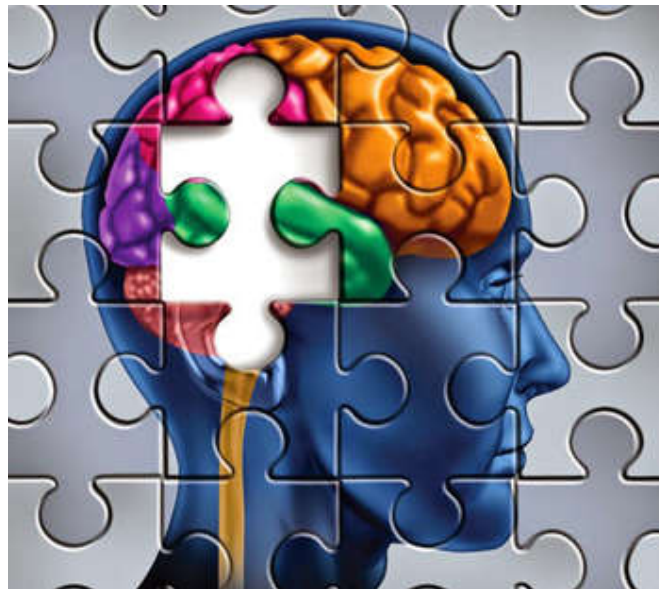




Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες (ΒΒΕ)»

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης (ΜΔΕ)

Τίτλος : «*Θεραπευτικές προσεγγίσεις αναγεννητικής ιατρικής σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες με χρήση βλαστικών κοττάρων*»



Όνοματεπώνυμο : Πατσιάς Ανάργυρος

Επιβλέπων : Κούκλης Παναγιώτης – Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας

Ιωάννινα 2018

«Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες (ΒΒΕ)»

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης (ΜΔΕ)

Τίτλος : «Θεραπευτικές προσεγγίσεις αναγεννητικής ιατρικής σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες με χρήση βλαστικών κυττάρων»

Όνοματεπώνυμο : Πατσιάς Ανάργυρος

Επιβλέπων : Κούκλης Παναγιώτης – Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας

Ιωάννινα 2018

«Η έγκριση της Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Όνοματεπώνυμο : Πατσιάς Ανάργυρος

Τίτλος του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης: «Θεραπευτικές προσεγγίσεις αναγεννητικής ιατρικής σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες με χρήση βλαστικών κυττάρων»

Ημερομηνία παρουσίασης : 15/02/2018

Επιβλέπων : Κούκλης Παναγιώτης – Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας

Εξεταστική Επιτροπή :

- 1) Αγγελίδης Χαράλαμπος – Καθηγητής Γενικής Βιολογίας
- 2) Σύρρου Μαρίκα – Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας – Ιατρικής Γενετικής
- 3) Κούκλης Παναγιώτης – Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1 ΝΟΣΟΣ ΑΛΤΣΧΑΙΜΕΡ (ALZHEIMER’S DISEASE)	7
1.1.1 Ορισμός.....	7
1.1.2 Ιστορική αναδρομή.....	7
1.1.3 Παθοφυσιολογία.....	11
1.1.4 Γενετική Βάση.....	14
1.1.5 Επιπρόσθετοι παράγοντες κινδύνου.....	19
1.1.6 Κλινικά συμπτώματα.....	20
1.1.7 Σταδιοποίηση ΝΑ.....	20
1.1.8 Συνοπτικά.....	23
1.2 ΝΟΣΟΣ ΠΑΡΚΙΝΣΟΝ (PARKINSON’S DISEASE)	24
1.2.1 Ορισμός	24
1.2.2 Ιστορική αναδρομή	24
1.2.3 Παθοφυσιολογία.....	27
1.2.4 Γενετική Βάση.....	32
1.2.5 Κλινική συμπτωματολογία.....	35
1.2.6 Σταδιοποίηση ΝΠ.....	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ	
2.1 Τι είναι τα βλαστικά κύτταρα;.....	40
2.2 Πηγές βλαστοκυττάρων.....	41
2.3 Κατηγοριοποίηση βλαστικών κυττάρων.....	42

2.4 Θεραπευτική αξιοποίηση τριών τύπων βλαστικών κυττάρων.....	43
2.5 Συμμετρική και ασύμμετρη διαίρεση των βλαστοκυττάρων.....	47
2.6 Ο ρόλος του θώκου στην αναγεννητική ιατρική.....	48
2.7 Νευρικά Βλαστικά Κύτταρα(Neural Stem Cells - NSCs).....	50
2.8 Μεσεγχυματικά Βλαστικά κύτταρα (Mesenchymal Stem Cells - MSCs).....	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ	
3.1 ΝΟΣΟΣ ΑΛΤΣΧΑΙΜΕΡ.....	54
3.1.1 Θεραπεία μέσω MSCs	54
3.1.2 Θεραπεία μέσω μικρογλοίας.....	57
3.1.3 Θεραπεία μέσω iPSCs	60
3.1.4 Θεραπεία μέσω ESCs.....	62
3.1.5 Θεραπεία μέσω NSCs.....	63
3.2 ΝΟΣΟΣ ΠΑΡΚΙΝΣΟΝ.....	64
3.2.1 Θεραπεία μέσω iPSCs	64
3.2.2 Θεραπεία μέσω NSCs.....	67
3.2.3 Θεραπεία μέσω αστροκυττάρων.....	69
3.2.4 Εκτίμηση αποτελεσματικότητας μοσχευμάτων από hESCs.....	70
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ.....	71
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ-ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	74

*The brain is the citadel of the senses; this guides the
principle of thought.*

Γλίνιος ο Πρεσβύτερος

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία συντάχθηκε κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2017-2018 στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες» του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή Γενικής Βιολογίας Κούκλη Παναγιώτη για την ανάθεση της διπλωματικής αυτής εργασίας και την άψογη συνεργασία, καθώς και τη σημαντική καθοδήγηση του σε όλα τα ζητήματα που προέκυψαν κατά την διάρκεια της εκπόνησης της. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και την οικογένεια μου για την ηθική υποστήριξη που μου προσέφερε αλλά και την υπομονή που επέδειξε κατά την διενέργεια της εργασίας μου.

«Θεραπευτικές προσεγγίσεις αναγεννητικής ιατρικής σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες με χρήση βλαστικών κυττάρων»

Πατσιάς Ανάργυρος

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις απαντώνται ολοένα και πιο συχνά λόγω της αύξησης του προσδόκιμου επιβίωσης αλλά και του μεγέθους του πληθυσμού. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων ασθενειών είναι η νόσος Αλτσχάιμερ και η νόσος Πάρκινσον. Είναι γνωστό ότι η νόσος Αλτσχάιμερ χαρακτηρίζεται από την εναπόθεση τεράστιων ινιδίων από β-πτυχωτά φύλλα του Αβ-αμυλοειδούς πεπτιδίου (αμυλοειδείς πλάκες) και τη συσσώρευση της υπερφωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης Tau (νευροϊνιδιακά πλέγματα) εσωτερικά των νευρώνων. Επίσης, η νόσος Πάρκινσον οφείλει την παθολογία της σε απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων του μεσεγκεφάλου λόγω ανώμαλης εναπόθεσης της πρωτεΐνης α-συνουκλεΐνης (σωμάτια Lewy). Ωστόσο, η θεραπεία αυτών των παθήσεων παραμένει ένα σοβαρό ζήτημα καθώς η συμβατική φαρμακευτική αγωγή που χορηγείται μπορεί να βελτιώνει τα συμπτώματα αλλά δεν είναι ικανή να θεραπεύσει την ασθένεια. Σε αυτήν την ανασκόπηση αφού εξεταστεί η παθοφυσιολογία των δύο νευροεκφυλιστικών ασθενειών, θα συζητηθούν οι πιθανές καινοτόμες θεραπευτικές προσεγγίσεις που εφαρμόζονται στον τομέα της αναγεννητικής ιατρικής με την αξιοποίηση των βλαστοκυττάρων αλλά και οι μελλοντικές προοπτικές που προκύπτουν από αυτό τον ταχύτατα αναδυόμενο τομέα.

Λέξεις – κλειδιά: Νόσος Αλτσχάιμερ (ΝΑ), Νόσος Πάρκινσον (ΝΠ), Αναγεννητική ιατρική, Βλαστικά κύτταρα, Θεραπεία.

«Therapeutical approaches of regenerative medicine in neurodegenerative diseases using stem cells»

Patsias Anargyros

ABSTRACT

Neurodegenerative diseases are more and more common due to the increase in life expectancy but also in size population. Typical examples of such diseases are Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD). Alzheimer's disease is known to be characterized by the deposition of enormous fibrils of beta-amyloid peptide (A β -amyloid plaques) and the accumulation of the hyperphosphorylated Tau protein (neurofibrillary tangles-NFT) inside the neurons. Also, the pathogenesis of Parkinson's disease is characterized by the loss of midbrain dopaminergic neurons due to abnormal deposition of the α -synuclein protein (Lewy bodies). However, the treatment of these conditions remains a serious issue as the conventional medication administered can ameliorate the symptoms but is not capable of curing the disease. In this review, after examining the pathophysiology of two neurodegenerative diseases, we will discuss the possible innovative therapeutic approaches applied in the field of regenerative medicine with the use of stem cells and the future prospects arising from this rapidly emerging field.

Keywords: Alzheimer's Disease (AD), Parkinson's Disease (PD), Regenerative medicine, Stem – cell Therapy.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΝΟΣΟΣ ΑΛΤΣΧΑΙΜΕΡ (ALZHEIMER'S DISEASE – AD)

1.1.1 Ορισμός

Η Νόσος Αλτσχάιμερ (ΝΑ) αποτελεί τυπικό παράδειγμα νευροεκφυλιστικής νόσου και είναι η πιο κοινή μορφή άνοιας (60-80% των περιπτώσεων)(Arber, et al, 2017). Άνοια γενικότερα είναι ένα σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από διαταραχές σε πολλαπλές εγκεφαλικές λειτουργίες συμπεριλαμβανομένων της μνήμης, της σκέψης, του προσανατολισμού, της κατανόησης, της υπολογιστικής και της μαθησιακής ικανότητας, της γλώσσας και της κρίσης. Πιο συγκεκριμένα, κατά την ασθένεια του Αλτσχάιμερ παρατηρείται μία προοδευτική φθορά στην γνωστική λειτουργία, στην μνήμη και στην μαθησιακή και γλωσσική δεξιότητα των ασθενών ενώ η εμφάνιση της είναι πιο συχνή ουσιαστικά σε άτομα ηλικίας άνω των 65 ετών. Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι η συγκεκριμένη νόσος θα πρέπει να διαφοροποιείται από την συσχετιζόμενη με την αυξανόμενη ηλικία απώλεια της γνωστικής λειτουργίας, η οποία πραγματοποιείται σταδιακά και χαρακτηρίζεται σε μικρότερο βαθμό από αναπηρία ενώ η ΝΑ ξεκινά με ήπια συμπτώματα και καταλήγει σε ολοκληρωτική καταστροφή του εγκεφάλου. Αποτέλεσμα όλων των παραπάνω είναι ότι αυτές οι εγκεφαλικές δυσλειτουργίες έχουν ανάλογο αρνητικό αντίκτυπο και στον συναισθηματικό έλεγχο, στην κοινωνική συμπεριφορά και στην κίνηση των πασχόντων ατόμων (Duthey, 2013).

1.1.2 Ιστορική Αναδρομή

Αρχικά...

Το όνομα της νόσου προήλθε από τον Αλοΐσιο Αλτσχάιμερ (Aloysius "Alois" Alzheimer) ο οποίος ήταν ο Γερμανός ψυχίατρος και νευροπαθολόγος που παρατήρησε για πρώτη φορά τα συμπτώματα της ΝΑ (**Εικόνα 1**). Το **1901**, ο Αλτσχάιμερ παρατήρησε μία ασθενή στο άσυλο της Φρανκφούρτης (άσυλο διανοητικώς καθυστερημένων) που ονομαζόταν Άουγκουστ Ντέτερ (Auguste Deter) (**Εικόνα 2**). Η ασθενής (51 ετών) είχε παράξενα συμπτώματα συμπεριφοράς όπως

ΠΜΣ «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες (BBE)»

αποπροσανατολισμό, ψευδαισθήσεις, παράνοια και ψυχοκοινωνική διαταραχή τα οποία συνδυάζονταν με απώλεια βραχυπρόθεσμης μνήμης. Τον Απρίλιο του **1906**, η Ντέτερ πέθανε και ο Αλτσχάμερ σε μία ομιλία του στις 3 Νοεμβρίου 1906 θα παρουσιάσει για πρώτη φορά την παθολογία και τα κλινικά συμπτώματα της νόσου Αλτσχάμερ. Βέβαια, η απόδοση του ονόματός του στην συγκεκριμένη ασθένεια πραγματοποιήθηκε λίγα χρόνια αργότερα από το συνάδελφό του Emil Kraepelin το 1910. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι πολλές από τις κλινικές παρατηρήσεις και τα παθολογικά ευρήματα τα οποία είχαν περιγράψει από τον Αλτσχάμερ πριν από περισσότερο από έναν αιώνα, παραμένουν κυρίαρχα στην κατανόηση της νόσου ακόμη και σήμερα (Korolev, 2014).



Εικόνα 1: Ο Αλοΐσιος Αλτσχάμερ (14 Ιουνίου 1864 – 19 Δεκεμβρίου 1915)
(<http://www.s9.com/Biography/alzheimer-alois/>)



Εικόνα 2: Άουγκουστ Ντέτερ (16 Μαΐου 1850 – 8 Απριλίου 1906). Η πρώτη γυναίκα που διεγνώσθη με την νόσο Αλτσχάμερ.
(<http://www.badische-zeitung.de/gesundheit-ernaehrung/ist-alzheimer-anstreckend--58890496.html>)

Στη συνέχεια...

Άλλες σημαντικές χρονολογίες σχετιζόμενες με τη ΝΑ οι οποίες αποτέλεσαν ως σημεία-σταθμοί στο πέρασμα των χρόνων είναι οι εξής (Alzheimer's Association, 2017):

1931: Η εφεύρεση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου από τους Γερμανούς Max Knoll (ηλεκτρολόγος μηχανικός) και Ernst Ruska (Φυσικός) επιτρέπει την περαιτέρω λεπτομερή μελέτη του εγκεφάλου (δυνατότητα μεγέθυνσης πάνω από 1 εκατομμύριο φορές).

1976: Η νόσος Αλτσχάιμερ αναγνωρίζεται ως η πιο κοινή μορφή άνοιας από τον Νευρολόγο Robert Katzman, εύρημα το οποίο δημοσιεύει σε ένα άρθρο του στο Archives of Neurology.

1984: Ταυτοποίηση της β-αμυλοειδούς πρωτεΐνης ως κύριο στοιχείο για τον σχηματισμό πλακών που συναντώνται σε εγκεφάλους με ΝΑ και πρωταρχικό «ύποπτο» για την καταστροφή των νευρικών κυττάρων.

1986: Ταυτοποίηση της Ταυ πρωτεΐνης ως κύριος παράγοντας δημιουργίας συσσωματωμάτων τα οποία αποτελούν το 2^ο βασικό παθολογικό εύρημα στη περίπτωση της ΝΑ.

1987: Ταυτοποίηση του 1^{ου} καθοριστικού γονιδίου το οποίο σχετίζεται με σπάνιες κληρονομήσιμες μορφές Αλτσχάιμερ ενώ βρέθηκε ότι εδράζεται στο χρωμόσωμα 21 και κωδικοποιεί την πρόδρομη μορφή της αμυλοειδούς πρωτεΐνης (Amyloid Precursor Protein - APP) από την οποία σχηματίζεται το β-αμυλοειδές μόριο. Το χρωμόσωμα 21 επίσης, καθώς σχετίζεται και με το Σύνδρομο Down, είχε παρατηρηθεί ότι άτομα με Σύνδρομο Down ανέπτυξαν Αλτσχάιμερ σε νεότερη ηλικία (30-40 ετών).

1993: Ταυτοποίηση του 1^{ου} παράγοντα κινδύνου (προδιάθεση για την ανάπτυξη της νόσου) ο οποίος ήταν το γονίδιο (APOE-e4) που εδράζεται στο χρωμόσωμα 19 και κωδικοποιεί την απολιποπρωτεΐνη Ε (APOE).

1993: Η έγκριση του 1^{ου} φαρμάκου από την FDA (The Food and Drug Administration) το οποίο στόχευε στο μετριασμό των συμπτωμάτων που σχετίζονταν με την μνήμη και την σκέψη.

1994 : Θέσπιση της Παγκόσμιας Ημέρας Αλτσχάιμερ στις 21 Σεπτεμβρίου.

2003: Έναρξη παγκόσμιας γενετικής μελέτης για την ΝΑ από την Alzheimer Association σε συνεργασία με το National Institute on Aging.

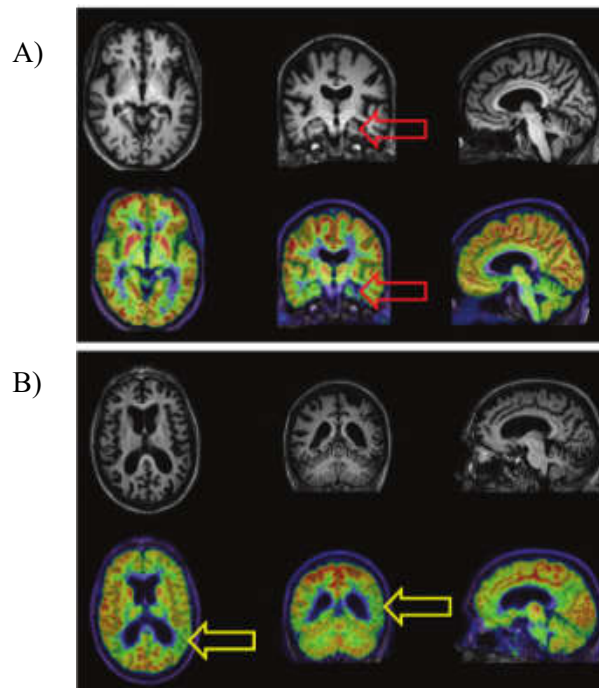
2010 – 2019: Θέσπιση νέων κριτηρίων για την διάγνωση του Αλτσχάιμερ, εύρεση νέων προδιαθεσιακών παραγόντων και διενέργεια κλινικών δοκιμών τόσο για την θεραπεία των ασθενών όσο και για την πρόληψή τους (π.χ. η κύρια κλινική δοκιμή, Dominantly Inherited Alzheimer Network Trial).

1.1.3 Παθοφυσιολογία

Σε υγιείς ανθρώπους οι αισθήσεις, οι κινήσεις, οι σκέψεις, οι αναμνήσεις και τα συναισθήματα είναι αποτέλεσμα σημάτων που αναμεταδίδονται μέσω των δισεκατομμυρίων νευρικών κυττάρων στον εγκέφαλο. Οι νευρώνες επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω ηλεκτρικών σημάτων τα οποία μεταφέρονται κατά μήκος των νευροαξόνων και προκαλούν την απελευθέρωση χημικών μηνυμάτων από τις συναπτικές σχισμές στους γειτονικούς νευρώνες. Άλλα είδη κυττάρων στον εγκέφαλο όπως είναι τα αστροκύτταρα και η μικρογλοία, λειτουργούν ως «απορριματοσυλλέκτες», απομακρύνοντας τα συντρίμματα των κυττάρων μετά από κάκωση ή νευρωνικό θάνατο (Kandel, et al, 2004).

Αντίθετα σε ένα άτομο με τη νόσο Αλτσχάιμερ, τοξικές αλλαγές στον εγκέφαλο του (αναφέρονται παρακάτω) καταστρέφουν αυτή την υγιή ισορροπία ενώ το εντυπωσιακό είναι ότι αυτές οι αλλαγές μπορούν να συμβαίνουν χρόνια, ακόμα και δεκαετίες, πριν την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων της άνοιας. Αναλυτικότερα, η παθολογία της ΝΑ χαρακτηρίζεται από μια σειρά ανωμαλιών στον εγκέφαλο που επηρεάζουν επιλεκτικά τους νευρώνες συγκεκριμένων περιοχών, ιδιαίτερα του νεοφλοιού, της ενδορινικής περιοχής, του ιππόκαμπου, της αμυγδαλής, του βασικού πυρήνα (Meypert), του πρόσθιου θαλάμου και κάποιων μονοαμινεργικών πυρήνων του εγκεφαλικού στελέχους (όπως του υπομέλανα τόπου και του συμπλέγματος της ραφής). Στις προσβεβλημένες εγκεφαλικές περιοχές, η δυσλειτουργία και ο θάνατος των νευρώνων σχετίζονται με ανωμαλίες του κυτταρικού σκελετού και οδηγούν σε μείωση του επιπέδου των συναπτικών πρωτεϊνών στις εγκεφαλικές περιοχές στις οποίες προβάλλουν οι παραπάνω νευρώνες. Η κατανομή και η επέκταση αυτών των ανωμαλιών ακολουθούν χαρακτηριστικά πρότυπα που είναι ειδικά ως προς την ανατομική περιοχή και μερικές φορές ακόμη ως προς το κύτταρο. Στο νεοφλοιό και στην ενδορινική περιοχή, τα κύτταρα που προσβάλλονται σε μεγαλύτερο βαθμό είναι τα μεγάλα γλουταμινεργικά πυραμιδοειδή κύτταρα, ενώ στον νεοφλοιό εκφυλίζονται επίσης και οι διάμεσοι νευρώνες. Παρομοίως στον ιππόκαμπο και ιδιαίτερα στις περιοχές CA1 και CA2, καταστρέφονται επιλεκτικά τα πυραμιδοειδή κύτταρα. Καταστροφή υπόκειται ακόμη και τα χολινεργικά κύτταρα του βασικού πυρήνα, του

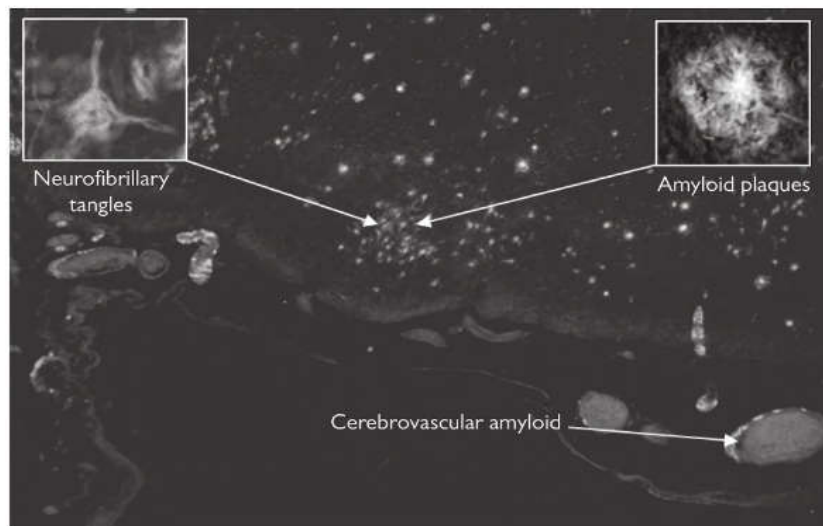
έσω πυρήνα του διαφράγματος και της διαγώνιας ταινίας του Broca, δομές που είναι υπεύθυνες για την κύρια χολινεργική νεύρωση του νεοφλοιού και του ιππόκαμπου. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων ακετυλοχολίνης και των χολινεργικών δεικτών (όπως η δραστηριότητα του ενζύμου ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης) στις περιοχές όπου προβάλλουν τα παραπάνω κύτταρα (Kandel, et al, 2006). Έτσι προκύπτει εγκεφαλική ατροφία στις μετωπικές, κροταφικές και βρεγματικές περιοχές του εγκεφάλου ενώ είναι εμφανής και ο μειωμένος μεταβολισμός (hypometabolism) της γλυκόζης στις συγκεκριμένες περιοχές του (Constantini, et al, 2008) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα σάρωσης MRI (Magnetic Resonance Imaging) και FDG – PET (Fluoro-Deoxy-Glucose – Positron Emission Tomography) ασθενών με νόσο Αλτσχάιμερ. Η σάρωση A απεικονίζει την αριστερή ατροφία του ιππόκαμπου και τον υπομεταβολισμό (κόκκινο βέλος) σε ασθενή που παρουσίαζε συμπτώματα τυπικής αμνησίας. Η σάρωση B απεικονίζει τον αριστερόπλευρο κροταφικό υπομεταβολισμό (κίτρινα βέλη) σε ασθενή με γλωσσική δυσχέρεια (Waldemar et Burns, 2017).

Βέβαια, όλη αυτή η παθολογική κατάσταση που προκύπτει έχει αποδοθεί επιστημονικά στην παρουσία 2 πρωτεϊνών οι οποίες ονομάζονται β-αμυλοειδές

πεπτιδίο (Αβ) και Tau πρωτεΐνη και οι οποίες με διάφορους τρόπους καθίστανται τοξικές για τον ίδιο τον εγκέφαλο. Πιο συγκεκριμένα, γίνεται εναπόθεση τεράστιων ινιδίων από β-πτυχωτά φύλλα του αμυλοειδούς πεπτιδίου Αβ με συνέπεια να σχηματίζονται αμυλοειδείς πλάκες οι οποίες συγκεντρώνονται μεταξύ των νευρώνων. Αυτή η διεργασία συνοδεύεται παράλληλα και από την συσσώρευση της ανώμαλης πρωτεΐνης Tau η οποία είναι υπερφωσφορυλιωμένη με συνέπεια να σχηματίζονται και νευροϊνιδιακά πλέγματα εσωτερικά των νευρώνων (**Εικόνα 4**). Καθώς το επίπεδο του β-αμυλοειδούς φτάσει σε ένα κρίσιμο σημείο, τότε επέρχεται μια ραγδαία εξάπλωση της Tau διαμέσου του εγκεφάλου με αποτέλεσμα την ελαττωμένη λειτουργικότητα των συνάψεων (Hardy, Selkoe, 2002, Hanger, et al, 2009).



Εικόνα 4: Μικροσκοπική απεικόνιση των αθροισμάτων των αμυλοειδών πλακών και των νευροϊνιδιακών κόμβων καθώς και των εγκεφαλοαγγειακών αμυλοειδών στο κροταφικό λοβό (Waldemar et Burns, 2017).

Ωστόσο, εκτός από αυτούς τους παράγοντες και άλλες αλλαγές διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση του Αλτσχάιμερ καθώς επηρεάζουν αρνητικά την λειτουργία του εγκεφάλου με την πάροδο του χρόνου. Επιγραμματικά:

- ✓ Το αγγειακό σύστημα πιθανόν αποτυγχάνει να μεταφέρει αρκετό αίμα και θρεπτικά συστατικά στον εγκέφαλο.

- ✓ Εμφάνιση χρόνιας φλεγμονής καθώς τα μικρογλοιακά κύτταρα αποτυγχάνουν να απομακρύνουν τα συντρίμματα και τα αστροκύτταρα αντιδρούν στη διαταραγμένη μικρογλοία ως αμυντικός μηχανισμός.

Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι οι νευρώνες να χάνουν την ικανότητα τους να επικοινωνήσουν. Καθώς οι νευρώνες πεθαίνουν, ο εγκέφαλος συρρικνώνεται, ξεκινώντας από τον ιππόκαμπο ο οποίος είναι υπεύθυνος για την μάθηση και την μνήμη. Τα άτομα θα αρχίζουν να εμφανίζουν απώλεια μνήμης, διαταραγμένη λήψη αποφάσεων και γλωσσικά προβλήματα. Όσο μεγαλώνει το εύρος των κατεστραμμένων νευρώνων, τόσο το άτομο χάνει την ικανότητα του να σκεφτεί, να θυμηθεί, να λάβει αποφάσεις και να λειτουργήσει ανεξάρτητα (National Institute on Aging, 2017).

Λαμβάνοντας υπόψιν όλα τα παραπάνω, η βαθύτερη κατανόηση και η μελέτη της αλληλεπίδρασης των μοριακών και κυτταρικών μηχανισμών που εμπλέκονται στην εμφάνιση και στην πρόοδο της ασθένειας (π.χ. με τη χρήση βιοδεικτών) σε συνδυασμό με τη αξιοποίηση προηγμένων απεικονιστικών μεθόδων του εγκεφάλου, θα αποτελούσαν ένα σημαντικό βήμα για την ανάπτυξη αποτελεσματικών θεραπειών (National Institute on Aging, 2017).

1.1.4 Γενετική Βάση

Πρόσφατες έρευνες στη μοριακή γενετική έδειξαν ότι αρκετά γονίδια είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση της οικογενούς μορφής της νόσου Αλτσχάιμερ, γεγονός το οποίο παρατηρήθηκε σε μερικές οικογένειες που παρουσίαζαν αυτό το πρότυπο κληρονομικότητας. Από μελέτες σε τέτοιες οικογένειες οι ερευνητές ταυτοποίησαν γονίδια τα οποία εδράζονται σε τρία χρωμοσώματα που σχετίζονται με τη ΝΑ, όπως είναι τα χρωμοσώματα 21, 14, και 1. Μεταλλάξεις σε οποιοδήποτε γονίδιο από τα χρωμοσώματα 1, 14 και 21, μπορεί να προκαλέσει αυτοσωματική, επικρατής, πρώιμης έναρξης, προγεροντική ΝΑ. Τα τρία γονίδια που είναι υπεύθυνα για την παθολογική αυτή κατάσταση είναι:

- α) το γονίδιο της **πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς** (Amyloid Precursor protein - **APP**) στο χρωμόσωμα 21

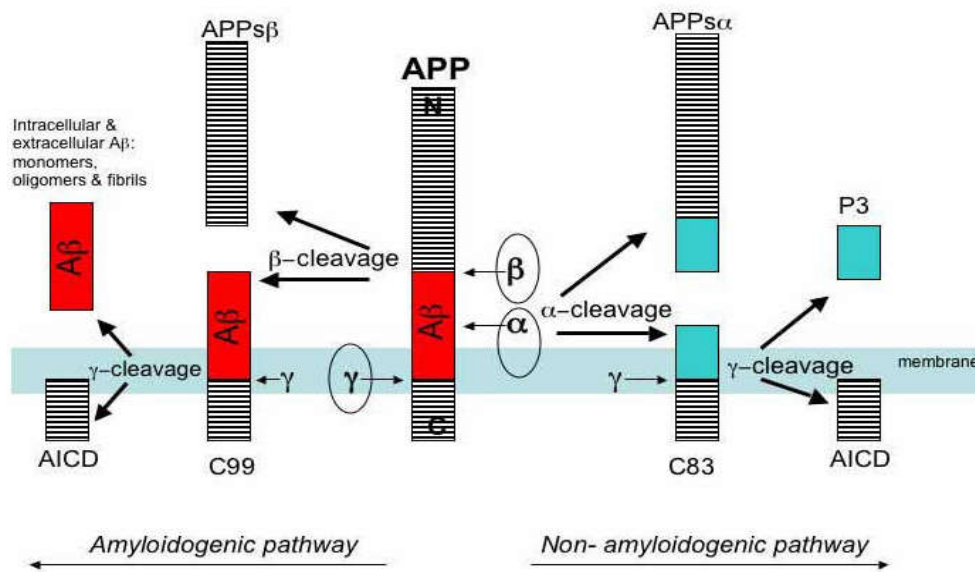
- β) το γονίδιο της **προσενιλίνης 1 (PS1)** στο χρωμόσωμα 14 και
γ) το γονίδιο της **προσενιλίνης 2 (PS2)** στο χρωμόσωμα 1.

Μεταλλάξεις σε οποιοδήποτε σημείο αυτών των γονιδίων προκαλούν διαταραχές του μεταβολισμού της APP, έτσι ώστε να παράγεται περισσότερο Aβ₄₂ αμυλοειδές πεπτίδιο. Τα ένζυμα που προκαλούν τη διάσπαση της APP είναι οι α, β και γ σεκρετάσες. Γενικά, η α-σεκρετάση διασπά το β-αμυλοειδές σε κομμάτια διαλυτά που απομακρύνονται από τον εγκέφαλο, ενώ οι σεκρετάσες β και γ απομονώνουν το Aβ₄₂ αμυλοειδές το οποίο είναι αδιάλυτο και εναποτίθεται στο μεσοκυττάριο χώρο. Το πεπτίδιο αυτό εναποτίθεται στις πλάκες του εγκεφάλου των ασθενών (αμυλοειδείς πλάκες). Τα δεδομένα αυτά οδηγούν στην κύρια υπόθεση για την παθογένεια της ΝΑ που είναι η «**Amyloid cascade hypothesis**», η υπόθεση του αμυλοειδούς, η οποία υποστηρίζει την υπερπαραγωγή ή την αδυναμία αποδόμησης του Aβ₄₂ αμυλοειδούς (Τσολάκη, 2002).

Αναλυτικότερα, η APP διαδοχικά αποκόπτεται από τη BACE1 (β-site APP cleaving enzyme I, μια ασπαρτική πρωτεάση), δηλαδή τη β-σεκρετάση, και τη γ-σεκρετάση η οποία είναι ένα σύμπλοκο που αποτελείται από τη προσενιλίνη 1 ή 2 (PS1 ή PS2), τη NCSTN (nicastrin), την Aph1 (anterior pharynx-defective 1) και την Pen2 (presenilin enhancer 2), έτσι ώστε να δημιουργηθεί το πεπτίδιο Αβ (**Σχήμα 1**). Η αποκοπή της APP από την BACE1 αποτελεί προϋπόθεση για το σχηματισμό του πεπτιδίου Αβ καθώς μετά από αυτή διαμορφώνεται το N-τελικό άκρο του πεπτιδίου και 2 κομμάτια απελευθερώνονται: το APPsβ - μια εκκρινόμενη εξωτερική επικράτεια - και το καρβοξυτελικό τμήμα (carboxyl terminal fragment - CTF) C99 το οποίο είναι μεμβρανοσυνδεδεμένο. Το τμήμα C99 αποτελεί υπόστρωμα για τη γ-σεκρετάση και η αποκοπή του γεννά το τμήμα AICD (APP intracellular domain) μαζί με το C-τελικό άκρο του Αβ (**amyloidogenic pathway**) (Cole, et al, 2007).

Ο σχηματισμός του πεπτιδίου Αβ παρεμποδίζεται από την δραστηριότητα της α-σεκρετάσης. Η α-σεκρετάση αποκόπτει τη APP για να δημιουργήσει το εκκρινόμενο εξωτερικό τμήμα που ονομάζεται APPsα και ένα μεμβρανοσυνδεδεμένο τμήμα CTF, το C83. Το τμήμα C83 ακολούθως αποκόπτεται από το σύμπλοκο της γ-σεκρετάσης

για να παραχθεί ένα τμήμα μοριακού βάρους 3 KDa, το P3 και το AICD (**non-amyloidogenic pathway**) (Cole, et al, 2007).

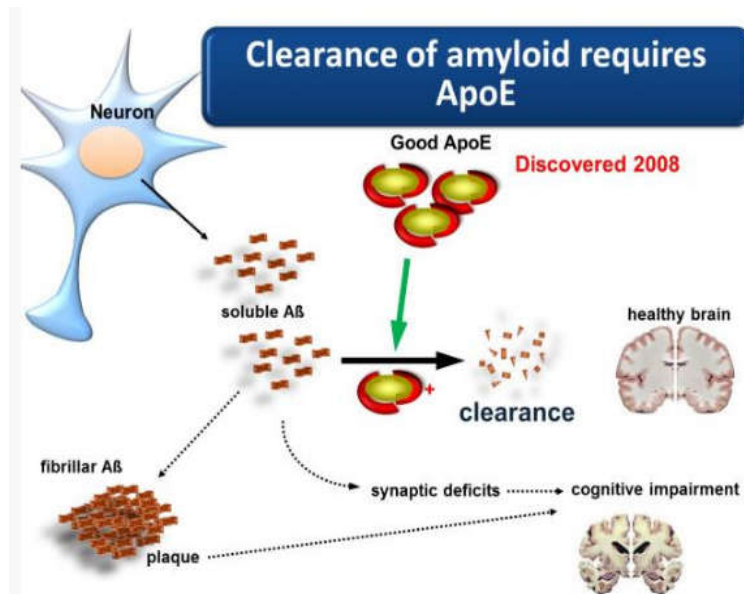


Σχήμα 1: Ο μεταβολισμός της APP από τα ενζύμα σεκρετάσες (Cole, et al, 2007).

Επίσης αξίζει να σημειωθεί ότι, εκτός από τις μεταλλάξεις αυτών των τριών γονιδίων τα οποία σχετίζονται με την πρόωμη έναρξη της ασθένειας μεταξύ της τρίτης και έκτης δεκαετίας της ζωής, συγκεκριμένα αλληλόμορφα της ApoE (**απολιποπρωτεΐνη E**) εντοπισμένα στο εγγύς μακρό σκέλος του χρωμοσώματος 19, ή τροποποιήσεις της **μακροσφαιρίνης α-2**, αποτελούν προδιαθεσιακούς παράγοντες για τις σποραδικές περιπτώσεις πρόωμης έναρξης της ΝΑ και ακόμα περισσότερο για την οικογενή νόσο όψιμης έναρξης (Kandel, et al, 2006).

α) Ρόλος της ApoE

Η απολιποπρωτεΐνη E είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που αποτελεί δομικό στοιχείο των VLDL (λιποπρωτεΐνη πολύ χαμηλής πυκνότητας) και HDL (λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας) και είναι καθοριστικός παράγοντας στο μονοπάτι του φυσιολογικού μεταβολισμού των εμπλουτισμένων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών. Παράγεται τόσο από περιφερειακούς ιστούς όπως είναι το συκώτι όπου και μετέχει σε διάφορες μεταβολικές οδούς, όσο και από κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος όπως είναι τα αστροκύτταρα και συμμετέχει στην εξωκυτταρική επικοινωνία μεταφέροντας την χοληστερόλη στους νευρώνες. Η παρουσία της ωστόσο, έχει συσχετιστεί με τη νόσο Αλτσχάιμερ όψιμης έναρξης ως παράγοντας κινδύνου. Πιο συγκεκριμένα, σε έναν μοναδικό γενετικό τόπο apoE εκφράζονται τρία αλληλόμορφα: το apoE2, apoE3 apoE4. Το αλληλόμορφο apoE3 έχει μία κυστεΐνη στη θέση 112 και μια αργινίνη στη θέση 158, το apoE4 έχει αργινίνη και στις δύο θέσεις και το apoE2 έχει κυστεΐνη και στις 2 θέσεις. Το αλληλόμορφο E2 είναι το σπανιότερο και φαίνεται να μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου Alzheimer, ενώ το αλληλόμορφο ApoE3 είναι το πιο κοινό στον γενικό πληθυσμό (συχνότητα ίση με 0,78). Η συχνότητα του αλληλομόρφου E4 είναι 0,50 σε ασθενείς με Αλτσχάιμερ όψιμης έναρξης. Επομένως, ο κίνδυνος προσβολής από τη νόσο Αλτσχάιμερ όψιμης έναρξης αυξάνεται με την παρουσία του apoE4 (αύξηση έως και 68% του κινδύνου εμφάνισης της νόσου στις γυναίκες και έως 52% στους άνδρες). Ο μηχανισμός με τον οποίο το αλληλόμορφο apoE αυξάνει τον κίνδυνο προσβολής από τη νόσο Αλτσχάιμερ όψιμης έναρξης παραμένει άγνωστος αλλά έχει διατυπωθεί μια υπόθεση σύμφωνα με την οποία συγκεκριμένες ισομορφές του apoE4 επηρεάζουν τη βιολογία των πεπτιδίων Αβ (Σχήμα 2). Το αλληλόμορφο apoE4 φαίνεται να επιταχύνει τη νόσο σε κάποιες οικογένειες με μεταλλάξεις στο γονίδιο της APP, αλλά όχι σε οικογένειες με μεταλλάξεις στο γονίδιο της προσενιλίνης (Kandel, et al, 2006).



Σχήμα 2: Η πρωτεΐνη ApoE παίζει σημαντικό ρόλο στο σώμα, συμβάλλοντας σε διαδικασίες όπως η μεταφορά της χοληστερόλης και του πεπτιδίου Aβ, μέσα και έξω από τα κύτταρα. Οι εναλλακτικοί τύποι της ApoE όμως, διενεργούν αυτή τη λειτουργία μεταφοράς διαφορετικά. Στην περίπτωση του πεπτιδίου Aβ, η μεταφορά του έξω από τον εγκέφαλο διαμεσολαβείται από την ApoE, με την αποτελεσματικότερη εκκαθάριση του να υλοποιείται από την ApoE2 σε σύγκριση με την ApoE4, ενώ η δραστηριότητα της ApoE3 να είναι ενδιάμεση των προαναφερθέντων. (<http://www.dnahealth.gr/apoe-alzheimer-risk/>)

β) Ρόλος της μακροσφαιρίνης α-2

Ένας άλλος παράγοντας κινδύνου που έχει μελετηθεί λιγότερο βέβαια για την ασθένεια όψιμης έναρξης, είναι το γονίδιο της μακροσφαιρίνης α-2. Κάποιοι ασθενείς με νόσο Αλτσχάιμερ όψιμης έναρξης έχουν μια μετάλλαξη (ή έναν πολυμορφισμό) στο γονίδιο αυτό η οποία πιστεύεται ότι αυξάνει την προδιάθεση του ασθενούς για άνοια, διαταράσσοντας τους μηχανισμούς μέσω των οποίων απομακρύνονται οι εναποθέσεις του πεπτιδίου Aβ από τις συναπτικές περιοχές (Kandel, et al, 2006).

1.1.5 Επιπρόσθετοι παράγοντες κινδύνου

1. Ηλικία

Η άνοια είναι ένα από τα πιο συχνά προβλήματα υγείας του ηλικιωμένου πληθυσμού. Είναι γνωστό σε όλους μας ότι ο επιπολασμός της άνοιας αυξάνεται με την ηλικία. Μάλιστα υποστηρίζεται ότι το ποσοστό διπλασιάζεται κάθε πέντε χρόνια μετά την ηλικία των 65 ετών. Πρόσφατη ανάλυση του επιπολασμού και της επίπτωσης της ΝΑ στην Ευρώπη έδειξε ότι αυξάνεται η επίπτωση με την ηλικία, έτσι ώστε στην ηλικία των 90 ή και περισσότερο ο αριθμός των νέων ασθενών να είναι 63,5 ανά 1000 άτομα τον χρόνο. Αν και έχουν περιγραφεί περιπτώσεις της ΝΑ και σε ηλικίες των 30, 40 και 50 ετών, η πλειονότητα των περιπτώσεων ασθενών παρατηρείται πάνω από την ηλικία των 65. Επομένως η ηλικία είναι ο πλέον αποδεκτός παράγοντας κινδύνου για τη ΝΑ (Τσολάκη, 2002).

2. Οικογενειακό ιστορικό

Από τις δεκαετίες του '20 και του '30 έχουν περιγραφεί οικογένειες στις οποίες αναφέρονται πολλά μέλη με νόσο Αλτσχάιμερ. Σε πρόσφατες επιδημιολογικές μελέτες, παρατηρήθηκε ότι ασθενείς με ΝΑ έχουν συχνότερα έναν τουλάχιστον συγγενή με ΝΑ απ' ό,τι οι ηλικιωμένοι χωρίς άνοια. Οι παρατηρήσεις αυτές αποτέλεσαν τη βάση της γενικής αποδοχής ότι ηλικιωμένοι με ιστορικό συγγενών που πάσχουν από ΝΑ διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο από τους ηλικιωμένους χωρίς κληρονομικό ιστορικό. Αυτό βέβαια δε σημαίνει ότι εάν κάποιος έχει συγγενή με ΝΑ πρόκειται οπωσδήποτε να νοσήσει. Η παρατήρηση ότι πολλά μέλη μιας οικογένειας πάσχουν από ΝΑ θα μπορούσε επίσης να οδηγήσει στη σκέψη ότι τα μέλη αυτής της οικογένειας εκτέθηκαν στους ίδιους περιβαλλοντολογικούς παράγοντες ή στην ιδέα της γενετικής αιτιοπαθογένειας, η οποία και τροφοδοτεί την έρευνα της ΝΑ τα τελευταία χρόνια με πολλά και θαυμαστά αποτελέσματα. Είναι πολύ ενδιαφέρον ότι μελέτες που γίνονται για να εξετάσουν άτομα υψηλού κινδύνου επικεντρώνονται σε άτομα με οικογενειακό ιστορικό και θετικό apoE4 αλληλόμορφο γονίδιο. Τέλος, το οικογενειακό ιστορικό αποτελεί και παράγοντα κινδύνου στη ΝΑ όψιμης έναρξης (Τσολάκη, 2002).

3. Σύνδρομο Down

Τα άτομα με σύνδρομο Down διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο να πάθουν ΝΑ και μάλιστα πάνω από την ηλικία των 35 ετών λόγω της συσχέτισης της παθολογίας του συγκεκριμένου συνδρόμου με το χρωμόσωμα 21 όπως προαναφέρθηκε και παραπάνω (Τσολάκη, 2002).

1.1.6 Κλινικά Συμπτώματα

Πιστεύεται ότι οι ανωμαλίες στον ενδορινικό φλοιό, τον ιππόκαμπο και στα άλλα κυκλώματα του έσω κροταφικού λοβού παίζουν σημαντικό ρόλο στην έκπτωση της μνήμης που χαρακτηρίζει την νόσο Αλτσχάιμερ. Οι ανωμαλίες στις συνειρμικές περιοχές του φλοιού, που πιστεύεται ότι σχετίζονται με τις διαταραχές των χολινεργικών συστημάτων του βασικού εγκεφάλου, μπορεί να ευθύνονται επίσης για τις δυσκολία στη μνήμη και τη διαταραχή στην προσοχή. Οι διαταραχές της συμπεριφοράς και του συναισθήματος που εμφανίζονται σε κάποιους ασθενείς μπορεί να αντικατοπτρίζουν τη συμμετοχή του μεταιχμιακού φλοιού, της αμυγδαλής, του θαλάμου, και κάποιων από τα μονοαμινεργικά συστήματα του εγκεφαλικού στελέχους που προβάλλουν στον φλοιό του ιππόκαμπου (Kandel, et al, 2006).

1.1.7 Σταδιοποίηση ΝΑ

Ένα από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της νόσου Αλτσχάιμερ όπως προαναφέρθηκε είναι ότι η εγκεφαλική βλάβη ξεκινάει μία δεκαετία ή και περισσότερο, προτού γίνουν φανερά τα συμπτώματα της νόσου (απώλεια μνήμης, γνωστικά προβλήματα κα.). Κατά το προκλινικό στάδιο της ΝΑ, τα άτομα δεν εμφανίζουν κάποιο σύμπτωμα αλλά λαμβάνουν χώρα οι τοξικές αλλαγές στον εγκέφαλο τους. Η πρόοδος της ασθένειας πραγματοποιείται στα παρακάτω στάδια: πρώιμο, μεσαίο και τελικό. Πιο αναλυτικά (National Institute on Aging, 2017):

Πρώιμο στάδιο ΝΑ

Συνήθως ένα άτομο στην πρώιμη φάση ανάπτυξης της νόσου Αλτσχάιμερ εμφανίζει απώλεια μνήμης, επαναλαμβάνει ερωτήσεις ενώ ακόμα:

- ✓ Έχει σταδιακά αυξανόμενη σύγχυση σχετικά με το πού βρίσκεται και παράλληλα παρουσιάζει την τάση να χάνεται εύκολα.
- ✓ Χάνει την ικανότητα να ξεκινάει δραστηριότητες με δική του πρωτοβουλία και χωρίς καθοδήγηση.
- ✓ Μπορεί να είναι κυκλοθυμικό και να έχει ενδείξεις κατάθλιψης, ενόχλησης και νευρικότητας.
- ✓ Παρουσιάζει καθυστερημένες αντιδράσεις και μειωμένη ικανότητα εκμάθησης.
- ✓ Αρχίζει να μιλά με πολύ πιο αργό ρυθμό σε σχέση με το παρελθόν και παρουσιάζει «φτωχή» κριτική ικανότητα και λαμβάνει λανθασμένες αποφάσεις.

Μεσαίο στάδιο ΝΑ

Κατά το μεσαίο στάδιο της νόσου τα συμπτώματα είναι τα εξής:

- ✓ Δυσκολία αναγνώρισης στενών φίλων και μελών της οικογένειάς του πάσχοντος.
- ✓ Ανησυχία και περιπλάνηση.
- ✓ Πρόβλημα στην ανάγνωση, τη γραφή και την αριθμητική.

- ✓ Πρόβλημα με την οργάνωση των σκέψεών του σε λογική σειρά.
- ✓ Οξυθυμία, εχθρικότητα και μη δεκτικότητα για συνεργασία.
- ✓ Εμφάνιση ψευδαισθήσεων, παραισθήσεων και παράνοιας.
- ✓ Συνεχής επίβλεψη.
- ✓ Απώλεια αίσθησης του χρόνου.

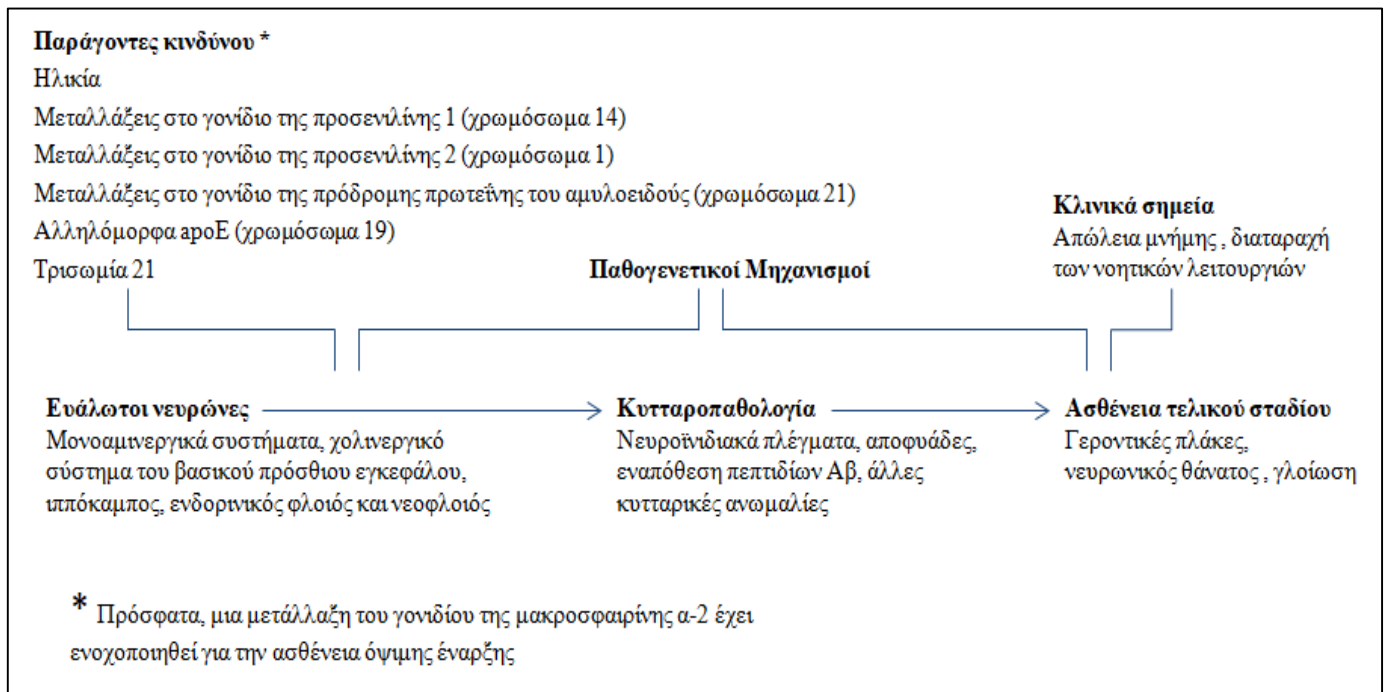
Τελικό στάδιο ΝΑ

Στο τελικό στάδιο ο ασθενής δεν μπορεί να επικοινωνήσει λεκτικά με τους γύρω του ενώ είναι καθηλωμένος στο κρεβάτι. Ακόμα:

- ✓ Δεν μπορεί πλέον να καλύψει από μόνος του τις καθημερινές του ανάγκες (φαγητό, μπάνιο, ντύσιμο).
- ✓ Χάνει την ικανότητα μάσησης της τροφής.
- ✓ Εμφανίζει απώλεια βάρους, επιληπτικές κρίσεις και δερματικές μολύνσεις.
- ✓ Παρουσιάζει ιδιαίτερα μεγάλη σύγχυση.
- ✓ Χάνει εύκολα την ισορροπία του και μπορεί να πέφτει συχνά.
- ✓ Έχει ακράτεια ούρων.

1.1.8 Συνοπτικά

Μια ολική ανασκόπηση για τη νόσο του Αλτσχάιμερ (Διάγραμμα 1):



Διάγραμμα 1: Η σχέση των παραγόντων κινδύνου, των παθογενετικών διεργασιών και των κλινικών σημείων με τις κυτταρικές ανωμαλίες στον εγκέφαλο στη νόσο Αλτσχάιμερ. Οι ίδιες εγκεφαλικές ανωμαλίες που απαντούν στη νόσο Αλτσχάιμερ παρατηρούνται επίσης και στο σύνδρομο Down (Kandel, et al, 2006).

1.2 ΝΟΣΟΣ ΠΑΡΚΙΝΣΟΝ (PARKINSON'S DISEASE)

1.2.1 Ορισμός

Η Νόσος Πάρκινσον (ΝΠ) είναι μια προοδευτική νευροεκφυλιστική ασθένεια του εγκεφάλου που εμφανίζεται συνήθως στην μέση ηλικία, με μέσο όρο έναρξης της νόσου τα 55 με 60 έτη. Θεωρείται ως η 2^η συχνότερη νευροεκφυλιστική νόσος μετά τη νόσο Αλτσχάιμερ. Υπολογίζεται ότι περίπου 2 με 3 στους 1000 ανθρώπους στον γενικό πληθυσμό πάσχουν από νόσο Πάρκινσον αλλά η συχνότητα της νόσου αυξάνει με την πάροδο του χρόνου έτσι ώστε σε ηλικίες άνω των 65 ετών να εμφανίζεται στο 1% περίπου του πληθυσμού (Στεφανής, 2011).

1.2.2 Ιστορική αναδρομή

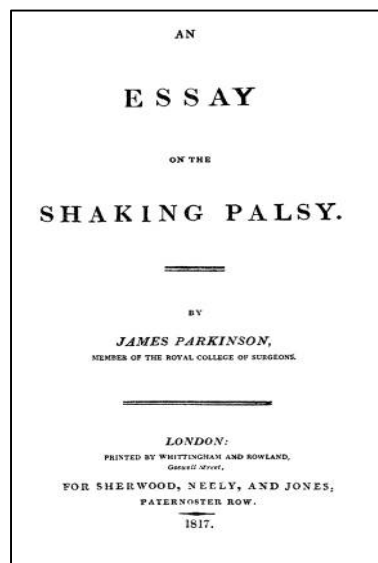
Από το 1000 π.Χ. μέχρι και σήμερα

1000 π.Χ. → Πρώτες αναφορές για τα συμπτώματα του Πάρκινσον είχαν γίνει σε παραδοσιακά ινδικά αρχαία και κινεζικές πηγές περίπου το 1000 π.Χ. (Manyam, 1990)

1817 → Η νόσος περιγράφηκε για πρώτη φορά ολοκληρωμένα από τον Άγγλο γιατρό James Parkinson στην κλασική μονογραφία του 1817 που είχε τίτλο "An essay on Shaking Palsy"**(Εικόνες 6,7)**. Η εργασία του βασίστηκε σε έξι περιπτώσεις που είχε παρατηρήσει κατά τη διάρκεια της πρακτικής του αλλά και από τον περίγυρό του.



Εικόνα 6: *Dr. James Parkinson. (11 Απριλίου 1755 – 21 Δεκεμβρίου 1824)*
(<http://www.viartis.net/parkinsons.disease/news/170411.htm>)



Εικόνα 7: *Η κλασική μονογραφία του James Parkinson η οποία για πρώτη φορά αναφέρεται στη νόσο Πάρκινσον. (Parkinson, 1817)*

1872 → Μετά από 55 χρόνια από τη δημοσίευση της μονογραφίας του, το 1872 ένας Γάλλος νευρολόγος, ο Jean Martin Charcot αναγνώρισε την σημαντικότητα των ευρημάτων της εργασίας του στο Πάρκινσον και απέδωσε το όνομα του Parkinson σε αυτή τη νόσο (**Εικόνα 8**).



Εικόνα 8: *Dr. Jean-Martin Charcot (29 Νοεμβρίου 1825 – 16 Αυγούστου 1893)*
(<http://www.pbs.org/wgbh/aso/databank/entries/bhchar.html>)

Έπειτα...

1910 → Σύνθεση ντοπαμίνης από την πρόδρομη μορφή της L-Dopa (Levodopa) μετά από ενζυματική δράση αποκαρβοξυλάσης.

1925 → Ο Γάλλος γιατρός Edouard Brissaud πρότεινε ότι η καταστροφή στην μέλαινα ουσία (μέρος του εγκεφάλου που ελέγχει την κίνηση) μπορεί να οδηγήσει σε νόσο του Πάρκινσον.

1967 → Καθορισμός των σταδίων της προόδου των κινητικών συμπτωμάτων του Πάρκινσον σε 5 από κλινικούς.

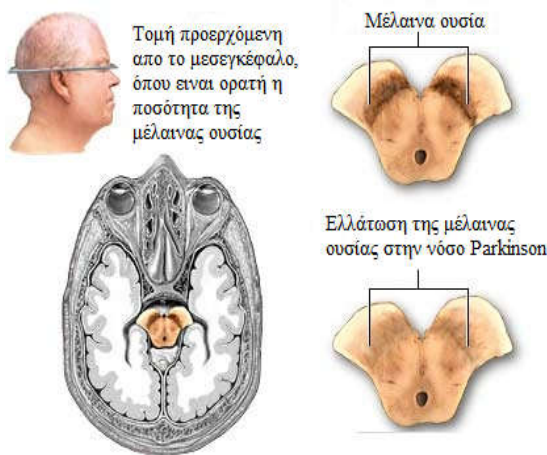
1997 → Η FDA εγκρίνει χειρουργική επέμβαση στον εγκέφαλο για την θεραπεία των συμπτωμάτων της νόσου.

2004 → Ανακάλυψη του γονιδίου LRRK2 ως η πιο κοινή γενετική αιτία του Πάρκινσον.

2017 → 10 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως ζουν με τη νόσο του Πάρκινσον, γεγονός που αποτελεί την αφορμή για περαιτέρω επιστημονική έρευνα και υποστήριξη τόσο των ατόμων όσο και των οικογενειών τους για βελτίωση της ποιότητας ζωής τους.

1.2.3 Παθοφυσιολογία

Από παθολογοανατομικές μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι η κύρια βλάβη στη νόσο του Πάρκινσον είναι η απώλεια συγκεκριμένων νευρώνων σε μία περιοχή του εγκεφάλου που λέγεται μεσεγκέφαλος. Οι νευρώνες αυτοί φυσιολογικά περιέχουν ένα συστατικό που λέγεται μελανίνη και απαρτίζουν την λεγόμενη *μέλαινα ουσία* (**Εικόνα 9**). Οι νευρώνες της μέλαινας ουσίας παράγουν έναν νευροδιαβιβαστή που ονομάζεται ντοπαμίνη. Η ντοπαμίνη που παράγεται από αυτούς τους νευρώνες μεταφέρεται μέσω των απολήξεων τους σε ένα άλλο τμήμα του εγκεφάλου το οποίο ονομάζεται ραβδωτό σώμα και συνδέεται εκεί με τους υποδοχείς της. Η μέλαινα ουσία και το ραβδωτό σώμα αποτελούν μέρη του συστήματος που ονομάζεται *Βασικά Γάγγλια*, βασικός ρόλος του οποίου είναι η ρύθμιση της κινητικότητας με τέτοιο τρόπο ώστε αυτή να γίνεται πιο αυτοματοποιημένα. Η απώλεια, ωστόσο, των νευρώνων της μέλαινας ουσίας και των νευρικών τους απολήξεων αναχαιτίζει τη μετάδοση σήματος μέσω ντοπαμίνης με συνέπεια να επιφέρεται η κινητική δυσλειτουργία (**Εικόνα 10**) (Στεφανής, 2011).



Εικόνα 9: Απεικόνιση της μείωσης της ποσότητας της μέλαινας ουσίας κατά τη νόσο του Πάρκινσον από τη περιοχή του μεσεγκεφάλου. (<http://diseasespictures.com/parkinsons-disease/>)

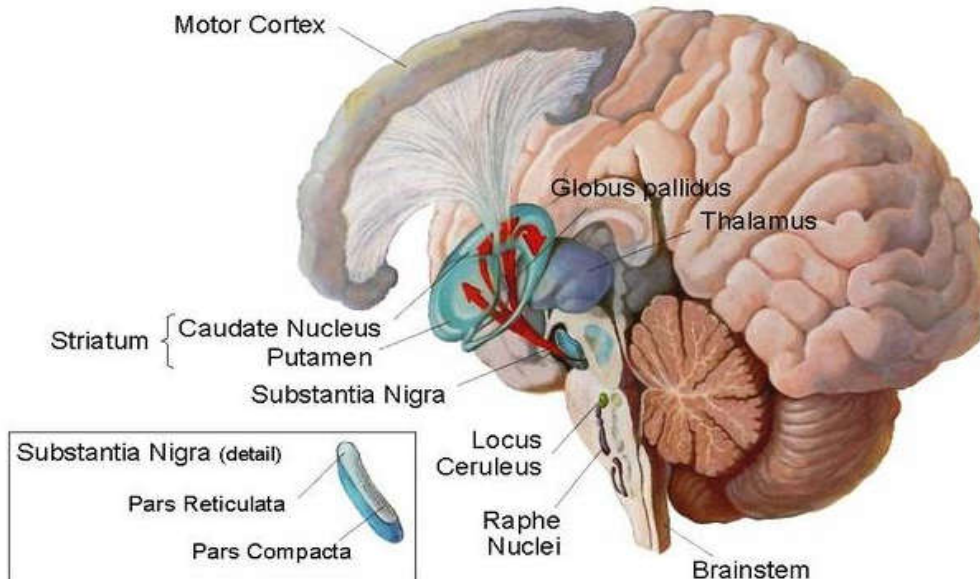


Εικόνα 10: Ο εκφυλισμός των ντοπαμινεργικών νευρώνων και κατά συνέπεια η μείωση της ποσότητα ντοπαμίνης. (<http://www.neurocenter.gr/parkinson.html>)

Εκτός από τον εκφυλισμό των νευρώνων της μέλαινας ουσίας, ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της παθοφυσιολογίας της συγκεκριμένου νόσου είναι και η ύπαρξη συσσωματωμάτων στο κυτταρόπλασμα των εναπομεινάντων νευρώνων. Οι συσσωματώσεις αυτές ονομάζονται σωματία ή έγκλειστα Lewy τα οποία περιέχουν ινίδια σε μία ακτινωτή διάταξη. Πιο συγκεκριμένα, τα ινίδια αυτά αποτελούνται από μη διαλυτές μορφές της πρωτεΐνης α-συνουκλεΐνης που προσομοιάζουν δομικά στο β-αμυλοειδές πεπτίδιο που εναποτίθεται στη νόσο Αλτσχάιμερ. Ένα άλλο βασικό συστατικό των σωματίων Lewy είναι πολλαπλές πρωτεΐνες που είναι συνδεδεμένες με μία μικρή πρωτεΐνη, την ουμπικουΐτίνη. Η σήμανση των πρωτεϊνών αυτών με ουμπικουΐτίνη επιτρέπει φυσιολογικά την αποικοδόμηση τους σε ένα κυλινδρικό ενδοκυττάριο σχηματισμό που ονομάζεται πρωτεάσωμα (ο ρόλος του συστήματος αναφέρεται παρακάτω). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα σωματία Lewy αποτελούν τη βάση της κλινικής έκφρασης της νόσου και ανάλογα της περιοχής εντόπισης διακρίνεται το Πάρκινσον από την άνοια. Δηλαδή, η εντόπισή των σωματίων Lewy στο εγκεφαλικό στέλεχος συσχετίζεται με τα κινητικά συμπτώματα της νόσου Parkinson, ενώ η εντόπιση τους στον φλοιό συσχετίζεται με την άνοια. Έτσι, πιο διάσπαρτη εντόπιση σωματίων Lewy που συμπεριλαμβάνει το μεταιχμιακό σύστημα και τον φλοιό εμφανίζεται ως άνοια ενώ πιο συγκεκριμένη εντόπιση των σωματίων Lewy στο στέλεχος και ιδιαίτερα στην μέλαινα ουσία στα αρχικά στάδια εμφανίζεται ως νόσος Parkinson. Ωστόσο, στην πορεία της νόσου Πάρκινσον τα σωματία Lewy εμφανίζονται διάσπαρτα στον εγκέφαλο, με αποτέλεσμα η άνοια να είναι πολύ συχνή στα όψιμα στάδια της νόσου. (Spillantini, et al, 1998, Στεφανής, 2011).

Επιπροσθέτως, ελλείμματα και άλλων νευροδιαβιβαστών, όπως της νοραδρεναλίνης και της ακετυλοχολίνης, καθώς και οι πιο εκτεταμένες, μη ντοπαμινεργικές παθολογοανατομικές βλάβες, είναι δύο παράγοντες που ευθύνονται κυρίως για τα μη κινητικά συμπτώματα της νόσου (Στεφανής, 2011).

Ανακεφαλαιώνοντας, τα τμήματα του εγκεφάλου που προσβάλλονται κατά τη νόσο του Πάρκινσον είναι τα εξής (**Εικόνα 11**):



Εικόνα 11: Απεικόνιση των τμημάτων του εγκεφάλου που επηρεάζονται από τη νόσο του Πάρκινσον. Περιλαμβάνονται: Ο κινητικός φλοιός (*motor cortex*), η ωχρά σφαίρα (*Globus pallidus*), ο θάλαμος (*Thalamus*), το εγκεφαλικό στέλεχος (*Brainstem*), το ραβδωτό σώμα (*Striatum*), ο κερκοφόρος πυρήνας (*Caudate Nucleus*) το κέλυφος (*Putamen*), η μέλαινα ουσία (*substantia nigra*), οι πυρήνες της ραφής (*Raphe Nuclei*) και ο υπομέλανας τόπος (*Locus Ceruleus*). (<http://diseasespictures.com/parkinsons-disease/>)

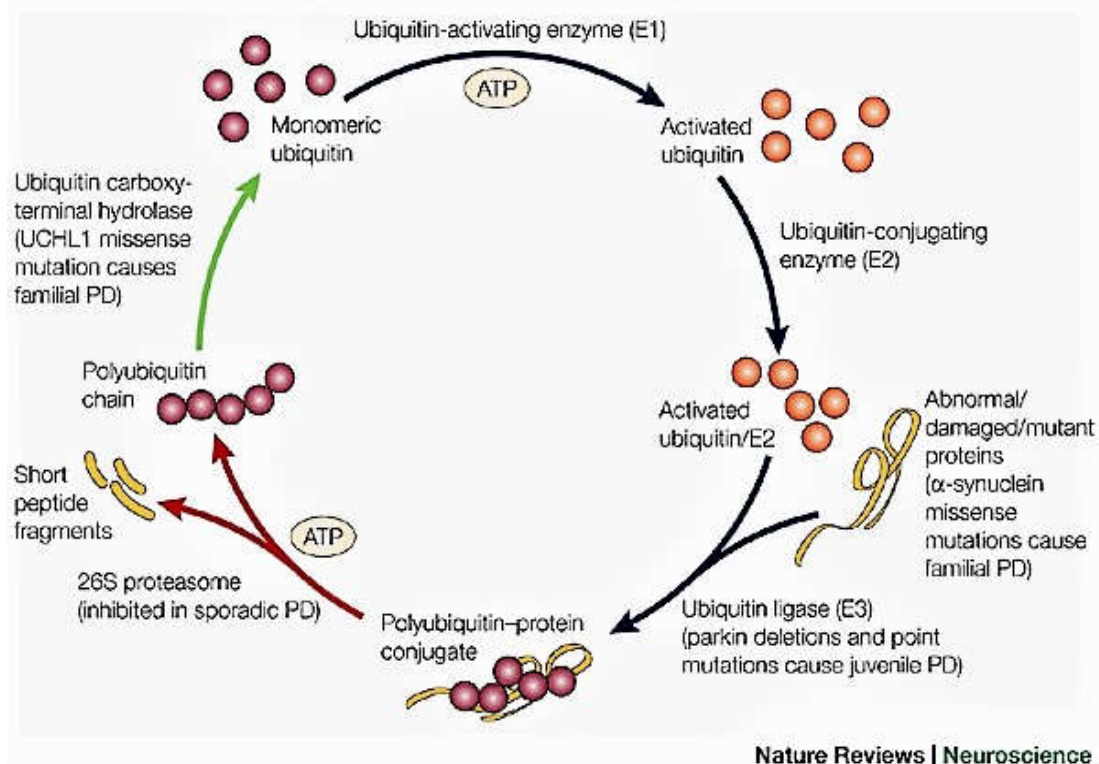
Το σύστημα Ουμπικουϊτίνης – Πρωτεάσωμα στη νόσο του Parkinson

Αρχικά, το κύτταρο έχει αναπτύξει ειδικούς προστατευτικούς μηχανισμούς ώστε να αποφευχθεί η λανθασμένη αναδίπλωση των πρωτεϊνών γιατί η μη σωστή αναδίπλωση τους μπορεί να οδηγήσει τόσο σε λανθασμένη λειτουργικότητα όσο και σε συσσώρευσή τους, 2 παράγοντες οι οποίοι θα μπορούσαν να αποβούν βλαπτικοί για το κύτταρο (π.χ. εναποθέσεις στις νόσους Αλτσχάιμερ και Πάρκινσον). Στους μηχανισμούς αυτούς περιλαμβάνονται τόσο οι ειδικές πρωτεΐνες (*chaperones*) οι οποίες καθοδηγούν την αναδίπλωση του πρωτεϊνικού μορίου στο χώρο όσο και το

σύστημα ubiquitin-πρωτεάσωμα το οποίο διασπά πρωτεΐνες που δεν έχουν αναδιπλωθεί σωστά.

Πιο αναλυτικά, η σύνδεση της ουμπικουΐτινης με το προς διάσπαση μόριο (ubiquitylation) αποτελεί μια πολυδιάστατη διαδικασία η οποία απαιτεί τη συμμετοχή τριών διαφορετικών ενζύμων (E1, E2 και E3). Αρχικά το ένζυμο E1 (ubiquitin-activating enzyme) σχηματίζει ένα θειο-εστερικό δεσμό με την καρβοξυτελική γλυκίνη της ουμπικουΐτινης. Σε αυτό το στάδιο απαιτείται κατανάλωση ενέργειας υπό τη μορφή ATP. Στη συνέχεια, το ένζυμο E2 (ubiquitin-conjugating enzyme) δέχεται την ουμπικουΐτινη από το E1 και τελικά η E3 – ubiquitin λιγάση καταλύει τη μεταφορά της ουμπικουΐτινης από το E2 στην ε-αμινομάδα ενός καταλοίπου λυσίνης του προς διάσπαση μορίου και μετά ακολουθεί η αποδόμηση από το πρωτεάσωμα. Όλα τα παραπάνω σχετίζονται με τη παθογένεια της νόσου του Πάρκινσον εάν ληφθεί υπόψιν ότι η α-συνουκλεΐνη διασπάται από το πρωτεάσωμα ενώ το parkin αποτελεί μια E3 λιγάση που χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα μια O-γλυκοζυλιωμένη μορφή της α-συνουκλεΐνης (Agorogiannis et al, 2006).

Αξιοσημείωτος είναι ο ρόλος επίσης της UCH-L1 (διπλή ενζυμική δράση: ubiquitin C-τελική υδρολάση και ubiquitin-λιγάση) η οποία υδρολύει τους δεσμούς χημικών αλυσίδων μορίων ουμπικουΐτινης με συνέπεια την απελευθέρωση μονομερών ουμπικουΐτινης και την ανακύκλωση της (**Σχήμα 3**).



Σχήμα 3: Αναπαράσταση του ρόλου του συστήματος της ουμπικουΐτινης – πρωτεασώματος στη νόσο Parkinson και οι συσχετιζόμενες γενετικές ανομαλίες που ευθύνονται για την παθογένεια της νόσου (Human Pathology, 2003).

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, θα μπορούσαμε να υποστηρίξουμε ότι η παθογένεια των κληρονομικών μορφών της νόσου οφείλεται σε:

- α) Μεταλλάξεις στο γονίδιο της α -συνουκλεΐνης που οδηγούν σε αυξημένη παραγωγή μη σωστά αναδιπλωμένης πρωτεΐνης με συνέπεια την αυξημένη τάση για δημιουργία συσσωματωμάτων
- β) Μεταλλάξεις στο γονίδιο της parkin που οδηγούν σε αδυναμία σήμανσης της α -συνουκλεΐνης με ουμπικουΐτινη και άρα σε αδυναμία αποδόμησης της από το πρωτεάσωμα
- γ) Μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την UCH-L1 και οδηγούν σε αδυναμία ανακύκλωσης της ουμπικουΐτινης με αποτέλεσμα την μείωση της διαθεσιμότητας και κατά συνέπεια σε δυσλειτουργία τους συστήματος (Agorogiannis et al, 2006).

1.2.4 Γενετική Βάση

Με βάση την ανάλυση συγκεκριμένων οικογενειών με πολλαπλούς πάσχοντες από τη νόσο έχει καταστεί δυνατή η ταυτοποίηση συγκεκριμένων μεταλλάξεων σε συγκεκριμένα γονίδια. Μέχρι σήμερα, μεταλλάξεις σε πέντε (5) γονίδια έχουν αδιαφιλονίκητα συσχετιστεί με τη νόσο του Πάρκινσον. Αναλυτικότερα:

1) Το γονίδιο α-συνουκλεΐνη (α-synuclein - SNCA)

Το πρώτο γονίδιο που συσχετίστηκε με τη νόσο Parkinson ήταν αυτό της α-συνουκλεΐνης. Το γονίδιο που την κωδικοποιεί βρίσκεται στο μακρό σκέλος του χρωμοσώματος 4 (4q21) ενώ η πρωτεΐνη αποτελούμενη από 140 αμινοξέα εναποτίθεται με την μορφή αμυλοειδούς στα σωματία Lewy. Είτε σημειακές μεταλλάξεις (Ala53Thr και Ala30Pro) που αλλάζουν την δομή της πρωτεΐνης, είτε πολλαπλασιασμός του γονιδίου της φυσιολογικής α-συνουκλεΐνης (υπερέκφραση) οδηγούν σε αυτοσωμική επικρατή μορφή του Parkinson. Το γεγονός αυτό έδωσε λαβή στην θεωρία ότι γενετικοί ή περιβαλλοντικοί παράγοντες που οδηγούν στην αλλαγή της δομής της α-συνουκλεΐνης προς μορφές που προσομοιάζουν με το αμυλοειδές ευθύνονται για τη νόσο, ακόμη και στα σποραδικά περιστατικά (Agorogiannis et al, 2006, Στεφανής, 2011).

2) Το γονίδιο parkin

Το γονίδιο της parkin εδράζεται στο γενετικό τόπο PARK2 (χρωμόσωμα 6.25.2-27) και κωδικοποιεί μία E3-λιγάση αποτελούμενη από 465 αμινοξέα, η οποία εμπλέκεται στη λειτουργία του συστήματος ουμπικουϊτίνης –πρωτεάσωμα . Μεταλλάξεις αυτού του γονιδίου προκαλούν την αυτοσωμική υπολειπόμενη νεανική μορφή (στη διάρκεια της δεύτερης δεκαετίας της ζωής) της νόσου του Parkinson ενώ κύριο χαρακτηριστικό σε αυτή την περίπτωση είναι η απουσία των σωματίων του Lewy από τη μέλαινα ουσία (Agorogiannis et al, 2006, Pickrell, 2015).

3) Το γονίδιο LRRK2

Το γονίδιο της LRRK2 εντοπίζεται στο γενετικό τόπο PARK8 και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη LRRK2 (leukine-rich repeat kinase 2) ή dardarin , μία κινάση η οποία βρίσκεται μεταλλαγμένη τόσο σε ασθενείς με ιδιοπαθή νόσο του Parkinson όσο και σε ασθενείς με οικογενή νόσο. Μεταλλάξεις του γονιδίου αυτού οδηγούν σε αυτοσωμικό επικρατή τύπο κληρονομικότητας της νόσου ενώ η παθολογοανατομική εικόνα χαρακτηρίζεται από ή μη παρουσία των σωματίων Lewy και από την περιστασιακή παρουσία συσσωρεύσεων της πρωτεΐνης Tau. Αν και ο φυσιολογικός ρόλος της δεν είναι γνωστός, θεωρείται ότι η μετάλλαξη της LRRK2 προκαλεί απρόσφορη φωσφορυλίωση και τροποποίηση πρωτεϊνών όπως της α-συνουκλεΐνης και της πρωτεΐνης Tau, προάγοντας έτσι το σχηματισμό συσσωματωμάτων (Agorogiannis et al, 2006).

4) Το γονίδιο PINK-1

Το γονίδιο της PINK-1 εντοπίστηκε στο γενετικό τόπο PARK6 και οι μεταλλάξεις του έχουν συσχετιστεί με τις πρώιμες έναρξης υπολειπόμενες μορφές της νόσου του Parkinson. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μια κινάση σερίνης-θρεονίνης η οποία φυσιολογικά εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια και ο ρόλος της είναι η προστασία της μιτοχονδριακής λειτουργίας σε συνθήκες οξειδωτικού στρες μέσω φωσφορυλίωσης άλλων κύριων ρυθμιστών αυτής της διαδικασίας όπως είναι της πρωτεΐνης parkin. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η αλληλεπίδραση της PINK1 με την parkin είναι απαραίτητη για τον φυσιολογικό έλεγχο της μιτοχονδριακής λειτουργίας μέσω της συμμετοχής τους σε ένα κοινό βιοχημικό μονοπάτι το οποίο διεκπεραιώνει την διεργασία της μιτοχονδριακής αυτοφαγίας (mitophagy) (Pickrell, 2015).

5) Το γονίδιο DJ-1

Το γονίδιο της DJ-1 εδράζεται στο γενετικό τόπο PARK7 και οι μεταλλάξεις του προκαλούν την πρώιμη έναρξη αυτοσωμική υπολειπόμενη μορφή της νόσου. Η

πρωτεΐνης DJ-1 συμμετέχει στην κυτταρική απόκριση στο οξειδωτικό στρες ενώ κύριες λειτουργίες της είναι τόσο η συνεισφορά της στην απόκτηση σωστής αναδίπλωσης νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών συμμετέχοντας ως μοριακός συνοδός (chaperone σε συνδυασμό με το σύστημα ουμπικουΐνης - πρωτεάσωμα) όσο και η αντιαποπτωτική της δράση η οποία με τη σειρά της επιτελείται μέσω της αρνητικής ρύθμισης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου PTEN και της αλληλεπίδρασης της με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες του κυττάρου (Agorogiannis et al, 2006).

Όλα τα παραπάνω συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 1**):

Πίνακας 1: Γενετικοί παράγοντες που ευθύνονται για την παθογένεια της νόσου του Parkinson αλλά και επιπρόσθετοι γενετικοί τόποι με τον αντίστοιχο ρόλο τους (Agorogiannis et al, 2006)

Γονίδιο-γενετικός τόπος	Χρωμοσωμική εντόπιση	Γονιδιακό προϊόν	Τύπος κληρονομικότητας	Φαινότυπος	Σωμάτια του Lewy
<i>PARK1</i>	4q21-q23	α -synuclein	ΑΕ	Σχετικά μικρότερη ηλικία έναρξης	+
<i>PARK2</i>	6q25.2-q27	Parkin	ΑΥ	Νεανική ηλικία έναρξης	-
<i>PARK3</i>	2p13	Άγνωστο	ΑΕ	Τυπική νόσος του Parkinson	+
<i>PARK4</i>	4p15	Άγνωστο	ΑΕ	Τρόμος στάσης, άνοια	+
<i>PARK5</i>	4p14	UCH-L1	ΑΕ	Τυπική νόσος του Parkinson	Άγνωστο
<i>PARK6</i>	1p35-p36	PINK1	ΑΥ	Μικρή ηλικία έναρξης	Άγνωστο
<i>PARK7</i>	1p36	DJ-1	ΑΥ	Μικρή ηλικία έναρξης	Άγνωστο
<i>PARK8</i>	12p11.2-q13.1	LRRK2 (dardarin)	ΑΕ	Νόσος με θετική ανταπόκριση στην L-dopa	±
<i>PARK9</i>	1p36	Άγνωστο	ΑΥ	Μεγάλη ηλικία έναρξης	Άγνωστο
<i>PARK10</i>	1p32	Άγνωστο	Αυξημένη πιθανότητα νόσησης (γενετικός παράγοντας κινδύνου)	Μεγάλη ηλικία έναρξης	Άγνωστο
<i>NR4A2</i>	2q22-23		Αυξημένη πιθανότητα νόσησης (γενετικός παράγοντας κινδύνου)		
<i>Synphilin-1</i>	5q23.1-23.3		Αυξημένη πιθανότητα νόσησης (γενετικός παράγοντας κινδύνου)		
<i>Tau</i>	17q21		Αυξημένη πιθανότητα νόσησης (γενετικός παράγοντας κινδύνου)		

ΑΕ: Αυτοσωμική επικρατούσα κληρονομικότητα, ΑΥ: Αυτοσωμική υπολειπόμενη κληρονομικότητα

Τέλος, σύμφωνα με τα όσα προαναφέρθηκαν οι βασικές θεωρίες για την παθογένεια της νόσου Parkinson είναι οι εξής:

- Θεωρία ανώμαλης εναπόθεσης πρωτεϊνών, ιδιαίτερα της α -συνουκλεΐνης.

- b) Θεωρία δυσλειτουργίας συστημάτων αποικοδόμησης ενδοκυττάρων πρωτεϊνών όπως του συστήματος ουμπικουΐτινης - πρωτεασώματος και των λυσοσωμάτων.
- c) Θεωρία δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων.
- d) Θεωρία υπέρμετρης ανάπτυξης οξειδωτικού στρες.
- e) Θεωρία φλεγμονής, όπου τα κύτταρα της μικρογλοίας, που δραστηριοποιούνται κανονικά μόνο σε λοιμώξεις ή φλεγμονές του νευρικού συστήματος, δραστηριοποιούνται υπέρμετρα, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση παραγόντων που είναι τοξικοί για τους νευρώνες. Η φλεγμονώδης αυτή αντίδραση πιθανότατα δεν έχει πρωτογενή παθογενετικό ρόλο, αλλά μπορεί να επιτείνει την ήδη εξελισσόμενη νευρωνική δυσλειτουργία και το νευρωνικό θάνατο. Οι θεωρίες αυτές δεν αναιρούν η μία την άλλη και είναι πιθανόν όλοι αυτοί οι μηχανισμοί να συνεισφέρουν στην ανάπτυξη της νόσου.

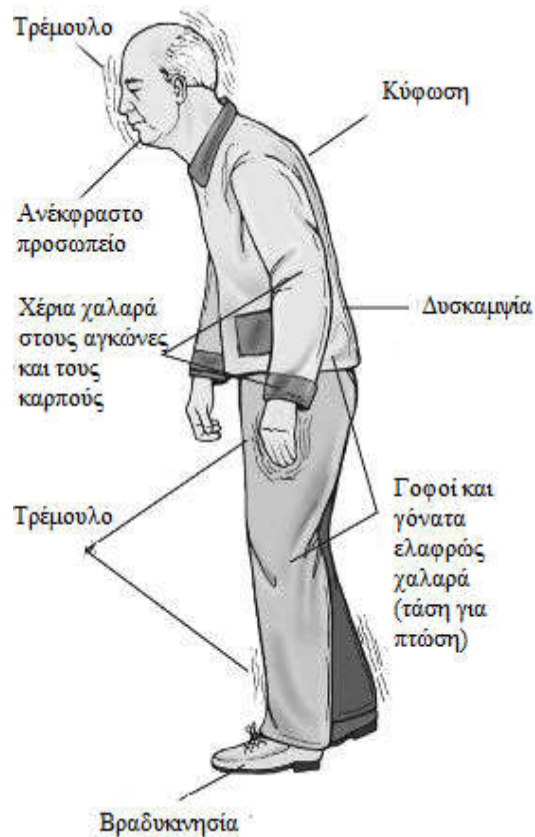
1.2.5 Κλινική συμπτωματολογία

Η εξέλιξη της νόσου είναι γενικά απρόβλεπτη και δεν είναι δυνατόν να προβλεφθούν ποια συμπτώματα θα εκδηλωθούν πρώτα, πότε θα εμφανισθούν και πόσο γρήγορα θα εξελιχθούν. Τα κυριότερα συμπτώματα είναι (**Εικόνα 12**):

- **Βραδυκινήσια:** Παρουσιάζεται βραδύτητα στις εκούσιες κινήσεις και δυσκολία στην έναρξη και διατήρηση κινήσεων. Μπορεί να διαπιστωθεί όταν ζητηθεί από τον εξεταζόμενο να κάνει επαναλαμβανόμενες κινήσεις είτε με τα άνω είτε με τα κάτω άκρα, οπότε οι κινήσεις γίνονται ολοένα μικρότερες και βραδύτερες με την επανάληψη (Τσίντου και Δαλαμάγκας, 2011)
- **Δυσκαμψία:** Σύσπαση αγωνιστών και ανταγωνιστών μυών κατά τη διάρκεια παθητικής κίνησης. Εμφανίζεται με δύο κλινικές μορφές: την δυσκαμψία τύπου «**οδοντωτού τροχού**» στις αρθρώσεις του καρπού και του αγκώνα, όπου ο ασθενής κατά την παθητική κίνηση συναντά αντίσταση που ενισχύεται κατά διαστήματα από μικρές ώσεις με μεσοδιαστήματα χαλάρωσης (π.χ κίνηση του δείκτη ενός ρολογιού) ή την δυσκαμψία τύπου

« **μολυβδοσωλήνα** » όταν η κίνηση γίνεται με διαδοχική δυσκολία όπως η κάμψη ενός μολυβδοσωλήνα (ο εξεταστής βρίσκει την ίδια αντίσταση σε όλο το εύρος μιας παθητικής κίνησης) (Τσίντου και Δαλαμάγκας, 2011)

- **Τρόμος ηρεμίας (Συχνότητα 3-7 Hz).** Οφείλεται σε εναλλασσόμενη σύσπασση αγωνιστών-ανταγωνιστών μυών. Η εμφάνιση του υποδηλώνει την ύπαρξη κεντρικού «Βηματοδότη»: ομάδα νευρικών κυττάρων που εμφανίζουν αυτόματες ρυθμικές εκφορτίσεις. Τέτοιος «βηματοδότης» φαίνεται ότι βρίσκεται στον θάλαμο, στον διάμεσο κοιλιακό πυρήνα. Η δραστηριότητα αυτή προβάλλεται στον κινητικό φλοιό και μέσω της πυραμιδικής οδού εκδηλώνεται κλινικά σαν τρόμος (Τάγαρης, 2005).
- **Ακινησία:** Το σοβαρότερο ίσως κλινικό σημείο της νόσου του Πάρκινσον το οποίο εκδηλώνεται με διαταραχή στην έναρξη και με βραδύτητα στην εκτέλεση σύνθετων κινήσεων. Αποδίδεται σε διαταραχή στην εκτέλεση του «κινητικού σχεδίου» (motor plan) και συγκεκριμένα στην ανάκληση των στοιχειωδών κινητικών προγραμμάτων που το αποτελούν (Τάγαρης, 2005).
- **Φαινόμενο freezing:** Δυσκολία στην έναρξη και διαταραχές στην συνέχιση ρυθμικών επαναλαμβανόμενων κινήσεων όπως το βάδισμα, η ομιλία και η γραφή. Είναι φαινόμενο ανεξάρτητο από την ακινησία και πιθανόν ανεξάρτητο από ντοπαμινεργικούς μηχανισμούς. Η παθοφυσιολογία του παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστη (Τάγαρης, 2005).



Εικόνα 12: Συμπτώματα της νόσου του Πάρκινσον.

(<http://www.biomedis-technology.gr/2016/07/parkinson-sumptwmata.html>)

Ωστόσο, κάποια συνοδά συμπτώματα είναι επίσης και μη κινητικά τα οποία περιλαμβάνουν την κατάθλιψη, την άνοια, τα ψυχωσικά επεισόδια με εμφάνιση οπτικών ή ακουστικών ψευδαισθήσεων, τη δυσκοιλιότητα, τις διαταραχές του ύπνου, την εύκολη κόπωση και τις διαταραχές της όσφρησης (Janikovic, 2008).

1.2.6 Σταδιοποίηση ΝΠ

Η πρόοδος της νόσου πραγματοποιείται μέσω των παρακάτω σταδίων:

1) Πρώιμο στάδιο (διάρκεια συμπτωματολογίας 3-5 χρόνια περίπου). Ο ασθενής (Παπαδόπουλος, 2005):

- Εμφανίζει τρόπο ηρεμίας στη μία πλευρά (συνήθως αριστερό άνω άκρο) ο οποίος μπορεί να είναι συνεχής, να έχει διαλείποντα χαρακτήρα ή να επιτείνεται με το άγχος.
- Βαδίζει με μικρότερα βήματα, αργά ή και συρόμενα και δείχνει κάποια δυσκολία όταν αλλάζει κατεύθυνση. Σε ορισμένους ασθενείς μπορεί να παρουσιάζονται επεισόδια παγώματος κατά το βάδισμα. Τα άνω άκρα κατά το βάδισμα χάνουν τον ρυθμό τους και το εύρος της κίνησης τους περιορίζεται.
- Διαπιστώνει κάποια βραδύτητα στις καθημερινές δραστηριότητες του (ένδυση, μπάνιο, σίτιση κ.λ.π.).
- Παρουσιάζει συχνά διαταραχές ύπνου και εμφανίζει αίσθημα κόπωσης και κακή διάθεση.

2) Μεσαίο στάδιο (διάρκεια συμπτωματολογίας 5-10 χρόνια). Χαρακτηριστικά αυτού του σταδίου είναι (Παπαδόπουλος, 2005):

- Ο τρόμος και η δυσκαμψία του κορμού.
- Η δυσκολία στο βάδισμα, με συχνές διαταραχές ισορροπίας ή παγώματα.
- Η κυφωτική στάση του σώματος.
- Μείωση της εκφραστικότητας του προσώπου και η μονότονη και χαμηλόφωνη ομιλία.
- Οι πιο έντονες διαταραχές του αυτόνομου νευρικού συστήματος (ούρηση, ύπνος, δυσκοιλιότητα) όπως και διαταραχές μνήμης.

3) Προχωρημένο στάδιο (συμπτώματα άνω των 10 χρόνων). Ο ασθενής (Παπαδόπουλος, 2005):

- Εμφανίζει μεγάλου βαθμού δυσκαμψία και βραδυκινησία ενώ το βάδισμα αν όχι αδύνατο γίνεται δυσχερές.
- Με μεγάλη δυσκολία εκτελεί καθημερινές προσωπικές και αναγκαίες δραστηριότητες για τις οποίες απαιτείται πλέον βοήθεια από το περίγυρό του.
- Παρουσιάζει έντονη σιελόρροια , η ομιλία του καθίσταται δυσδιάκριτη ενώ η γραφή του είναι δυσανάγνωστη έως αδύνατη.
- Χάνει την ισορροπία του και οδηγείται σε πτώσεις.
- Δείχνει τάσεις διαρκούς υπνηλίας κατά τη διάρκεια της ημέρας και κοιμάται διαρκώς.
- Εμφανίζει ανοϊκές εκδηλώσεις και ψευδαισθήσεις.

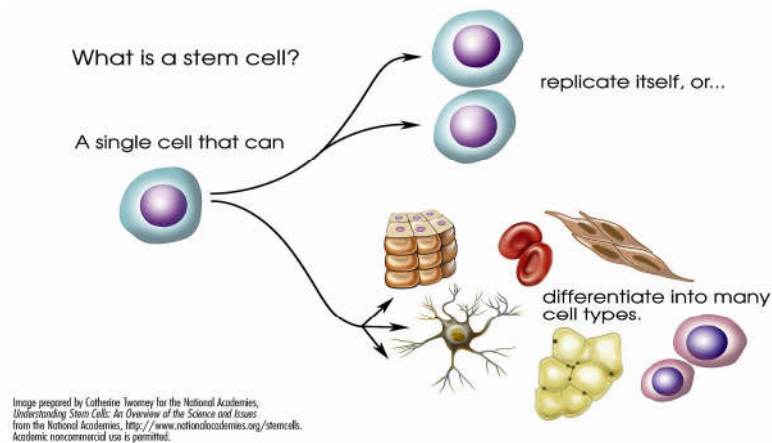
Από τη θεωρία στην πράξη...

Συμπερασματικά, ύστερα από την ανάλυση των δύο νευροεκφυλιστικών ασθενειών Αλτσχάιμερ και Πάρκινσον σε γενετικό, μοριακό αλλά και αιτιολογικό και συμπτωματολογικό επίπεδο, γίνεται φανερό ότι η αναζήτηση και η εύρεση νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για τις συγκεκριμένες νόσους είναι αναγκαία. Σε αυτό το πλαίσιο, ο αναδυόμενος τομέας της Αναγεννητικής Ιατρικής με την αξιοποίηση της σωματο-κυτταρικής θεραπείας και της αναπαραγωγής της νευροεκφυλιστικής ασθένειας σε κυτταρικό επίπεδο με την χρήση βλαστοκυττάρων (disease modeling) θα μπορούσε να αποβεί εξαιρετικά ωφέλιμος για την εξάλειψη των συμπτωμάτων αυτών των νόσων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

2.1 Τι είναι τα βλαστικά κύτταρα;

Οι εξελίξεις στην βιολογία των βλαστοκυττάρων βοηθούν στην κατανόηση των μηχανισμών οργανογένεσης, καρκινογένεσης, αλλά και στον σχεδιασμό βλαστικών κυττάρων ως θεραπευτικό εργαλείο για την επιτάχυνση της ιστικής επιδιόρθωσης. Τα βλαστικά κύτταρα (stem cells) διαθέτουν τις μοναδικές ιδιότητες της αυτοανανέωσης (self-renewal) και της δυναμικής διαφοροποίησης, οι οποίες τα καθιστούν ικανά να παράγουν κάθε κυτταρικό τύπο (**Εικόνα 13**) (Triga et al, 2017).



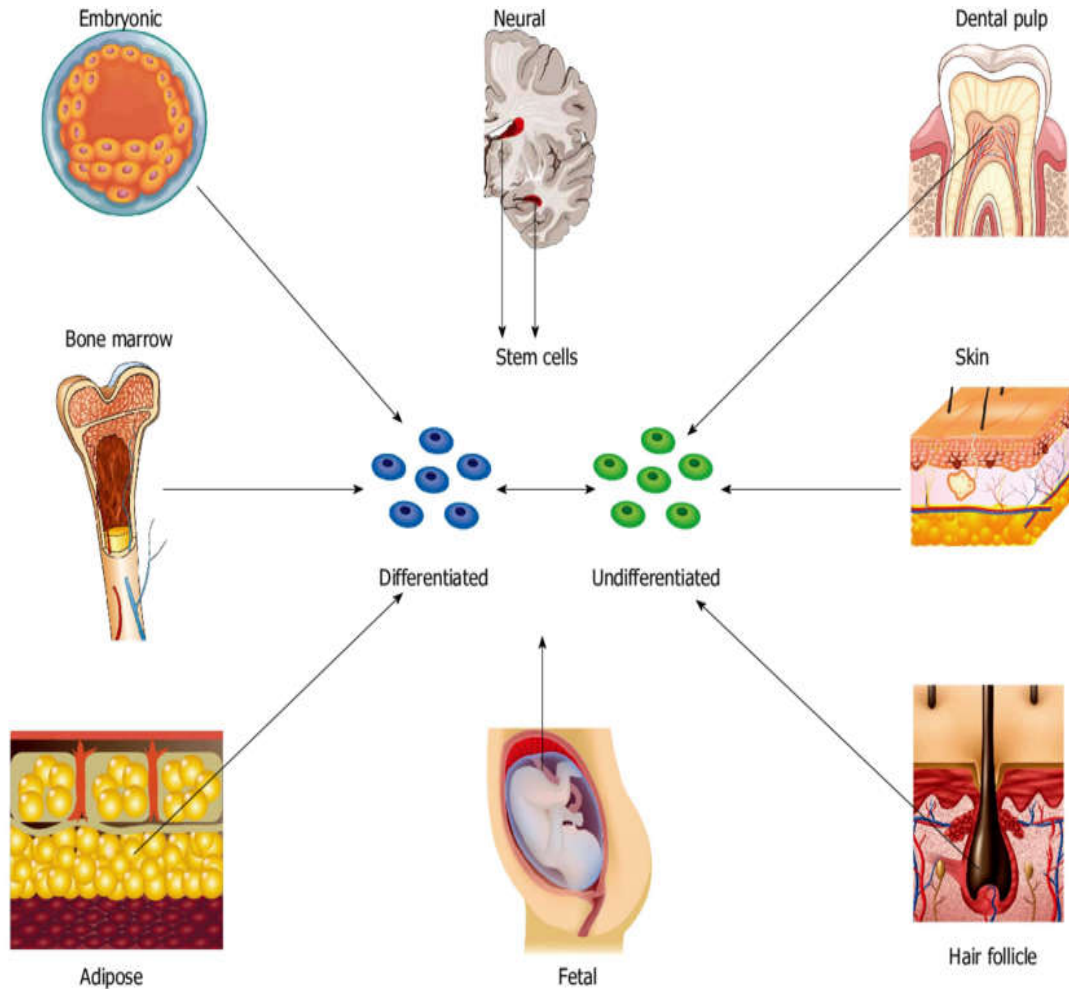
Εικόνα 13: Οι μοναδικές ιδιότητες του βλαστικού (στελεχιαίου) κυττάρου.

(<https://www.nationalmssociety.org/Research/Research-News-Progress/Stem-Cells-in-MS>)

Η ρύθμιση της διαφοροποίησης (η μετάβαση από ένα μη εξειδικευμένο κύτταρο σε ένα συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο) καθορίζεται τόσο από ένα σύνθετο ρυθμιστικό δίκτυο εσωτερικού προγραμματισμού (μέσω γονιδίων) όσο και από εξωτερική σηματοδότηση μέσω της έκκρισης παραγόντων από άλλα κύτταρα, από την φυσική επαφή με γειτονικά κύτταρα και από μόρια του μικροπεριβάλλοντος. Όλες αυτές οι αλληλεπιδράσεις των σηματοδοτικών μονοπατιών οδηγούν σε επιγενετικές τροποποιήσεις (μεθυλίωση DNA, ακετυλίωση και φωσφορυλίωση ιστονών, γονιδιακή αποτύπωση-imprinting) στο κυτταρικό DNA οποίες με τη σειρά τους μπορούν να προάγουν ή να παρεμποδίζουν την διαδικασία της γονιδιακής έκφρασης (Triga et al, 2012).

2.2 Πηγές Βλαστοκυττάρων

Οι διαφορετικές πηγές βλαστοκυττάρων συνοψίζονται παρακάτω (Εικόνα 14):



Εικόνα 14: Τα *ESCs* προέρχονται από την *ICM* της βλαστοκύστης ενώ τα νευρικά βλαστικά κύτταρα (*NSCs*) απομονώνονται από την υποκοιλιακή ζώνη της πλάγιας κοιλίας και τη γυροειδή αύλακα στον ιππόκαμπο. Τα βλαστικά κύτταρα του **μυελού των οστών** συλλέγονται από την κοιλότητα του μυελού των μακρίων οστών ενώ βλαστοκύτταρα μπορούν να προέλθουν και από τον **λιπώδη ιστό** μέσω λιποαναρρόφησης. Επίσης βλαστοκύτταρα συλλέγονται από το **δέρμα** και τα **τριχοθυλάκια**, από τον **πολφό των δοντιών** αλλά και από **εμβρυικούς ιστούς** που παρέχουν πληθυσμούς βλαστικών κυττάρων προερχόμενοι από την αμνιακή μεμβράνη, το αμνιακό υγρό και το αίμα του ομφάλιου λώρου. (Fairbairn et al, 2015)

2.3 Κατηγοριοποίηση των βλαστικών κυττάρων

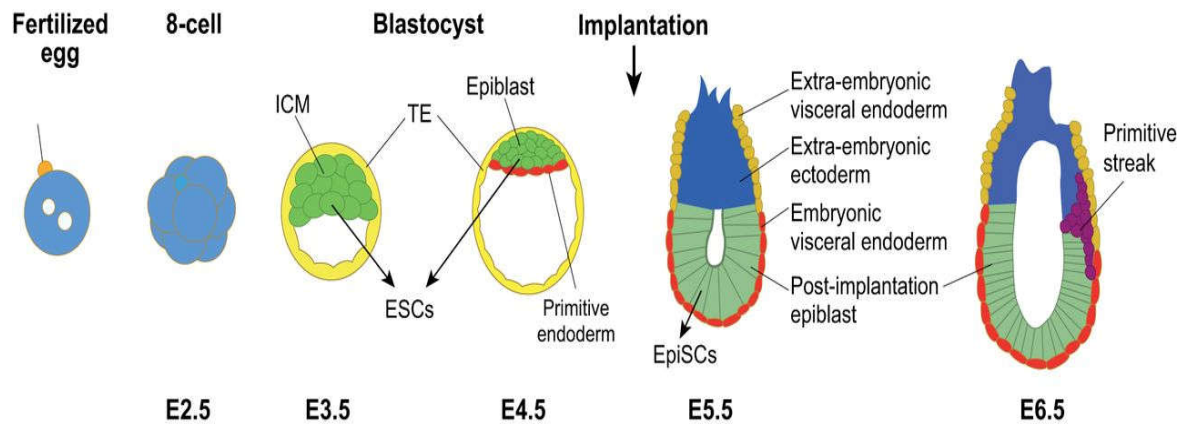
Ο όρος «Βλαστικά κύτταρα» περιλαμβάνει κύτταρα με διαφορετικές ιδιότητες:

1. Ολοδυναμία (Totipotency)

Η ικανότητα δημιουργίας ολόκληρου οργανισμού συμπεριλαμβανομένων και του εμβρυϊκού ιστού και του πλακούντα. Μόνο το γονιμοποιημένο ωάριο (**ζυγωτό**) και οι απόγονοι των δύο πρώτων διαιρέσεων είναι παντοδύναμα (totipotent) κύτταρα, ικανά δηλαδή να σχηματίσουν το έμβρυο καθώς και εξωεμβρυϊκούς ιστούς (τροφοβλάστη) (Triga et al, 2012).

2. Πολυδυναμία (Pluripotency)

Μετά από 4 περίπου ημέρες, τα ολοδύναμα κύτταρα αρχίζουν να διαφοροποιούνται σχηματίζοντας την βλαστοκύστη και μια ομάδα κυττάρων που ονομάζεται εσωτερική κυτταρική μάζα ICM (Inner Cell Mass - ICM) από όπου και αναπτύσσεται το έμβρυο. Τα κύτταρα της εσωτερικής στιβάδας δεν είναι ολοδύναμα πλέον αλλά πολυδύναμα (pluripotent). Τα πολυδύναμα κύτταρα με τη σειρά τους διακρίνονται στα **εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα** (Embryonic Stem Cells – ESCs) και στα **εμβρυονικά γαμετικά κύτταρα** (Embryonic Germ Cells- EGCs). Έτσι, με την πρόοδο της εμβρυϊκής ανάπτυξης τα κύτταρα αυτά μετατρέπονται σε ένα συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο χάνοντας το απεριόριστο δυναμικό διαφοροποίησής τους. Πολυδύναμα βλαστοκύτταρα είναι δυνατόν να βρεθούν ακόμη και εντός του αμνιακού υγρού ενώ στην κατηγορία αυτή ανήκουν και τα επαγόμενα πολυδύναμα κύτταρα (Induced Pluripotent Stem Cells - iPSCs)(βλέπε παρακάτω)(**Εικόνα 15**) (Triga et al, 2012, Δεληγεώργη – Πολίτη, 2013).



Εικόνα 15: Τα διαδοχικά στάδια προς την πολυδυναμία σε έμβryo ποντικού (πράσινο χρώμα). Από την ολοδυναμία του ζυγωτού στην πολυδυναμία των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων της βλαστοκύστης στην ολιγοδυναμία των βλαστικών κυττάρων των ιστών (Davidson et al, 2015).

3. Ολιγοδυναμία/ Πλειοδυναμία (Multipotency)

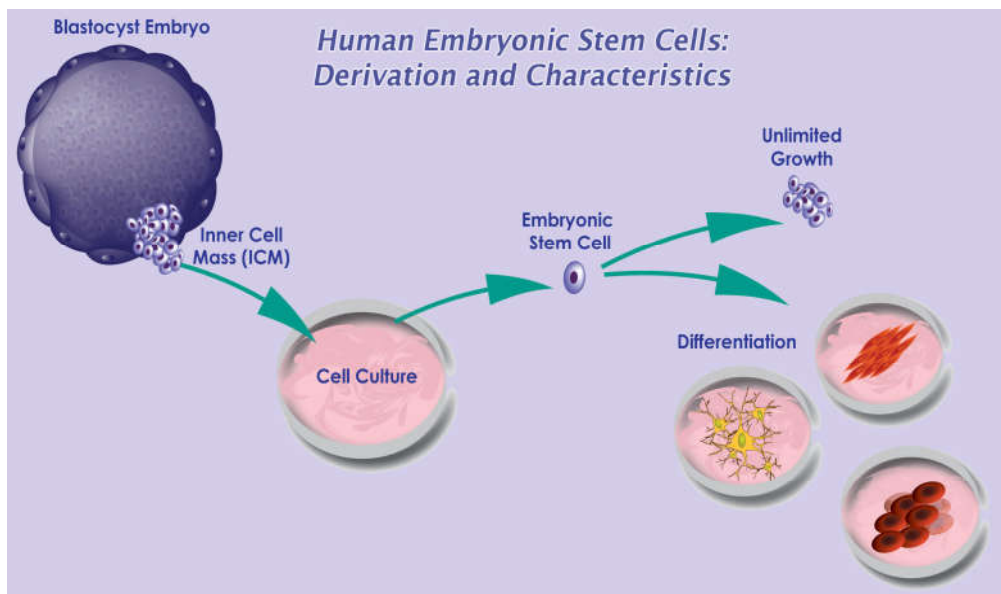
Σε αυτή την κατηγορία συμπεριλαμβάνονται τα βλαστικά κύτταρα των ώριμων εμβρυικών ιστών και τα βλαστικά κύτταρα των ενήλικων ιστών (Adult Stem Cells - ASCs), 2 είδη κυττάρων με εξειδικευμένο και κατ' επέκταση περιορισμένο δυναμικό διαφοροποίησης.

2.4 Θεραπευτική αξιοποίηση τριών τύπων βλαστικών κυττάρων

Από τις παραπάνω κατηγορίες βλαστικών κυττάρων, οι ερευνητές έχουν εστιάσει την προσοχή τους στην θεραπευτική αξιοποίηση τριών τύπων βλαστικών κυττάρων: των ESCs, των ASCs και των iPSCs. Πιο συγκεκριμένα:

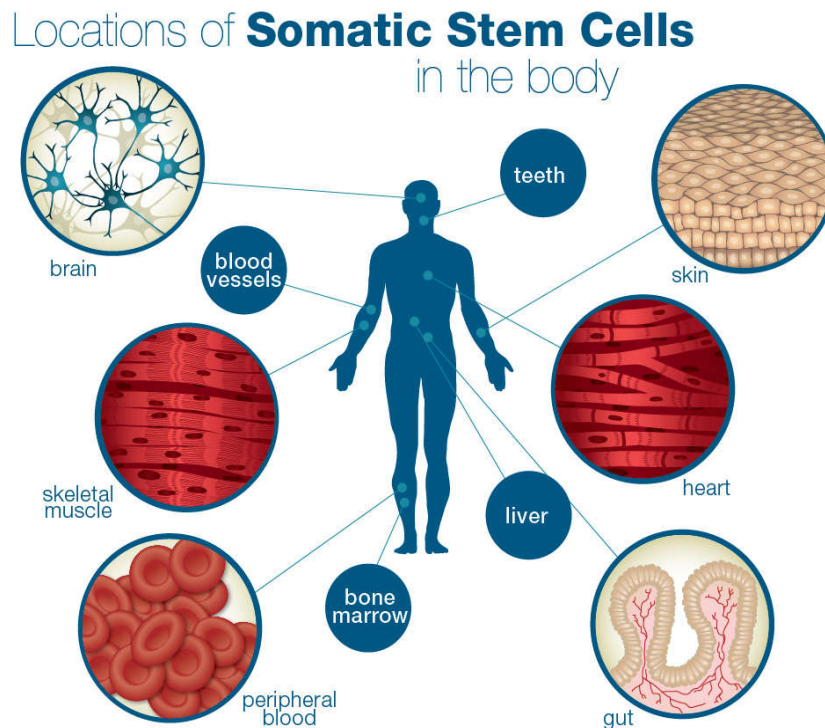
α) Τα **ESC**s προέρχονται από ωάρια που γονιμοποιήθηκαν in vitro, είναι 4-5 ημερών και λαμβάνονται από την ICM της βλαστοκύστης και συγκεκριμένα από την επιβλάστη (ενσωμάτωση σε όλες τις εμβρυικές σειρές διαφοροποίησης αλλά όχι συμμετοχή στη δημιουργία εξωεμβρυικών ιστών - εξωεμβρυικού μεσοδέρματος και τροφοβλάστης) (**Εικόνα 16**). Επίσης, καλλιεργούνται (θεωρητικά επ' άοριστον, πρακτικά όμως για μήνες) και αυτοανανεώνονται ενώ παραμένουν αδιαφοροποίητα και χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένους επιφανειακούς δείκτες και μεταγραφικούς

παράγοντες, που μέσω της συνεργιστικής τους δράσης μεταβάλλουν την γονιδιακή έκφραση την κατάλληλη χρονική στιγμή (Nanog, Oct3/4 και Sox2) (Γεωργάτος και άλλοι, 2012).



Εικόνα 16: Προέλευση και χαρακτηριστικά των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων.
(<http://www.awaremed.com/tag/embryonic-stem-cell/>)

β) Τα **ASCs** μπορούν να διαφοροποιηθούν αποκτώντας ιδιότητες εξειδικευμένων κυττάρων, συμμετέχοντας στην ιστική ομοιόσταση και επιδιόρθωση. Διακρίνονται σε Πλειοδύναμα, Ολιγοδύναμα και Μονοδύναμα (**Εικόνα 17**). Η ικανότητα διαφοροποίησης τους είναι περιορισμένη καθώς όταν διαιρείται ένα τέτοιο βλαστοκύτταρο σε δυο, το ένα παραμένει ως βλαστοκύτταρο και το άλλο διαφοροποιείται για να αναγεννήσει μέρος του ιστού που έχει καταστραφεί (Δεληγεώργη – Πολίτη, 2013).

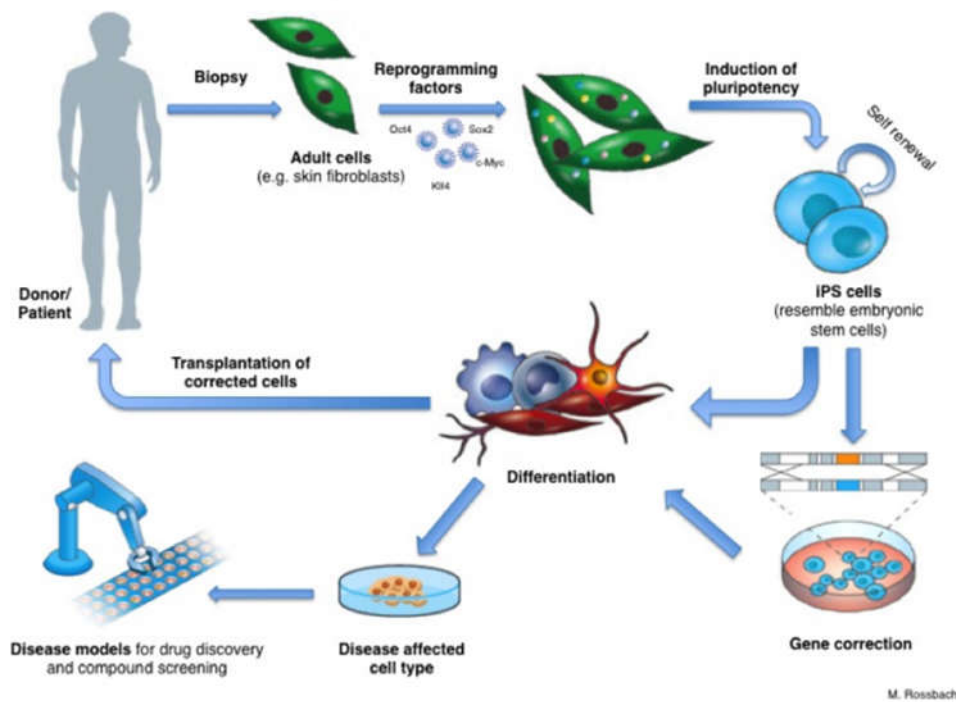


Εικόνα 17: Τα ASCs βρίσκονται στους περισσότερους ιστούς και όργανα του σώματος, όπως στον εγκέφαλο, στον μυελό των οστών, στο ήπαρ, στο περιφερικό αίμα και στα αιμοφόρα αγγεία, στο δέρμα, στα δόντια και στους σκελετικούς μύες.

(<http://learn.genetics.utah.edu/content/stemcells/quickref/>)

γ) Τα **iPSCs** κύτταρα δημιουργήθηκαν το 2006 από τους ερευνητές Shinya Yamanaka του Πανεπιστημίου του Kyoto και John Gurdon του Πανεπιστημίου του Κέμπριτζ (Nobel Prize Φυσιολογίας / Ιατρικής 2012), όπου κατάφεραν μέσω της υπερέκφρασης των 4 μεταγραφικών παραγόντων Oct3/4, Sox2, Klf4 και c-myc να δημιουργήσουν από ινοβλάστες δέρματος ποντικού, πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα με ταυτόσημες σχεδόν ιδιότητες των ESCs. Το εντυπωσιακό σε αυτή την διαδικασία δημιουργίας πολυδύναμων κυττάρων που προέρχονται από πλήρως διαφοροποιημένα σωματικά κύτταρα σε εργαστηριακές συνθήκες είναι ότι επιτεύχθηκε επαναπρογραμματισμός του DNA in vitro μέσω της έκφρασης αυτών των μεταγραφικών παραγόντων (**Εικόνα 18**). Το πρωτόκολλο εφαρμόστηκε στην συνέχεια και σε ανθρώπινα σωματικά κύτταρα ενώ σε πρόσφατες μελέτες

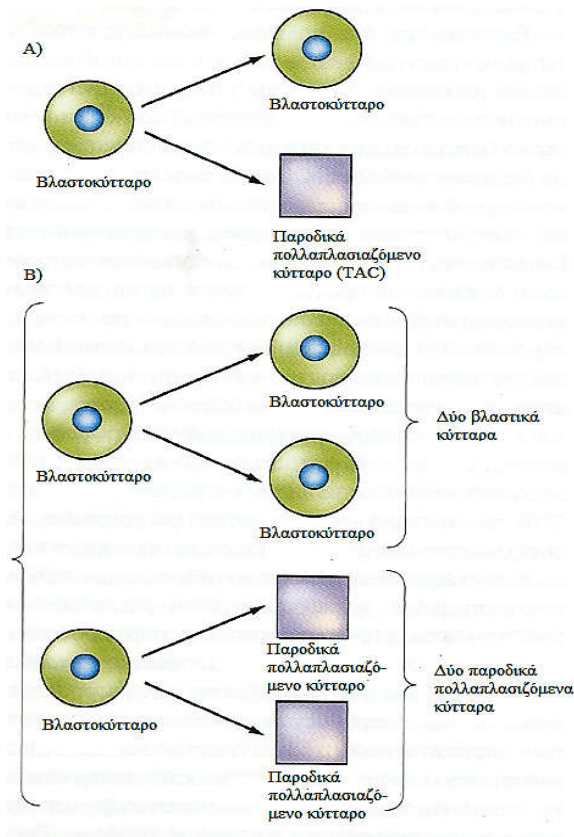
αντικαταστάθηκαν οι αρχικοί μεταγραφικοί παράγοντες με παρόμοιους εκτός από τον Oct3/4. Αυτό σημαίνει πιθανόν ότι ο Oct3/4 είναι ο μοναδικός απαραίτητος μεταγραφικός παράγοντας για τον επαναπρογραμματισμό, και ότι οι υπόλοιποι μεταγραφικοί παράγοντες ή σηματοδοτικά μόρια απλά διευκολύνουν την ενεργοποίηση του κυκλώματος πολυδυναμίας (Triga et al, 2012). Δυστυχώς όμως τα iPSCs έχουν το ίδιο μειονέκτημα που έχουν τα ESCs δηλ. να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα και να δημιουργούν καλοήθη ή κακοήθη τερατώματα. Αντίθετα, τα ενήλικα βλαστοκύτταρα και τα βλαστοκύτταρα του ομφαλίου λώρου έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην αντιμετώπιση ασθενειών (Δεληγεώργη - Πολίτη, 2013).



Εικόνα 18: Απεικόνιση της διαδικασίας επαναπρογραμματισμού του DNA *in vitro* μέσω της έκφρασης των 4 μεταγραφικών παραγόντων Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc και τελικά την δημιουργία iPSCs, τα οποία με τη σειρά τους αξιοποιούνται για θεραπευτική χρήση είτε με διόρθωση γονιδίων (*gene correction*) είτε με προσομοίωση της ασθένειας (*disease modeling*). (<http://www.eurostemcell.org/ips-cells-and-reprogramming-turn-any-cell-body-stem-cell>)

2.5 Συμμετρική και ασύμμετρη διαίρεση των βλαστοκυττάρων.

Τα βλαστοκύτταρα βάσει των ιδιοτήτων τους είναι σε θέση να διαιρούνται απεριόριστα. Ωστόσο σε καμία περίπτωση δεν είναι τα μόνα διαιρούμενα κύτταρα ενός ιστού καθώς και οι άμεσοι απόγονοι τους είναι συνήθως παροδικά πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα (Transit Amplifying Cells, TAC), τα οποία όμως διαιρούνται λίγες μόνο φορές και μετατρέπονται σε τελικώς διαφοροποιημένα (Terminally Differentiated, TD) κύτταρα. Με αυτό τον τρόπο, η διαίρεση των παροδικά πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων ρυθμίζεται έτσι ώστε να ικανοποιείται η ανάγκη του ιστού για νέα διαφοροποιημένα κύτταρα. Τα βλαστοκύτταρα συνήθως συνιστούν μικρό τμήμα του διαιρούμενου πληθυσμού και γενικά πολλαπλασιάζονται με μικρότερο ρυθμό από τα παροδικά πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα. Παρά το γεγονός ότι οι διαιρέσεις των βλαστοκυττάρων αποσκοπούν τόσο στη διατήρηση του αριθμού τους όσο και στην διατήρηση των πληθυσμών των παροδικά πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων και διαφοροποιημένων κυττάρων, οι κυτταρικές τους διαιρέσεις δεν είναι πάντοτε ασύμμετρες. Είναι απαραίτητο δηλαδή κατά μέσο όρο οι απόγονοι τους να περιλαμβάνουν κατά 50 % βλαστοκύτταρα και κατά 50% κύτταρα που προορίζονται για διαφοροποίηση (**Σχήμα 4**) (Slack, 2007, Triga et al, 2012).

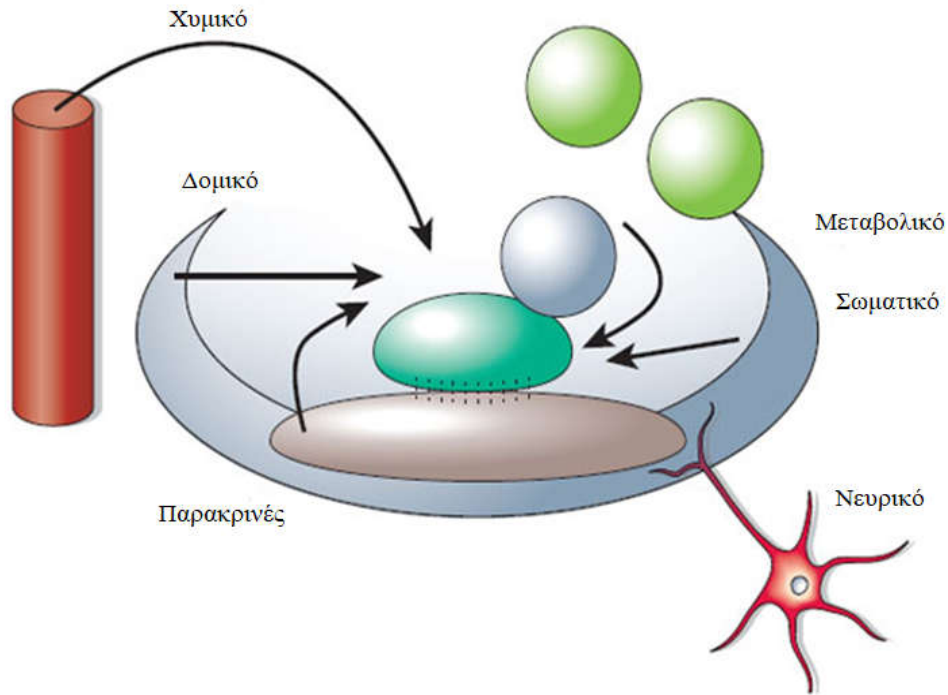


Σχήμα 4: Τα βλαστοκύτταρα διατηρούνται είτε A) μέσω της επανειλημμένης ασύμμετρης διαίρεσης είτε B) μέσω συμμετρικών διαιρέσεων στις οποίες οι απόγονοι είναι βλαστοκύτταρα και TACs σε ίση συχνότητα αλλά από διαφορετικές διαιρέσεις (Slack, 2007).

2.6 Ο ρόλος του θώκου στην αναγεννητική ιατρική

Κατά την διάρκεια ζωής κάθε οργανισμού, τα βλαστοκύτταρα στους ιστούς και στα όργανα εγκαθίστανται σε ένα περιβάλλον το οποίο αποκαλείται **θώκος**. Η έννοια θώκος για τα βλαστικά κύτταρα δεν περιλαμβάνει μόνο τα συστατικά του χώρου που περιβάλλει τα ίδια αλλά και τα μηνύματα και τα σήματα που μεταφέρονται από τα γειτονικά κύτταρα και επηρεάζουν την λειτουργία τους (**Εικόνα 19**). Στο σώμα του ενήλικου ατόμου, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός περιορίζεται κυρίως στις περιοχές των αναγεννόμενων ιστών που περιέχουν τα βλαστοκύτταρα και τα παροδικά πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, ενώ στο υπόλοιπο σώμα τα περισσότερα κύτταρα βρίσκονται σε ήρεμη κατάσταση. Έτσι, ο θώκος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της ισορροπίας της αυτό-αναγέννησης και της διαφοροποίησης, κάτι το οποίο αποδεικνύεται από το γεγονός ότι δυσλειτουργία αυτού του συστήματος λόγω κάποιας αλλαγής από το μικροπεριβάλλον μπορεί εύκολα να οδηγήσει σε καρκινική

κατάσταση και να προκαλέσει μια ανεπανόρθωτη βλάβη στον οργανισμό σε σύντομο χρονικό διάστημα (Slack, 2007, Γεωργιάτος και άλλοι, 2008).



Εικόνα 19: Τα ερεθίσματα που περιλαμβάνονται στο μικροπεριβάλλον του θώκου γενικά μπορεί είναι χυμικά, δομικά, παρακρινή, μεταβολικά, σωματικά και νευρικά.

(<https://pimm.wordpress.com/2007/02/09/elements-of-the-stem-cell-niche-2-figures-by-scadden/>)

2.7 Νευρικά βλαστικά κύτταρα (Neural Stem Cells - NSCs)

α) Απομόνωση NSCs

Όπως προαναφέρθηκε νευρικά βλαστικά κύτταρα μπορούν να απομονωθούν από δύο περιοχές του ενήλικου εγκεφάλου οι οποίες είναι η υποκοιλιακή ζώνη και η γυροειδής αύλακα που εντοπίζεται στον ιππόκαμπο (έδρα των κέντρων μνήμης). Στη γυροειδή αύλακα και στην οσφρητική ταινία η νευρογένεση διενεργείται με γρήγορο ρυθμό. Επίσης, η απομόνωση των NSCs μπορεί να πραγματοποιηθεί και από εμβρυικούς ιστούς καθώς τα κύτταρα αυτά όταν τοποθετηθούν σε κυτταροκαλλιέργειες σχηματίζουν χαρακτηριστικές σφαιρικές μάζες οι οποίες αποκαλούνται νευρόσφαιρες (neurospheres). Οι νευροσφαίρες μπορούν να καλλιεργηθούν περαιτέρω σε θρεπτικά μέσα παρουσία αυξητικών παραγόντων EGF και FGF-2, οι οποίοι δρουν σαν μιτογόνα υπό *in vivo* και *in vitro* συνθήκες (Γεωργάτος και άλλοι, 2008)

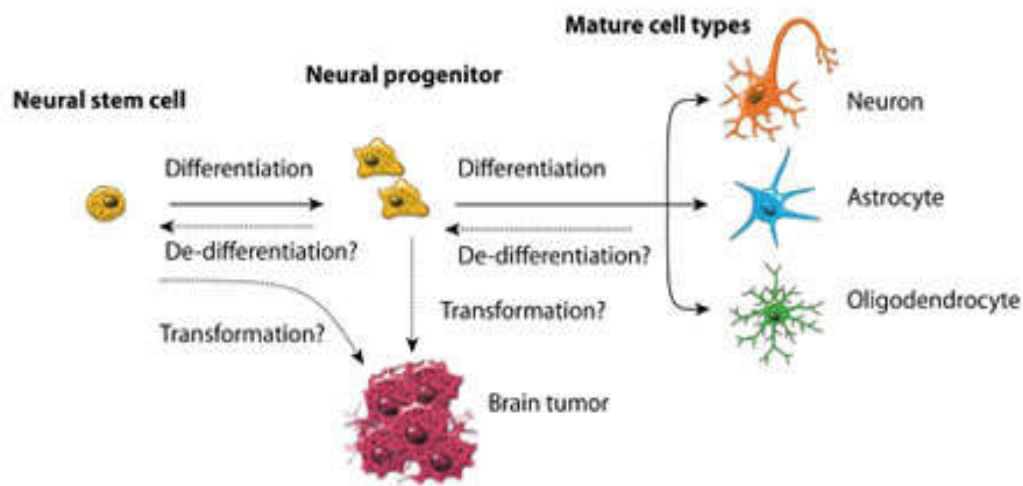
β) Κατηγοριοποίηση των νευρικών βλαστικών κυττάρων

Τα νευρικά βλαστικά κύτταρα διακρίνονται στους παρακάτω κυτταρικούς πληθυσμούς, με τον καθένα να παρουσιάζει κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που τον διαφοροποιούν από τους υπολοίπους (**Εικόνα 20**):

A) Neural Stem Cell (NSCs): Πλειοδύναμα κύτταρα τα οποία είναι ικανά να αυτό-ανανεώνονται και να πολλαπλασιάζονται απεριόριστα έτσι ώστε να παράγουν κύτταρα απογόνους, τα οποία τελικά θα διαφοροποιηθούν σε νευρώνες, αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα. Το μη βλαστικό απογονικό κύτταρο των NSCs αποκαλείται ως νευρικό προγονικό κύτταρο (Lee, et al, 2015).

B) Neural Progenitor Cell: Τα νευρικά προγονικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε περισσότερους από ένα τύπους κυττάρων. Επομένως, τα κύτταρα αυτά μπορεί να είναι μονοδύναμα, ολιγοδύναμα ή πλειοδύναμα. Ένα διακριτό χαρακτηριστικό των κυττάρων αυτών είναι ότι, αντίθετα από ένα βλαστικό κύτταρο, έχουν περιορισμένο δυναμικό πολλαπλασιασμού και δεν διαθέτουν την ιδιότητα της αυτο-ανανέωσης (Lee, et al, 2015).

Γ) Neural Precursor Cells (NPCs): Τα νευρικά πρόδρομα κύτταρα αποτελούν ένα μίγμα πληθυσμού κυττάρων, αποτελούμενο από όλους τους αδιαφοροποίητους απογόνους των νευρικών βλαστικών κυττάρων και επομένως περιλαμβάνει τόσο νευρικά προγονικά κύτταρα όσο και νευρικά βλαστικά κύτταρα. Ο όρος NPCs χρησιμοποιείται κοινώς για να περιγράψουμε συλλογικά το μίγμα πληθυσμών τόσο των NSCs όσο και των νευρικών προγονικών κυττάρων που προέρχονται από ESCs και από iPSCs (Lee, et al, 2015).



Εικόνα 20: Απεικονίζονται η διαδικασία διαφοροποίησης των νευρικών βλαστικών κυττάρων αποδεικνύοντας την νευρική τρι-δυναμία τους σε νευρώνες, αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα αλλά και τα ενδεχόμενα γεγονότα που μπορεί να εμφανιστούν όπως η αποδιαφοροποίηση και ο σχηματισμός όγκου στον εγκέφαλο μετά από εμφύτευση των συγκεκριμένων κυττάρων. (<https://stemcellthailand.org/neural-stem-cells-glial-cells-neurons/>)

γ) Ταυτοποίηση NSCs

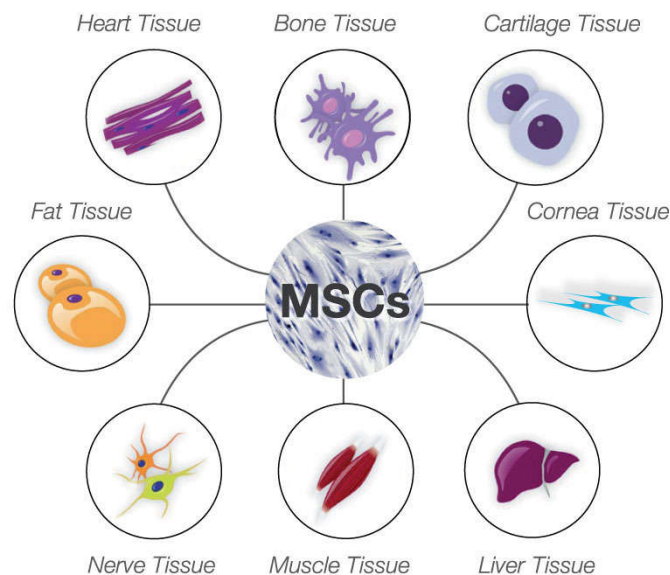
Τα NSCs χαρακτηρίζονται από τους δείκτες nestin⁺, peanut agglutinin – binding glycoprotein^{low} και το heat – stable antigen (CD24). Ακόμη, ανθρώπινα κύτταρα που διαφοροποιούνται προς νευρώνες και αστροκύτταρα εκφράζουν τον χαρακτηριστικό δείκτη CD133 των ανθρώπινων αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων. Ας δούμε αναλυτικότερα τόσο ένα κύριο χαρακτηριστικό δείκτη των NSCs όσο και έναν βασικό μεταγραφικό παράγοντα που καθορίζει και προάγει την νευρωνική διαφοροποίηση:

A) Η **nestin** είναι υπομονάδα των κυτταροπλασματικών ενδιάμεσων ινιδίων που περιλαμβάνουν κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες με ιστική εξειδίκευση. Εκφράζεται παροδικά σε βλαστικά και προγονικά κύτταρα του ΚΝΣ και κατά τη διαφοροποίηση η έκφραση της μειώνεται και αντικαθίσταται από άλλες υπομονάδες των ενδιάμεσων ινιδίων. Επιπλέον, εκφράζεται σε ενδοθηλιακά κύτταρα εγκεφάλου, αστροκύτταρα και σε διάφορες κυτταρικές σειρές προερχόμενες από όγκους του ΚΝΣ (Γεωργάτος και άλλοι, 2008).

B) Ο **μεταγραφικός παράγοντας SOX1** (HMG - high mobility group-box πρωτεΐνη-οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων SOX καθοριστική για την διατήρηση της πολυδυναμίας των βλαστικών κυττάρων) είναι ένας πρώιμος δείκτης σε βλαστικά κύτταρα που ακολουθούν νευρωνική κατεύθυνση και εκφράζεται μόνο στο νευρικό σύστημα και στον φακό του οφθαλμού. Η υπερέκφραση του οδηγεί κύτταρα τερατοκαρκινώματος στη νευρογένεση ενώ η διαφοροποίηση και η απώλεια μιτωτικής δραστηριότητας συνοδεύεται από μείωση του μεταγραφικού παράγοντα στο ΚΝΣ. Εκφράζεται επίσης σε προγονικά και σε πολυδύναμα νευρικά κύτταρα όπου ο Sox1⁺ πληθυσμός αποτελεί υποσύνολο των nestin⁺ κυττάρων, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο SOX1 αποτελεί χαρακτηριστικό των NSCs που επιδεικνύουν περισσότερη εξειδίκευση (Γεωργάτος και άλλοι, 2008).

2.8 Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (Mesenchymal Stem Cells - MSCs)

Τα μη-αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα του στρώματος του μυελού ονομάζονται μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs). Τα **MSCs** μπορούν να απομονωθούν εκτός από τον μυελό των οστών όπου υπάρχουν σε αφθονία, από το περιφερικό αίμα, το αίμα του ομφάλιου λώρου, τον λιπώδη ιστό, το αμνιακό υγρό και τον πλακούντα ενώ έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται προς λιποκύτταρα, οστεοβλάστες, χονδροκύτταρα, μυϊκά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, νευρώνες, ηπατοκύτταρα και β-παγκρεατικά κύτταρα (Fukuchi, et al, 2004, Boyle, et al, 2010, Bhandari, et al, 2011) (Εικόνα 21).



Εικόνα 21: Το δυναμικό διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων. (<http://www.stemcellclinic.com/a-modern-view-on-mesenchymal-stem-cells/?lang=en>)

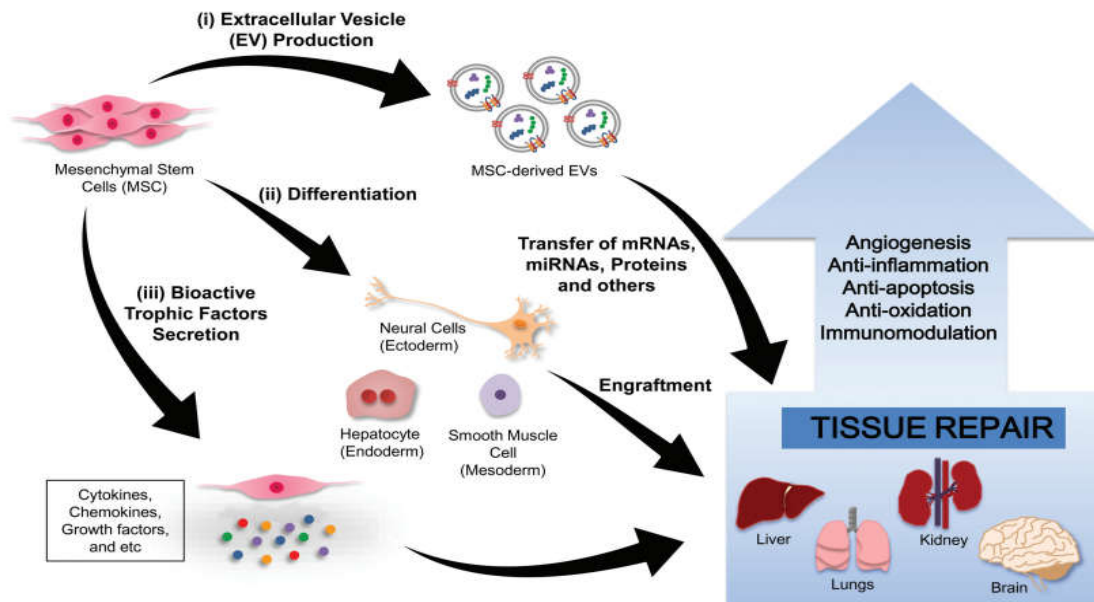
Επίσης, πιστεύεται ότι τα MSCs είναι μη ανοσογονικά ή υπο-ανοσογονικά επειδή δεν εκφράζουν, ούτε μόρια MHC τάξης II ούτε συνδιεγερτικά μόρια, όπως είναι το CD80,CD86,CD40. Η ικανότητα των MSCs να καταστέλλουν την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων, να αποδυναμώνουν την διαφοροποίηση και την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων και να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των B-λεμφοκυττάρων, συνεισφέρει στην ανοσοκατασταλτική τους δράση (Corcione, et al, 2006).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

3.1 ΝΟΣΟΣ ΑΛΤΣΧΑΙΜΕΡ

3.1.1 Θεραπεία μέσω MSCs

Είναι γνωστό ότι τα MSCs με τις χαρακτηριστικές ιδιότητες του δυναμικού διαφοροποίησης τους καθώς και με τις ικανότητες της προσέλκυσης και της μετανάστευσης τους στο επιθυμητό σημείο-στόχο αποτελούν ιδανικούς υποψηφίους για την αξιοποίησή τους στην αναγεννητική ιατρική (Kassem, et al, 2004) (Σχήμα 5). Αυτό το γεγονός βέβαια, συνδυάζεται και με τις ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες που διαθέτουν καθώς έτσι αποφεύγεται η απόρριψη των μεταμοσχευμένων κυττάρων κατά την αποκατάσταση μιας βλάβης ενός ιστού ή ενός οργάνου, πράγμα που θεωρείται ανασταλτικός παράγοντας κατά την διαδικασία της μεταμόσχευσης (Patel, et al, 2008).



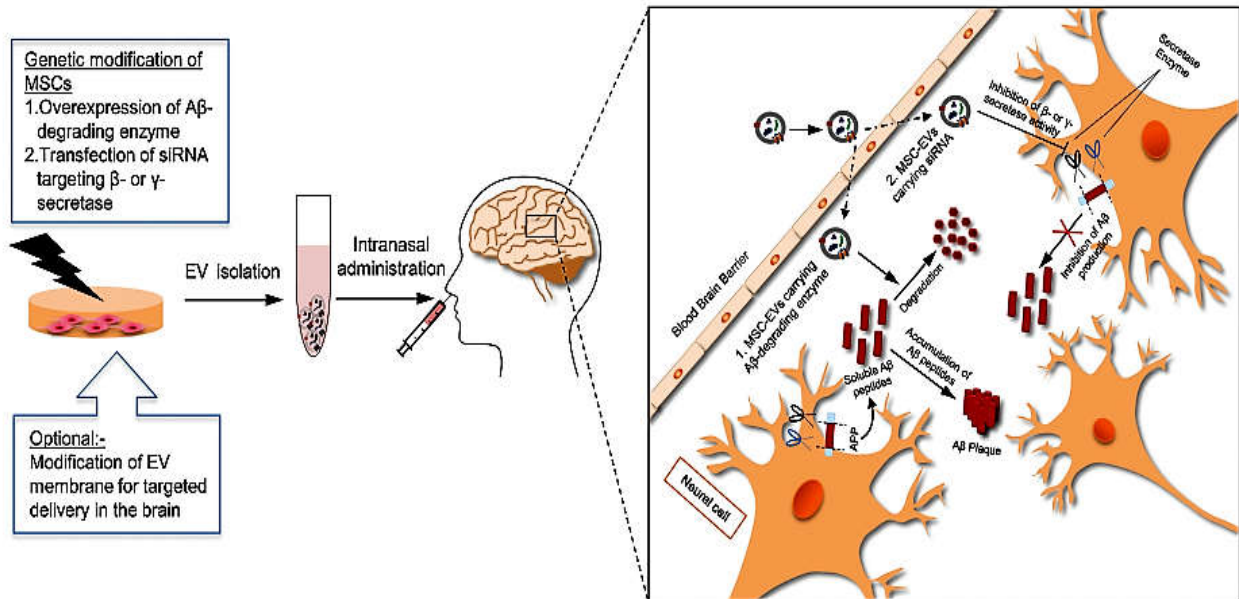
Σχήμα 5: Απεικόνιση των θεραπευτικών στρατηγικών μέσω MSCs που εφαρμόζονται για την επιδιόρθωση ιστών. Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα συμβάλλουν στην αποκατάσταση ενός ιστού μέσω μηχανισμών στους οποίους περιλαμβάνονται i) η μεταφορά θεραπευτικών βιομοριών μέσω των EVs ii) η διαφοροποίηση των MSCs σε πολλαπλούς κυτταρικούς τύπους μετά από μεταμόσχευση στο σημείο του κατεστραμμένου ιστού και iii) η έκκριση βιοενεργών τροφικών παραγόντων οι οποίοι προάγουν την ιστική αποκατάσταση (Liew, et al, 2017).

Πρόσφατα στοιχεία έχουν δείξει ότι το θεραπευτικό δυναμικό των MSCs οφείλεται εν μέρει στην έκκριση από αυτά τα κύτταρα εξωκυτταρικών κυστιδίων (Extracellular Vesicles-EVs) τα οποία διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στην διακυτταρική επικοινωνία (Tetta, et al, 2013). Πιο συγκεκριμένα, τα EVs έχουν μέγεθος της τάξης νάνο (διάμετρος 50-150 nm), εκκρίνονται σε μεγάλη ποσότητα από τα MSCs και το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό τους είναι η ικανότητά τους να μεταφέρουν ένα μεγάλο εύρος βιομορίων μεταξύ των κυττάρων και να ξεπερνούν ταυτόχρονα τους βιολογικούς φραγμούς (π.χ αιματοεγκεφαλικός φραγμός) καθιστώντας τα ιδανικά για την θεραπεία της νόσου Αλτσχάιμερ (Zhuang, et al, 2011).

Η νευροπροστασία των EVs κατά την ΝΑ

Ο νευροπροστατευτικός ρόλος των νευρωνικών EVs κατά τη νόσο Αλτσχάιμερ αποδίδεται στην ικανότητα τους να προσδένονται στα νευροτοξικά Αβ-αμυλοειδή πεπτιδία σχηματίζοντας σύμπλοκα ινιδίων τα οποία διαδοχικά εσωτερικεύονται στα μικρογλοιακά κύτταρα όπου μεταφέρονται στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση. Έτσι, επιτυγχάνεται η άμεση εκκαθάριση των Αβ πεπτιδίων που είναι προσδεδεμένα με τα EVs από την μικρογλοία πριν από τον σχηματισμό των εναποθέσεων αμυλοειδούς (Yuyama, et al, 2012, Yuyama et al, 2014). Επιπλέον, ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίο τα EVs συνεισφέρουν στην θεραπεία της ΝΑ είναι ότι EVs που εκκρίνονται από MSCs-προερχόμενα από τον ανθρώπινο λιπώδη ιστό (ADSCs) μπορεί να είναι εμπλουτισμένα με το αποδομητικό ένζυμο του Αβ-αμυλοειδούς στον εγκέφαλο, την neprilysin (NEP). Η διαπίστωση αυτή έγινε όταν, μετά από συγκαλλιέργεια των ADSCs που έκκριναν EVs - εμπλουτισμένα με NEP, με μια γενετικά τροποποιημένη κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος όπου υπερπαραγόταν η ανθρώπινη Αβ αμυλοειδής πρωτεΐνη (N2a κύτταρα), παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση των ενδοκυτταρικών επιπέδων Αβ στα N2a κύτταρα στα οποία είχαν ενσωματωθεί τα EVs (Katsuda, et al, 2013). Επιπροσθέτως, τα MSCs μπορούν να τροποποιηθούν γενετικά ώστε να παράγουν EVs τα οποία είναι εμπλουτισμένα με θεραπευτικούς παράγοντες, όπως για παράδειγμα μέσω της διαμόλυνσης τους με siRNAs που στοχεύουν στα ένζυμα σεκρετάσες (β- ή γ-σεκρετάσες) με συνέπεια να προκαλείται αναστολή της παραγωγής Αβ αμυλοειδούς, ή μέσω της υπερέκφρασης ενζύμων που αποδομούν το

Αβ-αμυλοειδές πεπτίδιο (Cheng, et al, 2011). Μια πρόσφατη μελέτη που διεξήχθη σε ποντικούς και αξιολογήσε την μεταφορά siRNA μέσω αυτού του συστήματος που στόχευε την β-σεκρετάση (BACE-1), έδειξε ότι μείωση της έκφρασης του γονιδίου BACE-1 οδήγησε με τη σειρά της σε μείωση των Αβ επιπέδων (Alvarez-Erviti, et al, 2011). Μια άλλη μελέτη που διεξήχθη σε διαγονιδιακά ποντίκια που υπερέκφραζαν APP, χρησιμοποίησε αναστολείς της γ-σεκρετάσης και είχε ανάλογα αποτελέσματα με την προαναφερθείσα (Dovey, et al, 2001). Ωστόσο, η εφαρμογή αναστολέων της γ-σεκρετάσης ως θεραπευτική στρατηγική θα πρέπει να είναι αρκετά προσεκτική γιατί το ενζύμο αυτό συμμετέχει και σε άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια (π.χ μονοπάτι Notch) που με τη σειρά τους καθορίζουν την κυτταρική διαφοροποίηση και ανάπτυξη και έτσι θα πρέπει να αποφευχθούν οποιεσδήποτε παρενέργειες (Augelli-Szafran, et al, 2010). Τέλος, η τροποποίηση της μεμβράνης των EV θα οδηγούσε σε μεγάλο βαθμό στην βελτίωση και στην ενίσχυση της πιο στοχευμένης χορήγησης των EVs στον εγκέφαλο μέσω της αύξησης της πρόσδεσης (docking) των EVs σε ειδικούς για τους νευρώνες υποδοχείς ή προσδέτες με ταυτόχρονο περιορισμό των ανεπιθύμητων εκτός στόχου επιδράσεων τους. Έτσι, καθαρισμένα EVs προερχόμενα από MSCs μπορούν να χορηγηθούν στους ασθενείς μέσω της ενδορινικής οδού και να επιδράσουν θεραπευτικά είτε μέσω της αναστολής της παραγωγής των νευροτοξικών Αβ πεπτιδίων είτε μέσω της αποδόμησης των διαλυτών Αβ πεπτιδίων (Liew, et al, 2017) (**Σχήμα 6**).

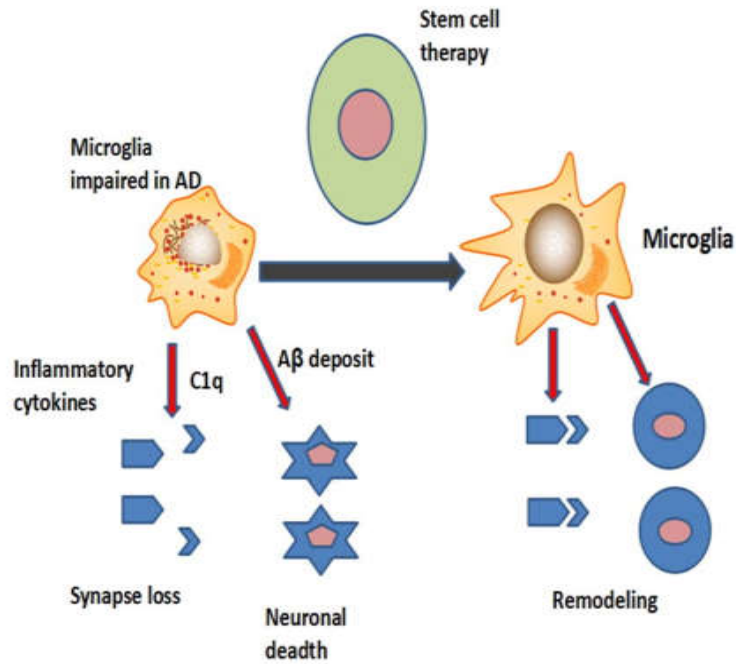


Σχήμα 6: Σχηματική αναπαράσταση της θεραπευτικής στρατηγικής για την νόσο Αλτσχάιμερ που βασίζεται στα εξωκυτταρικά κυστίδια που προέρχονται από τα MSCs (Liew, et al, 2017).

3.1.2 Θεραπεία μέσω στόχευσης κυττάρων μικρογλοίας

Η μικρογλοία αποτελεί τα φυσικά μακροφάγα του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος και υπό φυσιολογικές συνθήκες βρίσκεται σε μια κατάσταση ηρεμίας (resting state) (Davalos et al, 2005). Τα μικρογλοιακά κύτταρα μόλις λάβουν ένα ερέθισμα από το μικροπεριβάλλον τους τότε υφίστανται μορφολογικές αλλαγές και ανταποκρίνονται στην αποκατάσταση της εγκεφαλικής βλάβης. Κατά τη νόσο Αλτσχάιμερ, η ενεργοποίηση της μικρογλοίας είναι μία αναμενόμενη προστατευτική απάντηση του εγκεφάλου έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα βλαβερά ερεθίσματα, όπως του Αβ αμυλοειδούς πεπτιδίου. Ωστόσο, η ανεξέλεγκτη και παρατεταμένη ενεργοποίηση της μικρογλοίας προάγει την σύνθεση διαφόρων βιολογικών μορίων, όπως κυτοκίνες, φλεγμονώδεις ρυθμιστές, αυξητικοί παράγοντες και μόρια κυτταρικής επιφάνειας με συνέπεια ο αυξανόμενος αριθμός των μικρογλοιακών κυττάρων κάτω από προφλεγμονώδεις συνθήκες να είναι επιβλαβής για τον ασθενή και να αυξάνει τον κίνδυνο για εμφάνιση ΝΑ (Bronzuoli, et al, 2016, Joers, et al, 2016). Αυτό το γεγονός οφείλεται στο ότι οι λειτουργίες της μικρογλοίας εξασθενούν κατά τη διάρκεια της νόσου και αποκτιέται ένας «τοξικός» φαινότυπος (υιοθέτηση διαφόρων προφίλ

ανάλογα την φύση των ερεθισμάτων, την ένταση, και τη διάρκεια τους), ο οποίος οδηγεί σε νευρωνική απώλεια μέσω διάφορων μηχανισμών όπως απεικονίζονται παρακάτω (Prokop, et al, 2013) (Σχήμα 7).



Σχήμα 7: Σχηματικό διάγραμμα που απεικονίζει την επίδραση της μικρογλοίας στην παθολογία της νόσου Αλτσχάιμερ. Κατά τη πρόοδο της νευροεκφυλιστικής νόσου, η μικρογλοία σταδιακά καταστρέφεται με συνέπεια η δυσλειτουργία της να οδηγεί στην συσσώρευση του Αβ αμυλοειδούς πεπτιδίου, των φλεγμονωδών κυτοκινών και της C1q, παράγοντες οι οποίοι με τη σειρά τους επάγουν τον νευρωνικό θάνατο και την συναπτική απώλεια. Η μεταμόσχευση των βλαστικών κυττάρων θα μπορούσε να αποκαταστήσει τις λειτουργίες της μικρογλοίας και να οδηγήσει σε νευρωνική αναδιαμόρφωση (Shen, et al, 2017).

Η πιο εντυπωσιακή υπόθεση από τους μηχανισμούς που συσχετίζονται με την ΝΑ είναι ο φαύλος κύκλος μεταξύ του Αβ αμυλοειδούς πεπτιδίου και της μικρογλοιακής δυσλειτουργίας κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής γήρανσης. Αναλυτικότερα, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι από τη μία πλευρά η μικρογλοία φαγοκυτταρώνει τα Αβ αμυλοειδή πεπτίδια και μειώνει την συγκέντρωσή τους στον εγκέφαλο, δρώντας έτσι προστατευτικά, αλλά από την άλλη πλευρά διευκολύνει ταυτόχρονα και την παραγωγή και την συσσώρευση του Αβ αμυλοειδούς λόγω της απελευθέρωσης

προφλεγμονωδών διαμεσολαβητών. Αντίστροφα, οι εναποθέσεις Αβ αμυλοειδούς θα μπορούσαν να προκαλέσουν ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων η οποία θα ήταν ωφέλιμη γιατί θα προωθούσε την απομάκρυνση της Αβ αλλά και επιβλαβής γιατί θα απελευθέρωνε νευροτοξικούς παράγοντες (Chen, et al, 2006.). Έτσι, με την αυξανόμενη συσσώρευση των εναποθέσεων Αβ κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της ΝΑ η μικρογλοία θα καταστεί ανώμαλη επιδεινώνοντας την νευροφλεγμονή. Οπότε, ο επαναπρογραμματισμός της δυσλειτουργικής μικρογλοίας σε υγιείς φαινοτύπους, είναι ένα προτεινόμενος θεραπευτικός στόχος (Mhatre, et al, 2015.) Προς αυτή την κατεύθυνση τα MSCs έχουν αναφερθεί ότι μπορούν να διευκολύνουν την αναγέννηση των νευρώνων μέσω της απελευθέρωσης αυξητικών παραγόντων, αντιαποπτωτικών μορίων και αντιφλεγμονωδών παραγόντων (Zhou, et al, 2009). Πιο συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι τα μεσεγχυματικά κύτταρα που προέρχονται από τον μυελό των οστών (BM-MSCs) μπορούν να μειώσουν στον εγκέφαλο τα επίπεδα Αβ μέσω της ενεργοποίησης της μικρογλοίας σε ποντίκια με ΝΑ. Ακόμη, τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από τον ομφάλιο λώρο (UCB – MSCs) συμβάλλουν στην νευροπροστασία μέσω εμπλοκής τους στην ενεργοποίηση της μικρογλοίας σε μοντέλα με ΝΑ (Lee, et al, 2012). Ανάλογα αποτελέσματα έχουν και τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από την αμνιακή μεμβράνη (AMSCs) (Kim, et al, 2013).

3.1.3 Θεραπεία μέσω iPSCs

Οι περιορισμοί που τίθενται σχετικά με την μελέτη της παθογένειας της νόσου Αλτσχάιμερ είναι αφενός η δυσκολία απόκτησης ζωντανών νευρώνων από ασθενείς, καθώς τα δείγματα προέρχονται από μεταθανάτιους ιστούς, αφετέρου τα συμβατικά πειραματικά μοντέλα δεν είναι επαρκώς κατάλληλα για την αναπαραγωγή των χαρακτηριστικών της ασθένειας στο εργαστήριο. Σε αυτό το πρόβλημα, λύση έρχονται να δώσουν τα μοντέλα της ΝΑ που είναι βασισμένα στα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs), καθιστώντας έτσι εφικτή τόσο την κυτταρική θεραπεία και το disease modeling όσο και την φαρμακολογική μελέτη και επίδραση πάνω σε αυτά (Wan, et al, 2015). Παρακάτω αναφέρονται οι σχετικές μελέτες που διενεργήθηκαν με χρήση iPSCs:

α) Μελέτη επιπέδων Αβ αμυλοειδούς.

Πιο συγκεκριμένα για την μελέτη της παθογένειας της οικογενούς μορφή της ΝΑ (familial AD - FAD), χρησιμοποιήθηκαν νευρώνες προερχόμενοι από iPSCs κύτταρα ασθενών με μεταλλάξεις στην APP, PSEN1 και PSEN2 και αναλύθηκε η παραγωγή των Αβ πεπτιδίων. Διάφορες μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση των Αβ πεπτιδίων, Αβ₃₈, Αβ₄₀, Αβ₄₂, και η αναλογία μεταξύ τους ήταν διαφορετική σε σχέση με iPSCs από υγιείς δότες γεγονός που σημαίνει ότι η ισορροπία παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της ΝΑ. Πράγματι, μερικές μελέτες έδειξαν ότι νευρώνες προερχόμενοι από iPSCs τα οποία προήλθαν από ινοβλάστες ασθενούς με FAD είχαν μια αυξημένη αναλογία Αβ₄₂/Αβ₄₀ η οποία ήταν παρόμοια σε εγκεφάλους ασθενών με ΝΑ (Hu, et al, 2015, Sproul, et al, 2014, Babos, et al, 2015).

β) Επεξεργασία γονιδίων (Gene Editing)

Τα iPSCs με ετερόζυγες ή ομόζυγες μεταλλάξεις στα γονίδια APP και PSEN1, οι οποίες δημιουργούνται μέσω της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 και η διαφοροποίηση τους σε νευρώνες του φλοιού έχουν εμφανίσει τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της ΝΑ (Paquet, et al, 2016).

γ) Τρισδιάστατες κυτταρικές καλλιέργειες (3D Cell Culture)

Μια άλλη στρατηγική στο τομέα του disease modeling θα μπορούσε να αποτελέσει και η 3D κυτταρική καλλιέργεια (τεχνολογία βασισμένη στο Matrigel), η οποία ουσιαστικά παρέχει τρισδιάστατα μοντέλα νευρικών κυτταρικών καλλιεργειών, τα οποία παρουσιάζουν χαρακτηριστικά συσχετιζόμενα με την ΝΑ και τα οποία είναι εμφανή σε μεταθανάτιους ιστούς π.χ. εναποθέσεις Αβ αμυλοειδούς παρόμοιες με τις αμυλοειδείς πλάκες και νευροϊνιδιακά πλέγματα παρόμοια με τα συσσωματώματα της Ταυ πρωτεΐνης. Αυτό το σύστημα τρισδιάστατων νευρικών κυτταρικών καλλιεργειών μπορεί να δημιουργηθεί είτε από νευρώνες προερχόμενοι από iPSCs είτε από γενετικά τροποποιημένες ανθρώπινες βλαστοκυτταρικές σειρές ενώ δεν είναι δυνατόν αυτό το μοτίβο να αναπαραχθεί σε ζωικά μοντέλα, γεγονός που δίνει ακόμα μεγαλύτερη βαρύτητα στην αξιοποίηση των iPSCs (Zhang, et al, 2014).

δ) Δημιουργία χολινεργικών νευρώνων

Σε μία άλλη μελέτη, μετά από ενδο-ιπποκαμπιακή μεταμόσχευση σε διαγονιδιακό μοντέλο ποντικού με ΝΑ, χολινεργικοί νευρωνικοί πρόδρομοι προερχόμενοι από ανθρώπινα iPSCs επιβίωσαν, διαφοροποιήθηκαν σε φαινοτυπικά ώριμους χολινεργικούς νευρώνες και αποκατέστησαν την «διαταραγμένη» χωρική μνήμη (Fujiwara, et al, 2013). Όμως, η χρήση αυτόλογων iPSCs για περιπτώσεις νευρικής αντικατάστασης περιορίζεται καθώς νευρώνες που δημιουργούνται από ασθενείς με ΝΑ παρουσιάζουν μετά από κάποιο χρονικό διάστημα την χαρακτηριστική φαινοτυπική νευροπαθολογία της ΝΑ, συμπεριλαμβανομένων τα ανώμαλα επίπεδα Αβ-αμυλοειδούς, τα αυξημένα επίπεδα φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης Ταυ, το μειωμένο νευριτικό μήκος και διαφοροποιημένη ηλεκτροφυσιολογία (Muratore, et al, 2014).

3.1.4 Θεραπεία μέσω ESCs

Αν και μελέτες συσχετιζόμενες με μεταμόσχευση ESCs έχουν δείξει την ικανότητα αποκατάστασης γνωστικών λειτουργιών κατά τον τραυματισμό εγκεφάλου σε πειραματικά μοντέλα τρωκτικών, η κλινική τους εφαρμογή είναι περιορισμένη. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η πολυδύναμη φύση αυτών των αδιαφοροποίητων κυττάρων παρουσιάζει έναν έμφυτο κίνδυνο για ανεξέλεγκτη κυτταρική αύξηση και σχηματισμό όγκου. Ωστόσο, μια προτεινόμενη λύση στο παραπάνω κίνδυνο είναι να πραγματοποιηθεί *in vitro* προ-διαφοροποίηση των ESCs σε NSCs, δημιουργώντας με αυτό τον τρόπο χολινεργικούς νευρώνες και επάγοντας βελτιώσεις στην επίδοση της μνήμης μετά από μεταμόσχευση των κυττάρων αυτών σε τρωκτικό μοντέλο με NA (Moghadam, et al, 2009). Πρόσφατα, μια μελέτη αναφέρει την σταθερή δημιουργία χολινεργικών νευρωνικών πληθυσμών από ανθρώπινα ESCs τα οποία μετά από μεταμόσχευση είναι ικανά να ενσωματώνονται λειτουργικά στα νευρωνικά κυκλώματα του υπόκαμπου (Bissonnette, et al, 2011). Μια άλλη μελέτη αναφέρει την μετατροπή των ESCs σε προγονικά κύτταρα της μέσης γαγγλιονικής επικράτειας όπου είναι ένας μεταβατικός τύπος βλαστικών κυττάρων στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο. Αφού ακολούθησε μεταμόσχευση τους σε μοντέλο ποντικού με εγκεφαλική βλάβη, αυτά τα κύτταρα ήταν ικανά να ωριμάσουν σε GABAεργικούς και χολινεργικούς νευρωνικούς υποτύπους και να ενσωματωθούν συναπτικά στα νευρωνικά κυκλώματα του ξενιστή, οδηγώντας έτσι σε βελτίωση της χωρικής μνήμης και της ικανότητας μάθησης (Liu, et al, 2013). Όμως, οι ηθικοί και ανοσογόνοι περιορισμοί που προκύπτουν από την χρησιμοποίηση αλλογονικών κυττάρων-δότη, δυσχεραίνουν ακόμα πιο πολύ την θεραπεία μέσω ESCs.

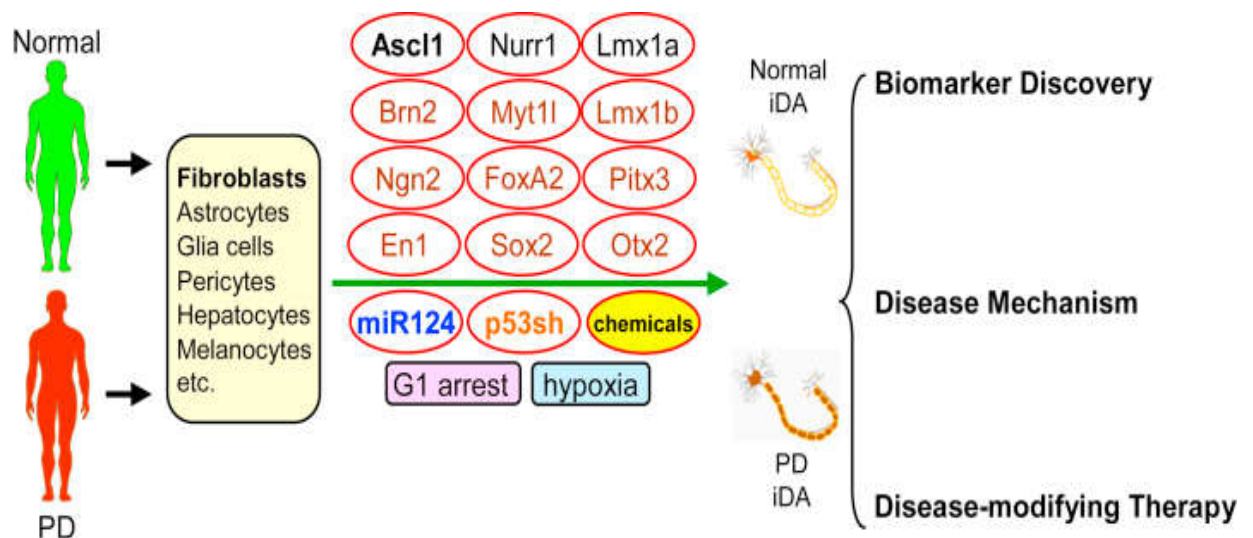
3.1.5 Θεραπεία μέσω NSCs

Η παρακρινής επίδραση των NSCs θα μπορούσε να αποτελέσει ένα θεραπευτικό εργαλείο για την NA καθώς παρέχεται η δυνατότητα έκκρισης σε μεγάλο βαθμό μορίων, όπως ο BDNF και ο NGF, τα οποία ρυθμίζουν την νευροπλαστικότητα και την νευρογένεση. Η αύξηση της διαδικασίας της νευρογένεσης και η αποκατάσταση της γνωστικής λειτουργίας έχει δειχθεί σε μοντέλα τρωκτικών και σε ηλικιωμένους εγκεφάλους πρωτεύοντων (Kordower, et al, 1994, Blurton-Jones, et al, 2009). Επιπλέον, στην περίπτωση χρόνιας φλεγμονής που αποτελεί κύριο στοιχείο της παθογένειας της NA, τα NSCs μπορούν να μειορρυθμίζουν τις προφλεγμονώδεις κυτοκίνες (TNF- α) και να αυξορρυθμίζουν τους αντιφλεγμονώδεις παράγοντες (IL-10) (Kim, et al, 2013). Ακόμη, οι νευρώνες προερχόμενοι από NSCs μπορούν να συνδεθούν συναπτικά με τους ενδογενείς νευρώνες του εγκεφάλου-ξενιστή ενώ η μεταμόσχευση NSCs μπορεί να ενισχύσει την ενδογενή παραγωγή και μεταφορά των νευροτροφικών παραγόντων (Trueman, et al, 2013). Επίσης, μεταμόσχευση ανθρώπινων NSCs που υπερέκφραζαν την ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης σε χολινεργικά νευροτοξικά μοντέλα τρωκτικών είχε σαν αποτέλεσμα της αποκατάστασης της χωρικής μνήμης και των μαθησιακών ελλειμμάτων (Park, et al, 2013). Άλλη μελέτη αναφέρει ότι η μεταμόσχευση NSCs μείωσε την νευροφλεγμονή και εξασθένησε την παρουσία του Α β αμυλοειδούς πεπτιδίου και της πρωτεΐνης Tau που ευθύνονται για την νευροπαθολογία της NA, ενώ προήγαγε την νευρογένεση και την συναπτογένεση (Lilja, et al, 2015, Agger, et al, 2015). Γενικά, αν και αυτοί οι θεραπευτικοί μηχανισμοί δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως, ο αποτελεσματικό τους ρόλος τους αποδίδεται ίσως στην παρακρινή απελευθέρωση τόσο νευροπροστατευτικών όσο και ανοσορρυθμιστικών παραγόντων αλλά και στην άμεση νευρωνική διαφοροποίηση (Blurton-Jones, et al, 2009, Xuan, et al, 2009).

3.2 ΝΟΣΟΣ ΠΑΡΚΙΝΣΟΝ

3.2.1 Θεραπεία μέσω iPSCs

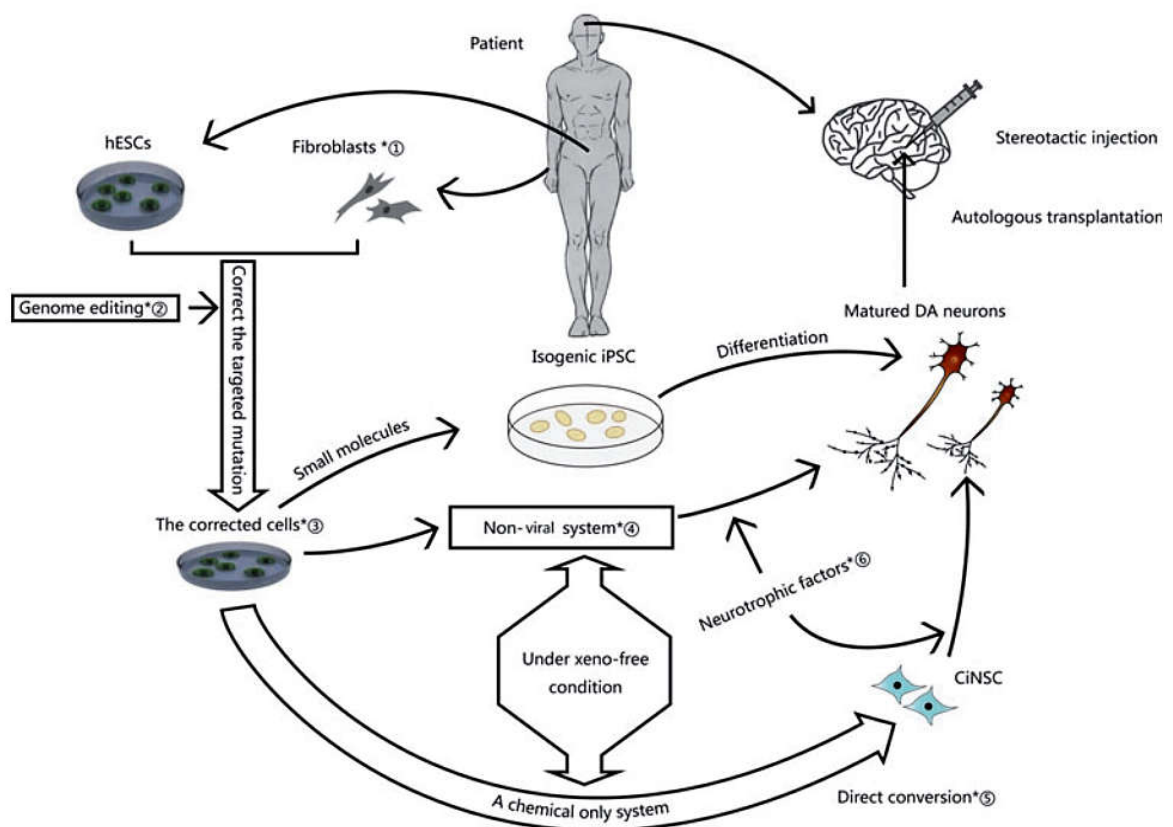
Η ανακάλυψη ότι τα σωματικά κύτταρα μπορούν να προγραμματισθούν σε iPS κύτταρα οδήγησε στον επαναπρογραμματισμό τελικώς διαφοροποιημένων σωματικών κυττάρων μεσοδερμικής, ενδοδερμικής και εξωδερμικής προελεύσεως ανθρώπου και τρωκτικού σε διαφορετικά σωματικά κύτταρα όπως και σε επαγόμενους νευρώνες, iNs (induced Neurons) (Vierbuchen, et al, 2010). Ο επαναπρογραμματισμός των σωματικών κυττάρων μπορεί να πραγματοποιηθεί αξιοποιώντας μεταγραφικούς παράγοντες και microRNAs (**Εικόνα 22**).



Εικόνα 22: Άμεση μετατροπή σωματικών κυττάρων, ειδικών του ασθενούς, σε επαγόμενους ντοπαμινεργικούς νευρώνες για την θεραπεία της νόσου Πάρκινσον (Xu, et al, 2017).

Αναλυτικότερα, ένας καινοτόμος μεταγραφικός παράγοντας, Ascl1 προωθεί την επιγενετική μετατροπή, η οποία ακολουθεί ντοπαμινεργική κατεύθυνση από μεταγραφικούς παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την εξειδικευμένη διαφοροποίηση σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες, όπως οι Nurr1 και Lmx1a. Τα microRNAs όπως το miR124, μπορούν να επαναπρογραμματίσουν τους ινοβλάστες σε νευρώνες απουσία του Ascl1. Η μετατροπή ενισχύεται από την αποσιώπηση του γονιδίου p53, από χημικά μόρια που ενεργοποιούν κατάλληλα σηματοδοτικά

μονοπάτια, την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην G1 και την υποξία. Οι επαγόμενοι ντοπαμινεργικοί νευρώνες από ασθενείς με ΝΠ και από φυσιολογικά άτομα δημιουργούν λειτουργικούς μεσεγκεφαλικούς ντοπαμινεργικούς νευρώνες οι οποίοι με τη σειρά τους είναι χρήσιμοι για την ανακάλυψη βιοδεικτών, την διεξαγωγή μηχανιστικών μελετών καθώς και την εφαρμογή για τροποποιητική της νόσου θεραπεία (Disease-modifying Therapy) (Xu, et al, 2017). Πέρα της διαδικασίας του επαναπρογραμματισμού, το ολοκληρωμένο μοντέλο θεραπείας κατά τη ΝΠ αναλύεται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 8):



Σχήμα 8: Αναπαράσταση των βημάτων που απαιτούνται για την αυτόλογη μεταμόσχευση των επαγόμενων ντοπαμινεργικών νευρώνων (iDAN) με διόρθωση στοχευμένης μετάλλαξης και χωρίς ενσωμάτωση εξωγενούς γονιδίου (Xeno-gene) (Zhang et al, 2017).

Κατά τη έναρξη αυτής της διαδικασίας, απαιτείται ένα σύστημα τροφοδοσίας αυτόλογων ισογονικών κυττάρων που προέρχονται κυρίως από σωματικά κύτταρα – ινοβλάστες, ειδικοί του ασθενούς- μέσω iPSCs (1) ή άμεσης μετατροπής (5) (Liu, et al, 2012). Ωστόσο, τα μετεμφυτευμένα κύτταρα τα οποία προέρχονται από τα hESCs και ADSCs είναι συνήθως αλλογονικά. Έτσι, αν ήταν δυνατή η κατασκευή μιας ειδικής ανθρώπινης εμβρυονικής βλαστοκυτταρικής σειράς για κάθε άτομο, η αυτόλογη κυτταρική θεραπεία θα ήταν περισσότερο προσιτή. Στη συνέχεια, θα πρέπει να γίνει επιδιόρθωση των κυττάρων (3) με στοχευμένη μετάλλαξη αξιοποιώντας τεχνικές γονιδιακής αποτύπωσης (2) (gDAN-NaAgo, CRISPR/Cas9). Επίσης, οι επαγόμενοι ντοπαμινεργικοί νευρώνες θα πρέπει να αναγεννηθούν κάτω από συνθήκες χωρίς την παρουσία εξωγενών παραγόντων (μη ιικά συστήματα μεταφοράς) (4). Αυτό θα οδηγήσει στη δημιουργία ciDAn (chemical iDAn) με την χρήση μικρών χημικών μορίων (A-83-01, thiazonivin, purmorphamine, και VPA) και νευροτροφικών παραγόντων (SHH, FGF8, GDNF, BDNF, TGF-3b, and RA) (6). Τέλος, μια ακριβής στερεοτακτική χειρουργική επέμβαση μεταμόσχευσης απαιτείται για να ολοκληρωθεί επιτυχώς η παραπάνω διαδικασία (Zhang, et, al, 2017). Η τεχνολογία βασιζόμενη στα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα επιτρέπει την παραγωγή αυτόλογων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων αποφεύγοντας με αυτό τον τρόπο τόσο τους ηθικούς περιορισμούς όσο και την ανοσολογική απόρριψη που προκύπτει από πηγές μη ασθενών. Μακροπρόθεσμη επιβίωση και αποτελεσματικότητα της ντοπαμινεργικής νευρωνικής μετεμφύτευσης προερχόμενη από αυτόλογα iPSCs έχει δείχθει σε πιθήκο με νόσο του Πάρκινσον με συνέπεια την βελτιωμένη κινητική του δραστηριότητα και λειτουργία και την εκτεταμένη κυτταρική επιβίωση στα 2 χρόνια μετά από χειρουργική επέμβαση (Hallett, et al, 2015). Μια άλλη πρόσφατη μελέτη έχει δείξει για πρώτη φορά ότι προγονικά ντοπαμινεργικά κύτταρα προερχόμενα από ανθρώπινα iPS κύτταρα που μεταμοσχεύθηκαν σε πρωτεύον μοντέλο (*Macaca fascicularis*) με νόσο του Πάρκινσον (χορήγηση MPTP), επιβίωσαν και δημιούργησαν λειτουργικούς μεσεγκεφαλικούς ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας ύστερα από βιντεοσκοπική παρακολούθηση και ιστολογικών μελετών ήταν η αύξηση της αυθόρμητης κίνησης των πιθήκων μετά την μετεμφύτευση των iPS κυττάρων

καθώς και η επέκταση πυκνών νευριτών στο ραβδωτό σώμα του ξενιστή από τους ώριμους ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Το αξιοσημείωτο στην περίπτωση αυτή είναι ότι το αποτέλεσμα ήταν το ίδιο είτε τα κύτταρα προέρχονταν από ασθενείς με Πάρκινσον είτε από υγιή άτομα. ενώ διαπιστώθηκε και ο μη σχηματισμός όγκου στον εγκέφαλο του ξενιστή για τουλάχιστον 2 χρόνια. Όλα τα παραπάνω σε συνδυασμό ότι οι νευρώνες που προέρχονται από iPSCs έχει αποδειχθεί ότι είναι δομικά και λειτουργικά ώριμοι και ικανοί να σχηματίσουν ηλεκτροφυσιολογικά ενεργά συναπτικά δίκτυα καθιστούν εφικτό το γεγονός για κλινική και κατ'επέκταση θεραπευτική εφαρμογή των προγονικών ντοπαμινεργικών κυττάρων προερχομένων από ανθρώπινα iPS κύτταρα σε ασθενείς με νόσο του Πάρκινσον (Kikuchi, et al, 2017).

3.2.2 Θεραπεία μέσω NSCs

Οι κλινικές μελέτες για την κυτταρική θεραπεία της νόσου του Πάρκινσον έχουν απασχολήσει την επιστημονική κοινότητα και το γενικό πληθυσμό εδώ και πάνω από 3 δεκαετίες. Οι πρώτες προσπάθειες αντικατάστασης ντοπαμινεργικών κυττάρων πραγματοποιήθηκαν το 1980 όταν εμβρυικά ντοπαμινεργικά κύτταρα μετεμφυτεύθηκαν για πρώτη φορά σε ασθενείς με ΝΠ και τα αποτελέσματα έδειξαν όχι μόνο την επιβίωση των μεταμοσχευμένων κυττάρων αλλά και την επανενσωμάτωσή τους με τα κύτταρα του ξενιστή (Kordower, et al, 1995). Ωστόσο, ένα μικρό ποσοστό ασθενών παρουσίασε κάποιες αμφιλεγόμενες παρενέργειες (επιδείνωση της δυσκινησίας), γεγονός που καθιστά απαραίτητη την βελτιστοποίηση της κυτταρικής θεραπείας όσον αφορά την αποτελεσματικότητά της και την ασφάλειά της. Σε μία μελέτη, ανθρώπινα μοσχεύματα εμβρυονικών ντοπαμινικών νευρώνων επιβίωσαν σε ασθενείς με σοβαρή μορφή νόσου του Πάρκινσον και είχαν κάποια κλινικά ωφέλη στους νεότερους ασθενείς αλλά όχι στους πιο ηλικιωμένους (Freed, et al, 2001). Μέχρι σήμερα οι κλινικές μελέτες επικεντρώνονται στην αποκατάσταση του μέλανος ραβδωτού ντοπαμινεργικού μονοπατιού μετά από την κυτταρική μεταμόσχευση.

Μία σύγχρονη μελέτη βασίστηκε στην ωφέλιμη θεραπευτική επίδραση των ανθρώπινων νευρικών βλαστικών κυττάρων (hNSCs) σε ζωικό μοντέλο με ΝΠ (Zuo, et al, 2017). Πιο αναλυτικά, οι επιστήμονες αξιοποιώντας τις πηγές των νευρικών βλαστικών κυττάρων (Υποκοιλιακή ζώνη – SVZ και SGZ – Subgranular Zone στον ιππόκαμπο) και αναγνωρίζοντας ότι η SVZ μπορεί να ενεργοποιήσει έναν ενδογενή μηχανισμό αποκατάστασης μετά από τραυματισμό, υπέδειξαν τον κύριο ρόλο της SVZ στην λειτουργική επαναφορά ενήλικων ποντικών (βελτίωση κίνησης και συμπεριφοράς) που στερούνταν ντοπαμίνη και τα οποία έλαβαν μοσχεύματα hNSC. Τα αποτελέσματα πρότειναν ότι τα hNSCs από μόνα τους δεν ευθύνονται άμεσα για τις λειτουργικές βελτιώσεις των παρκινσονικών ποντικών, αλλά δρουν έμμεσα με το να διεγείρουν την νευρογενή SVZ (όπως και τα παρακείμενα βλαστικά κύτταρα μέσα στο θώκο), με συνέπεια η υποκοιλιακή ζώνη με τη σειρά της να πυροδοτεί εγκεφαλικές αναγεννητικές διαδικασίες οι οποίες περιλαμβάνουν την έκκριση ειδικών επανορθωτικών αυξητικών παραγόντων και αντι-φλεγμονωδών κυτοκινών. Συνολικά, η αλληλεπίδραση των hNSCs με την SVZ θα μπορούσε να αποτελέσει μια θεραπευτική στρατηγική για τη νόσο του Πάρκινσον. Από την έρευνα αυτή έγινε φανερό ότι μη αδιαφοροποίητα, αρχέγονα, μη χειριζόμενα προς μια συγκεκριμένη κατεύθυνση διαφοροποίησης και μη ντοπαμινεργικά hNSC κύτταρα μπορούν να επιτρέπουν ισοδύναμα την λειτουργική επαναφορά της ΝΠ με τα κύτταρα που διαφοροποιούνται σε ντοπαμινεργικά, παρακάμπτοντας το βήμα διαφοροποίησης. Επίσης, καθώς παρατηρήθηκε στα πειραματικά μοντέλα βελτίωση της γνωστικής τους επίδοση η οποία συνδέεται με τον ιππόκαμπο, προτάθηκε η υπόθεση ότι η διάδοση της νευροεκφύλισης πέρα από το ντοπαμινεργικό μονοπάτι, όπως στον ιππόκαμπο, ίσως να ανοίγει νέους δρόμους για την παθολογία της ΝΠ και την θεραπεία της μέσω της SGZ (μελέτη της αλληλεπίδρασης της SGZ με την ενδογενή μοίρα των βλαστικών κυττάρων, με την έκκριση νευροτροφικών παραγόντων και με το προφίλ των κυτοκινών) (Yasuhara, et al, 2006).

Τέλος, αναδείχθηκε και το δυναμικό μιας κυτταρικής «βιογέφυρας» η οποία ουσιαστικά είναι ένα εξωκυττάριο πλέγμα που σχηματίζεται από τα μεταμοσχευμένα κύτταρα και μέσω αυτού μπορούν να μεταφέρονται τα ενδογενή βλαστικά κύτταρα από την υποκοιλιακή ζώνη στις τραυματισμένες περιοχές μακριά από την νευρογενή

περιοχή (Tajiri, et al, 2013). Γενικά, η κατανόηση του πρωτεωμικού προφίλ των βλαστικών κυττάρων και των εξωσωμάτων και η επακόλουθη διαχείριση του πρωτεώματος, των αυξητικών παραγόντων και των αντιφλεγμονωδών κυτοκινών μέσω αποσιώπησης RNA ή μέσω ιικών φορέων, θα συνέβαλλαν θεραπευτικά στη ΝΠ (Naroli et Borlongan, 2017).

Μια επιπρόσθετη πρόσφατη θεραπευτική στρατηγική έδειξε ότι η απευθείας μετατροπή ινοβλαστών ποντικού σε επαγόμενα νευρικά βλαστικά κύτταρα (iNSCs) και η μετέπειτα μεταμόσχευσή τους στο ραβδωτό σώμα ενίσχυσε την λειτουργική αποκατάσταση σε μοντέλο ποντικού με ΝΠ (ένεση με 6-υδροξυντοπαμίνη, 6-OHDA) (Choi, et al, 2017). Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι τα μεταμοσχευμένα iNSCs επιβίωσαν στο ραβδωτό σώμα και ακολούθησαν διάφορες νευρωνικές κατευθύνσεις. Πιο συγκεκριμένα, τα μεταμοσχευμένα iNSCs που διαφοροποιήθηκαν σε κύτταρα γλοίας αυξήθηκαν σημαντικά στο ραβδωτό σώμα του ποντικού ενώ τα iNSCs που είχαν διαφοροποιηθεί σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες μετακινήθηκαν στην μέλαινα ουσία. Έτσι, τα απευθείας μετατρεπόμενα iNSCs ομοιάζαν αρκετά τα αντίστοιχα in vivo στο πλαίσιο του προτύπου γονιδιακής έκφρασης, της επιγενετικής κατάστασης και του δυναμικού διαφοροποίησης τόσο in vitro όσο και in vivo (Thier, et al, 2012).

3.2.3 Θεραπεία μέσω αστροκυττάρων

Μια άλλη θεραπευτική προσέγγιση για την ΝΠ είναι η αναγέννηση νευρώνων ντοπαμίνης από άμεση μετατροπή των αστροκυττάρων. Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει τον επαναπρογραμματισμό και την διαφοροποίηση ανθρώπινων αστροκυττάρων in vitro και αστροκυττάρων ποντικού in vivo σε επαγόμενους νευρώνες ντοπαμίνης (iDANs – induced dopamine neurons) μέσω της χρήσης μεταγραφικών παραγόντων (NEUROD1, ASCL1 and LMX1A) και microRNAs (NeAL218). Η αποτελεσματικότητα του επαναπρογραμματισμού in vitro βελτιώθηκε από μικρά μόρια τα οποία προώθησαν την αναδιαμόρφωση χρωματίνης και ενεργοποίησαν σηματοδοτικά μονοπάτια όπως του TGF, Shh και Wnt. Τα ανθρώπινα αστροκύτταρα επαναπρογραμματίστηκαν σε iDANs in vitro σε ποσοστό πάνω από 16 % ενώ στο μοντέλο ποντικού με ΝΠ το NeAL218 από μόνο του επαναπρογράμματα

ενήλικα ραβδωτά αστροκύτταρα σε iDANS (in vivo) οι οποίοι με τη σειρά τους διόρθωσαν την κινητική συμπεριφορά in vivo (π.χ. βελτίωση στο βάδισμα) (Rivetti di Val Cervo, et al, 2017)

3.2.4 Εκτίμηση αποτελεσματικότητας μοσχευμάτων από hESCs.

Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις που βασίζονται στην μεταμόσχευση ανώριμων προγονικών βλαστικών κυττάρων που επακόλουθα υφίστανται φαινοτυπική και λειτουργική ωρίμανση in vivo (όπως προαναφέρθηκαν), έρχονται αντιμέτωπες με την πρόκληση κατά πόσο μακροπρόθεσμα θα είναι η αποτελεσματικότητα του μοσχεύματος. Μια μελέτη πάνω στην βελτιστοποίηση αυτής της διαδικασίας, ταυτοποίησε προγνωστικούς δείκτες που εκφράζονται σε προγονικούς νευρώνες ντοπαμίνης και συσχετίζονται με την αποδοτικότητα του μοσχεύματος σε αρουραίο με ΝΠ μέσω ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης περισσότερων από 30 παρτίδες μεταμοσχευμένων προγονικών κυττάρων που προέρχονταν από hESC. Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας έδειξαν ότι πολλοί κοινοί δείκτες δεν προέβλεπαν ακριβώς την in vivo ειδική ωρίμανση του νευρικού υπότυπου ενώ ένα ειδικό σειτ δεικτών του ουραίου μεσεγκεφάλου συνδέθηκε με την υψηλή απόδοση ντοπαμινεργικής παραγωγής μετά την μεταμόσχευση in vivo. Έτσι, αξιοποιώντας αυτούς τους δείκτες είναι δυνατή η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου διαφοροποίησης (GMP-Good Manufacturing Practice) το οποίο θα οδηγήσει σε υψηλά αποτελεσματική παραγωγή μεταμοσχεύσιμων ντοπαμινεργικών προγόνων από hESCs αλλά και θα μπορεί να προβλέπει την in vivo επίδοση των προϊόντων των βλαστικών κυττάρων σε προγονικό στάδιο in vitro, μειώνοντας με αυτό τον τρόπο τις in vivo μελέτες που θα διεξάγονταν κατά τη αναπτυξιακή διαδικασία των βλαστοκυττάρων αλλά και προάγοντας την εξατομικευμένη ιατρική (Kikerby, et al, 2017).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Πολλές προσπάθειες έχουν πραγματοποιηθεί για την αποκατάσταση της εγκεφαλικής λειτουργίας κατά τις νόσους Αλτσχάιμερ και Πάρκινσον. Μελέτες που έχουν διεξαχθεί για την NA σε C57BL/6 και APP/PS1 διαγονιδιακούς ποντικούς έχουν δείξει ότι μεταμόσχευση μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων που προέρχονταν από τον μυελό των οστών οδήγησε σε μείωση της εναπόθεσης του Αβ-αμυλοειδούς πεπτιδίου και ενεργοποίηση της μικρογλοίας (Xuan, et al, 2008). Επίσης, άλλες έρευνες έχουν δείξει το δυναμικό διαφοροποίησης των μεταμοσχευμένων NSCs σε χολινεργικούς νευρώνες και την ικανότητα τους να επιβιώνουν και να μεταναστεύουν στο τραυματισμένο ιππόκαμπο με αποτέλεσμα να βελτιώνουν την δυσλειτουργία της μνήμης (Yamasaki, et al, 2007, Xuan, et al, 2009). Αντίστοιχες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί και για την νόσο του Πάρκινσον. Πιο συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι μοσχεύματα ντοπαμινεργικών νευρώνων μπορούν να επιβιώσουν, να λειτουργήσουν και να επαναφέρουν την απελευθέρωση ντοπαμίνης στο κέλυφος των ασθενών ακόμα και μετά από χρονικό διάστημα μιας δεκαετίας αλλά και να παρέχουν μιας μακράς διάρκειας αποκατάσταση των κινητικών λειτουργιών τους σε τέτοιο βαθμό που οι ασθενείς θα μπορούσαν ακόμα και να σταματήσουν την ντοπαμινεργική φαρμακευτική αγωγή (Piccini, et al, 1999, Kefalopoulou, et al, 2014).

Αναγνωρίζοντας και κατανοώντας το ευρύ φάσμα των θεραπευτικών δυνατοτήτων που παρέχονται από την τεχνολογία των βλαστικών κυττάρων, σε αυτή την ανασκόπηση επικεντρωθήκαμε στις πιθανές θεραπευτικές προσεγγίσεις που μπορούν να εφαρμοστούν για την αντιμετώπιση των νευροεκφυλιστικών ασθενειών, της νόσου Αλτσχάιμερ και της νόσου Πάρκινσον. Ξεκινώντας με την νόσο Αλτσχάιμερ αναφέραμε θεραπευτικές στρατηγικές βασιζόμενες στα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα σε συνδυασμό με τα εξωκυτταρικά κυστίδια (EVs), στα μικρογλοιακά κύτταρα, στα iPSCs, στα ESCs και στα NSCs. Ακολούθως, αναφέραμε θεραπευτικές μεθόδους βάση των iPSCs, ESCs, NSCs και των αστροκυττάρων για την νόσο του Πάρκινσον. Λαμβάνοντας υπόψιν όλα τα παραπάνω, είναι αποδεκτό το γεγονός ότι οι προκλινικές μελέτες με βλαστικά κύτταρα που διεξάγονται σε διαγονιδιακά μοντέλα (τροφκτικά και πρωτεύοντα) δίνουν την δυνατότητα για μελλοντικές εφαρμογές

θεραπευτικών προσεγγίσεων ακόμα και σε ανθρώπινο επίπεδο. Τα πλεονεκτήματα της κυτταρική θεραπείας με βάση τα βλαστοκύτταρα είναι ότι έχουμε πρόσβαση σε μεγάλο αριθμό κυττάρων και η κυτταρική πηγή για πρώτη φορά είναι απόλυτα χαρακτηρισμένη όσον αφορά την βιωσιμότητα, την σύσταση, και την δραστικότητα της, με συνέπεια να παρέχονται μοσχεύματα τα οποία είναι πανομοιότυπα από ασθενή σε ασθενή. Ωστόσο, υπάρχει ακόμα ένα σημαντικό χάσμα μεταξύ των εφαρμογών των θεραπευτικών στρατηγικών στα πειραματικά μοντέλα και στον ανθρώπινο οργανισμό. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι τα αποτελέσματα των μελετών είναι μοντελο-εξαρτώμενα και τα κλινικά και νευροεκφυλιστικά χαρακτηριστικά ανάμεσα στα δύο είδη διαφέρουν με συνέπεια οι περισσότερες κλινικές δοκιμές στον άνθρωπο να έχουν αποτύχει. Οπότε, θα ήταν χρήσιμο οι κυτταρικές θεραπείες να πραγματοποιούνται σε υψηλότερης τάξης ζώα των οποίων η νευροεκφυλιστική παθολογία θα μιμείται τις ανθρώπινες συνθήκες. Επίσης, βασικά ζητήματα που πρέπει να απαντηθούν είναι σχετικά με την μακράς διάρκειας επιβίωσης και ασφάλειας των βλαστοκυττάρων, την κατάλληλη κυτταρική πηγή, το σύστημα χορήγησης τους καθώς και με την κατανόηση της ανταπόκρισης του κύτταρου-δότη σε περιβάλλον της ΝΑ και ΝΠ και την εξακρίβωση των μηχανισμών της δράσης του. Εξαιτίας της πολυπλοκότητας της παθοφυσιολογίας των 2 νόσων ίσως θα απαιτούνταν μία πολύτροπη θεραπευτική προσέγγιση μέσω της οποίας θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί φαρμακολογική στόχευση της παθολογίας τους με ταυτόχρονη διέγερση της ενδογενούς νευρογένεσης και συναπτογένεσης καθώς και της εξωγενούς νευρικής αντικατάστασης. Επιπρόθετες προκλήσεις που θα πρέπει να αντιμετωπιστούν ώστε να γίνει ακόμα πιο αποτελεσματική η θεραπεία είναι ότι κατά την δημιουργία νευρώνων που προορίζονται για μεταμόσχευση, θα πρέπει να διορθωθούν στα κύτταρα-δότες οι γενετικές βλάβες που δημιουργούν τα βιοχημικά συμπτώματα των 2 ασθενειών μέσω τεχνικών γονιδιακής αποσιώπησης (Yagi, et al, 2011). Η επιγενετική μνήμη των βλαστοκυττάρων έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει την γονιδιακή έκφραση και την κυτταρική σταθερότητα ακολούθως μετά από τον επαναπρογραμματισμό και την μεταμόσχευση. Γι'αυτό το λόγο αρχίζουν και αυξάνονται οι έρευνες που επικεντρώνονται σε γονιδιωματικούς χάρτες αναφοράς πάνω σε επιγενετικούς μηχανισμούς (Bock, et al, 2011). Τέλος, άλλα ζητήματα που

έχουν προκύψει από την χρήση των βλαστοκυττάρων είναι ηθικά θέματα, η ογκογένεση, η ανοσολογική απόκριση και η τοξικότητα τους. Έτσι, ο περιορισμός των δυσχερειών αυτών στο μέλλον θα αποτελέσει την προϋπόθεση για το άνοιγμα νέων δρόμων διαχείρισης και προηγμένης εξέλιξης στις θεραπευτικές μεθόδους αυτών των νευροεκφυλιστικών παθήσεων δίνοντας την ελπίδα για την ολιστική αντιμετώπισή τους.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Ager, R.R., Davis, J.L., Agazaryan, A., Benavente, F., Poon, W.W., LaFerla, F.M., Blurton-Jones, M. (2015) Human neural stem cells improve cognition and promote synaptic growth in two complementary transgenic models of Alzheimer's disease and neuronal loss. *Hippocampus*. 25:813–26.
2. Agorogiannis, E.I, Agorogiannis, G.I, Papadimitriou, A., Hadjigeorgiyo, G.M. (2006) Genetic and molecular pathogenesis of Parkinson's disease, *Archives of Hellenic Medicine* 23(5):435-443.
3. Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhali, S., Wood, M.J. (2011) Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat. Biotechnol.* 29: 341.
4. Arber, C., Lovejoy, C., Wray, S. (2017) Stem cell models of Alzheimer's disease: progress and challenges. *Alzheimer's Research & Therapy*. 9:42.
5. Augelli-Szafran, C.E., Wei, H.X., Lu, D. et al. (2010) Discovery of notch-sparing gamma-secretase inhibitors. *Curr. Alzheimer Res.* 7:207.
6. Babos, K., Ichida, J.K. (2015) Small molecules take a big step by converting fibroblasts into neurons. *Cell Stem Cell* 17(2): 127-129.
7. Bhandari, D.R., Seo, K.W., Sun, B., et al. (2011) The simplest method for in vitro β -cell production from human adult stem cells. *Differentiation* 82:144.
8. Bissonnette, C.J., Lyass, L., Bhattacharyya, B.J., Belmadani, A., Miller, R.J., Kessler, J.A., (2011) The controlled generation of functional basal forebrain cholinergic neurons from human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 29:802–11.
9. Bock, C., Kiskinis, E., Verstappen, G., Gu, H., Boulting, G., Smith, Z.D., et al. (2011) Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell*. 144:439–452.
10. Boyle, A.J., McNiece, I.K. and Hare, J. M. (2010) Mesenchymal stem cell therapy for cardiac repair. *Methods Mol. Biol.* 660:65.
11. Blurton-Jones, M., Kitazawa, M., Martinez-Coria, H., Castello, N.A., Müller F.J., Loring, J.F., Yamasaki, T.R., Poon, W.W., Green, K.N., LaFerla, F.M. (2009) Neural stem cells improve cognition via BDNF in a transgenic model of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci*. 106:13594–9.
12. Bronzuoli, M.R., Iacomino, A., Steardo, L., Scuderi, C. (2016) Targeting neuroinflammation in Alzheimer's disease. *J Inflamm Res* 9:199–208.
13. Cheng, Y., Judd, T.C., Bartberger, M.D. et al. (2011) From fragment screening to in vivo efficacy: optimization of a series of 2-aminoquinolines as potent inhibitors of
ΠΜΣ «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες (BBE)»

- beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE1). *J. Med. Chem.*54:5836.
14. Chen, K., Iribarren, P., Hu, J., Chen, J., Gong, W., Cho, E. H., Lockett, S., Dunlop N.M., Wang, J.M. (2006) Activation of Toll-like receptor 2 on microglia promotes cell uptake of Alzheimer disease-associated amyloid beta peptide. *Journal of Biological Chemistry* 281: 3651–3659.
15. Choi, D.H., Kim, J.H., Kim, S.M., Kang, K., Han, D.W., Lee, J. (2017) Therapeutic Potential of Induced Neural Stem Cells for Parkinson’s Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 18(1):224.
16. Cole, S.L., Vassar, R. (2007) The Alzheimer’s disease beta-secretase enzyme, BACE1. *Mol. Neurodegener.* 2:22.
17. Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., et al. (2006) Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 107:367.
18. Costantini, L.C., Barr, L.J., Vogel, J.L., Henderson, S.T. (2008) Hypometabolism as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *BMC Neurosci.* 9 (Suppl 2): S16-10.1186/1471-2202-9-S2-S16.
19. Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J., V., Zuo, Y., Jung, S., Littman D.R., Dustin, M.L., Gan, W., B. (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience* 8:752–758.
20. Davidson, K.C., Mason, E.A., Pera, M.F. (2015) The pluripotent state in mouse and human, *Development* 142: 3090-3099.
21. Dovey, H., F., John, V., Anderson, J., P., et al. (2001) Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *J. Neurochem.* 76:173.
22. Duthey, B. (2013) Background Paper 6.11 Alzheimer Disease and other Dementia. A Public Health Approach to Innovation. Update on 2004 Background Paper. pp. 6-8.
23. Fairbairn, N.G., Meppelink A.M., Joanna Ng-Glazier, Randolph M.A., Winograd J.M. (2015) Augmenting peripheral nerve regeneration using stem cells: A review of current opinion. *World J Stem Cells.* 7(1): 11-26.
24. Freed, C.R., Greene, P.E., Breeze, R.E., Tsai W.Y., DuMouchel W., Kao R., Dillon, S. Winfield, H., Culver, S., Trojanowski, J.Q., Eidelberg, D., Fahn S. (2001) Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson’s disease. *N Engl J Med* 344:710–719.
25. Fujiwara, N., Shimizu, J., Takai, K., Arimitsu, N., Saito, A., Kono, T., Umehara, T., Ueda, Y., Wakisaka, S., Suzuki, T. (2013) Restoration of spatial memory dysfunction of human APP transgenic mice by transplantation of neuronal precursors derived from human iPS cells. *Neurosci Lett.* 557:129–34.

26. Fukuchi, Y., Nakajima, H., Sugiyama, D., Hirose, I., Kitamura, T., Tsuji, K. (2004) Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells* 22:649.
27. Hallett, P.J., Deleidi, M., Astradsson, A., Smith, G.A., Cooper, O., Osborn, T.M., Sundberg, M., Moore, M.A., Perez-Torres, E., Brownell, A.L. (2015) Successful function of autologous iPSC-derived dopamine neurons following transplantation in a non-human primate model of Parkinson's disease. *Cell Stem Cell*. 16:269–74.
28. Hanger, D.P., Anderton, B.H., Noble, W., (2009) Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med* 15: 112–19.
29. Hardy, J., Selkoe, D.J., (2002) The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-356.
30. Hu, W., Qiu, B., Guan, W., Wang, Q., Wang, M., et al. (2015) Direct conversion of normal and Alzheimer's disease human fibroblasts into neuronal cells by small molecules. *Cell Stem Cell* 17(2): 204-212.
31. Jankovic, J. (2008) Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 79:368–376.
32. Joers, V., Tansey, M.G., Mulas, G., Carta, A., R. (2016) Microglial phenotypes in Parkinson's disease and animal models of the disease. *Progress in Neurobiology*. Advance online publication. doi:10.1016/j.pneurobio.2016.04.006.
33. Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell T.M. (2004). Βασικές Αρχές Νευροεπιστημών (Ελληνική Έκδοση), Εκδόσεις Πασχαλίδης, Τόμος I , 2:27.
34. Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell T.M. (2006). Βασικές Αρχές Νευροεπιστημών (Ελληνική Έκδοση), Εκδόσεις Πασχαλίδης, Τόμος III, 58 : 1542-1543,1548-1549.
35. Kassem, M., Kristiansen, M., Abdallah, B. M. (2004) Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol*. 95:209.
36. Katsuda, T., Tsuchiya, R., Kosaka, N., et al. (2013) Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes. *Sci. Rep*. 3:1197.
37. Kefalopoulou, Z., Politis, M., Piccini, P., Mencacci, N., Bhatia, K., Jahanshahi, M., Widner H, Rehncrona, S., Brundin, P., Bjorklund, A., Lindvall, O., Limousin, P., Quinn, N., Foltynie, T. (2014) Long-term clinical outcome of fetal cell transplantation for Parkinson disease: Two case reports. *JAMA Neurol*. 71:83-87.
38. Kikuchi, T., Morizane, A., Doi, D., Magotani, H., Onoe, H., Hayashi, T., Mizuma H., Takara, S., Takahashi, R., Inoue H., Morita S., Yamamoto, M., Okita K., Nakagawa, M., Parmar, M., Takahashi, J. (2017) Human iPSC cell-derived

- dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model. *Nature* 548:592–596.
39. Kim, J., Su S.C., Wang, H., Cheng, A.W., Cassady, J.P., Lodato, M.A., Lengner, C.J., Chung, C.Y., Dawlaty, M.M., Tsai, L.H., Jaenisch, R. (2011) Functional integration of dopaminergic neurons directly converted from mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*. 9:413–419.
40. Kim, K. S., Kim, H.S., Park, J. M., Kim, H. W., Park, M. K., Lee, H. S., Chopp, M., Moon, J. (2013). Long-term immunomodulatory effect of amniotic stem cells in an Alzheimer's disease model. *Neurobiology of Aging*, 34:2408–2420.
41. Kirkeby, A., Nolbrant, S., Tiklova, K., Heuer, A., Kee, N., Cardoso, T., Ottosson D.R., Lelos M.J., Rifes, P., Dunnett, S.B. (2017) Predictive markers guide differentiation to improve graft outcome in clinical translation of hESC-based therapy for Parkinson's disease. *Cell Stem Cell*. 20:135–148.
42. Kordower, J.H., Freeman, T.B., Snow, B.J. et al. (1995) Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease. *N Engl J Med* 332:1118–1124.
43. Kordower, J.H., Winn, S.R., Liu, Y.T., Mufson, E.J., Sladek, J.R., Hammang, J.P., Baetge, E.E., Emerich, D.F. (1994) The aged monkey basal forebrain: rescue and sprouting of axotomized basal forebrain neurons after grafts of encapsulated cells secreting human nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci*. 91:10898–902.
44. Korolev, I.O. (2014) Alzheimer's Disease: A Clinical and Basic Science Review. *Medical Student Research Journal*. 4:24–33.
45. Lee, V.M., Louis, S.A, Reynolds, B.A. (2015) Neural Stem Cells, *STEMCELL TECHNOLOGIES*.
46. Lee, J.K., Jin, H.K., Endo, S. Schuchman, E.H. Carter, J.E. Bae, J.S. (2010) Intracerebral transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduces amyloid-beta deposition and rescues memory deficits in Alzheimer's disease mice by modulation of immune responses. *Stem Cells*. 28(2): 329-343.
47. Lee, J., K., Schuchman, E., H., Jin, H., K., Bae, J.S. (2012) Soluble CCL5 derived from bone marrow-derived mesenchymal stem cells and activated by amyloid beta ameliorates Alzheimer's disease in mice by recruiting bone marrow-induced microglia immune responses. *Stem Cells* 30:1544–1555.
48. Liew, L.C., Katsuda, T., Gailhouse, L., Nakagama, H., Ochiya, T., (2017) Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: a glimmer of hope in treating Alzheimer's disease. *Int. Immunol.* 29(1): 11-19.

49. Lilja, A.M., Malmsten, L., Röjdner, J., Voytenko, L., Verkhatsky, A., Ögren, S.O., Nordberg, A., Marutle, A. (2015) Neural stem cell transplant-induced effect on neurogenesis and cognition in Alzheimer Tg2576 mice is inhibited by concomitant treatment with amyloid-lowering or cholinergic 7 nicotinic receptor drugs. *Neural Plast.* 2015:370432.
50. Liu, Y., Weick, J.P., Liu, H, Krencik, R, Zhang, X, Ma, L., Zhou, G.M., Ayala, M., (2013) Zhang, S.C., Medial ganglionic eminence-like cells derived from human embryonic stem cells correct learning and memory deficits. *Nat Biotechnol.*, 31:440–7
51. Liu, X., Li, F., Stubblefield, E.A., Blanchard, B., Richards, T.L., Larson, G.A., He, Y., Huang, Q., Tan, A.C., Zhang, D. (2012) Direct reprogramming of human fibroblasts into dopaminergic neuron-like cells. *Cell Res.* 22:321–32.
52. Manyam, B.V. (1990) Paralysis agitans and levodopa in “Ayurveda”: Ancient Indian medical treatise. *Mov Disord.* 5:47–48.
53. Mhatre, S.D., Tsai, C.A., Rubin, A.J., James, M.L., Andreasson, K.I. (2015) Microglial malfunction: The third rail in the development of Alzheimer’s disease. *Trends in Neurosciences*, 38:621–636.
54. Moghadam, F.H., Alai, H., Karbalaie, K., Tanhaei, S., Esfahani, M.H.N., Baharvand, H., (2009) Transplantation of primed or unprimed mouse embryonic stem cell-derived neural precursor cells improves cognitive function in Alzheimerian rats. *Differentiation.* 78:59–68.
55. Muratore, C.R., Rice, H.C., Srikanth, P., Callahan, D.G., Shin, T., Benjamin, L.N., Walsh, D.M., Selkoe, D.J., Young-Pearse, T.L. (2014) The familial Alzheimer’s disease APPV717I mutation alters APP processing and Tau expression in iPSC-derived neurons. *Hum Mol Genet.* 23:3523–36.
56. Napoli, E., Borlongan, C.V., (2017) Cell Therapy in Parkinson’s Disease: Host Brain Repair Machinery Gets a Boost from Stem Cell Grafts. *STEM CELLS* 35:1443–1445.
57. Paquet, D., Kwart, D., Chen, A., Sproul, A., Jacob, S., et al. (2016) Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature* 533(7601): 125-129.
58. Parkinson, J. (1817) An assay on the shaking palsy. Whittingham and Rowland for Sherwood, Needly and Jones, London.
59. Park, D., Yang Y.H., Bae DK, Lee, S.H., Yang, G., Kyung, J., Kim, D., Choi, E.K., Lee, S.W., Kim, G.H. (2013) Improvement of cognitive function and physical activity of aging mice by human neural stem cells over-expressing choline acetyltransferase. *Neurobiol Aging.* 34:2639–46.

60. Patel, S. A., Sherman, L., Munoz, J., Rameshwar, P. (2008) Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 56:1.
61. Piccini, P., Brooks, D.J., Bjorklund, A., Gunn, R.N., Grasby, P.M., Rimoldi, O., Brundin, P., Hagell, P., Rehnström, S., Widner, H., Lindvall, O. (1999) Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nat Neurosci*. 2:1137-1140.
62. Pickrell, A.M., Youle, R.J. (2015) The Roles of PINK1, Parkin and Mitochondrial Fidelity in Parkinson's Disease. *Neuron*. 85(2):257–273.
63. Prokop, S., Miller, K., R., Heppner, F., L. (2013) Microglia actions in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica* 126:461–477.
64. Rivetti di Val Cervo, P., Romanov, R.A., Spigolon, G., Masini, D., Martin-Montanez, E., Toledo, E.M., La Manno, G., Feyder, M., Pifl, C., Ng, Y.H., Sanchez, S.P., Linnarsson, S., Wernig, M., Harkany, T., Fisone, G., Arenas, E., (2017) Induction of functional dopamine neurons from human astrocytes in vitro and mouse astrocytes in a Parkinson's disease model. *Nat. Biotechnol*. 35(5):444-452.
65. Shen, Z., Li, X., Bao, X., Wang, R. (2017) Microglia-targeted stem cell therapies for Alzheimer disease: A preclinical data review *Journal of Neuroscience Research* . 95 (12) : 2420-2429.
66. Slack, J.M.W. (2007) Βασικές Αρχές Βιολογίας Ανάπτυξης. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, Δεύτερη Έκδοση, Ελληνική έκδοση, 13:248-249.
67. Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M., Goedert, M. (1998). α -synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6469–6473.
68. Sproul, A.A., Jacob, S., Pre, D., Kim, S.H., Nestor, M.W., et al. (2014) Characterization and molecular profiling of PSEN1 familial Alzheimer's disease iPSC derived neural progenitors. *PLoS One* 9(1):e84547.
69. Tajiri, N., Kaneko, Y., Shinozuka, K., et al., (2013) Stem cell recruitment of newly formed host cells via a successful seduction? Filling the gap between neurogenic niche and injured brain site. *PLoS One* 8:e74857. 10.1371/journal.pone.0074857.
70. Tetta, C., Ghigo, E., Silengo, L., Deregibus, M. C., Camussi, G. (2013) Extracellular vesicles as an emerging mechanism of cell-to cell communication. *Endocrine* 44:11.
71. Thier, M., Worsdorfer, P., Lakes, Y.B., Gorris, R., Herms, S., Opitz, T., Seiferling, D., Quandel, T., Hoffmann, P., Nothen, M.M., Brustle, O., Edenhofer F. (2012) Direct conversion of fibroblasts into stably expandable neural stem cells. *Cell Stem Cell*. 10:473-479.

72. Triga, K., Vaitsis, N., Germpei, M., Kefalopoulou, Z., Sotiropoulou–Bonikou G. (2012) Stem Cells Biology. *Ach Iatr.* 31:144-149.
73. Trueman, R.C., Klein, A., Lindgren, H.S., Lelos, M.J., Dunnett, S.B. (2013) Repair of the CNS using endogenous and transplanted neural stem cells. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 15:357–398.
74. Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z.P., Kokubu, Y., Sudhof, T.C., Wernig, M. (2010) Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*. 463:1035–1041.
75. Waldemar G., Burns A., (2017). *Alzheimer’s Disease*. Oxford University Press, 2^H Έκδοση, 2, 5: 8 (Figure 2.1), 1929 (Figure 5.1).
76. Wan, W., Cao, L., Kalionis, B., Xia, S., Tai, X. (2015) Applications of induced pluripotent stem cells in studying the neurodegenerative diseases. *Stem Cells Int* 2015: 382530.
77. Xuan, A., Luo, M., Ji W., Long, D. (2009) Effects of engrafted neural stem cells in Alzheimer’s disease rats. *Neurosci Lett.* 450:167–71.
78. Xuan, A.G., Long, D.H., Gu, H.G., Yang, D.D., Hong, L.P., Leng, S.L. (2008) BDNF improves the effects of neural stem cells on the rat model of Alzheimer's disease with unilateral lesion of fimbria fornix. *Neurosci. Lett.* 440 (3):331-335.
79. Xu Z., Chu, X., Jiang, H., Schilling, H., Chen, S, Feng, J. (2017) Induced dopaminergic neurons: A new promise for Parkinson’s disease. *Redox Biology* 11 :606–612.
80. Yagi, T., Ito, D., Okada, Y., Akamatsu, W., Nihei, Y., Yoshizaki, T., et al. (2011) Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet.* 20:4530–4539.
81. Yamasaki, T.R., Blurton-Jones, M., Morrisette, D.A., Kitazawa, M., Oddo, S., LaFerla, F.M. (2007) Neural stem cells improve memory in an inducible mouse model of neuronal loss. *J. Neurosci.* 27(44):11925-11933.

82. Yasuhara, T., Matsukawa, N., Hara, K., Yu, G., Maki, M. Kim S.U., Borlongan, C.V. (2006) Transplantation of human neural stem cells exerts neuroprotection in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 26:12497-12511.
83. Yuyama, K., Sun, H., Mitsutake, S., Igarashi, Y. (2012) Sphingolipid-modulated exosome secretion promotes clearance of amyloid- β by microglia. *J. Biol. Chem.* 287:10977.
84. Yuyama, K., Sun, H., Sakai, S., et al. (2014) Decreased amyloid- β pathologies by intracerebral loading of glycosphingolipid-enriched exosomes in Alzheimer model mice. *J. Biol. Chem.* 289:24488.
85. Zhang, D., Pekkanen-Mattila, M., Shahsavani, M., Falk, A., Teixeira, A.I., et al. (2014) A 3D Alzheimer's disease culture model and the induction of P21-activated kinase mediated sensing in iPSC derived neurons. *Biomaterials* 35(5): 1420- 1428.
86. Zhang, Q., Chen, W., Tan, S., Lin T. (2017) Stem Cells for Modeling and Therapy of Parkinson's Disease Human Gene Therapy. *January 28(1): 85-98.*
87. Zhou, C., Zhang, C., Chi, S., Xu, Y., Teng, J., Wang, H., Song, Y., Zhao, R. (2009) Effects of human marrow stromal cells on activation of microglial cells and production of inflammatory factors induced by lipopolysaccharide. *Brain Research* 1269:23–30.
88. Zhuang, X., Xiang, X., Grizzle, W., et al. (2011) Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated antiinflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Mol. Ther.* 19:1769.
89. Zuo, F., Xiong, F., Wang, X., et al. (2017) Intrastratial transplantation of human neural stem cells restores the impaired subventricular zone in parkinsonian mice. *STEM CELLS* (in press).
90. Γεωργάτος Σ.Δ., Κούκλης, Π.Δ., Λαζαρίδης, Γ.Α., Μελιδώνη, Α.Ν. (2008) Τα βλαστικά κύτταρα, ΕΦΥΡΑ, Ιωάννινα, Σελ.76-79, 95-100.
91. Δελιγεώργη – Πολίτη, Ε., (2013) Βλαστοκύτταρα: *Η μεγάλη ελπίδα της ιατρικής για τον 21ο αιώνα*, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
92. Παπαδόπουλος, Κ. (2005) Κλινική εικόνα της νόσου Πάρκινσον — νεότερα δεδομένα, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Σελ.176-177.
93. Στεφανής, Λ. (2011) Παθολογοανατομική, νευροχημική και μοριακή βάση της νόσου Parkinson. Σύγχρονες και μελλοντικές θεραπευτικές στρατηγικές. Αθήνα
94. Τάγαρης, Γ.Α. (2005) Νόσος Πάρκινσον: Παθοφυσιολογία-Παθογένεια Νευρολογική Κλινική ΠΓΝΑ «Γ. Γεννηματάς.
95. Τσίντου, Μ., Δαλαμάγκας, Κ.. (2011) ΝΟΣΟΣ PARKINSON, *HelMedica* ,7 Άρθρο 7^ο.

96. Τσολάκη, Μ. (2002) Άνοια τύπου ALZHEIMER: η πρόκληση του 21ου αιώνα. Ελληνική Εταιρεία Νόσου Alzheimer.

Ιστοσελίδες – Πηγές Internet

1. <https://www.nia.nih.gov/health/video-how-alzheimers-changes-brain>
2. http://www.alz.org/research/science/major_milestones_in_alzheimers.asp
3. <http://www.emedi.gr/κλασική-ιατρική/ενδοκρινολογία/item/2488-ντοπαμίνη.html#.Wc4UYXG7Vdg>
4. <http://www.parkinson.org/find-help/blogs/history-of-parkinsons>
5. <http://www.parkinsons.org/parkinsons-history.html>
6. http://www.parkinson.gr/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=35&Itemid=56
7. <https://www.humphath.com/spip.php?article995>