



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**“ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΛΙΠΙΔΙΚΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΣΤΑ
ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΚΑΙ
ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΥΓΙΩΝ ΑΤΟΜΩΝ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΝΟΣΟ
PARKINSON”**

**“ANALYSIS OF LIPID RECEPTOR EXPRESSION IN
IMMUNE SYSTEM CELLS AND SERUM OF HEALTHY
CONTROLS AND PATIENTS WITH PARKINSON'S
DISEASE”**

Αναστασία Α. Ανδρουτσοπούλου

ΛΑΡΙΣΑ, 2022

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Σταματία Παπουτσοπούλου: Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής
Ανοσοβιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

Γεωργία Ξηρομερήσιου: Επίκουρη Καθηγήτρια Νευρολογίας, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ματθαίος Σπελέτας: Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	6
Περίληψη	7
Abstract	9
1. Εισαγωγή	10
1.1. Η νόσος Parkinson και τα χαρακτηριστικά της	10
1.2. Κλινική εικόνα της νόσου Parkinson.....	11
1.3. Η παθογένεση της νόσου Parkinson και οι μηχανισμοί που οδηγούν σε αυτή	12
1.3.1. Εκφυλισμός των ντοπαμινεργικών νευρώνων	12
1.3.2. Α-συνουκλεΐνη: Λανθάνουσα αναδίπλωση και συσσώρευση – Σχηματισμός σωματίων Lewy	13
1.3.3. Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία.....	14
1.3.4. Αδυναμία αποικοδόμησης και απομάκρυνσης πρωτεϊνών	15
1.3.5. Νευροφλεγμονή.....	16
1.3.6. Άξονας εντέρου-εγκεφάλου («Gut-Brain axis»).....	18
1.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση της νόσου του Parkinson	19
1.4.1. Ηλικία - Φύλο.....	19
1.4.2. Περιβαλλοντικοί παράγοντες και τρόπος ζωής	20
1.4.3. Γενετικοί παράγοντες.....	21
1.5. Η οικογένεια υποδοχέων με VPS10P επικράτεια	23
1.6. Η σορτιλίνη και τα χαρακτηριστικά της	24
1.7. Οι γενικές δράσεις της σορτιλίνης	25
1.8. Οι ιστοειδικές δράσεις της σορτιλίνης και οι κυριότερες ασθένειες στις οποίες εμπλέκεται	27
1.8.1. Η σορτιλίνη στο ανοσοποιητικό σύστημα.....	27
1.8.2. Η σορτιλίνη στον εγκέφαλο.....	29
1.8.3. Η σορτιλίνη στο καρδιαγγειακό σύστημα και στον μεταβολισμό	30
Σκοπός.....	32
2. Υλικά και μέθοδοι	33

2.1.	Σχεδιασμός μελέτης και συλλογή βιολογικών δειγμάτων	33
2.2.	Κυτταρομετρία ροής.....	33
2.2.1.	Ορισμός.....	33
2.2.2.	Μεθοδολογία πειράματος.....	34
2.3.	ELISA.....	36
2.3.1.	Ορισμός.....	36
2.3.2.	Μεθοδολογία πειράματος.....	36
2.4.	Στατιστική ανάλυση.....	36
3.	Σύνοψη αποτελεσμάτων.....	38
3.1.	Κυτταρομετρία ροής.....	38
3.1.1.	Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση και ποσοτικός προσδιορισμός της Σορτιλίνης 38	
3.1.2.	Διαφορές στα ποσοστά των πληθυσμών των μονοκυττάρων, των Β και των Τ λεμφοκυττάρων μεταξύ ασθενών με Parkinson και υγείων.....	39
3.1.3.	Προσδιορισμός των επιπέδων Σορτιλίνης στην επιφάνεια των κυττάρων κάθε πληθυσμού σε ασθενείς με Parkinson και υγείς	41
3.1.4.	Διαφορές στα επίπεδα έκφρασης της Σορτιλίνης στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος μεταξύ των φύλων.....	43
3.2.	ELISA για τον προσδιορισμό της Σορτιλίνης.....	44
3.2.1.	Διαφορές στα επίπεδα έκφρασης της Σορτιλίνης στον ορό του αίματος μεταξύ ασθενών με Parkinson και υγείων	44
3.2.2.	Διαφορές στα επίπεδα έκφρασης της Σορτιλίνης στον ορό του αίματος μεταξύ των φύλων	45
3.2.3.	Διαφορές στα επίπεδα έκφρασης της Σορτιλίνης στον ορό του αίματος μεταξύ διαφορετικών δεικτών μάζας σώματος.....	46
3.3.	ELISA για τον προσδιορισμό της CCL2	48
3.3.1.	Διαφορές στα επίπεδα έκφρασης της CCL2 στον ορό του αίματος μεταξύ ασθενών με Parkinson και υγείων.....	48
3.3.2.	Διαφορές στα επίπεδα έκφρασης της CCL2 στον ορό του αίματος μεταξύ των φύλων.....	49

3.3.3. Διαφορές στα επίπεδα έκφραση της CCL2 στον ορό του αίματος μεταξύ διαφορετικών δεικτών μάζας σώματος	50
4. Συμπεράσματα – συζήτηση	52
Βιβλιογραφία	58

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σε συνεργασία με το εργαστήριο Ανοσολογίας – Ιστοσυμβατότητας στο τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα, κα. Σταματία Παπουτσοπούλου, επίκουρη καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, το συνεχές ενδιαφέρον και την απρόσκοπτη επιστημονική καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της μελέτης.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Γεωργία Ξηρομερήσιου, επίκουρη καθηγήτρια του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τη πολύτιμη υλική υποστήριξη των πειραμάτων μέσω της προσφοράς των κατάλληλων αντιδραστηρίων και της παροχής δειγμάτων αίματος.

Ιδιαίτερη μνεία και ευχαριστίες οφείλω στον κ. Ματθαίο Σπελέτα, καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την προσφορά των χώρων του εργαστηρίου Ανοσολογίας – Ιστοσυμβατότητας για την εκπόνηση των πειραμάτων.

Σημαντικό ρόλο στη διεξαγωγή των πειραμάτων κατέχει και η κα. Φανή Καλαλά, επίκουρη καθηγήτρια Ιατρικής Ανοσολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Την ευχαριστώ ιδιαίτερος για την αμέριστη βοήθεια και πολύτιμη καθοδήγηση στη μεθοδολογία της Κυτταρομετρίας Ροής.

Ευχαριστώ από καρδιάς την τεχνικό του εργαστηρίου Ανοσολογίας – Ιστοσυμβατότητας, Αθανασία Φουσίκα, για την άριστη συνεργασία, τη προθυμία και την υποστήριξη, σε εργαστηριακό και ψυχολογικό επίπεδο, καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους αφανείς ήρωες αυτής της εργασίας· τους γονείς μου, Τάσο και Γεωργία, για την αγάπη, τη κατανόηση και τη συνεχή ενθάρρυνση και υποστήριξή τους.

Περίληψη

Η νόσος Parkinson (Parkinson's Disease, PD) είναι η πιο κοινή κινητική διαταραχή και η δεύτερη πιο κοινή νευροεκφυλιστική διαταραχή μετά τη νόσο του Alzheimer, με περίπου 7 με 10 εκατομμύρια ασθενείς παγκοσμίως. Χαρακτηρίζεται από τον εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας (Substantia Nigra, SN) του μεσεγκεφάλου και την επακόλουθη μείωση της σηματοδότησης της ντοπαμίνης στη μελαινοραβδωτή οδό, η οποία ελέγχει τις εκούσιες κινήσεις. Αυτή η μείωση επηρεάζει και άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια του εγκεφάλου απαραίτητα για τις γνωστικές λειτουργίες, τη μνήμη και τα συναισθήματα ανταμοιβής και ευχαρίστησης. Αυτό σε συνδυασμό με την πληθώρα αιτιών και παθογενετικών μηχανισμών που μπορούν να οδηγήσουν στην εκδήλωση της ασθένειας, καθιστά το Parkinson μία πολυπαραγοντική νόσο, η οποία καλύπτει ένα μεγάλο εύρος κινητικών ή μη κινητικών συμπτωμάτων. Δυστυχώς, τα περισσότερα κινητικά συμπτώματα εκδηλώνονται όταν πλέον έχει χαθεί πάνω από το 70% των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Το γεγονός αυτό επιδεικνύει την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα στους μοριακούς μηχανισμούς που διέπουν αυτή τη νόσο, ούτως ώστε να βρεθούν εξειδικευμένοι διαγνωστικοί δείκτες για την ανίχνευση του Parkinson σε αρχικό στάδιο.

Τα τελευταία χρόνια, αρκετές έρευνες έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους στις πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια υποδοχέων με VPS10P (Vacuolar Protein Sorting 10 Protein) επικράτεια και την εμπλοκή τους σε διάφορες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένης της νόσου του Parkinson, του Alzheimer, των καρδιαγγειακών παθήσεων, του σακχαρώδη διαβήτη τύπου II και του καρκίνου. Όλα τα μέλη της οικογένειας είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς τύπου I και το κοινό χαρακτηριστικό τους είναι η επικράτεια VPS10P στο N-τελικό άκρο τους, η οποία χρησιμεύει στην ενδοκυτταρική διακίνηση πρωτεϊνών και τη μεταγωγή σήματος. Αναλυτικότερα, οι πρωτεΐνες με VPS10P επικράτεια είναι υποδοχείς πολλαπλών συνδετών που διακινούν πρωτεΐνες από το δίκτυο Trans-Golgi σε ενδοσώματα, εκκριτικά κυστίδια, λυσοσώματα ή την κυτταρική επιφάνεια.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η μελέτη των επιπέδων έκφρασης ενός μέλους της οικογένειας υποδοχέων με VPS10P επικράτεια, της Σορτιλίνης, σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και στον ορό από υγιείς δότες και ασθενείς που πάσχουν από νόσο του Parkinson. Επιπρόσθετα, διερευνήθηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης χημειοτακτισμού μονοκυττάρων-1 [Monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1 – γνωστή και ως Chemokine (CC-motif) ligand 2 (CCL2)] στον ορό ασθενών και υγείων. Τέλος,

πραγματοποιήθηκε συσχέτιση των αποτελεσμάτων με το φύλο και τον δείκτη μάζας σώματος.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is the most common motor disorder and the second most common neurodegenerative disorder after Alzheimer's disease, with approximately 7 to 10 million patients worldwide. PD is characterized by the degeneration of dopamine neurons in the substantia nigra (SN) of the midbrain and the subsequent reduction in dopaminergic signaling from the nigrostriatal pathway, which controls voluntary movements. This reduction also affects other signaling pathways of the brain essential for cognitive functions, memory, and feelings of reward and pleasure. This, combined with the multitude of causes and pathogenic mechanisms that can lead to the manifestation of the disease, makes Parkinson's a multifactorial disease, which covers a wide range of motor or non-motor symptoms. Unfortunately, most motor symptoms appear when more than 70% of the dopaminergic neurons have been lost. This fact demonstrates the need for further research into the molecular mechanisms underlying this disease, in order to find specific diagnostic markers for the detection of early stages of PD.

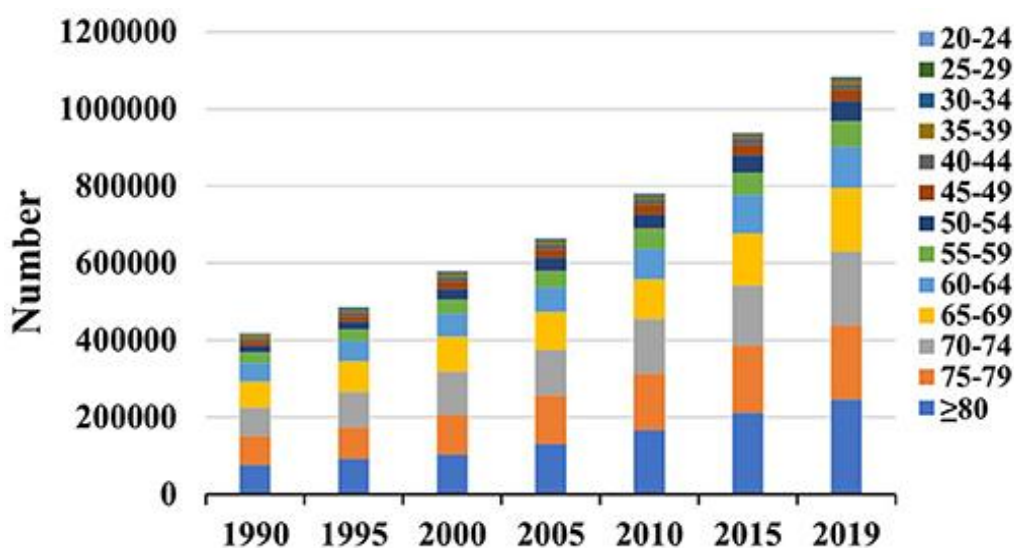
In recent years, several studies have focused on proteins belonging to the VPS10P (Vacuolar Protein Sorting 10 Protein) domain receptor family and their involvement in various diseases, including Parkinson's disease, Alzheimer's disease, cardiovascular disease, diabetes mellitus type II and cancer. All members of the family are type I transmembrane receptors and their common feature is the VPS10P domain at their N-terminus, which serves in intracellular protein trafficking and signal transduction. More specifically, VPS10P domain proteins are multiligand receptors that traffic proteins from the Trans-Golgi network to endosomes, secretory vesicles, lysosomes, or the cell surface.

The aim of this thesis was to study the expression levels of Sortilin, a member of the receptor family with VPS10P domain, in cells of the immune system and in the serum, in healthy donors and patients suffering from Parkinson's disease. Additionally, the concentration of Monocyte chemoattractant protein-1 [MCP-1 – also known as Chemokine (CC-motif) ligand 2 (CCL2)] in the serum of patients and healthy individuals was investigated. Finally, the results were correlated with gender and body mass index.

1. Εισαγωγή

1.1. Η νόσος Parkinson και τα χαρακτηριστικά της

Η νόσος Parkinson (Parkinson's Disease, PD) αποτελεί μία χρόνια προοδευτική νευρολογική διαταραχή, η οποία οφείλεται στον εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας και του υπομέλανα τόπου του εγκεφάλου και αφορά, κυρίως, άτομα ηλικίας 60 και άνω. Πρώτη φορά περιγράφηκε από τον Άγγλο ιατρό James Parkinson το 1817 στην μονογραφία του «An Essay on the Shaking Palsy» [1]. Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί μια ραγδαία αύξηση των περιστατικών αυτής της νόσου, με αποτέλεσμα να θεωρείται πλέον μια από τις κύριες αιτίες πηγές αναπηρίας στον κόσμο [2]. Συγκεκριμένα, από το 1990 έως το 2019, σε παγκόσμια κλίμακα, τα περιστατικά Parkinson αυξήθηκαν κατά 159,73%, με τους ασθενείς, το 2019, να φτάνουν τα 1.081.720 περιστατικά. Αυτά τα ποσοστά αναμένεται να αυξηθούν κατακόρυφα τα επόμενα χρόνια, καθώς αυξάνεται το προσδόκιμο ζωής. Στο πλαίσιο της διεθνούς συνεργατικής Μελέτης της Παγκόσμιας Επιβάρυνσης των Ασθενειών (Global Burden of Disease, GBD), το 2016, εκτιμήθηκε ότι μέχρι το 2040 περισσότερα από 13 εκατομμύρια άτομα θα πάσχουν από Parkinson και, παρόλο που η νόσος αυτή δεν είναι μεταδοτική, χαρακτηρίζουν αυτή την εξάπλωση ως πανδημία [3, 4]. Τέτοιου είδους προβλέψεις σε συνδυασμό με το γεγονός ότι το Parkinson έχει ζοφερές συνέπειες στην ποιότητα ζωής των πασχόντων, έχουν εγείρει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για την ανακάλυψη νέων και εξειδικευμένων μοριακών δεικτών που θα μπορούν να προσφέρουν έγκαιρη και αξιόπιστη διάγνωση της ασθένειας αλλά και νέων θεραπευτικών μονοπατιών.



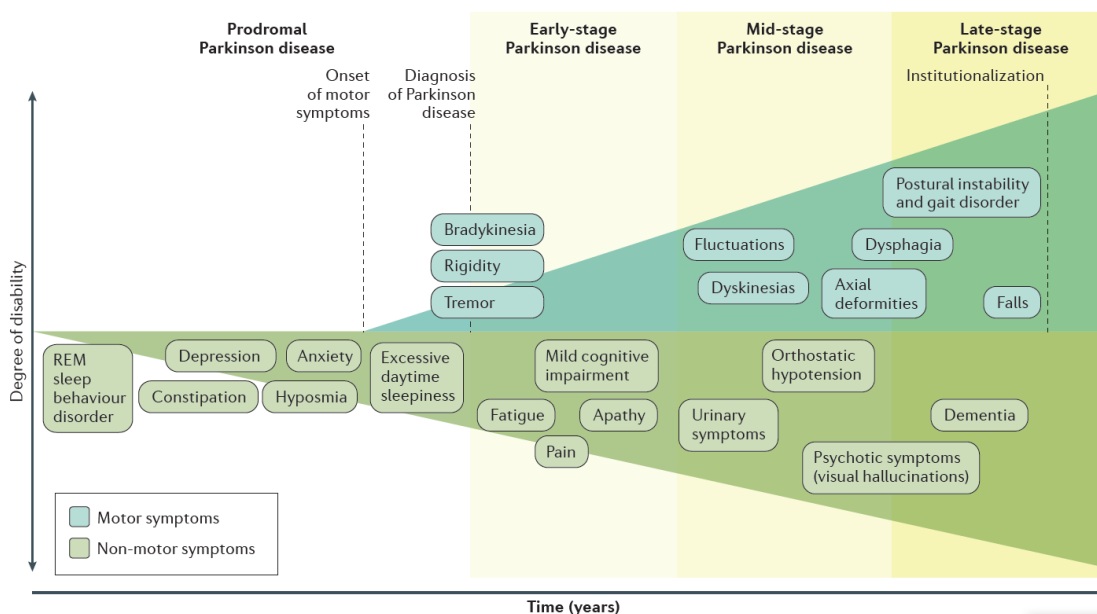
Εικόνα 1: Περιστατικά Parkinson σε κλίμακα ηλικιών από το 1990 έως το 2019 [5].

1.2. Κλινική εικόνα της νόσου Parkinson

Σύμφωνα με την International Parkinson and Movement Disorder Society (MDS), η τρέχουσα κλινική διάγνωση της νόσου Parkinson βασίζεται σε τρία βασικά κινητικά συμπτώματα της νόσου [6, 7]:

- Υποκινησία: Εκδηλώνεται με βάδιση με μικρά και συρόμενα βήματα, ένδεια εκφράσεων του προσώπου, μειωμένη συχνότητα βλεφαριδισμών, αργή και μονότονη ομιλία και μικρογραφία (ο ασθενής γράφει με όλο και πιο μικρά γράμματα). Η πολύ βαριά μορφή υποκινησίας ονομάζεται ακινησία.
- Αυξημένο μυϊκό τόνο: Εκδηλώνεται ως ακαμψία και «πάγωμα» των κινήσεων.
- Τρόμο (4–6 Hz): Παρατηρείται σε ηρεμία και συχνά αυξάνεται με την βάδιση ή την πνευματική συγκέντρωση.

Η έναρξη των κινητικών συμπτωμάτων, συνήθως, γίνεται ετερόπλευρα ή πιο έντονα στην μία πλευρά του σώματος [8]. Ύστερα από την εμφάνιση των κύριων κινητικών συμπτωμάτων, παρουσιάζονται και άλλα τα οποία αφορούν, κυρίως, την παθολογική στάση του σώματος (σκυφτή στάση σώματος, κάμψη των γονάτων), τη δυσφαγία (δυσκολία στην κατάποση) και την διαταραχή των αντανακλαστικών της στάσης, η οποία, σε συνδυασμό με την υποκινησία, μερικές φορές, μπορεί να οδηγήσει σε πτώση.



Εικόνα 2: Τα κινητικά και μη κινητικά συμπτώματα σε κάθε στάδιο της νόσου Parkinson [9].

Αρκετά χρόνια ή και δεκαετίες πριν την εκδήλωση των πρώτων κινητικών συμπτωμάτων, εμφανίζονται ορισμένα πρόδρομα μη κινητικά συμπτώματα, όπως οι

διαταραχές στον ύπνο, η οσφρητική ανεπάρκεια/υποσμία, η δυσκοιλιότητα και η κόπωση [10, 11]. Ωστόσο, αυτά τα συμπτώματα είναι πολύ γενικά ώστε να βασιστεί σε αυτά η διάγνωση των πρώιμων σταδίων του Parkinson. Με την πάροδο του χρόνου, εμφανίζονται και άλλα μη κινητικά χαρακτηριστικά της νόσου, όπως η ορθοστατική υπόταση, η στυτική δυσλειτουργία, η έντονη ακράτεια ούρων και ο χρόνιος πόνος [12]. Παράλληλα, πλήττονται οι γνωσιακές λειτουργίες, η μνήμη του ασθενούς και η ψυχολογία του, καθώς εκδηλώνει κατάθλιψη, απάθεια, παραισθήσεις ή ψύχωση [9]. Είναι, λοιπόν, φανερό το γεγονός ότι τα μη κινητικά συμπτώματα είναι, τελικά, αυτά τα οποία επηρεάζουν περισσότερο την καθημερινότητα των ασθενών, καθώς μειώνουν την ποιότητα ζωής και την αυτονομία τους.

1.3. Η παθογένεση της νόσου Parkinson και οι μηχανισμοί που οδηγούν σε αυτή

Είναι γεγονός ότι ένας μεγάλος αριθμός μοριακών μηχανισμών εμπλέκεται στην παθογένεση του Parkinson και ευθύνεται για την μεγάλη ετερογένεια των συμπτωμάτων αυτής της νόσου. Ο εκφυλισμός των ντοπαμινεργικών νευρώνων, η συσσώρευση της ασυνουκλεΐνης, η λυσοσωμική, πρωτεασωμική και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και η νευροφλεγμονή βρίσκονται στο επίκεντρο της ανάπτυξης της νόσου. Υπάρχουν πολλές υποθέσεις σχετικά με το ποιος μοριακός μηχανισμός απορρυθμίζεται πρώτος και ποιοι άλλοι ακολουθούν κατά την παθογένεση του Parkinson. Παρ' όλα αυτά, δεδομένης της ετερογένειας αυτής της νόσου δεν είναι δυνατόν να γνωρίζουμε το εναρκτήριο λάκτισμα, διότι κάθε περιστατικό είναι ξεχωριστό και η εμφάνισή του οφείλεται σε διαφορετικό συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Εκτός από αυτό, είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι αυτές οι διαδικασίες είναι άρρηκτα συνδεδεμένες μεταξύ τους, με αποτέλεσμα η απορρύθμιση της μίας να επηρεάζει και όλες τις υπόλοιπες.

1.3.1. Εκφυλισμός των ντοπαμινεργικών νευρώνων

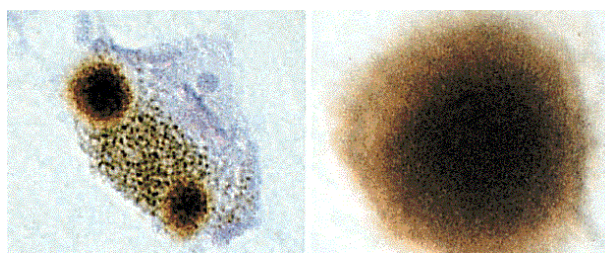
Η ντοπαμίνη είναι ένας νευροδιαβιβαστής μονοαμίνης, που ανήκει στην οικογένεια των κατεχολαμινών. Παράγεται στον εγκέφαλο από το αμινοξύ L-τυροσίνη, η οποία μετατρέπεται σε L-DOPA μέσω της υδροξυλάσης της τυροσίνης και, ύστερα, σε ντοπαμίνη με τη δράση της αρωματικής αποκαρβοξυλάσης L-αμινοξέος [13]. Μετά τη σύνθεσή της, αποθηκεύεται σε συναπτικά κυστίδια μέσω του μεταφορέα φυσαλιδώδους μονοαμίνης 2 (Vesicular Monoamine Transporter 2, VMAT2) [14]. Η μέλαινα ουσία (Substantia Nigra,

SN) και η κοιλιακή καλυπτρική περιοχή (Ventral Tegmental Area, VTA) είναι οι κυριότερες περιοχές του εγκεφάλου που παράγουν ντοπαμίνη, καθώς είναι πλούσιες σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες [15].

Η ντοπαμίνη συμμετέχει σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια του εγκεφάλου με αποτέλεσμα να επηρεάζει και πολλές από τις λειτουργίες του, με κυριότερες τον έλεγχο των εκούσιων κινήσεων, των γνωστικών λειτουργιών, της μνήμης και των αισθημάτων ανταμοιβής και ευχαρίστησης [16]. Είναι φανερό, λοιπόν, ότι η ελλειμματική σηματοδότησή της μπορεί να επιφέρει πληθώρα δυσλειτουργιών στον οργανισμό, εξηγώντας την παρουσία ποικίλων μη κινητικών συμπτωμάτων στη νόσο του Parkinson. Στο Parkinson, ο εκφυλισμός αφορά κυρίως τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες της μέλαινας ουσίας, αν και, με την πάροδο του χρόνου, εξαπλώνεται και σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου. Αξίζει να αναφερθεί ότι ο αριθμός των ντοπαμινεργικών νευρώνων στη μέλαινα ουσία μειώνεται με ρυθμό ~ 4% ανά δεκαετία ως μέρος της φυσιολογικής διαδικασίας γήρανσης [17]. Ωστόσο, αυτή η μείωση επιταχύνεται στο Parkinson και, μάλιστα, τα συμπτώματα της νόσου συνήθως δεν παρουσιάζονται έως ότου το 70-80% των ντοπαμινεργικών νευρώνων έχει ήδη χαθεί [18].

1.3.2. Α-συνουκλεΐνη: Λανθάνουσα αναδίπλωση και συσώρευση – Σχηματισμός σωματίων Lewy

Ορόσημο στη παθογένεση της νόσου Parkinson αποτελεί ο σχηματισμός των σωματίων (Lewy bodies, LB) ή/και νευριτών Lewy (Lewy neurites, LN). Τα σωματία Lewy είναι ενδονευρωνικά νηματώδη πρωτεϊνικά έγκλειστα σωματία υαλίνης αποτελούμενα κυρίως από αδιάλυτα συσσωματώματα λανθασμένα αναδιπλωμένης α-συνουκλεΐνης, τα οποία βρίσκονται στο σώμα του νευρώνα [19]. Λιγότερο συχνά εντοπίζονται συσσωματώματα και στους άξονες των νευρώνων, οι οποίοι ονομάζονται νευρίτες Lewy.



Εικόνα 3: Ένας νευρώνας με δύο σωματία Lewy από ανοσοϊστοχημεία μέλαινας ουσίας από ασθενή με νόσο Parkinson (από την MRC Cambridge Brain Bank). Οι σκούρες περιοχές στο κέντρο των σωματίων Lewy αντιστοιχούν σε συσσωματώματα α-συνουκλεΐνης [20].

Η α-συνουκλεΐνη είναι μια μικρή πρωτεΐνη (14kDa), που κωδικοποιείται από το γονίδιο *SNCA* (*PARK1/PARK4*), και εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στις προσυναπτικές απολήξεις και στους άξονες των νευρώνων [21]. Εντοπίζεται σε μεμβρανική και σε διαλυτή μορφή. Για την ακρίβεια, μπορεί να υιοθετήσει ένα ευρύ φάσμα δομικών διαμορφώσεων (ολιγομερή, πρωτοϊνίδια και ινίδια) [22]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, υπάρχει μια δυναμική ισορροπία μεταξύ των μη αναδιπλωμένων μονομερών στο κυτταρόπλασμα και των μεμβρανικών με δομή α-έλικας τετραμερών. Ωστόσο, στο Parkinson, διαταράσσεται αυτή η ισορροπία, καθώς η πρωτεΐνη αναδιπλώνεται σε δομή β-ελάσματος και δημιουργεί αδιάλυτα συσσωματώματα, τα οποία, τελικά, οδηγούν σε σχηματισμό σωματίων και νευριτών Lewy [20, 23]. Αυτή η λανθάνουσα αναδίπλωση της α-συνουκλεΐνης μπορεί να οφείλεται είτε σε μεταλλάξεις στο γονίδιο *SNCA* είτε σε περιβαλλοντικούς παράγοντες στους οποίους θα αναφερθούμε στη συνέχεια.

Η α-συνουκλεΐνη εμπλέκεται σε διάφορες λειτουργίες του κεντρικού νευρικού συστήματος, με κυριότερες την καταστολή απόπτωσης των ντοπαμινεργικών νευρώνων μέσω αναστολής της δράσης της πρωτεϊνικής κινάσης C και τη συναρμολόγηση του συμπλόκου SNARE κατά την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών συμπεριλαμβανομένης της ντοπαμίνης [24]. Επομένως, είναι λογικό η λανθασμένη αναδίπλωση και συσσώρευση της να έχει σοβαρό αντίκτυπο στη σύναψη, με αποτέλεσμα την ανεπαρκή σηματοδότηση ντοπαμίνης, ακόμα και πριν τον εκφυλισμό του νευρώνα [25].

1.3.3. Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία

Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία θεωρείται βασικό στοιχείο στην παθογένεση τόσο της ιδιοπαθούς όσο και της κληρονομικής νόσου Parkinson [26]. Μπορεί να προκύψει από μια σειρά διαταραχών φυσιολογικών λειτουργιών, όπως βλάβες κατά τη μιτοχονδριακή βιογένεση, αυξημένη παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS), ελαττωματική μιτοφαγία, δυσλειτουργία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, ανισορροπία ασβεστίου (Ca^{2+}) και πιθανώς άλλες έμμεσες επιδράσεις [27, 28]. Μεταθανάτιες μελέτες εγκεφάλων ασθενών με Parkinson αποκάλυψαν ανεπάρκεια του μιτοχονδριακού ενζυμικού συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας (σύμπλοκο της αφυδρογονάσης του NADH), το οποίο έχει ζωτική σημασία στην μεταφορά ηλεκτρονίων κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση, στην μέλαινα ουσία και τον υπομέλαινα τόπο [29]. Αναστολή του συμπλόκου I μπορεί να προκληθεί από διάφορες τοξίνες και φυτοφάρμακα, με κυριότερο την 1-μεθυλο-4-φαινυλο-1,2,3,6-

τετραυδροπυριδίνη (MPTP) [30]. Έχοντας, λοιπόν, υπόψη ότι το 80% του ATP που χρειάζεται ένα κύτταρο καλύπτεται από το στάδιο της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης [31], καταλαβαίνουμε ότι οποιαδήποτε ανεπάρκεια στα ένζυμα που συμμετέχουν σε αυτό μπορεί να οδηγήσει σε ανεπαρκή παραγωγή ενέργειας, οξειδωτικό στρες και, τελικά, απόπτωση [26]. Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία μπορούν, επίσης, να προκαλέσουν ορισμένες μεταλλάξεις γονιδίων που ευθύνονται για την κληρονομική μορφή της νόσου, με κυριότερα τα γονίδια *PRKN* και *PINK1* [32, 33].

1.3.4. Αδυναμία αποικοδόμησης και απομάκρυνσης πρωτεϊνών

Το μονοπάτι ουβικουιτίνης - πρωτεασώματος (Ubiquitin - Proteasome Pathway, UPP) και το μονοπάτι αυτοφαγίας - λυσοσώματος (Autophagy - Lysosomal Pathway, ALP) είναι δύο από τα πιο βασικά συστήματα που είναι υπεύθυνα για τον αυστηρό έλεγχο της λειτουργίας των οργανιδίων και των πρωτεϊνών στο κύτταρο και την απομάκρυνσή τους όταν φέρουν κάποια βλάβη. Το UPP στοχεύει πρωτεΐνες μικρής διάρκειας ζωής, ενώ το ALP στοχεύει πρωτεΐνες, συσσωματώματα πρωτεϊνών και οργανίδια που έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής. Και τα δύο συστήματα έχουν ζωτική σημασία, καθώς μέσω αυτών διατηρείται η ομοιόσταση μέσα στα κύτταρα και αποφεύγεται η αύξηση δραστικών ριζών οξυγόνου και η φλεγμονή.

Το πιο αντιπροσωπευτικό παράδειγμα βλάβης στο σύστημα ουβικουιτίνης – πρωτεασώματος είναι η περίπτωση απώλειας λειτουργίας της πρωτεΐνης Parkin, η οποία είναι μία Ε3 λιγάση της ουβικουιτίνης και κωδικοποιείται από το γονίδιο *PRKN* (*PARK2*) [34]. Από την άλλη, η αυτοφαγία έχει συσχετιστεί με την μακροζωία και την αντίσταση σε ασθένειες σε διάφορους οργανισμούς μοντέλα [35-37]. Με το πέρασμα του χρόνου, όπως και άλλοι κυτταρικοί μηχανισμοί έτσι και αυτή η διαδικασία μειορρυθμίζεται, γεγονός το οποίο μπορεί άμεσα να συσχετιστεί με το ότι η ηλικία είναι ο κυριότερος παράγοντας κινδύνου για το Parkinson και άλλες νευροεκφυλιστικές νόσους [38]. Πέρα από αυτό, όμως, υπάρχει μια αξιοσημείωτη γενετική συσχέτιση μεταξύ του Parkinson και της αυτοφαγίας, καθώς πολλά γονίδια που προκαλούν κληρονομική μορφή της νόσου ή αποτελούν παράγοντες κινδύνου εμφάνισης της νόσου εμπλέκονται στο μονοπάτι ALP. Τα κυριότερα από αυτά είναι τα *GBA* [39], *Parkin* (*PARK2*) - *PINK1* (*PARK6*) [40], (*PARK7*) [41], *LRRK2* (*PARK8*) [42], *ATP13A2* (*PARK9*) [43] και *VPS35* (*PARK17*) [44].

1.3.5. Νευροφλεγμονή

Στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), η συνεχής αλληλεπίδραση των νευρώνων, των νευρογλοιακών κυττάρων και του μικροπεριβάλλοντος είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ομοιόστασης. Αντίθετα, οι βλάβες σε αυτή την συνεχή επικοινωνία οδηγούν σε νευροεκφυλιστικές καταστάσεις, όπως το Parkinson. Από τα νευρογλοιακά κύτταρα, τα μικρογλοιακά κύτταρα είναι αυτά τα οποία θα επάγουν μια ανοσολογική απόκριση σε περίπτωση βλάβης. Ωστόσο, υπάρχουν αποδείξεις ότι και τα ανοσοκύτταρα από το περιφερικό αίμα συμμετέχουν στην ανοσοαπόκριση κατά την παθογένεση του Parkinson. Αν και η μεγαλύτερη προσοχή της επιστημονικής κοινότητας στρέφεται στην επαγωγή της έμφυτης ανοσίας, όλο και περισσότερα δεδομένα αποκαλύπτουν και την συμμετοχή της προσαρμοστικής ανοσίας.

Έμφυτη ανοσία

Τα μικρογλοιακά κύτταρα είναι τα μακροφάγα κύτταρα του εγκεφάλου, τα οποία «περιπολούν» το εγκεφαλικό παρέγχυμα και αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας [45]. Η συσσώρευση α-συνουκλεΐνης, τα πεπτίδια παθογόνων (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) και διάφορες περιβαλλοντικές τοξίνες, όπως τα φυτοφάρμακα και τα βαρέα μέταλλα, μπορούν αναγνωριστούν από Toll-like υποδοχείς (TLRs) [46] και να οδηγήσουν στην ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων οδηγώντας στην επαγωγή φλεγμονώδων μονοπατιών και στην παραγωγή δραστικών ριζών O_2 και N_2 [47]. Κατά το Parkinson, η ενεργοποίησή τους μπορεί, στην αρχή, να εντοπίζεται στον μεσεγκέφαλο, αλλά, στην συνέχεια, επεκτείνεται και σε ευρύτερες περιοχές του εγκεφάλου, όπως το ραβδωτό σώμα, η ουαρόλειος γέφυρα, ο εγκεφαλικός φλοιός και ο ιπλόκαμπος [48, 49]. Επομένως, η απόκρισή τους διαφοροποιείται, τόσο σε επίπεδο πολλαπλασιασμού όσο και σε επίπεδο έκφρασης πρωτεϊνών, κατά την εξέλιξη της νόσου [50, 51]. Αν αυτή η ανοσοαπόκριση διατηρηθεί για αρκετό διάστημα μπορεί να οδηγήσει σε χρόνια εκτεταμένη νευροφλεγμονή προκαλώντας κυτταρικό θάνατο. Πράγματι, έχουν εντοπιστεί σε βιοψίες εγκεφάλου, στον ορό και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) ασθενών με Parkinson αυξημένες συγκεντρώσεις των ενζύμων COX1 και iNOS [52, 53], τα οποία εμπλέκονται στην ανοσοαπόκριση μέσω της σύνθεσης προσταγλανδινών (PGs) και NO, πρωτεϊνών του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας II (MHC II) [54-57], το οποίο εμπλέκεται στην αντιγονοπαρουσίαση, και φλεγμονώδων κυτταροκινών, όπως ο παράγοντας νέκρωσης

όγκου α (TNF- α), ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β (TGF- β), η ιντερλευκίνη-1 β (IL-1 β), η IL-2, η IL-4, η IL-6, η IL-10 και η IL-12 [58-61].

Ο εκφυλισμός των ντοπαμινεργικών νευρώνων και η συνεχής έκκριση κυτταροκινών από τα μικρογλοιακά κύτταρα οδηγεί σε όλο και πιο εκτεταμένη ανοσοαπόκριση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή ενός καταρράκτη φλεγμονωδών μονοπατιών με κυριότερα σημεία την ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων NF- κ B [46] και Nrf2 [62], την στρατολόγηση του φλεγμονοσώματος NLRP3 [63] και την ταυτόχρονη παραγωγή ROS, επιβαρύνοντας όλο και περισσότερο το μικροπεριβάλλον του εγκεφάλου. Οι συνέπειες της νευροφλεγμονής σταδιακά επεκτείνονται και σε άλλο είδος νευρογλοιακών κυττάρων, που ονομάζονται αστροκύτταρα [57]. Τα αστροκύτταρα προσφέρουν στήριξη και μεταβολική συνεισφορά στους νευρώνες, συμμετέχουν στην επιδιόρθωση νευρικού ιστού και συμβάλλουν στην δημιουργία και σταθεροποίηση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού [64]. Οι λειτουργίες αυτές αποσυντονίζονται από την παρουσία φλεγμονής με αποτέλεσμα όχι μόνο την ατροφία του νευρικού ιστού, αλλά και την αύξηση της διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού [65, 66]. Συνεπώς, γίνεται εφικτή η διήθηση περιφερικών ανοσοκυττάρων στον εγκέφαλο. Συγκεκριμένα, έχουν εντοπιστεί σε μεταθανάτιες βιοψίες εγκεφάλων ασθενών με Parkinson [67] και οργανισμών-μοντέλων [68] πρωτεΐνες που εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό σε μονοκύτταρα/μακροφάγα του αίματος, αλλά όχι σε μικρογλοιακά κύτταρα, όπως οι υποδοχείς CD163 [69] και CCR2 [70].

Προσαρμοστική ανοσία

Η αυξημένη έκφραση MHC II, που προαναφέρθηκε, προΐδεάζει για την εμπλοκή των κυττάρων της προσαρμοστικής ανοσίας στην παθογένεση του Parkinson, με τα μικρογλοιακά κύτταρα να δρουν ως αντιγονοπαρουσιαστικά στα T βοηθητικά λεμφοκύτταρα. Πράγματι, έχει παρατηρηθεί διήθηση T λεμφοκυττάρων από το αίμα στον εγκέφαλο ασθενών με Parkinson [72] και οργανισμών-μοντέλων [73]. Επιπλέον, πολλές μελέτες συνδέουν την αυξημένη συγκέντρωση των CD4+ T λεμφοκυττάρων με τον νευροεκφυλισμό [72, 74] και, μάλιστα, έχει αποδειχθεί ότι, σε ασθενείς με Parkinson, τα CD4+ αναγνωρίζουν ορισμένα πεπτίδια α -συνουκλεΐνης [75]. Τέλος, ο ρόλος των B λεμφοκυττάρων στο Parkinson δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί.

μικροβίωμα του εντέρου κατά το Parkinson προκαλούνται από τη σηματοδότηση του εγκεφάλου ή εάν οι ίδιες οι αλλαγές είναι αυτές που προκαλούν την εγκεφαλική δυσλειτουργία παραμένει ακόμη ασαφές.

1.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση της νόσου του Parkinson

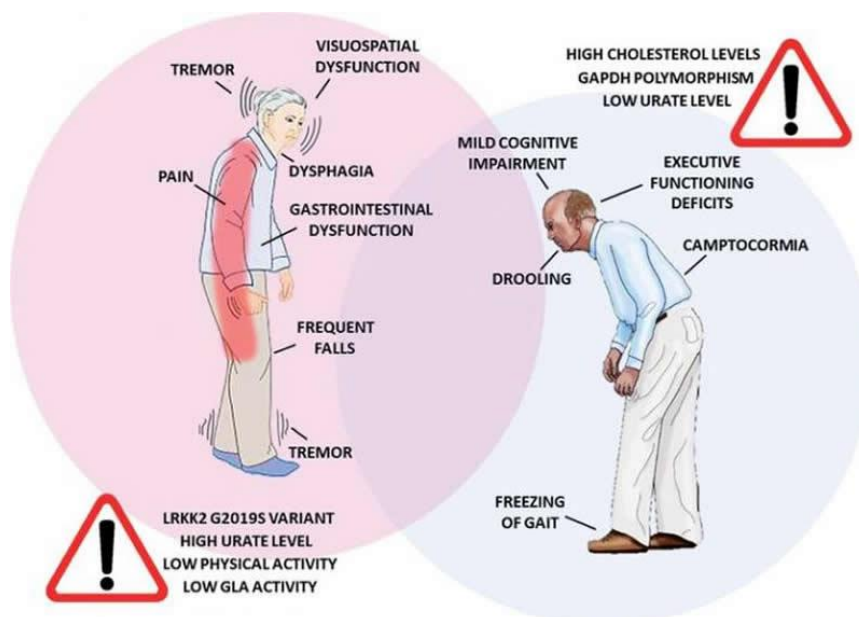
Τα ακριβή αίτια ή ο μηχανισμός εκφυλισμού των νευρώνων στο Parkinson δεν είναι ακόμη γνωστά, παρά τις εντατικές έρευνες. Το μόνο σίγουρο είναι ότι αντικρίζουμε μία νόσο, η οποία, το 90% περίπου των περιπτώσεων, είναι σποραδική, ή αλλιώς ιδιοπαθής, δηλαδή έχει πολυπαραγοντική αιτιολογία. Με άλλα λόγια, είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης διάφορων περιβαλλοντικών, γενετικών και επιγενετικών παραγόντων και, γενικότερα, του τρόπου ζωής ενός ατόμου. Ωστόσο, ακόμα και το 10% των υπόλοιπων περιπτώσεων, οι οποίες αφορούν την κληρονομική μορφή αυτής της νόσου, οφείλεται σε μια ποικιλία γονιδίων, τα οποία συμμετέχουν σε μία πληθώρα διαφορετικών κυτταρικών διαδικασιών, συμβάλλοντας, με αυτό τον τρόπο, στην ετερογένεια του Parkinson.

1.4.1. Ηλικία - Φύλο

Ένας πολύ σημαντικός παράγοντας κινδύνου εμφάνισης της σποραδικής νόσου Parkinson είναι η ηλικία, καθώς με το γήρας πολλοί κυτταρικοί μηχανισμοί φθείρονται και απορρυθμίζονται. Ειδικότερα, η συχνότητα εμφάνισης της νόσου αυξάνεται κατά 5 έως 10 φορές από την έκτη έως την ένατη δεκαετία της ζωής [85], ενώ τα μεγαλύτερα ποσοστά νόσησης παρατηρούνται σε ηλικίες άνω των 80 ετών [5].

Παράλληλα, όλο και περισσότερες μελέτες υποστηρίζουν ότι το φύλο αποτελεί έναν ακόμα καθοριστικό παράγοντα που σχετίζεται με την εκδήλωση του Parkinson. Συγκεκριμένα, ο κίνδυνος εκδήλωσης της νόσου είναι δύο φορές μεγαλύτερος στους άντρες από ό,τι στις γυναίκες [86]. Ωστόσο, οι γυναίκες έχουν υψηλότερο δείκτη θνησιμότητας και ταχύτερη εξέλιξη της νόσου [87]. Διαφορές παρατηρούνται, επίσης, στην κλινική εικόνα των ασθενών, καθώς τα δύο φύλα, συχνά, εκδηλώνουν διαφορετικά συμπτώματα ή τα ίδια αλλά με διαφορετικές εντάσεις [88, 89]. Αυτές οι διαφορές, πιθανώς, οφείλονται εν μέρει στον νευροπροστατευτικό ρόλο των γυναικείων ορμονών, όπως η οιστραδιόλη και η

προγεστερόνη, καθώς και στις διαφορετικές περιβαλλοντικές τοξίνες, στις οποίες εκτίθενται τα δύο φύλα.



Εικόνα 5: Οι διαφορές στην συμπτωματολογία της νόσου Parkinson μεταξύ αντρών και γυναικών.

1.4.2. Περιβαλλοντικοί παράγοντες και τρόπος ζωής

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, ένας μεγάλος αριθμός επιδημιολογικών μελετών έχει προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες, οι οποίες οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το περιβάλλον και ο τρόπος ζωής παίζουν σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση του Parkinson. Η έκθεση σε τοξικά χημικά, όπως τα φυτοφάρμακα, αποτελεί έναν από τους πιο βασικούς παράγοντες κινδύνου. Μια πολύ γνωστή ουσία που περιέχεται σε διάφορα είδη φυτοφαρμάκων και ζιζανιοκτόνων είναι η 1-μεθυλο-4-φαινυλο-1,2,3,6-τετραυδροπυριδίνη (MPTP) [90]. Εδώ και πολλά χρόνια, αυτή η ουσία χρησιμοποιείται σε ζωικά μοντέλα για την μελέτη των μοριακών μηχανισμών του Parkinson και την ανάπτυξη νευροπροστατευτικών φαρμάκων [91, 92]. Άλλοι παράγοντες κινδύνου, που έχουν συνδεθεί με την νόσο, είναι η έκθεση σε βαρέα μέταλλα, η αγροτική ενασχόληση, η συνεχής κατανάλωση νερού από πηγάδι, ο τραυματισμός στο κεφάλι, ο διαβήτης τύπου 2, η χρήση μεθαμφεταμίνης και η κατανάλωση πολλών γαλακτοκομικών προϊόντων [93, 94]. Είναι, όμως, σημαντικό να διευκρινιστεί ότι οι περισσότεροι παράγοντες κινδύνου είναι συμπεράσματα επιδημιολογικών ερευνών και δεν έχουν αποκαλυφθεί ακόμα όλοι οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται γύρω από την συσχέτιση αυτών με το Parkinson.

1.4.3. Γενετικοί παράγοντες

Περίπου το 10% των περιπτώσεων Parkinson οφείλεται σε γενετικές μεταλλάξεις, οι οποίες μπορεί να προκαλούν τη νόσο είτε με αυτοσωμική επικρατή είτε με αυτοσωμική υπολειπόμενη κληρονομηση. Αν και είναι αδιαμφισβήτητη η εμπλοκή τους στην εκδήλωση του Parkinson, πολλές μεταλλάξεις δεν μπορούν να επάγουν από μόνες τους την νόσο παρά μόνο να προσδώσουν μία προδιάθεση στο άτομο που τις φέρει και, γι' αυτό θεωρούνται απλώς παράγοντες κινδύνου για το Parkinson. Σε γενικές γραμμές, η κληρονομική νόσος συνδέεται με εκδήλωση σε αρκετά νεαρή ηλικία και, πολλές φορές, οδηγεί σε άτυπα συμπτώματα [4, 95]. Είναι, επίσης, ενδιαφέρον ότι οι ασθενείς που εμφανίζουν την ίδια γενετική μετάλλαξη τυπικά δεν έχουν παρόμοιες κλινικές εκδηλώσεις, υποδηλώνοντας την ύπαρξη μιας πολύπλοκης αλληλεπίδρασης μεταξύ περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων. Μέχρι στιγμής, χάρη στην πρόοδο των τεχνικών γενετικής και των πληθυσμιακών μελετών, έχουν περιγραφεί περισσότερες από 20 μονογονιδιακές μορφές του Parkinson και έχουν αναγνωριστεί πάνω από 100 γονιδιακοί τόποι ως παράγοντες κινδύνου [96, 97].

Αξίζει να αναφερθεί ότι έχουν εντοπιστεί αρκετοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) που σχετίζονται τόσο με τη νόσο του Alzheimer όσο και του Parkinson. Αρκετά SNPs που αφορούν και τις δύο νόσους εντοπίζονται στο γονίδιο *SORL1*, που κωδικοποιεί τη πρωτεΐνη SorLA της οικογένειας των υποδοχέων με VPS10P επικράτεια. Αναφορικά, έχει προταθεί ως παράγοντας κινδύνου για το Parkinson η μετάλλαξη c.G1135T (p.G379W) του γονιδίου *SORL1*, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την μετατροπή της γλυκίνης 379 σε θρεονίνη και τη λανθασμένη τριδιάστατη δομή της SorLA [98]. Τέλος, οι πολυμορφισμοί rs1010159 και rs2298813 αποτελούν εξίσου παράγοντες κινδύνου για τη νόσο [99].

Στον πίνακα παρακάτω παρατίθενται τα κυριότερα γονίδια που εμπλέκονται στην αιτιολογία του Parkinson, οι γονιδιακοί τόποι τους, οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν και τα μοριακά μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται.

Πίνακας 1: Τα κυριότερα γονίδια τα οποία σχετίζονται με την κληρονομική νόσο του Parkinson. Ορισμένα γονίδια εντοπίζονται σε παραπάνω από μία κατηγορίες, καθώς έχει βρεθεί ότι κάποιες μεταλλάξεις τους επάγουν τη νόσο, ενώ κάποιες άλλες προσδίδουν μόνο μία γενετική προδιάθεση στο άτομο που τις φέρει και θεωρούνται παράγοντες κινδύνου.

Όνομα Γονιδίου	Γονιδιακός τόπος	Πρωτεΐνη	Μοριακό μονοπάτι
Αυτοσωμική επικρατής κληρονόμηση της νόσου Parkinson			
SNCA (PARK1 / PARK4)	4q22.1	α-συνουκλεΐνη	Διακίνηση συναπτικών κυστιδίων – Απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών [24]
PARK3	2p13	Άγνωστη	Άγνωστο
UCHL1 (PARK5)	4p13	Ubiquitin C-terminal hydrolase L1	Μονοπάτι ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος (UPP) [100]
LRRK2 (PARK8)	12q12	Leucine-rich repeat kinase 2 / «Dardarin»	Ανάπτυξη νευρίτη – Αυτοφαγία – Διακίνηση συναπτικών κυστιδίων – Ανοσοαπόκριση - Ελαγωγή φλεγμονής [101-103]
HTRA2	2p13.1	HtrA serine peptidase 2	Μιτοφαγία – Αλόπωση – Διατήρηση αιματοεγκεφαλικού φραγμού [104, 105]
VPS35	16q12	Vacuolar protein sorting 35	Αυτοφαγία [106]
EIF4G1	3q27.1	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	Έναρξη μετάφρασης πρωτεϊνών [107]
DNAJC13	3q22.1	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C13	Ρύθμιση αυτοφαγίας – Ομοιόσταση πρωτεϊνών [108]
CHCHD2	7p11.2	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2	Μιτοχονδριακή λειτουργία – Αλόπωση στο οξειδωτικό στρες [109]
Αυτοσωμική υπολειπόμενη κληρονόμηση της νόσου Parkinson			
PRKN (PARK2)	6q26	Parkin	Μονοπάτι ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος (UPP) – Βιογένεση μιτοχονδρίων – Μιτοφαγία [32-34]
PINK1 (PARK6)	1p36.12	PTEN-induced putative kinase 1	Βιογένεση μιτοχονδρίων – Μιτοφαγία [32, 33]
DJ-1 (PARK7)	1p36.23	DJ-1	Αυτοφαγία – Μιτοφαγία – Ανοσοαπόκριση [110]
ATP13A2	1p36.13	ATPase cation transporting 13A2	Μονοπάτι αυτοφαγίας – λυσοσώματος (ALP) [43]
GIGYF2 (PARK11)	2q36-37	GRB10 interacting GYF protein 2	IGF σηματοδότηση [111]
PLA2G6 (PARK14)	22q13.1	calcium-independent phospholipase A2 beta enzyme (iPLA ₂ β)	Ομοιόσταση κυτταρικής μεμβράνης – Μιτοχονδριακή λειτουργία – Μιτοφαγία - Μεταβολισμός λιπιδίων [112]
FBXO7	22q12.3	F-box protein 7	Μιτοφαγία - Μονοπάτι ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος (UPP) [113]
DNAJC6	1p31.3	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C6	Αλόπωση στο οξειδωτικό στρες – Συμμετοχή στην ορθή αναδίπλωση πρωτεϊνών [114]
SYNJ1	21q22.11	Synaptojanin 1	Μονοπάτι αυτοφαγίας – λυσοσώματος (ALP) - Διακίνηση συναπτικών κυστιδίων [115, 116]
VPS13C	15q22.2	Vacuolar protein sorting 13 homolog C	Αυτοφαγία – Μιτοφαγία [117]

Παράγοντες κινδύνου εκδήλωσης της νόσου Parkinson

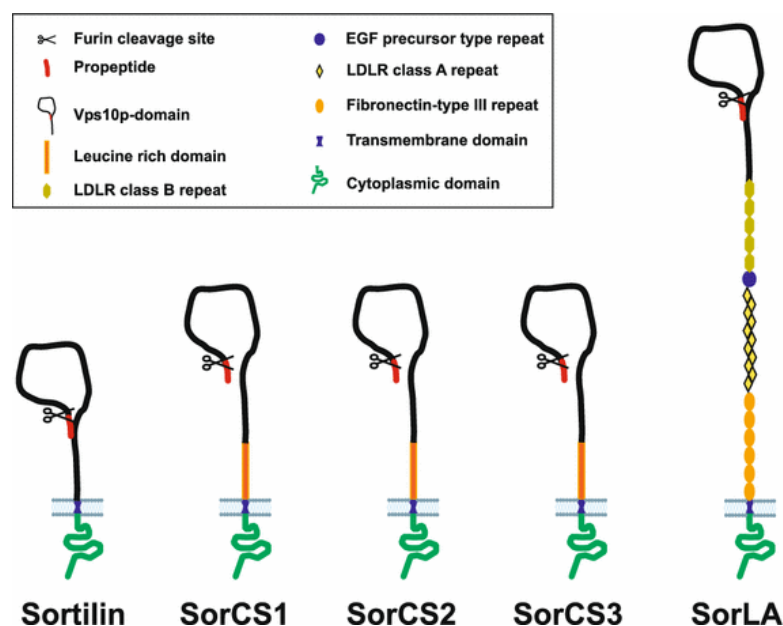
SNCA (PARK1 / PARK4)	4q22.1	α-συνουκλεΐνη	Διακίνηση συναπτικών κυστιδίων – Απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών [24]
GBA	12q12	β γλυκοκερεβροσιδάση	Λυσοσωμική λειτουργία – Ρύθμιση ανοσοαπόκρισης [118]
MAPT	1p32	Microtubule associated protein tau	Διατήρηση σταθερότητας των μικροσωληνίσκων – Συμμετοχή στην συναπτική σηματοδότηση [119]
PARK10	1q32	Άγνωστη	Άγνωστο
PARK12	Xq21-q22	Άγνωστη	Άγνωστο
LRRK2 (PARK8)	1q22	leucine-rich repeat kinase 2 / «Dardarin»	Ανάπτυξη νευρίτη – Αυτοφαγία – Διακίνηση συναπτικών κυστιδίων – Ανοσοαπόκριση - Επαγωγή φλεγμονής [101-103]
PARK16	17q21.31	Άγνωστη	Άγνωστο
SORL1	c.G1135T	SorLA	Διακίνηση κυστιδίων[98]

1.5. Η οικογένεια υποδοχέων με VPS10P επικράτεια

Η οικογένεια υποδοχέων με VPS10P (Vacuolar Protein Sorting 10 Protein) επικράτεια αποτελείται από πέντε μέλη: τη σορτιλίνη, τη SorLA, τη sorCS1, τη sorCS2 και τη sorCS3. Όλα τα μέλη της οικογένειας είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς τύπου I και το κοινό χαρακτηριστικό τους είναι η επικράτεια VPS10P στο N-τελικό άκρο τους, η οποία αποτελείται από 700 αμινοξέα, είναι πλούσια σε κυστεΐνες και χρησιμεύει στην δέσμευση των προσδετών [120, 121]. Στην σορτιλίνη είναι η μοναδική επικράτεια, ενώ στις άλλες τέσσερις πρωτεΐνες συνδυάζεται και με άλλες επικράτειες. Συγκεκριμένα, στην SorLA συμπεριλαμβάνονται 5 επαναλήψεις χαμηλής πυκνότητας υποδοχέα λιποπρωτεϊνών (Low Density Lipoprotein Receptor, LDLR) κατηγορίας B, 1 επανάληψη τύπου πρόδρομου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor, EGF), 11 επαναλήψεις LDLR κατηγορίας A και 6 επαναλήψεις φιμπρονεκτίνης τύπου III.

Οι SorCS1, SorCS2 και SorCS3 είναι σε πολύ μεγάλο βαθμό ομόλογες και, εκτός από τη VPS10P επικράτεια, περιλαμβάνουν και μία πλούσια σε λευκίνη επικράτεια. Όλοι οι υποδοχείς φέρουν μία μικρή (40-80 αμινοξέα) κυτταροπλασματική ουρά που περιλαμβάνει τυπικά μοτίβα για αλληλεπίδραση με μόρια. Η σορτιλίνη, η SorLA, η SorCS1 και η SorCS3 όταν συντίθενται περιλαμβάνουν στο N-τελικό άκρο τους ένα προπεπτιδίο 44 περίπου αμινοξέων, το οποίο τις καθιστά ανενεργές και αποτρέπει την σύνδεση προσδέτη στην VPS10P επικράτεια. Για τη μετατροπή τους σε ώριμους υποδοχείς χρειάζεται η μεταφορά τους στο δίκτυο Trans-Golgi (TGN), όπου πραγματοποιείται η διάσπαση των προπεπτιδίων τους [122, 123].

Η κύρια λειτουργία των υποδοχέων με επικράτεια VPS10P είναι η ενδοκυτταρική διακίνηση πρωτεϊνών και η μεταγωγή σήματος. Συγκεκριμένα, μεσολαβούν στην ενδοκυττάρωση και την ταξινόμηση πρωτεϊνών εξωκυτταρικής προέλευσης και στη μεταφορά πρωτεϊνών ενδοκυτταρικής και εξωκυτταρικής προέλευσης από το δίκτυο Trans-Golgi σε ενδοσώματα, εκκριτικά κυστίδια, λυσοσώματα ή την πλασματική μεμβράνη [124-126]. Γι' αυτό το λόγο, το μεγαλύτερο ποσοστό τους βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα ή σε μεμβράνες οργανιδίων και μόνο ένα μικρό ποσοστό εντοπίζεται στη πλασματική μεμβράνη. Η μόνη εξαίρεση είναι η SorCS3, η οποία κυριαρχεί στη πλασματική μεμβράνη και έχει μικρή ενδοκυτταρική έκφραση [127]. Η αφθονία αυτών των υποδοχέων στον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό καθώς και πολλοί από τους προσδέτες τους, μερικούς από τους οποίους θα αναφέρουμε στη συνέχεια, υποδεικνύουν ότι εμπλέκονται σε ζωτικές λειτουργίες του νευρικού συστήματος που αφορούν την επιβίωση, τη λειτουργία και τη πλαστικότητα των νευρώνων [128-130].

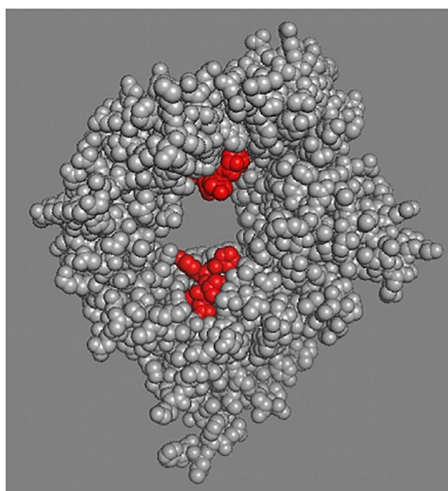


Εικόνα 6: Οι δομές των υποδοχέων με επικράτεια VPS10P [120].

1.6. Η σορτιλίνη και τα χαρακτηριστικά της

Η σορτιλίνη (sortilin), γνωστή και ως υποδοχέας νευροτενσίνης-3 (Neurotensin Receptor-3, NTR3), είναι μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου I και μέλος της οικογένειας υποδοχέων με VPS10P (Vacuolar Protein Sorting 10 Protein) επικράτεια. Αποτελείται από 833 αμινοξέα, έχει μάζα 100 kDa και κωδικοποιείται από το γονίδιο *SORT1*, το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1, στον γονιδιακό τόπο 1p13.3. Εντοπίστηκε για

πρώτη φορά στον ανθρώπινο εγκέφαλο [131], όπου εκφράζεται σε αρκετά υψηλό βαθμό, ιδιαίτερα στον ιπλόκαμπο και στον φλοιό [132]. Η έκφρασή της δεν περιορίζεται μόνο στον εγκέφαλο, καθώς εντοπίζεται και σε άλλους ιστούς και όργανα, με κυριότερα το νωτιαίο μυελό, τον σπλήνα και τους όρχεις. Επίσης, έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση στους πνεύμονες κατά την εμβρυική ανάπτυξη [120]. Χαμηλότερα ποσοστά σορτιλίνης εντοπίζονται στην καρδιά και το ήπαρ [133]. Τέλος, η κατανομή της σορτιλίνης στο κύτταρο είναι εξαιρετικά ρυθμισμένη, με το μεγαλύτερο ποσοστό της να εντοπίζεται σε ενδοκυτταρικά διαμερίσματα, όπως το σύμπλεγμα Golgi, και σε ενδοσώματα, ενώ ένα μικρό ποσοστό βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη [134].



Εικόνα 7: Δομικό μοντέλο της σορτιλίνης σε σύμπλοκο με τη νευροτενσίνη (PDB: 3F6K). Η σορτιλίνη αναπαριστάται με γκρι και με κόκκινο η νευροτενσίνη [135].

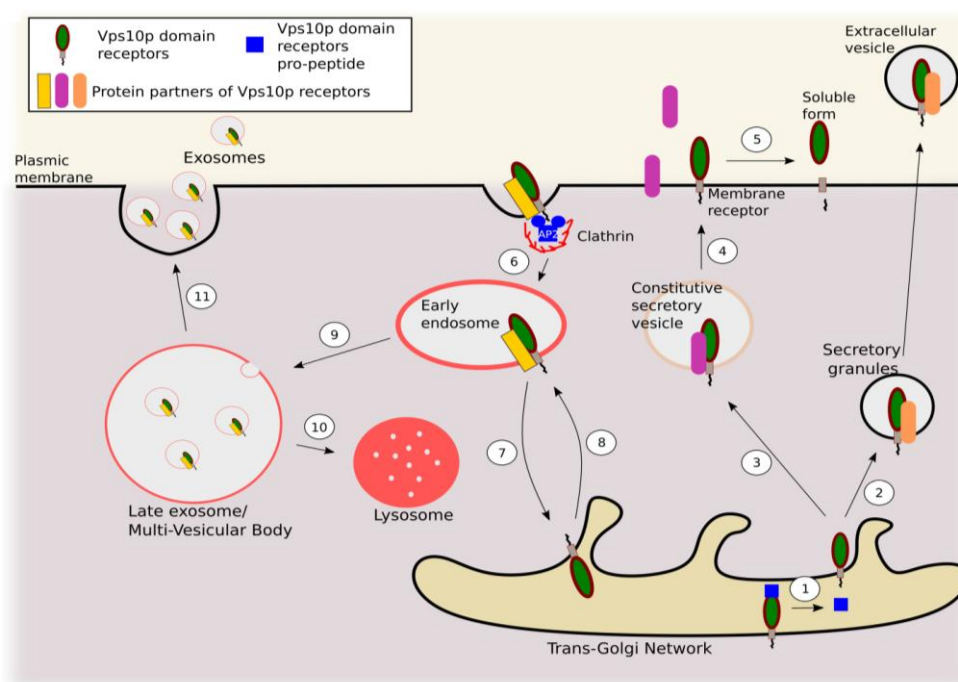
1.7. Οι γενικές δράσεις της σορτιλίνης

Η σορτιλίνη έχει αποκτήσει μεγάλη προσοχή τα τελευταία χρόνια για τις σημαντικές της λειτουργίες στην ενδοκυτταρική διακίνηση και ταξινόμηση σημαντικών μορίων, καθώς και για το ρόλο της ως υποδοχέα και συν-υποδοχέα στην πλασματική μεμβράνη. Εντοπίζεται είτε στην μεμβρανική μορφή της στην πλασματική μεμβράνη, σε ενδοσώματα και στις μεμβράνες των οργανιδίων του κυττάρου είτε στη διαλυτή μορφή της στον εξωκυττάριο χώρο. Αφού πραγματοποιηθεί η ωρίμασή της στο δίκτυο Trans-Golgi, η σορτιλίνη μπορεί να δράσει άμεσα ως υποδοχέας δεσμεύοντας κάποια πρωτεΐνη στο δίκτυο και στη συνέχεια το σύμπλοκό τους να απελευθερωθεί στον εξωκυττάριο χώρο μέσω εκκριτικών κοκκίων [136].

Εναλλακτικά, μπορεί από το Trans-Golgi να μεταφερθεί στην πλασματική μεμβράνη μέσω εκκριτικών κυστιδίων. Εκεί μπορεί να υποστεί πρωτεολυτική διάσπαση από τη

μεταλλοπρωτεάση ADAM10 ή την ADAM17 και ύστερα με τη βοήθεια της γ -εκκριτάσης να απελευθερωθεί στον εξωκυττάριο χώρο στην διαλυτή μορφή της [137, 138]. Στη πλασματική μεμβράνη, μόλις η σορτιλίνη δεσμεύσει κάποιον προσδέτη της, το σύμπλοκό τους υπόκειται σε εξαρτώμενη από την AP-2 (Activating Protein 2) και την κλαθρίνη ενδοκυττάρωση [124, 139]. Στη συνέχεια, το ενδόσωμα που δημιουργείται μπορεί να μεταφερθεί στο δίκτυο Trans-Golgi [140, 141] ή σε λυσοσώματα για αποικοδόμηση [142, 143] ή να εξωκυτταρωθούν σε εξωσώματα [144].

Τις τελευταίες δεκαετίες, έχει αποδειχθεί ότι η απορρύθμιση της σορτιλίνης εμπλέκεται σε πολλές παθοφυσιολογίες, συμπεριλαμβανομένων νευροεκφυλιστικών διαταραχών, όπως η νόσος Alzheimer και η νόσος Parkinson, σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, παχυσαρκία, καρκίνο και καρδιαγγειακές παθήσεις, όπως η αθηροσκλήρωση [145].



Εικόνα 8: Μονοπάτια ενδοκυττάριας διακίνησης της σορτιλίνης και των προσδετών της [145].

1.8. Οι ιστοειδικές δράσεις της σορτιλίνης και οι κυριότερες ασθένειες στις οποίες εμπλέκεται

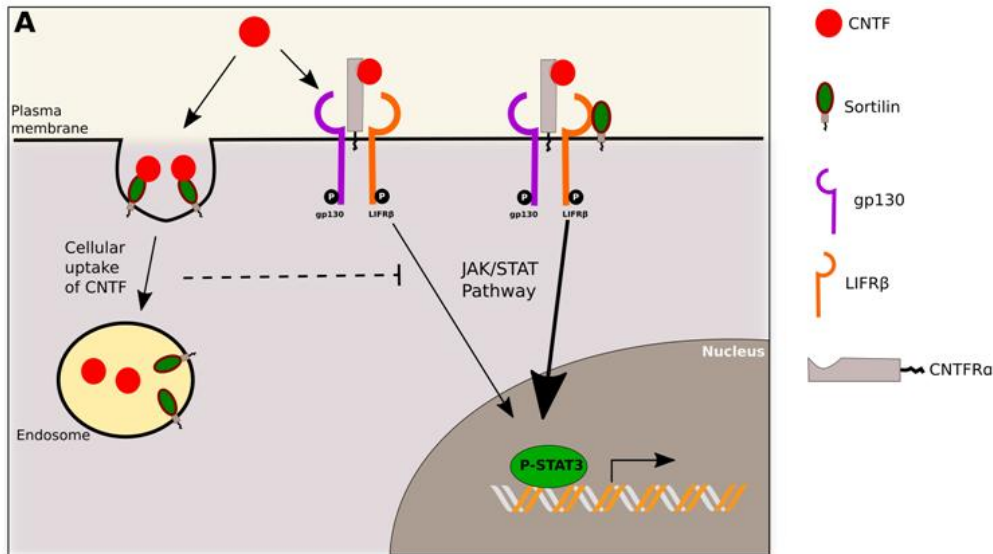
1.8.1. Η σορτιλίνη στο ανοσοποιητικό σύστημα

Η σορτιλίνη εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, αλλά σε μεγαλύτερο βαθμό στα μακροφάγα, τα δενδριτικά, τα Β λεμφοκύτταρα, τα Th1 βοηθητικά λεμφοκύτταρα και τα Τ κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα [145]. Πρόσφατες μελέτες έχουν επισημάνει τη συμμετοχή της σορτιλίνης στη ρύθμιση της έκκρισης κυτταροκινών και άλλων ουσιών που σχετίζονται με την κυτταροτοξικότητα και τη φλεγμονή κατά τη διάρκεια διαφορετικών ανοσολογικών αποκρίσεων. Πρωταγωνιστές στις αποκρίσεις κυτταροτοξικότητας είναι τα φυσικά φονικά κύτταρα (Natural Killer cells, NKs), τα φυσικά φονικά Τ κύτταρα (Natural Killer T cells, NKTs) και τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα (Cytotoxic T lymphocytes, CTLs). Αυτά τα κύτταρα ενεργοποιούνται κυρίως ως απόκριση σε ιικές μολύνσεις, κάποια ενδοκυτταρικά βακτήρια και όγκους. Εκκρίνουν κυτταροκίνες, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκου α (Tumor Necrosis Factor alpha, TNF-α) και η ιντερφερόνη-γ (Interferon gamma, IFN-γ), και κυτταρολυτικά κοκκία, τα οποία περιέχουν ένζυμα, όπως η περφορίνη και οι θρυμματίνες, τα οποία οδηγούν σε απόπτωση των παθογόνων που έχουν προσβάλλει τον οργανισμό. Αυτές οι διαδικασίες φαίνεται να εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη σορτιλίνη, η οποία ρυθμίζει την ενδοκυτταρική διακίνηση τόσο της IFN-γ στα NK, στα CTL και στα Th1 βοηθητικά κύτταρα όσο και της θρυμματίνης Α από τα NK και τα CTL [146]. Η σορτιλίνη, επίσης, δεσμεύει με μεγάλη συγγένεια την ιντερλευκίνη-6 (Interleukin-6, IL-6) [147], την IFN-α, την IL-10, την IL-12, και την IL-17A και κατ'επέκταση ρυθμίζει την έκκρισή τους [133]. Επομένως, οποιαδήποτε αυξομείωση της έκφρασής της μπορεί να επηρεάσει άμεσα την επαγωγή ή την καταστολή διάφορων ανοσολογικών αποκρίσεων.

Μία ακόμα σημαντική λειτουργία της σορτιλίνης στο ανοσοποιητικό σύστημα είναι η «σάρωση» για εξωκυτταρικά αντιγόνα σε μακροφάγα και η ωρίμαση του φαγοσώματος. Τα μακροφάγα ακολουθούν το κλασικό μονοπάτι ενεργοποίησης ως απόκριση σε παθογόνα και το εναλλακτικό μονοπάτι ενεργοποίησης με στόχο τη ρύθμιση και καταστολή της ανοσοαπόκρισης και την επούλωση πληγών [148]. Στα εναλλακτικά ενεργοποιημένα μακροφάγα (Alternatively Associated Macrophages, AAMs), η σορτιλίνη μπορεί να δεσμεύσει εξωκυτταρικά αντιγόνα και να μεσολαβήσει στην ενδοκυττάρωσή τους [156].

Στη συνέχεια, το αντιγόνο αποικοδομείται στο λυσόσωμα με αποτέλεσμα τα μακροφάγα να μην μπορούν να το επεξεργαστούν και να το παρουσιάσουν στα T βοηθητικά λεμφοκύτταρα μέσω μορίων MHC τάξης II. Επομένως, πραγματοποιείται καταστολή της ανοσοαπόκρισης. Επιπλέον, κατά τη φαγοκυττάρωση από τα μακροφάγα, ενεργοποιείται η σηματοδοτική οδός του NF-κB, προκαλώντας τη μεταγραφή του γονιδίου *SORT1*. Η σορτιλίνη που συντίθεται μεταφέρει το ένζυμο όξινη σφιγγομυελινάση (Acid Sphingomyelinase) στα πρώιμα φαγοσώματα [149]. Αυτό το βήμα είναι κρίσιμο για την ωρίμαση του φαγοσώματος και την εξάλειψη του παθογόνου.

Εκτός από τη ρύθμιση της εξωκυττάρωσης των κυτταροκινών, η σορτιλίνη ρυθμίζει και τη σηματοδότησή τους. Συγκεκριμένα, ελέγχει την ενεργοποίηση του μονοπατιού που επάγει ο ακτινωτός νευροτροφικός παράγοντας (Ciliary Neurotrophic Factor, CNTF), ο οποίος ανήκει στην οικογένεια κυτταροκινών IL-6 [150]. Ο CNTF όταν συνδεθεί στον υποδοχέα του, CNTFRa, στρατολογείται το ετεροδιμερές σύμπλοκο gp130/LIFRb, αλληλεπιδρά με την κυτταροπλασματική ουρά του CNTFRa και ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι JAK/STAT, το οποίο οδηγεί στη μεταγραφή κάποιων γονιδίων υπεύθυνων για τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, την ενεργοποίηση και τη στρατολόγηση κυττάρων του ανοσοποιητικού. Η σορτιλίνη δεσμεύει την C-τελική ουρά του CNTF με υψηλή συγγένεια, σε μια ξεχωριστή θέση σύνδεσης από αυτή που συνδέεται με τον CNTFRa, μεσολαβώντας στην ταχεία πρόσληψη του εξωκυτταρικού CNTF σε ενδοσώματα και εμποδίζοντας την σύνδεσή του με τον υποδοχέα του [145]. Παράλληλα, όμως, η σορτιλίνη μπορεί να αλληλεπιδράσει με το LIFRb διευκολύνοντας και ενισχύοντας τη σηματοδότηση CNTF μέσω του ετεροδιμερούς gp130/LIFRb. Μέσω της σύνδεσής της με το LIFRb, η σορτιλίνη εμπλέκεται στη σηματοδότηση και άλλων κυτταροκινών της οικογένειας IL-6, όπως η CT-1, η LIF και η OSM, που η σηματοδότησή τους εξαρτάται από το ετεροδιμερές gp130/LIFRb, αλλά όχι στη σηματοδότηση της IL-6, η οποία εξαρτάται από το ομοδιμερές gp130 [151].



Εικόνα 9: Η σορτιλίνη ρυθμίζει τη σηματοδότηση CNTF [145].

1.8.2. Η σορτιλίνη στον εγκέφαλο

Η σορτιλίνη αλληλεπιδρά, μέσω της VPS10P επικράτειας, με νευροπεπτίδια, όπως η νευροτενσίνη, και νευροτροφικούς παράγοντες, όπως ο νευρικός αυξητικός παράγοντας (Nerve Growth Factor, NGF), ο CNTF, η προ-γκρανουλίνη (Progranulin, PGRN) και ο εγκεφαλικός νευροτροφικός παράγοντας (Brain Derived Neurotrophic Factor, BDNF) [152-154]. Η αλληλεπίδρασή της με την νευροτενσίνη στα μικρογλοιακά κύτταρα είναι αρκετά ενδιαφέρουσα, καθώς αυτά τα κύτταρα δεν φέρουν τους άλλους δύο βασικούς υποδοχείς της νευροτενσίνης, NTSR1 και NTSR2, επομένως η σηματοδότηση που επάγεται από τη νευροτενσίνη εξαρτάται απόλυτα από την παρουσία σορτιλίνης στη κυτταρική μεμβράνη τους [155]. Η αλληλεπίδραση αυτή επάγει την ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών PI3K/AKT και MAPK/ERK1-2 οδηγώντας σε αύξηση προφλεγμονώδων κυτταροκινών, όπως η IL-1β και ο TNF-α, και έκφραση χημειοκινών, όπως η πρωτεΐνη χημειοτακτισμού μονοκυττάρων-1 [Monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1 – γνωστή και ως Chemokine (CC-motif) ligand 2 (CCL2)] [156]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μετανάστευση των μικρογλοιακών κυττάρων στο σημείο της βλάβης και την επαγωγή της φαγοκυττάρωσης [155]. Εκτός από την επαγωγή φλεγμονής στον εγκέφαλο, η σορτιλίνη μεσολαβεί και σε αντι-φλεγμονώδεις δράσεις μέσω της πρόσληψης προγκρανουλίνης από τα μικρογλοιακά κύτταρα [157, 158]. Παράλληλα, έχει αποδειχθεί ότι ελέγχει την

ακεραιότητα και την ομοιόσταση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού [159]. Είναι, λοιπόν, φανερό το γεγονός ότι οποιαδήποτε δυσλειτουργία της σορτιλίνης είναι ικανή να οδηγήσει σε νευροφλεγμονή και να ευνοήσει την ανάπτυξη και την εξέλιξη ποικίλων νευροεκφυλιστικών νόσων.

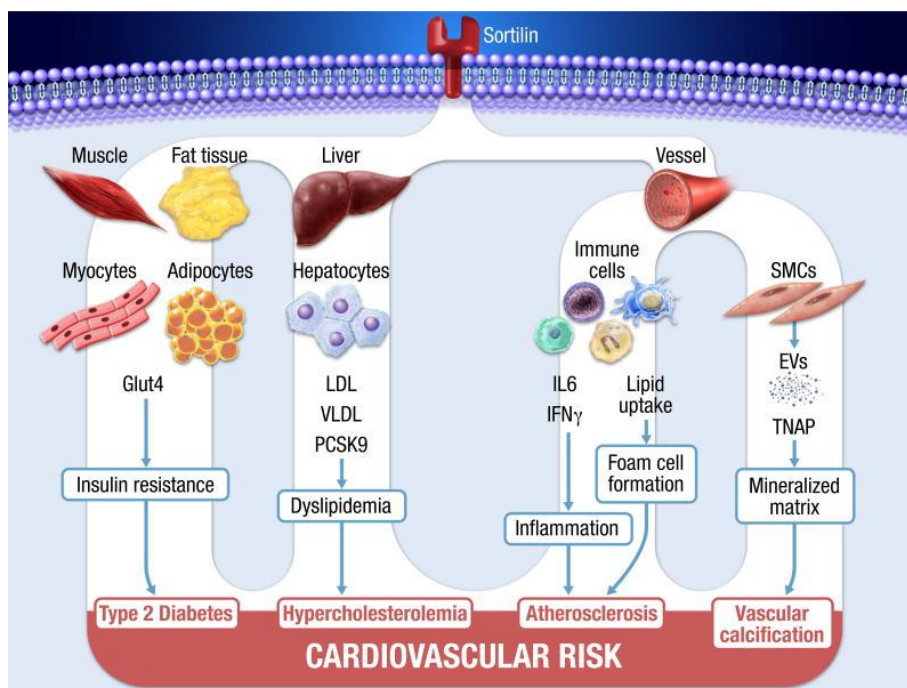
Πράγματι, η εμπλοκή της σορτιλίνης σε νευροεκφυλιστικές νόσους έχει επιβεβαιωθεί, ιδιαίτερα στη νόσο Alzheimer. Συγκεκριμένα, αλληλεπιδρά με την πρόδρομη πρωτεΐνη αμυλοειδούς (Amyloid Precursor Protein, APP) [160] και τα προϊόντα του καταβολισμού της, sAPPα (soluble Amyloid Precursor Protein α) και β-αμυλοειδές (Amyloid β peptide, Aβ) [161], καθώς και με την απολιποπρωτεΐνη E (APOE) [162]. Αυτές οι πρωτεΐνες αποτελούν ορόσημα στην παθογένεση του Alzheimer, διότι συμβάλλουν στο σχηματισμό πλακών αμυλοειδούς στον εξωκυττάριο χώρο. Η σορτιλίνη είναι αυτή που ευθύνεται για την ενδοκυττάρωση των συμπλόκων β-αμυλοειδούς και APOE με στόχο τον καταβολισμό τους, όπως, επίσης, και για τη διακίνηση της APP μέσα στο κύτταρο [163].

1.8.3. Η σορτιλίνη στο καρδιαγγειακό σύστημα και στον μεταβολισμό

Ολοένα και περισσότερα στοιχεία υποδηλώνουν το σημαντικό ρόλο της σορτιλίνης στην παθογένεση των καρδιαγγειακών και μεταβολικών νοσημάτων. Τα κυριότερα στα οποία εμπλέκεται είναι η αθηροσκλήρωση, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II, οι διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων και η παχυσαρκία [164] και, μάλιστα, έχει προταθεί ως δείκτης κινδύνου για τη στεφανιαία νόσο [165]. Η συμβολή της σορτιλίνης σε καρδιαγγειακά νοσήματα αποκαλύφθηκε από μια σειρά μελετών συσχέτισης σε όλο το γονιδίωμα (Genome-Wide Association Studies, GWAS), οι οποίες συνέδεσαν τον γονιδιακό τόπο 1p13.3, όπου εδράζεται το γονίδιο *SORT1*, με τα επίπεδα χοληστερόλης στο πλάσμα και στο ήπαρ και τον κίνδυνο εμφράγματος του μυοκαρδίου (καρδιακή προσβολή) [166, 167]. Ωστόσο, τα αποτελέσματα πολλών ερευνών που έχουν στόχο την εύρεση της ακριβούς επίδρασης της σορτιλίνης στη χοληστερόλη στο πλάσμα αλλά και στο ήπαρ παρουσιάζουν αντικρουόμενα αποτελέσματα μέχρι στιγμής [168]. Παρ' όλ' αυτά, η επικρατέστερη υπόθεση υποστηρίζει ότι η σορτιλίνη αποτελεί δείκτη κινδύνου για την υπερλιπιδαιμία, καθώς σχετίζεται με την ενδοκυτταρική διακίνηση της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (Low Density Lipoprotein, LDL), η οποία παράγεται και εκκρίνεται από τα ηπατοκύτταρα στο αίμα [169]. Άλλο ένα στοιχείο που ενισχύει την παραπάνω υπόθεση είναι η

αλληλεπίδραση της σορτιλίνης με το ένζυμο PCSK9 (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9), το οποίο συντίθεται από τα ηπατοκύτταρα, συνδέεται με τον υποδοχέα της LDL και προκαλεί τη λυσοσωμική του αποικοδόμηση [170]. Παράλληλα με την αύξηση της συγκέντρωσης της LDL στο αίμα, η σορτιλίνη προάγει τη πρόσληψη της LDL από τα μακροφάγα κύτταρα στο ενδοθήλιο των αγγείων, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό αφρωδών κυττάρων και αθηροματικών πλακών και, επομένως, την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης [171].

Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι η έκφραση της σορτιλίνης μειώνεται σε αρκετές παθολογικές καταστάσεις του μεταβολισμού, όπως η παχυσαρκία και ο διαβήτης τύπου II. Το μονοπάτι στο οποίο εμπλέκεται αφορά την ενδοκυττάρωση της γλυκόζης στα κύτταρα του μυϊκού και του λιπώδους ιστού [135]. Είναι γνωστό ότι η πρόσληψη γλυκόζης προϋποθέτει την δέσμευση της ινσουλίνης στον υποδοχέα της, IR (insulin receptor). Αυτή η αλληλεπίδραση ελάγει το μονοπάτι σηματοδότησης PI3K/AKT/mTOR στρατολογώντας κυστίδια, που περιέχουν τον μεταφορέα γλυκόζης-4 (Glucose Transporter-4, GLUT4), από τα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα στην επιφάνεια του κυττάρου [172]. Έχει προταθεί ότι η ο σχηματισμός και η ινσουλινοεξαρτώμενη μετατόπιση του Glut4 εξαρτώνται από τη σορτιλίνη [173, 174]. Άρα, η σορτιλίνη εμμέσως επηρεάζει την πρόσληψη της γλυκόζης από τα κύτταρα και ίσως να έχει ένα σημαντικό ρόλο στην αντίσταση στην ινσουλίνη που παρατηρείται στον διαβήτη τύπου II.



Εικόνα 10: Η σορτιλίνη ως παράγοντας κινδύνου για καρδιαγγειακά και μεταβολικά νοσήματα [164].

Σκοπός

Η νόσος του Parkinson είναι η δεύτερη πιο κοινή νευροεκφυλιστική νόσος στον κόσμο, με πολλά επώδυνα συμπτώματα, τα οποία επηρεάζουν όχι μόνο την κίνηση, αλλά και μία ποικιλία άλλων συστημάτων του οργανισμού, πλήττοντας την καθημερινότητα και τη ποιότητα ζωής των ασθενών. Αυτή η ετερογένεια των συμπτωμάτων οφείλεται στη πληθώρα παραγόντων και παθογενετικών μηχανισμών που μπορούν να προκαλέσουν αυτή την ασθένεια. Ολοένα και περισσότερες μελέτες στρέφουν το ενδιαφέρον τους στη συμμετοχή του ανοσοποιητικού συστήματος στο Parkinson. Είναι γεγονός ότι ο εκφυλισμός των ντοπαμινεργικών νευρώνων και η ύπαρξη σωματίων Lewy επάγουν εκτεταμένη φλεγμονή στον εγκέφαλο, αλλά και τη περιφέρεια. Πρωταγωνιστές στη φλεγμονή είναι κυρίως τα μικρογλοιακά κύτταρα και κύτταρα της έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας από την περιφέρεια, τα οποία καταφέρνουν και διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

Η σορτιλίνη είναι μία πρωτεΐνη, η οποία εμπλέκεται σε μεγάλο βαθμό σε ποικίλες διαδικασίες ανοσοαπόκρισης, ενώ, παράλληλα, επηρεάζει τη σηματοδότηση πολλών νευροτροφικών παραγόντων. Επομένως, σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη των επιπέδων έκφρασης της σορτιλίνης σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και στον ορό ασθενών με Parkinson και υγείων ατόμων. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός των ποσοστών των πληθυσμών μονοκύτταρων, T- και B- λεμφοκυττάρων στο αίμα ασθενών και υγείων μέσω της κυτταρομετρίας ροής. Στη συνέχεια, υπολογίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης της σορτιλίνης στην επιφάνεια κυττάρων στο συνολικό πληθυσμό των κυττάρων του ανοσοποιητικού, αλλά και ξεχωριστά σε κάθε ένα πληθυσμό που προσδιορίστηκε νωρίτερα. Ακολούθησε η ανίχνευση και ο υπολογισμός των επιπέδων της σορτιλίνης, αλλά και της πρωτεΐνης χημειοτακτισμού μονοκυττάρων-1 (MCP-1, ή αλλιώς CCL2) στον ορό του αίματος ασθενών και υγείων μέσω της μεθόδου ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Σχεδιασμός μελέτης και συλλογή βιολογικών δειγμάτων

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της κυτταρομετρίας ροής για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης της Σορτλίνης στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος ασθενών με Parkinson και υγιών ατόμων. Για αυτή τη διαδικασία, συλλέχθηκαν 10 δείγματα περιφερικού αίματος ασθενών με Parkinson κατά την παρακολούθησή τους στα εξωτερικά ιατρεία της Νευρολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και 6 δείγματα από υγιή άτομα. Όλα τα δείγματα επεξεργάστηκαν εντός 24 ωρών από τη στιγμή της συλλογής τους. Η δεύτερη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της έκφρασης της Σορτλίνης, αλλά και της CCL2, είναι ο προσδιορισμός με ανοσοπροσρόφηση δεσμευμένου ενζύμου (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), ή εν συντομία ELISA. Για την ELISA, συλλέχθηκαν 110 δείγματα περιφερικού αίματος ασθενών με Parkinson κατά την παρακολούθησή τους στα εξωτερικά ιατρεία της Νευρολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και 38 δείγματα από υγιή άτομα. Όλα τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 3500 rpm για 15', προκειμένου να συλλεχθεί ο ορός, ο οποίος στη συνέχεια αποθηκεύτηκε στους -20°C. Μία μέρα πριν τη διεξαγωγή της ELISA, οι οροί τοποθετήθηκαν στους 4°C, ώστε να ξεπαγώσουν ομαλά, και την ημέρα της διεξαγωγής αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, όπως και όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν.

2.2. Κυτταρομετρία ροής

2.2.1. Ορισμός

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μια ποσοτική, πολυπαραμετρική και αυτοματοποιημένη μέθοδος μέτρησης και ανάλυσης των σημάτων που παράγονται, όταν μία μονήρης σωματιδιακή διάταξη διέρχεται από μία φωτεινή δέσμη [175]. Είναι ένα ισχυρό εργαλείο που έχει εφαρμογές σε πολλούς κλάδους όπως η ανοσολογία, η ιολογία, η μοριακή βιολογία, η βιολογία του καρκίνου και η παρακολούθηση μολυσματικών ασθενειών. Χρησιμοποιείται κυρίως για την καταμέτρηση και ταξινόμηση κυττάρων, τον

προσδιορισμό των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των κυττάρων, την εύρεση βιοδεικτών και τη διάγνωση διάφορων ασθενειών, όπως οι αιματολογικές κακοήθειες.

2.2.2. Μεθοδολογία πειράματος

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το κυτταρόμετρο Cytomics FC 500 της Beckman Coulter και για την επιμέρους ανάλυση των δεδομένων εφαρμόστηκε το λογισμικό CXP 2.3 της Beckman Coulter. Το συγκεκριμένο κυτταρόμετρο είναι εξοπλισμένο με αερόψυκτο λέιζερ ιόντων αργού 488 nm συμπληρωμένο με λέιζερ κόκκινης διόδου 631 nm και διαθέτει δύο φωτοδιόδους για την πρόσθια και πλάγια σκέδαση και πέντε φωτοπολλαπλασιαστές που συλλέγουν τα σήματα φθορισμού (FL1: 525 nm, FL2: 575 nm, FL3: 620 nm, FL4: 675 nm και FL5: 755 nm).

Αντισώματα

Χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα Anti-CD3 PE, Anti-CD19 PC7, Anti-CD14 PC5 για τον εντοπισμό των πληθυσμών των T λεμφοκυττάρων, των B λεμφοκυττάρων και των μονοκυττάρων αντίστοιχα. Το Anti-CD3 προσδένεται στον συν-υποδοχέα του T-cell receptor (TCR), CD3, και είναι σημασμένο με φυκοερυθρίνη (Phycoerythrin, PE), που εκπέμπει στα 576 nm (κίτρινο). Το Anti-CD19 προσδένεται στον συν-υποδοχέα του B-cell receptor (BCR), CD19, και είναι σημασμένο με φυκοερυθρίνη-κυανίνη 7 (Phycoerythrin-Cyanin 7, PC7), που εκπέμπει στα 767 nm (σκούρο κόκκινο). Το Anti-CD14 προσδένεται στον συν-υποδοχέα του Toll-like receptor 4 (TLR 4), CD14, και είναι σημασμένο με φυκοερυθρίνη-κυανίνη 5 (Phycoerythrin-Cyanin 5, PC5), που εκπέμπει στα 670 nm (κόκκινο).

Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα Anti-Human Sortilin unconjugated, Mouse F(ab2) IgG (H+L) FITC και Mouse IgG1 Isotype control της εταιρίας R&D Systems, τα οποία προηγουμένως είχαν αραιωθεί με αποστειρωμένο PBS προς τελική συγκέντρωση τα 0,5 mg/ml. Το Anti-Human Sortilin unconjugated δεσμεύεται στην σορτιλίνη, αλλά δεν εκπέμπει κάποιο χρώμα. Το Mouse IgG1 Isotype control συνδέεται μη ειδικά στην επιφάνεια των κυττάρων και χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας (negative control) προκειμένου να διαφοροποιηθούν τα μη ειδικά σήματα από τα σήματα του αντισώματος

για τη σορτυλίνη. Τέλος, το Mouse F(ab2) IgG (H+L) FITC χρησιμοποιήθηκε ως δευτερεύον αντίσωμα, το οποίο δεσμεύεται στα δύο προηγούμενα αντισώματα και είναι σημασμένο με ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (Fluorescein Isothiocyanate, FITC), που εκπέμπει στα 525 nm (πράσινο).

Προετοιμασία δειγμάτων

Χρησιμοποιήθηκαν για κάθε δείγμα δύο σωληνάκια (ένα control και ένα test) με 100 μl περιφερικού αίματος το καθένα. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε λύση των ερυθρών κυττάρων με τη προσθήκη 1 ml VersaLyse Lysing Solution ανά σωληνάκι. Στη συνέχεια, συμπληρώθηκε μέχρι το πάνω μέρος του σωληνακίου PBS (Phosphate-Buffered Saline) buffer, το οποίο είχε αποθηκευτεί στους -20°C, ώστε να διακοπεί η αντίδραση λύσης. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 10' στις 1500 rpm και απόρριψη των υπερκείμενων. Στο ίζημα προστέθηκαν 5 μl FcR Blocking Reagent, ώστε να εμποδιστεί ανεπιθύμητη σύνδεση αντισωμάτων σε κύτταρα που εκφράζουν υποδοχείς Fc, όπως τα Β λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα, και πραγματοποιήθηκε επώαση για 20' σε θερμοκρασία δωματίου. Ύστερα, χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω συνδυασμοί αντισωμάτων:

Πίνακας 2: Τα «κοκτέιλ» αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τα ισχυτικά δείγματα ελέγχου (control) και τα τεστ.

Αντίσωμα - Φθοριόχρωμα	Control	Test
Anti-CD3 PE	10 μl	10 μl
Anti-CD19 PC7	10 μl	10 μl
Anti-CD14 PC5	10 μl	10 μl
Anti-Human Sortilin unconjugated	-	10 μl
Mouse IgG1 Isotype control	10 μl	-

Μετά την προσθήκη των «κοκτέιλ» αντισωμάτων, πραγματοποιήθηκε επώαση για 30' στους 4°C και πλύση με PBS. Αφού απορρίφθηκε το υπερκείμενο, προστέθηκαν 10 μl αντισώματος Mouse F(ab2) IgG (H+L) FITC σε όλα τα σωληνάκια. Επαναλήφθηκε επώαση για 30' στους 4°C και πλύση με PBS. Τέλος, έγινε επαναιώρηση του ιζήματος με 500 μl PBS σε κάθε σωληνάκι και τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο κυτταρόμετρο για επεξεργασία και ανάλυση.

2.3. ELISA

2.3.1. Ορισμός

Η ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη ανοσοενζυμική μέθοδος ανίχνευσης της παρουσίας και ποσοτικού προσδιορισμού ουσιών (συνήθως πρωτεϊνών) σε ένα εναιώρημα με τη χρήση αντισωμάτων έναντι αυτών [176]. Είναι μία πολύ ευαίσθητη τεχνική, η οποία εφαρμόζεται στην ανάλυση αλλεργιογόνων πρωτεϊνών σε τρόφιμα ή βιολογικά δείγματα και πρωτεϊνών ή άλλων μακρομορίων σε βιολογικά δείγματα.

2.3.2. Μεθοδολογία πειράματος

Πραγματοποιήθηκε ELISA τύπου Sandwich με τη χρήση δύο πλακών 96 πηγαδιών, για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης χημειοτακτισμού μονοκυττάρων-1 (MCP-1, ή αλλιώς CCL2), και μίας πλάκας 96 πηγαδιών, για τη μελέτη της σορτιλίνης. Για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της σορτιλίνης στον ορό αίματος ασθενών με Parkinson και υγείων χρησιμοποιήθηκε το Human Sortilin ELISA Kit (EH433RB) της εταιρίας Invitrogen, το οποίο περιέχει επικαλυμμένη πλάκα με μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για τη σορτιλίνη. Αντίστοιχα, για την ανίχνευση της CCL2 χρησιμοποιήθηκε το Human CCL2/MCP-1 Quantikine ELISA Kit (DCP00) της εταιρίας R&D Systems, το οποίο περιέχει επικαλυμμένη πλάκα με μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για τη CCL2. Όλα τα στάδια της κάθε διαδικασίας πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. Η ανάλυση των σημάτων χρώματος πραγματοποιήθηκε από το λογισμικό SkanIt RE έκδοση 5.0. Οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών-στόχων προσδιορίστηκαν με κατασκευή τυπικών καμπύλων.

2.4. Στατιστική ανάλυση

Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων τόσο της κυτταρομετρίας ροής όσο και της ELISA, με στόχο τον εντοπισμό σημαντικών διαφορών στα επίπεδα της σορτιλίνης στα κύτταρα του ανοσοποιητικού και στον ορό ασθενών με Parkinson και υγείων. Τα δεδομένα της έρευνας παρουσιάζονται ως μέσος όρος (mean) ± τυπικό σφάλμα μέσης τιμής (Standard Error of Mean, SEM). Για τον έλεγχο της σημαντικότητας των μέσων όρων, πραγματοποιήθηκαν οι δοκιμασίες Mann-Whitney και

Kruskal-Wallis (one-way ANOVA), ενώ για τον προσδιορισμό της σημαντικότητας των συγκρίσεων που έγιναν υπολογίστηκε η τιμή σημαντικότητας (p-value). Η στατιστική σημαντικότητα προσδιορίστηκε ως $p\text{-value} < 0.05$. Για την κατασκευή των γραφημάτων σύγκρισης των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό GraphPad Prism 9.4.0.

3. Σύνοψη αποτελεσμάτων

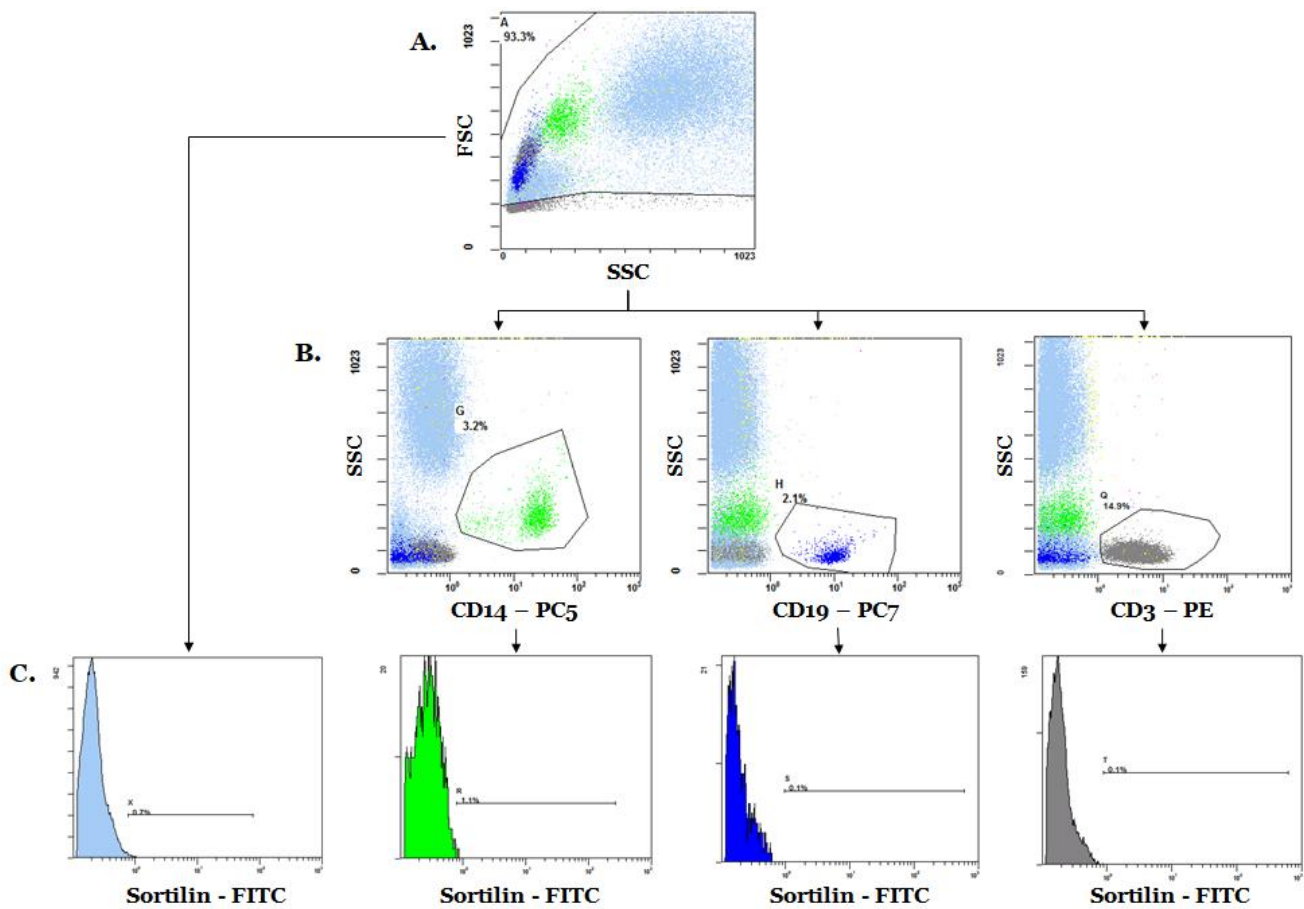
3.1. Κυτταρομετρία ροής

3.1.1. Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση και ποσοτικός προσδιορισμός της Σορτιλίνης

Το πρώτο βήμα της εργασίας ήταν ο ανοσοφαινοτυπικός προσδιορισμός των δειγμάτων που συλλέχθηκαν, μέσω της κυτταρομετρίας ροής. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε απεικόνιση των συνολικών κυττάρων του ανοσοποιητικού με την κατασκευή ενός σκιτογράμματος (dot plot), στο οποίο ο άξονας y αντιστοιχεί στην ευθύγραμμη σκέδαση (forward scatter, FSC) και ο άξονας x αντιστοιχεί στην πλάγια σκέδαση (side scatter, SSC). Η FSC είναι ανάλογη του μεγέθους των κυττάρων, ενώ η SSC σχετίζεται με το σχήμα και την οπτική ομοιογένεια (κοκκίωση) των κυττάρων. Έτσι, διακρίνονται διαφορετικοί πληθυσμοί κυττάρων σε αυτό το γράφημα ανάλογα με το μέγεθος και τη μορφολογία τους. Πραγματοποιήθηκε σήμανση (gating) στο σύνολο αυτών των πληθυσμών για να μελετηθούν στη συνέχεια με μεγαλύτερη λεπτομέρεια. Από το gating αποκλείστηκαν κύτταρα των οποίων οι FSC και SSC ήταν σχεδόν μηδενικές, καθώς αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ήταν νεκρά ερυθρά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια με αποτέλεσμα να σκεδάζουν λιγότερο το φως που προσπίπτει πάνω τους.

Ακολούθησε προσδιορισμός των πληθυσμών μονοκυττάρων, Β και Τ λεμφοκυττάρων με βάση τη χρώση τους με τα αντισώματα έναντι των επιφανειακών επιτόπων CD14, CD19 και CD3, αντίστοιχα. Εν συνεχεία, προσδιορίστηκε η παρουσία σορτιλίνης στον συνολικό πληθυσμό των κυττάρων του ανοσοποιητικού, αλλά και σε κάθε εξεταζόμενο πληθυσμό ξεχωριστά με τη χρήση ιστογραμμάτων κατανομής συχνότητας. Ο άξονας y αντιστοιχεί στον αριθμό των κυττάρων και ο άξονας x στην ένταση του σήματος. Αρχικά, οριοθετήθηκε η κατανομή των ψευδώς θετικών κυττάρων, με τη χρήση ενός αρνητικού μάρτυρα, δηλαδή ενός ιστοτυπικού δείγματος ελέγχου (isotype control) που δεν είχε σημανθεί με αντίσωμα για τη Σορτιλίνη. Ύστερα, εξαιρώντας την κατανομή των σημάτων του ιστοτυπικού δείγματος, προσδιορίστηκε το τμήμα της κατανομής που αντιστοιχεί στα αληθώς θετικά κύτταρα για τη Σορτιλίνη. Μέσω των ιστογραμμάτων, υπολογίστηκε η μέση ένταση φθορισμού (Mean Fluorescent Intensity, MFI) για τη Σορτιλίνη τόσο στο συνολικό πληθυσμό των κυττάρων του ανοσοποιητικού όσο και σε κάθε υπό μελέτη πληθυσμό ξεχωριστά. Ουσιαστικά, η MFI αντιπροσωπεύει τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης που

μελετάται, στην προκειμένη περίπτωση της Σορτιλίνης, και, συχνά, χρησιμοποιείται για τη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης της μεταξύ δειγμάτων ή πληθυσμών κυττάρων.



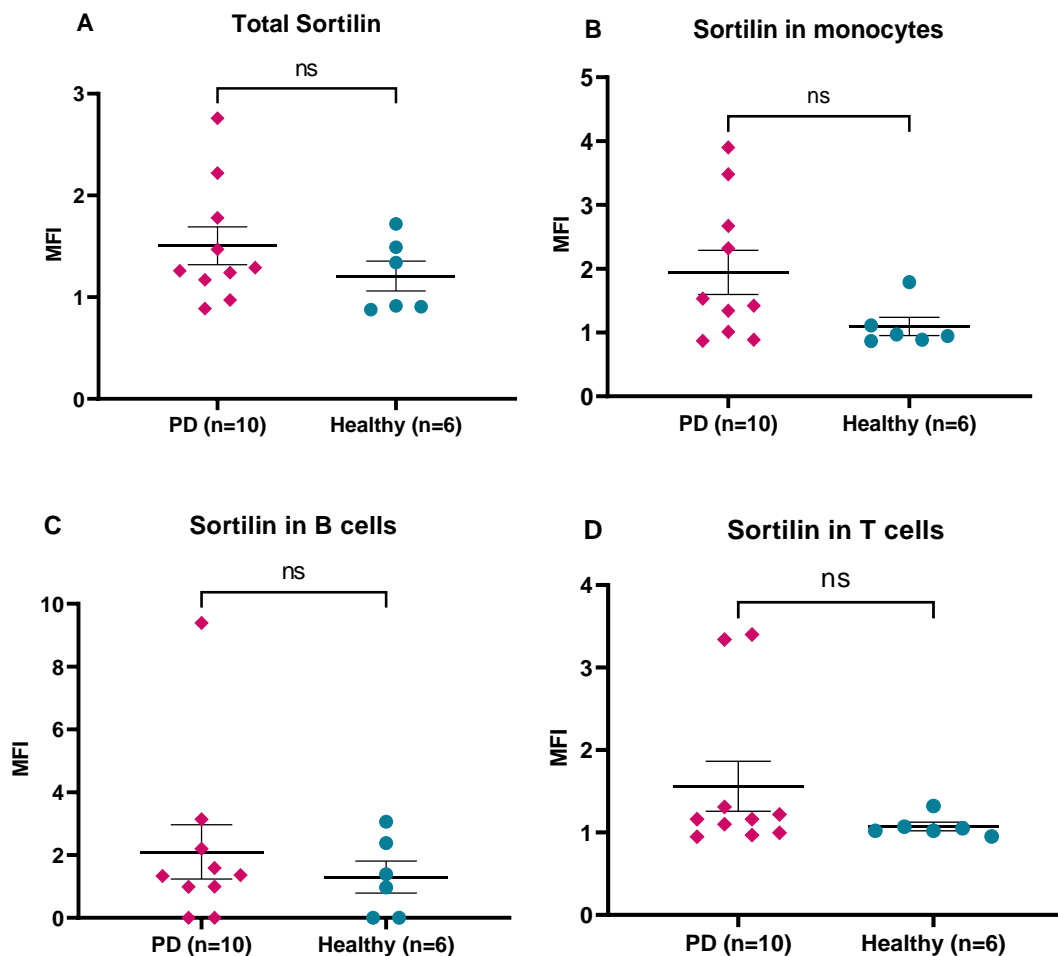
Εικόνα 11: Α. Ενδεικτική σήμανση (gating) των κυττάρων του ανοσοποιητικού με βάση την πρόσθια (FSC Lin) και την πλάγια σκέδαση (SSC Lin). Β. Ενδεικτικό gating των κυτταρικών πληθυσμών των CD14+ κυττάρων, τα οποία αντιστοιχούν στον πληθυσμό των μονοκυττάρων, των CD19+ κυττάρων, τα οποία αντιστοιχούν στον πληθυσμό των Β λεμφοκυττάρων, και των CD3+ κυττάρων, τα οποία αντιστοιχούν στον πληθυσμό των Τ λεμφοκυττάρων. Γ. Ενδεικτικά ιστογράμματα κατανομής συχνότητας, τα οποία απεικονίζουν την ένταση της έκφρασης της Σορτιλίνης στον συνολικό πληθυσμό των κυττάρων του ανοσοποιητικού, στον πληθυσμό των μονοκυττάρων, στον πληθυσμό των Β λεμφοκυττάρων και στον πληθυσμό των Τ λεμφοκυττάρων.

3.1.2. Διαφορές στα ποσοστά των πληθυσμών των μονοκυττάρων, των Β και των Τ λεμφοκυττάρων μεταξύ ασθενών με Parkinson και υγείων

Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των ποσοστών των πληθυσμών των μονοκυττάρων, των Β και των Τ λεμφοκυττάρων σε υγείς και ασθενείς με Parkinson για τη διερεύνηση σημαντικών αλλαγών στα επίπεδά τους. Ο μέσος όρος του ποσοστού των μονοκυττάρων στους υγείς είναι 2.72 ± 0.005 %, ενώ στους ασθενείς είναι 1.77 ± 0.006 %.

3.1.3. Προσδιορισμός των επιπέδων Σορτιλίνης στην επιφάνεια των κυττάρων κάθε πληθυσμού σε ασθενείς με Parkinson και υγιείς

Συγκρίθηκαν οι μέσες εντάσεις φθορισμού (MFIs) της σορτιλίνης σε ασθενείς με Parkinson και υγιείς για τον συνολικό πληθυσμό των κυττάρων, αλλά και για κάθε πληθυσμό ξεχωριστά.

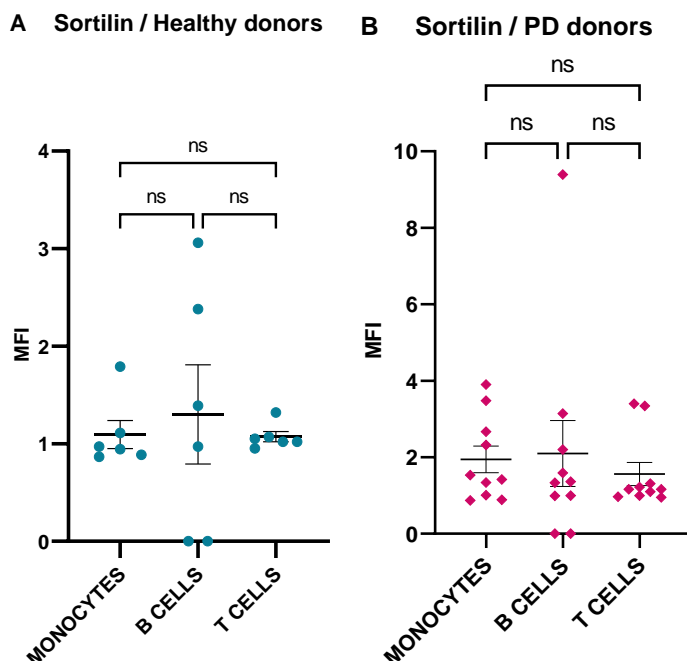


Εικόνα 13: Σύγκριση των MFI σορτιλίνης μεταξύ υγείων (n=6) και ασθενών (n=10) με Parkinson. A. Σύγκριση των τιμών MFI της σορτιλίνης στο συνολικό πληθυσμό των κυττάρων του ανοσοποιητικού (p-value=0.4278). B. Σύγκριση των τιμών MFI της σορτιλίνης στα μονοκύτταρα (p-value= 0.0982). C. Σύγκριση των τιμών MFI της σορτιλίνης στα B λεμφοκύτταρα (p-value= 0.6909). D. Σύγκριση των τιμών MFI της σορτιλίνης στα T λεμφοκύτταρα (p-value= 0.3538).

Ο μέσος όρος των MFIs της σορτιλίνης στον συνολικό πληθυσμό των κυττάρων του ανοσοποιητικού στους υγιείς είναι 1.21 ± 0.14 , ενώ στους ασθενείς είναι 1.51 ± 0.18 . Το p-value είναι ίσο με 0.4278, επομένως δεν εντοπίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά στη

μέση ένταση φθορισμού της σορτιλίνης στον συνολικό πληθυσμό των κυττάρων του ανοσοποιητικού μεταξύ υγιών και ασθενών με Parkinson. Παράλληλα, ο μέσος όρος των MFIs της σορτιλίνης στα μονοκύτταρα των υγιών είναι 1.09 ± 0.14 και στους παρκινσονικούς είναι 1.94 ± 0.34 . Το p-value βρέθηκε ίσο με 0.0982, επομένως η διαφορά στους μέσους όρους των MFIs της σορτιλίνης στα μονοκύτταρα υγιών και ασθενών με Parkinson δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική, αλλά έχει μια μικρή τάση προς τη σημαντικότητα. Ο μέσος όρος των MFIs της σορτιλίνης στα B λεμφοκύτταρα των υγιών δειγμάτων υπολογίστηκε 1.3 ± 0.51 , ενώ των ασθενών 2.1 ± 0.86 . Ωστόσο, αυτή η διαφορά δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική, καθώς το p-value βρέθηκε ίσο με 0.6909. Τέλος, ο μέσος όρος των MFIs της σορτιλίνης στα T λεμφοκύτταρα στους υγιείς είναι ίσος με 1.07 ± 0.05 και στους ασθενείς 1.56 ± 0.30 . Το p-value βρέθηκε ίσο με 0.3538, επομένως δεν εντοπίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην παρουσία σορτιλίνης σε T λεμφοκύτταρα υγιών και ασθενών με Parkinson.

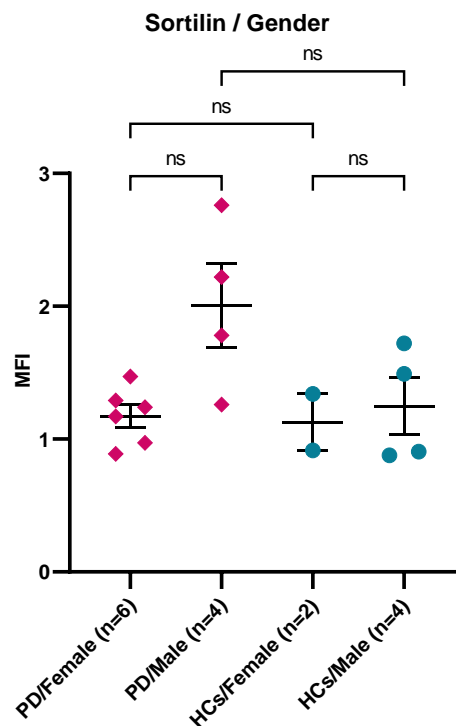
Επιπρόσθετα, συγκρίθηκαν οι μέσοι όροι των τιμών MFI της σορτιλίνης που προαναφέρθηκαν μεταξύ των ανοσοκυτταρικών πληθυσμών που εξετάστηκαν (μονοκύτταρα, B και T λεμφοκύτταρα) σε υγιείς και σε ασθενείς με PD. Τα p-value όλων των συγκρίσεων υπολογίστηκαν >0.9999 , άρα δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές MFI της σορτιλίνης στους πληθυσμούς που εξετάστηκαν.



Εικόνα 14: Τιμές MFI της σορτιλίνης στους ανοσοκυτταρικούς πληθυσμούς υγιών και ασθενών PD. Α. Υγιείς δότες (n=6, p-value > 0.9999). Β. Ασθενείς με Parkinson (n=10, p-value > 0.9999).

3.1.4. Διαφορές στα επίπεδα έκφρασης της Σορτιλίνης στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος μεταξύ των φύλων

Διερευνήθηκε αν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των φύλων ως προς την έκφραση της σορτιλίνης στην επιφάνεια των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος τόσο σε υγιείς (Healthy controls, HCs) όσο και σε ασθενείς με PD. Ο μέσος όρος των τιμών MFI της σορτιλίνης στους άντρες με Parkinson είναι ίσος με 2 ± 0.32 , ενώ στους υγιείς άντρες 1.248 ± 0.21 . Παράλληλα, στις γυναίκες με Parkinson είναι ίσος με 1.171 ± 0.09 , ενώ στις υγιείς είναι ίσος με 1.127 ± 0.21 . Τα p-value των συγκρίσεων γυναικών με PD – υγιείς γυναίκες και των υγιών γυναικών – υγιείς άντρες βρέθηκαν >0.9999 , άρα δεν εντοπίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε αυτές τις ομάδες. Το p-value της σύγκρισης αντρών με PD – υγιείς άντρες είναι ίσο με 0.1494 και της σύγκρισης αντρών με PD – γυναίκες με PD ισούται με 0.0644 . Επομένως, οι διαφορές αυτές είχαν μία σημαντική τάση προς τη σημαντικότητα.



Εικόνα 15: Οι τιμές MFI της σορτιλίνης που αντιστοιχούν σε κάθε φύλο τόσο υγιών όσο και ασθενών με PD.

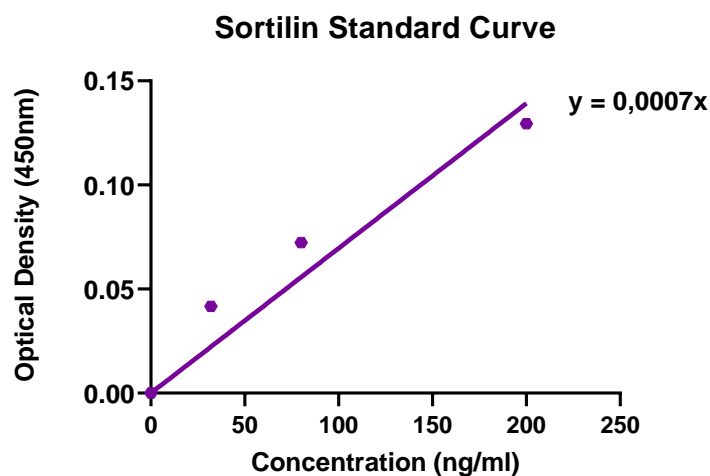
3.2. ELISA για τον προσδιορισμό της Σορτιλίνης

Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των δοτών, των οποίων τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή της δοκιμασίας ELISA για τη Σορτιλίνη αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3: Δημογραφικά στοιχεία των δοτών.

Demographic factor	PD	Healthy control
Total subjects	42	38
Female	14	16
Male	28	22
Age (years, mean \pm SEM)	64.7 \pm 1.8	58 \pm 2.1
BMI (kg/m ² , mean \pm SEM)	-	27.5 \pm 0.8

Επίσης, κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της Σορτιλίνης σε κάθε δείγμα. Η εξίσωση που προέκυψε ήταν: $y = 0.0007x$.

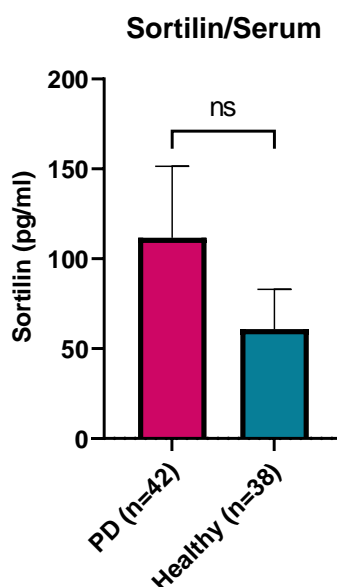


Εικόνα 16: Πρότυπη καμπύλη της σορτιλίνης.

3.2.1. Διαφορές στα επίπεδα έκφρασης της Σορτιλίνης στον ορό του αίματος μεταξύ ασθενών με Parkinson και υγείων

Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των μέσων όρων των συγκεντρώσεων της σορτιλίνης στον ορό αίματος ασθενών με Parkinson και υγείων. Αναλυτικότερα, ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων της σορτιλίνης σε ασθενείς με PD είναι ίσος με 111.58 ± 39.80 pg/ml, ενώ σε υγείς ισούται με 60.87 ± 22.17 pg/ml. Το p-value ισούται με 0.8235, επομένως δεν

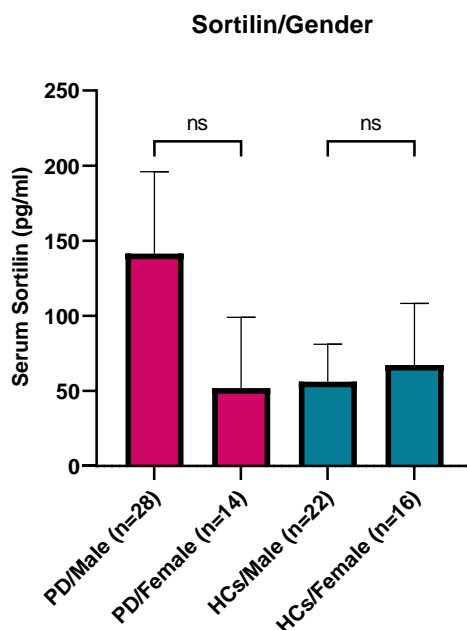
εντοπίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις συγκεντρώσεις της σορτιλίνης ασθενών και υγείων.



Εικόνα 17: Σύγκριση των μέσων όρων των συγκεντρώσεων (pg/ml) της σορτιλίνης στον ορό αίματος ασθενών με Parkinson (n=42) και υγείων (n=38). Το p-value ισούται με 0.8235.

3.2.2. Διαφορές στα επίπεδα έκφρασης της Σορτιλίνης στον ορό του αίματος μεταξύ των φύλων

Συγκρίθηκαν οι μέσοι όροι των συγκεντρώσεων της Σορτιλίνης μεταξύ αντρών με Parkinson ή υγείων και γυναικών με Parkinson ή υγείων, με στόχο την εύρεση σημαντικών διαφορών στα επίπεδα έκφρασης της Σορτιλίνης μεταξύ των φύλων. Ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων της Σορτιλίνης στον ορό αίματος υγείων γυναικών είναι ίσος με 67.29 ± 40.98 pg/ml, ενώ στον ορό υγείων αντρών είναι 56.19 ± 24.93 pg/ml. Παράλληλα, ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων της Σορτιλίνης στον ορό αίματος αντρών με Parkinson ισούται με 141.44 ± 54.52 pg/ml, ενώ στον ορό γυναικών με PD ισούται με 47.22 ± 176.78 pg/ml. Το p-value της σύγκρισης υγείων γυναικών – υγείων αντρών βρέθηκε >0.9999 και το p-value της σύγκρισης γυναικών με PD – αντρών με PD βρέθηκε ίσο με 0.4003, επομένως δεν βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των φύλων.



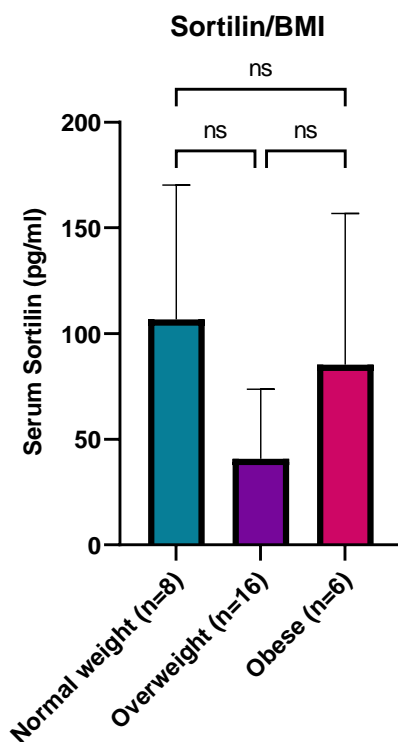
Εικόνα 18: Διαφορές των μέσων όρων συγκέντρωσης της Σορτιλίνης μεταξύ υγείων γυναικών (n=16), υγείων αντρών (n=22), γυναικών με PD (n=14) και αντρών με PD (n=28).

3.2.3. Διαφορές στα επίπεδα έκφρασης της Σορτιλίνης στον ορό του αίματος μεταξύ διαφορετικών δεικτών μάζας σώματος

Υπολογίστηκε ο δείκτης μάζας σώματος (Body mass index, BMI) κάθε υγιή δότη με βάση το σωματικό βάρος και το ύψος και αναλόγως την τιμή του προσδιορίστηκαν ως άτομα φυσιολογικού βάρους (20-24.9 kg/m²), υπέρβαροι (25-29.9 kg/m²) ή παχύσαρκοι (>30 kg/m²). Στη συνέχεια, συγκρίθηκαν οι μέσοι όροι των συγκεντρώσεων της Σορτιλίνης σε δότες με φυσιολογικό βάρος (n=8), υπέρβαρους (n=16) και παχύσαρκους (n=6), για τον εντοπισμό διαφορών στην έκφραση της Σορτιλίνης που επηρεάζονται από τον BMI.

Ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων της Σορτιλίνης σε άτομα με φυσιολογικό βάρος είναι ίσος με 106.61 ± 63.64 pg/ml, σε υπέρβαρα άτομα είναι ίσος με 39.5 ± 32.97 pg/ml, ενώ σε παχύσαρκα άτομα είναι ίσος με 85.3 ± 71.51 pg/ml. Το p-value της σύγκρισης ατόμων φυσιολογικού βάρους με υπέρβαρα βρέθηκε ίσο με 0.1946 και το p-value της σύγκρισης υπέρβαρων ατόμων με παχύσαρκα άτομα βρέθηκε ίσο με 0.2802, επομένως οι διαφορές στην έκφραση της σορτιλίνης μεταξύ ατόμων φυσιολογικού βάρους και υπέρβαρων ατόμων και υπέρβαρων ατόμων και παχύσαρκων ατόμων δεν είναι στατιστικά σημαντικές, αλλά έχουν μία ασθενή τάση προς τη σημαντικότητα. Αντιθέτως, το p-value της

σύγκρισης ατόμων φυσιολογικού βάρους με παχύσαρκα άτομα βρέθηκε >0.9999 , άρα δεν βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ ατόμων φυσιολογικού βάρους με παχύσαρκα.



Εικόνα 19: Σύγκριση των μέσων όρων των συγκεντρώσεων της Σορτιλίνης σε δότες με φυσιολογικό βάρος (n=8), υπέρβαρους (n=16) και παχύσαρκους (n=6).

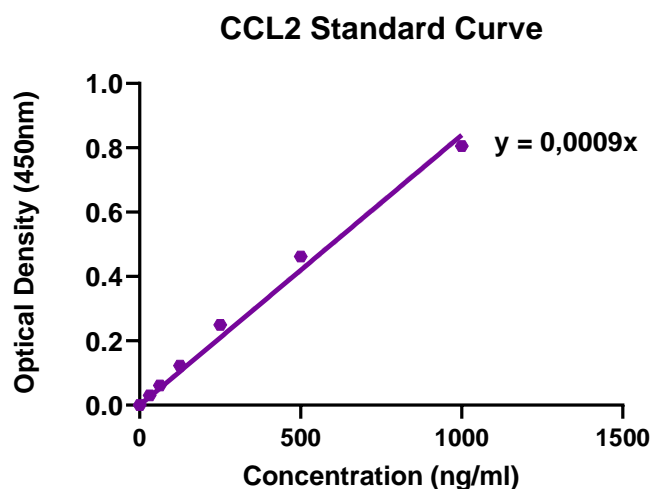
3.3. ELISA για τον προσδιορισμό της CCL2

Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των δοτών, των οποίων τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή της δοκιμασίας ELISA για τη CCL2 αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4: Δημογραφικά στοιχεία των δοτών.

Demographic factor	PD	Healthy control
Total subjects	110	38
Female	43	16
Male	67	22
Age (years, mean \pm SEM)	68.5 \pm 1.2	58 \pm 2.1
BMI (kg/m ² , mean \pm SEM)	-	27.5 \pm 0.8

Επίσης, κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της CCL2 σε κάθε δείγμα. Η εξίσωση που προέκυψε ήταν: $y = 0.0009x$.

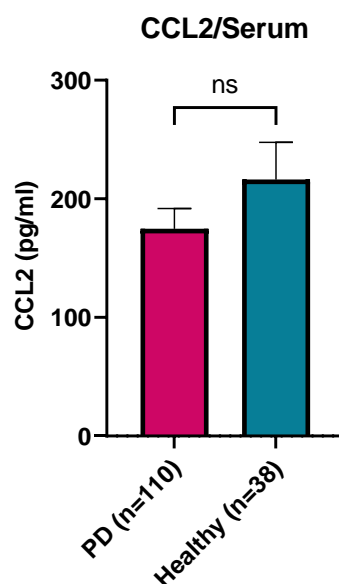


Εικόνα 20: Πρότυπη καμπύλη της CCL2.

3.3.1. Διαφορές στα επίπεδα έκφρασης της CCL2 στον ορό του αίματος μεταξύ ασθενών με Parkinson και υγιών

Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των μέσων όρων των συγκεντρώσεων της CCL2 στον ορό αίματος ασθενών με Parkinson και υγιών. Ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων της CCL2 σε ασθενείς με PD είναι ίσος με 174.76 ± 179.7 pg/ml, ενώ σε υγιείς ισούται με $216.31 \pm$

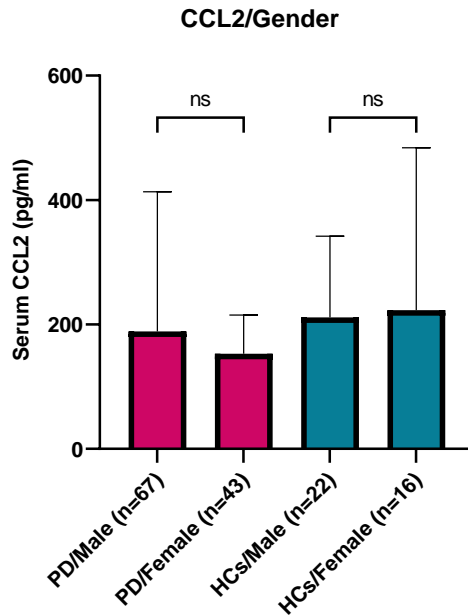
193.13 pg/ml. Το p-value ισούται με 0.3242, άρα δεν εντοπίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις συγκεντρώσεις της CCL2 ασθενών και υγείων.



Εικόνα 21: Σύγκριση των μέσων όρων των συγκεντρώσεων (pg/ml) της CCL2 στον ορό αίματος ασθενών με Parkinson (n=110) και υγείων (n=38). Το p-value ισούται με 0.3242.

3.3.2. Διαφορές στα επίπεδα έκφρασης της CCL2 στον ορό του αίματος μεταξύ των φύλων

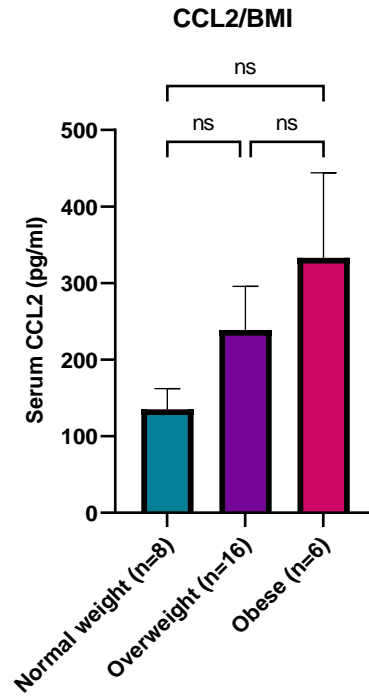
Συγκρίθηκαν οι μέσοι όροι των συγκεντρώσεων της CCL2 μεταξύ αντρών με Parkinson ή υγείων και γυναικών με Parkinson ή υγείων, με στόχο την εύρεση σημαντικών διαφορών στα επίπεδα έκφρασης της CCL2 μεταξύ των φύλων. Συγκεκριμένα, ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων της CCL2 στον ορό αίματος υγείων γυναικών είναι ίσος με 223.04 ± 65.27 pg/ml, ενώ στον ορό υγείων αντρών είναι 221.41 ± 27.77 pg/ml. Επιπλέον, ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων της CCL2 στον ορό αίματος αντρών με Parkinson ισούται με 188.77 ± 27.41 pg/ml, ενώ στον ορό γυναικών με PD ισούται με 152.94 ± 9.48 pg/ml. Το p-value της σύγκρισης υγείων γυναικών – υγείων αντρών βρέθηκε ίσο με 0.2014 και το p-value της σύγκρισης γυναικών με PD – αντρών με PD βρέθηκε >0.9999 , επομένως δεν βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των φύλων.



Εικόνα 22: Διαφορές των μέσων όρων συγκέντρωσης της CCL2 μεταξύ υγείων γυναικών (n=16), υγείων αντρών (n=22), γυναικών με PD (n=43) και αντρών με PD (n=67).

3.3.3. Διαφορές στα επίπεδα έκφρασης της CCL2 στον ορό του αίματος μεταξύ διαφορετικών δεικτών μάζας σώματος

Συγκρίθηκαν οι μέσοι όροι των συγκεντρώσεων της CCL2 σε δότες με φυσιολογικό βάρος (n=8), υπέρβαρους (n=16) και παχύσαρκους (n=6), για τον εντοπισμό διαφορών στην έκφραση της CCL2 που επηρεάζονται από τον BMI. Ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων της CCL2 σε άτομα με φυσιολογικό βάρος είναι ίσος με 135.12 ± 27.11 pg/ml, σε υπέρβαρα άτομα είναι ίσος με 238.82 ± 57.02 pg/ml, ενώ σε παχύσαρκα άτομα είναι ίσος με 332.98 ± 110.97 pg/ml. Το p-value της σύγκρισης ατόμων φυσιολογικού βάρους με υπέρβαρα βρέθηκε ίσο με 0.7533 και το p-value της σύγκρισης υπέρβαρων ατόμων με παχύσαρκα άτομα βρέθηκε ίσο με 0.3762, επομένως οι διαφορές στην έκφραση της CCL2 μεταξύ ατόμων φυσιολογικού βάρους και υπέρβαρων ατόμων και υπέρβαρων ατόμων και παχύσαρκων ατόμων δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Αντιθέτως, το p-value της σύγκρισης ατόμων φυσιολογικού βάρους με παχύσαρκα άτομα βρέθηκε ίσο με 0.0681, άρα η διαφορά στα επίπεδα έκφρασης της CCL2 μεταξύ ατόμων φυσιολογικού βάρους και παχύσαρκων έχει μία έντονη τάση προς τη σημαντικότητα.



Εικόνα 23: Σύγκριση των μέσων όρων των συγκεντρώσεων της CCL2 σε δότες με φυσιολογικό βάρος (n=8), υπέρβαρους (n=16) και παχύσαρκους (n=6).

4. Συμπεράσματα – συζήτηση

Η νόσος του Parkinson αποτελεί μία από τις συχνότερες παθήσεις που αφορούν την γήρανση με το ποσοστό των πασχόντων να αυξάνεται δραματικά κάθε χρόνο. Κατά 90% εμφανίζεται σποραδικά στον πληθυσμό, με παράγοντες κινδύνου να αποτελούν η ηλικία, το φύλο, η έκθεση σε φυτοφάρμακα και βαρέα μέταλλα, ο τραυματισμός στο κεφάλι και ο διαβήτης τύπου 2 [93, 94]. Το υπόλοιπο 10% των περιπτώσεων οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες, με συγκεκριμένους γενετικούς τόπους να ευθύνονται για αυτοσωμική επικρατή ή υπολειπόμενη κληρονομικότητα της νόσου [4, 95]. Τα συμπτώματα που συνοδεύουν τη νόσο καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα όχι μόνο κινητικών δυσλειτουργιών, όπως η υποκινησία και ο τρόμος, αλλά και μη κινητικών διαταραχών, όπως η δυσκοιλιότητα, η άνοια, η υποσμία, η έντονη ακράτεια ούρων και ο χρόνιος πόνος [9]. Αυτή η ποικιλομορφία στα συμπτώματα οφείλεται στο γεγονός ότι το Parkinson είναι μια πολυπαραγοντική νόσος και η παθογένεσή του μπορεί να οφείλεται στη δυσλειτουργία πολλών κυτταρικών διαδικασιών.

Ολοένα και περισσότερες έρευνες στρέφουν το ενδιαφέρον τους στη Σορτιλίνη ή αλλιώς υποδοχέα νευροτενσίνης-3 (Neurotensin Receptor-3, NTR3), η οποία είναι μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου I και μέλος της οικογένειας υποδοχέων με VPS10P επικράτεια. Εμπλέκεται σε μεγάλο βαθμό σε ποικίλες διαδικασίες ανοσοαπόκρισης, ενώ, παράλληλα, επηρεάζει τη σηματοδότηση πολλών νευροτροφικών παραγόντων. Τόσο όμως ο φυσιολογικός όσο και ο παθολογικός της ρόλος δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Συν τοις άλλοις, έχει συσχετιστεί με πολλές νευρολογικές διαταραχές, όπως η νόσος Alzheimer, η άνοια και η κατάθλιψη, ενώ άλλα μέλη της ίδιας οικογένειας εμπλέκονται και στη νόσο του Parkinson [145]. Τα στοιχεία, λοιπόν, που έχουν συλλεχθεί από ένα εύρος μελετών επισημαίνουν έναν ιδιαίτερο ρόλο της Σορτιλίνης ως υποδοχέα πολλαπλών συνδετών που ρυθμίζει πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια. Γι' αυτό θεωρείται κρίσιμη η περαιτέρω μελέτη αυτού του υποδοχέα ούτως ώστε να ξετυλιχθεί πλήρως ο ρόλος του στη μεταγωγή σήματος, καθώς και η συμμετοχή του στις διάφορες παθήσεις στις οποίες μπορεί να εμπλέκεται.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη των επιπέδων έκφρασης της Σορτιλίνης, σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και στον ορό από υγιείς δότες και ασθενείς που πάσχουν από νόσο του Parkinson. Εκτός από τα επίπεδα έκφρασης της Σορτιλίνης, διερευνήθηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης CCL2 στον ορό

ασθενών και υγείων. Σε συνδυασμό με τα παραπάνω, πραγματοποιήθηκε συσχέτιση των αποτελεσμάτων με το φύλο και τον δείκτη μάζας σώματος.

Ένα από τα πιο κύρια ευρήματα της μελέτης αποτελεί η στατιστικά σημαντική μείωση των T λεμφοκυττάρων στους ασθενείς με Parkinson. Συγκεκριμένα, ο μέσος όρος του ποσοστού των T λεμφοκυττάρων στους υγιείς είναι 18.83 % και στους ασθενείς 8.27 %. Παρόμοια μείωση έχει παρατηρηθεί σε άλλες μελέτες [177-180], αν και ο μηχανισμός πίσω από αυτή τη μείωση δεν έχει αποκαλυφθεί πλήρως. Ορισμένες μελέτες υποστηρίζουν ότι η έντονη μείωση του συνολικού αριθμού των T λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα ασθενών με PD οφείλεται κυρίως στη μείωση των CD8+ κυτταροτοξικών T κυττάρων και σχετίζεται με τη σοβαρότητα της νόσου [180]. Μάλιστα, σημαντικά μειωμένα επίπεδα CD8+ T κυττάρων έχουν βρεθεί σε ασθενείς με προχωρημένη νόσο Parkinson [179], ενώ άλλες μελέτες υπογραμμίζουν μία σημαντική μείωση των CD4+ βοηθητικών T λεμφοκυττάρων και, ταυτόχρονη, αύξηση των CD8+ κυτταροτοξικών σε ασθενείς με ήπια μορφή της νόσου [181].

Αντίστοιχα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των B λεμφοκυττάρων στους ασθενείς με Parkinson σε σχέση με τους υγιείς. Ο μέσος όρος των ποσοστών των B λεμφοκυττάρων στους υγιείς είναι 2.42 %, ενώ στους παρκινσονικούς ισούται με 1%. Πράγματι, έχει παρατηρηθεί και από άλλες μελέτες μειωμένος συνολικός αριθμός και μειωμένη κυτταρική διαίρεση B κυττάρων σε ασθενείς με PD σε σύγκριση με υγιείς και, αναλυτικότερα, έχουν βρεθεί μειωμένα ποσοστά υποσυνόλων ρυθμιστικών B λεμφοκυττάρων (Regulatory B cells, Bregs) και αυξημένα προφλεγμονώδη B κύτταρα [182]. Παράλληλα, έχουν παρατηρηθεί σημαντικά διαφορετικά τα ποσοστά των θυλακοειδών βοηθητικών T κυττάρων (Follicular Helper T cells, TFHs), τα οποία είναι γνωστά για τη ρύθμιση των αποκρίσεων των B λεμφοκυττάρων, μεταξύ παρκινσονικών και υγείων [182, 183].

Ακολουθώς, ο πληθυσμός των μονοκυττάρων δεν εμφάνισε κάποια σημαντική μεταβολή μεταξύ ασθενών και υγείων, αν και είχε μία τάση προς μείωση στους παρκινσονικούς. Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, πράγματι δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στη ποσότητα των ολικών μονοκυττάρων στο περιφερικό αίμα ασθενών με Parkinson και υγείων [184, 185]. Ωστόσο, περαιτέρω αναλύσεις των υποπληθυσμών των μονοκυττάρων έχουν δείξει υψηλότερα επίπεδα κλασικών μονοκυττάρων (CD14+ CD16-) και χαμηλότερα επίπεδα ενδιάμεσων (CD14+ CD16+) και

μη κλασικών (CD14+ CD16+) μονοκυττάρων σε ασθενείς με PD από ό,τι στους υγιείς μάρτυρες [184]. Τα κλασικά μονοκύτταρα είναι απαραίτητα για την φλεγμονώδη απόκριση και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε μακροφάγα σε διάφορους ιστούς, ενώ τα μη κλασικά μονοκύτταρα έχουν θεωρηθεί ευρέως ως αντιφλεγμονώδη [186]. Ο πληθυσμός των μονοκυττάρων στη νόσο του Parkinson δεν μεταβάλλεται μόνο ποσοτικά, αλλά και ποιοτικά, καθώς έχει παρατηρηθεί μειωμένη βιωσιμότητα των μονοκυττάρων, αλλά και αυξημένη τάση προς κυτταρική διαίρεση [185].

Το επόμενο βήμα αυτής της μελέτης ήταν η διερεύνηση σημαντικών διαφορών στα επίπεδα έκφρασης της Σορτιλίνης στην κυτταρική επιφάνεια των μονοκυττάρων, των Β και των Τ λεμφοκυττάρων μεταξύ ασθενών με PD και υγιών. Αν και τα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικά σημαντικά, αξίζει να ληφθούν υπόψη και να συζητηθούν. Φάνηκε πως τόσο στον συνολικό αριθμό των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος όσο και σε κάθε πληθυσμό που μελετήθηκε ξεχωριστά ο μέσος όρος των MFIs της σορτιλίνης ήταν υψηλότερος στους ασθενείς σε σύγκριση με τους υγιείς. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι ενώ προηγουμένως αποδείξαμε πως τα Τ και Β λεμφοκύτταρα μειώνονται και τα μονοκύτταρα δεν μεταβάλλονται στους παρκινσονικούς, η σορτιλίνη σε αυτούς τους πληθυσμούς παρουσιάζει μία ήπια αύξηση. Η συνολική αύξηση της σορτιλίνης στα κύτταρα του ανοσοποιητικού μπορεί, επίσης, να οφείλεται στην παραγωγή της από πληθυσμούς κυττάρων που δεν εξετάστηκαν, όπως τα φυσικά φονικά κύτταρα. Μέχρι στιγμής, γνωρίζουμε πως η σορτιλίνη εμπλέκεται κυρίως στη διακίνηση και έκκριση φλεγμονωδών κυτταροκινών [145], γεγονός το οποίο συμπίπτει με την αύξηση των CD4+ Τ βοηθητικών κυττάρων σε προχωρημένα στάδια της νόσου [179], των προφλεγμονωδών υποπληθυσμών των Β λεμφοκυττάρων [182] και των κλασικών μονοκυττάρων [184]. Παράλληλα, η σορτιλίνη παίζει ρόλο στην ωρίμαση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των Τ και Β λεμφοκυττάρων ρυθμίζοντας τη μεταφορά του BDNF, η οποία αυξάνεται σε καταστάσεις στρες και εκκρίνεται με αυτοκρινή τρόπο [187, 188].

Όταν συγκρίθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της Σορτιλίνης μεταξύ των διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών (μονοκύτταρα, Β και Τ λεμφοκύτταρα) σε υγιείς και σε ασθενείς με PD, δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές. Παρ' όλα αυτά, δεδομένα από άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι τα μεγαλύτερα ποσοστά Σορτιλίνης εντοπίζονται σε μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα και Τ λεμφοκύτταρα [133].

Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των μέσων όρων των συγκεντρώσεων της σορτιλίνης στον ορό αίματος ασθενών με Parkinson και υγείων. Όπως και στην επιφάνεια των κυττάρων του ανοσοποιητικού, έτσι και στον ορό αίματος, η έκφραση της Σορτιλίνης βρέθηκε υψηλότερη στους παρκινσονικούς σε σύγκριση με τους υγιείς, χωρίς όμως αυτή η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική. Αναλυτικότερα, ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων της σορτιλίνης σε ασθενείς με PD είναι ίσος με 111.58 pg/ml, ενώ σε υγιείς ισούται με 60.87 pg/ml. Αυτή η γενικότερη αύξηση της Σορτιλίνης στα κύτταρα του ανοσοποιητικού στο περιφερικό αίμα και στον ορό ασθενών με Parkinson υποδηλώνει ότι η Σορτιλίνη συμμετέχει μέσω κάποιου μοριακού μηχανισμού στη παθογένεση της νόσου.

Όσον αφορά τις διαφορές στην έκφραση της σορτιλίνης στην επιφάνεια των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος μεταξύ των φύλων, δεν βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Μέχρι στιγμής δεν έχει βρεθεί κάποια συσχέτιση της σορτιλίνης με το φύλο [189]. Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί ότι βρέθηκε μία έντονη διαφοροποίηση μεταξύ των αντρών και γυναικών με PD, καθώς ο μέσος όρος των τιμών MFI της σορτιλίνης στους άντρες με Parkinson είναι ίσος με 2, ενώ στις γυναίκες που νοσούν ισούται με 1.171 και το p-value της διαφοράς τους βρέθηκε 0.0644. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν κατά τη σύγκριση των επιπέδων Σορτιλίνης στον ορό του αίματος μεταξύ των φύλων. Συγκεκριμένα, ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων της Σορτιλίνης στον ορό αίματος αντρών με Parkinson ισούται με 141.44 pg/ml, ενώ στον ορό γυναικών με PD ισούται με 47.22 pg/ml, ενώ στους υγιείς και τα δύο φύλα είχαν απειροελάχιστες διαφορές. Επομένως, φαίνεται ότι στο Parkinson υπάρχει μία μεγαλύτερη τάση αύξησης της Σορτιλίνης τόσο στην επιφάνεια των κυττάρων του ανοσοποιητικού όσο και στον ορό στους άντρες από ό,τι στις γυναίκες.

Στη συνέχεια, αναλύθηκε η συσχέτιση των επιπέδων της Σορτιλίνης με τον δείκτη μάζας σώματος των υγείων δοτών. Ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων της Σορτιλίνης σε άτομα με φυσιολογικό βάρος είναι ίσος με 106.61 pg/ml, σε υπέρβαρα άτομα είναι ίσος με 39.5 pg/ml, ενώ σε παχύσαρκα άτομα είναι ίσος με 85.3 pg/ml. Οι διαφορές στην έκφραση της σορτιλίνης μεταξύ ατόμων φυσιολογικού βάρους, υπέρβαρων και παχύσαρκων ατόμων δεν είναι στατιστικά σημαντικές, αλλά έχουν μία ασθενή τάση προς τη σημαντικότητα. Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα αυτά, είναι γνωστό ότι τα αυξημένα επίπεδα σορτιλίνης στην κυκλοφορία του αίματος σχετίζονται με τη στεφανιαία νόσο και το σακχαρώδη διαβήτη και, μάλιστα, έχει προταθεί να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά ως βιοδείκτης για διάφορες καρδιαγγειακές και μεταβολικές νόσους [135, 189-191]. Αυτές οι νόσοι είναι άρρηκτα

συνδεδεμένες με την διατροφή και τον δείκτη μάζας σώματος, καθώς το αυξημένο βάρος και η συσσώρευση λιπώδη ιστού αποτελούν παράγοντες κινδύνου. Παράλληλα, έχει αποδειχθεί ότι η ανεπάρκεια Σορτιλίνης σε *Sort1*^{-/-} knockout ποντικούς-μοντέλα παχυσαρκίας επάγει έναν ωφέλιμο μεταβολικό φαινότυπο στο ήπαρ και τον λιπώδη ιστό [192]. Η ανεπάρκεια σορτιλίνης οδήγησε σε δραματικά εξασθενημένη ηπατική στεάτωση, καλύτερη ευαισθησία στην ινσουλίνη και μειωμένη φλεγμονή στον λιπώδη ιστό αυτών των ποντικών. Από την άλλη, άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι η ανεπάρκεια σορτιλίνης σε ποντικούς δεν επηρεάζει την ανάπτυξη της παχυσαρκίας, αλλά τροποποιεί τον μεταβολισμό της γλυκόζης στον λιπώδη ιστό σε καταστάσεις νηστείας [193].

Το τελευταίο στάδιο αυτής της έρευνας ήταν η διερεύνηση των διαφορών στα επίπεδα της πρωτεΐνης χημειοτακτισμού μονοκυττάρων-1 (Monocyte chemoattractant protein-1), ή αλλιώς CCL2 στον ορό του αίματος μεταξύ ασθενών με Parkinson και υγείων. Ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων της CCL2 φαίνεται να είναι αυξημένος στους υγιείς σε σύγκριση με τους ασθενείς με PD, αν και η διαφορά δεν είναι στατιστικά σημαντική. Πράγματι, έχουν περιγραφεί σε αρκετές έρευνες παρόμοια επίπεδα CCL2 τόσο στους παρκινσονικούς όσο και στους υγιείς [194]. Αντιθέτως, άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι τα επίπεδα της CCL2 είναι ελαφρώς αυξημένα στο περιφερικό αίμα ασθενών με Parkinson σε σχέση με υγιείς δότες [195]. Ακόμη, η πρόκληση Parkinson μέσω χορήγησης MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) σε ποντικούς οδηγεί στην αύξηση της χημειοκίνης CCL2 στο ραβδωτό σώμα και τον μεσεγκέφαλο [196]. Μια εξήγηση για αυτές τις αποκλίσεις μπορεί να είναι οι διαφορές στα κλινικά χαρακτηριστικά και τον υπότυπο Parkinson κατάσταση στις διάφορες ομάδες ασθενών. Ομοίως, δεν βρέθηκε κάποια διαφορά στις συγκεντρώσεις της CCL2 μεταξύ αντρών και γυναικών και μέχρι στιγμής δεν υπάρχει κάποια απόδειξη ότι η έκφραση της πρωτεΐνης επηρεάζεται από το φύλο.

Κατά τη συσχέτιση των επιπέδων της CCL2 στον ορό αίματος με τον δείκτη μάζας σώματος, παρατηρήθηκε μία σταδιακή άνοδος στη συγκέντρωση της πρωτεΐνης από τα άτομα φυσιολογικού βάρους, στα υπέρβαρα και, ύστερα, στα παχύσαρκα άτομα. Με άλλα λόγια, ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων της CCL2 σε άτομα με φυσιολογικό βάρος είναι ίσος με 135.12 pg/ml, σε υπέρβαρα άτομα 238.82 pg/ml, ενώ σε παχύσαρκα άτομα 332.98 pg/ml. Αν και μη στατιστικά σημαντικά, τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με έρευνες τόσο σε παχύσαρκους ενήλικες [197] όσο και σε παχύσαρκα παιδιά [198], οι οποίες τονίζουν μια έντονη αύξηση της CCL2 στο πλάσμα των παχύσαρκων σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες. Μάλιστα, έχει βρεθεί ότι η συστηματική χορήγηση CCL2 σε ποντίκια προκάλεσε

αντίσταση στην ινσουλίνη και φλεγμονή στον λιπώδη ιστό [199]. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η CCL2 συνδέεται με πρωτεογλυκάνες, όπως η θειική ηπαράνη (Heparan Sulfate, HS), στην επιφάνεια του λιπώδους ιστού [200]. Όσο περισσότερο συσσωρεύεται ο λιπώδης ιστός τόσο υψηλότερα επίπεδα πρωτεογλυκανών παράγονται, με αποτέλεσμα την αύξηση της CCL2, η οποία προσελκύει μονοκύτταρα και μακροφάγα στον ιστό προκαλώντας τοπική φλεγμονή.

Ο κύριος περιορισμός της παρούσας μελέτης είναι η περιττή ποικιλομορφία των χαρακτηριστικών τόσο των υγιών όσο και των ασθενών που συμμετείχαν. Συγκεκριμένα, οι δότες παρουσιάζουν μεγάλες αποκλίσεις ως προς την ηλικία και το οικογενειακό ιστορικό νευροεκφυλιστικών νόσων και αρκετοί από αυτούς διαθέτουν άλλα προβλήματα υγείας, για τα οποία λαμβάνουν φάρμακα. Παράλληλα, οι ασθενείς βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια της νόσου, λαμβάνουν ή όχι φαρμακευτική αγωγή και έχουν διαφορετικούς υπότυπους Parkinson. Αυτό το ευρύ φάσμα χαρακτηριστικών των δοτών μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα ανεπιθύμητο και εκτεταμένο σφάλμα στα αποτελέσματα μιας έρευνας, καθώς και μη στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. Πολλά από τα αποτελέσματα της πτυχιακής εργασίας δεν είναι στατιστικά σημαντικά, ωστόσο έχουν μία ισχυρή τάση προς τη σημαντικότητα. Αυτό το γεγονός οφείλεται τόσο στη ποικιλομορφία των χαρακτηριστικών των δοτών όσο και στον μικρό μέγεθος του πληθυσμού των συμμετεχόντων.

Ως εκ τούτου, η παρούσα μελέτη θα πρέπει να θεωρείται διερευνητική, αλλά και χρήσιμη απόδειξη της τροποποίησης της έκφρασης της Σορτιλίνης, αλλά και της CCL2, κατά το Parkinson. Σε μελλοντικό ερευνητικό στάδιο, είναι επιτακτική ανάγκη η οργάνωση μιας μεγαλύτερης πολυκεντρικής μελέτης παρατήρησης, η οποία θα επιτρέψει μία πιο άρτια αξιολόγηση της συσχέτισης της Σορτιλίνης και της CCL2 με τη νόσο του Parkinson. Με αυτό τον τρόπο θα υπάρξει η δυνατότητα εντοπισμού στατιστικά σημαντικών διαφορών στα επίπεδα έκφρασης της Σορτιλίνης μεταξύ ασθενών με Parkinson και υγιών ή μεταξύ των φύλων και άλλων δημογραφικών παραμέτρων, όπως οι ηλικίες, το κάπνισμα και ο δείκτης μάζας σώματος. Μια ακόμα ενδιαφέρουσα πρόταση θα ήταν η διερεύνηση των επιπέδων της Σορτιλίνης και σε άλλους πληθυσμούς κυττάρων του ανοσοποιητικού ή σε υποπληθυσμούς των κυττάρων που μελετήθηκαν σε αυτή την έρευνα σε δείγματα ασθενών με Parkinson.

Βιβλιογραφία

1. Parkinson, J., *An essay on the shaking palsy. 1817.* J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 2002. **14**(2): p. 223-36; discussion 222.
2. Group, G.B.D.N.D.C., *Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015.* Lancet Neurol, 2017. **16**(11): p. 877-897.
3. Dorsey, E.R., et al., *The Emerging Evidence of the Parkinson Pandemic.* J Parkinsons Dis, 2018. **8**(s1): p. S3-S8.
4. Dorsey, E.R. and B.R. Bloem, *The Parkinson Pandemic-A Call to Action.* JAMA Neurol, 2018. **75**(1): p. 9-10.
5. Ou, Z., et al., *Global Trends in the Incidence, Prevalence, and Years Lived With Disability of Parkinson's Disease in 204 Countries/Territories From 1990 to 2019.* Front Public Health, 2021. **9**: p. 776847.
6. Postuma, R.B., et al., *MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease.* Mov Disord, 2015. **30**(12): p. 1591-601.
7. Jankovic, J., *Parkinson's disease: clinical features and diagnosis.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2008. **79**(4): p. 368-76.
8. Rizek, P., N. Kumar, and M.S. Jog, *An update on the diagnosis and treatment of Parkinson disease.* CMAJ, 2016. **188**(16): p. 1157-1165.
9. Poewe, W., et al., *Parkinson disease.* Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17013.
10. Mantri, S., J.F. Morley, and A.D. Siderowf, *The importance of preclinical diagnostics in Parkinson disease.* Parkinsonism Relat Disord, 2019. **64**: p. 20-28.
11. Heinzl, S., et al., *Update of the MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease.* Mov Disord, 2019. **34**(10): p. 1464-1470.
12. Sveinbjornsdottir, S., *The clinical symptoms of Parkinson's disease.* J Neurochem, 2016. **139** Suppl 1: p. 318-324.
13. Fernstrom, J.D. and M.H. Fernstrom, *Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain.* J Nutr, 2007. **137**(6 Suppl 1): p. 1539S-1547S; discussion 1548S.
14. Eiden, L.E. and E. Weihe, *VMAT2: a dynamic regulator of brain monoaminergic neuronal function interacting with drugs of abuse.* Ann NY Acad Sci, 2011. **1216**: p. 86-98.
15. Loughlin, S.E. and J.H. Fallon, *Dopaminergic and non-dopaminergic projections to amygdala from substantia nigra and ventral tegmental area.* Brain Res, 1983. **262**(2): p. 334-8.
16. Klein, M.O., et al., *Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases.* Cell Mol Neurobiol, 2019. **39**(1): p. 31-59.
17. Fearnley, J.M. and A.J. Lees, *Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity.* Brain, 1991. **114** (Pt 5): p. 2283-301.
18. El-Agnaf, O.M., et al., *Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease.* FASEB J, 2006. **20**(3): p. 419-25.
19. Wakabayashi, K., et al., *The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders.* Mol Neurobiol, 2013. **47**(2): p. 495-508.
20. Spillantini, M.G., et al., *Alpha-synuclein in Lewy bodies.* Nature, 1997. **388**(6645): p. 839-40.
21. Polymeropoulos, M.H., et al., *Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease.* Science, 1997. **276**(5321): p. 2045-7.
22. Mehra, S., S. Sahay, and S.K. Maji, *alpha-Synuclein misfolding and aggregation: Implications in Parkinson's disease pathogenesis.* Biochim Biophys Acta Proteins Proteom, 2019. **1867**(10): p. 890-908.
23. Nuber, S., et al., *Abrogating Native alpha-Synuclein Tetramers in Mice Causes a L-DOPA-Responsive Motor Syndrome Closely Resembling Parkinson's Disease.* Neuron, 2018. **100**(1): p. 75-90 e5.

24. Emamzadeh, F.N., *Alpha-synuclein structure, functions, and interactions*. J Res Med Sci, 2016. **21**: p. 29.
25. Chung, C.Y., et al., *Dynamic changes in presynaptic and axonal transport proteins combined with striatal neuroinflammation precede dopaminergic neuronal loss in a rat model of AAV alpha-synucleinopathy*. J Neurosci, 2009. **29**(11): p. 3365-73.
26. Moon, H.E. and S.H. Paek, *Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease*. Exp Neurobiol, 2015. **24**(2): p. 103-16.
27. Grunewald, A., K.R. Kumar, and C.M. Sue, *New insights into the complex role of mitochondria in Parkinson's disease*. Prog Neurobiol, 2019. **177**: p. 73-93.
28. Park, J.S., R.L. Davis, and C.M. Sue, *Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease: New Mechanistic Insights and Therapeutic Perspectives*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2018. **18**(5): p. 21.
29. Schapira, A.H., et al., *Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease*. J Neurochem, 1990. **54**(3): p. 823-7.
30. Nicklas, W.J., I. Vyas, and R.E. Heikkila, *Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine*. Life Sci, 1985. **36**(26): p. 2503-8.
31. Papa, S., et al., *The oxidative phosphorylation system in mammalian mitochondria*. Adv Exp Med Biol, 2012. **942**: p. 3-37.
32. Eiyama, A. and K. Okamoto, *PINK1/Parkin-mediated mitophagy in mammalian cells*. Curr Opin Cell Biol, 2015. **33**: p. 95-101.
33. Klein, C. and A. Westenberger, *Genetics of Parkinson's disease*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(1): p. a008888.
34. Klein, C. and M.G. Schlossmacher, *Parkinson disease, 10 years after its genetic revolution: multiple clues to a complex disorder*. Neurology, 2007. **69**(22): p. 2093-104.
35. Pyo, J.O., et al., *Overexpression of Atg5 in mice activates autophagy and extends lifespan*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2300.
36. Simonsen, A., et al., *Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult Drosophila*. Autophagy, 2008. **4**(2): p. 176-84.
37. Zheng, S., et al., *Deletion of the huntingtin polyglutamine stretch enhances neuronal autophagy and longevity in mice*. PLoS Genet, 2010. **6**(2): p. e1000838.
38. Carnio, S., et al., *Autophagy impairment in muscle induces neuromuscular junction degeneration and precocious aging*. Cell Rep, 2014. **8**(5): p. 1509-21.
39. Sidransky, E., et al., *Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease*. N Engl J Med, 2009. **361**(17): p. 1651-61.
40. Ge, P., V.L. Dawson, and T.M. Dawson, *PINK1 and Parkin mitochondrial quality control: a source of regional vulnerability in Parkinson's disease*. Mol Neurodegener, 2020. **15**(1): p. 20.
41. Xu, C.-Y., et al., *DJ-1 Inhibits α -Synuclein Aggregation by Regulating Chaperone-Mediated Autophagy*. Frontiers in Aging Neuroscience, 2017. **9**.
42. Madureira, M., N. Connor-Robson, and R. Wade-Martins, *"LRRK2: Autophagy and Lysosomal Activity"*. Frontiers in Neuroscience, 2020. **14**.
43. Wang, R., et al., *ATP13A2 facilitates HDAC6 recruitment to lysosome to promote autophagosome-lysosome fusion*. J Cell Biol, 2019. **218**(1): p. 267-284.
44. Zavodszky, E., M.N. Seaman, and D.C. Rubinsztein, *VPS35 Parkinson mutation impairs autophagy via WASH*. Cell Cycle, 2014. **13**(14): p. 2155-6.
45. Li, Q. and B.A. Barres, *Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(4): p. 225-242.
46. Daniele, S.G., et al., *Activation of MyD88-dependent TLR1/2 signaling by misfolded alpha-synuclein, a protein linked to neurodegenerative disorders*. Sci Signal, 2015. **8**(376): p. ra45.
47. Zhang, W., et al., *Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease*. FASEB J, 2005. **19**(6): p. 533-42.
48. Gerhard, A., et al., *In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease*. Neurobiol Dis, 2006. **21**(2): p. 404-12.

49. Iannaccone, S., et al., *In vivo microglia activation in very early dementia with Lewy bodies, comparison with Parkinson's disease*. Parkinsonism Relat Disord, 2013. **19**(1): p. 47-52.
50. Sanchez-Guajardo, V., et al., *Microglia acquire distinct activation profiles depending on the degree of alpha-synuclein neuropathology in a rAAV based model of Parkinson's disease*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8784.
51. Watson, M.B., et al., *Regionally-specific microglial activation in young mice over-expressing human wildtype alpha-synuclein*. Exp Neurol, 2012. **237**(2): p. 318-34.
52. Hunot, S., et al., *Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease*. Neuroscience, 1996. **72**(2): p. 355-63.
53. Knott, C., G. Stern, and G.P. Wilkin, *Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2*. Mol Cell Neurosci, 2000. **16**(6): p. 724-39.
54. McGeer, P.L., et al., *Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains*. Neurology, 1988. **38**(8): p. 1285-91.
55. Croisier, E., et al., *Microglial inflammation in the parkinsonian substantia nigra: relationship to alpha-synuclein deposition*. J Neuroinflammation, 2005. **2**: p. 14.
56. Orr, C.F., et al., *A possible role for humoral immunity in the pathogenesis of Parkinson's disease*. Brain, 2005. **128**(Pt 11): p. 2665-74.
57. Miklossy, J., et al., *Role of ICAM-1 in persisting inflammation in Parkinson disease and MPTP monkeys*. Exp Neurol, 2006. **197**(2): p. 275-83.
58. Boka, G., et al., *Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease*. Neurosci Lett, 1994. **172**(1-2): p. 151-4.
59. Nagatsu, T., et al., *Cytokines in Parkinson's disease*. J Neural Transm Suppl, 2000(58): p. 143-51.
60. Brodacki, B., et al., *Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNFalpha, and INFgamma concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism*. Neurosci Lett, 2008. **441**(2): p. 158-62.
61. Karpenko, M.N., et al., *Interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-6, interleukin-10, and tumor necrosis factor-alpha levels in CSF and serum in relation to the clinical diversity of Parkinson's disease*. Cell Immunol, 2018. **327**: p. 77-82.
62. Rojo, A.I., et al., *Redox control of microglial function: molecular mechanisms and functional significance*. Antioxid Redox Signal, 2014. **21**(12): p. 1766-801.
63. Wang, W., et al., *Caspase-1 causes truncation and aggregation of the Parkinson's disease-associated protein alpha-synuclein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(34): p. 9587-92.
64. Bolanos, J.P., *Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neuronal activity*. J Neurochem, 2016. **139 Suppl 2**: p. 115-125.
65. Kortekaas, R., et al., *Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo*. Ann Neurol, 2005. **57**(2): p. 176-9.
66. Gray, M.T. and J.M. Woulfe, *Striatal blood-brain barrier permeability in Parkinson's disease*. J Cereb Blood Flow Metab, 2015. **35**(5): p. 747-50.
67. Pey, P., et al., *Phenotypic profile of alternative activation marker CD163 is different in Alzheimer's and Parkinson's disease*. Acta Neuropathol Commun, 2014. **2**: p. 21.
68. Harms, A.S., et al., *Peripheral monocyte entry is required for alpha-Synuclein induced inflammation and Neurodegeneration in a model of Parkinson disease*. Exp Neurol, 2018. **300**: p. 179-187.
69. Polfliet, M.M., et al., *The rat macrophage scavenger receptor CD163: expression, regulation and role in inflammatory mediator production*. Immunobiology, 2006. **211**(6-8): p. 419-25.
70. Mizutani, M., et al., *The fractalkine receptor but not CCR2 is present on microglia from embryonic development throughout adulthood*. J Immunol, 2012. **188**(1): p. 29-36.
71. MacMahon Copas, A.N., et al., *The Pathogenesis of Parkinson's Disease: A Complex Interplay Between Astrocytes, Microglia, and T Lymphocytes?* Front Neurol, 2021. **12**: p. 666737.
72. Brochard, V., et al., *Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease*. J Clin Invest, 2009. **119**(1): p. 182-92.

73. Harms, A.S., et al., *alpha-Synuclein fibrils recruit peripheral immune cells in the rat brain prior to neurodegeneration*. Acta Neuropathol Commun, 2017. **5**(1): p. 85.
74. Liu, Z., et al., *IL-17A exacerbates neuroinflammation and neurodegeneration by activating microglia in rodent models of Parkinson's disease*. Brain Behav Immun, 2019. **81**: p. 630-645.
75. Sulzer, D., et al., *T cells from patients with Parkinson's disease recognize alpha-synuclein peptides*. Nature, 2017. **546**(7660): p. 656-661.
76. Bhattarai, Y. and P.C. Kashyap, *Parkinson's disease: Are gut microbes involved?* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2020. **319**(5): p. G529-G540.
77. Keshavarzian, A., et al., *Colonic bacterial composition in Parkinson's disease*. Mov Disord, 2015. **30**(10): p. 1351-60.
78. Unger, M.M., et al., *Short chain fatty acids and gut microbiota differ between patients with Parkinson's disease and age-matched controls*. Parkinsonism Relat Disord, 2016. **32**: p. 66-72.
79. Devos, D., et al., *Colonic inflammation in Parkinson's disease*. Neurobiol Dis, 2013. **50**: p. 42-8.
80. Schwiertz, A., et al., *Fecal markers of intestinal inflammation and intestinal permeability are elevated in Parkinson's disease*. Parkinsonism Relat Disord, 2018. **50**: p. 104-107.
81. Mulak, A. and B. Bonaz, *Brain-gut-microbiota axis in Parkinson's disease*. World J Gastroenterol, 2015. **21**(37): p. 10609-20.
82. Obrenovich, M.E.M., *Leaky Gut, Leaky Brain?* Microorganisms, 2018. **6**(4).
83. Hawkes, C.H., K. Del Tredici, and H. Braak, *Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2007. **33**(6): p. 599-614.
84. Hawkes, C.H., K. Del Tredici, and H. Braak, *Parkinson's disease: the dual hit theory revisited*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1170**: p. 615-22.
85. Twelves, D., K.S. Perkins, and C. Counsell, *Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease*. Mov Disord, 2003. **18**(1): p. 19-31.
86. Cerri, S., L. Mus, and F. Blandini, *Parkinson's Disease in Women and Men: What's the Difference?* J Parkinsons Dis, 2019. **9**(3): p. 501-515.
87. Dahodwala, N., et al., *Sex disparities in access to caregiving in Parkinson disease*. Neurology, 2018. **90**(1): p. e48-e54.
88. Haaxma, C.A., et al., *Gender differences in Parkinson's disease*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2007. **78**(8): p. 819-24.
89. Baba, Y., et al., *Gender and the Parkinson's disease phenotype*. J Neurol, 2005. **252**(10): p. 1201-5.
90. González-Casacuberta, I., et al., *Bioenergetics and Autophagic Imbalance in Patients-Derived Cell Models of Parkinson Disease Supports Systemic Dysfunction in Neurodegeneration*. Frontiers in Neuroscience, 2019. **13**.
91. Mustapha, M. and C.N. Mat Taib, *MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease: A promising direction of therapeutic strategies*. Bosn J Basic Med Sci, 2021. **21**(4): p. 422-433.
92. Zhang, G., G. Yang, and J. Liu, *Phloretin attenuates behavior deficits and neuroinflammatory response in MPTP induced Parkinson's disease in mice*. Life Sci, 2019. **232**: p. 116600.
93. Ascherio, A. and M.A. Schwarzschild, *The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention*. Lancet Neurol, 2016. **15**(12): p. 1257-1272.
94. Martino, R., et al., *Onset and progression factors in Parkinson's disease: A systematic review*. Neurotoxicology, 2017. **61**: p. 132-141.
95. Armstrong, M.J. and M.S. Okun, *Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review*. JAMA, 2020. **323**(6): p. 548-560.
96. Nalls, M.A., et al., *Identification of novel risk loci, causal insights, and heritable risk for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies*. Lancet Neurol, 2019. **18**(12): p. 1091-1102.
97. Balestrino, R. and A.H.V. Schapira, *Parkinson disease*. Eur J Neurol, 2020. **27**(1): p. 27-42.

98. Xiromerisiou, G., et al., *SORL1 mutation in a Greek family with Parkinson's disease and dementia*. *Ann Clin Transl Neurol*, 2021. **8**(10): p. 1961-1969.
99. Wang, Y., et al., *Evaluation of the relationship between SORL1 gene polymorphism and Parkinson's disease in the Chinese population*. *Neurosci Lett*, 2022. **778**: p. 136602.
100. Setsuie, R. and K. Wada, *The functions of UCH-L1 and its relation to neurodegenerative diseases*. *Neurochem Int*, 2007. **51**(2-4): p. 105-11.
101. Rideout, H.J. and L. Stefanis, *The neurobiology of LRRK2 and its role in the pathogenesis of Parkinson's disease*. *Neurochem Res*, 2014. **39**(3): p. 576-92.
102. Atashrazm, F. and N. Dzamko, *LRRK2 inhibitors and their potential in the treatment of Parkinson's disease: current perspectives*. *Clin Pharmacol*, 2016. **8**: p. 177-189.
103. Wallings, R.L. and M.G. Tansey, *LRRK2 regulation of immune-pathways and inflammatory disease*. *Biochem Soc Trans*, 2019. **47**(6): p. 1581-1595.
104. Hu, Y., et al., *Omi/HtrA2 Protease Associated Cell Apoptosis Participates in Blood-Brain Barrier Dysfunction*. *Front Mol Neurosci*, 2019. **12**: p. 48.
105. Kang, S., T. Fernandes-Alnemri, and E.S. Alnemri, *A novel role for the mitochondrial HTRA2/OMI protease in aging*. *Autophagy*, 2013. **9**(3): p. 420-1.
106. Zavodszky, E., et al., *Mutation in VPS35 associated with Parkinson's disease impairs WASH complex association and inhibits autophagy*. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 3828.
107. Deng, H., Y. Wu, and J. Jankovic, *The EIF4G1 gene and Parkinson's disease*. *Acta Neurol Scand*, 2015. **132**(2): p. 73-8.
108. Girard, M., et al., *The DnaJ-domain protein RME-8 functions in endosomal trafficking*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(48): p. 40135-43.
109. Ruan, Y., et al., *CHCHD2 and CHCHD10 regulate mitochondrial dynamics and integrated stress response*. *Cell Death Dis*, 2022. **13**(2): p. 156.
110. Zhang, L., et al., *Role of DJ-1 in Immune and Inflammatory Diseases*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 994.
111. Higashi, S., et al., *GIGYF2 is present in endosomal compartments in the mammalian brains and enhances IGF-1-induced ERK1/2 activation*. *J Neurochem*, 2010. **115**(2): p. 423-37.
112. Chiu, C.C., et al., *PARK14 (D331Y) PLA2G6 Causes Early-Onset Degeneration of Substantia Nigra Dopaminergic Neurons by Inducing Mitochondrial Dysfunction, ER Stress, Mitophagy Impairment and Transcriptional Dysregulation in a Knockin Mouse Model*. *Mol Neurobiol*, 2019. **56**(6): p. 3835-3853.
113. Zhou, Z.D., et al., *Linking F-box protein 7 and parkin to neuronal degeneration in Parkinson's disease (PD)*. *Mol Brain*, 2016. **9**: p. 41.
114. Koroglu, C., et al., *DNAJC6 is responsible for juvenile parkinsonism with phenotypic variability*. *Parkinsonism Relat Disord*, 2013. **19**(3): p. 320-4.
115. Pan, P.Y., et al., *Synaptojanin1 deficiency upregulates basal autophagosome formation in astrocytes*. *J Biol Chem*, 2021. **297**(1): p. 100873.
116. Choudhry, H., M. Aggarwal, and P.Y. Pan, *Mini-review: Synaptojanin 1 and its implications in membrane trafficking*. *Neurosci Lett*, 2021. **765**: p. 136288.
117. Lesage, S., et al., *Loss of VPS13C Function in Autosomal-Recessive Parkinsonism Causes Mitochondrial Dysfunction and Increases PINK1/Parkin-Dependent Mitophagy*. *Am J Hum Genet*, 2016. **98**(3): p. 500-513.
118. Liu, J., et al., *Gaucher disease gene GBA functions in immune regulation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(25): p. 10018-23.
119. Guo, T., W. Noble, and D.P. Hanger, *Roles of tau protein in health and disease*. *Acta Neuropathol*, 2017. **133**(5): p. 665-704.
120. Hermey, G., *The Vps10p-domain receptor family*. *Cell Mol Life Sci*, 2009. **66**(16): p. 2677-89.
121. Quistgaard, E.M., et al., *Ligands bind to Sortilin in the tunnel of a ten-bladed beta-propeller domain*. *Nat Struct Mol Biol*, 2009. **16**(1): p. 96-8.
122. Jacobsen, L., et al., *Activation and functional characterization of the mosaic receptor SorLA/LR11*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(25): p. 22788-96.
123. Munck Petersen, C., et al., *Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding*. *EMBO J*, 1999. **18**(3): p. 595-604.

124. Nielsen, M.S., et al., *The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein*. EMBO J, 2001. **20**(9): p. 2180-90.
125. Nielsen, M.S., et al., *Sorting by the cytoplasmic domain of the amyloid precursor protein binding receptor SorLA*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(19): p. 6842-51.
126. Nielsen, M.S., et al., *Different motifs regulate trafficking of SorCS1 isoforms*. Traffic, 2008. **9**(6): p. 980-94.
127. Westergaard, U.B., et al., *SorCS3 does not require propeptide cleavage to bind nerve growth factor*. FEBS Lett, 2005. **579**(5): p. 1172-6.
128. Sarret, P., et al., *Distribution of NTS3 receptor/sortilin mRNA and protein in the rat central nervous system*. J Comp Neurol, 2003. **461**(4): p. 483-505.
129. Hermey, G., et al., *The three sorCS genes are differentially expressed and regulated by synaptic activity*. J Neurochem, 2004. **88**(6): p. 1470-6.
130. Rezgaoui, M., et al., *Identification of SorCS2, a novel member of the VPS10 domain containing receptor family, prominently expressed in the developing mouse brain*. Mech Dev, 2001. **100**(2): p. 335-8.
131. Petersen, C.M., et al., *Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography*. J Biol Chem, 1997. **272**(6): p. 3599-605.
132. Hermans-Borgmeyer, I., et al., *Expression of the 100-kDa neurotensin receptor sortilin during mouse embryonal development*. Brain Res Mol Brain Res, 1999. **65**(2): p. 216-9.
133. Yabe-Wada, T., et al., *TLR signals posttranscriptionally regulate the cytokine trafficking mediator sortilin*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 26566.
134. Morris, N.J., et al., *Sortilin is the major 110-kDa protein in GLUT4 vesicles from adipocytes*. J Biol Chem, 1998. **273**(6): p. 3582-7.
135. Blondeau, N., et al., *Sortilin in Glucose Homeostasis: From Accessory Protein to Key Player?* Front Pharmacol, 2018. **9**: p. 1561.
136. Yang, M., et al., *Precursor of brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) forms a complex with Huntingtin-associated protein-1 (HAP1) and sortilin that modulates proBDNF trafficking, degradation, and processing*. J Biol Chem, 2011. **286**(18): p. 16272-84.
137. Ohwaki, K., et al., *A secreted soluble form of LR11, specifically expressed in intimal smooth muscle cells, accelerates formation of lipid-laden macrophages*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(5): p. 1050-6.
138. Nyborg, A.C., et al., *Sortilin, SorCS1b, and SorLA Vps10p sorting receptors, are novel gamma-secretase substrates*. Mol Neurodegener, 2006. **1**: p. 3.
139. Morinville, A., et al., *Internalization and trafficking of neurotensin via NTS3 receptors in HT29 cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(11): p. 2153-68.
140. Mari, M., et al., *SNX1 defines an early endosomal recycling exit for sortilin and mannose 6-phosphate receptors*. Traffic, 2008. **9**(3): p. 380-93.
141. Seaman, M.N., *Identification of a novel conserved sorting motif required for retromer-mediated endosome-to-TGN retrieval*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 14): p. 2378-89.
142. Dumanis, S.B., et al., *Distinct Functions for Anterograde and Retrograde Sorting of SORLA in Amyloidogenic Processes in the Brain*. J Neurosci, 2015. **35**(37): p. 12703-13.
143. Tanimoto, R., et al., *The perlecan-interacting growth factor progranulin regulates ubiquitination, sorting, and lysosomal degradation of sortilin*. Matrix Biol, 2017. **64**: p. 27-39.
144. Wilson, C.M., et al., *Sortilin mediates the release and transfer of exosomes in concert with two tyrosine kinase receptors*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 18): p. 3983-97.
145. Talbot, H., et al., *Regulatory Roles of Sortilin and SorLA in Immune-Related Processes*. Front Pharmacol, 2018. **9**: p. 1507.
146. Herda, S., et al., *The sorting receptor Sortilin exhibits a dual function in exocytic trafficking of interferon-gamma and granzyme A in T cells*. Immunity, 2012. **37**(5): p. 854-66.
147. Mortensen, M.B., et al., *Targeting sortilin in immune cells reduces proinflammatory cytokines and atherosclerosis*. J Clin Invest, 2014. **124**(12): p. 5317-22.

148. Leopold Wager, C.M. and F.L. Wormley, Jr., *Classical versus alternative macrophage activation: the Ying and the Yang in host defense against pulmonary fungal infections*. *Mucosal Immunol*, 2014. **7**(5): p. 1023-35.
149. Vazquez, C.L., et al., *The proneurotrophin receptor sortilin is required for Mycobacterium tuberculosis control by macrophages*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 29332.
150. Schuster, B., et al., *Signaling of human ciliary neurotrophic factor (CNTF) revisited. The interleukin-6 receptor can serve as an alpha-receptor for CTNF*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(11): p. 9528-35.
151. Larsen, J.V., et al., *Sortilin facilitates signaling of ciliary neurotrophic factor and related helical type 1 cytokines targeting the gp130/leukemia inhibitory factor receptor beta heterodimer*. *Mol Cell Biol*, 2010. **30**(17): p. 4175-87.
152. Nykjaer, A., et al., *Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death*. *Nature*, 2004. **427**(6977): p. 843-8.
153. Teng, H.K., et al., *ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75^{NTR} and sortilin*. *J Neurosci*, 2005. **25**(22): p. 5455-63.
154. Jian, J., et al., *Progranulin directly binds to the CRD2 and CRD3 of TNFR extracellular domains*. *FEBS Lett*, 2013. **587**(21): p. 3428-36.
155. Martin, S., J.P. Vincent, and J. Mazella, *Involvement of the neurotensin receptor-3 in the neurotensin-induced migration of human microglia*. *J Neurosci*, 2003. **23**(4): p. 1198-205.
156. Dicou, E., J.P. Vincent, and J. Mazella, *Neurotensin receptor-3/sortilin mediates neurotensin-induced cytokine/chemokine expression in a murine microglial cell line*. *J Neurosci Res*, 2004. **78**(1): p. 92-9.
157. Paushter, D.H., et al., *The lysosomal function of progranulin, a guardian against neurodegeneration*. *Acta Neuropathol*, 2018. **136**(1): p. 1-17.
158. Chen, X., et al., *Progranulin does not bind tumor necrosis factor (TNF) receptors and is not a direct regulator of TNF-dependent signaling or bioactivity in immune or neuronal cells*. *J Neurosci*, 2013. **33**(21): p. 9202-13.
159. Toth, A.E., et al., *Sortilin regulates blood-brain barrier integrity*. *FEBS J*, 2022. **289**(4): p. 1062-1079.
160. Yang, M., et al., *The intracellular domain of sortilin interacts with amyloid precursor protein and regulates its lysosomal and lipid raft trafficking*. *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e63049.
161. Gustafsen, C., et al., *Sortilin and SorLA display distinct roles in processing and trafficking of amyloid precursor protein*. *J Neurosci*, 2013. **33**(1): p. 64-71.
162. Carlo, A.S., et al., *The pro-neurotrophin receptor sortilin is a major neuronal apolipoprotein E receptor for catabolism of amyloid-beta peptide in the brain*. *J Neurosci*, 2013. **33**(1): p. 358-70.
163. Eggert, S., et al., *Trafficking in Alzheimer's Disease: Modulation of APP Transport and Processing by the Transmembrane Proteins LRP1, SorLA, SorCS1c, Sortilin, and Calsyntenin*. *Mol Neurobiol*, 2018. **55**(7): p. 5809-5829.
164. Goettsch, C., M. Kjolby, and E. Aikawa, *Sortilin and Its Multiple Roles in Cardiovascular and Metabolic Diseases*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018. **38**(1): p. 19-25.
165. Samani, N.J., et al., *Genomewide association analysis of coronary artery disease*. *N Engl J Med*, 2007. **357**(5): p. 443-53.
166. Muendlein, A., et al., *Significant impact of chromosomal locus 1p13.3 on serum LDL cholesterol and on angiographically characterized coronary atherosclerosis*. *Atherosclerosis*, 2009. **206**(2): p. 494-9.
167. Kathiresan, S., et al., *Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans*. *Nat Genet*, 2008. **40**(2): p. 189-97.
168. Zhong, L.Y., et al., *Sortilin: A novel regulator in lipid metabolism and atherogenesis*. *Clin Chim Acta*, 2016. **460**: p. 11-7.
169. Strong, A., et al., *Hepatic sortilin regulates both apolipoprotein B secretion and LDL catabolism*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(8): p. 2807-16.

170. Gustafsen, C., et al., *The hypercholesterolemia-risk gene SORT1 facilitates PCSK9 secretion*. Cell Metab, 2014. **19**(2): p. 310-8.
171. Patel, K.M., et al., *Macrophage sortilin promotes LDL uptake, foam cell formation, and atherosclerosis*. Circ Res, 2015. **116**(5): p. 789-96.
172. Tunduguru, R. and D.C. Thurmond, *Promoting Glucose Transporter-4 Vesicle Trafficking along Cytoskeletal Tracks: PAK-Ing Them Out*. Front Endocrinol (Lausanne), 2017. **8**: p. 329.
173. Huang, G., et al., *Insulin responsiveness of glucose transporter 4 in 3T3-L1 cells depends on the presence of sortilin*. Mol Biol Cell, 2013. **24**(19): p. 3115-22.
174. Ariga, M., et al., *Glucose deprivation attenuates sortilin levels in skeletal muscle cells*. Endocr J, 2017. **64**(3): p. 255-268.
175. McKinnon, K.M., *Flow Cytometry: An Overview*. Curr Protoc Immunol, 2018. **120**: p. 5 11-5 11.
176. Engvall, E., *The ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay*, in Clin Chem. 2010. p. 319-20.
177. Saunders, J.A., et al., *CD4+ regulatory and effector/memory T cell subsets profile motor dysfunction in Parkinson's disease*. J Neuroimmune Pharmacol, 2012. **7**(4): p. 927-38.
178. Bas, J., et al., *Lymphocyte populations in Parkinson's disease and in rat models of parkinsonism*. J Neuroimmunol, 2001. **113**(1): p. 146-52.
179. Jiang, S., et al., *The correlation of lymphocyte subsets, natural killer cell, and Parkinson's disease: a meta-analysis*. Neurol Sci, 2017. **38**(8): p. 1373-1380.
180. Bhatia, D., et al., *T-cell dysregulation is associated with disease severity in Parkinson's Disease*. Journal of Neuroinflammation, 2021. **18**(1): p. 250.
181. Baba, Y., et al., *Alterations of T-lymphocyte populations in Parkinson disease*. Parkinsonism Relat Disord, 2005. **11**(8): p. 493-8.
182. Li, R., et al., *Abnormal B-Cell and Tfh-Cell Profiles in Patients With Parkinson Disease: A Cross-sectional Study*. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm, 2022. **9**(2).
183. Zhao, X., et al., *Imbalance of Circulating Tfh/Tfr Cells in Patients With Parkinson's Disease*. Front Neurol, 2020. **11**: p. 572205.
184. Su, Y., et al., *Dysregulation of peripheral monocytes and pro-inflammation of alpha-synuclein in Parkinson's disease*. J Neurol, 2022.
185. Nissen, S.K., et al., *Alterations in Blood Monocyte Functions in Parkinson's Disease*. Mov Disord, 2019. **34**(11): p. 1711-1721.
186. Narasimhan, P.B., et al., *Nonclassical Monocytes in Health and Disease*. Annu Rev Immunol, 2019. **37**: p. 439-456.
187. Fauchais, A.L., et al., *Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival*. J Immunol, 2008. **181**(5): p. 3027-38.
188. Wang, N. and B. Tian, *Brain-derived neurotrophic factor in autoimmune inflammatory diseases (Review)*. Exp Ther Med, 2021. **22**(5): p. 1292.
189. Møller, P.L., et al., *Sortilin as a Biomarker for Cardiovascular Disease Revisited*. Front Cardiovasc Med, 2021. **8**: p. 652584.
190. Oh, T.J., et al., *Circulating sortilin level as a potential biomarker for coronary atherosclerosis and diabetes mellitus*. Cardiovasc Diabetol, 2017. **16**(1): p. 92.
191. Biscetti, F., et al., *Sortilin levels correlate with major cardiovascular events of diabetic patients with peripheral artery disease following revascularization: a prospective study*. Cardiovascular Diabetology, 2020. **19**(1): p. 147.
192. Rabinowich, L., et al., *Sortilin deficiency improves the metabolic phenotype and reduces hepatic steatosis of mice subjected to diet-induced obesity*. J Hepatol, 2015. **62**(1): p. 175-81.
193. Li, J., et al., *Sortilin 1 knockout alters basal adipose glucose metabolism but not diet-induced obesity in mice*. FEBS Lett, 2017. **591**(7): p. 1018-1028.
194. Santaella, A., et al., *Inflammation biomarker discovery in Parkinson's disease and atypical parkinsonisms*. BMC Neurol, 2020. **20**(1): p. 26.
195. Reale, M., et al., *Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease*. Brain Behav Immun, 2009. **23**(1): p. 55-63.

196. Kalkonde, Y.V., et al., *Chemokines in the MPTP model of Parkinson's disease: absence of CCL2 and its receptor CCR2 does not protect against striatal neurodegeneration*. Brain Res, 2007. **1128**(1): p. 1-11.
197. Catalan, V., et al., *Proinflammatory cytokines in obesity: impact of type 2 diabetes mellitus and gastric bypass*. Obes Surg, 2007. **17**(11): p. 1464-74.
198. Breslin, W.L., et al., *Obese Mexican American children have elevated MCP-1, TNF-alpha, monocyte concentration, and dyslipidemia*. Pediatrics, 2012. **129**(5): p. e1180-6.
199. Tateya, S., et al., *An increase in the circulating concentration of monocyte chemoattractant protein-1 elicits systemic insulin resistance irrespective of adipose tissue inflammation in mice*. Endocrinology, 2010. **151**(3): p. 971-9.
200. Dommel, S. and M. Blüher, *Does C-C Motif Chemokine Ligand 2 (CCL2) Link Obesity to a Pro-Inflammatory State?* Int J Mol Sci, 2021. **22**(3).