



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας



Διπλωματική Εργασία

*«Επίπεδα ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα
NF-κB σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος
ασθενών με νόσο του Parkinson»*

Diploma Thesis

*«Activation levels of NF-κB transcription factor in cells of
the immune system of patients with Parkinson's Disease»*



Παναγιώτης Β. Νταβαρούκας

Λάρισα, Σεπτέμβριος 2022

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Παπουτσοπούλου Σταματία – Επιβλέπουσα
Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Ανοσοβιολογίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ξηρομερήσιου Γεωργία

Επίκουρος Καθηγήτρια Νευρολογίας
Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Καλαλά Φανή

Επίκουρος Καθηγήτρια Ιατρικής Ανοσολογίας
Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Παναγιώτης Νταβαρούκας

του Βασιλείου

Λάρισα, Σεπτέμβριος 2022

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια της συνεργασίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Πιο συγκεκριμένα, κατά πλειοψηφία, η διεξαγωγή των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του τμήματος Ιατρικής.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας, Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Ανοσοβιολογίας στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, κυρία Παπουτσοπούλου Σταματία. Η συνεχής καθοδήγηση και το ενδιαφέρον, εντός και εκτός εργαστηρίου, καθώς και η εμπιστοσύνη και στήριξη της σε κάθε βήμα αυτής της εργασίας, υπήρξαν σημαντικές συνιστώσες για την επιτυχία της διεκπεραίωσης.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα άλλα δύο μέλη της επιτροπής, την Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Ανοσολογίας στο τμήμα Ιατρικής, κυρία Καλαλά Φανή για τις συμβουλές και την καθοδήγηση σε θέματα που αφορούσαν την κυτταρομετρία ροής, και την Επίκουρη Καθηγήτρια Νευρολογίας στο τμήμα Ιατρικής, κυρία Ξηρομερήσιου Γεωργία για την όλη οργάνωση της μελέτης όσο αφορά τους ασθενείς και τα δείγματα που μας παραχωρήθηκαν. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στα μέλη του εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του τμήματος Ιατρικής και ιδιαίτερα στην τεχνολόγο του εργαστηρίου, κυρία Φουσίκα Αθανασία, για την διαρκή της βοήθεια και καθοδήγηση σε όλη τη διάρκεια παραμονής μας στο εργαστήριο.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένεια μου, που είναι δίπλα μου και με στηρίζει σε κάθε μου βήμα και απόφαση, όπως και στους φίλους μου, με τους οποίους δημιουργήσαμε όμορφες αναμνήσεις σε αυτά τα τέσσερα χρόνια φοιτητικών σπουδών.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	6
Abstract.....	7
1. Εισαγωγή.....	8
1.1 Νόσος του Parkinson.....	9
1.1.1 Γενικά στοιχεία.....	9
1.1.2 Ιστορική αναδρομή.....	10
1.1.3 Επιδημιολογία της νόσου.....	13
1.1.4 Αιτιολογικοί παράγοντες εμφάνισης της νόσου.....	15
1.1.5 Μηχανισμοί παθογένεσης.....	18
1.1.6 Παθοφυσιολογία.....	24
1.1.7 Συμπτώματα και θεραπεία της νόσου.....	25
1.2 Μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ.....	27
1.2.1 Γενικά στοιχεία.....	27
1.2.2 Μέλη της οικογένειας του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ.....	28
1.2.3 Δομή των πρωτεϊνών της οικογένειας του NF-κΒ.....	29
1.2.4 Η οικογένεια των ανασταλτικών πρωτεϊνών ΙκΒ.....	31
1.2.5 Σηματοδοτικά μονοπάτια ενεργοποίησης του NF-κΒ.....	34
1.2.5.1 Κανονικό (κλασικό) μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-κΒ.....	35
1.2.5.2 Μη κανονικό (εναλλακτικό) μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-κΒ.....	35
1.2.5.3 Τερματισμός της σηματοδότησης του NF-κΒ.....	36
1.2.6 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των υπομονάδων του NF-κΒ.....	37
1.3 Ανοσολογική απόκριση στη νόσο του Parkinson.....	38
1.3.1 Φλεγμονή στη νόσο του Parkinson.....	38
1.3.2 Ο ρόλος της σηματοδότησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ στη νευρωνική λειτουργία και τη νευροφλεγμονή.....	42
2. Σκοπός της εργασίας.....	45
3. Υλικά και μέθοδοι.....	46
3.1 Κυτταρομετρία ροής.....	46
3.1.1 Πειραματική διαδικασία.....	48

3.2	Ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA (Enzyme – linked Immunosorbent Assay).....	51
3.2.1	Πειραματική διαδικασία.....	53
3.3	Στατιστική ανάλυση.....	59
4.	Αποτελέσματα.....	61
4.1	Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής.....	61
4.1.1	Επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης p65/NF-κB σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.....	62
4.1.2	Επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα CD40 σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.....	67
4.2	Μετρήσεις βιοδεικτών στον ορό αίματος με ELISA.....	70
4.2.1	Προσδιορισμός επιπέδων TNF.....	71
4.2.2	Προσδιορισμός επιπέδων CCL2.....	75
5.	Συζήτηση.....	79
6.	Βιβλιογραφία.....	84

Περίληψη

Η νόσος του Parkinson αποτελεί μια από τις πιο συχνά εμφανιζόμενες νευροεκφυλιστικές ασθένειες που πλήττουν τον ανθρώπινο πληθυσμό παγκοσμίως, με τη πιθανότητα εμφάνισης της να αυξάνεται σε άτομα με χρονολογική ηλικία άνω των 65 ετών. Πρόκειται για μια νόσο που χαρακτηρίζεται από κινητικά και μη συμπτώματα, η εμφάνιση των οποίων οφείλεται σε ένα ετερογενές μείγμα αιτιών. Η συνεισφορά τόσο των γενετικών όσο και των περιβαλλοντικών παραγόντων, φαίνεται πως επηρεάζει εξίσου το ενδεχόμενο εμφάνισης της, μαζί με την ηλικία και το βιολογικό φύλο. Η μοριακή της βάση εντοπίζεται σε μια πληθώρα γεγονότων, όπως η λανθασμένη αναδίπλωση πρωτεϊνών, η μιτοχondριακή δυσλειτουργία, το οξειδωτικό στρες και η νευροφλεγμονή. Αυτά οδηγούν στα κύρια παθοφυσιολογικά γνωρίσματα της νόσου που είναι ο εκφυλισμός των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας και η παρουσία σωμάτων Lewy, δηλαδή συσσωματώματα της πρωτεΐνης α-συνουκλεΐνη. Μελέτες έχουν καταδείξει το σημαντικό ρόλο της νευροφλεγμονής στην έκβαση της νόσου και ιδιαίτερα την εμπλοκή του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB σε αυτή. Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB αποτελείται από μια οικογένεια πρωτεϊνών που ρυθμίζουν ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων με κρίσιμους ρόλους στην λειτουργία των κυττάρων, μέσω δύο διαφορετικών μονοπατιών ενεργοποίησης. Η ρύθμιση του υπόκεινται τόσο στις ανασταλτικές πρωτεΐνες IκB όσο και σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Δεδομένου της εμπλοκής του στη λειτουργία των νευρώνων αλλά και του ανοσοποιητικού συστήματος, η απορυθμισμένη ενεργοποίηση του NF-κB συμβάλλει στις παθογόνες διεργασίες διαφόρων φλεγμονωδών ασθενειών, όπως και η νόσος του Parkinson. Στη παρούσα εργασία, μελετώνται τα επίπεδα ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς και τα ποσοτικά επίπεδα των κυτοκινών TNF και CCL2, στον ορό αίματος ασθενών με νόσο του Parkinson και υγιών ατόμων, με απώτερο στόχο την διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης τους με την εμφάνιση της νόσου.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is one of the most common neurodegenerative diseases affecting the human population worldwide, with the possibility of its occurrence in people with a chronological age of more than 65 years. It is a disease characterized by kinetic and non-kinetic symptoms, the appearance of which is not due to a heterogeneous cause. The contribution of both genetic and environmental factors seems to influence the possibility of its occurrence, along with age and biological sex. Its molecular basis is found in a multitude of events, including protein misfolding, mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and neuroinflammation. These lead to the main pathophysiological features of the disease which are the degeneration of dopaminergic neurons of the substantia nigra and the presence of Lewy bodies, which are aggregates of the α -synuclein protein. Studies have shown the important role of neuroinflammation in the outcome of the disease and especially the involvement of the transcription factor NF- κ B in it. The transcription factor NF- κ B consists of a family of proteins that regulate a large number of genes with critical roles in cell function, through two distinct activation pathways. Its regulation is subject to both inhibitory I κ B proteins and post-translational modifications. Given its involvement in the function of neurons as well as the immune system, deregulated NF- κ B activation contributes to the pathogenic processes of various inflammatory diseases, such as Parkinson's disease. In the present work, the activation levels of the transcription factor NF- κ B in cells of the immune system, as well as the quantitative levels of the cytokines TNF and CCL2, in the serum of patients with Parkinson's disease and healthy individuals are studied, in order to investigate the possible correlation between them with the onset of the disease.

1. Εισαγωγή

Η σημερινή εποχή χαρακτηρίζεται από την αλματώδη ανάπτυξη των επιστημών και των τεχνολογικών τους εφαρμογών, με αποτέλεσμα να παρατηρείται μια ραγδαία αλλαγή στον τρόπο ζωής των ανθρώπων. Ιδιαίτερα, η εξέλιξη στον τομέα της έρευνας, σε σχέση με την υγεία, και η εφαρμογή των επιστημονικών αποτελεσμάτων στη σύγχρονη ιατρική, οδήγησε στην αύξηση του προσδόκιμου ζωής του ανθρώπινου πληθυσμού. Ωστόσο, η σύγχρονη καθημερινότητα στην οποία διαβίει ο άνθρωπος, διέπτεται από γρήγορους και έντονους ρυθμούς, που οδηγούν αναμφισβήτητα σε έντονο στρες και ψυχολογική αστάθεια, με ενδεχόμενες αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου. Συνεπώς, γίνεται αντιληπτό ότι η υγεία του σύγχρονου ανθρώπου καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό τόσο από τις κοινωνικές συνθήκες όσο και από τις σωματικές συνήθειες.

Για το μεγαλύτερο μέρος του περασμένου αιώνα, η κοινωνική πολιτική των χωρών ανά τον πλανήτη, εστίαζε στην αύξηση του προσδόκιμου ζωής στον ανθρώπινο πληθυσμό. Ωστόσο, τις τελευταίες δεκαετίες, η πολιτική και η έρευνα επικεντρώνονται ολοένα και περισσότερο στις δυνατότητες αύξησης της υγιούς ζωής ή της επέκτασης του χρόνου της υγιούς διαβίωσης [1]. Η γήρανση αποτελεί μια αναπόφευκτη και μη αναστρέψιμη διαδικασία, που σχετίζεται με εύκολα αναγνωρίσιμες και χαρακτηριστικές αλλαγές στη φυσική εμφάνιση και λειτουργία του οργανισμού. Δεδομένου ότι μια πληθώρα γενετικών αλλά και περιβαλλοντικών παραγόντων καθορίζουν την εξέλιξη της, συνάμα με αυτή στη διάρκεια των χρόνων, μπορεί να εμφανιστούν διάφορες παθολογικές καταστάσεις που μπορούν να επηρεάσουν το χρόνο αλλά και την ποιότητα της διαβίωσης του ανθρώπου. Ένα μεγάλο ποσοστό αυτών περιλαμβάνουν μια ομάδα νευροεκφυλιστικών ασθενειών, οι οποίες είναι διαταραχές που σχετίζονται με την ηλικία, χαρακτηρίζονται από προοδευτικό λειτουργικό εκφυλισμό ή/και θάνατο νευρώνων στο νευρικό σύστημα και μπορεί να είναι αποτέλεσμα κληρονομικών ή σποραδικών αιτιών [2].

Ένας αυξανόμενος όγκος στοιχείων δείχνει ότι το νευρικό και το ανοσοποιητικό σύστημα δρουν σε συνέργεια και διατηρούν εκτεταμένη επικοινωνία. Αυτή η αλληλεπίδραση φαίνεται να αποτελεί τη βάση της νευροφλεγμονής, η οποία αποτελεί τον ομοιοστατικό αμυντικό μηχανισμό που ενεργοποιείται στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) και στοχεύει στην πρόληψη της επιδείνωσης της βλάβης κατά τη διάρκεια της αντιμετώπισης προσβολών από τραυματισμό, μόλυνση, αυτοάνοση απόκριση ή μεταβολικό στρες [3]. Το έμφυτο και επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα ενεργοποιούνται ως απάντηση σε αυτές τις προσβολές. Το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα αντιδρά ταχύτερα, αλλά μη ειδικά και αποτελείται από κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των κατοικούμενων μικρογλοιακών κυττάρων του εγκεφάλου και μονοκυττάρων/μακροφάγων που προέρχονται από τον μυελό των οστών. Το επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα, το οποίο εξαρτάται από την ενεργοποίηση των Τ

και Β λεμφοκυττάρων, είναι πολύ πιο εξειδικευμένο αλλά απαιτεί χρόνο για να ενισχυθεί [4]. Επιπρόσθετα, τα αστροκύτταρα και τα ολιγοδενδροκύτταρα του εγκεφάλου ενέχουν δράση κυττάρων του ανοσοποιητικού, με αποτέλεσμα να ρυθμίζουν την ανοσολογική απόκριση εντός του ΚΝΣ. Η ανεπίλυτη χρόνια νευροφλεγμονή μπορεί να οδηγήσει σε νευροεκφυλισμό, ο οποίος, όπως αναφέρθηκε, εκδηλώνεται με σταδιακή εξάλειψη των νευρικών κυττάρων. Ο νευροεκφυλισμός ενσωματώνει τις παθολογίες αρκετών εξουθενωτικών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων της σκλήρυνσης κατά πλάκας (MS), της νόσου Alzheimer (AD), της νόσου του Huntington, της αμυοτροφικής πλευρικής σκλήρυνσης και της νόσου του Parkinson (PD) [5]. Οι κυτταρικοί και μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται σε αυτές τις διαταραχές δεν είναι καλά κατανοητοί και μια σειρά από πιθανές παθολογικές οδούς έχουν συσχετιστεί με την αιτιολογία της εμφάνισης τους, συμπεριλαμβανομένων γεγονότων όπως συσσώρευση πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, τροποποιημένες λειτουργίες των μιτοχονδρίων, οξειδωτικές αποκρίσεις, μη φυσιολογική δυναμική των διαύλων ιόντων, αλλοιωμένη διαδικασία της αυτοφαγίας και κυτταρικό θάνατο [6].

Η παγκόσμια έρευνα για τις νευρολογικές παθήσεις αποκάλυψε ότι η επίπτωση και ο επιπολασμός της νόσου του Parkinson έχει αυξηθεί ραγδαία σε όλο τον κόσμο. Η νόσος του Parkinson μπορεί ακόμη και να είναι η ταχύτερα αναπτυσσόμενη νευρολογική πάθηση παγκοσμίως. Η αύξηση μπορεί να εξηγηθεί εν μέρει από τη γήρανση του πληθυσμού, επειδή η συχνότητα της νόσου του Parkinson αυξάνεται με την ηλικία. Ωστόσο, η νόσος προβλέπεται να συνεχίσει να αυξάνεται σε συχνότητα εμφάνισης, αλλά πλέον οφείλεται σε περισσότερους παράγοντες εκτός από τη γήρανση [7]. Υπό το φως των υποθέσεων που βλέπουν τη φλεγμονή ως συμπαραγοντα των νευροεκφυλιστικών διεργασιών, η δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος προστίθεται στον κατάλογο των παραγόντων που συνδέουν τις γενετικές μεταλλάξεις και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Αν και πολλαπλοί μεταγραφικοί παράγοντες ρυθμίζουν τις νευροφλεγμονώδεις αποκρίσεις, η συσχέτιση της νόσου του Parkinson και του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ έχει εδραιωθεί τα τελευταία χρόνια, μέσω των εκτεταμένων μελετών που πραγματοποιούνται από τους ερευνητές. Έτσι, παρακάτω, η παρούσα εργασία αναφέρεται τόσο στη νόσο του Parkinson και τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ, όσο και στο ρόλο αυτού στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και στη φλεγμονή που δημιουργείται στη συγκεκριμένη ασθένεια.

1.1 Νόσος του Parkinson

1.1.1 Γενικά στοιχεία

Η νόσος του Parkinson είναι μια πολύπλοκη νευροεκφυλιστική διαταραχή, δεύτερη σε συχνότητα εμφάνισης στον ανθρώπινο πληθυσμό μετά τη νόσο Alzheimer, και με επικράτηση 1%-2% στον πληθυσμό ηλικίας άνω των 65 ετών, η οποία περιεγράφηκε από τον James Parkinson το 1817. Στον πυρήνα της, η νόσος του Parkinson είναι μια

νευρολογική νόσος με πρώιμο εμφανή θάνατο ντοπαμινεργικών νευρώνων που προβάλλουν από τη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας (SNpc) στο ουραίο τμήμα του ραβδώτου σώματος και την ευρεία συσσώρευση της πρωτεΐνης α-συνουκλεΐνης (α-syn) με τη μορφή σωμάτων Lewy (Lewy Bodies) σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου. Η προκύπτουσα ανεπάρκεια ντοπαμίνης εντός των βασικών γαγγλίων οδηγεί σε απώλεια της νευροδιαβίβασης της ντοπαμίνης, προκαλώντας τα κύρια κινητικά συμπτώματα, συμπεριλαμβανομένου του τρόμου κατά την ηρεμία, της βραδυκινησίας, της ακαμψίας και της αστάθειας της στάσης του σώματος. Ωστόσο, η νόσος του Parkinson περιλαμβάνει νευροδιαβιβαστές εκτός της ντοπαμίνης (ακετυλοχολίνη, νοραδρεναλίνη, σεροτονίνη) και περιοχές του νευρικού συστήματος έξω από τα βασικά γάγγλια, οδηγώντας επίσης σε μη κινητικά συμπτώματα που περιλαμβάνουν ανοσμία, διαταραχές του ύπνου και δυσκοιλιότητα καθώς και γνωστικά και ψυχιατρικά συμπτώματα, όπως η άνοια και η κατάθλιψη [8,9]. Τα περισσότερα από αυτά τα μη κινητικά συμπτώματα προηγούνται της κινητικής δυσλειτουργίας για περισσότερο από μια δεκαετία πριν την διάγνωση της νόσου. Μέχρι σήμερα, οι υπάρχουσες θεραπείες ανακουφίζουν τα συμπτώματα σε συγκεκριμένους πληθυσμούς ασθενών, αλλά δεν σταματούν την εξέλιξη της νόσου ή αναστρέφουν τις υπάρχουσες αναπηρίες. Αν και οι μηχανισμοί που διέπουν την παθοφυσιολογία της νόσου δεν είναι πλήρως κατανοητοί, αυξανόμενα στοιχεία υποδηλώνουν ότι κρίσιμους ρόλους στον καταρράκτη των γεγονότων που οδηγούν στον εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων, διαδραματίζουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ πολλαπλών γενετικών παραγόντων, του περιβάλλοντος, του ανοσοποιητικού συστήματος και της γήρανσης. Η αποσαφήνιση της αιτιολογίας και της παθογένειας της νόσου είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη διαγνωστικών μεθόδων και θεραπειών για την συγκεκριμένη νόσο [10]. Σήμερα, η διάγνωσή της είναι καθαρά κλινική και βασίζεται στο ιατρικό ιστορικό και τη νευρολογική αξιολόγηση, με σύγχρονες απεικονιστικές ή εργαστηριακές εξετάσεις, ενώ η θεραπεία στηρίζεται στη χορήγηση, κυρίως, λεβοντόπας και άλλων ντοπαμινικών αγωνιστών, αλλά με εμφανής παρενέργειες [11].

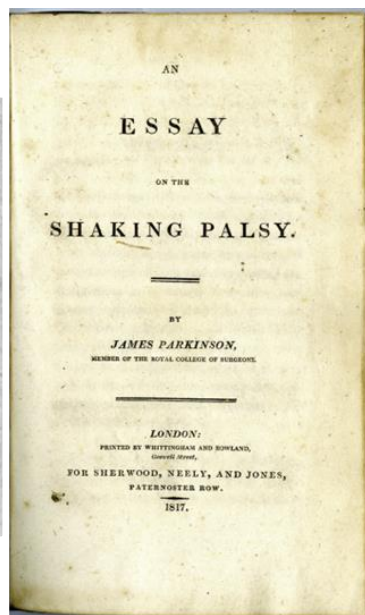
1.1.2 Ιστορική αναδρομή

Οι πρώιμες ιστορικές αναφορές που σχετίζονται με τη νόσο του Parkinson, χάνονται στα βάθη των αιώνων. Έχοντας τις ρίζες της χιλιάδες χρόνια πριν την εμφάνιση της σύγχρονης ιατρικής, η Αγιουρβέδα (Ayurveda) αποτέλεσε το αρχαίο ιατρικό σύστημα που αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε στην Ινδία (5000 – 3000 π.Χ.). Από τα θεμελιώδη κείμενα στα οποία βασίστηκε, για την εσωτερική παθολογία του ανθρώπου, αποτέλεσε το «Charaka Samhita», το οποίο γράφτηκε στα σανσκριτικά από τον Charaka, έναν από τους κύριους συντελεστές της Αγιουρβέδικης λογοτεχνίας. Σε αυτό το κείμενο, γίνεται αναφορά στον τρόμο και σε πιθανά παρκινσονικά χαρακτηριστικά, χρησιμοποιώντας διάφορους όρους, ωστόσο, η ασθένεια δεν κατηγοριοποιήθηκε ως μια ξεχωριστή οντότητα. Ένα μεταγενέστερο σανσκριτικό κείμενο του 15^{ου} αιώνα, το «Basavarajiyam» (1400 μ.Χ.), περιγράφει ξεκάθαρα ισοδύναμα συμπτώματα της νόσου Πάρκινσον, την οποία ονομάζει ως «Kampavata». Αξιοσημείωτο γεγονός

αποτελεί ότι, η θεραπεία αυτών των συμπτωμάτων, με βάση την παραδοσιακή ινδική ιατρική, γινόταν μέσω της χορήγησης αλεσμένων σπόρων, κυρίως του φυτού *Mucuna pruriens*. Μελέτες ανάλυσης της χημικής σύστασης αυτών των σπόρων, αποκάλυψαν την ύπαρξη λεβοντόπας, η οποία αποτελεί και το πιο αποτελεσματικό φάρμακο που ανακαλύφθηκε ποτέ για τον παρκινσονισμό [12].

Παρομοίως, στα πλαίσια της παραδοσιακής κινέζικης ιατρικής, αναφέρονται περιγραφές των χαρακτηριστικών συμπτωμάτων του τρόμου και της ακαμψίας, ήδη από το 425-221 π.Χ. αποδίδοντας την νόσο με την ονομασία «σύνδρομο ανεμοκίνησης». Σημαντική πηγή γνώσης αυτών αποτέλεσε το «The Yellow Emperor's Internal Classic», που συνιστά μια συλλογή από κλινικές εμπειρίες κινέζων ιατρών εκείνης της περιόδου. Παραδοσιακά φάρμακα όπως το «κρασί Jinya», το «χάπι του τρόμου», βότανα που περιείχαν ντοπαμινεργικές ή αντιχολινεργικές ενώσεις αλλά και προϊόντα με αντιοξειδωτικές ιδιότητες, χρησιμοποιούνταν για τη θεραπεία των συμπτωμάτων. Από την άλλη πλευρά, όσο αφορά τη δυτική ιατρική, μια από τις πρώτες περιγραφές που περιλάμβανε ένα σύμπλεγμα συμπτωμάτων που έμοιαζε με τον νόσο του Parkinson, έγινε από τον αρχαίο Έλληνα λόγιο και ιατρό ερευνητή Γαληνό (138-201 μ.Χ.). Στην έρευνα του ο Γαληνός, μέσω της δικής του βιβλιογραφίας για τον τρόμο, το αίσθημα των παλμών, την ακαμψία και τον σπασμό, προσπάθησε να διακρίνει τις διαφορετικές μορφές τρόμου με βάση την προέλευση και την εμφάνισή τους. Συνεπώς, είναι προφανές ότι αιώνες πριν από τις περιγραφές του James Parkinson, άλλοι είχαν ήδη περιγράψει χαρακτηριστικά και συμπτώματα της νόσου που αργότερα θα έφεραν το όνομά του.

Στην πορεία των χρόνων που μεσολάβησαν, δεν υπήρξαν αξιοσημείωτες αναφορές που να σχετίζονται με τα συμπτώματα που υποδήλωναν την νόσο του Parkinson, με αποτέλεσμα η συγκεκριμένη ασθένεια να μην ενταχθεί στην επίσημη ιατρική νοσολογία. Ήταν το 1817 μ.Χ. όταν ο James Parkinson (1755-1824), Άγγλος ιατρός και πολιτικός ακτιβιστής, δημοσίευσε το δοκίμιο του με τίτλο «Essay on the Shaking Palsy» (Εικ. 1) και στο οποίο περιέγραφε για πρώτη φορά επίσημα τη νόσο ως «τρομώδη παράλυση», τα συμπτώματά της, συζητούσε διαφορικές διαγνώσεις, πρότεινε πιθανές αιτιολογίες και εξέταζε πιθανούς τρόπους αντιμετώπισης. Ο Parkinson περιέγραψε έξι περιπτώσεις των κινητικών χαρακτηριστικών ανθρώπων, τρεις από τις οποίες παρατηρήθηκαν απλώς περιστασιακά στους δρόμους του Λονδίνου, όλοι άνδρες άνω των 50 ετών. Σχεδόν πέντε δεκαετίες μετά την δημοσίευση του Parkinson, ο Γάλλος ιατρός Jean-Martin Charcot αναγνώρισε τη σπουδαιότητα του έργου του, αποδίδοντας στην πάθηση τη σημερινή της ονομασία, δηλαδή Νόσος του Parkinson (Parkinson's Disease, PD). Ο Charcot χαρακτήρισε τη βραδυκινησία ως διαφορετική από την ακαμψία και επίσης αναγνώρισε μη κινητικά χαρακτηριστικά της νόσου. Η συμβολή του Charcot στη νόσο του Parkinson περιλαμβάνει, επίσης, τον διαχωρισμό των τεσσάρων κύριων συμπτωμάτων της συγκεκριμένης πάθησης: τον τρόμο ηρεμίας, τη βραδυκινησία, την ακαμψία και τις διαταραχές της βάδισης και της στάσης του ατόμου [13].



Εικόνα 1: James Parkinson και το εξώφυλλο της εργασίας του [14].

Οι παθολογικές έρευνες στα τέλη του 19ου και στις αρχές του 20ου αιώνα οδήγησαν στην ανακάλυψη νευροανατομικών βλαβών, που ευθύνονται για τη νόσο του Parkinson. Ο Brissaud, το 1895, ήταν εκείνος που επισήμανε αρχικά αλλοιώσεις στη μέλαινα ουσία του εγκεφάλου και οι οποίες ίσως αποτελούσαν θέση της βλάβης στην νόσο του Parkinson. Δύο δεκαετίες αργότερα, αυτή η ιδέα συγκέντρωσε υποστήριξη από το έργο του Tretiakoff, ο οποίος ήταν ο πρώτος που ανέφερε νευροπαθολογικές αλλαγές στη μέλαινα ουσία ασθενών με Parkinson. Συγκεκριμένα, παρατήρησε μακροσκοπικά αποχρωματισμό της μέλαινας ουσίας, μικροσκοπικά κυτταρικό εκφυλισμό νευρώνων και γλοίωση. Βρήκε, επίσης, ηωσινόφιλα ενδονευρωνικά έγκλειστα, ευρήματα που είχαν περιγραφεί προηγουμένως από τον Fritz Lewy το 1913 στο ραχιαίο πυρήνα του πνευμονογαστρικού, πλέον γνωστά ως σωμάτια Lewy. Στα επόμενα χρόνια, ακολούθησε η πρόοδος στη νευροχημεία και η ανακάλυψη της ντοπαμίνης με την συνακόλουθη ιδέα της χημικής νευροδιαβίβασης, κάτι που ερευνήθηκε σε μεγάλο βαθμό από τον Arvid Carlsson, ο οποίος τιμήθηκε και με το βραβείο Νόμπελ. Το 1957, ο Carlsson ανέφερε τα πρώτα στοιχεία για τον λειτουργικό ρόλο της ντοπαμίνης στον έλεγχο της κίνησης, περιγράφοντας το αποτέλεσμα της ρεζερπίνης στη μείωση της κινητικής δραστηριότητας στα ζώα, το οποίο αντιστράφηκε με τη χορήγηση L-3,4-διδροξυφαινυλαλανίνης (L-DOPA), ενός προδρόμου στη σύνθεση της ντοπαμίνης. Το 1960 οι Ehringer και Hornykiewicz περιέγραψαν την μείωση τόσο στο ραβδωτό σώμα όσο και στη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας (SNcp) στον εγκέφαλο ασθενών με Parkinson.

Όσο αφορά την αντιμετώπιση της ασθένειας, τα πρώτα δεδομένα για τη βελτίωση της κατάστασης των ασθενών με Parkinson, παρατέθηκαν από τον Έλληνα ερευνητή Γεώργιο Κοτζιά το 1967, έπειτα από την χορήγηση σε αυτούς υψηλής δόσης L-Dopa.

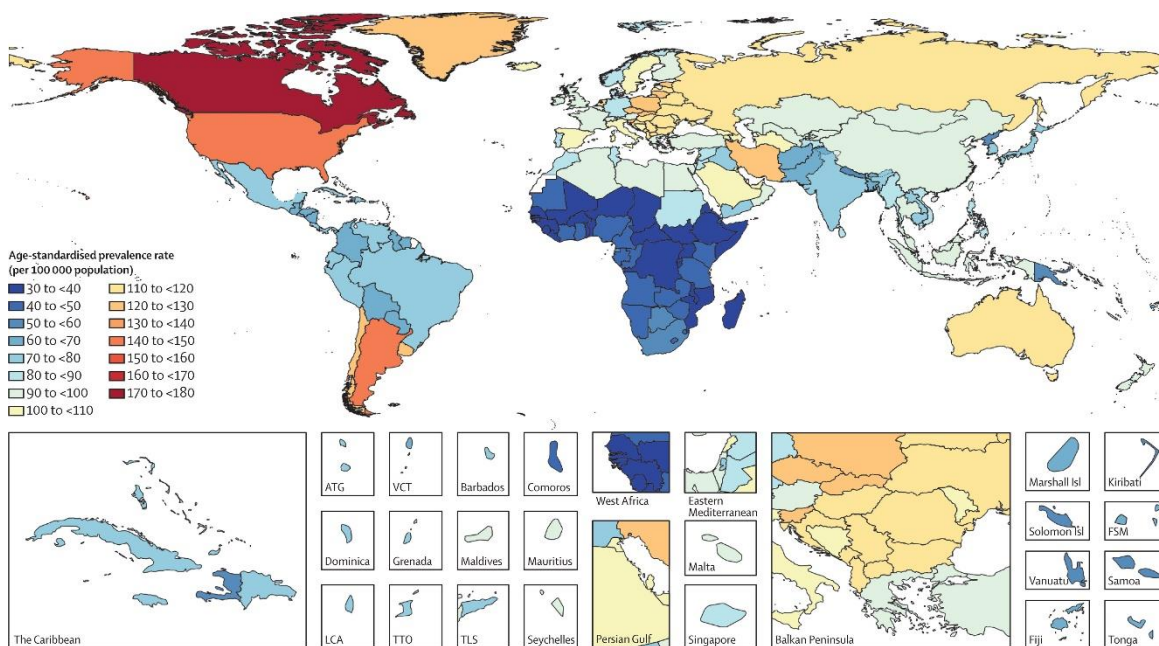
Από εκείνη την χρονική περίοδο, η L-Dopa αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες που συμβάλλουν στη θεραπεία ατόμων με Parkinson, αλλά παρά τα θεραπευτικά αποτελέσματα δεν παύουν να υφίστανται προβλήματα και περιορισμοί στη χρήση της. Στα τέλη της δεκαετίας του 1990, λόγω της βελτίωσης και της πολυπλοκότητας των τεχνικών γενετικής ανάλυσης, μεταλλάξεις στο γονίδιο SNCA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη άλφα-συνουκλεΐνη (α -syn) αναγνωρίστηκαν ως η πρώτη γενετική αιτία της νόσου του Parkinson. Έκτοτε, φτάνοντας στο σήμερα, οι εξελίξεις στη γενετική και τις μοριακές τεχνικές όπως το CRISPR, επέτρεψαν την ανάπτυξη νέων πειραματικών μοντέλων που βασίζονται στη χρήση διαγονιδιακών ζώων που παρουσιάζουν μεταλλάξεις σε γονίδια που σχετίζονται με το Parkinson. Αυτά τα παραδείγματα ανοίγουν την πόρτα στους ερευνητές για μελέτες του δυνητικού ρόλου της συσσώρευσης και εξάπλωσης γενετικών μεταλλάξεων, την αξιολόγηση πιθανών θεραπευτικών ουσιών, απεικονιστικών ανιχνευτών ή βιοδεικτών, με σκοπό τη διάγνωση, κλινική αξιολόγηση και θεραπεία της νόσου του Parkinson [15].

1.1.3 Επιδημιολογία της νόσου

Η νόσος του Parkinson εμφανίζεται σε όλο τον κόσμο, σε όλες τις εθνότητες, και επηρεάζει και τα δύο φύλα περίπου εξίσου ή με ελαφρά επικράτηση στους άνδρες. Οι εκτιμήσεις της παγκόσμιας επίπτωσης της νόσου κυμαίνονται από 5 έως >35 νέες περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα ετησίως, γεγονός που πιθανώς αντανακλά διαφορές στα δημογραφικά στοιχεία των πληθυσμών που μελετήθηκαν ή στις μεθόδους κάθε μελέτης. Επίσης, η εμφάνιση της νόσου είναι σπάνια πριν από την ηλικία των 50 ετών, αλλά αυξάνεται 5-10 φορές από την έκτη έως την ένατη δεκαετία της ζωής [16]. Ο παγκόσμιος επιπολασμός, που υπολογίζεται στο 0,3% συνολικά, αυξάνεται επίσης απότομα με την ηλικία σε >3% σε άτομα ηλικίας >80 ετών. Από την άλλη, η θνησιμότητα δεν αυξάνεται την πρώτη δεκαετία μετά την έναρξη της νόσου, αλλά αυξάνεται στη συνέχεια, διπλασιάζοντας την τελικά σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό. Ωστόσο, η βελτίωση της υγειονομικής περίθαλψης έχει οδηγήσει σε μεγαλύτερη επιβίωση, η οποία σχετίζεται με την αύξηση του επιπολασμού της νόσου Parkinson με την πάροδο των χρόνων, όπως αποδεικνύεται μέσα από μελέτες. Αυτές αναφέρουν ακόμη ότι ο αριθμός των ατόμων με νόσο του Parkinson αναμένεται να διπλασιαστεί μεταξύ του 2005 και 2030 [17].

Η νόσος του Parkinson είναι δύο φορές πιο συχνή στους άνδρες από ό,τι στις γυναίκες (M/F = 1,3-2) στους περισσότερους πληθυσμούς, αν και σε λίγους πληθυσμούς, συμπεριλαμβανομένης μιας μελέτης από την Ιαπωνία, δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ των φύλων [18]. Η προστατευτική επίδραση των γυναικείων ορμονών του φύλου, κάποιος γενετικός μηχανισμός που σχετίζεται με το φύλο ή οι φυλετικές διαφορές στην έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου μπορεί να εξηγήσουν αυτή την ανδρική υπεροχή, αν και οι διαφορές στην υγειονομική περίθαλψη θα μπορούσαν επίσης να συμβάλουν. Επιπρόσθετα, η συχνότητα εμφάνισης φαίνεται να ποικίλλει σε υποομάδες που ορίζονται ανά φυλή, εθνικότητα, γονότυπο ή

περιβάλλον. Η γεωγραφική κατανομή και η φυλή σχετίζονται συχνά και μπορεί να είναι δύσκολο να προσδιοριστεί η σχετική συμβολή καθενός στον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Για παράδειγμα, στις ΗΠΑ η συχνότητα εμφάνισης της νόσου, προσαρμοσμένη στην ηλικία και το φύλο, ήταν υψηλότερη μεταξύ των Ισπανόφωνων, ακολουθούμενη από τους μη Ισπανούς λευκούς, Ασιάτες και έγχρωμους [19]. Επίσης, ο επιπολασμός της νόσου, προσαρμοσμένος στην ηλικία, που αντανακλά τόσο τη συχνότητα εμφάνισης όσο και τη θνησιμότητα, φαίνεται να είναι χαμηλότερος στην Αφρική από ό,τι στην Ευρώπη και την Αμερική (Εικ. 2). Ο τρόπος ζωής, συμπεριλαμβανομένης της έκθεσης σε περιβαλλοντικές συνθήκες που συνδέονται με την εκβιομηχάνιση, όπως φυτοφάρμακα, οργανικούς διαλύτες ή μέταλλα, σε συνδυασμό με την αλληλεπίδραση τους με γενετικούς παράγοντες, θα μπορούσε να εξηγήσει τις διαφορές μεταξύ των πληθυσμών ανά τον πλανήτη. Έτσι, γίνεται αντιληπτό ότι απαιτούνται υψηλής ποιότητας μελέτες και λεπτομερή μητρώα για να ερευνηθούν οι χρονικές τάσεις στην παγκόσμια συχνότητα εμφάνισης της νόσου του Parkinson με μεγαλύτερη ακρίβεια και να κατανοηθούν οι παράγοντες που μπορεί να οδηγούν σε αυτή, καθώς αναμένεται προοδευτική αύξηση της προσωπικής, κοινωνικής και οικονομικής επιβάρυνσης που σχετίζεται με τη νόσο στο μέλλον, καθώς ο παγκόσμιος πληθυσμός γερνάει [20].



Εικόνα 2: Προτυποποιημένος βάσει ηλικίας χάρτης επιπολασμού της νόσου του Parkinson ανά 100.000 άτομα πληθυσμού ανά τοποθεσία και για τα δύο φύλα, το έτος 2016 [20].

1.1.4 Αιτιολογικοί παράγοντες εμφάνισης της νόσου

Τα τελευταία χρόνια η έρευνα για την κατανόηση των αιτιών εμφάνισης της νόσου του Parkinson έχει εξελιχθεί σε μεγάλο βαθμό, αλλά παρά την εντατική προσπάθεια που έχει διεξαχθεί σε αυτό το κομμάτι, δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως. Από τους πιο σημαντικούς παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου είναι η γήρανση [21]. Η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου αυξάνεται σημαντικά με την ηλικία και παρατηρείται απότομη αύξηση της καμπύλης επίπτωσης της μετά την πέμπτη δεκαετία της ζωής, με διάμεση ηλικία έναρξης της νόσου τα 60 έτη. Ωστόσο, παραμένει άγνωστο αν ευθύνεται η χρονολογική ηλικία ή η διαδικασία της γήρανσης, δηλαδή το αν η νόσος είναι απλώς «επιταχυνόμενη» γήρανση ή όχι. Πολλά στοιχεία από ανθρώπινες νευροανατομικές μελέτες υποδεικνύουν ότι ενώ η απώλεια ντοπαμινεργικών κυττάρων της μέλαινας ουσίας και η μείωση της ντοπαμίνης του ραβδωτού σώματος αποτελούν μέρος της φυσιολογικής γήρανσης, το μοτίβο της απώλειας κυττάρων είναι διαφορετικό από αυτό που εμφανίζεται στην νόσο του Parkinson [22]. Επομένως, είναι απίθανο η νόσος να προκύπτει απλώς από την επιταχυνόμενη γήρανση, αλλά από την αλληλεπίδραση μεταξύ της γήρανσης και άλλων παραγόντων. Έτσι, τα πραγματικά αίτια των περισσότερων περιπτώσεων της συγκεκριμένης ασθένειας είναι άγνωστα και ονομάζονται «σποραδικά». Αυτή η ομάδα αντιπροσωπεύει συνήθως περίπου το 90% των συνολικών περιπτώσεων, ενώ οι αμιγώς κληρονομικές «γενετικές» μορφές της νόσου ευθύνονται περίπου για το 10% του συνόλου των περιπτώσεων. Η τρέχουσα άποψη που έχουν πολλοί ερευνητές είναι ότι οι περισσότερες περιπτώσεις της νόσου του Parkinson πιθανότατα προκύπτουν από έναν συνδυασμό περιβαλλοντικών εκθέσεων και γενετικής ευαισθησίας [23].

Πολυάριθμες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη γενετική της νόσου του Parkinson, με τις τελευταίες δύο δεκαετίες να έχουν εντοπιστεί αρκετά γονίδια που προκαλούν μονογονικές οικογενείς μορφές της νόσου. Πιο πρόσφατα, σε μελέτες συσχέτισης σε ολόκληρο το γονιδίωμα (GWAS), οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) πολλών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένου του γονιδίου SNCA που κωδικοποιεί την ασ-συνουκλείνη, βρέθηκε ότι σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Η μελέτη αυτών των γονιδίων μπορεί να βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση των μοριακών διεργασιών που διέπουν την παθογένεση του Parkinson. Πράγματι, τα γονίδια που περιγράφονται στον Πίνακα 1 εμπλέκονται σε κοινές ενδοκυτταρικές λειτουργίες, όπως η συναπτική μετάδοση, η διακίνηση κυστιδίων, λυσοσωμικές και ενδοσωμικές οδούς, στη λειτουργία των μιτοχονδρίων, καθώς και στον ποιοτικό έλεγχο των πρωτεϊνών [24].

S.No.	Gene with Symbol	Locus/Loci	Chromosomal Location	Year of Discovery	Recessive or Dominant	Clinical Features in PD	Reported Variants associated with PD	Target in Cell	Possible Function(s)
1.	<i>α-synuclein (SNCA)</i>	PARK1 and PARK4	4q21	1997	Dominant	Hyposomnia, and sleep disorder	rs2583988, rs356219, and rs2736990	Presynaptic terminals	Regulating synapse, vesicle trafficking
2.	<i>Parkin (PRKN)</i>	PARK2	6q25.2-q27	1998	Recessive	Hyper-reflexia	S167N, E310D, D394N	Mitochondria	E3 Ubiquitin Protein Ligase
3.	<i>UCHL1</i>	PARK5	4p13	1998	Dominant	Multiple tumors	I93M and S18Y	Nerve cells	Synthesize an enzyme called ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1
4.	<i>DJ1</i>	PARK7	1p36	2003	Recessive	Dyskinesia, rigidity, and tremors,	C53A and DJ-1C106	Nerve cells	Transcriptional regulation, antioxidative stress reaction, and chaperone, protease, and mitochondrial regulation
5.	<i>PINK1</i>	PARK6	1p36-1p35	2004	Recessive	Dystonia	P37L, R42P, R256C, G328E, and R334C	Mitochondrial membrane	Mitochondrial kinase
6.	<i>POLG</i>	<i>POLG1</i>	15q26.1	2004	Dominant	Bradykinesia and rigidity, resting tremor and they respond well to levodopa treatment	p.A899T	Cortex	CAG-repeat, encoding a polyglutamine (poly-Q) tract
7.	<i>LRRK2</i>	PARK8	12q12	2004	Dominant	Less non-motor function, olfactory, and cognitive impairment	A419V, G2019S, R1441C/G/H, G2385R, and R1628P	Glial cells and Neurons	Protein kinase
8.	<i>HtrA2</i>	PARK13	2p12	2005	Dominant	Bradykinesia, tremor	Omi/HtrA2, Pro143Ala	Glia cells and Neurons	Mitochondrial serine kinase
9.	<i>ATP13A2</i>	PARK9	1p36	2006	Recessive	Kufor-Rakeb syndrome, pallido-pyramidal syndrome, dystonia	F182L and G504R	Lysosomes	Improves the lysosome membrane integrity and protects against iron-induced cell damage
10.	<i>FBOX7</i>	PARK15	22q12-q13	2008	Recessive	Rigidity, bradykinesia and postural instability	Arg498Stop	Cerebral cortex, Globus pallidum and the Substantia nigra	Ubiquitin ligase
11.	<i>GIGYF2</i>	PARK11	2q37.1	2008	Dominant	Less motor symptom	N56SN457Trs12328151, rs2289912, rs2305138, rs3816334, A572AH1171R	Endosomes	Progression in motor symptoms
12.	<i>GBA</i>	GBA1	1q21	2009	Dominant	Hallucinations and cognitive decline	E326K, T369M, N370S, D409H, and L444P	Endoplasmic reticulum	Regulation of the lysosomal system
13.	<i>PLA2G6 or iPLA2β</i>	PARK14	22q12-q13	2009	Recessive	Axonal dystrophy, dystonia, dementia, visual disturbances	p.R301C and p.D331N	Peripheral nerves	Phospholipase A2
14.	<i>Vps35</i>	PARK17	16q11.2	2011	Dominant	Tremors, bradykinesia, rigidity of limbs and gait defects	p. Asp620Asn	Lysosomal vesicles	Retromer component
15.	<i>EIF4G1</i>	PAERK18	3q27.1	2011	Dominant	Motor dysfunction	A502V, G686C, S1164R, and R1197W	Presynaptic nerves	Scaffold subunit of the translation initiation complex eIF4F, which binds the ribosomal
16.	<i>DNAJC6</i>	PARK19	1p31.3	2012	Recessive	Mental retardation, pyramidal signs and epilepsy	p.Q734X	Cerebellum, corpus callosum, cortex, brainstem, pons, putamen, spinal cord, and substantia nigra.	Cochaperone
17.	<i>SYNJ1</i>	PARK20	21q22.11	2013	Recessive	Dystonia, oculomotor apraxia, and seizures	Nil	Presynaptic terminal	Polyphosphoinositide phosphatase
18.	<i>DNAJC13</i>	PARK21	3q22.1	2014	Recessive	Motor dysfunction	p. N855S	Neurons	Endosomal transport
19.	<i>CHCHD2</i>	CHCHD2	7p11.2	2015	Recessive	Bradykinesia and rigidity, hypomimic face and mydriatic pupils	G66V and P80L	Cortical neurons	Mitochondrial protein
20.	<i>LRP10 (low-density lipoprotein receptor-related protein 10)</i>	LRP10	14p13-q12	2018	Dominant	Motor fluctuations and dyskinesia, no cognitive impairment	OR11H12, POTEK, and LRP10	Cerebral cortex	Regulates amyloid precursor protein (APP) trafficking and processing.

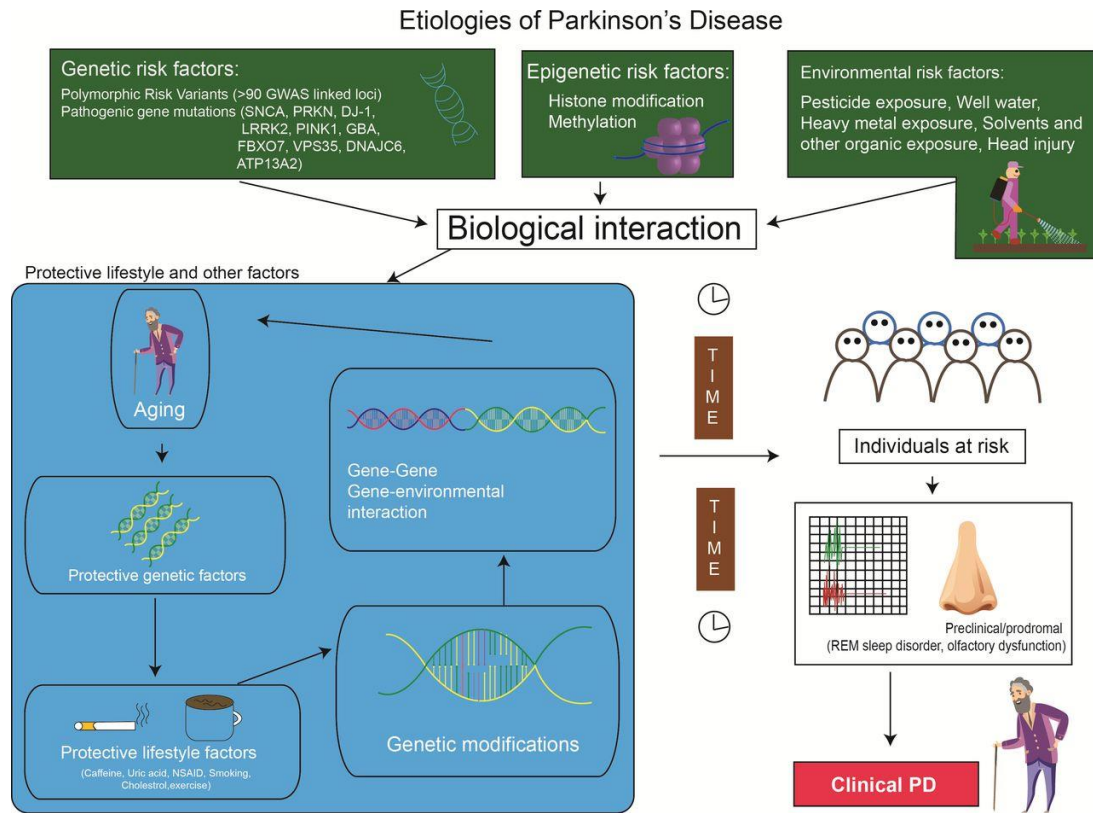
Πίνακας 1: Σύνοψη των γονιδίων που σχετίζονται με τη νόσο του Parkinson [25].

Από την άλλη πλευρά, ο όρος «περιβάλλον» περιλαμβάνει οποιονδήποτε μη ενδογενή παράγοντα, όπως παθογόνο λοίμωξη, τραύμα στο κεφάλι, τη διατροφή, φαρμακευτικές ουσίες, συμπληρώματα, χρήση ναρκωτικών, άλλους φυσιολογικούς στρεσογόνους παράγοντες και φυσικά χημικές τοξικές ουσίες που μολύνουν το νερό, τον αέρα και το χώμα. Η αναζήτηση για περιβαλλοντικούς παράγοντες που θα μπορούσαν να ξεκινήσουν ή να ενισχύσουν τη νευροεκφυλιστική διαδικασία στην νόσο του Parkinson εντάθηκε μετά την ανακάλυψη του παρκινσονισμού που προκαλείται από τη τοξίνη 1-μεθυλ-4-φαινυλ-1,2,3,6-τετραϋδροπυριδίνη (MPTP). Το MPTP διασχίζει ελεύθερα τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και μετατρέπεται στην εγγύς τοξίνη MPP⁺ (1-μεθυλ-4-φαινυλοπυριδίνιο), που προσλαμβάνεται από τον προσυναπτικό μεταφορέα ντοπαμίνης στα ντοπαμινεργικά νευρικά τερματικά. Το MPP⁺ που δεν απομονώνεται σε κυστίδια από τον φυσαλιδωτό μεταφορέα μονοαμίνης, προσλαμβάνεται από τα μιτοχόνδρια, όπου αναστέλλει το σύμπλοκο I, διαταράσσοντας την οξειδωτική φωσφορυλίωση, με αποτέλεσμα τη βιοενεργειακή αποτυχία και τον επακόλουθο κυτταρικό θάνατο [26]. Επίσης, η επαγγελματική έκθεση σε φυτοφάρμακα, όπως τα Paraquat και ροτενόνη, που επηρεάζουν το μιτροχονδριακό σύμπλοκο I και αυξάνουν το οξειδωτικό στρες, εντείνουν τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου σε πληθυσμούς που εκτίθενται σε αυτά. Ωστόσο, ένας επαρκής αριθμός περιβαλλοντικών παραγόντων φαίνεται πως προσφέρει μια προστατευτική ασπίδα έναντι της συγκεκριμένης νόσου, με την κατανάλωση καφέ, πράσινου και μαύρου τσάι, την αύξηση της σωματικής δραστηριότητας αλλά και το κάπνισμα, να αποτελούν μέρος αυτών [27].

Αν και αρκετές γενετικές μεταλλάξεις έχουν εντοπιστεί ότι σχετίζονται με υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου του Parkinson, οι περισσότεροι άνθρωποι δεν έχουν αυτές τις γενετικές παραλλαγές. Από την άλλη πλευρά, παρόλο που τα φυτοφάρμακα και τα τραύματα στο κεφάλι συνδέονται με την νόσο, οι περισσότεροι άνθρωποι δεν έχουν εμφανή έκθεση σε αυτούς τους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Έτσι, η νόσος του Parkinson προκαλείται από έναν συνδυασμό γονιδίων, περιβαλλοντικών επιρροών και συνηθειών στον τρόπο ζωής, με την αλληλεπίδραση και των τριών συστατικών να καθορίζει εάν κάποιος θα αναπτύξει τη νόσο [28].

Μαζί με τη γήρανση, τη γενετική και το περιβάλλον, ο ρόλος του βιολογικού φύλου ως σημαντικού παράγοντα στην ανάπτυξη της συγκεκριμένης νόσου έχει συζητηθεί ευρέως την τελευταία δεκαετία. Υπάρχουν σαφείς διαφορές που σχετίζονται με το φύλο στα επιδημιολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου: το Parkinson, όπως αναφέραμε και πιο πάνω, επηρεάζει τους άνδρες σχεδόν δύο φορές πιο συχνά από τις γυναίκες, αλλά οι γυναίκες έχουν υψηλότερο ποσοστό θνησιμότητας και ταχύτερη εξέλιξη της νόσου [29]. Επιπλέον, οι γυναίκες εμφανίζουν χαρακτηριστικά συμπτώματα καθώς και διαφορές στην ανταπόκριση στις φαρμακολογικές θεραπείες και στη διαδικασία διέγερσης του εγκεφάλου σε βάθος και στην προσωπική αξιολόγηση της ποιότητας ζωής σε σύγκριση με τους άνδρες. Ακόμη, η πιθανή ευεργετική δράση των γυναικείων γοναδικών ορμονών στο ντοπαμινεργικό σύστημα, ιδιαίτερα της κυκλοφορούσας οιστραδιόλης, η οποία μπορεί να δρα ως νευροπροστατευτικός παράγοντας, φαίνεται πως εντείνουν τη βάση για την προσθήκη του βιολογικού φύλου ως παράγοντα που συμβάλει στην ανάπτυξη της νόσου [30].

Συνεπώς, γίνεται φανερό πως ένας ικανοποιητικός αριθμός παραγόντων είναι υπαίτιος για την πιθανή πρόκληση της νόσου του Parkinson.



Εικόνα 3: Αιτιολογίες της νόσου του Parkinson: βιολογική αλληλεπίδραση μεταξύ γενετικών περιβαλλοντικών και άλλων παραγόντων [9].

1.1.5 Μηχανισμοί παθογένεσης

Ανεξάρτητα από τις υποκείμενες αιτιολογίες (περιβαλλοντικοί, γενετικοί ή άλλοι παράγοντες κινδύνου), αρκετά μοριακά γεγονότα και χαρακτηριστικά έχουν αναφερθεί με συνέπεια σε ανθρώπινους μεταθανάτιους ιστούς, *in vitro* ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, οργανοειδή ανθρώπινου εγκεφάλου και ζωικά μοντέλα. Αυτά περιλαμβάνουν τη λανθασμένη αναδίπλωση και συσσώρευση της πρωτεΐνης α-συνουκλεΐνη, τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, τη διαταραχή της διαδικασίας αποικοδόμησης των πρωτεϊνών (που περιλαμβάνει τα συστήματα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και αυτοφαγίας-λυσosώματος), το οξειδωτικό στρες και τη νευροφλεγμονή (Εικ. 4). Αυτά τα κύρια μοριακά και κυτταρικά χαρακτηριστικά συχνά συνδέονται με πολλά άλλα αλληλένδετα συμβάντα, όπως για παράδειγμα η διαταραχή της κυστιδιακής μεταφοράς, και ουσιαστικά, όλοι αυτοί οι μηχανισμοί δυνητικά προάγουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) ή τη νέκρωση. Επιπρόσθετα, υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις για τη σύνδεση εντέρου-εγκεφάλου ως συνεισφέροντος παράγοντα στην παθογένεση της νόσου, όπου τα πνευμονογαστρικά νεύρα ενεργούν ως «λεωφόρος» για τη μεταφορά της συσσωματωμένης α-

συνουκλείνης από τη γαστρεντερική οδό στο κατώτερο εγκεφαλικό στέλεχος. Καθώς οι κυτταρικές διεργασίες είναι δυναμικές και ο νευροεκφυλισμός εμφανίζεται σε μια παρατεταμένη περίοδο προσβολών/στρες και με διάφορους αντισταθμιστικούς μηχανισμούς να παίζουν ρόλο, είναι αδύνατο να προσδιοριστεί με βεβαιότητα εάν αυτές οι οδοί λειτουργούν ανεξάρτητα ή συγκλίνουν σε μια ενιαία οδό προς τον νευρωνικό θάνατο. Είναι πιο πιθανό οι διάφορες παθοφυσιολογικές διεργασίες να διασταυρώνονται μεταξύ τους, με αποτέλεσμα έναν ογκώδη καταρράκτη προσβολών και τελικά τη μη αναστρέψιμη κυτταρική βλάβη [31]. Παρακάτω αναφέρονται με περισσότερες λεπτομέρειες κάποια από τα μοριακά γεγονότα που δυνητικά μπορούν να συμβάλλουν στην ανάπτυξη της νόσου.

▪ Λανθασμένη αναδίπλωση και συσσωμάτωση της α-συνουκλείνης

Στη φυσική της κατάσταση, η α-συνουκλείνη είναι μια διαλυτή και ξεδιπλωμένη πρωτεΐνη χωρίς καθορισμένη τριτοταγή δομή. Λόγω μιας κεντρικής υδρόφοβης περιοχής στην πρωτεΐνη, η α-συνουκλείνη έχει υψηλή τάση να συσσωματώνεται και αρχικά σχηματίζει μια ενδιάμεση δακτυλοειδή δομή που ονομάζεται ολιγομερές ή πρωτοϊνίδιο και τελικά σχηματίζει αδιάλυτα πολυμερή ή ινίδια [32]. Αυτά τα αδιάλυτα ινίδια είναι το κύριο συστατικό των σωμάτων Lewy. Δεν είναι σαφές εάν το ινίδιο, το πρωτοϊνίδιο ή το διαλυτό είδος είναι το πιο τοξικό είδος στους νευρώνες. Διάφοροι παράγοντες προάγουν τη συσσωμάτωση της α-συνουκλείνης: οι μεταλλάξεις προάγουν το σχηματισμό του ολιγομερούς, αλλά όχι του ινιδικού είδους [33]. Οι μεταμεταφραστικές ομοιοπολικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης όπως η φωσφορυλίωση, η νίτρωση και η γλυκοζυλίωση μπορεί να συμβάλλουν στη συσσωμάτωση και η ίδια η ντοπαμίνη είναι σε θέση να σταθεροποιεί το πρωτοϊνίδιο της α-συνουκλείνης σχηματίζοντας ένα προϊόν προσθήκης ντοπαμίνης-α-συνουκλείνης [34]. Μελέτες σε τρωκτικά έδειξαν ότι το πιο νευροτοξικό είδος α-συνουκλείνης είναι η πρώιμη ολιγομερής μορφή, παρά τα ώριμα αδιάλυτα ινίδια. Η αυξημένη τοξικότητα αυτών των ολιγομερών, σε αντίθεση με την ινιδώδη α-συνουκλείνη, επικυρώθηκε σε προσδιορισμούς που βασίζονται σε κύτταρα [35]. Έτσι, τα ολιγομερή είδη της α-συνουκλείνης είναι ικανά να εξαπλωθούν και να επιταχύνουν τη μη φυσιολογική συσσώρευση πρωτεϊνών και αυτός μπορεί να είναι ένας μηχανισμός που βρίσκεται κάτω από την εξάπλωση της παθολογίας της α-συνουκλείνης στον εγκέφαλο.

▪ Δυσλειτουργικά συστήματα κάθαρσης πρωτεϊνών

Υπάρχουν δύο κεντρικά συστήματα κάθαρσης πρωτεϊνών εντός των κυττάρων που είναι υπεύθυνα για την απομάκρυνση των δυσλειτουργικών πρωτεϊνών: το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος (Ubiquitin – Proteasome System, UPS) και η οδός αυτοφαγίας-λυσωσώματος (Autophagy – Lysosomal Pathway, ALP). Το UPS είναι κυρίως υπεύθυνο για τη διάσπαση των μη φυσιολογικών πρωτεϊνών, και το κάνει με το να τις επισημάνει με ουβικιτίνη και να τις μεταφέρει στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση. Η οδός αυτοφαγίας-λυσωσώματος χωρίζεται σε τρεις κατηγορίες: τη

μακροαυτοφαγία, τη μικροαυτοφαγία και την αυτοφαγία με τη μεσολάβηση συνοδών πρωτεϊνών (Chaperone – Mediated Autophagy, CMA). Εν συντομία, στη μακροαυτοφαγία, τα ενδοκυτταρικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών του κυτταροπλάσματος, εγκολλώνονται από το αυτοφαγόσωμα, το οποίο στη συνέχεια συντήκεται με το λυσόσωμα, οδηγώντας στη διάσπαση του περιεχομένου του. Από την άλλη πλευρά, στη μικροαυτοφαγία, το λυσόσωμα από μόνο του εγκολλώνει και καταστρέφει τα κυτταροπλασματικά συστατικά. Το CMA είναι μια πιο επιλεκτική διαδικασία, όπου οι μοριακοί συνοδοί στοχεύουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες και τις μεταφέρουν στο λυσόσωμα για αποικοδόμηση [36]. Η μονομερής α-συνουκλεΐνη γενικά καθαρίζεται τόσο από το UPS όσο και από το ALP και η βλάβη σε οποιονδήποτε από τους μηχανισμούς τους εμπλέκεται στην παθογένεση της νόσου Parkinson συμβάλλοντας στη συσσώρευση ελαττωματικών πρωτεϊνών, ιδιαίτερα διαλυτών λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών α-συνουκλεΐνης [37].

Οι πρωτεασωμικές ανωμαλίες είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό μεταξύ πολλών πρωτεϊνοπαθειών, δηλαδή νευροεκφυλιστικών ασθενειών που χαρακτηρίζονται από μη φυσιολογική συσσώρευση πρωτεϊνών. Οι ενδείξεις τέτοιων ανωμαλιών στην νόσο του Parkinson παρασχέθηκαν για πρώτη φορά από μεταθανάτιες μελέτες στη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας (SNpc), όπου η καταλυτική δραστηριότητα του UPS βρέθηκε σημαντικά μειωμένη σε σύγκριση με υγιείς εγκεφάλους [38]. Τα ίδια ευρήματα αναφέρθηκαν αργότερα σε μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με νόσο του Parkinson αλλά όχι σε υγιή άτομα [39]. Εκτός από τη μειωμένη δραστηριότητα, μια χαμηλότερη έκφραση διαφορετικών πρωτεασωμικών συστατικών έχει επίσης εντοπιστεί στην SNpc του εγκεφάλου των παρκινσονικών ατόμων. Συγκεκριμένα, η α-υπομονάδα του πρωτεασώματος 20S και άλλα μόρια που εμπλέκονται στη φυσιολογική λειτουργία του UPS, όπως τα PA700 και PA28 (ενεργοποιητές πρωτεασώματος), μειώνονται [40]. Πρόσθετα στοιχεία παρέχονται από γενετικές μελέτες και την ανακάλυψη ότι δύο από τα γονίδια PARK που συνδέονται με τη μονογονιδιακή νόσο κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη λειτουργία του UPS, συγκεκριμένα, η Parkin (PARK2, που κωδικοποιεί για μια E3 λιγάση ουβικιτίνης) και η UCH-L1 (PARK5, που κωδικοποιεί για μια καρβοξυτελική υδρολάση ουβικιτίνης) [41,42]. Συνεπώς, η δυσλειτουργία της πρωτεϊνικής αποικοδόμησης μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο των νευρωνικών κυττάρων, παρέχοντας έτσι έναν πιθανό παθογόνο μηχανισμό για την εμφάνιση της νόσου.

Παρόμοια με τα ευρήματα στο σύστημα UPS, πολλά λυσοσωμικά και σχετιζόμενα με την αυτοφαγία συστατικά, επίσης δυσλειτουργούν ή εκφράζονται διαφορετικά στην νόσο του Parkinson. Στους νευρώνες της μέλαινας ουσίας του εγκεφάλου ατόμων με Parkinson, τα επίπεδα του δείκτη αυτοφαγώματος LC3-II ήταν αυξημένα, υποδηλώνοντας συσσώρευση αυτοφαγικών κενοδοπιών [43]. Αντίθετα, οι ζωτικές πρωτεΐνες των λυσοσωμικών μεμβρανών (LAMP1 και LAMP2A) και αρκετοί μοριακοί συνοδοί από την οικογένεια πρωτεϊνών θερμικού σοκ (όπως οι HSP70 και HSP35) βρέθηκαν να μειώνονται κατά τη μεταθανάτια εξέταση [44]. Επιπλέον, ιδιαίτερη είναι η ανακάλυψη μιας σημειακής μετάλλαξης στο γονίδιο της λυσοσωμικής πρωτεΐνης ATP13A2 (PARK9), που οδηγεί σε ένα αυτοσωματικό υπολειπόμενο άτυπο

σύνδρομο Parkinson, που αναφέρεται ως σύνδρομο Kufor-Rakeb [45]. Σημειακές μεταλλάξεις σε δύο ακόμη γονίδια PARK βλάπτουν τη λειτουργία είτε της Parkin (PARK2) είτε της PINK1 (PARK6, κωδικοποιεί για μια μιτοχονδριακή κινάση σερίνης/θρεονίνης), τα οποία εμπλέκονται στον αυτοφαγικό κύκλο των μιτοχονδρίων [46]. Επιπλέον, η εμφάνιση μεταλλάξεων στο GBA1 (κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη της λυσοσωμικής μεμβράνης που διασπά τη βήτα-γλυκοσιδική σύνδεση του γλυκοσυλκεραμιδίου, ενός ενδιάμεσου στο μεταβολισμό των γλυκολιπιδίων), που οδηγούν σε δυσλειτουργία του συστήματος λυσοσώματος-αυτοφαγίας, ως ισχυρός γενετικός παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου προσθέτει βάρος στην ιδέα ότι αυτό το σύστημα είναι σημαντικό για την ανάπτυξη της [47]. Έτσι, αυτές οι μελέτες υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η δυσλειτουργία στην οδό αυτοφαγίας-λυσοσώματος μπορεί να συμβάλλει στην παθογένεση της νόσου του Parkinson.

▪ Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία

Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία είναι κεντρική στην αιτιολογία της απορύθμισης και του θανάτου των νευρώνων ντοπαμίνης στην νόσο του Parkinson. Εκτός από την παραγωγή ενέργειας μέσω αερόβιας οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, τα μιτοχόνδρια ρυθμίζουν επίσης τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ασβεστίου, συμμετέχουν στον μεταβολισμό των λιπιδίων, καθώς και στη διάσπαση στεροειδών, υδατανθράκων και αμινοξέων. Τα μιτοχόνδρια είναι υπεύθυνα για τη σηματοδότηση των αποπτωτικών οδών και είναι οι φύλακες των αποπτωτικών μηχανισμών για την ολοκλήρωση ενός οργανωμένου κυτταρικού θανάτου. Η διαδικασία της μιτοχονδριακής αναπνοής μέσα στους νευρώνες απαιτεί αερόβια οξειδωτική φωσφορυλίωση, μια διαδικασία που παράγει φυσικά μεγάλη ποσότητα οξειδωτικών υποπροϊόντων, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και υπεροξειδίο ($O_2^{\cdot-}$) [48]. Σε έναν υγιή νευρώνα, τα μιτοχόνδρια θα αποτοξινώσουν αυτά τα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) χρησιμοποιώντας κανονικούς αντισταθμιστικούς μηχανισμούς όπως οι αντιοξειδωτικές και οι δραστικές πρωτεΐνες δέσμευσης οξυγόνου (π.χ. υπεροξειδάση γλουταθειόνης) [49]. Ωστόσο, ακόμη και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, οι νευρώνες ντοπαμίνης της μελαινοραβδωτής οδού υπάρχουν σε πιο οξειδωμένη κατάσταση από άλλους νευρώνες. Κάτω από παθολογικές συνθήκες, αυτοί οι αντισταθμιστικοί μηχανισμοί μπορεί να κατακλυστούν στον νευρώνα της ντοπαμίνης και η παραγωγή ROS από τα μιτοχόνδρια γίνεται πηγή οξειδωτικού στρες για το κύτταρο [50]. Εκτός από το οξειδωτικό στρες, η μιτοχονδριακή δυναμική είναι επίσης ένας σημαντικός παράγοντας στην παθολογία των νευρώνων ντοπαμίνης. Η μιτοχονδριακή σύντηξη και σχάση, οι διεργασίες με τις οποίες οι εξωτερικές μεμβράνες δύο μιτοχονδρίων ενώνονται για να σχηματίσουν μια μεμβράνη (σύντηξη) ή με τις οποίες μια μόνο μιτοχονδριακή μεμβράνη γίνεται δύο (σχάση), είναι επίσης πιθανές πηγές δυσλειτουργίας στον νευρώνα [51]. Οι μεταλλάξεις στα γονίδια που ρυθμίζουν τη μιτοχονδριακή δυναμική είναι μια γνωστή αιτία κληρονομικών μορφών Parkinson (π.χ. μεταλλάξεις στα γονίδια PINK1, Parkin, SNCA) [52]. Δεν αποτελεί έκπληξη λοιπόν ότι τα γονίδια που ελέγχουν τη

μιτοχονδριακή δυναμική είναι κεντρικά για την επιβίωση των νευρώνων ντοπαμίνης, δεδομένου ότι η συναπτική συντήρηση, η μιτοχονδριακή βιογένεση και η νευροδιαβίβαση ρυθμίζονται όλα από αυτή τη διαδικασία.

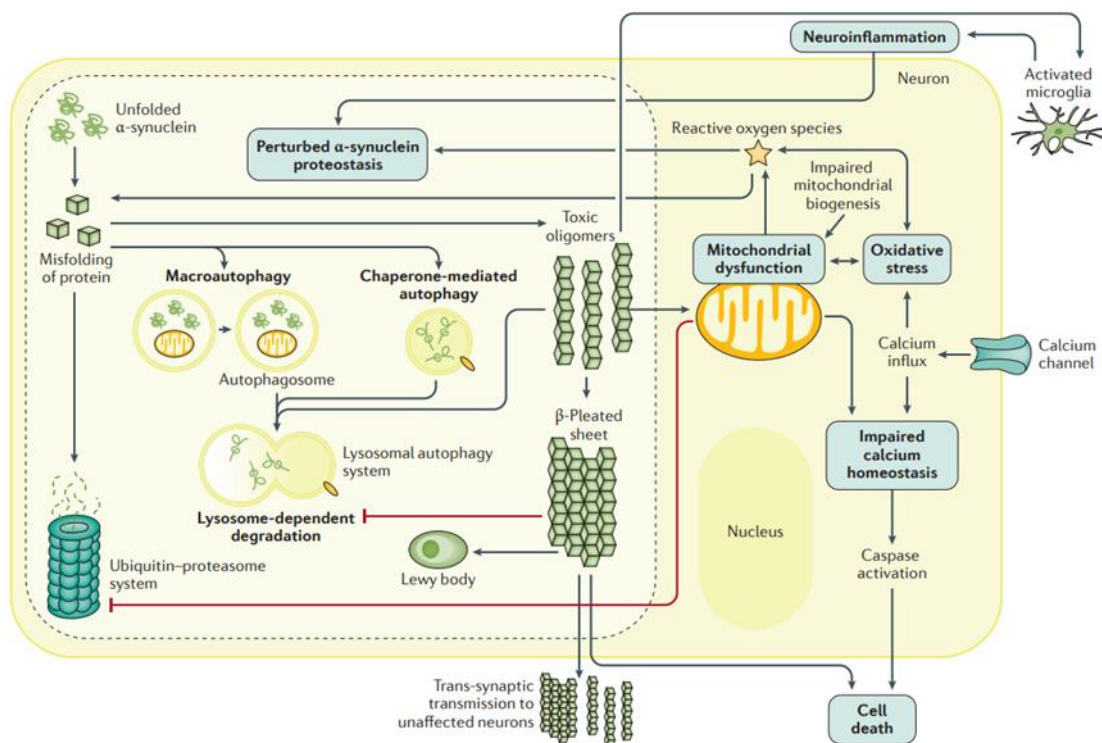
▪ Οξειδωτικό στρες

Οι παθολογικές αυξήσεις στα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) μπορεί να προκύψουν από ανώμαλη ενισχυμένη παραγωγή ή μειωμένη αποτοξίνωση ή από κάποιο συνδυασμό αυτών. Αν και το H_2O_2 έχει χαμηλή σχετικά τοξικότητα, είναι δυνατός ο σχηματισμός δραστικών ριζών από αυτό. Μέσα στον εγκέφαλο, το μονοξείδιο του αζώτου (NO) είναι άφθονο και όταν συνδυάζεται με H_2O_2 , οδηγεί στην παραγωγή υπεροξυνιτρώδους άλατος ($ONOO^-$) και τη ρίζα υδροξυλίου (OH^\cdot). Η εξαιρετικά τοξική ρίζα υδροξυλίου είναι ικανή να δεσμεύεται με κυτταρικά μακρομόρια προκαλώντας εκτεταμένη πρωτεϊνική δυσλειτουργία, οξείδωση λιπιδίων και δημιουργία θραυσμάτων στο DNA. Το υπεροξυνιτρώδες άλας επιτίθεται στα υπολείμματα τυροσίνης και προκαλεί δυσλειτουργία των πρωτεϊνών, η οποία παρατηρείται εύκολα και σε ζωικά μοντέλα της νόσου καθώς και σε πάσχοντες [53]. Η λειτουργία της υδροξυλάσης τυροσίνης εντός των νευρώνων ντοπαμίνης μπορεί να διακυβευτεί από τα υπεροξυνιτρώδη, μια διαδικασία που μπορεί να συμβάλει στη δυσλειτουργία της παραγωγής ντοπαμίνης ακόμη και σε διατηρημένους νευρώνες στη μέλαινα ουσία [54].

Είναι σαφές ότι το οξειδωτικό στρες παίζει βασικό ρόλο στην παθογένεση του Parkinson, μιας και ο μεταθανάτιος ιστός από τη μέλαινα ουσία παρκινσονικών ατόμων περιείχε στοιχεία υπεροξειδωσης λιπιδίων, μειωμένα επίπεδα γλουταθειόνης και αυξημένη περιεκτικότητα σε σίδηρο [55]. Ο σίδηρος και άλλα ευαίσθητα σε οξειδοαναγωγή μέταλλα μετάπτωσης (χαλκός, μαγγάνιο) που υπάρχουν μέσα στο κύτταρο συμβάλλουν στην οξειδωτική βλάβη μέσω της αντίδρασης Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^\cdot + OH^-$) με αποτέλεσμα την παραγωγή της ρίζας υδροξυλίου. Αρκετές σειρές αποδεικτικών στοιχείων υποστηρίζουν τη θεωρία ότι ο μεταβολισμός του σιδήρου διαταράσσεται σε αυτή τη νόσο, οδηγώντας τόσο σε αυξημένη συσσώρευση ριζών σιδήρου όσο και οξυγόνου στη μέλαινα ουσία. Παρατηρείται επίσης ότι οι εναποθέσεις σιδήρου αλληλεπιδρούν με την α-συνουκλείνη, συμβάλλοντας στο σχηματισμό σωμάτων Lewy. Οι πρωτεΐνες που αποθηκεύουν σίδηρο σε μη αντιδραστική κατάσταση (φερριτίνη, υποδοχέας τρανσφερίνης) αποτελούν σημαντικό συστατικό της ρύθμισης του σιδήρου στον εγκέφαλο και η διαταραχή αυτών των πρωτεϊνών μπορεί να συμβάλει σε νευροεκφυλιστικές διεργασίες [56].

Η σχετική έλλειψη αντιοξειδωτικών στο ΚΝΣ είναι επίσης πιθανό να παίζει ρόλο στην οξειδωτική βλάβη που παρατηρείται στο Parkinson. Το κύριο αποτοξινωτικό πεπτιδικό αντιοξειδωτικό του ΚΝΣ, η γλουταθειόνη (GSH), μπορεί να δράσει για την απομάκρυνση των ROS είτε μέσω μη ενζυματικής αναγωγής είτε μέσω κατάλυσης με υπεροξειδάση γλουταθειόνης, οδηγώντας σε οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG). Η

εξάντληση της GSH στους εγκεφάλους ασθενών με Parkinson είναι μια από τις πρώτες βιοχημικές αλλαγές που συμβαίνουν, γεγονός που υποδηλώνει ότι μπορεί να συμβάλει στην εξέλιξη της νόσου. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε μειωμένη σύνθεση GSH, λόγω των μειωμένων επιπέδων της πρόδρομης της ουσίας, της κυστεΐνης, τα κυκλοφορούντα επίπεδα της οποίας έχει αναφερθεί ότι μειώνονται με την ηλικία. Επειδή τα ROS που παράγονται από το μιτοχονδριακό σύμπλεγμα I αποτοξινώνονται κυρίως στους νευρώνες από την GSH, η νευρωνική βλάβη είναι ευρέως διαδεδομένη μετά την εξάντληση της. Επιπλέον, μεταλλάξεις στο γονίδιο DJ1 (γνωστό και ως PARK7), που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη αισθητήρα η οποία ενεργοποιείται όταν τα επίπεδα της GSH μειώνονται, και που προκαλεί πρόωμης έναρξης αυτοσωμική υπολειπόμενη νόσο του Parkinson, σχετίζεται με αυξημένο κυτταρικό οξειδωτικό στρες [57]. Ακόμη, σημαντικό ρόλο στην εξάπλωση της οξειδωτικής βλάβης φέρεται να παίζει ο μεταβολισμός της ντοπαμίνης, του βασικού νευροδιαβιβαστή σε αυτή τη νόσο, μιας και έχει επίσης την ικανότητα να παράγει αντιδραστικά ενδιάμεσα, τα οποία μπορεί να προκαλέσουν παράπλευρη οξειδωτική βλάβη εντός του κυττάρου. Η κυτταρική τοξικότητα που προκύπτει από το μεταβολισμό της ντοπαμίνης έχει αποδειχθεί ότι συμβαίνει μέσω δύο κύριων οδών. την παραγωγή αντιδραστικών ενδιάμεσων από τον ενζυματικό μεταβολισμό της κατεχολαμίνης και την αυτοοξειδωση του μορίου σε μια εξαιρετικά ηλεκτροφιλική ντοπαμινοκινόνη [58]. Τέλος, η μη φυσιολογική και υπέρμετρη οξειδωτική βλάβη οδηγεί στην ενεργοποίηση των κυτταρικών φλεγμονωδών οδών μέσω των οποίων συντελείται η παθολογική νευροφλεγμονή που ενισχύει την τοξικότητα των νευρώνων της ντοπαμίνης, κάτι το οποίο θα συζητηθεί στη συνέχεια αυτής της εργασίας.



Εικόνα 4: Μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στη νόσο του Parkinson [59].

1.1.6 Παθοφυσιολογία

Η νόσος του Parkinson είναι κυρίως μια διαταραχή των βασικών γαγγλίων, τα οποία είναι μια ομάδα πυρήνων που βρίσκονται στη βάση του πρόσθιου εγκεφάλου. Μακροσκοπικά ο εγκέφαλος, στην ιδιοπαθή νόσο του Parkinson, χαρακτηρίζεται από ήπια ατροφία του μετωπιαίου φλοιού και σε ορισμένες περιπτώσεις κοιλιακή διαστολή. Η κύρια διακριτική μορφολογική αλλαγή στον εγκέφαλο παρατηρείται σε μεταθανάτιες εγκάρσιες τομές του εγκεφαλικού στελέχους, όπου σχεδόν όλες οι περιπτώσεις παρουσιάζουν απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας (SNpc) και των κύριων προεξοχών του άξονα στο ραβδωτό σώμα. Ο εκφυλισμός της μέλαινας ουσίας θεωρείται η κύρια βλάβη της νόσου, καθώς αποτελείται κυρίως από νευρώνες ντοπαμίνης που περιέχουν τη χρωστική νευρομελανίνη, ένα προϊόν του μεταβολισμού των κατεχολαμινών, ο οποίος είναι εμφανώς μειωμένος σε ένταση στον εγκέφαλο των ατόμων με Parkinson. Η απώλεια νευρώνων ντοπαμίνης δεν συμβαίνει ομοιόμορφα σε όλη τη μέλαινα ουσία και το μοτίβο του θανάτου των νευρώνων διαφέρει μεταξύ των ατόμων με τη νόσο σε σχέση με την τυπική απώλεια νευρώνων ντοπαμίνης που σχετίζεται μόνο με τη γήρανση, η οποία εμφανίζεται κυρίως στη ραχιαία βαθμίδα της μέλαινας ουσίας [60]. Αποτέλεσμα αυτής της ιδιαίτερης κυτταρικής απώλειας είναι η απονεύρωση της μέλαινας ουσίας, που οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα ντοπαμίνης στο ραβδωτό σώμα. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η εκφυλιστική διαδικασία ξεκινά ανάδρομα, από τους τερματικούς άξονες που προεξέχουν στο ραβδωτό σώμα προς το κυτταρικό σώμα του νευρώνα της μέλαινας ουσίας [61]. Έτσι, η μείωση της ντοπαμινεργικής σηματοδότησης θεωρείται υπεύθυνη για την εμφάνιση των βασικών κινητικών συμπτωμάτων στην νόσο του Parkinson.

Εκτός από τη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας (SNpc) του εγκεφάλου, εκτεταμένη απώλεια κυττάρων μπορεί να βρεθεί σε αρκετούς υποφλοιώδεις πυρήνες, συμπεριλαμβανομένου του υπομέλα τύπου, του βασικού πυρήνα του Meynert, του ραχιαίου κινητικού πυρήνα του πνευμονογαστρικού νεύρου, των πυρήνων ραφής, καθώς και του υποθάλαμου και του οσφρητικού βολβού [62]. Επηρεάζονται πολλαπλά μη ντοπαμινεργικά συστήματα νευροδιαβιβαστών, όπως τα χολινεργικά, αδενοσινεργικά, γλουταμινεργικά, GABAεργικά, νοραδρενεργικά, σεροτονινεργικά και ισταμινεργικά. Ο εκφυλισμός σε αυτά τα συστήματα πιστεύεται ότι ευθύνεται για ορισμένα από τα μη κινητικά συμπτώματα της νόσου που δεν ανταποκρίνονται καλά στις θεραπείες υποκατάστασης ντοπαμίνης [63]. Ωστόσο, οι ακριβείς παθολογικοί μηχανισμοί που κρύβονται πίσω από τα μη κινητικά συμπτώματα στην νόσο του Parkinson είναι ακόμη σχετικά ασαφή.

Μικροσκοπικά, το παθολογικό χαρακτηριστικό της νόσου Parkinson είναι η παρουσία μη φυσιολογικών κυτταροπλασματικών εναποθέσεων (εγκλείστων) εντός των σωμάτων των νευρικών κυττάρων που είναι ανοσοαντιδραστικά για την πρωτεΐνη α-συνουκλεΐνη (α-syn). Αυτά τα παθολογικά πρωτεϊνικά συσσωματώματα ονομάζονται σώματα Lewy (LBs) και συχνά συνοδεύονται από δυστροφικούς νευρίτες (νευρίτες Lewy, NLs), οι οποίοι είναι ως επί το πλείστον αξονικοί [64]. Τα σώματα και οι

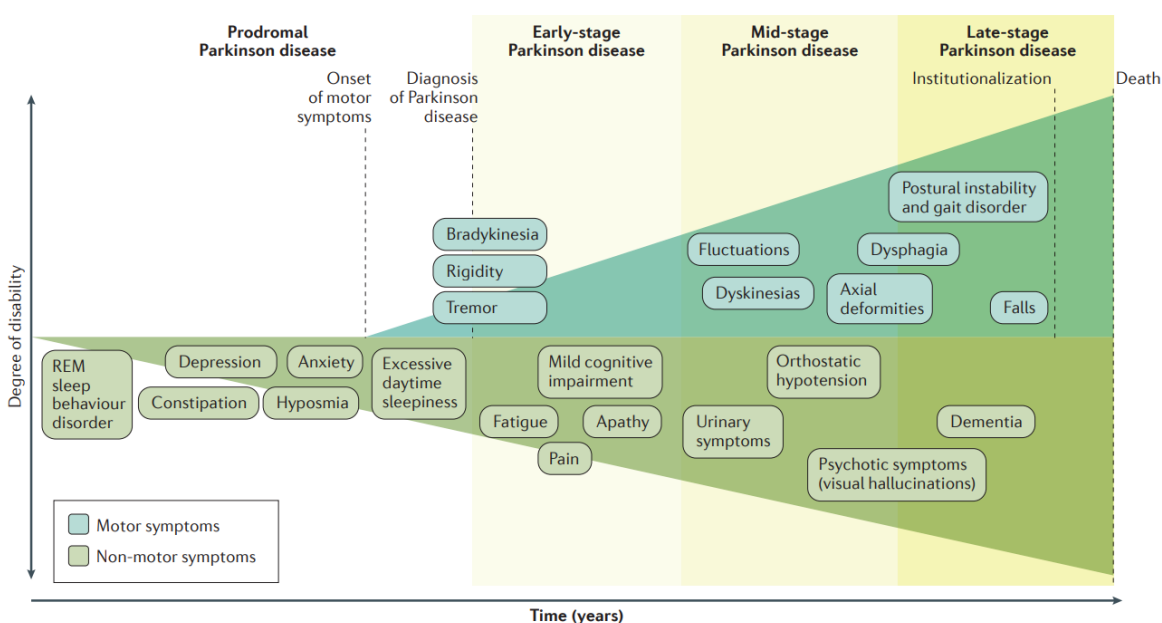
νευρίτες Lewy αποτελούνται κυρίως από συσσωματωμένη πρωτεΐνη α-συνουκλεΐνη με ποικίλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, συμπεριλαμβανομένης της φωσφορυλίωσης, της ουβικουϊτίνωσης, της νίτρωσης και της οξειδωσης πολλών καταλοίπων [65]. Στην νόσο του Parkinson και σε άλλες συνουκλεινοπάθειες, αποκτά νηματοειδές δομή που μοιάζει με αμυλοειδές και γίνεται αφύσικα φωσφορυλιωμένη και συσσωματωμένη προάγοντας τη νευροτοξικότητα. Ο ρόλος της α-συνουκλεΐνης στον υγιή εγκέφαλο παραμένει κάπως ασαφής, αν και υπάρχουν ενδείξεις ότι συμμετέχει στη λειτουργία των συναπτικών κυστιδίων [66]. Σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί για την α-συνουκλεΐνη (SNCA), αλλαγές στον αριθμό του αγρίου τύπου γονιδίου που την κωδικοποιεί ή και πολυμορφισμοί που αυξάνουν την έκφραση της αγρίου τύπου πρωτεΐνης, φαίνεται ότι ευθύνονται για την εμφάνιση της συγκεκριμένης νόσου [67]. Επιπλέον, τα παθολογικά σωματία Lewy δεν περιορίζονται μόνο στον εγκέφαλο αλλά μπορεί επίσης να βρεθούν στον ωτιαίο μυελό και στο περιφερικό νευρικό σύστημα [68]. Επομένως, τα διάφορα παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά της νόσου, που δημιουργούνται εξαιτίας των διαφορετικών αιτιολογικών παραγόντων και προκύπτουν μέσω των παθογενετικών μηχανισμών, οδηγούν στα ιδιαίτερα και πολυάριθμα συμπτώματα της νόσου.

1.1.7 Συμπτώματα και θεραπεία της νόσου

Τα κλασικά κινητικά συμπτώματα της νόσου του Parkinson έχουν αναγνωριστεί ως εξέχοντα συστατικά της νόσου από την αρχική περιγραφή του James Parkinson τον 19ο αιώνα, που αργότερα διορθώθηκαν από τον Jean-Martin Charcot. Αυτά τα παρκινσονικά συμπτώματα περιλαμβάνουν βραδυκινησία, μυϊκή ακαμψία, τρόμο ηρεμίας και δυσλειτουργία της στάσης και βάδισης του ατόμου. Τα κινητικά χαρακτηριστικά σε ασθενείς με νόσο του Parkinson είναι ετερογενή, γεγονός που έχει οδηγήσει σε προσπάθειες ταξινόμησης υποτύπων της νόσου [69]. Ωστόσο, δεν έχει επέλθει ακόμη συναίνεση σχετικά με την ταξινόμηση των υποτύπων της νόσου, αλλά οι εμπειρικές κλινικές παρατηρήσεις προτείνουν δύο κύριους υποτύπους: τη νόσο του Parkinson που κυριαρχείται από τρόμο (με σχετική απουσία άλλων κινητικών συμπτωμάτων) και τη νόσο του Parkinson που δεν κυριαρχείται από τρόμο (η οποία περιλαμβάνει φαινότυπους που περιγράφονται ως ακινητο-άκαμπτο σύνδρομο με διαταραχή βάδισης και αστάθεια στάσης). Μια επιπλέον υποομάδα ασθενών με νόσο του Parkinson έχει μεικτό ή απροσδιόριστο φαινότυπο με αρκετά κινητικά συμπτώματα συγκρίσιμης σοβαρότητας. Η πορεία και η πρόγνωση της νόσου διαφέρει μεταξύ των υποτύπων, όπως επίσης αναφέρεται ότι αυτοί οφείλονται σε διαφορετικές αιτιολογίες και παθογένειες. Επίσης, η νόσος που κυριαρχείται από τρόμο συνδέεται συχνά με βραδύτερο ρυθμό εξέλιξης και λιγότερη λειτουργική αναπηρία από τη μη επικρατούσα νόσο [70]. Εκτός από τις προαναφερθείσες βλάβες της πρωτογενούς κινητικής λειτουργίας, τα δευτερογενή κινητικά συμπτώματα όπως διαταραχές βάδισης, δυσκολίες στην ομιλία, δυσφαγία, δυστονία και διαταραχές ακριβούς κρατήματος επιδεινώνουν την ποιότητα ζωής των προσβεβλημένων ατόμων. Επιπλέον, όσο αφορά την έναρξη των κινητικών συμπτωμάτων, αυτή είναι συνήθως μονόπλευρη

και η ασυμμετρία τους επιμένει σε όλη τη διάρκεια της νόσου. Η μέση ηλικία έναρξης είναι στα τέλη της δεκαετίας των πενήντα χρόνων, με ένα ευρύ φάσμα ηλικίας από <40 έως >80 ετών. Η νεανική νόσος του Parkinson ορίζεται συνήθως από την ηλικία έναρξης <45 ετών και περισσότερο από το 10% αυτών των ατόμων έχουν γενετική βάση και το ποσοστό των γενετικά καθορισμένων περιπτώσεων αυξάνεται σε >40% εκείνων με έναρξη της νόσου πριν από την ηλικία των 30 ετών [71].

Από την άλλη πλευρά, τα μη κινητικά χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν νευροψυχιατρικά συμπτώματα (κατάθλιψη, γνωστικές δυσλειτουργίες και άνοια), διαταραχές ύπνου (αϋπνία, διαταραχές ταχείας κίνησης των ματιών, ζωντανά όνειρα) και συμπτώματα αυτόνομης λειτουργίας (διαταραχές κύστης, ορθοστατική υπόταση, στυτική ανικανότητα) (Εικ. 5). Αυτά τα συμπτώματα είναι συχνά παρόντα πριν από την έναρξη των κλασικών κινητικών συμπτωμάτων, με αυτή την περίοδο να ανφέρεται ως προκινητική ή προδρομική φάση της νόσου και η οποία μπορεί να παραταθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα [72]. Η παθολόγος διαδικασία που προκαλεί τη νόσο του Parkinson θεωρείται ότι βρίσκεται σε εξέλιξη κατά τη διάρκεια της προκινητικής φάσης, και περιλαμβάνει περιοχές του περιφερικού και κεντρικού νευρικού συστήματος εκτός από τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες της συμπαγής μοίρας της μέλαινας ουσίας (SNpc). Έτσι, αυτή η σιωπηλή περίοδος παθογένεσης είναι εξαιρετικά προβληματική καθώς περιορίζει το παράθυρο για νευροπροστατευτική θεραπευτική παρέμβαση στην περίοδο μετά την κλινική διάγνωση [73].



Εικόνα 5: Κλινικά συμπτώματα που σχετίζονται με την εξέλιξη της νόσου Parkinson [59].

Δεν υπάρχει οριστικό τεστ εκτός των κλινικών διαγνωστικών κριτηρίων και της ανταπόκρισης του ασθενούς στη λεβοντόπα (L-DOPA), η οποία είναι η πρόδρομος της ντοπαμίνης και η πιο αποτελεσματική συμπτωματική θεραπεία για τη νόσο [74]. Δυστυχώς, η θεραπεία με L-DOPA και αγωνιστές του υποδοχέα της ντοπαμίνης έχει

περιορισμούς. Αφενός, τα μιμητικά ντοπαμίνης είναι χρήσιμα για την καταπολέμηση πολλών από τα συμπτώματα της νόσου, όπως η βραδυκίνηση, η ακαμψία και ο τρόμος, ενώ από την άλλη συμβάλλουν σε μια σειρά από ιατρογενή συμπτώματα, όπως δυσκινήσεις, φθορά των επιδράσεων και παραισθήσεις [75]. Επιπλέον, η θεραπεία με αγωνιστές ντοπαμίνης μπορεί να επιδεινώσει διαταραχές ελέγχου των παρορμήσεων, όπως ο υπερβολικός τζόγος και η συμπεριφορά αναζήτησης ανταμοιβής [76]. Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι η ίδια η θεραπεία υποκατάστασης ντοπαμίνης συμβάλλει στην κυτταρική τοξικότητα, ενισχύοντας πιθανώς την προοδευτική απώλεια νευρώνων που σχετίζεται με την νόσο του Parkinson. Αρκετές θεραπείες με τη χρήση μικρών μορίων που στοχεύουν στην αναστολή της εξέλιξης της ασθένειας έχουν εισέλθει στο προσκύνιο για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων, πολλές από τις οποίες είναι αντιφλεγμονώδεις θεραπείες που στοχεύουν στον περιορισμό του οξειδωτικού στρες [77]. Είναι κρίσιμο να σημειωθεί, ωστόσο, ότι καμία ένωση δεν έχει αποδειχθεί επιτυχής σε κλινικές δοκιμές Φάσης III για το σκοπό αυτό, και η αναζήτηση νέων θεραπευτικών στρατηγικών συνεχίζεται.

1.2 Μεταγραφικός παράγοντας NF-κB

1.2.1 Γενικά στοιχεία

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB (Nuclear Factor-kappa B ή NF-κB) ανακαλύφθηκε από τους David Baltimore και Ranjan Sen το 1986, ως ένας πυρηνικός παράγοντας με ειδικότητα δέσμευσης στο DNA εντός ενός ιντρονικού ενισχυτή του γονιδίου της ελαφριάς αλυσίδας κάπα των αντισωμάτων στα ενεργοποιημένα B λεμφοκύτταρα. Λόγω της επαγωγικής του επίδρασης στην ωρίμανση των B λεμφοκυττάρων, παλαιότερα θεωρούνταν ότι έπαιζε σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση και την ανάπτυξη τους. Χρόνια έντονης έρευνας που ακολούθησαν έδειξαν ότι ο NF-κB εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και ιστούς, και συγκεκριμένες θέσεις δέσμευσης του υπάρχουν στους υποκινητές και ενισχυτές μεγάλου αριθμού γονιδίων. Η ενεργοποίηση του NF-κB ρυθμίζει την έκφραση περίπου 500 γονιδίων, η πλειονότητα των οποίων ελέγχει κρίσιμες λειτουργίες των κυττάρων όπως τον πολλαπλασιασμό, την ανάπτυξη και την επιβίωση τους αλλά και τον κυτταρικό θάνατο [78]. Επίσης, γρήγορα εκτιμήθηκε ότι ο NF-κB ήταν ένας επαγωγίμος μεταγραφικός παράγοντας με βασικούς ρόλους τόσο στη ρύθμιση της ανάπτυξης και της ομοιόστασης του ανοσοποιητικού συστήματος όσο και στον συντονισμό της φλεγμονώδους απόκρισης.

Ο ρόλος του NF-κB ως κύριου ρυθμιστή της φλεγμονώδους απόκρισης πηγάζει από τον κρίσιμο ρόλο του στον έλεγχο της έκφρασης μεγάλου αριθμού γονιδίων που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό, ιδιαίτερα εκείνων που κωδικοποιούν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, χημειοκίνες, καθώς και άλλα γονίδια σημαντικά για την ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος. Ο NF-κB ενεργοποιείται από ένα ευρύ

φάσμα ερεθισμάτων, συμπεριλαμβανομένων μικροβιακών συστατικών γνωστών ως μοριακών μοτίβων που σχετίζονται με παθογόνα (PAMPs) και μοριακών μοτίβων που σχετίζονται με ενδογενή βλάβη (DAMPs), που αναγνωρίζονται από υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων, όπως οι υποδοχείς τύπου Toll (TLRs) [79,80]. Επιπλέον, ο NF-κB βρίσκεται καθοδικά υποδοχέων αντιγόνων, υποδοχέων αυξητικών παραγόντων και υποδοχέων κυτοκινών, συμπεριλαμβανομένου της υπεροικογένειας των υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF). Ο NF-κB μπορεί, επίσης, να ενεργοποιηθεί από ποικίλες περιβαλλοντικές επιδράσεις, μερικοί εκ των οποίων αποτελούν η υπεριώδης ακτινοβολία, οξειδωτικές καταπονήσεις από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) λόγω εισπνοής καπνού τσιγάρου, καθώς και καρκινογόνες, μολυσματικές ουσίες και διάφορα μιτογόνα [81].

Γίνεται αντιληπτό ότι λόγω της ικανότητάς του να επηρεάζει την έκφραση πολλών γονιδίων, η δραστηριότητα του NF-κB ρυθμίζεται στενά σε πολλαπλά επίπεδα. Ο κύριος μηχανισμός για τη ρύθμιση του NF-κB είναι μέσω των ανασταλτικών πρωτεϊνών IκB (Inhibitor of NF-κB proteins – IκB) και του συμπλέγματος της κινάσης που φωσφορυλιώνει τις IκBs (IκB kinase – IKK). Στα περισσότερα μη διεγερμένα κύτταρα, τα διμερή NF-κB διατηρούνται σε ανενεργή μορφή στο κυτταρόπλασμα μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τις πρωτεΐνες IκB. Η αποικοδόμηση αυτών των αναστολέων κατά τη φωσφορυλίωση τους από το σύμπλεγμα της κινάσης IκB (IKK) οδηγεί σε μετατόπιση του NF-κB στον πυρήνα και στην επακόλουθη μεταγραφή των γονιδίων στόχων. Αν και η δραστηριότητα του NF-κB είναι επαγωγίμη στα περισσότερα κύτταρα, ο NF-κB μπορεί επίσης να ανιχνευθεί και ως μια συστατικά ενεργή, πυρηνική πρωτεΐνη σε ορισμένους τύπους κυττάρων, όπως τα ώριμα B κύτταρα, τα μακροφάγα, σε νευρώνες και αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα. Ένας αριθμός μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων ελέγχει, επίσης, τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών IκB και IKK καθώς και των ίδιων των μορίων του NF-κB. Κατ' επέκταση, λόγω της συμμετοχής του σε βασικές φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι η απορύθμιση του μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις, όπως η αρθρίτιδα, η ανοσοανεπάρκεια, η αυτοανοσία και ο καρκίνος, αλλά ενέχει ρόλο και στη νευροφλεγμονή που παρουσιάζει η νόσος του Parkinson [82].

1.2.2 Μέλη της οικογένειας του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB

Μολονότι συχνά αναφέρεται ως ένας μοναδικός μεταγραφικός παράγοντας, στην πραγματικότητα ο NF-κB στα θηλαστικά συνιστά μια οικογένεια πέντε πρωτεϊνών που συνδυάζονται για να σχηματίσουν διμερή, τα οποία μπορούν ρυθμίσουν τη μεταγραφή των γονιδίων τόσο θετικά όσο και αρνητικά (Εικ. 6). Τα πέντε μέλη αυτής της οικογένειας αποτελούν οι πρωτεΐνες p65 (επίσης γνωστή ως RelA), RelB, c-Rel, p105/p50 (NF-κB1) και p100/p52 (NF-κB2), που συνδέονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν διακριτά μεταγραφικά ενεργά ομο- και ετεροδιμερή σύμπλοκα [83]. Οι p50 και p52 μεταγράφονται ως μακρύτερες πρόδρομες πρωτεΐνες p100 (NF-κB1) και

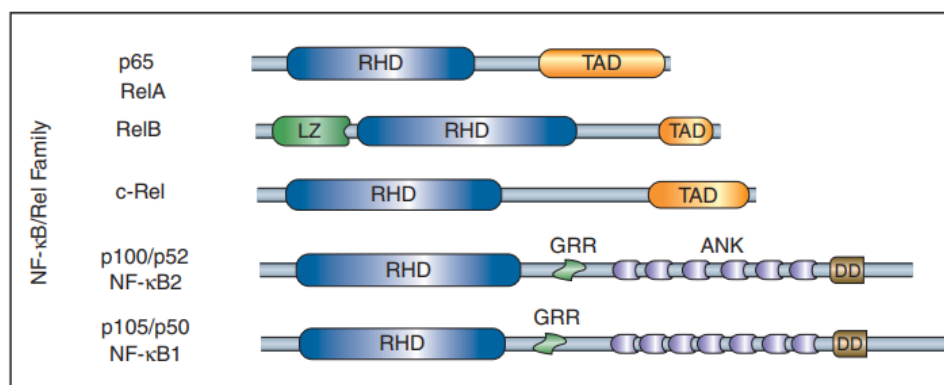
p105 (NF-κB2), αντίστοιχα, οι οποίες στη συνέχεια μετατρέπονται στις λειτουργικές υπομονάδες με αλλαγές κατά τη διαδικασία της μετάφρασης και πιο συγκεκριμένα μέσω της διάσπασης μιας C-τερματικής περιοχής που περιέχει επαναλήψεις αγκυρίνης (Ankyrin Repeat – AnkR) [84]. Όλες οι υπομονάδες μοιράζονται ένα συντηρημένο 300 αμινοξέων μακρύ αμινοτελικό τομέα ομολογίας Rel (Rel Homology Domain – RHD) και οι αλληλουχίες εντός του RHD απαιτούνται για τον διμερισμό μεταξύ των διαφορετικών υπομονάδων, τη δέσμευση τους στο DNA, την αλληλεπίδραση τους με τις ανασταλτικές πρωτεΐνες IκBs, καθώς και για την μετατόπιση τους στον πυρήνα [85].

Οι πέντε διακριτές πεπτιδικές υπομονάδες μπορούν να ομο- και ετεροδιμεριστούν για να σχηματίσουν 15 πιθανούς συνδυασμούς με ποικίλες μεταγραφικές ιδιότητες και χαρακτηριστικά γνωρίσματα δέσμευσης στο DNA. Ωστόσο, η φυσιολογική ύπαρξη και σχέση ανάμεσα σε όλα τα πιθανά διμερή σύμπλοκα δεν έχει ακόμη αποδειχθεί [86]. Η κύρια ενεργοποιημένη μορφή του NF-κB αποτελεί το ετεροδιμερές p50/p65, το οποίο αντιπροσωπεύει το πιο άφθονο από τα διμερή της οικογένειας Rel και βρίσκεται σχεδόν σε όλους τους τύπους κυττάρων, ενώ άλλα διμερικά σύμπλοκα απαντώνται μόνο σε περιορισμένα υποσύνολα κυττάρων [87]. Έτσι, ενώ οι p50 και p65 εκφράζονται ευρέως σε διάφορους τύπους κυττάρων, η έκφραση της RelB περιορίζεται σε συγκεκριμένες περιοχές του θύμου αδένα, των λεμφαδένων και των πλακών του Peyer στο λεπτό έντερο. Το ίδιο συμβαίνει και με την έκφραση της c-Rel, η οποία περιορίζεται σε αιμοποιητικά κύτταρα και λεμφοκύτταρα [88].

1.2.3 Δομή των πρωτεϊνών της οικογένειας του NF-κB

Όσο αφορά τη δομή των πρωτεϊνών που απαρτίζουν την οικογένεια του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, αυτή εμφανίζει διαφορές μεταξύ των μελών. Οι υπομονάδες p65, RelB και c-Rel περιέχουν στο καρβοξυτελικό τους άκρο μια περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης (Transactivation Domain – TAD) που επιτρέπει σε αυτές να προάγουν άμεσα τη γονιδιακή μεταγραφή. Από την άλλη, οι υπομονάδες p52 και p50 στερούνται TAD και επομένως βασίζονται σε αλληλεπιδράσεις με άλλους παράγοντες για τη θετική ρύθμιση της μεταγραφής. Στην ομοδιμερή μορφή τους, οι p50 και p52 πιστεύεται ότι δρουν κυρίως ως καταστολείς της μεταγραφής μέσω του ανταγωνισμού με μεταγραφικά ενεργά διμερή για δέσμευση σε συγκεκριμένες θέσεις στο DNA. Ωστόσο, όταν δεσμεύονται σε μια υπομονάδα που περιέχει TAD ως μέρος ενός ετεροδιμερούς, μπορούν να ρυθμίσουν θετικά τη μεταγραφή [89]. Τα αμινοτελικά άκρα αυτών των προδρόμων πρωτεϊνών περιέχουν περιοχές RHDs, ακολουθούμενες από μια περιοχή πλούσια σε γλυκίνη (GRR) και πολλαπλά αντίγραφα επαναλήψεων αγκυρίνης (AnkR), που είναι επίσης χαρακτηριστικά για την οικογένεια των ανασταλτικών πρωτεϊνών IκB. Επιπρόσθετα, η RelB είναι μοναδική στο ότι απαιτεί μια αμινοτελική περιοχή φερμουάρ λευκίνης (Leucine Zipper – LZ) εκτός από το TAD της για να είναι πλήρως ενεργή [90]. Συνεπώς, οι προαναφερθείσες πρωτεΐνες μπορούν περαιτέρω να χωριστούν σε δύο υποκατηγορίες: οι υπομονάδες NF-κB p50 και p52

ανήκουν στην κατηγορία I λόγω του ότι δεν διαθέτουν τομέα ενεργοποίησης της μεταγραφής (TAD), ενώ, τα άλλα τρία μέλη της οικογένειας, RelA, c-Rel και RelB, που περιέχουν την συγκεκριμένη περιοχή, ανήκουν στην κατηγορία II.

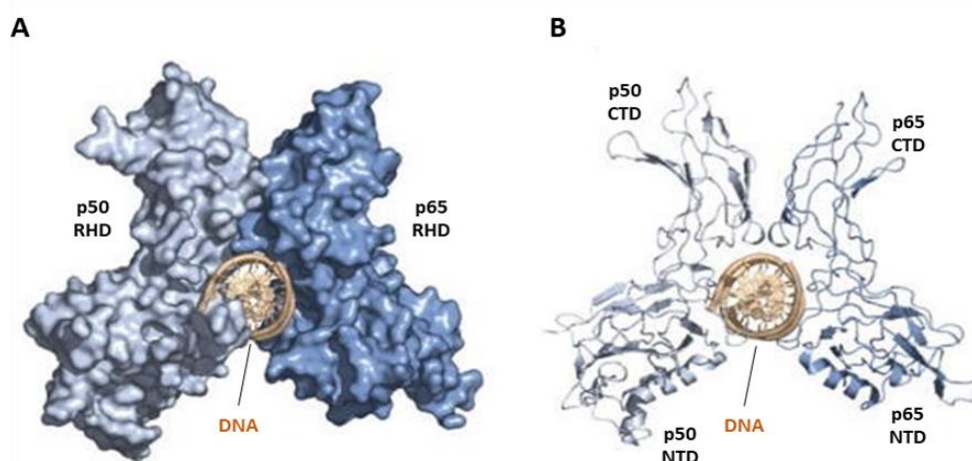


Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση των πρωτεϊνών που αποτελούν τα μέλη της οικογένειας του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ. Εμφανίζονται οι διαφορετικοί τομείς, που περιλαμβάνουν τον τομέα ομολογίας Rel (RHD), τη περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (TAD), το μοτίβο φερμουάρ λευκίνης (LZ), την περιοχή πλούσια σε γλυκίνη (GRR) και τις επαναλήψεις αγκυρίνης (ANK) [86].

Μέχρι σήμερα, αρκετές τρισδιάστατες δομές διμερών του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, που συνδέονται με το DNA, έχουν απεικονιστεί και αποκαλύπτουν έναν κοινό τρόπο σύνδεσης και διμερισμού με αυτό. Οι δομές μοιάζουν με πεταλούδα με το διμερές της πρωτεΐνης να σχηματίζει τα φτερά γύρω από το κυλινδρικό σώμα του DNA (Εικ. 7Α). Η περιοχή ομολογίας RHD της υπομονάδας του NF-κΒ, περιέχει δύο διακριτές περιοχές που ενώνονται με έναν συνδέτη, τον N-τερματικό τομέα (N-Terminal Domain – NTD) και τον C-τερματικό τομέα (C-Terminal Domain – CTD) (Εικ. 7Β). Ο NF-κΒ χρησιμοποιεί και τις δύο περιοχές του RHD για να περικυκλώσει το DNA στόχο. Αντί να χρησιμοποιούν α-έλικες για αλληλεπίδραση με το DNA, όπως συχνά παρατηρείται σε άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, τα διμερή NF-κΒ χρησιμοποιούν εύκαμπτους βρόχους από το NTD και το CTD για να μεσολαβήσουν στις επαφές του DNA. Ο C-τερματικός τομέας είναι αποκλειστικά υπεύθυνος για τον διμερισμό, την αλληλεπίδραση με τις IκBs και δημιουργεί μη ειδικές επαφές με το DNA. Από την άλλη, ο N-τερματικός τομέας αναγνωρίζει την αλληλουχία που υπάρχει στα ρυθμιστικά στοιχεία των γονιδίων στόχων του NF-κΒ μέσω ειδικής αλληλεπίδρασης με βάσεις του DNA, αλλά αλληλεπιδρά και μη ειδικά με τη φωσφορική ραχοκοκαλιά του [91]. Ακόμη, η εύκαμπτη περιοχή στον C-τερματικό τομέα του RHD περιέχει το σήμα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal – NLS) της πρωτεΐνης p65.

Η ανάλυση των διαθέσιμων δομών έδειξε να υπάρχει πλαστικότητα στην ρυθμιστική αλληλουχία του DNA των γονιδίων στόχων, που δεσμεύουν τα ομο- και ετεροδιμερή του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ και οι οποίες μπορεί να βρίσκονται είτε σε υποκινητές είτε σε ενισχυτές. Γενικά, η συναινετική αλληλουχία του DNA που αναγνωρίζει είναι η 5'-GGGRNYYYCC-3' (όπου R είναι πουρίνη, Y είναι πυριμιδίνη

και N είναι οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο), όπου αναφέρεται ως στοιχείο κB ή θέση κB και η οποία είναι ψευδο-συμμετρική, με τη περιοχή RHD κάθε μονομερούς του NF-κB να καταλαμβάνει το ήμισυ αυτής [92]. Διαφορετικά μέλη της οικογένειας του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB προτιμούν διαφορετικές μισές θέσεις. Για παράδειγμα, στο ετεροδιμερές NF-κB p50/p65, η p50 αναγνωρίζει μια μισή θέση πέντε ζευγών βάσεων, ενώ η p65 χρησιμοποιεί μια μισή θέση τεσσάρων ζευγών βάσεων [93]. Οι πολύπλοκες δομές, μαζί με τη δυνατότητα συγκεκριμένων διμερών του NF-κB να πυροδοτούν ειδικές αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης στον υποκινητή ή τον ενισχυτή, καθίστανται σημαντικές καθώς ο μεταγραφικός έλεγχος περιλαμβάνει τη συντονισμένη δράση του μεταγραφικού παράγοντα, των συν-ενεργοποιητών και των συν-καταστολέων στο πλαίσιο της πυρηνικής χρωματίνης. Επιπλέον, η κινητική της σύνδεσης και της απελευθέρωσης του διμερούς NF-κB από το DNA βασίζεται στην παρουσία επαρκών ανασταλτικών πρωτεϊνών IκBs, καθώς και στη φύση των μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων των υπομονάδων του NF-κB [86]. Επομένως, η συνδυαστική ποικιλομορφία των διμερών NF-κB προσθέτει στην ικανότητά τους να ρυθμίζουν διακριτά αλλά επικαλυπτόμενα σύνολα γονιδίων, επηρεάζοντας με αυτό το τρόπο όλες τις πτυχές της επιλογής θέσης δέσμευσης του στο DNA.

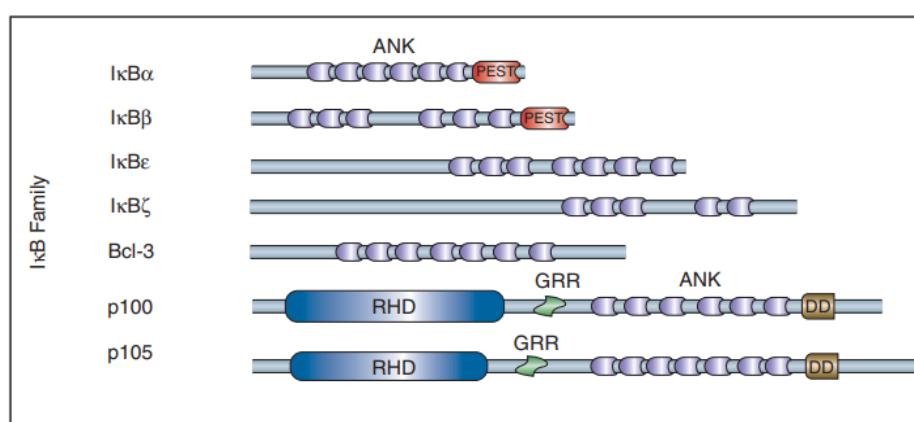


Εικόνα 7: (A) Μοντέλο πλήρωσης χώρου της κρυσταλλικής δομής του ετεροσυμπλέγματος p50/p65 που είναι συνδεδεμένο με DNA. (B) Η ίδια δομή με τη μορφή διαγράμματος κορδέλας [91].

1.2.4 Η οικογένεια των ανασταλτικών πρωτεϊνών IκB

Οι κύριοι ρυθμιστές της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB, αποτελούν οι πρωτεΐνες της οικογένειας IκB (Inhibitor of NF-κB proteins). Ο κλασικός ρόλος αυτών των πρωτεϊνών είναι να απομονώνουν τα σύμπλοκα NF-κB στο κυτταρόπλασμα των μη διεγερμένων κυττάρων. Με αυτό τον τρόπο αναστέλλουν την μετατόπιση του NF-κB στον πυρήνα και τη δέσμευση του στις ειδικές αλληλουχίες DNA των γονιδίων στόχων, την έκφραση των οποίων και ενεργοποιεί. Τα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών IκB μπορούν να διαχωριστούν σε τρεις κατηγορίες: (i) τις τυπικές πρωτεΐνες IκB, που αποτελούν οι IκBα, IκBβ και IκBε, (ii) τις άτυπες πρωτεΐνες IκB, που είναι οι Bcl-3, IκBγ, IκBζ, IκBNS, καθώς και (iii) οι πρόδρομες πρωτεΐνες Rel p100 και p105

αποτελούν μέρος αυτής [83]. Όλες οι πρωτεΐνες IκB χαρακτηρίζονται δομικά από την παρουσία πέντε έως επτά επαναλαμβανόμενων μοτίβων αγκυρίνης, τα οποία μεσολαβούν στην αλληλεπίδρασή τους με το RHD των πρωτεϊνών NF-κB (Εικ. 8). Παρόλο που οι πρωτεΐνες IκB είναι παρόμοιες στη δομή τους, η καθεμιά πιστεύεται ότι έχει τις δικές της δεσμευτικές προτιμήσεις και ασκούν διαφορετική μεταγραφική ρύθμιση στα μέλη της οικογένειας του NF-κB [94]. Για παράδειγμα, από τη μία πλευρά, τα κλασικά ετεροδιμερή p65/p50, όπως και αυτά που περιέχουν c-Rel, ρυθμίζονται κυρίως από τη IκBα [95]. Από την άλλη πλευρά, η RelB δεσμεύεται αποκλειστικά από τη πρωτεΐνη p100, ενώ η Bcl-3 και η IκBζ κατά προτίμηση συνδέονται με ομοδιμερή των p50 και p52 [96]. Άρα, υπάρχει μια ποικιλία μεταξύ των διαφόρων συνδυασμών που μπορούν να προκύψουν κατά τη δέσμευση του NF-κB και των ανασταλτικών πρωτεϊνών IκB.



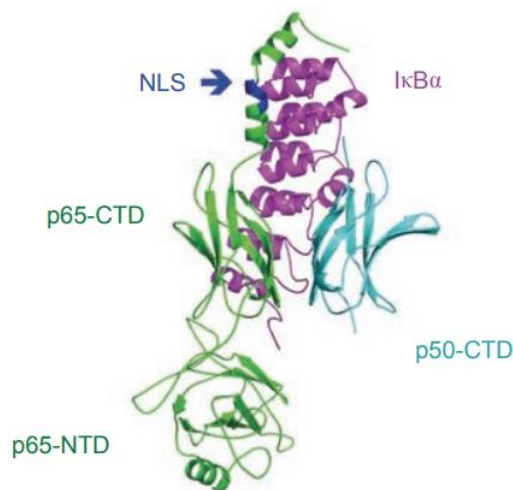
Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση των μελών της οικογένειας των ανασταλτικών πρωτεϊνών IκB.

Εμφανίζονται οι επαναλήψεις αγκυρίνης (ANK), που είναι τυπικές για αυτήν την οικογένεια πρωτεϊνών, όπως και άλλοι τομείς συμπεριλαμβανομένων των τομέα ομολογίας Rel (RHD), περιοχή πλούσια σε γλυκίνη (GRR), μοτίβο αμινοξέων προλίνη-γλουταμικό οξύ-σερίνη (PEST) και του τομέα θανάτου (Death Domain – DD) [86].

Η επικρατούσα άποψη για τον μηχανισμό δράσης αυτών των πρωτεϊνών, είναι ότι διατηρούν τον NF-κB στο κυτταρόπλασμα καλύπτοντας τις αλληλουχίες πυρηνικού εντοπισμού (NLSs) στις υπομονάδες του. Ωστόσο, μελέτες έχουν δείξει ότι ο κυτταροπλασματικός εντοπισμός των ανενεργών διμερών του NF-κB επιτυγχάνεται στην πραγματικότητα εξισορροπώντας τη συνεχή μετακίνηση του μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος. Δομικά και βιοχημικά πειράματα σε σύμπλοκα IκBα:p65:p50 (Εικ. 9) αποκάλυψαν ότι το μόριο της IκBα καλύπτει μόνο την αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (NLS) της p65, ενώ η NLS της p50 παραμένει προσβάσιμη, επιτρέποντας σε αυτό να μεταφερθεί στον πυρήνα. Ταυτόχρονα, το σήμα πυρηνικής εξαγωγής (NES) που βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης IκBα λειτουργεί για να αποβάλει το σύμπλοκο NF-κB-IκBα από τον πυρήνα [97]. Καθώς ο ενεργός NF-κB προάγει την έκφραση της IκBα, δημιουργείται ένας σημαντικός ρυθμιστικός μηχανισμός αρνητικής ανάδρασης που επηρεάζει κρίσιμα τη διάρκεια της απόκρισης του NF-κB. Επίσης, η ταχεία αποικοδόμηση και επανασύνθεση της IκBα επιτρέπει την ταχεία αναστολή της

δραστηριότητας του NF-κB, ενώ η πιο αργή κινητική των IκBβ και IκBe δρα μειώνοντας τις μακροπρόθεσμες ταλαντώσεις της απόκρισης του NF-κB. Αυτές οι χρονικές διαφορές στην αποικοδόμηση και την επανασύνθεση των IκB φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό των λειτουργικών χαρακτηριστικών τους στη ρύθμιση της δραστηριότητας του NF-κB. Έτσι, αν και η IκBβ εμφανίζει εξειδίκευση δέσμευσης στον NF-κB παρόμοια με τη IκBa, σε αντίθεση με αυτή, τα σύμπλοκα IκBβ:NF-κB δεν υφίστανται πυρηνική-κυτταροπλασματική μετακίνηση. Η IκBβ συσχετίζεται με σύμπλοκα του NF-κB που συνδέονται με το DNA, λόγω της κάλυψης και των δύο NLS στο διμερές του NF-κB από αυτή και της απουσίας λειτουργικού NES στο αμινοτελικό της άκρο, υποδηλώνοντας μια πιθανή ρυθμιστική της λειτουργία στον πυρήνα. Επιπλέον, η έκφραση και η λειτουργία της IκBe φαίνεται να περιορίζεται σε κύτταρα της αιμοποιητικής γενεαλογίας, ενισχύοντας την υπόθεση ότι οι διαφορετικές τυπικές πρωτεΐνες IκB ασκούν μοναδικούς ρόλους στις αποκρίσεις του NF-κB, σε διαφορετικά κυτταρικά σενάρια [98].

Σε αντίθεση με τις τυπικές πρωτεΐνες IκB, οι οποίες λειτουργούν κυρίως ως αναστολείς της ενεργοποίησης του NF-κB, οι άτυπες πρωτεΐνες IκB, Bcl-3, IκBζ, IκBNS και IκBy λειτουργούν σε μεγάλο βαθμό για να ρυθμίζουν τη μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κB στον πυρήνα. Αυτή η διαμόρφωση επιτυγχάνεται μέσω ενός αριθμού μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της σταθεροποίησης του NF-κB, της στρατολόγησης συμπαραγόντων και της ενίσχυσης ή της αναστολής της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB [99]. Για παράδειγμα, ενώ μερικές αναφορές υποδεικνύουν ότι η BCL3 αλληλεπιδρά και συμμετέχει στην απομάκρυνση των ομοδιμερών p50 και p52 από το DNA και έτσι τερματίζει τα μεταγραφικά κατασταλτικά αποτελέσματα αυτών των διμερών που στερούνται TAD, άλλες μελέτες δείχνουν ότι η BCL3 αλληλεπιδρά με τα p52 και p50 για να τους προσδώσει μεταγραφική δραστηριότητα. Ωστόσο, η BCL3 μπορεί στην πραγματικότητα να διευκολύνει την κατασταλτική λειτουργία του p50 σταθεροποιώντας τα ομοδιμερή του και αποτρέποντας έτσι την πρόσβαση διμερών που περιέχουν TAD σε θέσεις κB που καταλαμβάνονται από ομοδιμερή p50 [100]. Η IκBζ δρα επίσης στον πυρήνα, δεν εκφράζεται συστατικά, αλλά επάγεται κατά τη δέσμευση των υποδοχέων IL-1 και TLR4. Ως επί το πλείστον, η IκBζ συσχετίζεται με ομοδιμερή p50 και υποτίθεται ότι δρα ως συνενεργοποιητής αυτών, παρόλο που δεν περιέχει εμφανή TAD. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι ρυθμίζει αρνητικά τα σύμπλοκα που περιέχουν p65 και έτσι μπορεί να ενεργοποιεί ή να εμποδίζει επιλεκτικά τη δραστηριότητα του NF-κB [101]. Εν κατακλείδι, οι πρωτεΐνες IκBs μπορούν να θεωρηθούν ως πολύπλευροι ρυθμιστές του NF-κB, λόγω της επίδρασης τους στη σύνθεση του κυτταρικού NF-κB μέσω ειδικής σταθεροποίησης ασταθών διμερών, της σταθεροποίησης των συνδεδεμένων με το DNA διμερών, καταστέλλοντας ή παρατείνοντας έτσι τις μεταγραφικές αποκρίσεις, ή ακόμη και λειτουργώντας ως μεταγραφικοί συνενεργοποιητές.



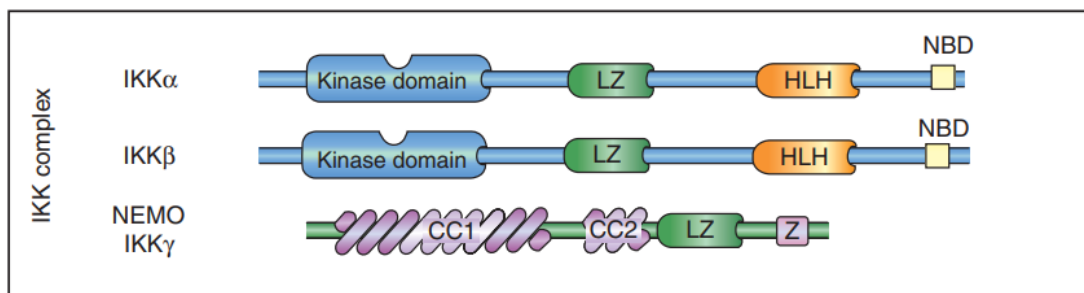
Εικόνα 9: Δομή του ετεροδιμερούς συμπλόκου p65/p50:IκBα. Κατά την αλληλεπίδραση με τη IκBα (μωβ), η NLS (μπλε) του p65 (πράσινο) υιοθετεί μια ελικοειδή διαμόρφωση. Η υπομονάδα p50 (κυανό) που χρησιμοποιείται για την κρυστάλλωση του συμπλόκου περιέχει μόνο CTD [102].

1.2.5 Σηματοδοτικά μονοπάτια ενεργοποίησης του NF-κB

Η ενεργοποίηση του NF-κB μπορεί να λάβει χώρα μέσω δύο διαφορετικών σηματοδοτικών οδών, που αναφέρονται συνήθως ως κανονική (ή κλασική) και μη κανονική (ή εναλλακτική) οδός (Εικ. 11). Το πρώτο βήμα της ενεργοποίησης του NF-κB είναι κοινό και στις δύο οδούς και περιλαμβάνει τη μετα-μεταφραστική τροποποίηση των αναστολέων IκB, κάτι το οποίο συμβαίνει μέσω της ετεροτριμερούς κινάσης IκB (IKK). Το μεγάλο αυτό πρωτεϊνικό σύμπλοκο είναι ικανό να φωσφορυλιώσει ειδικά τη IκBα στις σερίνες (Ser) 32 και 36. Η φωσφορυλιωμένη IκBα στη συνέχεια ουβικιτινιλιώνεται και αποικοδομείται από το 26S πρωτεάσωμα, επιτρέποντας έτσι στον NF-κB να μετατοπιστεί στον πυρήνα, όπου ρυθμίζει την έκφραση μιας πληθώρας γονιδίων [102].

Ο καθαρισμός του συμπλόκου IKK αποκάλυψε την παρουσία δύο καταλυτικά ενεργών κινασών, των IKKα και IKKβ και της ρυθμιστικής υπομονάδας IKKγ (ή NEMO) [103]. Οι IKKα και IKKβ εκφράζονται πάντα και περιέχουν μια αμινοτελική περιοχή κινάσης, ένα φερμουάρ λευκίνης (LZ) και μια καρβοξυτελική περιοχή έλικας-βρόχου-έλικας (HLH) (Εικ. 10). Το φερμουάρ λευκίνης είναι υπεύθυνο για τον διμερισμό των κινασών και οι μεταλλάξεις σε αυτή την περιοχή καθιστούν τις κινάσες ανενεργές, ενώ το HLH είναι περιττό για το διμερισμό, αλλά απαραίτητο για τη βέλτιστη δραστηριότητα κινάσης. Τα καρβοξυτελικά τμήματα των IKKα και IKKβ είναι κρίσιμα για την αλληλεπίδρασή τους με τη ρυθμιστική υπομονάδα IKKγ, η οποία διαμεσολαβείται από μια εξαπεπτιδική αλληλουχία (LDWSWL) στα IKKs που ονομάζεται περιοχή σύνδεσης NEMO (NEMO binding domain – NBD). Η ενεργοποίηση του συμπλόκου IKK εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση δύο σερινών της αλληλουχίας SLCTS των περιοχών του T-βρόχου, σε τουλάχιστον μία από τις κινάσες IκB [104]. Ειδικά μόρια

προσαρμογής, λιγάσες ουβικιτίνης και πρωτεϊνικές κινάσες εμπλέκονται στις διάφορες οδούς για την ενεργοποίηση του συμπλέγματος IKK.



Εικόνα 10: Σχηματική δομή των κινασών του συμπλέγματος IKK [86].

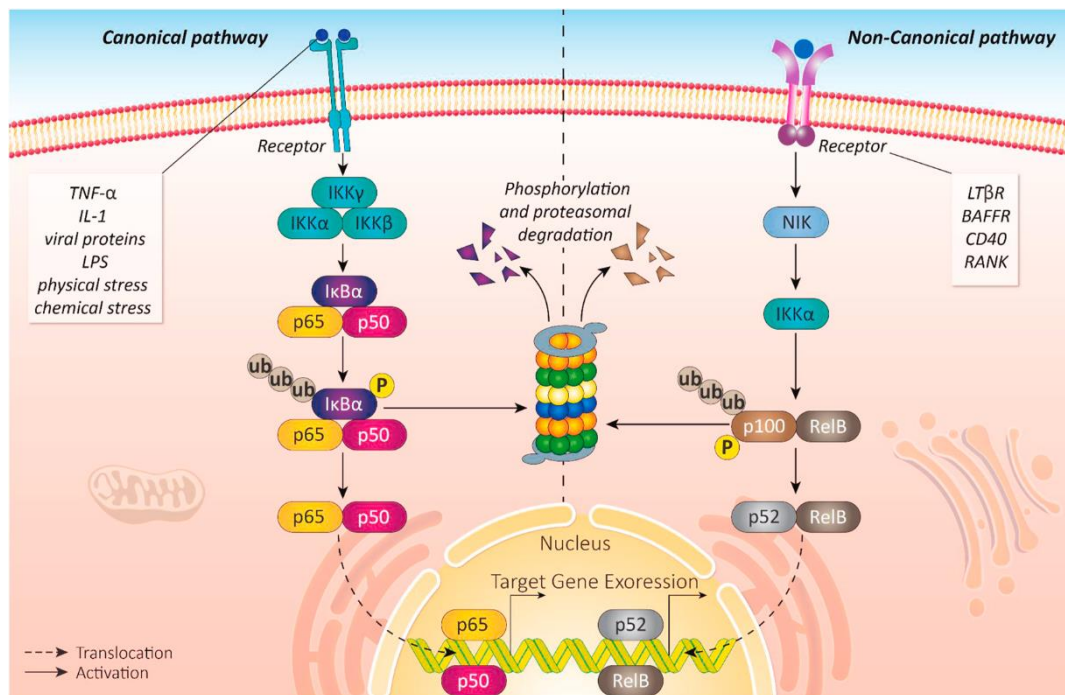
1.2.5.1 Κανονικό (κλασικό) μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-κB

Μια ποικιλία ανοσολογικά σχετικών προσδετών, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-άλφα (TNF-α), οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS), που αποτελούν συστατικά των βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων και η ιντερλευκίνη-1 (IL-1), μπορούν να ενεργοποιήσουν την κανονική οδό του NF-κB. Οι υποδοχείς τύπου Toll (TLRs), υποδοχείς προφλεγμονοδών κυτοκινών (πχ. TNFR1/2, IL-1R) και οι υποδοχείς των T (TCR) και B λεμφοκυττάρων (BCR), αντίστοιχα, δεσμεύουν αυτούς τους προσδέτες που είναι ικανοί να διεγείρουν την ενεργοποίηση της κανονικής σηματοδότησης του NF-κB, η οποία είναι απαραίτητη για τους φλεγμονώδεις μηχανισμούς και σημαντικός παράγοντας στον έλεγχο της έμφυτης ανοσίας. Εφόσον ενεργοποιηθούν οι υποδοχείς, καθοδικά αυτών και μέσω μιας ποικιλίας πρωτεϊνών προσαρμογής και σηματοδοτικών κινασών, μπορεί να πραγματοποιηθεί η ενεργοποίηση της IKKβ στο σύμπλεγμα IKK, το οποίο μπορεί στη συνέχεια να φωσφορυλιώσει τη IκBa στα υπολείμματα σερίνης S32 και S36. Αυτή η φωσφορυλίωση είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την επακόλουθη πολυουβικουϊτινίωσή της, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε πρωτεασωμική αποικοδόμηση της IκBa, από το 26S πρωτεάσωμα, εκθέτοντας έτσι το NLS της p65 και προκαλώντας την πυρηνική μετατόπιση των διμερών p65/p50. Ο ενεργοποιημένος πλέον NF-κB, ρυθμίζει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του, μέσω δέσμευσης στις ειδικές αλληλουχίες κB στο DNA, πολλά εκ των οποίων είναι υπεύθυνα για την παραγωγή διαφόρων κυτοκινών, χημειοκινών, μορίων κυτταρικής προσκόλλησης, γονίδια που επάγουν φλεγμονώδεις αποκρίσεις καθώς και γονίδια που είναι υπεύθυνα για την επιβίωση των κυττάρων [105].

1.2.5.1 Μη κανονικό (εναλλακτικό) μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-κB

Σε αντίθεση με το κανονικό μονοπάτι NF-κB, το μη κανονικό μονοπάτι ανταποκρίνεται επιλεκτικά σε μια συγκεκριμένη ομάδα ερεθισμάτων, συμπεριλαμβανομένων των προσδεμάτων μιας υποομάδας των μελών της υπεροικογένειας του TNF. Πιο

συγκεκριμένα, η εναλλακτική οδός ενεργοποιείται έπειτα από την σύνδεση στους αντίστοιχους υποδοχείς των LTβ (Lymphotoxin β), BAFF (B cell activating factor), CD40 και RANK (receptor activator for nuclear factor kappa B), με απώτερο στόχο την ρύθμιση, διαφοροποίηση και ωρίμανση των ανοσοκυττάρων του επίκτητου ανοσοποιητικού και την οργανογένεση των δευτερογενών λεμφικών οργάνων. Η εναλλακτική οδός είναι μοναδική στο ότι είναι ανεξάρτητη από τη IKKβ και τη NEMO. Αντίθετα, το λειτουργικό σύμπλοκο IKK απαρτίζεται από ομοδιμερές της IKKα, τα οποία φωσφορυλιώνουν επιλεκτικά τη p100 που διμερίζεται με τη RelB. Επομένως, η επεξεργασία της p100 απελευθερώνει ένα υποσύνολο μεταγραφικά ενεργών διμερών NF-κB, που αποτελούνται κυρίως από p52:RelB. Ο μηχανισμός της ενεργοποίησης της IKKα, περιλαμβάνει την κινάση NIK (NF-κB inducing kinase – NIK), η οποία είναι υπεύθυνη για την άμεση φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της IKKα. Η φωσφορυλίωση της NIK έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της δράσης κινάσης, επιτρέποντας την επακόλουθη φωσφορυλίωση της IKKα. Τα ομοδιμερή IKKα φωσφορυλιώνουν περαιτέρω την p100, με αποτέλεσμα την ουβικουϊτινοποίηση και την αποικοδόμηση που ακολουθείται από την απελευθέρωση ενεργών διμερών p52:RelB που μπορούν να εισέλθουν στον πυρήνα και να ρυθμίσουν τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων τους [106].



Εικόνα 11: Αναπαράσταση των δύο διαφορετικών μονοπατιών ενεργοποίησης του NF-κB [107].

1.2.5.3 Τερματισμός της σηματοδότησης του NF-κB

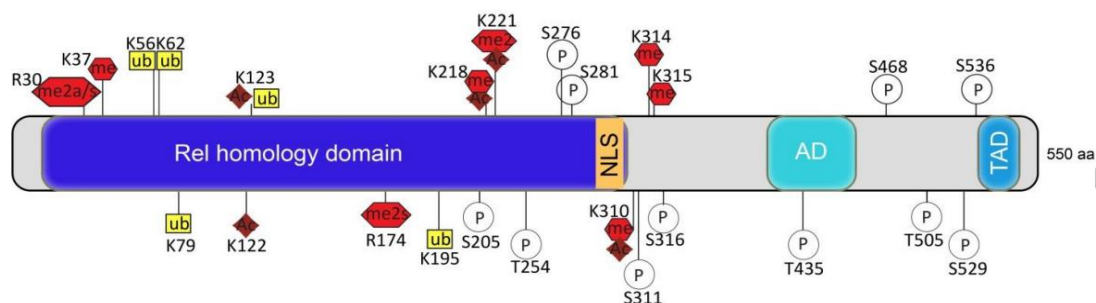
Ο καλύτερα μελετημένος και αποδεκτός μηχανισμός για τον τερματισμό της απόκρισης του NF-κB περιλαμβάνει την επανασύνθεση των πρωτεϊνών IκB που προκαλείται από

τον ενεργοποιημένο NF-κB. Η πρόσφατα συντιθέμενη IκBα μπορεί να εισέλθει στον πυρήνα, να αφαιρέσει τον NF-κB από το DNA και να τον επανατοποθετήσει στο κυτταρόπλασμα. Επίσης, οι πρόδρομες πρωτεΐνες p105 και p100, καθώς και οι c-Rel και RelB, είναι γονίδια επαγώγιμα από τον NF-κB, και ως εκ τούτου η σύνθεση των διμερών του NF-κB σε ένα κύτταρο μπορεί να ποικίλλει με την πάροδο του χρόνου. Επομένως, οι οδοί σηματοδότησης που οδηγούν στην ενεργοποίηση του NF-κB αποτελούν παράδειγμα αυτορρυθμιζόμενων οδών, λόγω της αρνητικής ανατροφοδότησης που προκύπτει από την μεταγραφή των γονιδίων στόχων του. Επιπλέον, έχουν εντοπιστεί πρόσθετοι ανασταλτικοί μηχανισμοί που λειτουργούν αργότερα στην οδό και επηρεάζουν άμεσα τον ενεργό, δεσμευμένο στο DNA NF-κB. Μερικοί από αυτούς, περιλαμβάνουν τις από-ουβικουϊτίνες A20 και CYLD, οι οποίες ρυθμίζονται ανοδικά από τον NF-κB, όπως και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των υπομονάδων του NF-κB και έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχουν στην απενεργοποίηση της απόκρισης του αλλάζοντας τη δέσμευση με συμπαράγοντες ή μεσολαβώντας στη μετατόπιση και την αποικοδόμηση του. Έτσι, η τυχόν αναστολή της ανάδρασης που μπορεί να προκύψει είναι κρίσιμη για την κανονική ομοιοστάση της οδού και την αποφυγή παθολογικών καταστάσεων που τυχόν μπορεί να προκύψουν [108].

1.2.6 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των υπομονάδων του NF-κB

Δεδομένου του ευρέος φάσματος βιολογικών διεργασιών που επηρεάζονται από τον NF-κB και των καταστροφικών συνεπειών της απορρυθμισμένης σηματοδότησης του, υπάρχουν περίπλοκοι και εξαιρετικά ρυθμισμένοι μηχανισμοί για τον έλεγχο της δραστηριότητας του. Αυτά τα προστιθέμενα στρώματα ρύθμισης περιλαμβάνουν μια ποικιλία μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων διαφόρων βασικών στοιχείων αυτής της σηματοδοτικής οδού, επηρεάζοντας έτσι τη δραστηριότητα του NF-κB σε πολλαπλά επίπεδα. Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, το κύριο σημείο ελέγχου της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB είναι μέσω των τυπικών πρωτεϊνών IκB που ελέγχουν τον υποκυτταρικό εντοπισμό του NF-κB. Αναμφισβήτητα, είναι σαφές από τις μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι και σήμερα, ότι ο συνδυασμός των υπομονάδων του NF-κB και η αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες IκB, παρέχει ένα πολύπλοκο ρυθμιστικό δίκτυο για τον έλεγχο σε μεταγραφικό επίπεδο. Ωστόσο, είναι επίσης κατανοητό ότι η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών IκB και η μετατόπιση των διμερών NF-κB στον πυρήνα, αν και είναι απαραίτητη, δεν επαρκεί για τη βέλτιστη μεταγραφική απόκριση που κατευθύνεται από τον NF-κB, ιδιαίτερα σε φλεγμονώδη ερεθίσματα [86]. Έτσι, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις έχουν αναδειχθεί ως μία από τις διαφορετικές στρατηγικές που είναι γνωστές για τη λεπτομερή ρύθμιση του NF-κB. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις είναι αλλαγές σε μια πρωτεΐνη, που μπορεί να τύχει να συμβούν μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας της μετάφρασης, είτε όταν μια λειτουργική ομάδα προστεθεί ομοιοπολικά στην πρωτεΐνη είτε κατά τη διάρκεια των διαδικασιών της πρωτεόλυσης μέρους αυτής ή της αναδίπλωσης της. Αυτές οι δομικές αλλαγές λειτουργούν ως μηχανισμός για την ειδικότητα των

πρωτεϊνών και αυξάνουν την ποικιλία τους. Έχει εντοπιστεί μια σειρά μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων συμπεριλαμβανομένων της φωσφορυλίωσης, της ουβικιτινίωσης, της ακετυλίωσης, της μεθυλίωσης και πολλών ακόμη, οι οποίες επηρεάζουν άμεσα τη μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κB. Ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου και το ερέθισμα, τέτοιες τροποποιήσεις ενεργοποιούν ή καταστέλλουν τη δραστηριότητα του NF-κB. Μεταξύ των διαφόρων υπομονάδων που μπορούν να σχηματίσουν τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB, οι ειδικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης p65 είναι μακράν οι πιο γνωστές (Εικ. 12) [109]. Επομένως, μια ποικιλόμορφη σειρά μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των πρωτεϊνών που απαρτίζουν τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB, παρέχει τα μέσα για τον πολύπλευρο και ακριβή συντονισμό της απόκρισης του, κυρίως για τον επιλεκτικό τρόπο της μεταγραφής των γονιδίων που ελέγχει.



Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση της υπομονάδας p65 του NF-κB και των σχετικών θέσεων των διάφορων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της. Δείχνονται κατάλοιπα αμινοξέων που είναι γνωστό ότι τροποποιούνται μετα-μεταφραστικά. ac (ακετυλίωση), ub (ουβικιτινίωση), p (φωσφορυλίωση), me (μεθυλίωση), s (συμμετρική μεθυλίωση), a (ασύμμετρη μεθυλίωση) [110].

1.3 Ανοσολογική απόκριση στη νόσο του Parkinson

1.3.1 Φλεγμονή στη νόσο του Parkinson

Η φλεγμονή είναι ένας εξαιρετικά ρυθμιζόμενος μηχανισμός έναντι παθογόνων ερεθισμάτων ή τραυματισμού των ιστών, που στοχεύει στην προστασία του ξενιστή από τους παράγοντες που προκαλούν βλάβη και στην προώθηση της επιδιόρθωσης των ιστών. Το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) θεωρούνταν ένας ιστός με προνομιακή ανοσία λόγω του διαχωρισμού από το περιφερικό ανοσοποιητικό σύστημα μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Ωστόσο, αυτή η έννοια έχει αναθεωρηθεί. Στην πραγματικότητα, μπορεί να προκληθεί μια ισχυρή έμφυτη ανοσολογική απόκριση ενάντια σε μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με παθογόνα (PAMPs) και σε μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με ενδογενή βλάβη (DAMPs). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η μικρογλοία και η αστρογλοία παρακολουθούν συνεχώς το παρέγχυμα του εγκεφάλου για να διατηρήσουν την ομοιότητα του ΚΝΣ απελευθερώνοντας νευροτροφικούς

παράγοντες, αφαιρώντας το συναπτικό γλουταμικό και αναδιαμορφώνοντας τις συνάψεις. Αυτά τα γλοιακά κύτταρα μπορούν να ενεργοποιηθούν από τα PAMP και τα DAMPs, όπως εκκρινόμενους παράγοντες από κατεστραμμένους νευρώνες ή πρωτεϊνικά συσσωματώματα (πχ. της α-συνουκλεΐνης), οδηγώντας σε επίμονη και χρόνια νευροφλεγμονή. Αν και μπορεί να μην αντιπροσωπεύει παράγοντα έναρξης σε όλες τις περιπτώσεις της νόσου Parkinson, μελέτες σε ανθρώπινα μεταθανάτια δείγματα αλλά και σε ζωικά μοντέλα έδειξαν ότι η χρόνια νευροφλεγμονή φαίνεται να είναι συμπαράγοντας για την εξέλιξη της [111].

Ένας σημαντικός αριθμός γεγονότων λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους απόκρισης, με ένα σύνολο κυττάρων τόσο αυτών που βρίσκονται στον εγκέφαλο αλλά και στην περιφέρεια να παίζουν σημαντικό ρόλο. Τα μικρογλοιακά κύτταρα είναι τα υπεύθυνα κύτταρα για τη μεσολάβηση της έμφυτης ανοσοαπόκρισης στον εγκέφαλο μέσω αντιγονοπαρουσιαστικών και τελεστικών λειτουργιών όπως η φαγοκυττάρωση, αποτελούν το 5-10% του συνόλου των εγκεφαλικών κυττάρων και το 20% του πληθυσμού των νευρογλοιακών κυττάρων του εγκεφάλου [112]. Αυτά τα κύτταρα εκκρίνουν νευροτροφικούς παράγοντες, απομακρύνουν τοξικές ουσίες και συμμετέχουν στην επιδιόρθωση των νευρώνων, την αναδιαμόρφωση και το συναπτικό κλάδεμα. Τα μικρογλοία βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας απουσία οποιουδήποτε ερεθίσματος, το οποίο επιτυγχάνεται από το ανοσοκατασταλτικό μικροπεριβάλλον που υπάρχει στο ΚΝΣ, όπου τα ανοσορυθμιστικά μόρια εκφράζονται και/ή απελευθερώνονται από υγιείς νευρώνες. Ωστόσο, η μικρογλοιακή ενεργοποίηση μπορεί να συμβεί ως απάντηση σε φλεγμονώδεις προκλήσεις από μια ποικιλία περιβαλλοντικών παραγόντων, μια διαδικασία που περιλαμβάνει μορφολογικές αλλαγές και ανοδική ρύθμιση ενός φάσματος ενδοκυτταρικών μορίων και επιφανειακών αντιγόνων. Τα μικρογλοία πολώνονται λειτουργικά προς τον κλασικό προφλεγμονώδη φαινότυπο M1 ή τον εναλλακτικό ανοσοκατασταλτικό και κυτταροπροστατευτικό φαινότυπο M2 [113]. Κατά τη διάρκεια του μετασχηματισμού, ο σε ηρεμία διακλαδισμένος φαινότυπος της μικρογλοίας μεταβάλλεται σε μια ενδιάμεση υπερ-διακλαδισμένη μορφολογία, η οποία αποτελείται από ένα μεγάλο σώμα και μια αμοιβαδοειδή μορφολογία για την έναρξη της φαγοκυττάρωσης. Μαζί με αυτές τις αλλαγές, τα μικρογλοία ρυθμίζουν προς τα πάνω τους δείκτες της κυτταρικής επιφάνειας της φλεγμονής, συμπεριλαμβανομένων των μορίων του κύριου συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης I και II, και των υποδοχέων κυτοκινών και χημειοκινών. Η κλασική ενεργοποίηση της μικρογλοίας οδηγεί στην απελευθέρωση προφλεγμονωδών μεσολαβητών όπως των IL-1β, IL-6, TNF-α, μονοξειδίου του αζώτου (NO), δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS), καθώς και πρωτεάσες. Από την άλλη, η μικρογλοία σε κατάσταση εναλλακτικής ενεργοποίησης σχετίζεται με νευροπροστασία και την παραγωγή των αντιφλεγμονωδών κυτοκινών IL-4, IL-13, IL-10 και TGF-β που ανταγωνίζονται τις δραστηριότητες των προφλεγμονωδών κυτοκινών για να αποκαταστήσουν την κανονική κατάσταση στον εγκέφαλο [114]. Η *in vivo* αξιολόγηση της μικρογλοιακής δραστηριότητας, σε εγκεφάλους ασθενών με Parkinson μέσω τομογραφίας εκπομπής ποζιτρονίων (PET), έδειξε ότι τα μικρογλοία ενεργοποιούνται νωρίς στη διαδικασία

της νόσου, αφήνοντάς τα να προάγουν τη νευροφλεγμονή σε ευάλωτες περιοχές του εγκεφάλου που σχετίζονται με τη νόσο, όπως το ραβδωτό σώμα και η μέλαινα ουσία [115]. Ακόμη, τα DAMPs που απελευθερώνονται από τους νεκρούς νευρώνες, ή οι προφλεγμονώδεις μεσολαβητές που εκκρίνονται από αστροκύτταρα (πχ CCL2), καθώς και οι λανθασμένες ή συσσωματωμένες πρωτεΐνες α-συνουκλεΐνης, μαζί με σήματα που μεταδίδονται από υποδοχείς τύπου Toll (TLRs), ευνοούν την απόκτηση του προφλεγμονώδους φαινοτύπου M1 από τα μικρογλοία, η οποία μπορεί να αλλάξει τη διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και να προκαλέσει εγκεφαλική διήθηση μέσω των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων. Έτσι, η χρόνια ενεργοποιημένη μικρογλοία εκκρίνει υψηλά επίπεδα προφλεγμονωδών μεσολαβητών που βλάπτουν τους νευρώνες και ενεργοποιούν περαιτέρω τη μικρογλοία, με αποτέλεσμα έναν κύκλο τροφοδοσίας που προάγει τη φλεγμονή και τον νευροεκφυλισμό [116].

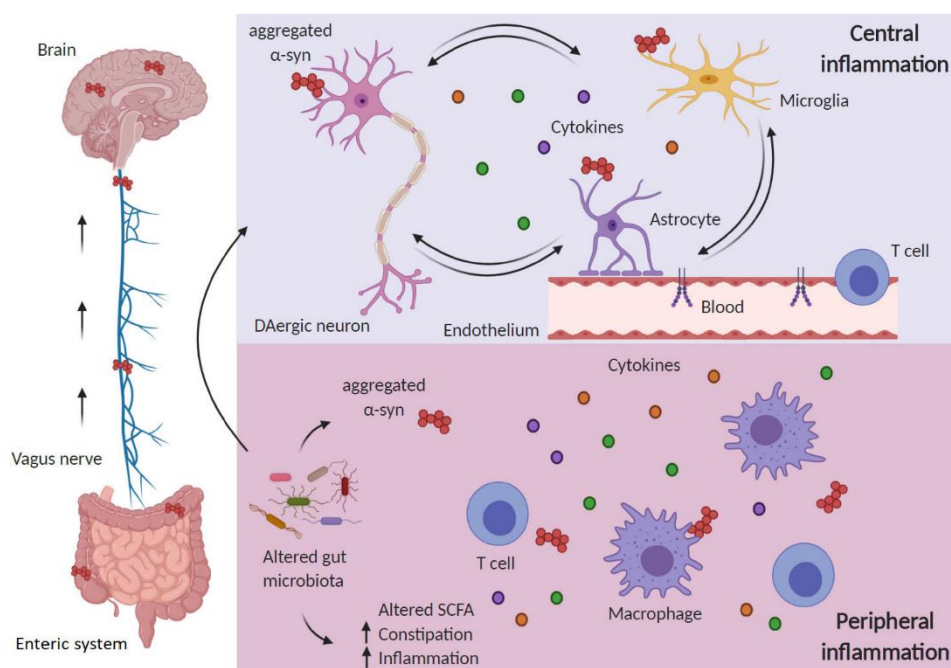
Επιπλέον, τα αστροκύτταρα είναι ο πιο άφθονος τύπος γλοιακών κυττάρων στο ΚΝΣ. Οι κυτταροπλασματικές προεκτάσεις τους συνδέονται απευθείας με τους νευρώνες και τα αιμοφόρα αγγεία στη νευροαγγειακή μονάδα. Τα αστροκύτταρα υποστηρίζουν μεταβολικά τους νευρώνες παρέχοντας γαλακτικό για τη μιτοχονδριακή αναπνοή και είναι προικισμένα με συγκεκριμένα συστήματα μεταφοράς όπως για τις ροές μηλικού-ασπαρτικού και γλουταμινικού-γλουταμίνης. Τα αστροκύτταρα συμμετέχουν επίσης στην επιδιόρθωση των ιστών, γεμίζοντας τα κενά που αφήνουν οι νεκροί νευρώνες και εκκρίνοντας τροφικούς παράγοντες που απαιτούνται για την επιβίωση των νευρώνων και τη συναπτική λειτουργία. Επιπλέον, συμμετέχουν στη διατήρηση και τη διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και της εγκεφαλικής ροής αίματος [117]. Όσο αφορά τη σχέση τους με τη φλεγμονή στη νόσο του Parkinson, έχουν βρεθεί ενδείξεις αστρογλοιοπάθειας στον εγκέφαλο παρκινσονικών τόσο της μέλαινας ουσίας όσο και του ραβδωτού σώματος, κάτι που επιβεβαιώθηκε και σε ζωικά μοντέλα [118]. Τα αντιδραστικά αστροκύτταρα βιώνουν αλλαγές γονιδιακής έκφρασης καθώς και μορφολογική αναδιάταξη. Οι μεταγραφικές αναλύσεις έχουν δείξει ότι μπορεί να υπάρχουν διαφορετικοί υποπληθυσμοί αντιδραστικών αστροκυττάρων ανάλογα με το μικροπεριβάλλον. Κατ' αναλογία με τη μικρογλοία, ο όρος A1 προσδιορίζει αστροκύτταρα που μοιάζουν με προφλεγμονώδη μικρογλοία M1 και εκκρίνουν IL1α και TNF-α. Αυτά τα κύτταρα A1 χάνουν τις φυσιολογικές τους λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της τροφής των νευρώνων, της λειτουργίας των συνάψεων και της φαγοκυττάρωσης των αλλοιωμένων συνάψεων και των υπολειμμάτων μυελίνης. Επιπλέον, εκκρίνουν ακόμη άγνωστους νευροτοξικούς παράγοντες που προάγουν το θάνατο νευρώνων και ολιγοδενδροκυττάρων. Από την άλλη πλευρά, τα αστροκύτταρα A2, που δημιουργούνται μετά από προσβολές, όπως η ισχαιμία, ρυθμίζουν ανοδικά πολλούς νευροτροφικούς παράγοντες και θεωρούνται νευροπροστατευτικοί. Πολύ σημαντικό είναι το γεγονός ότι τα αστροκύτταρα A1 είναι άφθονα στον εγκέφαλο των ατόμων με Parkinson και φαίνεται να ενεργοποιούνται, τουλάχιστον εν μέρει, μέσω της αλληλεπίδρασης με τη μικρογλοία. Επιπρόσθετα, μεταξύ των 17 μονογονιδιακών γονιδίων που είναι γνωστό ότι έχουν αιτιολογικό ρόλο στην ανάπτυξη της νόσου του Parkinson, οκτώ εκφράζονται στα αστροκύτταρα. Έτσι, τα παραπάνω δεδομένα

δείχνουν την άμεση συμβολή των αστροκυττάρων στη φλεγμονή που δημιουργείται στη συγκεκριμένη νόσο [119].

Αξιοσημείωτο κρίνεται επίσης το γεγονός ότι οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως η IL1 β ή ο TNF-a και άλλα μόρια που απελευθερώνονται από την ενεργοποιημένη μικρογλοία και την αστρογλοία, επηρεάζουν τις λειτουργίες των ενδοθηλιακών κυττάρων. Επιπλέον, τα ενδοθηλιακά κύτταρα του εγκεφάλου εκφράζουν επίσης TLRs και προκαλούν μια φλεγμονώδη απόκριση, που προέρχεται από το ενδοθήλιο, σε DAMPs και PAMPs [120]. Τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα παράγουν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες (όπως IL1 β , IL6, TNF-a), χημειοκίνες (όπως CCL2, CXCL1) και μόρια προσκόλλησης (όπως το μόριο διακυτταρικής προσκόλλησης 1 – ICAM1, το μόριο προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων 1 – VCAM1, σελεκτίνες), που συμμετέχουν στη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου. Υπό αυτές τις συνθήκες, συμβάλλουν στη στρατολόγηση των κυκλοφορούντων κυττάρων του αίματος στο μικροαγγειακό σύστημα του εγκεφάλου μέσω της έκφρασης μορίων προσκόλλησης. Είναι ενδιαφέρον ότι αναφέρθηκαν υψηλά επίπεδα του διαλυτού VCAM1 στο πλάσμα παρκινσονικών ασθενών σε σύγκριση με μάρτυρες ελέγχου, υποδεικνύοντας ισχυρές συνδέσεις αίματος-εγκεφάλου μέσω της κυτταρικής κυκλοφορίας [121]. Ακόμη, οι αγγειακές ανωμαλίες σε ασθενείς με Parkinson που σχετίζονται με νευροφλεγμονή συνοδεύονται από διαρροή του αιματοεγκεφαλικού φραγμού στο ραβδωτό σώμα και στον μεσεγκέφαλο. Έτσι, η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων σε ασθενείς με Parkinson έχει αποκαλύψει μια σχέση μεταξύ της διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, της διήθησης των ανοσοκυττάρων του αίματος, όπως τα λεμφοκύτταρα CD4⁺ και CD8⁺, και της απώλειας νευρώνων [122]. Συνεπώς, εφόσον η νευροαγγειακή μονάδα μεταβάλλεται στην νόσο του Parkinson, επιτρέπει όχι μόνο την ενεργοποίηση της έμφυτης ανοσοαπόκρισης, αλλά και τη στρατολόγηση και ενεργοποίηση του προσαρμοστικού βραχίονα του ανοσοποιητικού συστήματος.

Τέλος, το εντερικό νευρικό σύστημα και το ανοσοποιητικό σύστημα είναι στενά συνδεδεμένα και επηρεάζονται από τη μικροχλωρίδα του εντέρου και μαζί αποτελούν ένα πεδίο εντατικής έρευνας λόγω της επίδρασής του στην νόσο του Parkinson. Η υπόθεση του «άξονα εντέρου-εγκεφάλου» υποστηρίζει ότι οι αλλαγές στη μικροχλωρίδα του εντέρου μπορεί να ευνοούν τη συσσώρευση α -συνουκλεΐνης και είναι υπεύθυνες για μια φλεγμονώδη απόκριση στην περιφέρεια, η οποία περιλαμβάνει αυξημένα επίπεδα κυτοκινών και ενεργοποιημένα T κύτταρα. Η συσσωματωμένη α -συνουκλεΐνη έχει προταθεί ότι εξαπλώνεται από την περιφέρεια στον εγκέφαλο μέσω του πνευμονογαστρικού νεύρου με τρόπο που μοιάζει με prion. Μόλις εισέλθει στον εγκέφαλο, η πρωτεϊνοπάθεια μαζί με άλλους παράγοντες πυροδότησης (μιτοχονδριακή βλάβη, ROS, κ.λπ.) θα διατηρήσουν την κεντρική φλεγμονή σε έναν φαύλο κύκλο μεταξύ των νεκρών ντοπαμινεργικών νευρώνων, των νευρογλοιακών κυττάρων και του ενεργοποιημένου ενδοθηλίου, που επιδεινώνεται περαιτέρω από τη διείσδυση των περιφερειακών ανοσοκυττάρων, εξασφαλίζοντας ένα πρόσφορο έδαφος για την περαιτέρω ανάπτυξη της νόσου του Parkinson [123]. Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα

παραπάνω γεγονότα, συνάγετε το συμπέρασμα ότι η νευροφλεγμονή μπορεί να θεωρηθεί ως συνέπεια πολύπλοκης σηματοδότησης μεταξύ αίματος, εντέρου και ΚΝΣ.



Εικόνα 13: Απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ της κεντρικής και περιφερειακής φλεγμονής που συντελείτε στη νόσο του Parkinson [124].

1.3.2 Ο ρόλος της σηματοδότησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB στη νευρωνική λειτουργία και τη νευροφλεγμονή

Οι φλεγμονώδεις μεσολαβητές που συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό στην πρόκληση χρόνιας φλεγμονής και απώλειας των ντοπαμινεργικών νευρώνων στην νόσο του Parkinson δείχνουν κοινό χαρακτηριστικό ότι ρυθμίζονται από τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB. Ο NF-κB ρυθμίζει την έκφραση πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό θάνατο και την κυτταρική επιβίωση εκφράζοντας προ-αποπτωτικά και αντι-αποπτωτικά γονίδια, που φαίνεται να εμπλέκονται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Επομένως, ο NF-κB εξυπηρετεί διπλή λειτουργία, είτε ως προστατευτικός μηχανισμός για την επιβίωση των κυττάρων είτε προάγοντας τον κυτταρικό θάνατο διεγείροντας τις ενδοκυτταρικές οδούς που εμπλέκονται στη βλάβη του DNA [125]. Η σηματοδότηση του στο κεντρικό νευρικό σύστημα έχει ζωτικό ρόλο ρυθμίζοντας ορισμένες λειτουργίες όπως τη πλαστικότητα των νευρώνων, τη νευρωνική ανάπτυξη και επίσης ρυθμίζει ορισμένες πρωτεΐνες ως μηχανισμούς άμυνας που δρουν ως απόκριση σε συγκεκριμένες συνθήκες κυτταρικού στρες [126]. Στους νευρώνες, η μεταγραφή μέσω των διμερών p50/p65 και p50/p50 μπορεί να ενεργοποιηθεί από γλουταμινεργικές συναπτικές εισροές μέσω της Ca^{2+} /εξαρτώμενης από καλμοδουλίνη πρωτεϊνικής κινάσης II (CaMKII) και της τοπικής υπομεμβρανόδους αύξησης ιόντων Ca^{2+} . Ενώ τα διμερή p50/p50 εντοπίζονται στο

κυτταρόπλασμα, τα διμερή p50/p65 βρίσκονται σε συναπτικά τερματικά από όπου, μετά από διέγερση γλουταμικού ή N-μεθυλ-D-ασπαρτικού (NMDA), μετατοπίζονται για να φτάσουν στον πυρήνα και μεταφράζουν τα συναπτικά σήματα σε τροποποιημένη γονιδιακή έκφραση [127]. Έχει δειχθεί ότι knockout ποντίκια για την υπομονάδα p65, παρουσιάζουν ελλείμματα χωρικής μάθησης, υποστηρίζοντας έτσι ότι η πυρηνική μετατόπιση του NF-κB και η ενεργοποίηση γονιδίων διέπουν τις μακροπρόθεσμες αλλαγές στη νευρωνική λειτουργία των ενθλίκων, που προκαλούνται από τη συναπτική διέγερση. Επίσης, ο NF-κB διασφαλίζει τη διαφοροποίηση των κυττάρων Schwann και της μυελίνωσης των περιφερειακών αξόνων, υποδηλώνοντας έναν εξέχον ρόλο και στην ανάπτυξη και πλαστικότητα του περιφερικού νευρικού συστήματος [128].

Τα περισσότερα από τα ερεθίσματα που ενεργοποιούν τον NF-κB στο ανοσοποιητικό σύστημα, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-άλφα (TNF-α) ή η ιντερλευκίνη 1 (IL-1), οι ιογενείς λοιμώξεις και το οξειδωτικό στρες, ασκούν τα ίδια επίδραση στο ΚΝΣ. Παραδόξως, η ενεργοποίηση του NF-κB με τη μεσολάβηση του TNF-α παίζει μοναδικό ρόλο στη διαμεσολάβηση της νευρωνικής πλαστικότητας στον υπόκαμπο χωρίς να προκαλεί νευροφλεγμονώδεις αλλαγές [129]. Τα γονίδια στόχοι του NF-κB στο ΚΝΣ χαρακτηρίζονται μόνο εν μέρει, αλλά είναι προβλέψιμο ότι μπορεί να εμφανίζουν σημαντικές διαφορές στην οργάνωση του προαγωγέα τους σε σύγκριση με τα κανονικά γονίδια που επηρεάζονται στο ανοσοποιητικό σύστημα. Σε αυτή τη γραμμή, έχει βρεθεί η παρουσία δύο θέσεων δέσμευσης του NF-κB εντός της ρυθμιστικής περιοχής του υποδοχέα ντοπαμίνης D2, ως απόδειξη της εμπλοκής του στη ρύθμιση των νευρωνικών αποκρίσεων στη ντοπαμινεργική διαμεσολαβούμενη μετάδοση σημάτων [130].

Στα νευρογλοιακά κύτταρα, η βασική δραστηριότητα του NF-κB είναι πολύ χαμηλή. Στη φλεγμονή, η ενεργοποίηση της μικρογλοίας έχει ως αποτέλεσμα τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του NF-κB, όπως του μονοξειδίου του αζώτου (NO), της IL-1β και του TNF-α που με τη σειρά τους επάγουν τη σηματοδότηση του NF-κB με επακόλουθη ενίσχυση των φλεγμονωδών μεσολαβητών που επιδεινώνουν τον θάνατο των νευρωνικών κυττάρων. Η οδός σηματοδότησης του NF-κB στη μικρογλοία φαίνεται επίσης να συμμετέχει ενεργά στους μηχανισμούς πλαστικότητας και τη νευρωνική ομοιόσταση ως απόκριση σε τραυματισμό. Ομοίως, εκτός από την πρόκληση έκφρασης προφλεγμονωδών γονιδίων, στα αστροκύτταρα ο NF-κB φαίνεται να παίζει ρόλο στον κεντρικό έλεγχο του μεταβολισμού, προάγοντας την εκκαθάριση του γλουταμικού από τις συνάψεις, στον τερματισμό των διεγερτικών σημάτων [131].

Συλλογικά, τα παραπάνω ευρήματα υποστηρίζουν ότι σε φυσιολογικές συνθήκες, ο NF-κB έχει αντι-αποπτωτική λειτουργία, αλλά σε παθολογικές καταστάσεις, εμπλέκεται στην απόπτωση ανάλογα με το ερέθισμα. Οι ανισορροπίες στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB μπορεί να συμβάλλουν σημαντικά στην παθογένεση της νόσου του Parkinson ευνοώντας τη συσσώρευση και την εξάπλωση της α-συνουκλεΐνης και προάγοντας την ενεργοποίηση των γλοιακών κυττάρων και των συνακόλουθο θάνατο των νευρωνικών κυττάρων. Αυτές οι ίδιες

διαδικασίες μπορεί να ενισχύσουν την ενεργοποίηση του NF-κB, ξεκινώντας έναν φαύλο κύκλο που προκαλεί την εξέλιξη της νόσου.

2. Σκοπός της εργασίας

Οι νευρολογικές διαταραχές αποτελούν μια από τις κύριες πηγές αναπηρίας που πλήττουν τον κόσμο, με την ταχύτερα αναπτυσσόμενη νευρολογική διαταραχή παγκοσμίως να φαίνεται πως είναι η νόσος του Parkinson. Χρόνια έντονης έρευνας, έχουν καταδείξει σημαντική την αλληλεπίδραση των γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, σε συνάρτηση με την ηλικία και το βιολογικό φύλο, ως κύριους παράγοντες που συντελούν στην πιθανή εμφάνιση της. Αρκετά πειραματικά στοιχεία έχουν πείσει τους ερευνητές για τον κρίσιμο ρόλο του οξειδωτικού στρες, της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας και της φλεγμονής στην έναρξη και την εξέλιξη της. Καθώς η χρόνια νευροφλεγμονή έχει λάβει καίρια θέση στην παθογένεση της, αυξανόμενο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι νευροφλεγμονώδεις οδοί σηματοδότησης στο κεντρικό νευρικό σύστημα που συμβάλλουν στην πολύπλοκη παθολογία της νόσου του Parkinson. Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB παίζει ζωτικό ρόλο τόσο στον φυσιολογικό προγραμματισμό του εγκεφάλου, όσο και στη δημιουργία του περιβάλλοντος της νευροφλεγμονής ρυθμίζοντας την έκφραση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων που συμβάλλουν επίσης στην έναρξη της ανοσολογικής απόκρισης έναντι της βλάβης και παράγουν φλεγμονώδεις μεσολαβητές. Αναδυόμενα στοιχεία που προκύπτουν από μελέτες, υποστηρίζουν την πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ της απορρύθμισης του NF-κB και του εκφυλισμού των νευρώνων της ντοπαμίνης στη νόσο του Parkinson, μέσω της εγκαθίδρυσης χρόνιας φλεγμονής.

Στο πλαίσιο αυτό, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας, αποτέλεσε η διερεύνηση των επιπέδων ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, τόσο σε ασθενείς με τη νόσο του Parkinson όσο και σε υγιή άτομα. Ειδικότερα, μελετήθηκαν τα επίπεδα του NF-κB σε κύτταρα της έμφυτης ανοσίας, όπως τα μακροφάγα (CD14⁺) αλλά και της επίκτητης ανοσίας, δηλαδή στα T και B λεμφοκύτταρα (CD3⁺, CD19⁺). Επίσης, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός δύο προφλεγμονοδών κυτοκινών, του TNF και της CCL2, στον ορό του αίματος ασθενών με νόσο του Parkinson και των υγιών ατόμων, προκειμένου να ελεγχθεί αν τα επίπεδά τους στην κυκλοφορία σχετίζονται με τη νόσο.

3. Υλικά και μέθοδοι

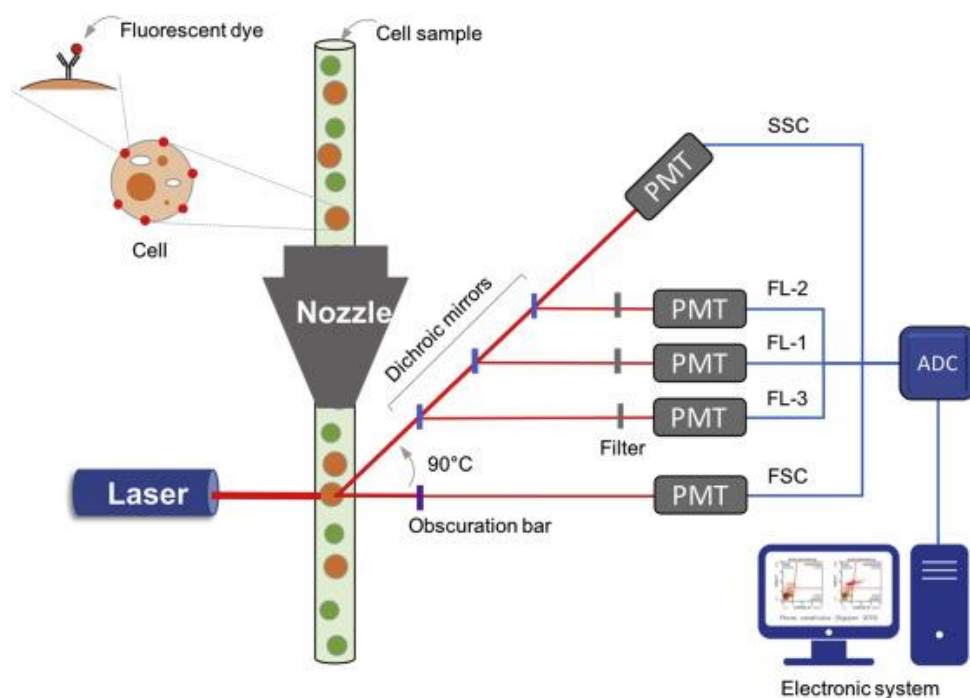
Οι εργαστηριακές τεχνικές που θα αναλυθούν παρακάτω πραγματοποιήθηκαν εξίσου στο Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του τμήματος Ιατρικής και στο εργαστήριο Βιοοργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Επίσης, η παρούσα μελέτη εγκρίθηκε από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας και από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Πριν από την συλλογή των δειγμάτων, όλοι οι συμμετέχοντες ενημερώθηκαν για τον σκοπό της μελέτης και έδωσαν την απαραίτητη ενυπόγραφη συγκατάθεση τους.

3.1 Κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια τεχνολογία που χρησιμοποιείται κυρίως στη βιολογία και την ιατρική, παρέχοντας ταχεία πολυπαραμετρική ανάλυση μεμονωμένων μικρών σωματιδίων που αιωρούνται σε διάλυμα, όπως κύτταρα ή μικροσωματίδια. Ο όρος κυτταρομετρία ροής, επινοήθηκε τη δεκαετία του 1970, έχοντας ωστόσο τις ρίζες της στην εφεύρεση του Wallace Coulter το 1953 και την αρχή που διατύπωσε, κατά την οποία οι όγκοι των κυττάρων ή σωματιδίων συνάγονται από μια παρατηρούμενη αλλαγή στην σύνθετη αντίσταση (ηλεκτρική αγωγιμότητα) καθώς ρέουν μέσα από ένα μικρό στόμιο [132,133]. Η σύγχρονη κυτταρομετρία ροής βασίζεται σε lasers που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση των φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών κυττάρων ή σωματιδίων σε ένα ετερογενές μίγμα ρευστού καθώς διέρχονται από μια πηγή φωτός. Καταρχάς, τα κυτταρικά συστατικά χρωματίζονται με χρωστικές σημασμένες με φθορισμό, έτσι ώστε η ποσότητα ενός συγκεκριμένου κυτταρικού συστατικού να υπολογίζεται με βάση την ένταση φθορισμού. Όταν τα εναιωρήματα των κυττάρων εγχέονται στο κυτταρόμετρο ροής, τα κυτταρικά συστατικά διεγείρονται από το laser, το οποίο εκπέμπει φως σε μια ζώνη μηκών κύματος. Ως εκ τούτου, η ένταση φθορισμού μετράται για κάθε συγκεκριμένο κύτταρο με ρυθμό χιλιάδων σωματιδίων ανά δευτερόλεπτο. Αυτό επιτρέπει την ταχεία και ποσοτική ανάλυση των κυττάρων σε ένα ετερογενές υγρό μίγμα [134].

Οι αναλύσεις κυτταρομετρίας ροής διεξάγονται σε κυτταρόμετρα που συνήθως αποτελούνται από τρία βασικά στοιχεία: ένα υδροδυναμικό, ένα οπτικό και ένα ηλεκτρονικό σύστημα, όπως απεικονίζονται και στην Εικόνα 14. Εν συντομία, το υδροδυναμικό σύστημα μεταφέρει τα σημασμένα κύτταρα μεμονωμένα, από ένα εναιώρημα, προς ανάλυση μέσω της διασποράς δέσμης φωτός από ένα ή πολλαπλά laser. Αυτές οι φωτεινές πηγές παράγουν σήματα σε συγκεκριμένη συχνότητα τα οποία συλλέγονται, φιλτράρονται και κατευθύνονται από το οπτικό σύστημα σε φωτοανιχνευτές. Οι φωτοανιχνευτές, με τη σειρά τους, μετρούν τα σήματα φωτός της

σκέδασης και τα μετατρέπουν σε ηλεκτρονικά σήματα τα οποία μετατρέπονται από το ηλεκτρονικό σύστημα σε δεδομένα για αποθήκευση, οπτικοποίηση και επακόλουθη ανάλυση από ειδικό λογισμικό [135]. Υπάρχουν δύο είδη μέτρησης της σκέδασης φωτός από δύο οπτικούς ανιχνευτές, συμπεριλαμβανομένης της διασποράς προς τα εμπρός (Forward Scatter – FSC) και της πλευρικής σκέδασης (Side Scatter – SSC). Η FSC διασκορπίζεται κατά μήκος της διαδρομής του laser που επιτρέπει την αναγνώριση των κυττάρων κατά μέγεθος, ενώ η μέτρηση της SSC είναι υπό γωνία 90° σε σχέση με το laser, κάτι που είναι χρήσιμο για την αναγνώριση της εσωτερικής πολυπλοκότητας (π.χ. κοκκοποίηση) ενός κυττάρου. Ο συνδυασμός FSC και SSC επιτρέπει τη φυσική ταξινόμηση ετερογενών μιγμάτων κυττάρων σε διαφορετικούς πληθυσμούς σε εξειδικευμένα κυτταρόμετρα ροής με δυνατότητες ταξινόμησης. Τα όργανα που χρησιμοποιούνται για την κυτταρομετρία ροής έχουν εξελιχθεί τις τελευταίες δεκαετίες, όπως επίσης και η διαθεσιμότητα των αντιδραστηρίων, ιδιαίτερα των φθοριοχρωμάτων που χρησιμοποιούνται για τη σύζευξη με μονοκλωνικά αντισώματα, οδηγώντας έτσι σε εκρηκτική αύξηση του αριθμού των παραμέτρων που χρησιμοποιούνται στα πειράματα κυτταρομετρίας ροής.



Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση των συστημάτων ενός κυτταρόμετρου ροής [134].

Το τελευταίο μέρος ενός πειράματος κυτταρομετρίας ροής, αποτελεί η ανάλυση των δεδομένων που εξάγονται από το κυτταρόμετρο και η οποία πραγματοποιείται με τη βοήθεια ειδικών λογισμικών σε ηλεκτρονικούς υπολογιστές. Το παραδοσιακό ιστόγραμμα δύο παραμέτρων (dot plot) εξακολουθεί να χρησιμοποιείται συχνά. Ωστόσο, η αύξηση του αριθμού των παραμέτρων και η πολυπλοκότητα στα πειράματα οδηγεί στη χρήση νεότερων αλγορίθμων κατηγορικής ανάλυσης δεδομένων. Αυτές οι

βελτιωμένες μέθοδοι εξόρυξης δεδομένων επιτρέπουν την εξαγωγή χρήσιμων πληροφοριών από τα δεδομένα που είναι πλέον διαθέσιμα από την κυτταρομετρία ροής.

Η συγκεκριμένη τεχνολογία συνιστά ένα ισχυρό εργαλείο που βρίσκει εφαρμογή σε πολλούς κλάδους όπως η ανοσολογία, η ιολογία, η μοριακή βιολογία, η βιολογία του καρκίνου και η παρακολούθηση μολυσματικών ασθενειών. Για παράδειγμα, είναι πολύ αποτελεσματική για τη μελέτη του ανοσοποιητικού συστήματος και την απόκρισή του σε μολυσματικές ασθένειες. Επιτρέπει τον ταυτόχρονο χαρακτηρισμό μικτών πληθυσμών κυττάρων από αίμα και μυελό των οστών καθώς και στερεών ιστών που μπορούν να διαχωριστούν σε μεμονωμένα κύτταρα όπως λεμφαδένες, σπλήνα, βλεννογόνους ιστούς και συμπαγείς όγκους. Τέλος, εκτός από την ανάλυση πληθυσμών κυττάρων, μια κύρια εφαρμογή της κυτταρομετρίας ροής είναι η ταξινόμηση των κυτταρικών πληθυσμών σε μεμονωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες για περαιτέρω ανάλυση [136].

3.1.1 Πειραματική διαδικασία

Στη παρούσα πειραματική μέθοδο, έγινε χρήση βιολογικού υλικού από δείγματα περιφερικού αίματος 10 ασθενών με νόσο του Parkinson και 10 υγιών εθελοντών (control), τα οποία προήλθαν από τη Νευρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Τα δείγματα αίματος τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια με EDTA για την αποφυγή πήξης τους, διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (20 – 24 °C) και επεξεργάστηκαν την ίδια ημέρα λήψης τους.

<i>Υλικά</i>
1. Βαθμονομημένες πιπέτες (2-20μl, 10-100μl, 20-200μl, 200-1000μl)
2. Ρύγχη πιπετών (Tips)
3. Δοκιμαστικοί σωλήνες
4. Φυγόκεντρος
5. Κυτταρόμετρο ροής (Cytomics FC500 Flow Cytometer by Beckman Coulter Life Sciences)
6. Ψυγείο
7. Στατό

Αντιδραστήρια

1. VersaLyse Lysing Solution (Beckman Coulter)
2. Fixation Buffer (Invitrogen)
3. FcR Blocking antibody (Beckman Coulter)
4. anti – human – CD3 – FITC (Beckman Coulter)
5. anti – human – CD19 – PC7 (Beckman Coulter)
6. anti – human – CD14 – PC5 (Beckman Coulter)
7. anti – human – CD40 – PE (Beckman Coulter)
8. anti – human p65/NFκB-PE antibody (R&D SYSTEMS)
9. Phosphate Buffer Saline pH 7,2 (PBS)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιλάμβανε τα παρακάτω στάδια:

- Αρχικά, 300μl αίματος μεταφέρθηκαν από κάθε δείγμα σε δοκιμαστικό σωλήνα και προστέθηκαν 2ml PBS ώστε να φυγοκεντρηθούν για 2min στις 1250-1500 rpm/350-500 x g.
- Έπειτα, αφαιρέθηκε προσεκτικά το υπερκείμενο και προστέθηκε 1ml VersaLyse Lysing Solution και το διάλυμα επώαστηκε για 15min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Όταν το διάλυμα έγινε διαυγές, προστέθηκαν 2ml PBS για να σταματήσει η αντίδραση λύσης των κυττάρων και φυγοκεντρήθηκαν για 3min στις 1250-1500 rpm/350-500 x g.
- Μετά τη φυγοκέντρηση αποχύθηκε το υγρό που περιείχε ο δοκιμαστικός σωλήνας και αφαιρέθηκε προσεκτικά με πιπέτα η περίσσεια αυτού.
- Στη συνέχεια, προστέθηκαν στο σωλήνα 290μl PBS και 10μl FcR Blocking antibody και το διάλυμα επώαστηκε για 20min σε θερμοκρασία δωματίου.

Περνώντας στην επόμενη φάση, μοιράστηκαν 100μl διαλύματος, του προηγούμενου βήματος, σε 3 δοκιμαστικούς σωλήνες, ώστε να ακολουθήσει η επώαση τους με τα αντίστοιχα αντισώματα, για κάθε δείγμα, όπως περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα:

Αντίσωμα	NF-κB Δείγμα	CD40 Δείγμα	NF-κB Control Δείγμα
anti – CD3 – FITC	10μl	10μl	10μl
anti – CD19 – PC7	10μl	10μl	10μl
anti – CD14 – PC5	10μl	10μl	10μl
anti – CD40 – PE	—	10μl	—

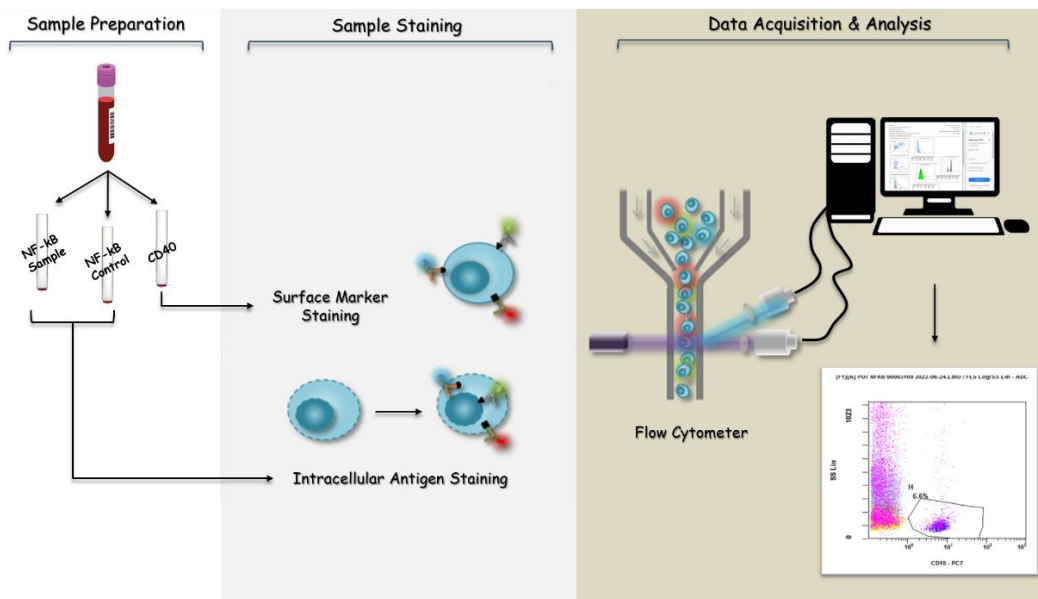
- Τα δείγματα επώαστηκαν για 30min στους 4°C.
- Πραγματοποιήθηκε πλύση των δειγμάτων με PBS και φυγοκεντρήθηκαν για 3min στις 1250-1500 rpm/350-500 x g.

Σε αυτό το σημείο αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και στα CD40 δείγματα προστέθηκε PBS μέχρις τελικού όγκου διαλύματος περίπου 250-300μl και ήταν έτοιμα προς ανάλυση, μιας και έχουμε εξωκυττάρια σήμανση με αντισώματα, ενώ τα δείγματα για τον NF-kB/p65, που απαιτούν ενδοκυττάριο εντοπισμό του, συνέχισαν ως εξής:

- Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 100μl Fixation Buffer A, για μονιμοποίηση τους, και αφέθηκαν να επωαστούν για 15min στους 4°C.
- Πραγματοποιήθηκε πλύση των δειγμάτων με PBS, φυγοκέντρησή τους για 3min στις 1250-1500 rpm/350-500 x g και μετά απορρίφθηκε το υπερκείμενο.
- Ακολούθως, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 500μl παγωμένης μεθανόλης (90% σε νερό / -20 °C) ώστε να δημιουργηθούν οπές στη μεμβράνη επιτρέποντας έτσι στα ενδοκυτταρικά αντισώματα χρώσης να εισέλθουν αποτελεσματικά στα κύτταρα. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν για επώαση στους 4°C για 20min.
- Εν συνεχεία, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 5min στις 1250-1500 rpm/350-500 x g και έπειτα απορρίφθηκε το υπερκείμενο.
- Αμέσως μετά, έγινε πλύση των δειγμάτων με PBS και φυγοκέντρησή τους για 3min στις 1250-1500 rpm/350-500 x g και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο.
- Έπειτα, προστέθηκε στα δείγματα το αντίσωμα έναντι της p65/NFkB ως εξής:

Αντίσωμα	NF-kB Δείγμα	NF-kB Control Δείγμα
anti – p65/NF-kB – PE	10μl	—

- Τα δείγματα επώαστηκαν για 30min στους 4°C.
- Πραγματοποιήθηκε πλύση των δειγμάτων με PBS, φυγοκεντρήθηκαν για 3min στις 1250-1500 rpm/350-500 x g και απορρίφθηκε το υπερκείμενο.
- Τέλος, σε κάθε δείγμα προστέθηκε PBS μέχρις τελικού όγκου διαλύματος περίπου 250-300μl και ήταν πλέον έτοιμα προς ανάλυση.



Εικόνα 15: Διαγραμματική σύνοψη των σταδίων που πραγματοποιήθηκαν για την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας, στα πλαίσια της κυτταρομετρίας ροής.

3.2 Ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA (Enzyme – linked Immunosorbent Assay)

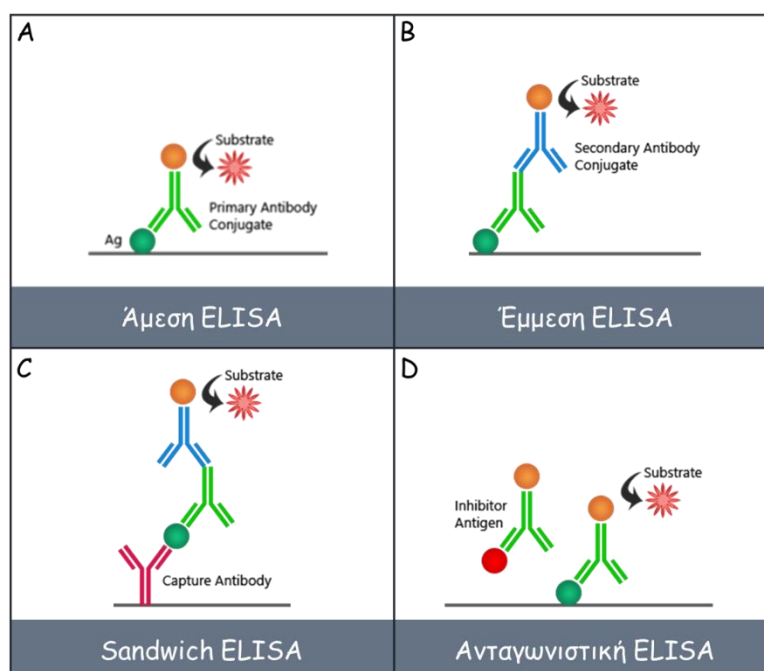
Η ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA) αποτελεί μια ανοσολογική ανάλυση, η οποία σχεδιάστηκε και περιγράφηκε, ανεξάρτητα, από τους Engvall και Perlmann στο Πανεπιστήμιο της Στοκχόλμης στη Σουηδία, και τους Anton Schuurs και Bauke van Weemen στην Ολλανδία, το 1971. Οι ερευνητές, αναζήτησαν μια μέθοδο ανοσοδοκιμασίας ικανή να ανιχνεύσει την παρουσία αντιγόνων ή αντισωμάτων για να αντικαταστήσει τη ραδιοανοσοδοκιμασία, η οποία χρησιμοποιούσε δυνητικά επικίνδυνα ραδιενεργά επισημασμένα αντιγόνα ή αντισώματα, και έτσι επινόησαν μια εναλλακτική λύση που βασίζεται σε ένζυμα. Όπως και άλλες ανοσοδοκιμασίες, βασική αρχή στην οποία στηρίζεται, αποτελεί η ειδική δέσμευση αντιγόνου (Ag) – αντισώματος (Ab) και η οποία χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό ενός μεγάλου εύρους διαλυτών ουσιών όπως αντισώματα, πεπτίδια, πρωτεΐνες, και ορμόνες. Συνήθεις τύποι δειγμάτων που χρησιμοποιούνται σε αυτές τις αναλύσεις, αποτελούν ο ορός, το πλάσμα, τα υπερκείμενα κυτταροκαλλιιεργειών, κυτταρολύματα, σάλιο και ούρα, αλλά θεωρητικά, οι περισσότεροι τύποι υγρών δειγμάτων θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την πραγματοποίησή τους.

Τυπικά, σε μια ELISA, το αντιγόνο (μακρομόριο στόχος) ακινητοποιείται σε μια στερεή επιφάνεια (φρεάτιο μικροπλάκας) είτε απευθείας είτε από ένα ειδικό αντίσωμα γνωστό ως «αντίσωμα σύλληψης». Έπειτα, προστίθεται ένα «πρωτογενές αντίσωμα ανίχνευσης», σχηματίζοντας, έτσι, ένα σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος. Το πρωτεύον αντίσωμα ανίχνευσης είναι είτε απευθείας σημασμένο με ένα ένζυμο, είτε

είναι το ίδιο συνδεδεμένο σε ένα δευτερεύον αντίσωμα γνωστό ως «αντίσωμα δευτερογενούς αντίχενυσης». Η προσθήκη ενός υποστρώματος παράγει ένα έγχρωμο σήμα που υποδεικνύει την παρουσία του αντιγόνου στο δείγμα, ενώ η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας από ένα φασματοφωτόμετρο ELISA (multi-well ELISA reader), καθίσταται ανάλογη με την ποσότητα του αντιγόνου στο δείγμα [137].

Οι ELISA χωρίζονται ανάλογα με τον τρόπο ακινητοποίησης και αντίχενυσης του αντιγόνου, με αποτέλεσμα να έχουμε τις 4 ακόλουθες κατηγορίες:

1. Άμεση ELISA
2. Έμμεση ELISA
3. Sandwich ELISA
4. Ανταγωνιστική ELISA, ο τρόπος λειτουργίας των οποίων φαίνεται σχηματικά στην Εικόνα 16.



Εικόνα 16: Σχηματική περιγραφή των μεθόδων άμεσης (A), έμμεσης (B), sandwich (C) και ανταγωνιστικής (D) ELISA.

Η μέθοδος ELISA αξιοποιείται σε μια μεγάλη ποικιλία εφαρμογών που αφορούν πολλούς κλάδους της βιομηχανίας αλλά και ως ένα ισχυρό όπλο της διαγνωστικής πρακτικής. Στη βιομηχανία τροφίμων αποτελεί την κύρια μέθοδο για τον εντοπισμό τροφικών αλλεργιογόνων, όπως αυτά που περιέχονται στο γάλα, τα φιστίκια, τα καρύδια, τα αμύγδαλα και τα αυγά. Επίσης, χρησιμοποιείται για να επιβεβαιώσει την αυθεντικότητα των προϊόντων διατροφής, με σκοπό την αποφυγή πιθανών οικονομικών απωλειών που προκαλούνται από δόλια υποκατάσταση. Στη βιομηχανία παραγωγής εμβολίων, αποσκοπεί στον έλεγχο για την αντίχενυση της παρουσίας αντισωμάτων έναντι ορισμένων τύπων αντιγόνων στον ορό ανθρώπων ή ζώων, τα οποία ενέθηκαν σκόπιμα στον εκάστοτε ξενιστή και αποτελούν πιθανούς υποψήφιους

για την ανάπτυξη εμβολίων. Στον τομέα της διάγνωσης, η ELISA έχει αποδειχθεί ότι είναι μια ικανή πλατφόρμα που εφαρμόζεται για την ανίχνευση ποικίλων τύπων ασθενειών σε ανθρώπους και ζώα, είτε οφείλονται σε ιούς, είτε σε μολυσματικούς παράγοντες ή και ακόμη την πιθανή ανάπτυξη καρκίνου. Τέλος, η ELISA μπορεί να ανιχνεύσει ορισμένες από τις πρωτεΐνες στο μητρικό αίμα, το σάλιο ή τα ούρα στα αρχικά στάδια της εγκυμοσύνης και, επομένως, η τεχνολογία της αξιοποιείται στην κατασκευή των τεστ εγκυμοσύνης [138].

3.2.1 Πειραματική διαδικασία

Για τη πραγματοποίηση της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας, έγινε χρήση βιολογικού υλικού από δείγματα ορού αίματος 110 ασθενών με νόσο του Parkinson και 38 υγιών εθελοντών (control), τα οποία προήλθαν από τη Νευρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας και η συλλογή των οποίων πραγματοποιήθηκε κατά το χρονικό διάστημα Απρίλιος 2018 – Ιούνιος 2022. Αρχικά, εφόσον έγινε η λήψη περιφερικού αίματος από κάθε συμμετέχοντα, αυτό τοποθετήθηκε σε φιαλίδιο δειγματοληψίας με κίτρινο πώμα, το οποίο περιέχει ένα gel που δημιουργεί φραγμό μεταξύ ορού και κυττάρων μετά τη φυγοκέντρηση του. Στη συνέχεια, τα δείγματα παρέμειναν για μικρό χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να πήξει το αίμα και έπειτα φυγοκεντρήθηκαν για 10min στις 2500-3000rpm, με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό των έμμορφων στοιχείων του αίματος και του ορού. Ακολούθως, έγινε η μετάγγιση του ορού από το συλλεχθέν αίμα των ατόμων σε Eppendorf των 2ml και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι την διεξαγωγή των πειραμάτων.

Έχοντας ως στόχο τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων των κυτοκινών του παράγοντα νέκρωσης όγκου-άλφα (TNF-α) και της πρωτεΐνης χημειοτακτισμού μονοκυττάρων (CCL2) στον ορό αίματος των ατόμων που συμμετείχαν στη μελέτη, η διαδικασία αυτή έλαβε χώρα με τη βοήθεια εμπορικά διαθέσιμων σετ αντιδραστηρίων (kits), τα οποία παρατίθενται αντίστοιχα στον παρακάτω πίνακα:

Εταιρεία κατασκευής	Εμπορική ονομασία kit	Κωδικός καταλόγου
Invitrogen	Human TNF-α ELISA Kit	KHC3011
		KHC3012
		KHC3012
R&D Systems	Human CCL2/MCP-1 Quantikine ELISA Kit	DCP00
		SCP00
		PDCP00

- **Human TNF-α ELISA Kit**

Αυτή η μέθοδος στηρίζεται στη ποσοτική τεχνική ενζυμικής ανοσοπροσροφητικής δοκιμασίας στερεής φάσης τύπου sandwich (Sandwich ELISA). Αυτή η δοκιμασία έχει σχεδιαστεί για να ανιχνεύει και να ποσοτικοποιεί τα επίπεδα του ανθρώπινου TNF-α

σε ανθρώπινο ορό, πλάσμα, ρυθμιστικά διαλύματα ή μέσο κυτταρικής καλλιέργειας. Η δοκιμασία αναγνωρίζει τόσο φυσικό όσο και ανασυνδυασμένο ανθρώπινο TNF-a.

Εν συντομία, ένα ειδικό για τον ανθρώπινο TNF-a αντίσωμα έχει προεπικαλυφθεί στα φρεάτια (wells) της παρεχόμενης μικροπλάκας (plate). Τα δείγματα, πρότυπα ή ορού αίματος, προστίθενται στα πηγαδάκια και μόρια του TNF-a που περιέχονται στα διαλύματα, συνδέονται με το ακινητοποιημένο αντίσωμα. Εφόσον γίνει πλύση για την απομάκρυνση μη δεσμευμένων ουσιών, σχηματίζεται το sandwich με την προσθήκη του δεύτερου μονοκλωνικού αντισώματος, ειδικό ως προς τον TNF-a, το οποίο είναι συνδεδεμένο με ένζυμο. Έπειτα, προστίθεται ένα διάλυμα υποστρώματος που αντιδρά με το σύμπλοκο ενζύμου-αντισώματος-στόχου για την παραγωγή μετρήσιμου σήματος, η ανάπτυξη του οποίου διακόπτεται σε συγκεκριμένο χρόνο από ειδικό διάλυμα (stop solution). Η ένταση του παραγόμενου σήματος είναι ευθέως ανάλογη με τη συγκέντρωση του στόχου που υπάρχει στο αρχικό δείγμα, δηλαδή του TNF-a.

Πριν από την έναρξη της διαδικασίας, τα δείγματα ορού αίματος απομακρύνθηκαν από τους -80 °C και αφέθηκαν να ξεπαγώσουν αποβραδής σε ψυγείο στους 4 °C, ενώ την ημέρα διεξαγωγής του πειράματος μεταφέρθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (20-24°C). Επίσης, πριν από τη χρήση τους όλα τα αντιδραστήρια βρέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και προετοιμάστηκαν καταλλήλως, ως ακολούθως:

Wash Buffer (Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης): Προστέθηκαν 16mL Wash Buffer Concentrate (25X) σε 384mL απεσταγμένο νερό, ώστε να προκύψει Wash Buffer (1X) τελικού όγκου 400mL.

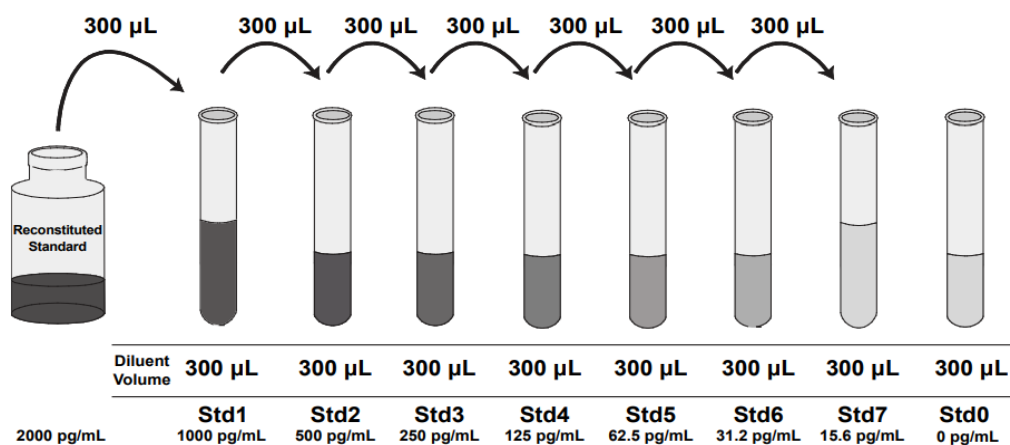
Human TNF-a Standard: Διαλύθηκε το λυοφιλιωμένο περιεχόμενο του Human TNF-a Standard σε 1mL Standard Dilution Buffer και προέκυψε διάλυμα συγκέντρωσης 2000 pg/mL, το οποίο αναδεύτηκε απαλά και αφέθηκε για 10min στον πάγκο εργασίας για να εξασφαλιστεί η πλήρης ανασύστασή του.

Streptavidin-HRP Solution (διάλυμα υποστρώματος): Μεταφέρθηκαν με πιπέτα σε δοκιμαστικό σωλήνα 90μl διαλύματος Streptavidin HRP (100X), στον οποίο προστέθηκε, επίσης, 1mL διαλύματος Streptavidin-HRP Diluent και αναμείχθηκαν με απαλή ανάδευση. Το συγκεκριμένο διάλυμα προετοιμάστηκε 15min πριν τη χρήση του, διότι είναι ευαίσθητο στο φως.

Τα βήματα της διαδικασίας που ακολουθήθηκε ήταν τα εξής:

- Αρχικά, ετοιμάστηκαν τα πρότυπα διαλύματα, όπου χρειαστήκαμε 8 δοκιμαστικούς σωλήνες, όπου σε κάθε έναν προστέθηκαν 300μl Standard Diluent Buffer. Στον πρώτο δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 300μl από το διάλυμα Reconstituted Standard συγκέντρωσης 2000 pg/ml, ώστε να προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 1000 pg/ml (Std1). Έπειτα, μεταφέρθηκαν 300μl από το αραιωμένο διάλυμα Std1 στον δεύτερο δοκιμαστικό σωλήνα, έτσι ώστε να προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 500 pg/ml (Std2). Η διαδικασία των

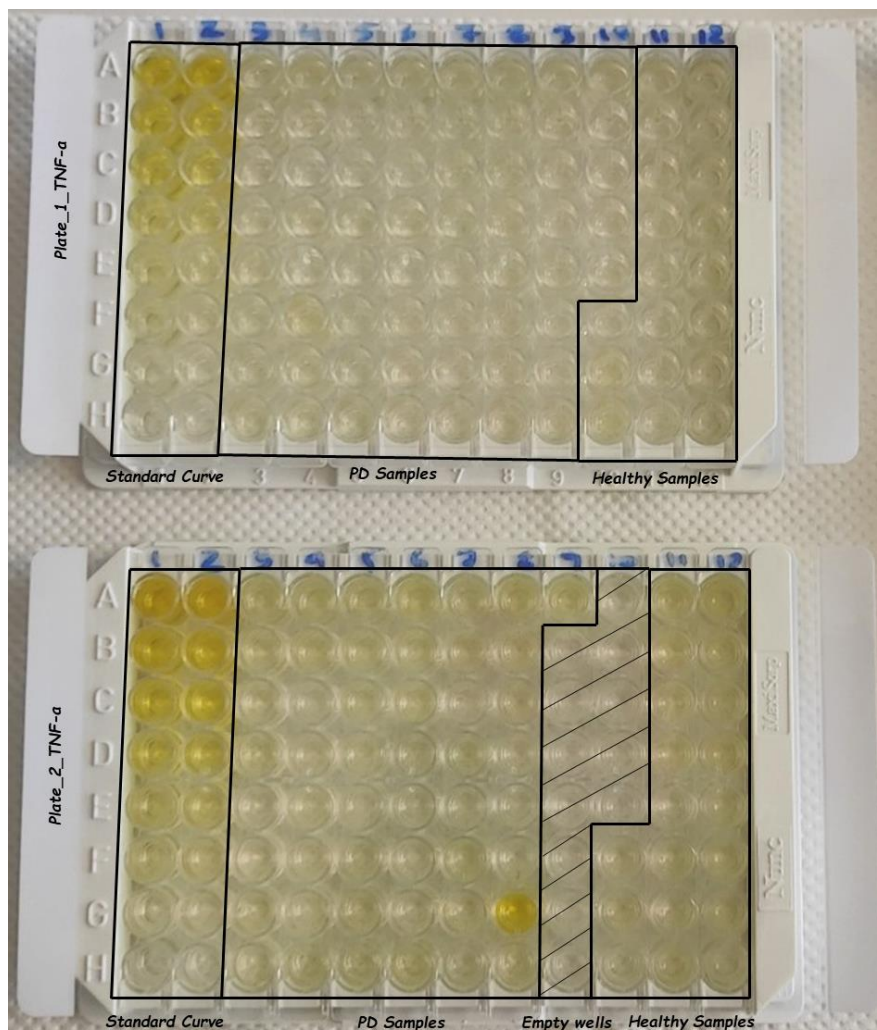
διαδοχικών αραιώσεων συνεχίστηκε και στους υπόλοιπους δοκιμαστικούς σωλήνες ώστε να προκύψουν διαλύματα συγκεντρώσεων 250 pg/ml (Std3), 125 pg/ml (Std4), 62,5 pg/ml (Std5), 31,2 pg/ml (Std6), 15,6 pg/ml (Std7), ενώ ο τελευταίος δοκιμαστικός σωλήνας περιείχε μόνο Standard Diluent Buffer και λειτούργησε ως το αρνητικό control, δηλαδή διάλυμα συγκέντρωσης 0 pg/ml (Std0). Η σειρά με την οποία έγιναν τα παραπάνω βήματα φαίνονται παρακάτω.



- Έπειτα, προστέθηκαν 50µl διαλύματος Incubation Buffer σε κάθε ένα από τα πηγαδάκια της μικροπλάκας, εκτός από αυτά που λειτούργησαν ως Blank για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης.
- Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν 100µl από κάθε δείγμα ορού αίματος σε κάθε πηγαδάκι της μικροπλάκας, όπως επίσης και 100µl των πρότυπων διαλυμάτων, στις κατάλληλες θέσεις και σύμφωνα με το προσχέδιο που είχε δημιουργηθεί. Σε αυτό το σημείο, η μικροπλάκα καλύφθηκε με διάφανη αυτοκόλλητη μεμβράνη και αφέθηκε για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για χρονικό διάστημα 2h.
- Αφού ολοκληρώθηκε ο χρόνος επώασης, η μικροπλάκα πλύθηκε 3 φορές χρησιμοποιώντας 1X Wash Buffer (Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης) και τινάχθηκε πολύ καλά σε απορροφητικό χαρτί για την απομάκρυνση της περίσσειας του διαλύματος.
- Ακολούθησε η προσθήκη 100µl διαλύματος Hu TNF-a Biotin Conjugate Solution σε κάθε ένα από τα πηγαδάκια, εκτός από αυτά που λειτούργησαν ως Blank. Η μικροπλάκα καλύφθηκε με διάφανη αυτοκόλλητη μεμβράνη και αφέθηκε για δεύτερη επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, αυτή τη φορά για 1h.
- Εφόσον έληξε ο χρόνος επώασης, η μικροπλάκα ξεπλύθηκε με 1X Wash Buffer (Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης) και με ελαφρύ τίναγμα απομακρύνθηκε η περίσσεια του διαλύματος.
- Κατόπιν τούτου, προστέθηκαν 100µl 1X Streptavidin-HRP Solution (διάλυμα υποστρώματος) σε κάθε ένα από τα πηγαδάκια, εκτός από αυτά που λειτούργησαν ως Blank. Η μικροπλάκα, για ακόμη μια φορά, καλύφθηκε με διάφανη αυτοκόλλητη μεμβράνη και αφέθηκε για τρίτη επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, για χρόνο 30min. Μετά το τέλος της επώασης έγινε πλύση της μικροπλάκας με 1X Wash Buffer (Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης) και η αφαίρεση της περίσσειας του διαλύματος με ελαφρύ τίναγμα σε απορροφητικό χαρτί.

- Στο επόμενο βήμα, προστέθηκαν 100 μ L διαλύματος Stabilized Chromogen σε κάθε πηγαδάκι και έτσι το διάλυμα του υποστρώματος άρχισε να αλλάζει χρώμα και να γίνεται μπλε. Η μικροπλάκα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για επώαση, έως χρόνου 30min.
- Τέλος, προστέθηκαν 100 μ l διαλύματος Stop Solution σε κάθε πηγαδάκι, με αποτέλεσμα το χρώμα του διαλύματος στα πηγαδάκια να αλλάξουν από μπλε σε κίτρινο.

Μετά το πέρας της παραπάνω διαδικασίας, η μικροπλάκα του kit ήταν έτοιμη προς ανάλυση της οπτικής πυκνότητας (OD) κάθε φρεατίου, χρησιμοποιώντας φωτόμετρο μικροπλακών (ELISA Reader) και ρυθμίζοντας την απορρόφηση στα 450 nm.



Εικόνα 17: Απεικόνιση της μικροπλάκας μετά την προσθήκη του διαλύματος Stop Solution, όπου και προκύπτει η μετατροπή του μπλε χρώματος σε κίτρινο, και συνεπώς έχουμε την ολοκλήρωση της διαδικασίας. Στο συγκεκριμένο πείραμα, λόγω του μεγάλου αριθμού δειγμάτων, αυτά χωρίστηκαν σε δύο μικροπλάκες για τον προσδιορισμό των επιπέδων του TNF-a στον ορό των ατόμων.

▪ **Human CCL2/MCP-1 Quantikine® ELISA Kit**

Παρομοίως, αυτή η δοκιμασία χρησιμοποιεί την ποσοτική τεχνική ενζυμικής ανοσοδοκιμασίας τύπου sandwich (Sandwich ELISA) και έχει σχεδιαστεί για τη μέτρηση της ανθρώπινης CCL2 σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιέργειας, ορό, πλάσμα και ούρα. Εν ολίγοις, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την ανθρώπινη CCL2 έχει προεπικαλυφθεί στη μικροπλάκα. Τα πρότυπα διαλύματα και τα δείγματα ορού αίματος μεταφέρονται με πιπέτα στα φρεάτια και οποιαδήποτε ποσότητα CCL2 υπάρχει σε αυτά δεσμεύεται από το ακινητοποιημένο αντίσωμα. Μετά την έκπλυση τυχόν μη δεσμευμένων ουσιών, προστίθεται στα φρεάτια ένα πολυκλωνικό αντίσωμα συνδεδεμένο με ένζυμο, ειδικό για την ανθρώπινη CCL2. Μετά από μια πλύση για την απομάκρυνση τυχόν μη δεσμευμένου αντιδραστήριου αντισώματος-ενζύμου, προστίθεται ένα διάλυμα υποστρώματος στα φρεάτια και το χρώμα αναπτύσσεται ανάλογα με την ποσότητα της CCL2 που δεσμεύτηκε στο αρχικό στάδιο. Η ανάπτυξη του χρώματος διακόπτεται και μετράται η ένταση του χρώματος, η οποία είναι ευθέως ανάλογη με τη συγκέντρωση της CCL2 σε κάθε δείγμα.

Τα δείγματα ορού αίματος ήταν τα ίδια που εφαρμόστηκαν και στην προαναφερθείσα δοκιμασία ELISA, συνεπώς, την ημέρα διεξαγωγής του πειράματος μεταφέρθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (20-24°C). Επιπλέον, πριν από τη χρήση τους όλα τα αντιδραστήρια του kit βρέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και προετοιμάστηκαν καταλλήλως, ως ακολούθως:

Wash Buffer (Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης): Προστέθηκαν 20mL Wash Buffer Concentrate (25X) σε 480mL απεσταγμένο νερό, ώστε να προκύψει Wash Buffer (1X) τελικού όγκου 500mL.

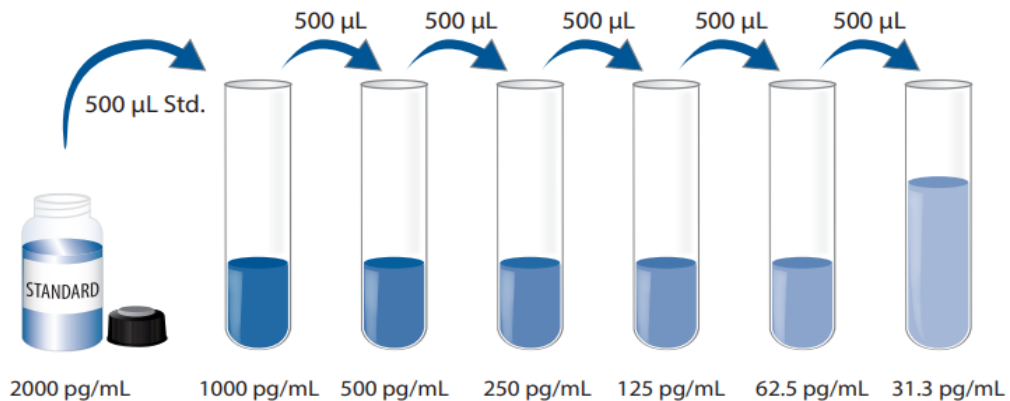
Human CCL2/MCP-1 Standard: Διαλύθηκε το λυοφιλιωμένο περιεχόμενο του Human CCL2/MCP-1 Standard σε 5mL Calibrator Diluent RD6Q (αραίωση 1:5) και προέκυψε διάλυμα συγκέντρωσης 2000 pg/mL, το οποίο αναδεύτηκε απαλά και αφέθηκε για 15min στον πάγκο εργασίας για να εξασφαλιστεί η πλήρης ανασύστασή του.

Substrate Solution (διάλυμα υποστρώματος): Τα χρωμογόνα διαλύματα A (υπεροξειδάση του υδρογόνου) και B (τετραμεθυλοβενζιδίνη), αναμείχθηκαν σε ίσους όγκους, από 10ml το καθένα. Το συγκεκριμένο διάλυμα προετοιμάστηκε 15min πριν τη χρήση του, διότι είναι ευαίσθητο στο φως.

Τα στάδια της διαδικασίας που ακολουθήθηκε ήταν τα εξής:

- Αρχικά, ετοιμάστηκαν τα πρότυπα διαλύματα, όπου χρειαστήκαμε 8 δοκιμαστικούς σωλήνες, όπου στους 7 από τους 8 προστέθηκαν 500μl Calibrator Diluent RD6Q. Το μη αραιωμένο διάλυμα Human CCL2/MCP-1 Standard συγκέντρωσης 2000 pg/mL, χρησίμευσε ως το υψηλό πρότυπο (Std1). Στον πρώτο δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 500μl από το διάλυμα Human CCL2/MCP-1 Standard συγκέντρωσης 2000 pg/ml, ώστε να προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 1000 pg/ml (Std2). Έπειτα, μεταφέρθηκαν 500μl από το

αραιωμένο διάλυμα Std1 στον δεύτερο δοκιμαστικό σωλήνα, έτσι ώστε να προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 500 pg/ml (Std3). Η διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων συνεχίστηκε και στους υπόλοιπους δοκιμαστικούς σωλήνες ώστε να προκύψουν διαλύματα συγκεντρώσεων 250 pg/ml (Std4), 125 pg/ml (Std5), 62,5 pg/ml (Std6), 31,3 pg/ml (Std7), ενώ ο τελευταίος δοκιμαστικός σωλήνας περιείχε μόνο Calibrator Diluent RD6Q και λειτούργησε ως το αρνητικό control, δηλαδή διάλυμα συγκέντρωσης 0 pg/ml (Std0). Η σειρά με την οποία έγιναν τα παραπάνω βήματα φαίνονται παρακάτω.

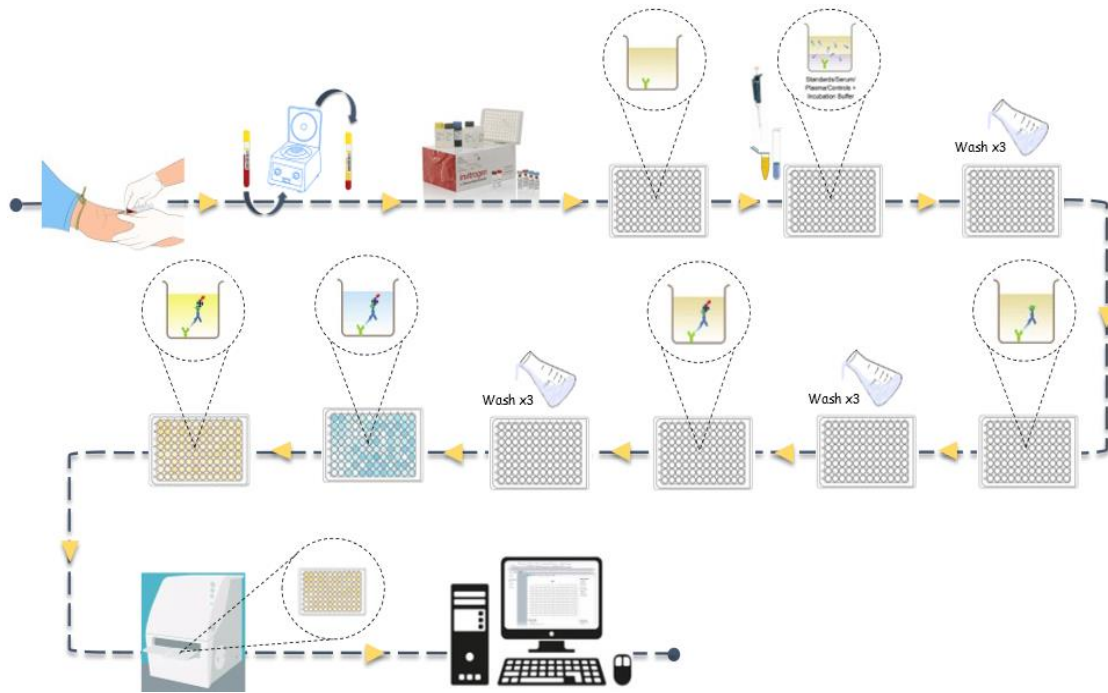


- Έπειτα, προστέθηκαν 50µl διαλύματος Assay Diluent RD1-83 σε κάθε ένα από τα πηγαδάκια της μικροπλάκας, εκτός από αυτά που λειτούργησαν ως Blank για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης.
- Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν 100µl από κάθε δείγμα ορού αίματος σε κάθε πηγαδάκι της μικροπλάκας, όπως επίσης και 100µl των πρότυπων διαλυμάτων, στις κατάλληλες θέσεις και σύμφωνα με το προσχέδιο που είχε δημιουργηθεί. Σε αυτό το σημείο, η μικροπλάκα καλύφθηκε με διάφανη αυτοκόλλητη μεμβράνη και αφέθηκε για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για χρονικό διάστημα 2h.
- Αφού ολοκληρώθηκε ο χρόνος επώασης, η μικροπλάκα πλύθηκε 3 φορές χρησιμοποιώντας 1X Wash Buffer (Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης) και τινάχθηκε πολύ καλά σε απορροφητικό χαρτί για την απομάκρυνση της περίσσειας του διαλύματος.
- Ακολούθησε η προσθήκη 200µl διαλύματος Human CCL2/MCP-1 Conjugate σε κάθε ένα από τα πηγαδάκια, εκτός από αυτά που λειτούργησαν ως Blank. Η μικροπλάκα καλύφθηκε με διάφανη αυτοκόλλητη μεμβράνη και αφέθηκε για δεύτερη επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2h.
- Εφόσον έληξε ο χρόνος επώασης, η μικροπλάκα ξεπλύθηκε με 1X Wash Buffer (Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης) και με ελαφρύ τίναγμα απομακρύνθηκε η περίσσεια του διαλύματος.
- Κατόπιν τούτου, προστέθηκαν 200µl Substrate Solution (διάλυμα υποστρώματος) σε κάθε ένα από τα πηγαδάκια, εκτός από αυτά που λειτούργησαν ως Blank. Μετά τη προσθήκη αυτού, το χρώμα του διαλύματος που περιείχαν τα πηγαδάκια άρχισε να μετατρέπεται σε μπλε. Η μικροπλάκα

παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για επώαση, έως χρόνου 30min.

- Τέλος, προστέθηκαν 50μl διαλύματος Stop Solution σε κάθε πηγαδάκι, με αποτέλεσμα το χρώμα του διαλύματος στα πηγαδάκια να αλλάξουν από μπλε σε κίτρινο.

Μετά το πέρας της παραπάνω διαδικασίας, η μικροπλάκα του kit ήταν έτοιμη προς ανάλυση της οπτικής πυκνότητας (OD) κάθε φρεατίου, χρησιμοποιώντας φωτόμετρο μικροπλακών (ELISA Reader) και ρυθμίζοντας την απορρόφηση στα 450 nm.



Εικόνα 18: Περιγραφική ανακεφαλαίωση των βημάτων που πραγματοποιήθηκαν για την ολοκλήρωση της μεθόδου ELISA, με σκοπό την εύρεση των επιπέδων των κυτοκινών TNF-α και CCL2 στον ορό αίματος των συμμετεχόντων στη παρούσα μελέτη.

3.3 Στατιστική ανάλυση

Μετά την ολοκλήρωση των προαναφερθέντων τεχνικών, πραγματοποιήθηκε η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν. Η ανάλυση των δεδομένων της κυτταρομετρίας ροής, πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού CXP Flow Cytometry Software (Beckman Coulter), όπου σε κάθε δείγμα έγινε «gating» για την διαδοχική αναγνώριση των κυτταρικών πληθυσμών και το συνακόλουθο ποσοστό αυτών, όπως επίσης και του MFI (Mean Fluorescence Intensity). Έπειτα, με τη βοήθεια του λογισμικού GraphPad Prism 9.4.1 υπολογίστηκε η αριθμητική μέση τιμή (MEAN) των ποσοστών για κάθε κυτταρικό πληθυσμό στο σύνολο των δειγμάτων και το

σφάλμα ορίστηκε μέσω της σταθερής απόκλισης λάθους (Standard Error of the Mean – SEM).

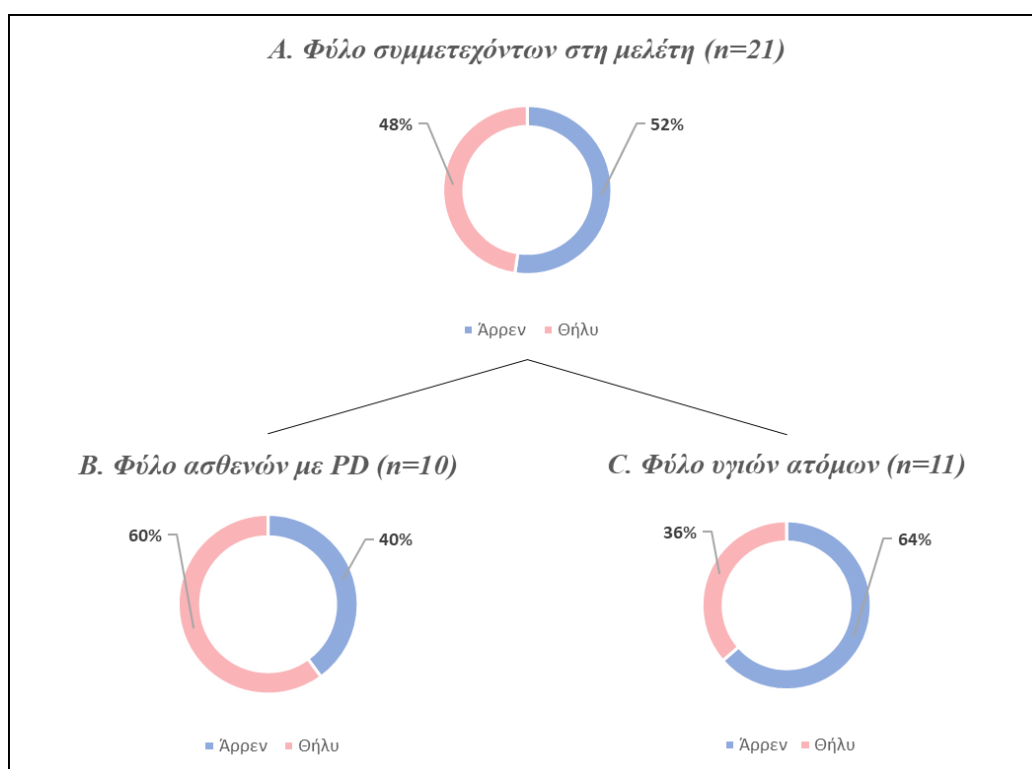
Αναλόγως, τα αποτελέσματα των απορροφήσεων της ELISA, στην οπτική πυκνότητα (OD) που μετρήθηκε κάθε μικροπλάκα, μετατράπηκαν σε τιμές συγκέντρωσης (pg/mL) TNF-a και CCL2 για κάθε δείγμα αντίστοιχα. Ειδικότερα, μέσω του προγράμματος Excel Office 2019 κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη με βάση τις απορροφήσεις των πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης, μέσω του υπολογισμού της μέσης τιμής κάθε οπτικής απορρόφησης για κάθε μια συγκέντρωση. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η εξίσωση της ευθείας και με τη χρήση αυτής και τις τιμές των απορροφήσεων κάθε δείγματος, εκφράστηκαν οι άγνωστες συγκεντρώσεις των δειγμάτων, και επομένως η συγκέντρωση του TNF-a και της CCL2. Έπειτα, με τη βοήθεια του προγράμματος GraphPad Prism 9.4.1 υπολογίστηκε η αριθμητική μέση τιμή (MEAN) των συγκεντρώσεων για την κάθε ομάδα ατόμων (υγιείς – ασθενείς), καθώς και το σφάλμα ορίστηκε μέσω της σταθερής απόκλισης λάθους (Standard Error of the Mean – SEM).

Στα αποτελέσματα και των δύο τεχνικών, οι διαφορές μεταξύ των ασθενών με νόσο του Parkinson και των υγιών ατόμων πραγματοποιήθηκαν με τις δοκιμασίες Mann-Whitney και Kruskal-Wallis (one-way ANOVA). Τέλος, στατιστικά σημαντικές τιμές θεωρήθηκαν αυτές που παρουσίασαν $p\text{-value} \leq 0,05$.

4. Αποτελέσματα

4.1 Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής

Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας της κυτταρομετρίας ροής, αναλύθηκαν συνολικά 21 δείγματα περιφερικού αίματος, εκ των οποίων 10 δείγματα από ασθενής με νόσο του Parkinson και 11 δείγματα υγιών εθελοντών (control). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, σε κάθε δείγμα προσδιορίστηκαν εξίσου οι δείκτες για την πρωτεΐνη p65/NF-κB αλλά και για τον υποδοχέα CD40. Παρακάτω, διαφαίνονται τα δημογραφικά στοιχεία και κάποια χαρακτηριστικά τόσο των υγιών εθελοντών όσο και των ασθενών με Parkinson, αντίστοιχα.



Εικόνα 19: Ποσοστιαία κατανομή του φύλου (A) στο σύνολο των συμμετεχόντων, (B) μεταξύ των ασθενών με νόσο του Parkinson, και (C) ανάμεσα στους υγιείς εθελοντές.

Υγιείς εθελοντές	Φύλο	Ηλικία	Θετικό οικογενειακό ιστορικό	Κάπνισμα
H1	Άρρεν	23	Όχι	Όχι
H2	Άρρεν	—	—	Ναι
H3	Θύλη	—	—	Όχι
H4	Άρρεν	—	—	Ναι
H5	Άρρεν	52	—	Ναι
H6	Θύλη	—	—	Όχι
H7	Άρρεν	68	—	Όχι
H8	Θήλυ	60	—	Όχι
H9	Θήλυ	67	—	Όχι
H10	Άρρεν	74	—	Ναι
H11	Θύλη	75	—	Ναι

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά των υγιών εθελοντών

Ασθενείς με PD	Φύλο	Ηλικία	Θετικό οικογενειακό ιστορικό	Κάπνισμα
PD1	Θύλη	55	Ναι	Όχι
PD2	Άρρεν	42	Όχι	Όχι
PD3	Άρρεν	60	—	Όχι
PD4	Θύλη	68	—	—
PD5	Άρρεν	69	Όχι	Όχι
PD6	Θύλη	72	—	—
PD7	Θύλη	68	Ναι	Όχι
PD8	Θύλη	—	—	—
PD9	Θύλη	77	Όχι	Όχι
PD10	Άρρεν	60	Όχι	—

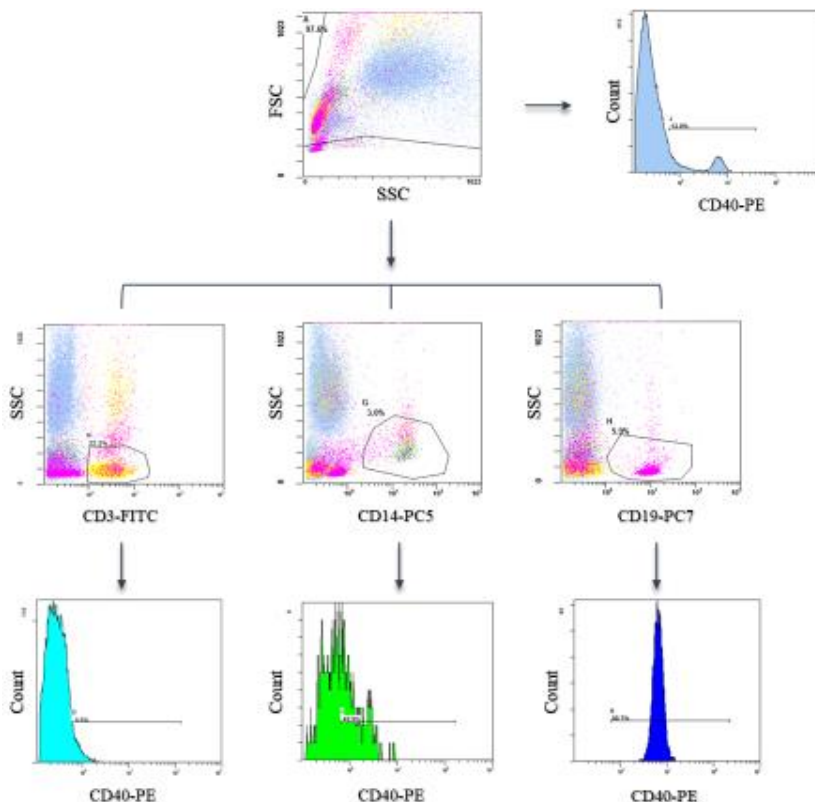
Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά των ασθενών με Parkinson

4.1.1 Επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης p65/NF-κB σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος

Κάθε δείγμα ολικού αίματος των υγιών ατόμων αλλά και των ασθενών με Parkinson επεξεργάστηκε καταλλήλως με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων της πρωτεΐνης p65/NF-κB. Αρχικά, όλα τα δείγματα επωάστηκαν με τα κατάλληλα μονοκλωνικά αντισώματα σημασμένα με φθοριοχρώματα, για τον φαινοτυπικό προσδιορισμό των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, ενώ έπειτα από περαιτέρω επεξεργασία πραγματοποιήθηκε ο ενδοκυττάριος εντοπισμός της p65/NF-κB προσθέτοντας το κατάλληλο αντίσωμα έναντι αυτής. Μέσω των επιφανειακών επιτόπων των κυττάρων του ανοσοποιητικού, καθορίστηκαν τα T λεμφοκύτταρα

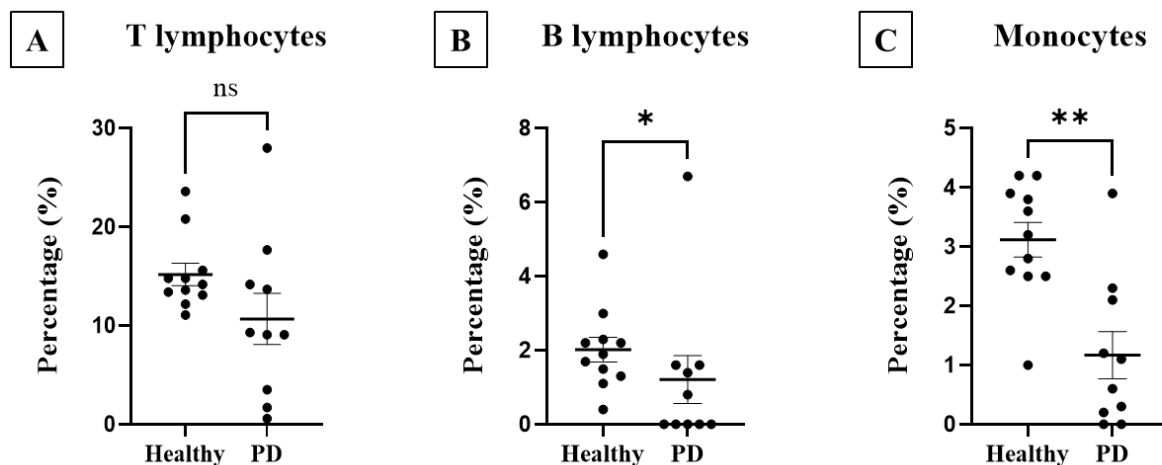
(CD3⁺), τα Β λεμφοκύτταρα (CD19⁺) και τα μονοκύτταρα (CD14⁺), και έπειτα η έκφραση της p65/NF-κB σε κάθε έναν από αυτούς τους κυτταρικούς πληθυσμούς. Πιο συγκεκριμένα, κατά την ανάλυση των δειγμάτων στο κυτταρόμετρο ροής, μέσω της πρόσθιας (FSC) και της πλάγιας (SSC) σκέδασης πραγματοποιήθηκε η επιλογή των βιώσιμων κυττάρων με «gating» το οποίο έγινε, πρώτα, για όλα τα κύτταρα και μετά σε κάθε έναν πληθυσμό ξεχωριστά και τα οποία απεικονίστηκαν ως dot plots. Στη συνέχεια, για κάθε κυτταρικό πληθυσμό εξήχθη το αντίστοιχο ιστόγραμμα στο οποίο απεικονιζόταν η μέση ένταση φθορισμού (MFI) για την πρωτεΐνη p65/NF-κ B ως προς τον αριθμό των κυττάρων συνολικά αλλά και για κάθε έναν κυτταρικό πληθυσμό.

Παρακάτω παρατίθεται ενδεικτικά ο τρόπος με τον οποίο έγινε ο διαχωρισμός των διάφορων κυτταρικών πληθυσμών (Εικ. 20), έπειτα από το gating που πραγματοποιήθηκε για κάθε έναν χωριστά, καθώς και τα αντίστοιχα διαγράμματα που προέκυψαν για το MFI. Συνοπτικά, χρησιμοποιώντας το αρνητικό control για κάθε έναν από τους δείκτες που θέλαμε να ανιχνεύσουμε στα δείγματα μας, δηλαδή της p65/NF-κB και του CD40, και οι οποίοι δεν είχαν σημειωθεί με τα αντίστοιχα αντισώματα, οριοθετήσαμε την κατανομή των ψευδώς θετικών κυττάρων. Στη συνέχεια, λαμβάνοντας υπόψιν την κατανομή του σήματος του αρνητικού control, προσδιορίσαμε το σήμα των αληθώς θετικών κυττάρων για κάθε δείκτη. Τέλος, να σημειωθεί ότι η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε τόσο για τον διαχωρισμό των κυτταρικών πληθυσμών σε σχέση με τα ποσοστά έκφρασης της p65, όσο και για τον CD40.



Εικόνα 20: Διαγραμματική προσέγγιση ανάλυσης των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν από τη κυτταρομετρία ροής.

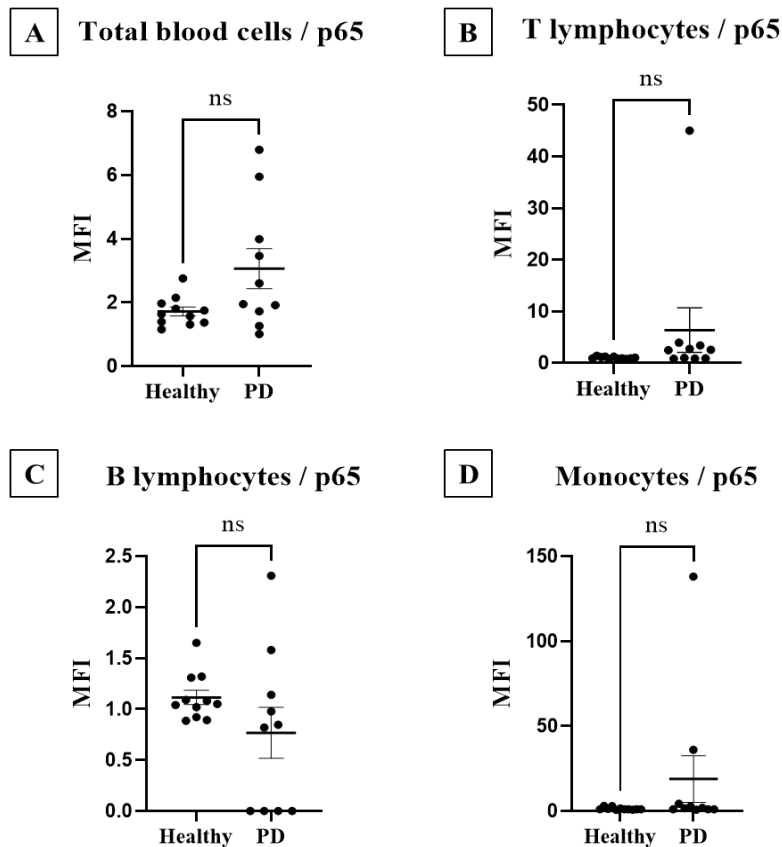
Με βάση τα δεδομένα που λάβαμε από κάθε δείγμα, το πρώτο μας μέλημα ήταν να συγκρίνουμε τα ποσοστά των T- και B-λεμφοκυττάρων καθώς και των μονοκυττάρων που βρέθηκαν στο αίμα των υγιών ατόμων (Healthy) και των ασθενών με Parkinson (PD), και τα οποία παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα.



Εικόνα 21: Συσχέτιση μεταξύ των υγιών ατόμων και των ασθενών με PD, των ποσοστών (%) για τους κυτταρικούς πληθυσμούς (A) των T-λεμφοκυττάρων, (B) των B-λεμφοκυττάρων και (C) των μονοκυττάρων, που βρέθηκαν στο αίμα τους (Percentage: Mean \pm SEM).

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην **Εικόνα 21**, προκύπτει ότι το ποσοστό των κυκλοφορούντων T-λεμφοκυττάρων στο αίμα των υγιών ατόμων (n=11) και των ασθενών με PD (n=10), δεν παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική διαφορά (15,2% \pm 1,12% έναντι 10,69% \pm 2,6% αντίστοιχα, p-value=0,0874 > 0,05, Εικ. 21A). Από την άλλη, όσο αφορά τα B-λεμφοκύτταρα (Εικ. 21B), φαίνεται ότι το μέσο ποσοστό τους είναι υψηλότερο στο αίμα των υγιών ατόμων σε σχέση με τους ασθενείς με PD (2,01% \pm 0,33% έναντι 1,21% \pm 0,64% αντίστοιχα) και αυτό εμφανίζει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων (p-value=0,0222 < 0,05). Επίσης, ανάλογη είναι και η ανομοιότητα που προκύπτει στο μέσο ποσοστό των μονοκυττάρων (Εικ. 21C) στο αίμα των υγιών ατόμων, όπου είναι υψηλότερο, και των ασθενών με PD (3,11% \pm 0,29% έναντι 1,17% \pm 0,39% αντίστοιχα), η οποία δείχνει και την ορατή στατιστικώς σημαντική διαφορά (p-value=0,0016 < 0,05) που προκύπτει από την σύγκριση των ποσοστών αυτού του κυτταρικού πληθυσμού ανάμεσα στις δύο αυτές ομάδες ατόμων.

Κατόπιν, αξιολογήσαμε την έκφραση της πρωτεΐνης p65/NF- κ B στο σύνολο των κυττάρων του αίματος καθώς και για κάθε κυτταρικό πληθυσμό που προσδιορίσαμε, συγκρίνοντας τη μέση ένταση φθορισμού (MFI) αυτής μεταξύ των υγιών ατόμων και των ασθενών με PD, όπως φαίνεται στα παρακάτω διαγράμματα.

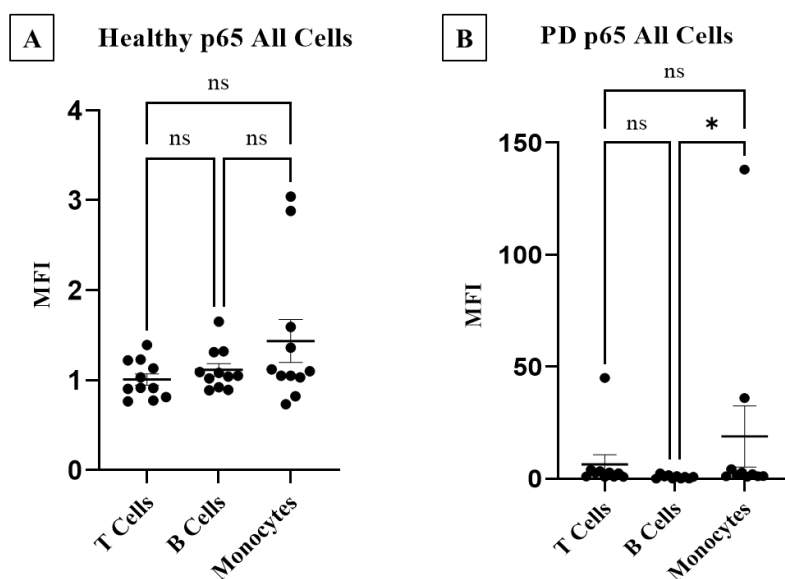


Εικόνα 22: Συσχέτιση μεταξύ των υγιών ατόμων και των ασθενών με PD, της έκφρασης της πρωτεΐνης p65/NF-κB (A) στο σύνολο των κυττάρων του αίματος, (B) στον πληθυσμό των T-λεμφοκυττάρων, (C) των B-λεμφοκυττάρων και (D) των μονοκυττάρων (MFI: Mean \pm SEM).

Όπως παρατηρούμε στην **Εικόνα 22**, τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης p65/NF-κB στο σύνολο των κυττάρων του αίματος, φαίνεται να μη διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των υγιών ατόμων και των ασθενών με PD (MFI: $1,71 \pm 0,13$ έναντι MFI: $3,06 \pm 0,62$ αντίστοιχα, $p\text{-value}=0,2512 > 0,05$, Εικ. 22A). Αναφορικά με τα επίπεδα έκφρασης της στον πληθυσμό των T-λεμφοκυττάρων, φαίνεται να μην υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των υγιών ατόμων και των ασθενών με PD (MFI: $1 \pm 0,06$ έναντι MFI: $6 \pm 4,3$ αντίστοιχα, $p\text{-value}=0,0720 > 0,05$, Εικ. 22B). Ωστόσο, παρατηρείται μια αυξητική τάση της έκφρασης της στο πληθυσμό των T-λεμφοκυττάρων των ασθενών με PD σε σχέση με τους υγιείς. Επίσης, στον πληθυσμό των B λεμφοκυττάρων δεν εμφανίστηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα της έκφρασης της p65/NF-κB ανάμεσα στα υγιή άτομα και τους ασθενείς με PD (MFI: $1,11 \pm 0,06$ έναντι $0,76 \pm 0,24$ αντίστοιχα, $p\text{-value}=0,1083 > 0,05$, Εικ. 22C), όπως και το ίδιο συνέβη και στον πληθυσμό των μονοκυττάρων (MFI: $1,43 \pm 0,23$ έναντι $18,87 \pm 13,66$ αντίστοιχα, $p\text{-value}=0,1366 > 0,05$, Εικ. 22D).

Στη συνέχεια, συγκρίναμε τα επίπεδα έκφρασης της p65/NF-κB μεταξύ των τριών κυτταρικών πληθυσμών των T- και B-λεμφοκυττάρων όπως και των μονοκυττάρων,

τόσο ανάμεσα στα υγιή άτομα όσο και μεταξύ των ασθενών με PD, με τα αποτελέσματα να παρουσιάζονται στα ακόλουθα γραφήματα.



Εικόνα 23: Συσχέτιση της έκφρασης της πρωτεΐνης p65/NF-κB μεταξύ των T- και B-λεμφοκυττάρων και των μονοκυττάρων, (A) ανάμεσα στα υγιή άτομα και (B) στους ασθενείς με PD (MFI: Mean \pm SEM).

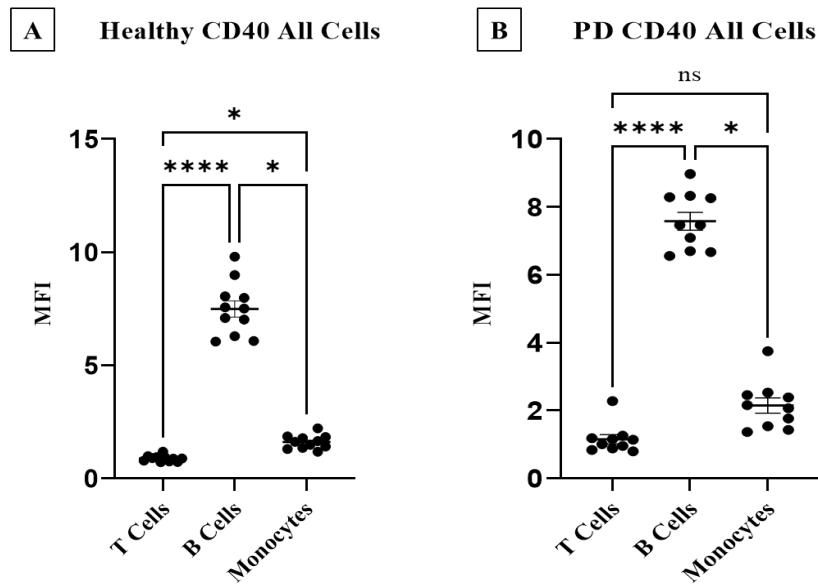
Τα αποτελέσματα αυτών των συσχετίσεων, όπως αυτά απεικονίζονται στην **Εικόνα 23**, έδειξαν τις διαφορές που υπάρχουν στα επίπεδα έκφρασης της p65/NF-κB μεταξύ των τριών κυτταρικών πληθυσμών του ανοσοποιητικού συστήματος, που στοχεύσαμε προς ανάλυση στη συγκεκριμένη μελέτη. Όσο αφορά τις διαφορές ανάμεσα στα υγιή άτομα (Εικ. 23A), φάνηκε πως δεν υπήρξαν στατιστικώς σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα της έκφρασης της μεταξύ T- και B-λεμφοκυττάρων (MFI: $1 \pm 0,06$ έναντι MFI: $1,11 \pm 0,06$ αντίστοιχα, $p\text{-value} > 0,9999$), ούτε και μεταξύ T-λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων (MFI: $1 \pm 0,06$ έναντι MFI: $1,43 \pm 0,23$ αντίστοιχα, $p\text{-value}=0,384 > 0,05$), όπως και ανάμεσα στα B-λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα (MFI: $1,11 \pm 0,06$ έναντι MFI: $1,43 \pm 0,23$ αντίστοιχα, $p\text{-value} > 0,9999$). Από την άλλη πλευρά, μεταξύ των ασθενών με PD (Εικ. 23B), βρέθηκε να υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά στην έκφραση της p65/NF-κB ανάμεσα στα B-λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα (MFI: $0,76 \pm 0,24$ έναντι MFI: $18,87 \pm 13,66$ αντίστοιχα, $p\text{-value}=0,0161 < 0,05$) με υπεροχή της έκφρασης της στα μονοκύτταρα. Ωστόσο, στατιστικώς σημαντική διαφορά δεν βρέθηκε να υπάρχει στα επίπεδα της έκφρασης της ούτε μεταξύ των T- και B-λεμφοκυττάρων (MFI: $6,36 \pm 4,3$ έναντι MFI: $0,76 \pm 0,24$ αντίστοιχα, $p\text{-value}=0,0541 > 0,05$) αλλά ούτε και μεταξύ T-λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων (MFI: $6,36 \pm 4,3$ έναντι MFI: $18,87 \pm 13,66$ αντίστοιχα, $p\text{-value} > 0,9999$).

4.1.2 Επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα CD40 σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος

Ο υποδοχέας CD40 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που ανήκει στην υπερικογένεια των υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF) και είναι κρίσιμος υποδοχέας για την έναρξη και τη διατήρηση της φλεγμονώδους απόκρισης στη νόσο του Parkinson. Η διαδικασία μεταγωγής σήματος, έπειτα από την ενεργοποίηση του συγκεκριμένου υποδοχέα, περιλαμβάνει τη στρατολόγηση παραγόντων που σχετίζονται με τον υποδοχέα TNF (TRAFs), οι οποίοι λειτουργούν ως πρωτεΐνες προσαρμογής για την έναρξη ενδοκυτταρικών καταρρακτών σηματοδότησης, συμπεριλαμβάνοντας και το μη κανονικό (εναλλακτικό) μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-κB. Η δράση αυτού του μονοπατιού, έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στην παραγωγή και απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών, αγγειογενετικών παραγόντων, προσταγλανδινών, μορίων κυτταρικής προσκόλλησης και χημειοκινών που συμμετέχουν στην αναπτυσσόμενη φλεγμονή που λαμβάνει χώρα στη νόσο του Parkinson.

Αντίστοιχα με την ανάλυση που αφορούσε την ανίχνευση των ποσοτικών επιπέδων της έκφρασης της πρωτεΐνης p65/NF-κB και η οποία περιγράφηκε παραπάνω, ανάλογη ήταν και αυτή για την εύρεση των επιπέδων της έκφρασης του CD40 στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που μελετήσαμε. Ωστόσο, στη συγκεκριμένη περίπτωση, ο CD40 εκφράζεται στην επιφάνεια των κυττάρων. Κατά συνέπεια, τα μονοκλωνικά αντισώματα σημασμένα με φθοριοχρώματα, προσδέθηκαν στην εξωτερική επιφάνεια των κυττάρων με στόχο τόσο τον φαινοτυπικό προσδιορισμό των κυττάρων του ανοσοποιητικού όσο και την ταυτόχρονη εύρεση της πιθανής έκφρασης του CD40 σε αυτά. Επιπρόσθετα, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, για κάθε κυτταρικό πληθυσμό εξήχθη το αντίστοιχο ιστόγραμμα στο οποίο απεικονιζόταν η μέση ένταση φθορισμού (MFI) για τον υποδοχέα CD40 ως προς τον αριθμό των κυττάρων συνολικά αλλά και για κάθε έναν κυτταρικό πληθυσμό.

Αρχίζοντας την ανάλυση των δεδομένων που λάβαμε από κάθε δείγμα, το πρώτο πράγμα που συγκρίναμε ήταν τα επίπεδα της έκφρασης του υποδοχέα CD40 μεταξύ των τριών κυτταρικών πληθυσμών των T- και B-λεμφοκυττάρων όπως και των μονοκυττάρων, τόσο ανάμεσα στα υγιή άτομα όσο και μεταξύ των ασθενών με Parkinson, με τα αποτελέσματα να παρουσιάζονται στα ακόλουθα γραφήματα.



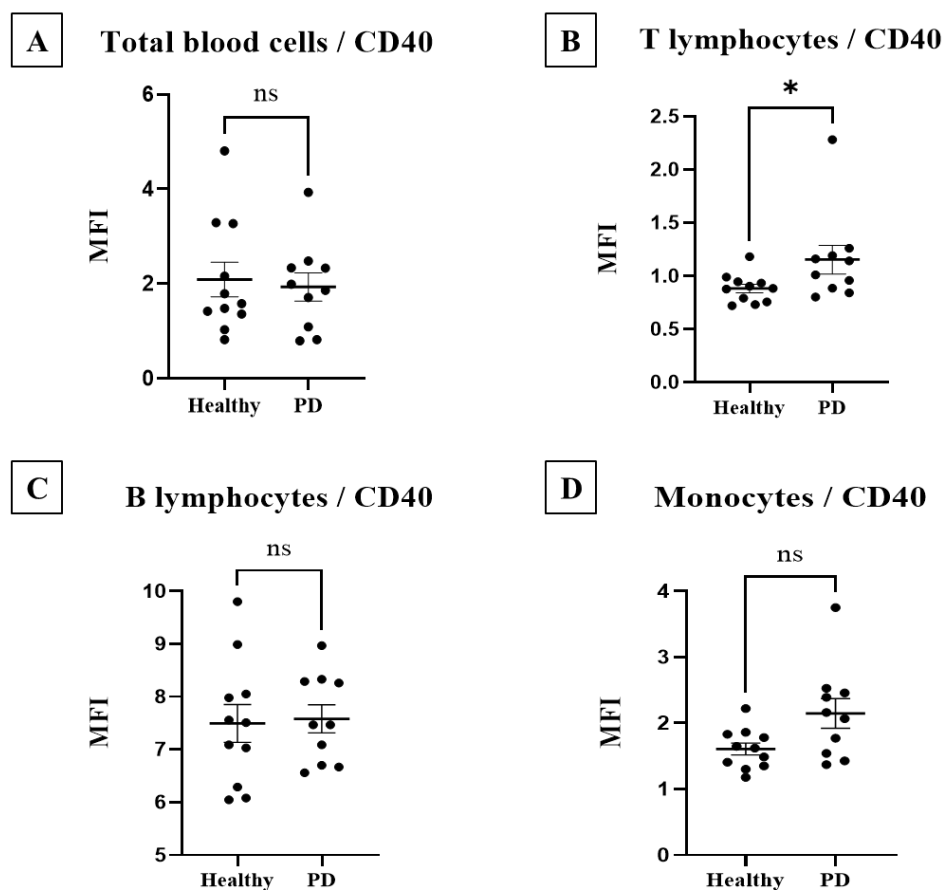
Εικόνα 24: Συσχέτιση της έκφρασης του υποδοχέα CD40 μεταξύ των T- και B-λεμφοκυττάρων και των μονοκυττάρων, (A) ανάμεσα στα υγιή άτομα και (B) στους ασθενείς με PD (MFI: Mean ± SEM).

Τα αποτελέσματα αυτών των συσχετίσεων, όπως αυτά απεικονίζονται στην **Εικόνα 24**, έδειξαν τις διαφορές που υπάρχουν στα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα CD40 μεταξύ των τριών κυτταρικών πληθυσμών του ανοσοποιητικού συστήματος, που στοχεύσαμε προς ανάλυση στη συγκεκριμένη μελέτη. Όσο αφορά τις διαφορές ανάμεσα στα υγιή άτομα (Εικ. 24A), φάνηκε πως υπήρξαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στα επίπεδα της έκφρασης του CD40 μεταξύ των τριών κυτταρικών πληθυσμών. Πιο συγκεκριμένα, αναφορικά με τη σύγκριση στην έκφραση του CD40 ανάμεσα στα T-λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα (MFI: 0,88 ± 0,04 έναντι MFI: 1,6 ± 0,09 αντίστοιχα, p-value=0,0244 < 0,05), φαίνεται πως είναι υψηλότερη στα μονοκύτταρα και αυτή η διαφορά είναι στατιστικώς σημαντική. Ακόμη, μεταξύ των B-λεμφοκυττάρων και των μονοκυττάρων (MFI: 7,49 ± 0,35 έναντι MFI: 1,6 ± 0,09 αντίστοιχα, p-value=0,0221 < 0,05) η έκφραση του CD40 εμφανίζεται αυξημένη στα B-λεμφοκύτταρα, με στατιστικά σημαντική διαφορά. Επιπρόσθετα, ανάμεσα στα T- και B-λεμφοκύτταρα (MFI: 0,88 ± 0,04 έναντι MFI: 7,49 ± 0,35 αντίστοιχα, p-value < 0,0001), η έκφραση του CD40 είναι σημαντικά υψηλότερη στα B-λεμφοκύτταρα.

Παράλληλα, διαφορές εντοπίζονται και στα επίπεδα της έκφρασης του υποδοχέα CD40 μεταξύ των κυττάρων του ανοσοποιητικού που μελετάμε στο αίμα των ασθενών με Parkinson (Εικ. 24B). Ειδικότερα, αναφορικά με τη σύγκριση στα επίπεδα έκφρασης του CD40 ανάμεσα στα T-λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα (MFI: 1,15 ± 0,13 έναντι MFI: 2,14 ± 0,22 αντίστοιχα, p-value=0,0762 > 0,05), φαίνεται πως δεν προκύπτει κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά. Απεναντίας, μεταξύ των B-λεμφοκυττάρων και των μονοκυττάρων (MFI: 7,58 ± 0,26 έναντι MFI: 2,14 ± 0,22 αντίστοιχα, p-value=0,0213 < 0,05) η έκφραση του CD40 εμφανίζεται αυξημένη στα B-λεμφοκύτταρα, με στατιστικώς σημαντική διαφορά. Ακόμη, ανάμεσα στα T- και B-

λεμφοκύτταρα (MFI: $1,15 \pm 0,13$ έναντι MFI: $7,58 \pm 0,26$ αντίστοιχα, p -value $< 0,0001$), η έκφραση του CD40 φαίνεται πως είναι στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη στο πληθυσμό των B-λεμφοκυττάρων.

Ακολουθώντας, εκτιμήσαμε την έκφραση του υποδοχέα CD40 στο σύνολο των κυττάρων του αίματος καθώς και για κάθε κυτταρικό πληθυσμό που προσδιορίσαμε, συγκρίνοντας τη μέση ένταση φθορισμού (MFI) αυτού μεταξύ των υγιών ατόμων και των ασθενών με Parkinson, όπως φαίνεται στα παρακάτω διαγράμματα.



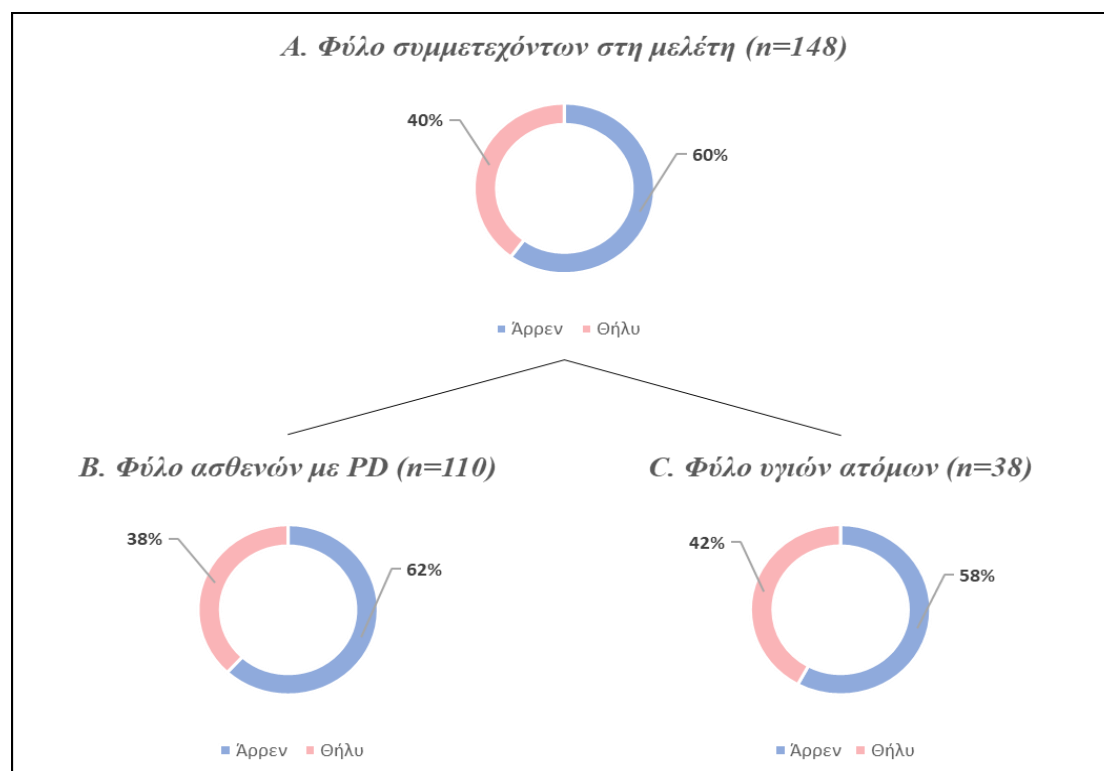
Εικόνα 25: Συσχέτιση μεταξύ των υγιών ατόμων και των ασθενών με PD, της έκφρασης του υποδοχέα (A) στο σύνολο των κυττάρων του αίματος, (B) στον πληθυσμό των T-λεμφοκυττάρων, (C) των B-λεμφοκυττάρων και (D) των μονοκυττάρων (MFI: Mean \pm SEM).

Όπως παρατηρούμε στην **Εικόνα 25**, τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα CD40 στο σύνολο των κυττάρων του αίματος, φαίνεται να μη διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των υγιών ατόμων και των ασθενών με PD (MFI: $2,09 \pm 0,36$ έναντι MFI: $1,93 \pm 0,29$ αντίστοιχα, p -value= $0,9725 > 0,05$, Εικ. 25A). Συγχρόνως, ανάλογη είναι η εικόνα που παρουσιάζουν τα επίπεδα έκφρασης του CD40 στην επιφάνεια των B-λεμφοκυττάρων, μεταξύ των υγιών ατόμων και των ασθενών με PD (MFI: $7,49 \pm 0,35$ έναντι MFI: $7,58 \pm 0,26$ αντίστοιχα, p -value= $0,7694 > 0,05$, Εικ. 25C), όσο και των μονοκυττάρων, πάλι μεταξύ των ίδιων ομάδων ατόμων ($1,6 \pm 0,09$ έναντι $2,14 \pm 0,22$

αντίστοιχα, $p\text{-value}=0,0513 > 0,05$, Εικ. 25D), οπότε επίσης και δεν προκύπτουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Αντιθέτως, όσο αφορά τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα CD40 στην επιφάνεια των Τ-λεμφοκυττάρων μεταξύ των υγιών ατόμων και των ασθενών με PD (MFI: $0,88 \pm 0,04$ έναντι MFI: $1,15 \pm 0,13$ αντίστοιχα, $p\text{-value}=0,0295 < 0,05$, Εικ. 25B), φαίνεται πως αυτά είναι υψηλότερα στα Τ-λεμφοκύτταρα των ασθενών με PD, οπότε και αυτή η διαφορά που προκύπτει είναι στατιστικώς σημαντική.

4.2 Μετρήσεις βιοδεικτών στον ορό αίματος με ELISA

Η πραγματοποίηση της ανοσοδοκιμασίας ELISA, έγινε έπειτα από την λήψη περιφερικού αίματος και την επακόλουθη επεξεργασία του για την παραλαβή του ορού, ο οποίος και χρησιμοποιήθηκε με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό των ποσοτικών επιπέδων του παράγοντα νέκρωσης όγκου-άλφα (TNF- α) και της πρωτεΐνης χημειοτακτισμού μονοκυττάρων (CCL2). Πιο συγκεκριμένα, στην παρούσα πειραματική διαδικασία, αναλύθηκαν 110 δείγματα ορού αίματος από ασθενής με νόσο του Parkinson και 38 δείγματα υγιών εθελοντών (control), και στα οποία έγινε, αμφότερα, ο προσδιορισμός για τις δύο αυτές κυτοκίνες. Παρακάτω, διαφαίνονται τα δημογραφικά στοιχεία και κάποια χαρακτηριστικά τόσο των υγιών εθελοντών όσο και των ασθενών με Parkinson.



Εικόνα 26: Ποσοστιαία κατανομή του φύλου (A) στο σύνολο των συμμετεχόντων, (B) μεταξύ των ασθενών με νόσο του Parkinson, και (C) ανάμεσα στους υγιείς εθελοντές.

Αριθμός υγιών εθελοντών	Φύλο		Ηλικία (Mean ± SD) (εύρος ηλικιών)		Θετικό οικογενειακό ιστορικό		Κάπνισμα	
	Αρρεν	Θήλυ	Mean ± SD (εύρος)	SD (εύρος)	Αρρεν	Θήλυ	Αρρεν	Θήλυ
38	22	Αρρεν	58 ± 13,7 (23 – 92)	58,6 ± 15,4 (23 – 92)	—	—	16/38 (42,1%)	12/22 (54,5%)
	16	Θήλυ	—	57,3 ± 11,5 (41 – 83)	—	—	—	4/16 (25%)

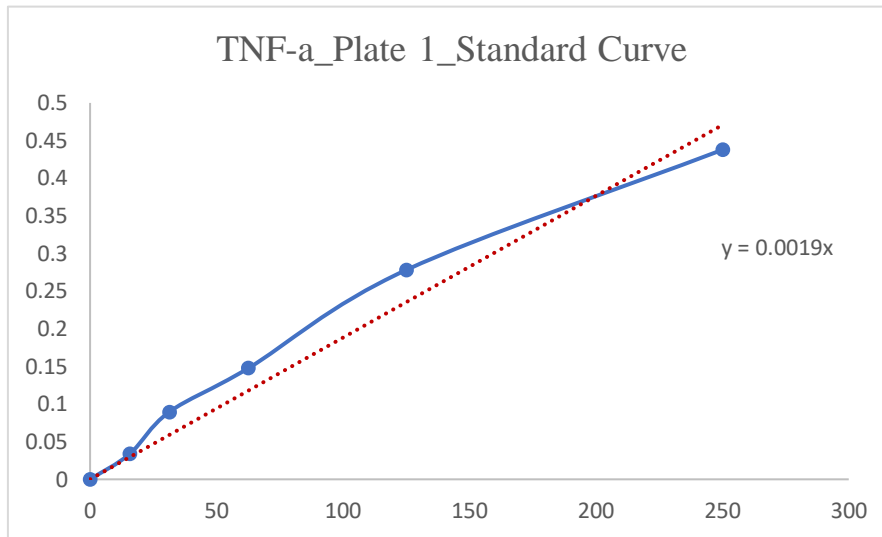
Πίνακας 4: Χαρακτηριστικά των υγιών εθελοντών

Αριθμός ασθενών με PD	Φύλο		Ηλικία (Mean ± SD) (εύρος ηλικιών)		Θετικό οικογενειακό ιστορικό		Κάπνισμα	
	Αρρεν	Θήλυ	Mean ± SD (εύρος)	SD (εύρος)	Αρρεν	Θήλυ	Αρρεν	Θήλυ
110	68	Αρρεν	68,5 ± 12,4 (17 – 89)	67,1 ± 13,7 (23 – 92)	9/68 (13,2%)	—	33/68 (48,5%)	—
	42	Θήλυ	—	71 ± 9,7 (49 – 89)	19/110 (17,3%)	10/42 (23,8%)	35/110 (31,8%)	2/42 (4,7%)

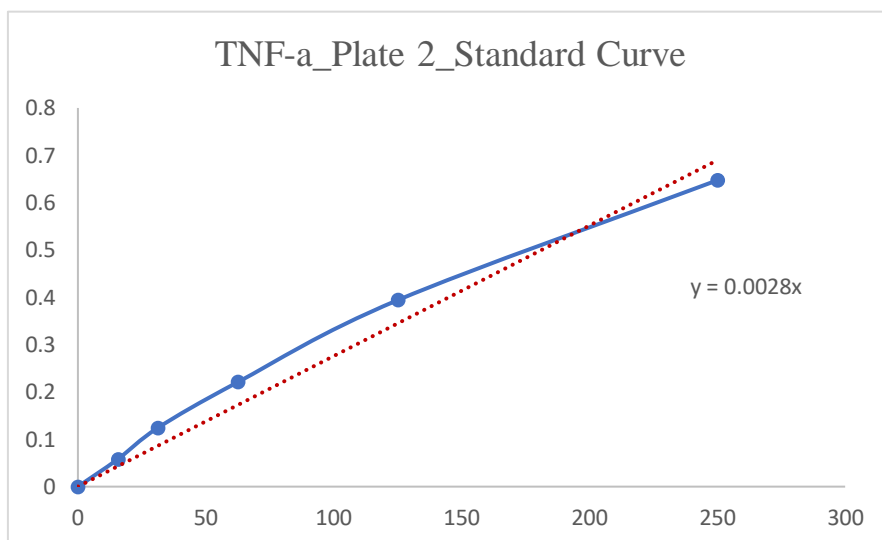
Πίνακας 5: Χαρακτηριστικά των ασθενών με Parkinson

4.2.1 Προσδιορισμός επιπέδων TNF

Για την ανίχνευση των επιπέδων του παράγοντα νέκρωσης όγκου-άλφα (TNF-α) στον ορό αίματος των ασθενών με Parkinson αλλά και των υγιών εθελοντών, έγινε χρήση του εμπορικά διαθέσιμου kit, Human TNF-α ELISA Kit της εταιρίας Invitrogen. Λόγω του μεγάλου αριθμού δειγμάτων χρειάστηκε να γίνει ο διαχωρισμός αυτών και να χρησιμοποιηθούν δύο kit για την επίτευξη της πειραματικής διαδικασίας. Έπειτα από την ολοκλήρωση των προαπαιτούμενων βημάτων και την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) των δειγμάτων που περιείχαν, για κάθε μικροπλάκα κατασκευάστηκε η ανάλογη πρότυπη καμπύλη με σκοπό τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του TNF-α. Ωστόσο, λόγω του ότι σε κάθε μικροπλάκα οι δύο πρώτες στήλες αντιστοιχούσαν σε πρότυπα διαλύματα, εφόσον λήφθηκαν οι απορροφήσεις αυτών υπολογίστηκε η μέση τιμή για το κάθε ένα, και έτσι προέκυψε μια τιμή για την επακόλουθη κατασκευή της καμπύλης. Στα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζονται οι πρότυπες καμπύλες που κατασκευάστηκαν για κάθε μικροπλάκα ξεχωριστά, καθώς και η εξίσωση για κάθε μια, με βάση την οποία υπολογίστηκε η συγκέντρωση του TNF-α σε κάθε δείγμα που περιείχαν αντίστοιχα.



Γράφημα 1: Πρότυπη καμπύλη της πρώτης μικροπλάκας και η εξίσωση της, για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του TNF-a στα δείγματα που τοποθετήθηκαν σε αυτή.

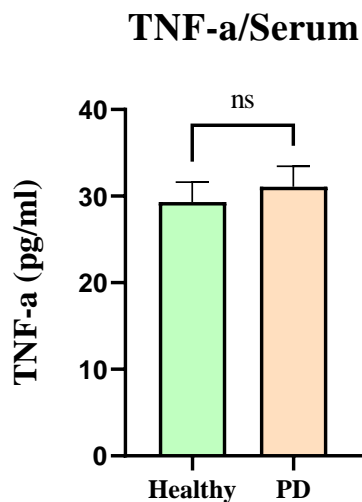


Γράφημα 2: Πρότυπη καμπύλη της δεύτερης μικροπλάκας και η αντίστοιχη εξίσωση που προκύπτει από αυτή για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του TNF-a στα δείγματα που περιείχε.

Κάθε εξίσωση που προέκυψε από τις παραπάνω πρότυπες καμπύλες, λύθηκε ως προς την άγνωστη τιμή x και έπειτα έγινε αντικατάσταση της οπτικής απορρόφησης κάθε δείγματος στην τιμή y , στην αντίστοιχη εξίσωση ανάλογα σε ποια μικροπλάκα είχε τοποθετηθεί. Η επίλυση της εξίσωσης και η εύρεση της άγνωστης τιμής x αντιπροσώπευε και την άγνωστη τιμή της συγκέντρωσης του TNF-a σε pg/ml που περιείχε κάθε δείγμα ορού είτε προερχόταν από ασθενή με Parkinson είτε από υγιή άτομο.

Έχοντας πλέον εντοπίσει τις συγκεντρώσεις του TNF-a για κάθε δείγμα, σε πρώτη φάση, κατασκευάσαμε γράφημα για να δούμε την μέση κατανομή της συγκέντρωσης

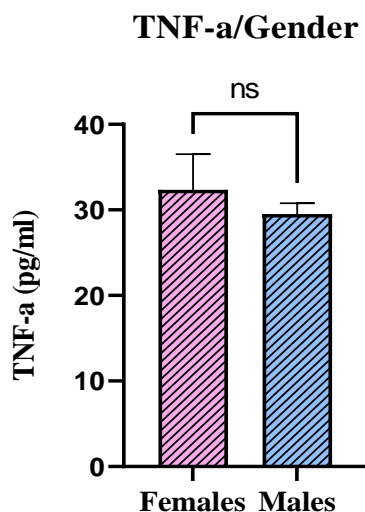
του σε κάθε ομάδα που μελετήθηκε (υγιείς – ασθενής με PD), και το οποίο απεικονίζεται παρακάτω.



Γράφημα 3: Σύγκριση των επιπέδων του TNF-a στον ορό αίματος, μεταξύ των υγιών εθελοντών και των ασθενών με PD (Concentration TNF-a: Mean ± SEM).

Από την ανάλυση των στοιχείων που απεικονίζονται στο **Γράφημα 3**, προκύπτει ότι η μέση τιμή της συγκέντρωσης του TNF-a στον ορό των υγιών ατόμων (n=38) είναι ίση με $29,3 \pm 2,311$ pg/ml, ενώ αυτή των ασθενών με PD (n=110) είναι ίση με $31,09 \pm 2,334$ pg/ml. Από την στατιστική ανάλυση αυτών των τιμών προκύπτει επίσης ότι το p-value είναι ίσο με 0,297 ($>0,05$), οπότε και δεν εξάγεται στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των υγιών ατόμων και των ασθενών με PD, όσο αφορά τα επίπεδα του TNF-a στον ορό τους.

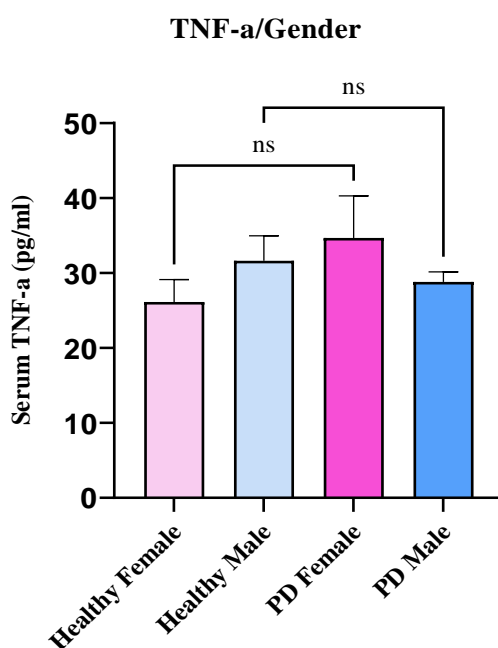
Έπειτα, συγκρίναμε τη μέση τιμή της συγκέντρωσης του TNF-a στον ορό του αίματος, μεταξύ όλων των θηλυκών ατόμων που συμμετείχαν στη μελέτη, έναντι αυτής όλων των αρσενικών ατόμων, όπως διαφαίνεται στο παρακάτω γράφημα.



Γράφημα 4: Σύγκριση των επιπέδων του TNF-a στον ορό αίματος, μεταξύ των θηλυκών και των αρσενικών ατόμων, που συμμετείχαν στη μελέτη (Concentration TNF-a: Mean ± SEM).

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο **Γράφημα 4**, βλέπουμε ότι η μέση τιμή της συγκέντρωσης του TNF-a στον ορό των θηλυκών ατόμων (n=58) βρέθηκε ίση με 28,41 pg/ml, ενώ στον ορό των αρσενικών ατόμων (n=90) ίση με 32,07 pg/ml. Από την στατιστική ανάλυση αυτών των τιμών προκύπτει ότι το p-value είναι ίσο με 0,5289 (>0,05), οπότε και δεν συνάγεται στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των θηλυκών και αρσενικών ατόμων, όσο αφορά τα επίπεδα του TNF-a στον ορό τους.

Στη συνέχεια, συγκρίναμε τη μέση τιμή της συγκέντρωσης του TNF-a μεταξύ των υγιών θηλυκών ατόμων και των θηλυκών με PD, όπως και τις αντίστοιχες τιμές μεταξύ των υγιών αρσενικών και αυτών με PD, και τα αποτελέσματα της σύγκρισης διαφαίνονται στο παρακάτω γράφημα.

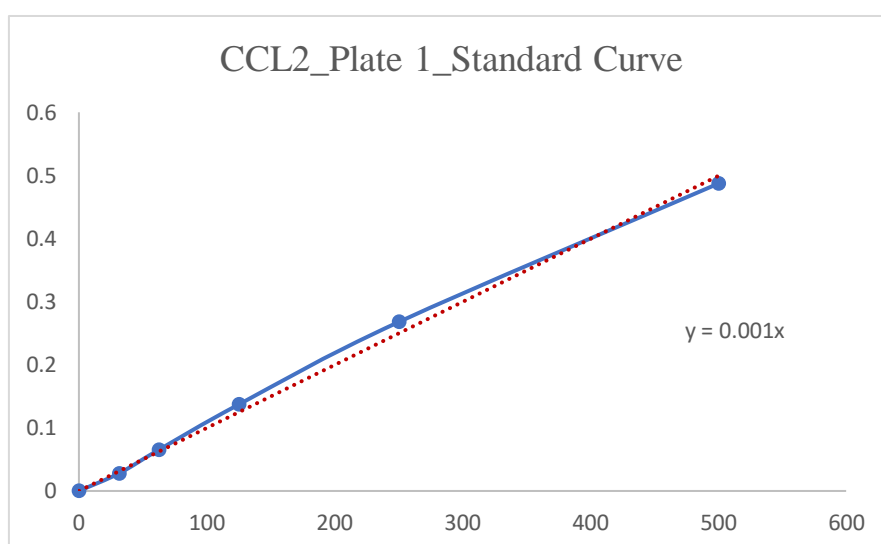


Γράφημα 5: Σύγκριση των επιπέδων του TNF-a στον ορό αίματος, μεταξύ των υγιών θηλυκών ατόμων και αυτών με PD και μεταξύ των υγιών αρσενικών ατόμων και αυτών με PD (Concentration TNF-a :Mean ± SEM).

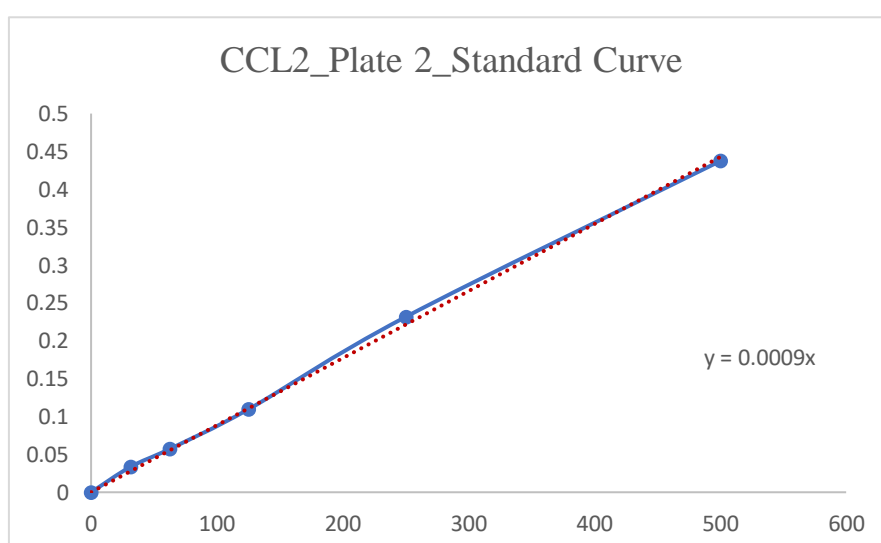
Στο **Γράφημα 5**, παρατηρούμε τη μέση τιμή της συγκέντρωσης του TNF-a στον ορό των υγιών θηλυκών ατόμων (n=16) που υπολογίστηκε ίση με $26,11 \pm 3,01$ pg/ml, ενώ αυτή στον ορό των θηλυκών ατόμων με PD (n=42) ίση με $29,29 \pm 1,52$. Τα στατιστικά αποτελέσματα αυτής της σύγκρισης έδειξαν το p-value ίσο με 0,0785 (>0,05), οπότε και δεν προκύπτει στατιστικώς σημαντική διαφορά όσο αφορά την συγκέντρωση του TNF-a στον ορό μεταξύ των υγιών θηλυκών και αυτών με PD. Αντίστοιχα, η μέση τιμή της συγκέντρωσης του TNF-a στον ορό των υγιών αρσενικών ατόμων (n=22) είναι ίση με $31,63 \pm 3,3$ pg/ml, ενώ στον ορό των αρσενικών με PD (n=68) ίση με $32,21 \pm 3,66$ pg/ml και η στατιστική ανάλυση έδειξε το p-value να είναι μεγαλύτερο του 0,999. Συνεπώς, ούτε στη περίπτωση της σύγκρισης υγιών αρσενικών και αυτών με PD δεν προκύπτει στατιστικώς σημαντική διαφορά στην ποσοτική συγκέντρωση του TNF-a που βρέθηκε στον ορό τους.

4.2.2 Προσδιορισμός επιπέδων CCL2

Η εύρεση των ποσοτικών επιπέδων της χημειοκίνης CCL2 στον ορό αίματος των ασθενών με νόσο του Parkinson αλλά και των υγιών εθελοντών, έγινε με τη βοήθεια του εμπορικά διαθέσιμου kit, Human CCL2/MCP-1 Quantkine ELISA kit της εταιρίας R&D Systems. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, λόγω του μεγάλου αριθμού δειγμάτων αυτά χωρίστηκαν για την ανάλυση τους και χρησιμοποιήθηκαν δύο μικροπλάκες και συνεπώς δύο kit για την εκτέλεση της πειραματικής διαδικασίας. Αντίστοιχα με την διαδικασία που έγινε για τον υπολογισμό του TNF-a στον ορό των συμμετεχόντων, όπως περιγράφηκε στην αρχή της ενότητας 4.1.1, ανάλογα βήματα πραγματοποιήθηκαν και για τον υπολογισμό της CCL2. Επομένως, από κάθε μικροπλάκα προέκυψε η αντίστοιχη πρότυπη καμπύλη, όπως αυτές παρατίθενται ακριβώς παρακάτω.



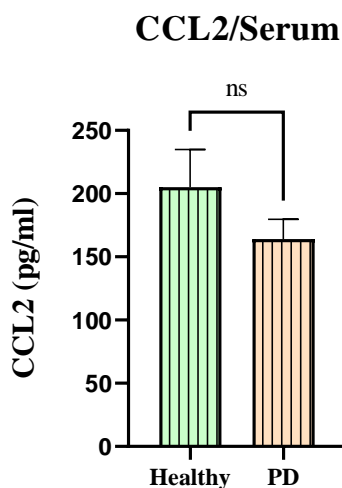
Γράφημα 6: Πρότυπη καμπύλη της πρώτης μικροπλάκας και η εξίσωσή της, για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της CCL2 στα δείγματα που τοποθετήθηκαν σε αυτή.



Γράφημα 7: Πρότυπη καμπύλη της δεύτερης μικροπλάκας και η αντίστοιχη εξίσωση που προκύπτει από αυτή για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της CCL2 στα δείγματα που περιείχε.

Κάθε εξίσωση που προέκυψε από τις παραπάνω πρότυπες καμπύλες, λύθηκε ως προς την άγνωστη τιμή x και έπειτα έγινε αντικατάσταση της οπτικής απορρόφησης κάθε δείγματος στην τιμή y , στην αντίστοιχη εξίσωση ανάλογα σε ποια μικροπλάκα είχε τοποθετηθεί. Η επίλυση της εξίσωσης και η εύρεση της άγνωστης τιμής x αντιπροσώπευε και την άγνωστη τιμή της συγκέντρωσης της CCL2 σε pg/ml που περιείχε κάθε δείγμα ορού είτε προερχόταν από ασθενή με Parkinson είτε από υγιή άτομο.

Μετά τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της CCL2 κάθε δείγματος, προβήκαμε στη δημιουργία γραφήματος, όπως απεικονίζεται παρακάτω, για την σύγκριση της μέσης τιμής των συγκεντρώσεων της CCL2 στον ορό τόσο των υγιών ατόμων όσο και των ασθενών με PD.

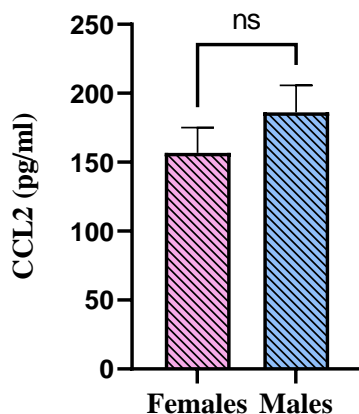


Γράφημα 8: Σύγκριση των επιπέδων της CCL2 στον ορό αίματος, μεταξύ των υγιών εθελοντών και των ασθενών με PD (Concentration CCL2: Mean \pm SEM).

Από τις τιμές που εξήχθησαν, υπολογίστηκε ότι η μέση τιμή της συγκέντρωσης της CCL2 στον ορό των υγιών ατόμων ($n=38$) ήταν ίση με $205,18 \pm 29,8$ pg/ml, ενώ στον ορό των ασθενών με PD ($n=110$) ίση με $164,04 \pm 15,55$ pg/ml. Όπως φαίνεται και στο **Γράφημα 8**, η στατιστική ανάλυση αυτών των αποτελεσμάτων, έδωσε το p -value ίσο με $0,28$ ($>0,005$) και επομένως η σύγκριση της συγκέντρωσης της CCL2 στον ορό μεταξύ υγιών ατόμων και ασθενών με PD δεν θεωρείται στατιστικώς σημαντική.

Όπως για τον TNF- α , έτσι και για την CCL2, συγκρίναμε επίσης τη μέση τιμή της συγκέντρωσης της μεταξύ όλων των θηλυκών ατόμων που συμμετείχαν στη μελέτη, έναντι αυτής όλων των αρσενικών ατόμων, όπως διαφαίνεται στο παρακάτω γράφημα.

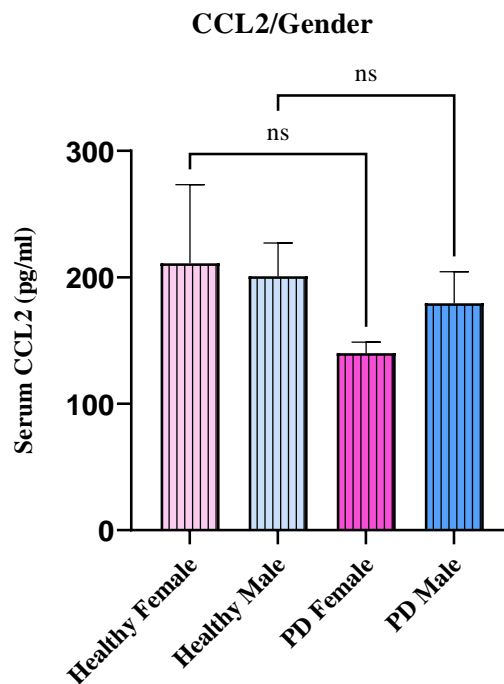
CCL2/Gender



Γράφημα 9: Σύγκριση των επιπέδων της CCL2 στον ορό αίματος, μεταξύ των θηλυκών και των αρσενικών ατόμων, που συμμετείχαν στη μελέτη (Concentration TNF-a: Mean \pm SEM).

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο **Γράφημα 9**, βλέπουμε ότι η μέση τιμή της συγκέντρωσης της CCL2 στον ορό των θηλυκών ατόμων (n=58) βρέθηκε ίση με 156,77 pg/ml, ενώ των αρσενικών ατόμων (n=90) ίση με 186,1 pg/ml. Από την στατιστική ανάλυση αυτών των τιμών προκύπτει ότι το p-value είναι ίσο με 0,2584 (>0,05), οπότε και δεν συνάγεται στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των θηλυκών και αρσενικών ατόμων, όσο αφορά τα επίπεδα του TNF-a στον ορό τους.

Τέλος, συγκρίναμε επίσης τη μέση τιμή της συγκέντρωσης της CCL2 μεταξύ των υγιών θηλυκών ατόμων και των θηλυκών με PD, όπως και τις αντίστοιχες τιμές μεταξύ των υγιών αρσενικών και αυτών με PD, και τα αποτελέσματα της σύγκρισης που λάβαμε απεικονίζονται στο παρακάτω γράφημα.



Γράφημα 10: Σύγκριση των επιπέδων της CCL2 στον ορό αίματος, μεταξύ των υγιών θηλυκών ατόμων και αυτών με PD και μεταξύ των υγιών αρσενικών ατόμων και αυτών με PD (Concentration CCL2: Mean \pm SEM).

Στο **Γράφημα 10**, παρατηρούμε τη μέση τιμή της συγκέντρωσης της CCL2 στον ορό των υγιών θηλυκών ατόμων ($n=16$) που υπολογίστηκε ίση με $211,09 \pm 62,22$ pg/ml, ενώ αυτή στον ορό των θηλυκών ατόμων με PD ($n=42$) ίση με $139,94 \pm 8,8$. Τα στατιστικά αποτελέσματα αυτής της σύγκρισης έδειξαν το p-value να είναι μεγαλύτερο του 0,999 οπότε και δεν προκύπτει στατιστικώς σημαντική διαφορά όσο αφορά την συγκέντρωση της CCL2 στον ορό μεταξύ των υγιών θηλυκών ατόμων και αυτών με PD. Αντίστοιχα, η μέση τιμή της συγκέντρωσης της CCL2 στον ορό των υγιών αρσενικών ατόμων ($n=22$) είναι ίση με $200,88 \pm 26,26$ pg/ml, ενώ στον αρσενικών με PD ($n=68$) ίση με $179,51 \pm 24,81$ pg/ml και η στατιστική ανάλυση έδειξε το p-value να ισούται με 0,169 ($>0,005$). Άρα, ούτε και στη περίπτωση της σύγκρισης υγιών αρσενικών και αυτών με PD δεν προκύπτει στατιστικώς σημαντική διαφορά στην συγκέντρωση της CCL2 που ανιχνεύθηκε στον ορό τους.

5. Συζήτηση

Η νόσος του Parkinson, βρίσκεται μεταξύ των πιο κοινών νευροεκφυλιστικών διαταραχών που επηρεάζουν τους ανθρώπους, συνήθως, άνω των 65 ετών, καταλαμβάνοντας τη δεύτερη θέση στη συχνότητα εμφάνισης της μετά τη νόσο Alzheimer. Η νόσος χαρακτηρίζεται από κινητικά συμπτώματα, συμπεριλαμβανομένης της βραδυκινησίας, της ακαμψίας και του τρόμου, και μια πληθώρα μη κινητικών διαταραχών που τις περισσότερες φορές προηγούνται των κινητικών. Οι χαρακτηριστικές παθολογικές αλλαγές στον εγκέφαλο των παρκινσονικών ατόμων, περιλαμβάνουν ενδονευρωνικά εγκλείσματα της πρωτεΐνης α-συνουκλεΐνη (σωμάτια Lewy και νευρίτες Lewy) και απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων στη μέλαινα ουσία και σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου, με αποτέλεσμα τη μειωμένη συγκέντρωση ντοπαμίνης στο ραβδωτό σώμα, προκαλώντας τα κλασικά κινητικά συμπτώματα. Οι γνώσεις που αφορούν τη γενετική ευαισθησία και τους παράγοντες κινδύνου που εμπλέκονται στην εμφάνιση της νόσου, έχουν δώσει πληροφορίες για τα εμπλεκόμενα παθογόνα μονοπάτια, τα οποία περιλαμβάνουν τη μιτοχονδριακή και ενδολυσosomalική δυσλειτουργία, τη διαταραγμένη πρωτεόσταση της α-συνουκλεΐνης και το οξειδωτικό στρες [59]. Η ανώμαλη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος έχει επίσης προταθεί ως κρίσιμο συστατικό της ευαισθησίας και της εξέλιξης της νόσου, με αυτό το τομέα έρευνας να έχει λάβει αυξανόμενη προσοχή τα τελευταία χρόνια.

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB αποτελεί έναν από τους κύριους ρυθμιστές πολυάριθμων συστημάτων του ανθρώπου, μεταξύ των οποίων του ανοσοποιητικού και του νευρικού συστήματος. Τα μέλη της οικογένειας του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB σχηματίζουν διμερή που ρυθμίζουν ένα ευρύ φάσμα γονιδίων, των οποίων οι λειτουργίες απαντώνται στον πολλαπλασιασμό, την ανάπτυξη, την επιβίωση και τον θάνατο των κυττάρων. Η επαγωγίμη δραστηριότητα του NF-κB μέσω των ποικίλων ερεθισμάτων, μπορεί να καταστεί δυνατή μέσω δύο διαφορετικών οδών σηματοδότησης, με αποτέλεσμα την εκκίνηση της μεταγραφής των γονιδίων στόχων του. Ωστόσο, η μεταγραφική του δραστηριότητα υπόκειται σε στενό έλεγχο μέσω των ανασταλτικών πρωτεϊνών IκB και διάφορων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των υπομονάδων του [86]. Η απορρύθμιση του μπορεί να καταστεί επιζήμια για την μοίρα των κυττάρων, προκαλώντας την εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων.

Δεδομένου της συμμετοχής του στη ρύθμιση ενός αριθμού γονιδίων τόσο του ανοσοποιητικού όσο και του νευρικού συστήματος, ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB αποτελεί έναν καίριο ρυθμιστή της νευροφλεγμονής που χαρακτηρίζει τη νόσο του Parkinson. Ενώ τα μεταγραφικά γεγονότα σε εγκεφαλικούς ιστούς από ασθενείς με Parkinson έχουν ρίξει φως στην παθογένεση της νόσου, μελέτες τα τελευταία χρόνια έχουν στραφεί στη χρήση του περιφερικού αίματος ως υποκατάστατου ιστού στην έρευνα για αυτή. Έτσι, στη παρούσα μελέτη έγινε χρήση περιφερικού αίματος τόσο από ασθενείς με Parkinson αλλά και από υγιή άτομα, για να διερευνηθούν τα επίπεδα

ενεργοποίησης του NF-κB σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω κυτταρομετρίας ροής, και η ποσοτικοποίηση της έκφρασης δύο γονιδίων στόχων του, της κυτταροκίνης TNF και της χημειοκίνης CCL2 μέσω της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA.

Αρχικά, τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από την κυτταρομετρία ροής αναλύθηκαν ώστε να διερευνηθούν τα ποσοστά των T- και B-λεμφοκυττάρων, καθώς και των μονοκυττάρων στο αίμα των παρκινσονικών και υγιών ατόμων. Τα ευρήματα αυτού του συσχετισμού έδειξαν ότι ο πληθυσμός των T λεμφοκυττάρων ήταν μειωμένος στους ασθενείς με Parkinson σε σχέση με τα υγιή άτομα, αλλά χωρίς να υπάρχει στατιστική σημαντικότητα. Επίσης, ο πληθυσμός των B λεμφοκυττάρων ήταν σημαντικά μειωμένος στα άτομα με Parkinson, όπως και αυτός των μονοκυττάρων σε σχέση με τους υγιείς. Έτσι, γίνεται αντιληπτό πως υπάρχει μια εμφανής αλλαγή στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος στο αίμα των ασθενών με Parkinson, κάτι το οποίο έχει διαπιστωθεί και σε άλλες μελέτες. Οι ερευνητές έχουν εντοπίσει, κατά κύριο λόγο, μείωση σε αυτούς τους κυτταρικούς πληθυσμούς, στο αίμα των παρκινσονικών ατόμων συγκριτικά με υγιή άτομα, αν και υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν αύξηση στα T κύτταρα [139,140,141]. Εφόσον η γήρανση αποτελεί παράγοντα υψηλού κινδύνου για την ανάπτυξη της νόσου, αυτή αντικατοπτρίζεται και στη γήρανση του ανοσοποιητικού που μεταφράζεται σε μειωμένο αριθμό των κυττάρων του [142]. Παράλληλα, η συσσώρευση της πρωτεΐνης α-συνουκλεΐνη, του κύριου παθοφυσιολογικού χαρακτηριστικού της νόσου, επάγει απόπτωση με αλλοιωμένη έκφραση των ανθρώπινων περιφερειακών λεμφοκυττάρων στη νόσο του Parkinson [143]. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι τα B κύτταρα εκφράζουν υποδοχείς ντοπαμίνης και ακόμη και οι χαμηλές δόσεις λεβοντόπας, του κύριου θεραπευτικού παράγοντα της νόσου, μειώνουν τον πολλαπλασιασμό τους [144]. Επομένως, αυτοί και άλλοι παράγοντες μπορεί να είναι ευνοϊκοί για την εξήγηση των αλλαγών στο προφίλ των κυττάρων του ανοσοποιητικού στο περιφερικό αίμα των παρκινσονικών ατόμων.

Στη συνέχεια, αναλύθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης p65/NF-κB τόσο στο σύνολο των κυττάρων του αίματος όσο και στους τρεις κυτταρικούς πληθυσμούς του ανοσοποιητικού συστήματος, χρησιμοποιώντας τα επίπεδα της μέσης έντασης φθορισμού (MFI). Η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης της συγκεκριμένης υπομονάδας του NF-κB μεταξύ υγιών και παρκινσονικών ατόμων, έδειξε αύξηση της στα κύτταρα του ολικού αίματος, όπως επίσης και στα T-λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα, στα άτομα με Parkinson. Από την άλλη, όσο αφορά την ίδια ομάδα ατόμων, παρατηρήθηκε μείωση της στα B-λεμφοκύτταρα, ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά χαρακτηρίστηκαν από μη στατιστικά σημαντικές διαφορές. Παράλληλα, έγινε σύγκριση των επιπέδων έκφρασης της p65/NF-κB, μεταξύ των τριών αυτών κυτταρικών πληθυσμών του ανοσοποιητικού συστήματος, στα υγιή άτομα αλλά και στα άτομα με Parkinson. Ανάμεσα στα υγιή άτομα, δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στην έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στα T- και B-λεμφοκύτταρα αλλά ούτε και στα μονοκύτταρα, στα οποία βέβαια υπάρχει μια αυξητική τάση σε σχέση με τους άλλους δύο πληθυσμούς, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά. Όσο αφορά τα άτομα με Parkinson, τα επίπεδα της p65 παρέμειναν περίπου στα ίδια επίπεδα τόσο στα T-

όσο και στα Β-λεμφοκύτταρα, με αυξητική τάση στα Τ κύτταρα αλλά χωρίς σημαντική διαφορά. Επίσης, παρόμοιο μοτίβο παρατηρήθηκε στη σύγκριση της έκφρασης της μεταξύ των Τ-λεμφοκυττάρων και των μονοκυττάρων, όπου στα τελευταία παρουσιάστηκε αυξητική τάση αλλά και πάλι χωρίς σημαντική διαφορά. Όμως, υπήρξε σημαντική διαφορά της έκφρασης στα μονοκύτταρα σε σχέση με τα Β-λεμφοκύτταρα των παρκινσονικών ατόμων, όπου είχαμε υψηλότερη έκφραση της p65 στα μονοκύτταρα.

Εξ όσων είναι γνωστά από την διεθνή βιβλιογραφία, δεν έχουν πραγματοποιηθεί αντίστοιχα πειράματα στα οποία να έχει γίνει χρήση του περιφερικού αίματος ατόμων με Parkinson, με στόχο να διερευνηθούν τα επίπεδα της έκφρασης της p65/NF-κΒ στα κύτταρα του ανοσοποιητικού τους. Οι ερευνητές, είχαν επικεντρώσει τις προσπάθειες τους στο να αποσαφηνίσουν το ρόλο του NF-κΒ στη παθογένεση της νόσου μέσω της χρήσης τομών από μεταθανάτιους εγκεφάλους ατόμων που είχαν διαγνωστεί με Parkinson και σε ζωικά μοντέλα με τη νόσο [145,146]. Ενώ η πυρηνική p65 έχει παρατηρηθεί σε νευρώνες καθώς και αστροκύτταρα σε ιστούς από ασθενείς με Parkinson, το αν η ενεργοποίηση του NF-κΒ εμφανίζεται κυρίως σε νευρώνες ή γλοία σε παρκινσονικά μοντέλα ποντικών μπορεί να εξαρτάται από το υπό μελέτη μοντέλο. Επιπρόσθετα, η προφλεγμονώδης λειτουργία του NF-κΒ έχει μελετηθεί εκτενώς σε μακροφάγα, μια μεγάλη οικογένεια κυττάρων του έμφυτου ανοσοποιητικού, που κατοικούν σε διαφορετικούς ιστούς και λειτουργούν στην πρώτη γραμμή μιας ανοσολογικής απόκρισης έναντι λοιμώξεων [147]. Ο NF-κΒ είναι ένας βασικός μεταγραφικός παράγοντας των μακροφάγων M1 και απαιτείται για την επαγωγή μεγάλου αριθμού φλεγμονωδών γονιδίων, αλλά και για τη προαγωγή της διαφοροποίησης των φλεγμονωδών Τ κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων Th1 και Th17, τα οποία με τη σειρά τους μεσολαβούν στη διατήρηση της φλεγμονής [148]. Συνεπώς, εφόσον τα δεδομένα μας παρουσίασαν μια αυξητική τάση στην έκφραση της p65/NF-κΒ στα μονοκύτταρα τόσο των ασθενών όσο και των υγιών ατόμων, τα οποία αποτελούν πρόδρομα των μακροφάγων, κρίνεται αναγκαία η περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου της ιδιαίτερα σε αυτά.

Επιπρόσθετα, παρόμοιες αναλύσεις που αφορούν στην έκφραση της p65/NF-κΒ στα κύτταρα του ανοσοποιητικού των ασθενών με νόσο του Parkinson και την σύγκρισή τους με υγιή άτομα, πραγματοποιήθηκαν και για την έκφραση του υποδοχέα CD40. Τα αποτελέσματα έδειξαν παρόμοια επίπεδα έκφρασης του στο σύνολο των κυττάρων του αίματος αλλά και στα Β-λεμφοκύτταρα, ενώ στα μονοκύτταρα υπήρχε μια αυξητική τάση στους ασθενείς με Parkinson, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τα υγιή άτομα. Από την άλλη, όσο αφορά στα Τ-λεμφοκύτταρα, φάνηκε πως υπήρχε μια αυξημένη έκφραση του CD40 σε αυτά των παρκινσονικών ατόμων, με σημαντική διαφορά σε σχέση με αυτά των υγιών. Συγχρόνως, η μελέτη της έκφρασης του CD40 στους τρεις αυτούς κυτταρικούς πληθυσμούς του ανοσοποιητικού και η σύγκριση της ανάμεσα στα υγιή άτομα, αλλά και στα άτομα με Parkinson, έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές. Πιο συγκεκριμένα, στα υγιή άτομα, παρατηρήθηκε ιδιαίτερα αυξημένη έκφραση του CD40 στα Β-λεμφοκύτταρα, ειδικά σε σχέση με τα Τ-λεμφοκύτταρα, αλλά και με τα μονοκύτταρα. Επίσης, σημαντική ήταν και η διαφορά

ανάμεσα στα μονοκύτταρα όπου παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του σε σχέση με τα Τ-λεμφοκύτταρα των υγιών ατόμων. Ακόμη, αναφορικά με την έκφραση του στα συγκεκριμένα κύτταρα των παρκινσονικών ατόμων, παρατηρήθηκε και πάλι υψηλή έκφραση στα Β-λεμφοκύτταρα σε σχέση με τους άλλους δύο πληθυσμούς, ενώ δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ των Τ-λεμφοκυττάρων και των μονοκυττάρων, αν και φάνηκε στα τελευταία να υπάρχει μια αυξητική τάση χωρίς όμως σημαντική διαφορά.

Ο υποδοχέας CD40 αποτελεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, μέλος της υπερικογένειας των υποδοχέων του TNF, καθώς και ένας μετατροπέας διαμεμβρανικών σημάτων που οδηγεί στην ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών κινασών και μεταγραφικών παραγόντων εντός του κυττάρου. Η εμπλοκή του CD40 ρυθμίζει ένα ευρύ φάσμα μοριακών και κυτταρικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της έναρξης και της εξέλιξης της κυτταρικής και χυμικής επίκτητης ανοσίας. Επίσης, αποτελεί έναν από τους υποδοχείς μέσω των οποίων καθίσταται ενεργό το εναλλακτικό μονοπάτι μεταγωγής σήματος που οδηγεί στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, ο οποίος ρυθμίζει ένα ευρύ αριθμό γονιδίων που επάγουν την έκφραση προφλεγμονωδών κυτοκινών. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι τα μικρογλοία και τα αστροκύτταρα, στο κεντρικό νευρικό σύστημα, διεγείρονται μέσω της σηματοδότησης του CD40, προκαλώντας έτσι την παραγωγή της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου και της κυκλοοξυγενάσης-2, δύο μόρια που είναι γνωστό ότι συμβάλλουν στην παθογένεση του Parkinson μιας και προκαλούν απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων [149].

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, όπως αναφέρθηκε, έγινε και ο ποσοτικός προσδιορισμός των κυτταροκινών TNF και CCL2 στον ορό αίματος των ασθενών με Parkinson αλλά και υγιών ατόμων, ώστε να εξεταστεί εάν υπάρχει συσχέτιση με την εμφάνιση της νόσου. Τα επίπεδα του TNF βρέθηκαν να είναι παρόμοια τόσο στα παρκινσονικά άτομα όσο και στα υγιή, ίσως με ελαφρά επικράτηση στους ασθενείς, αλλά χωρίς στατιστική σημαντικότητα. Επίσης, συσχέτιστηκαν τα επίπεδα του με βάση το φύλο των συμμετεχόντων, με τα αποτελέσματα να δείχνουν για το σύνολο των ατόμων, είτε νοσούσαν είτε όχι, ότι υπάρχει μια ελαφρά υπεροχή στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες, χωρίς να θεωρείτε όμως στατιστικά σημαντική. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός ανδρών και γυναικών σε ομάδες υγιών και παρκινσονικών ατόμων, όπου έγινε σύγκριση των επιπέδων του TNF ανάμεσα σε υγιής και ασθενής αναλογικά με το φύλο τους. Έτσι, βρέθηκε ότι τα επίπεδα του TNF ήταν αυξημένα στα θηλυκά άτομα με Parkinson συγκριτικά με τα υγιή, ενώ ελαφρά επικράτηση βρέθηκε να υπάρχει στα υγιή αρσενικά έναντι αυτών με τη νόσο, χωρίς όμως στατιστική σημαντικότητα.

Οι αντίστοιχες αναλύσεις που αφορούσαν στα επίπεδα της CCL2 στον ορό του αίματος ανάμεσα στα υγιή και παρκινσονικά άτομα, έδειξαν υπεροχή στη συγκέντρωση της στον ορό των υγιών έναντι των ασθενών, αλλά δεν ήταν στατιστικώς σημαντική. Επίσης, φάνηκε πως υπήρχε αυξημένη συγκέντρωση της στον ορό των αρσενικών σε σύγκριση με τα θηλυκά άτομα, στο σύνολο των συμμετεχόντων, αλλά και πάλι χωρίς σημαντική διαφορά. Επιπλέον, αυξημένα ήταν τα επίπεδά της στα υγιή θηλυκά και

αρσενικά συγκριτικά με τα θηλυκά και αρσενικά άτομα με Parkinson, αντίστοιχα, με εμφανή να καθίσταται η διαφορά μεταξύ υγιών και παρκινσονικών θηλυκών, ωστόσο, και αυτά τα αποτελέσματα χαρακτηρίστηκαν μη στατιστικώς σημαντικά.

Μέχρι σήμερα, δεδομένα από μελέτες έχουν δείξει ότι η ανοσολογική απορρύθμιση τόσο στη περιφέρεια όσο και στον εγκέφαλο μπορεί να προκαλέσει ανοδική ρύθμιση των φλεγμονωδών κυτοκινών που εκκινούν έναν καταρράκτη προφλεγμονωδών γεγονότων σηματοδότησης που οδηγούν στη νευροτοξικότητα που σχετίζεται με τη νόσο του Parkinson. Έτσι, έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα διάφορων κυτοκινών στον ορό σε ασθενείς με νόσο του Parkinson, συμπεριλαμβανομένων των TNF και CCL2, που σχετίζονται με τη σοβαρότητα της νόσου και την προκαλούμενη αναπηρία [150,151,152]. Αυτό μπορεί να είναι αποτέλεσμα της γενικής αλλαγής του προφίλ των κυκλοφορούντων ανοσοκυττάρων στο αίμα των ασθενών με Parkinson. Επιπλέον, το εάν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των φύλων στις ανοσολογικές αποκρίσεις στην νόσο του Parkinson παραμένει σε μεγάλο βαθμό ανεξερεύνητο. Υπάρχουν παράγοντες, όμως, που πιθανώς να συμβάλλουν στις παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ των φύλων, όπως η εμπλοκή των φυλετικών ορμονών, η διαφορική έκφραση γονιδίων μεταξύ ανδρών και γυναικών αλλά και η επίπτωση της θεραπευτικής αγωγής στο κάθε φύλο. Επίσης, μπορεί να υπάρχουν και διαφορές στην έκβαση της επίπτωσης της ανοσολογικής δυσλειτουργίας στη νόσο του Parkinson στο ίδιο φύλο, όπως για παράδειγμα στα θηλυκά λόγω της εμμηνόπαυσιακής περιόδου στη ζωή των γυναικών, όπου χάνεται η προστατευτική δράση των οιστρογόνων, συμβάλλοντας στη μείωση των ντοπαμινεργικών νευρώνων και την κατ'επέκταση πρόσφορη ανάπτυξη της νόσου [153].

Συμπερασματικά, τα υπάρχοντα αλλά και αναρτημένα στη διεθνή βιβλιογραφία δεδομένα, υποδηλώνουν αλλαγές στο μικροπεριβάλλον του κεντρικού και περιφερικού ανοσολογικού συστήματος στη νόσο του Parkinson, που συμβάλει στη διαδικασία της παθογένεσης της. Ωστόσο, δεν είναι σαφές εάν αυτές οι αλλαγές είναι δευτερεύουσες στη διαδικασία του κυτταρικού εκφυλισμού ή αν μπορεί να παίζουν ενεργό ρόλο στον νευροεκφυλισμό. Η εύκολη πρόσβαση σε δείγματα αίματος οδήγησε σε έναν σημαντικό αριθμό μελετών που αναλύουν τα επίπεδα περιφερικών φλεγμονωδών κυτοκινών σε ασθενείς με Parkinson σε σύγκριση με υγιή άτομα, με την ελπίδα καλύτερης κατανόησης της αιτιολογίας της και την παροχή υποψηφίων βιοδεικτών για τη πρόγνωση της νόσου. Παρόλα αυτά, η εξέταση των ρυθμιστικών στοιχείων, όπως του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, των φλεγμονωδών σηματοδοτικών μονοπατιών, μέσω των οποίων συντελείται η έκφραση κρίσιμων γονιδίων για την έκβαση της νόσου, είναι ελάχιστα μελετημένη ειδικά σε δείγματα αίματος. Ίσως, αν στο μέλλον, πραγματοποιηθούν μελέτες με περισσότερα δείγματα αίματος από ασθενείς με Parkinson και υγιή άτομα, να μπορεί να γίνει περισσότερο κατανοητός ο ρόλος του NF-κB στη παθογένεση της συγκεκριμένης νόσου σε σχέση με το ανοσοποιητικό σύστημα και να δοκιμαστούν πιθανές θεραπείες που να αφορούν στη στόχευση αυτού.

6. Βιβλιογραφία

1. Crimmins EM. (2015) Lifespan and Healthspan: Past, Present, and Promise. *Gerontologist*. Dec;55(6):901-11.
2. Armstrong RA, Lantos PL, Cairns NJ (2005) Overlap between neurodegenerative disorders. *Neuropathology* 25:111–124
3. Amor S, Woodroffe MN. (2014) Innate and adaptive immune responses in neurodegeneration and repair. *Immunology*. 141:287–91.
4. Schonhoff A.M., Williams G.P., Wallen Z.D. et al. (2020) Innate and Adaptive Immune Responses in Parkinson's Disease. 1st ed. Volume 252. Elsevier; Amsterdam, The Netherlands.
5. Stephenson J., Nutma E., van der Valk P., Amor S. (2018) Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. *Immunology*. 154:204–219.
6. Ransohoff R.M. (2016) How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*. 353:777–783.
7. Feigin, V. L., Nichols, E., Alam, T. et al. (2019). Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, 18, pp. 459-480
8. Surmeier D.J., Obeso J.A., Halliday G.M. (2017) Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 18:101–113.
9. Jankovic J., Tan E.K. (2020) Parkinson's disease: Etiopathogenesis and treatment. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 91(8):795-808.
10. S. Mullin, A.H. Schapira. (2015) Pathogenic mechanisms of neurodegeneration in Parkinson disease. *Neurol. Clin.*, 33 (1), pp. 1-17
11. Birkmayer W, Hornykiewicz O. (1961) [The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia]. *Wien Klin Wochenschr.* 10; 73:787-8.
12. Amit Batla, Deepti Vibha. *Understanding Parkinsonism: The Clinical Perspective* © 2017, Jaypee Brothers Medical Publishers
13. Goldman, Jennifer G. (2007). [Handbook of Clinical Neurology] Parkinson's Disease and Related Disorders, Part I Volume 83 || History of Parkinson's disease., (), 107–128.
14. Toodayan, N. (2018). James Parkinson's Essay on the shaking palsy, 1817-2017. *The Medical Journal of Australia*, 208(9), 384–386.
15. Del Rey NL, Quiroga-Varela A, Garbayo E. et al. (2018) Advances in Parkinson's Disease: 200 Years Later. *Front Neuroanat.* 14; 12:113.
16. Savica, R., Grossardt, B. R., Bower, J. H. et al. (2013) Incidence and pathology of synucleinopathies and tauopathies related to parkinsonism. *JAMA Neurol.* 70, 859–866 (2013).
17. Dorsey, E. R. et al. (2007) Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology* 68, 384–386
18. Kusumi, M., Nakashima, K., Harada, H. (1996) Epidemiology of Parkinson's disease in Yonago City, Japan: comparison with a study carried out 12 years ago. *Neuroepidemiology* 15, 201–207.
19. SK Van Den Eeden, CM Tanner, AL Bernstein, et al. (2003) Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol*, 157, pp. 1015-1022
20. Dorsey, E. R., Elbaz, A., Nichols, E. et al. (2018). Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*.
21. Collier TJ, Kanaan NM, Kordower JH. (2011) Ageing as a primary risk factor for Parkinson's disease: evidence from studies of non-human primates. *Nat Rev Neurosci.* 12(6):359-66.
22. Kish SJ, Shannak K, Rajput A. (1992) Aging produces a specific pattern of striatal dopamine loss: implications for the etiology of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurochem.* 58(2):642-8.

23. Cannon, J. R., & Greenamyre, J. T. (2013). Gene–environment interactions in Parkinson’s disease: Specific evidence in humans and mammalian models. *Neurobiology of Disease*, 57, 38–46.
24. Day, & Mullin, S. (2021). The Genetics of Parkinson’s Disease and Implications for Clinical Practice. *Genes*, 12(7), 1006.
25. Falaq Naz, Yasir Hasan Siddique (2020) Role of Genes and Treatments for Parkinson’s Disease. *The Open Biology Journal*, Vol. 8, pp 47-65.
26. Przedborski S, Jackson-Lewis V. (1998) Mechanisms of MPTP toxicity. *Mov. Disord.* 13(Suppl. 1):35–38
27. Ascherio, A., & Schwarzschild, M. A. (2016). The epidemiology of Parkinson’s disease: risk factors and prevention. *The Lancet Neurology*, 15(12), 1257–1272.
28. Marras, C., Canning, C. G., & Goldman, S. M. (2019). Environment, lifestyle, and Parkinson’s disease: Implications for prevention in the next decade. *Mov Disord.* 34(6):801-811.
29. Dahodwala N., Shah K., He Y. et al. (2018) Sex disparities in access to caregiving in Parkinson disease. *Neurology*. 90(1):e48-e54.
30. Cerri, S., Mus, L., & Blandini, F. (2019). Parkinson’s Disease in Women and Men: What’s the Difference? *Journal of Parkinson’s Disease*, 1–15.
31. Giguère, N., Burke Nanni, S., & Trudeau, L.-E. (2018). On Cell Loss and Selective Vulnerability of Neuronal Populations in Parkinson’s Disease. *Frontiers in Neurology*, 9.
32. Giasson, B.I., Murray, I.V., Trojanowski, J.Q. and Lee, V.M. (2001) A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J. Biol. Chem.*, 276, 2380 –2386.
33. Conway, K.A., Lee, S.J., Rochet, J.C. et al. (2000). Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson’s disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 97, 571 –576.
34. Conway, K.A., Rochet, J.C., Bieganski, R.M. and Lansbury, P.T. Jr. (2001) Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine–alpha-synuclein adduct. *Science*, 294, 1346 – 1349.
35. Winner B, Jappelli R, Maji SK. et al. (2011) In vivo demonstration that -synuclein oligomers are toxic. *Proc Natl Acad Sci.* 108(10):4194–9.
36. Pan T., Kondo S., Le W. et al. (2008) The role of autophagy-lysosome pathway in neurodegeneration associated with Parkinson’s disease. *Brain*. 131(8):1969–78.
37. Xilouri M, Brekk OR, Stefanis L. (2013) Alpha-synuclein and protein degradation systems: A reciprocal relationship. *Mol Neurobiol.* 47(2):537–51.
38. McNaught KSP, Jenner P. (2001) Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson’s disease. *Neurosci Lett.* 297(3):191–4.
39. Ullrich C., Mlekusch R., Kuschnig A. et al. (2010) Ubiquitin enzymes, ubiquitin and proteasome activity in blood mononuclear cells of MCI, Alzheimer and Parkinson patients. *Curr Alzheimer Res.* 7(6):549–55.
40. McNaught KSP., Belizaire R., Isacson O., (2003) Altered proteasomal function in sporadic Parkinson’s disease. *Exp Neurol.* 179(1):38–46.
41. Kitada T., Asakawa S., Hattori N. et al. (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature.* 392(6676):605–8.
42. Nishikawa K., Li H., Kawamura R. et al. (2003) Alterations of structure and hydrolase activity of parkinsonism-associated human ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 variants. *Biochem Biophys Res Commun.* 304(1):176–83.
43. Dehay B., Bove J., Rodriguez-Muela N. et al. (2010) Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson’s disease. *J Neurosci.* 30(37):12535–44.
44. Alvarez-Erviti L., Rodriguez-Oroz MC., Cooper JM. et al. (2010) Caballero C, Ferrer I, Obeso JA, et al. Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains. *Arch Neurol.* 67(12):1464–72.

45. Williams DR., Hadeed A., al-Din ASN. et al. (2005) Kufor Rakeb disease: Autosomal recessive, levodopa-responsive parkinsonism with pyramidal degeneration, supranuclear gaze palsy, and dementia. *Mov Disord.* 20(10):1264–71
46. Pickrell AM., Youle RJ. (2015) The roles of PINK1, Parkin and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron.* 85(2):257–73.
47. TT Du., L Wang., CL Duan. et al. (2015) GBA deficiency promotes SNCA/ α -synuclein accumulation through autophagic inhibition by inactivated PPP2A. *Autophagy*, 11, pp. 1803-1820
48. Murphy MP. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 417(1):1-13.
49. H. L. Martin and P. Teismann, (2009) Glutathione—a review on its role and significance in Parkinson's disease, *FASEB J.*, 23, 3263 —3272
50. V. Dias, E. Junn and M. M. Mouradian. (2013) The role of oxidative stress in Parkinson's disease, *J. Parkinson's Dis.*, 3, 461 —491
51. B. Su, X. Wang, L. Zheng, G. et al. (2010) Abnormal mitochondrial dynamics and neurodegenerative diseases, *BBA, Mol. Basis Dis.*, 1802 , 135-142
52. A. M. Pickrell, M. Pinto and C. T. Moraes (2013) Mouse models of Parkinson's disease associated with mitochondrial dysfunction, *Mol. Cell. Neurosci.*, 55, 87-94
53. R. A. Roberts, R. A. Smith, S. Safe (2010) Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species, *Toxicology*, 276, 85 —94
54. B. Blanchard-Fillion, J. M. Souza, T. Friel et al. (2001) Nitration and Inactivation of Tyrosine Hydroxylase by Peroxynitrite, *J. Biol. Chem.*, 276, 46017-46023
55. A. Hartmann (2004) Postmortem studies in Parkinson's disease. *Dialogues Clin. Neurosci.* 6(3):281-93.
56. T. Yoshida, M. Tanaka, A. Sotomatsu et al. (1998) Activated microglia cause iron-dependent lipid peroxidation in the presence of ferritin, *NeuroReport*, 9, 1929-1933
57. T. G. Hastings (2009) The role of dopamine oxidation in mitochondrial dysfunction: implications for Parkinson's disease, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 41, 469-472
58. N. Hattoria, M. Wanga, H. Taka et al. (2009) Toxic effects of dopamine metabolism in Parkinson's disease, *Parkinsonism Relat. Disord.*, 15, S35-S38
59. Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M. et al. (2017) Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17013.
60. J. M. Fearnley and A. J. Lees (1991) Ageing and Parkinson's disease: Substantia Nigra Regional Selectivity, *Brain*, 114, 2283 —2301
61. Kordower JH, Olanow CW, Dodiya HB. et al. (2013) Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease. *Brain.* 136(8):2419-31.
62. Giguère N, Burke Nanni S, Trudeau LE. (2018) On Cell Loss and Selective Vulnerability of Neuronal Populations in Parkinson's Disease. *Front Neurol.* 9:455.
63. Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AH. (2006) Non-motor symptoms of Parkinson's disease: Diagnosis and management. *Lancet Neurol.* 5(3):235-45.
64. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM. (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature.* 388(6645):839–40.
65. K. Beyer and A. Ariza (2012) Alpha-Synuclein Posttranslational Modification and Alternative Splicing as a Trigger for Neurodegeneration, *Mol. Neurobiol.*, 47, 509-524
66. J. Lotharius and P. Brundin (2002) Pathogenesis of parkinson's disease: dopamine, vesicles and α -synuclein, *Nat. Rev. Neurosci.*, 3, 932-942
67. A. B. Singleton, M. Farrer, J. Johnson et al. (2003) alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease, *Science*, 302, 841
68. Del Tredici K, Hawkes CH, Ghebremedhin E. et al. (2010) Lewy pathology in the submandibular gland of individuals with incidental Lewy body disease and sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 119:703-713

69. Marras C., Lang A. (2013) Parkinson's disease subtypes: lost in translation? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 84: 409-415
70. Jankovic J., McDermott M., Carter J. et al. (1990) Variable expression of Parkinson's disease: a base-line analysis of the DATATOP cohort. The Parkinson Study Group. *Neurology*, 40: 1529-34
71. Marder KS., Tang MX., Mejia-Santana H. et al. (2010) Predictors of parkin mutations in early-onset Parkinson disease: the consortium on risk for early-onset Parkinson disease study. *Arch Neurol*. 67(6):731-8.
72. Postuma RB., Aarsland D., Barone P. et al. (2012) Identifying prodromal Parkinson's disease: pre-motor disorders in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 27: 617-26.
73. Siderowf A., Lang AE. (2012) Premotor Parkinson's disease: concepts and definitions. *Mov Disord*. 27: 608-16.
74. J. Jankovic (2008) Parkinson's disease: clinical features and diagnosis, *J. Neurol., Neurosurg. Psychiatry*, 79, 368-376
75. K. Kiebertz (2003) Designing neuroprotection trials in Parkinson's disease, *Ann. Neurol.*, 53, S100-S109
76. M. L. Dodd, K. J. Klos, J. H. Bower et al. (2005) Pathological gambling caused by drugs used to treat Parkinson disease, *Arch. Neurol.*, 62, 1377-1381
77. C. K. Glass, K. Saijo, B. Winner et al. (2010) Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration, *Cell*, 140, 918-934
78. A.B. Kunnumakkara, B. Shabnam, S. Girisa et al. (2020) Inflammation, NF- κ B, and chronic diseases: how are they linked? *Crit. Rev. Immunol.*, 40, pp. 1-39
79. R.J. Carmody, Y.H. Chen (2007) Nuclear factor-kappa B: activation and regulation during toll-like receptor signaling. *Cell. Mol. Immunol.*, 4, pp. 31-41
80. Feldman, A. Rotter-Maskowitz, E. Okun (2015) DAMPs as mediators of sterile inflammation in aging-related pathologies. *Ageing Res. Rev.*, 24, pp. 29-39
81. H.P. Zhang, Y.J. Xu, Z.X. Zhang (2004) [Expression of protein kinase C and nuclear factor kappa B in lung tissue of patients with chronic obstructive pulmonary disease]. *Zhonghua nei ke za zhi*, 43, pp. 756-759
82. Courtois G, Gilmore TD. (2006) Mutations in the NF- κ B signaling pathway: Implications for human disease. *Oncogene* 25: 6831-6843.
83. Hayden MS, Ghosh S. (2012) NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev*. 26(3):203-34.
84. Smale, S. T. (2012). Dimer-specific regulatory mechanisms within the NF- κ B family of transcription factors. *Immunological Reviews*, 246(1), 193-204.
85. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. (1998) NF- κ B and Rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16: 225 -260.
86. Oeckinghaus, A., & Ghosh, S. (2009). The NF- κ B Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(4), a000034-a000034.
87. Hayden MS, Ghosh S. (2004) Signaling to NF- κ B. *Genes Dev*. 18: 2195-2224.
88. Li, Q., & Verma, I. M. (2002). Erratum: NF- κ B regulation in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 2(10), 725-734.
89. Hayden MS, Ghosh S. (2008) Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell*, 132:344-62
90. Dobrzanski P, Ryseck RP, Bravo R. (1993) Both N- and C-terminal domains of RelB are required for full transactivation: Role of the N-terminal leucine zipper-like motif. *Mol Cell Biol* 13: 1572-1582
91. Napetschnig, J., & Wu, H. (2013). Molecular Basis of NF- κ B Signaling. *Annual Review of Biophysics*, 42(1), 443-468.
92. Mulero MC, Wang VY, Huxford T. et al. (2019) Genome reading by the NF- κ B transcription factors. *Nucleic Acids Res*. 47(19):9967-9989.
93. Chen YQ, Ghosh S, Ghosh G. (1998) A novel DNA recognition mode by the NF- κ B p65 homodimer. *Nat Struct Biol*. 5(1):67-73.

94. Whiteside ST, Israel A. (1997). I κ B proteins: structure, function and regulation. *Semin. Cancer Biol.* 8:75–82
95. Karin M, Ben-Neriah Y. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu. Rev. Immunol.* 18:621–63
96. Hoffmann A, Natoli G, Ghosh G. (2006) Transcriptional regulation via the NF- κ B signaling module. *Oncogene* 25: 6706–6716.
97. Birbach A, Gold P, Binder BR. (2002) Signaling molecules of the NF-kappa B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem.* 277(13):10842-51.
98. Tam WF, Sen R. (2001) I κ B family members function by different mechanisms. *J Biol Chem* 276: 7701–7704.
99. M. Hinz, S.C. Arslan, C. Scheidereit (2012) It takes two to tango: IkappaBs, the multifunctional partners of NF-kappaB. *Immunol. Rev.*, 246, pp. 59-76
100. Massoumi R, Chmielarska K, Hennecke K. (2006) Cyld inhibits tumor cell proliferation by blocking Bcl-3-dependent NF- κ B signaling. *Cell* 125: 665–677.
101. Yamamoto M, Yamazaki S, Uematsu S. et al. (2004) Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein I κ Bzeta. *Nature* 430: 218 –222.
102. G. Bonizzi, M. Karin (2004) The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Cell*, 25, pp. 280-288
103. Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M. (1997) The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. *Cell* 91: 243–252.
104. Mercurio F, Zhu H, Murray BW. et al. (1997) IKK-1 and IKK-2: Cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation. *Science* 278: 860–866.
105. Hoesel, B., Schmid, J.A. (2013) The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer* 12, 86.
106. Shih VF, Tsui R, Caldwell A. (2011) A single NF-kappaB system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Res*, 21: 86-102
107. Mirzaei, S., Zarrabi, A., Hashemi, F. et al. (2021) Regulation of Nuclear Factor-KappaB (NF- κ B) signaling pathway by non-coding RNAs in cancer: Inhibiting or promoting carcinogenesis? *Cancer Letters*, 509, 63–80.
108. Jack A. Prescott, Jennifer P. Mitchell, Simon J. Cook (2021) Inhibitory feedback control of NF- κ B signalling in health and disease. *Biochem J.* 478 (13): 2619–2664.
109. Huang B., Yang X.D., Lamb A. et al. (2010) Posttranslational modifications of NF- κ B: Another layer of regulation for NF- κ B signaling pathway. *Cell Signal.* 22:1282–1290.
110. Ackloo, S., Brown, P. J., & Müller, S. (2017). Chemical probes targeting epigenetic proteins: Applications beyond oncology. *Epigenetics*, 12(5), 378–400.
111. Chen Z, Trapp BD. (2016) Microglia and neuroprotection. *J Neurochem.* 136 Suppl 1:10-7.
112. Li Q, Barres BA. (2018) Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol.* 18:225–42.
113. Tang, Y. (2018) Editorial: Microglial Polarization in the Pathogenesis and Therapeutics of Neurodegenerative Diseases. *Front. Aging Neurosci.* 10, 154.
114. Colton CA. (2009) Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol.* 4:399–418.
115. Tronel C, Largeau B, Santiago Ribeiro MJ et al. (2017) Molecular Targets for PET Imaging of Activated Microglia: The Current Situation and Future Expectations. *Int J Mol Sci.* 18(4):802.
116. Salvi, V.; Sozio, F.; Sozzani, S. et al. (2017) Role of Atypical Chemokine Receptors in Microglial Activation and Polarization. *Front. Aging Neurosci.* 9, 148.
117. Bolanos, J.P. (2016) Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neuronal activity. *J. Neurochem.* 139 (Suppl. 2), 115–125.
118. Gu, X.L.; Long, C.X.; Sun, L. et al. (2010) Astrocytic expression of Parkinson’s disease-related A53T alpha-synuclein causes neurodegeneration in mice. *Mol. Brain* 3, 12.

119. Booth, H.D.E.; Hirst, W.D.; Wade-Martins, R. (2017) The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis. *Trends Neurosci.* 40, 358–370.
120. Nagyoszi, P., Wilhelm, I., Farkas, A.E. et al. (2010) Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells. *Neurochem. Int.* 57, 556–564.
121. Perner, C.; Perner, F.; Gaur, N.; Zimmermann, S.; Witte, O.W.; Heidel, F.H.; Grosskreutz, J.; Prell, T. Plasma VCAM1 levels correlate with disease severity in Parkinson's disease. *J. Neuroinflamm.* 2019, 16, 94.
122. Brochard V., Combadiere B., Prigent A. et al. (2009) Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *J. Clin. Investig.* 119, 182–192.
123. Pereira P.A.B., Aho V.T.E., Paulin L. et al. (2017) Oral and nasal microbiota in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 38, 61–67.
124. Pajares M, I Rojo A, Manda G. et al. (2020) Inflammation in Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Cells.* 9(7):1687.
125. Jia G., Zhang Y., Li W. et al. (2019) Neuroprotective role of icariin in experimental spinal cord injury via its antioxidant, anti-neuroinflammatory and anti-apoptotic properties. *Mol. Med. Rep.* 20(4):3433–3439.
126. Gutierrez H., Davies A.M. (2011) Regulation of neural process growth, elaboration and structural plasticity by NF- κ B. *Trends Neurosci.* 34(6):316–325.
127. Bellucci A., Bubacco L., Longhena, F. et al. (2020) Nuclear Factor- κ B Dysregulation and α -Synuclein Pathology: Critical Interplay in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12:68.
128. Meffert M. K., Chang J. M., Wiltgen B. J. et al. (2003). NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior. *Nat. Neurosci.* 6, 1072–1078.
129. Beattie, E. C., Stellwagen, D., Morishita, W., Bresnahan, J. C., Ha, B. K., Von Zastrow, M., et al. (2002). Control of synaptic strength by glial TNF α . *Science* 295, 2282–2285.
130. Bontempi S., Fiorentini C., Busi C. et al. (2007) Identification and characterization of two nuclear factor-kappaB sites in the regulatory region of the dopamine D2 receptor. *Endocrinology* 148, 2563–2570.
131. Zhang Y., Reichel J. M., Han C. et al. (2017) Astrocytic process plasticity and IKKbeta/NF-kappaB in central control of blood glucose, blood pressure, and body weight. *Cell Metab.* 25, 1091–1102.e4.
132. Coulter W. H. U.S. Patent 2,656,508, 1953.
133. Robinson P. J. (2013). Wallace H. Coulter: Decades of invention and discovery. *Cytometry Part A*, 83A (5), 1552–4922.
134. Van Nguyen, T., & Alfaro, A. C. (2019). Applications of flow cytometry in molluscan immunology: Current status and trends. *Fish & Shellfish Immunology*. Vol. 94, Pages 239-248
135. H.M. Shapiro (2003) Chapter 4: how flow cytometers work. N.J. Hoboken (Ed.), *Practical Flow Cytometry*, Wiley
136. McKinnon KM. (2018) Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol.* 120:5.1.1-5.1.11.
137. Hosseini S., Vázquez-Villegas P., Rito-Palomares, M. et al. (2018). Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). *SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology*.
138. Hosseini S., Vázquez-Villegas P., Rito-Palomares M. et al. (2017). General Overviews on Applications of ELISA. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*, 19–29.
139. Jiang, S., Gao, H., Luo, Q. et al. (2017) The correlation of lymphocyte subsets, natural killer cell, and Parkinson's disease: a meta-analysis. *Neurol Sci* 38, 1373–1380.
140. Stevens C. H., Rowe D., Morel-Kopp M.-C. et al. (2012) Reduced T helper and B lymphocytes in Parkinson's disease. *Journal of Neuroimmunology*, 252(1-2), 95–99.
141. Grozdanov V., Bliedehaeuser C., Ruf WP. et al. (2014) Inflammatory dysregulation of blood monocytes in Parkinson's disease patients. *Acta Neuropathol.* 128(5):651-63.

142. Qin L, Jing X, Qiu Z, et al. (2016) Aging of immune system: Immune signature from peripheral blood lymphocyte subsets in 1068 healthy adults. *Aging (Albany NY)*. 8(5):848-59.
143. Kim S., Jeon BS., Heo C. et al. (2004) Alpha-synuclein induces apoptosis by altered expression in human peripheral lymphocyte in Parkinson's disease. *FASEB J*. 18(13):1615-7.
144. E.J. Meredith, M.J. Holder, A. Rosen et al. (2006) Dopamine targets cycling B cells independent of receptors/transporter for oxidative attack: implications for non-Hodgkin's lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 10, pp. 13485-13490
145. Ghosh A., Roy A., Liu X. et al. (2007) Selective inhibition of NF-kappaB activation prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(47):18754-9.
146. Hunot S., Brugg B., Ricard D. et al. (1997) Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(14):7531-6.
147. Wang N., Liang H., Zen K. (2014) Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front Immunol* 5: 614.
148. Park J., Lee J. W., Cooper S. et al. (2017) Parkinson disease-associated LRRK2 G2019S transgene disrupts marrow myelopoiesis and peripheral Th17 response. *Journal of Leukocyte Biology*, 102, 1093– 1102.
149. Okuno T., Nakatsuji Y., Kumanogoh A. et al. (2005) Loss of dopaminergic neurons by the induction of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 via CD40: Relevance to Parkinson's disease. *J. Neurosci. Res*. 81:874–882.
150. Qin X. Y., Zhang S. P., Cao C. et al. (2016). Aberrations in peripheral inflammatory cytokine levels in Parkinson disease: A systematic review and meta-analysis. *JAMA Neurology*, 73, 1316– 1324.
151. Reale, M. et al. (2009) Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. *Brain Behav. Immun*. 23, 55–63.
152. Brodacki, B. et al. (2008) Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNF α , and INF γ concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism. *Neurosci. Lett*. 441, 158–162.
153. Vaidya B., Dhamija K., Guru P. et al. (2021). Parkinson's disease in women: Mechanisms underlying sex differences. *European Journal of Pharmacology*, 895, 173862.