

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΑΘΗΝΑ ΒΕΛΕΝΤΖΑ**

ΑΜ:513894

*«ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΗΝ  
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΩΝ ΝΟΣΩΝ: ΜΕΘΟΔΟΙ  
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥΣ»*



*Picture created by Award- Winning Illustrator, Bob Lambiase*

ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ:  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΜΕ ΕΞΑΜΗΝΙΑΙΕΣ  
ΘΕΜΑΤΙΚΕΣ ΕΝΟΤΗΤΕΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΔΙΑΜΑΝΤΗΣ ΣΙΔΕΡΗΣ

ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΑΝΟΙΧΤΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΙΟΥΝΙΟΣ 2023

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του φοιτητή («συγγραφέας/δημιουργός») που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του συγγραφέα/δημιουργού. Ο συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.



«ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΗΝ  
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΩΝ ΝΟΣΩΝ: ΜΕΘΟΔΟΙ  
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥΣ»

Αθηνά Βελέντζα

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής:

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:

Διαμάντης Σίδερης

Σταθόπουλος Κωνσταντίνος

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα  
Βιολογίας ΕΚΠΑ

Καθηγητής Βιοχημείας, Ιατρικής  
Πανεπιστημίου Πατρών

Ιούνιος 2023

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....</b>	<b>vi</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>ix</b>
<b>1<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>- 1 -</b>
1.1 ΤΑ ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ.....	- 1 -
1.2 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ .....	- 2 -
1.3 ΤΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ .....	- 3 -
1.3.1 ΤΑ ΝΕΥΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	- 4 -
1.3.2 ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑ ΤΩΝ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ .....	- 6 -
1.3.3 ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ (ΚΝΣ) .....	- 9 -
1.3.4 ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ (ΠΝΣ) .....	- 14 -
1.3.5 ΝΕΥΡΟΓΛΟΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ .....	- 15 -
<b>2<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΝΟΣΟΣ ALZHEIMER (AD).....</b>	<b>- 19 -</b>
2.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ .....	- 19 -
2.1.1 Η ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ .....	- 19 -
2.1.2 ΤΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ .....	- 21 -
2.1.3 ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΚΑΙ ΜΗ ΑΙΤΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ- ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ.....	- 21 -
2.1.4 ΠΩΣ ΓΙΝΕΤΑΙ Η ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ .....	- 24 -
2.1.5 Η ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ.....	- 24 -
2.2 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ALZHEIMER .....	- 25 -
2.2.1 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	- 25 -
2.2.2 ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ .....	- 27 -
<b>3<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΝΟΣΟΣ PARKINSON (PD) .....</b>	<b>- 30 -</b>
3.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ .....	- 30 -
3.1.1 Η ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ .....	- 30 -
3.1.2 ΤΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ .....	- 33 -
3.1.3 ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΚΑΙ ΜΗ ΑΙΤΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ- ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ.....	- 34 -
3.1.4 ΠΩΣ ΓΙΝΕΤΑΙ Η ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ .....	- 39 -
3.1.5 Η ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ.....	- 40 -
3.2 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ PARKINSON.....	- 40 -
3.2.1 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	- 40 -
3.2.2 ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ .....	- 42 -
<b>4<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΑΜΥΟΤΡΟΦΙΚΗ ΠΛΕΥΡΙΚΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ (ALS).....</b>	<b>- 47 -</b>
4.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ .....	- 47 -
4.1.1 Η ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ .....	- 48 -
4.1.2 ΤΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ Η ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ .....	- 49 -
4.1.3 ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΚΑΙ ΜΗ ΑΙΤΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ- ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ.....	- 50 -
4.1.4 ΠΩΣ ΓΙΝΕΤΑΙ Η ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ .....	- 57 -
4.1.5 Η ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ.....	- 57 -
4.2 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΤΟΥ ΚΙΝΗΤΙΚΟΥ ΝΕΥΡΩΝΑ.....	- 58 -
4.2.1 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	- 58 -
4.2.2 ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ .....	- 60 -

<b>5<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΝΟΣΟΣ HUNTINGTON (HD).....</b>	<b>- 68 -</b>
5.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ .....	- 68 -
5.1.1 Η ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ .....	- 68 -
5.1.2 ΤΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ Η ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ .....	- 71 -
5.1.3 ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ- ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ .....	- 72 -
5.1.4 ΠΩΣ ΓΙΝΕΤΑΙ Η ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ .....	- 73 -
5.1.5 Η ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ.....	- 73 -
5.2 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ HUNTINGTON .....	- 74 -
5.2.1 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	- 74 -
5.2.2 ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ .....	- 76 -
<b>6<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ .....</b>	<b>- 80 -</b>
6.1 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR) .....	- 80 -
6.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ.....	- 86 -
6.2.1 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΚΑΤΑ SANGER.....	- 86 -
6.2.2 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΕΠΟΜΕΝΗΣ ΓΕΝΙΑΣ (NGS) .....	- 88 -
6.3 SOUTHERN, NORTHERN ΚΑΙ WESTERN BLOTTING .....	- 92 -
6.4 ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ .....	- 97 -
6.5 ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΟΣΟΡΟΦΗΤΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ (ELISA).....	- 98 -
6.6 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC) .....	- 103 -
6.7 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (MS) .....	- 106 -
<b>7<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>- 111 -</b>
<b>8<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ .....</b>	<b>- 114 -</b>

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η ολοκλήρωση αυτής της διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε για εμένα μεγάλη πρόσκληση. Γι' αυτό το λόγο θα ήθελα να ευχαριστήσω τα αγαπημένα μου πρόσωπα για τη συνδρομή τους, καθώς δίχως αυτούς το δύσκολο αυτό εγχείρημα δε θα είχε πραγματοποιηθεί.

Αρχικά, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ και να εκφράσω την εκτίμηση μου για την υπομονή που έδειξε στις ατελείωτες ώρες διαβάσματος και συγγραφής εργασιών, στα ξενύχτια αλλά και στις απογοητεύσεις, ο σύντροφός μου Αλέξανδρος. Παράλληλα τον ευχαριστώ γιατί ήταν εκείνος που από την πρώτη στιγμή στήριξε την επιθυμία μου να ξεκινήσω τις μεταπτυχιακές αυτές σπουδές.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την αγαπημένο μου φίλο Γιώργο Γιαννίση για την καθοδήγηση και τις συμβουλές του, οι οποίες ήταν ζωτικής σημασίας για εμένα, σε κρίσιμες στιγμές και αποφάσεις ζωής. Με έκαναν να καταλάβω τι είναι αυτό που χρειάζομαι για να προχωρήσω παρακάτω στη σταδιοδρομία μου και με οδήγησαν τελικά σε αυτό το εξαιρετικό πρόγραμμα σπουδών.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις αγαπημένες μου συμφοιτήτριες Ευαγγελία Σουμελίδου, Κωνσταντίνα Κωστακοπούλου, και Δήμητρα Σχοινά για όλα αυτά τα δύσκολα και τα όμορφα που περάσαμε μαζί αυτά τα χρόνια. Τις εκτιμώ και τις έχω πάντα στην καρδιά μου. Χωρίς αυτές τίποτα δε θα ήταν το ίδιο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για τη συνεχή στήριξη που μου παρείχαν στο έργο της ολοκλήρωσης των σπουδών μου: τη μητέρα μου Ειρήνη, τον πατέρα μου Γιώργο και την αδελφή μου Ελισάβετ. Ιδιαίτερα θερμές ευχαριστίες και την αμέριστη αγάπη μου στην πολυαγαπημένη μου θεία Σοφία χωρίς την έμπρακτη στήριξη της οποίας δε θα είχε πραγματοποιηθεί αυτή η διπλωματική εργασία.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία, με τίτλο «Γενετικοί και βιοχημικοί δείκτες στην ανίχνευση νευροεκφυλιστικών ασθενειών: Μέθοδοι προσδιορισμού τους», πραγματοποιεί μια διεξοδική εξέταση του ρόλου που διαδραματίζουν οι γενετικοί και βιοχημικοί δείκτες στην ανίχνευση νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως η νόσος Αλτσχάιμερ, Πάρκινσον, Huntington και η νόσος του Κινητικού Νευρώνα (ALS). Η μελέτη ξεκινά με μια ολοκληρωμένη εισαγωγή που περιλαμβάνει το νευρικό σύστημα περιγράφοντας λεπτομερώς το κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα, τις νευρικές συνάψεις και τα νευρικά κύτταρα- συμπεριλαμβανομένης της μικρογλοίας, η οποία χρησιμεύει ως βάση για τις επόμενες συζητήσεις για τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Τα επόμενα τέσσερα κεφάλαια διερευνούν σχολαστικά τη νόσο Αλτσχάιμερ, Πάρκινσον, ALS και Huntington, κάθε μία ξεχωριστά. Τα κεφάλαια επεξηγούν την παθοφυσιολογία, τα συμπτώματα, το γενετικό υπόβαθρο, τη διάγνωση, τη θεραπεία και τον ρόλο συγκεκριμένων γενετικών και βιοχημικών δεικτών που εμπλέκονται σε αυτές τις ασθένειες, ρίχνοντας έτσι φως στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της κάθε ασθένειας. Το έκτο κεφάλαιο εμβαθύνει στις διάφορες μεθόδους που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό αυτών των κρίσιμων βιοδεικτών. Οι τεχνικές προσδιορισμού που περιγράφονται περιλαμβάνουν αλληλούχηση, τεχνικές στύπωσης, Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR), Ενζυμική Ανοσοροφητική Δοκιμασία (ELISA), Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC), Φασματομετρία Μάζας και Μικροσυστοιχίες. Κάθε μέθοδος αξιολογείται ως προς την αποτελεσματικότητα, την ακρίβεια και την εφαρμογή της. Το τελικό κεφάλαιο συνθέτει τις πληροφορίες που συγκεντρώθηκαν από τα προηγούμενα κεφάλαια, αντανακλώντας τον σημαντικό ρόλο των γενετικών και βιοχημικών δεικτών στην έγκαιρη ανίχνευση και διάγνωση νευροεκφυλιστικών νόσων. Επιπλέον, αξιολογεί τη συμβολή κάθε μεθόδου ανίχνευσης, υπογραμμίζοντας την ανάγκη για συνεχή έρευνα και ανάπτυξη σε αυτές τις τεχνικές για την ενίσχυση της ακρίβειας, της ταχύτητας και της οικονομικής απόδοσης στη διάγνωση και τη διαχείριση της νόσου. Μέσω αυτής της διατριβής, έχει επιτευχθεί μια βαθύτερη κατανόηση των νευροεκφυλιστικών ασθενειών και των μεθόδων ανίχνευσης τους, τονίζοντας τη σημασία αυτών των δεικτών για την έγκαιρη ανίχνευση, τις στοχευμένες στρατηγικές θεραπείας και ενδεχομένως ανοίγοντας το δρόμο για προληπτικές προσεγγίσεις στο μέλλον.

## Λέξεις – Κλειδιά

Νευροεκφυλιστικά νοσήματα, Αλτσχάιμερ, Πάρκινσον, Νόσος του Κινητικού Νευρώνα, Νόσος Huntington's, Μέθοδοι Προσδιορισμού



# «GENETIC AND BIOCHEMICAL MARKERS IN THE DETECTION OF NEURODEGENERATIVE DISORDERS: METHODS OF THEIR DETERMINATION»

Velentza Athina

## ABSTRACT

This postgraduate diploma thesis, titled "Genetic and Biochemical markers in the Detection of Neurodegenerative Diseases: Methods for Their Determination", conducts a thorough examination of the role genetic and biochemical markers play in detecting neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, Parkinson's, ALS, and Huntington's. The study commences with a comprehensive introduction of the nervous system, detailing central and peripheral nerve system, nerve synapses, and nerve cells, including microglia, which serves as a foundation to the subsequent discussions on neurodegenerative diseases. The succeeding four chapters thoroughly explore Alzheimer's, Parkinson's, ALS, and Huntington's disease individually. Chapters explain the pathophysiology, symptoms, genetic basis, disease diagnosis, treatment, and the role of specific genetic and biochemical markers involved in these diseases, thus shedding light on the particular characteristics of each disease. Chapter six delves into the various methods used in determining these crucial biomarkers. The determination techniques include DNA sequencing, blotting techniques, Polymerase Chain Reaction (PCR), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Mass Spectrometry, and Microarrays. Each method is evaluated for its efficiency, precision, and applicability. The concluding chapter synthesizes the information gleaned from the preceding chapters, reflecting on the significant role of genetic and biochemical markers in early detection and diagnosis of neurodegenerative diseases. Furthermore, it evaluates the contribution of each detection method, underscoring the need for continuous research and development in these techniques to enhance accuracy, speed, and cost-effectiveness in disease diagnosis and management. Through this thesis, a deeper understanding of neurodegenerative

diseases and their detection methods has been achieved, emphasizing the importance of these markers in timely detection, targeted treatment strategies, and potentially paving the way for preventive approaches in the future.

## **Keywords**

Neurodegenerative diseases, Alzheimer's, Parkinson's, Amyotrophic Lateral Sclerosis, Huntington's Disease, Methods of Determination

## 1<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 ΤΑ ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα (ND) αποτελούν ένα σημαντικό πρόβλημα παγκοσμίως καθώς είναι παθήσεις οι οποίες επηρεάζουν τον εγκέφαλο και το νευρικό σύστημα του ανθρώπου. Κάποιες αλλαγές που παρατηρούνται στους νευρώνες (νευρικά κύτταρα), οδηγούν στη μη σωστή λειτουργία τους και μετέπειτα στο θάνατό του κυττάρου. Οι δυσλειτουργίες αυτές στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) οδηγούν σε προοδευτική απώλεια του νευρικού ιστού. Αυτό συμβαίνει γιατί τελικά λόγω βλαβών οι νευρώνες χάνουν την ικανότητά τους να αναγεννούνται. (Agrawal & Biswas, 2015)

Τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα συχνά διακρίνονται μεταξύ τους με βάση τη διαφορετική περιοχή του εγκεφάλου που προσβάλλουν. Φαίνεται να έχουν επίσης σχετικά διακριτά συμπτώματα και παθολογίες. Παρ' όλα αυτά, υπάρχει "κοινός τόπος" σε γενετικό ή και κυτταρικό επίπεδο. Κάποια από αυτά τα κοινά χαρακτηριστικά είναι η πρόωμη αγγειακή δυσλειτουργία, η συσσώρευση και εξάπλωση μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, η εκλεκτική ευπάθεια συγκεκριμένων νευρώνων και η ενεργοποίηση ανοσολογικών αποκρίσεων. (Aronson & Ferner, 2017)

Σύμφωνα με μελέτες, στην Αμερική η πιο συχνή νευροεκφυλιστική νόσος είναι το Alzheimer (AD) και υπολογίζεται ότι περίπου 5 εκατομμύρια Αμερικανοί υποφέρουν από αυτό, ακολουθεί η ασθένεια Parkinson (PD) με περίπου 1 εκατομμύριο περιστατικά, η Νόσος του Κινητικού Νευρώνα (ALS) με 30.000 περιπτώσεις και η νόσος του Huntington με 3000 περιστατικά. (Chung et al., 2002)

Τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα εξελίσσονται σταδιακά στη διάρκεια της ζωής του ανθρώπου που πάσχει, ενώ η βλάβη που προκαλούν είναι μη αναστρέψιμη άρα είναι ανίατα. (Rachakonda et al., 2004) Η θνητότητα ειδικά στους ηλικιωμένους είναι πολύ συχνή και αυξάνεται συνεχώς. (Erkkinen et al., 2018) Οι συνέπειες που έχουν στην ποιότητα ζωής τόσο του ασθενή όσο και της οικογένειας και του κοινωνικού περιγύρου είναι δυσμενείς και δύσκολα διαχειρίσιμες από όλες τις πλευρές. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν διαταραχή νοητικών λειτουργιών όπως η μνήμη, η ομιλία, ο προσανατολισμός αλλά και των συναισθημάτων και της συμπεριφοράς. (Erkkinen et al., 2018)

Σήμερα, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, αναφέρεται ότι πάνω από 55 εκατομμύρια άνθρωποι πάσχουν από άνοια. Το ποσοστό αυτό αναμένεται να αυξηθεί τα επόμενα χρόνια όσο αυξάνεται και το προσδόκιμο ζωής. (“Focus on Neurodegenerative Disease,” 2018), (Bordoni et al., 2020) Η αιτία που κρύβεται πίσω από την ανάπτυξη των νοσημάτων αυτών παραμένει ακόμα άγνωστη, παρά τις πολλές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί. (Bordoni et al., 2020)

Όλα τα παραπάνω καθιστούν επιτακτική την εύρεση θεραπείας για κάθε ένα από τα παραπάνω νοσήματα. Οι περισσότερες ελπίδες για την εύρεση θεραπείας εντοπίζονται στη νευροαναγέννηση είτε μέσω της θεραπείας με βλαστοκύτταρα, είτε με αντικατάσταση του νευρικού ιστού. (Chung et al., 2002), (Rachakonda et al., 2004) Παρ’ όλα αυτά αυτές οι μελέτες βρίσκονται ακόμα σε εξέλιξη. Κατά κύριο λόγο, η θεραπεία είναι συμπτωματική. (Bordoni et al., 2020)

Επομένως, το κλειδί για καλύτερη πρόγνωση της ασθένειας φαίνεται να είναι η έγκαιρη διάγνωση του νευροεκφυλισμού. Ειδικά όταν εντοπιστεί σε πρώιμο στάδιο, οι ασθενείς λαμβάνουν γρήγορα τη διάγνωση άρα και καταλληλότερη φαρμακευτική αγωγή ή εισέρχονται στις αντίστοιχες κλινικές δοκιμές, οι οποίες μελλοντικά θα οδηγήσουν στη θεραπεία αυτών των ασθενειών. (Agrawal & Biswas, 2015) Ο εγκυρότερος τρόπος διάγνωσης αυτών των νοσημάτων βασίζεται στη νευροπαθολογία μέσω αυτοψίας, η οποία δυστυχώς πραγματοποιείται μετά το θάνατο του ασθενούς. (Chung et al., 2002) Συνηθέστερα, οι ειδικοί για τη διάγνωση βασίζονται στα συμπτώματα που αφορούν τη συμπεριφορά των ασθενών. Όπως για παράδειγμα η μέθοδος ADAS-Cog, η οποία αποτελεί Κλίμακα Αξιολόγησης Νόσων Αλτσχάιμερ (Γνωσιακή Υποκλίμακα) και είναι μια σύντομη νευροψυχολογική αξιολόγηση, για την οποία όμως υπάρχουν κάποιες ανησυχίες ως προς τη χρήση της στα κρίσιμα πρώιμα στάδια αυτής της νόσου. (Posner et al., 2013)

## 1.2 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ

Ένας βιοδείκτης είναι μια βιολογική παρατήρηση, ένας μετρήσιμος δείκτης που υποκαθιστά και ιδανικά προβλέπει μια κλινική κατάσταση που είναι δύσκολο να παρατηρηθεί αλλιώς. Χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση βιολογικών διεργασιών ή συνθηκών στο σώμα. Μπορεί να είναι ένα μόριο, ένα γονίδιο ή μια χαρακτηριστική αλλαγή σε έναν ιστό ή κύτταρο. Η χρήση κλινικών βιοδεικτών είναι ευκολότερη και

λιγότερο δαπανηρή σε σχέση με άλλες τεχνικές και συνήθως η μέτρησή τους γίνεται σε μικρότερο χρονικό διάστημα. (Aronson & Ferner, 2017) Η διάγνωση των νευροεκφυλιστικών νοσημάτων με σύγχρονες τεχνικές μέσω γενετικών και βιοχημικών δεικτών είναι πολλά υποσχόμενη και ισχυρή, προσφέροντας έγκυρες αποδείξεις με μη επεμβατικό τρόπο. Βασικά χαρακτηριστικά ενός δείκτη είναι η ακρίβεια, η εξειδίκευση και η αξιοπιστία του. (Agrawal & Biswas, 2015), (Rachakonda et al., 2004) Οι βιοδείκτες έχουν μια πληθώρα από πλεονεκτήματα. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν στον προσυμπτωματικό έλεγχο, ως προγνωστικοί δείκτες, στη διάγνωση, τον χαρακτηρισμό και την παρακολούθηση των ασθενειών. Επίσης είναι πολύ χρήσιμοι για την ανάπτυξη εξατομικευμένων θεραπευτικών παρεμβάσεων, για την πρόβλεψη και τη θεραπεία ανεπιθύμητων ενεργειών στα φάρμακα και για φαρμακοδυναμικές μελέτες και μελέτες σχετικές με την απόκριση του ασθενή στη δόση του φαρμάκου που λαμβάνει. (Aronson & Ferner, 2017)

Η παρούσα εργασία θα πραγματοποιήσει μια παρουσίαση των δεικτών αυτών, ταξινομημένους ανά νευροεκφυλιστικό νόσημα. Κάθε κεφάλαιο θα παρουσιάζει αρχικά εν συντομία τα χαρακτηριστικά της ασθένειας και έπειτα θα αναλύονται οι διαφορετικοί δείκτες που βοηθούν στη διάγνωση της. Τέλος θα γίνει παρουσίαση των μεθόδων προσδιορισμού των βιοδεικτών αυτών.

### 1.3 ΤΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Το νευρικό σύστημα παίζει θεμελιώδη ρόλο στην επιβίωση του ανθρώπινου οργανισμού. Είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση της ομοιόστασης σε συνδυασμό με το ενδοκρινικό σύστημα. Η διατήρηση ενός σταθερού εσωτερικού περιβάλλοντος παρά τις όποιες εξωτερικές ή εσωτερικές μεταβολές είναι υψίστης σημασίας. Το νευρικό σύστημα παρακολουθεί και ανταποκρίνεται σε αλλαγές στο εσωτερικό και εξωτερικό περιβάλλον, συντονίζοντας παράλληλα τις λειτουργίες των συστημάτων του οργανισμού με βάση αυτά τα ερεθίσματα που δέχεται. Το νευρικό σύστημα περιλαμβάνει όλο το **νευρικό ιστό** του σώματος ο οποίος και είναι υπεύθυνος για τη μετάδοση της πληροφορίας από το ένα μέρος του σώματος στο άλλο. Τέλος, στις βασικές λειτουργίες του περιλαμβάνονται οι αισθήσεις, οι κινήσεις, η μνήμη και η ομιλία. (Farley, Johnstone, et al., 2014) (Parker E. Ludwig, 2023)

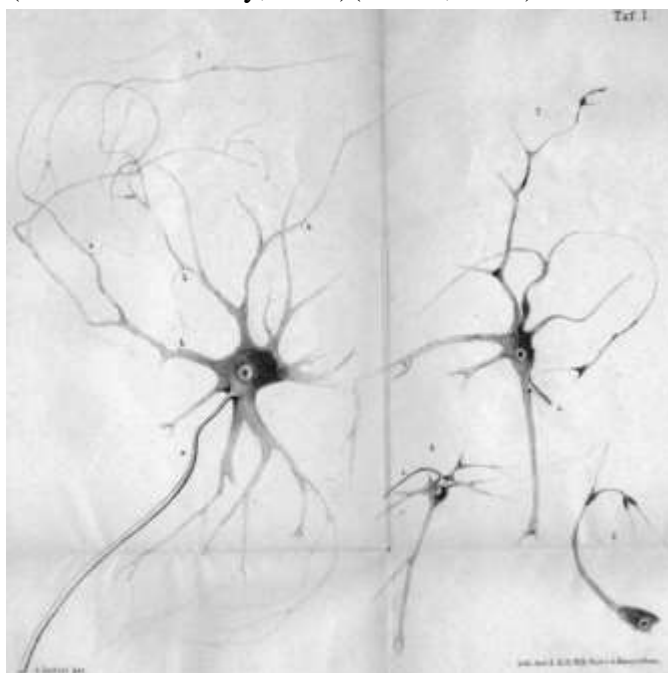
Το νευρικό σύστημα διαχωρίζεται σε Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) και Περιφερικό Νευρικό Σύστημα (ΠΝΣ).

Το νευρικό σύστημα αποτελείται από νευρικά κύτταρα και νευρογλοιακά κύτταρα.

### 1.3.1 ΤΑ ΝΕΥΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

#### ΔΟΜΗ ΝΕΥΡΩΝΩΝ

Οι νευρώνες ή νευρικά κύτταρα αποτελούν την κύρια λειτουργική μονάδα του νευρικού συστήματος. Είναι κύτταρα τα οποία διεγείρονται ηλεκτρικά και μεταδίδουν σήματα εντός και εκτός του σώματος. Το 1860, ο Γερμανός ανατόμος Otto Friedrich Karl Deiters περιέγραψε τη βασική δομή του νευρικού κυττάρου (Εικόνα 1). Παρατήρησε ότι αποτελείται από τρία μέρη: το κυτταρικό σώμα, τους δενδρίτες και το νευράξονα. (Deiters & Guillery, 2013)(Muzio, 2022)



Εικόνα 1 Σχηματικές απεικονίσεις νευρικών κυττάρων από το βιβλίο του O. Deiters

Πηγή: Vera S Deiters, RW Guillery, "Otto Friedrich Karl Deiters (1834-1863)" *Journal of Comparative Neurology*. 2013 Jun 15;521(9):1929-53.

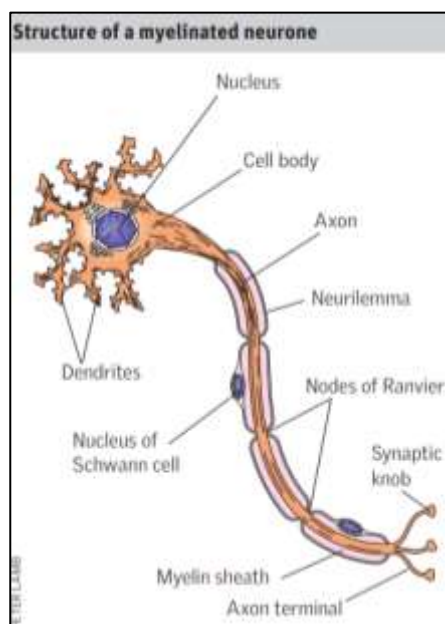
Το **κυτταρικό σώμα** (ή περικάρυον) περιέχει τον πυρήνα που περιβάλλεται από το κυτόπλασμα και άλλα οργανίδια που είναι απαραίτητα για τη λειτουργία των νευρώνων. Στο σώμα γίνεται η πρωτεϊνοσύνθεση και είναι υπεύθυνο για την διατήρηση της υγείας του κυττάρου. Τα κυτταρικά σώματα συναντώνται πολύ συχνά όλα μαζί πακεταρισμένα σε έναν ιστό που λέγεται **γκρίζα ύλη (φαιά ουσία)**, εκεί όπου γίνεται η επεξεργασία και αποθήκευση της πληροφορίας. Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι

το κυτταρικό σώμα δεν διαθέτει κεντρόσωμα επομένως δεν μπορεί να συμβεί μίτωση. Έτσι, το ώριμο νευρικό κύτταρο δε μπορεί να διαιρεθεί. Το γεγονός αυτό είναι υψίστης σημασίας γιατί υποδεικνύει ότι ο κατεστραμμένος νευρικός ιστός δεν έχει τη δυνατότητα αναγέννησης. (Farley, Johnstone, et al., 2014) (Parker E. Ludwig, 2023) Οι **δενδρίτες** είναι έντονα διακλαδισμένες κυτταροπλασματικές προεξοχές του κυτταρικού σώματος. Το μεγαλύτερο ποσοστό της συνολικής επιφάνειας ενός νευρώνα συχνά καλύπτεται από δενδρίτες. Ο ρόλος τους περιλαμβάνει κατά κύριο λόγο τη λήψη πληροφοριών αλλά κάποιες φορές και τη μετάδοσή τους μέσα στο σώμα. Παράλληλα εμπλέκονται τόσο στη σύνθεση πρωτεϊνών όσο και σε ανεξάρτητες λειτουργίες σηματοδότησης με άλλους νευρώνες. (Farley, Johnstone, et al., 2014) (Parker E. Ludwig, 2023)

Ο **νευράξονας** είναι μια μεμονωμένη κυτταροπλασματική προβολή του κυτταρικού σώματος. Ο άξονας καταλήγει σε πολλές νευρικές απολήξεις κάθε μία από τις οποίες έχει ένα τελικό κομβίο ή τελοδενδρίο. Αυτή η δομή προβάλλει σε συνάψεις με δενδρίτες ή κυτταρικά σώματα άλλων νευρώνων ή με μη νευρωνικούς στόχους όπως οι μυϊκές ίνες. Επομένως, κύριος λειτουργικός ρόλος του νευράξονα είναι η μεταβίβαση των πληροφοριών εκτός του σώματος. Στα τελοδενδρία απελευθερώνονται νευροδιαβιβαστές, νευροδιαμορφωτές ή νευροορμόνες κατά τη μετατροπή του ηλεκτρικού σήματος σε χημικό σήμα και έτσι διασχίζουν μια σύναψη ή μια νευρομυϊκή σύνδεση. Όταν συγκεντρωθούν σε δέσμες οι δενδρίτες και οι νευράξονες σχηματίζουν αυτό που ονομάζουμε **λευκή ουσία**, η οποία έχει ρόλο στη μετάδοση των νευρικών ώσεων. (Maria Rosaria Muzio, 2022), (Farley et al., 2014), (Parker E. Ludwig, 2023) Οι άξονες, με βάση τη θέση που έχουν μέσα στο σώμα, δύναται να καλύπτονται από ένα μονωτικό υλικό το οποίο ονομάζεται μυελίνη. Ανάλογα με το εάν ένας άξονας καλύπτεται ή όχι από μυελίνη διακρίνεται σε μυελινωμένος ή μη μυελινωμένος. (Maria Rosaria Muzio, 2022) Η μυελίνη σχηματίζεται από περιβλήματα της πλασματικής μεμβράνης νευρογλοιακών κυττάρων (κύτταρα Schwann στο ΠΝΣ και ολιγοδενδροκύτταρα στο ΚΝΣ) γύρω από τον άξονα. Αποτελεί μια πρόσφατη εξέλιξη του νευρικού συστήματος που αυξάνει την ταχύτητα μετάδοσης σημάτων, μέσω των κόμβων Ranvier που σχηματίζονται κατά μήκος των μυελινωμένων αξόνων (Εικόνα 2). (Monje, 2018) (Maria Rosaria Muzio, 2022)



Οι νευρώνες ταξινομούνται είτε *δομικά* με βάση τις πρωτοπλασματικές προεκτάσεις από το κυτταρικό σώμα σε: πολύπολους νευρώνες, δίπολους νευρώνες, μονόπολους ή ψευδομονόπολοι νευρώνες και αναξονικούς νευρώνες, είτε *λειτουργικά* σε: αισθητήριους, κινητικούς και ενδιάμεσους ή συνδετικούς νευρώνες. (Maria Rosaria Muzio, 2022) (Farley, Johnstone, et al., 2014)



Εικόνα 2 Μυελινοποιημένος νευρώνας. Στην εικόνα φαίνονται τα κύττρα Schwann του ΠΝΣ που μυελινοποιούν τον άξονα καθώς επίσης και οι κόμβοι Ranvier

Πηγή: Alistair Farley, Carolyn Johnstone, Charles Hendry, Ella McLafferty "Nervous system: part 1", Nursing Standard. 2014 Apr 2-8;28(31):46-51.

### 1.3.2 ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑ ΤΩΝ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

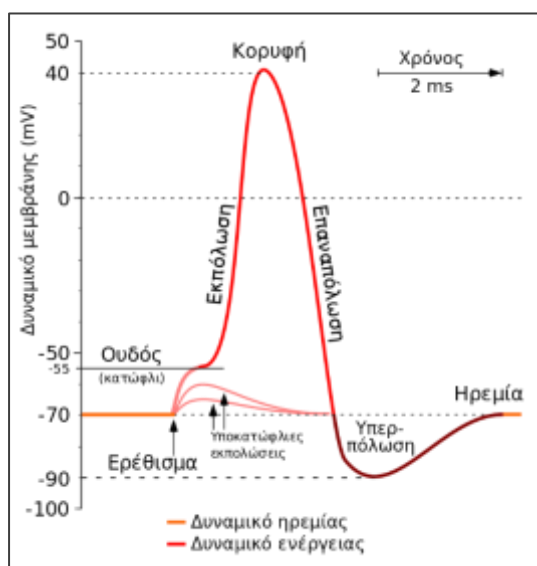
Τα νευρικά κύτταρα λαμβάνουν πληροφορίες (ερεθίσματα) από το εσωτερικό και εξωτερικό περιβάλλον και πρέπει να μεταδώσουν αυτή την πληροφορία στα γειτονικά νευρικά κύτταρα. Ο πρώτος μηχανισμός αφορά τη μετάδοση του σήματος μέσα στο νευρικό κύτταρο και γίνεται ηλεκτρικά. Ο δεύτερος μηχανισμός αφορά με μετάδοση σημάτων μεταξύ των νευρικών κυττάρων και γίνεται χημικά. ("The Principles of Nerve Cell Communication,," 1997) (Michael H. Grider, 2022)

#### ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΣΗΜΑΤΟΣ ΕΝΤΟΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ- ΟΙ ΝΕΥΡΙΚΕΣ ΩΣΕΙΣ

Ο μηχανισμός αυτός βασίζεται στη διαφορά δυναμικού που υπάρχει μεταξύ του εξωτερικού και του εσωτερικού του νευρικού κυττάρου. (Isaac Chen, 2022) Αυτή η διαφορά δυναμικού, προκύπτει από την άνιση κατανομή των ιόντων νατρίου και καλίου στις δύο πλευρές της μεμβράνης και διατηρείται με τη βοήθεια μιας αντλίας  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , με υψηλότερη συγκέντρωση νατρίου εξωκυτταρικά και υψηλότερη



συγκέντρωση καλίου ενδοκυτταρικά. (Yasaman Pirahanchi, 2022) Σε κατάσταση ηρεμίας- όταν ο νευρώνας δε δέχεται ερεθίσματα, το φορτίο στο εσωτερικό του κυττάρου είναι αρνητικό και στο εξωτερικό θετικό. Η μεμβράνη είναι πολωμένη και το δυναμικό ηρεμίας είναι περίπου  $-70\text{mV}$ . (Farley, Johnstone, et al., 2014) Στην περίπτωση όμως, που εμφανιστεί ένα αρκετά ισχυρό ερέθισμα- με ενέργεια υψηλότερη από ένα καθορισμένο κατώφλι, προκαλείται μείωση του δυναμικού ηρεμίας, δηλαδή η μεμβράνη γίνεται θετικότερη (λιγότερο αρνητική) και τότε λαμβάνει χώρα μία ταχύτατη αλληλουχία γεγονότων- αλλαγών του δυναμικού της μεμβράνης, η οποία παράγει ένα δυναμικό ενέργειας (*neuronal action potential*) ή αλλιώς μια νευρική ώση (*nerve impulse*) όπως ονομάζεται. (Michael H. Grider, 2022)(Farley, Johnstone, et al., 2014) Η παραγωγή μιας νευρικής ώσης περιλαμβάνει τρία στάδια: εκπόλωση, επαναπαρόλωση και υπερπόλωση. (Εικόνα 3)



Εικόνα 3 Τα στάδια για την παραγωγή μιας νευρικής ώσης εντός του νευρικού κυττάρου: Εκπόλωση, Κορύφωση, Επαναπαρόλωση, Υπερπόλωση

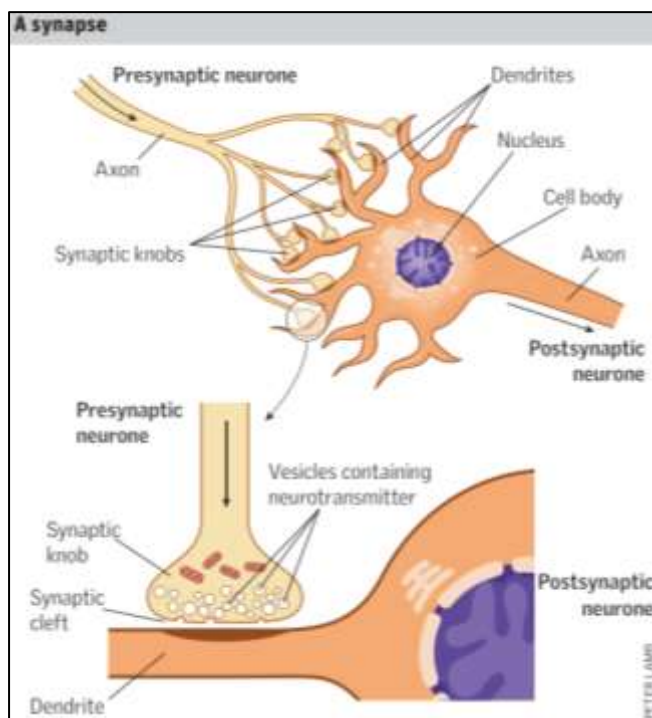
Πηγή: Action\_potential.svg: Original by en:User:Chris 73, updated by en:User:Diberri, converted to SVG by tiZomderivative work: de:Benutzer:Jnns and based on his work Badseed. - Translated and optimized version of File:Aktionspotential.svg which in turn was based on File:Action\_potential.svg., CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=24122038>

## ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΣΗΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ- ΟΙ ΝΕΥΡΙΚΕΣ ΣΥΝΑΨΕΙΣ

Η διάδοση μιας νευρικής ώσης συνεχίζεται, από το ένα σημείο της μεμβράνης στο άλλο, μέχρι τον τερματισμό της σε μία νευρική σύναψη στα τελικά κομβία των νευραξόνων. (Isaac Chen, 2022) Η νευρική σύναψη είναι μια νευροδραστήρια σύνδεση με συγκεκριμένη δομή. Αποτελείται από ένα προσυναπτικό άκρο, πχ τον άξονα του νευρώνα που έχει δημιουργήσει τη νευρική ώση, στα τελικά κομβία του οποίου υπάρχουν τα συναπτικά κοκκία (*synaptic knobs*). Επίσης, διαθέτει ένα μετασυναπτικό άκρο πχ στους δενδρίτες του νευρώνα που θα μεταδοθεί η νευρική ώση.

Η προσυναπτική μεμβράνη και η μετασυναπτική μεμβράνη, διαχωρίζονται μεταξύ τους από ένα μικροσκοπικό κενό (15-20 nm) γνωστό ως *συναπτική σχισμή* (*synaptic cleft*). (Südhof, 2021) (Hyman, 2005) (Farley, Johnstone, et al., 2014) Το δυναμικό ενέργειας φτάνοντας στο *προσυναπτικό άκρο*, προκειμένου να διασχίσει τη *συναπτική σχισμή*, θα πρέπει να μετατραπεί από ηλεκτρικό σήμα σε χημικό. Αυτό πραγματοποιείται με την απελευθέρωση μιας χημικής ουσίας, ενός νευροδιαβιβαστή. (“The Principles of Nerve Cell Communication.,” 1997) Όταν ένα δυναμικό ενέργειας φτάνει στο τέλος του άξονα, η νευρική ώση μπαίνει στα τελικά κομβία που καταλήγουν σε *συναπτικά κοκκία*. (Farley, Johnstone, et al., 2014) Εκεί, πραγματοποιείται η εκπόλωση, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τα  $\text{Ca}^{2+}$  να εισέρχονται στο κύτταρο. Η αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης  $\text{Ca}^{2+}$ , πυροδοτεί την εξωκύτωση των μορίων νευροδιαβιβαστών μέσα από τα συναπτικά κοκκία, προς τη συναπτική σχισμή. (Hyman, 2005) (“The Principles of Nerve Cell Communication.,” 1997) Ο νευροδιαβιβαστής διαχέεται κατά μήκος της *συναπτικής σχισμής* και καταλαμβάνει υποδοχείς ενσωματωμένους στη *μετασυναπτική μεμβράνη*. (Pitman, 1984) (Hyman, 2005) (Εικόνα 4)

Ανάλογα με το είδος του ιόντος, η φυσιολογική απόκριση μπορεί να είναι είτε διεγερτική είτε ανασταλτική. Οι νευροδιαβιβαστές όπως η ακετυλοχολίνη και το γλουταμικό οξύ προκαλούν εκπόλωση και θεωρούνται διεγερτικοί, ενώ το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) θεωρείται ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής. Τα μόρια νευροδιαβιβαστών που δεν βρίσκουν υποδοχέα για πρόσδεση απομακρύνονται μέσω εξειδικευμένων μεταφορέων, είτε στο προσυναπτικό άκρο είτε στα γειτονικά νευρογλοιακά κύτταρα. Αυτή η διαδικασία είναι σημαντική για τη διατήρηση της πιστότητας της μετάδοσης των σημάτων στις νευρικές συνάψεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι, εκτός από χημικές συνάψεις, οι οποίες παρουσιάστηκαν παραπάνω, υπάρχουν επίσης και ηλεκτρικές συνάψεις. Οι ηλεκτρικές συνάψεις επιτρέπουν τη ροή των ιόντων μεταξύ των κυττάρων μέσω *διακλαδώσεων διάκενου*. Παρ’ όλα αυτά, η μετάδοση σήματος μέσω νευροδιαβιβαστών αποτελεί την πλειοψηφία και οι νευροδιαβιβαστές απελευθερώνονται τόσο σε χημικές συνάψεις όσο και σε νευρομυϊκές συνδέσεις. (Hyman, 2005) (Pitman, 1984)



Εικόνα 4 Σχηματική απεικόνιση μιας νευρικής σύναψης.

Φαίνεται το προσυναπτικό άκρο, το μετασυναπτικό άκρο καθώς και τα συναπτικά κοκκία. (Πάνω) Ενώ δίνεται και μία πιο εστιασμένη εκδοχή που φαίνεται καθαρά η συναπτική σχισμή και οι νευροδιαβιβαστές που περιέχονται στα συναπτικά κοκκία. (Κάτω)

Πηγή: Alistair Farley, Carolyn Johnstone, Charles Hendry, Ella McLafferty "Nervous system: part 1", Nursing Standard. 2014 Apr 2-8;28(31):46-51.

### 1.3.3 ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ (ΚΝΣ)

Το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) είναι υπεύθυνο για τη λήψη, την επεξεργασία και την ανταπόκριση σε αισθητηριακές πληροφορίες. Αποτελείται από τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό. Ο εγκέφαλος συνδέεται με την παρεγκεφαλίδα μέσω του εγκεφαλικού στελέχους. Παρακάτω θα επιγραφτούν τα χαρακτηριστικά καθενός από προαναφερθέντα τμήματα.

#### Ο ΕΓΚΕΦΑΛΟΣ

Ο ανθρώπινος εγκέφαλος διαθέτει περίπου 86 δισεκατομμύρια νεύρα, τα οποία κατανέμονται ανομοιόμορφα μεταξύ της παρεγκεφαλίδας, του εγκεφαλικού φλοιού και των υποφλοιωδών πυρήνων. Είναι υπεύθυνος για την ανταπόκριση σε σήματα, τις αισθήσεις, τις κινήσεις, τα συναισθήματα, την επικοινωνία, την επεξεργασία της σκέψης και τη μνήμη. (Lauren Thau et al 2023) (Van Essen et al., 2018) Αποτελείται από τα παρακάτω βασικά τμήματα:

#### Ο πρόσθιος εγκέφαλος (Cerebrum)

Ο πρόσθιος εγκέφαλος αποτελεί 87% του συνολικού όγκου του εγκεφάλου. Περιλαμβάνει τα δύο εγκεφαλικά ημισφαίρια- το δεξί και το αριστερό. Τα εγκεφαλικά ημισφαίρια εμφανίζουν αναδιπλώσεις οι οποίες αυξάνουν την επιφάνεια του

εγκεφάλου και δίνουν τη δυνατότητα για περισσότερα διαθέσιμα νεύρα για επικοινωνία, γεγονός που αποτελεί μια εξελικτική προσαρμογή καθώς οι μεγάλοι εγκέφαλοι θα έπρεπε να χωρέσουν σε σχετικά μικρά κρανία για να εξυπηρετήσουν τη διαδικασία γέννησης. Οι αναδιπλώσεις αυτές περιλαμβάνουν υπερυψωμένα σημεία (προεξοχές), τις επανομαζόμενες *έλικες* (*gyri*) και ρηχές αυλακώσεις, τις *αύλακες* (*sulci*) καθώς και βαθιές αυλακώσεις, τις *σχισμές* (*fissures*). Μία βασική σχισμή είναι η *επιμήκης σχισμή* (*longitudinal fissure*), η οποία διαχωρίζει τα δύο εγκεφαλικά ημισφαίρια. Η επικοινωνία μεταξύ των ημισφαιρίων γίνεται μέσω του *μεσολοβίου* (*corpus callosum*), ενός ιστού με λευκή ουσία. (Chauhan et al., 2021) (Andrea Goldstein, 2023) (Hendry et al., 2014) (Kinaan Javed, 2023) (Εικόνα 5)

Τα εγκεφαλικά ημισφαίρια διαθέτουν έναν επιφανειακό ιστό που ονομάζεται *εγκεφαλικός φλοιός* (*cerebral cortex*). Ο εγκεφαλικός φλοιός αποτελείται επιφανειακά από γκριζα ύλη (φαιά ουσία) και δισεκατομμύρια νεύρα για να εκτελούν διεργασίες υψηλού επιπέδου, ενώ εσωτερικά αποτελείται από λευκή ουσία.

Κάθε εγκεφαλικό ημισφαίριο διαχωρίζεται σε 4 λοβούς και κάθε λοβός παίρνει το όνομά του από το αντίστοιχο κρανιακό οστό κάτω από το οποίο βρίσκεται. (Εικόνα 5) Ο *μετωπιαίος λοβός* (*frontal lobe*) είναι υπεύθυνος για την εκούσια κινητική λειτουργία, την επίλυση προβλημάτων, τη συμπεριφορά και τη γλώσσα. Σε αυτό το λοβό εντοπίζεται ο κινητικός φλοιός ο οποίος επιτρέπει την οικειοθελή κίνηση των σκελετικών μυών, καθώς και η περιοχή Broca η οποία ελέγχει τις κινητικές λειτουργίες που απαιτούνται προκειμένου να παραχθεί ο λόγος και να σχηματιστούν προτάσεις. Ο *βρεγματικός λοβός* (*parietal lobe*) είναι υπεύθυνος για την πρόσληψη και επεξεργασία των αισθητηριακών πληροφοριών και περιέχει τον σωματοαισθητηριακό φλοιό. Ο *κροταφικός λοβός* (*temporal lobe*) επεξεργάζεται τα ακουστικά ερεθίσματα μέσω του ακουστικού φλοιού. Εδώ επίσης βρίσκεται το κέντρο της όσφρησης καθώς και κέντρα που αφορούν την ομιλία όπως η περιοχή Wernicke. Ο *ινιακός λοβός* (*occipital lobe*) προσλαμβάνει οπτικές πληροφορίες από τον αμφιβληστροειδή και τις ερμηνεύει με βάση παλαιότερες οπτικές εμπειρίες- είναι δηλαδή, το κέντρο επεξεργασίας της όρασης και περιέχει τον οπτικό φλοιό. (Kinaan Javed, 2023) (Lauren Thau et al 2023) (Hendry et al., 2014)

Ένα ακόμα τμήμα του πρόσθιου εγκεφάλου είναι ο *διεγκέφαλος* (*diencephalon*). Εντοπίζεται κάτω από τα εγκεφαλικά ημισφαίρια και μεταξύ αυτών και του μεσεγκέφαλου. Το διεγκέφαλο απαρτίζουν ο *θάλαμος* και ο *υποθάλαμος*. Ο *θάλαμος*

αποτελεί το μεγαλύτερο τμήμα του διεγκεφάλου (σχεδόν το 80%) και απαρτίζεται κυρίως από γκρίζα ύλη. Είναι το κέντρο αναμετάδοσης του εγκεφάλου. Ο υποθάλαμος είναι ένα μικρό μέρος του εγκεφάλου, το οποίο βρίσκεται κάτω και μπροστά από τον θάλαμο. Ο ρόλος του είναι ζωτικός για την ομοιόσταση του οργανισμού και συνδέει το νευρικό σύστημα με το ενδοκρινικό σύστημα. (Tyler J. Torrico, n.d.) (Hendry et al., 2014)

### ***Η παρεγκεφαλίδα (Cerebellum)***

Η παρεγκεφαλίδα ή αλλιώς *cerebellum*- στα λατινικά σημαίνει μικρός εγκέφαλος, αποτελεί μόλις το 10% του συνολικού όγκου του εγκεφάλου. Παράλληλα, περιέχει περίπου το 80% των εγκεφαλικών νευρών, τα οποία είναι μικροσκοπικά και κοκκώδη, πακτωμένα σε ένα πυκνό στρώμα στο φλοιό της παρεγκεφαλίτιδας, γεγονός που αιτιολογεί και τη μικρή μάζα της παρ' όλα αυτά. Ο ρόλος της παρεγκεφαλίδας εστιάζεται στο συντονισμό των κινήσεων του σώματος, στο να εξασφαλιστεί η ομαλότητα και η ακρίβεια των κινήσεων, η ισορροπία αλλά και για την εκμάθηση της κίνησης. (Kenia A. Maldonado, 2023) (Roostaei et al., 2014)

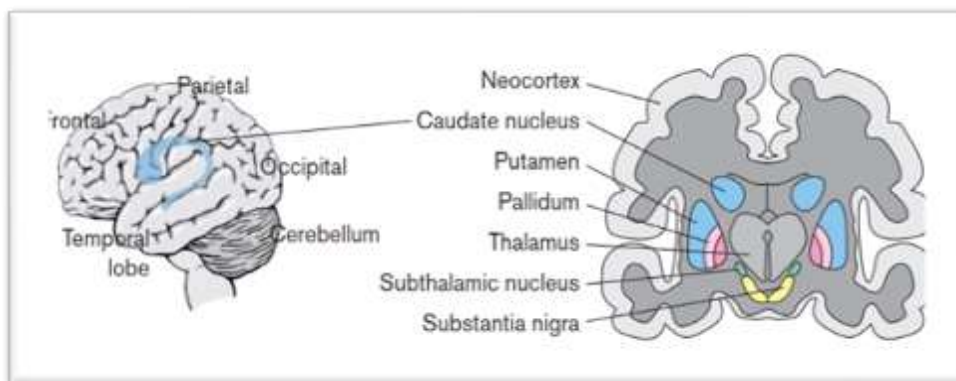
### ***Το εγκεφαλικό στέλεχος (Brainstem)***

Το εγκεφαλικό στέλεχος αποτελείται από το μεσεγκέφαλο (*midbrain*), τη γέφυρα (*pons*) και τον προμήκη μυελό (*medulla oblongata*). Είναι η δομή η οποία συνδέει τον πρόσθιο εγκέφαλο με το νωτιαίο μυελό και την παρεγκεφαλίδα. Είναι υπεύθυνο για ζωτικής σημασίας λειτουργίες όπως η αναπνοή, η συνείδηση, η πίεση του αίματος, ο ρυθμός της καρδιάς, ο ύπνος, η πέψη και η κατάποση. (Hayden Basinger 2023) (Kenia A. Maldonado, 2023)



### **ΒΑΣΙΚΟΙ ΠΥΡΗΝΕΣ ή ΓΑΓΓΛΙΑ (BASAL NUCLEI)**

Οι βασικοί πυρήνες, γνωστοί και ως βασικά γάγγλια, βρίσκονται βαθιά μέσα στην λευκή ουσία του εγκεφάλου. Είναι οι μεγαλύτερες υποφλοιώδεις δομές στον ανθρώπινο πρόσθιο εγκέφαλο. Αποτελούνται από τον *κερκοφόρο πυρήνα* (*caudate nucleus*) και το *κέλυφος* (*putamen*)- τα οποία σχηματίζουν το *ραβδωτό σώμα* (*striatum*), το οποίο λαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος της εισροής πληροφοριών από το φλοιό προς τα βασικά γάγγλια και την *ωχρή σφαίρα* (*globus pallidus/ pallidum*), η οποία λαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος των εξερχόμενων σημάτων από το ραβδωτό σώμα. Επιπλέον περιλαμβάνουν τον *υποθαλάμιο πυρήνα* (*subthalamic nucleus*), μια βασική δομή που ελέγχει τη λειτουργία της ωχρής σφαίρας. Τέλος, στα βασικά γάγγλια περιλαμβάνεται και η *μέλαινα ουσία* (*substantia nigra*), με μια περιοχή που περιέχει ντοπαμίνη, το *pars compacta* και μια δεύτερη περιοχή, το *pars reticulata*. Οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες που περιέχει είναι κρίσιμοι στη ρύθμιση της κίνησης που σχετίζεται με τα βασικά γάγγλια. Τα βασικά γάγγλια γενικά είναι υπεύθυνα για τις κινήσεις και τον συντονισμό των μυών. (Hayden Basinger; Jeffery P. Hogg, 2023) (Lauren Thau 2023) (Graybiel, n.d.)(Εικόνα 6)

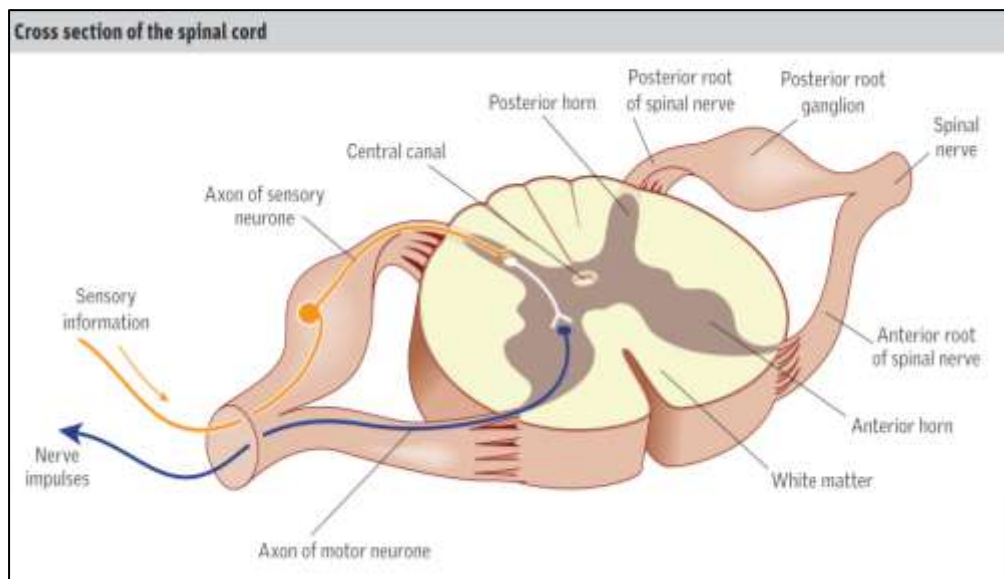


Εικόνα 5 Η βασική ανατομία του εγκεφάλου που δείχνει τις κύριες περιοχές εντός των βασικών γαγγλίων: το ραβδωτό σώμα (μπλε), το οποίο αποτελείται από τον κερκοφόρο πυρήνα και το κέλυφος, η ωχρή σφαίρα (ροζ)- η οποία αποτελείται από εξωτερικά και εσωτερικά τμήματα, ο υποθαλάμιος πυρήνας (πράσινος) και η μέλαινα ουσία (κίτρινο). Πηγή: Graybiel, A. M., "The basal ganglia", *Current Biology* 2000, 10(14), R509–R511.

### **Ο ΝΩΤΙΑΙΟΣ ΜΥΕΛΟΣ**

Ο νωτιαίος μυελός είναι ένα ζωτικής σημασίας όργανο του κεντρικού νευρικού συστήματος. Εξυπηρετεί ως αγωγός σημάτων από και προς τον εγκέφαλο και συντονίζει αντανakλαστικές κινήσεις. (Michaela Harrow-Mortelliti et al 2023) Βρίσκεται εντός της σπονδυλικής στήλης και εκτείνεται από τον προμήκη μυελό μέχρι

τον πρώτο ή δεύτερο οσφυϊκό σπόνδυλο, ενώ αποτελείται από 31 τμήματα. Εκτός από το πρώτο αυχενικό τμήμα, όλα τα υπόλοιπα διαθέτουν ένα ζευγάρι ραχιαίων (ή οπίσθιων) - αισθητηριακών και κοιλιακών (ή πρόσθιων)- κινητικών ριζών που ενώνονται και σχηματίζουν ένα *μεικτό νωτιαίο νεύρο*. Έξω από το νωτιαίο μυελό και ακριβώς κοντά στη συμβολή του με την κοιλιακή ρίζα, η ραχιαία ρίζα έχει μια ωοειδή διεύρυνση, το *γάγγλιο της ραχιαία ρίζας (posterior root ganglion)*, που περιέχει τους πρωτεύοντες αισθητηριακούς νευρώνες. (Εικόνα 7). Σε κυτταρικό επίπεδο, ο νωτιαίος μυελός απαρτίζεται από φαιά και λευκή ουσία. Η *φαιά ουσία* αποτελείται από το σώμα των αισθητηριακών και κινητικών νευρικών κυττάρων (μορφή σχήματος H) και περιβάλλεται από τη *λευκή ουσία* που αποτελείται κυρίως από εμμύελους άξονες αισθητηριακών και κινητικών νευρώνων. (Εικόνα 7) Ο νωτιαίος μυελός περιλαμβάνει επίσης δομές όπως τα ραχιαία και κοιλιακά κέρατα. Τα ραχιαία κέρατα περιέχουν δευτερεύοντες αισθητηριακούς νευρώνες, ενώ τα κοιλιακά κέρατα περιλαμβάνουν α- και γ- κινητικούς νευρώνες. Οι αισθητηριακοί νευρώνες μεταφέρουν πληροφορίες από τους αισθητήρες προς το ΚΝΣ, ενώ οι κινητικοί νευρώνες μεταφέρουν πληροφορίες από το ΚΝΣ προς τους μύες. (Bican et al., 2013) (Farley, McLafferty, et al., 2014) (Cho, 2015) Ο νωτιαίος μυελός διαδραματίζει ακόμα μία σημαντική λειτουργία στη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού μέσω του ελέγχου των αντανακλαστικών. Τα αντανακλαστικά είναι άμεσες κινητικές αποκρίσεις που συμβαίνουν ανεξάρτητα από τον εγκέφαλο, όταν ο οργανισμός αντιμετωπίζει ένα συγκεκριμένο ερέθισμα. Ο νωτιαίος μυελός μπορεί να ελέγχει αυτά τα αντανακλαστικά μέσω των αντανακλαστικών τόξων. Ένα αντανακλαστικό τόξο αντιπροσωπεύει τη βασική μονάδα ενός αντανακλαστικού και περιλαμβάνει νευρικές οδούς που δρουν σε μια ώση πριν αυτή φτάσει στον εγκέφαλο. Τα αντανακλαστικά του νωτιαίου μυελού μπορούν να είναι μονοσυναπτικά, πολυσυναπτικά και διατμηματικά. (Aaron D. Walkowski 2023) (Celena Derderian, 2023) (Farley et al., 2014) (Harrow-Mortelliti; 2023)



Εικόνα 6 Μία εγκάρσια σχηματική απεικόνιση του νωτιαίου μυελού όπου φαίνονται τα πρόσθια και οπίσθια κέρατα που σχηματίζουν τη φαιά ουσία του νωτιαίου μυελού σε σχήμα Η, καθώς και η λευκή ουσία που τα περιβάλλει. Διακρίνονται επίσης οι πρόσθιες και οπίσθιες ρίζες που σχηματίζουν ένα μεικτό νωτιαίο νεύρο. Τέλος, φαίνεται το γάγγλιο της ραχιαίας ρίζας (posterior root ganglion.)

Πηγή: Alistair Farley, Ella McLafferty, Carolyn Johnstone, Charles Hendry, "Nervous system: part 3", Nursing Standard 2014 Apr;28(33):46-50

### 1.3.4 ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ (ΠΝΣ)

Το Περιφερικό Νευρικό Σύστημα (ΠΝΣ) αποτελείται από όλους τους υπόλοιπους ιστούς οι οποίοι δεν είναι μέρος του ΚΝΣ. Πιο συγκεκριμένα, αποτελείται από το Σωματικό Νευρικό Σύστημα (ΣΝΣ) που περιλαμβάνει κρανιακά και νωτιαία νεύρα και το Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα (ΑΝΣ) που διαχωρίζεται σε Συμπαθητικό Νευρικό Σύστημα και Παρασυμπαθητικό Νευρικό Σύστημα και Εντερικό Νευρικό Σύστημα.

Το **Σωματικό Νευρικό Σύστημα (ΣΝΣ)** συνδέει τον εγκέφαλο με τους σκελετικούς μύες και εκτελεί τις κινήσεις του σώματος. Αποτελείται από **κρανιακά νεύρα** που ελέγχουν την εκούσια κίνηση και τις δομές του κεφαλιού και **νωτιαία νεύρα** που συνδέουν το σώμα με το νωτιαίο μυελό. Τα νωτιαία νεύρα μεταφέρουν σωματοαισθητηριακές πληροφορίες μέσα στο νωτιαίο μυελό και κινητικές οδηγίες έξω από αυτόν. Το ΣΝΣ επιτρέπει τις συνειδητές κινήσεις και μεταφέρει αισθητηριακές πληροφορίες προς τον εγκέφαλο. Επιπλέον, είναι υπεύθυνο για τη λειτουργία του αντανακλαστικού τόξου. (Micky A. Akinrodoye, 2023) (Farley, McLafferty, et al., 2014)



Το **Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα** αποτελείται από το συμπαθητικό, το παρασυμπαθητικό και το εντερικό νευρικό σύστημα. Αυτό το σύστημα ελέγχει αυτόματες λειτουργίες του σώματος όπως ο παλμός, η θερμοκρασία, η αρτηριακή πίεση και η πέψη. Οι νευρώνες αυτού του συστήματος σχηματίζουν μονοπάτια που περνούν από το κεντρικό νευρικό σύστημα και συνδέονται με τα όργανα-στόχους. Στο συμπαθητικό σύστημα, ο προγαγγλιακός νευρώνας συνάπτεται με το μεταγαγγλιακό νευρώνα και απελευθερώνει το νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη που ενεργοποιεί νικοτινικούς υποδοχείς, ενώ ο μεταγαγγλιακός νευρώνας συνάπτεται στο όργανο στόχο και ενεργοποιεί αδρενεργικούς υποδοχείς με την απελευθέρωση νοραδρεναλίνης (νορεπινεφρίνη). Στο παρασυμπαθητικό σύστημα ο νευροδιαβιβαστής ακετυλοχολίνη απελευθερώνεται και στις δυο περιπτώσεις. Το συμπαθητικό και το παρασυμπαθητικό σύστημα επιτελούν αντίθετες λειτουργίες, επομένως δρουν ανταγωνιστικά. Το συμπαθητικό νευρικό σύστημα ανταποκρίνεται σε στρεσογόνες καταστάσεις και σε διλλήματα του τύπου “μάχη ή φυγή”, ενώ το παρασυμπαθητικό είναι κυρίαρχο σε κατάσταση ηρεμίας, ελέγχοντας δραστηριότητες όπως η βρογχοδιαστολή, ο αυξημένος καρδιακός ρυθμός, η αγγειοσυστολή και η διαστολή της κόρης. (Joshua A. Waxenbaum, 2023) (Tyler LeBouef, 2023) (Farley, McLafferty, et al., 2014)

Το **Εντερικό Νευρικό Σύστημα** είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση των πεπτικών διεργασιών και αποτελείται από μεγάλο αριθμό νευρώνων που ελέγχουν την κίνηση και την περίσταση του εντέρου. (Kajal S. Patel, 2023)(Joshua A. Waxenbaum, 2023)

### 1.3.5 ΝΕΥΡΟΓΛΟΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα νευρογλοιακά κύτταρα αποτελούν βασική δομική μονάδα του νευρικού συστήματος μαζί με τα νευρικά κύτταρα και ο ρόλος τους είναι πολλαπλός και ζωτικής σημασίας. Η λέξη νευρογλοία, ή κόλλα των νευρώνων, χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Γερμανό παθολόγο Virchow το 1856. Στο νευρικό σύστημα, οι νευρώνες ανευρίσκονται πάντα σε στενή συσχέτιση με νευρογλοιακά κύτταρα, τα οποία τους παρέχουν υποστήριξη σε κρίσιμες λειτουργίες τους. Τα νευρογλοιακά κύτταρα είναι πιο άφθονα από τους νευρώνες και συνολικά, από κοινού, καταλαμβάνουν ένα σημαντικό μέρος του νευρικού ιστού. Παραδείγματος χάρη στον εγκέφαλο, καταλαμβάνουν περίπου το μισό όγκο του. Οι σημαντικότερες κατηγορίες νευρογλοιακών κυττάρων στο ΚΝΣ περιλαμβάνουν: αστροκύτταρα, ολιγοδενδρίτες,

μικρογλοία και επενδυματικά κύτταρα. Ενώ στο ΠΝΣ περιλαμβάνονται κύτταρα Schwann, δορυφορικά κύτταρα καθώς και κύτταρα τους εντερικής γλοίας και νευρογλοιακά κύτταρα τους οσφρητικής επένδυσης. (Kettenmann & Verkhratsky, 2011) (Parker E. Ludwig, 2023) (Jessen, 2004) (Young, 1991)

Τα **αστροκύτταρα** είναι ένα ετερογενές πληθυσμός κυττάρων που αλληλεπιδρούν με νευρώνες και αιμοφόρα αγγεία. Διαθέτουν προεκτάσεις σε σχήμα αστεριού που αποτελούν σημαντικό συστατικό του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, προστατεύοντας το ΚΝΣ από ανεπιθύμητες ουσίες. Εμπλέκονται στον σχηματισμό και έλεγχο των νευρικών συνάψεων, επηρεάζοντας τη μετάδοση των νευρικών σημάτων. Επιπλέον, ανακαλύφθηκε ότι τα αστροκύτταρα ρυθμίζουν την παροχή αίματος σε ενεργές συνάψεις, σχετίζονται με τον κύκλο ύπνου-εγρήγορσης και συμβάλλουν στην εξισορρόπηση των ενεργειακών απαιτήσεων. Τέλος, η δυσλειτουργία των αστροκυττάρων συνδέεται με παθολογικές καταστάσεις και γνωστική δυσλειτουργία. (Lloyd & Stevens, 2017) (Parker E. Ludwig, 2023) (Jessen, 2004) (Kettenmann & Verkhratsky, 2011)

Τα **ολιγοδενδροκύτταρα** είναι ένας τύπος νευρογλοιακών κυττάρων που παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό και τη διατήρηση της μυελίνης, η οποία μονώνει τους νευρικούς άξονες και διευκολύνει την ταχεία μετάδοση των νευρικών σημάτων. Τα ολιγοδενδροκύτταρα, δημιουργώντας περιβλήματα μυελίνης κατά μήκος των αξόνων, όχι μόνο επιτρέπουν την ταχεία μετάδοση των σημάτων, αλλά παρέχουν και μεταβολική υποστήριξη στους άξονες, ενώ δρουν και νευροπροστατευτικά. Οι δυσλειτουργίες των ολιγοδενδροκυττάρων συνδέονται με νευρολογικές διαταραχές, όπως η πολλαπλή σκλήρυνση, η εγκεφαλική παράλυση και η σχιζοφρένεια. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα μικρογλοιακά κύτταρα, ένας άλλος τύπος γλοιακών κυττάρων, επηρεάζουν τη λειτουργία των ολιγοδενδροκυττάρων και την παραγωγή μυελίνης στον εγκέφαλο. (Krasemann et al., 2017) (Nave, 2010) (Fancy et al., 2011) (Nave & Werner, 2014)

Τα **μικρογλοιακά κύτταρα** αποτελούν εξειδικευμένα ανοσοκύτταρα του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος και παίζουν καίριο ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών και στην αντίδραση σε παθολογικές καταστάσεις. Προέρχονται από μυελοειδή πρόδρομα κύτταρα και παραμένουν στο ΚΝΣ καθ' όλη την ενήλικη ζωή. Είναι δυναμικά κύτταρα που εξερευνούν συνεχώς το περιβάλλον τους και ανταποκρίνονται

σε σήματα από γειτονικά κύτταρα. Έχουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης σε περιοχές τραυματισμού και φλεγμονής, όπου αναλαμβάνουν τη φαγοκυτταρωτική λειτουργία και εκκρίνουν κυτοκίνες και φλεγμονώδεις μεσολαβητές. Συμβάλλουν επίσης στην ανοσολογική απόκριση. Τα μικρογλοιακά κύτταρα έχουν επίσης σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των συνάψεων και της πλαστικότητας. Εμπλέκονται στη διαδικασία τους συναπτικής διαλογής (*synaptic pruning*), η οποία περιλαμβάνει αφαίρεση περιττών ή αδύναμων συνάψεων για τη βελτίωση των νευρωνικών συνδέσεων. Η δυσλειτουργία τους έχει συνδεθεί με νευρολογικές διαταραχές, όπως η νόσος του Αλτσχάιμερ, το Πάρκινσον και η σκλήρυνση κατά πλάκας. (Lloyd & Stevens, 2017) (Kettenmann & Verkhratsky, 2011)(Kettenmann et al., 2013)

Τα **επενδυματικά κύτταρα** είναι ένας τύπος νευρογλοιακών κυττάρων που καλύπτουν το κοιλιακό σύστημα του εγκεφάλου και τον κεντρικό σωλήνα του νωτιαίου μυελού. Συμμετέχουν στη ρύθμιση της ροής του εγκεφαλονωτιαίου υγρού και στη δημιουργία νέων νευρώνων μέσω της αλληλεπίδρασής τους με βλαστοκύτταρα. Η κατανόηση του ρόλου των επενδυματικών κυττάρων είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη θεραπευτικών στρατηγικών που προάγουν την αποκατάσταση των νευρώνων. (Jacquet et al., 2009)(Parker E. Ludwig, 2023)

Τα **κύτταρα Schwann** είναι νευρογλοιακά κύτταρα του ΠΝΣ που περιβάλλουν τους άξονες των περιφερικών νεύρων. Υπάρχουν δύο μορφές αυτών των κυττάρων, τα μυελινοποιητικά και τα μη μυελινοποιητικά. Τα κύτταρα Schwann είναι απαραίτητα για την επιβίωση και ανάπτυξη των νευρώνων, ελέγχουν την αναγέννηση των κατεστραμμένων νευρώνων, είναι πιθανό να έχουν μεταβολικές και μηχανικές λειτουργίες υποστήριξης καθώς και σημαντικό ρόλο στη δημιουργία και διατήρηση ώριμων νευρομυϊκών συνδέσεων. Τέλος, ρυθμίζουν το σχηματισμό των κόμβων του Ranvier. Ο ρόλος τους είναι κρίσιμος για τη λειτουργία και αποκατάσταση του Περιφερικού Νευρικού Συστήματος. (Jessen & Mirsky, 2016) (Bhatheja & Field, 2006)

Τα **δορυφορικά κύτταρα** (satellite glial cells- SGCs) είναι νευρογλοιακά κύτταρα του ΠΝΣ, τα οποία περιβάλλουν τα σώματα των νευρικών κυττάρων αισθητήριων, συμπαθητικών και παρασυμπαθητικών γαγγλίων του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Τα κύτταρα αυτά σχηματίζουν μια δομή σε σχήμα φακέλου γύρω από τους νευρώνες. Αυτό το περίβλημα επιτρέπει τη διάχυση μεγάλων μορίων μέσα στο

νευρώνα και λειτουργεί σα φραγμός για την εισροή χημικών ενώσεων εντός. Επιπλέον, διαθέτουν μηχανισμούς για την πρόσληψη ή διάσπαση νευροδιαβιβαστών και θεωρούνται ρυθμιστές του νευρωνικού μικροπεριβάλλοντος. (Dublin & Hanani, 2007) (C. B. Reed et al., 2022)

**Τα νευρογλοιακά κύτταρα της όσφρησης** (olfactory ensheathing cells OECs) είναι ειδικά νευρογλοιακά κύτταρα που βρίσκονται στο οσφρητικό σύστημα. Προσομοιάζουν με τα μη μυελινοποιητικά κύτταρα Schwann. Το οσφρητικό σύστημα έχει εξαιρετική ικανότητα ανανέωσης και αναγέννησης το οποίο οφείλεται εν μέρει στα OEC που είναι κρίσιμα για την επιβίωση και την ανάπτυξη των οσφρητικών νευρώνων. (C. B. Reed et al., 2022)

Η ιδέα του εντέρου ως ένας αυτόνομος "εγκέφαλος" αναπτύχθηκε στα μέσα του 1700. Το εντερικό νευρικό σύστημα (ΕΝΣ) ελέγχει την κινητικότητα, τις εκκρίσεις και τη ρύθμιση του εντέρου. **Η εντερική γλοία**, ένας τύπος γλοιακών κυττάρων, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του εντέρου. Ρυθμίζει τη νευρωνική δραστηριότητα και ανταποκρίνεται στην ATP, επηρεάζοντας τη νευροδιαβίβαση. Επίσης, ρυθμίζει τις ανοσολογικές αποκρίσεις και διατηρεί την ακεραιότητα του εντερικού φραγμού για προστασία από παθογόνους οργανισμούς. Η υποεπιθηλιακή γλία συμβάλλει στην υποστήριξη των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου. Αυτές οι λειτουργίες επισημαίνουν τη σημαντική συμβολή της εντερικής γλοίας στη λειτουργία και προστασία του εντέρου. (Jessen, 2004) (Gulbransen & Sharkey, 2012) (C. B. Reed et al., 2022)

## 2<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΝΟΣΟΣ ALZHEIMER (AD)

### 2.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ

Η νόσος Αλτσχάιμερ (AD) είναι μια προοδευτική νευροεκφυλιστική διαταραχή που επηρεάζει τον εγκέφαλο, οδηγώντας σε εξασθένηση της γνωστικής ικανότητας και απώλεια μνήμης. Είναι η πιο κοινή μορφή άνοιας, που αντιπροσωπεύει περίπου το 60-80% όλων των περιπτώσεων. Η ασθένεια επηρεάζει κυρίως άτομα ηλικίας άνω των 65 ετών, αλλά η πρόωπη έναρξη του Αλτσχάιμερ μπορεί επίσης να εμφανιστεί σε άτομα ηλικίας 30 ή 40 ετών. Ο εκτιμώμενος επιπολασμός της ασθένειας είναι περίπου 30 εκατομμυρίων ανθρώπων παγκοσμίως, αριθμός που αναμένεται να τετραπλασιαστεί σε 40 χρόνια. Το 1907, ο Aloysius "Alöis" Alzheimer ήταν εκείνος περιέγραψε τα κλινικά συμπτώματα μιας 51χρονης γυναίκας, η οποία έπασχε από μία περίεργης μορφής άνοιας και βρισκόταν υπό τη φροντίδα του σε κρατικό άσυλο στη Φρανκφούρτη της Γερμανίας. Αυτά τα συμπτώματα σε συνδυασμό με τα ιστοπαθολογικά ευρήματα που εντόπισε στο εγκέφαλο της γυναίκας μετά το θάνατο της, συνηγορούσαν στο ότι έπασχε από τη νόσο που σήμερα γνωρίζουμε ως Αλτσχάιμερ. (Bondi et al., 2017) (Holtzman et al., 2011)

#### 2.1.1 Η ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Η ασθένεια χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό μη φυσιολογικών εναποθέσεων πρωτεΐνης στον εγκέφαλο. Αυτές οι δομές είναι πλάκες ενός πεπτιδίου, του β-αμυλοειδούς (Αβ) καθώς και νευροϊνδιακοί σωροί της πρωτεΐνης tau. Έρευνες έχουν δείξει ότι η συσσώρευση β-αμυλοειδούς (Αβ) πρωτεΐνης είναι χαρακτηριστικό της νόσου. Το β-αμυλοειδές πεπτίδιο, 40 ή 42 αμινοξέων προέρχεται μια μεγαλύτερη πρωτεΐνη που ονομάζεται πρόδρομη πρωτεΐνη αμυλοειδούς (Amyloid Precursor Protein- APP), μετά από διαδοχική διάσπαση της από τα ένζυμα β- και γ-σεκρετάσες. Ο φυσιολογικός της ρόλος πιθανότατα σχετίζεται με τη διαμόρφωση της συναπτικής δραστηριότητας αν και εξακολουθεί να είναι αμφιλεγόμενο. Σε υγιή άτομα, το Αβ αμυλοειδές απομακρύνεται από τον εγκέφαλο μέσω πολλών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της φαγοκυττάρωσης από μικρογλοία και της κάθαρσης μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Ωστόσο, σε άτομα με νόσο Αλτσχάιμερ, το Αβ συσσωρεύεται και σχηματίζει πλάκες στον εξωκυτταρικό χώρο του εγκεφάλου

οδηγώντας σε νευροφλεγμονή και βλάβη στους νευρώνες. (Serrano-Pozo et al., 2011) (Selkoe & Hardy, 2016) (Holtzman et al., 2011)

Οι νευροϊνιδιακοί σωροί (Neurofibrillary tangles- NFTs), ένα άλλο χαρακτηριστικό γνώρισμα της νόσου και αποτελούνται από μια πρωτεΐνη που ονομάζεται tau. Η tau πρωτεΐνη βρίσκεται φυσιολογικά στον άξονα του νευρικού κυττάρου και είναι σημαντική για τη σταθεροποίηση της δομής των νευρώνων, καθώς συνδέεται με την τουμπουλίνη και σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους. Στη νόσο του Αλτσχάιμερ, η πρωτεΐνη tau υπερφωσφορυλιώνεται, αναδιπλώνεται λανθασμένα σε β-φύλλο, οδηγώντας στο σχηματισμό συσσωματωμάτων μέσα στα νευρικά κυτταρικά σώματα, γνωστά και ως δυστροφικοί νευρίτες τα οποία διαταράσσουν την κανονική λειτουργία των νευρώνων. (Holtzman et al., 2011) (Serrano-Pozo et al., 2011)

Παρά το γεγονός ότι οι παραπάνω δομές αποτελούν χαρακτηριστικά γνωρίσματα της νόσου, δεν υπάρχει πραγματική συσχέτιση μεταξύ των ποσοτικών επιπέδων των δομών αυτών (φλοιώδεις πλάκες) και της γνωστικής εξασθένησης στη νόσο. Η συσχέτιση φαίνεται να είναι πιο έμμεση. Το κλειδί για τη συσχέτιση της γνωστικής εξασθένησης που προκαλεί η νόσος είναι η απώλεια των συνάψεων και η απώλεια των χολινεργικών νευρώνων που οδηγούν σε μειωμένη μνήμη και προσοχή. (Ferreira-Vieira et al., 2016) Οι χολινεργικοί νευρώνες που βρίσκονται στον βασικό πρόσθιο εγκέφαλο, συμπεριλαμβανομένων των νευρώνων που σχηματίζουν τον βασικό πυρήνα του Meynert, υφίστανται πολύ σοβαρό εκφυλισμό στη νόσο του Αλτσχάιμερ. Σχεδόν όλες οι περιοχές του εγκεφάλου νευρώνονται από χολινεργικούς νευρώνες γεγονός που καταδεικνύει τον σημαντικό ρόλο που έχουν στη φυσιολογία του οργανισμού. Έχει αποδειχθεί ότι το χολινεργικό σύστημα εμπλέκεται στην προσοχή, τη μάθηση, τη μνήμη, την απόκριση στο στρες, την εγρήγορση και τον ύπνος και τις αισθητηριακές πληροφορίες. (Ferreira-Vieira et al., 2016)

Ο νευροδιαβιβαστής ακετυλοχολίνη, ο οποίος παρουσιάζει σημαντική δράση τόσο στο συμπαθητικό όσο και στο παρασυμπαθητικό σύστημα συντίθεται από χολινεργικούς νευρώνες. Απελευθερώνεται σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένου του ιππόκαμπου και του φλοιού και εκεί συνδέεται με νικοτινικούς και μουσκαρινικούς υποδοχείς. (M. M. Mesulam, 2004) Ο τερματισμός της χολινεργικής νευροδιαβίβασης στους νευρώνες γίνεται μέσω της ταχείας υδρόλυσης της ακετυλοχολίνης σε οξικό και χολίνη με το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση (AChE), ενώ το ένζυμο βουτυρυλοχολινεστεράση (BChE)



συμμετέχει αντίστοιχα στην περίπτωση των νευρογλοιακών κυττάρων. (M. Mesulam, 2004) Ο κρίσιμος ρόλος της ακετυλοχολίνης στην παθολογία του Αλτσχάιμερ αποδεικνύεται από τη συσχέτισή της με τις παθολογικές δομές- πλάκες β αμυλοειδούς και τους νευροϊνιδιακοί σωροί, που παρατηρούνται μεταθανάτια σε εγκεφάλους. Το Αβ έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τη σύνθεση, την απελευθέρωση και το μεταβολισμό της ακετυλοχολίνης, καθώς υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της μειωμένης δραστηριότητας του ενζύμου σύνθεσης ακετυλοχολίνης- της ακετυλοτρανσφεράσης της χολίνης με αυξανόμενους αριθμούς πλακών. Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις ότι η απώλεια της χολινεργικής νεύρωσης του φλοιού σχετίζεται και πιθανώς προκαλείται από νευροϊνιδιακούς σωρούς στο βασικό πυρήνα του Meynert. (Hampel et al., 2018)

### 2.1.2 ΤΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Η νόσος Αλτσχάιμερ εξελίσσεται σε τρία στάδια, με αντίστοιχα συμπτώματα σε κάθε ένα από αυτά. Στο πρώιμο στάδιο, ο ιππόκαμπος, υπεύθυνος για τη μνήμη, επηρεάζεται, προκαλώντας ένα από τα πρώτα σημάδια, την απώλεια της βραχυπρόθεσμης μνήμης. Οι ασθενείς εμφανίζουν δυσκολίες στο multitasking και στην επίλυση προβλημάτων. Στο μεσαίο στάδιο, η απώλεια μνήμης είναι πιο σοβαρή και συνοδεύεται από δυσκολίες σε καθημερινές εργασίες και σύγχυση. Τέλος, στο τελευταίο στάδιο, οι ασθενείς εξαρτώνται πλήρως από άλλους, χάνουν την ικανότητα επικοινωνίας και κινητικότητας, μένοντας κατάκοιτοι και παράλληλα χάνουν τον έλεγχο των σωματικών λειτουργιών τους (πχ ούρηση). Έτσι, συχνά, καταλήγουν σε μια κατάσταση "φυτού". (Sheppard O, 2021) (Anil Kumar, 2023)

### 2.1.3 ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΚΑΙ ΜΗ ΑΙΤΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ- ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Η νόσος Αλτσχάιμερ περιλαμβάνει μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση γενετικών, περιβαλλοντικών και παραγόντων του τρόπου ζωής. Υπάρχουν δύο κύριες μορφές της νόσου, η οικογενής και η σποραδική. Η οικογενής μορφή είναι κληρονομούμενη με αυτοσωμικό κυρίαρχο τρόπο με πλήρως διεισδυτικές σημειακές μεταλλάξεις σε γονίδια όπως αυτά της πρόδρομης πρωτεΐνης αμυλοειδούς (APP) στο χρωμόσωμα 21 και των γονιδίων PSEN1 στο χρωμόσωμα 14 και PSEN2 στο χρωμόσωμα 1, που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες πρεσενιλίνη-1 και πρεσενιλίνη-2 αντίστοιχα. Αυτές οι πρωτεΐνες που παίζουν κρίσιμο ρόλο στην επεξεργασία και την κάθαρση του β αμυλοειδούς στον εγκέφαλο. Η περίπτωση μετάλλαξης των γονιδίων της APP είναι πιο

σπάνια, ενώ πιο συνήθης είναι η μετάλλαξη στα γονίδια των πρεσενιλινών. (Pimenova et al., 2018) (Bertram & Tanzi, 2012) (Selkoe, 2001) (Anil Kumar, 2023)

Η σποραδική μορφή της νόσου Αλτσχάιμερ είναι η πιο κοινή μορφή, αποτελώντας πάνω από το 95% των περιπτώσεων. Ο κίνδυνος εμφάνισης αυξάνεται με την ηλικία, με τις περισσότερες περιπτώσεις να εμφανίζονται μετά τα 65 έτη. Δεν προκαλείται από μία μόνο γενετική μετάλλαξη, αλλά πιστεύεται ότι συνδέεται με ένα πολύπλοκο μοτίβο γενετικών και μη παραγόντων που παραμένουν μόνο εν μέρει κατανοητοί. Το ΑΡΟΕ, το γονίδιο που κωδικοποιεί την απολιποπρωτεΐνη Ε και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19, είναι ένα γονίδιο που παίζει καθοριστικό ρόλο στο μεταβολισμό των λιπιδίων, συμπεριλαμβανομένης της χοληστερόλης, και εμπλέκεται σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες στον εγκέφαλο, όπως η απομάκρυνση β αμυλοειδούς. Υπάρχουν τρία αλληλόμορφα της ΑΡΟΕ στους ανθρώπους τα Ε2, Ε3 και Ε4 που διαφέρουν στην αλληλουχία μόνο κατά ένα. Το αλληλόμορφο απολιποπρωτεΐνης Ε4 είναι ένας σημαντικός γενετικός παράγοντας κινδύνου για τη σποραδική όψιμη έναρξη του Αλτσχάιμερ, ενώ το αλληλόμορφο Ε2 είναι θεωρείται προστατευτικό. (Selkoe, 2001) (Anil Kumar, 2023) (Selkoe & Hardy, 2016) (Holtzman et al., 2011)

Εκτός από αυτές τις σπάνιες, πλήρως διεισδυτικές μεταλλάξεις, οι μελέτες συσχέτισης σε όλο το γονιδίωμα (GWAS) έχουν εντοπίσει πολλές κοινές γενετικές παραλλαγές που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης Αλτσχάιμερ. Το γονίδιο CLU (χρωμόσωμα 8p21) κωδικοποιεί την κλαστερίνη ή αλλιώς απολιποπρωτεΐνη J, μια πρωτεΐνη που εκφράζεται σε όλους τους ιστούς και στο ΚΝΣ. Εμπλέκεται στο μεταβολισμό του β αμυλοειδούς προσδένοντας το και συμμετέχει στην απομάκρυνσή του από τον εγκέφαλο (μοριακός συνοδός). Παραλλαγές στο γονίδιο CLU έχουν συσχετιστεί με αλλαγές στα επίπεδα της κλαστερίνης και αυξημένο κίνδυνο Αλτσχάιμερ σε μεγαλύτερες ηλικίες. (Bertram & Tanzi, 2012) (Holtzman et al., 2011)

Οι νευροπαθολόγοι, από καιρό, έχουν προτείνει ότι ο εγκέφαλος έχει ένα έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα, που περιλαμβάνει και τη μικρογλοιακή απόκριση στην πλάκα που σχηματίζεται από τις εναποθέσεις β αμυλοειδούς στην παθολογία της νόσου. Το γονίδιο CR1 (1q32.2) κωδικοποιεί τον υποδοχέα συμπληρώματος 1 (3b/4b). Το CR1 είναι ο κύριος υποδοχέας της πρωτεΐνης C3b του συμπληρώματος, η οποία προέρχεται από το διασπασμένο C3, το κεντρικό συστατικό του συμπληρώματος και μια βασική φλεγμονώδη πρωτεΐνη που ενεργοποιείται στο Αλτσχάιμερ. Μελέτες δείχνουν ότι η ενεργοποίηση του συμπληρώματος μπορεί να προστατεύσει από τη νευροτοξικότητα



που προκαλείται από το Αλτσχάιμερ και ότι εμπλέκεται στην κάθαρση του Αβ με τη βοήθεια των μικρογλοίων και των εκφυλιστικών νευρώνων. Παραλλαγές στο γονίδιο CR1 έχουν συσχετιστεί με μειωμένη δραστηριότητα του συμπληρώματος- μη απομάκρυνση του αμυλοειδούς από τα μικρογλοία άρα αυξημένο κίνδυνο Αλτσχάιμερ σε μεγάλες ηλικίες. (Bertram & Tanzi, 2012) (Selkoe & Hardy, 2016)

Το γονίδιο TREM2 κωδικοποιεί ένα μονό διαμεμβρανικό υποδοχέα τύπου 1, ο οποίος εκφράζεται στα μικρογλοία και εμπλέκεται στη φαγοκυττάρωση και τη φλεγμονή. Οι παραλλαγές του TREM2 μειώνουν τη μεταφορά και την έκφραση της κυτταρικής επιφάνειας της πλήρους μήκους πρωτεΐνης, μειώνοντας έτσι τη δραστηριότητα της, με αποτέλεσμα τη μείωση της μικρογλοιακής λειτουργίας και φαγοκυττάρωσης και αυξημένο κίνδυνο Αλτσχάιμερ. Συχνά τέτοιες μεταλλάξεις παρατηρούνται στη σποραδική πρόωμης μορφής της νόσου. (Pimenova et al., 2018) (Selkoe & Hardy, 2016)

Το γονίδιο PICALM κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη συναρμολόγησης κλαθρίνης που δεσμεύει τη φωσφατιδυλινοσιτόλη, η οποία εμπλέκεται στην ενδοκυττάρωση που προκαλείται από κλαθρίνη. Είναι ενδιαφέρον ότι το C-τελικό θραύσμα της APP που δημιουργείται από τη διάσπαση της β-σεκρετάσης υφίσταται ενδοκυττάρωση μέσω κοιλοτήτων/κυστιδίων επικαλυμμένων με κλαθρίνη προτού διασπαστεί από τη γ-σεκρετάση. Παραλλαγές στο γονίδιο PICALM προκαλούν μια δυσλειτουργική πρωτεΐνη PICALM, η οποία θα μπορούσε να παρέμβει σε αυτή τη διαδικασία και, τελικά υπάρχει συσχέτιση με μειωμένη κάθαρση Αβ και αυξημένο κίνδυνο Αλτσχάιμερ σε όψιμη ηλικία. (Bertram & Tanzi, 2012) (Selkoe & Hardy, 2016) )

Άλλα γονίδια που εμπλέκονται στην παθογένεση της AD περιλαμβάνουν εκείνα που εμπλέκονται στον μεταβολισμό της tau πρωτεΐνης. Το γονίδιο της MAPT κωδικοποιεί τη σχετική με τους μικροσωληνίσκους πρωτεΐνη tau. Παραλλαγές στο γονίδιο MAPT, έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο Αλτσχάιμερ με νεαρή ηλικία σε οικογενείς μορφές της νόσου. (Bertram & Tanzi, 2012) (Sheppard O, 2021)

Το γονίδιο ABCA7 κωδικοποιεί την πρωτεΐνη μεταφορέα λιπιδίων. Η ABCA7 εκφράζεται σε νευρώνες, μικρογλοία και περιφερειακά μακροφάγα και κανονικά προάγει την εκροή λιπιδίων από τα κύτταρα σε απολιποπρωτεΐνες και επίσης ρυθμίζει τη φαγοκυττάρωση. Μεταλλάξεις απώλειας σε αυτό το γονίδιο, αυξάνουν τον κίνδυνο Αλτσχάιμερ περίπου στο τριπλάσιο καθώς έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται στην εκκαθάριση του β αμυλοειδούς. (Pimenova et al., 2018) (Selkoe & Hardy, 2016) (Holtzman et al., 2011)

Παραλλαγές στο γονίδιο για τον υποδοχέα σορτιλίνης, SORT1, το οποίο είναι απαραίτητο για τη μεταφορά της APP από την κυτταρική επιφάνεια στο σύμπλεγμα Golgi-ενδοπλασματικού δικτύου, έχουν βρεθεί σε οικογενείς και σποραδικές μορφές της νόσου Alzheimer. (Anil Kumar, 2023)

Παράγοντες που σχετίζονται με το περιβάλλον και τον τρόπο ζωής επηρεάζουν την εμφάνιση της νόσου Αλτσχάιμερ. Αυτοί περιλαμβάνουν τραυματισμό στο κεφάλι, υπέρταση, κατάθλιψη, κάπνισμα, διαβήτη, ρύπανση, στρες και έκθεση σε βαρέα μέταλλα, οι οποίοι συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο. Από την άλλη πλευρά, η τριτοβάθμια εκπαίδευση, η χρήση οιστρογόνων από γυναίκες, η χρήση αντιφλεγμονωδών παραγόντων, το διάβασμα, το παίξιμο μουσικών οργάνων, η υγιεινή διατροφή και άσκηση συνδέονται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. (Sheppard O, 2021) (Anil Kumar, 2023)

#### **2.1.4 ΠΩΣ ΓΙΝΕΤΑΙ Η ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ**

Η διάγνωση της νόσου Αλτσχάιμερ είναι ένα σύνθετο ζήτημα που απαιτεί συνδυασμό ψυχολογικών και γνωστικών τεστ- που αξιολογούν την προσοχή, τη μνήμη, τη γλώσσα, τη συλλογιστική, τη συμπεριφορά και την προσωπικότητα, απεικονιστικών τεχνικών-όπως η MRI και η PET, μπορούν να ανιχνεύσουν αλλαγές στον εγκέφαλο που σχετίζονται με τη νόσο και εξετάσεων εγκεφαλονωτιαίου υγρού και αίματος για να αποκλειστούν άλλες νευρολογικές διαταραχές. Η έγκαιρη διάγνωση είναι κρίσιμη για την αντιμετώπιση της νόσου, ώστε να δοθεί η κατάλληλη φαρμακευτική ή μη αγωγή στον ασθενή, σε ένα στάδιο διαχειρίσιμο όπου δε θα έχει εξελιχθεί αρκετά η νόσος. Η διάγνωση αντιμετωπίζει προκλήσεις λόγω της επικάλυψης συμπτωμάτων με άλλες μορφές άνοιας και της έλλειψης αξιόπιστων βιοδεικτών. Η μεταθανάτια εξέταση του εγκεφάλου παραμένει ο αξιόπιστος τρόπος διάγνωσης. (Agrawal & Biswas, 2015) (Anil Kumar, 2023) (Sheppard O, 2021) (Dubois et al., 2014) (Koo, 2015) (Fink HA, 2020)

#### **2.1.5 Η ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ**

Η νόσος του Αλτσχάιμερ αντιμετωπίζεται κυρίως με αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης (AChEIs), όπως η donepezil, η ριβαστιγμίνη και η γκαλανταμίνη. Αυτά τα φάρμακα αυξάνουν τα επίπεδα της ακετυλοχολίνης, βελτιώνοντας τη γνωστική ικανότητα και τη νευρική λειτουργία. Η donepezil είναι ένα κορυφαίο φάρμακο προτίμησης σε ήπιες έως μέτριες περιπτώσεις, ενώ η

ριβαστιγμίνη και η γκαλανταμίνη χρησιμοποιούνται επίσης. Επιπλέον, ανταγωνιστές των υποδοχέων NMDARs, όπως η μεμαντίνη, χρησιμοποιούνται για να αντιμετωπίσουν τη διεγερτοτοξικότητα από το γλουταμινικό οξύ που παρατηρείται στη νόσο. Αυτές οι θεραπευτικές προσεγγίσεις παρέχουν συμπτωματική ανακούφιση και βελτίωση της ποιότητας ζωής σε ασθενείς με νόσο του Αλτσχάιμερ. Πρόσφατη έρευνα εστιάζει στην ανάπτυξη θεραπειών τροποποίησης της νόσου, που στοχεύουν στην παθοφυσιολογία της νόσου αντί για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων. Αυτή η προσέγγιση περιλαμβάνει τη στόχευση του β-αμυλοειδούς και της ταυ με μονοκλωνικά αντισώματα. Φάρμακα μικρών μορίων, όπως οι αναστολείς BACE και οι αναστολείς γ-σεκρετάσης, επίσης στοχεύουν στη μείωση της παραγωγής β-αμυλοειδούς. Παράλληλα, ορισμένες μη φαρμακευτικές παρεμβάσεις, όπως η μουσική και οι αισθητηριακές διεγέρσεις, έχουν επίσης μελετηθεί για την αντιμετώπιση της νόσου. (Cummings, 2004) (Vaz & Silvestre, 2020) (Sevigny et al., 2016) (Briggs et al., 2016) (J. Liu et al., 2019) (Sharma, 2019)

## **2.2 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ALZHEIMER**

### **2.2.1 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ**

Στην ενότητα 2.1.3. “Γενετικά και μη αίτια της νόσου- Παράγοντες κινδύνου” έχει αναλυθεί μια πληθώρα γονιδίων τα οποία έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται με τη νόσο, χωρίς ωστόσο η παρουσία τους να σημαίνει απαραίτητα εκδήλωση της νόσου, όμως εν τέλει αποτελούν παράγοντα κινδύνου. Συνοπτικά θα αναφερθούν μερικά από τα βασικότερα γονίδια. Σημαντικοί γενετικοί δείκτες της νόσου του Αλτσχάιμερ είναι μεταλλάξεις στα γονίδια της APP αλλά και πιο συνηθισμένα στα PSEN1, PSEN2, τα οποία σχετίζονται με οικογενείς μορφές της νόσου και εκδήλωση της νόσου σε νεαρή ηλικία. Όσο αφορά το γονίδιο της APP παρουσιάζονται σημειακές μεταλλάξεις, που εντοπίζονται είτε αμέσως πριν από τη θέση διάσπασης της β-σεκρετάσης, λίγο μετά τη θέση της α-σεκρετάσης, είτε λίγο μετά το καρβοξυτελικό άκρο στη θέση διάσπασης της γ-σεκρετάσης. Αυτές οι λανθασμένες μεταλλάξεις αλλάζουν την πρωτεολυτική επεξεργασία στις τρεις θέσεις των σεκρετασών με διάφορους τρόπους. (Selkoe, 2001) Οι μεταλλάξεις στην αλληλουχία του αμυλοειδούς Αβ έχουν τη δυνατότητα να επηρεάσουν τις βιοφυσικές του ιδιότητες, όπως η υδροφοβικότητα και ο ρυθμός συσσωμάτωσης, ενώ οι μεταλλάξεις στο καρβοξυτελικό άκρο του Αβ στη θέση της γ-

σεκρετάσης επηρεάζουν την αναλογία Αβ42 προς Αβ40. (Pimenova et al., 2018) Τα γονίδια PSEN1 και PSEN2 κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες πρεσενιλίνες 1 και 2 αντίστοιχα, οι οποίες μεσολαβούν στην ενδομεμβρανική επεξεργασίας της APP από τη γ-σεκρετάσης για τη δημιουργία του β αμυλοειδούς. (Bertram & Tanzi, 2012) Μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια επηρεάζουν τη δραστηριότητα ενδοπεπτιδάσης ή καρβοξυπεπτιδάσης της γ-σεκρετάσης, μετατοπίζοντας την παραγωγή των Αβ40 και Αβ42 σε μεγαλύτερα και πιο νευροτοξικά είδη, όπως το Αβ43 στην περίπτωση της μετάλλαξης PSEN1-R278I ή της PSEN1-L435F, με αποτέλεσμα τη μειωμένη παραγωγή Αβ και την αύξηση των άλλων μορφών οι οποίες συσσωρεύονται. (Pimenova et al., 2018) Ενώ, για τις σποραδικές μορφές της νόσου σε μεγαλύτερες ηλικίες βασικό ρόλο έχει το γονίδιο APOE με τη συχνότητα εμφάνισης του είναι μεγαλύτερη από τα δυο προηγούμενα γονίδια που εμφανίζονται εξαιρετικά σπάνια. Το APOE φαίνεται πως συνδέεται με το υδρόφοβο πεπτίδιο Αβ. Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί rs429358 και rs7412 στο εξώνιο 4 στο γονίδιο APOE δεν είναι συνώνυμοι και καταλήγουν σε αλλαγή αμινοξέων από Cys σε Arg και Arg σε Cys οδηγώντας σε τρία αλληλόμορφα, E2, E3 και E4. Τα άτομα που φέρουν το αλληλόμορφο E4 διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. (D. H. Kim et al., 2014) Οι μεταλλάξεις στα γονίδια APP και PSEN1, PSEN2 και APOE αλλά και σε άλλα γονίδια που έχουν αναφερθεί μπορούν να προσδιοριστούν με μεθόδους αλληλούχισης DNA όπως Sanger sequencing ή την πιο σύγχρονη τεχνική- Next Generation Sequencing (NGS) αφού πρώτα έχει προηγηθεί ενίσχυση του επιθυμητού γονιδίου μέσω PCR. (Nicolas et al., 2017) (Guerreiro et al., 2010) (Lleó et al., 2002)

Επιπλέον, στη σύγχρονη βιβλιογραφία, υπάρχουν πολλές μελέτες που αναφέρουν ότι τα ευρισκόμενα στο αίμα, στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (CSF) ή στον εγκέφαλο miRNAs είναι υποψήφιοι βιοδείκτες της νόσου του Αλτσχάιμερ. Αυτά τα μικρά μη κωδικά RNA, έχουν την ικανότητα να δεσμεύονται στην 3'-αμετάφραστη περιοχή (UTR) στο mRNA και ελέγχουν την γονιδιακή έκφραση. Με αυτόν τον τρόπο, καταστέλλουν τη μετάφραση ή προκαλούν την αποικοδόμηση του mRNA στόχου. (Swarbrick et al., 2019) Η απορρύθμιση των miRNAs μπορεί να οδηγήσει σε ανώμαλη έκφραση των γονιδίων-στόχων τους και να συμβάλει στην ανάπτυξη διαφόρων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του Αλτσχάιμερ. Οι αλλαγές στη σηματοδότηση των miRNAs έχουν εμπλακεί στην επιγενετική και μοριακή γενετική όλων των νευροβιολογικών διεργασιών που σχετίζονται με την παθοφυσιολογία της νόσου του Αλτσχάιμερ. (Zhao

et al., 2020) Τέσσερα miRNAs, έχουν συσχετιστεί με τη διάγνωση της νόσου: miR-21, miR-125b, miR-146a και miR-222, ενώ πολλά περισσότερα φαίνεται να απορρυθμίζονται. (Marchegiani et al., 2019) (Swarbrick et al., 2019) Παραδείγματος χάρη, σύμφωνα με τους (Villa et al., 2013) βρέθηκαν στοιχεία για την απορρύθμιση του περιφερειακού miR-29b, που ρυθμίζει το μεταγραφικό παράγοντα Sp1, ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων APP και tau πρωτεΐνης συμβάλλοντας έτσι στην ανάπτυξη της νόσου. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται συνήθως για τον ποσοτικό προσδιορισμό των miRNAs είναι με Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qRT-PCR) (D. H. Kim et al., 2014)

### 2.2.2 ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Οι σημαντικότεροι βιοχημικοί δείκτες της νόσου Αλτσχάιμερ είναι το β-αμυλοειδές πεπτίδιο, η tau πρωτεΐνη και η tau φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη. Το β-αμυλοειδές είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό πλακών στον εγκέφαλο. Μπορεί να προσδιοριστεί τόσο με απεικονιστικές τεχνικές, όσο και με μετρήσεις από το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (CSF). Οι απεικονιστικές τεχνικές περιλαμβάνουν PET-Scan και Μαγνητική τομογραφία (MRI). Η δυνατότητα χρήσης του PET-Scan οφείλεται ανάπτυξη της ένωσης Pittsburgh B (PiB), η οποία είναι ένα ραδιενεργό ανάλογο της φθορίζουσας αμυλοειδούς χρωστικής θειοφλαβίνης T62. Έχει την ικανότητα αφενός να διασχίζει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και αφετέρου να συνδέεται με το β-αμυλοειδές με υψηλή συγγένεια. Συγκριτικές μελέτες με ιστοπαθολογική ανάλυση έδειξαν υψηλή ευαισθησία (88–98%) και ειδικότητα (88–100%) για την ανίχνευση μέτριων ή συχνών νευριτικών πλακών β-αμυλοειδούς με τη μέθοδο PET-Scan. Επίσης, μπορεί να γίνει και νευροαπεικόνιση με MRI, με σκοπό να εντοπιστεί ατροφία στον ιππόκαμπο λόγω την εναπόθεσης του β-αμυλοειδούς. Ωστόσο, αυτές οι απεικονιστικές τεχνικές έχουν υψηλό κόστος και είναι εξειδικευμένες, οπότε δεν ενδείκνυται για μαζικό έλεγχο. Πολλά υποσχόμενες μελέτες γίνονται επίσης, για αναζήτηση κατάλληλων ιχνηθετών προκειμένου να γίνει δυνατή η απεικόνιση με PET-Scan και των νευροινιδιακών σωρών που προκαλούνται από τη φωσφορυλιωμένη tau πρωτεΐνη. (Masters et al., 2015) (Swarbrick et al., 2019)

Η απομόνωση και ο προσδιορισμός του β-αμυλοειδούς, της tau πρωτεΐνης και της tau φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης, γίνονται συχνότερα και με μεγαλύτερη ευκολία μέσω του εγκεφαλονωτιαίου υγρού. (Young, 1991) Η ποσότητα στο CSF αντικατοπτρίζει αντιστρόφως ανάλογα το φορτίο αμυλοειδούς στον εγκέφαλο. Πιο συγκεκριμένα,



προσδιορίζονται οι διαλυτές μορφές του Αβ42 και μια χαμηλή συγκέντρωση υποδηλώνει ότι έχει συμβεί σημαντική παρεγχυματική εναπόθεση στον εγκέφαλο. Η tau πρωτεΐνη αντανakλά άμεσα το βαθμό του νευροεκφυλισμού, ενώ η tau φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη θεωρείται ένας άμεσος δείκτης παθολογίας για τα νευροϊνδιακά μπερδέματα. (Dubois et al., 2014) Πρέπει να αναφερθεί ότι η διαδικασία λήψης CSF είναι επεμβατική, απαιτεί αναισθησία και εμφανίζονται συχνά ανεπιθύμητες παρενέργειες όπως πονοκέφαλος. Μετά την απομόνωση των επιθυμητών πρωτεϊνών από το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, πραγματοποιείται ποσοτικοποίηση μέσω ενζυμικών ανοσοπροσροφητικών δοκιμασιών, όπως ELISA. (Swarbrick et al., 2019) Σύμφωνα με μελέτες,, ο συνδυασμός χαμηλών επιπέδων του Αβ42 του CSF και υψηλών επιπέδων tau και tau φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης ονομάζεται «προφίλ εγκεφαλονωτιαίου υγρού της νόσου του Αλτσχάιμερ» και είναι εξαιρετικά προγνωστικός για την άνοια που προκαλεί η νόσος. Ο συνδυασμός αυτός παρέχει 85–90% ευαισθησία και ειδικότητα και καλύτερη διάγνωση από οποιοδήποτε βιοδείκτη χρησιμοποιηθεί μεμονομένα. Επιπλέον, φαίνεται να αυξάνει σημαντικά την ακρίβεια της διάγνωσης της νόσου ακόμη και σε πρόδρομο στάδιο. (Masters et al., 2015) (Dubois et al., 2014)

Εκτός από τις παραπάνω, έχει παρατηρηθεί μια γενική αύξηση και σε άλλες ενδοκυτταρικές νευρωνικές πρωτεΐνες στο CSF ασθενών με Alzheimer, όπως η visinin-like protein 1 (VLP1) και το neurofilament light polypeptide (NFL), που προβλέπουν τόσο το ρυθμό κλινικής επιδείνωσης όσο και την ποσοστό νευροεκφυλισμού. (Masters et al., 2015) Η VLP-1 έχει αναγνωριστεί ως πιθανός βιοδείκτης για τη νόσο του Αλτσχάιμερ λόγω της σημαντικά αυξημένης συγκέντρωσής της στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με Αλτσχάιμερ σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες. Οι δυνατότητές της ως βιοδείκτης είναι πολλά υποσχόμενες, παρ' ότι δε φαίνεται να εμφανίζει ειδικότητα για κάποια συγκεκριμένη πάθηση. Η πρωτεΐνη VLP-1 είναι μέλος της οικογένειας νευρωνικών πρωτεϊνών αισθητήρων του ασβεστίου, η οποία εκφράζεται στους νευρώνες του ιππόκαμπου και του φλοιού. Εμπλέκεται σε διάφορες παθολογικές διαταραχές της ομοιόστασης του  $Ca^{2+}$  που οδηγούν σε απώλεια νευρώνων. Η διαταραγμένη ομοιόσταση  $Ca^{2+}$  στο Αλτσχάιμερ συνδέεται με βλάβη των νευρώνων που περιέχουν VLP-1 στον εγκέφαλο, η οποία οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα του VLP-1 στο CSF. (J.-M. Lee et al., 2008) (Grobelska et al., 2015)

Το neurofilament light polypeptide (NFL) έχει προταθεί ως ένας πολλά υποσχόμενος

βιοδείκτης για νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Τα NFLs είναι τα κύρια κυτταροσκελετικά συστατικά των νευρωνικών κυττάρων, που εμπλέκονται στη διατήρηση του νευραξονικού διαμετρήματος και στη μορφολειτουργική ακεραιότητα. Εκφράζονται κυρίως σε μυελινωμένους άξονες μεγάλου διαμετρήματος και τα αυξημένα επίπεδα του NFL στο CSF συσχετίζονται με αλλοιώσεις λευκής ουσίας και άλλες μορφές βλάβης στις υποφλοιώδεις περιοχές του εγκεφάλου, υποδηλώνοντας μια πιθανή διαγνωστική συνάφεια με το Αλτσχάιμερ. Αυξημένα επίπεδα NFLs έχουν παρατηρηθεί σε μεγάλο αριθμό νευροεκφυλιστικών νοσημάτων γεγονός που δεν καθιστά τον υποψήφιο βιοδείκτη ειδικό για το Αλτσχάιμερ. Παρ' όλα αυτά εξακολουθεί να διερευνάται καθώς απαιτείται πλήρης κατανόηση της σχέσης μεταξύ NFL και Αλτσχάιμερ προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικό εργαλείο. Η ποσοτικοποίηση των VLP1 και NFLs πραγματοποιείται μέσω ενζυμικών ανοσοπροσροφητικών δοκιμασιών, όπως ELISA. (Skillback et al., 2014) (J.-M. Lee et al., 2008) (Marchegiani et al., 2019)

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί η προσπάθεια που γίνεται από την επιστημονική κοινότητα όλες οι παραπάνω πρωτεΐνες να μπορούν να απομονωθούν από το περιφερικό αίμα των ασθενών. Ο τρόπος αυτός είναι μη επεμβατικός, ευκολότερος και με χαμηλότερο κόστος από το CSF, με δυνατότητα να χρησιμοποιείται ευρέως και τακτικά για την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου. (Marchegiani et al., 2019) Αρκετές μελέτες έχουν βρει αξιόλογες διαφορές στις συγκεντρώσεις συγκεκριμένων πρωτεϊνών μεταξύ του αίματος υγιών ανθρώπων και του αίματος ασθενών, υπογραμμίζοντας τις δυνατότητές που δίνονται ως διαγνωστική διαδικασία. Παραδείγματος χάρη, στη μελέτη των Wang et al (2013), διαπιστώθηκε ότι το αμυλοειδές Αβ40 που απομονώθηκε από περιφερικό πλάσμα ήταν ικανό να διακρίνει ασθενείς με Αλτσχάιμερ από υγιείς με ευαισθησία 80% και ειδικότητα 69,6%. (Wang et al., 2014)

### 3<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΝΟΣΟΣ PARKINSON (PD)

#### 3.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ

Η νόσος του Πάρκινσον είναι μια χρόνια και προοδευτική νευρολογική διαταραχή που επηρεάζει τον κινητικό φλοιό του εγκεφάλου. Περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1817 από τον Βρετανό γιατρό Τζέιμς Πάρκινσον, ο οποίος αναγνώρισε τα χαρακτηριστικά συμπτώματα της νόσου όπως τρέμουλο, ακαμψία και βραδυκινησία στους ασθενείς του και την χαρακτήρισε ως την “τρωμάδη παράλυση” (“shaking palsy”). Αξιοθαύμαστο αποτελεί το γεγονός ότι 200 χρόνια μετά και ενώ οι μελέτες για τη νόσο έχουν αυξηθεί με ραγδαίο ρυθμό, η αρχική διαπίστωση του Τζέιμς Πάρκινσον παραμένει σαφής περιεκτική και λεπτομερής, καλύπτοντας πολλές πτυχές της ασθένειας όπως τη γνωρίζουμε σήμερα. Η νόσος του Πάρκινσον είναι η δεύτερη πιο συχνή νευροεκφυλιστική διαταραχή μετά τη νόσο του Αλτσχάιμερ, επηρεάζοντας περίπου το 2-3% του πληθυσμού άνω των 65 ετών, αν και μπορεί να εμφανιστεί και σε νεότερα άτομα. Η νόσος εμφανίζεται δυο φορές συχνότερα στους άνδρες από ότι στις γυναίκες. Οι άνθρωποι που νοσούν με Πάρκινσον αναμένεται να διπλασιαστούν μέχρι το 2030. (Obeso et al., 2017) (Poewe et al., 2017) (Beitz, 2014)

##### 3.1.1 Η ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Η νόσος του Πάρκινσον είναι μια νευροεκφυλιστική ασθένεια που χαρακτηρίζεται από την απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων (νευρώνων που παράγουν ντοπαμίνη) στη μέλαινα ουσία (*substantia nigra pars compacta*) του μεσεγκεφάλου και τη συσσωμάτωση πρωτεϊνών, όπως η α-συνουκλεΐνη, που οδηγεί στη δημιουργία σωμάτων Lewy. Αν και κανένα από αυτά τα χαρακτηριστικά δεν είναι ειδικό για τη νόσο, η συνδυαστική τους παρουσία οδηγεί στη διάγνωση της νόσου.

Η μέλαινα ουσία παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κίνησης λόγω της παραγωγής ντοπαμίνης. Η προοδευτική απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων στη μέλαινα ουσία οδηγεί σε μείωση της ντοπαμίνης στο ραβδωτό σώμα και βλάβη στο σύστημα ελέγχου της κίνησης, προκαλώντας κινητικά συμπτώματα. Καθώς η νόσος εξελίσσεται, όμως, η απώλεια αυτών των νευρώνων εξαπλώνεται και σε άλλες περιοχές του μεσεγκεφάλου. (A. H. V. Schapira et al., 2017) (Lotharius & Brundin, 2002) (Poewe et al., 2017) (Beitz, 2014) Η άλλη βασική πτυχή της παθοφυσιολογίας του Πάρκινσον είναι η ανώμαλη εναπόθεση της α-συνουκλεΐνης στον εγκέφαλο. Η α-συνουκλεΐνη



είναι μια προσυναπτική πρωτεΐνη 140 αμινοξέων που εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των νευρώνων και η λειτουργία της δεν έχει ακόμη κατανοηθεί πλήρως. Εντούτοις, φαίνεται ότι παίζει ρόλο στη δυναμική των συναπτικών κοκκίων, στη μιτοχονδριακή λειτουργία, στην ενδοκυτταρική διακίνηση και ενδεχομένως αποτελεί μοριακό συνοδό. Κατά τη διάρκεια παθολογικών διαδικασιών, η α-συνουκλεΐνη παρουσιάζει ανώμαλη αναδίπλωση και σχηματίζει συσσωματώσεις που ονομάζονται σωμάτια Lewy. Αυτές οι ενδοκυτταρικές συσσωματώσεις, που περιέχουν επίσης άλλα μόρια εκτός από την α-συνουκλεΐνη, εμφανίζονται σε πολλές περιοχές του εγκεφάλου. Η παθολογία Lewy εμφανίζεται αρχικά σε συγκεκριμένους νευρώνες και στη συνέχεια εξαπλώνεται σε άλλες περιοχές καθώς η νόσος εξελίσσεται. Αν και η ακριβής σημασία των σωμάτων Lewy για την πάθηση του Πάρκινσον παραμένει άγνωστη, υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορούν να μεταδοθούν μεταξύ νευρώνων, συμβάλλοντας έτσι στην εξάπλωση της νόσου. (Z. Chen et al., 2020) (Lotharius & Brundin, 2002) (Poewe et al., 2017) (Recasens et al., 2014)

Ο μηχανισμός της παθογένεσης του Πάρκινσον είναι περίπλοκος και φαίνεται να περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις μεταξύ βασικών μοριακών μονοπατιών, όπως η μιτοχονδριακή λειτουργία και το οξειδωτικό στρες, η νευροφλεγμονή, και η βλάβη στα συστήματα αποικοδόμησης πρωτεϊνών (Poewe et al., 2017)

#### *Δυσλειτουργία μιτοχονδρίων και οξειδωτικό στρες*

Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία αποτελεί βασικό στοιχείο στην παθογένεση της νόσου του Πάρκινσον. Μια θεωρία υποστηρίζει την ύπαρξη ενός φαύλου κύκλου ανάμεσα στη συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης και τη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, όπου η μία κατάσταση επηρεάζει αρνητικά την άλλη. Σε παθολογικές συνθήκες, η συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης μέσα στα μιτοχόνδρια οδηγεί σε βλάβες, ενώ σε φυσιολογικές συνθήκες υπάρχουν χαμηλά επίπεδα αυτής της ουσίας. Τα μιτοχόνδρια από τη μέλαινα ουσία των ασθενών με Πάρκινσον δείχνουν μείωση της δραστηριότητας του συμπλέγματος αναπνευστικής αλυσίδας I, μιας σημαντικής ένωσης για την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Καταλυτικές υπομονάδες αυτού του συμπλόκου έχουν αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον εγκέφαλο ατόμων με συμπτώματα Πάρκινσον, που συσχετίζονται με μειωμένους ρυθμούς μεταφοράς ηλεκτρονίων. Αυτό υποδηλώνει ότι η υπερβολική οξειδωτική βλάβη των υπομονάδων μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένη συναρμολόγηση και δυσλειτουργία

του συμπλόκου I. Επιπλέον, ο μειωμένος έλεγχος ποιότητας των μιτοχονδρίων αποτελεί έναν άλλο μηχανισμό που συμβάλλει στη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Τα μιτοχόνδρια είναι ένα δυναμικό δίκτυο οργανιδίων που υφίστανται συνεχείς κύκλους σύντηξης και σχάσης. Η μειωμένη λειτουργία αυτού του συστήματος έχει αναφερθεί στη νόσο του Πάρκινσον, οδηγώντας σε συσσώρευση κατεστραμμένων μιτοχονδρίων και διαταραχή της μιτοχονδριακής λειτουργίας. Η ανακάλυψη των γονιδίων PINK1 και Parkin αποκάλυψε τη σημασία τους στον έλεγχο αυτού του συστήματος. (Giannoccaro et al., 2017) (Büeler, 2009) (Poewe et al., 2017)

### *Νευροφλεγμονή*

Η νευροφλεγμονή θεωρείται βασικό χαρακτηριστικό της παθογένεσης της νόσου, συμβάλλοντας στον προοδευτικό εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Η συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης προκαλεί τόσο έμφυτη όσο και προσαρμοστική ανοσολογική απόκριση στη νόσο του Πάρκινσον και η νευροφλεγμονή μπορεί επίσης να προάγει τη λανθασμένη αναδίπλωση της α-συνουκλεΐνης, υποδηλώνοντας ότι οι δύο διεργασίες συμμετέχουν σε έναν αυτο-επιβαρυντικό κύκλο. Μία έμφυτη ανοσολογική απόκριση που πυροδοτείται είναι η ενεργοποίηση των μικρογλοίων του εγκεφάλου. (Poewe et al., 2017) (Obeso et al., 2017) Σε ενεργοποιημένη κατάσταση, τα μικρογλοία μπορούν να παράγουν νευροτοξίνες, προκαλώντας οξειδωτικό στρες και νευροτοξικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της επίθεσης στα ντοπαμινεργικά κύτταρα. Η μικρογλοιακή ενεργοποίηση οδηγεί στην ενεργοποίηση της προσαρμοστικής ανοσίας συμπεριλαμβανομένης της διήθησης T-λεμφοκυττάρων, της παραγωγής ανοσοσφαιρινών, κυτοκινών και ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων. Οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), η ιντερλευκίνη-1 (IL-1) και η IL-6, ενισχύουν και συντηρούν τη φλεγμονή και τις ανοσολογικές αποκρίσεις. Εντοπίζονται αυξημένα επίπεδα φλεγμονωδών κυτοκινών σε ασθενείς με Πάρκινσον. (Obeso et al., 2017) (Pajares et al., 2020) Επιπλέον, η απορρύθμιση του άξονα εντέρου-εγκεφάλου συμβάλλει στη νευροφλεγμονή. Οι αλλαγές στη μικροχλωρίδα του εντέρου προκαλούν δυσβίωση, ενεργοποιώντας το ανοσοποιητικό σύστημα και επηρεάζοντας την αλληλεπίδραση του άξονα εγκεφάλου-εντέρου. (Mulak & Bonaz, 2015) Μάλιστα, σύμφωνα με τη θεωρία “dual hit” του Braak (Hawkes et al., 2007) προτείνεται ότι ένα ιογενές παθογόνο εισέρχεται στον εγκέφαλο μέσω της οσφρητικής οδού, ή της κατάποση ρινικών εκκρίσεων εισάγεται στο έντερο και στη συνέχεια εισέρχεται στο

πνευμονογαστρικό νεύρο και στο ΚΝΣ. Η παθολογική υποστήριξη αυτής της υπόθεσης προέρχεται από την αναγνώριση των σωματίων Lewy στις εντερικές δομές, στο πνευμονογαστρικό νεύρο και τις δομές του εγκεφάλου των ασθενών της νόσου. (Hawkes et al., 2007) (Z. Chen et al., 2020) (Beitz, 2014)

#### *Αποικοδόμηση της α-συνουκλεΐνης*

Η ενδοκυτταρική ομοιόσταση της α-συνουκλεΐνης διατηρείται από τις δράσεις των συστημάτων της ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος (*ubiquitin– proteasome system- UPS*) και της λυσοσωμικής αυτοφαγίας (*lysosomal autophagy system- LAS*). Από τα δύο συστήματα μεγαλύτερη σημασία φαίνεται να έχει το LAS στην αποικοδόμηση της α-συνουκλεΐνης. Όσον αφορά το LAS, τόσο η προκαλούμενη από μοριακό συνοδό αυτοφαγία (CMA), όσο και η μακροαυτοφαγία προτείνονται να μεσολαβούν στην αποικοδόμηση της α-συνουκλεΐνης. Η αυτοφαγία με τη μεσολάβηση μοριακού συνοδού περιλαμβάνει συγκεκριμένους συνοδούς που στοχεύουν ορισμένες πρωτεΐνες στα λυσοσώματα, ενώ η μακροαυτοφαγία συνεπάγεται το σχηματισμό αυτοφαγοσωμάτων που κατευθύνονται σε περιπυρηνικά λυσοσώματα. Η αναστολή οποιουδήποτε από αυτά συστήματος οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα α-συνουκλεΐνης και υπάρχουν ενδείξεις για αντισταθμιστική αλληλεπίδραση μεταξύ των συστημάτων. Η βλάβη σε αυτά τα συστήματα μπορεί να οφείλεται σε παράγοντες όπως η ηλικία και οι γονιδιακές μεταλλάξεις. (Poewe et al., 2017)

### **3.1.2 ΤΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ**

Η ασθένεια παρουσιάζει τόσο κινητικά συμπτώματα όσο και μη κινητικά συμπτώματα τα οποία και φαίνεται να προηγούνται των πρώτων. Τα κύρια κινητικά συμπτώματα περιλαμβάνουν τρέμουλο των άκρων σε ηρεμία, δυσκαμψία, αύξηση του μυϊκού τόνου, βραδυκινησία και προβλήματα στη στάση του σώματος. Αυτά οφείλονται στην απώλεια νευρώνων που παράγουν ντοπαμίνη στον εγκέφαλο. Πέραν των κινητικών συμπτωμάτων, η νόσος μπορεί να προκαλέσει μη κινητικά συμπτώματα όπως υποσμία, διπλωπία, γνωστική εξασθένηση, κατάθλιψη, διαταραχές ύπνου και δυσλειτουργίες του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Τα μη κινητικά συμπτώματα επηρεάζουν σημαντικά την ποιότητα ζωής των ασθενών. Η νόσος εξελίσσεται μέσα από ποικίλα στάδια, περιλαμβάνοντας πρόδρομο, πρώιμο κινητικό, πρώιμο-μέσο και τελικό στάδιο. Η διαχείριση της νόσου αποτελεί πρόκληση λόγω της αντίστασης των μη κινητικών συμπτωμάτων στη θεραπεία με ντοπαμίνη. Συνεπώς, είναι σημαντικό να

αντιμετωπίζονται αυτά τα συμπτώματα για τη βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών. (Z. Chen et al., 2020) (A. H. V. Schapira et al., 2017) (Beitz, 2014)

### 3.1.3 ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΚΑΙ ΜΗ ΑΙΤΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ- ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Η αιτιολογία της νόσου περιλαμβάνει μια σειρά από παράγοντες όπως γενετικά αίτια, περιβαλλοντικά αίτια, τον τρόπο ζωής καθώς και την ηλικία. Τα γενετικά αίτια της ασθένειας μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με την ηλικία εμφάνισης της νόσου, με μεταίχμιο τα 50 έτη, σε πρώιμης και όψιμης εμφάνισης. Επίσης, η νόσος μπορεί να διαχωριστεί σε οικογενής ή σποραδική. Τέλος, μπορεί να είναι μονογονιδιακή, δηλαδή να προέρχεται από ένα μόνο γονίδιο ή να είναι ιδιοπαθής. (Day & Mullin, 2021)

#### *Γενικά αίτια*

##### A. Γονίδια σχετιζόμενα με την α- συνουκλεΐνης

Το γονίδιο PARK- SNCA (PARK1) είναι το πρώτο μονογονικό αίτιο, που σχετίστηκε με τη νόσο, εντοπίζεται στη χρωμόσωμα 4, έχει υψηλή διεισδυτικότητα και κληρονομείται με μεντελικό, αυτοσωμικό κυρίαρχο τρόπο. Κωδικοποιεί την πρωτεΐνη α- συνουκλεΐνη. Η πρωτεΐνη αυτή όπως έχει αναφερθεί είναι βασικό συστατικό των σωματίων Lewy, τα οποία αποτελούν χαρακτηριστικό γνώρισμα της νόσου του Πάρκινσον. Οι μεταλλάξεις και η υπερέκφραση του γονιδίου SNCA έχουν συσχετιστεί με τη νόσο του Πάρκινσον, ιδιαίτερα σε οικογενείς περιπτώσεις με πρώιμη εμφάνιση της νόσου, κατά μέσο όρο 46 έτη. Η πρώτη παθολογική μετάλλαξη που εντοπίστηκε είναι η A53T και προκαλεί μια αντικατάσταση ενός αμινοξέος. Αυτή η μετάλλαξη, όπως και άλλες παθολογικές μεταλλάξεις, προσδίδει στην α- συνουκλεΐνη μεγαλύτερη τάση λανθασμένης αναδίπλωσης και συσσωμάτωσης σε σχέση με τη φυσιολογική πρωτεΐνη. Άλλες παθολογικές μεταλλάξεις του SNCA επηρεάζουν την ποσότητα της α- συνουκλεΐνης, μέσω διπλασιασμών ή τριπλασιασμών, προκαλώντας μεγαλύτερη έκφραση της πρωτεΐνης οδηγώντας έτσι σε πιο σοβαρά κλινικά χαρακτηριστικά. Η ποσότητα της α- συνουκλεΐνης επηρεάζεται επίσης μέσω αλλοιώσεων στην έκφρασή της είτε στην εκκαθάρισή της και μεταβάλλοντας τις μετα-μεταγραφικές της τροποποιήσεις ή και την αλληλεπίδρασή της με άλλους κυτταρικούς οργανισμούς και συστήματα μεταφοράς. Ο συσχετισμός του συγκεκριμένου γονιδίου έχει γίνει και με ιδιοπαθείς μορφές της νόσου λόγω της παρουσίας των σωματίων Lewy σε αυτές, αλλά

και άλλων χαρακτηριστικών της παθογένεσης της νόσου. Τέλος, να σημειωθεί ότι οι παθολογικές αυτές παραλλαγές του γονιδίου SNCA εμφανίζονται σπάνια. (Balestrino & Schapira, 2020) (Day & Mullin, 2021)

Όπως έχει ήδη συζητηθεί υπάρχουν πολλά στοιχεία που συνδέουν τη νόσο με τη δυσλειτουργία στις οδούς κυτταρικής εκκαθάρισης και την αυτοφαγία. Ένα από τα γονίδια που εμπλέκεται σε αυτές τις διαδικασίες είναι τα LRRK2. (Balestrino & Schapira, 2020)

Το γονίδιο PARK- **LRRK2** (PARK8) είναι το πιο κοινό αυτοσωμικό κυρίαρχο γονίδιο που σχετίζεται με τη νόσο, ενώ η κοινή μετάλλαξη του παγκοσμίως – η G2019S, έχει εντοπιστεί τόσο στην οικογενή όσο και στη σποραδική μορφή του Πάρκινσον με διεισδυτικότητα εξαρτώμενη από την ηλικία. (Jankovic & Tan, 2020) Οι μεταλλάξεις του LRRK2 αντιπροσωπεύουν το 3-41% των περιπτώσεων οικογενούς νόσου του Πάρκινσον, αλλά παρατηρούνται σε χαμηλότερο ποσοστό σε φαινομενικά σποραδικές περιπτώσεις. Ο φαινότυπος των μεταλλάξεων LRRK2 Gly2019Ser δεν διακρίνεται από τη σποραδική νόσο του Πάρκινσον. (Bloem et al., 2021) Το μεταλλαγμένο LRRK2 παρεμβαίνει στην αυτοφαγία και έχει αναφερθεί ότι επιβραδύνει την αποικοδόμηση της α-συνουκλεΐνης, συμβάλλοντας στη συσσώρευσή της. (Balestrino & Schapira, 2020)

Το LRRK2 κωδικοποιεί τη μεγάλη (2527 αμινοξέα), πλούσια σε λευκίνη πρωτεΐνη επαναλαμβανόμενης κινάσης 2. Η πρωτεΐνη αυτή, που αναφέρεται επίσης ως «dardarin» (που σημαίνει τρέμουλο) διαθέτει τόσο περιοχές κινάσης όσο και GTPάσης. Ο φυσιολογικός της ρόλος πιστεύεται ότι περιλαμβάνει την αυτοφαγία, τη μιτοχονδριακή λειτουργία και τη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων, ενώ μπορεί επίσης να εμπλέκεται στο ανοσοποιητικό σύστημα. Το LRRK2 εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στους μεσαίου μεγέθους ακανθώδεις νευρώνες του ραβδωτού σώματος, όπως και σε μακροφάγα και στη μικρογλοία υποδηλώνοντας την εμπλοκή του σε φλεγμονώδεις οδούς. Οι παθογόνες παραλλαγές οδηγούν σε απορρύθμιση των δραστηριοτήτων κινάσης και GTPάσης, προκαλώντας τοξικότητα. (Jankovic & Tan, 2020) (Day & Mullin, 2021)

Το γονίδιο GBA (Glucocerebrosidase), βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1q21 και κωδικοποιεί το λυσοσωμικό ένζυμο γλυκοσερεβροσιδάση που αποσυνθέτει τη γλυκοσερεβροσιδή σε γλυκόζη και κεραμίδιο, παίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση των σφιγγολιπιδίων. (Jankovic & Tan, 2020) Οι κοινές παθογόνες

παραλλαγές περιλαμβάνουν τις N370S, E326K και T369 M. Παραλλαγές στο GBA μπορούν να προκαλέσουν τη νόσο Gaucher, την πιο διαδεδομένη διαταραχή λυσοσωμικής αποθήκευσης και έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για τη νόσο του Πάρκινσον. Μάλιστα οι ετερόζυγες παραλλαγές GBA έχουν βρεθεί ότι προκαλούν ανεξάρτητα από άλλους παράγοντες Πάρκινσον, αντιπροσωπεύοντας τον έναν και σημαντικότερο γενετικό παράγοντα κινδύνου της νόσου στο γενικό πληθυσμό, προσδίδοντας περισσότερο από πέντε φορές αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης Πάρκινσον. Το Πάρκινσον που προκαλείται λόγω του GBA έχει παρόμοιο κλινικό φαινότυπο με την ιδιοπαθή μορφή της νόσου, αλλά οι παραλλαγές του GBA σχετίζονται με πρώιμη έναρξη, υψηλότερα ποσοστά άνοιας και ταχύτερη εξέλιξη των κινητικών συμπτωμάτων. Μεταλλάξεις GBA ανευρίσκονται στο 10% της σποραδικής PD και σε πάνω από το 40% της οικογενούς σε Ασθενάζι Εβραίους ασθενείς. Το μεταλλαγμένο γονίδιο εμπλέκεται στην παθογένεση της νόσου μέσω αλληλεπιδράσεων με διαφορετικά μονοπάτια όπως η συσσώρευση α-συνουκλεΐνης, το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου και η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. (Day & Mullin, 2021) (Balestrino & Schapira, 2020) (Jankovic & Tan, 2020)

#### Β. Γονίδια Parkin σχετιζόμενα με μιτοχονδριακή δυσλειτουργία

Τα γονίδια PARK- PRKN (PARK2)-, PINK1 (PARK2) και DJ1- PARK7, σχετίζονται με τη νόσο μέσω μηχανισμών βλάβης της μιτοχονδριακής λειτουργίας. Το PINK1 και το PRKN αλληλεπιδρούν στην οδό ποιοτικού ελέγχου των μιτοχονδρίων. Το γονίδιο PINK1 κωδικοποιεί την επαγόμενη από το PTEN κινάση 1, μια μιτοχονδριακά συνδεδεμένη κινάση σερίνης/θρεονίνης, η οποία επισημαίνει τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια και ενεργοποιεί το μονοπάτι της μιτοφαγίας μέσω της πρόσληψης του Parkin, μιας λιγάσης ουβικιτίνης E3. Επίσης, μπορεί να έχει αντιφλεγμονώδη ρόλο όπως φαίνεται από ζωικά μοντέλα. (Balestrino & Schapira, 2020) (Day & Mullin, 2021) Το PRKN κωδικοποιεί την Parkin, η οποία είναι μια λιγάση ουβικιτίνης που εμπλέκεται στο σύστημα αποικοδόμησης του πρωτεασώματος και επίσης παίζει ρόλο στη διατήρηση της μιτοχονδριακής δομής και της ακεραιότητας του DNA. Οι συχνές μεταλλάξεις PRKN αντιπροσωπεύουν έως και το 77% των περιπτώσεων νεανικής νόσου Parkinson (η ηλικία έναρξης είναι μικρότερη των 20 ετών) και 10-20 % της νόσου του Πάρκινσον σε νεαρή ηλικία. Το **DJ-1** παίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της ροής ασβεστίου στο μιτοχόνδριο, προστατεύοντας το κύτταρο από το οξειδωτικό στρες



που παράγεται από τη δραστηριότητα των ντοπαμινεργικών νευρώνων και της τοξικότητας της ντοπαμίνης. Ακόμη, έχει αποδειχθεί ότι αλληλεπιδρά με έναν αριθμό πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των tau, Parkin και PINK1. (Day & Mullin, 2021) (Balestrino & Schapira, 2020) (Bloem et al., 2021)

Συνδυαστικά, αυτά τα τρία γονίδια το PRKN, το DJ-1 και το PINK1 σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα λιγάσης ουβικιτίνης του οποίου η λειτουργία επηρεάζεται από παθογόνες παραλλαγές. Συνολικά, φαίνεται πως αλληλεπιδρούν μέσα στο σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και διαδραματίζουν ρόλο στη διατήρηση της μιτοχονδριακής δομής. Οι παραλλαγές αυτών των τριών γονιδίων προκαλούν οικογενείς αυτοσωμικές υπολειπόμενες μορφές Πάρκινσον, με πρόιμη έναρξη της νόσου. (Bloem et al., 2021) (Day & Mullin, 2021)

Γ. Άλλα γονίδια που σχετίζονται με τη νόσο του Πάρκινσον

Το γονίδιο **ATP13A2** (PARK9) εμπλέκεται στην εμφάνιση μιας αυτοσωματικής υπολειπόμενης μορφής παρκινσονισμού πρόιμης έναρξης (στην εφηβική ηλικία), που ονομάζεται σύνδρομο Kufor-Rakeb (KRS) και περιλαμβάνει πυραμιδική εκφύλιση και άνοια. Το γονίδιο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1p36 και κωδικοποιεί φυσιολογικά μια διαμεμβρανική λυσοσωμική ATPάση τύπου P5 (ATP13A2). Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό προκαλούν απώλεια της λειτουργίας της ATP13A2 και οδηγούν σε λυσοσωμική δυσλειτουργία, συσσώρευση συνουκλεΐνης και κατ' επέκταση νευροτοξικότητα. (Usenovic et al., 2012) (Dehay et al., 2012) (Day & Mullin, 2021)

Το γονίδιο **VPS35** (χρωμόσωμα 16q11) κωδικοποιεί ένα συστατικό του πολυμερούς συμπλόκου ρετρομερούς που μεσολαβεί στην διακίνηση των ενδοσωμάτων, την πρωτεΐνη που σχετίζεται με τη διαλογή πρωτεΐνης κενοτοπίων 35 (vacuolar protein sorting-associated protein 35-VPS35). Αυτή η πρωτεΐνη φαίνεται να είναι σημαντική στη νευρωνική μεταφορά στους δένδριτες. Μεταλλάξεις στο γονίδιο VPS35- όπως η παραλλαγή p.D620N με λάθος νόημα, έχουν συνδεθεί με την όψιμη έναρξη της νόσου του Πάρκινσον, τόσο σε οικογενείς περιπτώσεις (με αυτοσωμικό κυρίαρχο τρόπο) όσο και σε σποραδικές. Μελέτες έδειξαν ότι τα νευρωνικά κύτταρα ανθρώπων με αυτήν την παραλλαγή παρουσιάζουν διαταραγμένη ενδοσωματική μεταφορά και ανώμαλη συσσώρευση α-συνουκλεΐνης και δραστικών μορφών οξυγόνου. (Balestrino & Schapira, 2020) (Day & Mullin, 2021)

Το γονίδιο **NR4A2**, γνωστό και ως πυρηνικός υποδοχέας υποοικογένεια 4, ομάδα A 2,



βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2q22-23 και είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που παίζει κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη, την επιβίωση και τον φαινότυπο των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Το NR4A2 εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες του μεσεγκεφάλου καθώς και στα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος. Μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο που εντοπίζονται κυρίως στο εξώνιο 1 και 3, έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της οικογενής μορφής της νόσου. Ενώ, επιπλέον πολυμορφισμοί που έχουν βρεθεί από μελέτες-συγκεκριμένα, ο πολυμορφισμός rs35479735 (εισαγωγή/διαγραφή ενός G) σχετίζονται τόσο με οικογενή όσο και με σποραδική εμφάνιση της νόσου. Αυτές οι μεταλλάξεις συνδέονται με σημαντικά μειωμένη έκφραση του γονιδίου NR4A2 σε ασθενείς με Πάρκινσον, γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει ότι η αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης του NR4A2 mRNA στα μονοπύρνα κύτταρα περιφερικού αίματος σχετίζεται με ευαισθησία για τη νόσο. Ακόμη, υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι οι μεταλλάξεις στο NR4A2 επηρεάζουν τη μεταγραφή του γονιδίου που κωδικοποιεί την υδροξυλάση της τυροσίνης. Συνολικά, αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι οι μεταλλάξεις στο NR4A2 μπορεί να προκαλέσουν ντοπαμινεργική δυσλειτουργία, που σχετίζεται με τη νόσο του Πάρκινσον. (Ruiz-Sánchez et al., 2017) (Le et al., 2003)

Το γονίδιο **UCH-L1**, που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 4p14, κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ουβικουτίνη καρβοξυ-τερματική υδρολάση L1 (UCH-L1), η οποία ανήκει στην οικογένεια των ενζύμων από- ουβικουτινοποίησης. Η UCH-L1 είναι μια από τις πιο άφθονες πρωτεΐνες, που εκφράζεται ειδικά και σε μεγάλο βαθμό στους εγκεφαλικούς νευρώνες, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 2% της συνολικής περιεκτικότητας σε διαλυτές πρωτεΐνες. Η φυσιολογική της λειτουργία θεωρείται ότι είναι η ανακύκλωση της ουβικουτίνης υδrolύοντας τα ουβικουτινωμένα πεπτίδια. Αυτό το ένζυμο παίζει ρόλο στην τροποποίηση των κατεστραμμένων πρωτεϊνών που διαφορετικά θα μπορούσαν να συσσωρευτούν σε τοξικά επίπεδα στον νευρώνα. Έχει προταθεί ως παράγοντας κινδύνου για το Πάρκινσον και πράγματι, έχει αναφερθεί ένας αριθμός οικογενών μεταλλάξεων, όπως π.χ. η p.I93M που συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. (Day & Mullin, 2021) (Lee & Hsu, 2016)

#### *Περιβαλλοντικοί παράγοντες και τρόπος ζωής*

Η νόσος σπάνια προκαλείται από έναν μόνο γενετικό παράγοντα. Οι περισσότερες περιπτώσεις είναι πολυπαραγοντικής αιτιολογίας συμπεριλαμβανομένων γενετικών,

περιβαλλοντικών και σχετιζόμενων με τον τρόπο ζωής αιτίων. Έρευνες έχουν δείξει ότι το MPTP, ένας νευροτοξικός παράγοντας, μπορεί να προκαλέσει βλάβη σε νευρώνες του εγκεφάλου παρόμοια με αυτή της νόσου Πάρκινσον. Επιπλέον, έχει υποδειχθεί ότι ορισμένα φυτοφάρμακα και ορισμένες ουσίες όπως η αννονασίνη μπορεί να συσχετιστούν με την ανάπτυξη της νόσου. Άλλοι παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνουν την έκθεση σε βαρέα μέταλλα, τραυματισμό στο κεφάλι, ιστορικό μελανώματος και σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Ωστόσο, οι επιδημιολογικές μελέτες έχουν περιορισμούς και συχνά δίνουν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Πρόσφατα, έχει δημιουργηθεί μια αυξανόμενη ανησυχία για τη δυνητική σύνδεση μεταξύ του ιού του Covid-19 και της νόσου Πάρκινσον, καθώς υπάρχουν σκέψεις ότι διαμέσου της ρινικής οδού θα μπορούσε να προκληθεί ένας καταρράκτης νευροεκφυλισμού στον εγκεφαλο. Αναγκαίες είναι περαιτέρω έρευνες για να επιβεβαιωθεί αυτή η σχέση. Ωστόσο, υπάρχουν αποδείξεις ότι το κάπνισμα και η κατανάλωση καφεΐνης μπορεί να μειώσουν τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου, ενώ άλλοι παράγοντες όπως η άσκηση και οι φαρμακευτικές αγωγές παραμένουν αβέβαιοι. (A. H. Schapira & Jenner, 2011) (Jankovic & Tan, 2020) (Obeso et al., 2017)

### **3.1.4 ΠΩΣ ΓΙΝΕΤΑΙ Η ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ**

Η διάγνωση της νόσου του Πάρκινσον είναι δύσκολη και απαιτεί πολλές και διαφορετικές μεθόδους. Οι μεταθανάτιες εξετάσεις του εγκεφάλου παραμένουν η κύρια μέθοδος επιβεβαίωσης της διάγνωσης, καθώς μπορούν να εντοπίσουν τη μη φυσιολογική εναπόθεση αναδιπλωμένης α-συνουκλεΐνης. Η κλινική αξιολόγηση βασίζεται στα κλασσικά συμπτώματα της νόσου, στη λήψη ιστορικού και στη νευρολογική εξέταση. Η ακρίβεια της κλινικής διάγνωσης μπορεί να βελτιωθεί με αυστηρή χρήση τυπικών κλινικών κριτηρίων, όπως τα κριτήρια της Τράπεζας Εγκεφάλου της Εταιρείας Νόσων Πάρκινσον του Ηνωμένου Βασιλείου (Parkinson's Disease Society Brain Bank). Οι τεχνικές απεικόνισης όπως PET, MRI και SPECT βοηθούν στη διάγνωση, ενώ η γενετική ανάλυση είναι χρήσιμη σε περιπτώσεις μονογονιδιακών οικογενών μορφών της νόσου. Παρόλα αυτά, η ακρίβεια των μεθόδων διάγνωσης είναι περιορισμένη, ειδικά στα πρώιμα στάδια της νόσου. Η ανάπτυξη ευαίσθητων και με ακρίβεια βιοδεικτών αποτελεί προτεραιότητα για την έρευνα και την κλινική πρακτική της νόσου του. Ενώ έχουν προταθεί πολλοί βιοδείκτες, δεν υπάρχει ακόμα διαθέσιμη διαγνωστική εξέταση που να τους χρησιμοποιεί

αποτελεσματικά για τη διάγνωση. (Poewe et al., 2017) (Bloem et al., 2021)

### 3.1.5 Η ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Η νόσος του Πάρκινσον είναι μια σύνθετη νευροεκφυλιστική διαταραχή με ένα ευρύ φάσμα κινητικών και μη κινητικών συμπτωμάτων. Η θεραπεία στοχεύει στην ανακούφιση των συμπτωμάτων και τη βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών. Η πιο κοινή και αποτελεσματική θεραπεία για τα κινητικά συμπτώματα είναι η χρήση της ουσίας λεβοντόπα (L-Dopa), η οποία μετατρέπεται σε ντοπαμίνη στον εγκέφαλο. Ωστόσο, η χρήση της L-Dopa μπορεί να προκαλέσει παρενέργειες και αποτυχία της δράσης του φαρμάκου με την πάροδο του χρόνου. Άλλες θεραπευτικές επιλογές περιλαμβάνουν αντιχολινεργικά φάρμακα, αντιγλουταμινεργικά φάρμακα, αγωνιστές ντοπαμίνης και βαθιά εγκεφαλική διέγερση (DBS). Επίσης, έρευνες γίνονται για την ανάπτυξη θεραπειών που στοχεύουν στην τροποποίηση της νόσου. Παράλληλα, οι μη φαρμακολογικές θεραπείες όπως η άσκηση, η φυσικοθεραπεία και η λογοθεραπεία έχουν επίσης σημαντικό ρόλο στη διαχείριση της νόσου. (Reich & Savitt, 2019) (Jankovic & Tan, 2020) (Balestrino & Schapira, 2020) (Beitz, 2014) (96, 111, 112, 120)

## 3.2 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ PARKINSON

### 3.2.1 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Ο γενετικός έλεγχος για τις Μεντελικές μορφές της νόσου του Πάρκινσον γίνεται όλο και περισσότερο στην κλινική πράξη και θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη σε ασθενείς με πρόωμη έναρξη της νόσου (που ορίζεται ως έναρξη πριν από την ηλικία των 40 ετών), ασθενείς με οικογενειακό ιστορικό και άτομα από πληθυσμούς υψηλού κινδύνου, με υψηλός επιπολασμός συγκεκριμένων μονογονιδιακών μορφών ασθένειας (π.χ. Εβραίοι Ασκενάζι, Βέρβεροι Άραβες της Βόρειας Αφρικής). Αν και οι περιπτώσεις μονογονιδιακής νόσου Πάρκινσον ορίζονται όλο και περισσότερο σε μοριακή βάση (π.χ. PARK-LRRK2, PARK-SNCA), μόνο το γονίδιο PARK-LRRK2 και το PARK-Parkin είναι σχετικά συχνό στην κλινική πράξη, γιατί ας μην ξεχνάμε ότι αυτές οι περιπτώσεις σχετίζονται μόνο με το 5-40% των περιπτώσεων της νόσου (ανάλογα με το εθνικό υπόβαθρο), καθώς το Πάρκινσον τελικά σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με παραλλαγές υψηλού κινδύνου στο γονίδιο GBA. (Tolosa et al., 2021)

Για τις μονογονιδιακές μορφές, υπάρχουν τα καλά εδραιωμένα γονίδια, με αυτοσωμικό κυρίαρχο τρόπους κληρονομικότητας: SNCA, LRRK2, VPS35 και αυτά με αυτοσωματικό υπολειπόμενο τρόπο: PRKN, PINK1, DJ1. Υπάρχει μια ποικιλία γενετικών δοκιμών που διατίθενται τόσο κλινικά όσο και ερευνητικά. Οι δοκιμές αυτές κυμαίνονται από στοχευμένες δοκιμές ενός μεμονωμένου γονιδίου ή παραλλαγής, έως δοκιμές μεγαλύτερης κλίμακας, όπως πάνελ παραλλαγών ή γονιδίων καθώς και αλληλούχιση εξονίων ή ολόκληρου γονιδιώματος. Τα τελευταία χρόνια, η παραδοσιακή προσέγγιση της δοκιμής ενός γονιδίου τη φορά έχει αντικατασταθεί σε μεγάλο βαθμό από ευρύτερες δοκιμές λόγω της αυξανόμενης διαθεσιμότητας και του μειωμένου κόστους των δοκιμών που βασίζονται στην αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS), εκτός φυσικά από περιπτώσεις όπου μια γνωστή γενετική αιτία έχει βρεθεί στην οικογένεια του ασθενούς ή σε σπάνιες περιπτώσεις όπου υπάρχει μεγάλη υποψία για ένα συγκεκριμένο γονίδιο. Μελέτες που έγιναν όσο αφορά την επιλογή γονιδίων για έλεγχο σε γονιδιακό πάνελ, έδειξαν ότι τα γονίδια που συμπεριελήφθησαν ήταν από 5 έως 62, με πέντε γονίδια να συμπεριλαμβάνονται σταθερά (SNCA, PRKN, PINK1, PARK7 (DJ1) και LRRK2) και άλλα ποικίλα (όπως VPS35 και GBA). Οι διαφορές που εμφανίστηκαν στα πάνελ οφείλονταν κυρίως στη συμπερίληψη γονιδίων που σχετίζονται με άτυπες διαταραχές παρκινσονισμού και δυστονίας ή γονιδίων με αβέβαιη συσχέτιση με τη νόσο. Σε περιπτώσεις όπου ο ασθενής παρουσιάζει συνδυασμένο ή άτυπο φαινότυπο, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη μια πιο ολοκληρωμένη προσέγγιση, είτε με χρήση ευρύτερου γονιδιακού πάνελ είτε γονιδιωματικής ανάλυσης με αλληλούχιση εξονίων ή γονιδιώματος. Τέλος να σημειωθεί ότι, οι παραλλαγές στο γονίδιο GBA μπορεί να περιπλέξουν την ανάλυση γονιδίων επειδή το γονίδιο GBA έχει ένα σχετικό ψευδογονίδιο που μοιάζει πολύ με το γονίδιο GBA. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε σφάλματα στον εντοπισμό παθογόνων παραλλαγών. Μια πιθανή λύση αναφέρθηκε σε σχετική έρευνα όπου χρησιμοποιήθηκε long-read sequencing με πλατφόρμα GridION nanopore sequencing. (Jia et al., 2022)

Επιπλέον, όπως έχει αναφερθεί και στη νόσο Αλτσχάιμερ- υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον και πολλές ενδείξεις ότι τα miRNAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες της νόσου. Μια μελέτη που χρησιμοποιεί qRT-PCR πρότεινε ότι στο περιφερικό αίμα τα επίπεδα έκφρασης των miR-1, miR-22-5p και miR-29 επιτρέπουν τη διάκριση των ασθενών με Πάρκινσον από υγιή άτομα, καθώς και των miR-16- 2-

3p, miR- 26a-2-3p, και miR30a ότι διαφοροποιούν μεταξύ των ασθενών που λαμβάνουν θεραπεία και των ασθενών που δεν λαμβάνουν θεραπεία. Σε μια πρόσφατη μελέτη που χρησιμοποιεί αλληλουχία επόμενης γενιάς (NGS) για ολικά λευκοκύτταρα αίματος, βρέθηκε ότι 16 miRNAs συμπεριλαμβανομένων των miR-16, miE-20a και miR-320 άλλαξαν σημαντικά σε ασθενείς με τη νόσο σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες. (Agrawal & Biswas, 2015)

### 3.2.2 ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Οι βιοχημικοί βιοδείκτες για τη νόσο του Πάρκινσον μπορούν να διερευνηθούν είτε στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (CSF) είτε στο αίμα. Το CSF είναι μια προσβάσιμη πηγή πρωτεϊνών που προέρχονται από τον εγκέφαλο και μπορεί να διερευνηθεί για πιθανούς βιοδείκτες λόγω διαταραχών που συμβαίνουν στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (BBB) κατά τη νόσο. Οι πρωτεΐνες του CSF μπορεί να αντανακλούν δραστηριότητες και τροποποιήσεις που προέρχονται από τον εγκέφαλο, αν και πολλές προέρχονται από το αίμα. (Lotankar et al., 2017)

#### *Α-συνουκλεΐνη*

Ο σημαντικότερος βιοδείκτης της νόσου είναι η α-συνουκλεΐνη. Μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί στο CSF, τόσο για την ολική α-συνουκλεΐνη όσο και για τα διάφορα είδη της που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της νόσου όπως η ολιγομερής, η φωσφορυλιωμένη, καθώς και τα συσσωματώματα α-συνουκλεΐνης. Οι μελέτες σχετικά με την ολική α-συνουκλεΐνη κατέληξαν στο ότι οι συγκεντρώσεις της εμφανίζονται μειωμένες σε ασθενείς με τη νόσο σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες ή με άλλους νευρολογικούς μάρτυρες. Παρ' όλα αυτά υπάρχουν περιορισμοί όπως η ανομοιογένεια του πληθυσμού που μελετάται (ηλικία, στάδιο της νόσου, φαρμακευτική αγωγή) που εμποδίζουν την κλινική χρήση της ως διαγνωστικού βιοδείκτη για τη νόσο. Επιπλέον, άλλες νευροεκφυλιστικές ασθένειες εμφανίζουν τιμές ολικής α-συνουκλεΐνης του CSF που επικαλύπτονται σε μεγάλο βαθμό με αυτές από ασθενείς με Πάρκινσον. Επομένως, η ολική α-συνουκλεΐνη του CSF από μόνη της δεν φαίνεται να είναι αξιόπιστος διαγνωστικός δείκτης για τη νόσο, όμως θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως δείκτης συνουκλεϊνοπάθειας όταν μειώνονται οι συγκεντρώσεις της, καθώς και ως μη ειδικός δείκτης συναπτικής βλάβης όταν αυξάνονται οι συγκεντρώσεις της στο CSF. Τέλος, ο συνδυασμός της με άλλους βιοδείκτες του CSF θα μπορούσε παρέχει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα. Ανοσοδοκιμασίες όπως ELISA , η φασματοσκοπία μάζας,

ηλεκτροχημιοφωταύγεια και τεχνολογία xMAP έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της ολικής α-συνουκλεΐνης του CSF. (Atik et al., 2016) (Parnetti et al., 2019)

Ο ολιγομερισμός της α-συνουκλεΐνης είναι μια διαδικασία που προηγείται της συσσώρευσής της σε ώριμα ινίδια αμυλοειδούς στα σωματίδια Lewy, ενώ η φωσφορυλιωμένη α-συνουκλεΐνη σχετίζεται άμεσα με τη νόσο αφού αποτελεί την τροποποίηση που αντιπροσωπεύει περισσότερο από το 90% της α-συνουκλεΐνης που βρίσκεται στα σωματίδια Lewy. Και οι δύο αυτές μορφές της α-συνουκλεΐνης έχουν βρεθεί αυξημένες σε ασθενείς με νόσο του Πάρκινσον, αλλά η διαγνωστική τους ακρίβεια είναι περιορισμένη. Απ' την άλλη, η μέτρηση των συσσωματωμάτων α-συνουκλεΐνης στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, μέσω τεχνικών Seeding aggregation assays όπως Cyclic Amplification (PMCA) and Real-Time Quaking- Induced Conversion (RT-QuIC), που βασίζονται στην ανίχνευση λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών που είναι επιρρεπείς σε συσσωμάτωση, είναι πολλά υποσχόμενες. Η εφαρμογή του RT-QuIC έδειξε αξιοσημείωτη διαγνωστική ακρίβεια, με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα στη διαφοροποίηση της νόσου του Πάρκινσον (ευαισθησία 95%) από άλλες νευρολογικές διαταραχές, όπως η άνοια με σωματίδια Lewy (ευαισθησία 92%), αλλά και σε σχέση με υγιείς μάρτυρες. Μελέτες έχουν δείξει μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ του ρυθμού συσσωμάτωσης της α-συνουκλεΐνης και του σύστηματος Hoehn and Yahr (H&Y), το οποίο χρησιμοποιείται συνήθως για να χαρακτηρίσει τα στάδια και την εξέλιξη της νόσου του Πάρκινσον. Η μελέτη διαπίστωσε ότι καθώς αυξανόταν το στάδιο H&Y- δηλαδή τα συμπτώματα της νόσου γίνονταν πιο σοβαρά, ο ρυθμός συσσωμάτωσης α-συνουκλεΐνης μειωνόταν. Το γεγονός αυτό, υποδηλώνει την καταλληλότητα του βιοδείκτη για την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου του Πάρκινσον. Τέλος, η χρησιμότητα αυτού του βιοδείκτη είναι μεγάλη αν αναλογιστεί κανείς ότι η συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης είναι ένα πρώιμο φαινόμενο στις συνουκλεινοπάθειες και η ανίχνευση συσσωματωμάτων μπορεί να βοηθήσει στην έγκαιρη διάγνωση. (Parnetti et al., 2019)

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια (RBCs) μπορεί να χρησιμεύσουν ως πιθανός βιοδείκτης για τη διάγνωση και τη σοβαρότητα της νόσου, καθώς η μόλυνση που προκαλείται από την αιμόλυση στο πλάσμα/ορό θα μπορούσε να επηρεάσει σημαντικά τα επίπεδα της α-συνουκλεΐνης. Ωστόσο, μελέτες για τα ολικά επίπεδα α-συνουκλεΐνης στα ερυθρά αιμοσφαίρια έχουν δείξει αντικρουόμενα αποτελέσματα, με ορισμένες να δείχνουν αύξηση σε ασθενείς με Πάρκινσον και άλλες μείωση. Ωστόσο, η ολιγομερής α-



συνουκλεΐνη αίματος και η φωσφορυλιωμένη α-συνουκλεΐνη του πλάσματος έχουν δείξει αυξημένες ποσότητες σε ασθενείς με νόσο του Πάρκινσον και έχουν υψηλή διαγνωστική ακρίβεια. Οι μέθοδοι προσδιορισμού που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι ELISA ευαίσθητη στα φωσφολιπίδια και Western Blot. (Atik et al., 2016) (Parnetti et al., 2019)

#### *Λυσοσωμικά ένζυμα*

Η συσσώρευση της συσσωματωμένης α-συνουκλεΐνης στον εγκέφαλο έχει συνδεθεί με βλάβες στην λυσοσωμική οδό αυτοφαγίας, η οποία είναι υπεύθυνη για την ενδοκυτταρική αποικοδόμηση της α-συνουκλεΐνης. Επομένως λυσοσωμικά ένζυμα αυτού του μονοπατιού στο CSF, φαίνεται να κερδίζουν ενδιαφέρον ως βιοδείκτες της ασθένειας. Ένα από αυτά, η β-γλυκοσερεβροσιδάση (GCase), έχει δείξει σταθερά σημαντική μείωση στη δραστηριότητα της (28%) σε ασθενείς με νόσο του Πάρκινσον σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες, όπως επίσης και οι δραστηριότητες των ενζύμων καθεψίνη D και β-εξοσαμινιδάση, εμφανίζουν μείωση. Ο συνδυασμός όλων των μετρούμενων λυσοσωμικών ενζυμικών δραστηριοτήτων βελτίωσε τη διαγνωστική ακρίβεια, με ευαισθησία 71% και ειδικότητα 85%. Ωστόσο, η ευαισθησία και η ειδικότητα των μεμονωμένων λυσοσωμικών ενζύμων δεν ήταν βέλτιστες για διαγνωστικούς σκοπούς. (Parnetti et al., 2019)

#### *Neurofilament light chain- NfL*

Η Neurofilament light chain (NfL) είναι μια πρωτεΐνη που βρίσκεται στους νευράξονες των νευρώνων, όπως έχει ήδη αναφερθεί στη νόσο του Αλτσχάιμερ. Η συγκέντρωσή της στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) και στο αίμα είναι ένας ευαίσθητος δείκτης εκφύλισης των νευραξόνων της λευκής ουσίας, ο οποίος είναι χαρακτηριστικός των άτυπων παρκινσονικών διαταραχών αλλά όχι της νόσου του Πάρκινσον. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι συγκεντρώσεις της NfL στο CSF και στο αίμα και μπορούν να διαφοροποιήσουν με ακρίβεια τη νόσο του Πάρκινσον από τις άτυπες παρκινσονικές διαταραχές όπως η προοδευτική υπερπυρηνική παράλυση, η πολλαπλή ατροφία του συστήματος και το φλοιοβασικό σύνδρομο, καθιστώντας τη βιοδείκτη, ένα δυνητικά χρήσιμο εργαλείο για τη διαφορική διάγνωση της νόσου. Ωστόσο, απαιτούνται περισσότερες μελέτες σε μεγάλες ομάδες νευροπαθολογικά επιβεβαιωμένων περιπτώσεων για να υποστηριχθεί η ακρίβεια αυτού του βιοδείκτη. (Atik et al., 2016)



(Parnetti et al., 2019) (Tolosa et al., 2021)

### *Glial Fibrillary Acidic Protein- GFAP*

Τα αστροκύτταρα εμπλέκονται στον μεταβολισμό του εγκεφάλου και στη μεταφορά θρεπτικών ουσιών στους νευρώνες. Χαρακτηρίζονται από την έκφραση των ενδιάμεσων νηματίων GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) και της βιμεντίνης. Η GFAP αποτελεί τη βασική πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη διατήρηση του σχήματος του αστροκυττάρου, στην υποστήριξη των γειτονικών νευρώνων και του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Το GFAP και τα προϊόντα διάσπασής του μπορούν να χρησιμεύσουν ως βιοδείκτης για νευρολογικές παθήσεις όπως η νόσος Πάρκινσον, καθώς ο τραυματισμός των αστροκυττάρων μπορεί να προκαλέσει την απελευθέρωση του GFAP στο αίμα, λόγω διαταραχή του BBB και απώλεια της αστροκυτταρικής δομικής ακεραιότητας λόγω νέκρωσης ή μηχανικής διαταραχής. Τα υψηλά επίπεδα GFAP στο CSF και GFAP στον ορό του αίματος, είναι ένας πιθανός πρώιμος βιοδείκτης για τη νόσο και τα επίπεδα GFAP συνήθως μετρώνται με kit ELISA που βασίζεται σε πολυκλωνικά αντισώματα. (Lotankar et al., 2017)

### *DJ-1*

Η DJ-1 είναι μια πρωτεΐνη που επάγεται από το οξειδωτικό στρες και έχει μελετηθεί ως πιθανός βιοδείκτης της νόσου του Πάρκινσον. Η περιεκτικότητα σε DJ-1 έχει προσδιοριστεί στο αίμα, στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και στα ερυθροκύτταρα. Τα ευρήματα είναι αμφιλεγόμενα λόγω του υψηλού επιπέδου μόλυνσης από αιμόλυση και ερυθροκύτταρα. Ωστόσο, όταν εξετάζεται το CSF χωρίς τα μολυσματικά κύτταρα του αίματος, τα επίπεδα DJ-1 μειώνονται σημαντικά σε ασθενείς με Πάρκινσον σε σύγκριση με ασθενείς με νόσο Αλτσχάιμερ και υγιή άτομα. Η έκφραση της DJ-1 σε μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος και στο εξωσωματικό RNA του CSF είναι αυξημένη σε ασθενείς με Πάρκινσον. Εκτός από τα ποσοτικά επίπεδα της DJ-1, ενδιαφέρον παρουσιάζει και η ποιοτική της αλλαγή, δηλαδή η οξειδωμένη μορφή της (oxDJ-1), ως υποψήφιος βιοδείκτης της νόσου Πάρκινσον. Χρησιμοποιώντας μια ανταγωνιστική ELISA για την oxDJ-1, βρέθηκε αύξηση στα επίπεδα της στα ερυθροκύτταρα., ιδιαίτερα σε ασθενείς χωρίς φαρμακευτική αγωγή κατά τη διάρκεια της πρώιμης φάσης του Πάρκινσον. (Saito, 2017)

### *Ουρικό οξύ*

Το ουρικό οξύ είναι ένα σημαντικό ενδογενές αντιοξειδωτικό με υψηλές συγκεντρώσεις στον εγκέφαλο και στον ορό. Μελέτες δείχνουν ότι τα άτομα με υψηλότερα επίπεδα ουρικού οξέος έχουν χαμηλότερο κίνδυνο να αναπτύξουν τη νόσο Πάρκινσον και ότι τα άτομα με τη νόσο Πάρκινσον τείνουν να έχουν χαμηλότερα επίπεδα ουρικού οξέος σε σύγκριση με υγιή άτομα. Το ουρικό οξύ μπορεί να διαδραματίσει προστατευτικό ρόλο στη νόσο του Πάρκινσον, δρώντας ως αντιοξειδωτικό και μειώνοντας το οξειδωτικό στρες στον εγκέφαλο λόγω της ικανότητάς του να καθαρίζει τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS). (Lotankar et al., 2017) (X. Chen et al., 2012)

### *Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)*

Πρώιμες έρευνες καταδεικνύουν έναν πιθανό ρόλο του BDNF ως βιοδείκτη για την αξιολόγηση γνωστικών αλλαγών στη νόσο του Πάρκινσον. Το BDNF έχει βρεθεί ότι αναστέλλει τον κυτταρικό θάνατο και τον εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Επομένως η μειωμένη έκφραση του BDNF στη μέλαινα ουσία, που συμβάλει στην εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων, έχει συσχετιστεί με χαμηλά επίπεδά του BDNF στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό έχοντας θετική συσχέτιση με τη μειωμένη γνωστική απόδοση σε ασθενείς με Πάρκινσον. Τα επίπεδα του πιθανού αυτού βιοδείκτη στο αίμα αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ELISA. (Costa et al., 2015) (Lotankar et al., 2017)

Οι περισσότεροι από τους παραπάνω δείκτες που αναφέρθηκαν, έχουν αναλυθεί επαρκώς για την εγκυρότητάς τους σε διάφορες πειραματικές μελέτες και έχει αποδειχθεί ότι η μέγιστη ακρίβεια τους πετυχαίνεται όταν εξετάζονται συνδυαστικά. Παρ' όλα αυτά, η τωρινή ανάγκη προσανατολίζεται, όχι τόσο στην αναζήτηση νέων βιοδεικτών για τη νόσο, αλλά περισσότερο στη μακρά διαδικασία κλινικής επιβεβαίωσης της εγκυρότητας και της χρησιμότητας των ήδη υπαρχόντων βιοδεικτών. Οι επικυρωμένοι βιοδείκτες με υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση για τη νόσο είναι εξαιρετικά απαραίτητοι, αλλά επί του παρόντος λείπουν. Αυτό το έλλειμμα αποτελεί σημαντικό εμπόδιο στην έρευνα για τη θεραπεία της νόσου, καθώς ο σχεδιασμός των κλινικών δοκιμών απαιτεί έναν βιοδείκτη για τη δοκιμή νευροπροστατευτικών θεραπειών. Επιπλέον, οι βιοδείκτες είναι κρίσιμοι για την έγκαιρη διάγνωση της νόσου

σε πρώιμα στάδια. Η προσυμπτωματική διάγνωση αποτελεί πρόκληση γιατί η νόσος εξελίσσεται αργά, καιρό πριν εμφανιστούν τα πρώτα συμπτώματα. Μέχρι εκείνη τη στιγμή, οι περισσότεροι από τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες έχουν ήδη καταστραφεί, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η αντιμετώπισή της νόσου. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι κανένας μεμονωμένος δείκτης δεν είναι επί του παρόντος ικανός να προβλέψει την εξέλιξη της νόσου με καλή αξιοπιστία και εγκυρότητα. (Parnetti et al., 2019) (Lotankar et al., 2017) (Beitz, 2014)

## **4<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΑΜΥΟΤΡΟΦΙΚΗ ΠΛΕΥΡΙΚΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ (ALS)**

### **4.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ**

Η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση ή νόσος του κινητικού νευρώνα (ALS)- γνωστή και ως νόσος του Lou Gehrig, από τον διάσημο παίκτη του μπέιζμπολ που διαγνώστηκε με αυτήν το 1939, είναι μια ετερογενής νευροεκφυλιστική νόσος που προσβάλλει τους νευρώνες που είναι υπεύθυνοι για τον έλεγχο της εκούσιας μυϊκής κίνησης. Είναι μια ταχέως εξελισσόμενη και καθολικά θανατηφόρα νευροεκφυλιστική διαταραχή του ανθρώπινου κινητικού συστήματος, που περιγράφηκε για πρώτη φορά στα μέσα του 19ου αιώνα. Ο όρος «αμυοτροφική πλάγια σκλήρυνση» επινοήθηκε από τον Γάλλο νευρολόγο Jean-Martin Charcot το 1800: «αμυοτροφική» αναφέρεται στη μυϊκή ατροφία και η «πλάγια σκλήρυνση» περιγράφει τη σκλήρυνση των ιστών στον πλάγιο νωτιαίο μυελό. Η μέση συχνότητα εμφάνισης είναι 2,8 περιστατικά σε 100.000 πληθυσμού στην Ευρώπη και 1.8 περιστατικά σε 100.000 στη Βόρεια Αμερική. Οι άνδρες προσβάλλονται ελαφρώς συχνότερα από τις γυναίκες, ενώ η διάμεση περίοδος επιβίωσης μετά την έναρξη είναι ανεξάρτητη από το φύλο και είναι συνήθως 2-4 χρόνια. Μια πρόσφατη επιδημιολογική ανάλυση έδειξε ότι η μέση ηλικία για την τυπική έναρξη της νόσου ALS (έναρξη σε ενήλικες) είναι περίπου στα 62 έτη, ενώ οι

περιπτώσεις νεανικής εμφάνισης της νόσου είναι σπάνιες (1-10% των περιπτώσεων). (Vucic et al., 2014) (Grad et al., 2017)

#### 4.1.1 Η ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Η ALS αρχικά θεωρούταν μια καθαρή νευρομυϊκή νόσος. Μετά όμως από εκτεταμένες μελέτες έχει επέλθει ριζική αλλαγή στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας και πλέον τα στοιχεία συνηγορούν στο ότι πρόκειται για μια πολυσυστηματική νευροεκφυλιστική διαταραχή. Τα βασικά νευροπαθολογικά χαρακτηριστικά της περιλαμβάνουν αφενός την εκτεταμένη απώλεια κατώτερων κινητικών νευρώνων που βρίσκονται στα πρόσθια κέρατα του νωτιαίου μυελού και του εγκεφαλικού στελέχους και προβάλλουν στους μύες, καθώς και τον εκφυλισμό και την απώλεια νευρώνων μεγάλων πυραμιδικών κυττάρων γνωστών ως κύτταρα Betz στον πρωτογενή κινητικό φλοιό. Επιπλέον, υπάρχει εκφύλιση των πλευρικών φλοιονωτιαίων οδών, που περιέχουν τους άξονες που προβάλλουν από τον πρωτογενή κινητικό φλοιό στους κινητικούς νευρώνες του νωτιαίου μυελού και του εγκεφαλικού στελέχους. Τέλος, ο εκφυλισμός των νευρικών αυτών κυττάρων οδηγεί σε- επαγόμενη ως αντίδραση, γλοίωση, η οποία χαρακτηρίζεται από την υπερτροφία των νευρογλοιακών κυττάρων στις περιοχές του εκφυλισμού εντός του κινητικού φλοιού και του νωτιαίου μυελού. Παρακάτω θα αναλυθούν βασικά σημεία της παθοφυσιολογίας της νόσου, που την χαρακτηρίζουν. (Hardiman et al., 2017) (Grad et al., 2017) (Vucic et al., 2014)

##### *Βλάβη στα συστήματα ομοιόστασης των πρωτεϊνών*

Ένα ακόμα χαρακτηριστικό της νόσου αποτελεί η παρουσία συσσωματωμένων ουβικουιτινοποιημένων εγκλεισμάτων πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα των κινητικών νευρώνων, που αποτελούν κλασικό νευροπαθολογικό δείκτη της ALS. Στους περισσότερους υποτύπους της ALS, η πρωτεΐνη TDP-43 (TAR DNA-binding protein-43), μια πυρηνική πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην επεξεργασία του DNA και του RNA, είναι το κύριο συστατικό αυτών των εγκλεισμάτων. Άλλοι τύποι πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, όπως εγκλείσματα νευρονηματοειδών υαλινοειδών και του λανθασμένα αναδιπλωμένου ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου Cu/ Zn (SOD1-superoxide dismutase) ή της πρωτεΐνης FUS με δράση μεταγραφικού ενεργοποιητή που δεσμεύεται RNA- μπορεί επίσης να παρατηρηθούν στην ALS. Σύμφωνα με μελέτες, οι μεταλλάξεις στα παραπάνω γονίδια μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στον πρωτεασωματικό και αυτοφαγικό μηχανισμό και κατ' επέκταση στο μηχανισμό

ανακύκλωσης των πρωτεϊνών οδηγώντας σε εναπόθεση των λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στα κύτταρα. (Grad et al., 2017) (Hardiman et al., 2017)

#### *Διεγερτοτοξικότητα επαγόμενη από το γλουταμικό*

Οι κινητικοί νευρώνες είναι πολύ ευαίσθητοι στην τοξικότητα που προκαλείται από την υπερβολική διέγερση του νευροδιαβιβαστή γλουταμικό. Παράλληλα, στην ALS παρατηρείται βλάβη της αστρογλοιακής πρωτεΐνης: διεγερτικός μεταφορέας αμινοξέων 2 ( EAAT2-excitatory amino acid transporter 2), η οποία ευθύνεται για την επαναπρόσληψη του γλουταμικού. Η υπερβολική διέγερση των ιονοτροπικών υποδοχέων του γλουταμικού οδηγεί σε νευροεκφυλισμό και δημιουργία ελεύθερων ριζών (οξειδωτικό στρες). Ωστόσο, η τοξικότητα του γλουταμικού δεν είναι η κύρια αιτία της ALS. (Hardiman et al., 2017) (Vucic et al., 2014)

#### *Νευροφλεγμονή*

Η έρευνα υποδεικνύει ότι τα γειτονικά νευρογλοιακά κύτταρα, όπως τα μικρογλοία και τα αστροκύτταρα, παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της ALS, μεσολαβώντας στον θάνατο των κυττάρων του κινητικού νευρώνα, μέσω αυξημένης έκκρισης νευροτοξικών παραγόντων, όπως το γλουταμινικό και οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες με αντίστοιχο τρόπο με αυτόν που περιγράφηκε και στην ενότητα 3.1.1 για τη νευροφλεγμονή στο Πάρκινσον. (Vucic et al., 2014)  
Σε κάθε περίπτωση, οι κινητικοί νευρώνες στην ALS χάνουν την ικανότητά τους να διατηρούν τις αξονικές προεξοχές τους, οδηγώντας σε ανάκληση και απονεύρωση του κυττάρου. Αυτό οδηγεί στην απώλεια ελέγχου των μυών και την υπέρτονία. (Hardiman et al., 2017)

### **4.1.2 ΤΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ Η ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ**

Η νόσος ALS εμφανίζει ένα πολύπλοκο κλινικό φαινότυπο, με εκφύλιση των ανώτερων (UMN- Upper Motor Neurons) και κατώτερων κινητικών νευρώνων (LMN- Lower Motor Neurons). Η τυπική μορφή περιλαμβάνει συμπτώματα και των δύο τύπων νευρώνων και έχει συνήθως αρνητική πρόγνωση. Η νόσος μπορεί να ξεκινήσει από τα άκρα (*limb-onset*) με συσπάσεις, κράμπες, μυϊκή αδυναμία ή από τη βολβική περιοχή του εγκεφάλου (*bulbar-onset*) με συμπτώματα όπως δυσαρθρία, δυσφαγία και προοδευτική μυϊκή ατροφία, ενώ σπάνια παρουσιάζονται και μορφές της νόσου με αναπνευστικά προβλήματα (*respiratory-onset*). Οι άτυπες μορφές PLS (Primary Lateral Sclerosis) και το PMA (Progressive Muscular Atrophy) έχουν συνήθως

καλύτερη πρόγνωση από την ALS, καθώς επηρεάζουν μόνο ένα επίπεδο κινητικών νευρώνων- τους LMN και τους UMN αντίστοιχα. Η αργή πρόοδος της νόσου και η μικρότερη σοβαρότητα των συμπτωμάτων οφείλονται στη δυνατότητα αντιστάθμισης από τον άθικτο κινητικό νευρώνα σε κάποιο βαθμό. Η επικέντρωση της παθολογίας σε μια συγκεκριμένη περιοχή διευκολύνει τη διαχείριση των συμπτωμάτων και καθυστερεί την πρόοδο της νόσου. Τέλος, στα τελικά στάδια της νόσου η αναπνευστική δυσλειτουργία κυριαρχεί, καταλήγοντας τελικά σε τερματική αναπνευστική ανεπάρκεια και θάνατο του ασθενούς. (Ralli et al., 2019) (Hardiman et al., 2017) (Grad et al., 2017) (Vucic et al., 2014)

#### **4.1.3 ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΚΑΙ ΜΗ ΑΙΤΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ- ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ**

Τα αίτια της νόσου περιλαμβάνουν γενετικούς παράγοντες αλλά και παράγοντες του τρόπου ζωής. Η νόσος είναι οικογενής στο 10% των ασθενών και συνήθως χαρακτηρίζεται από κυρίαρχο τρόπο κληρονομικότητας. Έχουν εντοπιστεί αρκετά γονίδια που προκαλούν ALS (σε οικογενή ALS) ή γονίδια που σχετίζονται με την ALS (σε σποραδική και οικογενειακή ALS). Παθογενείς παραλλαγές στα γονίδια C9ORF72, SOD1, FUS και TARDBP εμφανίζονται πιο συχνά, ενώ οι παραλλαγές σε άλλα γονίδια είναι σχετικά ασυνήθιστες. (Mejzini et al., 2019) (Philips & Robberecht, 2011) (Ralli et al., 2019)

##### *C9ORF72*

Το γονίδιο C9ORF72 αποτελεί κοινό γενετικό αίτιο τόσο για τις οικογενείς μορφές της νόσου (33,7%) όσο και για τις σποραδικές (5,1%). Σχετικά πρόσφατα, το 2011, έγινε η πρωτοποριακή ανακάλυψη ότι η επαναλαμβανόμενη εξανουκλεοτιδική επέκταση GGGGCC, που παρατηρείται στο πρώτο εσώνιο του γονιδίου- μεταξύ δύο θέσεων έναρξης μεταγραφής, στη μη κωδικοποιητική περιοχή του C9ORF72 μπορεί να προκαλέσει την ALS. (Shpilyukova et al., 2020) (Mejzini et al., 2019) Οι διευρυμένες επαναλήψεις GGGGCC (G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>) υφίστανται αμφίδρομη μεταγραφή για να παράγουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες RNA, το οποίο σχηματίζει νοηματικές και αντινοηματικές εστίες RNA. Αυτά τα RNA βρίσκονται σε μια μη κωδικοποιητική περιοχή του γονιδίου C9ORF72, αλλά παραδόξως, μπορούν να μεταφραστούν σε όλα τα πλαίσια ανάγνωσης για να δημιουργήσουν πέντε διαφορετικές διπεπτιδικές



επαναλαμβανόμενες πρωτεΐνες (dipeptide repeat proteins- DPRs) — poly-GA, poly-GP, poly-GR, poly-PA και poly-PR — μέσω ενός μη κανονικού μηχανισμού γνωστού ως επαναλαμβανόμενη μετάφραση μη ATg (repeat- associated non- ATg translation- RAN). Στα περισσότερα φυσιολογικά άτομα (>95%), η ακολουθία G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> επαναλαμβάνεται κυρίως δύο έως πέντε φορές. Σπάνια επαναλαμβάνεται περισσότερες από πέντε φορές και ποτέ δεν επαναλαμβάνεται πάνω από 30 φορές. Στα άτομα με παθολογία ALS οι επαναλήψεις είναι συνήθως πάνω από 30. Το μήκος της διευρυμένης επανάληψης είναι ακόμα αβέβαιο, αλλά μπορεί να αποτελείται μέχρι και από αρκετές εκατοντάδες ή και χιλιάδες επαναλήψεις. Η bulbar- onset μορφή της νόσου, έχει πολύ συχνά συσχετιστεί με το γονίδιο C9ORF72, όπως και ο συνδυασμός της ALS με μετωποκροταφική άνοια, η οποία προσδίδει παραλλαγές στη συμπεριφορά του ασθενή. Γενικά μια κλινική εικόνα η οποία περιλαμβάνει ψύχωση, παρκινσονισμό και αταξία συχνά έχει τις ρίζες του σε γενετικά αίτια σχετικά με αυτό το γονίδιο. (Robberecht & Philips, 2013) (Balendra & Isaacs, 2018)

Ο φυσιολογικός λειτουργικός ρόλος της πρωτεΐνης C9ORF72, η οποία εικάζεται ότι υπάρχει στο κυτταρόπλασμα, παραμένει ασαφής. Ωστόσο, διαθέτει δομικές ομοιότητες με τις πρωτεΐνες του τομέα DENN, οι οποίες είναι γνωστό ότι δρουν ως παράγοντες ανταλλαγής GDP-GTP για τις RAB GTPases και διατηρούνται σε υψηλό βαθμό. Πρόσφατη έρευνα δείχνει ότι το C9ORF72 δημιουργεί δύο ισομορφές - η μία είναι μια πρωτεΐνη 481 αμινοξέων που παράγεται από τα εξώνια 2-11, ενώ η άλλη είναι μια μικρότερη πρωτεΐνη 222 αμινοξέων που προκύπτει από τα εξώνια 2-5. (Robberecht & Philips, 2013)

Οι μηχανισμοί με τους οποίους η επέκταση του γονιδίου C9ORF72 οδηγεί σε νευροεκφυλισμό στο ALS μένει να διευκρινιστούν πλήρως. (Vucic et al., 2014) Το γονίδιο αυτό και οι παραλλαγές του συχνά εμπλέκονται μηχανισμούς παθογένεσης της νόσου και σε διαταραχές σε κρίσιμα βιομοριακά μονοπάτια όπως στη συσσώρευση εγκλεισμάτων πρωτεΐνης TDP-43, στην παθολογία λόγω DPR (RAN τοξικότητα), στη διαταραχή της μεταγραφής και του ματίσματος του RNA (RNA τοξικότητα) καθώς και στη αυτοφαγία και στο λυσοσωμικό μονοπάτι.

Η πλειοψηφία των περιπτώσεων ALS και το 50% των περιπτώσεων FTD περιλαμβάνουν εγκλείσματα της πρωτεΐνης TDP-43 που δεσμεύει το RNA σε νευρώνες και γλοία. Οι μεταλλάξεις C9ORF72 μπορούν να οδηγήσουν σε εγκλείσματα TDP-43 τόσο στο ALS όσο και στο FTD, επηρεάζοντας διάφορες περιοχές του

εγκεφάλου. (Balendra & Isaacs, 2018)

Τα εγκλείσματα DPR έχουν βρεθεί σε ασθενείς με παραλλαγές του γονιδίου C9ORF72. Τα νευρωνικά αυτά κυτταροπλασματικά εγκλείσματα μπορεί να αποτελούνται από περισσότερους από έναν τύπους DPR, αλλά η νοηματική μορφή poly-GA είναι η πιο συχνή μορφή DPR, ακολουθούμενη από το poly-GP και στη συνέχεια το poly-GR, ενώ οι DPR που προέρχονται από το αντινοηματικό poly-PA και poly-PR είναι οι λιγότερο συχνές. Η παθολογία DPR είναι πιο εμφανής στην παρεγκεφαλίδα, τον ιππόκαμπο και τον φλοιό και είναι λιγότερο συχνή στις υποφλοιώδεις περιοχές. Τα DPR είναι επιρρεπή σε συσσώματωση και μπορούν να ανιχνευθούν σε αδιάλυτα κλάσματα από τον μετωπιαίο φλοιό ή την παρεγκεφαλίδα του ασθενούς. Υπάρχον αντικρουόμενες μελέτες για το ρόλο των DPR στην παθογένεση της νόσου σχετικά με το αν είναι παθολογικά ή ακόμα και προστατευτικά. Παρ' όλα αυτά διαφαίνεται ότι παθολογία της TDP-43 πιθανώς έπεται της παθολογίας DPR, εξηγώντας γιατί η πρώτη συσχετίζεται πιο στενά και ξεκάθαρα με τον νευροεκφυλισμό. Ενδεχομένως τα DPR έχουν ένα ρόλο σε πιο αρχικά στάδια της νόσου.

Πρόσφατες μελέτες *in vitro* έχουν καταδείξει ότι οι επαναλήψεις G4C2, σχηματίζουν τις δευτερογενείς δομές G-quadruplexes με σύσταση από μόρια RNA ή DNA πλούσια σε γουανίνη, που αποτελούνται από τέσσερα υπολείμματα γουανίνης ευθυγραμμισμένα σε τετράγωνη επίπεδη διαμόρφωση. (Balendra & Isaacs, 2018) Αυτές οι τετραπλές δομές G θα μπορούσαν να δεσμεύσουν μεταγραφικούς παράγοντες όπως ASF/SF2 και hnRNPA1, καθοριστικούς στο μεταβολισμό DNA/RNA, οδηγώντας σε τοξικότητα του RNA. (Vucic et al., 2014) Τέλος, το γονίδιο C9orf72 σχετίζεται δομικά με πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη διακίνηση στις νευρικές σχισμές, την αυτοφαγία και το λυσοσωμικό μονοπάτι. Η μείωση της έκφρασης του C9orf72 αναστέλλει την αυτοφαγία και οδηγεί σε συσσώρευση υποστρωμάτων αυτοφαγίας, ενώ η υπερέκφραση του C9orf72 μπορεί να ενεργοποιήσει την αυτοφαγία. Το C9orf72 αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που μεσολαβούν στην αυτοφαγία μέσω του συμπλέγματος ULK1 και μπορεί να επηρεάσει επίσης τη λυσοσωμική λειτουργία. Η απώλεια του C9orf72 σε μικρογλοία και νευρώνες μπορεί να ευαισθητοποιήσει τα κύτταρα σε άλλες προσβολές και να συμβάλει στον νευροεκφυλισμό. (Balendra & Isaacs, 2018)

### *SOD1*

Το γονίδιο SOD-1 έχει συνδεθεί με οικογενείς και σποραδικές περιπτώσεις ALS, με

μεταλλάξεις στο γονίδιο που υποκρύπτουν το 14-23% των οικογενών και το 1-7% των σποραδικών περιπτώσεων.

Το 1993, το γονίδιο SOD1 αναγνωρίστηκε ως το πρώτο γονίδιο που σχετίζεται με την ALS. Αυτό το γονίδιο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της δισμουτάσης υπεροξειδίου 1 (Cu/Zn), ενός μεταλλοενζύμου που αποτελείται από 153 αμινοξέα. Στον άνθρωπο, υπάρχουν τρία ένζυμα υπεροξειδικής δισμουτάσης και το SOD1 είναι ένα από αυτά. Η κύρια λειτουργία του SOD1 είναι να δεσμεύει Cu και Zn για να σχηματίσει ένα σταθερό ομοδιμερές. Αυτά τα διμερή υπάρχουν τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στο ενδομεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων. Καταλύοντας τη μετατροπή των ειδών υπεροξειδίου που παράγονται κατά την κυτταρική αναπνοή σε οξυγόνο και υπεροξείδιο του υδρογόνου, το SOD1 παίζει κρίσιμο ρόλο στους αντιοξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς. Το γονίδιο SOD1 σχετίζεται με την Αμυοτροφική Πλάγια Σκλήρυνση (ALS) και κωδικοποιεί ένα μεταλλοένζυμο που βοηθά στην προστασία των κυττάρων από οξειδωτική βλάβη καταλύοντας την παραγωγή οξυγόνου και υπεροξειδίου του υδρογόνου. Έχουν εντοπιστεί περισσότερες από 185 παραλλαγές του SOD1 που σχετίζονται με τη νόσο, με τις πιο κοινές μεταλλάξεις με λάθος νόημα. Διαφορετικές παραλλαγές SOD1 μπορούν να οδηγήσουν σε διαφορετική σοβαρότητα, εξέλιξη και κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου. Οι επαγόμενες από μετάλλαξη διαμορφωτικές και λειτουργικές αλλαγές του SOD1 μπορούν να οδηγήσουν σε αλληλεπιδράσεις με διάφορες πρωτεΐνες και μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένης της διεγερτικής τοξικότητας, του οξειδωτικού στρες, του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας και της διάδοσης που μοιάζει με prion. (Robberecht & Philips, 2013) (Mejzini et al., 2019)

Οι μεταλλάξεις στο SOD1 οδηγούν σε συσσωμάτωση και λανθασμένη αναδίπλωση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης, η οποία στοχεύεται για αποικοδόμηση από το σύστημα ουβικιτυλίωσης, ωστόσο, φαίνεται να διαφεύγει από αυτή τη ρυθμιστική διαδικασία στο κύτταρο. Το μεταλλαγμένο SOD1 ένζυμο συσσωρεύεται ως ολιγομερή και συσσωματώματα, οδηγώντας σε μια απόκριση στρες που τελικά οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο. Επιπλέον, το SOD1 άγριου τύπου που οξειδώνεται μπορεί επίσης να αναδιπλωθεί και να είναι τοξικό για τους κινητικούς νευρώνες. (Robberecht & Philips, 2013) (Kaur et al., 2016)

Ενώ ορισμένες παραλλαγές SOD1 που προκαλούν ALS έχουν ως αποτέλεσμα

μειωμένη ενζυματική δραστηριότητα του SOD1, άλλες διατηρούν δραστικότητα συγκρίσιμη με αυτή του SOD1 άγριου τύπου. Παρατηρήσεις που έχουν προκύψει από μελέτες, υποδηλώνουν ότι το SOD1 μπορεί να μην είναι αιτιολογικό της νόσου, αλλά θα μπορούσε να τροποποιεί πτυχές της παθογένεσης της ALS ή μπορεί να προκαλέσει άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες. (G. Kim et al., 2020)

### *TARDBP*

Η ανακάλυψη της πρωτεΐνης TDP-43, που κωδικοποιείται από το γονίδιο TARDBP έχει αλλάξει την κατανόηση της παθογένεσης της ALS. (G. Kim et al., 2020) Το TDP-43 είναι μια πρωτεΐνη που δεσμεύει DNA/RNA και η συσσώρευσή της σε κυτταροπλασματικά νευρωνικά εγκλείσματα θετικά στην ουβικιτίνη θεωρείται πλέον παθολογικό χαρακτηριστικό της ALS. Είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη μεταγραφή, το μάτισμα RNA και τη μεταφορά. Ο ρόλος της στο μάτισμα του mRNA έχει κερδίσει τη μεγαλύτερη προσοχή. Το TDP43 περιέχει δύο μοτίβα αναγνώρισης RNA (RRMs) και συνδέεται με ιντρονικές πλούσιες σε GU αλληλουχίες που συχνά βρίσκονται πολύ μακριά από τα όρια ιντρονίου-εξονίου 54,55. Καθώς πολλά pre-mRNA περιέχουν τέτοιες επαναλήψεις, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι το TDP43 στοχεύει περισσότερα από 6.000 mRNA. Η πτώση του TDP-43 αλλάζει την αφθονία περισσότερων από 600 mRNAs και το μάτισμα 965 mRNAs και επηρεάζει το μάτισμα και τη σταθερότητα πολλών μη κωδικοποιητικών RNA και miRNAs. (Robberecht & Philips, 2013)

Οι κυρίαρχες μεταλλάξεις στο γονίδιο TARDBP έχουν αναγνωριστεί ως κύρια αιτία της ALS και τουλάχιστον 48 παραλλαγές της TARDBP έχουν συσχετιστεί με την ALS. (G. Kim et al., 2020) Οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες ανακατανέμονται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, με αποτέλεσμα την τοξικότητα. Οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί με τους οποίους αυτές οι μεταλλάξεις οδηγούν σε νευροεκφυλισμό παραμένουν να καθοριστούν πλήρως, αλλά έχουν προταθεί πολλαπλοί μηχανισμοί, συμπεριλαμβανομένης της αύξησης της τοξικότητας, της απώλειας της πυρηνικής λειτουργίας της TDP-43 και του σχηματισμού εγκλεισμάτων. (Vucic et al., 2014) Η ομοιόσταση του TDP-43 είναι κρίσιμη για την κανονική κυτταρική λειτουργία και η περίσσεια TDP-43 στο κυτταρόπλασμα μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό εγκλειστών σωματίων που οδηγούν σε κυτταρική δυσλειτουργία, ενώ η πυρηνική εξάντληση μπορεί να προκαλέσει εκτεταμένη απορρύθμιση του μεταβολισμού του

mRNA. (Mejzini et al., 2019) Η μη φυσιολογική συσσωμάτωση TDP-43 μπορεί να οδηγήσει στην απομόνωση άλλων πρωτεϊνών που δεσμεύουν το RNA, μειώνοντας το μεταβολισμό του RNA και προκαλώντας εναλλακτικό μάτισμα. Αυτό μπορεί να προκαλέσει σε αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση και στη σύνθεση πρωτεϊνών που συμβάλλουν στον εκφυλισμό των κινητικών νευρώνων και στην ανάπτυξη συμπτωμάτων ALS. (Prasad et al., 2019) Η σοβαρότητα του εκφυλισμού του κινητικού νευρώνα του φλοιού και της σπονδυλικής στήλης φαίνεται να είναι ανάλογη με τα επίπεδα πρωτεΐνης TDP-43. (Vucic et al., 2014)

Τέλος, η ευπάθεια των νευρώνων σε λανθασμένα εντοπισμένες ή συσσωματωμένες πρωτεΐνες συχνά προκαλείται μέσω δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων. Η υπερέκφραση της TDP-43 έχει βρεθεί ότι μειώνει το μήκος των μιτοχονδρίων και βλάπτει την κίνηση, οδηγώντας σε ανώμαλη μιτοχονδριακή μεταφορά και κατανομή σε μοντέλα ποντικών και μυγών. Η έκφραση του TDP-43 έχει επίσης βρεθεί ότι προκαλεί οξειδωτικό στρες και βλάπτει την οδό Nrf2/ARE, η οποία είναι απαραίτητη για τη μείωση της οξειδωτικής βλάβης. (Prasad et al., 2019)

### *FUS*

Το FUS (Fused in Sarcoma) είναι ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια πυρηνική πρωτεΐνη δέσμευσης RNA που ανήκει στην οικογένεια FET, η οποία περιλαμβάνει επίσης τις TAF15 και EWSR1. Διαθέτει παρόμοιες φυσιολογικές λειτουργίες με την TDP-43 όπως ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, συμπεριλαμβανομένης της μεταγραφής, του ματίσματος mRNA, της μεταφοράς RNA και της ρύθμισης της μετάφρασης. Αν και μοιράζονται πολλές ομοιότητες, το TDP-43 και το FUS ρυθμίζουν διαφορετικούς στόχους RNA και παρουσιάζουν διαφορετική ειδικότητα δέσμευσης αλληλουχίας. Το FUS εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα, αλλά μπορεί να περάσει στο κυτταρόπλασμα για νουκλεοκυτταροπλασματική μεταφορά. Το 2009, παθογόνες παραλλαγές στο γονίδιο FUS εντοπίστηκαν σε μια υποομάδα ασθενών με ALS. Το FUS σχετίζεται με πρόωμη έναρξη και νεανική ALS. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο FUS προκαλούν ALS και σχεδόν όλες είναι κυρίαρχες, ενώ εμφανίζονται στο 4% των ασθενών με οικογενή ALS και σε < 1% των ασθενών με σποραδική μορφή ALS. (G. Kim et al., 2020) Πάνω από 50 αυτοσωματικές επικρατούσες παραλλαγές FUS έχουν πλέον ταυτοποιηθεί σε ασθενείς με ALS. Η πλειονότητα είναι αντινοσηματικές μεταλλάξεις, αν και σε σπάνιες περιπτώσεις έχουν αναφερθεί παρεμβολές, διαγραφές, μάτισμα και μη νοσηματικές μεταλλάξεις. Χαρακτηρίζεται από

παθολογική συσσώρευση πρωτεΐνης FUS, που γενικά αναφέρεται ότι εμφανίζεται μόνο σε ασθενείς με παθολόγες παραλλαγές στο γονίδιο FUS. Η συσσώρευση TDP-43 δεν παρατηρείται συχνά σε ασθενείς με FUS υποδηλώνοντας ότι η οδός της νόσου FUS είναι ανεξάρτητη από την TDP-43. (Robberecht & Philips, 2013) (Mejzini et al., 2019) Η FUS συνδέεται σε περισσότερα από 5.500 γονίδια μέσω ενός μοτίβου δέσμησης GUGGU και η εξάντληση της μεταβάλλει το μάτισμα σχεδόν 1.000 mRNA. Οι μεταλλάξεις FUS διαταράσσουν το σήμα πυρηνικού εντοπισμού της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα την εσφαλμένη εντόπισή της στο κυτταρόπλασμα, οδηγώντας έτσι σε συσσωμάτωση FUS, τοξικότητα και επακόλουθη απώλεια της πυρηνικής λειτουργίας. (Robberecht & Philips, 2013) (Prasad et al., 2019) Υπάρχει συζήτηση ως προς το εάν η τοξικότητα προκαλείται κυρίως από τα συσσωματώματα FUS άμεσα ή μέσω μιας αύξησης του διαλυτού FUS στο κυτταρόπλασμα μετά την ανακατανομή του. (Mejzini et al., 2019) Η FUS είναι επίσης παρούσα στη νευρομυϊκή σύνδεση (NMJ) και παίζει ρόλο στην τοπική μετάφραση και στη συναπτική δομή και λειτουργία. Ωστόσο, μελέτες έχουν δείξει ότι η απώλεια του FUS από μόνη της είναι ανεπαρκής για να προκαλέσει FUS-ALS, υποδηλώνοντας ότι μπορεί να εμπλέκονται και άλλοι παράγοντες. (Prasad et al., 2019)

Η ALS είναι μια σύνθετη ασθένεια, η οποία περιλαμβάνει και πολλούς πιθανούς περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου, επίσης. Μερικοί από αυτούς είναι κάπνισμα, σωματική δραστηριότητα, τραυματισμοί στο κεφάλι, μεταβολικές και φλεγμονώδεις καταστάσεις, έκθεση σε τοξίνες και ιστορικό καρκίνου ή ηλεκτροπληξίας. Ορισμένες μελέτες υποδεικνύουν ότι το τραύμα στο κεφάλι μπορεί να αυξήσει την πιθανότητα εμφάνισης ALS, ενώ η υπερχοληστερολαιμία και η χρήση στατινών μπορεί να μειώσουν τον κίνδυνο. Έχουν αναφερθεί αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με τα επίπεδα λιπιδίων και τη χρήση ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων. Μια αναδρομική μελέτη επαγγελματιών ποδοσφαιριστών έδειξε υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης ALS, ιδιαίτερα σε αυτούς που έπαιζαν για περισσότερα από 5 χρόνια, χωρίς να υπάρχει επαρκής εξήγηση για το γεγονός αυτό. Ωστόσο, οι μόνοι καθορισμένοι παράγοντες κινδύνου για ALS είναι μόνο η ηλικία, το φύλο και το οικογενειακό ιστορικό. (Ralli et al., 2019)



#### 4.1.4 ΠΩΣ ΓΙΝΕΤΑΙ Η ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Η διάγνωση της ALS (Amyotrophic Lateral Sclerosis) βασίζεται σε κλινικά ευρήματα και συμπτώματα, καθώς δεν υπάρχουν συγκεκριμένες εξετάσεις. Η διάγνωση περιλαμβάνει την αξιολόγηση των ανώτερων και κατώτερων κινητικών νευρώνων και τη συλλογή ιστορικού ασθενούς. Οι κλινικοί γιατροί χρησιμοποιούν κριτήρια όπως τα κριτήρια El Escorial και Airlie House για να ταξινομήσουν τη σοβαρότητα και τη βεβαιότητα της νόσου. Η διάγνωση συνήθως καθυστερεί λόγω της σταδιακής προόδου των συμπτωμάτων, απαιτώντας μεγάλο χρονικό διάστημα (8-15 μήνες) για την οριστική διάγνωση. Οι εξετάσεις περιλαμβάνουν MRI, ηλεκτρομυογραφία, μελέτες αγωγιμότητας νευρών, διακρανιακή μαγνητική διέγερση και εργαστηριακές εξετάσεις όπως βιοψίες δέρματος. Οι εξετάσεις αυτές βοηθούν στη διάγνωση, διαφοροποιώντας την ALS από άλλες παθήσεις με παρόμοια συμπτώματα. Οι βιοδείκτες του αίματος μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για τη διάγνωση και πρόγνωση της ALS. Συνολικά, μια ολοκληρωμένη αξιολόγηση είναι απαραίτητη για τη διάγνωση της ALS και την αποκλεισμό άλλων παθήσεων. (Kaur et al., 2016) (Hardiman et al., 2017) (Ralli et al., 2019)

#### 4.1.5 Η ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Η νόσος ALS (Amyotrophic Lateral Sclerosis) δεν έχει αυτή τη στιγμή θεραπεία και οι υπάρχουσες θεραπείες επικεντρώνονται κυρίως στη διαχείριση των συμπτωμάτων, την επιβράδυνση της προόδου της νόσου και τη βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών. Έχουν μελετηθεί περισσότερα από 50 φάρμακα με διάφορους μηχανισμούς δράσης για τη θεραπεία της ALS, αλλά λόγω διάφορων αιτιών δεν έχουν καταφέρει να φτάσουν στην αγορά. Οι πιο γνωστές θεραπείες είναι η ριλουζόλη (Riluzole) και το Edaravone (Radicava), με μέτρια οφέλη στην επιβίωση και την επιβράδυνση της νόσου. (Vucic et al., 2014) (Hardiman et al., 2017) (Mejzini et al., 2019) Μια ακόμα βασική προσέγγιση για τη διαχείριση των συμπτωμάτων της ALS περιλαμβάνει έγκαιρες παρεμβάσεις όπως η ρινογαστρική σίτιση, η πρόληψη της εισρόφησης και η παροχή αναπνευστικής υποστήριξης. (R. H. Brown & Al-Chalabi, 2017) Η αναπνευστική ανεπάρκεια, συχνά η αιτία θανάτου σε ασθενείς με ALS, μπορεί να ανακουφιστεί μέσω μη επεμβατικού αερισμού. Οι προσεγγίσεις πολυθεραπείας που περιλαμβάνουν ανταγωνιστές γλουταμικού, αντιοξειδωτικά, αντι-αποπτωτικούς παράγοντες και αντιφλεγμονώδεις παράγοντες διερευνώνται ως πιθανές στρατηγικές για τη διαχείριση της ALS. (Kaur et al., 2016) Επιπλέον, υπάρχουν αρκετές πολλά

υποσχόμενες θεραπευτικές προσεγγίσεις που εξετάζονται. Αυτές περιλαμβάνουν θεραπείες κυτταρικής αντικατάστασης, ιδίως νευρωνικά βλαστοκύτταρα (NSC) και μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (MSC). (Robberecht & Philips, 2013) (Vucic et al., 2014) Τέλος, το Bexarotene (Bxt), ένας αγωνιστής του ρετινοειδούς υποδοχέα X, έχει αποδειχθεί πολλά υποσχόμενη θεραπευτική παρέμβαση για νευροεκφυλιστικές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένης της ALS. (Kaur et al., 2016)

## 4.2 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΤΟΥ ΚΙΝΗΤΙΚΟΥ ΝΕΥΡΩΝΑ

### 4.2.1 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Την τελευταία δεκαετία, έχουν σημειωθεί σημαντικές εξελίξεις στον τομέα των γενετικών δοκιμών για την ALS. Προηγουμένως, ο εμπορικός γενετικός έλεγχος για το ALS περιοριζόταν μόνο στην αλληλούχιση του γονιδίου SOD1.

Η αξιοσημείωτη πρόοδος που πραγματοποιήθηκε στον εντοπισμό γονιδίων που σχετίζονται με τη νόσο, οδήγησαν σε καλύτερη κατανόηση του γενετικού μηχανισμού που εμπλέκεται τόσο σε οικογενείς όσο και σε σποραδικές περιπτώσεις. Τα εμπορικά εργαστήρια, πλέον προσφέρουν μια σειρά από πολυγονιδιακά πάνελ για δοκιμές ALS καθώς και συνδυασμένες δοκιμές ALS-FTD, καθώς και δοκιμές ειδικά σχεδιασμένες για την ανίχνευση της γενετικής ανωμαλίας επέκτασης του C9orf72. Επιπλέον, χρησιμοποιείται η αλληλούχιση όλων των εξωνίων (Whole Exome Sequencing, WES), η οποία περιλαμβάνει τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των περιοχών που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του γονιδιώματος ενός ατόμου. Η τεχνική αυτή όμως, δεν μπορεί να ανιχνεύσει παραλλαγές σε μη κωδικοποιητικές περιοχές ή στο μιτοχονδριακό DNA, ούτε μπορεί να ανιχνεύσει επαναλαμβανόμενες επεκτάσεις ή παραλλαγές μεγάλου αριθμού αντιγράφων.

Ο εντοπισμός συγκεκριμένων γενετικών αιτιών έχει ανοίξει νέες ευκαιρίες για την ανάπτυξη γονιδιακών θεραπειών, δίνοντας έτσι ελπίδα στα άτομα που πάσχουν από ALS. Οι γονιδιακές θεραπείες αναπτύσσονται επί του παρόντος και κινούνται μέσω κλινικών δοκιμών. Προϋπόθεση όμως, για την επιτυχία τους, αποτελεί η ενημέρωση με τις πιο πρόσφατες εξελίξεις στις τεχνολογίες γενετικών δοκιμών αλλά και η διασφάλιση της πρόσβασης στις κατάλληλες μεθόδους και τεχνικές γονιδιακού ελέγχου.

Η αξία του γενετικού ελέγχου στην κλινική διαχείριση εκτιμάται ιδιαίτερα από τους

ασθενείς, αν και, στις περισσότερες χώρες, όπως πχ οι Ηνωμένες Πολιτείες, δεν υπάρχουν κατευθυντήριες γραμμές που να αφορούν την παροχή γενετικών εξετάσεων σε ασθενείς με ALS. Στις περιπτώσεις που αφορούν οικογενή νόσο, υπάρχει μια αυξανόμενη τάση για την προσφορά γενετικών εξετάσεων σε ασθενείς, γεγονός το οποίο δεν παρατηρείται αντίστοιχα σε περιστατικά φαινομενικά σποραδικής νόσου. Σύμφωνα με αποτελέσματα μελετών, προτείνεται σε όλους τους ασθενείς, ανεξάρτητα από το οικογενειακό τους ιστορικό, να πραγματοποιείται εξέταση για την επέκταση του C9orf72 λόγω της σημαντικής συχνότητάς του σε σποραδικές περιπτώσεις. Ο περιορισμός της προσφοράς της δοκιμής επέκτασης C9orf72 σε ασθενείς με ALS με θετικό οικογενειακό ιστορικό θα είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια του 50% των φορέων. Η ανίχνευση επέκτασης C9orf72 απαιτεί επί του παρόντος μια εξειδικευμένη ανάλυση- μια επαναλαμβανόμενη δοκιμασία αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), η οποία μπορεί να συνδυαστεί με μια δοκιμασία μήκους φθορισμού αμπλικόνιου. Αυτή η δοκιμή διατίθεται στο εμπόριο σε σχετικά χαμηλό κόστος. Οι δοκιμές που βασίζονται σε PCR για την ανίχνευση επεκτάσεων στο γονίδιο C9orf72 έχουν αμφισβητηθεί για την ακρίβειά τους. Το ακριβές μέγεθος της επαναλαμβανόμενης επέκτασης είναι δύσκολο λόγω της επαναλαμβανόμενης φύσης και της πλούσιας σε GC περιεκτικότητας του γονιδίου, καθώς και της σωματικής αστάθειας. Σε μια μελέτη που συνέκρινε τεχνικές που βασίζονται σε PCR, ορισμένα εργαστήρια ανέφεραν ασυνεπή αποτελέσματα σε σύγκριση με τη μέθοδο αναφοράς Southern blot.

Για ασθενείς με οικογενειακό ιστορικό ALS ή ALS-FTD που το αποτέλεσμα είναι αρνητικό για την επέκταση C9orf72, συνίσταται η πραγματοποίηση πολυγονιδιακών δοκιμών σε πάνελ. Αυτά τα πάνελ χρησιμοποιούν τεχνολογία αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS) με μαζική παράλληλη τεχνολογία αλληλούχισης για να επιτυγχάνεται ανάλυση μερικών έως εκατοντάδων γονιδίων ταυτόχρονα, με οικονομικό και χρονικά αποδοτικό τρόπο. Ένα ολοκληρωμένο πάνελ ALS-FTD θα πρέπει να περιλαμβάνει γονίδια που εμπλέκονται συνήθως όπως SOD1, FUS, TARDBP, TBK1, VCP, SQSTM1, UBQLN2, GRN και MAPT.

Τέλος, ένα ακόμα γονίδιο που μπορεί να ελεγχθεί σε οικογενείς και πρώιμες περιπτώσεις ALS, όπου δε βρέθηκε γενετική αιτία μετά από έλεγχο στο C9orf72 και σε πολυγονιδιακή δοκιμή πάνελ, είναι το ATXN2 μέσω εξειδικευμένων αναλύσεων

για τον εντοπισμό παθογόνων επεκτάσεων στο ως αιτία της ALS. (Roggenbuck & Fong, 2020) (Roggenbuck et al., 2017) (Renton et al., 2011)

#### 4.2.2 ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS) είναι μια νευροεκφυλιστική νόσος που απαιτεί έγκαιρη διάγνωση και ακριβείς προγνωστικές πληροφορίες για την καθοδήγηση των θεραπευτικών προσεγγίσεων. Ο εντοπισμός βιοδεικτών που μπορούν να ικανοποιήσουν αυτές τις ανάγκες είναι ζωτικής σημασίας. Ο ιδανικός βιοδείκτης για την ALS θα πρέπει να είναι αρκετά ευαίσθητος ώστε να ανιχνεύει τη νόσο σε προσυμπτωματικά στάδια, ειδικά για την ALS, να μπορεί να τη διακρίνει από άλλες παρόμοιες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, να είναι προγνωστικός της εξέλιξης της νόσου σε μεμονωμένους ασθενείς και να είναι εύκολα προσβάσιμος ανεξάρτητα από τη φυσική κατάσταση του ασθενούς. Διάφοροι βιοδείκτες έχουν διερευνηθεί στο ALS.

Οι μοριακοί δείκτες στα βιολογικά υγρά έχουν διερευνηθεί εκτενώς. Τα νευροϊνίδια (NFs), συγκεκριμένα τα NFH και NFL, έχουν αναδειχθεί ως πολλά υποσχόμενοι βιοδείκτες για την ALS, που δείχνουν δυνατότητες διάγνωσης και πρόγνωσης. Φλεγμονώδη μόρια, μεταβολικοί δείκτες και microRNAs (miRNAs) έχουν επίσης διερευνηθεί, αλλά κανένα από αυτά δεν πληροί μεμονωμένα τις απαιτήσεις για έναν γενικό βιοδείκτη. Οι κυτοκίνες, το γλουταμινικό, τα πολυ-διπεπτίδια που προέρχονται από επεκτάσεις GGGGCC στο C9ORF72, το TDP-43 και τα miRNAs έχουν δείξει επίσης, συσχετίσεις με την εξέλιξη της ALS. Ενώ ακόμη, η εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα νευροτροφίνης p75 (*p75 Neurotrophin Receptor Extracellular Domain -p75ECD*) στα ούρα έχει επιδείξει προγνωστική αξία. (Moreno-Martinez et al., 2019) (Pampalakis et al., 2019)

##### *Neurofilament proteins*

Τα νευροϊνίδια είναι κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες σε νευρώνες που ερευνώνται ως πιθανοί βιοδείκτες για το ALS και άλλες νευρολογικές διαταραχές. Ο τραυματισμός των νευρικών αξόνων οδηγεί σε απελευθέρωση αυτών των πρωτεϊνών στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και στη συνέχεια στο αίμα. Οι πρώιμες μελέτες αποκάλυψαν αυξημένα επίπεδα φωσφορυλιωμένης βαριάς αλυσίδας νευρονηματίων (pNFH) αλλά και ελαφριάς αλυσίδας νευρονηματίων (NFL) στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με

ALS σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες. Επιπλέον, τα υψηλά επίπεδα pNFH και NFL στο CSF συνδέθηκαν με ταχύτερη εξέλιξη της νόσου και μειωμένη επιβίωση, ενώ συσχετίστηκαν επίσης με τη συμμετοχή των ανώτερων κινητικών νευρώνων (UMN), υποδεικνύοντας πιθανή χρήση του pNFH στη διάκριση του εκφυλισμού των ανώτερων και των κατώτερων κινητικών νευρώνων. Συνιστάται προσοχή κατά την ερμηνεία του NFL ως βιοδείκτη στα βιολογικά υγρά, λόγω της αστάθειάς του και της ευαισθησίας του στην αποικοδόμηση πρωτεΐσης. Εν τω μεταξύ, μελέτες δείχνουν ότι τα επίπεδα pNFH και NFL αυξάνονται σημαντικά στα βιορευστά κοντά ή κατά την έναρξη των συμπτωμάτων σε ασθενείς με ALS. (Vu & Bowser, 2017) (Huang et al., 2020) Διαχρονικές μελέτες υποδηλώνουν ότι τα επίπεδα NFL τόσο στο αίμα όσο και στο ΕΝΥ παραμένουν σταθερά με την πάροδο του χρόνου. Η σταθερότητα αυτών των πρωτεϊνών νευροινιδίων στο ΕΝΥ και στο περιφερικό αίμα υποδηλώνει την πιθανή εφαρμογή τους ως προγνωστικοί βιοδείκτες σε κλινικές δοκιμές, διευκολύνοντας τη διαστρωμάτωση των συμμετεχόντων με βάση τα αναμενόμενα ποσοστά εξέλιξης της νόσου. (Benatar et al., 2016) Υψηλότερα επίπεδα pNFH στο πλάσμα του αίματος έχουν βρεθεί σε ασθενείς με ALS σε σύγκριση με υγιή άτομα. Αν και δεν υπήρχε σημαντική διαφορά σε σύγκριση με ασθενείς ελέγχου, υψηλότερα επίπεδα pNFH συσχετίστηκαν με ταχύτερη μείωση της βαθμολογίας ALSFRS-R στους 4 μήνες από την έναρξη της νόσου. Ωστόσο, αυτή η συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε στους 12 μήνες. Είναι ενδιαφέρον ότι τα αυξημένα επίπεδα pNFH στο πλάσμα και στον ορό συσχετίστηκαν με μικρότερο χρόνο επιβίωσης και bulbar onset μορφή της νόσου. Όσον αφορά τα NFL, τα επίπεδα ήταν σημαντικά υψηλότερα σε ασθενείς με ALS από ότι τόσο οι υγιείς μάρτυρες όσο και οι φορείς μετάλλαξης (C9orf72, SOD1, TARDP, FUS) που ήταν ασυμπτωματικοί. (Vu & Bowser, 2017) Τα pNFH και NFL μπορούν να ανιχνευθούν μέσω ανοσοπροσδιορισμών που βασίζονται σε αντισώματα όπως είναι η ELISA. (Benatar et al., 2016)

### *TDP-43*

Το TDP-43 είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη που μπορεί να μετατοπιστεί στο κυτταρόπλασμα όταν μεταλλάσσεται ή κάτω από συνθήκες στρες. Στην ALS, το TDP-43 συσσωματώνεται και σχηματίζει συσσωματώματα θετικά στην ουβικιτίνη. Αυτά τα συσσωματώματα υπάρχουν στην πλειονότητα των περιπτώσεων ALS, εκτός από αυτές που προκαλούνται από συγκεκριμένες παραλλαγές γονιδίων. Επομένως, τα συσσωματώματα TDP-43 θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως γενικός βιοδείκτης για

το ALS. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει αυξημένα επίπεδα TDP-43 στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) και στο πλάσμα ασθενών με ALS αλλά και FTD. Διαφορετικά αντισώματα μονής αλυσίδας έχουν αναπτυχθεί για να στοχεύουν συγκεκριμένες παραλλαγές TDP-43. Συγκεκριμένα, οι φορείς του γονιδίου C9ORF72 της επέκτασης εξανουκλεοτιδίου έχουν διαφορετικές μορφές TDP-43 στο πλάσμα τους σε σύγκριση με ασθενείς με SALS. Επομένως, αυτά τα αντισώματα θα μπορούσαν να βοηθήσουν όχι μόνο στη διάγνωση της ALS αλλά και στη διαστρωμάτωση των ασθενών σε διαφορετικούς υποτύπους. Τα επίπεδα TDP-43 στο ENY μπορούν επίσης να βοηθήσουν στη διαφοροποίηση της ALS από άλλες καταστάσεις όπως η νόσος του Πάρκινσον, η σκλήρυνση κατά πλάκας και το σύνδρομο Guillain-Barré. (Pampalakis et al., 2019) Σε μελέτες, προκειμένου να μετρηθεί η συγκέντρωση της πρωτεΐνης TDP-43 χρησιμοποιήθηκε μέθοδος ELISA με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού και ένα πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού κατά του TDP-43. Η πρωτεΐνη αρχικά πολλαπλασιάστηκε μέσω PCR και στη συνέχεια εκφράστηκε σε βακτήριο *E. coli*. Ενώ τέλος, έγινε ανίχνευση της φωταύγειας χρησιμοποιώντας ειδικό όργανο (Lumistar Optima). (Verstraete et al., 2012) Παρά τα πολλά υποσχόμενα ευρήματα, τα απόλυτα επίπεδα του TDP-43 ποικίλλουν μεταξύ των μελετών λόγω ασυνεπειών στις ανοσοδοκιμασίες, εν μέρει επειδή το TDP-43 μπορεί να αυτοσυσσωματωθεί και να σχηματίσει δομές που εμποδίζουν την ανίχνευση. Τα επίπεδα του TDP-43 έχουν αξιολογηθεί και στο πλάσμα όπου παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα σε ασθενείς με ALS σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη τους περιορισμούς των σημερινών ανοσοδοκιμών TDP-43, η πιθανή χρησιμότητα του TDP-43 στο αίμα του βιοδείκτη παραμένει αβέβαιη. (Vu & Bowser, 2017) Επιπλέον, το TDP-43 έχει βρεθεί στο δέρμα ασθενών με ALS, υποδηλώνοντας την πιθανή χρήση βιοψιών δέρματος για τη διάγνωση της ALS. (Pampalakis et al., 2019)

### *SOD1*

Αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει αλλαγές στην έκφραση του SOD1 σε ιστούς και βιολογικά υγρά, χρησιμοποιώντας την ELISA για τη μέτρηση του ολικού SOD1 και/ή του κακώς διπλωμένου SOD1. Χρησιμοποίησαν εξειδικευμένα αντισώματα σχεδιασμένα για τον εντοπισμό λανθασμένα αναδιπλωμένων μορφών του SOD1. Ωστόσο, τα ευρήματα από αυτές τις μελέτες ήταν αντιφατικά. Σε μία μελέτη, δεν βρέθηκαν διαφορές στα επίπεδα των λανθασμένα αναδιπλωμένων SOD1 μεταξύ



οικογενών και σποραδικών περιπτώσεων της νόσου CSF. Παρομοίως, σε άλλη μελέτη, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα συνολικά επίπεδα SOD1 στο CSF ασθενών με ALS σε σύγκριση με τους νευρολογικά υγιή δείγματα ελέγχου. Επομένως, τα αποτελέσματα δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των ασθενών με ALS και των μαρτύρων, υποδεικνύοντας ότι δεν αποτελεί διαγνωστικό βιοδείκτη. Ωστόσο, οι ερευνητές παρατήρησαν ότι τα επίπεδα SOD1 του CSF ήταν αυξημένα σε ασθενείς με ALS και παρέμειναν σταθερά με την πάροδο του χρόνου, υποδηλώνοντας το SOD1 ως πιθανό φαρμακοδυναμικό βιοδείκτη. Επίσης, βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα SOD1 του CSF σε άνδρες ασθενείς με ALS, υποδηλώνοντας ότι είναι ένας πιθανός βιοδείκτης διαστροφμάτωσης φύλου (Vu & Bowser, 2017)(Benatar et al., 2016)

### *DPRs*

Οι πρόσφατες μελέτες που ανακάλυψαν ότι οι διπεπτιδικές επαναλαμβανόμενες πρωτεΐνες (DRPs), που προκύπτουν από την επαναλαμβανόμενη μη ATg μετάφραση (RAN), υπάρχουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα ασθενών με επέκταση του γονιδίου C9ORF72, άνοιξε το δρόμο για τη χρήση τους ως βιοδείκτες της νόσου. Οι ανοσοδοκιμασίες που πραγματοποιήθηκαν για τα DPRs poly(GP), poly(GR), poly(PA), poly(PR) και poly(GA) έδειξαν ότι όλα τα DRPs μπορούσαν να ανιχνευθούν σε πολλαπλές περιοχές του εγκεφάλου ασθενών που είχαν τη μετάλλαξη για τις επαναλαμβανόμενες επεκτάσεις του C9ORF72, με χαμηλότερα επίπεδα στο νωτιαίο μυελό, ενώ τα υψηλότερα επίπεδα βρέθηκαν στο poly (GP) στην παρεγκεφαλίδα. Μια άλλη μελέτη βρήκε DRPs μόνο στο CSF ασθενών με επέκταση του C9ORF72, υπονοώντας την πιθανή χρήση του στη διαστροφμάτωση ασθενών. Ωστόσο, η συσχέτισή τους με τις κλινικές παραμέτρους της νόσου είναι ασαφής, καθώς τα στοιχεία δείχνουν πως ίσως πρόκειται για έναν ημιποσοτικό δείκτη κάτι που δικαιολογεί περαιτέρω διερεύνηση. (Jeromin & Bowser, 2017) Άλλες προκλήσεις σχετικά με τη χρήση των DPRs περιλαμβάνουν την περιορισμένη διαθεσιμότητα ειδικών ανοσοαντιδραστηρίων για κάθε μεμονωμένο είδος πρωτεΐνης και την ανάγκη για περισσότερα δεδομένα σχετικά με τα επίπεδα έκφρασής τους. (Benatar et al., 2016)

### *p75 Neurotrophin Receptor Extracellular Domain*

Ο υποδοχέας νευροτροφίνης p75NTR είναι ένας υποδοχέας για αυξητικούς παράγοντες που ονομάζονται νευροτροφίνες, οι οποίοι διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο

στην επιβίωση και τη διαφοροποίηση των νευρώνων. Σε ανθρώπους και τρωκτικά, η έκφραση του p75NTR είναι υψηλή στους κινητικούς νευρώνες κατά την ανάπτυξη αλλά μειώνεται μετά τη γέννηση. Ωστόσο, μετά από τραυματισμό νευρών, το p75NTR εκφράζεται εκ νέου και τα πειράματα έχουν δείξει αυξημένα επίπεδα της εξωκυτταρικής περιοχής του p75NTR (p75NTRECD) στα ούρα τραυματισμένων αρουραίων. Παρόμοια ευρήματα έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με ALS, υποδηλώνοντας ότι το p75NTRECD των ούρων θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως πιθανός βιοδείκτης για τη νόσο. Τα προκαταρκτικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι τα επίπεδά του αυξάνονται τη στιγμή που εμφανίζονται τα συμπτώματα του ALS, καθιστώντας το έναν πολλά υποσχόμενο δείκτη για την εξέλιξη της νόσου και πιθανές θεραπευτικές δοκιμές. (Benatar et al., 2016)

#### *Βιοδείκτες σχετικοί με την διεγερτοτοξικότητα του γλουταμινικού*

Μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση του mGLUR2, ενός προστατευτικού υποδοχέα έναντι της διεγερτοτοξικότητας, βρέθηκε ότι μειώνεται στα λεμφοκύτταρα T σε ασθενείς με σποραδική ALS, υποδεικνύοντας γλουταμινεργική δυσλειτουργία τόσο στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) όσο και στο περιφερικό αίμα. με ALS. Τα επίπεδα άλλων γονιδίων mGluR ήταν παρόμοια με υγιείς μάρτυρες και ασθενείς με άλλες νευρολογικές διαταραχές. Οι ανωμαλίες στην έκφραση του mGluR στα T λεμφοκύτταρα θα μπορούσαν ενδεχομένως να χρησιμεύσουν ως περιφερειακός δείκτης για την πρόιμη διάγνωση της ALS και μπορεί να έχουν επιπτώσεις για μελλοντικές προσεγγίσεις έρευνας και θεραπείας. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν απομόνωση κυττάρων του αίματος, στη συνέχεια το ολικό RNA απομονώθηκε από τα T λεμφοκύτταρα και μεταγράφηκε αντίστροφα σε συμπληρωματικό DNA (cDNA). Τέλος, ακολούθησε η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), κατόπιν επιλογής των κατάλληλων εκκινητών PCR από την GenBank database. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν από άλλες μελέτες, οι οποίες ανίχνευαν υψηλή συγκέντρωση γλουταμινικού στο CSF πολλών ασθενών. Μια νέα μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) με κουλομετρική ανίχνευση αναπτύχθηκε για τη μέτρηση των συγκεντρώσεων γλουταμινικού στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. (Robelin & Gonzalez De Aguilar, 2014) (Poulopoulou et al., 2005) (Spreux-Varoquaux et al., 2002)

### *Βιοδείκτες σχετικοί με το οξειδωτικό στρες*

Διάφοροι μεταβολίτες έχουν προταθεί ως πιθανοί βιοδείκτες για να υποδείξουν την παρουσία οξειδωτικού στρες σε ασθενείς με ALS. Σε μια μελέτη παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής γλουταθειόνης μειώθηκε στα ερυθροκύτταρα ασθενών με ALS και αυτή η μείωση βρέθηκε να συσχετίζεται με τη διάρκεια της νόσου. Άλλοι ερευνητές ανακάλυψαν αυξημένα επίπεδα 8-υδροξυ-2'-δεοξυγουανωσίνης (8OH2'dG), ενός δείκτη οξειδωτικής βλάβης του DNA, σε ασθενείς με ALS. Είναι ενδιαφέρον ότι τα επίπεδα του 8OH2'dG ήταν υψηλότερα σε ασθενείς με limb onset μορφή της ALS σε σύγκριση με αυτούς με bulbar onset. Αυτή η αύξηση στη συγκέντρωση 8OH2dG παρατηρήθηκε επίσης στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με ALS. Επιπλέον, αυξημένες ποσότητες 4-υδροξυ-2,3-νενεάλης, ένα υποπροϊόν της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, και προσταγλανδίνης E2, που παίζει ρόλο στη δημιουργία ελεύθερων ριζών, ανιχνεύθηκαν τόσο στον ορό όσο και στο CSF ασθενών με ALS. (Robelin & Gonzalez De Aguilar, 2014)

### *Βιοδείκτες σχετικοί με την ανοσολογική απόκριση στη φλεγμονή*

Τόσο οι έμφυτες όσο και οι προσαρμοστικές ανοσοαποκρίσεις εμπλέκονται στην εξέλιξη της ALS και μπορούν να προάγουν είτε νευροπροστασία είτε νευροτοξικότητα ανάλογα με το στάδιο της νόσου, αποδεικνύοντας τον διπλό ρόλο της φλεγμονής στην ALS. Αρχικά, υπάρχει μια πρόιμη αντιφλεγμονώδης ή νευροπροστατευτική φάση, όπου νευροτροφικοί παράγοντες και αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως η ιντερλευκίνη (IL)-4 και η IL-10, εκκρίνονται από τα περιβάλλοντα αστροκύτταρα και τη μικρογλοία. Καθώς η νόσος εξελίσσεται, η νευροπροστατευτική απόκριση αλλάζει σε κυτταροτοξική φάση και ακολουθεί απελευθέρωσης τοξικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και των προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως η IL-1β και ο παράγοντας νέκρωσης όγκου. TNF-α, που προκαλεί προοδευτική βλάβη στους κινητικούς νευρώνες. (Moreno-Martinez et al., 2019)

Η σοβαρότητα της νόσου, όπως μετράται με το ALSFRS-R, συσχετίζεται με υψηλά επίπεδα IL-8 στο CSF και υψηλά επίπεδα ευρείας περιοχής C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (wrCRP). Επιπλέον, τα υψηλότερα επίπεδα στο πλάσμα των IP-10, ιντερλευκίνη IL-5, L-φερριτίνης και MCP-1 από το CSF σε συνδυασμό με μια ιδιαίτερη αναλογία της ιντερφερόνης γ (IFN-γ) από το CSF προς την IFN-γ από το πλάσμα του αίματος, προέβλεψαν μεγαλύτερη επιβίωση του ασθενούς, ενώ υψηλότερα επίπεδα στο CSF

της ιντερλευκίνης IL-8 προέβλεπαν μικρότερη διάρκεια ζωής. (Jeromin & Bowser, 2017) Η φλεγμονώδης απόκριση υποδεικνύεται επίσης, από αυξημένα επίπεδα φλεγμονωδών παραγόντων όπως η IL-6 τόσο στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό όσο και στο πλάσμα. Ωστόσο, σε αντίθεση με τα επίπεδα του CSF, τα επίπεδα στο πλάσμα δείχνουν μείωση στους ανοσολογικούς παράγοντες ιντερλευκίνες IL-5 και IL-2, υποδηλώνοντας μειωμένη ανοσοαπόκριση και αυξημένο οξειδωτικό στρες. (Vu & Bowser, 2017)

Ορισμένες μελέτες έχουν παρατηρήσει αυξημένα επίπεδα TNF-α στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και στο αίμα ασθενών με ALS, ενώ άλλες έχουν βρει χαμηλότερα επίπεδα στο αίμα. Επιπλέον, τα επίπεδα του TNF-α δεν συσχετίστηκαν σταθερά με τη σοβαρότητα ή την εξέλιξη της νόσου. Αυτές οι αποκλίσεις μπορεί να οφείλονται στην πλειοτροπική φύση του TNF-α, καθώς μπορεί να ασκήσει τόσο προφλεγμονώδη όσο και αντιφλεγμονώδη δράση, επομένως ο ρόλος του παραμένει αβέβαιος. (Moreno-Martinez et al., 2019)

Ακόμη, είναι ενδιαφέρον ότι ο αυξητικός παράγοντας TGF-β1 βρέθηκε ότι είναι αυξημένος στο πλάσμα, θετικά συσχετιζόμενος με τη διάρκεια της νόσου. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τις προσδοκίες, καθώς ο TGF-β1 είναι γνωστό ότι έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την κατανόηση του ρόλου του TGF-β1 στην εξέλιξη της ALS. (Vu & Bowser, 2017)

#### *mi-RNAs*

Υπάρχουν πάνω από 1000 miRNA στους ανθρώπους και τυπικά μετρώνται χρησιμοποιώντας μεθοδολογίες αλληλούχησης RNA, μικροσυστοιχίας, Nanostring ή ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qRT-PCR). Στο πλαίσιο των διαταραχών του κεντρικού νευρικού συστήματος, αλλαγές στη ρύθμιση του miRNA έχουν ενοχοποιηθεί και σε ασθένειες με ALS. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα miRNA είναι δυσρυθμισμένα σε ασθενείς με ALS, τόσο στους ιστούς του νωτιαίου μυελού όσο και σε βιορευστά όπως το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, ο ορός και το πλάσμα. Τα περισσότερα επίπεδα miRNAs μειώνονται στο CSF, στον ορό και στο πλάσμα ασθενών με ALS σε σύγκριση με υγιείς και ασθενείς ελέγχου, υποδηλώνοντας τη δυνατότητα τους ως βιοδείκτες για την ALS. Ωστόσο, μερικά miRNAs, όπως τα miRNA-181a-5p, miRNA-143-5p, miRNA-574-5p και miRNA-338-3p, έχουν βρεθεί ότι είναι αυξημένα στο CSF ασθενών με ALS. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την κατανόηση των ειδικών ρόλων αυτών των

miRNAs και των στόχων τους στην παθογένεση του ALS, καθώς και για την επικύρωση των δυνατοτήτων τους ως διαγνωστικοί ή προγνωστικοί βιοδείκτες για το ALS. (Vu & Bowser, 2017)

Συνολικά, αν και έχουν εντοπιστεί πολλοί δυνητικοί βιοδείκτες, κανένας βιοδείκτης δεν έχει επαρκή ευαισθησία ή ειδικότητα για να χρησιμεύσει ως καθολικός δείκτης για την ALS. Ασυνέπειες στη βιβλιογραφία μπορεί να αποδοθούν στην ετερογένεια των ασθενών και στην πολύπλοκη φύση της νόσου. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την ανακάλυψη πιο αξιόπιστων και περιεκτικών βιοδεικτών για τη διάγνωση, την πρόγνωση και τη θεραπευτική παρακολούθηση της ALS. (Moreno-Martinez et al., 2019)

## 5<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΝΟΣΟΣ HUNTINGTON (HD)

### 5.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ

Η νόσος του Huntington (HD), γνωστή παλαιότερα και ως χορεία του Huntington, είναι μια σπάνια γενετική νευροεκφυλιστική διαταραχή που επηρεάζει το κεντρικό νευρικό σύστημα. Πήρε το όνομά της από τον Αμερικανό γιατρό George Huntington, ο οποίος την περιέγραψε για πρώτη φορά το 1872. Η δημοσίευσή του ορόσημο, «On Chorea», παρείχε κρίσιμες γνώσεις για τις κλινικές εκδηλώσεις και την οικογενή φύση της νόσου. Σχετικά πρόσφατα, το όνομα της άλλαξε σε νόσο του Huntington για να αντικατοπτρίζει το γεγονός ότι η χορεία δεν είναι η μόνη σημαντική εκδήλωση της νόσου. Αυτή η κληρονομική ασθένεια χαρακτηρίζεται από την προοδευτική εκφύλιση των νευρικών κυττάρων στον εγκέφαλο, που οδηγεί στη σταδιακή επιδείνωση τόσο των πνευματικών όσο και των σωματικών ικανοτήτων. Η νόσος συναντάται σε όλο τον κόσμο και σε όλες τις εθνικότητες. Ο παγκόσμιος επιπολασμός της υπολογίζεται ότι είναι 4-5 άτομα ανά ένα εκατομμύριο πληθυσμού. Στις δυτικές χώρες υπολογίζεται ότι είναι 8-10 άτομα ανά 100.000 άτομα. Δεν εμφανίζεται υπεροχή ενός εκ των δύο φύλων στη συχνότητα εμφάνισης. Η μέση ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων είναι τα 40 έτη, αλλά μορφές νεανικής έναρξης (<20 ετών) και όψιμης έναρξης (>70 ετών) είναι επίσης αναγνωρισμένες. (Novak & Tabrizi, 2010) (Zuccato et al., 2010)

#### 5.1.1 Η ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Η νόσος του Huntington χαρακτηρίζεται από απώλεια κυττάρων και ατροφία. Η βλάβη εντοπίζεται στον κερκοφόρο πυρήνα (*caudate nucleus*) και το κέλυφος (*putamen*), τα οποία σχηματίζουν το ραβδωτό σώμα (*striatum*), όπου και παρατηρείται επιλεκτικός εκφυλισμός των GABAεργικών μεσαίου μεγέθους ακανθωδών νευρώνων, ενώ ορισμένοι μεσαίου μεγέθους μη ακανθώδεις χολινεργικοί ενδονευρώνες παραμένουν σχετικά ανέπαφοι. Καθώς η νόσος εξελίσσεται, όλες οι περιοχές-στόχοι του ραβδωτού σώματος εκφυλίζονται, εκτός από κάποιους νευρώνες του ραβδωτού σώματος που προβάλλουν στη μέλαινα ουσία *pars compacta*. Ο κλινικός φαινότυπος της νόσου είναι πιο σύνθετος από απλή διαταραχή κίνησης. Καθώς η νόσος προχωρά, εμπλέκονται και άλλες περιοχές, όπως ο εγκεφαλικός φλοιός, η ωχρή σφαίρα, ο θάλαμος και άλλες. Η προχωρημένη νόσος επηρεάζει επίσης τη λευκή ουσία και άλλες περιοχές του εγκεφάλου. (Zuccato et al., 2010)



Η νόσος του Huntington προκαλείται από μια μεμονωμένη γονιδιακή ανωμαλία στο γονίδιο HTT. Το φυσιολογικό γονίδιο HTT είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της πρωτεΐνης huntingtin, η οποία εκφράζεται σε διάφορα κύτταρα και παίζει ρόλο στη νευρική ανάπτυξη, τη συναπτική λειτουργία και την επιβίωση των κυττάρων μέσω του ελέγχου του BDNF και της πρωτεάσης κασπάση-8. Η μετάλλαξη στο γονίδιο αυτό περιλαμβάνει μια διευρυμένη επανάληψη τρινουκλεοτιδίου CAG (επέκταση πολυγλουταμίνης) που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 4p16.3 και οδηγεί στην παραγωγή μιας μεταλλαγμένης μορφής της πρωτεΐνης huntingtin. Αυτή η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη συσσωρεύεται στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα νευρώνων στο ραβδωτό σώμα και τον φλοιό. Οι συσσωρευμένες πρωτεΐνες είναι ουμπικιτινοποιημένες και σχηματίζουν συσσωματώματα παρόμοια με αμυλοειδή. Η περίσσεια μεταλλαγμένης huntingtin εντός του πυρήνα ή του κυτταροπλάσματος μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρική δυσλειτουργία ή θάνατο. Οι ακριβείς μηχανισμοί παραμένουν ασαφείς, αλλά η μετάλλαξη huntingtin είναι κοινός παράγοντας σε όλα τα άτομα που επηρεάζονται από τη νόσο. (Zuccato et al., 2010) (Novak & Tabrizi, 2010) (Gusella & MacDonald, 2009) (Kegel et al., 2000) Η απλοανεπάρκεια (ανεπάρκεια παραγωγή μιας ζωτικής πρωτεΐνης) θεωρήθηκε αρχικά πιθανή εξήγηση για την παθογένεση της νόσου, όμως τα στοιχεία δείχνουν ότι η HD προκαλείται από *τοξικό κέρδος λειτουργίας*, λόγω συσσώρευσης της μεταλλαγμένης huntingtin πρωτεΐνης. Τα συσσωματώματα της huntingtin διαταράσσουν τις φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου και εμποδίζουν την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Επιπλέον, επηρεάζει αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη μεταγραφή, την απόπτωση, τη μιτοχονδριακή λειτουργία, την καταστολή του όγκου, την απελευθέρωση στις συναπτικές σχισμές και τη μεταφορά νευραξόνων. Η μεταλλαγμένη huntingtin επηρεάζει επίσης τη λειτουργία γειτονικών νευρώνων και νευρογλίων, προκαλώντας δυσλειτουργία στους προσβεβλημένους νευρώνες. Οι παρόμοιες ασθένειες με επαναλήψεις πολυγλουταμίνης υποστηρίζουν την ιδέα του τοξικού κέρδους λειτουργίας στη νόσο του Huntington. (Walker, 2007) Παρακάτω παρουσιάζονται οι βασικοί μηχανισμοί που οδηγούν στο νευροεκφυλισμό στη νόσο Huntington:

#### *Απώλεια BDNF*

Η νόσος του Huntington (HD) χαρακτηρίζεται από την απώλεια του νευροτροφικού παράγοντα που προέρχεται από τον εγκέφαλο (BDNF), ο οποίος είναι σημαντικός για την επιβίωση των μεσαίων ακανθωδών νευρώνων (MSNs). Μελέτες έχουν δείξει ότι

τα επίπεδα BDNF μειώνονται στον φλοιό και το ραβδωτό σώμα ασθενών με HD και ζωικών μοντέλων. Η μείωση του BDNF οφείλεται στη μεταλλαγμένη Huntingtin, η οποία παρεμβαίνει στη γονιδιακή μεταγραφή του BDNF- συγκεκριμένα στον σιγαστήρα RE1/NRSE αλλά και στη διακίνησή του BDNF. Αυτές οι αλλαγές συμβάλλουν στην ευπάθεια και τον εκφυλισμό των MSN σε HD. (Zuccato et al., 2010) (Ghosh & Tabrizi, 2018)

#### *Διεγερτοτοξικότητα*

Η διεγερτοτοξικότητα λόγω υπερβολικής ενεργοποίησης των υποδοχέων NMDARs και αυξημένης απελευθέρωσης γλουταμικού, είναι ένας βασικός παθογόνος μηχανισμός στη νόσο. Οι διαταραχές στη δραστηριότητα των υποδοχέων NMDA, η μείωση του γλουταμικού μεταφορέα, σε συνδυασμό με διαταραγμένη επικοινωνία του φλοιού με το ραβδωτό σώμα, συμβάλλουν στη διεγερτοτοξική διαδικασία. Αυτή η διεγερτοτοξικότητα οδηγεί σε νευρωνική δυσλειτουργία και εκφυλισμό των κυττάρων. Η μείωση της ικανότητας εκκαθάρισης του γλουταμικού επιπλέον συμβάλλει σε αυτήν τη διαδικασία. (Zuccato et al., 2010) (Rikani et al., 2014)

#### *Πρωτεόλυση*

Η πρωτεόλυση της huntingtin από κασπάσες και καλπαΐνες, είναι σημαντική στη νόσο του Huntington (HD), γιατί φαίνεται πως δημιουργεί τοξικά θραύσματα που περιέχουν την επέκταση πολυγλουταμίνης, οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο. Η κασπάση-6 έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα τοξική και συνδέεται με τα συμπεριφορικά και νευροπαθολογικά χαρακτηριστικά της HD. Η αναστολή της διάσπασης από την κασπάση-6 προστατεύει από την ατροφία του ραβδωτού σώματος και τη νευροτοξικότητα. (Zuccato et al., 2010) (Ghosh & Tabrizi, 2018)

#### *Μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες*

Οι μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη νόσο του Huntington (HD). Η μεταλλαγμένη huntingtin, προσδένεται πάνω στα μιτοχόνδρια οδηγώντας σε αλλοιωμένη μεταβολική δραστηριότητα και μειωμένη κινητικότητα εντός των κυττάρων. Οι ασθενείς με HD εμφανίζουν αυξημένες μεταλλάξεις και διαγραφές του μιτοχονδριακού DNA, επηρεάζοντας τη μιτοχονδριακή αναπνοή στους νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού. Παρατηρούνται δυσλειτουργίες στον ενεργειακό μεταβολισμό, συμπεριλαμβανομένης της μειωμένης δραστηριότητας των ενζύμων που εμπλέκονται στην οξειδωτική φωσφορυλίωση και του διαταραγμένου μεταβολισμού

της γλυκόζης. Τα μιτοχόνδρια στην HD βιώνουν επίσης οξειδωτικό στρες, με αποτέλεσμα την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου και πιθανή βλάβη στους νευρώνες. (Zuccato et al., 2010) (Illarioshkin et al., 2018)

#### *Νευροφλεγμονή και μικρογλία*

Η ενεργοποίηση της μικρογλίας και η επαγόμενη νευροφλεγμονή που συνδέεται με το οξειδωτικό στρες, οδηγούν σε νευροεκφυλισμό, όπως έχει αναφερθεί αναλυτικότερα και στην ενότητα 3.1.1. Η παρουσία παθολογικής εναπόθεσης σιδήρου συμβάλλει επίσης στο οξειδωτικό στρες. Η υπερέκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων ως προσαρμοστική απόκριση για την εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών, είναι φαινόμενο που παρατηρείται επίσης στη νόσο. (Illarioshkin et al., 2018)

#### *Μεταγραφική και μεταμεταγραφική απορρύθμιση*

Έρευνες έχουν αποδείξει ότι η μεταλλαγμένη huntingtin είναι υπεύθυνη για τη μεταγραφική και μεταμεταγραφική απορρύθμιση που εμφανίζεται στη νόσο. Φαίνεται πως επηρεάζει την έκφραση γονιδίων που αφορούν τη βιοσύνθεση της χοληστερόλης. Αυτό οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή χοληστερόλης στον εγκέφαλο, με αρνητικές επιπτώσεις σε διάφορες λειτουργίες του εγκεφάλου. Επιπλέον, η μεταλλαγμένη huntingtin επηρεάζει τη δομή της χρωματίνης και τη δραστηριότητα της ακετυλοτρανσφεράσης της ιστόνης, προκαλώντας μειωμένη γονιδιακή μεταγραφή. Τέλος, η μεταμεταγραφική δυσρύθμιση στην HD περιλαμβάνει διαταραχές στο σύστημα των miRNA. Η μείωση ορισμένων miRNA, στοχευόμενων από το REST, και η διαταραχή της αλληλεπίδρασης με τα συστατικά του μονοπατιού σίγησης των microRNAs, οδηγούν σε μειωμένη επεξεργασία των microRNAs. (Zuccato et al., 2010) (Ghosh & Tabrizi, 2018)

### **5.1.2 ΤΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ Η ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ**

Η νόσος του Huntington εκδηλώνεται σε μία περίοδο 15-20 ετών και περιλαμβάνει κινητικά, γνωσιακά και ψυχιατρικά συμπτώματα. Οι κινητικές εκδηλώσεις περιλαμβάνουν χορειακές κινήσεις (ή απλά χορεία) που αποτελούνται από ακούσιες, γρήγορες, ακανόνιστες, σπασμωδικές κινήσεις, ενώ τα γνωσιακά συμπτώματα περιλαμβάνουν επιβράδυνση σκέψης, δυσκολίες μνήμης και εκτελεστικών λειτουργιών. Οι ψυχιατρικές εκδηλώσεις, όπως κατάθλιψη και απάθεια, είναι επίσης

κοινές. Οι ασθενείς αντιμετωπίζουν αυξημένο κίνδυνο αυτοκτονίας και παρουσιάζουν μεταβολικά συμπτώματα και βαριά αναπηρία σε προχωρημένα στάδια. Η άνοια δεν είναι χαρακτηριστική της νόσου, και οι ασθενείς μπορούν ακόμη να αναγνωρίζουν και να αλληλεπιδρούν με τους άλλους. Η νόσος του Huntington προκαλεί σοβαρές επιπτώσεις στην ποιότητα ζωής των ατόμων που την αφορά. (Novak & Tabrizi, 2010) (Mestre et al., 2009)

### 5.1.3 ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ- ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Η νόσος του Huntington ακολουθεί ένα αυτοσωμικό κυρίαρχο πρότυπο κληρονομικότητας, που σημαίνει ότι ένα άτομο που κληρονομεί ένα μόνο αντίγραφο του μεταλλαγμένου γονιδίου HTT από έναν προσβεβλημένο γονέα θα αναπτύξει τη νόσο. Κάθε παιδί ενός προσβεβλημένου ατόμου έχει 50% πιθανότητα να κληρονομήσει το μεταλλαγμένο γονίδιο. Η νόσος του Huntington δεν “προσπερνάει” γενιές, ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, η νεανική νόσος τείνει να κληρονομείται από τους πατέρες, πιθανώς λόγω μειωτικής αστάθειας στην πατρική κληρονομικότητα. (Novak & Tabrizi, 2010) (Myers, 2004) Το γονίδιο HTT θεωρείται «φυσιολογικό» όταν περιέχει λιγότερες από 36 επαναλήψεις της τρινουκλεοτιδικής αλληλουχίας CAG. Εάν το γονίδιο έχει 36 ή περισσότερες επαναλήψεις, θεωρείται μη φυσιολογικό ή επιμηκυμένο, και εάν έχει 40 ή περισσότερες επαναλήψεις CAG, οδηγεί πάντα σε νόσο του Huntington. Όταν το μήκος επανάληψης CAG πέφτει μεταξύ 36 και 39, η διείσδυση της νόσου μειώνεται. Αυτό σημαίνει ότι ορισμένα άτομα με αυτά τα επαναλαμβανόμενα μήκη μπορεί να αναπτύξουν νόσο Huntington, ενώ άλλα όχι. Για όσους τελικά νοσήσουν, είναι πιθανό η νόσος να κάνει την εμφάνισή της αργότερα στη ζωή τους. Τα ενδιάμεσα μήκη επαναλήψεων που κυμαίνονται από 29 έως 35 δεν προκαλούν άμεσα τη νόσο, αλλά μπορεί ενοχοποιηθούν για την εμφάνιση της νόσου σε μελλοντικές γενιές.

Η αστάθεια των ενδιάμεσων αλληλόμορφων είναι μία από τις αιτίες των σποραδικών περιπτώσεων της νόσου του Huntington, όπου η νόσος εμφανίζεται σε άτομα χωρίς εμφανές οικογενειακό ιστορικό. Περίπου το 6-8% των νέων περιπτώσεων της νόσου κατηγοριοποιούνται ως φαινομενικά σποραδικές περιπτώσεις, οι οποίες μπορεί επίσης να προκύψουν λόγω απροσδόκητης ή άγνωστης πατρότητας ή όταν ένας γονέας πεθάνει πριν εμφανίσει συμπτώματα της νόσου.

Σε επίπεδο πληθυσμού, το μήκος των επαναλήψεων CAG σχετίζεται με την ηλικία

στην οποία εκδηλώνονται τα συμπτώματα της νόσου του Huntington. Γενικά, τα άτομα με μεγαλύτερο μήκος επαναλήψεων CAG τείνουν να εμφανίζουν πρωιμότερη έναρξη των συμπτωμάτων. Ωστόσο, το μήκος της επανάληψης αντιπροσωπεύει μόνο το 50-70% της μεταβλητότητας στην έναρξη της νόσου και ο γενετικός έλεγχος δεν μπορεί να προβλέψει αξιόπιστα την έναρξη της νόσου σε ένα άτομο. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, η νεανική νόσος τείνει να κληρονομείται από τους πατέρες, πιθανώς λόγω μειωτικής αστάθειας στην πατρική κληρονομικότητα. (Novak & Tabrizi, 2010) (Walker, 2007) (Myers, 2004) (Ross et al., 2014)

#### **5.1.4 ΠΩΣ ΓΙΝΕΤΑΙ Η ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ**

Η διάγνωση της νόσου του Huntington βασίζεται στα τυπικά συμπτώματα και το οικογενειακό ιστορικό. Η Ενοποιημένη Κλίμακα Αξιολόγησης HD (UHDRS) χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της νόσου. Οι απεικονιστικές τεχνικές όπως η MRI και τα CT scans αποκαλύπτουν τις αλλαγές στον εγκέφαλο, αλλά δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές στα πρώιμα στάδια της νόσου. Προηγμένες τεχνικές απεικόνισης όπως οι σαρώσεις PET και οι λειτουργικές μελέτες MRI έχουν ανιχνεύσει αλλαγές στον εγκέφαλο πριν από την έναρξη των συμπτωμάτων. Η διαφορική διάγνωση είναι σημαντική για την αποκλεισμό άλλων καταστάσεων με παρόμοια συμπτώματα. Η γενετική εξέταση για τη μη φυσιολογική επέκταση της επανάληψης CAG στο γονίδιο HTT είναι η οριστική διάγνωση της νόσου. (Walker, 2007)

#### **5.1.5 Η ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ**

Η θεραπεία της νόσου του Huntington στοχεύει στη διαχείριση των συμπτωμάτων και τη βελτίωση της ποιότητας ζωής, καθώς δεν υπάρχουν θεραπείες που να επιβραδύνουν την εξέλιξή της. Η φαρμακευτική αντιμετώπιση περιλαμβάνει φάρμακα όπως την τετραβεναζίνη- έναν συναπτικό αναστολέα μεταφοράς αμίνης, την δευτετραβεναζίνη και άλλα νευροληπτικά για τη μείωση των κινητικών συμπτωμάτων. Οι παρενέργειες είναι πιθανές και η επιλογή του φαρμάκου γίνεται με βάση κυρίως την κλινική εμπειρία. Οι γνωστικές και ψυχιατρικές εκδηλώσεις αντιμετωπίζονται με αντίστοιχα φάρμακα και ψυχολογικές θεραπείες. Οι μη φαρμακευτικές παρεμβάσεις, όπως η χρήση βοηθητικών συσκευών και οι θεραπείες αποκατάστασης, μπορούν επίσης να είναι χρήσιμες στη διαχείριση των συμπτωμάτων. (Novak & Tabrizi, 2010) (Walker, 2007) (McColgan & Tabrizi, 2018)

## 5.2 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ HUNTINGTON

### 5.2.1 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Ο γενετικός έλεγχος για τη νόσο του Huntington- είτε είναι προληπτικός είτε διαγνωστικός, εκτελείται με ακριβή μέτρηση του μεγέθους της επαναλαμβανόμενης ακολουθίας CAG στο γονίδιο HTT, με σκοπό τη διάκριση μεταξύ φυσιολογικού μήκους επαναλήψεων, ενδιάμεσου μήκους επαναλήψεων και παθογόνων επαναλήψεων. (Novak & Tabrizi, 2010) (De Luca et al., 2021) Λόγω των τεχνικών προκλήσεων της ανίχνευσης και του μεγέθους των επαναλαμβανόμενων επεκτάσεων τρινουκλεοτιδίων CAG, μπορεί να χρειαστούν πολλαπλές μέθοδοι για τον αποκλεισμό ή τον εντοπισμό επαναλαμβανόμενης επέκτασης CAG. Οι περισσότερες επαναλήψεις μπορούν να ανιχνευθούν με την παραδοσιακή PCR. (Caron et al., 1993) Οι δοκιμασίες που βασίζονται στην παραδοσιακή PCR για τον προσδιορισμό του μεγέθους της επανάληψης CAG τυπικά περιλαμβάνουν ενίσχυση χρησιμοποιώντας εκκινητές που πλαισιώνουν την περιοχή επανάληψης CAG, ακολουθούμενη από τριχοειδική ηλεκτροφόρηση. Όποτε ανιχνεύεται μόνο μία κορυφή κατά την ηλεκτροφόρηση, συνήθως εκτελούνται πρόσθετες δοκιμές όπως η ενίσχυση PCR της παρακείμενης περιοχής CCG για να αποκλειστούν σφάλματα και αποτυχία ενίσχυσης PCR ή, στο παρελθόν, ανάλυση Southern blot για την ανίχνευση μεγάλων επεκτάσεων στα αλληλόμορφα. (De Luca et al., 2021) Ωστόσο ακόμη και στην περίπτωση που ένα άτομο φαίνεται να έχει δύο αντίγραφα κανονικού μεγέθους επανάληψης CAG σε ένα συγκεκριμένο γονίδιο, είναι πιθανό να έχει μια πολύ μεγάλη εκτεταμένη επανάληψη CAG που δεν έχει ανιχνευθεί από την αρχική ανάλυση. (Caron et al., 1993) Η αντίστροφη σχέση μεταξύ του μήκους της επανάληψης και της αποτελεσματικότητας της ενίσχυσης είναι ένα αξιοσημείωτο μειονέκτημα της επαναλαμβανόμενης πλευρικής PCR. Επιπρόσθετα, οι πολυμορφισμοί στις πλευρικές αλληλουχίες μπορεί να οδηγήσουν σε αποτυχία της PCR που είναι ειδική για ορισμένα αλληλόμορφα (allele drop-out), που ενδεχομένως οδηγεί σε εσφαλμένες διαγνώσεις. (De Luca et al., 2021) Για να προσδιοριστεί με ακρίβεια η παρουσία μιας μεγάλης εκτεταμένης επανάληψης CAG, μπορεί να απαιτούνται πρόσθετες μέθοδοι δοκιμής όπως PCR με τριπλή εκκίνηση (Triple- Primed PCR, TP-PCR) ή στύπωση κατά Southern. Αυτές οι τεχνικές είναι πιο ευαίσθητες και ικανές να ανιχνεύουν μεγαλύτερες επαναλαμβανόμενες επεκτάσεις που μπορεί να μην εντοπιστούν μέσω τυπικών μεθόδων γενετικών δοκιμών. (Caron et al., 1993) Πιο συγκεκριμένα, η TP-PCR ζευγαρώνει έναν πλευρικό εκκινητή



με έναν τυχαίο εκκινητή εντός της περιοχής της επανάληψης για να δημιουργήσει αμπλικόνια διαφορετικών μεγεθών. Αυτή η μέθοδος έχει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις παραδοσιακές τεχνικές όπως η μεθοδολογία Southern blot. Η TP-PCR παράγει ισχυρή ενίσχυση και αξιόπιστη ανίχνευση όλων των διευρυμένων αλληλόμορφων, ανεξάρτητα από το μέγεθός τους. Τα επιμηκυμένα αλληλόμορφα παράγουν ένα χαρακτηριστικό μοτίβο τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης που μπορεί εύκολα να διακριθεί από το σχέδιο των μη διογκωμένων αλληλόμορφων. Αυτό εξαλείφει την ανάγκη για τη χρονοβόρα και σύνθετη μεθοδολογία της στύπωσης κατά Southern. Η επιτροπή του Αμερικανικού Κολλεγίου Ιατρικής Γενετικής και Γονιδιωματικής (ACMG) αναγνωρίζει την TP-PCR ως την προτιμώμενη μέθοδο για τον γενετικό έλεγχο της νόσου Huntington και συνιστούν τη χρήση κατάλληλων δειγμάτων ελέγχου, που περιλαμβάνουν ένα εύρος επαναλήψεων CAG, τα οποία μπορούν να αξιοποιηθούν χρησιμοποιώντας τα ως εξωτερικά ή εσωτερικά πρότυπα. (De Luca et al., 2021)

Ακόμη, αξίζει να αναφερθεί- καθώς παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και η χρήση των mi-RNAs του CSF ως βιοδείκτες για τη νόσο HD. Μελέτη η οποία συνέκρινε τα επίπεδα των miRNAs στο CSF μεταξύ ατόμων με διάγνωση HD και μαρτύρων, καθώς και μεταξύ προδρομικών ατόμων με διαφορετικά επίπεδα κινδύνου διάγνωσης HD, έδειξε ότι έξι miRNAs (miR-520f-3p, miR-135b-3p, miR-4317, miR-5p392, miR-8082, miR-140-5p) εκφράστηκαν διαφορετικά στο διαγνωσμένο HD σε σύγκριση με τους ελέγχους. Πιο συγκεκριμένα, το μοτίβο της έκφρασης των miRNA στις προδρομικές ομάδες έδειξε μια αύξηση από τους μάρτυρες σε άτομα χαμηλού κινδύνου, ακολουθούμενη από μια επιπλέον αύξηση από τα άτομα χαμηλού κινδύνου σε αυτά μεσαίου κινδύνου, η οποία παρέμεινε υψηλή στις ομάδες μεσαίου κινδύνου έως υψηλού κινδύνου και διαγνωσμένης HD. Οι αναλύσεις έγιναν μέσω αλληλούχησης νέας γενιάς (NGS). Συνολικά, μελέτες σαν την παραπάνω, τονίζουν τη σημασία των πρώιμων αλλαγών των miRNAs στην εξέλιξη της νόσου και τις δυνατότητές τους ως βιοδείκτες για την παρακολούθηση της ανάπτυξης ασθενειών και την αξιολόγηση των προληπτικών θεραπειών. (E. R. Reed et al., 2018)

## 5.2.2 ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Οι βιοχημικοί βιοδείκτες για τη νόσο του Huntington είναι ιδιαίτερα επιθυμητοί αλλά δύσκολο να αναπτυχθούν. Αρκετοί βιοχημικοί δείκτες έχουν διερευνηθεί, ωστόσο λίγοι από αυτούς είναι εφαρμόσιμοι επί του παρόντος στην κλινική πράξη.

### *Μεταλλαγμένη πρωτεΐνη Huntingtin (mHTT)*

Ένας από τους βασικούς βιοχημικούς δείκτες στην νόσο αυτή, είναι η ανίχνευση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης Huntingtin (mHTT). Πρόσφατα κατέστη δυνατός ο εντοπισμός της mHTT από μονοκύτταρα που προέρχονται από το αίμα, με τα επίπεδα της να συσχετίζονται με το φορτίο της νόσου και την ατροφία του κερκοφόρου πυρήνα (*caudate nucleus*). Πολλά υποσχόμενη είναι και η ανίχνευση του mHTT στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Η πρωτεΐνη HTT στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό μπορεί να προέρχεται από τον εγκέφαλο, ως αποτέλεσμα έκκρισης ή απελευθέρωσης από τραυματισμένα ή ετοιμοθάνατα κύτταρα. Το mHTT στο CSF συσχετίζεται με το φορτίο της νόσου, το στάδιο της νόσου και επίσης με τη γνωστική και κινητική απόδοση. Τα επίπεδα μεταλλαγμένης Huntingtin στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό αντανακλούν τα επίπεδα του εγκεφάλου, τα οποία αυξάνονται με το στάδιο της νόσου και μειώνονται μετά από καταστολή της εγκεφαλικής Huntingtin. (McColgan & Tabrizi, 2018) (Tabrizi et al., 2020) (Southwell et al., 2015) Ωστόσο, οι τυπικές μέθοδοι ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών που έχουν εφαρμοστεί προηγουμένως στην ανίχνευση HTT σε προϊόντα λύσης κυττάρων ή ιστών, όπως η ποσοτική ανοσοστύπωση (immunoblotting) δεν είναι επαρκώς ευαίσθητα για την ακριβή ανίχνευση και μέτρηση της πρωτεΐνης HTT στο CSF. Η συγκέντρωση της mHTT μπορεί να ποσοτικοποιηθεί αξιόπιστα με υπερευαίσθητες ανοσοδοκιμασίες που έχουν επικυρωθεί για χρήση σε κλινικές δοκιμές. (Tabrizi et al., 2020) Ένα παράδειγμα μεθόδου που με επιτυχία προσδιορίζει την HTT είναι η τεχνική της ανοσοκατακρήμνισης με βάση μικροσφαιρίδια ακολουθούμενη από κυτταρομετρία ροής (IP-FCM). Το IP-FCM είναι μια εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδος ανίχνευσης πρωτεϊνών που μπορεί να εφαρμοστεί είτε σε μεμονωμένες πρωτεΐνες είτε σε αυτές που βρίσκονται σε πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα. (Southwell et al., 2015)

### *Neurofilament light protein (NfL)*

Η πρωτεΐνη NfL βρίσκεται κυρίως στους άξονες και απελευθερώνεται όταν υπάρχει νευρωνική βλάβη. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι συγκεντρώσεις NfL στο αίμα και στο

εγκεφαλονωτιαίο υγρό αυξάνονται μετά από τραύμα στο κεφάλι και είναι υψηλότερες σε άτομα με νόσο Huntington (HD) σε σύγκριση με υγιή άτομα. Τα αυξημένα επίπεδα NfL συσχετίζονται με την εξέλιξη της νόσου και προβλέπουν το ρυθμό εξέλιξης στην HD. Υψηλότερα επίπεδα NfL παρατηρήθηκαν σε ασθενείς με πιο προχωρημένη HD και σε αυτούς με μεγαλύτερο αριθμό επαναλήψεων CAG, που σχετίζονται με πιο σοβαρές μορφές της νόσου. Τόσο τα επίπεδα CSF όσο και τα επίπεδα NfL στο πλάσμα σχετίζονται με την ατροφία του εγκεφάλου και τη σοβαρότητα της νόσου. Στην προδιαγεγραμμένη μορφή της HD, τα επίπεδα NfL στο πλάσμα μπορούν να προβλέψουν την πιθανότητα κλινικής έναρξης εντός των επόμενων 3 ετών και επακόλουθης εξέλιξης της νόσου. Οι αλλαγές NfL συμβαίνουν νωρίτερα από τις αλλαγές στην απεικόνιση του εγκεφάλου, στην κινητική λειτουργία και στα γνωστικά τεστ, υποδηλώνοντας ότι είναι ένας από τους πρώτους ανιχνεύσιμους βιοδείκτες στην HD. Η NfL του πλάσματος είναι καλύτερος προγνωστικός παράγοντας της κλινικής εξέλιξης. Ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιείται με υπερευαίσθητες τεχνικές ανοσοδοκιμασίας. (Tabrizi et al., 2020) (Byrne et al., 2017)

#### *Ιντερλευκίνες IL6 και IL8 και κλαστερίνη*

Μελέτες έχουν εστιάσει το ενδιαφέρον στη δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος στη νόσο Huntington. Τα αυξημένα επίπεδα κυτοκινών όπως ιντερλευκίνες IL6 και IL8 καθώς και κλαστερίνης στο CSF και στο αίμα βρέθηκε ότι συσχετίζονται με την εξέλιξη της νόσου. Μελέτες σε δείγματα πλάσματος αίματος φορέων του γονιδίου HD, έδειξαν ότι τα επίπεδα IL-6 στο αίμα τους αυξήθηκαν- κατά μέσο όρο 16 χρόνια πριν από την προβλεπόμενη έναρξη των κλινικών συμπτωμάτων, αντιπροσωπεύοντας την πιο πρώιμη ανωμαλία του πλάσματος που έχει εντοπιστεί μέχρι σήμερα στην ανθρώπινη παθολογία. (Zuccato et al., 2010) Τα επίπεδα κλαστερίνης στο πλάσμα αλλά και στο CSF εμφανίζουν αύξηση σε ασθενείς με τη νόσο. Η ποσότητα της κλαστερίνης αξιολογήθηκε με ανοσοσύτρωση και ποσοτικοποίηση μέσω ELISA τόσο στο CSF όσο και στο πλάσμα, ενώ τα επίπεδα ιντερλευκίνης-6 (IL-6) με χρήση sandwich ELISA. Ωστόσο, οι τεχνικές δειγματοληψίας, ο τύπος του δείγματος που συλλέγεται και οι αναλυτικές τεχνικές ποικίλλουν ευρέως μεταξύ των μελετών και συχνά καθιστούν τις συγκρίσεις δύσκολες. (Björkqvist et al., 2008) (Dalrymple et al., 2007) (Bates et al., 2015)

### *Tau*

Η *Tau* είναι μια πρωτεΐνη που σχετίζεται με μικροσωληνίσκους και συχνά εμπλέκεται σε ορισμένες νευρολογικές παθολογικές καταστάσεις. Τα αυξημένα επίπεδα *Tau* στο CSF θεωρούνται γενικά ως μη ειδικός δείκτης νευρωνικού θανάτου. Η νόσος HD δεν αποτελεί εξαίρεση. Αρκετές μελέτες επιβεβαιώνουν ότι τα άτομα με μεταλλάξεις γονιδίων HD εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα ολικής *Tau* στο CSF σε σύγκριση με υγιή άτομα, γεγονός που αναδεικνύει ένα ρόλο της συγκέντρωση ολικής *Tau* του CSF ως πολύτιμου βιοδείκτη στην HD. Συγκεκριμένα, μελέτη κατέδειξε μια συσχέτιση μεταξύ της ολικής συγκέντρωσης *Tau* του CSF και της φαινοτυπικής μεταβλητότητας στην HD, όπως μετράται από τα κινητικά συμπτώματα και τη γνωστική δυσλειτουργία. Κατά συνέπεια, η διαχρονική ανάλυση της ολικής *Tau* του CSF είναι δικαιολογημένη για να προσδιοριστεί η δυνατότητά του να προβλέψει την εξέλιξη της νόσου, τη φαινοτυπική μεταβλητότητα και τη θεραπευτική απόκριση. Η μέθοδος προσδιορισμού που επιλέχθηκε από τις προαναφερθείσες μελέτες είναι η sandwich ELISA. (Tabrizi et al., 2020) (Constantinescu et al., 2011) (Rodrigues et al., 2016)

### *8OHdG*

Η 8-υδροξυδεοξυγουανωσίνη (8OHdG) ένα προϊόν οξειδωτικής βλάβης του DNA, αναφέρθηκε ότι είναι αυξημένη στο πλάσμα ασθενών με HD και ότι ανταποκρίνεται στη θεραπεία με το αντιοξειδωτικό κρεατίνη. (Ross et al., 2014) Τα χαρακτηριστικά αυτά την κάνουν ένα ελκυστικό βιοδείκτη για τη νόσο παρ' όλα αυτά έδωσε ασυνεπή αποτελέσματα σε μεγαλύτερες ομάδες ασθενών και οι μέθοδοι προσδιορισμού της δεν έχουν επικυρωθεί ακόμα. Συγκεκριμένα, η 8OHdG φαίνεται πως απέτυχε σε προσπάθειες αναπαραγωγής της μεθόδου που έγιναν με ιδιαίτερα αυστηρές προϋποθέσεις. (Bates et al., 2015)

### *BDNF*

Ο νευροτροφικός παράγοντας που προέρχεται από τον εγκέφαλο (BDNF) συγκεντρώνεται κυρίως στο νευρικό σύστημα, αλλά μπορεί επίσης να βρεθεί στο αίμα των ανθρώπων αν και η λειτουργία του στο αίμα δεν είναι καλά κατανοητή. Το BDNF στο αίμα προέρχεται από διάφορες πηγές, συμπεριλαμβανομένων των μονοκύτταρων αιμοσφαιρίων, των ενδοθηλιακών κυττάρων και της απελευθέρωσης αιμοπεταλίων. Οι αλλαγές στα επίπεδα του BDNF στον ορό σε αρουραίους κατά την ανάπτυξη συσχετίζονται με εκείνα στον εγκέφαλο. Δεδομένου ότι το BDNF μειώνεται στους

εγκεφάλους της νόσου του Huntington (HD), οι ερευνητές έχουν προτείνει ότι η μέτρηση των περιφερικών επιπέδων BDNF θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως δείκτης της κατάστασης της νόσου ή της αποτελεσματικότητας της θεραπείας. Μελέτες σε τρωκτικά έχουν δείξει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα στην αξιολόγηση των επιπέδων mRNA και πρωτεΐνης του BDNF στο αίμα υπό διαφορετικές συνθήκες και φαρμακολογικές θεραπείες. Ωστόσο, η ανίχνευση της πρωτεΐνης BDNF σε δείγματα ανθρώπινου αίματος HD παραμένει πρόκληση και απαιτεί τυποποίηση στις μεθόδους συλλογής και επεξεργασίας δειγμάτων. (Zuccato et al., 2010) (Ross & Tabrizi, 2011)

#### *24- υδροξυχοληστερόλη*

Μελέτες έχουν δείξει μείωση της δραστηριότητας της οδού βιοσύνθεσης της χοληστερόλης στους εγκεφάλους διαφόρων ζωικών μοντέλων της νόσου του Huntington (HD). Το γεγονός αυτό έχει συνδεθεί με αλλοιωμένη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της χοληστερόλης. Για να διατηρηθεί η ομοιόσταση, η χοληστερόλη του εγκεφάλου μετατρέπεται σε μια πιο πολική στερόλη που ονομάζεται 24-υδροξυχοληστερόλη (24OHC), η οποία μπορεί να διασχίσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να εισέλθει στην κυκλοφορία. Τα μειωμένα επίπεδα του 24OHC στον εγκέφαλο και στο πλάσμα ζωικών μοντέλων HD, οδήγησαν σε περαιτέρω έρευνα σε ασθενείς με HD. Τα επίπεδα πλάσματος του 24OHC βρέθηκαν να είναι σημαντικά χαμηλότερα σε ασθενείς με HD σε σύγκριση με μάρτυρες. Άτομα με προεκδηλωμένη HD εμφάνισαν παρόμοια επίπεδα 24OHC με τους μάρτυρες, αλλά όσοι ήταν πιο κοντά στην ανάπτυξη κινητικών συμπτωμάτων είχαν χαμηλότερα επίπεδα. Βρέθηκε επίσης συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του 24OHC και της ατροφίας του κερκοφόρου πυρήνα σε προκλινικούς ασθενείς και ασθενείς αρχικού σταδίου HD. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι τα επίπεδα 24OHC, σε συνδυασμό με άλλους βιοδείκτες ή μαγνητική τομογραφία, μπορεί να είναι χρήσιμα για την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου στα πρώιμα στάδια της HD. (Zuccato et al., 2010)

## 6<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

### 6.1 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η PCR (*Polymerase Chain Reaction*) εφευρέθηκε το 1983 από τον Αμερικανό βιοχημικό Kary Mullis ενώ εργαζόταν στην Cetus Corporation. Ο Mullis φέρεται να συνέλαβε την ιδέα για PCR ενώ οδηγούσε σε έναν αυτοκινητόδρομο. Η επαναστατική του ιδέα θα του χάρισε αργότερα το Νόμπελ Χημείας το 1993. Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) είναι ένα ζωτικό στοιχείο σε πολλές διαδικασίες και μπορεί αναμφισβήτητα να χαρακτηριστεί ως ακρογωνιαίος λίθος της μοριακής βιολογίας. Η PCR έχει σχεδιαστεί για να ενισχύει ελάχιστες ποσότητες DNA σε όγκο αρκετά μεγάλο ώστε είτε να χρησιμοποιηθεί άμεσα είτε να εφαρμοστεί σε επόμενες διαδικασίες. (Waters & Shapter, 2014) (Bartlett & Stirling, n.d.)

#### *Συμβατική PCR- End point PCR*

Η PCR βασίζεται σε μια κυκλική σειρά αλλαγών θερμοκρασίας, γνωστή ως θερμικός κύκλος, και σε τρία θεμελιώδη βήματα: Πρώτα πραγματοποιείται *αποδιάταξη* του DNA. Το δείγμα DNA θερμαίνεται στους 94- 96°C περίπου. Αυτή η υψηλή θερμοκρασία σπάει τους δεσμούς υδρογόνου που συγκρατούν μαζί τους δύο κλώνους του μορίου DNA, προκαλώντας το δίκλωνο DNA να ξετυλιχθεί και να χωριστεί σε δύο μονούς κλώνους. Στο δεύτερο βήμα- αυτό του *υβριδισμού* των εκκινητών, η θερμοκρασία μειώνεται στους 55°C περίπου, γεγονός που επιτρέπει στις σύντομες αλληλουχίες DNA που ονομάζονται εκκινητές να υβριδοποιηθούν στις αντίστοιχες συμπληρωματικές τους στο μονόκλωνο πλέον μόριο DNA. Τέλος, γίνεται *επιμήκυνση* των δύο κλώνων γίνεται με τη βοήθεια της βακτηριακής Taq DNA πολυμεράσης. Η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C περίπου, που είναι η βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας για το ένζυμο. (Εικόνα 7) Η Taq DNA πολυμεράση, συνδέεται με τον υβριδοποιημένο εκκινητή DNA και προσθέτει τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs- ATP, TTP, GTP, CTP), τα δομικά στοιχεία του DNA, για να επεκτείνει την αλληλουχία DNA, αντιγράφοντας τον αρχικό κλώνο. Αυτά τα βήματα επαναλαμβάνονται (συνήθως 25–35 κύκλοι) για να συνεχιστεί η ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας DNA. (Waters & Shapter, 2014)

Στα αρχικά της στάδια, η PCR απαιτούσε από τους επιστήμονες να προσθέτουν

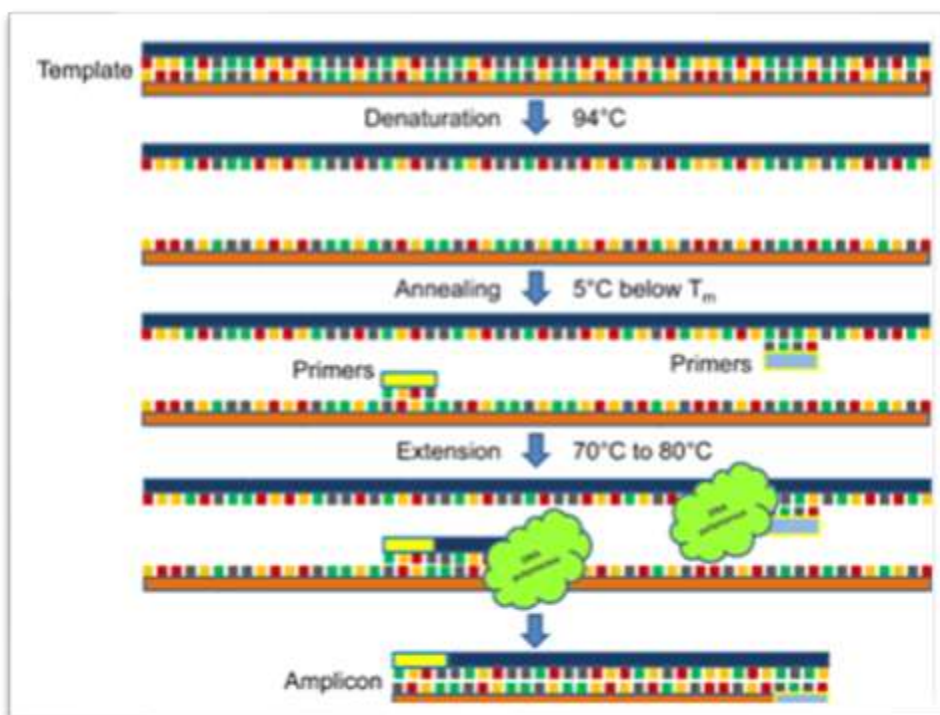


χειροκίνητα την πολυμεράση DNA από το βακτήριο *Escherichia coli* μετά από κάθε βήμα θέρμανσης, επειδή οι υψηλές θερμοκρασίες υποβάθμιζαν το ένζυμο. Αυτό το πρόβλημα λύθηκε με την ανακάλυψη μιας θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης που ονομάζεται Taq DNA πολυμεράση και εξάγεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Αυτή η πολυμεράση DNA θα μπορούσε να αντέξει τις υψηλές θερμοκρασίες που χρησιμοποιούνται στην PCR, αυτοματοποιώντας έτσι τη διαδικασία και αυξάνοντας σημαντικά την απόδοσή της. Το ποσοστό σφάλματος της πολυμεράσης Taq είναι κρίσιμο καθώς δε διαθέτει δραστηριότητα εξωνουκλεάσης 3' έως 5'. Παρ' όλα αυτά, έχει αξιολογηθεί ως χαμηλό- για τις αντικαταστάσεις βάσης είναι 1 στις 9.000 και 1 στις 41.000 για σφάλματα μετατόπισης πλαισίου. Το ένζυμο είναι ευαίσθητο σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, οδηγώντας σε υψηλότερους ρυθμούς κακής ενσωμάτωσης. Η διατήρηση μιας συγκέντρωσης τουλάχιστον 10 μM ελαχιστοποιεί αυτό το ζήτημα. (Waters & Shapter, 2014) (Bell, 1989)

Σημαντική παράμετρο για την επιτυχία της PCR αποτελούν οι εκκινητές που επιλέγονται. Όταν γίνεται ο σχεδιασμός ενός συνόλου εκκινητών για μια συγκεκριμένη περιοχή DNA, ο ένας εκκινητής θα πρέπει να υβριδίζεται στη μία μονόκλωνη αλυσίδα, με κατά σύμβαση προσανατολισμό στην κατεύθυνση 5' → 3' (νοηματικός κλώνος) και ο άλλος εκκινητής θα πρέπει να υβριδίζεται στην άλλη μονόκλωνη αλυσίδα, με προσανατολισμό 3' → 5' (αντινοηματικός κλώνος). Η ειδικότητα μιας αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) προσδιορίζεται από αυτούς τους δύο συνθετικούς ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση. Παράγοντες που μπορούν να ρυθμιστούν για τα βέλτιστα τελικά αποτελέσματα είναι ο χρόνος και οι θερμοκρασίες υβριδοποίησης των εκκινητών καθώς και η συγκέντρωση μαγνησίου στο ρυθμιστικό διάλυμα. Αν και δεν υπάρχουν αυστηροί κανόνες για την επιλογή εκκινητών, συνήθως έχουν μήκος 18-22 βάσεις και αλληλουχίες που μπορεί να προάγουν τη δευτερογενή δομή θα πρέπει να αποφεύγονται, καθώς υπάρχει περίπτωση αυτό-υβριδοποίησης των εκκινητών (self-annealing primers). Είναι κρίσιμο να αποφευχθούν οι συμπληρωματικές βάσεις στα 3' άκρα των ζευγών ολιγονουκλεοτιδίων, καθώς μπορούν να οδηγήσουν σε ανεπιθύμητο αυτο-ζευγάρωμα και επέκταση των εκκινητών, γνωστών ως σχηματισμός "primer-dimer". Επίσης, τα ολιγονουκλεοτίδια με υψηλή περιεκτικότητα σε GC συνήθως απαιτούν υψηλότερες θερμοκρασίες υβριδισμού και επέκτασης και γι' αυτό το λόγο αποφεύγονται. (Waters & Shapter, 2014) (Bell, 1989) (Lorenz, 2012)

Η PCR μπορεί να πραγματοποιηθεί με πολλά διαφορετικά ζεύγη ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων στον ίδιο σωλήνα, επιτρέποντας την ταυτόχρονη ενίσχυση πολλαπλών τμημάτων DNA που μας ενδιαφέρουν, από ένα μόνο δείγμα. Αυτή η προσέγγιση έχει σημαντικές οικονομικές επιπτώσεις, καθώς εξοικονομεί χρόνο, πόρους και μειώνει την ποσότητα του δείγματος που απαιτείται. (Bell, 1989)

Ένας σημαντικός περιορισμός στις συμβατικές PCR- End point PCR έγκειται στο φαινόμενο του “πλατώ”. Το φαινόμενο πλατώ, εμφανίζεται όταν ορισμένα συστατικά της αντίδρασης (όπως τα νουκλεοτίδια) περιορίζονται και τα συσσωρευμένα προϊόντα PCR ανταγωνίζονται για τη σύνδεση με την πολυμεράση. Ως αποτέλεσμα, δείγματα με σημαντικά διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις νουκλεϊκού οξέος στόχου μπορεί να αποδώσουν παρόμοιες συγκεντρώσεις στο τελικό σημείο. Το πρόβλημα αυτό ήρθε να λύσει η τεχνολογία real time qPCR που αναπτύχθηκε. (Peirson & Butler, 2007)



Εικόνα 7 Ο τυπικός κύκλος PCR τριών σταδίων περιλαμβάνει αποδιάταξη του εκμαγείου DNA, υβριδισμό εκκινήτων και επιμήκυνση του DNA στόχου (αμπλικόνιο) από DNA πολυμεράση.

Πηγή: Lorenz, T. C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*, (63). doi:10.3791/3998

### *Real-time PCR ή Ποσοτική PCR (qPCR)*

Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (PCR) είναι μια ισχυρή τεχνική για την ευαίσθητη, ειδική και αναπαραγώγιμη ποσοτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων. Έχει φέρει επανάσταση στον τομέα της μοριακής διάγνωσης, επιτρέποντας υψηλής απόδοσης και αυτοματοποιημένη ανάλυση με μειωμένους χρόνους διεκπεραίωσης. Η PCR σε πραγματικό χρόνο μπορεί να ενισχύσει και να ανιχνεύσει ακόμη και ένα μόνο αντίγραφο μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Η εκθετική ενίσχυση των εκμαγείων DNA σε PCR δημιουργεί μια ποσοτική σχέση μεταξύ της αρχικής αλληλουχίας στόχου και του συσσωρευμένου προϊόντος PCR. Ωστόσο, παράγοντες όπως οι αναστολές πολυμεράσης, οι περιορισμοί των αντιδραστηρίων ή η συσσώρευση μορίων πυροφωσφορικών μπορεί να προκαλέσουν την αντίδραση να φτάσει σε μια φάση πλατώ, καθιστώντας τον ποσοτικό προσδιορισμό του τελικού σημείου αναξιόπιστο (end point PCR). Μόνο κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια η αρχική ποσότητα της ακολουθίας προτύπων. Η ποσοτική PCR μετρά τα συσσωρευμένα προϊόντα PCR σε πραγματικό χρόνο, επιτρέποντας την ποσοτικοποίηση στην εκθετική φάση και εξαλείφοντας τη μεταβλητότητα που σχετίζεται με τη συμβατική PCR. (Arya et al., 2005)

Προκειμένου να ανιχνευθεί η επιθυμητή αλληλουχία στόχος με PCR σε πραγματικό χρόνο υπάρχουν δύο βασικοί τρόποι: οι αναλύσεις με SYBR Green (δίκλωνοι παράγοντες παρεμβολής DNA) και δοκιμασίες που βασίζονται σε ανιχνευτές TaqMan. Το SYBR Green I είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη φθορογόνος χρωστική σε PCR πραγματικού χρόνου για την ανίχνευση δίκλωνου DNA (dsDNA). Προσδένεται στη μικρή αύλακα του dsDNA ανεξάρτητα από την αλληλουχία και εμφανίζει υψηλή συγγένεια δέσμησης σε σύγκριση με άλλες χρωστικές όπως το βρωμιούχο αιθίδιο. Το SYBR Green I παρουσιάζει μικρό φθορισμό όταν δεν είναι δεσμευμένο σε διάλυμα, αλλά εκπέμπει ένα ισχυρό φθορίζον σήμα- πάνω από 1000 φορές ισχυρότερο, κατά τη δέσμηση στο dsDNA, καθιστώντας το κατάλληλο για την παρακολούθηση της συσσώρευσης προϊόντων PCR. Το πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι ότι είναι σχετικά φθηνή καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί με οποιοδήποτε ζεύγος εκκινήτων για οποιονδήποτε στόχο. Ωστόσο, καθώς η παρουσία οποιουδήποτε dsDNA δημιουργεί φθορισμό, η ειδικότητα αυτής της δοκιμασίας μειώνεται σημαντικά λόγω της ενίσχυσης μη ειδικών προϊόντων PCR και διμερών εκκινήτων. Επομένως, η

βελτιστοποίηση της ανάλυσης κρίνεται απαραίτητη για την ελαχιστοποίηση των μη ειδικών προϊόντων. (Arya et al., 2005)

Στην ποσοτική ανάλυση TaqMan σε πραγματικό χρόνο χρησιμοποιείται επίσης και ένας φθορογόνος μη επεκτάσιμος ανιχνευτής TaqMan. Ο ανιχνευτής έχει διπλή σήμανση: έχει μια φθορίζουσα χρωστική αναφοράς (φθοροφόρο μόριο) στο άκρο 5' και μια χρωστική σβέσης προσαρτημένη στο άκρο 3' (μόριο σβέσης). Εάν υπάρχει η αλληλουχία στόχος, ο φθορογόνος ανιχνευτής υβριδίζεται καθοδικά από μία από τις θέσεις εκκινήτων. Όταν η πολυμεράση- η οποία προσθέτει νουκλεοτίδια στον εκκινήτη, συναντήσει τον ανιχνευτή, χρησιμοποιεί τη δράση εξωνουκλεάσης 5' - 3' που διαθέτει και τον διασπά. Για όσο χρόνο ο ανιχνευτής παραμένει άθικτος, η στενή εγγύτητα του μορίου σβέσης με το φθοροφόρο μόριο, μπλοκάρει το φθορισμό που εκπέμπεται από τη χρωστική αναφοράς. Ένα σήμα φθορισμού εκπέμπεται μόνο κατά τη διάσπαση του ανιχνευτή, με βάση την αρχή μεταφοράς ενέργειας συντονισμού φθορισμού (FRET). Η διάσπαση του ανιχνευτή από την πολυμεράση Taq κατά τη διάρκεια της PCR διαχωρίζει τις χρωστικές αναφοράς και σβέσης, αυξάνοντας έτσι τον φθορισμό από τις πρώτες. Επιπρόσθετα, η διάσπαση αφαιρεί τον ανιχνευτή από τον κλώνο στόχο, επιτρέποντας την επέκταση του εκκινήτη να συνεχίσει μέχρι το άκρο του κλώνου του εκμαγείου, χωρίς να παρεμβαίνει έτσι στην εκθετική συσσώρευση του προϊόντος PCR. Επιπλέον μόρια χρωστικής αναφοράς αποκόπτονται από τους αντίστοιχους ανιχνευτές τους με κάθε κύκλο της qPCR, οδηγώντας σε αύξηση της έντασης φθορισμού ανάλογη με την ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος. Η εκπομπή φθορισμού ανιχνεύεται σε πραγματικό χρόνο από έναν τροποποιημένο θερμοκυκλοποιητή, ενώ το λογισμικό του υπολογιστή κατασκευάζει γραφήματα ενίσχυσης με βάση τα δεδομένα φθορισμού που συλλέγονται κατά τη διάρκεια της PCR. (Arya et al., 2005)

Η ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (RT-qPCR) μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε δύο κύριους τύπους με βάση τον επιδιωκόμενο σκοπό: απόλυτη ποσοτικοποίηση και σχετική ποσοτικοποίηση. Η απόλυτη ποσοτικοποίηση χρησιμοποιείται στη μικροβιολογία, την τεχνολογία τροφίμων και τη βιοτεχνολογία για τη μέτρηση του μικροβιακού φορτίου ή των αριθμών αντιγράφων, ενώ η σχετική ποσοτικοποίηση χρησιμοποιείται στη γονιδιωματική και τη μεταγραφική για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης. (Harshitha & Arunraj, 2021)

### *PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR)*

Το γονιδιωματικό DNA είναι ένα πολύτιμο αρχικό υλικό για την ενίσχυση PCR, αλλά δεν παρέχει πληροφορίες για το εάν ένα γονίδιο εκφράζεται πραγματικά σε ένα κύτταρο, ιστό, άτομο ή δεν επιτρέπει συγκρίσεις της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ διαφορετικών συνθηκών. Για την αντιμετώπιση αυτών των περιορισμών, η τεχνολογία PCR έχει επεκταθεί ώστε να περιλαμβάνει ένζυμα αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription- RT), επιτρέποντας την ενίσχυση του αγγελιαφόρου RNA (mRNA). Αυτή η προσέγγιση, γνωστή ως RT-PCR, περιλαμβάνει τη μετατροπή του mRNA σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) *in vitro* πριν από την ενίσχυση PCR. Τα ένζυμα RT, όπως η μεταγραφάση του ιού της λευχαιμίας ποντικού Moloney, είναι RNA εξαρτώμενες- DNA πολυμεράσες, που εκφράζονται από ρετροϊούς που περιέχουν RNA. Μπορούν να συνθέσουν τον πρώτο κλώνο του cDNA από ένα μονόκλωνο πρότυπο RNA. Η RT-PCR μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ένα μόνο βήμα ή σε μια διαδικασία δύο σταδίων. Στην προσέγγιση ενός σταδίου, το mRNA υφίσταται αντίστροφη μεταγραφή και ενίσχυση PCR σε μία μόνο αντίδραση. Αν και βολική, αυτή η μέθοδος έχει το μειονέκτημα της χρήσης RNA ως αρχικού εκμαγείου, το οποίο είναι επιρρεπές σε αποικοδόμηση με την πάροδο του χρόνου. Εναλλακτικά, η διαδικασία δύο σταδίων περιλαμβάνει ξεχωριστές αντιδράσεις RT και PCR. Αυτή η προσέγγιση είναι ευεργετική όταν το ίδιο δείγμα χρειάζεται να αναλυθεί πολλές φορές με την πάροδο του χρόνου, καθώς μειώνει τον κίνδυνο αποικοδόμησης RNA. Ωστόσο, αυξάνει την πιθανότητα μόλυνσης του DNA. Ανεξάρτητα από τη μέθοδο που επιλέχθηκε, το επίπεδο του cDNA που συντίθεται είναι ανάλογο με την ποσότητα του αρχικού mRNA, καθιστώντας την RT-PCR ένα χρήσιμο εργαλείο για την αξιολόγηση των αλλαγών στη γονιδιακή έκφραση. Η χρήση του RNA ως αρχικού υλικού στην PCR εγγυάται την επιλεκτική ενίσχυση των κωδικοποιητικών περιοχών (εξωνίων), ενώ παράλληλα προσφέρει ένα πολύτιμο μέσο για την εξέταση της γονιδιακής μεταγραφικής δραστηριότητας και την ταυτόχρονη διερεύνηση πολλαπλών παραπλήσιων εξωνίων σε μία μόνο ανάλυση. (Jones, 2002) (Ishmael & Stellato, 2008)



## 6.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ

### 6.2.1 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΚΑΤΑ SANGER

Το 1977, μια πρωτοποριακή μέθοδος έφερε επανάσταση στον τομέα της τεχνολογίας προσδιορισμού αλληλουχίας DNA. Αυτή η κομβική στιγμή, ήρθε με την παρουσίαση της τεχνικής Sanger, από το Sanger και τους συνεργάτες του, γνωστή και ως “αλληλούχιση τερματισμού αλυσίδας” ή “μέθοδος διδεοξυνουκλεοτιδίου”. Αρχικά, το DNA στόχος, ενισχύεται με PCR ή δημιουργείται ένα συμπληρωματικό DNA (cDNA). Στη συνέχεια, και αφού αποδιαταχθούν με θερμότητα τα μόρια του DNA, συγκολλάται πάνω τους ένας εκκινητής (ένα κοντό ολιγονουκλεοτίδιο με αλληλουχία συμπληρωματική του DNA εκμαγείου) ώστε να ξεκινήσει η επέκταση της αλυσίδας από το ένζυμο πολυμεράσης DNA. Μέσα στο μίγμα που χρησιμοποιείται για την αλληλούχιση, εκτός από τα 4 τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs: dATP, dGTP, dCTP, dTTP) που είναι απαραίτητα για τη δράση της DNA πολυμεράσης, υπάρχουν επίσης και τριφωσφορικά διδεοξυνουκλεοτίδια ή αλλιώς τερματιστές (ddNTPs: ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP). Τα διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs) στερούνται την 3' υδροξυλομάδα που απαιτείται για την επέκταση των αλυσίδων DNA και επομένως δεν μπορούν να σχηματίσουν δεσμό με το 5' φωσφορικό του επόμενου dNTP. Όταν η πολυμεράση ενσωματώσει ένα διδεοξυνουκλεοτίδιο στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα, η αντιγραφή σταματά.

Αυτή η διαδικασία εκτελέστηκε σε τέσσερις διαφορετικούς σωλήνες, καθένας από τους οποίους περιείχε μια μικρή ποσότητα ενός από τους τέσσερις τερματιστές, οι οποίοι ήταν ραδιοσημασμένοι. Το αποτέλεσμα ήταν η παραγωγή κλώνων DNA κάθε πιθανού μήκους, καθώς τα διδεοξυνουκλεοτίδια ενσωματώνονται τυχαία καθώς ο κλώνος εκτείνεται. Όλα τα δημιουργημένα θραύσματα είχαν το ίδιο άκρο 5', ενώ το υπόλειμμα στο άκρο 3' προσδιορίστηκε από το διδεοξυνουκλεοτίδιο που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση. Αφού ολοκληρώθηκαν και οι τέσσερις αντιδράσεις, το μείγμα θραυσμάτων DNA διαφορετικού μεγέθους αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε μετουσιωτική γέλη πολυακρυλαμιδίου, σε τέσσερις παράλληλες λωρίδες. Το σχέδιο των ζωνών έδειξε την κατανομή του τερματισμού στον συντιθέμενο κλώνο του DNA και η άγνωστη αλληλουχία μπορούσε να διαβαστεί με αυτοραδιογραφία. ((França et al., 2002), (Heather & Chain, 2016) (Crossley et al., 2020) (Sanger et al., 1977) Με την πάροδο των ετών, έχουν γίνει σημαντικές βελτιώσεις στη μεθοδολογία της αλληλούχισης κατά Sanger. Αυτές οι βελτιώσεις περιστρέφονταν κυρίως γύρω από την



αντικατάσταση της ραδιοσήμανσης με ανίχνευση που βασίζεται σε φθορισμό, επιτρέποντας στην όλη αντίδραση να πραγματοποιηθεί σε ένα μόνο δοχείο και όχι σε 4. Επιπλέον, η εισαγωγή της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης βελτίωσε σημαντικά τη διαδικασία ανίχνευσης. Αυτές οι καινοτομίες έπαιξαν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη αυτοματοποιημένων μηχανών προσδιορισμού αλληλουχίας DNA. Ως αποτέλεσμα, εμφανίστηκε η πρώτη γενιά εμπορικών μηχανών προσδιορισμού αλληλουχίας DNA, δίνοντας τη δυνατότητα στους επιστήμονες να αλληλουχούν τα γονιδιώματα ολόενα και πιο περίπλοκων ειδών.

Η αυτοματοποίηση στον προσδιορισμό αλληλουχίας Sanger επιτρέπει επί του παρόντος τη δημιουργία αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων που κυμαίνονται από περίπου 800 έως 1.000 ζεύγη βάσεων (bp) σε μήκος. Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένοι περιορισμοί που σχετίζονται με αυτήν την προσέγγιση. Μία από τις κύριες προκλήσεις είναι η απόκτηση αλληλουχιών υψηλής ποιότητας εντός των πρώτων 15 έως 40 bp λόγω δέσμευσης εκκινητών. Επιπλέον, η διάκριση διαφορών ενός ζεύγους βάσεων σε μεγαλύτερα τμήματα, όπως αυτά που υπερβαίνουν τα 900 bp, δεν είναι πάντα δυνατή. (Crossley et al., 2020)

Λόγω της εξαιρετικής ακρίβειας, της αξιοπιστίας και την ευχρηστεία της, η μέθοδος τερματισμού της διδεοξυαλυσίδας αναδείχθηκε ως η εξέχουσα τεχνική για τον προσδιορισμό αλληλουχίας DNA. Αυτή η επαναστατική προσέγγιση, αν και βασίζεται στις ίδιες βασικές αρχές με άλλες τεχνικές αλληλούχισης, ξεπέρασε τις αντίστοιχες ως προς την απόδοση και την ευκολία εφαρμογής, χαρακτηριστικά που την καθιέρωσαν ως το χρυσό πρότυπο στον προσδιορισμό αλληλουχίας DNA για μεγάλο χρονικό διάστημα. (Heather & Chain, 2016)

Η τεχνική εξακολουθεί να εφαρμόζεται και σήμερα, γι' αυτό παρουσιάζει ενδιαφέρον η αναφορά σε κάποιες τεχνικές λεπτομέρειες της αλληλούχισης κατά Sanger. Ο επιτυχημένος προσδιορισμός της αλληλουχίας των νουκλεϊκών οξέων βασίζεται στη λήψη μακρών, μη αποικοδομημένων κλώνων DNA ή RNA του αμπλικονίου ως εκμαγείο. Η διατήρηση και η εξαγωγή άθικτου DNA και RNA είναι ζωτικής σημασίας σε όλη τη διαδικασία για την εξασφάλιση προτύπων υψηλής ποιότητας για ανάλυση αλληλουχίας. Πρωτόκολλα εκχύλισης και εμπορικά κιτ είναι διαθέσιμα για την ανάκτηση DNA και RNA υψηλής ποιότητας από διαφορετικούς τύπους ιστών και συνθήκες.

Πριν από την ανάλυση αλληλούχισης, θα πρέπει να γίνει καθαρισμός του DNA ή του

cDNA αμπλικόνιου προκειμένου να εξαλειφθούν τα μη ενσωματωμένα dNTP, τα ένζυμα πολυμεράσης, οι μη δεσμευμένοι εκκινητές, τα άλατα και άλλες ακαθαρσίες που ήταν μέρος της αντίδρασης PCR που παράγει την αλληλουχία DNA ή cDNA στόχος.

Για βέλτιστα αποτελέσματα αλληλουχίας, τα αμπλικόνια DNA ή RNA θα πρέπει να είναι μεγαλύτερα από αυτά που χρησιμοποιούνται στην ενίσχυση PCR, τυπικά να υπερβαίνουν τα 150 ζεύγη βάσεων. Ο σχεδιασμός εκκινητών και η βελτιστοποίηση των αντιδραστηρίων και των συνθηκών ανάλυσης διαδραματίζουν επίσης κρίσιμο ρόλο στη διαδικασία. Τα ηλεκτρονικά εργαλεία ανοιχτής πρόσβασης και το εμπορικό λογισμικό μπορούν να βοηθήσουν στο σχεδιασμό των εκκινητών, λαμβάνοντας υπόψη το μήκος, τη θερμοκρασία τήξης και πιθανά προβλήματα δέσμευσης. Όσο αφορά την ηλεκτροφόρηση, γέλης ή τριχοειδής μπορεί να επιβεβαιώσει την παρουσία ενός μόνο, ομοιογενούς προϊόντος. Σε περιπτώσεις όπου σχηματίζονται πολλαπλά προϊόντα, η συγκεκριμένη ζώνη ενδιαφέροντος θα πρέπει να απομονώνεται χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους καθαρισμού.

Τέλος, ο ποσοτικός προσδιορισμός και η εκτίμηση της καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων τυπικά εκτελούνται χρησιμοποιώντας φασματοφωτομετρική ανάλυση ή φθορίζουσα επισήμανση. Οι λόγοι απορρόφησης σε συγκεκριμένα μήκη κύματος υποδεικνύουν τη συγκέντρωση και την καθαρότητα του DNA. (Crossley et al., 2020)

### **6.2.2 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΕΠΟΜΕΝΗΣ ΓΕΝΙΑΣ (NGS)**

Μεταξύ 2004 και 2006 παρουσιάστηκαν οι τεχνολογίες «αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS)», οι οποίες μεταμόρφωσαν τη βιοϊατρική έρευνα και οδήγησαν σε δραματική αύξηση στην παραγωγή δεδομένων αλληλούχισης. Η σημαντική αύξηση στην παραγωγή δεδομένων οφειλόταν στις αρχές της νανοτεχνολογίας και στις καινοτομίες που επέτρεψαν μαζική παράλληλη αλληλούχιση μεμονωμένων μορίων DNA με υψηλή απόδοση. (Hu et al., 2021)

Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing- NGS) ή μαζική παράλληλη αλληλούχιση ή αλληλούχιση DNA υψηλής απόδοσης είναι όροι που περιγράφουν μια τεχνολογία προσδιορισμού αλληλουχίας DNA που έχει φέρει επανάσταση στη γονιδιωματική έρευνα. Ο όρος «επόμενης γενιάς» χρησιμοποιείται προκειμένου να υποδηλώσει ότι αυτή η τεχνολογία αυτοματοποιημένων μηχανημάτων προσδιορισμού αλληλουχίας που έχει αναπτυχθεί, στην πραγματικότητα είναι η «δεύτερη» γενιά μετά τις αρχικές μεθόδους Sanger που χρησιμοποιούσαν ραδιενέργεια

και πηκτώματα πλακών. (Slatko et al., 2018) Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι με την NGS έγινε δυνατός ο προσδιορισμός της αλληλουχίας ενός ολόκληρου ανθρώπινου γονιδιώματος σε μία μόνο μέρα, σε αντίθεση, με την αλληλούχιση Sanger, όπου χρειάστηκε περισσότερο από μια δεκαετία για να ολοκληρωθεί το αντίστοιχο πρότζεκτ. Αξιοσημείωτο είναι και το κόστος των δυο τεχνικών, αν αναλογιστεί κανείς ότι μια υπερσύγχρονη πλατφόρμα NGS μπορεί να πραγματοποιήσει περίπου 150 000 000 αναγνώσεις για περίπου £ 1000 ενώ μία μόνο ανάγνωση με τη μέθοδο Sanger συνήθως κοστίζει λιγότερο από 1 £. (Behjati & Tarpey, 2013)

Όλες οι πλατφόρμες NGS εκτελούν αλληλούχιση εκατομμύρια μικρών θραυσμάτων DNA ταυτόχρονα. Στη συνέχεια, μέσω βιοπληροφορικών αναλύσεων, αυτά τα θραύσματα συνενώνονται σχολαστικά, χαρτογραφώντας τις μεμονωμένες αναγνώσεις στο ανθρώπινο γονιδίωμα αναφοράς. Συγκεκριμένα, αυτή η διαδικασία διασφαλίζει ότι καθεμία από τις τρεις δισεκατομμύρια βάσεις που αποτελούν το ανθρώπινο γονιδίωμα αλληλουχείται πολλές φορές, με αποτέλεσμα ένα ολοκληρωμένο και ακριβές σύνολο δεδομένων, το οποίο μάλιστα μπορεί να παρέχει πληροφορίες για απροσδόκητες παραλλαγές του DNA.

Η ευελιξία της NGS επεκτείνεται και στις εφαρμογές της, επιτρέποντας την αλληλούχιση ολόκληρων γονιδιωμάτων (Whole Genome Sequencing -WGS) ή τη στοχευμένη αλληλούχιση συγκεκριμένων περιοχών ενδιαφέροντος. Αυτό μπορεί να περιλαμβάνει την αλληλούχιση του συνόλου των περίπου 22.000 κωδικοποιητικών γονιδίων (όλων των εξονίων σε όλα τα γονίδια)- γνωστό και ως αλληλούχιση όλων των εξονίων (Whole Exome Sequencing- WES). Το WES περιλαμβάνει τη σύλληψη κατακερματισμένου γονιδιωματικού DNA από ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές που καλύπτουν συλλογικά όλες τις εξωνικές περιοχές. Είτε ακόμη, μπορεί να γίνει εστίαση σε επιλεγμένα μεμονωμένα γονίδια. Αυτή η ευελιξία δίνει τη δυνατότητα σε ερευνητές και κλινικούς γιατρούς να εξερευνήσουν διάφορους τομείς γενετικού ενδιαφέροντος, επιτρέποντας μια βαθύτερη κατανόηση και πιθανές ανακαλύψεις σε διάφορους τομείς. (Behjati & Tarpey, 2013) (Thermes, 2014)

Το Εθνικό Ινστιτούτο Έρευνας Ανθρώπινου Γονιδιώματος των ΗΠΑ (NHGRI) έχει διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην προώθηση των τεχνολογιών αλληλούχισης γονιδιώματος. Το 2008, το NHGRI ξεκίνησε ένα πρόγραμμα χρηματοδότησης με στόχο τον προσδιορισμό της αλληλουχίας ενός ανθρώπινου γονιδιώματος για \$1000 ή λιγότερο. Αυτό το πρόγραμμα οδήγησε σε σημαντική πρόοδο στον τομέα. Τον

Δεκέμβριο του 2010, η κοινοπραξία NHGRI δημοσίευσε τον πιο ολοκληρωμένο χάρτη ανθρώπινης γενετικής παραλλαγής μέχρι σήμερα. Αυτή η μελέτη χρησιμοποίησε τεχνολογίες αλληλουχίας DNA επόμενης γενιάς για να χαρακτηρίσει τις γενετικές διαφορές μεταξύ ατόμων από διαφορετικούς πληθυσμούς. Αυτές οι πιλοτικές μελέτες αποτελούσαν μέρος του «έργου 1000 γονιδιωμάτων», το οποίο στοχεύει στη δημιουργία ενός δημοσίως διαθέσιμου χάρτη γενετικής παραλλαγής με την αλληλούχιση των γονιδιωμάτων 2.500 ατόμων από διαφορετικούς πληθυσμούς παγκοσμίως. (Pareek et al., 2011)

### *Αλληλούχιση 2<sup>ης</sup> γενιάς*

Η απαρχή της 2<sup>ης</sup> γενιάς μηχανημάτων αλληλούχισης, έγινε όταν ο Jonathan Rothberg και η εταιρεία που ίδρυσε- η 454 Life Sciences, παρουσίασαν για πρώτη φορά μια μέθοδο φωταύγειας που ονομάζεται pyrosequencing, η οποία μετρά τη σύνθεση πυροφωσφορικών για να συμπεράνει την αλληλουχία νουκλεοτιδίων. Η αρχή της μεθόδου αυτής της καινοτόμου προσέγγισης περιλάμβανε μια διεργασία δύο ενζύμων: της η ATP σουλφουρυλάσης που χρησιμοποιείται για τη μετατροπή του πυροφωσφορικού σε ATP, το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για τη λουσιφεράση, παράγοντας έτσι φως ανάλογο με την ποσότητα του πυροφωσφορικού. Αυτή η προσέγγιση χρησιμοποιήθηκε για να συναχθεί η αλληλουχία με τη μέτρηση της παραγωγής πυροφωσφορικών καθώς κάθε νουκλεοτίδιο πλένεται μέσω του συστήματος με τη σειρά του, πάνω από το πρότυπο DNA που έχει προσκολληθεί σε μια στερεά φάση. Πιο συγκεκριμένα, τα φρεάτια φορτώνονται με ένζυμα προσδιορισμού αλληλουχίας και έναν εκκινητή και στη συνέχεια εκτίθενται σε ροή ενός μη επισημασμένου νουκλεοτιδίου κάθε φορά, επιτρέποντας τη σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου DNA. Όταν ενσωματώνεται ένα νουκλεοτίδιο, απελευθερώνεται πυροφωσφορικό και παρατηρείται η εκπομπή φωτός σε πραγματικό χρόνο. Αυτή η τεχνική προσέφερε πλεονεκτήματα όπως η παρατήρηση σε πραγματικό χρόνο (αντί να απαιτούνται μεγάλες ηλεκτροφορήσεις αλλά και η χρήση φυσικών νουκλεοτιδίων (αντί για τα τροποποιημένα dNTP που χρησιμοποιούνται στην τεχνική Sanger). Η τεχνική επικυρώθηκε με επιτυχία όταν πραγματοποιήθηκε η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος (580069 bp) του *Mycoplasma genitalia* με 96% κάλυψη και ακρίβεια 99,96% σε μία μόνο ανάγνωση του συστήματος GS 20. (Heather & Chain, 2016) (Thermes, 2014) (Pareek et al., 2011)

Μετά την επιτυχία του pyrosequencing, προέκυψαν και άλλες τεχνικές παράλληλης

αλληλούχισης. Οι τρεις κορυφαίες πλατφόρμες αλληλούχισης επόμενης γενιάς- υψηλής απόδοσης (HT-NGS) δεύτερης γενιάς περιλαμβάνουν τις Roche, SOLiD και Illumina. (Heather & Chain, 2016) Αυτές οι πλατφόρμες μπορούν να δημιουργήσουν εκατοντάδες εκατομμύρια έως δισεκατομμύρια βάσεις δεδομένων ακατέργαστων ακολουθιών σε μία μόνο εκτέλεση. (Pareek et al., 2011) Αναφορικά, το Roche 454 ήταν το πρώτο εμπορικά επιτυχημένο σύστημα NGS που χρησιμοποίησε τεχνολογία pyrosequencing, ενώ το SOLiD χρησιμοποιεί αλληλούχιση δύο βάσεων με βάση τη σύνδεση, με ειδικούς ανιχνευτές και φθορίζουσες βαφές που υποδεικνύουν την αλληλουχία του θραύσματος DNA. Τέλος, ο σημαντικότερος εκπρόσωπος αυτής της γενιάς, το Illumina υιοθετεί την τεχνολογία προσδιορισμού αλληλουχίας με σύνθεση (SBS). Σε αυτή τη διαδικασία, μια βιβλιοθήκη με σταθερούς προσαρμογείς μετουσιώνεται σε μονούς κλώνους και συνδέεται σε μια κυψέλη ροής. Μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται ενίσχυση γέφυρας, σχηματίζονται συστάδες που περιέχουν πανομοιότυπα θραύσματα DNA. Πριν από τον προσδιορισμό της αλληλουχίας, ένα ένζυμο γραμμικοποίησης βοηθά στη συναρμολόγηση της βιβλιοθήκης σε μονούς κλώνους. Κατά τον προσδιορισμό της αλληλουχίας τέσσερις τύπους νουκλεοτιδίων (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP)- το καθένα από τα οποία φέρει διαφορετική διασπώμενη φθορίζουσα χρωστική και μια αφαιρούμενη ομάδα αποκλεισμού, συμπληρώνουν το εκμαγείο με ρυθμό μία βάση τη φορά και το σήμα λαμβάνεται από μια συσκευή συζευγμένη με φορτίο (CCD). (L. Liu et al., 2012)

#### *Αλληλούχιση 3<sup>ης</sup> γενιάς*

Οι πλατφόρμες τρίτης γενιάς High-Throughput Next-Generation Sequencing (HT-NGS)- σε αντίθεση με τις πλατφόρμες δεύτερης γενιάς που βασίζονται στην ενίσχυση PCR, στοχεύουν στην αλληλούχιση του DNA απευθείας από ένα μόνο μόριο χωρίς ενίσχυση. Τα πλεονεκτήματα των πλατφορμών HT-NGS τρίτης γενιάς, έχουν χαρακτηριστικά όπως υψηλότερη απόδοση, ταχύτερο χρόνο διεκπεραίωσης, μεγαλύτερα μήκη ανάγνωσης, υψηλότερη συναινετική ακρίβεια, χαμηλότερες απαιτήσεις υλικού εκκίνησης και μειωμένο κόστος. Η εξάλειψη της ενίσχυσης PCR και κατ' επέκταση η ικανότητα άμεσης αλληλούχισης μεμονωμένων μορίων, είναι μία από τις σημαντικότερες βελτιώσεις που εμφάνισαν τα μηχανήματα 3<sup>ης</sup> γενιάς. Η ανάπτυξη αυτών των τεχνολογιών μείωσε τα σφάλματα και τη μεροληψία της μεθόδου, μείωσε σημαντικά το κόστος και αύξησε την ταχύτητα της αλληλούχισης του DNA, φέρνοντας επανάσταση στη γονιδιωματική έρευνα και τις εφαρμογές της σε διάφορους

τομείς. (Pareek et al., 2011)

Επί του παρόντος, μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνολογίες τρίτης γενιάς είναι η πλατφόρμα ενός μορίου σε πραγματικό χρόνο (SMRT) που αναπτύχθηκε από την PacBio. Οι εκτελέσεις SMRT περιλαμβάνουν πολυμερισμό DNA σε κυματοδηγούς μηδενικής λειτουργίας (ZMWs), οι οποίοι είναι μικροσκοπικές οπές σε ένα μεταλλικό φιλμ σε ένα τσιπ. Οπτικοποιώντας μεμονωμένα φθορίζοντα μόρια κοντά στον πυθμένα των ZMW, η αλληλουχία DNA μπορεί να πραγματοποιηθεί σε πραγματικό χρόνο. Οι μηχανές PacBio προσφέρουν πλεονεκτήματα όπως η απόκτηση κινητικών δεδομένων, η ανίχνευση τροποποιημένων βάσεων και η παραγωγή μακρών αναγνώσεων, που υπερβαίνουν τα 10 kb, ωφέλιμα για de novo συγκροτήματα γονιδιώματος. (Heather & Chain, 2016)

### 6.3 SOUTHERN, NORTHERN ΚΑΙ WESTERN BLOTTING

Οι μέθοδοι στύπωσης χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με ηλεκτροφόρηση σε gel για διαχωρισμό και την ανίχνευση DNA, RNA και πρωτεϊνών. Αυτές οι μέθοδοι επιτρέπουν την ανίχνευση συγκεκριμένων μορίων μέσα στο μείγμα γέλης, μεταφέροντάς τα σε μια πορώδη μεμβράνη. Η μεταφορά τυπικά επιτυγχάνεται με εμφύσηση της γέλης και της μεμβράνης σε ένα διάλυμα χρησιμοποιώντας απορροφητικό χαρτί ή μέσω ηλεκτροστύπωσης για πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου. Οι αλληλουχίες DNA και RNA αναγνωρίζονται στη μεμβράνη μέσω μοριακού υβριδισμού με επισημασμένους ανιχνευτές νουκλεϊκού οξέος, ενώ οι πρωτεΐνες ανιχνεύονται χρησιμοποιώντας επισημασμένα αντισώματα. (Southern, 2006) Το Southern ή αντίστοιχα το Northern blotting είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μεταφορά θραυσμάτων DNA ή RNA από ένα πήκτωμα ηλεκτροφόρησης σε μια μεμβράνη, δημιουργώντας ένα ημιμόνιμο αντίγραφο του σχεδίου ζωνών της γέλης. Αυτό επιτρέπει την ταυτοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA ή RNA μέσω ανάλυσης υβριδισμού. (T. Brown, 1993)

Η συνολική διαδικασία περιλαμβάνει καθαρισμό του δείγματος DNA, πέψη με ένζυμα περιορισμού, ηλεκτροφόρηση των θραυσμάτων σε gel, μεταφορά των θραυσμάτων του DNA σε μεμβράνη, σήμανση των θραυσμάτων με σημασμένους ανιχνευτές (probes) μέσω υβριδοποίησης και ανίχνευση DNA. (Southern, 2006)

Πρώτα, το νουκλεϊκό οξύ (DNA ή RNA) πρέπει να καθαριστεί από ευκαρυωτικά

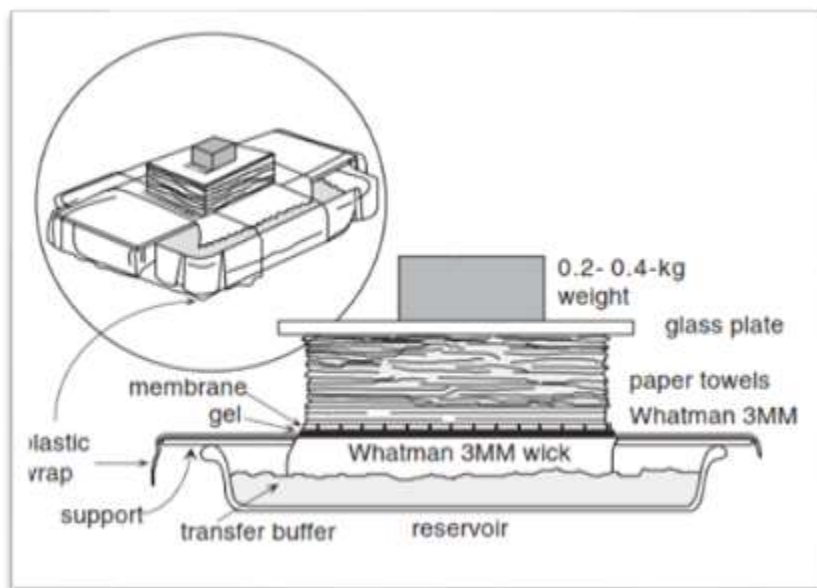


κύτταρα ή βακτήρια. Στο δεύτερο βήμα το γενωμικό DNA διασπάται σε θραύσματα από ένζυμα περιορισμού. Η ποσότητα του DNA πρέπει να είναι επαρκής για την ανίχνευση ενός μεμονωμένου γονιδιακού αντιγράφου και εξαρτάται από το μέγεθος του γονιδιώματος του οργανισμού, αλλά περιορίζεται επίσης από την ποσότητα που μπορεί να φορτωθεί πρακτικά και να τρέξει σε ένα πήκτωμα αγαρόζης και επιπλέον εξαρτάται από την ευαισθησία της τεχνικής ανίχνευσης. Η επιλογή του περιοριστικού ενζύμου εξαρτάται από τον στόχο και η πλήρης πέψη είναι κρίσιμη για την ακριβή ερμηνεία των τελικών μοτίβων ζωνών. Το κατακερματισμένο DNA στη συνέχεια διαχωρίζεται σε μεγάλο βαθμό με ηλεκτροφόρηση. Στη συνέχεια το DNA αποπουρινώνεται και μετουσιώνεται και μεταφέρεται μόνιμα σε μεμβράνη. (Gebbie, 2014) Οι πιο δημοφιλείς τύποι μεμβρανών που χρησιμοποιούνται είναι η νιτροκυτταρίνη και το νάιλον. Οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης προσφέρουν χαμηλότερα θόρυβο υποβάθρου με ορισμένους ανιχνευτές, αλλά είναι εύθραυστες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέχρι τρεις φορές. Οι μεμβράνες από νάιλον, από την άλλη πλευρά, είναι πιο στιβαρές και μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν πολλές φορές πριν φθαρούν. Το βασικό πρωτόκολλο περιλαμβάνει τριχοειδή μεταφορά προς τα πάνω με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς υψηλής περιεκτικότητας σε άλατα για τη διευκόλυνση της δέσμευσης του DNA στη μεμβράνη. (Εικόνα 8) Η υπερϊώδης ακτινοβολία (για νάιλον) ή το ψήσιμο (για τη νιτροκυτταρίνη) χρησιμοποιείται για τη μόνιμη ακινητοποίηση του DNA στη μεμβράνη. (T. Brown, 1993)

Στη συνέχεια, μπορεί να γίνει ανίχνευση και αναγνώριση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA ή RNA που μας ενδιαφέρουν με μια ισχυρή τεχνική μοριακού υβριδισμού με έναν επισημασμένο ανιχνευτή (probe). Η διαδικασία περιλαμβάνει τη σύζευξη ενός σημασμένου μορίου ανιχνευτή με το συμπληρωματικό μόριο στόχο του, και η σταθερότητα του προκύπτοντος υβριδίου εξαρτάται από την έκταση του ζεύγους βάσεων. Η διαδικασία ξεκινά με την ακινητοποίηση των μετουσιωμένων νουκλεϊκών οξέων σε ένα στερεό υπόστρωμα, ακολουθούμενη από την εφαρμογή του επισημασμένου ανιχνευτή, ο οποίος προάγει τον υβριδισμό. Μετά την επώαση, η μεμβράνη πλένεται για να αφαιρεθεί ο μη ειδικά δεσμευμένος ανιχνευτής, αφήνοντας μόνο τα συγκεκριμένα υβρίδια ανιχνευτή-στόχου. Η θερμοκρασία, η συγκέντρωση άλατος και φορμαμίδης κατά τον υβριδισμό και η θερμοκρασία των πλύσεων μετά τον υβριδισμό επηρεάζουν την αυστηρότητα της αλληλεπίδρασης μεταξύ του ανιχνευτή και του γενωμικού DNA. (T. Brown, 1993) (Gebbie, 2014) Η ανίχνευση του

υβριδοποιημένου ανιχνευτή εξαρτάται από τη μέθοδο σήμανσης που χρησιμοποιείται. Παραδείγματος χάρη, με τους ανιχνευτές με σήμανση  $^{32}\text{P}$  το σήμα ανιχνεύεται και ποσοτικοποιείται χρησιμοποιώντας φιλμ ακτίνων X για αυτοραδιογραφία. (Kroczeck, 1993) Το αρχικό πρωτόκολλο χρησιμοποιούσε ραδιενεργούς ανιχνευτές, αλλά από τότε έχουν αναπτυχθεί εναλλακτικά συστήματα σήμανσης όπως αντιδραστήρια φθορισμού και χημειοφωταύγειας. Ένας δημοφιλής τύπος ανιχνευτή είναι οι ανιχνευτές σημασμένοι με διγοξιγενίνη (digoxigenin labelled probes- DIG), οι οποίοι σε συνδυασμό με ανίχνευση χημειοφωταύγειας, μπορεί να είναι πολύ ευαίσθητοι. (Gebbie, 2014) Έχουν επίσης γίνει τροποποιήσεις, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης ανιχνευτών DNA αντί για RNA, μεμβρανών νάιλον αντί νιτροκυτταρίνης, διαλύματος αλκαλικής μεταφοράς για την αποτροπή επανασύνδεσης DNA και επεξεργασίας με οξύ για την ενίσχυση της μεταφοράς μεγάλων θραυσμάτων DNA. Επιπλέον, η μέθοδος έχει προσαρμοστεί σε διαφορετικές μορφές γέλης. (Southern, 2006) Το στύπωμα έπαιξε καθοριστικό ρόλο σε βασικές μελέτες όπως η γενετική χαρτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος, η ταυτοποίηση των ιντρονίων και η παραγωγή δακτυλικών αποτυπωμάτων DNA. Ενώ νεότερες τεχνικές όπως η αλληλουχία Sanger και η PCR έχουν αντικαταστήσει ορισμένες εφαρμογές, η στύπωση παραμένει πολύτιμη. (Southern, 2006) Η κηλίδωση Southern είναι μια ευέλικτη τεχνική που χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση του μεγέθους συγκεκριμένων θραυσμάτων DNA μέσα σε ένα πολύπλοκο μείγμα γονιδιωματικού DNA. Οι εφαρμογές του καλύπτουν διάφορους τομείς της γενετικής έρευνας. Για παράδειγμα, μπορεί να διερευνήσει φυσιολογικές γονδιακές αναδιατάξεις, όπως αυτές που συμβαίνουν σε υποδοχείς T-κυττάρων ή γονίδια ανοσοσφαιρίνης. Επιπλέον, διευκολύνει την εξέταση χρωμοσωμικών ανακατατάξεων ή μετατοπίσεων που περιλαμβάνουν ογκογονίδια στα καρκινικά κύτταρα. Επιπλέον, το Southern blotting προσφέρει ένα σχετικό μέτρο του αριθμού αντιγράφων γονιδίου μέσα σε ένα γονιδίωμα, καθιστώντας το χρήσιμο για ποσοτική ανάλυση. Διαμορφώνοντας την αυστηρότητα του υβριδισμού, η κηλίδωση Southern μπορεί να προσαρμοστεί για την αναγνώριση σχετικών αλληλουχιών εντός του γονιδιώματος ή την ανακάλυψη παρόμοιων αλληλουχιών σε διαφορετικά είδη. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η κηλίδωση Southern βοηθά στον εντοπισμό μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) που επηρεάζουν τις θέσεις αναγνώρισης συγκεκριμένων ενζύμων περιορισμού. Επιπλέον, η τεχνική χρησιμεύει ως μέσο για την επαλήθευση της απουσίας μεγάλων

αναδιατάξεων κατά τη διάρκεια της διαδικασίας κλωνοποίησης ενός θραύσματος DNA. (Glenn & Andreou, 2013)



Εικόνα 8 Διάταξη για στύπωση κατά Southern μέσω τριχοειδούς μεταφοράς.

Πηγή: Brown, T. (2001). *Southern Blotting. Current Protocols in Immunology*.  
doi:10.1002/0471142735.im1006as06

Το Western blotting, γνωστό και ως πρωτεϊνικό ανοσοστύπωμα (protein immunoblotting), είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική στην κυτταρική και μοριακή βιολογία για την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε δείγμα ομογενοποιημένου ιστού ή εκχυλίσματος. Προέρχεται από το Southern blotting και το Northern blotting και περιλαμβάνει τον διαχωρισμό πρωτεϊνών μέσω ηλεκτροφόρησης γέλης και τη μεταφορά τους σε μια μεμβράνη για ανίχνευση χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα.

Η διαδικασία ξεκινά με την προετοιμασία του δείγματος, όπου ιστοί ή κυτταρικά εκχυλίσματα συλλέγονται και λύνονται χρησιμοποιώντας μηχανικές ή ηχητικές μεθόδους. Ρυθμιστικά διαλύματα λύσης που περιέχουν απορρυπαντικά, άλατα και αναστολείς χρησιμοποιούνται για τη διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών και την πρόληψη της αποικοδόμησης. Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος μέσω ηλεκτροφόρησης γέλης, με βάση παράγοντες όπως το μοριακό βάρος ή το ισοηλεκτρικό σημείο. Ο πιο κοινός τύπος ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιείται είναι πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου και ρυθμιστικά διαλύματα φορτωμένα με

δωδεκυλοθεικό νάτριο (SDS). Το SDS είναι ένα ισχυρά ανιονικό απορρυπαντικό. Η διαδικασία SDS-PAGE, μετουσιώνει τις πρωτεΐνες επεξεργάζοντάς τις με SDS και τις διαχωρίζει με βάση το μοριακό τους βάρος.

Μετά την ηλεκτροφόρηση, οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μια μεμβράνη συνήθως νιτροκυτταρίνης λαμβάνοντας έτσι το στύπωμα. Η ηλεκτροστύπωση είναι η πιο δημοφιλής διαδικασία για τη μεταφορά πρωτεϊνών από ένα πήκτωμα σε μια μεμβράνη. Τα κύρια πλεονεκτήματά του είναι η ταχύτητα και η πληρότητα μεταφοράς. Αυτή η διαδικασία χρησιμοποιεί ηλεκτρικό ρεύμα για να τραβήξει πρωτεΐνες από το πήκτωμα στη μεμβράνη. Ο αποκλεισμός με διαλύματα πρωτεΐνης αποτρέπει τη μη ειδική δέσμευση αντισωμάτων. Η συγκέντρωση αντισωμάτων θα πρέπει να βελτιστοποιηθεί για να παρέχει την καλύτερη αναλογία σήματος προς θόρυβο. Πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση πρωτεϊνών, με την ανίχνευση χημειοφωταύγειας να είναι η πιο δημοφιλής μέθοδος. Η τεχνική είναι παρόμοια με τους ραδιοσημασμένους ανιχνευτές αλλά έχει πλεονεκτήματα, καθώς δεν απαιτεί πηγή διέγερσης ή μονοχρωμάτορα. Η χημειοφωταύγεια μπορεί να επιτύχει χαμηλότερα όρια ανίχνευσης (10-100 φορές χαμηλότερα) σε σύγκριση με άλλες τεχνικές φωταύγειας.

Η μεμβράνη επωάζεται με ένα πρωτογενές αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη στόχο. Αφού πλυθεί για να αφαιρεθεί η περίσσεια του πρωτογενούς αντισώματος, η μεμβράνη επωάζεται με ένα δευτερεύον αντίσωμα. Το δευτερεύον αυτό αντίσωμα είναι συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση (AP) ή υπεροξειδάση χρένου (HRP) και μπορεί να αναγνωρίζει το πρωτεύον αντίσωμα. Επιπλέον προστίθεται και ένα υπόστρωμα χημειοφωταύγειας που θα καταστεί δυνατή την ανίχνευση. Το AP καταλύει την αποφωσφορυλίωση του υποστρώματος χημειοφωταύγειας, με αποτέλεσμα την εκπομπή φωτός. Το HRP καταλύει την οξειδωση της λουμινόλης παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου, το οποίο επίσης εκπέμπει φως. Το εκπεμπόμενο φως μπορεί να ενισχυθεί σημαντικά (έως και 1000 φορές) με την προσθήκη ενώσεων όπως οι φαινόλες. Τέλος, η εικόνα κηλίδας οπτικοποιείται με την έκθεσή της σε φιλμ. (Kurien & Scofield, 2006) (Jensen, 2012)

## 6.4 ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ

Η ανάλυση γονιδιακής έκφρασης, που διεξήχθη αρχικά ένα γονίδιο τη φορά χρησιμοποιώντας μεθόδους όπως στύπωμα Northern και ποσοτική RT-PCR, υπέφερε από περιορισμούς όπως υψηλή απαίτηση δείγματος, ανάλυση ενός γονιδίου και πολυπλοκότητα σχεδιασμού συγκεκριμένων προτύπων ενίσχυσης. Ως απόκριση, προέκυψε η τεχνολογία συστοιχίας υβριδισμού, επιτρέποντας την ταυτόχρονη ανάλυση πολλαπλών γονιδιακών εκφράσεων. (Freeman et al., 2000)

Οι μικροσυστοιχίες σχεδιάστηκαν από την ανάγκη εντοπισμού μικρότερων γενετικών ανισορροπιών, επεξεργασίας πολλών ασθενών ταυτόχρονα και ελαχιστοποίησης της τεχνικής διάρκειας και χρήσης των αντιδραστηρίων. Μια μικροσυστοιχία είναι μια μικροσκοπική επιφάνεια (chip), κατασκευασμένη από γυαλί ή πυρίτιο, που φέρει ένα πλήθος χαρτογραφημένου DNA ή μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών. Αυτές οι αλληλουχίες, γνωστές ως «ανιχνευτές», αντιστοιχούν σε αλληλουχίες DNA που είναι κατανεμημένες σε όλο το γονιδίωμα. Οι ανιχνευτές κατασκευάζονται είτε από κλώνους, προϊόντα PCR ή από ολιγονουκλεοτίδια που έχουν εντοπιστεί ρομποτικά. Τα ολιγονουκλεοτίδια στο chip χρησιμοποιούνται για τον υβριδισμό βιβλιοθηκών cDNA ή cRNA σημασμένων με φθοροφόρο, άργυρο ή χημειοφωταύγεια. Η γονιδιωματική ανάλυση μιας συγκεκριμένης συστοιχίας καθορίζεται από τη φυσική απόσταση μεταξύ δύο ανιχνευτών και το μέγεθος ενός μόνο ανιχνευτή. Οι μικροσυστοιχίες χρησιμοποιούνται για ανάλυση μεταγραφώματος, γονότυπο και ταυτοποίηση αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-DNA ή επιγενετικών προτύπων σε κλίμακα ευρείας γονιδιώματος (ChIP-chip). (Thermes, 2014) (Freeman et al., 2000) (Keren & Le Caignec, 2011)

Ένας εξελιγμένος τύπος συστοιχιών υβριδισμού είναι οι συστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων υψηλής πυκνότητας ή συμπληρωματικών DNA. Αυτές οι συστοιχίες είναι ισχυρά εργαλεία για τη γονιδιωματική, επιτρέποντας στους ερευνητές να αξιοποιήσουν τον τεράστιο όγκο των διαθέσιμων πληροφοριών αλληλουχίας. Διαφέρουν από άλλες μορφές συστοιχιών στο ότι ο ανιχνευτής δημιουργείται in situ στην επιφάνεια της μήτρας. Οι πρόσφατες εξελίξεις στην τεχνολογία οδήγησαν στη σμίκρυνση των συστοιχιών και στην αύξηση της πειραματικής αποτελεσματικότητας και του περιεχομένου πληροφοριών. Τώρα, μπορούν να παραχθούν συστοιχίες με πάνω από 250.000 διαφορετικούς ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές ή 10.000 διαφορετικά cDNA ανά τετραγωνικό εκατοστό. Αυτές οι συστοιχίες υψηλής πυκνότητας, που

συνήθως αναφέρονται ως μικροσυστοιχίες DNA, συστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων, συστοιχίες GeneChip ή απλά "chip", έχουν φέρει επανάσταση στα βιολογικά πειράματα και χρησιμοποιούνται εκτενώς στην έρευνα γονιδιωματικής. (Lockhart & Winzeler, 2000)

Ωστόσο, οι συστοιχίες μετρούν μόνο σχετικά, όχι απόλυτα τα επίπεδα γονιδιακής μεταγραφής και τυπικά δεν διαφοροποιούν μεταξύ εναλλακτικά ματισμένων μεταγραφών ή εξαιρετικά ομόλογων οικογενειών γονιδίων. Επιπλέον, δεν μπορούν να συσχετίσουν τις αλλαγές του mRNA με τις πρωτεϊνικές αλλαγές. Παρά τους περιορισμούς αυτούς, έως ότου οι πρωτεομικές τεχνολογίες γίνουν καθολικά προσβάσιμες, οι συστοιχίες υβριδισμού αντιπροσωπεύουν την καλύτερη μέθοδο για ανάλυση γονιδιακής έκφρασης μεγάλης κλίμακας. (Freeman et al., 2000)

## **6.5 ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΟΣΟΡΟΦΗΤΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ (ELISA)**

Η Ενζυμική Ανοσοροφητική Δοκιμασία (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) ή απλώς ELISA, είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη εργαστηριακή τεχνική για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό διαφόρων ουσιών, συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών, πεπτιδίων, αντισωμάτων και ορμονών. Λειτουργεί με βάση την αρχή των ειδικών αλληλεπιδράσεων αντισώματος-αντιγόνου, χρησιμοποιώντας την υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία των αντισωμάτων για τον εντοπισμό και τη μέτρηση των μορίων-στόχων. Η μέθοδος επινοήθηκε ταυτόχρονα από δύο ερευνητικές ομάδες. Το 1971, οι Ελβετοί επιστήμονες Engvall και Perlmann, τροποποίησαν τη μέθοδο RIA (Radioimmunoassay- ραδιοανοσοδοκιμασία) αντικαθιστώντας το ραδιενεργό ιώδιο με ένζυμο. Ποσοτικοποίησαν με επιτυχία τα επίπεδα IgG στον ορό κουνελιού, με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση. Την ίδια χρονιά, μια άλλη ερευνητική ομάδα, οι Van Weemen and Schuurs, χρησιμοποίησε το ένζυμο υπεροξειδάση χρένου για τη μέτρηση της ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης στα ούρα. Το ELISA κέρδισε γρήγορα δημοτικότητα, με εφαρμογές σε διάφορους τομείς. Οι ερευνητές τη χρησιμοποίησαν για τη διάγνωση λοιμώξεων, τον εντοπισμό ασθενειών όπως η ελονοσία και για τη μέτρηση των συγκεντρώσεων ορμονών, πεπτιδίων και πρωτεϊνών. Με την πάροδο του χρόνου, η ELISA έγινε μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος σε ερευνητικά και διαγνωστικά εργαστήρια παγκοσμίως. Η ELISA χρησιμοποιείται στην ιατρική διαγνωστική, τη βιοϊατρική έρευνα και τη φαρμακευτική ανάπτυξη. Με την αξιοποίηση



των ενζυματικών αντιδράσεων, αυτή η τεχνική παρέχει ακριβή και αξιόπιστα αποτελέσματα, καθιστώντας την ένα ανεκτίμητο εργαλείο για την κατανόηση των μηχανισμών της νόσου και την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας. (Aydin, 2015) (Lequin, 2005)

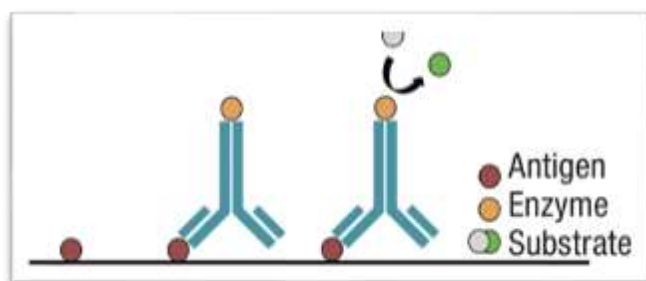
Η βασική αρχή της ELISA περιλαμβάνει 4 συνιστώσες: ένα αντιγόνο που ακινητοποιείται σε πλάκες μικροτιτλοδότησης 96 φρεατίων- συνήθως από πολυστυρένιο (immunosorbent), ένα αντίσωμα που προσδένεται στο αντιγόνο, σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος, ένα ένζυμο προσαρτημένο στο αντίσωμα (enzyme-linked) και τέλος ένα χρωμογόνο υπόστρωμα για το ένζυμο, το οποίο αποδίδει μια ορατή αλλαγή χρώματος ή φθορισμό, υποδηλώνοντας την παρουσία αντιγόνου. (Gan & Patel, 2013) (Shah & Maghsoudlou, 2016) Τα ένζυμα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ELISA περιλαμβάνουν τη β γαλακτοσιδάση, την οξειδάση της γλυκόζης, την υπεροξειδάση και την αλκαλική φωσφατάση. (Aydin, 2015) Τα γενικά βήματα της ELISA περιλαμβάνουν την επίστρωση των πλακών, εν συνεχεία το «μπλοκάρισμα» της πλάκας με διάλυμα «αποκλεισμού» προκειμένου να αποτραπεί η μη ειδική σύνδεση άλλων μορίων στην επιφάνεια της, το πλύσιμο της πλάκας με ρυθμιστικό διάλυμα μετά από κάθε βήμα αφαιρώντας τυχόν μη δεσμευμένα συστατικά ή υπολείμματα της ανάλυσης, γεγονός που ενισχύει την ειδικότητα της ανάλυσης και μειώνει τον θόρυβο του περιβάλλοντος κατά την ανίχνευση, τη δημιουργία σήματος με την προσθήκη του υποστρώματος του ενζύμου και τέλος την ανάγνωση των πλακών. Υπάρχουν τέσσερις τύποι της ELISA: έμμεση, άμεση, sandwich και ανταγωνιστική, με την άμεση μέθοδο να είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη. (Shah & Maghsoudlou, 2016) (Gao et al., 2018)

#### *Άμεση ELISA και Έμμεση ELISA*

Αρχικά, πραγματοποιείται ακινητοποίηση του αναλύτη (πχ ένα αντιγόνο) απευθείας πάνω σε μια στέρεη επιφάνεια (πχ πλάκα πολυστυρενίου) με φρεάτια. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιείται ένα ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει την αναλυόμενη ουσία (συνήθως Buffer ανθρακικού-διττανθρακικού, pH 9). Εκτός από το διάλυμα που περιέχει την αναλυόμενη ουσία, επιστρώνονται πρότυπα, θετικοί μάρτυρες και αρνητικοί μάρτυρες. Τα πρότυπα είναι δείγματα με γνωστές συγκεντρώσεις της αναλυόμενης ουσίας και μια πρότυπη καμπύλη προετοιμάζεται με αραίωση μιας γνωστής συγκέντρωσης σε μια περιοχή κοντά στην αναμενόμενη άγνωστη

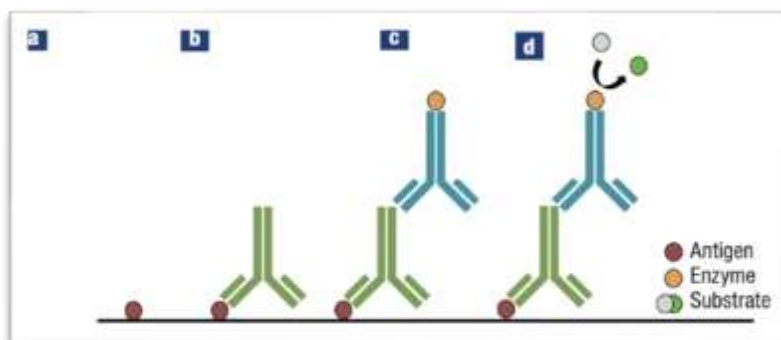
συγκέντρωση. Για να αποφευχθεί μη ειδική δέσμευση στις θέσεις που δεν ακινητοποιήθηκε αντιγόνο προστίθεται διάλυμα αλβουμίνης ορού βοοειδών ή καζεΐνη, που περιέχει πρωτεΐνες που δεν αντιδρούν. Σε κάθε στάδιο γίνεται πλύση με ρυθμιστικά διαλύματα. Έπειτα, προστίθεται το *πρωταρχικό αντίσωμα ανίχνευσης*, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός συμπλέγματος αντιγόνου-αντισώματος (στην περίπτωση που το δείγμα είναι θετικό για τον αναλύτη που εξετάζεται). Το πρωτεύον αντίσωμα ανίχνευσης είτε είναι άμεσα συνδεδεμένο με ένα ένζυμο (δηλαδή άμεση ELISA) είτε είναι το ίδιο συνδεδεμένο σε ένα δευτερεύον αντίσωμα γνωστό ως *αντίσωμα δευτερογενούς ανίχνευσης* (δηλαδή έμμεση ELISA). Στη συνέχεια, προστίθεται ένα υπόστρωμα, που οδηγεί σε αλλαγή χρώματος που σημαίνει παρουσία αντιγόνου. Η ένταση αυτού του χρώματος, μετρούμενη ως οπτική πυκνότητα, αντιστοιχεί άμεσα στην ποσότητα του αντιγόνου στο δείγμα. Η ανίχνευση γίνεται χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης μικροπλάκας και οι μετρήσεις των δειγμάτων συγκρίνονται με την τυπική καμπύλη για ανάλυση.

Η άμεση ELISA είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό της ποσότητας αντιγόνων υψηλού μοριακού βάρους, είναι γρήγορη αλλά έχει χαμηλότερη ευαισθησία καθώς δεν γίνεται ενίσχυση του σήματος. Επίσης είναι απαραίτητο να υπάρχει συγκεκριμένο αντίσωμα για κάθε αντιγόνο που πρέπει να προσδιοριστεί, γεγονός που αυξάνει το κόστος και είναι χρονοβόρο. Απ' την άλλη, η έμμεση ELISA προσφέρει μεγαλύτερη ευελιξία καθώς πολλαπλά πρωτεύοντα αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν με το ίδιο δευτερεύον αντίσωμα, μεγάλη ευαισθησία και μικρότερο κόστος. Ωστόσο, μπορεί να εμφανιστεί διασταυρούμενη αντίδραση με το δευτερεύον αντίσωμα, με αποτέλεσμα μη ειδικά σήματα. (Εικόνα 9, 10) (Aydin, 2015) (Shah & Maghsoudlou, 2016)



Εικόνα 9 Άμεση ELISA

Shah, K., & Maghsoudlou, P., "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics", *British Journal of Hospital Medicine* 2016, 77(7), C98–C101.



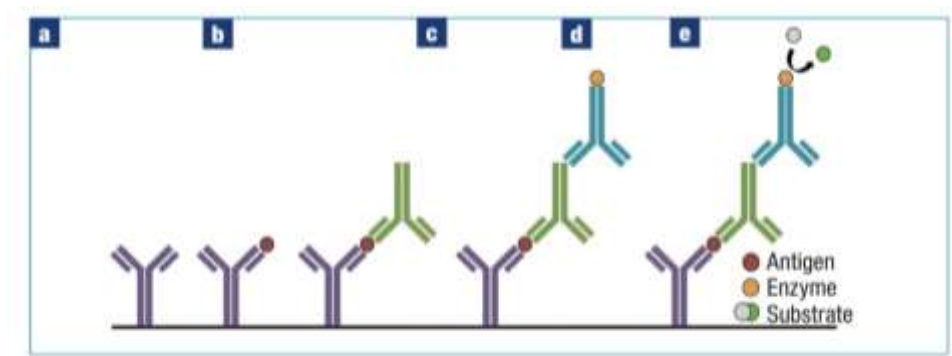
Εικόνα 10 Έμμεση ELISA.

Πηγή: Shah, K., & Maghsoudlou, P., "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics", *British Journal of Hospital Medicine* 2016, 77(7), C98–C101.

### Sandwich ELISA

Στην Sandwich ELISA, η πλάκα επιστρώνεται με ένα *αντίσωμα σύλληψης* και στη συνέχεια τα άδεια φρεάτια αποκλείονται με διάλυμα μπλοκαρίσματος. Έπειτα, το δείγμα του αναλύτη- αντιγόνου προστίθεται και δεσμεύεται στο αντίσωμα σύλληψης. Η πλάκα εκπλένεται για να απομακρυνθούν τα μη δεσμευμένα αντιγόνα. Μετά το στάδιο της πλύσης, προστίθενται και επωάζονται *πρωταρχικά αντισώματα ανίχνευσης* ειδικά για το αντιγόνο- αναλύτη. Στη συνέχεια, προστίθενται στην πλάκα *αντισώματα δευτερογενούς ανίχνευσης επισημασμένα με ένα ένζυμο*, τα οποία προσδένονται στα πρωταρχικά αντισώματα ανίχνευσης. Για την οπτικοποίηση της ενζυμικής δραστηριότητας, εισάγεται ένα υπόστρωμα κατάλληλο για το ένζυμο, το οποίο υφίσταται αντίδραση με αυτό, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ορατού χρώματος ή σήματος, εάν φυσικά είναι παρών ο αναλύτης στο αρχικό δείγμα. Έτσι δημιουργείται μια δομή "Sandwich" με δύο αντισώματα να περιβάλουν το αντιγόνο που βρίσκεται αναμεσά τους. Σε περιπτώσεις όπου απαιτείται η ευαίσθητη και ισχυρή μέτρηση του αντιγόνου- ειδικά για το διαχωρισμό και την ανίχνευσή του σε μια πολύπλοκη μήτρα δείγματος, η Sandwich ELISA βρίσκει εφαρμογή. Το αντιγόνο ενδιαφέροντος μπορεί να επιλεγεί ειδικά από ένα δείγμα μικτών αντιγόνων, μέσω του αντισώματος «σύλληψης» και έτσι το βήμα του καθαρισμού του δείγματος παραλείπεται, εξοικονομώντας χρόνο και χρήματα, ενώ παράλληλα εξασφαλίζεται η ειδικότητα και ευαισθησία της μεθόδου. Το βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι η ανάγκη προσεκτικής επιλογής συγκεκριμένων πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων.

Στην πραγματικότητα, θα πρέπει να εξασφαλιστεί ότι αυτά τα αντισώματα δημιουργούν έναν ταιριαστό συνδυασμό μεταξύ τους, συνδεόμενα σε διαφορετικούς επίτοπους του ίδιου αντιγόνου, κάτι που είναι πολύ σημαντικό για να αποτραπεί ανταγωνισμός για τις θέσεις δέσμευσης στο αντιγόνο. Έτσι, τελικά, μια Sandwich ELISA είναι πιο χρονοβόρα και πιο ακριβή από την άμεση και την έμμεση ELISA. (Εικόνα 11) (Aydin, 2015) (Gan & Patel, 2013) (Shah & Maghsoudlou, 2016)



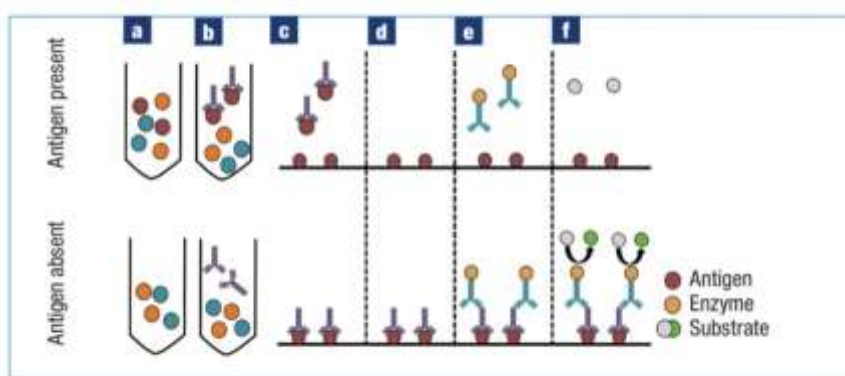
Εικόνα 11 Sandwich ELISA.

Πηγή: Shah, K., & Maghsoudlou, P., "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics", *British Journal of Hospital Medicine* 2016, 77(7), C98–C101.

### Ανταγωνιστική ELISA

Η ανταγωνιστική ELISA βασίζεται σε μια διαδικασία ανταγωνιστικής δέσμευσης. Σε αυτή τη μέθοδο, πρωταρχικά αντισώματα ανίχνευσης αναμιγνύονται με ένα μη καθαρισμένο δείγμα που περιέχει τα αντιγόνα ενδιαφέροντος. Τα αντισώματα συνδέονται με τυχόν αντιγόνα που υπάρχουν, σχηματίζοντας σύμπλοκα αντιγόνου-αντισώματος. Αυτά τα σύμπλοκα στη συνέχεια προστίθενται σε μια πλάκα φρεατίων προ-επικαλυμμένη με το αντιγόνο που μας ενδιαφέρει. Οποιαδήποτε μη δεσμευμένα αντισώματα θα συνδεθούν με το αντιγόνο στο φρεάτιο. Όσο περισσότερα σύμπλοκα αντιγόνου-αντισώματος σχηματίζονται τόσο λιγότερα αντισώματα θα είναι διαθέσιμα για να συνδεθούν με το αντιγόνο στο φρεάτιο. Ως εκ τούτου, υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ των αντιγόνων στο δείγμα και εκείνων που έχουν προεπικαλυφθεί στο φρεάτιο, για τη δέσμευση με τα αντισώματα. Μετά από μια περίοδο επώασης και τα βήματα πλύσης για την απομάκρυνση των μη δεσμευμένων αντισωμάτων, προστίθενται δευτερεύοντα αντισώματα σημασμένα με ένζυμο, καθώς και ένα υπόστρωμα, προκαλώντας μια αλλαγή χρώματος ή φθορισμό. Στην ανταγωνιστική ELISA, υπάρχει αντίστροφη αναλογία μεταξύ της συγκέντρωσης της αναλυόμενης ουσίας- αντιγόνου και της έντασης του προκύπτοντος χρώματος ή φθορισμού. Όταν η ποσότητα του

αντιγόνου στο δείγμα είναι υψηλή, λιγότερα αντισώματα θα είναι διαθέσιμα για σύνδεση με το αντιγόνο στην πλάκα και κατ' επέκταση για σύνδεση με τα δευτερεύοντα αντισώματα σημασμένα με ένζυμο, οδηγώντας σε χαμηλότερη ένταση χρώματος ή φθορισμού. Αυτός ο τύπος ELISA είναι χρήσιμος σε περιπτώσεις όπου το προς μέτρηση αντιγόνο είναι μικρό σε μέγεθος, όταν έχει μόνο έναν επίτοπο για δέσμευση αντισώματος και όταν απαιτείται υψηλή ευαισθησία σε ένα δείγμα που είναι ένα σύνθετο μείγμα αντιγόνων. Ωστόσο, η ανταγωνιστική ELISA έχει χαμηλή ειδικότητα, επομένως δεν πρέπει να χρησιμοποιείται για αραιωμένα δείγματα. (Εικόνα 12) (Aydin, 2015) (Gan & Patel, 2013) (Shah & Maghsoudlou, 2016)



Εικόνα 12 Ανταγωνιστική ELISA

Πηγή: Shah, K., & Maghsoudlou, P., "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics", *British Journal of Hospital Medicine* 2016, 77(7), C98–C101.

## 6.6 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

Η HPLC, ή υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, οφείλει την ανάπτυξή της στις επίμονες προσπάθειες του Csaba Horvath, ενός χημικού μηχανικού ουγγρικής-αμερικανικής καταγωγής. Η αφοσίωση του Horvath διήρκεσε πάνω από μια δεκαετία καθώς κατασκεύασε το όργανο χρησιμοποιώντας τον εργαστηριακό εξοπλισμό του εργαστηρίου του. Αυτό άνοιξε το δρόμο για την ευρεία υιοθέτηση και εμπορευματοποίηση της πρωτοποριακής έρευνας που διεξήχθη από τους Martin και Synge, οι οποίοι ανέπτυξαν τις θεμελιώδεις αρχές και έννοιες που έθεσαν τα θεμέλια για την HPLC όπως τη γνωρίζουμε σήμερα.

Σήμερα, η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι μια ισχυρή, πολυχρηστική αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως σε διάφορους

επιστημονικούς και βιομηχανικούς τομείς. Έχει φέρει επανάσταση στον τομέα της επιστήμης επιτρέποντας τον διαχωρισμό, την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση σύνθετων μειγμάτων με υψηλή απόδοση και ακρίβεια. Παράλληλα είναι μια εύκολη στη χρήση μέθοδος και αρκετά οικονομική. Λόγω του εκτεταμένου αυτοματισμού, μπορεί να λειτουργήσει σχεδόν χωρίς επίβλεψη με πολλαπλά δείγματα σε διάφορες συνθήκες διαχωρισμού. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην αρχή της χρωματογραφίας υγρού-στερεού, όπου ένα μείγμα δείγματος διέρχεται από μια στατική φάση ενώ μεταφέρεται από μια κινητή φάση. (Blum, 2014) (Žuvela et al., 2019)

#### *Η στατική φάση*

Η στατική φάση συχνά αναφέρεται ως «η καρδιά» του χρωματογραφικού συστήματος καθώς εκεί λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των αναλυτών. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται μέσω δύο φαινομένων, αφενός της διαδικασίας κατακρήμνισης όπου τα μόρια της αναλυόμενης ουσίας βυθίζονται εξ ολοκλήρου στη στατική φάση ή/και αφετέρου του φαινομένου της προσρόφησης που συμβαίνει στη διεπιφάνεια μεταξύ της στατικής φάσης και του διαλύτη. Συνήθως, η στατική φάση είναι συσκευασμένη σε στήλη, κατασκευασμένη από ανοξείδωτο χάλυβα και αποτελείται από πορώδη σωματίδια επικαλυμμένα με ένα συγκεκριμένο υλικό, παρέχοντας μοναδικά χαρακτηριστικά διαχωρισμού. Έτσι, η επιλογή της κατάλληλης στατικής φάσης βελτιώνει τη χρωματογραφική επιλεκτικότητα, με αποτέλεσμα μια εξαιρετικά ευδιάκριτη, αξιόπιστη και αναπαραγώγιμη ανάλυση. Οι στήλες HPLC περιλαμβάνουν είτε κανονικής φάσης, είτε ανάστροφης φάσης. Στη χρωματογραφία κανονικής φάσης, χρησιμοποιείται μη τροποποιημένο πυρίτιο, το οποίο είναι πολικό και κατάλληλο κυρίως για εξαιρετικά υδρόφοβες ενώσεις που είναι αδιάλυτες σε πολικούς ή υδατικούς διαλύτες. Η στατική φάση παρουσιάζει υψηλότερο βαθμό πολικότητας από εκείνον της κινητής φάσης και κατά συνέπεια, η σειρά έκλουσης εξαρτάται από την πολικότητα των αναλυτών: από τις πιο υδρόφοβες έως τις πιο υδρόφιλες ενώσεις. Τα πιο πολικά συστατικά της αναλυόμενης ουσίας, προσροφούνται πιο έντονα στη στατική φάση και επομένως απαιτούν περισσότερο χρόνο για να μετατοπιστούν και να εκλουστούν από τη στήλη. Αντίθετα, τα μη πολικά συστατικά έχουν ασθενή συγγένεια για τη στατική φάση και επομένως εκλούνται με μικρότερο χρόνο κατακράτησης. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης είναι ο πιο δημοφιλής τρόπος χρωματογραφίας, αντιπροσωπεύοντας περισσότερο από το 90% όλων των διαχωρισμών. Περισσότερες από 600 στήλες HPLC ανάστροφης φάσης είναι



διαθέσιμες στην αγορά, μερικές με μεγάλες διαφορές στην εκλεκτικότητα καθώς και στα πρότυπα κατασκευής. Η χρωματογραφία ανάστροφης φάσης χρησιμοποιεί μια μη πολική στατική φάση και μια πολική κινητή φάση. Η στατική φάση χρησιμοποιεί αλυσίδες C8 ή C18 συνδεδεμένες με το πυρίτιο και η διαβαθμισμένη έκλουση γίνεται από τα πολικά στα μη πολικά συστατικά. Τα πιο λιπόφιλα- μη πολικά συστατικά της αναλυόμενης ουσίας απορροφώνται πιο εύκολα και εκλούνται από τη στήλη αργότερα σε σχέση με τα πολικά ή όταν μειωθεί η πολικότητα του διαλύτη (Gradient). Ενώ αντίστοιχα τα πολικά συστατικά παρασύρονται από την κινητή φάση καθώς δεν κατακρατώνται καθόλου και εκλούνται γρηγορότερα. (Žuvela et al., 2019) (Blum, 2014) (Opuni et al., 2021) (Rafferty et al., 2007)

#### *Η κινητή φάση*

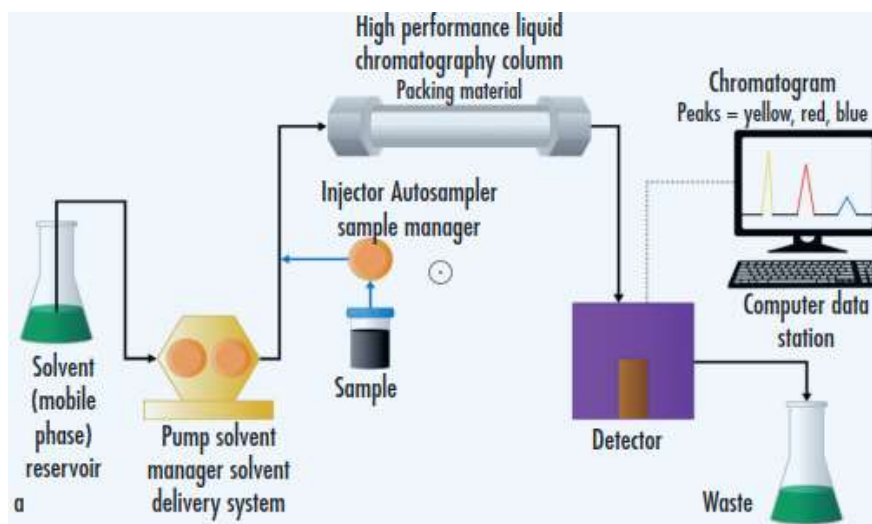
Η κινητή φάση, επίσης γνωστή ως υγρό έκλουσης, είναι ένα υγρό ή ένας συνδυασμός υγρών που μεταφέρει το δείγμα μέσω του χρωματογραφικού συστήματος. Αν και δεν ευθύνεται άμεσα για τον χρωματογραφικό διαχωρισμό, η κινητή φάση είναι απαραίτητη για την ακρίβεια του διαχωρισμού και την εκλεκτικότητα της μεθόδου. Πρέπει να είναι συμβατή με τις αναλυόμενες ουσίες που μας ενδιαφέρουν αλλά και με τη στατική φάση. Μπορεί να έχει σταθερή σύσταση, δηλαδή να είναι ισοκρατική ή να είναι διαβαθμισμένης σύστασης (Gradient). Οι κοινώς χρησιμοποιούμενες κινητές φάσεις περιλαμβάνουν οργανικούς διαλύτες (π.χ. μεθανόλη, ακετονιτρίλιο) και υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα. Άλλοι διαλύτες όπως εξάνιο, ισοπροπανόλη και διχλωρομεθάνιο χρησιμοποιούνται επίσης. Μια αντλία υψηλής πίεσης χρησιμοποιείται για τη δημιουργία και τη μέτρηση ενός καθορισμένου ρυθμού ροής κινητής φάσης, συνήθως χιλιοστόλιτρα ανά λεπτό. Ένας εγχυτήρας εισάγει το δείγμα στο συνεχώς ρέον ρεύμα κινητής φάσης που μεταφέρει το δείγμα στη στήλη υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. (Εικόνα 13) (Blum, 2014) (Žuvela et al., 2019) (Opuni et al., 2021)

#### *Ο ανιχνευτής*

Ο ανιχνευτής είναι υπεύθυνος για τη μέτρηση των αναλυτών που εκλούνται από τη στήλη και τη δημιουργία των αντίστοιχων σημάτων. Η επιλογή του ανιχνευτή εξαρτάται από τις ιδιότητες της αναλυόμενης ουσίας και την επιθυμητή ευαισθησία και επιλεκτικότητα. Οι κοινοί ανιχνευτές στην HPLC περιλαμβάνουν ανιχνευτές απορρόφησης UV-Vis, ανιχνευτές φθορισμού, ανιχνευτές δείκτη διάθλασης, ηλεκτροχημικούς ανιχνευτές και φασματομέτρα μάζας. Οι ανιχνευτές παρέχουν ποσοτικές και ποιοτικές πληροφορίες για τα διαχωρισμένα συστατικά. (Opuni et al.,

2021)

Αν και η HPLC προσφέρει μια ευέλικτη και ευρέως εφαρμόσιμη τεχνική διαχωρισμού, μπορεί να εμφανίσει δυσκολίες στο σχεδιασμό λόγω των πολυάριθμων μεταβλητών που εμπλέκονται, όπως το pH κινητής φάσης, η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος, ο ρυθμός ροής, η θερμοκρασία στήλης και το μήκος κύματος του ανιχνευτή, μεταξύ άλλων, προκειμένου να επιτευχθούν οι επιθυμητοί διαχωρισμοί. Η



Εικόνα 13 Ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Απαρτίζεται από μια κινητή φάση, μια αντλία, έναν εγχυτήρα δείγματος, τη στήλη, τον ανιχνευτή και τον υπολογιστή που επεξεργάζεται τα δεδομένα. Πηγή: Blum, F., "High performance liquid chromatography", *British Journal of Hospital Medicine* 2014, 75(Sup2), C18–C21.

βελτιστοποίηση των παραμέτρων αυτών, είναι μια πολύπλοκη διαδικασία και απαιτεί προσεκτική προσαρμογή πριν από κάθε εκτέλεση. (Sahu et al., 2018)

## 6.7 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (MS)

Η φασματοσκοπία μάζας είναι μια ισχυρή αναλυτική τεχνική που έχει φέρει επανάσταση στον τομέα της επιστήμης, συμπεριλαμβανομένης της βιοχημείας και της ιατρικής. Παρέχει πολύτιμες πληροφορίες τόσο ποιοτικές όσο και ποσοτικές. Παραδείγματος χάρη, μπορεί να προσδιοριστεί η στοιχειακή σύνθεση μιας ουσίας, να μετρηθεί η μοριακή μάζα ενός πολυπεπτιδίου και να δοθούν λεπτομερείς δομικές πληροφορίες όπως η δομή του αβ αμυλοειδούς που απομονώνεται από ασθενείς με τη νόσο Αλτσχάιμερ, ή προσδιορισμό της αλληλουχίας αμινοξέων ή της θέσης προσκόλλησης και του τύπου των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων μιας πρωτεΐνης. (Domon & Aebersold, n.d.) (Burlingame & Boyd, 1994)

Στον πυρήνα της, η φασματοσκοπία μάζας περιλαμβάνει το διαχωρισμό και την ανίχνευση ιόντων με βάση την αναλογία μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ). Τα φασματόμετρα μάζας αποτελούνται από τρία βασικά στοιχεία: μια πηγή ιόντων, έναν αναλυτή μάζας και έναν ανιχνευτή ιόντων. (Εικόνα 14) (Guerrera & Kleiner, 2005) (Matthiesen & Bunkenborg, 2013)

#### *Η πηγή ιόντων*

Οι φασματομετρικές μετρήσεις μάζας πραγματοποιούνται στην αέρια φάση σε ιονισμένους αναλυτές. Στην πηγή ιόντων παράγονται τα ιόντα του αναλύτη. Η πηγή ιόντων παράγει ιόντα μεταφέροντας μόρια από τη συμπυκνωμένη (υγρή ή στερεά) φάση, στην αέρια φάση και ιονίζοντάς τα είτε θετικά είτε αρνητικά κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας. (Matthiesen & Bunkenborg, 2013) (Aebersold & Mann, 2003)

Η φασματομετρία μάζας περιορίστηκε για μεγάλο χρονικό διάστημα σε μικρές και θερμοσταθερές ενώσεις λόγω της έλλειψης αποτελεσματικών τεχνικών για ήπιο ιονισμό και μεταφορά των ιονισμένων μορίων από τη συμπυκνωμένη φάση στην αέρια φάση χωρίς υπερβολικό κατακερματισμό. (Domon & Aebersold, n.d.) Οι επαναστατικές ανακαλύψεις στα τέλη της δεκαετίας του 1980 της μεθόδου Εκρόφησης- Ιοντισμού από μήτρα μέσω λέιζερ (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization -MALDI) και του Ιοντισμού με Ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization-ESI) κατέστησαν δυνατή την ανάλυση ουσιών όπως ανέπαφων πολυπεπτιδίων και πρωτεϊνών από την MS. (Van Riper et al., 2013) Τόσο η MALDI όσο και ο ESI είναι τεχνικές ήπιου ιονισμού που παράγουν ιόντα με ελάχιστη εσωτερική ενέργεια, με αποτέλεσμα περιορισμένο κατακερματισμό. Στη MALDI, τα δείγματα συν-κρυσταλλώνονται με μια οργανική μήτρα σε έναν μεταλλικό στόχο. Χρησιμοποιείται ένα παλμικό λέιζερ για τη διέγερση της μήτρας, προκαλώντας ταχεία θερμική θέρμανση των μορίων και επακόλουθη απελευθέρωση ιόντων στην αέρια φάση. Ο ESI βασίζεται στην εισαγωγή ενός ηλεκτρικά παραγόμενου αραιού διαλύματος ιόντων απευθείας στην είσοδο ενός φασματόμετρου μάζας, που λειτουργεί σε ατμοσφαιρική πίεση. Με την πάροδο του χρόνου, έχει επιτευχθεί αξιοσημείωτη πρόοδος που προκύπτει από τη βελτιστοποίηση του ρυθμού ροής υγρού κατά τον ηλεκτροψεκασμό. Αυτή η τελειοποίηση είχε ως αποτέλεσμα την πιο αποτελεσματική παραγωγή ιόντων. Αυτή η μέθοδος επιτρέπει τον άμεσο ιονισμό των μορίων από ένα διάλυμα, καθιστώντας το συμβατό με τεχνικές διαχωρισμού υγρών (όπως HPLC). (Guerrera & Kleiner, 2005) Αντίστοιχα, η MALDI εξαχνώνει και ιονίζει τα δείγματα

από μια ξηρή, κρυσταλλική μήτρα μέσω παλμών λέιζερ. Το MALDI-MS χρησιμοποιείται συνήθως για την ανάλυση σχετικά απλών μιγμάτων πεπτιδίων, ενώ τα ολοκληρωμένα συστήματα υγρής χρωματογραφίας ESI-MS (LC-MS) προτιμώνται για την ανάλυση πολύπλοκων δειγμάτων. (Aebersold & Mann, 2003)

#### *Ο αναλυτής μάζας*

Μετά τη διαδικασία του ιονισμού, το δείγμα προχωρά στον αναλυτή μάζας, ο οποίος διαχωρίζει τα ιόντα με βάση τους λόγους μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ). Η κίνηση των ιόντων μέσα στον αναλυτή μάζας μπορεί να ελεγχθεί από ηλεκτρικά ή μαγνητικά πεδία προκειμένου να κατευθυνθούν προς έναν ανιχνευτή. Όσο αφορά τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών, χρησιμοποιούνται επί του παρόντος τέσσερις κύριοι τύποι αναλυτών μάζας: αναλυτές χρόνου πτήσης (Time Of Flight- TOF), αναλυτές παγίδας ιόντων (Ion Trap- IT), τετραπολικοί αναλυτές και αναλυτές κυκλοτρονικού συντονισμού ιόντων με μετασχηματισμού Fourier (Fourier-transform ion cyclotron resonance- FTICR). Αυτοί οι τέσσερις αναλυτές διαφέρουν σημαντικά ως προς την ευαισθησία, την ανάλυση, την ακρίβεια μάζας και την ικανότητά τους να κατακερματίζουν πεπτιδικά ιόντα. (Guerrera & Kleiner, 2005)

Οι αναλυτές χρόνου πτήσης TOF καθορίζουν την αναλογία μάζας προς φορτίο των ιόντων της αναλυόμενης ουσίας με βάση τον χρόνο πτήσης τους μέσω ενός σωλήνα κενού. Οι αναλυτές αυτοί επιταχύνουν τα ιόντα και μετρούν το χρόνο πτήσης μεταξύ της επιτάχυνσης και της χρονικής στιγμής που φτάνουν στον ανιχνευτή. Έχουν γίνει σημαντικές βελτιώσεις όσον αφορά την ανάλυση και την ακρίβεια της μάζας που μετράται, με τις δυνάμεις ανάλυσης να ξεπερνούν τις 12.000 και τους ποσοτικούς προσδιορισμούς της τάξεως των ppm να γίνονται ρουτίνα. (Domon & Aebersold, n.d.) (Matthiesen & Bunkenborg, 2013)

Στους αναλυτές παγίδας ιόντων, τα ιόντα πρώτα δεσμεύονται ή «παγιδεύονται» για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα και στη συνέχεια υποβάλλονται σε ανάλυση MS. Οι αναλυτές παγίδας ιόντων χρησιμοποιούνται συνήθως στην έρευνα της Πρωτεομικής λόγω της σταθερότητας, της ευαισθησίας και της οικονομικής τους αποδοτικότητας. Ωστόσο, υποφέρουν από χαμηλή ακρίβεια μάζας, περιορίζοντας την ακρίβειά τους στη μέτρηση μαζών ιόντων. Μια πρόσφατη εξέλιξη που ονομάζεται «γραμμική» ή «δισδιάστατη παγίδα ιόντων» αντιμετωπίζει αυτό το ζήτημα παρέχοντας αυξημένη ευαισθησία, ανάλυση και ακρίβεια μάζας. (Aebersold & Mann, 2003)

Ένα άλλο ισχυρό όργανο είναι το FT-MS (Fourier Transform Mass Spectrometry), το

οποίο προσφέρει υψηλή ευαισθησία, ακρίβεια μάζας, ανάλυση και δυναμικό εύρος. Μπορούν να επιτευχθούν μετρήσεις στο εύρος χαμηλών ppm και sub ppm. Η υψηλή ανάλυση αυτού του οργάνου όχι μόνο συνεπάγεται καλύτερη ποιότητα δεδομένων, αλλά αυξάνει επίσης τη μέγιστη χωρητικότητα και έτσι επιτρέπει την ανίχνευση περισσότερων σημάτων σε σύγκριση με όργανα με χαμηλότερη ισχύ ανάλυσης. Ωστόσο, η συχνή χρήση του είναι περιορισμένη λόγω του υψηλού κόστους, της λειτουργικής πολυπλοκότητας και της χαμηλής αποτελεσματικότητας κατακερματισμού πεπτιδίων. (Domon & Aebersold, n.d.) (Aebersold & Mann, 2003)

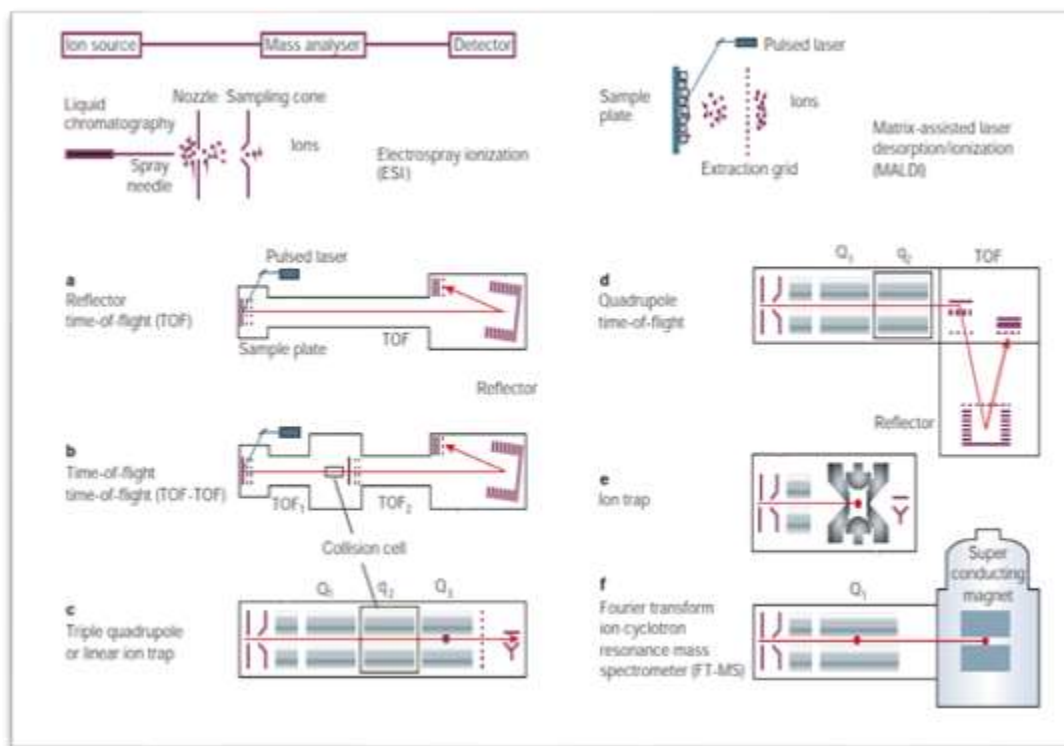
Ένας ακόμα ισχυρός αναλυτή είναι το *τριπλό τετράπολο*. Τα τετραπολικά φασματόμετρα μάζας επιλέγουν με χρονικά μεταβαλλόμενα ηλεκτρικά πεδία μεταξύ τεσσάρων ράβδων, τα οποία επιτρέπουν μια σταθερή τροχιά μόνο για ιόντα ενός συγκεκριμένου επιθυμητού λόγου m/z. Και πάλι, τα ιόντα ενός συγκεκριμένου m/z επιλέγονται στο πρώτο τετράπολο (Q1), κατακερματίζονται σε ένα κελί σύγκρουσης στο δεύτερο τετράπολο (Q2) και τα θραύσματα χωρίζονται στο τρίτο τετράπολο. Το τριπλό τετράπολο, αν και δεν είναι ανταγωνιστικό ως προς την ακρίβεια στον υπολογισμό της μάζας, προσφέρει πολύτιμες δυνατότητες για στοχευμένη ανάλυση και ποσοτικοποίηση, ενώ επιπλέον έχει προταθεί ως οικονομικά αποδοτικό και ευαίσθητο σύστημα. (Matthiesen & Bunkenborg, 2013) (Aebersold & Mann, 2003)

Οι αναλυτές μάζας είναι, κυριολεκτικά και μεταφορικά, κεντρικό στοιχείο της τεχνολογίας της φασματομετρίας μάζας. Διαφέρουν πολύ σε σχεδιασμό και απόδοση και καθένας έχει τα θετικά και τα αρνητικά σημεία του. Οι αναλυτές αυτοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνοι τους ή να συνδυαστούν μεταξύ τους για να επωφεληθούμε από τα δυνατά σημεία του καθενός. (Aebersold & Mann, 2003)

Η τεχνική ιοντισμού MALDI συνήθως συνδέεται με αναλυτές TOF, ενώ ο ESI συχνά συνδέεται με παγίδες ιόντων και όργανα τριπλού τετραπόλου. Η ESI- MS μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση της αλληλουχία θραυσμάτων DNA ή την ανάλυση τροποποιήσεων νουκλεοτιδίων, ενώ τεχνικές όπως η MALDI-TOF έχουν αναπτυχθεί ως εναλλακτικές στις παραδοσιακές μεθόδους προσδιορισμού αλληλουχίας όπως η αλληλούχιση Sanger. (Aebersold & Mann, 2003)

Τελικά, τα ιόντα καταλήγουν σε έναν ανιχνευτή ιόντων, ο οποίος καταγράφει και αναλύει τα σήματα ιόντων που παράγονται από τον αναλυτή μάζας. Οι πιο συνηθισμένοι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στη φασματομετρία μάζας

περιλαμβάνουν πολλαπλασιαστές ηλεκτρονίων, πλάκες μικροκαναλιού και σωλήνες φωτοπολλαπλασιαστή. Αυτοί οι ανιχνευτές μετατρέπουν τα ρεύματα ιόντων σε μετρήσιμα ηλεκτρικά σήματα, τα οποία στη συνέχεια ενισχύονται, ψηφιοποιούνται και αναλύονται από συστήματα υπολογιστών. (Matthiesen & Bunkenborg, 2013)



Εικόνα 14 Συστήματα φασματομετρίας μάζας. Στο πάνω μέρος της εικόνας παρουσιάζονται δύο συχνά χρησιμοποιούμενες πηγές ιόντων: οι MALDI και ESI. Στα σχέδια από το a-f παρουσιάζονται διατάξεις με διαφορετικούς αναλυτές μάζας όπως TOF, Παγίδας Ιόντων, το τετράπολο και με μετασχηματισμό Fourier.

Πηγή: Aebersold, R., & Mann, M., "Mass spectrometry-based proteomics", Nature 2003, 422(6928), 198–207.



## 7<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αυτή η διατριβή έχει προσφέρει μια εκτεταμένη έρευνα για την παθοφυσιολογία και τους σχετικούς εμπλεκόμενους μηχανισμούς της κάθε μία από τις νευροεκφυλιστικές νόσους που περιγράφηκαν, συμπεριλαμβανομένων των νόσο Αλτσχάιμερ, νόσο Πάρκινσον, τη νόσο ALS και τη νόσο Huntington, σε συνδυασμό με μια σε βάθος ανασκόπηση των γενετικών και βιοχημικών δεικτών που σχετίζονται με τις τέσσερις αυτές εξέχουσες νευροεκφυλιστικές νόσους. Τέλος, εξετάστηκαν οι σημαντικότερες τεχνικές και μέθοδοι για τον προσδιορισμό αυτών των βιοδεικτών.

Η σοβαρότητα αυτών των ασθενειών δεν μπορεί να υποτιμηθεί. Προκαλούν ανυπέρβλητα προβλήματα στους ασθενείς και τις οικογένειές τους, ενώ επιβαρύνουν επίσης σε μεγάλο βαθμό τα συστήματα υγειονομικής περίθαλψης παγκοσμίως. Δεδομένης της γήρανσης του παγκόσμιου πληθυσμού, ο επιπολασμός αυτών των διαταραχών αναμένεται να αυξηθεί, υπογραμμίζοντας την επείγουσα ανάγκη για πιο αποτελεσματικές διαγνωστικές στρατηγικές και αποτελεσματικές θεραπείες. Οι γενετικοί και βιοχημικοί δείκτες διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην κατανόηση και τη διαχείριση των νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Παρέχουν πληροφορίες για την έναρξη, την εξέλιξη και την πρόγνωση της νόσου, βοηθώντας στην έγκαιρη διάγνωση και εκτίμηση κινδύνου. Περισσότερο από αυτό, αποκαλύπτουν πιθανούς στόχους για θεραπευτική παρέμβαση. Η ανακάλυψη του αμυλοειδούς-βήτα και της tau στο Αλτσχάιμερ, της α-συνουκλεΐνης στο Πάρκινσον, της huntingtin στο Huntington και του SOD1 στο ALS, έφεραν πράγματι επανάσταση στην αντίληψή μας για αυτές τις ασθένειες και άνοιξαν νέες θεραπευτικές δυνατότητες. Αυτή η εργασία έχει τονίσει ότι, ενώ υπάρχει σημαντική πρόοδος στον τομέα, υπάρχει ένα εύλογο χάσμα μεταξύ της «ανακάλυψης» αυτών των βιοδεικτών και της ικανότητας να εφαρμοστεί αυτή η γνώση με σκοπό τη θεραπεία. Η κύρια πρόκληση έγκειται στη μετάφραση αυτών των μοριακών κατανοήσεων σε κλινικά οφέλη, μια διαδικασία που παρεμποδίζεται από την περιορισμένη γνώση μας για την ακριβή αιτιολογία και παθοφυσιολογία αυτών των διαταραχών. Επιπλέον, πολλοί δείκτες συνδέονται επί του παρόντος με την εξέλιξη της νόσου και όχι με την έναρξη, γεγονός που περιορίζει τις δυνατότητές τους για έγκαιρη διάγνωση. Η μελλοντική έρευνα θα πρέπει να επικεντρωθεί στον εντοπισμό και την επικύρωση δεικτών που συνδέονται με τα πρώιμα στάδια αυτών των ασθενειών. Είναι σαφές ότι κανένας μεμονωμένος βιοδείκτης δεν θα είναι

πιθανότατα επαρκής για τη διάγνωση ή την πρόβλεψη της πορείας αυτών των πολύπλοκων, πολυπαραγοντικών ασθενειών. Έτσι, η μελλοντική έρευνα θα πρέπει επίσης να στοχεύει στον εντοπισμό πάνελ βιοδεικτών που μπορεί να προσφέρουν πιο ολοκληρωμένες διαγνωστικές, προγνωστικές και θεραπευτικές πληροφορίες.

Όσο αφορά τις μεθόδους προσδιορισμού, οι τεχνολογίες της αλληλουχίας επόμενης γενιάς (NGS), για παράδειγμα, έχουν φέρει επανάσταση στην κατανόησή μας για τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες σε μοριακό επίπεδο. Επιτρέπουν την αλληλουχία υψηλής απόδοσης, επιτρέποντάς μας έτσι να αναλύσουμε γρήγορα και οικονομικά ολόκληρο το γονιδίωμα, τα εξώνια ή συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος. Αυτό όχι μόνο επιτάχυνε τον εντοπισμό νέων γενετικών παραλλαγών που σχετίζονται με αυτές τις διαταραχές, αλλά επίσης κατέστησε δυνατή τη διεξαγωγή μελετών μεγάλης κλίμακας για την επικύρωση αυτών των συσχετίσεων. Παράλληλα, οι εξελίξεις στη βιοπληροφορική μας επέτρεψαν να διαχειριζόμαστε, να αναλύουμε και να ερμηνεύουμε αποτελεσματικά τον πλούτο των δεδομένων που παράγονται από την NGS και άλλες τεχνολογίες υψηλής απόδοσης. Πολύπλοκοι αλγόριθμοι και τεχνικές μηχανικής μάθησης αναπτύσσονται τώρα για τον εντοπισμό προτύπων μέσα σε αυτά τα δεδομένα, προσφέροντας τη δυνατότητα ανακάλυψης νέων βιοδεικτών και θεραπευτικών στόχων. Αυτές οι εξελίξεις έρχονται σε πλήρη αντίθεση με τις σχετικά περιορισμένες τεχνολογίες που ήταν διαθέσιμες μόλις πριν από μερικές δεκαετίες. Η ταχεία πρόοδος στην τεχνολογία και τη γονιδιωματική έχει γίνει ένας ισχυρός σύμμαχος στον αγώνα μας κατά των νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Ωστόσο, αυτές οι τεχνικές έχουν περιορισμούς, συμπεριλαμβανομένου του κόστους, της ευαισθησίας, της ειδικότητας και της ανάγκης για εξελιγμένο εξοπλισμό και τεχνογνωσία. Η μελλοντική έρευνα θα πρέπει να επικεντρωθεί στη βελτίωση αυτών των τεχνικών για να γίνουν πιο προσιτές και πρακτικές για κλινική χρήση ρουτίνας.

Παρά τους τρέχοντες περιορισμούς και προκλήσεις, το μέλλον της έρευνας για τις νευροεκφυλιστικές νόσους είναι πολλά υποσχόμενο. Οι νέες τεχνολογίες όπως η αλληλούχιση επόμενης γενιάς και οι εξελίξεις στη βιοπληροφορική αναμένεται να επιταχύνουν την ανακάλυψη και την επικύρωση νέων βιοδεικτών. Επιπλέον, η αυξανόμενη κατανόηση των μηχανισμών της νόσου θα διευκολύνει την ανάπτυξη πιο στοχευμένων και αποτελεσματικών θεραπειών. Ο δρόμος προς μια θεραπεία για νευροεκφυλιστικές ασθένειες είναι γεμάτος προκλήσεις, αλλά οι πιθανές ανταμοιβές

για τους ασθενείς, τις οικογένειές τους και την κοινωνία γενικότερα είναι ανυπολόγιστες. Τα ενθαρρυντικά βήματα που έγιναν μέχρι στιγμής ενισχύουν την αισιοδοξία μας ότι με συνεχή έρευνα και τεχνολογική πρόοδο, το μέλλον θα φέρει καλύτερα διαγνωστικά εργαλεία, πιο αποτελεσματικές θεραπείες και, τελικά, μια θεραπεία για αυτές τις εξουθενωτικές διαταραχές.

Συμπερασματικά, η παρούσα διατριβή υπογραμμίζει τη σημασία της συνεχούς έρευνας για τους γενετικούς και βιομοριακούς δείκτες των νευροεκφυλιστικών διαταραχών, μέσω της ενίσχυσης της κατανόησής μας, της τελειοποίησης των υφιστάμενων διαγνωστικών τεχνικών και της αξιοποίησης των νέων τεχνολογιών, ώστε να βαδίσουμε πιο κοντά στον απώτερο στόχο: έναν κόσμο απαλλαγμένο από το βάρος των νευροεκφυλιστικών ασθενειών.

## 8<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- Aaron D. Walkowski; Sunil Munakomi. (2023). *Monosynaptic Reflex*. StatPearls Publishing.
- Aebersold, R., & Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422(6928), 198–207. <https://doi.org/10.1038/nature01511>
- Agrawal, M., & Biswas, A. (2015). Molecular diagnostics of neurodegenerative disorders. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2, 54. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2015.00054>
- Andrea Goldstein, B. P. C. N. M. F. B. M. (2023). *Neuroanatomy, Corpus Callosum*. StatPearls Publishing.
- Anil Kumar, J. S. A. G. J. W. T. (2023). *Alzheimer Disease*. StatPearls Publishing.
- Aronson, J. K., & Ferner, R. E. (2017). Biomarkers-A General Review. *Current Protocols in Pharmacology*, 76, 9.23.1-9.23.17. <https://doi.org/10.1002/cpph.19>
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, H. R. H. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. In *Expert Review of Molecular Diagnostics* (Vol. 5, Issue 2, pp. 209–219). <https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209>
- Atik, A., Stewart, T., & Zhang, J. (2016). Alpha-Synuclein as a Biomarker for Parkinson's Disease. *Brain Pathology*, 26(3), 410–418. <https://doi.org/10.1111/bpa.12370>
- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>
- Balendra, R., & Isaacs, A. M. (2018). C9orf72-mediated ALS and FTD: multiple pathways to disease. In *Nature Reviews Neurology* (Vol. 14, Issue 9, pp. 544–558). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0047-2>
- Balestrino, R., & Schapira, A. H. V. (2020). Parkinson disease. In *European Journal of Neurology* (Vol. 27, Issue 1, pp. 27–42). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/ene.14108>
- Bartlett, J. M. S., & Stirling, D. (n.d.). A Short History of the Polymerase Chain Reaction. In *PCR Protocols* (pp. 3–6). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-384-4:3>
- Bates, G. P., Dorsey, R., Gusella, J. F., Hayden, M. R., Kay, C., Leavitt, B. R., Nance, M., Ross, C. A., Scahill, R. I., Wetzel, R., Wild, E. J., & Tabrizi, S. J. (2015). Huntington disease. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 1). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.5>

- Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition*, 98(6), 236–238.  
<https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>
- Beitz, J. M. (2014). Parkinson s disease a review. *Frontiers in Bioscience*, S6(1), S415. <https://doi.org/10.2741/S415>
- Bell, J. (1989). The polymerase chain reaction. In *Immunology Today* (Vol. 10, Issue 10).
- Benatar, M., Boylan, K., Jeromin, A., Rutkove, S. B., Berry, J., Atassi, N., & Bruijn, L. (2016). ALS biomarkers for therapy development: State of the field and future directions. *Muscle and Nerve*, 53(2), 169–182.  
<https://doi.org/10.1002/mus.24979>
- Bertram, L., & Tanzi, R. E. (2012). The genetics of Alzheimer’s disease. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 107, pp. 79–100). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385883-2.00008-4>
- Bhatheja, K., & Field, J. (2006). Schwann cells: Origins and role in axonal maintenance and regeneration. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(12), 1995–1999. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.05.007>
- Bican, O., Minagar, A., & Pruitt, A. A. (2013). The spinal cord: a review of functional neuroanatomy. *Neurologic Clinics*, 31(1), 1–18.  
<https://doi.org/10.1016/j.ncl.2012.09.009>
- Björkqvist, M., Wild, E. J., Thiele, J., Silvestroni, A., Andre, R., Lahiri, N., Raibon, E., Lee, R. V., Benn, C. L., Soulet, D., Magnusson, A., Woodman, B., Landles, C., Pouladi, M. A., Hayden, M. R., Khalili-Shirazi, A., Lowdell, M. W., Brundin, P., Bates, G. P., ... Tabrizi, S. J. (2008). A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington’s disease. *Journal of Experimental Medicine*, 205(8), 1869–1877.  
<https://doi.org/10.1084/jem.20080178>
- Bloem, B. R., Okun, M. S., & Klein, C. (2021). Parkinson’s disease. In *The Lancet* (Vol. 397, Issue 10291, pp. 2284–2303). Elsevier B.V.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00218-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00218-X)
- Blum, F. (2014). High performance liquid chromatography. *British Journal of Hospital Medicine*, 75, C18–C21.
- Bondi, M. W., Edmonds, E. C., & Salmon, D. P. (2017). Alzheimer’s disease: Past, present, and future. In *Journal of the International Neuropsychological Society* (Vol. 23, Issues 9-10 Special Issue, pp. 818–831). Cambridge University Press.  
<https://doi.org/10.1017/S135561771700100X>
- Bordoni, M., Scarian, E., Rey, F., Gagliardi, S., Carelli, S., Pansarasa, O., & Cereda, C. (2020). Biomaterials in Neurodegenerative Disorders: A Promising Therapeutic Approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3243. <https://doi.org/10.3390/ijms21093243>

- Briggs, R., Kennelly, S. P., & O'Neill, D. (2016). Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clinical Medicine*, 16(3), 247–253.  
<https://doi.org/10.7861/clinmedicine.16-3-247>
- Brown, R. H., & Al-Chalabi, A. (2017). Amyotrophic Lateral Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 377(2), 162–172. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1603471>
- Brown, T. (1993). Southern Blotting. *Current Protocols in Immunology*, 6(1).  
<https://doi.org/10.1002/0471142735.im1006as06>
- Büeler, H. (2009). Impaired mitochondrial dynamics and function in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 218(2), 235–246.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.03.006>
- Burlingame, A. L., & Boyd, R. K. (1994). Mass Spectrometry Review Contents Overview Scope Innovative Techniques and Instrumentation Ionization Techniques-MALDI and Electrospray Time-of-Flight Analyzers in Tandem MS Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR) MS and Quadrupole Trap MS Surface-Induced Dissociation Mass Spectrometric Studies of Noncovalent Collision-Induced Light Emission Interactions Mass Spectrometric Detection for On-Line High-Resolution Separations Ionization Sources and Interfaces for MS as a. In *Anal. Chem* (Vol. 66).
- Byrne, L. M., Rodrigues, F. B., Blennow, K., Durr, A., Leavitt, B. R., Roos, R. A. C., Scahill, R. I., Tabrizi, S. J., Zetterberg, H., Langbehn, D., & Wild, E. J. (2017). Neurofilament light protein in blood as a potential biomarker of neurodegeneration in Huntington's disease: a retrospective cohort analysis. *The Lancet Neurology*, 16(8), 601–609. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30124-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30124-2)
- Caron, N. S., Wright, G. E., & Hayden, M. R. (1993). *Huntington Disease*.
- Celena Derderian, K. R. S. P. T. (2023). *Physiology, Withdrawal Response*. StatPearls Publishing.
- Chauhan, P., Rathawa, A., Jethwa, K., & Mehra, S. (2021). *The Anatomy of the Cerebral Cortex*. Exon Publications.
- Chen, X., Wu, G., & Schwarzschild, M. A. (2012). Urate in Parkinson's Disease: More Than a Biomarker? *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 12(4), 367–375. <https://doi.org/10.1007/s11910-012-0282-7>
- Chen, Z., Li, G., & Liu, J. (2020). Autonomic dysfunction in Parkinson's disease: Implications for pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Neurobiology of Disease*, 134, 104700. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104700>
- Cho, T. A. (2015). Spinal cord functional anatomy. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, 21(1 Spinal Cord Disorders), 13–35.  
<https://doi.org/10.1212/01.CON.0000461082.25876.4a>



- Chung, S., Sonntag, K.-C., Andersson, T., Bjorklund, L. M., Park, J.-J., Kim, D.-W., Kang, U. J., Isacson, O., & Kim, K.-S. (2002). Genetic engineering of mouse embryonic stem cells by Nurr1 enhances differentiation and maturation into dopaminergic neurons. *European Journal of Neuroscience*, 16(10), 1829–1838. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02255.x>
- Constantinescu, R., Romer, M., Zetterberg, H., Rosengren, L., & Kieburz, K. (2011). Increased levels of total tau protein in the cerebrospinal fluid in Huntington's disease. In *Parkinsonism and Related Disorders* (Vol. 17, Issue 9, pp. 714–715). <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2011.06.010>
- Costa, A., Peppe, A., Carlesimo, G. A., Zabberoni, S., Scalici, F., Caltagirone, C., & Angelucci, F. (2015). Brain-derived neurotrophic factor serum levels correlate with cognitive performance in Parkinson's disease patients with mild cognitive impairment. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00253>
- Crossley, B. M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M. L., Clement, T., & Toohey-Kurth, K. (2020). Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(6), 767–775. <https://doi.org/10.1177/1040638720905833>
- Cummings, J. L. (2004). Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, 351(1), 56–67. <https://doi.org/10.1056/NEJMra040223>
- Dalrymple, A., Wild, E. J., Joubert, R., Sathasivam, K., Björkqvist, M., Petersén, Å., Jackson, G. S., Isaacs, J. D., Kristiansen, M., Bates, G. P., Leavitt, B. R., Keir, G., Ward, M., & Tabrizi, S. J. (2007). Proteomic profiling of plasma in Huntington's disease reveals neuroinflammatory activation and biomarker candidates. *Journal of Proteome Research*, 6(7), 2833–2840. <https://doi.org/10.1021/pr0700753>
- Day, J. O., & Mullin, S. (2021). The genetics of parkinson's disease and implications for clinical practice. In *Genes* (Vol. 12, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/genes12071006>
- De Luca, A., Morella, A., Consoli, F., Fanelli, S., Thibert, J. R., Statt, S., Latham, G. J., & Squitieri, F. (2021). A Novel Triplet-Primed PCR Assay to Detect the Full Range of Trinucleotide CAG Repeats in the Huntingtin Gene (HTT). *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1689. <https://doi.org/10.3390/ijms22041689>
- Dehay, B., Martinez-Vicente, M., Ramirez, A., Perier, C., Klein, C., Vila, M., & Bezaud, E. (2012). Lysosomal dysfunction in Parkinson disease. *Autophagy*, 8(9), 1389–1391. <https://doi.org/10.4161/auto.21011>
- Deiters, V. S., & Guillery, R. W. (2013). Otto Friedrich Karl Deiters (1834-1863). *Journal of Comparative Neurology*, 521(9), 1929–1953. <https://doi.org/10.1002/cne.23316>

- Domon, B., & Aebersold, R. (n.d.). *Mass Spectrometry and Protein Analysis*.  
<http://science.sciencemag.org/>
- Dublin, P., & Hanani, M. (2007). Satellite glial cells in sensory ganglia: their possible contribution to inflammatory pain. *Brain, Behavior, and Immunity*, 21(5), 592–598. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.11.011>
- Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., Hampel, H., Molinuevo, J. L., Blennow, K., Dekosky, S. T., Gauthier, S., Selkoe, D., Bateman, R., Cappa, S., Crutch, S., Engelborghs, S., Frisoni, G. B., Fox, N. C., Galasko, D., Habert, M. O., Jicha, G. A., Nordberg, A., ... Cummings, J. L. (2014). Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: The IWG-2 criteria. In *The Lancet Neurology* (Vol. 13, Issue 6, pp. 614–629). Lancet Publishing Group.  
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70090-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70090-0)
- Erkkinen, M. G., Kim, M.-O., & Geschwind, M. D. (2018). Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(4), a033118.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033118>
- Fancy, S. P. J., Chan, J. R., Baranzini, S. E., Franklin, R. J. M., & Rowitch, D. H. (2011). Myelin Regeneration: A Recapitulation of Development? *Annual Review of Neuroscience*, 34(1), 21–43. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113629>
- Farley, A., Johnstone, C., Hendry, C., & McLafferty, E. (2014). Nervous system: part 1. *Nursing Standard (Royal College of Nursing (Great Britain) : 1987)*, 28(31), 46–51. <https://doi.org/10.7748/ns2014.04.28.31.46.e7004>
- Farley, A., McLafferty, E., Johnstone, C., & Hendry, C. (2014). Nervous system: part 3. *Nursing Standard (Royal College of Nursing (Great Britain) : 1987)*, 28(33), 46–50. <https://doi.org/10.7748/ns2014.04.28.33.46.e8187>
- Ferreira-Vieira, T. H., Guimaraes, I. M., Silva, F. R., & Ribeiro, F. M. (2016). Alzheimer's Disease: Targeting the Cholinergic System. In *Current Neuropsychopharmacology* (Vol. 14).
- Fink HA, H. L. L. E. S. P. M. R. M. J. T. K. D. P. F. M. M. M. B. M. N. V. T. B. N. W. O. J. G. N. S. K. W. T. B. M. (2020). Diagnosis and Treatment of Clinical Alzheimer's-Type Dementia: A Systematic Review . In *Agency for Healthcare Research and Quality (US)* (Issues 20-EHC003).
- Focus on neurodegenerative disease. (2018). *Nature Neuroscience*, 21(10), 1293–1293. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0250-x>
- França, L. T. C., Carrilho, E., & Kist, T. B. L. (2002). A review of DNA sequencing techniques. In *Quarterly Reviews of Biophysics* (Vol. 35, Issue 2, pp. 169–200). <https://doi.org/10.1017/S0033583502003797>

- Freeman, W. M., Robertson, D. J., & Vrana, K. E. (2000). Fundamentals of DNA Hybridization Arrays for Gene Expression Analysis. *BioTechniques*, 29(5), 1042–1055. <https://doi.org/10.2144/00295rv01>
- Gan, S. D., & Patel, K. R. (2013). Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(9), 1–3. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.287>
- Gao, Y., Huang, X., Zhu, Y., & Lv, Z. (2018). A brief review of monoclonal antibody technology and its representative applications in immunoassays. In *Journal of Immunoassay and Immunochemistry* (Vol. 39, Issue 4, pp. 351–364). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/15321819.2018.1515775>
- Gebbie, L. (2014). Genomic southern blot analysis. *Methods in Molecular Biology*, 1099, 159–177. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-715-0\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-715-0_14)
- Ghosh, R., & Tabrizi, S. J. (2018). Clinical features of huntington's disease. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1049, pp. 1–28). Springer New York LLC. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-71779-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-71779-1_1)
- Giannoccaro, M. P., La Morgia, C., Rizzo, G., & Carelli, V. (2017). Mitochondrial DNA and primary mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 32(3), 346–363. <https://doi.org/10.1002/mds.26966>
- Glenn, G., & Andreou, L. V. (2013). Analysis of DNA by southern blotting. In *Methods in Enzymology* (Vol. 529, pp. 47–63). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00005-7>
- Grad, L. I., Rouleau, G. A., Ravits, J., & Cashman, N. R. (2017). Clinical Spectrum of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). In *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* (Vol. 7, Issue 8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024117>
- Graybiel, A. M. (n.d.). *Primer The basal ganglia*.
- Groblewska, M., Muszyński, P., Wojtulewska-Supron, A., Kulczyńska-Przybik, A., & Mroczko, B. (2015). The Role of Visinin-Like Protein-1 in the Pathophysiology of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 47(1), 17–32. <https://doi.org/10.3233/JAD-150060>
- Guerreiro, R. J., Baquero, M., Blesa, R., Boada, M., Brás, J. M., Bullido, M. J., Calado, A., Crook, R., Ferreira, C., Frank, A., Gómez-Isla, T., Hernández, I., Lleó, A., Machado, A., Martínez-Lage, P., Masdeu, J., Molina-Porcel, L., Molinuevo, J. L., Pastor, P., ... Clarimón, J. (2010). Genetic screening of Alzheimer's disease genes in Iberian and African samples yields novel mutations in presenilins and APP. *Neurobiology of Aging*, 31(5), 725–731. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.06.012>
- Guerrera, I. C., & Kleiner, O. (2005). Application of mass spectrometry in proteomics. *Bioscience Reports*, 25(1–2), 71–93. <https://doi.org/10.1007/s10540-005-2849-x>

- Gulbransen, B. D., & Sharkey, K. A. (2012). Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 9(11), 625–632. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.138>
- Gusella, J. F., & MacDonald, M. E. (2009). Huntington's disease: the case for genetic modifiers. *Genome Medicine*, 1(8), 80. <https://doi.org/10.1186/gm80>
- Hampel, H., Mesulam, M. M., Cuello, A. C., Farlow, M. R., Giacobini, E., Grossberg, G. T., Khachaturian, A. S., Vergallo, A., Cavedo, E., Snyder, P. J., & Khachaturian, Z. S. (2018). The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. In *Brain* (Vol. 141, Issue 7, pp. 1917–1933). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/brain/awy132>
- Hardiman, O., Al-Chalabi, A., Chio, A., Corr, E. M., Logroscino, G., Robberecht, W., Shaw, P. J., Simmons, Z., & Van Den Berg, L. H. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 3). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.71>
- Harshitha, R., & Arunraj, D. R. (2021). Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 49(5), 800–812. <https://doi.org/10.1002/bmb.21552>
- Hawkes, C. H., Del Tredici, K., & Braak, H. (2007). Parkinson's disease: A dual-hit hypothesis. In *Neuropathology and Applied Neurobiology* (Vol. 33, Issue 6, pp. 599–614). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2007.00874.x>
- Hayden Basinger; Jeffery P. Hogg. (2023). *Neuroanatomy, Brainstem*. StatPearls Publishing.
- Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. In *Genomics* (Vol. 107, Issue 1, pp. 1–8). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
- Hendry, C., Farley, A., McLafferty, E., & Johnstone, C. (2014). Nervous system: part 2. *Nursing Standard (Royal College of Nursing (Great Britain) : 1987)*, 28(32), 45–49. <https://doi.org/10.7748/ns2014.04.28.32.45.e7931>
- Holtzman, D. M., Morris, J. C., & Goate, A. M. (2011). Alzheimer's Disease: The Challenge of the Second Century. *Science Translational Medicine*. <http://www.alz.org>
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*, 82(11), 801–811. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>
- Huang, F., Zhu, Y., Hsiao-Nakamoto, J., Tang, X., Dugas, J. C., Moscovitch-Lopatin, M., Glass, J. D., Brown, R. H., Ladha, S. S., Lacomis, D., Harris, J. M., Searce-Levie, K., Ho, C., Bowser, R., & Berry, J. D. (2020). Longitudinal biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 7(7), 1103–1116. <https://doi.org/10.1002/acn3.51078>

- Hyman, S. E. (2005). Neurotransmitters. *Current Biology : CB*, 15(5), R154-8.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.02.037>
- Illarioshkin, S. N., Klyushnikov, S. A., Vigont, V. A., Seliverstov, Y. A., & Kaznacheyeva, E. V. (2018). Molecular Pathogenesis in Huntington's Disease. In *Biochemistry (Moscow)* (Vol. 83, Issue 9, pp. 1030–1039). Pleiades journals.  
<https://doi.org/10.1134/S0006297918090043>
- Isaac Chen, F. L. (2022). *Neuroanatomy, Neuron Action Potential*. StatPearls Publishing.
- Ishmael, F. T., & Stellato, C. (2008). Principles and applications of polymerase chain reaction: Basic science for the practicing physician. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 101(4), 437–443. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)60323-7](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)60323-7)
- Jacquet, B. V., Salinas-Mondragon, R., Liang, H., Therit, B., Buie, J. D., Dykstra, M., Campbell, K., Ostrowski, L. E., Brody, S. L., & Ghashghaei, H. T. (2009). FoxJ1-dependent gene expression is required for differentiation of radial glia into ependymal cells and a subset of astrocytes in the postnatal brain. *Development*, 136(23), 4021–4031. <https://doi.org/10.1242/dev.041129>
- Jankovic, J., & Tan, E. K. (2020). Parkinson's disease: Etiopathogenesis and treatment. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 91(8), 795–808.  
<https://doi.org/10.1136/jnnp-2019-322338>
- Jensen, E. C. (2012). The Basics of Western Blotting. In *Anatomical Record* (Vol. 295, Issue 3, pp. 369–371). Blackwell Publishing Inc.  
<https://doi.org/10.1002/ar.22424>
- Jeromin, A., & Bowser, R. (2017). Biomarkers in neurodegenerative diseases. In *Advances in Neurobiology* (Vol. 15, pp. 491–528). Springer New York LLC.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-57193-5\\_20](https://doi.org/10.1007/978-3-319-57193-5_20)
- Jessen, K. R. (2004). Glial cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(10), 1861–1867. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.02.023>
- Jessen, K. R., & Mirsky, R. (2016). The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *The Journal of Physiology*, 594(13), 3521–3531.  
<https://doi.org/10.1113/JP270874>
- Jia, F., Fellner, A., & Kumar, K. R. (2022). Monogenic Parkinson's Disease: Genotype, Phenotype, Pathophysiology, and Genetic Testing. *Genes*, 13(3), 471.  
<https://doi.org/10.3390/genes13030471>
- Jones, N. L. (2002). *PCR Principles, Procedures, and Parameters*.
- Joshua A. Waxenbaum, V. R. M. V. (2023). *Anatomy, Autonomic Nervous System*. StatPearls Publishing.
- Kajal S. Patel, A. T. (2023). *Physiology, Peristalsis*. StatPearls Publishing.



- Kaur, S. J., McKeown, S. R., & Rashid, S. (2016). Mutant SOD1 mediated pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. In *Gene* (Vol. 577, Issue 2, pp. 109–118). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.11.049>
- Kegel, K. B., Kim, M., Sapp, E., McIntyre, C., Castañ, J. G., Aronin, N., & Difiglia, M. (2000). *Huntingtin Expression Stimulates Endosomal-Lysosomal Activity, Endosome Tubulation, and Autophagy*.
- Kenia A. Maldonado, K. A. (2023). *Physiology, Brain*. StatPearls Publishing.
- Keren, B., & Le Caignec, C. (2011). Oligonucleotide microarrays in constitutional genetic diagnosis. In *Expert Review of Molecular Diagnostics* (Vol. 11, Issue 5, pp. 521–532). <https://doi.org/10.1586/erm.11.32>
- Kettenmann, H., Kirchhoff, F., & Verkhratsky, A. (2013). Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron*, 77(1), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.023>
- Kettenmann, H., & Verkhratsky, A. (2011). Neuroglia, der lebende Nervenkitz. *Fortschritte Der Neurologie · Psychiatrie*, 79(10), 588–597. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1281704>
- Kim, D. H., Yeo, S. H., Park, J. M., Choi, J. Y., Lee, T. H., Park, S. Y., Ock, M. S., Eo, J., Kim, H. S., & Cha, H. J. (2014). Genetic markers for diagnosis and pathogenesis of Alzheimer's disease. In *Gene* (Vol. 545, Issue 2, pp. 185–193). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.05.031>
- Kim, G., Gautier, O., Tassoni-Tsuchida, E., Ma, X. R., & Gitler, A. D. (2020). ALS Genetics: Gains, Losses, and Implications for Future Therapies. In *Neuron* (Vol. 108, Issue 5, pp. 822–842). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.08.022>
- Kinaan Javed, V. R. F. L. (2023). *Neuroanatomy, Cerebral Cortex*. StatPearls Publishing.
- Koo, E. H. (2015). *Preclinical and Clinical Understanding: Major Gaps in Our Understanding and Capabilities*. Translational Neuroscience: Toward New Therapies.
- Krasemann, S., Madore, C., Cialic, R., Baufeld, C., Calcagno, N., El Fatimy, R., Beckers, L., O'Loughlin, E., Xu, Y., Fanek, Z., Greco, D. J., Smith, S. T., Tweet, G., Humulock, Z., Zrzavy, T., Conde-Sanroman, P., Gacias, M., Weng, Z., Chen, H., ... Butovsky, O. (2017). The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Immunity*, 47(3), 566–581.e9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.08.008>
- Krocze, R. (1993). Review Southern and Northern analysis. In *Journal of Chromatography* (Vol. 618).



- Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2006). Western blotting. *Methods*, 38(4), 283–293.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.11.007>
- Lauren Thau; Vamsi Reddy; Paramvir Singh. (2023). *Anatomy, Central Nervous System*. StatPearls Publishing.
- Le, W., Xu, P., Jankovic, J., Jiang, H., Appel, S. H., Smith, R. G., & Vassilatis, D. K. (2003). Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. *Nature Genetics*, 33(1), 85–89. <https://doi.org/10.1038/ng1066>
- Lee, J.-M., Blennow, K., Andreasen, N., Laterza, O., Modur, V., Olander, J., Gao, F., Ohlendorf, M., & Ladenson, J. H. (2008). The Brain Injury Biomarker VLP-1 Is Increased in the Cerebrospinal Fluid of Alzheimer Disease Patients. *Clinical Chemistry*, 54(10), 1617–1623. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.104497>
- Lee, Y.-T. C., & Hsu, S.-T. D. (2016). Familial Mutations and Post-translational Modifications of UCH-L1 in Parkinson's Disease and Neurodegenerative Disorders. *Current Protein & Peptide Science*, 18(7), 733–745.  
<https://doi.org/10.2174/1389203717666160217143721>
- Lequin, R. M. (2005). Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical Chemistry*, 51(12), 2415–2418.  
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.051532>
- Liu, J., Chang, L., Song, Y., Li, H., & Wu, Y. (2019). The Role of NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 13.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00043>
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., & Law, M. (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. In *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (Vol. 2012). <https://doi.org/10.1155/2012/251364>
- Lleó, A., Blesa, R., Queralt, R., Ezquerra, M., Molinuevo, J. L., Peñ A-Casanova, J., Rojo, A., & Oliva, R. (2002). *Frequency of Mutations in the Presenilin and Amyloid Precursor Protein Genes in Early-Onset Alzheimer Disease in Spain*. <http://archneur.jamanetwork.com/>
- Lloyd, A. C., & Stevens, B. (2017). Editorial overview: Glial biology. *Current Opinion in Neurobiology*, 47, iv–vi. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.11.008>
- Lockhart, D. J., & Winzler, E. A. (2000). Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature*, 405(6788), 827–836. <https://doi.org/10.1038/35015701>
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*, 63.  
<https://doi.org/10.3791/3998>
- Lotankar, S., Prabhavalkar, K. S., & Bhatt, L. K. (2017). Biomarkers for Parkinson's Disease: Recent Advancement. In *Neuroscience Bulletin* (Vol. 33, Issue 5, pp. 585–597). Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0183-5>

- Lotharius, J., & Brundin, P. (2002). Pathogenesis of parkinson's disease: dopamine, vesicles and  $\alpha$ -synuclein. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(12), 932–942. <https://doi.org/10.1038/nrn983>
- Marchegiani, F., Matacchione, G., Ramini, D., Marcheselli, F., Recchioni, R., Casoli, T., Mercuri, E., Lazzarini, M., Giorgetti, B., Cameriere, V., Paolini, S., Paciaroni, L., Rossi, T., Galeazzi, R., Lisa, R., Bonfigli, A. R., Procopio, A. D., De Luca, M., Pelliccioni, G., & Olivieri, F. (2019). Diagnostic performance of new and classic CSF biomarkers in age-related dementias. *Aging*, 11(8), 2420–2429. <https://doi.org/10.18632/aging.101925>
- Maria Rosaria Muzio, M. C. (2022). *Histology, Axon*. StatPearls Publishing.
- Masters, C. L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A., & Cummings, J. L. (2015). Alzheimer's disease. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 1). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.56>
- Matthiesen, R., & Bunkenborg, J. (2013). Introduction to mass spectrometry-based proteomics. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1007, pp. 1–45). Humana Press Inc. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-392-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-392-3_1)
- McColgan, P., & Tabrizi, S. J. (2018). Huntington's disease: a clinical review. *European Journal of Neurology*, 25(1), 24–34. <https://doi.org/10.1111/ene.13413>
- Mejzini, R., Flynn, L. L., Pitout, I. L., Fletcher, S., Wilton, S. D., & Akkari, P. A. (2019). ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now? In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01310>
- Mestre, T., Ferreira, J., Coelho, M. M., Rosa, M., & Sampaio, C. (2009). Therapeutic interventions for symptomatic treatment in Huntington's disease. In *Cochrane Database of Systematic Reviews* (Issue 3). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006456.pub2>
- Mesulam, M. (2004). The Cholinergic Lesion of Alzheimer's Disease: Pivotal Factor or Side Show? In *Learning and Memory* (Vol. 11, Issue 1, pp. 43–49). <https://doi.org/10.1101/lm.69204>
- Mesulam, M. M. (2004). The cholinergic innervation of the human cerebral cortex. *Progress in Brain Research*, 145, 67–78. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(03\)45004-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(03)45004-8)
- Michael H. Grider, R. J. R. K. (2022). *Physiology, Action Potential*. StatPearls Publishing.
- Michaela Harrow-Mortelliti; Vamsi Reddy; George Jimsheleishvili. (2023). *Physiology, Spinal Cord*. StatPearls Publishing.
- Micky A. Akinrodoye, F. L. (2023). *Neuroanatomy, Somatic Nervous System*. StatPearls Publishing.

- Monje, M. (2018). Myelin Plasticity and Nervous System Function. *Annual Review of Neuroscience*, 41, 61–76. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-080317-061853>
- Moreno-Martinez, L., Calvo, A. C., Muñoz, M. J., & Osta, R. (2019). Are circulating cytokines reliable biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis? In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20112759>
- Mulak, A., & Bonaz, B. (2015). Brain-gut-microbiota axis in Parkinson's disease. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 21, Issue 37, pp. 10609–10620). WJG Press. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i37.10609>
- Myers, R. H. (2004). *Huntington's Disease Genetics*.
- Nave, K.-A. (2010). Myelination and the trophic support of long axons. *Nature Reviews. Neuroscience*, 11(4), 275–283. <https://doi.org/10.1038/nrn2797>
- Nave, K.-A., & Werner, H. B. (2014). Myelination of the Nervous System: Mechanisms and Functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30(1), 503–533. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013101>
- Nicolas, G., Charbonnier, C., & Champion, D. (2017). From common to rare variants: The genetic component of Alzheimer disease. In *Human Heredity* (Vol. 81, Issue 3, pp. 129–141). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000452256>
- Novak, M. J. U., & Tabrizi, S. J. (2010). Huntington's disease. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 340, c3109. <https://doi.org/10.1136/bmj.c3109>
- Obeso, J. A., Stamelou, M., Goetz, C. G., Poewe, W., Lang, A. E., Weintraub, D., Burn, D., Halliday, G. M., Bezard, E., Przedborski, S., Lehericy, S., Brooks, D. J., Rothwell, J. C., Hallett, M., DeLong, M. R., Marras, C., Tanner, C. M., Ross, G. W., Langston, J. W., ... Stoessl, A. J. (2017). Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. *Movement Disorders*, 32(9), 1264–1310. <https://doi.org/10.1002/mds.27115>
- Opuni, K. F. M., Boadu, J. A., Amponsah, S. K., & Okai, C. A. (2021). High performance liquid chromatography: A versatile tool for assaying antiepileptic drugs in biological matrices. In *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* (Vol. 1179). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122750>
- Pajares, M., I Rojo, A., Manda, G., Boscá, L., & Cuadrado, A. (2020). Inflammation in Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Cells*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/cells9071687>
- Pampalakis, G., Mitropoulos, K., Xeromerisiou, G., Dardiotis, E., Deretzi, G., Anagnostouli, M., Katsila, T., Rentzos, M., & Patrinos, G. P. (2019). New molecular diagnostic trends and biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. In *Human Mutation* (Vol. 40, Issue 4, pp. 361–373). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/humu.23697>

- Pareek, C. S., Smoczynski, R., & Tretyn, A. (2011). Sequencing technologies and genome sequencing. In *Journal of Applied Genetics* (Vol. 52, Issue 4, pp. 413–435). <https://doi.org/10.1007/s13353-011-0057-x>
- Parker E. Ludwig, J. M. Das. (2023). *Histology, Glial Cells*. StatPearls Publishing.
- Parnetti, L., Gaetani, L., Eusebi, P., Paciotti, S., Hansson, O., El-Agnaf, O., Mollenhauer, B., Blennow, K., & Calabresi, P. (2019). CSF and blood biomarkers for Parkinson's disease. In *The Lancet Neurology* (Vol. 18, Issue 6, pp. 573–586). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30024-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30024-9)
- Peirson, S. N., & Butler, J. N. (2007). *Quantitative Polymerase Chain Reaction*.
- Philips, T., & Robberecht, W. (2011). Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: Role of glial activation in motor neuron disease. In *The Lancet Neurology* (Vol. 10, Issue 3, pp. 253–263). [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70015-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70015-1)
- Pimenova, A. A., Raj, T., & Goate, A. M. (2018). Untangling Genetic Risk for Alzheimer's Disease. In *Biological Psychiatry* (Vol. 83, Issue 4, pp. 300–310). Elsevier USA. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.05.014>
- Pitman, R. M. (1984). The versatile synapse. *The Journal of Experimental Biology*, 112, 199–224. <https://doi.org/10.1242/jeb.112.1.199>
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkman, J., Schrag, A.-E., & Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17013. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>
- Posner, H. B., Cano, S., Carrillo, M. C., Selnes, O., Stern, Y., Thomas, R. G., Zajicek, J., Hobart, J., & Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2013). Establishing the psychometric underpinning of cognition measures for clinical trials of Alzheimer's disease and its precursors: a new approach. *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association*, 9(1 Suppl), S56-60. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.10.008>
- Pouloupoulou, C., Davaki, P., Koliarakis, V., Kolovou, D., Markakis, I., & Vassilopoulos, D. (2005). Reduced expression of metabotropic glutamate receptor 2mRNA in T cells of ALS patients. *Annals of Neurology*, 58(6), 946–949. <https://doi.org/10.1002/ana.20675>
- Prasad, A., Bharathi, V., Sivalingam, V., Girdhar, A., & Patel, B. K. (2019). Molecular mechanisms of TDP-43 misfolding and pathology in amyotrophic lateral sclerosis. In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00025>
- RACHAKONDA, V., PAN, T. H., & LE, W. D. (2004). Biomarkers of neurodegenerative disorders: How good are they? *Cell Research*, 14(5), 349–358. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290235>

- Rafferty, J. L., Zhang, L., Siepmann, J. I., & Schure, M. R. (2007). Retention mechanism in reversed-phase liquid chromatography: A molecular perspective. *Analytical Chemistry*, 79(17), 6551–6558. <https://doi.org/10.1021/ac0705115>
- Ralli, M., Lambiase, A., Artico, M., de Vincentiis, M., & Greco, A. (2019). Amyotrophic Lateral Sclerosis: Autoimmune Pathogenic Mechanisms, Clinical Features, and Therapeutic Perspectives. *The Israel Medical Association Journal : IMAJ*, 21(7), 438–443.
- Recasens, A., Dehay, B., Bové, J., Carballo-Carbajal, I., Dovero, S., Pérez-Villalba, A., Fernagut, P.-O., Blesa, J., Parent, A., Perier, C., Fariñas, I., Obeso, J. A., Bezard, E., & Vila, M. (2014). Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger  $\alpha$ -synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. *Annals of Neurology*, 75(3), 351–362. <https://doi.org/10.1002/ana.24066>
- Reed, C. B., Feltri, M. L., & Wilson, E. R. (2022). Peripheral glia diversity. *Journal of Anatomy*, 241(5), 1219–1234. <https://doi.org/10.1111/joa.13484>
- Reed, E. R., Latourelle, J. C., Bockholt, J. H., Bregu, J., Smock, J., Paulsen, J. S., & Myers, R. H. (2018). MicroRNAs in CSF as prodromal biomarkers for Huntington disease in the PREDICT-HD study. *Neurology*, 90(4), e264–e272. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000004844>
- Reich, S. G., & Savitt, J. M. (2019). Parkinson's Disease. In *Medical Clinics of North America* (Vol. 103, Issue 2, pp. 337–350). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.10.014>
- Renton, A. E., Majounie, E., Waite, A., Simón-Sánchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J. R., Schymick, J. C., Laaksovirta, H., van Swieten, J. C., Myllykangas, L., Kalimo, H., Paetau, A., Abramzon, Y., Remes, A. M., Kaganovich, A., Scholz, S. W., Duckworth, J., Ding, J., Harmer, D. W., ... Traynor, B. J. (2011). A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*, 72(2), 257–268. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.010>
- Rikani, A. A., Choudhry, Z., Choudhry, A. M., Rizvi, N., Ikram, H., Mobassarrah, N. J., & Tulli, S. (2014). The mechanism of degeneration of striatal neuronal subtypes in Huntington disease. In *Annals of Neurosciences* (Vol. 21, Issue 3, pp. 112–114). Indian Academy of Neurosciences. <https://doi.org/10.5214/ans.0972.7531.210308>
- Robberecht, W., & Philips, T. (2013). The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 14, Issue 4, pp. 248–264). <https://doi.org/10.1038/nrn3430>
- Robelin, L., & Gonzalez De Aguilar, J. L. (2014). Blood biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis: Myth or reality? In *BioMed Research International* (Vol. 2014). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2014/525097>



- Rodrigues, F. B., Byrne, L., McColgan, P., Robertson, N., Tabrizi, S. J., Leavitt, B. R., Zetterberg, H., & Wild, E. J. (2016). Cerebrospinal fluid total tau concentration predicts clinical phenotype in Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, 139(1), 22–25. <https://doi.org/10.1111/jnc.13719>
- Roggenbuck, J., & Fong, J. C. (2020). Genetic Testing for Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia: Impact on Clinical Management. *Clinics in Laboratory Medicine*, 40(3), 271–287. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2020.05.002>
- Roggenbuck, J., Quick, A., & Kolb, S. J. (2017). Genetic testing and genetic counseling for amyotrophic lateral sclerosis: An update for clinicians. In *Genetics in Medicine* (Vol. 19, Issue 3, pp. 267–274). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/gim.2016.107>
- Roostaei, T., Nazeri, A., Sahraian, M. A., & Minagar, A. (2014). The human cerebellum: a review of physiologic neuroanatomy. *Neurologic Clinics*, 32(4), 859–869. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2014.07.013>
- Ross, C. A., Aylward, E. H., Wild, E. J., Langbehn, D. R., Long, J. D., Warner, J. H., Scahill, R. I., Leavitt, B. R., Stout, J. C., Paulsen, J. S., Reilmann, R., Unschuld, P. G., Wexler, A., Margolis, R. L., & Tabrizi, S. J. (2014). Huntington disease: Natural history, biomarkers and prospects for therapeutics. In *Nature Reviews Neurology* (Vol. 10, Issue 4, pp. 204–216). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.24>
- Ross, C. A., & Tabrizi, S. J. (2011). Huntington's disease: From molecular pathogenesis to clinical treatment. In *The Lancet Neurology* (Vol. 10, Issue 1, pp. 83–98). [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70245-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70245-3)
- Ruiz-Sánchez, E., Yescas, P., Rodríguez-Violante, M., Martínez-Rodríguez, N., Díaz-López, J. N., Ochoa, A., Valdes-Rojas, S. S., Magos-Rodríguez, D., Rojas-Castañeda, J. C., Cervantes-Arriaga, A., Canizales-Quinteros, S., & Rojas, P. (2017). Association of polymorphisms and reduced expression levels of the NR4A2 gene with Parkinson's disease in a Mexican population. *Journal of the Neurological Sciences*, 379, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2017.05.029>
- Sahu, P. K., Ramiseti, N. R., Cecchi, T., Swain, S., Patro, C. S., & Panda, J. (2018). An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. In *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (Vol. 147, pp. 590–611). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.006>
- Saito, Y. (2017). DJ-1 as a biomarker of Parkinson's disease. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1037, pp. 149–171). Springer New York LLC. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-6583-5\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-10-6583-5_10)
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174) (Vol. 74, Issue 12).



- Schapira, A. H., & Jenner, P. (2011). Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 26(6), 1049–1055.  
<https://doi.org/10.1002/mds.23732>
- Schapira, A. H. V., Chaudhuri, K. R., & Jenner, P. (2017). Non-motor features of Parkinson disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(7), 435–450.  
<https://doi.org/10.1038/nrn.2017.62>
- Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiological Reviews*. <http://physrev.physiology.org>
- Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*, 8(6), 595–608.  
<https://doi.org/10.15252/emmm.201606210>
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., & Hyman, B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006189>
- Sevigny, J., Chiao, P., Bussière, T., Weinreb, P. H., Williams, L., Maier, M., Dunstan, R., Salloway, S., Chen, T., Ling, Y., O'Gorman, J., Qian, F., Arastu, M., Li, M., Chollate, S., Brennan, M. S., Quintero-Monzon, O., Scannevin, R. H., Arnold, H. M., ... Sandrock, A. (2016). The antibody aducanumab reduces Aβ plaques in Alzheimer's disease. *Nature*, 537(7618), 50–56.  
<https://doi.org/10.1038/nature19323>
- Shah, K., & Maghsoudlou, P. (2016). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *British Journal of Hospital Medicine*, 77(7), C98–C101.  
<https://doi.org/10.12968/hmed.2016.77.7.C98>
- Sharma, K. (2019). Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review). *Molecular Medicine Reports*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10374>
- Sheppard O, C. M. (2021). Alzheimer's Disease: Etiology, Neuropathology and Pathogenesis. In *Exon Publications: Vol. Chapter 1* (Issue Alzheimer's Disease: Drug Discovery). Huang X.
- Shpilyukova, Y. A., Fedotova, E. Y., Abramychева, N. Y., Kochergin, I. A., Zakroyshchikova, I. V., Zakharova, M. N., & Illarioshkin, S. N. (2020). C9orf72 Gene Expression in Frontotemporal Dementia and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 169(5), 673–676.  
<https://doi.org/10.1007/s10517-020-04952-0>
- Skillback, T., Farahmand, B., Bartlett, J. W., Rosen, C., Mattsson, N., Nagga, K., Kilander, L., Religa, D., Wimo, A., Winblad, B., Rosengren, L., Schott, J. M., Blennow, K., Eriksdotter, M., & Zetterberg, H. (2014). CSF neurofilament light differs in neurodegenerative diseases and predicts severity and survival. *Neurology*, 83(21), 1945–1953.  
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001015>

- Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current Protocols in Molecular Biology*, 122(1).  
<https://doi.org/10.1002/cpmb.59>
- Southern, E. (2006). Southern blotting. *Nature Protocols*, 1(2), 518–525.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.73>
- Southwell, A. L., Smith, S. E. P., Davis, T. R., Caron, N. S., Villanueva, E. B., Xie, Y., Collins, J. A., Li Ye, M., Sturrock, A., Leavitt, B. R., Schrum, A. G., & Hayden, M. R. (2015). Ultrasensitive measurement of huntingtin protein in cerebrospinal fluid demonstrates increase with Huntington disease stage and decrease following brain huntingtin suppression. *Scientific Reports*, 5(1), 12166.  
<https://doi.org/10.1038/srep12166>
- Spreux-Varoquaux, O., Bensimon, G., Lacomblez, L., Franc Bois Pradat, P., Le Forestier, N., Marouan, A., Dib, M., & Meininger, V. (2002). *Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients*.  
[www.elsevier.com/locate/jns](http://www.elsevier.com/locate/jns)
- Südhof, T. C. (2021). The cell biology of synapse formation. *The Journal of Cell Biology*, 220(7). <https://doi.org/10.1083/jcb.202103052>
- Swarbrick, S., Wragg, N., Ghosh, S., & Stolzing, A. (2019). Systematic Review of miRNA as Biomarkers in Alzheimer's Disease. In *Molecular Neurobiology* (Vol. 56, Issue 9, pp. 6156–6167). Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1500-y>
- Tabrizi, S. J., Flower, M. D., Ross, C. A., & Wild, E. J. (2020). Huntington disease: new insights into molecular pathogenesis and therapeutic opportunities. In *Nature Reviews Neurology* (Vol. 16, Issue 10, pp. 529–546). Nature Research.  
<https://doi.org/10.1038/s41582-020-0389-4>
- The principles of nerve cell communication. (1997). *Alcohol Health and Research World*, 21(2), 107–108.
- Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. In *Trends in genetics : TIG* (Vol. 30, Issue 9, pp. 418–426).  
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.001>
- Tolosa, E., Garrido, A., Scholz, S. W., & Poewe, W. (2021). Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 20(5), 385–397.  
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00030-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00030-2)
- Tyler J. Torrico, S. M. (n.d.). *Neuroanatomy, Thalamus*. StatPearls Publishing.
- Tyler LeBouef, Z. Y. L. W. (2023). *Physiology, Autonomic Nervous System*. StatPearls Publishing.
- Usenovic, M., Tresse, E., Mazzulli, J. R., Taylor, J. P., & Krainc, D. (2012). Deficiency of ATP13A2 leads to lysosomal dysfunction,  $\alpha$ -synuclein

- accumulation, and neurotoxicity. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(12), 4240–4246.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5575-11.2012>
- Van Essen, D. C., Donahue, C. J., & Glasser, M. F. (2018). Development and Evolution of Cerebral and Cerebellar Cortex. *Brain, Behavior and Evolution*, 91(3), 158–169. <https://doi.org/10.1159/000489943>
- Van Riper, S. K., de Jong, E. P., Carlis, J. V., & Griffin, T. J. (2013). *Mass Spectrometry-Based Proteomics: Basic Principles and Emerging Technologies and Directions* (pp. 1–35). [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5896-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5896-4_1)
- Vaz, M., & Silvestre, S. (2020). Alzheimer’s disease: Recent treatment strategies. *European Journal of Pharmacology*, 887, 173554.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173554>
- Verstraete, E., Kuiperij, H. B., Van Blitterswijk, M. M., Veldink, J. H., Schelhaas, H. J., Van Den Berg, L. H., & Verbeek, M. M. (2012). TDP-43 plasma levels are higher in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 13(5), 446–451. <https://doi.org/10.3109/17482968.2012.703208>
- Villa, C., Ridolfi, E., Fenoglio, C., Ghezzi, L., Vimercati, R., Clerici, F., Marcone, A., Gallone, S., Serpente, M., Cantoni, C., Bonsi, R., Cioffi, S., Cappa, S., Franceschi, M., Rainero, I., Mariani, C., Scarpini, E., & Galimberti, D. (2013). Expression of the Transcription Factor Sp1 and its Regulatory hsa-miR-29b in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Alzheimer’s Disease. *Journal of Alzheimer’s Disease*, 35(3), 487–494. <https://doi.org/10.3233/JAD-122263>
- Vu, L. T., & Bowser, R. (2017). Fluid-Based Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis. In *Neurotherapeutics* (Vol. 14, Issue 1, pp. 119–134). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s13311-016-0503-x>
- Vucic, S., Rothstein, J. D., & Kiernan, M. C. (2014). Advances in treating amyotrophic lateral sclerosis: Insights from pathophysiological studies. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 37, Issue 8, pp. 433–442). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.05.006>
- Walker, F. O. (2007). *Huntington’s disease*. [www.thelancet.com](http://www.thelancet.com)
- Wang, T., Xiao, S., Liu, Y., Lin, Z., Su, N., Li, X., Li, G., Zhang, M., & Fang, Y. (2014). The efficacy of plasma biomarkers in early diagnosis of Alzheimer’s disease. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 29(7), 713–719.  
<https://doi.org/10.1002/gps.4053>
- Waters, D. L. E., & Shapter, F. M. (2014). The polymerase chain reaction (PCR): General methods. *Methods in Molecular Biology*, 1099, 65–75.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-62703-715-0\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-715-0_7)
- Yasaman Pirahanchi, R. J. N. R. A. (2022). *Physiology, Sodium Potassium Pump*. StatPearls Publishing.

- Young, J. Z. (1991). The concept of neuroglia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 633, 1–18. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1991.tb15590.x>
- Zhao, Y., Jaber, V., Alexandrov, P. N., Vergallo, A., Lista, S., Hampel, H., & Lukiw, W. J. (2020). microRNA-Based Biomarkers in Alzheimer's Disease (AD). In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.585432>
- Zuccato, C., Valenza, M., & Cattaneo, E. (2010). Molecular Mechanisms and Potential Therapeutical Targets in Huntington's Disease. *Physiological Reviews*, 90(3), 905–981. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2009>
- Žuvela, P., Skoczylas, M., Jay Liu, J., Baczek, T., Kaliszan, R., Wong, M. W., & Buszewski, B. (2019). Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. In *Chemical Reviews* (Vol. 119, Issue 6, pp. 3674–3729). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00246>

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.