



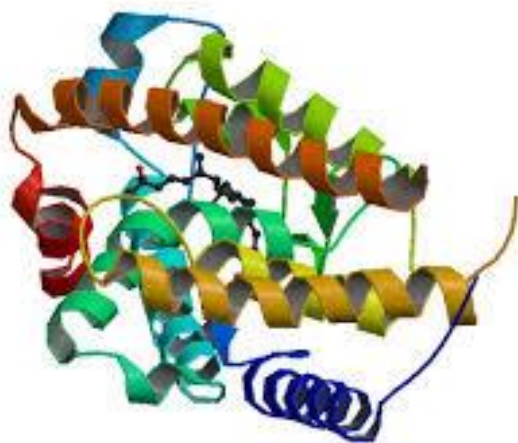
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Φαρμακευτικής

ΜΔΕ Σχεδιασμός και ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών
ενώσεων

Κατεύθυνση Φαρμακολογία



Αντώνιος

Δεμερτζής

Αθήνα 2020

Μελέτη της εμφάνισης των πολυμορφισμών rs10735810, rs1544410 και rs731236 του γονιδίου του υποδοχέα της βιταμίνης D (VDR) σε καυκάσιους ασθενείς με επιληψία, υπό αντιεπιληπτική αγωγή.

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

1. Δρακούλης Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής του τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Επιβλέπων)
2. Ανδρεάδου Ιωάννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του τομέα Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
3. Παπαπετρόπουλος Ανδρέας, Καθηγητής του τομέα Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε το ακαδημαϊκό έτος 2019-2020, στο Εργαστήριο της Ερευνητικής Ομάδας Κλινικής Φαρμακολογίας και Φαρμακογονιδιωματικής, στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος «Σχεδιασμός και Ανάπτυξη Νέων Φαρμακευτικών Ενώσεων – Κατεύθυνση: Φαρμακολογία» του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιστημονικό υπεύθυνο της εργασίας μου, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Νικόλαο Δρακούλη, για την για την πολύτιμη ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στη συγκεκριμένη ομάδα, δείχνοντάς μου την εμπιστοσύνη του από την πρώτη στιγμή.

Θα ήθελα ακόμη, να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Ομάδα Α' Νευροχειρουργικής Κλινικής του Γενικού Νοσοκομείου «Ο Ευαγγελισμός» για την παραχώρηση ασθενών για τη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης και ιδιαίτερες στον Αναπληρωτή Καθηγητή και Νευρολόγο της Α' Νευροχειρουργικής Κλινικής, Στέργιο-Στυλιανό Γκατζώνη, για την επιστημονική του καθοδήγηση και την προθυμία του να μοιραστεί τις γνώσεις του και τις απόψεις του πάνω στο ερευνητικό έργο.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Μάρθα-Σπυριδούλα Κατσαρού για την καθοδήγηση και τις υποδείξεις της που ήταν πολύ σημαντικές για την υλοποίηση αυτής της εργασίας. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Μαρία Λάγιου για την όλη την βοήθεια και την υποστήριξη που μου παρείχε, την επίβλεψη στο πειραματικό κομμάτι της εργασίας και τη βοήθειά της κατά τη διαμόρφωση του κειμένου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα υπόλοιπα μέλη της ερευνητικής ομάδας, για την άριστη συνεργασία που είχαμε.

Κλείνοντας, θα ήθελα από καρδιάς να ευχαριστήσω όλους όσους μου έδιναν δύναμη καθημερινά για να κατακτήσω τους στόχους μου, οικογένεια και φίλοι, άνθρωποι που είναι κοντά και άνθρωποι που είναι λίγο πιο μακριά, χωρίς αυτούς, δεν θα τα κατάφερνα.

Περίληψη

Η επιληψία είναι μία από τις πιο κοινές νευρολογικές ασθένειες, καθώς επηρεάζει το 1 – 2% του παγκόσμιου πληθυσμού. Ορίζεται ως η διαρκής προδιάθεση για εμφάνιση επιληπτικής κρίσης, δηλαδή την μη φυσιολογική, απρόβλεπτη και συγχρονισμένη εκφόρτηση των νευρώνων του εγκεφάλου. Οι επιληπτικές κρίσεις χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τις εστιακές και τις γενικευμένες, ανάλογα με το πόσο επηρεάζεται το επίπεδο της συνείδησης. Τα αίτια που οδηγούν σε αυτές να είναι συνήθως εξωγενείς παράγοντες η δυσλειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Η δράση της βιταμίνης D, είναι γνωστή για τον νευροπροστατευτικό της χαρακτήρα. Τα χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D σχετίζονται με πολλές νευρολογικές ασθένειες όπως την σκλήρυνση κατά πλάκας, την νόσο του Alzheimer, την νόσο του Parkinson και την επιληψία.

Η βιταμίνη D δρα είτε μέσω της σύνδεσής της σε υποδοχείς της μεμβράνης ενεργοποιώντας έναν καταρράκτη σηματοδότησης (μη γενομικός τρόπος δράσης), είτε μέσω της σύνδεσής της στον πυρηνικό της υποδοχέα VDR (γενομικός τρόπος δράσης) όπου λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας.

Σκοπός αυτής της μελέτης, είναι η συσχέτιση των πολυμορφισμών rs2228570 (FokI), rs154410 (BsmI) και rs731236 (TaqI) του γονιδίου VDR και της πιθανότητας εμφάνισης επιληψίας σε δείγμα ασθενών Νοτιοανατολικής Ευρωπαϊκής Καυκάσιας καταγωγής.

Στην μελέτη συμπεριλήφθηκαν 128 ασθενείς με εστιακή επιληψία και 509 μάρτυρες Νοτιοανατολικής Ευρωπαϊκής Καυκάσιας καταγωγής. Το DNA απομονώθηκε από λευκά αιμοσφαίρια ολικού αίματος με kit απομόνωσης DNA και οι πολυμορφισμοί αναλύθηκαν με την χρήση της τεχνικής real – time PCR.

Abstract

Epilepsy is one of the most common neurological disorder, as long as it affects 1 – 2% of the global population. It is described as a continuous tense for epileptic seizures, which are unpredictable, abnormal and massive discharges of neurons that disrupt the normal brain function. They are classified as focal or generalized depending on the level of consciousness that is affected. Epileptogenesis may occur due to exogenous factors or central nervous system dysfunction.

Vitamin D is known for its neuroprotective action. Low vitamin D levels may refer to many neurological diseases such as multiple sclerosis, Alzheimer disease, Parkinson disease and epilepsy.

Vitamin D acts through binding to membrane receptors, triggering a signaling cascade (non genomic actions) or through binding to its nuclear receptor VDR (genomic actions) working as a transcription factor.

This study aims to investigate the association between rs2228570 (FokI), rs154410 (BsmI) and rs731236 (TaqI) polymorphisms of the VDR gene and the appearance of epilepsy in a sample of Southeastern European Caucasian patients.

This study included 128 patients diagnosed with focal epilepsy and 509 Southeastern European Caucasian controls. Genomic DNA was extracted from white blood cells of peripheral blood using a DNA isolation kit. Polymorphisms were analyzed by using real - time PCR.

Πίνακας περιεχομένων

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
1.1 Επιληψία.....	2
1.2 Ταξινόμηση επιληπτικών κρίσεων.....	3
1.2.1 Εστιακές επιληπτικές κρίσεις.....	5
1.2.2 Γενικευμένες επιληπτικές κρίσεις	7
1.2.3 Επιληπτικοί σπασμοί.....	8
1.3 Παθοφυσιολογία της επιληψίας.....	9
1.4 Επιληπτογένεση.....	11
1.5 Βιταμίνη D.....	12
1.5.1 Εισαγωγή.....	12
1.5.2 Σύνθεση βιταμίνης D.....	14
1.5.3 Μηχανισμός δράσης βιταμίνης D.....	15
1.5.3.1 Μη γενομικός τρόπος δράσης.....	15
1.5.3.2 Γενομικός τρόπος δράσης.....	16
1.5.4 Έλλειψη βιταμίνης D.....	17
1.5.5 Υποδοχέας της βιταμίνης D.....	19
1.5.6 Δομή του VDR.....	20
1.6 Βιταμίνη D και νευρικό σύστημα.....	22
1.6.1 Σύνθεση και μεταβολισμός της βιταμίνης D στον εγκέφαλο.....	22
1.6.2 Αλληλεπιδράσεις με το κεντρικό νευρικό σύστημα.....	23
1.6.3 Κατανομή του VDR στον εγκέφαλο.....	25
1.6.4 Βιταμίνη D, VDR και νευρολογικές παθήσεις.....	25
1.6.5 Επιληψία και βιταμίνη D.....	26
1.6.6 Μηχανισμοί δράσης της βιταμίνης D στην επιληψία.....	27
1.7 Γονίδιο του VDR.....	29
1.7.1 Χαρακτηριστικά του γονιδίου.....	29
1.7.2 Πολυμορφισμοί του γονιδίου του VDR.....	29
1.8 Θεραπεία.....	30

1.8.1 Ιστορική αναδρομή.....	30
1.8.2 Μηχανισμός δράσης.....	34
1.8.2.1 Διάλυτοι ιόντων.....	34
1.8.2.2 Φάρμακα που ενισχύουν την ανασταλτική νευροδιαβίβαση μέσω ενίσχυσης του GABA.....	36
1.8.2.3 Φάρμακα που ελαττώνουν την διεγερτική νευροδιαβίβαση μέσω ρύθμισης του γλουταμικού.....	37
B.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	38
2.1 Σκοπός.....	39
2.2 Ασθενείς και μέθοδοι.....	39
2.2.1 Κριτήρια εισαγωγής και αποκλεισμού ασθενών στην μελέτη.....	40
2.2.2 Δημογραφικά στοιχεία σθενών.....	41
2.3 Λήψη δείγματος.....	43
2.4 Επεξεργασία αίματος.....	44
2.4.1 Διαχωρισμός και απομόνωση στοιχείων του αίματος.....	44
2.4.2 Υλικά – Εξοπλισμός.....	45
2.4.3 Πρωτόκολλο.....	46
2.5 Απομόνωση DNA.....	46
2.5.1 Αρχή μεθόδου.....	46
2.5.2 Αντιδραστήρια και εξοπλισμός.....	48
2.6 Φωτομέτρηση διαλυμάτων DNA.....	50
2.6.1 Αρχή μεθόδου.....	50
2.6.2 Αντιδραστήρια – Υλικά – Εξοπλισμός.....	51
2.6.3 Πρωτόκολλο.....	52
2.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR.....	53
2.7.1 Αρχή μεθόδου.....	53
2.7.2 Αρχή μεθόδου real – time PCR.....	54
2.7.2.1 Διαδικασία Real – Time PCR με LightSNiP.....	56

2.7.2.2 Αντιδραστήρια – Υλικά – Εξοπλισμός.....	58
2.7.2.3 Πρωτόκολλο.....	58
2.8 Κατανομή συχνοτήτων.....	60
2.8.1 Κατανομή συχνοτήτων του FokI (rs2228570).....	60
2.8.2 Κατανομή συχνοτήτων του BsmI (rs1544410).....	61
2.8.3 Κατανομή συχνοτήτων του TaqI (rs731236).....	63
2.9 Συσχέτιση των πολυμορφισμών rs2228570, rs1544410 και rs731236 με την εμφάνιση της επιληψίας.....	64
2.9.1 Συσχέτιση του πολυμορφισμού FokI (rs2228570) με την εμφάνιση επιληψίας.....	64
2.9.2 Συσχέτιση του πολυμορφισμού BsmI (rs1544410) με την εμφάνιση επιληψίας.....	65
2.9.3 Συσχέτιση του πολυμορφισμού TaqI (rs731236) με την εμφάνιση επιληψίας.....	66
2.9.4 Συσχέτιση συνδυασμού γονοτύπων των πολυμορφισμών FokI (rs2228570) και BsmI (rs1544410) με την εμφάνιση επιληψίας.....	67
2.9.5 Συσχέτιση συνδυασμού γονοτύπων των πολυμορφισμών FokI (rs2228570) και TaqI (rs731236) με την εμφάνιση επιληψίας.....	68
2.9.6 Συσχέτιση συνδυασμού γονοτύπων των πολυμορφισμών BsmI (rs1544410) και TaqI (rs731236) με την εμφάνιση επιληψίας.....	69
2,10 Συζήτηση αποτελεσμάτων.....	70
Παράρτημα Α.....	92
Παράρτημα Β.....	97

Ευρετήριο εικόνων

Εικόνα 1. Ορολογία επιληπτικών κρίσεων από το 1989 στο 2017.....	4
Εικόνα 2. Ταξινόμηση επιληπτικών κρίσεων από ILAE 2017.....	5
Εικόνα 3: Σύνθεση της βιταμίνης D.....	15
Εικόνα 4. Γενομικός και μη γενομικός τρόπος δράσης	17
Εικόνα 5: Γραφική παράσταση της έλλειψης βιταμίνης D κατά την χειμερινή και θερινή περίοδο σε διάφορες ηλικιακές κλίμακες.....	19
Εικόνα 6 : Σχηματική αναπαράσταση των πυρηνικών υποδοχέων.....	20
Εικόνα 7. Οι τρεις γενιές αντιεπιληπτικών φαρμάκων.....	33
Εικόνα 8. Φυγοκεντρίμενο αίμα με προσθήκη αντιπηκτικού EDTA.....	45
Εικόνα 9: Διαδικασία απομόνωσης DNA.....	47
Εικόνα 10 α) Φασματοφωτόμετρο BioPhotometer (Eppendorf, Germany)	
β) Αρχή μεθόδου φασματοφωτομετρίας.....	52
Εικόνα 11: Ειδικό σύστημα ανίχνευσης.....	55
Εικόνα 121. Διαγράμματα καμπυλών τήξης.....	57
Εικόνα 13: Πολυμορφισμοί του γονιδίου του VDR και επίπεδο οργάνωσης..	71
Εικόνα 14. Προτεινόμενο μοντέλο της αλληλεπίδρασης μεταξύ της 25(OH)D, της 1,25(OH) ₂ D και της 1,24,25(OH) ₃ D με τον υποδοχέα της βιταμίνης D (VDR) και τον FokI πολυμορφισμό του γονιδίου του VDR.....	76

Ευρετήριο πινάκων

Πίνακας 1. Ταξινόμηση εστιακών κρίσεων.....	6
Πίνακας 2: Εξωγενείς παράγοντες που μπορεί να προκαλέσουν επιληπτικές κρίσεις.....	12
Πίνακας 3. Κατάσταση της βιταμίνης D ανάλογα με της συγκέντρωσή της στον ορό του αίματος.....	18
Πίνακας 4: Αντιεπιληπτικά φάρμακα επαγωγής ενζύμων (EIAEDs).....	26
Πίνακας 5: Συσχέτιση του πολυμορφισμού FokI (rs2228570) με την εμφάνιση επιληψίας.....	65
Πίνακας 6: Συσχέτιση του πολυμορφισμού BsmI (rs2228570) με την εμφάνιση επιληψίας.....	65
Πίνακας 7: Συσχέτιση του πολυμορφισμού TaqI (rs2228570) με την εμφάνιση επιληψίας.....	66

Ευρετήριο γραφημάτων

Γράφημα 1: κατανομή ασθενών με επιληψία με βάση το φύλο.....	41
Γράφημα 2: Ηλικιακή κατανομή ασθενών με επιληψία.....	42
Γράφημα 3: κατανομή των ασθενών με βάση το κάπνισμα.....	42
Γράφημα 4: Κατανομή των ασθενών με βάση την ανταπόκριση στη θεραπεία.....	43
Γράφημα 5: Κατανομή γονοτύπων για τον πολυμορφισμό FokI.....	60
Γράφημα 6: Κατανομή αλληλομόρφων για τον πολυμορφισμό FokI.....	61
Γράφημα 7: Κατανομή γονοτύπων για τον πολυμορφισμό BsmI.....	62
Γράφημα 8: Κατανομή αλληλομόρφων για τον πολυμορφισμό BsmI.....	62
Γράφημα 9: Κατανομή γονοτύπων για τον πολυμορφισμό TaqI.....	63
Γράφημα 10: Κατανομή αλληλομόρφων για τον πολυμορφισμό TaqI.....	64

Ευρετήριο σχημάτων

Σχήμα 1:α) Χημική δομή εργοκαλσιφερόλης	
β) Χημική δομή χοληκαλσιφερόλης.....	13
Σχήμα 2. Όγκος αντιδραστηρίων και DNA που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση ενός δείγματος.....	59
Σχήμα 3. Πρόγραμμα PCR στο LightCycler 480.....	59

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α: ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Επιληψία

Ως επιληψία ορίστηκε το 2005 η διαταραχή του εγκεφάλου που χαρακτηρίζεται από διαρκή προδιάθεση για την δημιουργία επιληπτικών κρίσεων. Για πρακτικούς κυρίως λόγους ως επιληψία ορίζεται πλέον η νόσος του εγκεφάλου που περιλαμβάνει οποιαδήποτε από τις ακόλουθες τρεις προϋποθέσεις:

- 1) Τουλάχιστον δύο μη προκληθείσες επιληπτικές κρίσεις που συμβαίνουν σε χρόνο μικρότερο από 24 ώρες μεταξύ τους.
- 2) Μία μη προκληθείσα επιληπτική κρίση με πιθανότητα εμφάνισης περαιτέρω κρίσεων έπειτα από δύο μη προκληθείσες κρίσεις που εμφανίζονται τα επόμενα 10 χρόνια.
- 3) Διάγνωση επιληπτικού συνδρόμου.¹

Η επιληπτική κρίση προκαλείται από μία μη φυσιολογική, απρόβλεπτη και συγχρονισμένη εκφόρτηση των νευρώνων του εγκεφάλου. Μπορεί να γίνει αντιληπτή είτε μέσω παρατήρησης των συμπτωμάτων, είτε με την χρήση ηλεκτρονιοεγκεφαλογραφήματος. Χαρακτηρίζεται από διαταραχή της συνείδησης, της κινητικότητας, της συμπεριφοράς, της αισθητικής καθώς και την λειτουργία του αυτόνομου νευρικού συστήματος.^{1,2}

Η επιληψία χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενες μη προκληθείσες επιληπτικές κρίσεις. Έχει πολλές αιτίες οι οποίες αντικατοπτρίζουν κατά κύριο λόγο την εγκεφαλική δυσλειτουργία. Μία και μόνο κρίση μπορεί να αναφέρεται σε αναστρέψιμους παράγοντες (π.χ. πυρετός, υπογλυκαιμία) δεν εμπίπτει όμως στον ορισμό της επιληψίας καθώς είναι μία παροδική και όχι χρόνια κατάσταση.²

Ως επιληπτικό σύνδρομο, ορίζεται μία ομάδα κλινικών χαρακτηριστικών που εμφανίζονται με συγκεκριμένη συχνότητα, με παρόμοιους τύπους επιληπτικών κρίσεων, παρόμοια ηλικία εμφάνισης, παρόμοια ευρήματα ηλεκτροεγκεφαλογραφήματος, παράγοντες ενεργοποίησης, γενετικό και φυσικό ιστορικό και ανταπόκριση στη θεραπεία.²

Οι επιληπτικές κρίσεις διαρκούν συνήθως δευτερόλεπτα έως λεπτά αλλά μπορούν επίσης να παραταθούν και να οδηγήσουν σε μία δύσκολη παθολογικά κατάσταση που ονομάζεται status epilepticus για την οποία θα γίνει αναφορά αργότερα.^{3,4}

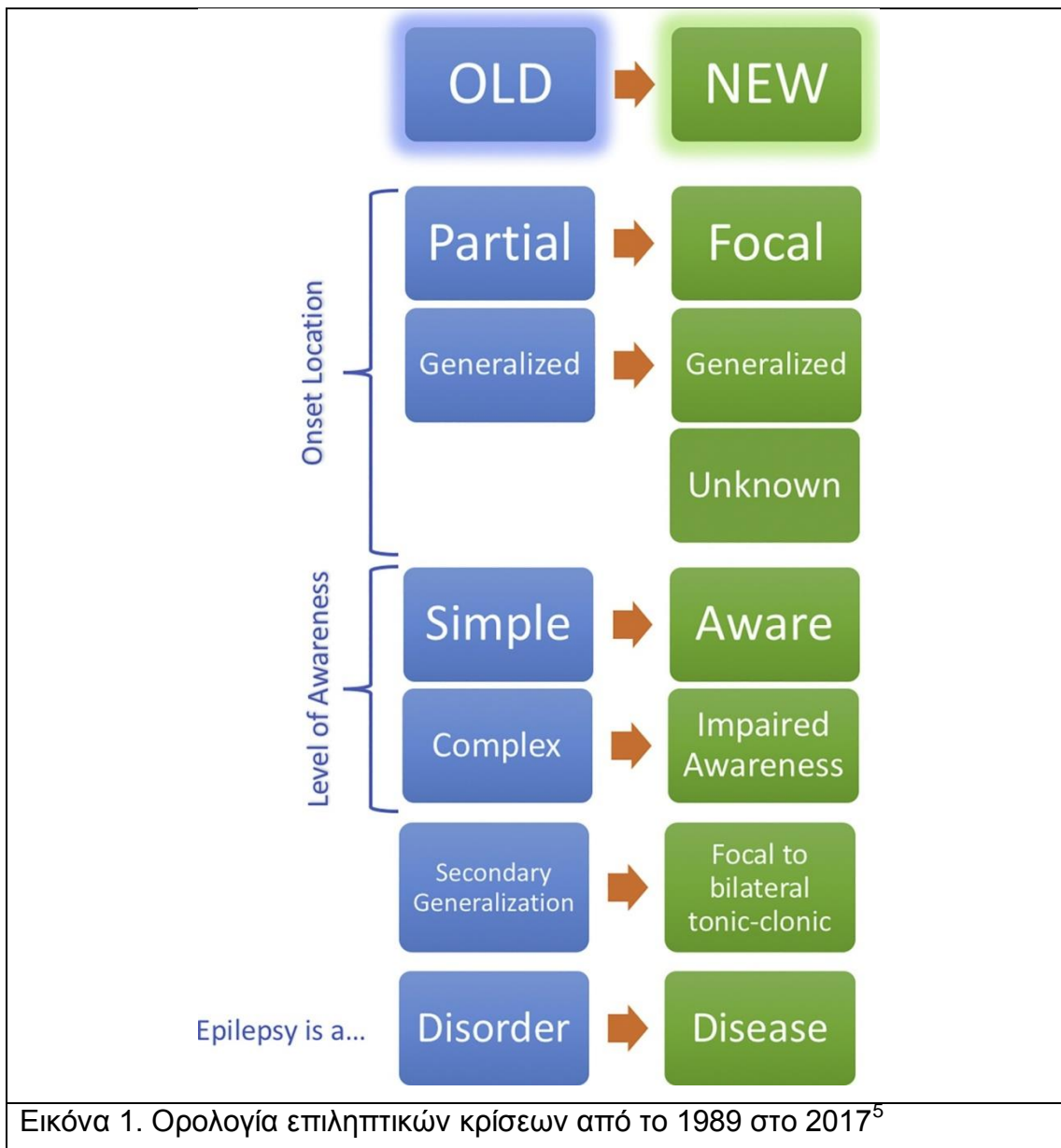
Η ανασκόπηση ορισμένων βασικών αρχών στη νευρολογία μπορεί να αποτελέσει ένα πλαίσιο για την κατανόηση των μηχανισμών των επιληπτικών κρίσεων, της επιληπτογένεσης και της επιληψίας. Μερικές από τις θεμελιώδεις αρχές της λειτουργίας των νευρικών κυττάρων, όπως και η ηλεκτρική βάση του δυναμικού της μεμβράνης και του δυναμικού δράσης, είναι απαραίτητες για την κατανόηση του τρόπου με τον οποίο μπορούν να ξεκινήσουν οι επιληπτικές κρίσεις. Οι μηχανισμοί που λαμβάνουν μέρος στην συναπτική μετάδοση μπορούν επίσης να παρέχουν πληροφορίες. Τέλος, ένα από τα πιο αξιοσημείωτα χαρακτηριστικά του νευρικού συστήματος, η πλαστικότητά του, αντανακλάται σε μηχανισμούς που υποκρύπτουν την επιληπτογένεση.²

1.2 Ταξινόμηση επιληπτικών κρίσεων

Η ταξινόμηση των επιληπτικών κρίσεων επιτρέπει την αναγνώριση της περιοχής του εγκεφάλου από την οποία προέκυψε η κρίση και βοηθά στις αρχικές διαγνωστικές εξετάσεις που υποβάλλονται οι ασθενείς. Οι επιληπτικές κρίσεις μπορούν να ταξινομηθούν με βάση παράγοντες όπως η ηλικία εμφάνισης των πρώτων συμπτωμάτων, το οικογενειακό ιστορικό, τα ευρήματα από το ηλεκτροεγκεφαλογράφημα και μελέτες της νευρολογικής απεικόνισης. Ο εντοπισμός του ακριβούς τύπου επιληπτικής κρίσης παρέχει πληροφορίες για την θεραπεία αλλά και την πρόγνωση της πορείας της

νόσου, αλλά παράλληλα διευκολύνει και την επικοινωνία μεταξύ των επαγγελματιών υγείας για την περίπτωση του κάθε ασθενούς.

Σχεδόν από την ίδρυσή της το 1909 η Διεθνής Ένωση κατά της Επιληψίας (ILAE), κάνει συνεχείς προσπάθειες για την βελτίωση της ταξινόμησης των επιληπτικών κρίσεων. (Εικόνα 1) Οι προσπάθειες αυτές απέκτησαν ιδιαίτερη δυναμική στις αρχές της δεκαετίας του 1960 με πρωτοπόρο τον Henri Gastaut και εδραιώθηκαν από το 1989 έχοντας πλέον μεγάλη επιρροή παγκοσμίως καθώς επίσης και σημαντικό αντίκτυπο στην περίθαλψη και την έρευνα για την επιληψία.



Εικόνα 1. Ορολογία επιληπτικών κρίσεων από το 1989 στο 2017⁵

Η ταξινόμηση των επιληπτικών κρίσεων είναι μία δυναμική διαδικασία που στόχο έχει την ανάπτυξη καινοτόμων θεραπειών και την καλύτερη κατανόηση του προφίλ του κάθε ασθενή, ώστε να επιτευχθεί βελτίωση στην περίθαλψη των ασθενών και εξατομίκευση της θεραπείας.^{4,6} (Εικόνα 2)

Οι επιληπτικές κρίσεις χωρίζονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες, τις εστιακές επιληπτικές κρίσεις, τις γενικευμένες και τους επιληπτικούς σπασμούς.



1.2.1 Εστιακές επιληπτικές κρίσεις

Οι εστιακές επιληπτικές κρίσεις συμβαίνουν χωρίς προειδοποίηση ως αποτέλεσμα της επίδρασης ορισμένων παθολογικών παραγόντων στον φλοιό του εγκεφάλου. Σύνθετες δομικές και λειτουργικές αλλοιώσεις των νευρώνων καθώς επίσης και νευρογλοιοαγγειακές αλληλεπιδράσεις και δυσλειτουργίες

του αιματοεγκεφαλικού φραγμού μπορεί να είναι τα αίτια αυτού του είδους επιληπτικής κρίσης. Οι αλλοιώσεις, αλληλεπιδράσεις και δυσλειτουργίες αυτές μπορεί να οφείλονται και σε κάποια φεγγονή.⁷⁻⁹ Συνήθως διαρκούν 2 – 6 λεπτά.¹⁰

Αποτελούν τον πιο κοινό τύπο κρίσεων στους ασθενείς με επιληψία και εμφανίζονται σε ένα μέρος του εγκεφάλου από το οποίο εξαρτώνται οι διαταραχές που θα εμφανίσει ο κάθε ασθενής. Οι διαταραχές αυτές μπορεί να είναι κινητικές, αισθητικές ή και οπτικές. Οι περισσότεροι ασθενείς διατηρούν τις αισθήσεις τους και πολλοί είναι ακόμη σε θέση να μιλήσουν κατά τη διάρκεια του επιληπτικού επεισοδίου. Διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τις απλές και τις σύνθετες εστιακές κρίσεις ανάλογα με αν υπάρχει διατήρηση της συνείδησης ή όχι. (Πίνακας 1)^{2-5,11}

Πίνακας 1. Ταξινόμηση εστιακών κρίσεων

α. Απλή εστιακή:	β. Σύνθετη εστιακή:
<p>Τα συμπτώματα που εμφανίζονται οφείλονται σε μία ομάδα υπερδραστικών νευρώνων οι οποίοι εντοπίζονται σε μικρή έκταση του εγκεφάλου. Συχνά συνοδεύονται από ανώμαλη κινητική δραστηριότητα ενός άκρου ενώ ο ασθενής διατηρεί την συνείδησή του εμφανίζοντας όμως πολλές φορές και αισθητικές διαταραχές. Στην περίπτωση αυτή η ηλεκτρονική διαταραχή δεν εξαπλώνεται σε άλλους νευρώνες. Μπορεί να εμφανιστεί σε όλες τις ηλικίες. Τέτοιου είδους κρίσεις συχνά αναφέρονται και ως αύρες</p>	<p>Συνοδεύεται από νοητικές διαταραχές, διαταραγμένο επίπεδο συνείδησης και συχνά απώλεια μνήμης. Μπορούν να προκληθούν ψευδαισθήσεις και κινητικές δυσλειτουργίες συμπεριλαμβανομένων των ανώμαλων κινητικών διαταραχών καθώς επίσης και την ακράτεια ούρων. Εμφανίζεται συνήθως πριν την ηλικία των 20 ετών.</p>

Η διάκριση μεταξύ απλών και σύνθετων εστιακών κρίσεων είναι κρίσιμη, διότι δραστηριότητες όπως η οδήγηση και ο χειρισμός επικίνδυνων μηχανημάτων πρέπει να περιορίζεται σε ασθενείς με σύνθετες εστιακές κρίσεις για την αποφυγή ατυχημάτων.

1.2.2 Γενικευμένες επιληπτικές κρίσεις

Οι γενικευμένες επιληπτικές κρίσεις επηρεάζουν όλο τον εγκέφαλο ωστόσο δεν είναι απαραίτητα χειρότερες από τις εστιακές κρίσεις αλλά είναι πιθανότερο να οδηγήσουν σε έλλειψη συνείδησης και να επιφέρουν σπασμούς σε όλο το σώμα. Διακρίνονται στις εξής πέντε κατηγορίες:

α. Τονικές κρίσεις:

Τα χέρια και τα πόδια γίνονται άκαμπτα και δύσκαμπτα. Αυτό το είδος κρίσης περνάει αρκετά γρήγορα και δεν επηρεάζει την συνείδηση. Συχνά εμφανίζονται κατά την διάρκεια του ύπνου και χαρακτηρίζονται από κάμψη στη μέση και στο λαιμό, έκταση των άνω και κάτω άκρων. Η τυπική διάρκειά της είναι 5-20 sec.

β. Ατονικές κρίσεις:

Οι ατονικές κρίσεις χαρακτηρίζονται από ξαφνική απώλεια του ορθοστατικού τόνου που συχνά οδηγεί σε πτώσεις. Η συνείδηση είναι συνήθως μειωμένη και κατά την πτώση μπορεί να προκληθεί σοβαρός τραυματισμός. Η διάρκεια είναι συνήθως αρκετά δευτερόλεπτα και σπάνια περισσότερο από ένα λεπτό.

γ. Μυοκλονικές κρίσεις:

Μεγάλες μυϊκές ομάδες όπως χέρια ή πόδια, συσπώνται για μικρό χρονικό διάστημα, συνήθως μικρότερο του ενός λεπτού. Μπορεί να εμφανιστεί και σε υγιή άτομα (καλοήθης) και να οφείλεται σε επιληπτικές ή μη αιτίες. Προκαλεί συνήθως σπασμούς οι οποίοι πλήττουν τον αυχένα, τους ώμους, τους βραχίονες και συνήθως δεν φαίνεται να επηρεάζει την συνείδηση.

δ. Αφαιρέσεις(petit mal):

Επεισόδια σύντομης διάρκειας 3 – 20 sec, όπου ο ασθενής έχει μειωμένη ευαισθητοποίηση και ανταπόκριση. Εάν η διάρκεια είναι μεγαλύτερη από 10 sec, υπάρχουν συνήθως συνοδά φαινόμενα σπασμών, όπως αυτόνομες κινήσεις του στόματος ή των χεριών. Τέτοιου είδους κρίσεις αρχίζουν συνήθως στην ηλικία 4 – 14 ετών, ενώ μέχρι την ηλικία των 8 συνήθως επιλύονται. Παιδιά τέτοιων περιπτώσεων έχουν συνήθως φυσιολογική ανάπτυξη και νοημοσύνη.

ε. Τονικοκλονικές κρίσεις(grand mal):

Προκαλούν απώλεια συνείδησης που συνδυάζεται με πτώση, φωνή που βγαίνει από την δυσκολία του αέρα να εισέλθει στους αεραγωγούς και σπασμούς των άκρων. Οι σπασμοί αυτοί επιβραδύνονται σταδιακά προς το τέλος του επεισοδίου. Διαρκούν συνήθως 30-120 sec. Μπορεί να εμφανιστεί σάλιο ή αφρισμός λόγω της δυσκολίας στην κατάποση αλλά και αιμορραγία από το δάγκωμα της γλώσσας ή των χειλιών. Η ακράτεια της ουροδόχου κύστης και του εντέρου είναι συχνό φαινόμενο.

1.2.3 Επιληπτικοί σπασμοί:

Αντιπροσωπεύουν έναν μοναδικό τύπο επιληπτικών κρίσεων, με ξεχωριστή σημειολογία και ηλεκτρογραφικό και ηλεκτρομυογραφικό συσχετισμό. Οι σπασμοί αυτοί συμβαίνουν συχνά στα πλαίσια της εγκεφαλικής παθοφυσιολογίας και συνήθως είναι προσανατολισμένοι. Δεν είναι σαφές αν πρόκειται για γενικευμένη ή εστιακή κρίση. Συμβαίνουν συνήθως κατά την βρεφική ηλικία και σπάνια σε ενήλικες.^{4,12,13}

1.3 Παθοφυσιολογία της επιληψίας

Για την κατανόηση των εννοιών επιληπτική κρίση, επιληψία και επιληπτογέννεση, απαιτείται η εξέταση μερικών βασικών ανατομικών και ηλεκτροφυσιολογικών ιδιοτήτων του εγκεφαλικού φλοιού και των παραγόντων που καθορίζουν το την νευρική δραστηριότητα σε κυτταρικό επίπεδο¹⁴.

Ο εγκεφαλικός φλοιός περιλαμβάνει δύο γενικές κατηγορίες νευρώνων, τους πυραμιδικούς νευρώνες και του εσωτερικούς. Οι πυραμιδικοί είναι κύτταρα που στέλνουν πληροφορίες σε νευρώνες που βρίσκονται σε μακρινές περιοχές του εγκεφάλου ενώ οι εσωτερικοί θεωρούνται ότι είναι κύτταρα τοπικού κυκλώματος που επηρεάζουν την δραστηριότητα κοντινών νευρώνων¹⁵.

Η επικοινωνία μεταξύ νευροκυττάρων γίνεται μέσω νευροδιαβιβαστών. Οι νευροδιαβιβαστές είναι ουσίες που απελευθερώνονται από το προσυναπτικό νευρικό άκρο σε μία σύναψη και στη συνέχεια δεσμεύονται σε συγκεκριμένους μετασυναπτικούς υποδοχείς του εν λόγω συνδέτη. Η δέσμευση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση διαύλων και την ελεύθερη διέλευση ιόντων στα κύτταρα¹⁶.

Οι κύριοι νευροδιαβιβαστές στον εγκέφαλο είναι το γλουταμικό οξύ, το γ-αμινο-βουτυρικό οξύ (GABA), η ακετυλοχολίνη και η ντοπαμίνη. Άλλα μόρια όπως νευροπεπίδια και ορμόνες, παίζουν ρυθμιστικούς ρόλους στην τροποποίηση της μετάδοσης σήματος για μεγαλύτερες χρονικές περιόδους¹⁶.

Επιληπτικές κρίσεις μπορούν να προκληθούν από πολλούς μηχανισμούς. Ωστόσο, πιστεύεται ότι εμφανίζονται όταν υπάρχει διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ διέγερσης και αναστολής. Δεδομένου ότι ο βασικός παράγοντας διέγερσης των νευρώνων είναι το δυναμικό δράσης, μία υπερευερέθιστη κατάσταση μπορεί να προκύψει από αυξημένη διεγερτική συναπτική νευροδιαβίβαση, από μειωμένη ανασταλτική νευροδιαβίβαση, από μία αλλοίωση των διαύλων ιόντων ή από μία αλλοίωση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης ιόντων προς αποπόλωση της μεμβράνης¹⁶.

Παρόλο που η έννοια της ισορροπίας παρέχει ένα χρήσιμο μοντέλο για τους μηχανισμούς που μπορούν να προκαλέσουν επιληπτικές κρίσεις, απαιτείται η εξέταση του μηχανισμού σε διαφορετικά επίπεδα του νευρικού συστήματος:

A. Ιόντα και μεμβράνες

Το νευρικό σύστημα εξαρτάται άμεσα από το ιοντικό του περιβάλλον. Σε φυσιολογικές συνθήκες, υπάρχει υψηλή συγκέντρωση καλίου στον ενδοκυττάριο χώρο του νευρικού κυττάρου και υψηλή συγκέντρωση εξωκυττάριου νατρίου και άλλων ιόντων. Αν η ισορροπία διαταραχθεί, δηλαδή βρεθεί αυξημένο εξωκυττάριο κάλιο, τότε το κύτταρο αποπολώνεται και προάγεται η μη φυσιολογική δραστηριότητα. Ταυτόχρονα, ανωμαλίες στον διάυλο νατρίου μπορεί να επιτρέψουν σε μεγάλες ποσότητες νατρίου να εισχωρήσουν στο εσωτερικό του κυττάρου επηρεάζοντας περαιτέρω την ισορροπία.¹⁶

B. Κύτταρα και κυκλώματα/συνάψεις

Η συναπτική μετάδοση στην έρευνα της επιληψίας παίζει σημαντικό ρόλο λόγω του κρίσιμου ρόλου στην διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ διέγερσης και αναστολής. Ελαττώματα καθ' όλη την διάρκεια του μηχανισμού μετάδοσης σήματος στις συνάψεις μπορούν να επιφέρουν επιληπτικές κρίσεις. Οι κύριοι νευροδιαβιβαστές στο νευρικό σύστημα είναι το γλουταμικό οξύ και το GABA¹⁶.

Το γλουταμικό είναι διεγερτικός νευροδιαβιβαστής. Αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς AMPA και NMDA οι οποίοι επιτρέπουν την εισροή ιόντων στο κύτταρο μετά την ενεργοποίησή του. Τόσο ο ένας όσο και ο άλλος υποδοχέας είναι διαπερατοί σε νάτριο και κάλιο με διαφορετική όμως ευαισθησία. Ο NMDA είναι εκλεκτικός ως προς τα ιόντα ασβεστίου, παραμένει όμως ανενεργός ιόντα μαγνησίου σε φυσιολογικές συνθήκες. Παρατεταμένη δράση του γλουταμικού πάνω στον υποδοχέα NMDA επιτρέπει την διέλευση ασβεστίου στο κύτταρο και με τον τρόπο αυτό προάγεται η νευροδιέγερση¹⁷.

Από την άλλη πλευρά, το GABA έχει κυρίως ανασταλτική δράση στον μηχανισμό της επιληψίας. Μειώνει την διεγερτική τάση των κυττάρων επιτρέποντας ιόντα χλωρίου να εισέλθουν στο κύτταρο¹⁸.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το GABA και το γλουταμικό οξύ βρίσκονται σε ισορροπία, ελέγχοντας με τον τρόπο αυτό πολλές διεργασίες και το συνολικό επίπεδο διέγερσης του εγκεφάλου. Τα επίπεδα των νευροδιαβιβαστών αυτών όμως μπορούν να επηρεαστούν από εξωτερικούς παράγοντες όπως το αλκοόλ, είτε από γενετικές διαταραχές. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα του ενζύμου αποκαρβοξυλάση του γλουταμικού (GAD), το οποίο μετατρέπει το γλουταμικό σε GABA. Μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου αυτού μπορεί σχετίζεται με διάφορες μορφές επιληψίας οι οποίες είναι και συχνά ανθεκτικές στη θεραπεία.¹⁹⁻²¹

1.4 Επιληπτογέννεση

Οι επιληπτικές κρίσεις είναι πιο συχνές απ' ότι γενικά εκτιμάται. Σχεδόν 10% του πληθυσμού εμφανίζει μία τουλάχιστον κρίση κατά την διάρκεια της ζωής του. Οι σύνθετες εστιακές κρίσεις είναι οι πιο συνηθισμένες ενώ οι γενικευμένες εμφανίζονται συχνότερα στις παιδικές ηλικίες. Συγκεκριμένα, οι γενικευμένες τονικοκλονικές κρίσεις εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα στις βρεφικές ηλικίες (15 ανά 100.000 κατοίκους) ενώ στη συνέχεια μειώνονται έως την ηλικία των 10 – 14 ετών και παραμένουν σε αυτή την συχνότητα μέχρι και τις μεγαλύτερες ηλικίες. Οι επιληπτικές κρίσεις μπορεί να είναι είτε αυθόρμητες είναι να προκαλούνται. Οι αυθόρμητες οφείλονται στην μη φυσιολογική λειτουργία του εγκεφάλου ενώ οι προκληθείσες οφείλονται σε εξωγενείς παράγοντες.(Πίνακας 2)²²⁻²⁴

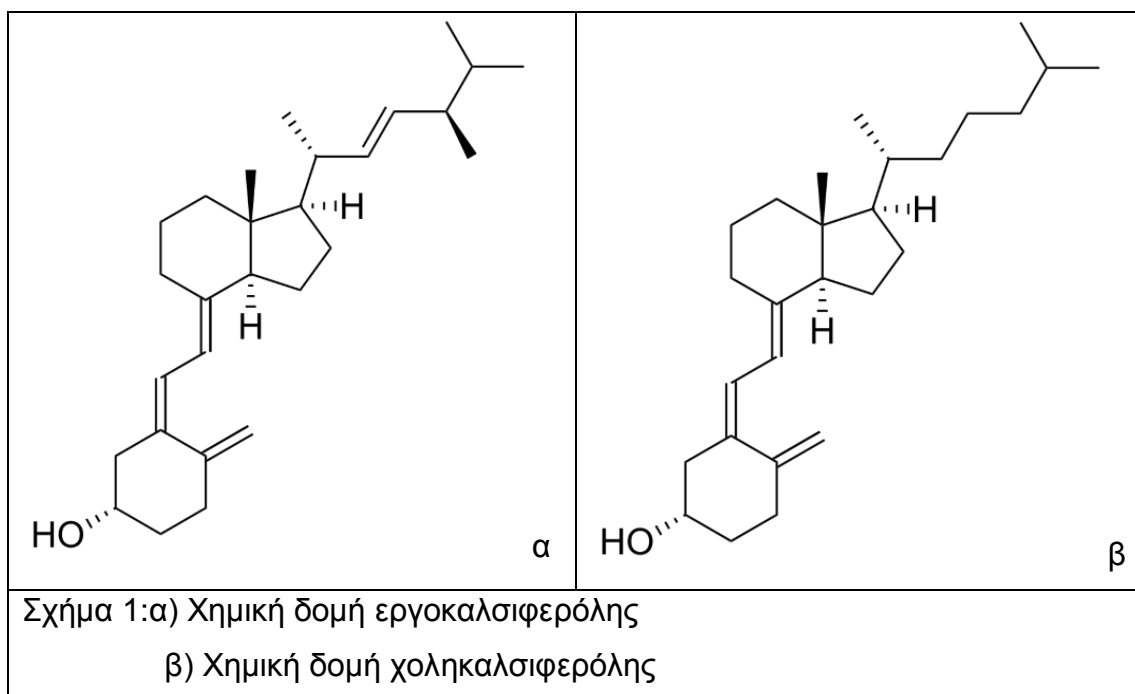
Πίνακας 2: Εξωγενείς παράγοντες που μπορεί να προκαλέσουν επιληπτικές κρίσεις²²

- Μεταβολικές ανωμαλίες
- Υπογλυκαιμία
- Υποκαλσιαιμία
- Κατανάλωση αλκοόλ
- Φλεγμονή
- Εγκεφαλικό επεισόδιο
- Τραύμα στο κεφάλι
- Λήψη ναρκωτικών ουσιών
- Υψηλός πυρετός στα παιδιά

1.5 Βιταμίνη D

1.5.1 Εισαγωγή

Η βιταμίνη D ανακαλύφθηκε στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, μετά την ανακάλυψη των βιταμινών A, B και C, ως συστατικό του ελαίου του ήπατος μπακαλιάρου. Γνωστή και ως καλσιφερόλη, η βιταμίνη D είναι μία λιποδιαλυτή προ ορμόνη που είναι υπεύθυνη για την ομοίωση της απορρόφησης του μαγνησίου, του ασβεστίου και των φωσφορικών αλάτων από τον ανθρώπινο οργανισμό. Οι δύο βιολογικά αδρανείς πρόδρομοι της βιταμίνης D είναι η βιταμίνη D₃ (χοληκαλσιφερόλη) και η βιταμίνη D₂ (εργοκαλσιφερόλη) (Σχήμα. 1).



Τόσο η βιταμίνη D3 όσο και η D2 μπορούν να ληφθούν από τροφές, καλύπτοντας 10 – 20% των ημερήσιων αναγκών του οργανισμού. Κατά κανόνα οι ζωικής προέλευσης τροφές είναι πλούσιες σε βιταμίνη D3 ενώ οι φυτικές σε D2. Η σύνθεση ωστόσο της βιταμίνης D3 στο δέρμα – όπως αναφέρεται παρακάτω – καλύπτει το μεγαλύτερο ποσοστό που απαιτεί ο οργανισμός καθημερινά (80 – 90%).²⁵ Έχει βρεθεί ότι η βιταμίνη D που παράγεται στο δέρμα (D3) μπορεί να διατηρηθεί έως και δύο φορές περισσότερο στην κυκλοφορία του αίματος σε σχέση με τις ποσότητες βιταμίνης που λαμβάνονται από τις τροφές (D2).²⁶ Και οι δύο πρόδρομοι της βιταμίνης D, μετατρέπονται στο ήπαρ σε 1,25 – υδροξυβιταμίνη D που αποτελεί την ενεργή μορφή της βιταμίνης D. Τα επίπεδα της 1,25 – υδροξυβιταμίνης D ανιχνεύονται στον ορό του αίματος.^{27,28}

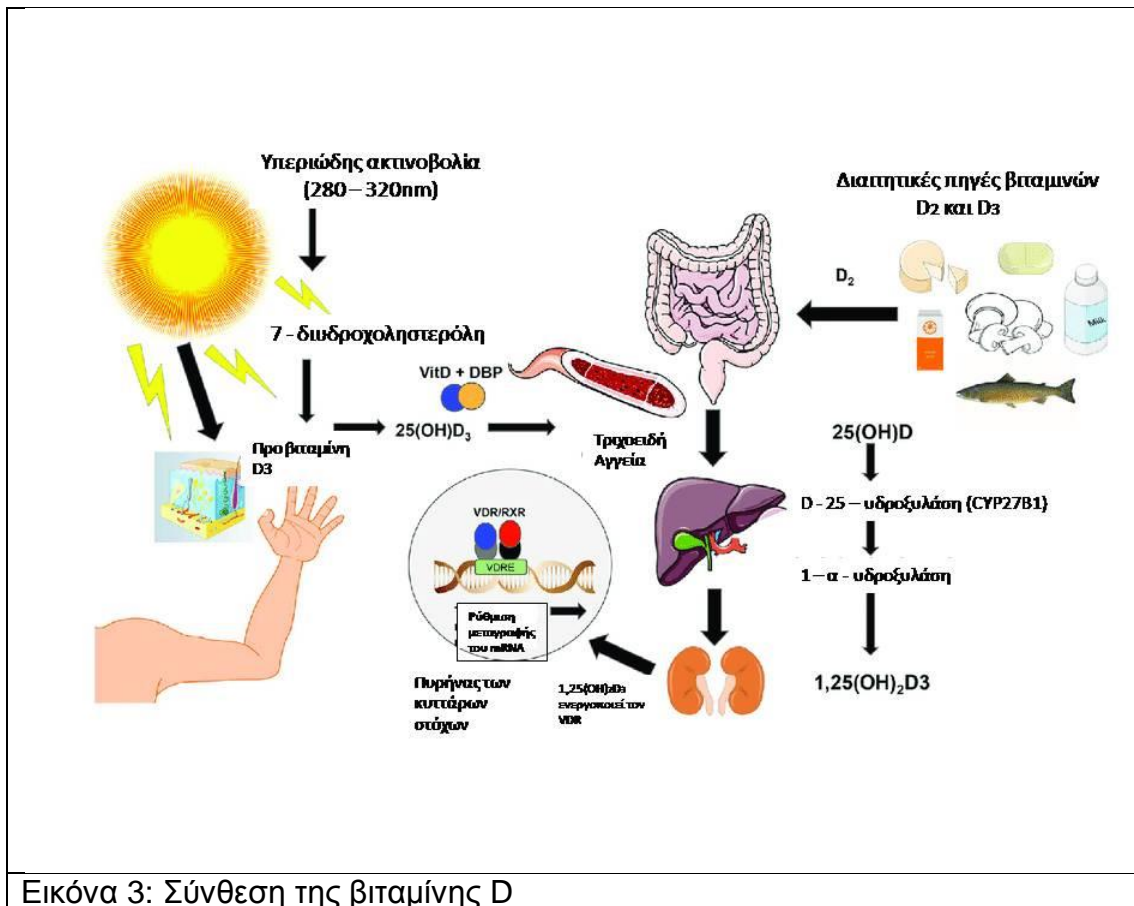
1.5.2 Σύνθεση βιταμίνης D

Η βιταμίνη D₃ σχηματίζεται όταν η 7-διυδροχοληστερόλη του δέρματος εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία (UVB 280-320nm) και στη συνέχεια μετατρέπεται σε προβιταμίνη D₃. Σε μία εξαρτώμενη από την θερμοκρασία διεργασία στο ήπαρ, η προβιταμίνη D₃ μετατρέπεται σε βιταμίνη D. Στην αντίδραση της προβιταμίνης D₃ με την υπεριώδη ακτινοβολία παράγονται και οι βιολογικά αδρανείς μεταβολίτες ταχυστερόλη και λουμιστερόλη. Η βιταμίνη D₂ προέρχεται από τα φυτά, παράγεται μετά από την επίδραση της ακτινοβολίας επί της εργοστερόλης και εισέρχεται στην κυκλοφορία μέσω της διατροφής.^{27,29-31} (Εικόνα 3)

Η βιταμίνη D, είτε με την μορφή D₂ είτε D₃ θεωρείται βιολογικά ανενεργή μέχρι να υποβληθεί σε δύο ενζυματικές αντιδράσεις υδροξυλίωσης. Η πρώτη λαμβάνει χώρα στο ήπαρ με τη μεσολάβηση της 25 – υδροξυλάσης και έτσι σχηματίζεται η 25 – υδροξυβιταμίνη D (25-(OH) D). Η δεύτερη αντίδραση λαμβάνει χώρα στους νεφρούς με την μεσολάβηση της 1 α – υδροξυλάσης (CYP27B1) η οποία μετατρέπει την 25 (OH) D στην ενεργή πλέον 1,25 – υδροξυβιταμίνη D. Το γονίδιο της 1 α – υδροξυλάσης εκφράζεται επίσης σε αρκετούς ιστούς πέρα από τους νεφρούς με άγνωστο όμως ρόλο.²⁸ Μετά την σύνθεσή της η βιταμίνη D συνδέεται με συγκεκριμένες πρωτεΐνες δέσμευσης και μεταφέρεται στα υπόλοιπα όργανα στόχους.^{28,31}

Η νεφρική σύνθεση της καλσιτριόλης ρυθμίζεται από δύο ορμόνες με ανταγωνιστική δράση μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, επηρεάζεται αύξηση των επιπέδων της βιταμίνης μέσω της δράσης της παραθυροειδούς ορμόνης, ενώ τα επίπεδα μπορούν να μειωθούν από τον αυξητικό παράγοντα FG-23.^{32,33}

Εκτός από την βιολογική μορφή της βιταμίνης D, ένας αριθμός αναλόγων με παρόμοια δομή έχει συντεθεί για χρήση τους ως δυναμικά φαρμακολογικοί παράγοντες. Αυτά τα παράγωγα δεν χρησιμοποιούνται για διαιτητικούς σκοπούς αλλά για ειδικές εφαρμογές στην έρευνα ή στην κλινική θεραπεία.³⁴



Εικόνα 3: Σύνθεση της βιταμίνης D

1.5.3 Μηχανισμός δράσης της βιταμίνης D

Οι δράσεις της βιταμίνης D είναι ποικίλες και χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τις γενομικές και μη γενομικές. Όλες της οι δράσεις πραγματοποιούνται μέσω του υποδοχέα της VDR. Όταν ο VDR επάγει την ταχεία σηματοδότηση στην κυτταρική μεμβράνη και το κυτταρόπλασμα τότε γίνεται λόγος για μη γενομικές δράσεις. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις που ο υποδοχέας της βιταμίνης D λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας και επάγει μία σειρά από γενομικές δράσεις.^{33,35}

1.5.3.1 Μη γενομικός τρόπος δράσης

Η 1,25- (OH) 2D μπορεί επίσης να συνδεθεί με τον υποδοχέα μεμβράνης του (MARRS) και να προκαλέσει γρήγορες μη-γονιδιωμιατικές αποκρίσεις.

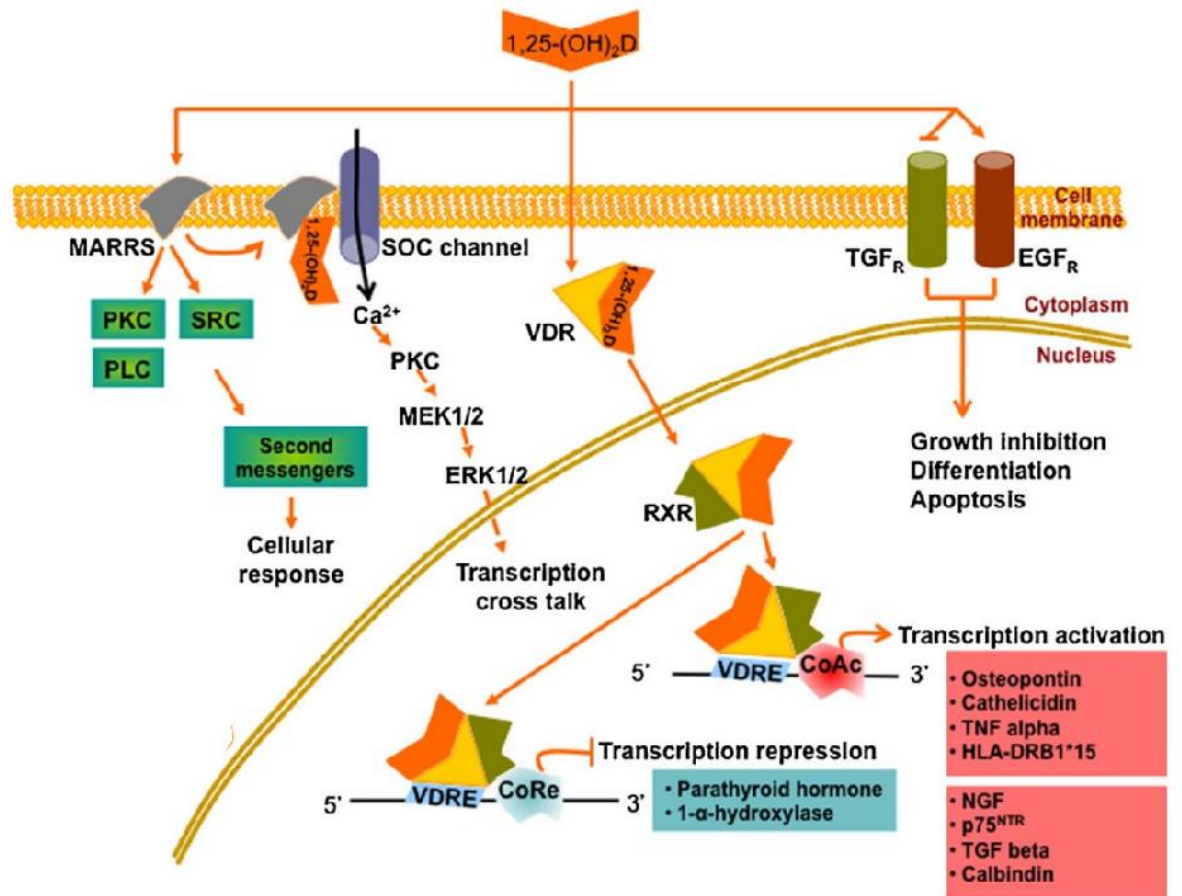
Οι μη γενομικές δράσεις της βιταμίνης D περιλαμβάνουν δέσμευση σε έναν συνδεδεμένο με τη μεμβράνη υποδοχέα βιταμίνης D (MARRS), ενεργοποιώντας έτσι έναν καταρράκτη σηματοδότησης που έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση ταχέων μη γονιδιωματικών αποκρίσεων. Μέσω της σηματοδότησης αυτής η βιταμίνη D είναι υπεύθυνη για την ρύθμιση της δραστηριότητας της αδενυλικής κυκλάσης, την φωσφολιπάσης (PLC) και της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC). Ρυθμίζει τα επίπεδα ασβεστίου, του μαγνησίου, των φωσφορικών αλάτων και τον κύκλο των κυττάρων μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων. Διαδραματίζει ενεργό ρόλο στον σχηματισμό των οστών και την ανάπτυξη και ορθή λειτουργία του εγκεφάλου. Τέλος, εκτός από την ειδική δέσμευση σε υποδοχείς βιταμίνης D που σχετίζονται με τη μεμβράνη, έχει επίσης προταθεί η αλλοστερική τροποποίηση του υποδοχέα GABA και επομένως η λεπτή ρύθμιση της νευρωνικής διεγέρσεως.³⁶⁻³⁹ (Εικόνα 4)

Η πρωτεϊνική κινάση C, είναι μια οικογένεια ενζύμων πρωτεϊνικής κινάσης που εμπλέκονται στον έλεγχο της λειτουργίας άλλων πρωτεϊνών. Ο έλεγχος αυτός γίνεται μέσω της φωσφορυλίωσης υδροξυλικών υπολειμμάτων σερίνης και θρεονίνης αμινοξέων των πρωτεϊνών αυτών. Η PKC με τη σειρά της ενεργοποιείται από σήματα όπως αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}). Ως εκ τούτου, τα ένζυμα PKC παίζουν σημαντικούς ρόλους σε αρκετούς καταρράκτες μεταγωγής σήματος.

1.5.3.2 Γενομικός τρόπος δράσης

Στις γενομικές δράσεις συμπεριλαμβάνονται όλες εκείνες οι περιπτώσεις που ο VDR, έπειτα από την ενεργοποίησή του η οποία προκύπτει με την σύνδεση με την βιταμίνη D, μεταβάλλει την γονιδιακή έκφραση. Η βιταμίνη D, μετά την σύνδεσή της με τον υποδοχέα της (VDR), σχηματίζει ένα ετεροδιμερές με τον υποδοχέα X του ρητινοϊκού οξέος RXR. Το σύμπλοκο αυτό αναγνωρίζει και συνδέεται με τα στοιχεία απόκρισης του VDR (VDRE), ενεργοποιώντας της παραγωγή μίας σειράς ενεργοποιητικών και κατασταλτικών παραγόντων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα της δράσης αυτής, είναι η αναστολή της δράσης της παραθυρεοειδικής ορμόνης και της 1 – α υδροξυλάσης, αλλά και

η ενίσχυση της έκφρασης παραγόντων που έχουν να κάνουμε με την ομοίωση του ασβεστίου, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική διαφοροποίηση και την παραγωγή μία σειράς από νευροπροστατευτικούς παράγοντες.^{39,40} (Εικόνα 4)



Εικόνα 4. Γενομικός και μη γενομικός τρόπος δράσης⁴¹

1.5.4 Έλλειψη βιταμίνης D

Η ανεπάρκεια βιταμίνης D είναι πλέον ένα παγκόσμιο πρόβλημα. Αποτελεί σοβαρό ζήτημα υγείας που ταλαιπωρεί εκατομμύρια ενήλικες και παιδιά σε όλο τον κόσμο, προκαλώντας μία πληθώρα από ασθένειες όπως:

- Περιοδοντίτιδα
- Αυτοάνοσες διαταραχές
- Μολυσματικές ασθένειες
- Καρκίνο
- Καρδιαγγειακές παθήσεις
- Διαβήτη τύπου II

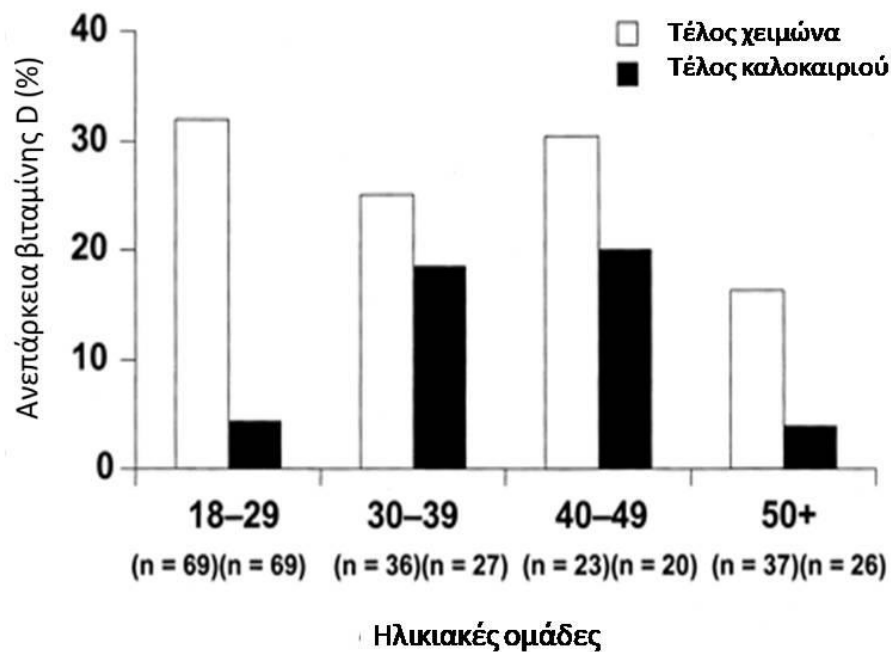
- Νευρολογικές διαταραχές⁴².

Η συγκέντρωση της βιταμίνης D στον ορό εκφράζεται ως η συνολική συγκέντρωση 25-υδροξυβιταμίνης D [25 (OH) D], δηλαδή ως η αθροιστική συγκέντρωση των D2 και D3 στο ορό του αίματος. Έχει παρατηρηθεί ότι επικείμενη έλλειψη της βιταμίνης εκφράζεται με υψηλά επίπεδα PTH σε μία προσπάθεια του οργανισμού να αντισταθμίσει το κενό παράγοντας περισσότερη βιταμίνη από τους νεφρούς^{43,44}. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η κατάσταση της βιταμίνης D ανάλογα με την συγκέντρωση της 25(OH)D στον ορό.(πίνακας 3)

Πίνακας 3. Κατάσταση της βιταμίνης D ανάλογα με της συγκέντρωσή της στον ορό του αίματος.⁴⁵

Ορισμός	nmol/L	ng/ml
Ανεπάρκεια	<50	<20
Έλλειψη	50 – 750	20 – 30
Υπερβιταμίνωση	>250	>100
Δηλητηρίαση	>375	>150

Κύρια πηγή βιταμίνης D για τον ανθρώπινο οργανισμό είναι η παραγωγή της στο δέρμα υπό την επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας. Πρακτικά, η έκθεση στο ηλιακό φως είναι αυτή που καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τα επίπεδά της στον οργανισμό. Έχει παρατηρηθεί μία μεταβλητότητα της συγκέντρωσης της βιταμίνης D σε διαφορετικούς πληθυσμούς ανάλογα τον τόπο κατοικίας, θρησκευτικές πεποιθήσεις και τον ρουχισμό που επιβάλλουν, τον τρόπο ζωής και εργασίας. Μεταβολές παρατηρούνται σε πληθυσμούς και από εποχή σε εποχή. Έχει παρατηρηθεί ότι κατά τους χειμερινούς μήνες τα επίπεδα βιταμίνης D είναι συχνά χαμηλά λόγω έλλειψης ήλιου ενώ κατά τους καλοκαιρινούς μήνες η έλλειψη που παρατηρείται δεν είναι τόσο έντονη^{38,42,46,47}.(Εικόνα 5)



Εικόνα 5: Γραφική παράσταση της έλλειψης βιταμίνης D κατά την χειμερινή και θερινή περίοδο σε διάφορες ηλικιακές κλίμακες³⁰

Η αντιμετώπιση των χαμηλών επιπέδων μπορεί να γίνει με συμπληρώματα βιταμίνης D. Μία διατροφή πλούσια σε βιταμίνη D μπορεί επίσης να επηρεάσει και αυτή τα επίπεδα της βιταμίνης στον ορό. Όπως προαναφέρθηκε, η βιταμίνη D3 μπορεί να ληφθεί από ζωικής προέλευσης τρόφιμα, ενώ η βιταμίνη D2 από φυτά. Ωστόσο τα περισσότερα τρόφιμα, εκτός από τα λιπαρά ψάρια, το κρέας και τα αυγά, έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνη D. Για τον λόγο αυτόν, η διατροφική βιταμίνη D επιλέγεται να λαμβάνεται μέσω συμπληρωμάτων διατροφής και τροφίμων εμπλουτισμένων με βιταμίνη D.⁴⁴

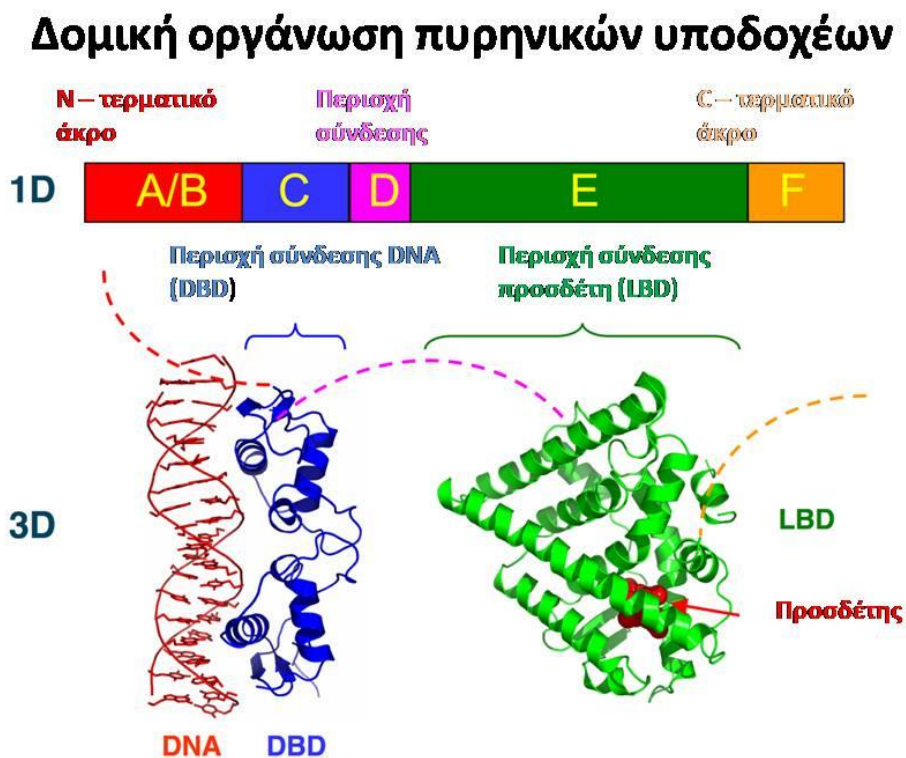
1.5.5 Υποδοχέας της βιταμίνης D

Απαραίτητη προϋπόθεση για την βιολογική δράση της βιταμίνης D είναι η σύνδεση με τον υποδοχέα της VDR. Ο VDR είναι μέλος της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων (NR). Διαθέτει μία καλά διατηρημένη περιοχή

δέσμευσης του DNA και μία περιοχή δέσμευσης της βιταμίνης D. Μόλις η βιταμίνη D συνδεθεί με τον υποδοχέα της, το σύμπλοκο βιταμίνης υποδοχέα σχηματίζει ένα ετεροδιμερές με τον υποδοχέα X του ρητινοϊκού οξέος RXR. Το ετεροδιμερές αυτό έπειτα μετακινείται στον πυρήνα των κυττάρων όπου συνδέεται με συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης της βιταμίνης D (VDREs) με αποτέλεσμα την έκφραση ή την καταστολή συγκεκριμένων γονιδιακών προϊόντων. Τα VDREs με υψηλή συγγένεια για το VDR αποτελούνται από μία επανάληψη της αλληλουχίας 5' - AGG/TTCA-3' ή μικρές παραλλαγές αυτού του μοτίβου.^{48 49-51}

1.5.6 Δομή του VDR

Η πρωτεΐνη VDR αποτελείται από 427 αμινοξέα τα οποία δημιουργούν περιοχές που είναι χαρακτηριστικές σε όλους τους πυρηνικούς υποδοχείς. (Εικόνα 6.).



Εικόνα 6 : Σχηματική αναπαράσταση των πυρηνικών υποδοχέων⁵²

Διαθέτει μια αμινο-τελική περιοχή ενεργοποίησης AF- (activation function - 1), η οποία στην περίπτωση του VDR είναι αρκετά μικρότερη σε σχέση με αυτή των υπολοίπων υποδοχέων που ανήκουν στην υπερικογένεια των NR. Διακρίνεται ακόμα, μια συντηρημένη περιοχή σύνδεσης του DNA (DNA Binding Domain, DBD) και πριν το καρβοξυτελικό άκρο μία δραστική περιοχή σύνδεσης με το πρόσδεμα (Ligand Binding Domain, LBD). Στο μόριο παρατηρείται και μία ενδιάμεση περιοχή που ενώνει τα δύο άκρα μεταξύ τους (hinge region)^{53,54}.

Αναλυτικότερα, η περιοχή σύνδεσης του DNA (DBD) περιγράφεται από τα αμινοξικά κατάλοιπα 16 ως 125. Τα 66 εξ αυτών είναι συντηρημένα σε υψηλό βαθμό. Δεν είναι τυχαίο το γεγονός ότι η περιοχή είναι σχεδόν ίδια σε ανθρώπους, ποντικούς και αρουραίους, αν εξαιρέσει κανείς το 108^ο αμινοξύ της ακολουθίας (λευκίνη στους ανθρώπους έναντι μεθειονίνης σε ποντικούς και αρουραίους)⁵⁵.

Η DBD παρουσιάζει δυο δακτυλίους ψευδαργύρου (zinc fingers). Έκαστος δακτύλιος αποτελείται από ένα άτομο ψευδαργύρου σε τετραεδρική διάταξη με τέσσερα υπολείμματα κυστεΐνης. Οι δυο δακτύλιοι δημιουργούν μια χαρακτηριστική περιοχή που είτε σταθεροποιεί την σύνδεση με το DNA (ειδικότερα με τα στοιχεία απόκρισης της βιταμίνης D) είτε συμμετέχει στην δημιουργία διμερών με υποδοχείς της οικογένειας των ρετινοειδών (Retinoid X Receptor, RXR), ή με τον ίδιο τον VDR. Επίσης, εντοπίζονται τρεις έλικες α: την έλικα αναγνώρισης (κατάλοιπα C41 ως K53), την έλικα πρόσδεσης στην φωσφορική ομάδα του DNA (κατάλοιπα Q77 ως I87) και την έλικα που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο της περιοχής, δημιουργώντας μια προέκταση – ουρά^{55,56}.

Η περιοχή δέσμευσης του προσδέτη είναι το πιο πολύπλοκο και λιγότερο συντηρημένο τμήμα του υποδοχέα. Αποτελείται από 12 α-έλικες οι οποίες σχηματίζουν έναν δυναμικό θύλακα δέσμευσης της βιταμίνης D. Διαθέτει ακόμα μία περιοχή ενεργοποίησης AF – 2, μία περιοχή για ομο – και ετεροδιμερισμό και μία περιοχή σύνδεσης συνενεργοποιητών. Η AF – 2 περιοχή βρίσκεται στο καρβοξυ – τελικό άκρο των πυρινικών υποδοχέων και

η δράση της εξαρτάται εξαρτάται από την παρουσία δεσμευμένου προσδέματος.⁵⁷

Η ενδιάμεση περιοχή (hinge region) συνδέει μεταξύ τους τις LDB και DBD. Ένα παράδειγμα που δείχνει την σημασία της ενδιάμεσης περιοχής είναι αυτό των μεταλλάξεων που είναι δυνατόν να παρατηρηθούν στα κατάλοιπα 690 και 691 του υποδοχέα της προγεστερόνης. Οι μεταλλάξεις αυτές καθιστούν αδύνατη την πρόσδεσή του υποδοχέα στην πυρηνική μήτρα, αδρανοποιώντας την μεταγραφική του λειτουργία⁵⁵.

Η ενδιάμεση περιοχή του VDR συμμετέχει με ενεργό ρόλο στην μεταγραφική του ενεργότητα. Η απώλεια 5 αμινοξέων από την ακολουθία της ενδιάμεσης περιοχής μειώνει την εξαρτώμενη από την αλληλεπίδραση με τον προσδέτη μεταγραφική ενεργότητα κατά 50 %. Σε άλλες περιπτώσεις η διαγραφή 13 αμινοξέων καταστρέφει εντελώς την μεταγραφική ιδιότητα του υποδοχέα. Η μελέτη πιθανών μεταλλάξεων στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον VDR είναι υψηλής σημασίας και μπορεί εύκολα να υποδείξει τυχόν προβλήματα στην λειτουργικότητα του υποδοχέα.⁵⁵

Η $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, δρα ως πρόσδεμα για τον VDR, ο οποίος μετά από αυτή την σύνδεση νεργοποιεί την έκφραση γονιδίων στόχων. Μπορεί να σχηματίσει είτε ομοδιμερή, είτε ετεροδιμερή με έναν εκ των RXR α , RXR β ή RXR γ ρητινοειδείς υποδοχείς. Το σύμπλοκο VDR/RXR δεσμεύεται αργότερα σε συγκεκριμένα ενισχυτικά στοιχεία, τα οποία αναφέρονται βιβλιογραφικά ως στοιχεία απόκρισης βιταμίνης D^{57,58}.

1.6 Βιταμίνη D και νευρικό σύστημα

1.6.1 Σύνθεση και μεταβολισμός της βιταμίνης D στον εγκέφαλο

Η σύνθεση της δραστικής μορφής της βιταμίνης D στον ανθρώπινο οργανισμό είναι μία διαδικασία πολλαπλών σταδίων. Η επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας στο δέρμα μετατρέπει την 7 – δευδροχοληστερόλη στην προ-βιταμίνη D₃. Η προ-βιταμίνη αυτή μεταφέρεται στο ήπαρ όπου υπό την επίδραση του ενζύμου CYP27A1 μετατρέπεται στην 25 – υδροξυ βιταμίνη D₃ η οποία σε μεγάλο βαθμό είναι αδρανής. Με μία επιπλέον υδροξυλίωση με

την βοήθεια της 1^α-υδροξυλάσης λαμβάνεται τελικά η βιολογικά ενεργή μορφή της βιταμίνης D. Αυτή η τελευταία υδροξυλίωση συμβαίνει κυρίως στους νεφρούς με την επίδραση του CYP27B1.^{59,60}

Η βιταμίνη D μπορεί να συντεθεί και να μεταβολισθεί τοπικά και στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Η παρουσία της 1α – υδροξυλάσης στους νευρώνες και στα νευρογλοιακά κύτταρα των ανθρώπινων εγκεφάλων υποδηλώνει ότι η βιολογικά ενεργή μορφή της βιταμίνης μπορεί να συντεθεί και στον εγκέφαλο. Οι δύο μεταβολίτες της βιταμίνης D φαίνεται ότι μπορούν και διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. In vitro μελέτες επιβεβαιώνουν ότι τα νευρογλοιακά κύτταρα μπορούν να μεταβολίσουν την 25-υδροξύ βιταμίνη D3 σε 1,25 δι-υδροξύ βιταμίνη D3. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι το CYP24A1, ένα βασικό ένζυμο για τον καταβολισμό της βιταμίνης βρίσκεται επίσης και στα νευρικά κύτταρα αρουραίων και σε νευρώνες και αστροκύτταρα του ανθρώπινου εγκεφάλου. Γνωρίζοντας ότι η παρουσία της βιταμίνης D ενισχύει την έκφραση του CYP24A1, μπορεί να θεωρηθεί ότι η δραστική της μορφή μπορεί να λειτουργήσει και να αυτορυθμιστεί στον εγκέφαλο.⁶¹⁻⁶⁷

1.6.2 Αλληλεπιδράσεις με το κεντρικό νευρικό σύστημα

Η επίδραση της βιταμίνης D στο νευρικό σύστημα, σχετίζεται με την παραγωγή και απελευθέρωση νευροτροφικών παραγόντων όπως ο αυξητικός νευρωτικός παράγοντας (NGF, nerve growth factor) ο οποίος είναι απαραίτητος για την διαφοροποίηση των νευρώνων. Η επίδραση της βιταμίνης D έχει ακόμα να κάνει και με την ρύθμιση νευροτροφικών παραγόντων. Πειραματικά δεδομένα έχουν δείχνουν την αύξηση των νευροτροφικών (NT-3) και την προς τα μείωση των (NT-4) με χορήγηση βιταμίνης D. Η αύξηση των NT-3 σχετίζεται με νευροπροστατευτικό αποτέλεσμα.⁶⁸

Σημαντικό ρόλο στην νευροπροστασία έχει και η ρύθμιση των επιπέδων ασβεστίου στους νευρώνες. Ο νευροπροστατευτικός ρόλος της βιταμίνης D περιλαμβάνει την σύνθεση πρωτεϊνών, όπως η παραλβουμίνη, που δεσμεύουν τα ιόντα ασβεστίου διατηρώντας την ομοιόσταση του ασβεστίου. Η βιταμίνη D μειώνει επίσης την έκφραση των διαύλων ασβεστίου μειώνοντας

έτσι την εισροή ιόντων ασβεστίου στους νευρώνες ενώ παράλληλα ρυθμίζει και το άνοιγμα των διαύλων ασβεστίου μέσω μη γονιδιωματικών επιδράσεων. Αποτρέπεται με τον τρόπο αυτό η διεγερτοτοξικότητα που προέρχεται από τα ιόντα ασβεστίου.⁶⁹

Η διατήρηση του κατάλληλου επιπέδου ασβεστίου στα νευρικά κύτταρα είναι ιδιαίτερα σημαντική για την κανονική λειτουργία του νευρικού συστήματος. Αυξημένα επίπεδα ιόντων ασβεστίου στα νευρικά κύτταρα, οδηγεί σε ενεργοποίηση της συνθάσης του αζώτου (NOS) και τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών (ROS) που επάγουν το οξειδωτικό στρες και λειτουργούν κυτταροτοξικά. Η 1,25(OH)₂ D₃ αυξάνει τα επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) στα νευρικά κύτταρα προσφέροντας προστατευτικό χαρακτήρα από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και την απόπτωση που προκαλείται από την οξειδωση.^{69,70}

Η βιταμίνη D αναστέλλει ακόμα την σύνθεση της συνθάσης του οξειδίου του αζώτου (iNOS). Όταν η συνθάση του αζώτου ενεργοποιείται, αποδίδει σημαντικές ποσότητες οξειδίου του αζώτου (NO) που ξεκινούν έναν καταρράκτη νευροτοξικότητας. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το μονοξείδιο του αζώτου (NO) είναι πρόδρομος του υπεροξυνιτρώδους ONOO, το οποίο με την σειρά του οδηγεί στην απενεργοποίηση μίας σειράς ενζύμων κατά την αντίδρασή του με ομάδες σουλφυδρυλίου (-SH). Ως αναστολέας της iNOS, η βιταμίνη D προστατεύει τον εγκέφαλο από τα υπεροξυνιτρώδη ιόντα ONOO και την βλάβη που μπορούν να προκαλέσουν στα νευρικά κύτταρα. Ο περιορισμός της δραστηριότητας της iNOS παίζει ρόλο στην προστασία των νευρώνων και αποτρέπει νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η νόσος Parkinson και η νόσος Alzheimer.^{69,71}

Η βιταμίνη D έχει ακόμα αντίκτυπο στην λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και την ανάπτυξη φλεγμονής καθώς διεγείρει την σύνθεση της ιντερλευκίνης (IL-10) που είναι γνωστή για την αντιφλεγμονώδη δράση της. Τέλος, οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις γίνονται αντιληπτές από το γεγονός ότι η βιταμίνη D αναστέλλει την παραγωγή του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF-α) και της ιντερλευκίνης (IL-6) στα αστροκύτταρα^{69,72-74}

1.6.3 Κατανομή του VDR στον εγκέφαλο

Ο υποδοχέας της βιταμίνης D φαίνεται ότι κατανέμεται ευρέως στον εγκέφαλο ενήλικων αρουραίων σύμφωνα με μελέτες που έγιναν με ραδιοσημασμένη βιταμίνη D₃. Ωστόσο, τελευταίες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την παρουσία του και στον ανθρώπινο εγκέφαλο. Η κατανομή αυτή δείχνει ότι η βιταμίνη D εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση νευρικών κυττάρων καθώς ανιχνεύεται τόσο σε αστροκύτταρα όσο και σε ολιγοδενδροκύτταρα.⁷⁵⁻
⁸¹ Η παρουσία του VDR ακόμα και στον ιππόκαμπο ή στον φλοιό υποστηρίζει τον ενεργό ρόλο της βιταμίνης D στην ρύθμιση της μάθησης, της μνήμης καθώς επίσης και των γνωστικών λειτουργιών. Ο VDR εμφανίζεται και στα οσφρινικά και οπτικά συστήματα παίζοντας καθοριστικό ρόλο σε όλο το κεντρικό νευρικό σύστημα.^{82,83}

1.6.4 Βιταμίνη D, VDR και νευρολογικές ασθένειες

Οι μελέτες για την επίδραση της βιταμίνης D και του υποδοχέα της σε διάφορες λειτουργίες του οργανισμού έχουν πολλαπλασιαστεί τα τελευταία χρόνια. Οι δύο αυτοί παράγοντες εμπλέκονται τόσο στην ανάπτυξη του εγκεφάλου όσο και στην σωστή του λειτουργία. Τα επίπεδα της βιταμίνης D έχουν συσχετιστεί άμεσα με διάφορες διαταραχές, όπως η νόσος Alzheimer και η νόσος του Parkinson, την σκλήρυνση κατά πλάκας αλλά και πολλές ψυχιατρικές και εγκεφαλο-αγγειακές διαταραχές^{72,73}.

Τα στοιχεία που ενισχύουν την άποψη αυτή για την αλληλεπίδραση της βιταμίνης D και του VDR στο κεντρικό νευρικό σύστημα είναι η ύπαρξη των υδροξυλασών που συμβάλλουν στην σύνθεση της βιταμίνης D όπως και η ύπαρξη mRNA που κωδικοποιεί το γονίδιο του VDR. Έχει παρατηρηθεί επιπλέον η έκφραση του γονιδίου του VDR σε νευρωνικά κύτταρα, που ρυθμίζουν την καλή ανάπτυξη και λειτουργία των νευρώνων⁸⁴.

1.6.5 Επιληψία και βιταμίνη D

Έχει παρατηρηθεί ότι ασθενείς που λαμβάνουν αντιεπιληπτικά φάρμακα φαίνεται να έχουν χαμηλότερα επίπεδα βιταμίνης D στον ορό του αίματος. Οι περισσότερες μελέτες που έχουν γίνει σχετικά με την επιληψία και την βιταμίνη D αφορούν την υγεία των οστών κατά την λήψη αντιεπιληπτικών φαρμάκων. Τα αντιεπιληπτικά φάρμακα (AEDs, antiepileptic drugs) και ειδικότερα τα αντιεπιληπτικά φάρμακα που επάγουν ένζυμα AEDs (EIAEDs, enzyme inducing antiepileptic drugs), έχουν συσχετιστεί με μειωμένη οστική πυκνότητα και κίνδυνο κατάγματος. Ορισμένα φάρμακα μειώνουν τα επίπεδα βιταμίνης D στον ορό του αίματος μέσω της αύξησης του καταβολισμού της. Τα φάρμακα αυτά μεταβολίζονται από ένζυμα της οικογένειας των ενζύμων του κυτοχρώματος P450, αυξάνοντας έτσι την μεταβολική κάθαρση της βιταμίνης D και την μεταβολή της σε ανενεργές μορφές (πίνακας 4). Ένας παράγοντας που συμβάλλει στον κίνδυνο αυτό είναι οι επιδράσεις των AED στον μεταβολισμό της βιταμίνης D και επομένως στην ομοίωση του ασβεστίου.⁸⁵⁻⁸⁷

Όνομα δραστικής	Ενζυμικό σύστημα
Καρβαμαζεπίνη	CYP3A4
Αιθοξυμίδα	CYP3A4
Φαινοβαρβιτάλη	CYP2C9 and CYP2C19
Φαινυτοΐνη	CYP2C9 and CYP2C19
Τιαγκαμπίνη	CYP3A4
Ζοσιναμίδη	CYP3A4

Πίνακας 4: Αντιεπιληπτικά φάρμακα επαγωγής ενζύμων (EIAEDs)⁸⁶

Λίγες είναι οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί για την συσχέτιση της επιληψίας με την βιταμίνη D, τα αποτελέσματα ωστόσο είναι ενθαρρυντικά. Συμπληρώματα βιταμίνης D δόθηκαν σε επιληπτικούς ασθενείς που λάμβαναν αντιεπιληπτική

θεραπεία και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χορήγηση βιταμίνης D μπορεί να μειώσει τους επιληπτικούς σπασμούς. Συγκεκριμένα, άτομα ανθεκτικά στην φαρμακευτική αγωγή, φαίνεται ότι εμφάνισαν μικρότερο αριθμό κρίσεων σε διάρκεια 90 ημερών μετά την έναρξη συγχορήγησης βιταμίνης D σε σύγκριση με την αρχική περίοδο.⁸⁵

1.6.6 Μηχανισμοί δράσης της βιταμίνης D στην επιληψία

Η βιταμίνη D εκφράζει την δράση της στην επιληψία με γενομικούς και μη γενομικούς μηχανισμούς. Οι γενομικοί μηχανισμοί πίσω από το αντισπασμωδικό αποτέλεσμα της βιταμίνης D βασίζονται στην ικανότητά της να ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων, μία διαδικασία που διαμεσολαβείται από τον πυρηνικό της υποδοχέα VDR. Ο VDR είναι ένας παράγοντας μεταγραφής, ο οποίος ενεργοποιείται από την βιταμίνη D και στη συνέχεια μεταβάλλει την γονιδιακή έκφραση.⁸⁸

Η αντισπασμωδική δράση του ενεργοποιημένου VDR βασίζεται στην παραγωγή μίας σειράς αντισπασμωδικών και νευροπροστατευτικών παραγόντων και στην μείωση της έκφρασης παραγόντων που μπορούν να προκαλέσουν σπασμούς.⁸⁸

Ο ενεργοποιημένος VDR είναι υπεύθυνος για την παραγωγή μίας σειράς από νευροπροστατευτικούς παράγοντες όπως οι νευροτροφίνες και ο αυξητικός παράγοντας νεύρων (NGF, nerve growth factor) οι οποίοι παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση, την διαφοροποίηση και την ανάπτυξη των νευρώνων. Ανάμεσα σε αυτούς τους παράγοντες είναι η νευροτροφίνη 3 η οποία λειτουργεί νευροπροστατευτικά ρυθμίζοντας την ομοιόσταση του ασβεστίου στους νευρώνες. Παράλληλα, ο VDR είναι υπεύθυνος για την παραγωγή παρβαλβουμίνης η οποία δεσμεύει το ασβέστιο προσυναπτικά και παρεμποδίζει την υπερβολική απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών που μπορεί να προκαλέσουν επιληπτική κρίση.⁸⁸⁻⁹⁰

Επιπλέον, μέσω του VDR αναστέλλονται μία σειρά από διεγερτικούς παράγοντες, όπως η νευροτροφίνη 4, και ένζυμα όπως η συνθετάση του νιτρικού υπεροξειδίου (iNOS) μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο για βλάβη των νευρικών κυττάρων από οξειδωτικό στρες. Μέσω του ίδιου μηχανισμού

μειώνεται η έκφραση ορισμένων κυτοκινών που μπορούν να προκαλέσουν σπασμούς, όπως η ιντερλευκίνη (IL-1β, Interleukine 1β) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF-α, tumor necrosis factor – α). Αυτές οι κυτοκίνες μπορούν να αυξήσουν την πιθανότητα για εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων με διάφορους τρόπους. Η IL-1β εμπλέκεται σε μια οδό που οδηγεί σε φωσφορυλίωση της NR2B υπομονάδας του υποδοχέα NMDA. Ο NMDA είναι ένας υποδοχέας γλουταμινικού, ο οποίος μόλις ενεργοποιηθεί επιτρέπει ιόντα ασβεστίου να εισέλθουν στο κύτταρο. Η φωσφορυλίωση της υπομονάδας του, σταθεροποιεί την ενεργοποιημένη του μορφή και αυξάνει την εισροή ιόντων ασβεστίου, οδηγώντας στην υπερδιέγερση του κυττάρου και την δημιουργία επιληπτικών κρίσεων. Η IL-1β μπορεί επίσης να προκαλέσει νευρωνική υπερευαισθησία μέσω της αύξησης της απελευθέρωσης γλουταμικού, και αναστολής της επαναπρόσληψης του. Το γλουταμικό είναι ο κύριος διεγερτικός νευροδιαβιβαστής του κεντρικού νευρικού συστήματος. Αύξηση του γλουταμικού μπορεί να οδηγήσει σε επιληπτογένεση.^{72,91-93}

Η βιταμίνη D μπορεί ακόμα να δράσει και με μη γενομικές διεργασίες. Σε αυτές περιλαμβάνονται η ρύθμιση του ασβεστίου, η αλλοστερική τροποποίηση του GABA υποδοχέα και η ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C. Η ικανότητα της βιταμίνης D να ρυθμίζει την ομοιοστάση του ασβεστίου, μπορεί να μειώσει τα επίπεδα ασβεστίου στον εγκέφαλο και να αποτρέψει τις επιληπτικές κρίσεις. Ακόμα, από την ενεργοποίηση της PKC επιτυγχάνεται η φωσφορυλίωση του GABA υποδοχέα. Με την τροποποίηση αυτή του GABA υποδοχέα, ο οποίος είναι ένας διάυλος ιόντων χλωρίου, σταθεροποιείται η ενεργοποιημένη του μορφή, επιτρέποντας ιόντα χλωρίου να εισέλθουν στο κύτταρο και οδηγώντας με τον τρόπο αυτό στην αποτροπή επιληπτικών κρίσεων. Αυτές οι οδοί μεταγωγής σήματος που θεωρήθηκε ότι μεσολαβούνταν από έναν διακριτό υποδοχέα βιταμίνης D στη μεμβράνη (VDRmem). Πιο πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι πρόκειται για την ίδια πρωτεΐνη VDR που μεσολαβεί στις γονιδιωματικές δράσεις της βιταμίνης D, οδηγώντας σε αντεπιληπτικά αποτελέσματα της βιταμίνης D⁹⁴.

1.7 Γονίδιο του VDR

1.7.1 Χαρακτηριστικά του γονιδίου

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα της βιταμίνης D (VDR gene) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 12, περιοχή 13 και αποτελείται από 14 εξώνια και 5 περιοχές υποκινητή, κάτι που μεταφράζεται σε ένα μέγεθος περίπου 100kb. Το πρώτο εξώνιο δεν μεταφράζεται, ενώ τα εξώνια 2 – 8 είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της πρωτεΐνης του VDR. Όπως είναι αναμενόμενο από το μέγεθος του γονιδίου, μπορούν να υπάρξουν περισσότεροι από 100 πολυμορφισμοί στην περιοχή του VDR, ορισμένοι από τους οποίους είναι λειτουργικά ασαφείς, όπως για παράδειγμα πολυμορφισμοί στην περιοχή του υποκινητή.⁹⁵⁻⁹⁷ Το γονίδιο το VDR μπορεί να μεταβληθεί κατά την διάρκεια της διαφοροποίησης των κυττάρων, την διαδικασία της ωρίμανσης και κατά την εμφάνιση κάποιας νόσου.^{98,99}

1.7.2 Πολυμορφισμοί του γονιδίου του VDR

Το γονίδιο του VDR, παρουσιάζει ορισμένους πολυμορφισμούς, ειδικά στις περιοχές προαγωγών κοντά στις θέσεις f και c του εξονίου 1, μεταξύ των εξονίων 2 και 9 και στην μη μεταφραζόμενη περιοχή 3'.¹⁰⁰

A. Πολυμορφισμός BsmI (rs1544410)

Βρίσκεται στο εσώνιο 8 και είναι το αποτέλεσμα υποκατάστασης μίας βάσης αδενίνης από γουανίνη. Δεν αλλάζει την αλληλουχία αμινοξέων της πρωτεΐνης, ωστόσο μπορεί να επηρεάσει την γονιδιακή έκφραση μεταβάλλοντας την σταθερότητα του mRNA.¹⁰¹

B. Πολυμορφισμός TaqI (rs731236)

Βρίσκεται στην περιοχή 3' του γονιδίου. Συμβαίνει στο εξόνιο 9 και είναι αποτέλεσμα αντικατάστασης μίας κυτοσίνης από θυμίνη. Οδηγεί σε μία σιωπηλή αλλαγή κωδικονίου από ATT σε ATC που αντιστοιχεί σε μία ισολευκίνη.^{102,103}

Γ. Πολυμορφισμός FokI (rs2228570)

Προκύπτει από την αντικατάσταση μίας κυτοσίνης από θυμίνη στην περιοχή σύνδεσης του εσωνίου 1 με το εξόνιο 2 δημιουργώντας ένα πρόσθετο κωδικόνιο έναρξης. Το αλληλόμορφο C αυτής της θέσης πολυμορφισμού παράγει έναν υποδοχέα που αποτελείται από 424 αμινοξέα, ενώ το αλληλόμορφο T κωδικοποιεί ένα προϊόν με 427 αμινοξέα. Μελέτες έχουν αναδείξει ότι το βραχύτερο πολυπεπτίδιο είναι περισσότερο αποτελεσματικό.^{104–107}

1.8 Θεραπεία

Η επιληψία είναι μία κοινή νευρολογική κατάσταση που επηρεάζει περίπου το 1% του γενικού πληθυσμού. Επιπλέον, περίπου το 10% του πληθυσμού βιώνει κάποια κρίση κατά την διάρκεια της ζωής του. Οι επιλογές θεραπείας έχουν εξελιχτεί και πλέον πέρα από τα βρωμίδια τα οποία πρώτα χρησιμοποιήθηκαν ως θεραπεία των επιληπτικών κρίσεων, υπάρχει μία ποικιλία από τρόπους θεραπείας συμπεριλαμβανομένων των φαρμάκων, των εμφυτεύσιμων συσκευών και της χειρουργικής επέμβασης. Το βασικό όπλο όμως είναι η φαρμακευτική αγωγή, με τους θεράποντες ιατρούς να έχουν τα τελευταία χρόνια στην κατοχή του μία μεγάλη γκάμα από αντιεπιληπτικά φάρμακα, με βελτιωμένο προφίλ ασφαλείας και νέους μηχανισμούς δράσης. Είναι πλέον δυνατόν να προσφερθούν προσαρμοσμένα προγράμματα θεραπείας με βάση το προφίλ του κάθε ασθενούς, η πρόκληση όμως έγκειται στην επιλογή του αρχικού φαρμάκου καθώς δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα σύγκρισης της αποτελεσματικότητας αυτών.^{108,109}

1.8.1 Ιστορική αναδρομή

Πριν από τον 19^ο αιώνα, η θεραπεία για άτομα με επιληψία ήταν βασισμένη σε πνευματικές και υπερφυσικές πεποιθήσεις, καθώς η επιληψία θεωρούνταν ότι είναι «Ιερή Νόσος» στην οποία οι πνεύματα καταλαμβάνουν το ανθρώπινο σώμα. Αυτή η κοινωνική αντίληψη δεν ευνοούσε καθόλου την ανάπτυξη κάποιου φαρμάκου για την αντιμετώπιση της επιληψίας αλλά αντίθετα είχε ως αποτέλεσμα την αποστασιοποίηση και περιθωριοποίηση των ατόμων αυτών,

κάτι το οποίο συνεχίζεται ακόμα και σήμερα στις αναπτυσσόμενες χώρες. Πρώτος ο Ιπποκράτης μίλησε για την επιληψία ως μία διαταραχή του εγκεφάλου, αλλά η άποψή του αυτή έμελε να ριζωθεί τελικά στα τέλη του 170μ. Χ. Από τις πρώτες μορφές θεραπείας αποτέλεσαν οι βοτανικές και φυτικές θεραπείες καθώς επίσης και διάφορα εμπειρικά παρασκευασμένα χημικά ή οργανικά σκευάσματα.¹¹⁰⁻¹¹²

Η πρώτη ανακάλυψη φαρμακευτικού σκευάσματος για τις επιληπτικές κρίσεις προήλθε από τον Sir Charles Locock, ο οποίος παρατήρησε ότι διάφορα ανόργανα άλατα βρωμίου, και συγκεκριμένα το βρωμιούχο κάλιο, οδηγούσαν σε ηρεμιστικά αποτελέσματα. Το βρωμιούχο κάλιο αποτέλεσε έκτοτε και για πολλά χρόνια την θεραπεία για την επιληψία, εγκαταλείφτηκε όμως μετέπειτα διότι διαθέτει χαμηλό θεραπευτικό δείκτη και λόγω μίας σειράς ανεπιθύμητων ενεργειών συμπεριλαμβανομένων των σοβαρών δερματικών αντιδράσεων, καθώς επίσης και της επίδρασης με το κεντρικό νευρικό σύστημα προκαλώντας λήθαργο, καχεξία, ψύχωση ακόμα και επιδείνωση της επιληπτικής δραστηριότητας.¹¹³

Τη θέση του βρωμιούχου καλίου έλαβε η φαινοβαρβιτάλη, η οποία έγινε διαθέσιμη το 1912 η οποία είχε ηρεμιστική και υπνωτική δράση σε σκύλους. Αργότερα συντέθηκε η φαινοβαρβιτάλη η οποία διατέθηκε εμπορικά από την Bayer με την ονομασία Luminal για την θεραπεία της αϋπνίας. Όταν το φάρμακο αυτό χρησιμοποιήθηκε σε ασθενείς με επιληψία, διαπιστώθηκε ότι είχε καλύτερη δράση από το βρωμιούχο κάλιο. Μέχρι και σήμερα η φαινοβαρβιτάλη παραμένει μία από τις κύριες θεραπείες των ασθενών με επιληψία.¹¹⁴

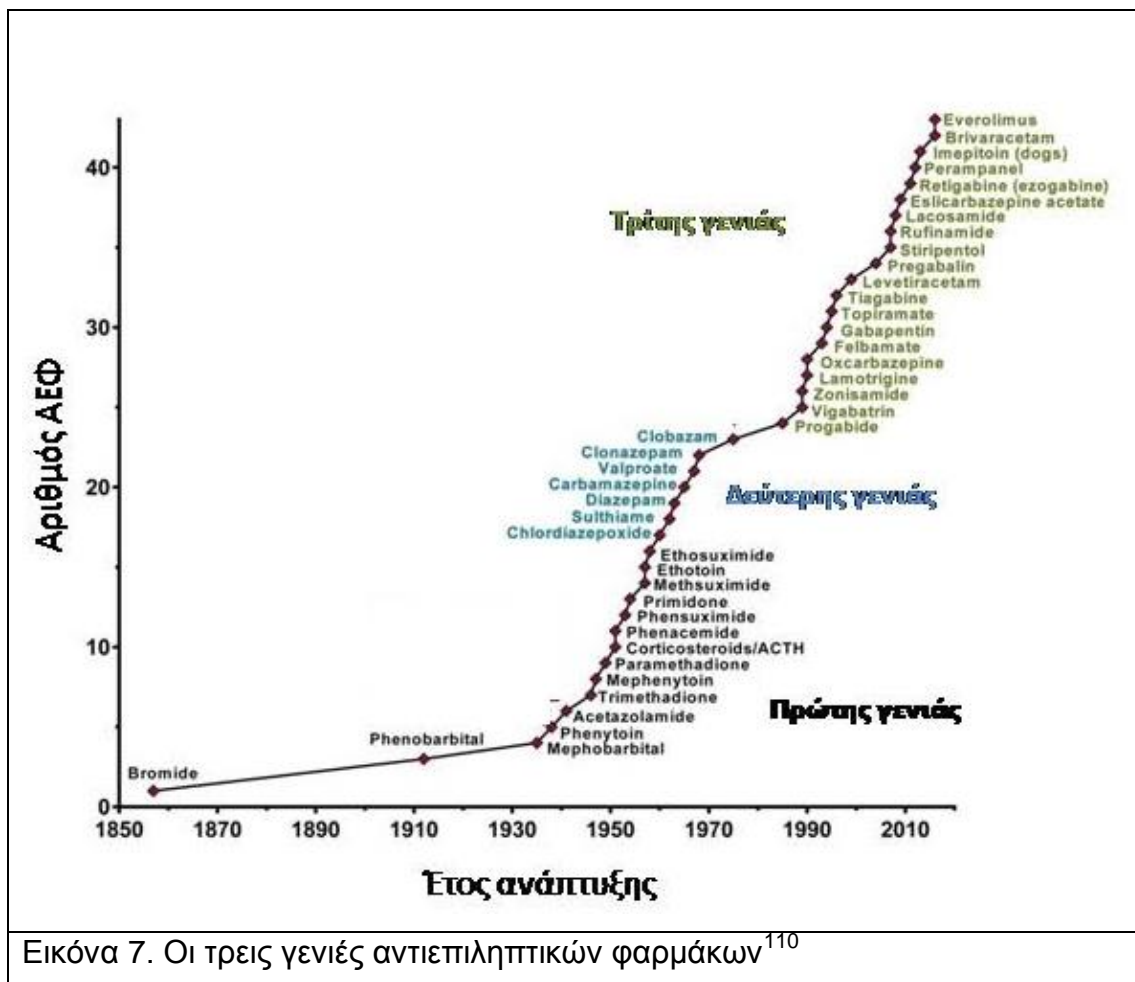
Στις αρχές της δεκαετίας του 1930 οι Merritt και Putnam, δημιούργησαν ένα απλό ζωικό μοντέλο στο οποίο με τη χρήση ηλεκτροσόκ σε γάτες, κατάφεραν να ελέγξουν εκατοντάδες ενώσεις για την αντισπασμωδική του δράση. Με τον τρόπο αυτό, ανακαλύφθηκε η φαινοτοΐνη, η οποία εμφανίστηκε να είναι πιο αποτελεσματική από το βρωμιούχο κάλιο και την φαινοβαρβιτάλη.^{115,116}

Την ανακάλυψη της φαινοτοΐνης, ακολούθησε η τριμεθαδιόνη το 1994 από τους Everett και Richards, οι οποίοι χρησιμοποίησαν ένα άλλο ζωικό μοντέλο, το μοντέλο επιληψίας σε ποντίκια. Η δοκιμασία της τριμεθαδιόνης άνοιξε τον

δρόμο για την ανακάλυψη των σουκινιμιδίων αργότερα. Τα δύο μοντέλα των Everett/Richards και Merritt/Putnam έθεσαν τα θεμέλια για μεταγενέστερες προσπάθειες ανακάλυψης φαρμάκων για την επιληψία.¹¹⁵⁻¹¹⁸

Μεταξύ της δεκαετίας 1960 και 1970, αναπτύχθηκαν μόλις δύο φάρμακα για την επιληψία, το βαλπροϊκό και η καρβαμαζεπίνη, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν αρχικά στην Ευρώπη και μετέπειτα μεταφέρθηκαν και στις Ηνωμένες Πολιτείες. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι βενζοδιαζεπίνες ανακαλύφθηκαν πρώτα στις ΗΠΑ στο Ινστιτούτο Hoffmann LaRoche στο Νιου Τζέρσυ, αλλά κυκλοφόρησαν για πρώτη φορά στο Ηνωμένο Βασίλειο το 1960 – χλωροδιαζεποξείδιο (Librium) και το 1963 η διαζεπίνη (Valium).¹¹⁹

Η συνεργασία των Ινστιτούτων υγείας των ΗΠΑ με την ερευνητική ομάδα του προγράμματος αντισπασμωδικών ελέγχων, που υιοθέτησαν την λογική χρήσης ζωικών μοντέλων για ανακάλυψη νέων φαρμάκων, έφεραν στο φως από το 1975 και έπειτα μία σειρά πρωτοποριακών φαρμάκων όπως η τοπιραμάτη και η λακοσαμίδη τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως έως σήμερα.¹¹⁸



Εικόνα 7. Οι τρεις γενιές αντιεπιληπτικών φαρμάκων¹¹⁰

Όπως φαίνεται παραπάνω (Εικόνα 7), τα αντιεπιληπτικά φάρμακα χωρίζονται σε πρώτης, δεύτερης και τρίτης γενιάς. Στα πρώτης γενιάς, τα ευρέως χρησιμοποιούμενα είναι η φαινυτοΐνη, η φαινοβαρβιτάλη, η καρβαμαζεπίνη, το βαλπροϊκό οξύ, η ζοσιναμίδη και η κλοβαζάμη. Η ζοσιναμίδη κατατάσσεται στα φάρμακα δεύτερης γενιάς στη Βόρεια Αμερική και στην Ευρώπη. Τα φάρμακα της τρίτης γενιάς συχνά αναφέρονται και ως νεότερα αντιεπιληπτικά φάρμακα. Μερικά από αυτά είναι η γκαμπαπεντίνη, η τοπιραμάτη, η λαμοτριγίνη και η λεβετιρακετάμη. Αρκετά από τα φάρμακα αυτά συνιστώνται ως φάρμακα πρώτης και δεύτερης γραμμής, με την καρβαμαζεπίνη και το βαλπροϊκό να είναι τα κυρίαρχα για εστιακές και γενικευμένες κρίσεις.^{120–122}

Τα περισσότερα νέα αντιεπιληπτικά φάρμακα, φαίνεται ότι έχουν καλύτερο φαρμακολογικό προφίλ έναντι των παλαιότερων. Αυτό πρακτικά σημαίνει λιγότερες τερατογεννέσεις και καλύτερη ανταπόκριση από τους ασθενείς. Αρκετά από αυτά είναι πρωτοπόρα, από την άποψη ότι διαθέτουν νεότερους

μηχανισμούς δράσης . Έχουν δηλαδή μοναδικές θέσεις σύνδεσης κάτι το οποίο τα καθιστά και κατάλληλα για συνδυαστική θεραπεία^{105–109}

1.8.2 Μηχανισμός δράσης

Η μεγάλη ποικιλία αντιεπιληπτικών φαρμάκων καθιστά απαραίτητη την ανάγκη ταξινόμησής του ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης τους. Έτσι διακρίνουμε :

1. Φάρμακα που διαμορφώνουν τα κανάλια ιόντων εμποδίζοντας την νευρωνική υπερδιέγερση.
2. Φάρμακα που ενισχύουν την ανασταλτική νευροδιαβίβαση μέσω ενίσχυσης του GABA.
3. Φάρμακα που ελαττώνουν την διεγερτική νευροδιαβίβαση μέσω της ρύθμισης του γλουταμικού.

1.8.2.1 Δίαυλοι ιόντων

Στο κεντρικό νευρικό σύστημα, τα τασο εξαρτώμενα κανάλια ιόντων ελέγχουν την ροή των κατιόντων κατά μήκος των μεμβρανών. Η δράση των αντιεπιληπτικών φαρμάκων στα κανάλια ιόντων, σταθεροποιεί τις νευρωνικές μεμβράνες, μπλοκάρει την νευρωνική υπερδιέγερση, μειώνει την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών και αποτρέπει την εξάπλωση επιληπτικών κρίσεων. Η αντισπασμωδική αυτή δράση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε κανάλια νατρίου, ασβεστίου και καλίου.^{123–126}

A. Δίαυλος νατρίου

Τα τασο εξαρτώμενα κανάλια νατρίου είναι υπεύθυνα για την αύξηση του νευρωνικού δυναμικού και ελέγχουν την ικανότητα διέγερσης του νευρικού συστήματος. Αποτελούνται από έναν αριθμό υπομονάδων οι οποίες σχηματίζουν έναν νάτριο – εκλεκτικό πόρο. Το κύριο δομικό συστατικό τους είναι η α – υπομονάδα η οποία συνδέεται με δύο βοηθητικές υπομονάδες β_1 και β_2 οι οποίες δεν είναι απαραίτητες για την βασική λειτουργία του διαύλου, φαίνεται όμως ότι διαμορφώνουν την έκφραση και την λειτουργία ορισμένων καναλιών. Υπάρχουν τέσσερα κυρίαρχα γονίδια α – υπομονάδας διαύλου

νατρίου που εκφράζονται στον εγκέφαλο των θηλαστικών και δηλώνονται ως SCN1A, SCN2A, SCN3A, SCN8A, τα οποία κωδικοποιούν τα κανάλια Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3 και Nav1.6 αντίστοιχα. Κάθε ένα από αυτά εκφράζονται διαφορετικά στο νευρικό σύστημα, όπως για παράδειγμα το Nav1.3 περιορίζεται στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης, το Nav1.2 κυριαρχεί στον ανώριμο εγκέφαλο ενώ το Nav1.6 γίνεται πιο διαδεδομένο κατά την ωρίμανση. Σε φυσιολογικά δυναμικά μεμβράνης, τα περισσότερα κανάλια νατρίου βρίσκονται κλειστά σε κατάσταση ηρεμίας. Μετά από την αποπόλωση, το κανάλι ενεργοποιείται επιτρέποντας την ροή ιόντων. Μετά από επαναπόλωση της νευρικής μεμβράνης, επαναφέρεται εκ νέου σε κατάσταση ηρεμίας από την οποία μπορεί να ανταποκριθεί σε επακόλουθες επαναπολώσεις. Η διαδικασία αυτή, η μετάβαση δηλαδή στην ενεργή ή στην ανενεργή μορφή, γίνεται σε λίγα μόλις χιλιοστά του δευτερολέπτου.^{108,126,127}

Τα αντιεπιληπτικά φάρμακα αυτής της κατηγορίας είναι οι ανταγωνιστές διαύλων νατρίου και ο ρόλος τους είναι η απενεργοποίηση αυτών. Τέτοια φάρμακα είναι η φαινυτοΐνη, η καρβαμαζεπίνη, η λαμοτριγίνη, η φελπμαμάτη, η τοπιραματη και η οξκαρβαζεπίνη.¹²⁸

B. Δίαυλος ασβεστίου

Τα τασο εξαρτώμενα κανάλια ασβεστίου παίζουν σημαντικό ρόλο στην συνολική διέγερση των νευρώνων, εμπλέκονται στενά με την νευρωνική υπερδιέγερση και είναι υπεύθυνα για τον έλεγχο της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών προ – συναπτικά. Μοιάζουν δομικά με τα κανάλια νατρίου που προαναφέρθηκαν, καθώς αποτελούνται δομικά από μία α – υπομονάδα, ενώ παράλληλα συνδέονται με βοηθητικές υπομονάδες τύπουβ, 2α και d που ρυθμίζουν την λειτουργία και την έκφραση της πρώτης. Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, ανάλογα με το δυναμικό της μεμβράνης στο οποίο ενεργοποιούνται. Έτσι, υπάρχουν οι δίαυλοι χαμηλής τάσης (LVA) οι οποίοι ενεργοποιούνται ως απόκριση σε αποπολώσεις μικρών δυναμικών και απενεργοποιούνται γρήγορα, και τους δίαυλους υψηλής τάσης (HVA) οι οποίοι υποκατηγοριοποιούνται στους τύπους L, N, P, Q και R. Οι δίαυλοι αυτοί κατανέμονται σε όλο το νευρικό σύστημα. Ειδικότερα οι δίαυλοι τύπου N, P και Q φαίνεται ότι εμπλέκονται στον έλεγχο της απελευθέρωσης

νευροδιαβιβαστών στη σύναψη. Στους αναστολείς διαύλων ασβεστίου χαμηλής τάσης ανήκουν η αιθοξιμίδη, η ζοσιναμίδη και πιθανώς το βαλπροϊκό, ενώ στους αναστολείς υψηλής τάσης η λαμοτριγίνη, η φελμπαμάτη, η τοπιραμάτη και η φαινοβαρβιτάλη.^{126,128-130}

Γ. Δίαυλος καλίου

Τα κανάλια καλίου ανήκουν στην μεγαλύτερη και πιο διαδεδομένη οικογένεια καναλιών ιόντων που λαμβάνουν μέρος στην ρύθμιση μίας ποικιλίας φυσικών λειτουργιών. Είναι μεγάλα πρωτεϊνικά σύμπλοκα που σχηματίζουν τετραμερείς δομές, τα μονομερή των οποίων σχετίζονται δομικά και γενετικά με τις α και $\alpha 1$ υπομονάδες των διαύλων νατρίου και ασβεστίου. Μέχρι σήμερα, έχουν εντοπιστεί περισσότερα από 80 διαφορετικά γονίδια που κωδικοποιούν τις α – υπομονάδες καναλιών καλίου, μαζί με πολλές βοηθητικές υπομονάδες. Όπως είναι αναμενόμενο μπορούν να εκφραστούν αμέτρητοι πληθυσμοί καναλιών καλίου με ξεχωριστές λειτουργίες και κατανομές στον εγκέφαλο των θηλαστικών. Είναι υπεύθυνα για την επαναπόλωση της μεμβράνης μετά από την ενεργοποίηση του διαύλου νατρίου. Η άμεση ενεργοποίηση των τασο εξαρτώμενων διαύλων καλίου υπερπολώνει την κυτταρική μεμβράνη και αποτρέπει μία πιθανή νευρωνική υπερδιέγερση. Επομένως ενεργοποιητές των καναλιών καλίου είναι πιθανό να έχουν αντισπασμωδική δράση σε πειραματικά μοντέλα επιληπτικών κρίσεων.^{126,131-133}

1.8.2.2 Φάρμακα που ενισχύουν την ανασταλτική νευροδιαβίβαση μέσω ενίσχυσης του GABA

Το GABA είναι ο κύριος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής στο κεντρικό νευρικό σύστημα των θηλαστικών. Συντίθεται από το γλουταμινικό με την δράση του ενζύμου αποκαρβοξυλάση. Μετά την απελευθέρωσή του συνδέεται με τους υποδοχείς GABA-A και GABA-B. Ο GABA-A υποδοχέας είναι μία πολυμερής, μακρομοριακή πρωτεΐνη που σχηματίζει έναν επιλεκτικό προς τα ιόντα χλωρίου πόρο. Μόλις το GABA συνδεθεί, διευκολύνεται η δίοδος ιόντων χλωρίου στο κύτταρο. Τα ιόντα χλωρίου καθιστούν την αποπόλωση του κυττάρου πιο δύσκολη. Φάρμακα τα οποία ενεργοποιούν τον GABA-A

υποδοχέα άμεσα η αλλοστερικά είναι οι βενζοδιαζεπίνες και τα βαρβιτουρικά καθώς επίσης και η φελμπαμάτη και η τοπιραμάτη.^{126,128}

Μερικά αντιεπιληπτικά φάρμακα αυξάνουν την συγκέντρωση του GABA αυξάνοντας έτσι την ανασταλτική του δράση (βαλπροϊκό, γκαμπαπεντινη) ή τείνουν να ανταγωνίζονται την επαναπρόσληψη του GABA στους νευρώνες και τα νευρογλοιακά κύτταρα (τιαγκαμπίνη).^{125,134}

1.8.2.3 Φάρμακα που ελαττώνουν την διεγερτική νευροδιαβίβαση μέσω ρύθμισης του γλουταμικού

Το γλουταμινικό αποτελεί τον κύριο διεγερτικό νευροδιαβιβαστή στον εγκέφαλο των θηλαστικών. Από πειραματικά δεδομένα που προήλθαν από μελέτες σε ζώα, προέκυψε ότι η υπερβολική διεγερτική νευροδιαβίβαση με την μεσολάβηση του γλουταμινικού μπορούν να συμβάλουν στην επιληπτική δραστηριότητα.^{126,128,135}

Η υπερδιέγερση αυτή που προκαλεί επιληπτογένεση, γίνεται μέσω ενεργοποίησης ιοντοτροπικών υποδοχέων. Τέτοιοι υποδοχείς είναι οι N-μέθυλο-D-ασπαρτικοί (NMDA), οι α-αμινο-3-υδροξυ-5-μεθυλο-4-ισοξαλοξικο-προπιονικοί (AMPA) και οι καινικοί. Η σύνδεση του γλουταμινικού σε αυτούς τους υποδοχείς, επιτρέπει την δίοδο νατρίου και ασβεστίου στο κύτταρο, οδηγώντας σε ενισχυμένη νευρωνική διεγερσιμότητα.^{135,136}

Πολλά αντιεπιληπτικά φάρμακα δρουν είτε μέσω του αποκλεισμού των ιοντοτροπικών υποδοχέων γλουταμινικού, είτε μειώνοντας την απελευθέρωση γλουταμικού οξέος. Τέτοια φάρμακα είναι η φελμπαμάτη και η τοπιραμάτη τα οποία μειώνουν την νευρική διεγερσιμότητα μέσω των υποδοχέων NMDA, AMPA και καινικών.^{125,126}

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β: ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟ

2.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της συχνότητας εμφάνισης των πολυμορφισμών rs2228570 (FokI), rs1544410 (BsmI) και rs731236 (TaqI) του γονιδίου του υποδοχέα της βιταμίνης D σε ασθενείς με εστιακή επιληψία. Για τον λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε σύγκριση της εμφάνισης των ανωτέρω πολυμορφισμών με γονιδιακά δεδομένα υγείων εθελοντών από την βιοτράπεζα της Ερευνητικής Ομάδας Κλινικής Φαρμακολογίας και Φαρμακογονιδιωματικής του Τμήματος Φαρμακευτικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν για την έγκαιρη πρόβλεψη της πιθανότητας εμφάνισης επιληψίας στα πλαίσια της προληπτικής και εξατομικευμένης θεραπείας. Οι παραπάνω πολυμορφισμοί θα μπορούσαν με άλλα λόγια να αξιοποιηθούν ως βιοδείκτες για την προδιάθεση εμφάνισης επιληψίας.

2.2 Ασθενείς και μέθοδοι

Στη μελέτη συμμετείχαν συνολικά 128 ασθενείς με εστιακή επιληψία. Οι ασθενείς αυτοί προέρχονται από τα Εξωτερικά Ιατρεία της Α΄ Νευροχειρουργικής Κλινικής του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Ο Ευαγγελισμός». Υπεύθυνος ιατρός της μελέτης ήταν ο αναπληρωτής καθηγητής και νευρολόγος, Γκατζώνης Στέργιος – Στυλιανός.

Η συμμετοχή των ασθενών στην μελέτη ήταν εθελοντική, αφού μελέτησαν και υπέγραψαν το έντυπο ενυπόγραφης συγκατάθεσης (Informed Consent, IC). Στο έντυπο αυτό παρέχονταν πληροφορίες σχετικά με τον σκοπό της μελέτης, το είδος του βιολογικού δείγματος που θα χρησιμοποιούνταν για την μελέτη καθώς επίσης και για την διαδικασία τήρησης του ιατρικού απορρήτου μέσω της διαδικασίας την ανωνυμοποίησης των δειγμάτων. Το παραπάνω έγγραφο υπογράφεται και από τον υπεύθυνο ιατρό.

Μετά την συγκατάθεσή τους για την συμμετοχή τους στην μελέτη, οι ασθενείς συμπληρώνουν με την βοήθεια του υπεύθυνου ιατρού ένα ειδικά σχεδιασμένο ερωτηματολόγιο (Case Report Form–CRF).

Το ερωτηματολόγιο αυτό περιλαμβάνει:

- κοινωνικά και δημογραφικά στοιχεία του ασθενούς
- στοιχεία για το ύψος και το βάρος του ασθενούς
- στοιχεία για το κάπνισμα
- οικογενειακό ιστορικό
- ατομικό ιστορικό
- ιστορικό φαρμακευτικής αγωγής
- καταγραφή ανεπιθύμητων ενεργειών και αντίστασης ως προς τη φαρμακευτική αγωγή

Με την συμπλήρωση του ερωτηματολογίου, κάθε ασθενής λαμβάνει έναν μοναδικό κωδικό ο οποίος αναγράφεται στο δείγμα που έδωσε για την μελέτη και στο ερωτηματολόγιο. Το ονοματεπώνυμο το ασθενούς αναγράφεται μόνο στο έντυπο ενυπόγραφης συγκατάθεσης το οποίο παραμένει στο νοσοκομείο «Ο Ευαγγελισμός». Το δείγμα αφού παραληφθεί από το εργαστήριο της Ερευνητικής Ομάδας Κλινικής Φαρμακολογίας και Φαρμακογονιδιωματικής λαμβάνει νέο κωδικό. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται η ανωνυμοποίηση της διαδικασίας και τηρείται η προστασία των προσωπικών δεδομένων του ασθενούς.

2.2.1 Κριτήρια εισαγωγής και αποκλεισμού ασθενών στη μελέτη

Στην μελέτη συμπεριλήφθηκαν άτομα τα οποία πληρούσαν όλες τις παρακάτω προϋποθέσεις.

- **Κριτήρια εισαγωγής**
 - Καυκάσιοι άνδρες και γυναίκες ηλικίας 18 ετών και άνω με προέλευση από την ευρύτερη περιοχή της Νοτιοανατολικής Ευρώπης-Βαλκανικής

- Διαγνωσμένη νευρολογική ασθένεια
- Ενυπόγραφη συγκατάθεση του ασθενούς

Από την μελέτη αποκλείστηκαν άτομα τα οποία είχαν τουλάχιστον ένα από τα παρακάτω χαρακτηριστικά

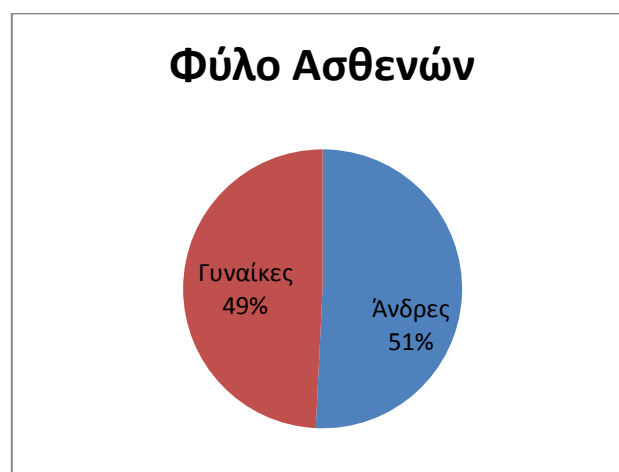
- **Κριτήρια αποκλεισμού**

- Άτομα με καρκίνο
- Άτομα με νοητική στέρωση
- Ασθενείς κάτω των 18 ετών

2.2.2 Δημογραφικά στοιχεία ασθενών

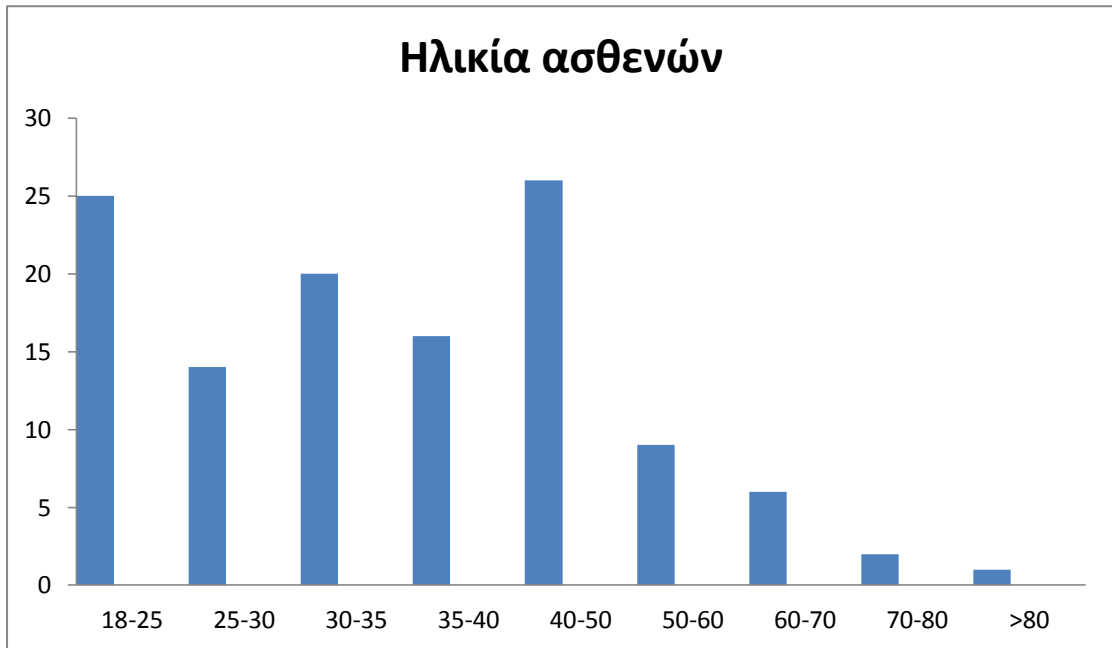
Στη μελέτη έλαβαν μέρος 128 ασθενείς με βέβαιη διάγνωση επιληψίας εκ των οποίων οι 63 (49.2%) ήταν γυναίκες και οι 65 (50.8%) άνδρες. (Γράφημα 1)

Γράφημα 1: κατανομή ασθενών με επιληψία με βάση το φύλο



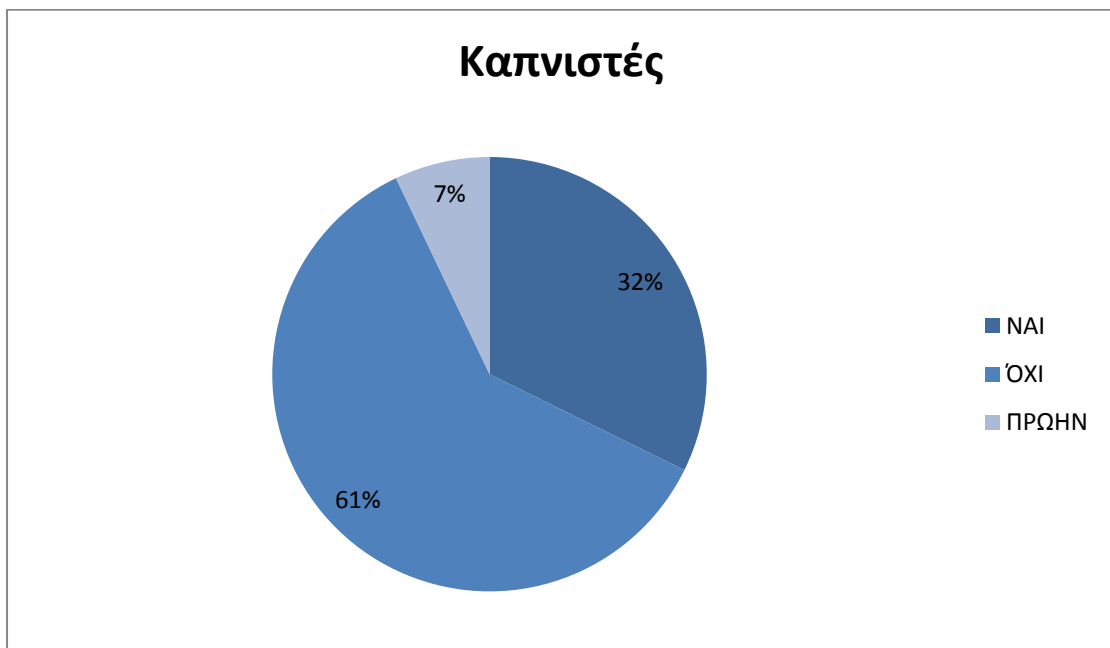
Η ηλικία των ασθενών ήταν άνω των 18, με επικρατέστερη ηλικιακή κλάση την 40-50.(Γράφημα 2)

Γράφημα 2: Ηλικιακή κατανομή ασθενών με επιληψία



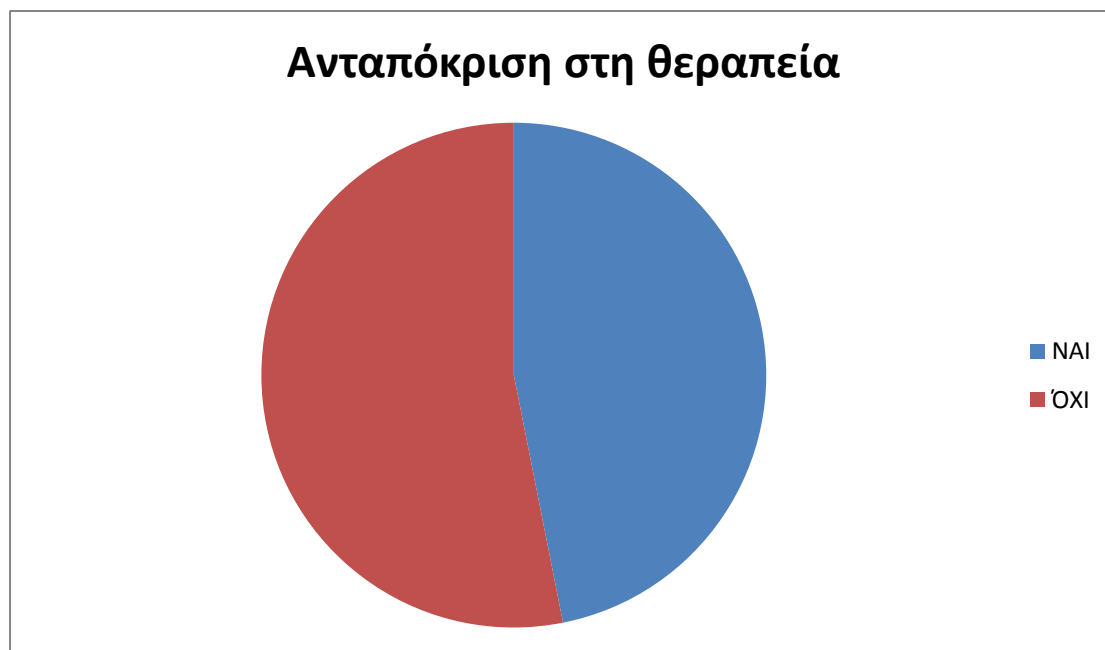
Όσον αφορά το κάπνισμα, οι 41 (32%) είναι καπνιστές, οι 77 (61%) δεν είναι ενώ 9 (7%) από αυτούς υπήρξαν καπνιστές στο παρελθόν. (Γράφημα 3)

Γράφημα 3: κατανομή των ασθενών με βάση το κάπνισμα



Τέλος, σχετικά με την θεραπεία, οι 60 από αυτούς είχαν καλή ανταπόκριση στην αγωγή που λάμβαναν, ενώ οι 68 από αυτούς ήταν ανθεκτικοί. (Γράφημα 4)

Γράφημα 4: Κατανομή των ασθενών με βάση την ανταπόκριση στη θεραπεία



2.3 Λήψη δείγματος

Μετά την συγκατάθεση των εθελοντών ασθενών και αφού έγινε έλεγχος από τον υπεύθυνο ιατρό ότι τηρούν όλες τις προϋποθέσεις για να ενταχθούν στην μελέτη, έγινε λήψη περιφερικού αίματος περίπου 15ml από τα οποία μεταφέρθηκαν σε ένα φιαλίδιο με αντιπηκτικό EDTA και σε δύο φιαλίδια χωρίς αντιπηκτικό.

Ακολούθησε ανωνυμοποίηση των δειγμάτων έτσι ώστε το εργαστήριο της Ερευνητικής Ομάδας Φαρμακολογίας και Φαρμακογονιδιωματικής να μην μπορεί να ταυτοποιήσει τον ασθενή.

Η μεταφορά των δειγμάτων από το Γ.Ν.Α. «Ο Ευαγγελισμός» προς το εργαστήριο έγινε με την χρήση ειδικού δοχείου ψύξης (+3° έως +10°C) και σε χρονικό διάστημα 2 ωρών από την λήψη τους από τον υπεύθυνο ιατρό.

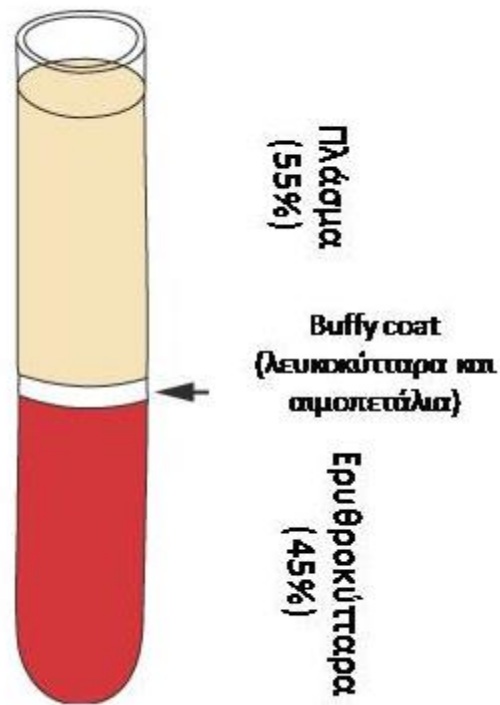
Κατά την είσοδό τους στο εργαστήριο, τα δείγματα έλαβαν εκ νέου νέο κωδικό και αρχειοθετήθηκαν σε ηλεκτρονική βάση καταγραφής του ιστορικού του κάθε ασθενή εθελοντή.

2.4 Επεξεργασία αίματος

2.4.1 Διαχωρισμός και απομόνωση στοιχείων του αίματος

Πραγματοποιήθηκε λήψη 500μl ολικού αίματος από το φιαλίδιο με το αντιπηκτικό τα οποία φυλάχθηκαν σε ψύξη -20°C τα οποία αξιοποιήθηκαν για την απομόνωση του DNA όπως αυτή περιγράφεται παρακάτω. Ακολούθησε φυγοκέντριση τόσο των φιαλιδίων με αντιπηκτικό όσο και αυτών χωρίς αντιπηκτικό για 10min σε 3.000rpm. Μετά το πέρας της φυγοκέντρισης είναι διακριτά τα εξής:

- Από το φιαλίδιο με το αντιπηκτικό διακρίνονται δύο στιβάδες, το ίζημα με τα έμμορφα κυτταρικά στοιχεία του αίματος, και ένα κιτρινωπό υπερκείμενο υγρό (πλάσμα). Μεταξύ ιζήματος και πλάσματος διακρίνεται μία λευκή στιβάδα (buffy coat) λευκοκυττάρων η οποία απομονώθηκε και φυλάχθηκε στους -80°C .
- Από το φιαλίδιο χωρίς αντιπηκτικό, λαμβάνονται το ίζημα που περιέχει τον θρόμβο που σχηματίζεται κατά την πήξη του αίματος και αποτελείται από τα έμμορφα στοιχεία και το ινωδογόνο, και ένα υπερκείμενο κιτρινωπό υγρό (ορός). Τα φιαλίδια αυτά περιέχουν και ένα είδος πηκτής (gel) που διευκολύνει τον διαχωρισμό των δύο στιβάδων. (Εικόνα 8)



Εικόνα 8. Φυγοκεντρίμενο αίμα με προσθήκη αντιπηκτικού EDTA¹³⁹

2.4.2 Υλικά – Εξοπλισμός

- Σωληνάριο Vacutainer K2EDTA
- Σωληνάριο
- Πιπέτες Pasteur 1ml (Nerbe Plus, Germany)
- Πιπέτα μεταβαλλόμενου όγκου 100-1000μL (PIPETMAN Neo Gilson Inc. US)
- Αναλώσιμα στόμια filter tips 100-1000μl (Nerbe Plus GmbH, Germany)
- Σωληνάρια τύπου Eppendorf 1,5ml (Eppendorf, Germany)

2.4.3 Πρωτόκολλο

Παρακάτω περιγράφεται η επεξεργασία των δειγμάτων:

1. Λήψη 500 μL ολικού αίματος από το φιαλίδιο με το αντιπηκτικό EDTA (γενική αίματος) και φύλαξη της -20°C για την απομόνωση DNA
2. Φυγοκέντρηση των δύο φιαλιδίων πήξης (χωρίς αντιπηκτικό) και του φιαλιδίου με αντιπηκτικό για 10 min της 3.000 rpm
3. Απομόνωση buffy coat από το φιαλίδιο με το αντιπηκτικό, δηλαδή του κλάσματος του αίματος που περιέχει τα έμμορφα συστατικά (λευκά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια)
4. Απομόνωση ορού και πήγματος από το φιαλίδιο χωρίς αντιπηκτικό
5. Αποθήκευση ορού, πήγματος και buffy coat σε ξεχωριστά φιαλίδια της -80°C .

2.5 Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση του DNA από τα δείγματα αίματος των ασθενών χρησιμοποιήθηκε το innuPREP Blood DNA Midi Kit (Analytik Jena, Germany). Η απομόνωση του DNA με έτοιμα kit ενδείκνυται για την ταυτόχρονη επεξεργασία πολλών δειγμάτων και οδηγεί στην απομόνωση καθαρού και υψηλής απόδοσης DNA.

2.5.1 Αρχή μεθόδου

Σύμφωνα με το εγχειρίδιο του κατασκευαστή, το innuPREP Blood DNA Midi Kit βασίζεται στην εκλεκτική δέσμευση του DNA σε πάνω σε στήλες που έχουν ως βάση το διοξείδιο του πυριτίου (silica – based membranes). Είναι μία μέθοδος εκχύλισης στερεάς φάσης, και πιο συγκεκριμένα είναι ένα είδος χρωματογραφίας συγγένειας.

Η διαδικασία της απομόνωσης του DNA περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Την λύση της μεμβράνης των λευκών αιμοσφαιρίων και την απελευθέρωση του DNA από αυτά
- Την δέσμευση του DNA πάνω στην στήλη πυριτίου
- Τον καθαρισμό του DNA με την απομάκρυνση των υπόλοιπων συστατικών του αίματος
- Την έκλυση του καθαρού DNA που επιτυγχάνεται με την αποδέσμευση του DNA από την στήλη πυριτίου. (Εικόνα 9)



Εικόνα 9: Διαδικασία απομόνωσης DNA¹⁴⁰

Η λύση των κυττάρων πραγματοποιείται συνήθως με διαλύματα αλάτων. Το αντιδραστήριο λύσης περιέχει συνήθως και κάποιο απορρυπαντικό για την διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών και των λιπιδίων και τη διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών.

Μετά την λύση των κυττάρων, το DNA δεσμεύεται πάνω στην στήλη και καθαρίζεται από το υπόλοιπο κυτταρικό υλικό, δηλαδή το RNA, τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες.

Με τη χρήση ειδικών ρυθμιστικών διαλυμάτων για έκπλυση και ρύθμιση του pH, κατάλληλων συγκεντρώσεων αλάτων και διαδοχικών φυγοκεντρήσεων, κατακρατάται στην στήλη μόνο το DNA, ενώ οι πρωτεΐνες και άλλες προσμίξεις διαπερνούν τη μεμβράνη και αποβάλλονται. Το DNA που απομονώνεται με αυτόν τον τρόπο, εκλύεται από τη στήλη σε ελαφρώς αλκαλικό διάλυμα (elution buffer), και είναι έτοιμο είτε να χρησιμοποιηθεί για αντιδράσεις PCR είτε να αποθηκευτεί στους -20°C για μετέπειτα χρήση.

2.5.2 Αντιδραστήρια και εξοπλισμός

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- InnuPREP Blood DNA Midi Kit της Analytik Jena
 - Ery Lysis Solution A (διάλυμα λύσης)
 - Ery Lysis Solution B (διάλυμα λύσης)
 - Lysis Solution TLS (διάλυμα λύσης)
 - Precipitation Buffer (ρυθμιστικό διάλυμα καθίζησης)
 - Πρωτεΐνάση K
 - Washing Solution MS (διάλυμα έκπλυσης)
 - Elution Buffer (διάλυμα έκλουσης)
 - Spin Filters (στήλες συλλογής)
 - Receiver Tubes (φιαλίδια συλλογής)
 - Elution Tubes (φιαλίδια έκλουσης)
- Αιθανόλη EtOH (70%, Merck, Germany)
- Απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό, ελεύθερο νουκλεασών και πυρετογόνων
- Επωαστήρας (Techne DRI-BLOCK DB.3, UK)
- Συσκευή Vortex (Vibrofix VF1 Electronic, IKA Labortechnik, Janke & Kunkel, Germany)
- Μικροφυγόκεντρος (Centrifuge 5424, Eppendorf, Germany)
- Μηχανικές πιπέτες ακριβείας 2-20 μL , 10-100 μL , 100-1000 μL (Eppendorf)
- Αναλώσιμα στόμια πιπετών 100 μL και 1000 μL (Saarstedt, Germany)
- Σωληνάρια τύπου Eppendorf 1,5 mL (Microtube Eppendorf)

Η διαδικασία απομόνωσης DNA περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Τα 500 μL ολικού αίματος που έχουν αποθηκευτεί στους -20°C αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να ξεπαγώσουν
2. Προσθήκη 1 mL Ery Lysis Solution A και vortex
3. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min
4. Φυγοκέντρηση για 3 min στις 6.000 rpm

5. Απόρριψη υπερκειμένου
6. Προσθήκη 1 mL Ery Lysis Solution B και vortex για 10 sec
7. Απόρριψη υπερκειμένου
8. Προσθήκη 200 μ L Lysis Solution TLS και 25 μ L Πρωτεϊνάσης K και vortex για 10 sec
9. Επώαση στους 70°C για 1h (μέχρι να διαλυθεί το ίζημα)
10. Σύντομο vortex 3-4 φορές κατά τη διάρκεια της επώασης για να εξασφαλιστεί η διαλυτοποίηση του ιζήματος
11. Προσθήκη 75 μ L Precipitation Buffer και vortex για 10 sec
12. Φυγοκέντρηση για 3 min στις 12.000 rpm
13. Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο eppendorf 1,5 mL
14. Προσθήκη 500 μ L 70% αιθανόλης και vortex
15. Μεταφορά του διαλύματος στη στήλη
16. Τοποθέτηση της στήλης σε φιαλίδιο συλλογής
17. Φυγοκέντρηση για 2 min στις 12.000 rpm
18. Τοποθέτηση της στήλης σε νέο φιαλίδιο συλλογής
19. Προσθήκη 750 μ L Washing Solution MS στη στήλη
20. Φυγοκέντρηση για 1 min στις 12.000 rpm
21. Τοποθέτηση της στήλης σε νέο φιαλίδιο συλλογής
22. Φυγοκέντρηση για 2 min στις 12.000 rpm, για να απομακρυνθούν όλα τα υπολείμματα αιθανόλης
23. Απόρριψη του φιαλιδίου συλλογής και μεταφορά της στήλης σε ένα φιαλίδιο έκλουσης
24. Προσθήκη 100 μ L Elution Buffer στη στήλη
25. Επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου
26. Φυγοκέντρηση για 1 min στις 10.000 rpm
27. Επανάληψη των βημάτων 24-26 για αύξηση της απόδοσης της διεργασίας
28. Αποθήκευση του DNA στους -20°C

2.6 Φωτομέτρηση διαλυμάτων DNA

Μετά την απομόνωση του DNA ακολούθησε η φωτομέτρηση των δειγμάτων για να γίνει έλεγχος της καθαρότητας και εκτίμηση της ποσότητας του DNA που απομονώθηκε.

2.6.1 Αρχή μεθόδου

Η φασματοφωτομετρία βασίζεται στην ιδιότητα των μορίων να απορροφούν εκλεκτικά μέρος της ακτινοβολίας του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία αλληλεπιδρά με την ύλη οδηγώντας στη διέγερση των ηλεκτρονίων των εξωτερικών στιβάδων και στην παροδική μετάπτωσησή τους σε μοριακά τροχιακά υψηλότερων ενεργειών. Κατά την αποδιέγερσή τους τα μόρια αποδίδουν την ενέργεια που έχει απορροφηθεί είτε με τη μορφή θερμότητας, είτε με τη μορφή φωσφορισμού ή φθορισμού.

Στη φασματοφωτομετρία υπεριώδους/ορατού (ultraviolet/visible – UV/Vis) με μήκος κύματος 200-750 nm, κάθε χημική ένωση έχει ένα χαρακτηριστικό μήκος κύματος (λ_{\max}) στο οποίο εμφανίζει τη μέγιστη απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Τα νουκλεϊκά οξέα εμφανίζουν το μέγιστο της απορρόφησής τους στα 260 nm. Κατά τη φωτομέτρηση μετρείται η απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στο λ_{\max} και με βάση το νόμο Lambert-Beer υπολογίζεται η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων με βάση την απορρόφηση αυτή.

Για την εκτίμηση της καθαρότητας του δείγματος μετρείται η απορρόφηση σε δύο μήκη κύματος, στα 260 nm και στα 280 nm, και στη συνέχεια υπολογίζεται ο λόγος των δύο απορροφήσεων $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$.

- Τιμές του λόγου $1,8 < A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} < 2$ είναι αποδεκτές, καθώς ο λόγος $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 1,8$ είναι χαρακτηριστικός διαλύματος καθαρού DNA.
- Τιμές του λόγου $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} < 1,7$ είναι ενδεικτικές της ύπαρξης προσμίξεων, συνήθως πρωτεϊνών ή φαινόλης, αν αυτή χρησιμοποιήθηκε κατά τη διαδικασία απομόνωσης DNA.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης DNA βασίζεται στο νόμο Lambert-Beer και αναμένεται συγκέντρωση DNA μεταξύ 5 – 50 $\mu\text{g/mL}$, καθώς σε αυτές τις συγκεντρώσεις εμφανίζεται γραμμική συσχέτιση με την απορρόφηση στα 260 nm.

2.6.2 Αντιδραστήρια-Υλικά-Εξοπλισμός

Για τη φωτομέτρηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν:

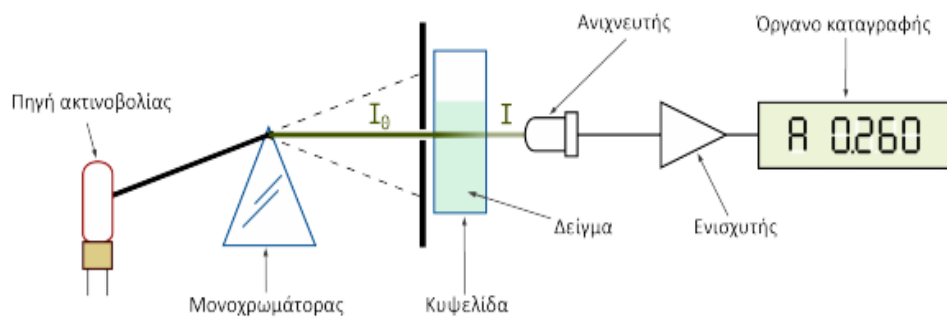
- Water for injection
- Κυψελίδες (Eppendorf)
- Φασματοφωτόμετρο BioPhotometer (Eppendorf, Germany). (Εικόνα 10α)

Το φασματοφωτόμετρο είναι το όργανο που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της απορρόφησης της μονοχρωματικής ακτινοβολίας. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο απλής δέσμης, το οποίο αποτελείται από:

- μια πηγή ακτινοβολίας, σταθερής ισχύος
- έναν επιλογέα μήκους κύματος, που απομονώνει τη μονοχρωματική ακτινοβολία από το σύνολο του φάσματος που εκπέμπει η πηγή ακτινοβολίας
- μια κυψελίδα για την τοποθέτηση του δείγματος
- έναν ανιχνευτή, που μετατρέπει το εξερχόμενο από την κυψελίδα οπτικό σήμα σε ηλεκτρικό
- ένα σύστημα μετρήσεως, που περιλαμβάνει έναν ενισχυτή του σήματος και ένα όργανο αναγνώσεως των μετρήσεων της απορρόφησης συνήθως σε αναλογική ή ψηφιακή οθόνη. (Εικόνα 10β)



α)



β)

Εικόνα 10 α) Φασματοφωτόμετρο BioPhotometer (Eppendorf, Germany)

β) Αρχή μεθόδου φασματοφωτομετρίας¹⁴¹

2.6.3 Πρωτόκολλο

Η διαδικασία φωτομέτρησης των δειγμάτων DNA περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Προσθήκη 100 μL water for injection στην κυψελίδα (τυφλό δείγμα)
2. Φωτομέτρηση τυφλού δείγματος και μηδενισμός φωτομέτρου
3. Προσθήκη 5 μL στην ίδια κυψελίδα και ανακάτεμα με την πιπέτα
4. Φωτομέτρηση δείγματος DNA

2.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR

2.7.1 Αρχή μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιείται για την ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος του DNA. Απαραίτητα για μία αντίδραση PCR είναι, εκτός από το DNA που θα χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο για τις νέες αλυσίδες DNA που θα παραχθούν, η DNA-πολυμεράση, ένα μείγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), ένα ζεύγος εκκινητών, που θα καθορίσουν το μέγεθος των αντιγράφων DNA, καθώς και ένα ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει στοιχεία που βελτιστοποιούν την αντίδραση και τη δράση του ενζύμου. Οι εκκινητές είναι ολιγονουκλεοτίδια συγκεκριμένης αλληλουχίας (20-30 ζεύγη βάσεων) που είναι συμπληρωματικά προς τα δύο 3' – άκρα του DNA στόχου. Η πολυμεράση είναι το ένζυμο που παράγει τους νέους κλώνους DNA χρησιμοποιώντας το πρότυπο DNA και τους εκκινητές. Η διαδικασία βασίζεται στη χρήση διαδοχικών μεταβολών της θερμοκρασίας.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε αυτόματους θερμικούς κυκλοποιητές, που μεταβαίνουν αυτόματα στις καθορισμένες επιθυμητές θερμοκρασίες κάθε κύκλου. Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται κάθε φορά ποικίλλουν ανάλογα με τις απαιτήσεις του ενζύμου, τη δομή και το μέγεθος του DNA που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο, καθώς και τις βέλτιστες συνθήκες πρόσδεσης του εκκινητή. Ωστόσο, ένα γενικό πρωτόκολλο της τεχνικής PCR περιλαμβάνει:

- Την αποδιάταξη του DNA (denaturation) όπου το DNA θερμαίνεται (94 – 96°C) για να διαχωριστούν οι αλυσίδες του.
- Τον υβριδισμό των εκκινητών (annealing) όπου η θερμοκρασία πέφτει (50 – 65°C) για να επιτρέψει στους εκκινητές να συνδεθούν με τα 3' άκρα των διαχωρισμένων αλυσίδων DNA.
- Την επιμήκυνση (extension) όπου η DNA πολυμεράση καταλύει την επιμήκυνση των εκκινητών με την ενσωμάτωση των συμπληρωματικών βάσεων που δεσμεύονται στο DNA στόχο. Με την

επιμήκυνση των εκκινητών, σχηματίζονται δύο νέοι κλώνοι DNA για τον επόμενο κύκλο της PCR.

- Την επαναποδιάταξη προϊόντων, όπου η θερμοκρασία αυξάνεται στους 94°C για 30-60 δευτερόλεπτα, ώστε τα μικρά τμήματα δίκλωνου DNA που δημιουργήθηκαν να αποχωριστούν πάλι και να αποτελέσουν εκμαγεία για τον επόμενο κύκλο σύνθεσης DNA.

Μία αντίδραση PCR διαρκεί περίπου 25 – 40 επαναλαμβανόμενους κύκλους των σταδίων που μόλις προαναφέρθηκαν. Η αύξηση του DNA είναι εκθετική κατά τους πρώτους κύκλους, με το πέρασμα όμως του χρόνου καταλήγει σε ένα πλατό όπου ο αριθμός των μορίων δεν αυξάνεται σημαντικά. Η χρονική στιγμή που εμφανίζεται το πλατό εξαρτάται από τον αριθμό των κύκλων, την αρχική ποσότητα του DNA στο δείγμα και από την ποσότητα των δεοξυνουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν.

2.7.2 Αρχή μεθόδου real – time PCR

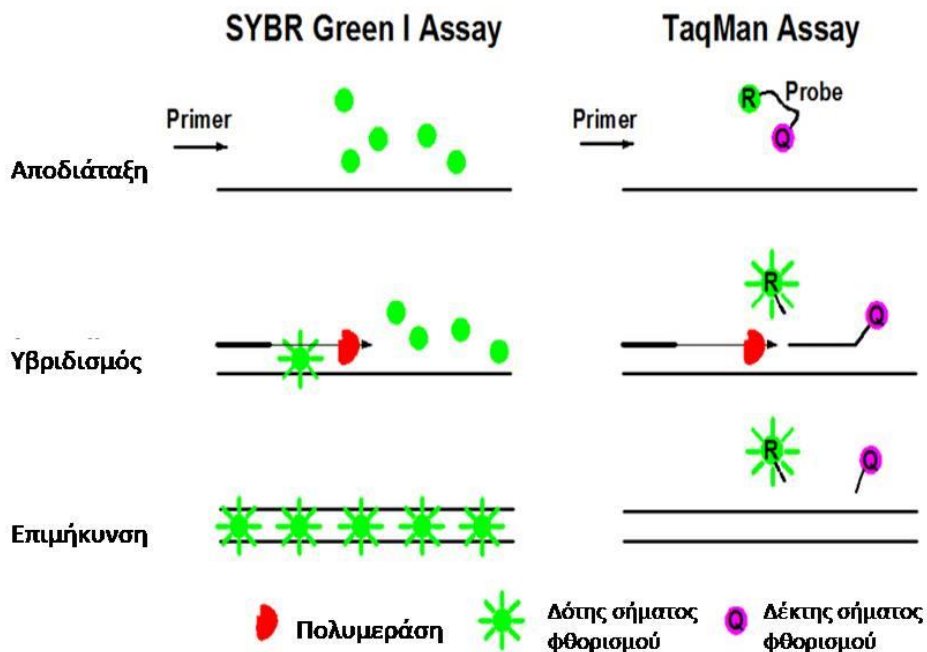
Η real – time PCR είναι μία εξέλιξη της συμβατικής PCR όπου είναι δυνατή η ποσοτικοποίηση των αλληλουχιών DNA που πολλαπλασιάζονται. Είναι μια υπερευαίσθητη τεχνική, κατά την οποία παράλληλα με την ενίσχυση της αλληλουχίας DNA γίνεται ανίχνευση του παραγόμενου προϊόντος σε πραγματικό χρόνο, καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης. Η ανίχνευση του παραγόμενου προϊόντος γίνεται με τη βοήθεια διάφορων φθορίζουσων ουσιών, οι οποίες ενσωματώνονται στην αλληλουχία που παράγεται. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη με την ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με τη συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος DNA.^{142,143}

Υπάρχουν δύο συστήματα ανίχνευσης, ανάλογα με το είδος της χρωστικής που χρησιμοποιείται:

- Μη ειδικό σύστημα ανίχνευσης: Πρόκειται για χρωστικές που δεσμεύονται σε όλο το δίκλωνο μόριο του DNA (πχ. SYBR green). Η χρωστική αυτή δεν φθορίζει όταν βρίσκεται ελεύθερη σε διάλυμα, αλλά παράγει φθορισμό με την ενσωμάτωσή της στο DNA, με την ένταση του φθορισμού αυτού να είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του

παραγόμενου προϊόντος. Το κύριο μειονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι ότι μπορεί να δημιουργήσει ψευδώς θετικά σήματα, καθώς η χρωστική μπορεί επίσης να συνδεθεί με μη ειδικές δίκλωνες αλληλουχίες DNA.

- Ειδικό σύστημα ανίχνευσης: Στην περίπτωση αυτή, χρησιμοποιούνται ανιχνευτές που είναι ειδικό ως προς την αλληλουχία - στόχο. Τέτοιο ανιχνευτές είναι αλληλουχίες ολιγονουκλεοτίδιων οι οποίες φέρουν στο 5' άκρο του έναν δότη σήματος φθορισμού (R) και στο 3' άκρο ένα δέκτη σήματος φθορισμού (Q). Όσο ο ανιχνευτής παραμένει άφθαρτος, το σήμα φθορισμού του είναι εξασθενημένο αφού ο δέκτης του μορίου(Q) απορροφάει μεγάλη ποσότητα φθορισμού που προέρχεται από τον δότη (R) μέσω του φαινομένου FRET. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας υβριδοποίησης και επέκτασης που συμβαίνουν σε μία αντίδραση PCR όπως περιγράφηκε προηγουμένως, η πολυμεράση DNA διασπά τον δέκτη φθορισμού (R) από τον ανιχνευτή, οδηγώντας στην εκπομπή του φθορισμού του. (Εικόνα 11)¹⁴²



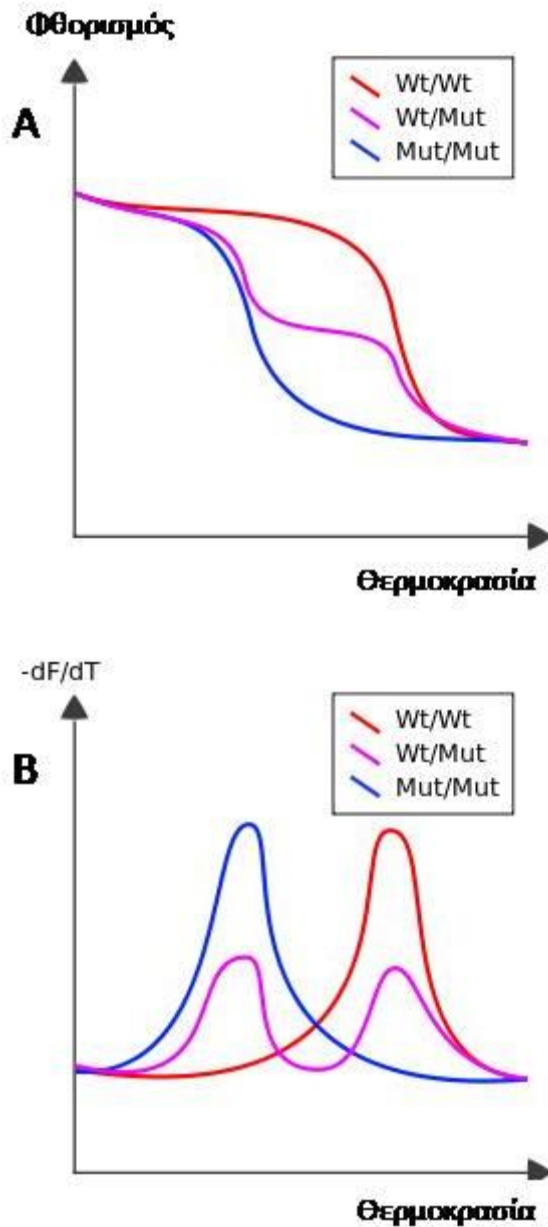
Εικόνα 11: Ειδικό σύστημα ανίχνευσης¹⁴²

2.7.2.1 Διαδικασία Real-Time PCR με LightSNiP

Για τη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε μια τυποποιημένη μέθοδος Real-Time PCR, που ονομάζεται LightSNiP, με σύστημα ανίχνευσης φθορισμού τον ανιχνευτή SimpleProbe®.

Ο ανιχνευτής υβριδισμού SimpleProbe® είναι ένα ολιγονουκλεοτίδιο σημασμένο με φθοροφόρο μόριο, και δε συμμετέχει στη διαδικασία της ενίσχυσης. Έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε να υβριδίζεται με μία αλληλουχία που περιέχει το SNP στόχο, αλλά δεν συμμετέχει στην διαδικασία της ενίσχυσης. Μόλις υβριδοποιηθεί με την αλληλουχία-στόχο, ο ανιχνευτής SimpleProbe® παράγει περισσότερο φθορισμό σε σχέση με την ελεύθερη μορφή του. Οι μεταβολές φθορισμού που βασίζονται αποκλειστικά στην κατάσταση υβριδισμού του μορίου ανιχνευτή εντοπίζονται με ανάλυση των καμπυλών τήξης (melting curve analysis).

Η τήξη έχει ως αποτέλεσμα την αποδιάταξη της διπλής έλικας σε δύο κλώνους. Για την δημιουργία μίας καμπύλης τήξης, το δείγμα θερμαίνεται με ταυτόχρονη μέτρηση του φθορισμού. Όσο η θερμοκρασία αυξάνεται ο φθορισμός μειώνεται, αρχικά με αργό ρυθμό και στην συνέχεια σε μία συγκεκριμένη θερμοκρασία απότομα. (Εικόνα 12)



Εικόνα 12. Διαγράμματα καμπυλών τήξης. Το A διαγραμμα αναπαριστά τον φθορισμό του δείγματος σε σχέση με την θερμοκρασία. Καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται, ο φθορισμός μειώνεται, ως αποτέλεσμα της απομάκρυνσης του ανιχνευτή SimpleProbe από το DNA. Το B διάγραμμα απεικονίζει την πρώτη αρνητική παράγωγο του φθορισμού σε σχέση με την θερμοκρασία. Αναπαρίσταται με τον τρόπο αυτό η θερμοκρασία τήξης του κάθε δείγματος ως κορυφές,

Οποιαδήποτε ασυμμετρία σύνδεσης του ανιχνευτή με την αλληλουχία-στόχο θα μειώσει τους δεσμούς υδρογόνου, άρα και τη θερμοκρασία τήξης, επιτρέποντας έτσι την ανάλυση των πολυμορφισμών μέσω καμπυλών τήξης.

Διαφορετικοί πολυμορφισμοί αποσταθεροποιούν διαφορετικά τους δεσμούς υδρογόνου, αποδίδοντας διαφορετικά σημεία τήξης, οδηγώντας έτσι στην εύκολη ταυτοποίηση των πολυμορφισμών.

2.7.2.2 Αντιδραστήρια-Υλικά-Εξοπλισμός

Για τη Real-Time PCR με LightSNiP χρησιμοποιήθηκαν:

- LightSNiP (Tib-MolBiol, Germany)
- FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics, Germany)
- MgCl₂
- PCR grade H₂O
- PCR plate 96*0,2mL (Nerbe Plus GmbH, Germany)
- PCR clear seal 135*80 (Nippon Genetics, EU)
- Real-Time PCR Light Cyclor 480 (Roche Diagnostics, Germany)
- Πιπέτα ακριβείας μεταβαλλόμενου όγκου PIPETMAN Neo 2 – 2-μL και 20 – 200μL (Gilson Inc., US)
- Αναλώσιμα στόμια με φίλτρο (filter tips) 2 – 20 μL και 20 – 200μL (Nerbe Plus GmbH, Germany)
- Σωληνάρια τύπου Eppendorf (Eppendorf tubes®) 1,5ml (Eppendorf, Germany)

2.7.2.3 Πρωτόκολλο

1. Αποστείρωση χώρου όπου γίνεται η προετοιμασία για τη φόρτωση της PCR
2. Παρασκευή PCR master-mix για κάθε πολυμορφισμό, το οποίο περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός του DNA (Σχήμα 2)
3. Προσθήκη 7,5 μL PCR master-mix και 2,5 μL DNA σε κάθε πηγαδάκι του PCR-plate, με καλή ανάδευση με την πιπέτα
4. Σφράγισμα του PCR-plate με ειδική μεμβράνη PCR clear-seal
5. Τοποθέτηση του PCR-plate στο θερμικό κυκλοποιητή Light Cyclor 480, ρύθμιση H/Y με το κατάλληλο θερμοκρασιακό πρόγραμμα (Σχήμα 3) και εκκίνηση διαδικασίας Real-Time PCR
6. Μετά το τέλος της Real-Time PCR, ανίχνευση SNPs μέσω ανάλυσης καμπυλών τήξης (melting curve analysis)

Αντιδραστήρια	τελικός όγκος = 20 μ L
H ₂ O	10,4 – 14,4 μ L
Reagent mix (primers+probes)	1 μ L
FastStart DNA-πολυμεράση	2 μ L
MgCl ₂ (25mM)	1,6 μ L
δείγμα DNA	1 – 5 μ L (50 ng)

Σχήμα 2. Όγκος αντιδραστηρίων και DNA που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση ενός δείγματος

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ							
	Αποδιάταξη	Ενίσχυση			Τήξη			Ψύξη
Ανάλυση	καμία	ποσοτικοποίηση			καμπύλες τήξης			καμία
Κύκλοι	1	45			1			1
Τμήματα	1	1	2	3	1	2	3	1
Θερμοκρασιακός στόχος (°C)	95	95	60	72	95	40	75	40
Διάρκεια σταδίου	10 min	10 sec	10sec	15 sec	30 sec	2 min	0 sec	30 sec
Ρυθμός μεταβολής θερμοκρασίας (°C)	4,4	4,4	2,2	4,4	4,4	1,5	-	1,5
Μέτρηση φθορισμού	καμία	καμία	μία	καμία	καμία	καμία	συνεχής (ανά 3°C)	καμία

Σχήμα 3. Πρόγραμμα PCR στο LightCycler 480

2.8 Κατανομή συχνοτήτων

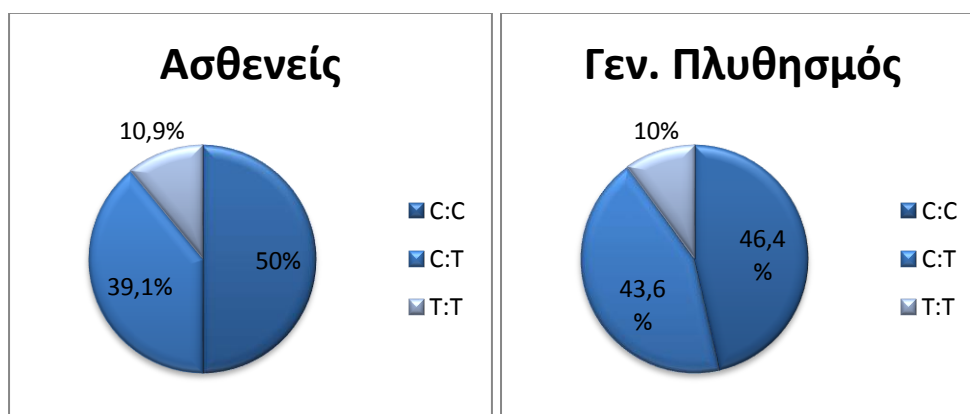
Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων και η σύγκριση των συχνοτήτων γονοτύπων και αλληλομόρφων για τους ασθενείς και τους μάρτυρες, έγινε με το πρόγραμμα SPSS Statistics 22.0 (IBM,USA). Πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος χ^2 και υπολογίσθηκαν οι λόγοι των σχετικών πιθανοτήτων (OR – Odds Ratio) και τα διαστήματα εμπιστοσύνης αυτών (CI – Confidence Interval) 95%. Ο στατιστικός έλεγχος έγινε σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Για την εύρεση στατιστικής σημαντικότητας μετρήθηκε η τιμή p value.

2.8.1 Κατανομή συχνοτήτων του FokI (rs2228570)

Από τους 128 ασθενείς, οι 64 (50%) είναι ομόζυγοι για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (C/C), 50 ασθενείς (39,1%) είναι ετερόζυγοι (C/T) και οι 14 (10,9%) ομόζυγοι για το φυσικό αλληλόμορφο (T/T). Στον γενικό πληθυσμό, επικρατεί ομοζυγωτία για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο C (C/C), αφού 236 (46.4%) από το σύνολο των 509 μαρτύρων φέρουν αυτό τον γονότυπο, 222 μάρτυρες (43.6%) είναι ετερόζυγοι (C/T), ενώ 51 (10.0%) είναι ομόζυγοι για το φυσικό αλληλόμορφο (T/T). (Γράφημα 5)

Γράφημα 5: Κατανομή γονοτύπων για τον πολυμορφισμό FokI

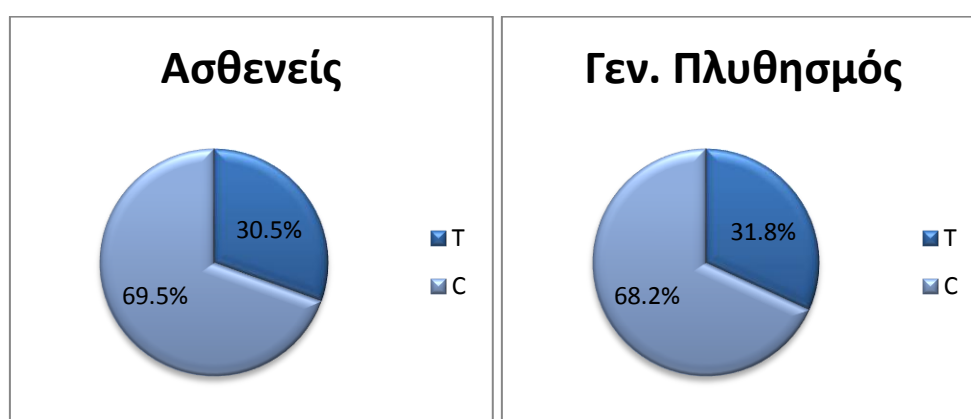
Γονότυπος	Ασθενείς		Γενικός πληθυσμός	
C:C	64	50%	236	46,4%
C:T	50	39.1%	222	43.6%
T:T	14	10.9%	51	10%
Σύνολο	128	100%	509	100%



Στους ασθενείς, το φυσικό αλληλόμορφο T εμφανίζεται 100 φορές (30,5%), ενώ το μεταλλαγμένο C 178 φορές (69,5%). Στον γενικό πληθυσμό, το φυσικό αλληλόμορφο T εμφανίζεται 324 φορές (31.8%) ενώ το μεταλλαγμένο C 694 φορές (68.2%). (Γράφημα 6)

Γράφημα 6: Κατανομή αλληλομόρφων για τον πολυμορφισμό FokI

Αλληλόμορφο	Ασθενείς		Γενικός πληθυσμός	
	Αριθμός	Ποσοστό	Αριθμός	Ποσοστό
T	78	30.5%	324	31.8%
C	178	69.5%	694	68.2%
Σύνολο	256	100%	1018	100%

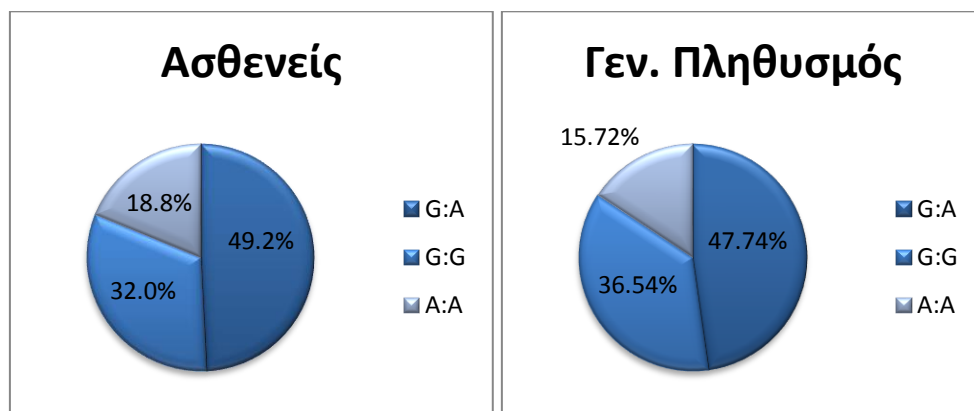


2.8.2 Κατανομή συχνοτήτων του BsmI (rs1544410)

Από τους 128 ασθενείς οι 63 (49.2%) είναι ετερόζυγοι (G/A) για τον πολυμορφισμό rs1544410, 41 (32.0%) ασθενείς είναι ομόζυγοι για το φυσικό αλληλόμορφο (G/G) και 24 (18.8%) είναι ομόζυγοι για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (A/A). Παρόμοια εικόνα παρουσιάζει και ο γενικός πληθυσμός αφού από τους 509 μάρτυρες οι 243 (47.74%) είναι ετερόζυγοι (G/A), οι 186 (36.54%) είναι ομόζυγοι για το φυσικό αλληλόμορφο G (G/G) και 80 (15.72%) είναι ομόζυγοι για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο A (A/A). (Γράφημα 7)

Γράφημα 7: Κατανομή γονοτύπων για τον πολυμορφισμό BsmI

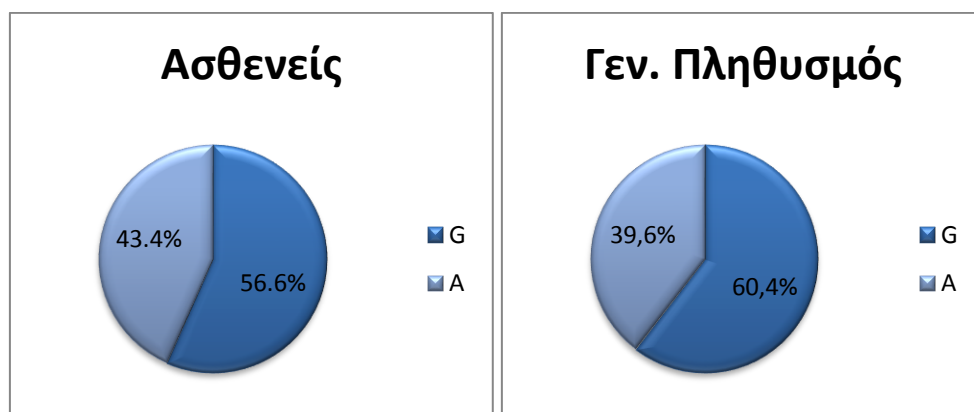
Γονότυπος	Ασθενείς		Γενικός πληθυσμός	
	Αριθμός	Ποσοστό	Αριθμός	Ποσοστό
G:A	63	49.2%	243	47.74%
G:G	41	32.0%	186	36.54%
A:A	24	18.8%	80	15.72%
Σύνολο	128	100%	509	100%



Το φυσικό αλληλόμορφο G εμφανίζεται στους ασθενείς 145 φορές (56.6%) ενώ το μεταλλαγμένο A 111 φορές (43.4%). Αντίστοιχα στον γενικό πληθυσμό, το αλληλόμορφο G εμφανίζεται 615 φορές (60.4%) ενώ το αλληλόμορφο A 403 φορές (39.6%).(Γράφημα 8)

Γράφημα 8: Κατανομή αλληλομόρφων για τον πολυμορφισμό BsmI

Αλληλόμορφο	Ασθενείς		Γενικός πληθυσμός	
	Αριθμός	Ποσοστό	Αριθμός	Ποσοστό
G	145	56.6%	615	60.4%
A	111	43.4%	403	39.6%
Σύνολο	256	100%	1018	100%



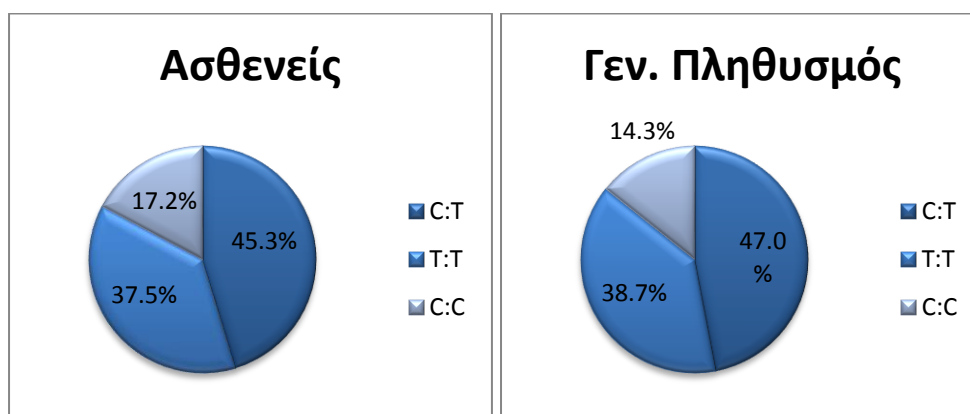
2.8.3 Κατανομή συχνοτήτων του ΤαqI (rs731236)

Από τους 128 ασθενείς οι 58 (45.3%) είναι ετερόζυγοι (C/T) για τον πολυμορφισμό rs1544410, 48 (37.5%) είναι ομόζυγοι για το φυσικό αλληλόμορφο (T/T), ενώ 22 (17.2%) είναι ομόζυγοι για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (C/C).

Όσον αφορά τον γενικό πληθυσμό, επικρατεί παρόμοια εικόνα με 239 άτομα (47.0%) να είναι ετερόζυγοι (C/T), 197 (38.7%) είναι ομόζυγοι για το φυσικό αλληλόμορφο T (T/T) και 73 (14.3%) είναι ομόζυγοι για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο C (C/C). (Γράφημα 9)

Γράφημα 9: Κατανομή γονοτύπων για τον πολυμορφισμό ΤαqI

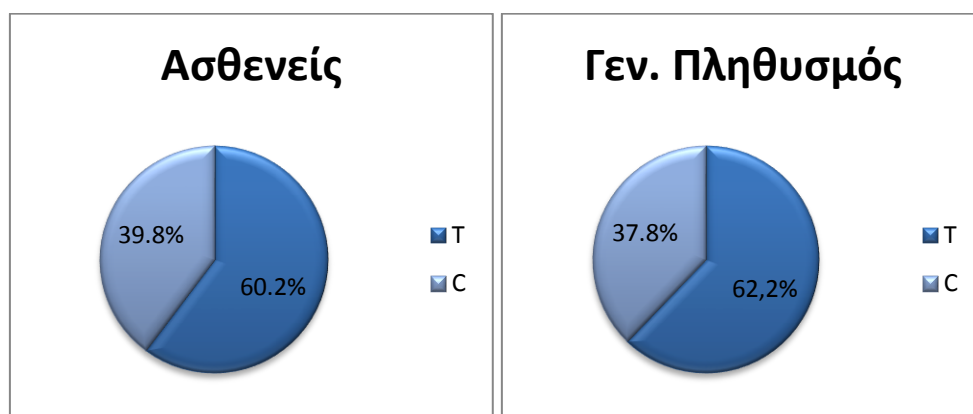
Γονότυπος	Ασθενείς		Γενικός πληθυσμός	
C:T	58	45.3%	239	47.0%
T:T	48	37.5%	197	38.7%
C:C	22	17.2%	73	14.3%
Σύνολο	128	100%	509	100%



Το φυσικό αλληλόμορφο T εμφανίζεται στους ασθενείς 154 φορές (60.2%) ενώ το μεταλλαγμένο C 102 φορές (39.8%). Στον γενικό πληθυσμό, το αλληλόμορφο T εμφανίζεται 633 φορές (62.2%) ενώ το αλληλόμορφο C 385 φορές (37.8%). (Γράφημα 10)

Γράφημα 10: Κατανομή αλληλομόρφων για τον πολυμορφισμό TaqI

Αλληλόμορφο	Ασθενείς		Γενικός πληθυσμός	
	Αριθμός	Ποσοστό	Αριθμός	Ποσοστό
T	154	60.2%	633	62.2%
C	102	39.8%	385	37.8%
Σύνολο	256	100%	1018	100%



2.9 Συσχέτιση των πολυμορφισμών rs2228570, rs1544410 και rs731236 με την εμφάνιση επιληψίας.

2.9.1 Συσχέτιση του πολυμορφισμού FokI (rs2228570) με την εμφάνιση επιληψίας

Ελέχθηκε η πιθανή συσχέτιση των γονοτύπων TT, CC και των αλληλομόρφων T,C του πολυμορφισμού rs2228570 με την εμφάνιση της νόσου. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης χ^2 παρουσιάζονται στον (Πίνακα 5).

Πίνακας 5: Συσχέτιση του πολυμορφισμού FokI (rs2228570) με την εμφάνιση επιληψίας

FokI (rs2228570)				
	Ασθενείς	Μάρτυρες	OR (95% CI)	P value
T/T	14	51	reference	
T/C	50	222	1.219 (0.626 – 2.373)	0.560
C/C	64	236	1.012 (0.527 – 1.944)	0.970
T/C + C/C	114	458	1.102 (0.590 – 2.062)	0.579
C/C	64	236	reference	
T/C	50	222	1.204 (0.799 – 1.819)	0.378
T/C + T/T	64	273	1.157(0.785 – 1.704)	0.462
Αλληλόμορφο T	78	324	reference	
Αλληλόμορφο C	178	694	0.939(0.697 – 1.263)	0.676

Δεν υπήρχε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε ασθενείς και μάρτυρες ούτε σε επίπεδο γονοτύπων ούτε σε επίπεδο αλληλομόρφων.

2.9.2 Συσχέτιση του πολυμορφισμού BsmI (rs1544410) με την εμφάνιση επιληψίας

Ελέγχθηκε η πιθανή συσχέτιση των γονοτύπων AA, GG και των αλληλομόρφων A,G του πολυμορφισμού rs1544410 με την εμφάνιση της νόσου. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης χ^2 παρουσιάζονται στον Πίνακα 6

Πίνακας 6: Συσχέτιση του πολυμορφισμού BsmI (rs2228570) με την εμφάνιση επιληψίας

BsmI (rs1544410)				
	Ασθενείς	Μάρτυρες	OR (95% CI)	P value
G/G	41	186	reference	
G/A	63	243	0.850 (0.549 – 1.316)	0.447
A/A	24	80	0.735 (0.416 – 1.296)	0.287
G/A + A/A	87	323	0.818 (0.542 – 1.237)	0.341
A/A	24	80	reference	
G/A	63	243	1.157 (0.678 – 1.973)	0.378
G/A + G/G	87	427	1.237 (0.748 – 2.048)	0.407
Αλληλόμορφο G	145	615	reference	
Αλληλόμορφο A	111	403	0.939(0.697 – 1.263)	0.676

Δεν υπήρχε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε ασθενείς και μάρτυρες ούτε σε επίπεδο γονοτύπων ούτε σε επίπεδο αλληλομόρφων.

2.9.3 Συσχέτιση του πολυμορφισμού TaqI (rs731236) με την εμφάνιση επιληψίας

Ελέχθηκε η πιθανή συσχέτιση των γονοτύπων TT, CC και των αλληλομόρφων T,C του πολυμορφισμού rs731236 με την εμφάνιση της νόσου. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης χ^2 παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Συσχέτιση του πολυμορφισμού TaqI (rs2228570) με την εμφάνιση επιληψίας

TaqI (rs731236)				
	Ασθενείς	Μάρτυρες	OR (95% CI)	P value
T/T	48	197	reference	
T/C	58	239	1.004 (0.655 – 1.538)	0.985
C/C	22	73	0.808 (0.456 – 1.432)	0.466
T/C + C/C	80	312	0.950 (0.637 – 1.417)	0.802
C/C	22	73	Reference	
T/C	58	239	1.242 (0.712 – 2.166)	0.445
T/C + T/T	128	436	1.027(0.613 – 1.719)	0.921
Αλληλόμορφο T	78	633	reference	
Αλληλόμορφο C	178	385	0.918(0.694 – 1.216)	0.551

Δεν υπήρχε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε ασθενείς και μάρτυρες ούτε σε επίπεδο γονοτύπων ούτε σε επίπεδο αλληλομόρφων.

2.9.4 Συσχέτιση συνδυασμού γονοτύπων των πολυμορφισμών FokI (rs2228570) και BsmI (rs1544410) με την εμφάνιση επιληψίας

Συνδυασμός Γονοτύπων	Ασθενείς	Μάρτυρες	OR (95% CI)	P value
C/C + A/A	88	316	1.164 (0.871 –1.555)	0.306
Υπόλοιποι συνδυασμοί	168	702		
Σύνολο	256	1018		
C/C + G/A	127	479	1.108 (0.842 –1.457)	0.464
Υπόλοιποι συνδυασμοί	129	539		
Σύνολο	256	1018		
C/C + G/G	105	422	0.982 (0.743 –1.297)	0.899
Υπόλοιποι συνδυασμοί	151	596		
Σύνολο	256	1018		
T/C + A/A	74	302	0.964 (0.713 –1.304)	0.812
Υπόλοιποι συνδυασμοί	182	716		
Σύνολο	256	1018		
T/C + G/A	113	465	0.940 (0.713 –1.238)	0.659
Υπόλοιποι συνδυασμοί	143	553		
Σύνολο	256	1018		
T/C + G/G	91	408	0.825 (0.620 –1.096)	0.185
Υπόλοιποι συνδυασμοί	165	610		
Σύνολο	256	1018		
T/T + A/A	38	131	1.180 (0.799 –1.744)	0.405
Υπόλοιποι συνδυασμοί	218	887		
Σύνολο	256	1018		
T/T + G/A	77	294	1.059 (0.785 –1.429)	0.706
Υπόλοιποι συνδυασμοί	179	724		
Σύνολο	256	1018		
T/T + G/G	55	237	0.902 (0.647 –1.256)	0.541
Υπόλοιποι συνδυασμοί	201	781		
Σύνολο	256	1018		

Δεν υπήρχε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε ασθενείς και μάρτυρες όσον αφορά τον συνδυασμό των γονοτύπων.

2.9.5 Συσχέτιση συνδυασμού γονοτύπων των πολυμορφισμών FokI (rs2228570) και TaqI (rs731236) με την εμφάνιση επιληψίας

Συνδυασμός Γονοτύπων	Ασθενείς	Μάρτυρες	OR (95% CI)	P value
C/C + C/C	86	309	1.161 (0.867 –1.554)	0.317
Υπόλοιποι συνδυασμοί	170	709		
Σύνολο	256	1018		
C/C + C/T	122	475	1.041 (0.791 –1.369)	0.775
Υπόλοιποι συνδυασμοί	134	543		
Σύνολο	256	1018		
C/C + T/T	112	433	1.051 (0.797 –1.385)	0.725
Υπόλοιποι συνδυασμοί	144	585		
Σύνολο	256	1018		
C/T + C/C	72	295	0.959 (0.707 –1.300)	0.788
Υπόλοιποι συνδυασμοί	184	723		
Σύνολο	256	1018		
C/T + C/T	108	461	0.882 (0.668 –1.163)	0.373
Υπόλοιποι συνδυασμοί	148	557		
Σύνολο	256	1018		
C/T + T/T	98	419	0.887 (0.669 –1.175)	0.402
Υπόλοιποι συνδυασμοί	158	599		
Σύνολο	256	1018		
T/T + C/C	36	124	1.180 (0.791 –1.759)	0.417
Υπόλοιποι συνδυασμοί	220	894		
Σύνολο	256	1018		
T/T + C/T	72	290	0.982 (0.724 –1.332)	0.908
Υπόλοιποι συνδυασμοί	184	728		
Σύνολο	256	1018		
T/T + T/T	62	248	0.992 (0.720 –1.366)	0.462
Υπόλοιποι συνδυασμοί	194	770		
Σύνολο	256	1018		

Δεν υπήρχε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε ασθενείς και μάρτυρες όσων αφορά τον συνδυασμό των γονοτύπων.

2.9.6 Συσχέτιση συνδυασμού γονοτύπων των πολυμορφισμών BsmI (rs1544410) και TaqI (rs731236) με την εμφάνιση επιληψίας

Συνδυασμός Γονοτύπων	Ασθενείς	Μάρτυρες	OR (95% CI)	P value
A/A + C/C	46	153	1.238 (0.862 –1.779)	0.248
Υπόλοιποι συνδυασμοί	210	865		
Σύνολο	256	1018		
A/A + C/T	82	319	1.033 (0.770 –1.386)	0.830
Υπόλοιποι συνδυασμοί	174	699		
Σύνολο	256	1018		
A/A + T/T	72	277	1.047 (0.771 –1.420)	0.769
Υπόλοιποι συνδυασμοί	184	741		
Σύνολο	256	1018		
A/G + C/C	85	316	0.104 (0.825 –1.479)	0.506
Υπόλοιποι συνδυασμοί	171	702		
Σύνολο	256	1018		
A/G + C/T	121	482	0.997 (0.757 –1.311)	0.981
Υπόλοιποι συνδυασμοί	135	536		
Σύνολο	256	1018		
A/G + T/T	111	440	1.006 (0.723 –1.326)	0.968
Υπόλοιποι συνδυασμοί	145	578		
Σύνολο	256	1018		
G/G + C/C	63	259	0.957 (0.696 –1.313)	0.784
Υπόλοιποι συνδυασμοί	193	759		
Σύνολο	256	1018		
G/G + C/T	99	425	0.880 (0.664 –1.165)	0.371
Υπόλοιποι συνδυασμοί	157	593		
Σύνολο	256	1018		
G/G + T/T	89	383	0.884 (0.663 –1.117)	0.398
Υπόλοιποι συνδυασμοί	167	635		
Σύνολο	256	1018		

Δεν υπήρχε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε ασθενείς και μάρτυρες όσων αφορά τον συνδυασμό των γονοτύπων.

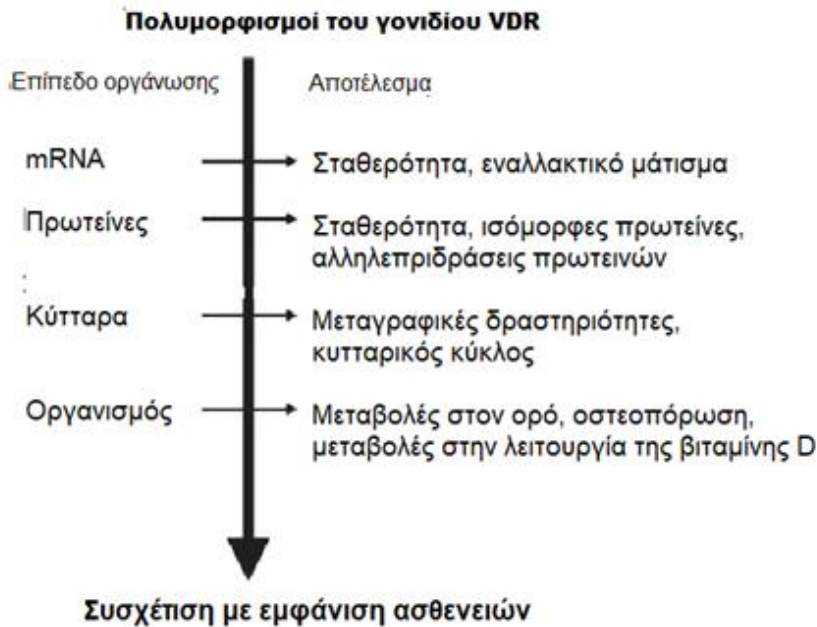
2.10 Συζήτηση αποτελεσμάτων

Η επιληψία είναι μία από τις πιο κοινές νευρολογικές διαταραχές, αφού πλήττει το 1 – 2 % του παγκόσμιου πληθυσμού. Η επιληπτογέννεση μπορεί να οφείλεται σε πολλούς παράγοντες, ωστόσο είναι ακόμα σε μεγάλο βαθμό άγνωστο το ποιοι παράγοντες μπορούν να πυροδοτήσουν την έναρξη των κρίσεων.

Η πληθώρα γονιδίων που έχουν σχετιστεί με την εμφάνιση της επιληψίας, ο ρόλος της βιταμίνης D και η δράση της στην νευροπροστασία, καθώς επίσης και τα χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D στους επιληπτικούς ασθενείς, αποτέλεσαν τα θεμέλια για να λάβει χώρα αυτή η εργασία.

Μελετήθηκαν τρεις πολυμορφισμοί του γονιδίου του υποδοχέα της βιταμίνης D, για να διαπιστωθεί η συσχέτιση των πολυμορφισμών αυτών με την εμφάνιση της επιληψίας.

Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου του υποδοχέα της βιταμίνης D έχουν συνδεθεί με πολλές ασθένειες μεταξύ των οποίων είναι διάφοροι τύποι καρκίνων, η σκλήρυνση κατά πλάκας και η επιληψία. Ανάλογα με το επίπεδο οργάνωσης στο οποίο παρεμβάλλονται οι πολυμορφισμοί, είναι και πιο πιθανό να σχετίζονται με την εμφάνιση κάποιας ασθένειας.¹⁴⁴ (Εικόνα 13)



Εικόνα 13: Πολυμορφισμοί του γονιδίου του VDR και επίπεδο οργάνωσης

Από τους πολυμορφισμούς που μελετήθηκαν, μόνο ο FokI έχει ως αποτέλεσμα την δομική αλλαγή της πρωτεΐνης VDR, ενώ οι άλλοι δύο πολυμορφισμοί BsmI και TaqI έχουν ως αποτέλεσμα μόνο την αλλαγή στο mRNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη που μελετήθηκε.

Πολυμορφισμός FokI (rs2228570) του γονιδίου VDR

Ο πολυμορφισμός FokI αναφέρεται στην αλλαγή της βάσης θυμίνη (T) σε κυτοσίνη (C). Η αλλαγή αυτή, έχει ως αποτέλεσμα η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται να έχει τρία αμινοξέα λιγότερα, καθώς ο πολυμορφισμός αυτός βρίσκεται στην θέση έναρξης της μετάφρασης του VDR.

Από την στατιστική μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε σύγκριση με υγιείς εθελοντές, δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση του πολυμορφισμού FokI με την εμφάνιση της επιληψίας, ωστόσο έγιναν παρατηρήσεις σχετικά με την επικινδυνότητα του πολυμορφισμού. Ο φυσικός γονότυπος T/T εμφανίζεται κατά 10% συχνότερα στους ασθενείς με επιληψία σε σχέση με τους μάρτυρες (OR:1.102). Το φυσικό αλληλόμορφο T, φαίνεται ότι έχει κάποια προστατευτική δράση (OR:0.939) χωρίς όμως αυτό να είναι στατιστικά σημαντικό. Δεν φαίνεται ωστόσο να επηρεάζεται η πιθανότητα εμφάνισης της

νόσου μεταξύ ατόμων ομόζυγων για το φυσικό αλληλόμορφο T/T έναντι αυτών που είναι ομόζυγοι για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο C/C (OR:1.012).

Αποδεικνύεται με τον τρόπο αυτό ότι, ο υποδοχέας του κωδικοποιείται ως αποτέλεσμα του πολυμορφισμού FokI, είναι το ίδιο λειτουργικός με τον φυσικό υποδοχέα και πως ο πολυμορφισμός αυτός δεν εμπλέκεται με την εμφάνιση της επιληψίας.

Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι ο FokI πολυμορφισμός μπορεί να επηρεάσει τα επίπεδα της βιταμίνης D και ότι σχετίζεται με πολλές νευροψυχιατρικές ασθένειες. Το αλληλόμορφο T φαίνεται ότι σχετίζεται με την νευροπροστασία ενώ το C αλληλόμορφο αυξάνει τον κίνδυνο νευρολογικών διαταραχών. Η μία μελέτη που έχει διεξαχθεί σχετικά με τους πολυμορφισμούς και την πιθανότητα εμφάνισης επιληψίας, συμφωνεί με την άποψη ότι δεν υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση και ότι το T αλληλόμορφο έχει πράγματι κάποια νευροπροστατευτική ιδιότητα έναντι του C αλληλόμορφου (OR:0.939)^{144,145}

Πολυμορφισμός BsmI (rs154410) του γονιδίου VDR

Ο πολυμορφισμός BsmI είναι η αλλαγή μίας βάσης γουανίνης (G) από μία βάση αδενίνης (A). Είναι μία σιωπηλή μετάλλαξη καθώς δεν αλλάζει την αλληλουχία των αμινοξέων της πρωτεΐνης, ενδέχεται όμως να επηρεάσει την έκφρασή της μέσω της μεταβολής της σταθερότητας του mRNA.

Ο φυσικός γονότυπος G/G φαίνεται να έχει προστατευτική δράση στην εμφάνιση της επιληψίας (OR:0.818). Αυτό σημαίνει ότι όσοι έχουν τον γονότυπο αυτό έχουν 18% μικρότερη πιθανότητα να εμφανίσουν επιληψία, χωρίς ωστόσο η παρατήρηση αυτή να είναι στατιστικά σημαντική. Το ίδιο ισχύει και για το φυσικό αλληλόμορφο G έναντι του A (OR:0.939). Αντίθετα, ο μεταλλαγμένος γονότυπος A/A φαίνεται να είναι επικίνδυνος, αφού η πιθανότητα εμφάνισης επιληψίας είναι 24% μεγαλύτερη για όσους έχουν τον γονότυπο αυτό (OR:1.237).

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης συμφωνούν με την βιβλιογραφία στην οποία αναφέρεται ότι δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια σύνδεση μεταξύ επιληψίας και του BsmI πολυμορφισμού. Επιβεβαιώθηκε επίσης ότι ο

πολυμορφισμός αυτός ενδεχομένως να συνδέεται με νευροεκφυλιστικές ασθένειες καθώς όπως αναφέρεται στην βιβλιογραφία το φυσικό αλληλόμορφο και ο φυσικός γονότυπος είναι αυτά που έχουν νευροπροστατευτική δράση (OR:0.939).^{144,145}

Πολυμορφισμός TaqI (rs731236) του γονιδίου VDR

Ο πολυμορφισμός TaqI (rs731236) αναφέρεται στην αλλαγή μίας βάσης θυμίνης (T) από μία βάση κυτοσίνης (C). Είναι όπως και ο BsmI μία σιωπηλή μετάλλαξη που δεν επηρεάζει την δομή της πρωτεΐνης, σχετίζεται όμως με χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D στον ορό.

Ο φυσικός γονότυπος T/T φαίνεται να έχει μία μικρή προστατευτική δράση (OR:0.950), το ίδιο και η παρουσία του φυσικού αλληλομόρφου T έναντι του μεταλλαγμένου (C) (OR:0.918). Επίσης η ομοζυγωτία του φυσικού γονότυπου T/T έναντι του μεταλλαγμένου γονότυπου C/C φαίνεται να έχει κάποιο προστατευτικό αποτέλεσμα, αφού όσοι έχουν τον φυσικό γονότυπο έχουν 20% λιγότερες πιθανότητες εμφάνισης επιληψίας.

Όπως και με τον BsmI πολυμορφισμό, έτσι και με τον TaqI δεν επηρεάζεται η δομή της παραγόμενης πρωτεΐνης. Φαίνεται ωστόσο από μελέτες ότι το φυσικό αλληλόμορφο μπορεί να μειώσει την πιθανότητα εμφάνισης της επιληψίας όπως και επιβεβαιώνεται από την στατιστική ανάλυση της μελέτης. Τα χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D στον ορό τα οποία οφείλονται στον TaqI πολυμορφισμό φαίνεται ότι δεν επηρεάζουν την δραστηριότητα της πρωτεΐνης. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι ο VDR μπορεί να δράσει και χωρίς την παρουσία της βιταμίνης D ως πρόσδεμα.^{144,145}

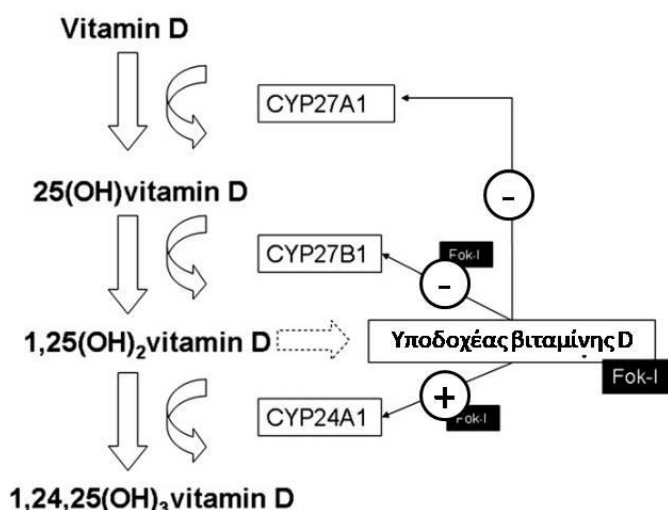
Σε μία μελέτη συσχέτισης του FokI πολυμορφισμού του VDR με την σκλήρυνση κατά πλάκας, διαπιστώθηκε ότι ασθενείς και εθελοντές που είχαν το μεταλλαγμένο F αλληλόμορφο, είχαν υψηλότερα επίπεδα ενεργής 1,25(OH)₂D βιταμίνης D από τα άτομα που είχαν το φυσικό αλληλόμορφο f. Τα άτομα αυτά παρουσίαζαν επίσης μεγαλύτερη αναλογία 1,25(OH)₂D/25(OH)D σε σύγκριση με όσους είχαν το φυσικό αλληλόμορφο.¹⁴⁶

Αυτή η άμεση σύνδεση του FokI πολυμορφισμού με τα επίπεδα την ενεργής βιταμίνης D στον ορό του αίματος, υποδηλώνει μία συσχέτιση του

πολυμορφισμού τόσο με την σκλήρυνση κατά πλάκας όσο και με άλλες ασθένειες που σχετίζονται με τα επίπεδα της βιταμίνης D, όπως συμβαίνει στην επιληψία.¹⁴⁷

Τα επίπεδα της 1,25(OH)₂D στον ορό του αίματος, είναι κυρίως αποτέλεσμα της ισορροπίας μεταξύ της υδροξυλίωσης της 25(OH)D από την 1 α – υδροξυλάση στους νεφρούς, και του μεταβολισμού της 1,25(OH)₂D από το CYP24A1 στα κύτταρα. Η ισορροπία αυτή ρυθμίζεται από το ασβέστιο και το φώσφορο του ορού και από τα επίπεδα της παραθυροειδούς ορμόνης.^{148,149}

Σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια, αποδείχθηκε ότι απουσία του γονιδίου του VDR, τα επίπεδα της 1,25(OH)₂D στον ορό του αίματος αυξήθηκαν, ενώ της 25(OH)D παρέμειναν αμετάβλητα. Επιπλέον, σε ποντίκια τα οποία εξέφραζαν το γονίδιο του VDR, η 1,25(OH)₂D δρούσε ανασταλτικά στο CYP27B1 ενώ παράλληλα αύξησε την δράση του CYP24A1. Επιπλέον, τα υψηλά επίπεδα της ενεργής μορφής της βιταμίνης D φάνηκε ότι περιορίζαν τον σχηματισμό της πρόδρομης βιταμίνης D.^{150–152} (Εικόνα 14)



Εικόνα 14. Προτεινόμενο μοντέλο της αλληλεπίδρασης μεταξύ της 25(OH)D, της 1,25(OH)₂D και της 1,24,25(OH)₃D με τον υποδοχέα της βιταμίνης D (VDR) και τον FokI πολυμορφισμό του γονιδίου του VDR¹⁴⁶

Τα χαμηλά επίπεδα πρόδρομης βιταμίνης D είναι αυτά που καθορίζουν εν τέλει την ποσότητα της ενεργής βιταμίνης D που θα σχηματιστεί και σε συνδυασμό με τον αυξημένο μεταβολισμό της 1,25(OH)₂D από το CYP24A1 εξάγεται το συμπέρασμα ότι ο FokI πολυμορφισμός έχει ως αποτέλεσμα τα μειωμένα επίπεδα βιταμίνης D στον ορό του αίματος. Τα χαμηλά αυτά επίπεδα, όπως προαναφέρθηκε, συνδέονται άμεσα με πολλές νευροεκφυλιστικές ασθένειες, μεταξύ των οποίων είναι και η επιληψία.

Όσα αναφέρθηκαν ανωτέρω, συμφωνούν με τα ευρήματα της παρούσας έρευνας, καθώς όσων αφορά τον FokI πολυμορφισμό, τα μεταλλαγμένο αλληλόμορφο C εμφανίζεται σε ποσοστό 69,5% έναντι του φυσικού που εμφανίζεται σε ποσοστό 30,5% στους ασθενείς. (βλ. Γράφημα 6)

Με το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο να είναι αυτό που επικρατεί στο δείγμα του πληθυσμού που έλαβε μέρος στην μελέτη και σύμφωνα με την βιβλιογραφία, υπάρχει άμεση σύνδεση του πολυμορφισμού FokI με την έλλειψη βιταμίνης D στους ασθενείς της μελέτης πράγμα το οποίο δικαιολογεί την ύπαρξη της επιληψίας. Από την στατιστική ανάλυση όμως, δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ επιληψίας και FokI.

Ωστόσο, τα ευρήματα αυτά δεν είναι αρκετά για να δώσουν μία ακριβή απάντηση για το αν υπάρχει κάποιος συνδετικός κρίκος μεταξύ των πολυμορφισμών του VDR και της επιληψίας. Σε μία μελέτη που έγινε για τον σακχαρώδη διαβήτη και τους πολυμορφισμούς του γονιδίου του VDR βρέθηκε ότι η ποσότητα της βιταμίνης D που λαμβάνει ο καθένας είτε από το ηλιακό φως είτε από την διατροφή μπορεί να επηρεάσει την πιθανότητα συσχέτισης των πολυμορφισμών με την εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D στον ορό του αίματος μπορούν να αποκρύψουν μία πιθανώς στατιστικά σημαντική συσχέτιση των πολυμορφισμών του γονιδίου του VDR με τον σακχαρώδη διαβήτη.¹⁵³

Τα αποτελέσματα της παραπάνω έρευνας χρησιμοποιήθηκαν αργότερα και σε άλλες έρευνες. Σε μία ήδη υπάρχουσα μελέτη συσχέτισης των πολυμορφισμών του VDR με τον καρκίνο του προστάτη όπου αρχικά δεν είχε βρεθεί κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα, η μέτα – ανάλυση, η οποία

περιελάμβανε και τα επίπεδα βιταμίνης D στον ορό του αίματος, έδειξε ότι υπήρχε εν τέλει συσχέτιση μεταξύ των δύο.¹⁴⁶

Οι παρατηρήσεις αυτές, χρησιμοποιήθηκαν και σε μελέτες συσχέτισης των πολυμορφισμών του γονιδίου του VDR με την σκλήρυνση κατά πλάκας. Το ενδιαφέρον των μελετών αυτών ήταν ότι σε πληθυσμούς με υψηλά επίπεδα βιταμίνης D, είτε λόγω γεωγραφικής θέσης είτε λόγω διατροφής, αναφέρθηκε ότι υπήρχε συσχέτιση μεταξύ πολυμορφισμών και σκλήρυνσης κατά πλάκας. Αντίθετα σε πληθυσμούς με χαμηλότερα επίπεδα βιταμίνης D λόγω γεωγραφικής θέσης δεν βρέθηκε σε καμία περίπτωση κάποια συσχέτιση.¹⁵⁴⁻¹⁵⁶

Δεδομένων όλων των ανωτέρω και το πρόβλημα έλλειψης βιταμίνης D που αντιμετωπίζεται στην Ελλάδα, η αδυναμία εύρεσης κάποιας συσχέτισης μεταξύ των πολυμορφισμών του γονιδίου του VDR με την επιληψία είναι αναμενόμενη. Ωστόσο τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης χρίζουν περαιτέρω έρευνας. Όπως προαναφέρθηκε, η πλειοψηφία των ασθενών που έλαβαν μέρος στην μελέτη είχαν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο F του FokI πολυμορφισμού, το οποίο συνδέεται με χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D. Είναι πιθανόν η επιληψία να σχετίζεται με τα χαμηλά αυτά επίπεδα βιταμίνης D στον ορό.

Επιπλέον, οι μελέτες που κάνουν λόγο ότι τα χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D μπορεί να επηρεάσουν τα αποτελέσματα της γονιδιακής ανάλυσης είναι άλλη μία παράμετρος που πρέπει να μελετηθεί. Οι ασθενείς της μελέτης, τόσο λόγω της αντιεπιληπτικής θεραπείας όσο και λόγω γεωγραφικής θέσης και F αλληλομόρφου ενδεχομένως να έχουν χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D τα οποία επηρεάζουν το αποτέλεσμα της στατιστικής ανάλυσης. Για την εξαγωγή ωστόσο ενός ασφαλούς συμπεράσματος, απαιτείται στην μελέτη αυτή να ληφθούν υπόψη τα επίπεδα βιταμίνης D τόσο των ασθενών όσο και των εθελοντών.

Βιβλιογραφία

1. Fisher, R. S. *et al.* ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* **55**, 475–482 (2014).
2. Stafstrom, C. E. & Carmant, L. Seizures and Epilepsy: An Overview for Neuroscientists. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **5**, a022426–a022426 (2015).
3. Fisher, R. S. *et al.* Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* **46**, 470–472 (2005).
4. Berg, A. T. *et al.* Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* **51**, 676–685 (2010).
5. Falco-Walter, J. J., Scheffer, I. E. & Fisher, R. S. The new definition and classification of seizures and epilepsy. *Epilepsy Res.* **139**, 73–79 (2018).
6. Scheffer, I. E. *et al.* ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* **58**, 512–521 (2017).
7. Seifert, G., Carmignoto, G. & Steinhäuser, C. Astrocyte dysfunction in epilepsy. *Brain Res. Rev.* **63**, 212–221 (2010).
8. Wetherington, J., Serrano, G. & Dingledine, R. Astrocytes in the Epileptic Brain. *Neuron* **58**, 168–178 (2008).
9. Marchi, N., Granata, T. & Janigro, D. Inflammatory pathways of seizure disorders. *Trends Neurosci.* **37**, 55–65 (2014).
10. Jenssen, S., Gracely, E. J. & Sperling, M. R. How Long Do Most Seizures Last? A Systematic Comparison of Seizures Recorded in the Epilepsy Monitoring Unit. *Epilepsia* **47**, 1499–1503 (2006).

11. Kumar, A. & Sharma, S. Simple Partial Seizure. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2020).
12. Shneker, B. F. & Fountain, N. B. Epilepsy. *Dis. Mon.* **49**, 426–478 (2003).
13. Camfield, P., Camfield, C., Lortie, A. & Darwish, H. Infantile Spasms in Remission May Reemerge as Intractable Epileptic Spasms. *Epilepsia* **44**, 1592–1595 (2003).
14. *The treatment of epilepsy: principles & practice.* (Lippincott Williams & Wilkins, 2006).
15. Graves, A. R. *et al.* Hippocampal Pyramidal Neurons Comprise Two Distinct Cell Types that Are Countermodulated by Metabotropic Receptors. *Neuron* **76**, 776–789 (2012).
16. *Basic Mechanisms Underlying Seizures and Epilepsy.*
17. Rogawski, M. A. AMPA receptors as a molecular target in epilepsy therapy. *Acta Neurol. Scand.* **127**, 9–18 (2013).
18. Pendo, K. & DeGiorgio, C. M. Vitamin D3 for the Treatment of Epilepsy: Basic Mechanisms, Animal Models, and Clinical Trials. *Front. Neurol.* **7**, (2016).
19. Sperk, G., Furtinger, S., Schwarzer, C. & Pirker, S. GABA and Its Receptors in Epilepsy. in *Recent Advances in Epilepsy Research* (eds. Binder, D. K. & Scharfman, H. E.) vol. 548 92–103 (Springer US, 2004).
20. Zhang, Y. *et al.* Inhibition of glutamate decarboxylase (GAD) by ethyl ketopentenoate (EKP) induces treatment-resistant epileptic seizures in zebrafish. *Sci. Rep.* **7**, 7195 (2017).
21. Hampe, C. S., Mitoma, H. & Manto, M. GABA and Glutamate: Their Transmitter Role in the CNS and Pancreatic Islets. in *GABA And Glutamate - New Developments In Neurotransmission Research* (ed. Samardzic, J.) (InTech, 2018).
doi:10.5772/intechopen.70958.
22. Hauser, W. A., Annegers, J. F. & Kurland, L. T. Prevalence of Epilepsy in Rochester, Minnesota: 1940–1980. *Epilepsia* **32**, 429–445 (1991).

23. Hauser, W. A., Annegers, J. F. & Kurland, L. T. Incidence of Epilepsy and Unprovoked Seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984. *Epilepsia* **34**, 453–458 (1993).
24. Annegers, J. F., Rocca, W. A. & Hauser, W. A. Causes of Epilepsy: Contributions of the Rochester Epidemiology Project. *Mayo Clin. Proc.* **71**, 570–575 (1996).
25. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminD-HealthProfessional/#h3>.
26. Haddad, J. G., Matsuoka, L. Y., Hollis, B. W., Hu, Y. Z. & Wortsman, J. Human plasma transport of vitamin D after its endogenous synthesis. *J. Clin. Invest.* **91**, 2552–2555 (1993).
27. Zhang, R. & Naughton, D. P. Vitamin D in health and disease: Current perspectives. *Nutr. J.* **9**, 65 (2010).
28. *Institute of Medicine (US) Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium; Ross AC, Taylor CL, Yaktine AL, et al., editors. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. 3, Overview of Vitamin D. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK56061/>.*
29. Holick, M. F. High Prevalence of Vitamin D Inadequacy and Implications for Health. *Mayo Clin. Proc.* **81**, 353–373 (2006).
30. Holick, M. F. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **80**, 1678S-1688S (2004).
31. Nair, R. & Maseeh, A. Vitamin D: The ‘sunshine’ vitamin. *J. Pharmacol. Pharmacother.* **3**, 118–126 (2012).
32. Galitzer, H., Ben-Dov, I., Lavi-Moshayoff, V., Naveh-Many, T. & Silver, J. Fibroblast growth factor 23 acts on the parathyroid to decrease parathyroid hormone secretion: *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **17**, 363–367 (2008).
33. Trochoutsou, A., Kloukina, V., Samitas, K. & Xanthou, G. Vitamin-D in the Immune System: Genomic and Non-Genomic Actions. *Mini-Rev. Med. Chem.* **15**, 953–963 (2015).

34. Pierides, A. M. Pharmacology and Therapeutic Use of Vitamin D and its Analogues: *Drugs* **21**, 241–256 (1981).
35. Fleet, J. C. Rapid, Membrane-Initiated Actions of 1,25 Dihydroxyvitamin D: What Are They and What Do They Mean? *J. Nutr.* **134**, 3215–3218 (2004).
36. Holló, A., Clemens, Z. & Lakatos, P. Epilepsy and vitamin D. *Int. J. Neurosci.* **124**, 387–393 (2014).
37. Norman, A. W. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am. J. Clin. Nutr.* **88**, 491S-499S (2008).
38. Trehan, N., Afonso, L., Levine, D. L. & Levy, P. D. Vitamin D Deficiency, Supplementation, and Cardiovascular Health: *Crit. Pathw. Cardiol.* **16**, 109–118 (2017).
39. Hii, C. & Ferrante, A. The Non-Genomic Actions of Vitamin D. *Nutrients* **8**, 135 (2016).
40. Kato, S. The Function of Vitamin D Receptor in Vitamin D Action. *J. Biochem. (Tokyo)* **127**, 717–722 (2000).
41. Fernandes de Abreu, D. A., Eyles, D. & Féron, F. Vitamin D, a neuro-immunomodulator: Implications for neurodegenerative and autoimmune diseases. *Psychoneuroendocrinology* **34**, S265–S277 (2009).
42. Holick, M. F. The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **18**, 153–165 (2017).
43. Hollis, B. W. Assessment of vitamin D nutritional and hormonal status: What to measure and how to do it. *Calcif. Tissue Int.* **58**, 4–5 (1996).
44. Holick, M. F. The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **18**, 153–165 (2017).
45. Bizzaro, G., Antico, A., Fortunato, A. & Bizzaro, N. Vitamin D and Autoimmune Diseases: Is Vitamin D Receptor (VDR) Polymorphism the Culprit? *Isr. Med. Assoc. J. IMAJ* **19**, 438–443 (2017).

46. Holick, M. F. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **80**, 1678S-1688S (2004).
47. Motta, E., Gołba, A., Bal, A., Kazibutowska, Z. & Strzafa-Orzeł, M. Seizure frequency and bioelectric brain activity in epileptic patients in stable and unstable atmospheric pressure and temperature in different seasons of the year – a preliminary report. *Neurol. Neurochir. Pol.* **45**, 561–566 (2011).
48. *Encyclopedia of Signaling Molecules*. (Springer International Publishing, 2018). doi:10.1007/978-3-319-67199-4.
49. Dusso, A. S. Molecular Biology of Vitamin D: Genomic and Nongenomic Actions of Vitamin D in Chronic Kidney Disease. in *Vitamin D in Chronic Kidney Disease* (eds. Ureña Torres, P. A., Cozzolino, M. & Vervloet, M. G.) 51–74 (Springer International Publishing, 2016). doi:10.1007/978-3-319-32507-1_3.
50. *Structural basis of VDR-DNA interactions on direct repeat response elements EMBO J.*, **21** (2002), pp. 2242-2252.
51. Cui, X., Gooch, H., Petty, A., McGrath, J. J. & Eyles, D. Vitamin D and the brain: Genomic and non-genomic actions. *Mol. Cell. Endocrinol.* **453**, 131–143 (2017).
52. Vanden Heuvel, J. P. Receptor-Mediated Carcinogenesis. in *Comprehensive Toxicology* 349–369 (Elsevier, 2010). doi:10.1016/B978-0-08-046884-6.01418-4.
53. Mutchie, T. R., Yu, O. B., Di Milo, E. S. & Arnold, L. A. Alternative binding sites at the vitamin D receptor and their ligands. *Mol. Cell. Endocrinol.* **485**, 1–8 (2019).
54. Belorusova, A. Y. & Rochel, N. Structural Studies of Vitamin D Nuclear Receptor Ligand-Binding Properties. in *Vitamins & Hormones* vol. 100 83–116 (Elsevier, 2016).
55. Wan, L.-Y., Zhang, Y.-Q., Chen, M.-D., Liu, C.-B. & Wu, J.-F. Relationship of structure and function of DNA-binding domain in vitamin D receptor. *Mol. Basel Switz.* **20**, 12389–12399 (2015).

56. Haussler, M. R. *et al.* Molecular Mechanisms of Vitamin D Action. *Calcif. Tissue Int.* **92**, 77–98 (2013).
57. Pike, J. W. & Meyer, M. B. The vitamin D receptor: new paradigms for the regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **39**, 255–269, table of contents (2010).
58. Kato, S. The Function of Vitamin D Receptor in Vitamin D Action. *J. Biochem. (Tokyo)* **127**, 717–722 (2000).
59. *Regular use of sunscreen on vitamin D levels* Holick, M.F., Matsuoka, L.Y., Wortsman, J. *Arch Dermatol.* Volume 131, Issue 11, Pages 1337-1339.
60. Cui, X., Gooch, H., Petty, A., McGrath, J. J. & Eyles, D. Vitamin D and the brain: Genomic and non-genomic actions. *Mol. Cell. Endocrinol.* **453**, 131–143 (2017).
61. Eyles, D. W., Smith, S., Kinobe, R., Hewison, M. & McGrath, J. J. Distribution of the Vitamin D receptor and 1 α -hydroxylase in human brain. *J. Chem. Neuroanat.* **29**, 21–30 (2005).
62. Fu, G. K. *et al.* Cloning of human 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase and mutations causing vitamin D-dependent rickets type 1. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **11**, 1961–1970 (1997).
63. Smolders, J. *et al.* Expression of Vitamin D Receptor and Metabolizing Enzymes in Multiple Sclerosis—Affected Brain Tissue. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **72**, 91–105 (2013).
64. Nav eilhan P.; Neveu, I.; Baudet, C.; Ohyama, K. Y.; Brachet, P.; Wion, D. *NeuroReport: December 1993 - p 255-257.*
65. Pardridge, W. M., Sakiyama, R. & Coty, W. A. Restricted Transport of Vitamin D and A Derivatives Through the Rat Blood-Brain Barrier. *J. Neurochem.* **44**, 1138–1141 (1985).
66. Spach, K. M. & Hayes, C. E. Vitamin D₃ Confers Protection from Autoimmune Encephalomyelitis Only in Female Mice. *J. Immunol.* **175**, 4119–4126 (2005).

67. Boontanrart, M., Hall, S. D., Spanier, J. A., Hayes, C. E. & Olson, J. K. Vitamin D3 alters microglia immune activation by an IL-10 dependent SOCS3 mechanism. *J. Neuroimmunol.* **292**, 126–136 (2016).
68. Kalueff, A. V., Eremin, K. O. & Tuohimaa, P. Mechanisms of Neuroprotective Action of Vitamin D₃. *Biochem. Mosc.* **69**, 738–741 (2004).
69. Wrzosek, M. *et al.* Vitamin D and the central nervous system. *Pharmacol. Rep.* **65**, 271–278 (2013).
70. Harms, L. R., Burne, T. H. J., Eyles, D. W. & McGrath, J. J. Vitamin D and the brain. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **25**, 657–669 (2011).
71. Pannu, R. & Singh, I. Pharmacological strategies for the regulation of inducible nitric oxide synthase: Neurodegenerative versus neuroprotective mechanisms. *Neurochem. Int.* **49**, 170–182 (2006).
72. Kalueff, A. V., Eremin, K. O. & Tuohimaa, P. Mechanisms of neuroprotective action of vitamin D(3). *Biochem. Biokhimiia* **69**, 738–741 (2004).
73. Garcion, E., Wion-Barbot, N., Montero-Menei, C. N., Berger, F. & Wion, D. New clues about vitamin D functions in the nervous system. *Trends Endocrinol. Metab.* **13**, 100–105 (2002).
74. Fernandes de Abreu, D. A., Eyles, D. & Féron, F. Vitamin D, a neuro-immunomodulator: Implications for neurodegenerative and autoimmune diseases. *Psychoneuroendocrinology* **34**, S265–S277 (2009).
75. Brown, J., Bianco, J. I., McGrath, J. J. & Eyles, D. W. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces nerve growth factor, promotes neurite outgrowth and inhibits mitosis in embryonic rat hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* **343**, 139–143 (2003).
76. Prüfer, K., Veenstra, T. D., Jirikowski, G. F. & Kumar, R. Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *J. Chem. Neuroanat.* **16**, 135–145 (1999).

77. Eyles, D. W., Smith, S., Kinobe, R., Hewison, M. & McGrath, J. J. Distribution of the Vitamin D receptor and 1 α -hydroxylase in human brain. *J. Chem. Neuroanat.* **29**, 21–30 (2005).
78. Cui, X., McGrath, J. J., Burne, T. H. J., Mackay-Sim, A. & Eyles, D. W. Maternal vitamin D depletion alters neurogenesis in the developing rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* **25**, 227–232 (2007).
79. Baas, D. *et al.* Rat oligodendrocytes express the vitamin D(3) receptor and respond to 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Glia* **31**, 59–68 (2000).
80. Cui, X. *et al.* The vitamin D receptor in dopamine neurons; its presence in human substantia nigra and its ontogenesis in rat midbrain. *Neuroscience* **236**, 77–87 (2013).
81. Bidmon, H.-J., Mayerhofer, A., Heiss, C., Bartke, A. & Stumpf, W. E. Vitamin D (Solatriol) receptors in the choroid plexus and ependyma: Their species-specific presence. *Mol. Cell. Neurosci.* **2**, 145–156 (1991).
82. Glaser, S. D., Veenstra, T. D., Jirikowski, G. F. & Prüfer, K. Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor immunoreactivity in the rat olfactory system. *Cell. Mol. Neurobiol.* **19**, 613–624 (1999).
83. Brewer, L. D. *et al.* Vitamin D hormone confers neuroprotection in parallel with downregulation of L-type calcium channel expression in hippocampal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **21**, 98–108 (2001).
84. Janjoppi, L. *et al.* Expression of vitamin D receptor mRNA in the hippocampal formation of rats submitted to a model of temporal lobe epilepsy induced by pilocarpine. *Brain Res. Bull.* **76**, 480–484 (2008).
85. Holló, A., Clemens, Z., Kamondi, A., Lakatos, P. & Szűcs, A. Correction of vitamin D deficiency improves seizure control in epilepsy: A pilot study. *Epilepsy Behav.* **24**, 131–133 (2012).

86. Perucca, E. Clinically relevant drug interactions with antiepileptic drugs. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **61**, 246–255 (2006).
87. Teagarden, D. L., Meador, K. J. & Loring, D. W. Low vitamin D levels are common in patients with epilepsy. *Epilepsy Res.* **108**, 1352–1356 (2014).
88. Pendo, K. & DeGiorgio, C. M. Vitamin D3 for the Treatment of Epilepsy: Basic Mechanisms, Animal Models, and Clinical Trials. *Front. Neurol.* **7**, (2016).
89. Garcion, E., Wion-Barbot, N., Montero-Menei, C. N., Berger, F. & Wion, D. New clues about vitamin D functions in the nervous system. *Trends Endocrinol. Metab.* **13**, 100–105 (2002).
90. Kalueff, A. V., Eremin, K. O. & Tuohimaa, P. Mechanisms of neuroprotective action of vitamin D(3). *Biochem. Biokhimiia* **69**, 738–741 (2004).
91. Pendo, K. & DeGiorgio, C. M. Vitamin D3 for the Treatment of Epilepsy: Basic Mechanisms, Animal Models, and Clinical Trials. *Front. Neurol.* **7**, (2016).
92. Fernandes de Abreu, D. A., Eyles, D. & Féron, F. Vitamin D, a neuro-immunomodulator: Implications for neurodegenerative and autoimmune diseases. *Psychoneuroendocrinology* **34**, S265–S277 (2009).
93. Holló, A., Clemens, Z. & Lakatos, P. Epilepsy and Vitamin D. *Int. J. Neurosci.* **124**, 387–393 (2014).
94. Merlin, L. R. Impact of Protein Kinase C Activation on Status Epilepticus and Epileptogenesis: Oh, What a Tangled Web. *Epilepsy Curr.* **8**, 101–103 (2008).
95. Crofts, L. A., Hancock, M. S., Morrison, N. A. & Eisman, J. A. Multiple promoters direct the tissue-specific expression of novel N-terminal variant human vitamin D receptor gene transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 10529–10534 (1998).
96. Miyamoto, K. *et al.* Structural Organization of the Human Vitamin D Receptor Chromosomal Gene and Its Promoter. *Mol. Endocrinol.* **11**, 1165–1179 (1997).

97. Taymans, S. E. *et al.* The Human Vitamin D Receptor Gene (VDR) Is Localized to Region 12cen-q12 by Fluorescent In Situ Hybridization and Radiation Hybrid Mapping: Genetic and Physical VDR Map. *J. Bone Miner. Res.* **14**, 1163–1166 (1999).
98. Pike, J. W. & Christakos, S. Biology and Mechanisms of Action of the Vitamin D Hormone. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **46**, 815–843 (2017).
99. Pike, J. W. *et al.* Genomic Determinants of Vitamin D-Regulated Gene Expression. in *Vitamins & Hormones* vol. 100 21–44 (Elsevier, 2016).
100. Uitterlinden, A. G., Fang, Y., van Meurs, J. B. J., Pols, H. A. P. & van Leeuwen, J. P. T. M. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* **338**, 143–156 (2004).
101. Morrison, N. A., Yeoman, R., Kelly, P. J. & Eisman, J. A. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 6665–6669 (1992).
102. Faraco, J. H., Morrison, N. A., Baker, A., Shine, J. & Frossard, P. M. Apal dimorphism at the human vitamin D receptor gene locus. *Nucleic Acids Res.* **17**, 2150–2150 (1989).
103. Morrison, N. A. *et al.* Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* **367**, 284–287 (1994).
104. Arai, H. *et al.* A Vitamin D Receptor Gene Polymorphism in the Translation Initiation Codon: Effect on Protein Activity and Relation to Bone Mineral Density in Japanese Women. *J. Bone Miner. Res.* **12**, 915–921 (1997).
105. Kerr Whitfield, G. *et al.* Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* **177**, 145–159 (2001).
106. Jurutka, P. W. *et al.* The Polymorphic N Terminus in Human Vitamin D Receptor Isoforms Influences Transcriptional Activity by Modulating Interaction with Transcription Factor IIB. *Mol. Endocrinol.* **14**, 401–420 (2000).

107. Gross, C. *et al.* The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal mexican-American women. *J. Bone Miner. Res.* **11**, 1850–1855 (2010).
108. Sankaraneni, R. & Lachhwani, D. Antiepileptic Drugs—A Review. *Pediatr. Ann.* **44**, e36–e42 (2015).
109. Hanaya, R. & Arita, K. The New Antiepileptic Drugs: Their Neuropharmacology and Clinical Indications. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* **56**, 205–220 (2016).
110. Rho, J. M. & White, H. S. Brief history of anti-seizure drug development. *Epilepsia Open* **3**, 114–119 (2018).
111. Eadie, M. J. & Bladin, P. F. *A disease once sacred: a history of the medical understanding of epilepsy.* (John Libbey, 2001).
112. Temkin, O. *The falling sickness: a history of epilepsy from the Greeks to the beginnings of modern neurology.* (Hopkins Univ. Press, 1994).
113. Eadie, M. Sir Charles Locock and potassium bromide. *J. R. Coll. Physicians Edinb.* **42**, 274–279 (2012).
114. Yasiry, Z. & Shorvon, S. D. How phenobarbital revolutionized epilepsy therapy: The story of phenobarbital therapy in epilepsy in the last 100 years: *How Phenobarbital Revolutionized Epilepsy Therapy.* *Epilepsia* **53**, 26–39 (2012).
115. Putnam, T. J. & Merritt, H. H. EXPERIMENTAL DETERMINATION OF THE ANTICONVULSANT PROPERTIES OF SOME PHENYL DERIVATIVES. *Science* **85**, 525–526 (1937).
116. Merritt, H. H. Landmark article Sept 17, 1938: Sodium diphenyl hydantoinate in the treatment of convulsive disorders. By H. Houston Merritt and Tracy J. Putnam. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **251**, 1062–1067 (1984).
117. Richards, R. K. & Everett, G. M. Tridione: a new anticonvulsant drug. *J. Lab. Clin. Med.* **31**, 1330–1336 (1946).

118. Porter, R. J. & Kupferberg, H. J. The Anticonvulsant Screening Program of the National Institute of Neurological Disorders and Stroke, NIH: History and Contributions to Clinical Care in the Twentieth Century and Beyond. *Neurochem. Res.* **42**, 1889–1893 (2017).
119. Wick, J. Y. The History of Benzodiazepines. *Consult. Pharm.* **28**, 538–548 (2013).
120. Johannessen Landmark, C. & Patsalos, P. N. Drug interactions involving the new second- and third-generation antiepileptic drugs. *Expert Rev. Neurother.* **10**, 119–140 (2010).
121. Glauser, T. *et al.* Updated ILAE evidence review of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes. *Epilepsia* **54**, 551–563 (2013).
122. Nunes, V. D., Sawyer, L., Neilson, J., Sarri, G. & Cross, J. H. Diagnosis and management of the epilepsies in adults and children: summary of updated NICE guidance. *BMJ* **344**, e281–e281 (2012).
123. Guerrini, R. & Parmeggiani, L. Topiramate and its clinical applications in epilepsy. *Expert Opin. Pharmacother.* **7**, 811–823 (2006).
124. Rho, J. M. & Sankar, R. The Pharmacologic Basis of Antiepileptic Drug Action. *Epilepsia* **40**, 1471–1483 (1999).
125. White, H. S., Smith, M. D. & Wilcox, K. S. Mechanisms of Action of Antiepileptic Drugs. in *International Review of Neurobiology* vol. 81 85–110 (Elsevier, 2007).
126. Kwan, P., Sills, G. J. & Brodie, M. J. The mechanisms of action of commonly used antiepileptic drugs. *Pharmacol. Ther.* **90**, 21–34 (2001).
127. White, H. S., Smith, M. D. & Wilcox, K. S. Mechanisms of Action of Antiepileptic Drugs. in *International Review of Neurobiology* vol. 81 85–110 (Elsevier, 2007).
128. Lasoń, W., Chlebicka, M. & Rejdak, K. Research advances in basic mechanisms of seizures and antiepileptic drug action. *Pharmacol. Rep.* **65**, 787–801 (2013).

129. Martin, D. J. *et al.* Gabapentin-mediated inhibition of voltage-activated Ca²⁺ channel currents in cultured sensory neurones is dependent on culture conditions and channel subunit expression. *Neuropharmacology* **42**, 353–366 (2002).
130. Meldrum, B. S. & Rogawski, M. A. Molecular targets for antiepileptic drug development. *Neurotherapeutics* **4**, 18–61 (2007).
131. Köhling, R. & Wolfart, J. Potassium Channels in Epilepsy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, a022871 (2016).
132. Villa, C. & Combi, R. Potassium Channels and Human Epileptic Phenotypes: An Updated Overview. *Front. Cell. Neurosci.* **10**, (2016).
133. D’Adamo, M. C., Catacuzzeno, L., Di Giovanni, G., Franciolini, F. & Pessia, M. K⁺ channelopathy: progress in the neurobiology of potassium channels and epilepsy. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, (2013).
134. Loscher, W. (2002). Valproic acid: Mechanisms of action. In “Antiepileptic Drugs” (R. H. Levy, R. H. Mattson, B. S. Meldrum, and E. Perucca, Eds.), 5th ed., pp. 767–779. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
135. Meldrum, B. S. Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology. *J. Nutr.* **130**, 1007S–1015S (2000).
136. Trist, D. G. Excitatory amino acid agonists and antagonists: pharmacology and therapeutic applications. *Pharm. Acta Helv.* **74**, 221–229 (2000).
137. Harty, T. P. & Rogawski, M. A. Felbamate block of recombinant N-methyl-d-aspartate receptors: selectivity for the NR2B subunit. *Epilepsy Res.* **39**, 47–55 (2000).
138. White, H. S., Wolf, H. H., Swinyard, E. A., Skeen, G. A. & Sofia, R. D. A Neuropharmacological Evaluation of Felbamate as a Novel Anticonvulsant. *Epilepsia* **33**, 564–572 (1992).
139. https://www.histology.leeds.ac.uk/blood/blood_content.php.
140. <http://www.bio-helix.com/products/193>.

141. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Spetrophotometer-en.svg#/media/File:Spetrophotometer-en.svg>.
142. Cao, Y., Yu, M., Dong, G., Chen, B. & Zhang, B. Digital PCR as an Emerging Tool for Monitoring of Microbial Biodegradation. *Molecules* **25**, 706 (2020).
143. *PCR for clinical microbiology: an Australian and international perspective*. (Springer, 2010).
144. Uitterlinden, A. G., Fang, Y., van Meurs, J. B. J., Pols, H. A. P. & van Leeuwen, J. P. T. M. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* **338**, 143–156 (2004).
145. Jiang, P. *et al.* Association between Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms with Childhood Temporal Lobe Epilepsy. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **12**, 13913–13922 (2015).
146. Smolders, J., Damoiseaux, J., Menheere, P., Tervaert, J. W. C. & Hupperts, R. Fok-I vitamin D receptor gene polymorphism (rs10735810) and vitamin D metabolism in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **207**, 117–121 (2009).
147. Orton, S.-M. *et al.* Evidence for genetic regulation of vitamin D status in twins with multiple sclerosis. *Am. J. Clin. Nutr.* **88**, 441–447 (2008).
148. Dusso, A. S., Brown, A. J. & Slatopolsky, E. Vitamin D. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* **289**, F8–F28 (2005).
149. Jongen, M. J. M., van der Vijgh, W. J. F., Lips, P. & Netelenbos, J. C. Measurement of Vitamin D Metabolites in Anephric Subjects. *Nephron* **36**, 230–234 (1984).
150. Takeyama, K. 25-Hydroxyvitamin D3 1-Hydroxylase and Vitamin D Synthesis. *Science* **277**, 1827–1830 (1997).
151. Qin, X. & Wang, X. Role of vitamin D receptor in the regulation of CYP3A gene expression. *Acta Pharm. Sin. B* **9**, 1087–1098 (2019).

152. Theodoropoulos, C., Demers, C., Petit, J.-L. & Gascon-Barré, M. High sensitivity of rat hepatic vitamin D₃-25 hydroxylase *CYP27A* to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ administration. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **284**, E138–E147 (2003).
153. Ponsonby, A.-L. *et al.* Variation in Associations between Allelic Variants of the Vitamin D Receptor Gene and Onset of Type 1 Diabetes Mellitus by Ambient Winter Ultraviolet Radiation Levels: A Meta-Regression Analysis. *Am. J. Epidemiol.* **168**, 358–365 (2008).
154. Tajouri, L. *et al.* VARIATION IN THE VITAMIN D RECEPTOR GENE IS ASSOCIATED WITH MULTIPLE SCLEROSIS IN AN AUSTRALIAN POPULATION. *J. Neurogenet.* **19**, 25–38 (2005).
155. Niino, M. *et al.* Vitamin D receptor gene polymorphism in multiple sclerosis and the association with HLA class II alleles. *J. Neurol. Sci.* **177**, 65–71 (2000).
156. Al-Temaimi, R. A., Al-Enezi, A., Al-Serri, A., Al-Roughani, R. & Al-Mulla, F. The Association of Vitamin D Receptor Polymorphisms with Multiple Sclerosis in a Case-Control Study from Kuwait. *PLOS ONE* **10**, e0142265 (2015).

Παράρτημα Α



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΤΟ ΠΑΡΟΝ ΕΝΤΥΠΟ ΕΧΕΙ ΔΗΜΙΟΥΡΓΗΘΕΙ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΙΣ ΟΔΗΓΙΕΣ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΦΟΡΜΑΣ ΕΝΥΠΟΓΡΑΦΗΣ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΤΟΥ ΠΑΓΚΟΣΜΙΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ
ΥΓΕΙΑΣ WHO- [HTTP://WWW.WHO.INT/RRPC/RESEARCH_ETHICS](http://www.who.int/rrpc/research_ethics)

Έντυπο ενυπόγραφης συγκατάθεσης εθελοντή ασθενή

Αυτή η ενυπόγραφη συγκατάθεση ασθενούς απευθύνεται σε άτομα που πάσχουν από

- νευρολογικές
- ψυχιατρικές
- άλλες παθήσεις

και καλούνται να συμμετάσχουν στην δημιουργία τράπεζας δεδομένων και βιολογικών υλικών.

Ο τίτλος του έργου αυτού είναι

‘Δημιουργία τράπεζας βιολογικών υλικών ασθενών με νευρολογικές, ψυχιατρικές και άλλες νόσους’

Κύριος ερευνητής: Νικόλαος Δρακούλης, επ. Καθηγητής Κλινικής Φαρμακολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Αυτό το έντυπο βεβαίωσης ενημερότητας έχει δύο μέρη :

- Φύλλο Πληροφοριών (για την ανταλλαγή πληροφοριών σχετικά με την έρευνα μαζί σας)
- Πιστοποιητικό της συναίνεσης (για υπογραφές , αν συμφωνείτε να πάρετε μέρος)

ΜΕΡΟΣ Ι: ΦΥΛΛΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Είμαστε μία ομάδα επιστημόνων που σε συνεργασία με νοσοκομειακές κλινικές (πανεπιστημιακές και μη) ασχολούμαστε με βασική και κλινική έρευνα και μελετάμε ασθένειες που είναι νευρολογικές, ψυχιατρικές αλλά και άλλες όπως καρδιολογικές. Σας καλούμε σε αυτή τη μελέτη που είναι η δημιουργία μίας τράπεζας όπου θα φυλάσσεται βιολογικό υλικό πχ. Αίμα, ιστός από ασθενείς και στη συνέχεια εφόσον θα υπάρχει ο κατάλληλος αριθμός ασθενών θα μπορούν να διενεργούνται μελέτες για τις συγκεκριμένες ασθένειες. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών ουδέποτε θα μπορούν να συσχετιστούν με τον καθένα από εσάς, αλλά θα μπορούν να συσχετιστούν μόνο με την ασθένεια την οποία πάσχετε κατά τον χρόνο της δειγματοληψίας. Αν δεν καταλαβαίνετε κάτι από τα παρακάτω παρακαλώ ρωτήστε κάθε λεπτομέρεια τον ερευνητή που σας το έδωσε για υπογραφή.

Ζητείται η ευπόγραφη άδεια σας, ώστε να αποθηκευτούν ολόκληρα τα δείγματα σας ή υπόλοιπα των δειγμάτων σας από προηγούμενη μελέτη, για πιθανή ερευνητική χρήση τους στο μέλλον.

Μερικοί άνθρωποι διστάζουν να παραχωρήσουν τα δείγματά τους για ερευνητική χρήση, καθώς φοβούνται ότι αυτό μπορεί να επηρεάσει τους ίδιους. Σας διαβεβαιώνουμε ότι το δείγμα σας θα ανωνυμοποιηθεί και καμία συσχέτιση δε θα μπορεί να υπάρξει με την ταυτότητά σας. Με αυτόν τον τρόπο συμμετέχετε και βοηθάτε, στην εξέλιξη της επιστήμης, όπως άλλοι πριν από μας βοήθησαν και έχουμε σήμερα τα διαθέσιμα μέσα για θεραπείες πολλών νοσημάτων. Η μοναδική πηγή πληροφοριών είναι από τα βιολογικό υλικό των ατόμων εκείνων που εμφανίζουν κάποιο πρόβλημα υγείας προσωρινό ή μη. Αυτό θα μας δώσει την δυνατότητα να μελετήσουμε στοιχεία όπως οι πρωτεΐνες και τα γονίδια για να βγουν συμπεράσματα που ενδεχόμενα να μην είναι χρήσιμα για σας άμεσα όμως να δώσουν πληροφορίες μετά από καιρό και αφού υπάρξει μεγάλος αριθμός δειγμάτων.

Τα δείγματά σας θα ανωνυμοποιηθούν με ειδικά υπολογιστικά προγράμματα και τα στοιχεία που θα συνοδεύουν το δείγμα σας πριν και μετά την αποθήκευση δε θα έχουν καμία σχέση με τα στοιχεία της ταυτότητός σας. Θα περιλαμβάνουν μόνο πληροφορίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ερευνητικές εργασίες ώστε να βρεθούν θεραπείες και δεδομένα που θα βοηθήσουν στην καλύτερη αντιμετώπιση της εκάστοτε νόσου.

Purpose of the research

Σκοπός της μελέτης είναι η συγκέντρωση πληροφοριών για νευρολογικά, ψυχιατρικά ή άλλα νοσήματα σε Ελληνικό ή άλλο πληθυσμό που διαμένει και νοσηλεύεται στην Ελλάδα. Η μοναδική πηγή πληροφοριών είναι από τα βιολογικό υλικό των ατόμων εκείνων που εμφανίζουν κάποιο πρόβλημα υγείας προσωρινό ή μη. Αυτό θα μας δώσει την δυνατότητα να μελετήσουμε στοιχεία όπως οι πρωτεΐνες και τα γονίδια για να βγουν συμπεράσματα που ενδεχόμενα να είναι χρήσιμα για σας άμεσα ενδεχόμενα όμως να δώσουν πληροφορίες μετά από καιρό και αφού υπάρξει μεγάλος αριθμός δειγμάτων. Οποσδήποτε συμμετέχετε και βοηθάτε με το τρόπο σας την εξέλιξη της επιστήμης όπως άλλοι πριν από μας βοήθησαν και έχουμε σήμερα τα διαθέσιμα μέσα για θεραπείες πολλών νοσημάτων. Απώτερος σκοπός της μελέτης είναι να δημιουργηθούν νέοι δείκτες που θα βοηθήσουν στην ασφάλεια και τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας των ιατρικών παρεμβάσεων.

Είδος ερευνητικής παρέμβασης

Αν συμφωνήσετε να συμμετέχετε στη μελέτη, θα χρησιμοποιηθεί από εσάς βιολογικό υλικό όπως αίμα ή ιστός που έχει ήδη ληφθεί από εσάς που έχει ήδη αφαιρεθεί από σας ανεξάρτητα από τη μελέτη αυτή, πχ κατά την εισαγωγή σας στο νοσοκομείο ή κατά τη διάρκεια κάποιας ιατρικής επέμβασης κατά την εισαγωγή σας. Το δείγμα αυτό θα μεταφερθεί στο Ερευνητικό εργαστήριο Κλινικής Φαρμακολογίας και Φαρμακογονιδιοματικής του Τμήματος Φαρμακευτικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών αφού ανωνυμοποιηθεί ώστε διενεργηθούν οι απαιτούμενες αναλύσεις για την διεξαγωγή της έρευνας. Οι παραπάνω διαδικασίες δε θα δώσουν πληροφορίες άμεσες για την προσωπική σας ιατρική φροντίδα, αλλά θα συμβάλλουν γενικότερα στην ανάπτυξη της ιατρικής έρευνας.

Εθελοντική συμμετοχή

Η συμμετοχή σας στη μελέτη είναι απολύτως εθελοντική. Είτε αποφασίσετε να συμμετέχετε στη μελέτη είτε όχι, δε θα αλλάξει απολύτως τίποτα στην κλινική σας παρακολούθηση και θεραπεία. Έχετε το δικαίωμα να αρνηθείτε να χρησιμοποιηθούν τα δείγματα σας χωρίς απώλεια των ιατρικών παροχών που είχατε μέχρι τώρα. Αν συμφωνήσετε να συμμετέχετε, πρέπει να γνωρίζετε ότι δεν μπορείτε να κάνετε άρση της συγκατάθεσής σας μετά την ανωνυμοποίηση καθώς δε θα μπορεί με κανένα τρόπο να βρεθεί το δείγμα σας επειδή θα έχει αποκοπεί ολοκληρωτικά από τα στοιχεία σας μετά την ανωνυμοποίησή του.

B. Περιγραφή της διαδικασίας

1. Λήψη των δειγμάτων

Αίμα: Η λήψη δείγματος γίνεται από τους ιατρούς που συμμετέχουν στη μελέτη. Θα ληφθούν από εσάς σε μία εφάπαξ συνάντηση 8 ml περιφερικό αίμα το οποίο μεταφέρεται αφενός μεν σε ένα φιαλίδιο που περιέχει αντιπηκτικό EDTA (3,5 ml) αφετέρου δε σε φιαλίδιο πήξης (4,5 ml).

Ιστός: Μέρος ιστού που έχει ήδη ληφθεί από εσάς για άλλη ιατρική πράξη

ΕΜΥ: Μικρή ποσότητα εγκεφαλονωτιαίου μυελού που έχει ήδη ληφθεί από εσάς για άλλη ιατρική πράξη θα μεταφερθεί στο εργαστήριο

2. Ανωνυμοποίηση

Τα δείγματά σας θα ανωνυμοποιηθούν με ειδικά υπολογιστικά προγράμματα και τα στοιχεία που θα συνοδεύουν το δείγμα σας πριν και μετά την αποθήκευση δε θα έχουν καμία σχέση με τα στοιχεία της ταυτότητός σας

3. Μεταφορά των δειγμάτων

Η παραλαβή των δειγμάτων, από τον επιστημονικό συνεργάτη του ερευνητικού εργαστηρίου κλινικής φαρμακολογίας και φαρμακογενετικής γίνεται αμέσως μετά τη λήψη. Κατόπιν, τα δείγματα θα μεταφέρονται στο εργαστήριο σε θερμοκρασία απλής ψύξης (+3 έως +10 °C) εντός ειδικού δοχείου διατήρησης της θερμοκρασίας.

4. Επεξεργασία δειγμάτων

Στα δείγματά σας μπορεί να γίνει επιπλέον επεξεργασία (π.χ απομόνωση γενετικού υλικού και πρωτεϊνών) πριν την αποθήκευση ή και να αποθηκευθούν ως έχουν. Μετά την επεξεργασία το κάθε δείγμα μεταφέρεται στους -80 °C για μακροχρόνια φύλαξη.

Η διάρκεια της μελέτης

Σε ένα προγραμματισμένο ραντεβού με το γιατρό σας θα σας ληφθεί εφάπαξ το δείγμα. Το δείγμα ή τα δείγματά σας θα αποθηκευθούν επ'αόριστον.

Κίνδυνοι

Δεν υπάρχει κανένας γνωστός κίνδυνος.

Τήρηση απορρήτου

Αν δώσετε τη συγκατάθεσή σας για τη λήψη αίματος από εσάς, τα δείγματα αυτά θα κωδικοποιηθούν με κωδικό αριθμό, ο οποίος θα διασφαλίζει το απόρρητο της ταυτότητάς σας. Υπάρχει πλήρης εμπιστευτικότητα των στοιχείων σας και των ιατρικών σας δεδομένων καθώς δεν μπορεί να συσχετιστεί με κανένα τρόπο η ταυτότητά σας με το δείγμα σας που έχει ληφθεί από εσάς.

Διάδοση των αποτελεσμάτων

Πληροφορίες και δεδομένα από αυτά τα δείγματα θα αναφέρονται μόνο σε ειδικά ιατρικά ή επιστημονικά έντυπα, επιστημονικά συνέδρια στην Ελλάδα και το εξωτερικό, συμπόσια, σεμινάρια και μαθήματα στο Πανεπιστήμιο. Τα ονόματα αλλά και τα προσωπικά σας στοιχεία δεν αναφέρονται πουθενά ούτε είναι δυνατόν να αποκαλυφθούν, και αυτό προστατεύεται από την νομοθεσία σε όλο το κόσμο.

Δικαίωμα άρνησης και Ανάληψης

Έχετε το δικαίωμα να αρνηθείτε να χρησιμοποιηθούν τα δείγματα σας χωρίς απώλεια των ιατρικών παροχών που είχατε μέχρι τώρα. Η τρέχουσα ερευνητική μελέτη δεν θα επηρεάσει με οποιοδήποτε τρόπο τη θεραπεία σας και την ιατρική σας παρακολούθηση. Αν συμφωνήσετε να συμμετέχετε, πρέπει να γνωρίζετε ότι δεν μπορείτε να κάνετε άρση της συγκατάθεσής σας μετά την ανωνυμοποίηση καθώς δε θα μπορεί με κανένα τρόπο να βρεθεί το δείγμα σας καθώς θα έχει αποκοπεί ολοκληρωτικά από τα στοιχεία σας.

Με ποιον να επικοινωνήσω

Αν έχετε κάποιες απορίες παρακαλώ ρωτήστε τον ιατρό που σας ενημερώνει για τη μελέτη αυτή τη στιγμή ή οπουδήποτε άλλη φορά θελήσετε.

Μέρος II. ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΝΑΙΝΕΣΗΣ

Γνωρίζω ότι το δείγμα μου είναι

1. Αίμα
2. Μέρος ιστού που μου αφαιρέθηκε για λόγους ανεξάρτητους από τη μελέτη αυτή και δεν επηρεάζει τη θεραπεία μου, τη διάγνωσή μου και τη νοσηλεία μου
3. Επιθηλιακά κύτταρα στόματος/τραχήλου κλπ
4. Ένα μικρό μέρος της ποσότητας ΕΝΥ που μου αφαιρέθηκε για λόγους ανεξάρτητους από τη μελέτη αυτή και δεν επηρεάζει τη θεραπεία μου, τη διάγνωσή μου και τη νοσηλεία μου
5. Άλλο

ΚΑΤΟΠΙΝ ΤΗΣ ΕΝΗΜΕΡΩΣΗΣ ΜΟΥ ΑΠΟΦΑΣΙΖΩ

- /// Δε δίνω την άδειά μου τα δείγματά μου/το δείγμα μου να αποθηκεύονται επ 'αόριστον
- /// Δίνω την άδειά μου τα δείγματά μου/το δείγμα μου να αποθηκεύονται επ 'αόριστον

ΚΑΙ (ΑΝ ΔΩΣΩ ΤΗΝ ΑΔΕΙΑ ΜΟΥ)

- /// Δίνω την άδεια μου τα δείγματά μου να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον για οποιαδήποτε ερευνητική μελέτη χρειαστεί, με την προϋπόθεση ότι η μελέτη αυτή θα διεξαχθεί με σκοπό την εξέλιξη της επιστήμης και τη βελτίωση της ποιότητας της ανθρώπινης ζωής.

Έχω διαβάσει τις πληροφορίες που αναφέρονται στις σελίδες 1-4 του παρόντος εντύπου. Είχα την ευκαιρία να υποβάλω ερωτήσεις και μου έχουν απαντηθεί ικανοποιητικά μου . Συναινώ εθελοντικά να αποθηκεύονται τα δείγματα μου για τους σκοπούς που αναφέρονται παραπάνω .

Όνομα _____

Υπογραφή του συμμετέχοντος _____

ημερομηνία _____

Ημέρα / μήνας / έτος

Αναλφάβητοι

Αντί του ασθενούς ένας μάρτυρας θα πρέπει να υπογράψει (αν είναι δυνατό , το πρόσωπο αυτό θα πρέπει να επιλέγεται από τον συμμετέχοντα και θα πρέπει να μην έχει καμία σχέση με την ερευνητική ομάδα). Οι συμμετέχοντες οι οποίοι είναι αναλφάβητοι θα πρέπει να αφήσουν αποτύπωμα του αντίχειρα.

Έχω δει την ακριβή διαδικασία ενημέρωσης για το έντυπο συγκατάθεσης με το συμμετέχοντα , και το άτομο είχε την ευκαιρία να υποβάλει ερωτήσεις . Βεβαιώνω ότι το άτομο έχει δώσει τη συγκατάθεσή ελεύθερα .

Όνομα _____

Υπογραφή του μάρτυρα _____

ημερομηνία _____

Δακτυλικό αποτύπωμα

Ανήλικοι

Αντί του ασθενούς θα πρέπει να υπογράψει ο κηδεμόνας ή νόμιμος εκπρόσωπός του .

Έχω δει την ακριβή διαδικασία ενημέρωσης για το έντυπο συγκατάθεσης με το συμμετέχοντα και συμφωνώ να συμμετέχει ο ασθενής.....
εθελοντικά στο παραπάνω έργο

Όνομα _____

Υπογραφή του μάρτυρα _____

ημερομηνία _____

Δήλωση του / συγκατάθεση ερευνητή, πρόσωπου που λαμβάνει το έντυπο ενυπόγραφης συγκατάθεσης

Έχω διαβάσει με ακρίβεια το φύλλο πληροφοριών για τις δυνατότητες των συμμετεχόντων, και με τον καλύτερο δυνατό τρόπο φρόντισα ώστε ο συμμετέχων αντιλαμβάνεται ότι θα πρέπει να γίνουν τα παραπάνω και ότι υπογράφοντας επιβεβαιώνει τα εξής

1. Έχει διαβάσει και κατανοήσει όλες τις πληροφορίες που περιέχονται στο παρόν έντυπο.
2. Όλα τα ερωτήματά του έχουν απαντηθεί ικανοποιητικά.
3. Δέχεται με τη θέλησή του να συμμετέχουν στην παρούσα ερευνητική μελέτη
4. Επιτρέπετε στα πλαίσια της μελέτης να δημοσιοποιηθούν πληροφορίες που αφορούν το ανωνυμοποιημένο δείγμα τους , σύμφωνα πάντα με το νόμο 2472/97 περί προσωπικών δικαιωμάτων.
5. Έχει πάρει ένα αντίγραφο του παρόντος εντύπου, το οποίο και θα κρατήσει.

Επιβεβαιώνω ότι ο συμμετέχων είχε την ευκαιρία να υποβάλει ερωτήσεις σχετικά με τη φύση και τον τρόπο αποθήκευσης των δειγμάτων , καθώς και όλες οι ερωτήσεις που τέθηκαν από τον συμμετέχοντα έχουν απαντηθεί σωστά και με τον καλύτερο δυνατό τρόπο . Βεβαιώνω ότι το άτομο δεν έχει εξαναγκαστεί να δώσει τη συγκατάθεσή του και η συγκατάθεση έχει δοθεί ελεύθερα και εθελοντικά.

Ονοματεπώνυμο ερευνητή

Υπογραφή ερευνητή

.....

Παράρτημα Β

 <p>ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών</p>	Αριθμός Ασθενούς
---	------------------

ΦΟΡΜΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

ΠΑ ΤΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ:/...../.....

ΩΡΑ:.....

ΠΡΟ ΓΕΥΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑ ΓΕΥΜΑΤΟΣ

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΑΣΘΕΝΟΥΣ

ΑΣΘΕΝΕΙΑ.....

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ.....

0-10 10-18 18-25 25-30 30-35 35-40 40-50 50-60 60-70 70-80 80-ΑΝΩ

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑ.....

ΚΑΤΑΓΩΓΗ.....

ΦΥΛΟ.....

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ

ΗΛΙΚΙΑ ΠΡΩΤΩΝ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΩΝ.....

(0-ΟΧΙ, 1-ΜΗΤΕΡΑ, 2-ΠΑΤΕΡΑΣ, 3-ΑΔΕΛΦΟΣ, 4-ΑΔΕΛΦΗ

5-ΠΑΠΠΟΥΣ, 6-ΓΙΑΓΙΑ, 7-ΘΕΙΟΣ ΘΕΙΑ, 8-ΑΛΛΟΣ,

9-ΠΑΤΕΡΑΣ+ΑΔΕΛΦΟΣ, 10-ΜΗΤΕΡΑ+ΑΔΕΛΦΗ)

ΒΑΡΟΣ

ΥΨΟΣ

ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ: ΝΑΙ ΟΧΙ ΠΡΩΗΝ

ΤΣΙΓΑΡΑ/ΜΕΡΑ.....

ΥΨΟΣ ΒΑΡΟΣ.....

ΣΥΝΤΟΜΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ (Προστίθεται σελίδα αν χρειασθεί)

ΠΡΟΣΟΧΗ!

Παρακαλώ, συμπληρώστε όλα τα στοιχεία του ασθενούς καθώς μετά την παραλαβή των δειγμάτων από το Ερευνητικό Εργαστήριο Κλινικής Φαρμακολογίας και Φαρμακογενετικής, δεν μπορεί να συσχετιστεί ο ασθενής με το δείγμα. Σε περίπτωση που λείπουν στοιχεία το δείγμα απορρίπτεται.



ΓΙΑ ΤΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΓΩΓΗ

ΦΑΡΜΑΚΟ	ΔΟΣΟΛΟΓΙΑ/ημερησίως	ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ

Ο ΑΣΘΕΝΗΣ ΕΧΕΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙ ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΣΕ ΚΑΠΟΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟ; ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Είδος παρενέργειας

Εμπορική ονομασία

Φαρμακευτική ουσία

Χρόνος από την έναρξη της αγωγής

Λόγος που χορηγήθηκε το φάρμακο

Ενέργεια που απαιτήθηκε

Ο ΑΣΘΕΝΗΣ ΕΧΕΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΣΕ ΚΑΠΟΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟ ΣΤΟ ΠΑΡΕΛΘΟΝ;

Εμπορική ονομασία

Φαρμακευτική ουσία

Πάθηση:

Μετρούμενο χαρακτηριστικό προ/μετά αγωγή

Όνοματεπώνυμο και Υπογραφή ιατρού
που συμμετέχει στη μελέτη

ΠΡΟΣΟΧΗ!

Παρακαλώ, συμπληρώστε όλα τα στοιχεία του ασθενούς καθώς μετά την παραλαβή των δειγμάτων από το Ερευνητικό Εργαστήριο Κλινικής Φαρμακολογίας και Φαρμακογενετικής, δεν μπορεί να συσχετιστεί ο ασθενής με το δείγμα. Σε περίπτωση που λείπουν στοιχεία το δείγμα απερρίβεται.