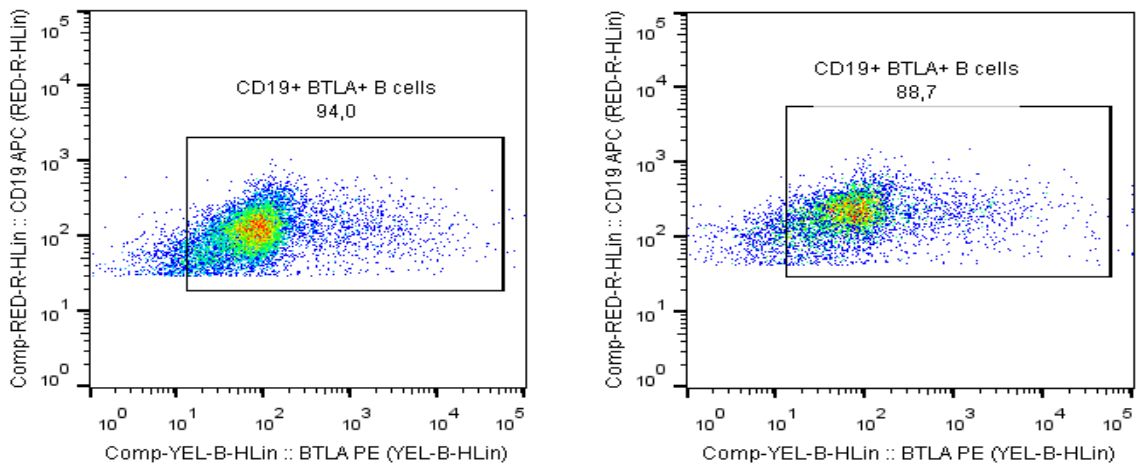
Διάγραμμα 17: Ενδεικτικός προσδιορισμός των BTLA+ υποπληθυσμών των NKT CD4+ (CD3+CD56+CD4+) κυττάρων ανάμεσα στις δύο ομάδες (αριστερά: υγιής μάρτυρας, δεξιά: ασθενής με PD).



Διάγραμμα 18: Ενδεικτικός προσδιορισμός των BTLA+ υποπληθυσμών των NK CD4- (CD3- CD56+CD4-) κυττάρων ανάμεσα στις δύο ομάδες (αριστερά: υγής μάρτυρας, δεξιά: ασθενής με PD).



Διάγραμμα 19: Ενδεικτικός προσδιορισμός των BTLA+ υποπληθυσμών των NK CD4+ (CD3- CD56+CD4+) κυττάρων ανάμεσα στις δύο ομάδες (αριστερά: υγής μάρτυρας, δεξιά: ασθενής με PD).



Διάγραμμα 20: Ενδεικτικός προσδιορισμός των BTLA+ υποπληθυσμών των B κυττάρων (CD19+) ανάμεσα στις δύο ομάδες (αριστερά: υγιής μάρτυρας, δεξιά: ασθενής με PD).

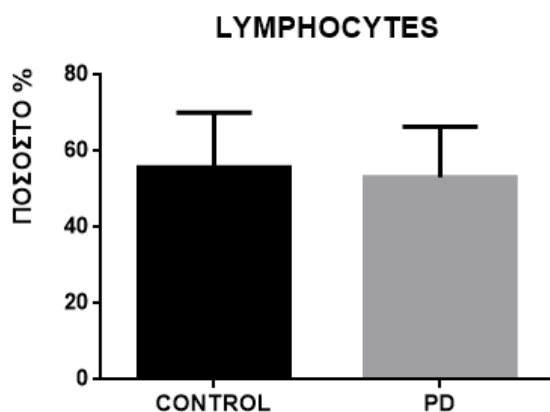
3. Στατιστική ανάλυση

Τα ποσοστά των διαφόρων λεμφοκυτταρικών πληθυσμών καθώς και τα ποσοστά των BTLA+ πληθυσμών των δειγμάτων PD ασθενών συγκρίθηκαν με αυτά των υγιών μαρτύρων ελέγχου. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία για όλα τα δείγματα. Πραγματοποιήθηκε ANOVA t-test ανάλυση για τον προσδιορισμό της σημαντικότητας των μέσων όρων των μετρήσεων για τον κάθε κυτταρικό πληθυσμό και προσδιορίστηκε η σημαντικότητα της διαφοράς τους (p value < 0.05).

Παρατίθενται παρακάτω τα διαγράμματα και τα στατιστικά δεδομένα των αναλύσεων για κάθε κυτταρικό υποπληθυσμό.

3.1. Προσδιορισμός του ολικού λεμφοκυτταρικού πληθυσμού ανάμεσα στις δύο ομάδες

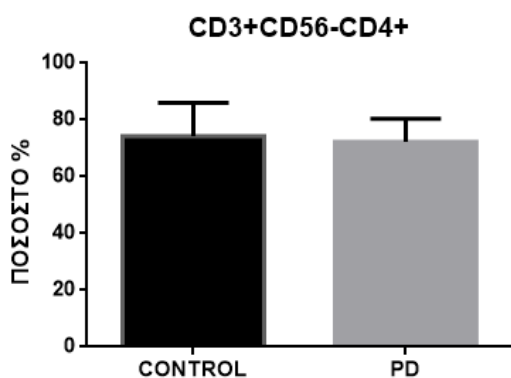
Το ολικό ποσοστό των λεμφοκυττάρων, μέσα στα οποία πραγματοποιήθηκαν οι επόμενες αναλύσεις, ήταν πανομοιότυπο στις δύο ομάδες (υγιείς μάρτυρες & ασθενείς PD). Ο λεμφοκυτταρικός πληθυσμός επιλέχθηκε με gating, όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 1, μέσα στα περιφερικά λευκοκύτταρα.



Διάγραμμα 21: Προσδιορισμός των ποσοστών (%) ολικών λεμφοκυτταρικών πληθυσμών ανάμεσα στους υγιείς μάρτυρες (n=8) και τους ασθενείς με PD (n=8).

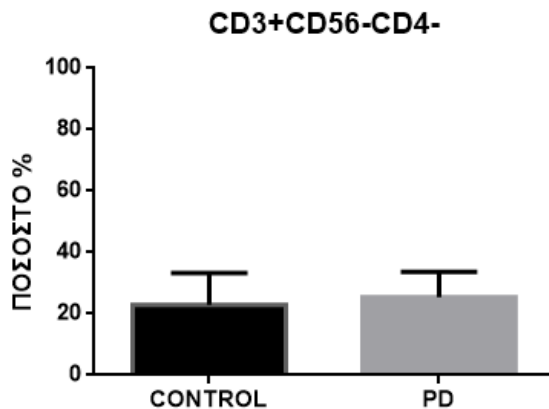
Ο μέσος όρος του ποσοστού των ολικών λεμφοκυττάρων στους ασθενείς με PD είναι $53,14 \pm 1,812$ και αυτός στους υγιείς μάρτυρες $55,80 \pm 1,829$. Το p value βρέθηκε ίσο με 0,3044 και επομένως δεν εντοπίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα δύο γκρουπ.

3.2. Στατιστική ανάλυση των T λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών ανάμεσα στις δύο ομάδες



Διάγραμμα 22: Σύγκριση των ποσοστών (%) του πληθυσμού T βοηθητικών κυττάρων (CD3+CD56-CD4+) ανάμεσα στους υγιείς μάρτυρες (n=8) και τους ασθενείς με PD (n=8)..

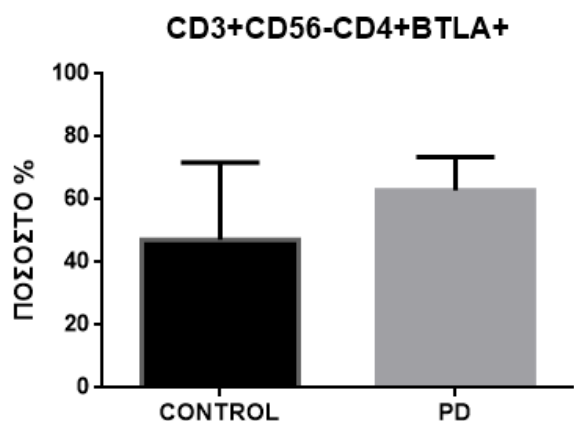
Ο μέσος όρος του ποσοστού του πληθυσμού των T βοηθητικών κυττάρων στους ασθενείς με PD είναι $72,32 \pm 1,753$ και αυτός στα υγιή control $74,31 \pm 3,251$. Το p value βρέθηκε ίσο με 0,5965 και επομένως δεν εντοπίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες.



Διάγραμμα 23: Σύγκριση των ποσοστών του πληθυσμού T κυτταροτοξικών κυττάρων (CD3+CD56-CD4-) ανάμεσα στους υγιείς μάρτυρες και τους ασθενείς με PD.

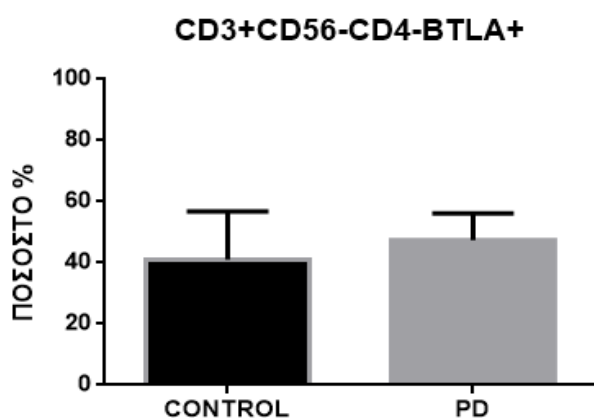
Ο μέσος όρος του ποσοστού του πληθυσμού στους ασθενείς με PD είναι $25,47 \pm 1,771$ και αυτός στα υγιή control $22,96 \pm 2,874$. Το p value βρέθηκε ίσο με 0,4653 και επομένως δεν εντοπίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες.

Μέσα στους προηγούμενους υποπληθυσμούς T λεμφοκυττάρων, συγκρίθηκαν επίσης τα ποσοστά των BTLA+ υποπληθυσμών. Ακολουθεί η στατιστική τους ανάλυση.



Διάγραμμα 24: Σύγκριση των ποσοστών των BTLA+ υποπληθυσμών των T βοηθητικών κυττάρων (CD3+CD56-CD4+BTLA+) ανάμεσα στους υγιείς μάρτυρες και τους ασθενείς με PD.

Ο μέσος όρος του ποσοστού των BTLA+ υποπληθυσμών των T βοηθητικών κυττάρων στους ασθενείς με PD είναι $62,88 \pm 3,211$ και αυτός στα υγιή control $47,21 \pm 8,678$. Το p value βρέθηκε ίσο με 0,1249 και επομένως δεν εντοπίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες.

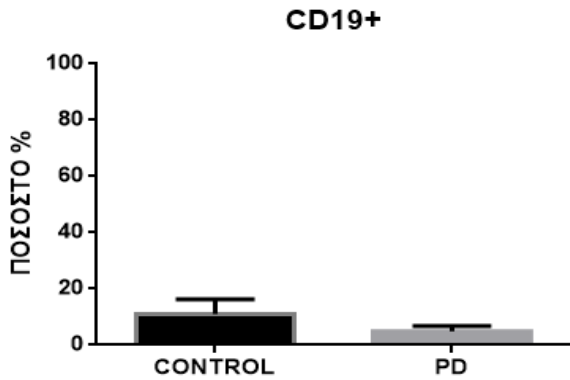


Διάγραμμα 25: Σύγκριση των ποσοστών των BTLA+ υποπληθυσμών των T κυτταροτοξικών κυττάρων (CD3+CD56-CD4-BTLA+) ανάμεσα στους υγιείς μάρτυρες και τους ασθενείς με PD.

Ο μέσος όρος του ποσοστού των BTLA+ υποπληθυσμών των T κυτταροτοξικών κυττάρων στους ασθενείς με PD είναι $41,03 \pm 5,572$ και αυτός στους υγιείς μάρτυρες $41,03 \pm 5,572$. Το p value βρέθηκε ίσο με 0,3215 και επομένως δεν εντοπίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες.

Συνοπτικά, στατιστικά σημαντική διαφορά δεν εντοπίστηκε ανάμεσα στους δύο υποπληθυσμούς T λεμφοκυττάρων (T βοηθητικών και T κυτταροτοξικών), αλλά ούτε και στην έκφραση της BTLA στους υποπληθυσμούς αυτούς ανάμεσα στις δύο ομάδες.

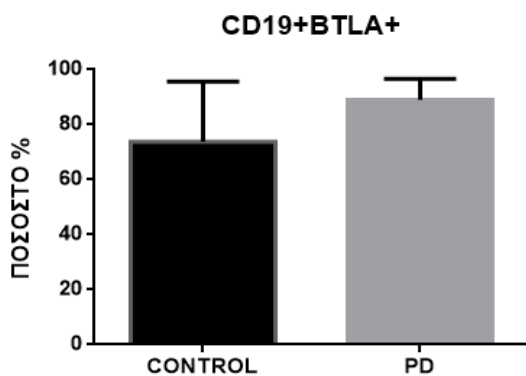
3.3. Στατιστική ανάλυση του πληθυσμού B λεμφοκυττάρων ανάμεσα στις δύο ομάδες



Διάγραμμα 26: Σύγκριση των ποσοστών του πληθυσμού των B λεμφοκυττάρων (CD19 +) ανάμεσα στους υγιείς μάρτυρες και τους ασθενείς με PD.

Ο μέσος όρος του ποσοστού του πληθυσμού των B λεμφοκυττάρων στους ασθενείς με PD είναι $4,920 \pm 0,3666$ και αυτός στους υγιείς μάρτυρες $11,05 \pm 0,8936$. Το p value βρέθηκε μικρότερο από 0,0001. Εντοπίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά (****) ανάμεσα στις δύο ομάδες.

Μέσα στους προηγούμενους πληθυσμούς B λεμφοκυττάρων, συγκρίθηκαν επίσης τα ποσοστά των BTLA+ υποπληθυσμών. Ακολουθεί η στατιστική τους ανάλυση.

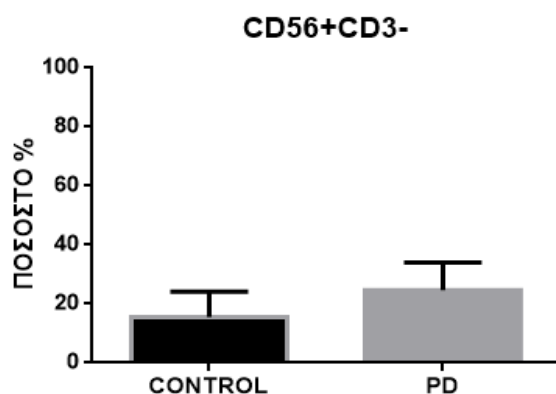


Διάγραμμα 27: Σύγκριση των ποσοστών του BTLA+ υποπληθυσμού των B λεμφοκυττάρων (CD19 +) ανάμεσα στους υγιείς μάρτυρες και τους ασθενείς με PD.

Ο μέσος όρος του ποσοστού του BTLA+ υποπληθυσμού των B λεμφοκυττάρων στους ασθενείς με PD είναι $89,01 \pm 1,987$ και αυτός στους υγιείς μάρτυρες $73,77 \pm 4,456$. Το p value βρέθηκε ίσο με 0,0038. Εντοπίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά (**) ανάμεσα στις δύο ομάδες.

Συνοπτικά, εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα ποσοστά B λεμφοκυττάρων στα δύο γκρουπ, όπου οι ασθενείς με PD παρουσιάζουν ελάττωση του πληθυσμού, αλλά και στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση της BTLA στους πληθυσμούς αυτούς, όπου οι ασθενείς με PD παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση.

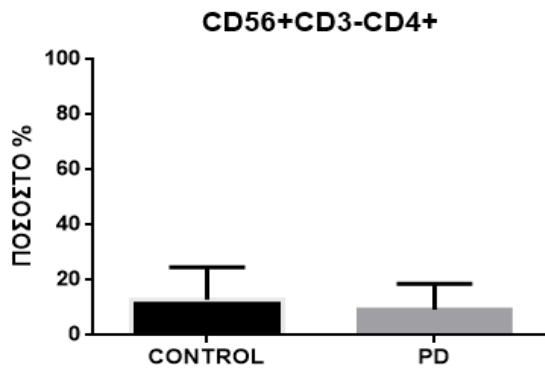
3.4. Στατιστική ανάλυση του NK πληθυσμού ανάμεσα στις δύο ομάδες



Διάγραμμα 28: Σύγκριση των ποσοστών του πληθυσμού NK κυττάρων (CD56 + CD3-) ανάμεσα στους υγιείς μάρτυρες και τους ασθενείς με PD.

Ο μέσος όρος του ποσοστού του πληθυσμού NK κυττάρων στους ασθενείς με PD είναι $24,70 \pm 1,915$ και αυτός στους υγιείς μάρτυρες $15,54 \pm 1,964$. Το p value βρέθηκε ίσο με 0,0018. Εντοπίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά (**) ανάμεσα στις δύο ομάδες.

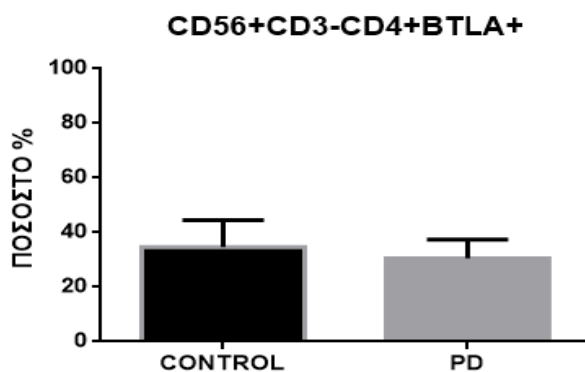
Έπειτα από σήμανση με το αντίσωμα έναντι του επιτόπου CD4, προσδιορίστηκε ο υποπληθυσμός CD4+ NK κυττάρων. Ακολουθεί η στατιστική του ανάλυση ανάμεσα στις δύο ομάδες.



Διάγραμμα 29: Σύγκριση των ποσοστών του υποπληθυσμού CD4+ των NK κυττάρων (CD56+CD3-CD4+) κυττάρων ανάμεσα στους υγιείς μάρτυρες και τους ασθενείς με PD.

Ο μέσος όρος του ποσοστού του υποπληθυσμού CD4+ των NK κυττάρων στους ασθενείς με PD είναι $9,320 \pm 2,031$ και αυτός στα υγιή control $12,97 \pm 3,257$. Το p value βρέθηκε ίσο με 0,3518. Δεν εντοπίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες.

Μέσα στον προηγούμενο πληθυσμό NK κυττάρων, συγκρίθηκαν επίσης τα ποσοστά των BTLA+ υποπληθυσμών. Ακολουθεί η στατιστική τους ανάλυση.

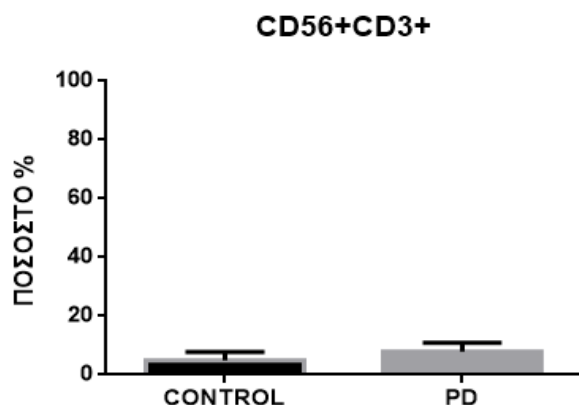


Διάγραμμα 30: Σύγκριση των ποσοστών του BTLA+ υποπληθυσμού των NK CD4+ κυττάρων (CD56+CD3-CD4+BTLA+) ανάμεσα στους υγιείς μάρτυρες και τους ασθενείς με PD.

Ο μέσος όρος του ποσοστού του BTLA+ υποπληθυσμού των NK CD4+ κυττάρων στους ασθενείς με PD είναι $30,51 \pm 2,090$ και αυτός στους υγιείς μάρτυρες $34,63 \pm 3,519$. Το p value βρέθηκε ίσο με 0,3348. Δεν εντοπίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες.

Συνοπτικά, εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα ποσοστά των NK (CD56+CD3-) κυττάρων στις δύο ομάδες, όπου οι ασθενείς με PD παρουσιάζουν αύξηση του πληθυσμού. Ο υποπληθυσμός CD4+ δεν παρουσιάζει σημαντική διαφορά, όπως επίσης και η έκφραση της BTLA στον υποπληθυσμό αυτό.

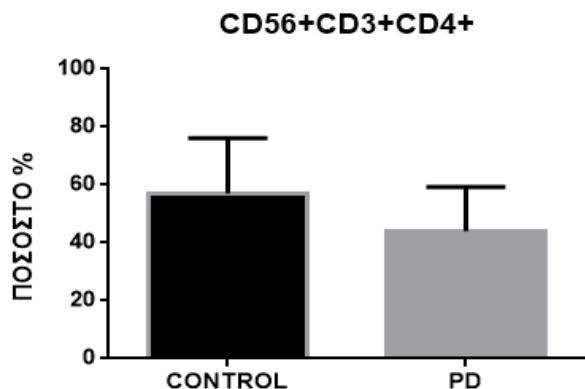
3.5. Στατιστική ανάλυση του NKT πληθυσμού ανάμεσα στις δύο ομάδες



Διάγραμμα 31: Σύγκριση των ποσοστών των NKT κυττάρων (CD56 + CD3+) ανάμεσα στους υγιείς μάρτυρες και τους ασθενείς με PD.

Ο μέσος όρος του ποσοστού των NKT κυττάρων στους ασθενείς με PD είναι $7,943 \pm 0,5986$ και αυτός στα υγιή control $4,971 \pm 0,6565$. Το p value βρέθηκε ίσο με 0,0018. Εντοπίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά (**)ανάμεσα στις δύο ομάδες.

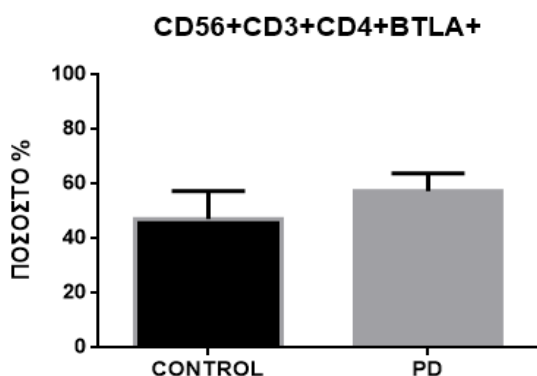
Έπειτα από σήμανση με το αντίσωμα έναντι του επιτόπου CD4, προσδιορίστηκε ο υποπληθυσμός CD4+ NKT κυττάρων. Ακολουθεί η στατιστική του ανάλυση ανάμεσα στις δύο ομάδες.



Διάγραμμα 32: Σύγκριση των ποσοστών του υποπληθυσμού CD4+ των NKT κυττάρων (CD56 + CD3+CD4+) ανάμεσα στους υγιείς μάρτυρες και τους ασθενείς με PD.

Ο μέσος όρος του ποσοστού του υποπληθυσμού CD4+ των NKT κυττάρων στους ασθενείς με PD είναι $44,03 \pm 3,340$ και αυτός στα υγιή control $57,01 \pm 5,332$. Το p value βρέθηκε ίσο με 0,0515. Εντοπίζεται οριακά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες.

Μέσα στον προηγούμενο πληθυσμό NKT κυττάρων, τα ποσοστά των BTLA+ υποπληθυσμών συγκρίθηκαν επίσης. Ακολουθεί η στατιστική τους ανάλυση.



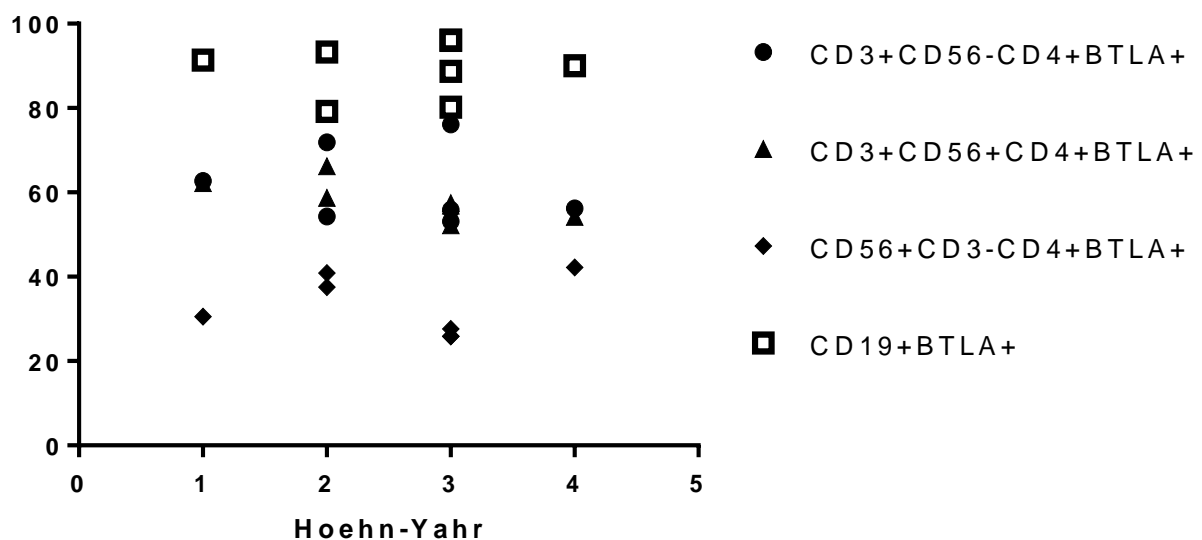
Διάγραμμα 33: Σύγκριση του πληθυσμού CD56 + CD3+CD4+BTLA+ κυττάρων ανάμεσα στους υγιείς μάρτυρες και τους ασθενείς με PD.

Ο μέσος όρος του ποσοστού του BTLA+ υποπληθυσμού των CD4+ NKT κυττάρων στους ασθενείς με PD είναι $57,38 \pm 1,982$ και αυτός στους υγιείς μάρτυρες $47,13 \pm 3,639$. Το p value βρέθηκε ίσο με 0,0307. Εντοπίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά (*) ανάμεσα στις δύο ομάδες.

Συνοπτικά, εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα ποσοστά των NKT (CD56+CD3+) κυττάρων στις δύο ομάδες, όπου οι ασθενείς με PD παρουσιάζουν αύξηση του πληθυσμού. Ο υποπληθυσμός CD4+ NKT παρουσιάζει οριακά στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους υγιείς και τους ασθενείς με PD. Επίσης, η έκφραση της BTLA στον υποπληθυσμό των NKT κυττάρων παρουσιάζεται στατιστικά σημαντικά αυξημένη στους ασθενείς.

3.6. Συσχέτιση της έκφρασης της πρωτεΐνης BTLA με τη σοβαρότητα της νόσου βάσει της κλίμακας Hoehn-Yahr

Τέλος, πραγματοποιήθηκε δοκιμασία συσχέτισης της έκφρασης της πρωτεΐνης BTLA με τη σοβαρότητα της νόσου βάσει της κλίμακας Hoehn-Yahr (αυξανόμενη σοβαρότητα από 1 έως 5) με τη χρήση του προγράμματος στατιστικής GraphPad Prism 6, όπου για κάθε ασθενή ξεχωριστά συσχετίστηκε η έκφραση της BTLA συναρτήσει της κλίμακας Hoehn-Yahr και προσδιορίστηκε η σημαντικότητα.



Διάγραμμα 34: Συσχέτιση έκφρασης BTLA βάσει της κλίμακας Hoehn-Yahr για κάθε ασθενή.

Πίνακας 14: Προσδιορισμός της στατιστικής σημαντικότητας της σχέσης (association) των ποσοστών των BTLA + υποπληθυσμών σε κάθε λεμφοκυτταρικό τύπου με την σοβαρότητα της νόσου σε κάθε ασθενή βάσει της κλίμακας Hoehn-Yahr. Δεν εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά σε κανέναν από τους υποπληθυσμούς.

	CD3+CD56- CD4+BTLA+	CD3+CD56+ CD4+BTLA+	CD56+CD3- CD4+BTLA+	CD19+ BTLA+
P value	0,6603	0,0610	0,9371	0,8743
P value summary	ns	Ns	ns	ns
Significant (alpha = 0.05)	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Με την ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης, επιτεύχθηκαν οι πρωταρχικοί στόχοι όπως αυτοί σχεδιάστηκαν και παρουσιάστηκαν στην *εισαγωγή*. Ειδικότερα συλλέχθηκαν δεδομένα σχετικά με την πλήρη ανοσοφαινοτυπική ταυτότητα των ασθενών με νόσο Parkinson, όπου εντοπίζεται σημαντική μείωση των Β κυττάρων και μικρότερη αύξηση των NK και NKT κυττάρων, καθώς και για τα επίπεδα έκφρασης της επιφανειακής πρωτεΐνης BTLA στα περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος (PBMCs), όπου εμφανίζεται αύξηση της στους πληθυσμούς Β, NK και NKT κυττάρων. Τα δεδομένα συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα υγιών μαρτύρων. Κατά την επιμέρους ανάλυση πραγματοποιήθηκε επίσης προσδιορισμός της συσχέτισης της σοβαρότητας της νόσου και της έκφρασης της BTLA και χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα των κυτταρομετρικών αναλύσεων των ασθενών και των κλινικών τους στοιχείων.

Αναλυτικότερα, ένα από τα πιο κύρια ευρήματα της μελέτης αποτελεί η στατιστικά σημαντική μείωση των Β (CD19+) κυττάρων στους ασθενείς με PD. Συγκεκριμένα, το ποσοστό των Β κυττάρων στους υγιείς ανέρχεται στο 11%, ενώ στους ασθενείς δεν ξεπερνά το 4,9% (Διάγραμμα 26). Εντούτοις, ο BTLA+ υποπληθυσμός των Β κυττάρων παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αύξηση στους ασθενείς, αγγίζοντας το 89%, σε σύγκριση με τους υγιείς που προσεγγίζει το 73,8% (Διάγραμμα 27). Τα ευρήματα της μελέτης αναδεικνύουν τον υποπληθυσμό των Β κυττάρων ως τον κύριο κυτταρικό πληθυσμό όπου παρατηρείται υψηλή έκφραση του BTLA. Ο ρόλος των Β κυττάρων στην παθογένεια της PD έχει επισημανθεί σε αρκετές μελέτες, όπου έχουν παρατηρηθεί και μελετηθεί η ανοσοαντιδραστικότητα της IgG [138] και η διεύδυση κυττάρων Β [139] εντός της οδού εκφύλισης, κατά την υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης σε ζωικά μοντέλα. Σε άλλες μελέτες προέκυψε ότι ο ορός IgG που μεταφέρθηκε από ασθενείς με PD σε μέλαινα ουσία ποντικού, ευθυνόταν για τον θάνατο κυττάρων [140]. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης υποδηλώνουν σημαντική έλλειψη ολικών Β κυττάρων και κατά συνέπεια του υποπληθυσμού των ανοσορυθμιστικών BTLA+CD19+. Ωστόσο, η αύξηση των επιπέδων της έκφρασης του BTLA στα κύτταρα ασθενών με PD αντανακλά την ενεργοποίηση ανοσορυθμίσεως και καταστολής των κυττάρων αυτών, μέσω ενός ενδογενούς μοριακού μηχανισμού που αξίζει να μελετηθεί περαιτέρω σε μελλοντικά πειράματα.

Σε αντίθεση, τα ποσοστά των NK κυττάρων (CD56+CD3-) παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική αύξηση στους ασθενείς με PD, αγγίζοντας το 24,7% σε σύγκριση με το 15,5% των μαρτύρων. Ωστόσο, η έκφραση της BTLA δεν παρουσιάζει κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή ανάμεσα στα δύο γκρουπ (Διαγράμματα 28-30). Το αυξημένο ποσοστό των NK κυττάρων στην παρούσα, αλλά και σε άλλες μελέτες, καταδεικνύει αυξημένη και εξαρτώμενη

από αντίσωμα κυτταρική τοξικότητα στη νόσο PD [141]. Ο κύριος μηχανισμός που συνδέεται με την κυτταροτοξική τους δράση, αφορά στη πρόσδεση της αυξημένης IgG στους υποδοχείς FcR. Η IgG ενεργοποιεί τον κυτταρικό θάνατο μέσω διαφόρων οδών. Μελέτες σε ποντίκια με έλλειψη FcγRI / III και θραύσματα Fab εμφάνισαν προστασία έναντι κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από IgG ανθρώπου [142]. Στη μέλαινα ουσία ασθενών με PD, FcγRI (CD64) / FcεRII (CD23) έχουν παρατηρηθεί στη μικρογλοία και FcγRIII (CD16) σε κύτταρα που μορφολογικά μοιάζουν με λεμφοκύτταρα [143]. Τα κύτταρα NK εκφράζουν FcR και οδηγούν στην απόπτωση κύτταρα με δεσμευμένη με FcR IgG.

Επιπλέον, αύξηση εντοπίζεται και στα ποσοστά των NKT (CD56+CD3+) κυττάρων των ασθενών, προσεγγίζοντας το 7,9%, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στους υγιείς κυμαίνεται κατά μέσο όρο στο 4.9% (Διάγραμμα 31). Στατιστικά σημαντική αύξηση του BTLA ανιχνεύεται επίσης στους ασθενείς. Συγκεκριμένα, μετά τη σήμανση με το αντίσωμα έναντι του επιτόπου CD4, ο CD4+ υποπληθυσμός των NKT κυττάρων παρουσιάζει αύξηση της έκφρασης BTLA σε ποσοστό 57%, ενώ η αντίστοιχη έκφραση στους υγιείς καταγράφεται κατά 10 μονάδες μικρότερη (Διάγραμμα 33). Παρόλα αυτά, δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα για το συγκεκριμένο λεμφοκυτταρικό πληθυσμό, τα οποία θα συνέβαλαν στην συγκριτική παράθεση των αποτελεσμάτων. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης αναδεικνύουν για πρώτη φορά τον πληθυσμό των NKT κυττάρων ως σημαντικό παράγοντα που επιδρά στην ανοσορύθμιση και την καταστολή της φλεγμονής μέσω της αύξησης έκφρασης του BTLA και πιθανώς την παραγωγή αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών. Ο συγκεκριμένος κυτταρικός πληθυσμός, καθώς και τα επίπεδα έκφρασης του BTLA χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών και υγιών μαρτύρων.

Ακολούθως, οι υποπληθυσμοί των συμβατικών (conventional) T λεμφοκυττάρων, δηλαδή τα βοηθητικά (CD3+CD56-CD4+) και τα κυτταροτοξικά (CD3+CD56-CD4-) κύτταρα, δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές ανάμεσα στις δύο ομάδες, όπως επίσης και η έκφραση της BTLA μέσα σε αυτούς (Διαγράμματα 22-25). Σύμφωνα όμως με την υπάρχουσα βιβλιογραφία φαίνεται ότι η περιφερειακή ομάδα T-κυττάρων μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της PD [144]. Συγκεκριμένα, ο πληθυσμός CD4 + βρέθηκε να μειώνεται [145]. Η παρατηρούμενη μείωση πιθανό να οφείλεται στην αυξημένη οξειδωτική βλάβη του DNA [146] και την επαγωγή απόπτωσης [147]. Τα κύτταρα CD4 + γδΤ, τα οποία ενεργοποιούνται κυρίως τοπικά και όχι σε δευτερογενή λεμφοειδή όργανα, αυξάνονται τόσο στην περιφέρεια όσο και στο CSF (εγκεφαλονωτιαίο υγρό) ασθενών με PD όπου εμφανίζουν ενεργοποιημένο φαινότυπο [148]. Επομένως, το επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα επικουρεί στην παθοφυσιολογία της PD, καθώς CD4 / CD8 T-κύτταρα διεισδύουν στη μέλαινα ουσία ασθενών με PD [149] και

συμβάλλει σε αγγειακές αλλαγές κατά τη διάρκεια της νόσου [150]. Σε εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με PD, ο τύπος της απόκρισης των T-κυττάρων φαίνεται να ποικίλλει ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι κυτταρικού θανάτου: στην απουσία του, η απόκριση συνίσταται κυρίως από CD4 T κύτταρα, ενώ όταν παρουσία κυτταρικού θανάτου, η διήθηση καθυστερεί και η αναλογία CD4 T κύτταρα σε σύγκριση με τα CD8 T κύτταρα μειώνεται [151].

Επιπρόσθετα, έχουν μελετηθεί τα γονίδια για διάφορες κυτοκίνες, χημειοκίνες και πρωτεΐνες οξείας φάσης για τον εντοπισμό πιθανών συσχετισμών μεταξύ συγκεκριμένων SNPs και συχνότητας εμφάνισης PD πρώιμης ή όψιμης έναρξης [152]. Η παρουσία αυξημένων επιπέδων κυτοκινών [συμπεριλαμβανομένου του TNF, IL-1β, IL-2, IL-4 και IL-6] ανιχνεύθηκε μεταθανάτια στη μέλαινα ουσία ασθενών με PD [153]. Αυτό πιθανό να οφείλεται στο γεγονός ότι η νευροφλεγμονώδης απόκριση είναι αποτέλεσμα τελικού σταδίου ενεργοποίησης της μικρογλοίας που συμβαίνει μετά τον νευρικό θάνατο. Επιπλέον, το τοπικό περιβάλλον που δημιουργείται από την ενεργοποίηση σηματοδοτικών οδών που επάγονται από κυτοκίνες επηρεάζει τόσο την επιβίωση των ντοπαμινεργικών νευρώνων όσο και την πορεία της PD. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα του TNF στον υγιή εγκέφαλο ενηλίκων ανιχνεύονται γενικά πολύ χαμηλά και παράγονται κυρίως από νευρώνες [154]. Ωστόσο, στην περιοχή της μέγιστης καταστροφής όπου βρίσκονται οι ευάλωτοι μελανοποιημένοι νευρώνες που παράγουν ντοπαμίνη στον κοιλιακό μέσο εγκέφαλο, τα επίπεδα των TNF, IL-1β και IFN γ αυξάνονται σημαντικά σε ασθενείς με PD σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες [155]. Αυξημένη συγκέντρωση κυτοκινών έχει επίσης αναφερθεί και στην περιφερική κυκλοφορία των ασθενών με PD [156], γεγονός που πιθανό να υποδηλώνει την παρουσία ορισμένων μη κινητικών συμπτωμάτων της PD. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα του TNF στον ορό ασθενών με PD διαπιστώθηκε ότι ήταν υψηλότερα σε ασθενείς με πιο σοβαρά συμπτώματα κατάθλιψης και κόπωσης [157], καθώς και διαταραχές τόσο της γνωστικής λειτουργίας όσο και του ύπνου [158]. Έχει αναφερθεί ότι το ENY ασθενών με PD περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις IL-1β [159], χωρίς όμως το εύρημα αυτό να παρουσιάζει μεγάλη ειδικότητα σε εγκέφαλο ασθενών Alzheimer και άνοια LB. Εμφανίζεται επίσης μικρογλοία που εκφράζει IL-1β κοντά σε νευρώνες που είναι εξαιρετικά ανοσοαντιδραστικοί για την πρόδρομη πρωτεΐνη β-αμυλοειδούς και περιέχουν τόσο LBs όσο και νευροϊνιδιακά συσσωματώματα [160]. Στην πραγματικότητα, τα ευρήματα αυτά συγκλίνουν στην άποψη ότι η IL-1β ευθύνεται για την κλινική και νευροπαθολογική αλληλεπικάλυψη μεταξύ AD και PD [161]. Πληθώρα μελετών υποστηρίζει τη συμβολή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών στην εξέλιξη της νόσου PD. Ωστόσο, σε ασθενείς με νόσο PD έχουν αναφερθεί αυξημένα επίπεδα και άλλων κυτοκινών με αντιφλεγμονώδεις ή επιδιορθωτικές λειτουργίες, όπως η IL-10 [162]. Η ήδη επιτυχημένη χρήση των αντι-TNF βιολογικών παραγόντων στη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου και της

ψωρίασης παραπέμπει στην άποψη ότι οι παράγοντες αυτοί δύνανται να προσφέρουν θεραπευτικό όφελος σε ασθενείς με PD ή άλλες νευρολογικές διαταραχές που χαρακτηρίζονται από χρόνια νευροφλεγμονή [163] .

Εν τέλει, δεν έχουν διεξαχθεί άλλες μελέτες για την επίδραση της BTLA στη νόσο Parkinson. Στην παρούσα έρευνα, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της BTLA και του σταδίου της νόσου βάσει της κλίμακας Hoehn-Yahr, αλλά επισημαίνεται μία τάση αύξηση της BTLA στους πληθυσμούς των B, NK και NKT κυττάρων. Σε παρόμοια μελέτη του Piancone και συνεργατών το 2016 [164] για τη σκλήρυνση κατά πλάκας και τον ρόλο της χυμικής ανοσίας, αναφέρεται ότι τα B κύτταρα που εκφράζουν BTLA (CD19 + , BTLA + , IL-10 + κύτταρα) μειώνονται σημαντικά σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν σε RRMS έδειξαν ότι η ύφεση της νόσου που προκλήθηκε από φινγκολιμόδη, σχετίζεται με μια σημαντική αύξηση των λεμφοκυττάρων Bregs (CD19 + , BTLA + και CD19 + , BTLA + , IL-10 + B). Η εξασθένηση των κυττάρων Bregs και ειδικότερα των CD19 + / BTLA +, πιθανό να διαδραματίζει σημαντικό παθογόνο ρόλο στη ΣΚΠ, γεγονός που θα μπορούσε να διερευνηθεί και στη νόσο του Parkinson.

Η μελέτη μας πάσχει από αξιοσημείωτους περιορισμούς. Για παράδειγμα, ο αριθμός των δειγμάτων που είχε αρχικά σχεδιαστεί να μελετηθεί είναι πολύ μεγαλύτερος εκείνου που τελικά εξετάστηκε, τόσο για το συνολικό δείγμα ασθενών όσο και για το αντίστοιχο των υγιών μαρτύρων. Τα περιορισμένα χρονικά περιθώρια, η έλλειψη ικανοποιητικού εργαστηριακού χρόνου και χώρου και οι περιορισμοί λόγω της πανδημίας δεν μας επέτρεψαν να ολοκληρώσουμε έλεγχο σε μεγαλύτερο δείγμα. Επίσης, η ανάλυση με κυτταρομετρία απαιτεί ακριβή αντιδραστήρια (πχ αγορά σημασμένων αντισωμάτων), τα οποία στην παρούσα μελέτη ήταν περιορισμένα. Ευελπιστούμε ότι στο άμεσο μέλλον, οι πληθυσμοί που θα ελεγχθούν θα είναι στατιστικά αξιοποιήσιμοι, ώστε να εξασφαλίζουν εγκυρότερα αποτελέσματα και πιθανόν δημοσιεύσιμα. Ανεξαρτήτως των παραπάνω περιορισμών, πιστεύουμε ότι τα αποτελέσματα είναι πρωτότυπα και πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω.

Πηγές-Βιβλιογραφία

- [1]Chou K: Clinical manifestations of Parkinson Disease. UpToDate. Retrieved on 7/22/2013 from www.uptodate.com. (2013)
- [2]Sherer TB, S Chowdhury, K Peabody, D Brooks: Overcoming obstacles in Parkinson's Disease. *Movement Disorders* 27(13), 1606-1611 (2012)
- [3]Ebersbach G, Baas H, Csoti I, et al. Scales in Parkinson's disease. *J Neurol* 2006;253:iv32–5.
- [4]Goetz CG, Fahn S, Martinez-Martin P, et al. Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): process, format, and clinimetric testing plan. *Mov Disord* 2007;22:41–7
- [5]Berardelli A, Rothwell JC, Thompson PD, et al. Pathophysiology of bradykinesia in Parkinson's disease. *Brain* 2001;124:2131–46.
- [6]Vingerhoets FJG, Schulzer M, Calne DB, et al. Which clinical sign of Parkinson's disease best reflects the nigrostriatal lesion? *Ann Neurol* 1997;41:58–64.
- [7]Ross GW, Petrovitch H, Abbott RD, et al. Parkinsonian signs and substantia nigra neuron density in decedents elders without PD. *Ann Neurol* 2004;56:532–9.
- [8]Cooper JA, Sagar HJ, Tidswell P, et al. Slowed central processing in simple and go/no-go reaction time tasks in Parkinson's disease. *Brain* 1994;117:517–29.
- [9]Bagheri H, Damase-Michel C, Lapeyre-Mestre M, et al. A study of salivary secretion in Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol* 1999;22:213–15.
- [10]Parr-Brownlie LC, Hyland BI. Bradykinesia induced by dopamine D2 receptor blockade is associated with reduced motor cortex activity in the rat. *J Neurosci* 2005;25:5700–9.
- [11] Martin WE, Loewenson RB, Resch JA, et al. Parkinson's disease: clinical analysis of 100 patients. *Neurology* 1973;23:783–90.
- [12]Hughes AJ, Daniel SE, Blankson S, et al. A clinicopathologic study of 100 cases of Parkinson's disease. *Arch Neurol* 1993;50:140–8.
- [13]Ashour R, Jankovic J. Joint and skeletal deformities in Parkinson's disease, multiple system atrophy, and progressive supranuclear palsy. *Mov Disord* 2006;21:1856–63.
- [14]Bloem BR. Postural instability in Parkinson's disease. *Clin NeurolNeurosurg* 1992;94:S41–5.
- [15]Wenning GK, Ebersbach G, Verny M, et al. Progression of falls in postmortemconfirmed parkinsonian disorders. *Mov Disord* 1999;14:947–50.
- [16] Bloem BR, Hausdorff JM, Visser JE, et al. Falls and freezing of gait in Parkinson's disease: a review of two interconnected, episodic phenomena. *Mov Disord* 2004;19:871–84.
- [17] Schaafsma JD, Balash Y, Gurevich T, et al. Characterization of freezing of gait subtypes and the response of each to levodopa in Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 2003;10:391–8.

- [18]Macht M, Kaussner Y, Moller JC, et al. Predictors of freezing in Parkinson's disease: a survey of 6,620 patients. *Mov Disord* 2007;22:953–6.
- [19] Giladi N, Kao R, Fahn S. Freezing phenomenon in patients with parkinsonian syndromes. *Mov Disord* 1997;12:302–5.
- [20]Sheffield JK, Jankovic J. Botulinum toxin in the treatment of tremors, dystonias, sialorrhea and other symptoms associated with Parkinson's disease. *Exp Rev Neurother* 2007;7:637–47.
- [21] Thomas RJ. Blinking and the release reflexes: are they clinically useful? *J Am Geriatr Soc* 1994;42:609–13.
- [22]Li JY, Espay AJ, Gunraj CA, et al. Interhemispheric and ipsilateral connections in Parkinson's disease: relation to mirror movements.
- [23]Critchley EMR. Speech disorders of Parkinsonism: a review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1981;44:751–8
- [24]Biouesse V, Skibell BC, Watts RL, et al. Ophthalmologic features of Parkinson's disease. *Neurology* 2004;62:177–80.
- [25]Sharpe JA, Fletcher WA, Lang AE, et al. Smooth pursuit during dose-related on-off fluctuations in Parkinson's disease. *Neurology* 1987;37:1389–92.
- [26]Sabate M, Gonzalez I, Ruperez F, et al. Obstructive and restrictive pulmonary dysfunctions in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 1996;138:114–19.
- [27] Shill H, Stacy M. Respiratory function in Parkinson's disease. *Clin Neurosci* 1998;5:131–5.
- [28]Pursiainen V, Haapaniemi TH, Korpelainen JT, et al. Sweating in Parkinsonian patients with wearing-off. *Mov Disord* 2007;22:828–32.
- [29]Senard JM, Rai S, Lapeyre-Mestre M, et al. Prevalence of orthostatic hypotension in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997;63:584–9.
- [30]Hely MA, Morris JGL, Reid WGJ, et al. Sydney Multicenter Study of Parkinson's disease: non-L-dopa-responsive problems dominate at 15 years. *Mov Disord* 2005;20:190–9.
- [31]Aarsland D, Bronnick K, Ehrt U, et al. Neuropsychiatric symptoms in patients with Parkinson's disease and dementia: frequency, profile and associated care giver stress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007;78:36–42.
- [32] Palmiter RD. Is dopamine a physiologically relevant mediator of feeding behavior? *Trends Neurosci* 2007;30:375–81.
- [33]Miyasaki JM, Al HK, Lang AE, et al. Punding prevalence in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2007;22:1179–81.
- [34] Gjerstad MD, Alves G, Wentzel-Larsen T, et al. Excessive daytime sleepiness in Parkinson disease: is it the drugs or the disease? *Neurology* 2006;67:853–8.

- [35]Gagnon J-F, Postuma RB, Mazza S, et al. Rapid-eye-movement sleep behaviour disorder and neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol* 2006;5:424–32.
- [36]Boeve BF, Silber MH, Saper CB, et al. Pathophysiology of REM sleep behaviour disorder and relevance to neurodegenerative disease. *Brain* 2007;130(Pt 11):2770– 88.
- [37] Tinazzi M, Del Vesco C, Fincati E, et al. Pain and motor complications in Parkinson’s disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006;77:822–5.
- [38] Ponsen MM, Stoffers D, Booij J, et al. Idiopathic hyposmia as a preclinical sign of Parkinson’s disease. *Ann Neurol* 2004;56:173–81.
- [39] Harding AJ, Stimson E, Henderson JM, et al. Clinical correlates of selective pathology in the amygdala of patients with Parkinson’s disease. *Brain* 2002;125:2431–45.
- [40]von Campenhausen S, Bornschein B, Wick R, Botzel K, Sampaio C, Poewe W, Oertel W, Siebert U, Berger K, Dodel R Prevalence and incidence of Parkinson’s disease in Europe. *Eur Neuropsychopharmacol* 15(4) 2005:473–490.
- [41]de Lau LM, Breteler MM (2006) Epidemiology of Parkinson’s disease. *Lancet Neurol* 5(6):525–535
- [42]de Rijk MC, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, Baldereschi M, Fratiglioni L, Lobo A, Martinez-Lage J, Trenkwalder C, Hofman A (2000) Prevalence of Parkinson’s disease in Europe: a collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* 54(11 Suppl 5):S21–S23).
- [43]Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Rocca WA. Influence of strict, intermediate, and broad diagnostic criteria on the age- and sex-specific incidence of Parkinson’s disease. *Mov Disord* 2000; 15: 819–25
- [44]Okubadejo NU, Bower JH, Rocca WA, Maraganore DM. Parkinson’s disease in Africa: a systematic review of epidemiologic and genetic studies. *Mov Disord* 2006; 21: 2150–56.
- [45]Hirtz D, Thurman DJ, Gwinn-Hardy K, Mohamed M, Chaudhuri AR, Zalutsky R. How common are the “common” neurologic disorders? *Neurology* 2007; 68: 326–37.
- [46]Tan LC, Venketasubramanian N, Jamora RD, Heng D. Incidence of Parkinson’s disease in Singapore. *Parkinsonism Relat Disord* 2007; 13: 40–43.
- [47]Mayeux R, Marder K, Cote LJ, et al. The frequency of idiopathic Parkinson’s disease by age, ethnic group, and sex in northern Manhattan, 1988–1993. *Am J Epidemiol* 1995;142:820–27.
- [48]Horsfall L, Petersen I, Walters K, Schrag A. Time trends in incidence of Parkinson’s disease diagnosis in UK primary care. *J Neurol* 2013; 260: 1351–57.
- [49]Darweesh SK, Koudstaal PJ, Stricker BH, Hofman A, Ikram MA. Trends in the incidence of Parkinson disease in the general population: the rotterdam study. *Am J Epidemiol* 2016; 183: 1018–26.

- [50] Sveinbjornsdottir S, Hicks AA, Jonsson T, Petursson H, Gugmundsson G, Frigge ML, Kong A, Gulcher JR, Stefansson K (2000) Familial aggregation of Parkinson's disease in Iceland. *N Engl J Med* 343(24):1765–1770.
- [51] Linder J, Stenlund H, Forsgren L (2010) Incidence of Parkinson's disease and parkinsonism in northern Sweden: a populationbased study. *Mov Disord* 25(3):341–348.
- [52] Taylor KSM, Cook JA, Counsell CE. Heterogeneity in male to female risk for Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78: 905–06.
- [53] Sherer TB, S Chowdhury, K Peabody, D Brooks: Overcoming obstacles in Parkinson's (2012) Disease. *Movement Disorders* 27(13), 1606-1611.
- [54] Sveinbjornsdottir S, Hicks AA, Jonsson T, Petursson H, Gugmundsson G, Frigge ML, Kong A, Gulcher JR, Stefansson K (2000) Familial aggregation of Parkinson's disease in Iceland. *N Engl J Med* 343(24):1765–1770.
- [55] Gilks WP, Abou-Sleiman PM, Gandhi S, Jain S, Singleton A, Lees AJ, Shaw K, Bhatia KP, Bonifati V, Quinn NP, Lynch J, Healy DG, Holton JL, Revesz T, Wood NW (2005) A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. *Lancet* 365(9457):415–416.
- [56] Lesage S, Brice A (2012) Role of mendelian genes in “sporadic” Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 18(Suppl 1):S66–S70.
- [57] Zimprich A, Biskup S, Leitner P, et al. Mutations in LRRK2 cause autosomaldominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 2004; 44:601– 607.
- [58] Shimura H, Hattori N, Kubo S, et al. Familial parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase [in process citation]. *Nat Genet* 2000; 25:302–305.
- [59] LewyLim KL, Chew KC, Tan JM, et al. Parkin mediates nonclassical, proteasomal independent ubiquitination of synphilin-1: implications for Lewy body formation. *J Neurosci* 2005; 25:2002–2009.
- [60] Hedrich K, Eskelson C, Wilmot B, et al. Distribution, type, and origin of Parkin mutations: review and case studies. *Mov Disord* 2004; 19:1146– 1157.
- [61] Lohmann E, Periquet M, Bonifati V, et al. How much phenotypic variation can be attributed to parkin genotype? *Ann Neurol* 2003; 54:176–185.
- [62] Pramstaller PP, Kis B, Eskelson C, et al. Phenotypic variability in a large kindred (Family LA) with deletions in the parkin gene. *Mov Disord* 2002; 17:424–426.
- [63] Valente EM, Salvi S, Ialongo T, et al. PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 2004; 56:336–341.
- [64] Hedrich K, Djarmati A, Schafer N, et al. DJ-1 (PARK7) mutations are less frequent than Parkin (PARK2) mutations in early-onset Parkinson disease. *Neurology* 2004; 62:389–394.

- [65]Canet-Aviles RM, Wilson MA, Miller DW, et al. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:9103–9108.
- [66]Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 2004; 55:164–173.
- [67]Singleton AB, Farrer M, Johnson J, et al. a-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003; 302:841–844.
- [69] Lewy Gasser T, Muller-Myhsok B, Wszolek ZK, et al. A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat Genet* 1998; 18:262–265.
- [68] Pals P, Lincoln S, Manning J, et al. alpha-Synuclein promoter confers susceptibility to Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2004; 56:591–595. This is the first of two recent papers identifying SNPs conferring an increased risk to develop Parkinson's disease.
- [70]Leroy E, Boyer R, Auburger G, et al. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease [letter]. *Nature* 1998; 395:451–452.
- [71]van der Walt JM, Noureddine MA, Kittappa R, et al. Fibroblast growth factor 20 polymorphisms and haplotypes strongly influence risk of Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2004; 74:1121–1127.
- [72] Aharon-Peretz J, Rosenbaum H, Gershoni-Baruch R. Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 2004; 351:1972–1977.
- [73]Lill CM (2016) Genetics of Parkinson's disease. *Mol Cell Probes* 30(6):386–396.
- [74]Thenganatt MA, Jankovic J (2014) Parkinson disease subtypes. *JAMA Neurol* 71(4):499.
- [75]Bellou V, Belbasis L, Tzoulaki I, Evangelou E, Ioannidis JP (2016) Environmental risk factors and Parkinson's disease: an umbrella review of meta-analyses. *Parkinsonism Relat Disord* 50. 23:1–9.
- [76]Jankovic J, H Hurtig, J Dashe: Etiology and pathogenesis of Parkinson Disease. UpToDate. Retrieved on 7/22/2013 from www.uptodate.com. (2013).
- [77]Ascherio, Alberto, and Michael A. Schwarzschild. "The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention." *The Lancet Neurology* 15.12 (2016): 1257-1272.
- [78]MacPhee G, D Stewart: Parkinson's Disease. *Reviews in Clinical Gerontology* 11, 33-49 (2001).
- [79] Gazewood J, D Richards, K Clebak: Parkinson Disease: An update. *American Family Physician* 87(4), 267-273 (2013).
- [80]Brown T, P Rumsby, A Capleton, L Rushton, L Levy: Pesticides and Parkinson's Disease: Is there a link? *Environmental Health Perspectives* 14(2), 156-164 (2006).

- [81] Chinta S, C Lieu, M Demaria, R Laberge, J Campisi, J Anderson: Environmental stress, ageing, and glial cell senescence: A novel mechanistic link to Parkinson's Disease? *Journal of Internal Medicine* 273, 429-436 (2013) .
- [82] Ceccatelli S: Mechanisms of neurotoxicity and implications for neurological disorders. *Journal of Internal Medicine* 273, 426-429 (2013).
- [83] Jankovic J, H Hurtig, J Dashe: Etiology and pathogenesis of Parkinson Disease. UpToDate. Retrieved on 7/22/2013 from www.uptodate.com. (2013).
- [84] Hawkes C, K Del Tredici, H Braak: Review: Parkinson's Disease: A dual-hit hypothesis. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 33, 599-614 (2007).
- [85] Fritsch T, K Smyth, M Wallendal, T Hyde, G Leo, D Geldmacher: Parkinson Disease: Research update and clinical management. *Southern Medical Association* 105(12), 650-656 (2012).
- [86] Cilia R, Akpalu A, Sarfo FS, et al. The modern pre-levodopa era of Parkinson's disease: insights into motor complications from sub-Saharan Africa. *Brain* 2014;137(Pt 10):2731-42.
- [87] Connolly BS, Lang AE. Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. *JAMA* 2014;311:1670-83.
- [89] Nutt JG, Woodward WR, Beckner RM, et al. Effect of peripheral catecholO-methyltransferase inhibition on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of levodopa in parkinsonian patients. *Neurology* 1994;44:913-9. *Parkinson Disease* 13 -90.
- [90] Thomas A, Iacono D, Luciano AL, et al. Duration of amantadine benefit on dyskinesia of severe Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75: 141-3.
- [91] Olanow CW, Koller WC. An algorithm (decision tree) for the management of Parkinson's disease: treatment guidelines. *American Academy of Neurology. Neurology* 1998;50(3 Suppl 3):S1-57.
- [92] Olanow CW, Kieburtz K, Odin P, et al. Continuous intrajejunal infusion of levodopa-carbidopa intestinal gel for patients with advanced Parkinson's disease: a randomised, controlled, double-blind, double-dummy study. *Lancet Neurol* 2014;13:141-9.
- [93] Perestelo-Perez L, Rivero-Santana A, Perez-Ramos J, et al. Deep brain stimulation in Parkinson's disease: meta-analysis of randomized controlled trials. *J Neurol* 2014;261:2051
- [94] Almeida L, Deeb W, Spears C, et al. Current practice and the future of deep brain stimulation therapy in Parkinson's disease. *Semin Neurol* 2017;37:205-14.
- [95] Cury RG, Fraix V, Castrioto A, et al. Thalamic deep brain stimulation for tremor in Parkinson disease, essential tremor, and dystonia. *Neurology* 2017;89:1416-23.
- [96] Calne DB, Snow BJ, Lee C. Criteria for diagnosing Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1992; 32 (suppl): S125-27.

- [97]Stoessl AJ, Rivest J. Differential diagnosis of parkinsonism. *Can J Neurol Sci* 1999; 26 (suppl 2): S1–4.
- [98]Kish SJ, Shannak K, Rajput A, Deck JH, Hornykiewicz O. Aging produces a specific pattern of striatal dopamine loss: implications for the etiology of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurochem* 1992; 58: 642–48
- [99] Jankovic J Essential tremor and Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1989; 25: 211–12.
- [100]Jimenez-Jimenez FJ, Garcia-Ruiz PJ, Molina JA. Drug-induced movement disorders. *Drug Saf* 1997; 16: 180–204.
- [101] Rajput A, Rajput AH. Progressive supranuclear palsy: clinical features, pathophysiology and management. *Drugs Aging* 2001; 18: 913–25.
- [102]Rinne JO, Lee MS, Thompson PD, Marsden CD. Corticobasal degeneration: a clinical study of 36 cases. *Brain* 1994; 117: 1183–96.
- [103] Gilman S, Low PA, Quinn N, et al. Consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *J Neurol Sci* 1999; 163: 94–98.
- [104] McKeith IG. Clinical Lewy body syndromes. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 920: 1–8.
- [105] Foltynie T, Barker R, Brayne C. Vascular parkinsonism: a review of the precision and frequency of the diagnosis. *Neuroepidemiology* 2002; 21: 1–7.
- [106]Curran T, Lang AE. Parkinsonian syndromes associated with hydrocephalus: case reports, a review of the literature, and pathophysiological hypotheses. *Mov Disord* 1994; 9: 508–20.
- [107]Demirkiran M, Bozdemir H, Sarica Y. Vascular parkinsonism: a distinct, heterogeneous clinical entity. *Acta Neurol Scand* 2001; 104: 63–67.
- [108]Vingerhoets FJ, Snow BJ, Lee CS, Schulzer M, Mak E, Calne DB. Longitudinal fluorodopa positron emission tomographic studies of the evolution of idiopathic parkinsonism. *Ann Neurol* 1994; 36: 759–64.
- [109] Guttman M, Stewart D, Hussey D, Wilson A, Houle S, Kish S. Influence of L-dopa and pramipexole on striatal dopamine transporter in early PD. *Neurology* 2001; 56: 1559–64.
- [110] Shoefeld, Yehuda, et al. "The mosaic of autoimmunity: hormonal and environmental factors involved in autoimmune diseases--2008." *The Israel Medical Association Journal* 10.1 (2008): 8.
- [111]Liu, Bin, Hui-Ming Gao, and Jau-Shyong Hong. "Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: role of neuroinflammation." *Environmental health perspectives* 111.8 (2003): 1065-1073.
- [112] Fiszer, U., et al. "Parkinson's disease and immunological abnormalities: increase of HLA-DR expression on monocytes in cerebrospinal fluid and of CD45RO+ T cells in peripheral blood." *Acta Neurologica Scandinavica* 90.3 (1994): 160-166.
- [113] Fahmy, Ahmed M., et al.

"Mitochondrial antigen presentation: a mechanism linking Parkinson's disease to autoimmunity." *Current opinion in immunology* 58 (2019): 31-37.

[114] Garretti, Francesca, et al. "Autoimmunity in Parkinson's Disease: the role of α -synuclein-specific T cells." *Frontiers in immunology* 10 (2019): 303.

[115] Reynolds, Ashley D., et al. "Regulatory T cells attenuate Th17 cell-mediated nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in a model of Parkinson's disease." *The Journal of Immunology* 184.5 (2010): 2261-2271.

[116] Valldeoriola, F. "Movement disorders of autoimmune origin." *Journal of neurology* 246.6 (1999): 423-431.

[117] Papachroni, Katerina K., et al. "Autoantibodies to alpha-synuclein in inherited Parkinson's disease." *Journal of neurochemistry* 101.3 (2007): 749-756.

[118] Zappia, Mario, et al. "Body weight influences pharmacokinetics of levodopa in Parkinson's disease." *Clinical neuropharmacology* 25.2 (2002): 79-82.

[119] Carvey, P. M., et al. "The potential use of a dopamine neuron antibody and a striatal-derived neurotrophic factor as diagnostic markers in Parkinson's disease." *Neurology* 41.5 Suppl 2 (1991): 53-58.

[120] Orr, Carolyn F., et al. "A possible role for humoral immunity in the pathogenesis of Parkinson's disease." *Brain* 128.11 (2005): 2665-2674.

[121] Chen, Shengdi, et al. "Experimental destruction of substantia nigra initiated by Parkinson disease immunoglobulins." *Archives of neurology* 55.8 (1998): 1075-1080.

[122] Al-Fulaij, Munya A., et al. "Pharmacological analysis of human D1 AND D2 dopamine receptor missense variants." *Journal of Molecular Neuroscience* 34.3 (2008): 211.

[123] He, Y. I., Wei-Dong Le, and Stanley H. Appel. "Role of Fc γ receptors in nigral cell injury induced by Parkinson disease immunoglobulin injection into mouse substantia nigra." *Experimental neurology* 176.2 (2002): 322-327.

[124] Luedtke, R. R., Griffin, S. A., Conroy, S. S., Jin, X., Pinto, A., & Sesack, S. R. "Immunoblot and immunohistochemical comparison of murine monoclonal antibodies specific for the rat D1a and D1b dopamine receptor subtypes." *Journal of Neuroimmunology*. 101 (1999): 170-187.

[125] Boundy, Virginia A., Robert R. Luedtke, and Perry B. Molinoff. "Development of Polyclonal Anti-D2 Dopamine Receptor Antibodies to Fusion Proteins: Inhibition of D2 Receptor-G Protein Interaction." *Journal of neurochemistry* 60.6 (1993): 2181-2191.

[126] Oberländer, Uwe, et al. "Neuromelanin is an immune stimulator for dendritic cells in vitro." *BMC neuroscience* 12.1 (2011): 1-9.

[127] Koutsilieris, E., M. B. Lutz, and C. Scheller. "Autoimmunity, dendritic cells and relevance for Parkinson's disease." *Journal of Neural Transmission* 120.1 (2013): 75-81.

- [128]De Virgilio, Armando, et al. "Parkinson's disease: autoimmunity and neuroinflammation." *Autoimmunity reviews* 15.10 (2016): 1005-1011.
- [129]Watanabe N., Gavrieli M., Sedy J.R., Yang J., Fallarino F., Loftin S.K., Hurchla M.A., Zimmerman N., Sim J., Zang X., Murphy T.L., Russell J.H., Allison J.P. and Murphy K.M., BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat. Immunol.* 4: 670–679, 2003.
- [130]Han P., Goularte O.D., Rufner K., Wilkinson B. and Kaye J., An inhibitory Ig superfamily protein expressed by lymphocytes and APCs is also an early marker of thymocyte positive selection. *J. Immunol.* 172: 5931– 5939, 2004.
- [131]Watanabe, Norihiko, et al. "BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1." *Nature immunology* 4.7 (2003): 670-679.
- [132]Sedy JR, Gavrieli M, Potter KG, Hurchla MA, Lindsley RC, Hildner K, et al. B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat Immunol.* (2005) 6:90–8. doi: 10.1038/ni1144
- [133]Cai G, Nie X, Li L, Hu L, Wu B, Lin J, et al. B and T lymphocyte attenuator is highly expressed on intrahepatic T cells during chronic HBV infection and regulates their function. *J Gastroenterol.* (2013) 48:1362–72. doi: 10.1007/s00535-013-0762-9
- [134]Vendel, Andrew C., et al. "B and T lymphocyte attenuator regulates B cell receptor signaling by targeting Syk and BLNK." *The Journal of Immunology* 182.3 (2009): 1509-1517.
- [135]Tao, Ran, et al. "Regulatory T cell expression of herpesvirus entry mediator suppresses the function of B and T lymphocyte attenuator-positive effector T cells." *The Journal of Immunology* 180.10 (2008): 6649-6655.
- [136]Torres, Raul M., John Imboden, and Harry W. Schroeder Jr. "Antigen receptor genes, gene products, and co-receptors." *Clinical Immunology*. Mosby, 2008. 53-77.
- [137]Chemnitz, Jens M., et al. "B and T lymphocyte attenuator-mediated signal transduction provides a potent inhibitory signal to primary human CD4 T cells that can be initiated by multiple phosphotyrosine motifs." *The Journal of Immunology* 176.11 (2006): 6603-6614.
- [138]He, Y, Le, WD, Appel, SH (2002) Role of Fcγ receptors in nigral cell injury induced by Parkinson disease immunoglobulin injection into mouse substantia nigra. *Exp Neurol* 176:322–327
- [139]Hunot, S, Dugas, N, Faucheux, B, Hartmann, A, Tardieu, M, Debre, P, Agid, Y, Dugas, B, Hirsch, EC (1999) FcεR2/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, *in vitro*, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-α in glial cells. *J Neurosci* 19:3440–3447.
- [140]Bokor, M, Farago, A, Garam, T, Malatinszky, G, Schnabel, R (1993) Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 115:47–50.
- [141]Defazio, G, Dal Toso, R, Benvegna, D, Minozzi, MC, Cananzi, AR, Leon, A (1994) Parkinsonian serum carries complement-dependent toxicity for rat mesencephalic dopaminergic neurons in culture. *Brain Res* 633:206–212.
- [142]Fiszer, U, Fredrikson, S, Czlonkowska, A (1996) Humoral response to hsp 65 and hsp 70 in cerebrospinal fluid in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 139:66–70.
- [143]Wang, XJ, Yan, ZQ, Lu, GQ, Stuart, S, Chen, SD (2007) Parkinson disease IgG and C5a-induced synergistic dopaminergic neurotoxicity: role of microglia. *Neurochem Int* 50:39–50.

- [144]Hisanaga, Kinya, et al. "Increase in peripheral CD4 bright+ CD8 dull+ T cells in Parkinson disease." *Archives of neurology* 58.10 (2001): 1580-1583.
- [145]Calopa, Màtil, et al. "Apoptosis of peripheral blood lymphocytes in Parkinson patients." *Neurobiology of disease* 38.1 (2010): 1-7.
- [146]Cornetta, T., et al. "Levodopa therapy reduces DNA damage in peripheral blood cells of patients with Parkinson's disease." *Cell biology and toxicology* 25.4 (2009): 321-330.
- [147]Blandini, F., et al. "Peripheral markers of apoptosis in Parkinson's disease: the effect of dopaminergic drugs." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1010.1 (2003): 675-678.
- [148]Fischer-Szafarz, Berta, and Edward De Maeyer. "Hyal-1, a locus determining serum hyaluronidase polymorphism, on chromosome 9 in mice." *Somatic cell and molecular genetics* 15.1 (1989): 79-83.
- [149]McGeer, Patrick L., et al. "Reactive microglia in patients with senile dementia of the Alzheimer type are positive for the histocompatibility glycoprotein HLA-DR." *Neuroscience letters* 79.1-2 (1987): 195-200.
- [150]Faucheux, Baptiste A., et al. "Blood vessels change in the mesencephalon of patients with Parkinson's disease." *Lancet (British edition)* 353.9157 (1999): 981-982.
- [151]Kebir, H, Kreymborg, K, Ifergan, I, Dodelet-Devillers, A, Cayrol, R, Bernard, M, Giuliani, F, Arbour, N, Becher, B, Prat, A (2007) Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 13:1173–1175.
- [152]Frugier, T, Morganti-Kossmann, MC, O'Reilly, D, McLean, CA (2010) *In situ* detection of inflammatory mediators in post mortem human brain tissue after traumatic injury. *J Neurotrauma* 27:497–507.
- [153]Mogi, M, Harada, M, Kondo, T, Riederer, P, Inagaki, H, Minami, M, Nagatsu, T (1994a) Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neurosci Lett* 180:147–150.
- [154]Breder, Christopher D., et al. "Distribution and characterization of tumor necrosis factor- α -like immunoreactivity in the murine central nervous system." *Journal of Comparative Neurology* 337.4 (1993): 543-567.
- [155]Hirsch, EC, Hunot, S, Damier, P, Faucheux, B (1998) Glial cells and inflammation in Parkinson's disease: a role in neurodegeneration? *Ann Neurol* 44:S115–120. Kozirowski, D, Tomasiuk, R, Szlufik, S, Friedman, A (2012) Inflammatory cytokines and NT-proCNP in Parkinson's disease patients. *Cytokine* 60:762–766. Lindqvist, D, Kaufman, E, Brundin, L, Hall, S, Surova, Y, Hansson, O (2012) Non-motor symptoms in patients with Parkinson's disease—correlations with inflammatory cytokines in serum. *PLoS ONE* 7:e47387
- [156]Menza, M, Dobkin, RD, Marin, H, Mark, MH, Gara, M, Bienfait, K, Dicke, A, Kusnekov, A (2010) The role of inflammatory cytokines in cognition and other non-motor symptoms of Parkinson's disease. *Psychosomatics* 51:474–479.
- [157]Blum-Degen, D, Muller, T, Kuhn, W, Gerlach, M, Przuntek, H, Riederer, P (1995) Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* 202:17–20. Grigoryan, GA, Gray, JA, Rashid, T, Chadwick, A, Hodges, H (2000) Conditionally immortal neuroepithelial stem cell grafts restore spatial learning in rats with lesions at the source of cholinergic forebrain projections. *Restor Neurol Neurosci* 17:1.

- [158]Mrak, RE, Griffin, WS (2007) Common inflammatory mechanisms in Lewy body disease and Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:683–686
- [159]Mogi, M, Harada, M, Narabayashi, H, Inagaki, H, Minami, M, Nagatsu, T (1996) Interleukin (IL)-1 beta, IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor-alpha levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 211: 13–16.
- [160]Clark, IA, Alleva, LM, Vissel, B (2010) The roles of TNF in brain dysfunction and disease. *Pharmacol Ther* 128:519–548.
- [161]Nishimura, M, Mizuta, I, Mizuta, E, Yamasaki, S, Ohta, M, Kaji, R, Kuno, S (2001) Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with sporadic Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 311:1–4.
- [162]Chu, K, Zhou, X, Luo, BY (2012) Cytokine gene polymorphisms and Parkinson's disease: a meta-analysis. *Can J Neurol Sci* 39:58–64.
- [163]Piancone, Federica, et al. "B lymphocytes in multiple sclerosis: bregs and BTLA/CD272 expressing-CD19+ lymphocytes modulate disease severity." *Scientific reports* 6.1 (2016): 1-11.
- [164]Πρωτόκολλο κατά: Riedhammer, Christine, Dagmar Halbritter, and Robert Weissert. "Peripheral blood mononuclear cells: isolation, freezing, thawing, and culture." *Multiple Sclerosis*. Humana Press, New York, NY, 2014. 53-61.
- [165]Skyvalidas, Dimitrios N., et al. "Curcumin mediates attenuation of pro-inflammatory interferon γ and interleukin 17 cytokine responses in psoriatic disease, strengthening its role as a dietary immunosuppressant." *Nutrition Research* 75 (2020): 95-108.
- [166]Mavropoulos, Athanasios, et al. "Human peripheral blood mononuclear cell culture for flow cytometric analysis of phosphorylated mitogen-activated protein kinases." *Human Cell Culture Protocols*. Humana Press, (2012) :275-285.
- [167]Mavropoulos, Athanasios, et al. "Flow cytometric detection of p38 MAPK phosphorylation and intracellular cytokine expression in peripheral blood subpopulations from patients with autoimmune rheumatic diseases." *Journal of immunology research* 2014 (2014).
- [168] Xiomerisiou, Georgia, et al. "Genetic basis of Parkinson disease." *Neurosurgical focus* 28.1 (2010): E7.
- [169] Le Couteur, D. G., McLean, A. J., Taylor, M. C., Woodham, B. L., & Board, P. G. (1999). Pesticides and Parkinson's disease. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 53(3), 122-130.