



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ MicroRNAs
ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΕΠΙΛΗΨΙΑ

ΠΑΠΑΓΡΗΓΟΡΙΟΥ ΜΑΡΙΑ ΕΛΕΝΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2017



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ MicroRNAs
ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΕΠΙΛΗΨΙΑ

ΠΑΠΑΓΡΗΓΟΡΙΟΥ ΜΑΡΙΑ ΕΛΕΝΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ: Δ. ΣΙΔΕΡΗΣ, ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΕΘΝΙΚΟ
ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Δ. ΣΙΔΕΡΗΣ, ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
- Α. ΣΚΟΡΙΛΑΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
- Δ. ΒΑΣΙΛΑΚΟΠΟΥΛΟΥ, ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΑΘΗΝΑ 2017

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία αποτελεί ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης και εκπονήθηκε στον Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος «Κλινική Βιοχημεία – Μοριακή Διαγνωστική».

Αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω ορισμένους από τους ανθρώπους που γνώρισα, συνεργάστηκα και έπαιξαν πολύ σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας.

Πρώτο από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω τον επιβλέποντα καθηγητή της διπλωματικής μου εργασίας, Αναπλ. Καθηγητή κ. Διαμάντη Σίδερη για την πολύτιμη καθοδήγησή του, την προθυμία του να με συμβουλεύει, την εμπιστοσύνη και την εκτίμηση που έδειξε στο πρόσωπό μου.

Ευχαριστώ θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Νικόλαο Δρακούλη του Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και τη Δρ. Μάρθα Κατσαρού για τη συλλογή του βιολογικού υλικού της παρούσας εργασίας.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δρ. Μαργαρίτη Αυγέρη για την εποικοδομητική συνεργασία, τις συμβουλές και την πολύτιμη βοήθειά του κατά τη διάρκεια της εργασίας μου.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στην υποψήφια διδάκτορα Ιωάννα Κοκκινοπούλου, η οποία με τα πνευματικά προσόντα και το ήθος της συνέβαλε ουσιαστικά στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και στον Καθηγητή κ. Ανδρέα Σκορίλα και την Αναπλ. Καθηγήτρια κα Διδώ Βασιλακοπούλου που δέχθηκαν να είναι μέλη της τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Χριστίνα Πετροπούλου και την προπτυχιακή φοιτήτρια Ασπασία Κοντού για την καθημερινή και άριστη συνεργασία. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για την πολύτιμη και συνεχή υποστήριξή τους.

ΑΘΗΝΑ 2017

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΓΚΕΦΑΛΟ	1
2. ΕΠΙΛΗΨΙΑ	4
2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
2.1.1. Ιστορικά στοιχεία	4
2.1.2. Ορισμός επιληψίας – επιληπτικής κρίσης – επιληπτικού συνδρόμου	6
2.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	8
2.2.1. Επιληπτικές κρίσεις	8
2.2.2. Επιληψίες και επιληπτικά σύνδρομα	9
2.3. ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ	12
2.4. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	14
2.5. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ	18
2.6. ΔΙΑΓΝΩΣΗ	20
2.7. ΠΡΟΓΝΩΣΗ	21
2.8. ΘΕΡΑΠΕΙΑ	23
2.8.1. Φαρμακευτική αντιμετώπιση	23
2.8.2. Χειρουργική αντιμετώπιση	25
2.8.3. Διέγερση του πνευμονογαστρικού νεύρου (VNS)	26
2.8.4. Κετογόνοσ δίαιτα	28
3. ΜΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΑ RNAs (NON-CODING RNAs,ncRNAs).	29
3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	29
4. Micro RNAs	30
4.1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	30
4.2. ΒΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ	31
4.3. ΤΑ MiRNAs ΣΤΙΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ	34
4.4. ΤΑ MiRNAs ΣΤΗΝ ΕΠΙΛΗΨΙΑ	42
4.4.1. Το miR-34a	44
4.4.2. Το miR-146a	46
5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	50
5.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	50

5.2. ΟΡΓΑΝΑ	50
5.3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	51
5.4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA	51
5.5. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ (REVERSE TRANSCRIPTION / RT)	53
5.5.1. Αρχή μεθόδου	53
5.5.2. Πειραματική διαδικασία	54
5.6. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL-TIME PCR)	55
5.6.1. Αρχή μεθόδου	55
5.6.2. Συστήματα ανίχνευσης στη Real – Time PCR	57
5.6.3. Real-Time PCR για cel-miR-39	63
5.6.4. Real-Time PCR για miR-34a	65
5.6.5. Real-Time PCR για miR-146a	66
5.7. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ miRNAs ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΧΕΤΙΚΗΣ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ $2^{-\Delta\Delta C}$	67
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	67
6.1. Εκτίμηση της ποιότητας και της συγκέντρωσης του απομονωμένου ολικού RNA	68
6.2. Έλεγχος έκφρασης miR-34a και miR-146a σε κυτταρικές σειρές ...	68
6.2.1. Εφαρμογή single miR-specific reverse transcription (μονή miR-ειδικής αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής)	69
6.2.2. Εφαρμογή multiple miR-specific reverse transcription (πολλαπλή miR-ειδικής αντίδρασης αντίστροφής μεταγραφής).	71
6.2.3. Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης miR-ειδικών RT εκκινητών για τον προσδιορισμό του miR-34a	73
6.2.4. Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης miR-ειδικού MGB TaqMan probe για τον προσδιορισμό του miR-34a	75
6.2.5. Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης του universal ανάστροφου R εκκινητή για τον προσδιορισμό του miR-34a	78
6.2.6. Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης του πρόσθιου F εκκινητή για τον προσδιορισμό του miR-34a	80

6.3. Έλεγχος έκφρασης miR-34a και miR-146a σε δείγματα ορού ασθενών με επιληψία	83
6.3.1. Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης stem-loop RT εκκινητή στην αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής	83
6.3.2. Έλεγχος επιπέδων miR-146a και miR-34a σε σημαντικό αριθμό δειγμάτων ορού ασθενών με επιληψία	87
6.3.3. Σχεδιασμός και έλεγχος ειδικότητας και απόδοσης νέου stem-loop RT εκκινητή για το miR-34a	89
6.3.4. Σχεδιασμός και έλεγχος ειδικότητας και απόδοσης νέου πρόσθιου F εκκινητή για το miR-34a	92
7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	95
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	102
ABSTRACT	106
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	109

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΕΓΚΕΦΑΛΟΣ ΓΕΝΙΚΑ

Ο εγκέφαλος είναι το μεγαλύτερο και πιο πολύπλοκο τμήμα του νευρικού συστήματος του ανθρώπου. Αποτελεί το βασικό ρυθμιστή και συντονιστή όλων των οργάνων και των λειτουργικών συστημάτων του σώματος. Βρίσκεται προστατευμένος μέσα στην κρανιακή κοιλότητα και μαζί με το νωτιαίο μυελό αποτελούν το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) [1]. Ο εγκέφαλος και ο νωτιαίος μυελός αποτελούνται από 100 δισεκατομμύρια εξειδικευμένα κύτταρα, τα νευρικά κύτταρα ή τους νευρώνες, οι οποίοι συνεργάζονται συντονισμένα και οργανωμένα για τη διαμόρφωση της συμπεριφοράς του ανθρώπινου οργανισμού [1, 2].

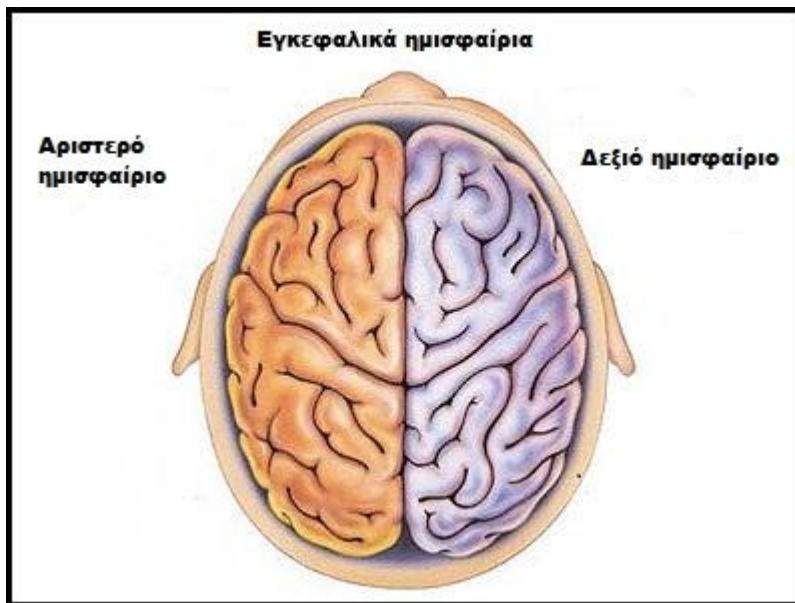
Το 82% του εγκεφάλου αποτελείται από τον εγκεφαλικό φλοιό καταλαμβάνοντας έτσι το μεγαλύτερο χώρο της κρανιακής κοιλότητας [3]. Η ύπαρξή του αυξάνει την πολυπλοκότητα της λειτουργίας του εγκεφάλου (Εικόνα 1). Ο εγκεφαλικός φλοιός είναι το τμήμα στο οποίο επιτελούνται οι ανώτερες λειτουργίες του εγκεφάλου όπως η σκέψη, οι συνειρμοί, η κρίση, οι αποφάσεις καθώς και ο έλεγχος της εκούσιας λειτουργίας των μυών του σώματος. Χωρίς αυτόν η ανθρώπινη φύση δε θα υπήρχε με τη γνωστή της μορφή [4]. Αν και δεν είναι μέχρι και σήμερα απόλυτα κατανοητός ο τρόπος με τον οποίο ο φλοιός επεξεργάζεται και ερμηνεύει τα εισερχόμενα ερεθίσματα, έχει διαπιστωθεί ότι εκτελεί μόνο δημιουργικές και επιτελικές λειτουργίες.



Εικόνα 1. Ο εγκεφαλικός φλοιός (neurosciencenews.com)

Ο εγκέφαλος χωρίζεται σε δύο ημισφαίρια, ένα αριστερό και ένα δεξιό, τα οποία μοιάζουν εξωτερικά, αλλά έχουν διαφορετικό μέγεθος και διαφέρουν ως προς τη λειτουργία τους. Το δεξιό ημισφαίριο ελέγχει και επεξεργάζεται σήματα από την αριστερή πλευρά του σώματος, ενώ το αριστερό από τη δεξιά πλευρά του σώματος [5].

Ο εγκεφαλικός φλοιός και τα εγκεφαλικά ημισφαίρια είναι δομές του εξωτερικού τμήματος του πρόσθιου εγκεφάλου, δηλαδή του τελικού εγκεφάλου ή τελεγκέφαλου.



Σχηματική απεικόνιση των εγκεφαλικών ημισφαιρίων

Κάθε ημισφαίριο είναι οργανωμένο σε δύο συστήματα, το αισθητικό και το κινητικό και παρόλο που καθένα επιτελεί διαφορετικές λειτουργίες συνεργάζονται με τέτοιο τρόπο, ώστε να εξασφαλίζεται η αμφίπλευρη λειτουργική συμμετρία των ημισφαιρίων. Για πρακτικούς λόγους τα ημισφαίρια του εγκεφάλου και ο εγκεφαλικός φλοιός διαιρούνται σε τέσσερις λοβούς και είναι: ο μετωπιαίος, ο βρεγματικός, ο κροταφικός και ο ινιακός (Εικόνα 2). Κάθε λοβός σχετίζεται με συγκεκριμένες λειτουργίες, ωστόσο υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ τους [4]. Πιο αναλυτικά:

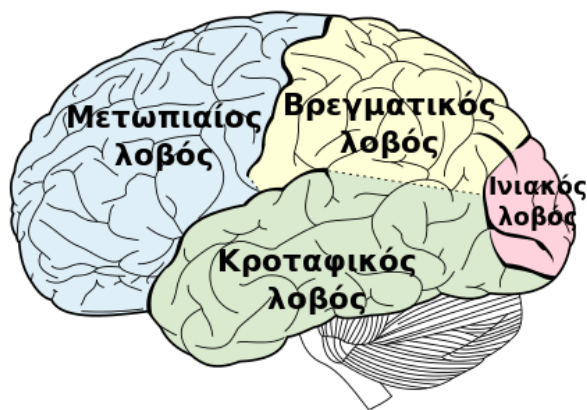
Ο μετωπιαίος λοβός βρίσκεται στο πρόσθιο μέρος της κεφαλής, καταλαμβάνει περίπου το 35% του όγκου των εγκεφαλικών ημισφαιρίων [6] και έχει πρωτίστως σχέση με την ομιλία. Στις λειτουργίες του μετωπιαίου λοβού

περιλαμβάνονται οι υψηλότερες διανοητικές λειτουργίες, η ικανότητα της λογικής σκέψης, ο έλεγχος των παρορμήσεων, η δημιουργικότητα και η οργάνωση [7, 8]. Ο μετωπιαίος λοβός περιλαμβάνει τις εξής περιοχές:

α) τον πρωτογενή κινητικό φλοιό, ο οποίος είναι υπεύθυνος για τον έλεγχο και την εκτέλεση των κινήσεων [9]

β) τον προκινητικό φλοιό, ο οποίος αποτελείται από τη συμπληρωματική κινητική περιοχή, το μετωπιαίο οφθαλμικό πεδίο, το οποίο σχετίζεται με τον έλεγχο της κίνησης των οφθαλμών και την περιοχή Broca, η οποία ελέγχει την εκούσια παραγωγή του λόγου [9]

γ) τον προμετωπιαίο φλοιό, ο οποίος σχετίζεται με την προσωπικότητα, τη ρύθμιση της συμπεριφοράς, τη διάθεση, την προσωρινή μνήμη, την κρίση, το σχεδιασμό για το άμεσο ή απώτερο μέλλον και την προσοχή [9, 10]



Εικόνα 2. Οι λοβοί του εγκεφάλου, μετωπιαίος, βρεγματικός, κροταφικός, ινιακός (<http://neurooncology.gr>)

Ο βρεγματικός λοβός βρίσκεται πίσω από το μετωπιαίο λοβό και ειδικεύεται στην επεξεργασία των σωματοαισθητικών πληροφοριών. Πιο συγκεκριμένα οι λειτουργίες του βρεγματικού λοβού σχετίζονται με τις γενικές αισθήσεις (δηλαδή τη θερμοκρασία, την αφή, την πίεση και τον πόνο), την αντίληψη των ερεθισμάτων, την ανάγνωση και τη γνώση των αριθμών. Ο βρεγματικός λοβός αποτελείται από τον πρωτογενή σωματοαισθητικό φλοιό, ο οποίος λαμβάνει πληροφορίες για τη θερμοκρασία, την κίνηση, την αφή και τη γεύση [11-13].

Ο κροταφικός λοβός βρίσκεται στο πλάγιο τμήμα κάθε ημισφαιρίου, κοντά στους κροτάφους. Είναι υπεύθυνος για την επεξεργασία των ακουστικών

ερεθισμάτων, την κατανόηση της γεύσης και της ομιλίας, την αντίληψη σύνθετων εικόνων, τη μάθηση, τα συναισθήματα και τη μνήμη. Στον κροταφικό λοβό περιλαμβάνεται η περιοχή Wernicke, η οποία σχετίζεται με την κατανόηση της ομιλίας [10, 14-16].

Τέλος, ο ινιακός λοβός εντοπίζεται στο οπίσθιο τμήμα του εγκεφαλικού φλοιού και επεξεργάζεται τα οπτικά ερεθίσματα. Αποτελείται από τον πρωτοταγή οπτικό φλοιό, ο οποίος είναι πολύ εξειδικευμένος στην επεξεργασία πληροφορίας ακίνητων ή κινούμενων αντικειμένων και τα συνειρμικά κέντρα [17-19].

2. ΕΠΙΛΗΨΙΑ

2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1.1. Ιστορικά στοιχεία

Ο όρος «επιληψία» εμφανίστηκε στη γαλλική γλώσσα το 1503. Προέρχεται από τη λατινική λέξη *epilepsia*, η ρίζα της οποίας βρίσκεται στο ελληνικό ρήμα «επιλαμβάνειν» (καταλαμβάνω, προσβάλλω αιφνίδια) [20]. Τα συμπτώματα της επιληψίας αναγνωρίζονται από πολύ νωρίς και δίνονται σε αυτά υπερφυσικές ερμηνείες. Οι πιο πρώιμες αναφορές σε επιληψία χρονολογούνται στη 2η χιλιετηρίδα π.Χ. στη Μεσοποταμία, όπου επιληπτικές κρίσεις και γενικευμένοι σπασμοί είχαν καταγραφεί με αξιοσημείωτα ακριβείς περιγραφές. Μία βαβυλωνιακή πήλινη πινακίδα, που εκτιμάται μεταξύ 1067-1046 π.Χ. και φυλάσσεται στο Βρετανικό Μουσείο του Λονδίνου, θεωρείται το αρχαιότερο ιατρικό κείμενο για την επιληψία [21, 22]. Στην Κίνα περίπου το 770 π.Χ. στο βιβλίο «Η κλασική ιατρική του κίτρινου αυτοκράτορα» εμφανίζεται το πρώτο γνωστό έγγραφο σχετικά με την επιληψία γραμμένο από μία ομάδα ιατρών. Η περιγραφή της επιληψίας περιορίζεται στις γενικευμένες επιληπτικές κρίσεις [23].

Στην αρχαία Ελλάδα η επιληψία, ο σεληνιασμός, η ιερά νόσος, η Ηράκλεια νόσος (γιατί ο Ηρακλής υπέφερε από αυτή) ή ο δαιμονισμός ήταν έννοιες ταυτόσημες, όπως αναφέρεται σε αρχαία ελληνικά κείμενα. Η ασθένεια είχε ονομαστεί ως ιερά νόσος, καθώς υπήρχε η πεποίθηση ότι είχε θεϊκή καταγωγή. Η επιληψία θεωρείτο ως μια δαιμονική δύναμη, μία θεϊκή τιμωρία για τους

αμαρτωλούς, μία αύρα μυστικισμού και δεισιδαιμονίας [24]. Προκειμένου να θεραπευτεί ο ασθενής θα έπρεπε να προσφέρει θυσίες στους θεούς, να ζητήσει εξιλέωση και να λάβει μέρος σε θρησκευτικές πράξεις σύμφωνα με τις οδηγίες του ιερέα [25].

Ο Ιπποκράτης ήταν ο πρώτος που αναγνώρισε την επιληψία ως κλινική οντότητα το 400 π.Χ. Στο έργο του «Περί ιερής νόσου» γράφει ότι η ιερά νόσος είναι μία διαταραχή για την οποία υπεύθυνος είναι ο εγκέφαλος [26]. Για να εδραιωθεί στους ιατρικούς κύκλους ότι η επιληψία αποτελούσε μία διαταραχή του εγκεφάλου χρειάστηκαν πολλοί αιώνες, ώσπου να φτάσουμε στο 18^ο και 19^ο αιώνα. Το 19^ο αιώνα, το έργο του John Hughlings Jackson (1835 –1911) κυριαρχεί στη βιβλιογραφία της επιληπτολογίας. Ο Άγγλος νευρολόγος διατύπωσε με διορατικότητα τα λειτουργικά χαρακτηριστικά της επιληπτικής εκφόρτισης «...αιφνίδια, προσωρινή και υπέρμετρη εκφόρτιση ασταθών κυττάρων ενός τμήματος της φαιάς ουσίας του εγκεφάλου...». Επίσης πρότεινε πως ο χαρακτήρας της επιληπτικής κρίσης είχε άμεση σχέση με το σημείο και τη λειτουργία της περιοχής όπου λάμβανουν χώρα οι εκφορτίσεις [27]. Η ανακάλυψη του ηλεκτροεγκεφαλογράφηματος (ΗΕΓ) από τον Hans Berger στις αρχές του 20^{ου} αιώνα κατέστησε δυνατή την καταγραφή του ηλεκτρικού δυναμικού του ανθρώπινου εγκεφάλου και επέτρεψε μια νέα προσέγγιση στην κατανόηση της επιληψίας, διαχωρίζοντας τις κρίσεις ανάλογα με τα κλινικά και νευροφυσιολογικά χαρακτηριστικά τους [28]. Τέλος, η αξιοσημείωτη πρόοδος των νευροαπεικονιστικών μεθόδων, όπως η μαγνητική τομογραφία (MRI) και η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET), συνέβαλε στην κατανόηση της λειτουργίας και των δομών του ανθρώπινου εγκεφάλου και κατ' επέκταση στη διαγνωστική προσέγγιση της επιληψίας [29].

Πολλές διάσημες προσωπικότητες της Ιστορίας έπασχαν ή λέγεται ότι έπασχαν από επιληψία. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται παγκόσμιοι ηγέτες, όπως ο Ιούλιος Καίσαρας, συγγραφείς, όπως ο Lewis Carroll, ο Ρώσος μυθιστοριογράφος Ντοστογιέφσκι, καλλιτέχνες, όπως ο Vincent Van Gogh, ο φιλόσοφος Σωκράτης, ο Μέγας Ναπολέων, ο εφευρέτης της πυρίτιδας Άλφρεντ Νόμπελ και ο κορυφαίος συνθέτης και πιανίστας Λούντβιχ Μπετόβεν. Η επιληψία φυσικά και επηρέασε τη ζωή τους και κατ' επέκταση και το έργο τους. Για

παράδειγμα υποστηρίχθηκε ότι η επιληψία έδωσε το βίωμα στην τεχνοτροπία των πινάκων του Vincent Van Gogh [30]. Ή στα βιβλία του Ντοστογιέφσκι η επιληψία είναι κεντρική πηγή θεμάτων, προσωπικοτήτων και γεγονότων [31]. Ο Lewis Carroll στις ιστορίες του, «Alice's Adventures in Wonderland» πιθανότατα αναφερόταν στις δικές του εμπειρίες από τις κρίσεις του κροταφικού λοβού [32]. Όλα αυτά τα άτομα παρά το γεγονός ότι έπασχαν από επιληψία, κατάφεραν να διακριθούν και να μεγαλουργήσουν και μ' αυτόν τον τρόπο να συνδέσουν την επιληψία με την ευφυΐα.

2.1.2. Ορισμός επιληψίας – επιληπτικής κρίσης – επιληπτικού συνδρόμου

Τα τελευταία χρόνια το θέμα ενός ευρύτερα αποδεκτού ορισμού για την επιληψία έχει εγείρει συζητήσεις στους κύκλους της επιστημονικής κοινότητας. Σύμφωνα με τη Διεθνή Ένωση κατά της Επιληψίας (International League Against Epilepsy - ILAE) το 2005, επιληψία ορίζεται ως η διαταραχή του εγκεφάλου που χαρακτηρίζεται από τη διαρκή προδιάθεση για την εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων και από τις νευροβιολογικές, γνωστικές, ψυχολογικές και κοινωνικές συνέπειες αυτής της κατάστασης [33]. Στις περιπτώσεις που συμμετέχει ο κινητικός φλοιός του εγκεφάλου μπορεί να προκαλούνται σπασμοί, ενώ σε εκείνες που συμμετέχει ο βρεγματικός ή ο ινιακός φλοιός, προκαλούνται ακουστικές ή οσφρητικές ψευδαισθήσεις [34]. Η επιληψία συναντάται συνήθως σε άτομα που έχουν την προδιάθεση να εμφανίσουν κρίσεις λόγω μίας χρόνιας παθολογικής κατάστασης, όπως όγκος εγκεφάλου, μετατραυματική βλάβη, γενετική ευαισθησία ή ίσως ενός συνδυασμού των παραπάνω. Στο ερώτημα αν η επιληψία είναι μία κληρονομική ασθένεια δεν υπάρχει μία γενική απάντηση. Έχουν βρεθεί πολλά γονίδια που σχετίζονται με την επιληπτογένεση, τη δημιουργία δηλαδή της επιληψίας [35]. Είναι πλέον αποδεκτό ότι ορισμένα άτομα μπορεί να έχουν γενετική προδιάθεση για την επιληψία και την ανάπτυξη κρίσεων [35-37].

Ως επιληπτική κρίση ορίζεται η προσωρινή εμφάνιση σημείων και/ή συμπτωμάτων που οφείλονται σε μία ανώμαλη υπερβολική ή σύγχρονη νευρωνική δραστηριότητα του εγκεφάλου [33]. Ανάλογα με την περιοχή που συμβαίνει αυτή η νευρωνική δραστηριότητα οι κρίσεις μπορεί να περιλαμβάνουν αλλαγή στην κινητική λειτουργία, την αισθητικότητα, την εγρήγορση, την αντίληψη, την

αυτονομία ή κάποιο συνδυασμό τους. Ένα επεισόδιο επιληπτικής κρίσης δε σημαίνει απαραίτητα επιληψία [38, 39]. Εντούτοις, περίπου τα μισά άτομα που έχουν ένα επεισόδιο επιληπτικής κρίσης χωρίς κάποια σαφή αιτία, θα εμφανίσουν κι άλλη συνήθως μέσα σε έξι μήνες. Μετά από δύο κρίσεις υπάρχει 80% πιθανότητα ότι θα ακολουθήσουν κι άλλες [40-42].

Ο ορισμός για την επιληψία που παρατίθεται ανωτέρω είναι ο εννοιολογικός ορισμός της. Η ILAE ωστόσο, ανέθεσε σε μία ομάδα εργασίας να διαμορφώσει και ένα λειτουργικό ορισμό της επιληψίας για κλινικούς λόγους. Με βάση λοιπόν το νέο ορισμό που δημοσιεύθηκε το 2014, επιληψία είναι η ασθένεια του εγκεφάλου, η οποία ορίζεται από οποιαδήποτε από τις ακόλουθες συνθήκες: α) ιστορικό δύο τουλάχιστον επεισοδίων σπασμών με περισσότερες από 24 ώρες διαφορά μεταξύ τους, β) ένα απρόκλητο επεισόδιο σπασμών και η πιθανότητα περαιτέρω επεισοδίων με τον κίνδυνο επανεμφάνισης να αγγίζει τουλάχιστον το 60% μετά από δύο απρόκλητα επεισόδια σπασμών, που μπορεί να συμβούν μέσα στα επόμενα 10 χρόνια και γ) διάγνωση ενός επιληπτικού συνδρόμου [43]. Παρατηρούμε ότι προστέθηκαν χρονικά όρια που παλαιότερα δεν υπήρχαν. Παραδοσιακά η επιληψία αναφερόταν ως εγκεφαλική διαταραχή ή ομάδα διαταραχών του εγκεφάλου παρά ως ασθένεια. Όμως, ο όρος «διαταραχή» είναι ελάχιστα κατανοητός από το ευρύ κοινό και υποβαθμίζει τη σοβαρότητα της επιληψίας. Με αυτόν τον τρόπο η Διεθνής Ένωση κατά της Επιληψίας και το Παγκόσμιο Γραφείο Επιληψίας (International Bureau for Epilepsy, IBE) συμφώνησαν πως είναι καλύτερα η επιληψία να ορίζεται ως ασθένεια και όχι ως διαταραχή [43]. Συνεπώς, με το νέο ορισμό διευρύνεται η έννοια της επιληψίας περιλαμβάνοντας ένα απρόκλητο επεισόδιο σπασμών με πιθανότητα επανεμφάνισης στο μέλλον. Το μεγάλο όφελος του, είναι ότι επιτρέπει σε έναν ασθενή να θεωρείται «θεραπευμένος» όταν δεν έχει βιώσει ένα επεισόδιο σπασμών σε διάστημα 10 χρόνων και δε λαμβάνει θεραπεία για 5 χρόνια.

Τα επιληπτικά σύνδρομα ορίζονται ως κλινικές διαταραχές που χαρακτηρίζονται από ένα σύμπλεγμα από συμπτώματα και σημεία που συνήθως εμφανίζονται μαζί. Τα κριτήρια για τον καθορισμό ενός επιληπτικού συνδρόμου περιλαμβάνουν τον τύπο των επιληπτικών κρίσεων, την ηλικία έναρξης των κρίσεων, την πορεία, τα ηλεκτροεγκεφαλογραφικά χαρακτηριστικά, τα σχετιζόμενα σημεία και

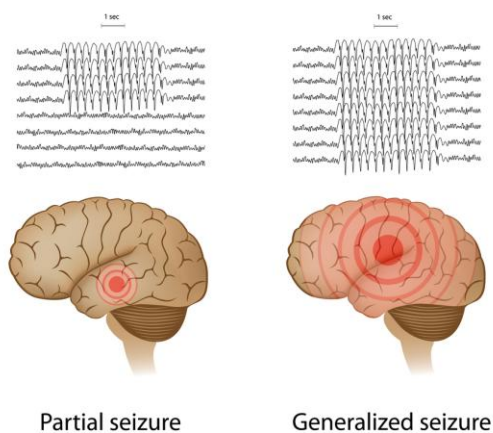
συμπτώματα, τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς, το ανατομικό υπόβαθρο, την αιτιολογία, και τη γενετική βάση [44].

2.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Ένας από τους βασικούς στόχους της ταξινόμησης της επιληψίας είναι η ανάπτυξη τεκμηριωμένων θεραπευτικών προσεγγίσεων και πρόγνωσης για τους ασθενείς [45]. Η πρώτη Διεθνής Ταξινόμηση της Επιληψίας που δημιουργήθηκε το 1970 όρισε δύο κατηγορίες ταξινόμησης, ένα για τις επιληπτικές κρίσεις και ένα για τις επιληψίες και για τα επιληπτικά σύνδρομα.

2.2.1. Επιληπτικές κρίσεις

Με βάση τη Διεθνή Ένωση κατά της Επιληψίας το 1981, οι επιληπτικές κρίσεις χωρίζονται σε δύο κύριες ομάδες: τις εστιακές και τις γενικευμένες. Οι εστιακές κρίσεις, ξεκινούν από συγκεκριμένη περιοχή του εγκεφάλου και υποδιαίρονται σε εκείνες, οι οποίες δε συνοδεύονται από διαταραχή του επιπέδου συνείδησης (απλές εστιακές) και σε εκείνες που συνοδεύονται από διαταραχή του επιπέδου συνείδησης (σύνθετες εστιακές). Και οι δύο μορφές εστιακών κρίσεων μπορούν να επεκταθούν ταχύτατα σε άλλες περιοχές ή και σε όλο τον εγκέφαλο οδηγώντας σε δευτεροπαθείς γενικευμένες τονικοκλονικές κρίσεις. Οι γενικευμένες επιληπτικές κρίσεις χαρακτηρίζονται από ταυτόχρονη εξαρχής συμμετοχή και των δύο εγκεφαλικών ημισφαιρίων και συνοδεύονται πάντα από διαταραχή του επιπέδου συνείδησης [39, 46, 47] (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Εστιακή (*partial seizure*) και γενικευμένη κρίση (*generalized seizure*) και τα αντίστοιχα ηλεκτροεγκεφαλογραφήματα (www.braintrainuk.com)

Πιο αναλυτικά ταξινομούνται ως εξής [46, 47]:

- Εστιακές κρίσεις
 - Απλές εστιακές κρίσεις (χωρίς διαταραχή επιπέδου συνείδησης)
 - Με κινητικά συμπτώματα
 - Αισθητικά συμπτώματα
 - Συμπτώματα από το αυτόνομο
 - Ψυχικά συμπτώματα
 - Σύνθετες εστιακές κρίσεις (με διαταραχή επιπέδου συνείδησης)
 - Με έναρξη ως απλή εστιακή και εμφάνιση διαταραχής συνείδησης στην εξέλιξη της κρίσης
 - Με διαταραχή της συνείδησης από την έναρξη
 - Εστιακές κρίσεις με δευτερογενή γενίκευση
- Γενικευμένες κρίσεις
 - Αφαιρέσεις (τυπικές ή άτυπες)
 - Μυοκλονικές κρίσεις
 - Κλονικές κρίσεις
 - Τονικές κρίσεις
 - Τονικοκλονικές κρίσεις (grand mal)
 - Ατονικές ή αστατικές κρίσεις

2.2.2. Επιληψίες και επιληπτικά σύνδρομα

Η ταξινόμηση της επιληψίας ή του επιληπτικού συνδρόμου εξασφαλίζει δύο επιπέδων κατηγοριοποίηση. Πρώτον, όσον αφορά στην ταξινόμηση των κρίσεων και δεύτερον, όσον αφορά στην οργάνωσή τους. Αναφορικά λοιπόν με την εντόπιση στον εγκέφαλο οι επιληψίες ταξινομούνται σε εστιακές ή γενικευμένες και ανάλογα με την αιτιολογία τους διακρίνονται σε ιδιοπαθείς, συμπτωματικές ή δευτεροπαθείς και κρυπτογενείς. Στην ιδιοπαθή επιληψία δεν υπάρχει κάποια συγκεκριμένη αιτία που προκαλεί τις κρίσεις, εκτός από πιθανή γενετική προδιάθεση. Στη δευτεροπαθή, ένας αριθμός διαταραχών, όπως όγκος

εγκεφάλου, τραυματισμός στο κεφάλι, μεταβολικές διαταραχές (υπογλυκαιμία, υπονατρίαζα), σοβαρές λοιμώξεις (μηνιγγίτιδα, AIDS, εγκεφαλίτιδα), προγεννητικές εγκεφαλικές βλάβες, αναπτυξιακές διαταραχές, εκφυλιστικές παθήσεις (π.χ. νόσος Alzheimer) και άλλες που θα αναλυθούν σε επόμενη ενότητα, μπορεί να προκαλέσει την εκδήλωση επιληπτικών κρίσεων. Στην κρυπτογενή επιληψία πιστεύεται ότι υπάρχει συγκεκριμένη αιτία, αλλά δεν μπορεί να γίνει γνωστή με βάση τις υπάρχουσες επιστημονικές γνώσεις τη δεδομένη χρονική στιγμή [48].

Στην ταξινόμηση της Διεθνούς Ένωσης κατά της Επιληψίας - ILAE 1989, οι επιληψίες και τα επιληπτικά σύνδρομα διαχωρίζονται με βάση τα κλινικά και ηλεκτροεγκεφαλογραφικά κριτήρια σε τέσσερις μεγάλες κατηγορίες [44], [49]:

➤ Επιληψίες και επιληπτικά σύνδρομα που σχετίζονται με συγκεκριμένη εντόπιση στον εγκέφαλο – εστιακές επιληψίες

A) Ιδιοπαθείς

Καλοήθης παιδική επιληψία με κεντροκροταφική εστία (Ρολάνδρειος επιληψία)

Καλοήθης παιδική επιληψία με ινιακή εστία (Σύνδρομο Παναγιωτόπουλος)

Πρωτοπαθής επιληψία της ανάγνωσης

B) Συμπτωματικές ή δευτεροπαθείς

Επιληψίες κροταφικού λοβού

Επιληψίες μετωπιαίου λοβού

Επιληψίες βρεγματικού λοβού

Επιληψίες ινιακού λοβού

Χρόνια προοδευτική εστιακή συνεχής επιληψία (Σύνδρομο Kojewnikow)

Επιληψίες με ειδικούς τρόπους έκλυσης των κρίσεων

Γ) Κρυπτογενείς

Συμπτωματικές, αλλά η αιτία παραμένει άγνωστη

➤ Επιληψίες και επιληπτικά σύνδρομα που χαρακτηρίζονται από γενικευμένες κρίσεις

A) Ιδιοπαθείς (βάσει ηλικίας εμφάνισης)

Καλοήθεις νεογνικοί οικογενείς σπασμοί

Καλοήθεις νεογνικοί σπασμοί

Καλοήθης μυοκλονική επιληψία της παιδικής ηλικίας

Επιληψία με αφαιρέσεις της παιδικής ηλικίας

Επιληψία με αφαιρέσεις της εφηβικής ηλικίας

Εφηβική μυοκλονική επιληψία

Επιληψία με κρίσεις «grand mal» στην αφύπνιση

Άλλες γενικευμένες ιδιοπαθείς αταξινόμητες επιληψίες.

B) Κρυπτογενείς (βάσει ηλικίας εμφάνισης)

Σύνδρομο West (βρεφικοί σπασμοί)

Σύνδρομο Lennox- Gastaut

Μυοκλονική αστατική επιληψία

Επιληψία με μυοκλονικές αφαιρέσεις

Γ) Συμπτωματικές

Μη ειδικής αιτιολογίας (πρώιμη μυοκλονική εγκεφαλοπάθεια, πρώιμη βρεφική επιληπτική εγκεφαλοπάθεια και άλλες συμπτωματικές αταξινόμητες επιληψίες

Ειδικά σύνδρομα (επιληπτικές κρίσεις που συνοδεύουν διάφορες παθήσεις)

➤ Επιληψίες και επιληπτικά σύνδρομα ακαθόριστου χαρακτήρα

A) Μη γενικευμένες και εστιακές κρίσεις

Βρεφικοί σπασμοί

Σοβαρή μυοκλονική επιληψία της βρεφικής ηλικίας

Επιληψία με συνεχείς εκφορτίσεις αιχμής-κύματος στη διάρκεια του βραδύ ύπνου

Επίκτητη επιληπτική αφασία (Σύνδρομο Landau-Kleffner)

Άλλες αταξινόμητες

B) Χωρίς σαφείς γενικευμένες ή εστιακές εκδηλώσεις

➤ Ειδικά σύνδρομα

Πυρετικοί σπασμοί

Μεμονωμένο επεισόδιο σπασμών ή επιληπτική κατάσταση (status epilepticus, SE)

Σπασμοί που εμφανίζονται μόνο σε ορισμένες καταστάσεις.

2.3. ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

Οποιαδήποτε κατάσταση, η οποία επηρεάζει τη λειτουργία του εγκεφάλου μπορεί να οδηγήσει σε επιληψία. Υπάρχουν διάφορες αιτίες που μπορούν να προκαλέσουν την επιληψία, ωστόσο σε περισσότερες από το 70% των περιπτώσεων, η αιτία της είναι άγνωστη [50]. Η Διεθνής Ένωση κατά της Επιληψίας, ILAE έχει χωρίσει τις αιτίες της επιληψίας σε γενετικές, μεταβολικές και άγνωστης αιτίας [51]. Έχει υπολογιστεί ότι οι μισές περιπτώσεις επιληψίας είναι αποτέλεσμα κάποιου τραύματος του εγκεφάλου [39]. Μερικοί από τους παράγοντες στους οποίους μπορεί να οφείλεται η επιληψία είναι:

- Προγεννητικοί παράγοντες: Εγκεφαλικές βλάβες που προκαλούνται από τραυματισμούς πριν από τη γέννηση ή από έλλειψη επαρκούς οξυγόνου. Μία βλάβη στον εγκέφαλο μπορεί να οδηγήσει σε επιληψία ή εγκεφαλική παράλυση[52].
- Περιγεννητικοί παράγοντες: Έλλειψη επαρκούς οξυγόνου ή τραυματισμοί στο κεφάλι κατά τη διάρκεια του τοκετού [52-54].
- Όγκοι εγκεφάλου: Οι όγκοι εγκεφάλου, είτε καλοήθεις είτε κακοήθεις, αποτελούν μία κοινή αιτία επιληψίας [55]. Σε ενήλικες άνω των 65 ετών συνιστούν αιτιολογικό παράγοντα για επιληπτική δραστηριότητα [39]. Μπορούν να εμφανισθούν σε οποιαδήποτε ηλικία, αλλά είναι πιο συχνοί σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας [56].
- Μεταδοτικές ασθένειες: Μολυσματικές ασθένειες, όπως μηνιγγίτιδα, AIDS και ιογενή εγκεφαλίτιδα μπορεί να προκαλέσουν επιληψία [53, 57, 58].
- Τραυματισμοί στο κεφάλι: Ένα τραύμα στο κεφάλι ως αποτέλεσμα ενός ατυχήματος κατά την εφηβεία ή την ενήλικη ζωή μπορεί να προκαλέσει επιληψία [39].

- Εγκεφαλικές βλάβες, όπως το εγκεφαλικό επεισόδιο. Το εγκεφαλικό είναι βασική αιτία επιληψίας όταν περιορίζεται η απαιτούμενη ποσότητα οξυγόνου προς τον εγκέφαλο [39, 52, 54].
- Νευροδερματικά σύνδρομα: Η επιληψία μπορεί μερικές φορές να συνδέεται με νευροδερματικές διαταραχές, όπως η οζώδης σκλήρυνση και η νευροϊνωμάτωση [53].
- Γενετικοί παράγοντες: Ορισμένοι τύποι επιληψίας, οι οποίοι κατηγοριοποιούνται από τον τύπο της κρίσης ή από το τμήμα του εγκεφάλου που συμμετέχει είναι κληρονομικοί. Σε αυτές τις περιπτώσεις είναι πιθανό ότι υπάρχει μία γενετική επιρροή. Οι ερευνητές έχουν συνδέσει ορισμένους τύπους επιληψίας σε συγκεκριμένα γονίδια. Στην πλειοψηφία των ατόμων, τα γονίδια αποτελούν ένα μέρος για την αιτία της επιληψίας [35, 36, 53, 59].
- Μεταβολικές διαταραχές: Αυτές οι διαταραχές προκαλούν αλλαγή στα επίπεδα διάφορων μεταβολικών ουσιών στο σώμα και μερικές φορές οδηγούν σε επιληπτικές κρίσεις. Τέτοιες είναι οι ηλεκτρολυτικές διαταραχές, όπως υπονατριαιμία, υποκαλιαιμία και αλλαγές στα επίπεδα του ασβεστίου ή μαγνησίου, υπογλυκαιμία και υπεργλυκαιμία, ενδοκρινικές διαταραχές, αιματολογικές διαταραχές, νεφρική ανεπάρκεια, ουραιμία, ηπατική ανεπάρκεια και υποξία [39, 60].
- Τοξικοί παράγοντες: Η παρουσία ορισμένων φαρμάκων, όπως και η ξαφνική απόσυρσή τους μπορεί να οδηγήσει σε επιληπτική δραστηριότητα [61]. Ανάμεσα σε αυτά φάρμακα συγκαταλέγονται τα αντιβιοτικά, τα ενδοκρινικά φάρμακα, τα τοπικά αναισθητικά, τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά, το λίθιο και τα αντιψυχωσικά φάρμακα [62, 63]. Παράνομη χρήση ναρκωτικών κυρίως της κοκαΐνης, της ηρωΐνης και των αμφεταμινών μπορεί να προκαλέσει επιληπτική κρίση [64]. Επίσης η απότομη διακοπή του αλκοόλ έχει συνδεθεί με την εμφάνιση της επιληπτικής δραστηριότητας [65]. Απόσυρση από συνταγογραφούμενα φάρμακα, όπως τα βαρβιτουρικά και οι βενζοδιαζεπίνες μπορεί ομοίως να οδηγήσουν σε κρίσεις [66].
- Εκφυλιστικές παθήσεις, όπως η νόσος Alzheimer [39, 53, 67].

2.4. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η επιληψία είναι μία από τις παλαιότερες καταστάσεις που έχει γνωρίσει η ανθρωπότητα και αποτελεί μία από τις πιο κοινές νευρολογικές διαταραχές, η οποία επηρεάζει άτομα όλων των ηλικιών. Υπολογίζεται ότι περίπου 50.000.000 άτομα παγκοσμίως έχουν διαγνωσθεί με επιληψία [68, 69]. Ωστόσο, δεν είναι ομοιόμορφα κατανομημένη με αποτέλεσμα οι επιδημιολογικές μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε διάφορες χώρες και σε διαφορετικούς πληθυσμούς να εμφανίζουν σημαντικές διαφορές στα ευρήματά τους. Πολλές από τις διαφορές μπορούν να αποδοθούν σε μεθοδολογικές αποκλίσεις, αλλά και τη δομή του κάθε πληθυσμού.

- Επιπολασμός

Σε ένα μεγάλο αριθμό μελετών φάνηκε ότι ο επιπολασμός της ενεργού επιληψίας είναι αρκετά ομοιόμορφος σε 4-10/1000 άτομα. Στην υποσαχάρια Αφρική, όπως και την Κεντρική και Νότια Αμερική έχουν σημειωθεί μεγαλύτερα ποσοστά επιπολασμού [70]. Σε τρεις μελέτες που διεξήχθησαν σε διάφορα μέρη του κόσμου φάνηκε σχέση μεταξύ κοινωνικοοικονομικού επιπέδου και του επιπολασμού [71-73]. Πιο συγκεκριμένα, στην πρώτη μελέτη που έγινε στη Βραζιλία ο επιπολασμός της ενεργού επιληψίας ήταν υψηλότερος σε άτομα με χαμηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο με 7.5/1000 από ότι σε πιο εύπορα άτομα (1.6/1000). Στη δεύτερη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη Ζάμπια, τα επιληπτικά άτομα βρέθηκαν σε χαμηλότερη κοινωνική και οικονομική κατάσταση από άτομα της ίδια ηλικίας με άλλες χρόνιες παθήσεις. Ωστόσο στην τρίτη μελέτη, η οποία έλαβε χώρα στη Νέα Υόρκη ο επιπολασμός της επιληψίας ήταν υψηλότερος σε άτομα με υψηλότερο εισόδημα.

Ο επιπολασμός ορισμένων επιληπτικών συνδρόμων διαμορφώνεται ως εξής: Σύνδρομο West: 1.4 – 1.9/10.000 παιδιά και 1-9/100.000 άτομα, Σύνδρομο Lennox-Gastaut 1.3-3/10.000 παιδιά και 2-6/100.000 άτομα, εφηβική μυοκλονική επιληψία 3/10.000 παιδιά και ιδιοπαθής επιληψία 2.4- 4/10.000 άτομα [74]. Ανάλογα με τον τύπο της επιληπτικής κρίσης σε σχέση με τον επιπολασμό έχει παρατηρηθεί υψηλότερο ποσοστό των γενικευμένων κρίσεων κι όχι εστιακών. Αυτό όμως δεν φαίνεται να ισχύει γενικότερα. Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν

στη Βορειοανατολική Αμερική παρατηρήθηκαν δραματικές διαφορές ανάλογα με τον τύπο της επιληπτικής κρίσης.

Αν και οι μελέτες δεν είναι σε απόλυτη συμφωνία, οι περισσότερες αναφορές δείχνουν την επιληψία να είναι πιο συχνή κατά την εφηβεία ή την πρώιμη ενήλικη ζωή [75-78]. Στις αναπτυγμένες χώρες οι περισσότερες μελέτες υποστηρίζουν ότι ο επιπολασμός της επιληψίας είναι σταθερός ανάμεσα στους ενήλικες και αυξάνεται μετά την ηλικία των 50 [77, 79]. Από την άλλη, στις αναπτυσσόμενες χώρες φαίνεται πως παραμένει σταθερός στην τρίτη και τέταρτη δεκαετία της ζωής και αρχίζει να μειώνεται μετά τα 50 χρόνια. Λιγότερες μελέτες έχουν δείξει ότι ο επιπολασμός αυξάνεται μετά τα 60 χρόνια [75, 76, 78]. Επίσης ο επιπολασμός είναι υψηλότερος στους άνδρες από τις γυναίκες με τη μεταξύ τους διαφορά να είναι ελάχιστη. Ένα ακραίο παράδειγμα μόνο έχει αναφερθεί στην Ινδία με τους άνδρες να έχουν σαφώς μεγαλύτερο επιπολασμό με 5.5/1000 από τις γυναίκες που είχαν μόλις 2.2/1000 [80].

Πολύ λίγες είναι οι μελέτες που εξέτασαν τον επιπολασμό συγκριτικά με τη φυλή ή την εθνικότητα. Το 1986 οι Haeger και συν αξιολόγησαν τον επιπολασμό της επιληψίας ανάμεσα στους Αφροαμερικάνους και τους Καυκάσιους και παρατήρησαν ότι ήταν υψηλότερος στους Αφροαμερικάνους με 8.2/1000 σε σχέση με τους Καυκάσιους που ήταν 5.4/1000.

- Επίπτωση

Τα στοιχεία που προκύπτουν για την επίπτωση της επιληψίας σε σχέση με αυτά του επιπολασμού είναι λιγότερα κι αυτό, γιατί οι μελέτες που πραγματοποιούνται για την επίπτωση είναι λιγότερο συχνές.

Η επίπτωση της επιληψίας είναι 24-53/100.000 άτομα στις αναπτυγμένες χώρες, ενώ μεγαλύτερη επίπτωση (49.3-190/100.000 άτομα) παρατηρείται στις αναπτυσσόμενες χώρες [81]. Αυτό μπορεί να αποδοθεί εν μέρει σε παρασιτικές ασθένειες, στον ιό HIV, σε τραύματα και σε αιμομιξίες, αλλά είναι αρκετά δύσκολο να ερμηνευθούν εξαιτίας μεθοδολογικών ζητημάτων. Μελέτες δείχνουν υψηλότερη επίπτωση σε άτομα με χαμηλότερο κοινωνικοοικονομικό επίπεδο συγκριτικά με άτομα υψηλότερου αντίστοιχου επιπέδου. Στη Μεγάλη Βρετανία άτομα που εμφάνιζαν χαμηλότερο κοινωνικοοικονομικό επίπεδο είχαν διπλάσιες πιθανότητες να εκδηλώσουν επιληψία απ' ότι άτομα με υψηλότερο επίπεδο [82]. Στην Ισλανδία

τα αποτελέσματα μιας μελέτης που πραγματοποιήθηκε για τη συσχέτιση μεταξύ του χαμηλού κοινωνικοοικονομικού επιπέδου και τον κίνδυνο εμφάνισης της επιληψίας έδειξαν ότι το χαμηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την επιληψία. Αυτή η συσχέτιση όμως δεν έχει καμία σχέση με τους καθιερωμένους παράγοντες κινδύνου της επιληψίας (όπως τραύμα στο κεφάλι, εγκεφαλικό επεισόδιο κ.ά), οι οποίοι έχουν υψηλότερη επίπτωση σε πληθυσμούς με το χαμηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο [83]. Σε μία άλλη μελέτη που εξέτασε δεδομένα από τον πληθυσμό της Σουηδίας, παρατηρήθηκε αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης της επιληψίας σε άτομα που εργάζονταν ως σερβιτόροι ή εργάτες οικοδομών σε σχέση με άλλα επαγγέλματα, όπως δικηγόροι, γιατροί, οικονομολόγοι και μηχανικοί [84].

Στις νέες περιπτώσεις επιληψίας, ένα ποσοστό 50% εμφανίζει εστιακές επιληπτικές κρίσεις και ένα 50% γενικευμένες επιληπτικές κρίσεις πριν την ηλικία των 40 ετών. Μετά από 40 χρόνια όμως, η αναλογία επίπτωσης της εστιακής επιληψίας αυξάνεται στο 75% από την ηλικία των 75 χρόνων [85]. Ανάλογα με την ηλικία οι τύποι των κρίσεων ποικίλλουν, με τις εστιακές να είναι πιο συχνές σε πολύ νεά και σε πολύ ηλικιωμένα άτομα. Γενικευμένες τονικοκλονικές κρίσεις προκύπτουν το πολύ μεταξύ 5-10 ετών και οι μυοκλονικές σε παιδιά κάτω από 5 ετών και περίπου στα 15 χρόνια [70]. Παρόλο που η επιληψία παρατηρείται σε όλες τις ηλικιακές ομάδες, οι μεγαλύτερες επιπτώσεις της αφορούν στη βρεφική και την τρίτη ηλικία.

Στις αναπτυγμένες χώρες μελέτες έδειξαν ότι η επίπτωση της επιληψίας είναι υψηλή στο πρώτο έτος της ζωής, κατά την πρώιμη παιδική ηλικία, να σταθεροποιείται μετά την εφηβεία και γενικότερα να είναι χαμηλή στην ενήλικη ζωή [86-90]. Αργότερα όμως αυξάνεται στις μεγαλύτερες ηλικιακές ομάδες. Από την άλλη, στις αναπτυσσόμενες χώρες η επίπτωση είναι υψηλή στην παιδική ηλικία, αλλά αύξηση σε μεγαλύτερες ηλικίες δεν έχει γενικά σημειωθεί [75, 91-93]. Πολλές μελέτες αναφέρουν ότι η επίπτωση ανάλογα με το φύλο δείχνει μία ήπια επικράτηση στους άνδρες [88]. Η αναλογία επίπτωσης για όλες τις περιπτώσεις κρίσεων που οφείλονται σε φυσικά αίτια στην Ισλανδία και τις Η.Π.Α. δείχνει μία σημαντική υπεροχή για τους άνδρες [88, 89]. Όπως στον επιπολασμό έτσι και στην επίπτωση λίγες μελέτες παρέχουν πληροφορίες σε σχέση με τη φυλή ή την εθνικότητα. Μία από τις λίγες μελέτες επίπτωσης διεξήχθη στο Χιούστον στο Τέξας

κατά την οποία παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην επίπτωση ανάμεσα σε μη Ισπανόφωνους λευκούς, Αφροαμερικάνους, Ισπανόφωνους και Ασιάτες κατοίκους. Σε μία μελέτη που έγινε για την εκτίμηση της επίπτωσης σε μία αστική κοινότητα βρέθηκε ότι η επίπτωση ανάμεσα στους Ισπανόφωνους ήταν παρόμοια με αυτή των Αφροαμερικάνων και των λευκών [94].

- Θνησιμότητα

Ασθενείς με επιληψία έχουν υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας σε σχέση με το γενικό πληθυσμό [95-97]. Η θνησιμότητα φαίνεται να είναι υψηλότερη κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους και περίπου 5-10 χρόνια αργότερα από την αρχική διάγνωση. Ως παράγοντες κινδύνου για τη θνησιμότητα ορίζονται:

α) ο τύπος της επιληπτικής κρίσης, με τις μυοκλονικές κρίσεις να καταλαμβάνουν υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας [96]

β) εάν η κρίση είναι ιδιοπαθής ή συμπτωματική, όπου στην ιδιοπαθή επιληψία η θνησιμότητα είναι σαφώς υψηλότερη από το γενικό πληθυσμό [95, 96]

γ) η αντιμετώπιση της επιληπτικής κρίσης. Ασθενείς μετά από χειρουργική επέμβαση εμφανίζουν πιο υψηλά ποσοστά θνησιμότητας σε σχέση με εκείνους που δε χειρουργήθηκαν [98].

Οι πιο κοινές αιτίες θανάτου κατά φθίνουσα συχνότητα αποτελούν ο καρκίνος, η ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια, η πνευμονία και άλλες αναπνευστικές παθήσεις. Στο SE αποδίδεται μόνο 1% των θανάτων ασθενών με επιληψία. Συγκριτικά με το γενικό πληθυσμό, τα επιληπτικά άτομα είναι σε αυξημένο κίνδυνο (με υψηλό συντελεστή θνησιμότητας) για θάνατο από καρκίνο -όχι απαραίτητα εγκεφάλου- , καρδιαγγειακές, αναπνευστικές και γαστρεντερικές ασθένειες, από άνοια ή ψυχιατρικές ασθένειες, από διάφορα τραύματα, ατυχήματα και αυτοκτονίες. Για ένα ποσοστό 18% των θανάτων ασθενών με επιληψία ευθύνεται ο αιφνίδιος θάνατος (Sudden Unexpected Death in Epilepsy – SUDEP) [99]. Η επίπτωση του αιφνίδιου θανάτου από επιληψία μπορεί να είναι σημαντικά μικρότερη στα παιδιά απ' ό τι στους ενήλικες [100].

2. 5. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Καθώς η επιληψία προκαλείται από μη φυσιολογική δραστηριότητα των κυττάρων του εγκεφάλου, οι επιληπτικές κρίσεις μπορεί να επηρεάσουν σχεδόν κάθε διαδικασία που συντονίζει ο εγκέφαλος. Τα συμπτώματα μιας επιληπτικής κρίσης λοιπόν μπορεί να περιλαμβάνουν [50, 101, 102]:

- Προσωρινή σύγχυση
- Ανεξέλεγκτες και σπασμωδικές κινήσεις των χεριών και των ποδιών
- Βλέμμα στο κενό
- Απώλεια της συνείδησης
- Ψυχικά συμπτώματα

Τα συμπτώματα ποικίλλουν ανάλογα με το είδος της κρίσης. Στις περισσότερες περιπτώσεις ένα άτομο με επιληψία τείνει να εκδηλώνει τα ίδια συμπτώματα σε κάθε επεισόδιο. Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη ενότητα όταν οι επιληπτικές κρίσεις προκύπτουν από μη φυσιολογική δραστηριότητα σε μία μόνο περιοχή του εγκεφάλου ονομάζονται εστιακές και εμπίπτουν σε δύο υποκατηγορίες, τις απλές και τις σύνθετες [39, 47]. Οι απλές εστιακές κρίσεις δεν προκαλούν απώλεια της συνείδησης. Παρατηρείται αλλαγή στα συναισθήματα ή τον τρόπο με τον οποίο το άτομο αντιλαμβάνεται τα πράγματα γύρω του (γεύση, όσφρηση, αφή, ακοή). Επίσης μπορούν να οδηγήσουν σε ακούσιες σπασμωδικές κινήσεις ενός μέρους του σώματος, όπως το ένα χέρι ή το ένα πόδι και αυθόρμητα αισθητήρια συμπτώματα, όπως τσούξιμο, ζάλη και “φώτα που αναβοσβήνουν” [103]. Στις σύνθετες εστιακές κρίσεις προκαλείται αλλαγή ή απώλεια της συνείδησης [39, 47]. Κατά τη διάρκεια μίας σύνθετης επιληπτικής κρίσης το άτομο μπορεί να κοιτάζει στο κενό και να μην ανταποκρίνεται κανονικά στο περιβάλλον του ή να κάνει επαναλαμβανόμενες κινήσεις, όπως το τρίψιμο του χεριού, το μάσημα, η κατάποση ή το περπάτημα σε κύκλους. Τα συμπτώματα των εστιακών κρίσεων μπορεί να συγχέονται με άλλες νευρολογικές διαταραχές όπως ημικρανία, ναρκοληψία ή ψυχική ασθένεια. Συνήθως διαρκούν από 15 δευτερόλεπτα έως 3 λεπτά [103].

Στις γενικευμένες επιληπτικές κρίσεις τα συμπτώματα διαφέρουν ανάλογα τον τύπο της γενικευμένης κρίσης. Έτσι έχει παρατηρηθεί ότι οι αφαιρετικές κρίσεις

ή αφαιρέσεις, παλαιότερα γνωστές ως *petit mal*, εμφανίζονται συχνά στα παιδιά και χαρακτηρίζονται από βλέμμα στο κενό ή λεπτές κινήσεις του σώματος, όπως το ανοιγοκλείσιμο των ματιών ή το χτύπημα των χειλιών μεταξύ τους. Διαρκούν συνήθως 3-20 δευτερόλεπτα. Είναι πιθανόν αυτές οι κρίσεις να προκαλέσουν και μία σύντομη απώλεια συνείδησης [103]. Ξαφνικά σύντομα τραντάγματα ή συσπάσεις των χεριών και των ποδιών υπάρχουν στις μυοκλονικές κρίσεις [103]. Έχουν πολύ μικρή διάρκεια συνήθως 1-2 δευτερόλεπτα. Οι κλονικές κρίσεις σχετίζονται με επαναλαμβανόμενες ή ρυθμικές, σπασμωδικές κινήσεις των μυών. Στις κρίσεις αυτές επηρεάζεται συνήθως ο λαιμός, το πρόσωπο και τα χέρια. Οι τονικές κρίσεις προκαλούν δυσκαμψία των μυών και επηρεάζουν συνήθως τους μύς της πλάτης, τα χέρια και τα πόδια και πιθανόν γι' αυτό το άτομο πέφτει στο έδαφος. Διαρκούν 5-20 δευτερόλεπτα [103]. Οι τονικοκλονικές κρίσεις, παλαιότερα γνωστές ως *grand mal* κρίσεις, είναι το πιο ακραίο είδος επιληπτικής κρίσης και μπορεί να προκαλέσουν απότομη απώλεια της συνείδησης, ακούσια σύσφιξη των μυών και τρέμουλο και μερικές φορές απώλεια του ελέγχου της κύστης ή δάγκωμα της γλώσσας. Στις ατονικές κρίσεις προκαλείται πλήρης απώλεια του ελέγχου των μυών, η οποία μπορεί να αναγκάσει το άτομο να καταρρεύσει ξαφνικά. Διαρκεί συνήθως αρκετά δευτερόλεπτα, σπάνια έχει διάρκεια περισσότερο από ένα λεπτό [103]. Μερικές φορές η επιληψία μπορεί να εκδηλωθεί χωρίς σπασμούς παρά μόνο με ψυχικά συμπτώματα, όπως ξαφνικό και αδικαιολόγητο αίσθημα τρόμου, αποξένωση από το περιβάλλον, διαταραχές της προσωπικότητας ή με ιδιότροπη και παράλογη συμπεριφορά.

Η κλασική κλινική εικόνα της επιληψίας θα μπορούσε να περιγραφεί ως εξής: γενικευμένοι τονικοκλονικοί σπασμοί (κρίσεις *grand-mal*) που χαρακτηρίζονται από απότομη αιφνίδια έναρξη με απώλεια συνείδησης, κραυγή, πτώση στο έδαφος που συχνά προκαλεί τραυματισμό. Η διάρκεια της κρίσης διαρκεί 3 περίπου λεπτά. Αρχικά παρατηρείται σύσπασση όλων των μυών (προσώπου, κορμού και άκρων) με αποτέλεσμα την αρχική κραυγή, συχνά δάγκωμα της γλώσσας, απώλεια ούρων, άπνοια και κυάνωση. Ακολουθούν γενικευμένοι τονικοκλονικοί σπασμοί που αραιώνουν όσο εξελίσσεται η κρίση. Τελικά, υπάρχει γενικευμένη μυική χάλαση με απώλεια συνείδησης, ρεγχώδης αναπνοή και συχνά έξοδος αιματηρού σάλιου από το στόμα από δήξη της

γλώσσας. Μετά το τέλος της κρίσης υπάρχει βραχείας διάρκειας (1-2 λεπτά) κατάσταση σύγχυσης και κατά κανόνα ακολουθεί βαθύς ύπνος.

2.6. ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η διάγνωση της επιληψίας έχει σημαντικές φυσικές, ψυχολογικές και οικονομικές συνέπειες στον ασθενή. Ως εκ τούτου είναι πολύ σημαντικό να είναι σωστή. Υπάρχει ένα μεγάλο ποσοστό διαγνώσεων που γίνονται από μη ειδικούς και είναι λανθασμένες [104, 105]. Θα πρέπει λοιπόν η διάγνωση να γίνεται από έναν ειδικό στην επιληψία νευρολόγο, με εμπειρία επί του θέματος, συνεχιζόμενη εκπαίδευση και κατάρτιση, αξιολόγηση από ομότιμους για την πρακτική και τον έλεγχο της διάγνωσης, που να συμπεριλαμβάνει την επιληψία ως ένα σημαντικό μέρος του κλινικού φόρτου εργασίας του [105, 106]. Η επιληψία είναι συνήθως δύσκολο να διαγνωστεί αμέσως, καθώς υπάρχουν άλλες διαταραχές που προκαλούν παρόμοια συμπτώματα, όπως οι ημικρανίες, οι λιποθυμίες, οι κρίσεις πανικού κ.ά.

Το να διασφαλισθεί ότι το άτομο έχει επιληψία και ποιο είδος συγκεκριμένα είναι ένα πρώτο κρίσιμο βήμα. Παρά την εξέλιξη της τεχνολογίας η διάγνωση της επιληψίας εξακολουθεί να είναι κλινική και βασίζεται σε ένα λεπτομερές και σαφές ιστορικό γύρω από τις συνθήκες και χαρακτηριστικά πριν, κατά τη διάρκεια και μετά από την εξεταζόμενη διαταραχή είτε από τον ίδιο τον ασθενή είτε από μάρτυρες στο συμβάν. Μιας και η σύγχρονη τεχνολογία το επιτρέπει, η καταγραφή ενός επεισοδίου με την κάμερα του κινητού τηλεφώνου θα ήταν μεγάλη διαγνωστική βοήθεια [107, 108]. Οι πιο σημαντικές πληροφορίες για τη διάγνωση της επιληψίας πηγάζουν από την περιγραφή των κρίσεων [109]. Η διάγνωση της επιληψίας λοιπόν ακολουθεί την εξής σειρά: αναγνώριση των επιληπτικών κρίσεων, ταξινόμηση του τύπου των κρίσεων, αναγνώριση του επιληπτικού συνδρόμου και καθορισμός της αιτιολογίας [110, 111].

Στην περίπτωση που το ιστορικό υποψιάζει για επιληπτικές κρίσεις, ακολουθεί ένα απλό ηλεκτροεγκεφαλογράφημα [112, 113]. Το ηλεκτροεγκεφαλογράφημα είναι ο ουσιαστικός διαγνωστικός παράγοντας και γνώμονας παρακολούθησης της θεραπευτικής αγωγής. Η κλινική διάγνωση μπορεί να επιβεβαιωθεί από ανωμαλίες στο ηλεκτροεγκεφαλογράφημα, ωστόσο

αυτές οι ανωμαλίες θα μπορούσαν να υπάρχουν και σε υγιή άτομα [114, 115]. Μέσω τυπικών διαδικασιών κατά την πραγματοποίησή του θα φανεί αν υπάρχει επιληπτική δραστηριότητα. Σε κάθε περίπτωση ακόμη κι αν όλες αυτές οι διαδικασίες δε δείξουν ηλεκτροεγκεφαλογραφικά επιληπτικά στοιχεία, δεν αποκλείεται οι κρίσεις να είναι επιληπτικής φύσης [114].

Οι εξετάσεις για τη διάγνωση της επιληψίας είναι:

- Νευρολογική εξέταση
- Βιοχημικός εργαστηριακός έλεγχος
- Καρδιολογικός έλεγχος
- Ηλεκτροεγκεφαλογράφημα
- Αξονική τομογραφία
- Νευροαπεικονιστικός έλεγχος του εγκεφάλου (Μαγνητική τομογραφία- MRI, μαγνητική φασματοσκοπία- MRS, ποζιτρονική τομογραφία- PET, λειτουργική μαγνητική τομογραφία- fMRI, τομογραφία εκπομπής μονού φωτονίου- SPECT, μαγνητοεγκεφαλογραφία- MEG) [110, 111, 116-119].

2.7. ΠΡΟΓΝΩΣΗ

Η έννοια της πρόγνωσης για ασθενείς με επιληψία έχει καθιερωθεί ως η πιθανότητα για περαιτέρω επιληπτικές κρίσεις μετά από μία τυχαία κρίση ή ως η πιθανότητα απαλλαγής από τις επιληπτικές κρίσεις ή ως η ύφεση μετά από μία σειρά επαναλαμβανόμενων κρίσεων [120]. Πλέον είναι αποδεκτό ότι 70% των επιληπτικών ατόμων θα σημειώσουν ύφεση συνήθως στα αρχικά στάδια της ασθένειας [121]. Ωστόσο, για τη μελέτη της πρόγνωσης θα πρέπει να ληφθούν υπόψιν πτυχές, όπως η πιθανότητα επανάληψης της επιληπτικής κρίσης, η επίδραση της θεραπείας σε αρχικό στάδιο της ασθένειας, η πιθανότητα υποτροπής και η πιθανότητα να απαλλαγεί ο ασθενής από επιληπτικές κρίσεις μετά τη λήψη αντιεπιληπτικής αγωγής ή μετά από χειρουργική επέμβαση.

Για έναν ασθενή, ο οποίος δεν έχει εμφανίσει επιληπτική κρίση για αρκετά χρόνια είναι πιθανή η διακοπή της φαρμακευτικής αγωγής. Εξαρτάται όμως από την ηλικία του ασθενούς, τον τύπο της επιληψίας και κάτι τέτοιο μπορεί να συμβεί μόνο υπό την παρακολούθηση ενός ειδικού. Τα $\frac{3}{4}$ των ενηλίκων που έχουν

απαλλαγεί από τις επιληπτικές κρίσεις για τρία έτη εξακολουθούν να μην έχουν εμφανίσει κάποια κρίση μετά τη διακοπή των φαρμάκων τους [122]. Η πρόγνωση ωστόσο, δεν είναι τόσο ενθαρρυντική για ασθενείς που λαμβάνουν περισσότερα από ένα αντιεπιληπτικά φάρμακα, έχουν οικογενειακό ιστορικό επιληψίας, εμφανίζουν εστιακές επιληπτικές κρίσεις ή συνεχίζουν να έχουν ανώμαλο ηλεκτροεγκεφαλογράφημα, ενώ λάμβαναν φαρμακευτική αγωγή.

Οι παράγοντες που φαίνεται να επηρεάζουν την πρόγνωση της επιληψίας είναι πολλοί και σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται η ηλικία και το γένος του ατόμου, ο τύπος της επιληπτικής κρίσης, η αιτιολογία, εάν οι κρίσεις είναι ελεγχόμενες με φαρμακευτική αγωγή, τα ηλεκτροεγκεφαλογραφικά ευρήματα και το οικογενειακό ιστορικό. Είναι γενικά αποδεκτό ότι ο τύπος της κρίσης έχει σοβαρό αντίκτυπο στην πρόγνωση. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι εστιακές επιληπτικές κρίσεις έχουν χειρότερη πρόγνωση από τις γενικευμένες [123-128]. Πιο ειδικά, οι παρακάτω τύποι επιληπτικών κρίσεων είναι αυτοί με τη χειρότερη πρόγνωση: Πολλαπλές επιληπτικές κρίσεις [129-131], ατονικές κρίσεις [124], βρεφικοί σπασμοί [132], γενικευμένες τονικοκλονικές κρίσεις [133] και status epilepticus (SE) [123, 134, 135]. Ορισμένες μελέτες δεν λαμβάνουν υπόψιν τους τον τύπο της κρίσης για την πρόγνωση [136, 137].

Η πρόγνωση της επιληψίας είναι σχετικά καλή. Υπολογίζεται ότι 70-80% των επιληπτικών ασθενών είναι καλά ρυθμισμένοι με μονοθεραπεία ή με συνδυασμό δυο ή περισσότερων φαρμάκων. Ένα ποσοστό 60%-70% των ασθενών απαλλάσσεται από την εμφάνιση των κρίσεων. Επίσης ιδιαίτερα υψηλή είναι και η πιθανότητα ασθενείς με ιδιοπαθή γενικευμένη επιληψία να απαλλαχθούν από κρίσεις μετά από φυσιολογικά αποτελέσματα κατά τη νευρολογική εξέταση [138]. Ωστόσο, έχει εκτιμηθεί ότι ένα ποσοστό 20-30% των ασθενών με επιληψία συνεχίζει να παρουσιάζει επιληπτικές κρίσεις (φαρμακοανθεκτική επιληψία) [139]. Οι ασθενείς αυτοί, με την αποκαλούμενη φαρμακοανθεκτική επιληψία, έχουν συχνές και σοβαρές κρίσεις, που επηρεάζουν ιδιαίτερα την καθημερινότητά τους. Έχουν δοκιμάσει τουλάχιστον δύο αντιεπιληπτικά φάρμακα, όπως επίσης έχουν δοκιμάσει και χωρίς επιτυχία συνδυασμούς φαρμάκων. Οι ασθενείς αυτοί θεωρούνται υποψήφιοι για τη χειρουργική της επιληψίας παρά να συνεχίσουν τη φαρμακευτική τους αγωγή [140, 141].

2.8. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η θεραπεία της επιληψίας αποσκοπεί στην εξάλειψη των επιληπτικών κρίσεων και τη βελτίωση διάφορων σωματικών και ψυχικών συμπτωμάτων που απορρέουν από την επιληψία. Τα αντιεπιληπτικά φάρμακα είναι αποδεδειγμένα η αποτελεσματικότερη θεραπεία για τον έλεγχο των επιληπτικών κρίσεων. Η λήψη του σωστού φαρμάκου και στη σωστή δόση εξασφαλίζουν την καλύτερη απόκριση του ασθενούς [111]. Στις περιπτώσεις ωστόσο, που δεν επιτυγχάνεται έλεγχος των κρίσεων, εναλλακτική επιλογή αποτελούν η χειρουργική αντιμετώπιση, η διέγερση του πνευμονογαστρικού νεύρου (vagus nerve stimulation, VNS) και η κετογόνος δίαιτα [111, 142].

2.8.1. Φαρμακευτική Αντιμετώπιση

Η χορήγηση της αντιεπιληπτικής θεραπείας δεν είναι θέμα απλής συνταγογράφησης και μόνο. Η αντιεπιληπτική αγωγή καθοδηγείται από αρχές και κανόνες που στηρίζονται εν μέρει στην εμπειρία, αλλά κυρίως στην επιστημονική έρευνα. Ωστόσο, έχει κάποιες ιδιαιτερότητες και διέπεται περισσότερο από κάθε άλλο είδος φαρμακευτικής αγωγής από μια φαρμακοκινητική λογική. Η επιλογή της εκάστοτε αντιεπιληπτικής αγωγής γίνεται με βάση τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της κλινικής εικόνας και η έναρξη, ο τρόπος χορήγησης, η διάρκεια, καθώς και ο τρόπος διακοπής της ακολουθούν συγκεκριμένους κανόνες [143].

Έντονος προβληματισμός υπάρχει σχετικά με την έναρξη της χορήγησης της αντιεπιληπτικής αγωγής. Παλαιότερα επικρατούσε η άποψη ο ασθενής να ξεκινά την αντιεπιληπτική θεραπεία από την πρώτη επιληπτική κρίση. Η τακτική αυτή στηριζόταν στη λογική του έγκαιρου ελέγχου των κρίσεων, διότι πίστευαν ότι όσο περισσότερο διατρέχει η νόσος χωρίς θεραπεία τόσο πιο δύσκολα ελέγχεται [144]. Σήμερα τα πράγματα έχουν αλλάξει. Η χορήγηση της αντιεπιληπτικής αγωγής εξαρτάται από την πιθανότητα υποτροπής της κρίσης και συνίσταται μετά τη δεύτερη επιληπτική κρίση. Κατ' εξαίρεση η αντιεπιληπτική αγωγή χορηγείται από την πρώτη κρίση όταν η πιθανότητα υποτροπής είναι αυξημένη κι αυτό μπορεί να συμβεί όταν α) η κρίση είναι εστιακή ή γενικευμένη με έναρξη ως εστιακή, β) στο ηλεκτροεγκεφαλογράφημα υπάρχει επιληπτική δραστηριότητα και

γ) όταν στην αντικειμενική εξέταση ή σε απεικονιστική εξέταση υπάρχουν εστιακά ευρήματα [145].

Ο παραδοσιακός τρόπος αντιμετώπισης των επιληπτικών κρίσεων, ο οποίος σήμερα ακολουθείται από ελάχιστους είναι η χορήγηση συνδυασμού πολλών φαρμάκων σε μικρές δόσεις, με το σκεπτικό ότι το θεραπευτικό αποτέλεσμα είναι αθροιστικό και η τοξικότητα μικρή. Σήμερα με τον καλύτερο σχεδιασμό των ερευνητικών πρωτοκόλλων και την προσθήκη των αντιεπιληπτικών φαρμάκων (ΑΕΦ) νέας γενιάς τα πράγματα άλλαξαν. Έχει πλέον δειχθεί ότι με την πολυφαρμακία αυξάνεται η πιθανότητα μη ελέγχου των κρίσεων, αλλά κυρίως αυξάνεται η πιθανότητα εκδήλωσης τοξικών φαινομένων. Έτσι πλέον ο γενικά παραδεκτός τρόπος αντιμετώπισης των επιληπτικών κρίσεων είναι η μονοθεραπεία [146]. Έχει αποδειχθεί ότι ένα ποσοστό γύρω στο 75% των ατόμων που πάσχουν από επιληψία θα επιτύχει με ένα μόνο φάρμακο πλήρη ή ικανοποιητικό έλεγχο των κρίσεων του [147, 148]. Το εναπομένον περίπου 25% του συνόλου των ασθενών πάσχει από τη λεγόμενη «ανθεκτική επιληψία» και δεν μπορεί να ρυθμιστεί με κανένα συνδυασμό φαρμάκων [149-151]. Η αντιεπιληπτική αγωγή είναι μακροχρόνια και για την επιλογή της χορήγησής της είναι σημαντικές ορισμένες παράμετροι, όπως η ηλικία του ασθενούς, το φύλο, η σωματική και ψυχική του κατάσταση, τυχόν συνυπάρχοντα νοσήματα και το τοξικό προφίλ κάθε φαρμάκου.

Ένα άλλο σημείο σοβαρού προβληματισμού αποτελεί η διάρκεια χορήγησης της αντιεπιληπτικής θεραπείας, της οποίας η μακρά διάρκεια δεν είναι άμοιρη εμφάνισης τοξικών φαινομένων και από το ΚΝΣ και από άλλα συστήματα [145, 153, 154]. Το χρονικό διάστημα που πρέπει ο ασθενής να παραμείνει ελεύθερος κρίσεων, ώστε να αποφασιστεί η διακοπή της αντιεπιληπτικής αγωγής βασίζεται στις παρατηρήσεις και τα αποτελέσματα επιδημιολογικών μελετών, αλλά είναι μάλλον αυθαίρετο. Έτσι έχει οριστεί ότι στα παιδιά, που ο κίνδυνος εμφάνισης σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών είναι αυξημένος η θεραπεία πρέπει να διακόπτεται εάν παραμένουν ελεύθερα κρίσεων για δύο χρόνια. Στους ενήλικες η αγωγή διακόπτεται όταν αυτοί παραμένουν ελεύθεροι κρίσεων για μία τριετία. Εκτιμάται ότι μετά τη διακοπή της αντιεπιληπτικής αγωγής το 20% των ασθενών θα εμφανίσει υποτροπή μέσα σε ένα χρόνο και περίπου το 25% μέσα σε δύο

χρόνια [155,156]. Όταν περάσουν δύο χρόνια από τη διακοπή των φαρμάκων η υποτροπή των κρίσεων είναι εξαιρετικά σπάνια [155-157].

Τα κύρια και πιο παλιά αντιεπιληπτικά φάρμακα, όπως η καρβαμαζεπίνη, το βαλπροϊκό νάτριο, η φαινυτοΐνη, η φαινοβαρβιτάλη, οι βενζοδιαζεπίνες και η εθουσιμίδη, αλλά και τα νεότερα, όπως η λαμοτριγίνη, η τοπιραμάτη, η γκαμπαπεντίνη, η πρεγλαμπαλίνη, η λακοσαμίδη και η λεβετιρασετάμη καταστέλλουν ή μειώνουν τη συχνότητα των κρίσεων. Δυστυχώς όμως και στις δύο περιπτώσεις φαρμάκων παρατηρούνται ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως ναυτία, ίλιγγος, αλωπεκία, αϋπνία, γαστρεντερικές διαταραχές, εξανθήματα, δύσπνοια, υπνηλία, κόπωση και σύγχυση [158]. Επίσης τα νεότερα ΑΕΦ είναι πιο ακριβά σε σύγκριση με τα πιο παλιά [159]. Ορισμένα αντιεπιληπτικά φάρμακα μπορεί να μειώσουν τη συγκέντρωση των αιμοπεταλίων στο αίμα ή να προκαλέσουν ηπατική ή νεφρική βλάβη. Επίσης στις έγκυες γυναίκες συστήνεται να συμβουλευονται το γιατρό τους πριν τη λήψη αντιεπιληπτικών φαρμάκων καθότι υπάρχει αυξημένος κίνδυνος για εμφάνιση γενετικών ανωμαλιών. Μέχρι σήμερα δεν έχει ανακαλυφθεί το ιδεώδες ΑΕΦ. Το φάρμακο, δηλαδή που είναι ασφαλές και αποτελεσματικό, που έχει καλή συχνότητα ημερήσιας χορήγησης και χορηγείται εύκολα από όλες τις οδούς, έχει μεγάλη βιοδιαθεσιμότητα, που δεν συνδέεται σε υψηλό βαθμό με τις πρωτεΐνες, που δεν ασκεί επαγωγική ή ανασταλτική δράση και του οποίου η αποβολή ακολουθεί γραμμική κινητική. Από την άλλη πλευρά, δεν υπάρχουν αντιεπιληπτικά ευρέος φάσματος που σημαίνει ότι ένα φάρμακο μπορεί να είναι πολύ αποτελεσματικό για κάποιον ασθενή, αλλά μπορεί να μη ρυθμίζει ή πιθανόν και να αυξάνει τη συχνότητα των κρίσεων κάποιου άλλου. Άρα δεν απομένει πλέον παρά να επιλέξει κανείς ανάμεσα σε μια σειρά φαρμάκων, το καταλληλότερο [143].

2.8.2. Χειρουργική αντιμετώπιση

Η χειρουργική αντιμετώπιση της επιληψίας μπορεί να ωφελήσει πολλούς ασθενείς των οποίων οι επιληπτικές κρίσεις είναι καταστροφικές, δεν μπορούν να ελεγχθούν με την φαρμακευτική αγωγή, κινδυνεύει η σωματική τους ακεραιότητα και η ποιότητα ζωής τους είναι φτωχή [160]. Οι περισσότεροι υποψήφιοι για χειρουργική επέμβαση πάσχουν από εστιακές επιληπτικές κρίσεις, οι οποίες προέρχονται από μία σχετικά περιορισμένη περιοχή του εγκεφάλου. Η χειρουργική

της επιληψίας αποτελεί παγκοσμίως εγκεκριμένη και δοκιμασμένη αντιμετώπιση με ιστορία που μετρά παραπάνω από 80 χρόνια [161]. Μέσω της χειρουργικής αντιμετώπισης δίνεται η δυνατότητα για οριστική παύση της εκδήλωσης των επιληπτικών κρίσεων, σημαντική μείωση της συχνότητας εκδήλωσης των κρίσεων και μείωση της έντασης των κρίσεων.

Η καταλληλότητα για χειρουργική αντιμετώπιση των επιληπτικών κρίσεων αξιολογείται βάσει των αποτελεσμάτων του προεγχειρητικού ελέγχου. Η προεγχειρητική διερεύνηση είναι σχολαστική, επίπονη και γίνεται με βάση συγκεκριμένα πρωτόκολλα με ηλεκτροεγκεφαλογράφημα, άλλες νευροφυσιολογικές τεχνικές, νευροψυχολογική διερεύνηση και νευροακτινοδιαγνωστική [162]. Σε περίπτωση που οι μέθοδοι αυτές δεν είναι επαρκείς χρησιμοποιούνται επεμβατικές μέθοδοι με ηλεκτρόδια [164]. Πριν την επέμβαση επίσης ελέγχεται πάντα το κέντρο ομιλίας και μνήμης με το Wada test (έγχυση αμοβαρβιτάλης στην έσω καρωτίδα) [164, 165]. Κατά τον προεγχειρητικό έλεγχο της επιληψίας λοιπόν, ο ασθενής υποβάλλεται σε μια σειρά από εξετάσεις και δοκιμασίες που αποσκοπούν: α) στον προσδιορισμό της πηγής της επιληπτικής δραστηριότητας ή/και το δίκτυο των επιληπτικών εκφορτίσεων στον εγκέφαλο που προκαλούν τις κρίσεις, τα οποία στο σύνολό τους ή μερικώς θα αποτελέσουν χειρουργικό στόχο και β) στη χαρτογράφηση των βασικών εγκεφαλικών λειτουργιών κοντά στην πηγή, προκειμένου να επιτευχθεί ασφαλής χειρουργική προσπέλαση με ελαχιστοποίηση των μετεγχειρητικών επιπτώσεων. Εάν η πηγή της επιληπτικής δραστηριότητας είναι διακριτή ως προς την θέση και την έκτασή της και δε τίθονται σε κίνδυνο βασικές εγκεφαλικές λειτουργίες, τότε ο ασθενής αποκτά έγκριση για να προχωρήσει σε χειρουργείο επιληψίας [162, 163]. Επεμβάσεις για την επιληψία πραγματοποιούνται σήμερα σε συγκεκριμένα κέντρα στην Ελλάδα, αλλά συχνά οι ασθενείς παραπέμπονται σε αντίστοιχα κέντρα του εξωτερικού.

2.8.3. Διέγερση πνευμονογαστρικού νεύρου (VNS)

Η διέγερση του πνευμονογαστρικού νεύρου χρησιμοποιείται ως εναλλακτική θεραπεία για τον έλεγχο φαρμακοανθεκτικών επιληπτικών κρίσεων τόσο σε ενήλικες όσο και σε παιδιά. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός δράσης του, στον

οποίο βασίζεται ο έλεγχος των επιληπτικών κρίσεων, δεν είναι πλήρως γνωστός. Πιθανόν να σχετίζεται με το συγχρονισμό και τον αποσυγχρονισμό της ηλεκτρικής δραστηριότητας του εγκεφάλου [166]. Στόχος αυτής της εναλλακτικής θεραπείας είναι η μείωση του αριθμού των κρίσεων, οι οποίες στην καλύτερη περίπτωση μειώνονται κατά 50% ή ακόμη και περισσότερο. Διέγερση του πνευμονογαστρικού νεύρου γίνεται μέσω εμφυτευμένου διεγέρτη, όπως παρατίθεται στην εικόνα 4, που στέλνει ηλεκτρικά σήματα προς το αριστερό πνευμονογαστρικό νεύρο στο λαιμό, μέσω ενός καλωδίου [163]. Κατά κύριο λόγο αυτός ο τύπος θεραπείας χρησιμοποιείται για τον έλεγχο απλών κρίσεων με ή χωρίς δευτερογενή γενίκευση ή γενικευμένες κρίσεις, οι οποίες είναι πλήρως φαρμακοανθεκτικές [167-173].

Όπως προκύπτει από διεθνείς αναφορές η μέθοδος αυτή έχει ένδειξη και για την θεραπεία της κατάθλιψης με πολύ θετικά αποτελέσματα, καθώς ασθενείς με επιληψία στους οποίους έχει τοποθετηθεί διεγέρτης πνευμονογαστρικού νεύρου βελτιώνονται και ψυχολογικά.



Εικόνα 4. Συσκευή διέγερσης πνευμονογαστρικού νεύρου [163]

Στο σύνολό της η αποτελεσματικότητα της διέγερσης του πνευμονογαστρικού νεύρου είναι ανάλογη των καινούργιων αντιεπιληπτικών φαρμάκων. Η VNS μέθοδος εφαρμόζεται με επιτυχία σε εξειδικευμένα κέντρα στην Ελλάδα [163].

2.8.4. Κετογόνος δίαιτα

Η κετογόνος δίαιτα (ή κετογονική δίαιτα) είναι μία δίαιτα πλούσια σε λιπαρά, επαρκής σε πρωτεΐνες και φτωχή σε υδατάνθρακες, η οποία έχει σχεδιαστεί, για να μιμείται πολλές από τις βιοχημικές μεταβολές που προκαλούνται από την παρατεταμένη νηστεία.

Αναπτύχθηκε αρχικά στις αρχές του 1900 και κατά τη δεκαετία του 1920 χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για τη θεραπεία επιληπτικών κρίσεων σε παιδιά [174]. Τα τελευταία χρόνια πολλές κλινικές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει τη χρησιμότητα της κετογόνου δίαιτας ως εναλλακτική θεραπεία για τη φαρμακοανθεκτική επιληψία [175]. Η έντονη στέρηση υδατανθράκων και η αύξηση των θερμίδων από τη λήψη άφθονων λιπών δημιουργεί κέτωση, δηλαδή παραγωγή κετονικών σωμάτων κι αυτό έχει ως επακόλουθο τη βελτίωση στον έλεγχο των επιληπτικών κρίσεων [176]. Η κετογόνος δίαιτα έχει φανεί ιδιαίτερα αποτελεσματική στον έλεγχο επιληψιών και επιληπτικών συνδρόμων, όπως η μυοκλονική αστατική επιληψία, η οζώδης σκλήρυνση, η σοβαρή μυοκλονική επιληψία της βρεφικής ηλικίας, το σύνδρομο Gastaut-Lennox, οι βρεφικοί σπασμοί, το σύνδρομο Landau-Kleffner [177]. Η έναρξη μίας κετογόνου δίαιτας συνίσταται αφού δύο κατάλληλα αντιεπιληπτικά φάρμακα έχουν δοκιμαστεί και έχουν αποτύχει [175]. Η εφαρμογή της δίαιτας στην καθημερινή πράξη είναι δύσκολη. Πρέπει να ακολουθείται αυστηρά και απαιτεί σαφή δέσμευση προκειμένου να λειτουργήσει αποτελεσματικά. Στις παρενέργειές της συμπεριλαμβάνονται επιβράδυνση της ανάπτυξης, γαστρεντερικά συμπτώματα, χαμηλά επίπεδα σακχάρου στο αίμα, αφυδάτωση, νεφρολιθίαση και αύξηση λιπιδίων. Οι παρενέργειες από τη ελλιπή σίτιση μπορούν να αποφευχθούν με κατάλληλη θεραπεία υποκατάστασης με βιταμίνες και ιχνοστοιχεία [178, 179].

Η κατανόηση του μηχανισμού δράσης της κετογόνου δίαιτας αποτελεί ένα από τα αδιευκρίνιστα μυστήρια της έρευνας της επιληψίας. Η μεγάλη αποτελεσματικότητα της δίαιτας απέναντι σε μία πληθώρα επιληπτικών κρίσεων και συνδρόμων υποδηλώνει ότι ενεργοποιείται ένα κοινό βασικό μοριακό μονοπάτι που καταστέλλει την ανώμαλη νευρωνική υπερδραστηριότητα του εγκεφάλου [175, 180, 181]. Η έρευνα στο κομμάτι της δίαιτας ως εναλλακτική θεραπεία συνεχίζεται με πρόσφατες ενδείξεις ότι μπορεί να είναι αποτελεσματικές και λιγότερο

απαιτητικές δίαιτες, όπως η τροποποιημένη δίαιτα Atkins, η κετονική δίαιτα με μέσης αλύσου τριγλυκερίδια και η δίαιτα χαμηλού γλυκαιμικού δείκτη [175, 182-184].

3. ΜΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΑ RNAs (NON-CODING RNAs, ncRNAs)

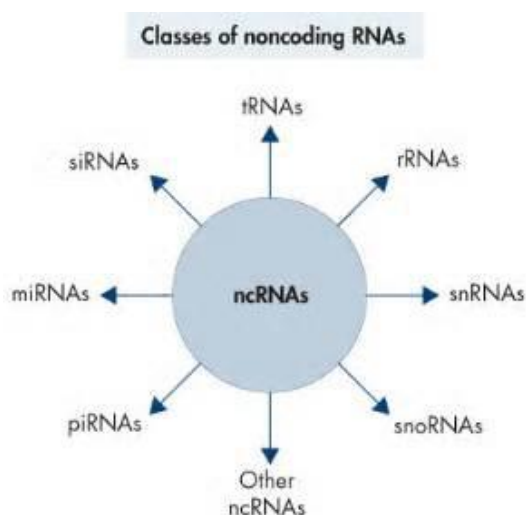
3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο όρος μη κωδικοποιητικά RNAs (Non-coding RNAs, nc-RNAs) χρησιμοποιείται κυρίως για μόρια RNA, τα οποία δεν κωδικοποιούν κάποια πρωτεΐνη. Ωστόσο, αυτό δε σημαίνει ότι αυτά τα RNAs δεν περιέχουν πληροφορίες ή ότι δεν επιτελούν κάποια λειτουργία [185]. Πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν ότι το 90% του ευκαρυωτικού γονιδιώματος μπορεί να μεταγραφεί και το ενδιαφέρον είναι ότι μόνο 1-2% από αυτά τα μετάγραφα κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Η πλειοψηφία τους μεταγράφεται ως μη κωδικοποιητικά RNA μόρια. Τα ncRNAs παίζουν μεγάλο ρόλο στην επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης εκτός από το ρόλο τους στο μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο κι αυτό γίνεται ολοένα και πιο σαφές [186]. Πιο συγκεκριμένα, τα ncRNA μόρια συμμετέχουν στην ενδονουκλεοτιδική διάσπαση και σύνθεση RNA, επεξεργάζονται και τροποποιούν άλλα RNAs, συμμετέχουν στη μεθυλίωση του DNA και την αποσιώπηση γονιδίων, έχουν ενζυμική δράση και συνθέτουν τελομερή του DNA [187].

Τα μη κωδικοποιητικά RNAs μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες ομάδες: α) τα *nc-RNAs με συγκεκριμένη δομή* και β) τα *ρυθμιστικά nc-RNAs* [187]. Τα *nc-RNAs με συγκεκριμένη δομή* φαίνεται πως εμπλέκονται στην πρωτεϊνοσύνθεση και το μάτισμα και περιλαμβάνουν RNAs, όπως τα ριβοσωμικά, τα μεταφορικά και τα μικρά πυρηνικά RNAs. Τα *ρυθμιστικά nc-RNAs* ελέγχουν τη γονιδιακή έκφραση και παρουσιάζουν μεγαλύτερο ερευνητικό ενδιαφέρον, καθώς εμπλέκονται στην τροποποίηση άλλων μορίων RNA [188]. Μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω στις εξής κατηγορίες [185, 189] (Εικόνα 5):

- MicroRNAs, miRNAs – μικρο RNA
- Small interfering RNAs, siRNAs – μικρά παρεμβατικά RNA

- Piwi-interacting RNAs, piRNAs
- Long non-coding RNAs, lnc-RNAs – μεγάλα μη κωδικοποιητικά RNA
- Small nucleolar RNAs, snoRNAs
- Other RNAs



Εικόνα 5. Κατηγορίες μη κωδικοποιητικών μορίων RNA (non-coding RNAs)

4. MicroRNAs

4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

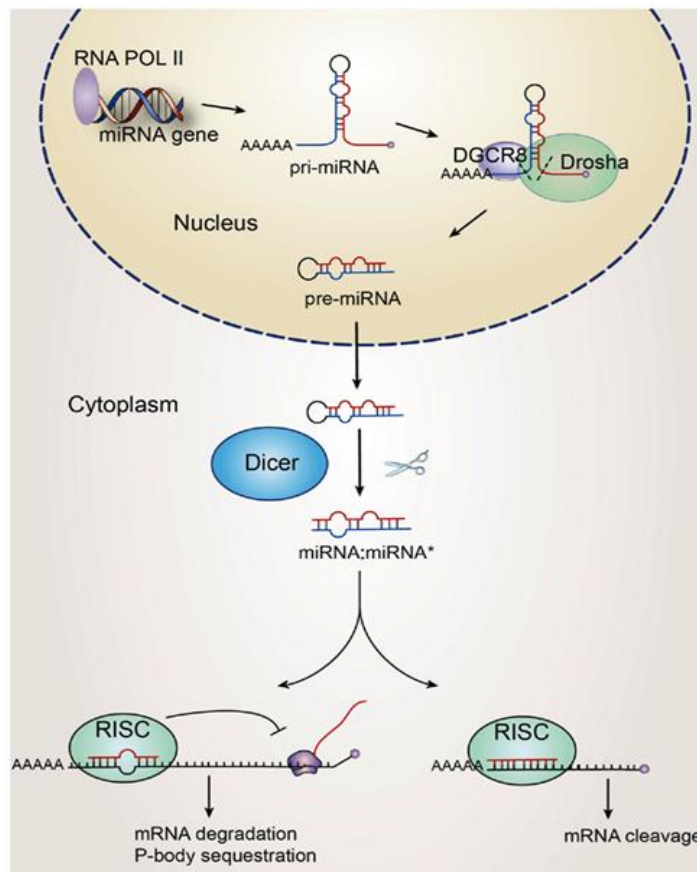
Τα microRNAs (miRNAs) είναι μικρά, εξελικτικά συντηρημένα, μη κωδικά ενδογενή RNA μόρια μεγέθους 21-25 νουκλεοτιδίων. Εμπλέκονται στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης των ευκαρυωτικών κυττάρων καθώς δεσμεύονται στην 3' αμετάφραστη περιοχή (3'-UTR) των mRNA στόχων σύμφωνα με τη συμπληρωματικότητα των βάσεων. Εκατοντάδες microRNA γονίδια έχουν βρεθεί σε ζώα, φυτά και ιούς καθιστώντας τα έτσι μία από τις μεγαλύτερες οικογένειες γονιδίων που έχει μελετηθεί μέχρι σήμερα [190]. Χαρακτηρίζονται από ιστοειδικότητα [191] και πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει πως παίζουν ρόλο κλειδί σε πολλές και σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η ανάπτυξη, η κυτταρική διαφοροποίηση, ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση και ο μεταβολισμός. Ωστόσο, η λειτουργία των περισσότερων microRNAs δεν είναι γνωστή [192]. Σήμερα,

σύμφωνα με τις τελευταίες εκτιμήσεις υπολογίζεται ότι υπάρχουν τουλάχιστον 300 miRNAs στο ανθρώπινο γονιδίωμα και περίπου 1400 miRNA γονίδια [193].

Το πρώτο microRNA ανακαλύφθηκε το 1993 και ήταν το lin-4 από τους Victor Ambros και Gary Ruvkun, οι οποίοι μελετούσαν τον κύκλο ανάπτυξης στο νηματώδη σκώληκα *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*). Οι μελέτες τους, οδήγησαν στη διαπίστωση ότι το συγκεκριμένο γονίδιο δεν κωδικοποιεί κάποια πρωτεΐνη, αλλά παράγει δύο μικρού μεγέθους μόρια RNA [194]. Αρχικά επικρατούσε η άποψη ότι τα miRNAs διαδραματίζουν ρυθμιστικό ρόλο μόνο στο σκώληκα. Το 2001 επινοήθηκε ο όρος microRNA και έκτοτε έχουν αναγνωρισθεί και κλωνοποιηθεί χιλιάδες μόρια miRNA από αρκετούς οργανισμούς συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου [195]. Τα γονίδια των miRNAs βρίσκονται κατανεμημένα σε περιοχές του γονιδιώματος ως ξεχωριστές μεταγραφικές μονάδες όπως επίσης και σε ομάδες (clusters) που μεταγράφονται ως πολυσιτρονικά πρωτογενή μετάγραφα [196, 197]. Εντοπίζονται σε όλα τα χρωμοσώματα του ανθρώπου, εκτός από το χρωμόσωμα Y [198]. Μελέτες αποκάλυψαν ότι περίπου τα μισά από τα γνωστά microRNAs εντοπίζονται σε εσώνια και εξώνια μη κωδικών RNAs ή σε εσώνια γονιδίων που κωδικοποιούν κάποια πρωτεΐνη. Πιο σπάνια τα microRNAs συναντώνται σε εξώνια μεταγράφων [199, 200].

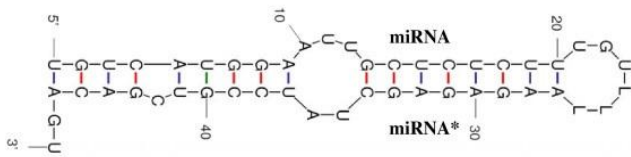
4.2. ΒΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Η βιογένεση των miRNAs αποτελεί μία σειρά από διαδοχικές διαδικασίες προκειμένου να δημιουργηθούν ώριμα miRNAs και ξεκινάει στον πυρήνα (Εικόνα 6). Αρχικά, το miRNA γονίδιο μεταγράφεται από την RNA πολυμεράση II [201]. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται ένα μεγάλου μήκους πρόδρομο μετάγραφο miRNA (primary miRNA) που ονομάζεται pri-miRNA [202]. Τα πρόδρομα μετάγραφα φέρουν ένα ειδικό 5' κάλυμμα και είναι πολυαδενυλιωμένα (polyA ουρά) [201, 203].



Εικόνα 6. Το μοντέλο βιογένεσης των *microRNAs* (www.frontiersin.org)

Το πρόδρομο miRNA αποτελείται από μία δομή μίσχου φουρκέτας (hairpin structure, HPS) μήκους 33 ζεύγη βάσεων, μία ακραία θηλιά (T-loop) και δύο μονόκλωνες περιοχές εκατέρωθεν της φουρκέτας [198]. Στη συνέχεια, ακολουθεί η πέψη του pri-miRNA και ο σχηματισμός του pre-microRNA (precursor miRNA). Η πέψη του pri-miRNA γίνεται από ένα σύμπλοκο γνωστό ως μικροεπεξεργαστής, που αποτελείται από το ένζυμο Drossha (ενδονουκλεάση RNάση τύπου III) και την πρωτεΐνη 8 της κρίσιμης περιοχής του γονιδίου του συνδρόμου DiGeorge (DiGeorge syndrome critical region of gene 8, DGCR8) [204, 205]. Το DGCR8 αναγνωρίζει το pri-miRNA και κατευθύνει τη Drossha σε μία συγκεκριμένη θέση πέψης [206-208]. Η δράση του συμπλόκου Drossha-DGCR8 οδηγεί στο σχηματισμό του pre-miRNA που είναι ένα μόριο ~ 70 νουκλεοτιδίων με δομή μίσχου-θηλιάς [209]. Έπειτα, το pre-miRNA εξάγεται στο κυτταρόπλασμα με τη βοήθεια της μεταφορικής πρωτεΐνης Exportin 5 μέσω υδρόλυσης GTP [210, 211] (Εικόνα 7). Όταν το pre-miRNA περάσει στο κυτταρόπλασμα αναλαμβάνει δράση μία άλλη ενδονουκλεάση RNάση τύπου III, η Dicer.



Εικόνα 7. Η δομή του *pre-miRNA* (Ahmed et al. *BCM Bioinformatics* 2009 10:105)

Η ενδονουκλεάση αυτή παράγει ένα δίκλωνο μόριο miRNA/miRNA* 22 νουκλεοτιδίων [193, 212]. Τα μόριο αυτό αποτελείται από δύο σκέλη: ένα που ονομάζεται σκέλος-οδηγός ή απλά miRNA και ένα που ονομάζεται σκέλος-επιβάτης ή miRNA* [193, 197, 202]. Στη συνέχεια, το σκέλος-οδηγός φορτώνεται στο σύμπλοκο RISC (RNA-induced silencing complex) σχηματίζοντας έτσι το σύμπλοκο miRISC, ενώ το σκέλος-επιβάτης αποκόπτεται [213]. Τα βασικά στοιχεία του συμπλόκου RISC είναι οι πρωτεΐνες Dicer, Ago2, PACT και TRBP [214-216]. Το σκέλος-οδηγός αποτελεί το ώριμο miRNA και οδηγεί το σύμπλοκο miRISC στο mRNA στόχο. Ανάλογα με το βαθμό συμπληρωματικότητας μεταξύ του miRNA και του mRNA στόχου ακολουθεί αποικοδόμηση ή αναστολή της μετάφρασης του mRNA στόχου [217, 218].

Ο ακριβής μηχανισμός δράσης των miRNAs αποτελεί αντικείμενο έντονης έρευνας. Τα miRNAs καταστέλλουν τη μετάφραση του mRNA στόχου μέσω παρέμβασης είτε στο στάδιο της έναρξης είτε στο στάδιο της επιμήκυνσης της μετάφρασης [193]. Ένας πιθανός μηχανισμός μέσω του οποίου φαίνεται να καταστέλλεται η μετάφραση είναι η συσσώρευση των mRNA σε κυτταροπλασματικούς σχηματισμούς επεξεργασίας, τα σωματίδια P (P-bodies, processing bodies). Αυτά πιστεύεται ότι διαδραματίζουν ένα ρόλο στη σίγηση των mRNA καθώς τα mRNA στόχοι και τα συστατικά του RISC συνεντοπίζονται σε αυτές τις περιοχές του κυττάρου. Τα P-bodies «φιλοξενούν» πολλές πρωτεΐνες που ελέγχουν τα σύμπλοκα των αγγελιαφόρων ριβονουκλεοπρωτεϊνών (messenger ribonucleoprotein, mRNP-complexes). Τα εν λόγω σύμπλοκα αποτελούνται από mRNA και πρωτεΐνες-καταστολείς, αλλά όχι από παράγοντες

έναρξης της μετάφρασης. Έτσι η τοπολογία των mRNAs στόχων και επάνω στα P-bodies και επομένως ο σχηματισμός των συμπλόκων mRNPs, παρεμποδίζουν τη μετάφραση [198, 219].

Από την άλλη, η αποδόμηση του mRNA είναι επίσης σημαντική. Πρόσφατες έρευνες αποκάλυψαν ότι η αποδόμηση περιλαμβάνει μηχανισμούς όπως η αποαδενυλίωση, η αφαίρεση του καλύμματος και η εξωνουκλεολυτική πέψη του mRNA στόχου. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός της συγκεκριμένης διαδικασίας είναι ακόμα άγνωστος [220-222].

4.3. ΤΑ miRNAs ΣΤΙΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Έχει αποδειχθεί ότι τα microRNAs παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο σε ένα ευρύ φάσμα αναπτυξιακών διαδικασιών, όπως ο μεταβολισμός, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση και η διαφοροποίηση των νευρωνικών κυττάρων [223-227]. Άλλοι ρυθμιστικοί ρόλοι που επιτελούν τα miRNAs είναι η έκφραση νευρικών κυττάρων, η μορφοποίηση του εγκεφάλου, η μυική διαφοροποίηση και η διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων [228-231]. Μελέτες έχουν δείξει ότι η απορρύθμισή τους σχετίζεται με την εμφάνιση διάφορων παθολογικών καταστάσεων, όπως ο καρκίνος. Σε όλες τις περιπτώσεις ρύθμισης που συμμετέχουν τα miRNAs, παρατηρείται ένα συγκεκριμένο προφίλ έκφρασης και η διατήρηση αυτού του προφίλ κρίνεται ζωτικής σημασίας για τη σωστή λειτουργία του οργανισμού. Διαταραγμένο προφίλ έκφρασης των miRNAs γονιδίων έχει συνδεθεί με ένα μεγάλο αριθμό ασθενειών στον ανθρώπινο οργανισμό που κυμαίνονται από το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου έως τις αυτοάνοσες παθήσεις [232].

Η ραγδαία πρόοδος και οι μεγάλες ανακαλύψεις πάνω στα miRNAs τα τελευταία χρόνια δίνουν την ελπίδα ότι στο εγγύς μέλλον θα αποτελέσουν ένα σημαντικό εργαλείο στη διάγνωση και θεραπεία πολλών ασθενειών [233].

Ορισμένες από τις ασθένειες που έχουν συσχετισθεί με τα miRNAs είναι οι ακόλουθες:

1. Τα miRNAs στον καρκίνο

Η πλέον άμεσα σχετιζόμενη ασθένεια με τα miRNAs είναι ο καρκίνος. Αυτό πιθανότατα να συμβαίνει λόγω της σύνδεσης των miRNAs με τον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση. Προφίλ έκφρασης των miRNAs αποδεικνύουν ότι η απορρυθμισμένη έκφραση τους εμφανίζεται σε καρκινικούς ιστούς και ότι κάθε είδος καρκίνου χαρακτηρίζεται από ένα συγκεκριμένο προφίλ έκφρασης miRNAs. Αυτό βασίζεται στο ότι η απορρύθμιση κάποιων miRNAs μπορεί να προκαλέσει καρκίνο. Επίσης τα προφίλ έκφρασης των miRNAs παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες στην πρόγνωση και την κατηγοριοποίηση του καρκίνου. Ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους, τα miRNAs που σχετίζονται με τον καρκίνο χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: α) σε αυτά που δρουν ως tumor suppressors και καταστέλλουν τον καρκίνο και η έκφρασή τους είναι μειωμένη στις κακοήθειες και β) στα oncogenes, τα οποία έχουν τα αντίθετα αποτελέσματα και επάγουν την εμφάνιση του καρκίνου [234].

Πολλά είδη καρκίνου έχουν συσχετισθεί με την αυξημένη και τη μειωμένη έκφραση διάφορων miRNAs, όπως ο καρκίνος του μαστού, των ωθηκών, το ενδομητριοειδές αδενοκαρκίνωμα, του εντέρου, διάφοροι αιματολογικοί καρκίνοι (οξεία μυελογενής λευχαιμία- AML, οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία- ALL, χρόνια μυελογενής λευχαιμία- CML, χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία- CLL), καρκίνος του οισοφάγου, γαστρεντερικοί καρκίνοι, του πνεύμονα, της ουροδόχου κύστης και του θυρεοειδούς αδένα [235]. Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνεται το διαφορετικό προφίλ έκφρασης των σχετιζόμενων miRNAs με αυτά τα είδη καρκίνων.

Πίνακας 1. *MiRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση σε διάφορα είδη καρκίνου*

Cancer type	miRNA	Up/Down Regulation
Breast	miR-21, miR-155, miR-23, and miR-191	Up
	miR-205, miR- 145, miR-10b, and miR-125b	Down
Ovary	miR-200a, miR-200c, and miR-141	Up
	miR-199a, miR-140, miR-145, and miR125bl	Down
Endometrioid adenocarcinoma	miR-205, miR155 miR 200a, 200b, 200c	Up

Cancer type	miRNA	Up/Down Regulation
	miR-193a, 193b	Down
Colon		
	miR-let 7g, miR-21, miR-20a, miR-17- 19 family, miR 31, miR 135, miR-181b, and miR 200c	Up
	miR-34, miR-let7, miR 143, miR 145, miR-133b, and miR- 126	Down
AML		
	Has- miR- 191, 199a, miR 155	Up
CML		
	miR-17-5p, miR-173p, miR- 18a, miR-19a, miR-19b-1, miR- 20a and miR- 92a-1	Up
CLL		
	miR-21, miR 150, miR-155, miR-15a	Up
	miR- 16, miR-29, miR143, miR-45, miR-30d, miR- let 7a, miR-181a	Down
Esophagus		
	miR-194, miR- 192, miR-200c	Up
	miR- 203	Down
Gastrointestinal		
	miR-106b- 25	Up
	miR-15b, miR- 16	Down
Lung		
	has-mir-21 and has-mir- 205, miR- 17-92	Up
	has-mir-126*, miR-let 7, hsa-let-7a-2, let-7f-1	Down
Bladder		
	miR-2 23, miR- 26b, miR- 221, miR- 103-1, miR-185, miR-23 b, miR- 203,miR 17-5p, miR-23, miR- 205	Up
	miR-29c, miR-26a, miR-30c, miR- 30e-5p	Down
Thyroid tumors		
PC	miR- 146 b, miR- 221, miR- 222, miR- 181b, miR- 155, miR- 224	Up
AC	miR-30d, miR-125b, miR- 26a, miR- 30a- 5p	Down

Έχει προβλεφθεί ότι τα miRNAs θα έχουν μία πολύ καλή προοπτική, ώστε να χρησιμοποιηθούν στη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου μελλοντικά.

2. Τα miRNAs στις καρδιαγγειακές παθήσεις

Η ανακάλυψη των miRNAs τα πρόσφατα χρόνια κατέστησε σαφές ότι αυτά τα RNA μόρια παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της καρδιακής λειτουργίας και το καρδιαγγειακό σύστημα των θηλαστικών γενικότερα [236, 237] (Πίνακας 2). Τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs είναι συνδεδεμένα με την απορρύθμιση αναπτυξιακών διαδικασιών και ασθενειών όπως η υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια και η καρδιακή ανεπάρκεια. Πολλά miRNAs εκφράζονται με ιστοειδικό τρόπο [238] και συγκεκριμένα στον καρδιακό ιστό παρατηρείται η έκφραση των παρακάτω miRNAs: miR-1, miR-16, miR-27b, miR-30d, miR-126, miR-133, miR-143 και η οικογένεια let-7 [239]. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα miRNAs miR-1, miR-133 και miR-208 εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό στην καρδιά [240, 241] και αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές της καρδιακής ανάπτυξης [237, 242-244]. Μάλιστα πρόσφατα, η απορρύθμιση της έκφρασης των miR-1 και miR-133 αναφέρθηκε στην καρδιακή ανεπάρκεια [236, 245, 246]. Οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους εμπλέκονται στις καρδιαγγειακές λειτουργίες δεν είναι γνωστοί.

Πίνακας 2. *MiRNAs σε διάφορες ανθρώπινες ασθένειες*

Disease type	miRNA	Up/Down Regulation
Cardiac hypertrophy	miR-23a, miR-23b, miR-24, miR-195, miR-199a, and miR-214	Up
Rheumatic arthritis	miR-155, miR-146	Up
Systemic lupus erythematosus	miR-189, miR-61, miR-78, miR-21, miR-142-3p, miR 342, miR-299-3p, miR-198 and miR-298	Up
	miR-196a, miR-17-5p, miR- 409-3p, miR-141, miR-383, miR- 112, and miR-184	Down
Psoriasis	miR-203	Up

3. Τα miRNAs στις νευρολογικές παθήσεις

Τα miRNAs εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό στον ανθρώπινο εγκέφαλο σε σχέση με άλλα όργανα [247-249]. Αποτελέσματα από πειράματα αλληλούχισης δεύτερης γενιάς υποστηρίζουν ότι ο αριθμός των miRNAs που εκφράζονται στον ανθρώπινο εγκέφαλο ξεπερνάει τα 1000 [250]. Η έκφραση των miRNAs στον εγκέφαλο αλλάζει κατά τη διάρκεια της εγκεφαλικής ανάπτυξης. Επομένως, κάποια miRNAs εκφράζονται περισσότερο κατά τη διάρκεια της αρχικής ανάπτυξης στον εγκέφαλο των θηλαστικών και κάποια εκφράζονται λιγότερο στη συνέχεια της ανάπτυξης [251, 252]. Οι αλλαγές αυτές στα επίπεδα έκφρασης κατά την εγκεφαλική ανάπτυξη πιθανόν να αναπαριστά βιοχημικά σήματα για τον κυτταρικό καθορισμό, την απόπτωση και/ή την κυτταρική διαίρεση [253]. Ένα από τα σημαντικότερα κοινά χαρακτηριστικά που συνδέουν πολλές από τις νευροαναπτυξιακές διαταραχές, όπως είναι η επιληψία, η διανοητική καθυστέρηση, η πολλαπλή σκλήρυνση, ο αυτισμός και η διαταραχή ελλειμματικής προσοχής και υπερκινητικότητας είναι ότι η εκδήλωση της νόσου εμφανίζεται κατά τη διάρκεια των περιόδων της ωρίμανσης και της ανάπτυξης [254]. Ως εκ τούτου είναι πολύ πιθανό τα miRNAs να συμβάλλουν σημαντικά στην παθογένεια νευροαναπτυξιακών διαταραχών σε μοριακό επίπεδο [255]. Στην επόμενη ενότητα θα γίνει αναλυτική αναφορά στη σχέση των miRNAs με την επιληψία.

4. Τα miRNAs στα αυτοάνοσα νοσήματα

Αποτελέσματα μελετών τόσο σε κυτταρικές καλλιέργειες όσο και σε ζώα αποκαλύπτουν ότι τα miRNAs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της φυσιολογικής λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς και την πρόληψη της αυτοανοσίας. Αυτό που δεν είναι ακόμα σαφές είναι ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η μειωμένη έκφραση των miRNAs θα μπορούσε να οδηγήσει σε παθογένεση σε μία αυτοάνοση νόσο. Στη συνέχεια θα εξετασθούν πιθανοί ρόλοι των miRNAs στη ρύθμιση δύο από τα πιο σημαντικά αυτοάνοσα νοσήματα, τη ρευματοειδή αρθρίτιδα και το συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (ΣΕΛ) [256].

A. Ρευματοειδής αρθρίτιδα

Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα παρατηρήθηκε μη φυσιολογική έκφραση των miRNAs

[257]. Συγκεκριμένα δύο miRNAs, τα miR-155 και miR-146 βρέθηκαν να εκφράζονται σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σε ιστολογικά ευρήματα από τον αρθρικό υμένα ή αρθρικό ιστό και σε ινοβλάστες του αρθρικού υμένα που απομονώθηκαν από ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα σε σχέση με τα υγιή άτομα (Πίνακας 2). Η παθογένεια της ρευματοειδούς αρθρίτιδας έχει συσχετισθεί με διάφορες μολύνσεις από ιούς, όπως ο ιός της χρόνιας ηπατίτιδας C (HVC), ο *Epstein-Barr* (EBV) και ο ιός HIV [258]. Φαίνεται πως οι ιοί έχουν την ικανότητα να κωδικοποιούν δικά τους miRNAs, τα οποία με τη δράση τους καταστέλλουν το ανοσοποιητικό σύστημα του κυττάρου ξενιστή. Χαρακτηριστικό παράδειγμα το miR-UL112-1 που εκφράζεται από τον ανθρώπινο κυτταρομεγαλοϊό και έχει ως στόχο του το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας τάξης I (MHC-I) [259]. Τρεις μελέτες έχουν δείξει μεταβολή της έκφρασης των miRNAs σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα σε σύγκριση με υγιή άτομα [257, 260-261]. Αυξημένη έκφραση των miR-155 και 146 σε ινοβλάστες αρθρικού υμένα με ρευματοειδή αρθρίτιδα έχουν τεθεί σε σύγκριση με εκείνους των ασθενών με οστεοαρθρίτιδα [262].

B. Συστηματικός ερυθρηματώδης λύκος (ΣΕΛ)

Ο συστηματικός ερυθρηματώδης λύκος είναι μία συστηματική φλεγμονώδης αυτοάνοση ασθένεια με ποικίλες κλινικές εκδηλώσεις που συμπεριλαμβάνουν φωτοευαισθησία, αρθρίτιδα, σπειραματονεφρίτιδα και νευρολογικές διαταραχές. Σε μία πρόσφατη ανάλυση της έκφρασης των miRNAs σε ασθενείς με ΣΕΛ μέσω μικροσυστοιχιών, βρέθηκε ότι επτά miRNAs (miR-196a, miR-17-5p, miR-409-3p, miR-141, miR-383, miR-112 και miR-184) έχουν μειωμένη έκφραση και εννέα miRNAs (miR-189, miR-61, miR-78, miR-21, miR-142-3p, miR-342, miR-299-3p, miR-198 και miR-298) παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση συγκριτικά με υγιή άτομα (Πίνακας 2) [263]. Το προφίλ των miRNAs από βιοψίες νεφρών ασθενών με νεφρικό ΣΕΛ έδειξε 66 miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση (36 για αυξημένη έκφραση και 30 για μειωμένη) σε σύγκριση με υγιή άτομα [264]. Φυσικά, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να καθοριστεί εάν η διαφορική έκφραση αυτών των miRNAs επαναλαμβάνεται [256].

5. Τα miRNAs στις ηπατικές νόσους

Το ήπαρ αποτελείται από πολλούς τύπους κυττάρων και κάθε κυτταρικός τύπος ίσως να έχει και ένα διακριτό προφίλ έκφρασης για τα miRNAs. Τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερη προσοχή έχει στραφεί στην ολοένα και αυξανόμενη κατανόηση των miRNAs λειτουργιών σε σχέση με τη φυσιολογία του ήπατος και με τις ηπατικές νόσους καθώς και τον προσδιορισμό των miRNAs στόχων [265].

- Πολυκυστική νόσος του ήπατος

Η πολυκυστική νόσος του ήπατος, αλλά και των νεφρών έχουν ετερογενή αιτιολογία και προκαλούνται από μεταλλάξεις και προκαλούνται από μεταλλάξεις σε δύο γονίδια, το PKD1 και PKD2 [266]. Η αυτοσωματική υπολειπόμενη πολυκυστική νόσος των νεφρών (ARPKD) μπορεί να εμφανιστεί στα νεογνά και χαρακτηρίζεται από την παρουσία πολυάριθμων μικρών κύστεων στους νεφρούς και σύμφωνα με τη μελέτη των Lee και συν υπάρχουν στοιχεία που αποδίδουν ένα ρόλο στα miRNAs. Σε αυτήν τη μελέτη τα επίπεδα του miR-15a βρέθηκαν μειωμένα στο ήπαρ ασθενών με ARPKD. Τα ευρήματα από αυτή τη μελέτη δείχνουν ότι αλλαγές στην έκφραση των miRNAs συμβάλλουν σε αλλαγές στο φαινότυπο της κυστικής νόσου του ήπατος [266].

6. Τα miRNAs στις μυοσκελετικές παθήσεις

Οι μυϊκές δυστροφίες είναι μία ετερογενής ομάδα διαταραχών που περιλαμβάνει εκφυλισμό των σκελετικών μυών. Όπως προέκυψε από μελέτες στα μυοειδικά miR-1, miR-133 και miR-206, τα miRNAs παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης των μυών [267]. Πρόσφατα μάλιστα μοναδικά miRNAs βρέθηκαν στη μυϊκή δυστροφία Duchenne [268, 269]. Είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι η διάγνωση της πρόσωπο-ώμο-βραχιονίου μυϊκής δυστροφίας (Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy, FSHD) θα μπορούσε να διακριθεί από τη μυϊκή δυστροφία Duchenne με βάση το επίπεδο της έκφρασης των miRNAs-381 και miRNAs-382 σε ασθενείς με FSHD [268]. Άλλες μελέτες έχουν δείξει αυξημένα επίπεδα έκφρασης των miRNAs-100, 103 και 107 σε μερικές μυοπάθειες [269].

7. Τα miRNAs στις δερματοπάθειες

Η συμμετοχή των miRNAs στη μορφογένεση του θύλακα της τρίχας, σε αυτοάνοσες και χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους έχει αποτελέσει αντικείμενο ερευνών [270-274]. Οι δερματικοί ινοβλάστες είναι σημαντικά κύτταρα που συμμετέχουν στη διαδικασία επούλωσης πληγών και από αναλύσεις φαίνεται ότι ένα σύμπλεγμα από 33 miRNAs εμπλέκεται στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων στόχων που απαιτούνται για την είσοδο των ινοβλαστών στον κυτταρικό κύκλο και τον πολλαπλασιασμό [271, 275]. Μία πρόσφατη ανασκόπηση έχει περιγράψει τη δυναμική σημασία της συμμετοχής των miRNAs στην αγγειογένεση των πληγών και τη μη φυσιολογική ακολουθία επούλωσης χρόνιων πληγών [272, 276].

- Ψωρίαση

Η ψωρίαση είναι μία χρόνια φλεγμονώδης δερματοπάθεια και πιστεύεται ότι εμπλέκονται στην παθογένειά της γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Πλέον είναι ευρέως αποδεκτό ότι προκύπτει από μειωμένη επικοινωνία ανάμεσα στο ανοσοποιητικό σύστημα και δομικά κύτταρα του δέρματος [273, 277, 278]. Τα σχετιζόμενα με την ψωρίαση miRNAs έχουν ταυτοποιηθεί στο δέρμα και συγκεκριμένα, το miR-203 φάνηκε να εκφράζεται 100 φορές περισσότερο στο δέρμα συγκριτικά με κάποιο άλλο όργανο (Πίνακας 2). Αναλύσεις έκφρασης των σχετιζόμενων με την ψωρίαση miRNAs (miR-203, miR-146a, miR-21 και miR-125b) σε κύτταρα υγιούς δέρματος και δέρματος με ψωρίαση έδειξαν ότι έχουν ένα διακριτό προφίλ έκφρασης [276]. Τέτοιες έρευνες αποδεικνύουν ότι ειδικά για την ψωρίαση-miRNAs εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου.

Βλέπουμε λοιπόν πως τα miRNAs εμπλέκονται στην έναρξη και την εξέλιξη διάφορων ανθρώπινων ασθενειών. Παράλληλα είναι πολύ ενδιαφέρουσα η παρουσία τους σε πολλά υγρά του ανθρώπινου σώματος, όπως ο ορός, το πλάσμα, το σάλιο, τα ούρα κ.ά. Καθώς ο ρόλος των miRNAs διευκρινίζεται ολοένα και περισσότερο και καθορίζεται ο τρόπος δράσης τους σε κάθε ασθένεια, μένει να δούμε νέες μεθόδους που θα στοχεύουν στην αντιμετώπιση και τη θεραπεία σημαντικών ασθενειών. Αυτό πιθανότατα θα διαδραματίσει ένα κύριο ρόλο στον τομέα της εξατομικευμένης ιατρικής στο σύντομο μέλλον.

4.4. ΤΑ miRNAs ΣΤΗΝ ΕΠΙΛΗΨΙΑ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η επιληψία αποτελεί μία από τις συχνότερες νευρολογικές διαταραχές παγκοσμίως. Οι περισσότερες προσπάθειες που βασίστηκαν στη στόχευση ενός γονιδίου με σκοπό τη διακοπή και την πρόληψη της επιληψίας, έπεσαν στο κενό. Σε αυτό το σημείο τα miRNAs αποτέλεσαν μία καλή εναλλακτική για διάφορους λόγους. Ατομικά miRNAs μπορούν να ρυθμίσουν πολλούς στόχους στο ίδιο κύτταρο και να επηρεάσουν περισσότερα από ένα μονοπάτια. Πράγματι, πάνω από το 60% των πρωτεϊνών αποτελούν προβλεπόμενους στόχους των miRNA [279]. Επίσης διάφορες παθολογικές διαδικασίες που διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην επιληψία, όπως ο νευρωνικός θάνατος, η φλεγμονή και η γλοιώση βρίσκονται υπό τον έλεγχο των miRNAs [280]. Μερικά miRNAs που έχει αναφερθεί ότι εμπλέκονται στην επιληψία είναι τα miR-124, miR-134, miR-132 και miR-196b [281, 282].

Λόγω της υψηλής επίπτωσής της στον ανθρώπινο πληθυσμό, η επιληψία του κροταφικού λοβού (Temporal Lobe Epilepsy, TLE) αποτελεί μία από τις πιο μελετημένες κατηγορίες επιληψίας [282]. Η πιο κοινή μορφή της είναι η επιληψία μέσου κροταφικού λοβού (Mesial Temporal Lobe Epilepsy, MTLE) και πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι τα miRNAs πιθανόν να διαδραματίζουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο σε μονοπάτια φλεγμονής στη MTLE [284, 285]. Σε ασθενείς με αυτόν τον τύπο επιληψίας έχουν παρατηρηθεί σημαντικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης του miR-146a [286, 287]. Ένα άλλο miRNA που έχει συσχετισθεί με τη φλεγμονή στη MTLE είναι το miR-155, για το οποίο παρατηρήθηκε αυξημένη έκφρασή του στον ιππόκαμπο παιδιών, καθώς και σε πειραματικά μοντέλα [288]. Επίσης σε ένα γενικότερο πλαίσιο, ισχυρός ρυθμιστής της φλεγμονής έχει αναδειχθεί το miR-132, το οποίο έχει αντιφλεγμονώδη δράση μέσω στόχευσης στην ακετυλοχολινεστεράση [289].

Οι δυσμορφίες του εγκεφαλικού φλοιού αποτελούν μία συχνή αιτία στη φαρμακοανθεκτική επιληψία [283]. Τα miRNAs φαίνεται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν φάσεις της δημιουργίας του εγκεφαλικού φλοιού. Μικρές αλλαγές στο προφίλ έκφρασής τους έχουν συσχετισθεί με μία ποικιλία νευρολογικών διαταραχών [290]. Σε πρόσφατες μελέτες παρατηρήθηκε ο πιθανός ρόλος των microRNAs στην παθογένεση και την

επιληπτογένεση προερχόμενες από δυσμορφίες κατά την ανάπτυξη του εγκεφαλικού φλοιού. Ορισμένα από αυτά τα microRNAs είναι τα εξής: miR-9, miR-124, miR-137, miR-184 και let-7 [291-295].

Σύμφωνα με έρευνες, τα miRNAs αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές του νευρωνικού θανάτου που επάγεται από επιληπτικές κρίσεις και είναι πολύ πιθανόν αυτά τα μικρά μόρια και να αποτελέσουν νέους θεραπευτικούς στόχους για την επιληψία. Συγκεκριμένα, πρόσφατα παρατηρήθηκε πως το miR-34a φαίνεται να παίζει ρόλο κλειδί στο μηχανισμό για την επαγωγή κρίσεων που επάγουν το θάνατο των νευρώνων [283, 296, 297].

Τα miRNAs εντοπίζονται σε ένα ευρύ φάσμα ιστών και εξωκυττάρων υγρών, όπως ο ορός και το πλάσμα του αίματος, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, τα δάκρυα, το σάλιο, τα ούρα και το αμνιακό υγρό [297, 298]. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το ότι είναι πολύ μικρά σταθερά μόρια τα καθιστούν πολύ καλούς βιοδείκτες για την επιληπτογένεση ή ακόμα και για την πρόγνωση της επιληψίας. Ειδικότερα, miRNAs που έχουν απομονωθεί από το αίμα έχει βρεθεί ότι μπορούν αξιοποιηθούν κλινικά ως νέοι βιοδείκτες της ασθένειας.

Μία άλλη « πηγή » miRNAs, τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες αποτελούν τα εξωσώματα (exosomes). Αυτά τα οργανίδια έχουν χαρακτηριστεί ως βιοδείκτες σε μία ποικιλία νευρολογικών διαταραχών, όπως το Alzheimer, η νόσος του Parkinson και το γλοιοβλάστωμα [299-301]. Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για τον έλεγχο του HIV παρατηρήθηκε ότι το miR-29b απελευθερώνεται σε εξωσώματα που σχετίζονται με ένα νευροτροφικό παράγοντα σε γειτονικούς νευρώνες [302].

Έρευνα δείχνει ότι η αναχαίτηση ενός ώριμου miRNA όχι μόνο μπορεί να επηρεάσει την παθολογία του εγκεφάλου, αλλά παρέχει και ένα νέο θεραπευτικό στόχο για την επιληψία. Σε πρόσφατη μελέτη [281] αναφέρεται ότι ίσως τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του miR-196b θα αποτελέσουν έναν αξιόλογο δείκτη για τη μοριακή διάγνωση και πρόγνωση της επιληψίας που προκαλείται από γλοίωμα εγκεφάλου (τύπος εγκεφαλικού όγκου). Υπερέκφραση αυτού του microRNA έχει αναφερθεί σε ασθενείς με γλοίωμα, οι οποίοι παρουσιάζουν επιληπτικές κρίσεις προεγχειρητικά και έτσι θα μπορούσε στο μέλλον να αποτελέσει ένα αξιόλογο προγνωστικό εργαλείο σε ασθενείς χωρίς επιληπτικές κρίσεις προεγχειρητικά. Στοχευμένες θεραπείες με σκοπό τη μείωση των επιπέδων του miR-196b ίσως

λοιπόν να αποτελούν νέα θεραπευτική προσέγγιση [303]. Επίσης πρόσφατη μελέτη αποκαλύπτει ότι τα ειδικά για τον εγκέφαλο miR-124, miR-134 και miR-9 εκφράζονται σε σημαντικά υψηλά επίπεδα σε στάδιο που σχετίζεται με τις επιληπτικές κρίσεις και προβλέπει πως αυτά τα τρία microRNAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά ως πιθανοί στόχοι των αντιεπιληπτικών φαρμάκων [282]. Η μείωση της *in vivo* έκφρασης των microRNAs με τη χρήση ανταγωνιστικών μορίων ίσως και να βοηθήσει στη θεραπεία για την επιληψία.

4.4.1. Το miR-34a

Το miR-34a ανήκει στην εξελικτικά συντηρημένη οικογένεια miR-34a, η οποία αποτελείται από 3 microRNAs: το miR-34a, το miR-34b και το miR-34c [304]. Πλέον είναι αποδεδειγμένο ότι παρουσιάζει ογκοκατασταλτική δράση. Το miR-34a εκφράζεται από το χρωμόσωμα 1p36 και κωδικοποιείται από το δικό του μετάγραφο σε αντίθεση με τα άλλα δύο (miR-34b και miR-34c), τα οποία εκφράζονται από το 11q23 χρωμόσωμα και μοιράζονται ένα κοινό πρώιμο μετάγραφο [304, 305]. Σε πειραματόζωα το miR-34a παρουσιάζει υψηλά επίπεδα έκφρασης στον εγκέφαλο [306], ενώ τα miR-34a και miR-34b εκφράζονται κυρίως στους πνεύμονες [307].

Το miR-34a ρυθμίζεται από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 και εκφράζεται στο μεγαλύτερο βαθμό στον εγκέφαλο [304], προωθώντας είτε την επιδιόρθωση του DNA, τον κυτταρικό κύκλο ή την απόπτωση μέσω μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων [308].

Το miR-34a ήταν το πρώτο miRNA που δείχθηκε ότι έχει άμεση προαποπτωτική δράση [309]. Οι Welch και συν ήταν οι πρώτοι που έδειξαν την προαποπτωτική δράση του miR-34a, γεγονός που επιβεβαίωσαν πολυάριθμες μελέτες στη συνέχεια. Υπερέκφραση του συγκεκριμένου microRNA μπορεί να επάγει την απόπτωση των κυττάρων μέσω της οδού των κασπασών [310], ενώ απενεργοποίησή του παρεμποδίζει την απόπτωση μέσω του p53 [311]. Επομένως, το miR-34a μπορεί να είναι απαραίτητο, αλλά όχι και επαρκές για την επαγωγή της απόπτωσης μέσω της p53 οδού, ενώ είναι πολύ πιθανό να διαθέτει και ανεξάρτητους από το p53 προαποπτωτικούς μηχανισμούς.

Πρόσφατες μελέτες από τους Agostini και συν έδειξαν ότι το προαποπτωτικό miR-34a ρυθμίζει την ανάπτυξη των νευρώνων, τα μορφολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά του νωτιαίου μυελού και τονίζοντας κυρίως την σημασία αυτού του microRNA στη νευρωνική διαφοροποίηση και τη συναπτογένεση. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί διάφοροι στόχοι του συγκεκριμένου miRNA ανάμεσά στους οποίους συμπεριλαμβάνονται η πρωτεΐνη Bcl-2 και η πρωτεϊνική κινάση MAP3K9 [303, 312].

Αυξημένα επίπεδα έκφρασης του miR-34a αναφέρθηκαν για πρώτη φορά σε ιππόκαμπο επίμου, 24 ώρες μετά τη χορήγηση πιλοκαρπίνης με επαγόμενη SE [313]. Η πιλοκαρπίνη, όπως και το καϊνικό οξύ (KA) αποτελούν επιληπτογόνους χημικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της επιληπτογένεσης. Ωστόσο, μελέτες έδειξαν ότι με χρήση ανταγωνιστή του miR-34a μπορεί μέσω μειωμένης έκφρασης της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης κασπάσης-3, η οποία αποτελεί κασπάση εκτελεστή της αποπτωτικής διαδικασίας, να προάγεται η επιβίωση των νευρώνων σε συγκεκριμένες περιοχές του ιππόκαμπου του εγκεφάλου [303]. Στο μοντέλο της πιλοκαρπίνης η επαγωγή του miR-34a διαρκεί όσο και οι επιληπτικές κρίσεις [314, 315]. Μέχρι στιγμής δεν έχει αναφερθεί κάποια ρύθμιση του miR-34a στην επιληψία του κροταφικού λοβού στον άνθρωπο [316, 317] ούτε σε επιληπτικούς μύες μετά από έγχυση που τους έγινε με KA στον αμυγδαλοειδή πυρήνα [318]. Αυτό πιθανόν να σημαίνει ότι το miR-34a κατέχει πιο σημαντικό ρόλο κατά τον αρχικό τραυματισμό.

Ο ρόλος που διαδραματίζει το miR-34a στο νευρωνικό θάνατο που επάγεται από επιληπτικές κρίσεις έχει διχάσει την επιστημονική κοινότητα. Προκειμένου λοιπόν να ελέγξουν αν το miR-34a είναι σημαντικό σε κρίσεις που επάγουν το θάνατο των νευρώνων, δύο ομάδες επιστημόνων χρησιμοποίησαν ανταγωνιστές του συγκεκριμένου microRNA κάνοντας έγχυση KA σε πειραματόζωα. Οι Sano και συν χρησιμοποίησαν μύες και με το δεδομένο ότι το p53 συμβάλλει στο νευρωνικό θάνατο που επάγεται από επιληπτικές κρίσεις, υπέθεσε ότι και το miR-34a θα είχε αυξημένη έκφραση και θα συνέβαλε στο νευρωνικό θάνατο [318]. Από την άλλη, οι Hu και συν χρησιμοποίησαν επιμύες [315]. Τελικά τα αποτελέσματα ήταν διάφορα (Πίνακας 3). Στη μελέτη του Sano φάνηκε ότι ναι μεν στις κρίσεις παρατηρείται αυξημένη έκφραση του miR-34a, αλλά η αποσιώπηση του miR-34a in vivo δεν αποτρέπει το νευρωνικό θάνατο που

επάγεται από επιληπτικές κρίσεις. Παρατηρήθηκε και μία μικρή μείωση στην ενεργοποιημένη κασπάση-3. Ενώ στην άλλη μελέτη η αναστολή του miR-34a επίσης μπλόκαρε τη δράση της κασπάσης-3, αλλά κυρίως είχε νευροπροστατευτική δράση [315]. Προφανώς αυτή η διαφορά στα αποτελέσματα μπορεί να αποδοθεί σε διάφορους παράγοντες, όπως τα διαφορετικά πειραματικά μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν, ο χρόνος που διήρκησε η κάθε αξιολόγηση, οι δόσεις και το πρόγραμμα έγχυσης που ακολουθήθηκε, καθώς και τότε σημειώθηκαν τα πρώτα συμπτώματα της επιληπτικής κατάστασης (SE).

Πίνακας 3. Αποτελέσματα της αναστολής του miR-34a στο νευρωνικό θάνατο που επάγεται από επιληπτικές κρίσεις

miRNA	Πειραματικό μοντέλο	Επίδραση ανταγωνιστή του miR-34a
miR-34a	SE (KA σε μύες)	Καμία
miR-34a	SE (πιλοκαρπίνη σε επίμυες)	Προστασία

4.4.2. Το miR-146a

Το πρώτο miRNA που μελετήθηκε στην επιληψία και βρέθηκε πως έχει άμεση σχέση με τη φλεγμονή ήταν το miR-146a [319]. Ο ρόλος του συνδέεται με την έκφραση των toll-like υποδοχέων (TLRs) και μονοπατιών των κυτταροκινών. Το miR-146a αποτελεί το microRNA που εμφανίζει τη μεγαλύτερη συνέπεια στην έκφρασή του σε υψηλά επίπεδα στην επιληψία. Αυτό που προέχει να διευκρινιστεί σε in vivo μελέτες είναι ο τρόπος εκμετάλλευσης των αυξανόμενων επιπέδων του miR-146, ώστε να δράσει προστατευτικά ή προληπτικά απέναντι στις επιληπτικές κρίσεις, ακόμα και να ανατρέψει την επιληψία.

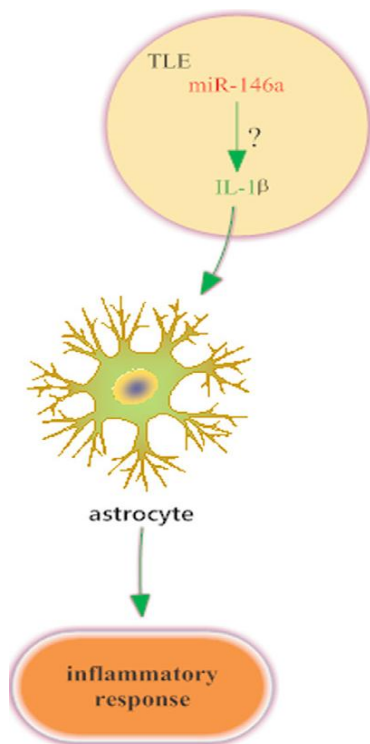
Είναι πλέον αναγνωρισμένο ότι η πλειοψηφία των σπονδυλωτών διαθέτει δύο αντίγραφα του γονιδίου που κωδικοποιεί το miR-146 και είναι τα miR-146a και miR-146b. Πρόκειται για δύο microRNAs, τα οποία προέρχονται από διαφορετικά γονίδια και εντοπίζονται στα χρωμοσώματα 5 και 10 αντίστοιχα. Η διαφορά μεταξύ τους έγκειται στην παρουσία 2 νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο τους στην ώριμη αλληλουχία. Και τα δύο είναι ευρύτερα γνωστά ως ρυθμιστές της ανοσολογικής απόκρισης [320].

Υπάρχει μεγάλη πιθανότητα το miR-146a να εμπλέκεται στην παθογένεια της επιληψίας του κροταφικού λοβού (TLE), καθώς πρόσφατα ευρήματα έδειξαν αυξημένη έκφρασή του σε πειραματικά μοντέλα για αυτόν τον τύπο επιληψίας. Οι πρώτοι που ανέφεραν διαφορά στο προφίλ έκφρασης του miR-146a ήταν το 2010, όταν ο Aronica και συν παρατήρησε αυξημένη έκφρασή του σε διάφορα στάδια της ασθένειας από πειράματα σε μύες, αλλά και σε ιστούς ανθρώπων. Μετά από SE, τα επίπεδα του εν λόγω miRNA ήταν αυξημένα στον ιππόκαμπο σε ανώριμους, αλλά και ενήλικους επίμους. Αυξημένα επίπεδα επίσης βρέθηκαν και στον ιππόκαμπο ενήλικων ατόμων και παιδιών με επιληψία κροταφικού λοβού (TLE) [319, 321]. Πιο συγκεκριμένα, η αυξημένη έκφραση παρατηρήθηκε στα νευρικά κύτταρα και τα αστροκύτταρα και όχι στα κύτταρα της μικρογλοίας, γεγονός που μαρτυρά την εξειδίκευση των κυτταρικών τύπων στους οποίους συναντάται το miR-146a. Αν και οι *in vivo* στόχοι του miR-146a στην επιληψία δεν είναι ακόμα γνωστοί, *in vitro* έχει φανεί ότι συμμετέχει στην καταστολή πρωτεϊνών που επάγουν τη φλεγμονή, όπως η TRAF6, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFκB και η κινάσες IRAK1 και IAK2 που σχετίζονται με τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης-1 [322].

Από την άλλη, σε μελέτη του Hu και της ομάδας του σε ιππόκαμπο επίμου μετά από χορήγηση λιθίου-πιλοκαρπίνης με επαγόμενη SE δεν παρατηρήθηκε διαφορά στο προφίλ έκφρασης του miR-146a. Μολαταύτα σε μελέτη του Omran και συν παρατηρήθηκε ότι η έκφραση της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-1β και της φλεγμονής που σχετίζεται με το miR-146a μπορεί να αλλάξει ανάλογα με το στάδιο της ασθένειας. Ειδικότερα βρέθηκε ότι σε λανθάνουσα περίοδο της TLE τα επίπεδα του miR-146a βρίσκονται στα υψηλότερα επίπεδα σε αντίθεση με τα επίπεδα έκφρασης της IL-1β, τα οποία βρίσκονται στο χαμηλότερο σημείο. Όταν η ασθένεια βρίσκεται σε οξεία φάση τα επίπεδα διαμορφώνονται ανάποδα, με την IL-β να εκφράζεται στο μεγαλύτερο βαθμό και το miR-146a στο μικρότερο. Αυτή η σαφής διαφορά στην έκφραση ενισχύει τα σενάρια ότι το miR-146a αποτελεί μόριο ρυθμιστή της φλεγμονώδους απόκρισης που οδηγείται από την ιντερλευκίνη-1β (Εικόνα 8). Ωστόσο, η άμεση σχέση μεταξύ των δύο μορίων δεν είναι ακόμα γνωστή.

Τα αποτελέσματα από τις μελέτες που περιγράφηκαν παραπάνω προτείνουν ότι ο άξονας IL-1-miR-146a θα μπορούσε να αποτελέσει νέο στόχο για

την αντιεπιληπτική θεραπεία [303]. Επιπλέον, υπερεκφρασμένο miR-146a σε νευρογλοιακά κύτταρα με βλάβη ασθενών με φαρμακοανθεκτική επιληψία αποτελούν απόδειξη για το ρόλο του στη ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης [322]. Ο αντιφλεγμονώδης ρόλος του miR-146a ενισχύεται από την ικανότητα που παρουσιάζει στη ρύθμιση της ιντερλευκίνης-1, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί άλλους προφλεγμονώδεις παράγοντες, όπως την ιντερλευκίνη-6, 8, τις χημειοκίνες IP-10 και MIP-1b, τον αυξητικό παράγοντα G-CSF, την ιντερφερόνη γ και τον TNF-α.



Εικόνα 8. Πιθανός ρόλος του miR-146a στην παθογένεια της επιληψίας κροταφικού λοβου (TLE) [303]

Η παρουσία γενετικών πολυμορφισμών ενός νουκλεοτιδίου (SNPs) σε θέσεις πρόσδεσης των microRNAs μπορεί να επιδρά στην έκφραση των miRNAs, καθιστώντας με αυτόν τον τρόπο ένα άτομο πιο ευπαθές μπροστά σε μία ποικιλία διαταραχών. Εντούτοις, μελέτη ελέγχου [323] που πραγματοποιήθηκε για πιθανή συσχέτιση ανάμεσα στο γενετικό πολυμορφισμό dbSNP rs2910164:G>C στη θέση πρόσδεσης του miR-146a και της επιληψίας του κροταφικού λοβού έδωσε τα εξής

αποτελέσματα: η παραλλαγή G>C οδηγεί σε αύξηση της ποσότητας του miR-146α και ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός δε συμβάλλει στην παρουσία αυτού του τύπου επιληψίας.

5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- TRI Reagent BD, Molecular Research Center, Inc, Cincinnati, OH, USA
- Χλωροφόρμιο, Scharlau Chemie S.A., Spain
- Ισοπροπανόλη, Scharlau Chemie S.A., Spain
- Αιθανόλη 75%, Scharlau Chemie S.A., Spain
- RSS (RNA Storage Solution), Ambion Inc, Carlsbad, CA, USA
- 5x First-Strand Buffer (250mM Tris-HCl (PH 8.3 , 25°C), 375 mM KCl και 15 mM MgCl₂), Invitrogen
- DTT (Dithio Threitol), Invitrogen
- RNaseOUT, Invitrogen
- M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase), Invitrogen Carlsbad, USA
- DNTPs set: dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Invitrogen
- Primers (In house design), Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany
- Probes (In house design), Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany
- Taq DNA polymerase, Kapa Biosystems, Wilmington, Massachusetts, USA
- MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate, Thermo Fisher Scientific Inc, USA
- Applied Biosystems MicroAmp Optical Adhesive Films, Thermo Fisher Scientific Inc, USA

5.2. ΟΡΓΑΝΑ

- Πιπέτες Gilson (Pipetman), Nichipet EXII (Nichiryo) και Witeg Germany
- Φυγόκεντρος MiniSpin (Eppendorf), μέγιστη ταχύτητα: 13400 rpm, μέγιστη ταχύτητα φυγοκέντρωσης: 12100 x g, χωρητικότητα: 12x1.5/2.0 ml
- MPS 1000 Mini PCR Plate Spinner (Labnet)
- Θερμοκυκλοποιητές
 - RT-PCR Eppendorf EP Gradient S
 - ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

5.3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Στην παρούσα ερευνητική εργασία χρησιμοποιήθηκαν ως βιολογικό υλικό 48 δείγματα ορού περιφερικού αίματος ασθενών με διαγνωσμένη επιληψία. Από το σύνολο των 48 ασθενών, 24 ασθενείς εμφανίζουν ανθεκτικότητα (resistant patients) στη φαρμακοθεραπεία που χορηγήθηκε για την επιληψία, ενώ οι υπόλοιποι 24 ασθενείς εμφάνισαν ανταπόκριση (non-resistant patients) στη φαρμακοθεραπεία επιλογής.

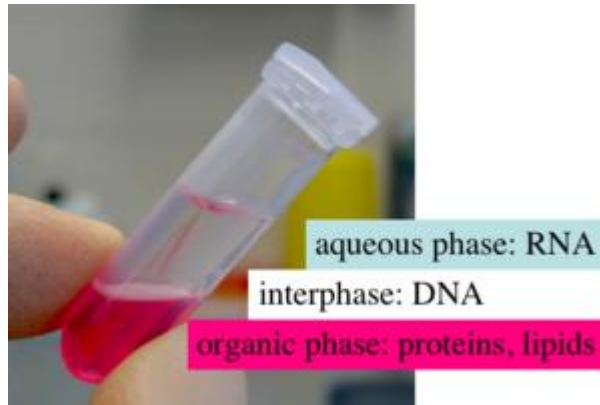
Τα δείγματα ορού περιφερικού αίματος μετά την παραλαβή τους από το νοσοκομείο αποθηκεύθηκαν άμεσα στους -80°C μέχρι τη στιγμή της ανάλυσής τους.

5.4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA

Το πρώτο βήμα της πειραματικής διαδικασίας είναι η απομόνωση του ολικού RNA από δείγματα ορού περιφερικού αίματος από επιληπτικούς ασθενείς και τους μάρτυρες. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε μέσω του αντιδραστηρίου TRI Reagent BD, το οποίο αποτελεί μία προσαρμογή της μεθόδου απομόνωσης ενός βήματος, όπως περιγράφηκε από τους Chomczynski και Sacchi [324]. Το αντιδραστήριο TRI Reagent BD είναι ένα μονοφασικό διάλυμα που συνδυάζει τη φαινόλη και την ισοθειοκυανική γουανιδίνη προκαλώντας την άμεση και αποτελεσματική αναστολή της δράσης των RNασών. Με αυτόν τον τρόπο διατηρείται η ακεραιότητα του RNA. Επίσης επιτρέπει την απομόνωση του ολικού RNA από ορό, πλάσμα ή ολικό αίμα [325].

Αρχικά, πραγματοποιείται απόψυξη των δειγμάτων ορού από τους -80°C . Από κάθε δείγμα ορού μεταφέρονται 100 μl σε αποστειρωμένο erpendorf των 2.0 ml, αφού πρώτα έχει προηγηθεί προσεκτική ανάδευσή του. Στη συνέχεια προστίθενται 5,0 μl cel-miR-39 20 nM σε κάθε δείγμα, το οποίο αποτελεί το ενδογενές μόριο αναφοράς της μεθόδου μας. Έπειτα προστίθενται 750 μl TRI Reagent BD σε κάθε δείγμα. Ακολουθεί έντονη ανάδευση για 10-20 sec και επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. Εν συνεχεία προστίθενται 200 μl χλωροφόρμιο σε κάθε δείγμα και ακολουθεί έντονη ανάδευση με το χέρι για 15 sec. Τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10

min, για να ακολουθήσει η φυγοκέντρησή τους σε 13.300 rpm για 15 min στους 4°C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης αφαιρείται πολύ προσεκτικά η υδατική φάση και μεταφέρεται σε νέο αποστειρωμένο erpendorf των 2.0 ml για κάθε δείγμα (Εικόνα 9). Στη συνέχεια προστίθενται 2,0 ml γλυκογόνο σε κάθε δείγμα και ακολουθεί πολύ ήπια ανάδευση με το χέρι (1-2 φορές). Έπειτα προστίθενται 500 μl ισοπροπανόλης σε κάθε δείγμα και πραγματοποιείται έντονη ανάδευση για 10 sec. Τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min και ακολουθεί φυγοκέντρησή τους σε 13.300 rpm για 8 min στους 4°C, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την καταβύθιση του RNA και τη δημιουργία ιζήματος λευκού χρώματος. Στο σημείο αυτό αφαιρείται με προσοχή το υπερκείμενο και προστίθεται 1.0 ml αιθανόλης 75% v/v σε κάθε δείγμα. Ακολουθεί ήπια ανάδευση των δειγμάτων για 5 δευτερόλεπτα και εν συνεχεία φυγοκέντρησή τους σε 13.300 rpm για 7 min στους 4°C. Μετά τη φυγοκέντρωση το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα από κάθε δείγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για την εξάτμιση της αιθανόλης. Τελικά πραγματοποιείται διαλυτοποίηση του ιζήματος για κάθε δείγμα σε 6.0 ml RNA Storage Solution, RSS (διάλυμα κιτρικού νατρίου 1.0 Mm με pH 6.4) και αποθήκευση των δειγμάτων στους -80°C.



Εικόνα 9. Ο διαχωρισμός του μίγματος μετά τη φυγοκέντρωση. Διακρίνονται οι 3 φάσεις που δημιουργούνται: υδατική φάση (RNA), μεσόφαση (DNA), οργανική φάση (πρωτεΐνες και λιπίδια)

Λόγω της μικρής συγκέντρωσης του ολικού RNA δεν είναι δυνατός ο προσδιορισμός της καθαρότητας και της συγκέντρωσης μέσω φασματοφωτομετρικού ελέγχου ή/και ηλεκτροφόρησης. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η ίδια και για τις δύο ομάδες ασθενών με επιληψία (ανθεκτικοί και μη ανθεκτικοί στη φαρμακοθεραπεία).

5.5. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ (REVERSE TRANSCRIPTION / RT)

5.5.1. Αρχή μεθόδου

Η αντίστροφη μεταγραφή είναι μία μέθοδος κατά την οποία το RNA μεταγράφεται *in vitro* σε συμπληρωματικό DNA (complementary DNA/cDNA) με τη βοήθεια του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase). Το cDNA χρησιμοποιείται στη συνέχεια ως υπόστρωμα για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Η αντίστροφη μεταγραφάση, με την βοήθεια κατάλληλου εκκινητή, χρησιμοποιεί το RNA ως εκμαγείο για τη μεταγραφή του RNA σε cDNA. Το ένζυμο αυτό είναι μία RNA εξαρτώμενη DNA πολυμεράση, η οποία προέρχεται από κάποιο RNA ιό και έχει την ικανότητα να μετατρέπει το γενετικό υλικό του ιού από τη μορφή του μονόκλωνου RNA σε δίκλωνο DNA, ώστε να μπορεί να ενσωματωθεί στο γενετικό υλικό των κυττάρων ξενιστών. Οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενες αντίστροφες μεταγραφάσες είναι η Avian Myeloblastosis Virus (AMV) αντίστροφη μεταγραφάση και η Moloney Murine Leukemia Virus αντίστροφη μεταγραφάση (M-MuLV, MMLV). Η MMLV δεν παρουσιάζει δραστηριότητα 3'→5' εξωνουκλεάσης [326].

Η επιλογή του κατάλληλου εκκινητή για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής (RT primer) είναι ιδιαίτερα σημαντική. Υπάρχουν τρία είδη εκκινητών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αντίστροφη μεταγραφή RNA μορίων: a) ολιγονουκλεοτίδια δεοξυθυμίνης (oligo-dTs), b) τυχαία ολιγομερή (random oligomers), όπως εξαμερή (hexamers) ή οκταμερή (octamers) και c) ειδικοί για την αλληλουχία εκκινητές (sequence specific primers).

Στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται ως εκκινητές ολιγονουκλεοτίδια δεοξυθυμίνης (oligo-dTs), επιτρέπεται η αντίστροφη μεταγραφή των mRNA και γενικότερα RNA μορίων με poly-A ουρά. Τα τυχαία ολιγομερή (random oligomers) συνδέονται χωρίς καμία ειδικότητα σε διάφορα σημεία κατά μήκος του RNA μορίου υποστρώματος. Υβριδοποιούνται στο συνολικό RNA πληθυσμό συμπεριλαμβανομένου των tRNA, rRNA και snRNA. Τέλος, οι ειδικοί για την αλληλουχία εκκινητές (sequence specific primers) είναι ειδικά σχεδιασμένοι

εκκινητές, οι οποίοι υβριδοποιούνται σε συγκεκριμένη αλληλουχία των RNA υποστρωμάτων-στόχων αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία της μεθόδου [327, 328].

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί για τα miRNA-στόχους stem-loop εκκινητές (miRNA-specific primers) τα χαρακτηριστικά των οποίων παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 4. Αλληλουχία miRNA-specific stem-loop RT εκκινητών

Όνομα	Αλληλουχία (5' – 3')
cel-miR-39_stem-loop RT	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCA AGCTGA
miR-34a-5p_stem-loop RT	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGACAA CCAG
miR-146a-5p_stem-loop RT	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAACC CATG

5.5.2. Πειραματική διαδικασία

Η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής των miRNAs πραγματοποιείται σε δύο φάσεις.

Το αρχικό μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 2,0 μl του ολικού RNA, 200 nM κάθε ενός εκ των τριών ανώτερων miRNA-specific stem-loop RT εκκινητών και DEPC-H₂O μέχρι τελικό όγκο 6,0 μL και επωάζεται 70°C για 5 min. Με την επώαση αυτή επιτυγχάνεται η αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών του RNA.

Στη συνέχεια προστίθενται 50 U αντίστροφης μεταγραφάσης M-MLV, 10 U αναστολέα RNAsών RNaseOUT, 2,0 μl 5x First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl και 15 mM MgCl₂), 1,0 μl DTT, 0,5 μl από 10 μM μείγματος dNTPs (10 μM από κάθε dATP, dGTP, dCTP και dTTP) και κατάλληλος όγκος DEPC-H₂O μέχρι τελικό όγκο 10 μL. Το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο της αντίδραση περιλαμβάνει επώση στους 16°C για 30 min και στους 42°C για 30 min, με τελικά απενεργοποίηση του ενζύμου στους 85°C για 5 min. Τα cDNAs που προκύπτουν φυλάσσονται στους -20°C μέχρι την ανάλυσή τους.

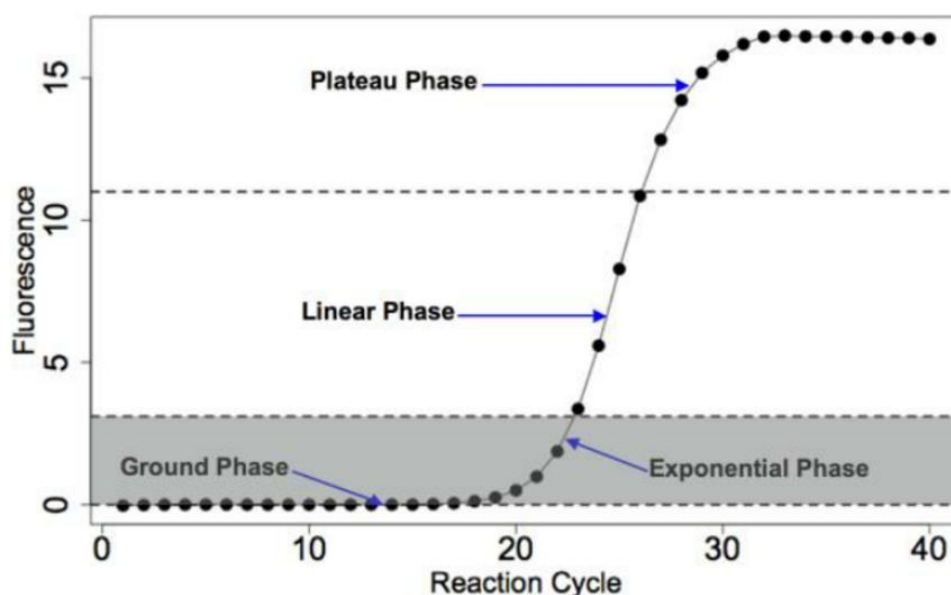
5.6. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL – TIME PCR)

5.6.1. Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real – Time PCR) γνωστή επίσης ως ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (quantitative PCR, qPCR) αποτελεί μία από τις πιο δυναμικές και ευαίσθητες τεχνικές ανάλυσης της Μοριακής Βιολογίας. Χρησιμοποιείται σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών όπως ο ποσοτικός προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης, η γονοτύπηση, η ανάλυση miRNAs, η ταυτοποίηση SNPs, η ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών και η αποτελεσματικότητα της θεραπευτικής αγωγής. Όπως συνεπάγεται από την ονομασία της, η μέθοδος αυτή δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας της ενίσχυσης ενός στοχευμένου μορίου DNA σε πραγματικό χρόνο και όχι μετά το τέλος της αντίδρασης, όπως συμβαίνει στη συμβατική PCR τελικού σημείου [329].

Η real – time PCR αποτελεί την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο ποσοτικοποίησης της γονιδιακής έκφρασης. Συγχρόνως επιτρέπει την ανίχνευση των προϊόντων ενίσχυσης χωρίς περαιτέρω επεξεργασία (ηλεκτροφόρηση). Χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη ευκολία, ακρίβεια και αυτοματοποίηση. Η ανίχνευση των προϊόντων ενίσχυσης γίνεται παρουσία χρωστικών ή φθορίζοντων ανιχνευτών [329, 330]. Η αντίδραση της real – time PCR πραγματοποιείται σε ένα θερμοκυκλοποιητή, ο οποίος έχει την ικανότητα να ανιχνεύει το φθορισμό που εκπέμπεται από το διεργεργμένο φθορισμογόνο, καθώς αυτές ενσωματώνονται στα προϊόντα της PCR. Ο θερμοκυκλοποιητής έχει την ικανότητα να θερμαίνει και να ψύχει τα δείγματα χρησιμοποιώντας τις φυσικοχημικές ιδιότητες των νουκλεϊκών οξέων και της DNA πολυμεράσης. Η μέθοδος της real-time PCR αποτελείται από μία σειρά από θερμοκρασιακούς κύκλους που επαναλαμβάνονται 25-50 φορές. Οι θερμοκρασιακοί αυτοί κύκλοι αποτελούνται από 2 στάδια: το 1^ο στάδιο, περίπου στους 95°C, όπου γίνεται ο διαχωρισμός του δίκλωνου DNA και ένα 2^ο στάδιο σε θερμοκρασία 60°C, όπου γίνεται η πρόσδεση των PCR εκκινητών στο μόριο-στόχο, καθώς και η ταυτόχρονη ενίσχυση του υποστρώματος από την DNA πολυμεράση [331].

Η ενίσχυση (πολλαπλασιασμός) των προϊόντων της real – time PCR χαρακτηρίζεται από 4 φάσεις: τη γραμμική φάση, την πρώιμη εκθετική φάση, την εκθετική φάση και τη φάση πλατώ [332] (Εικόνα 10). Κατά τη διάρκεια της γραμμικής φάσης γνωστή ως φάση υποβάθρου (baseline ή background phase), που συνήθως είναι οι 10-15 πρώτοι κύκλοι, η αντίδραση μόλις έχει ξεκινήσει και η εκπομπή σήματος φθορισμού δεν έχει ξεπεράσει ακόμα το φθορισμό υποβάθρου. Στην πρώιμη εκθετική φάση η ένταση του φθορισμού έχει φτάσει ένα κατώφλι όπου είναι σημαντικά υψηλότερο από τα επίπεδα υποβάθρου. Ο κύκλος της αντίδρασης όπου ο ειδικός φθορισμός της αντίδρασης από την ενίσχυση των προϊόντων αυτής ξεπερνά το σήμα του υποβάθρου ονομάζεται κύκλος κατωφλίου ή Ct (cycle threshold) [333, 334]. Αυτή η τιμή αντικατοπτρίζει τον αριθμό αντιγράφων-στόχων στο αρχικό δείγμα και χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό των δειγμάτων ελέγχου [333]. Κατά την εκθετική φάση, η real – time PCR φθάνει στη βέλτιστη απόδοση ενίσχυσης με το PCR προϊόν να διπλασιάζεται μετά από κάθε κύκλο σε ιδανικές συνθήκες αντίδρασης. Τέλος, η αντίδραση φθάνει στη φάση πλατώ όταν τα συστατικά της αντίδρασης εξαντλούνται [335]. Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του DNA στο αρχικό δείγμα τόσο νωρίτερα θα εμφανιστεί μία σημαντική αύξηση στο σήμα φθορισμού, με αποτέλεσμα ένα μικρότερο Ct [333, 336]



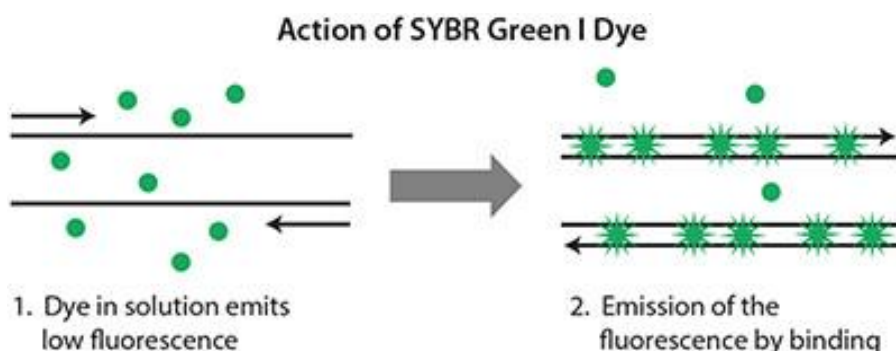
Εικόνα 10. Οι φάσεις της real – time PCR [337]

5.6.2. Συστήματα ανίχνευσης στη real – time PCR

Για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των προϊόντων της real – time PCR χρησιμοποιούνται συστήματα ανίχνευσης φθορισμού, τα οποία διακρίνονται σε μη ειδικά και ειδικά. Τα μη ειδικά συστήματα περιλαμβάνουν φθορίζοντα μόρια ιχνηθετών που προσδένονται μη ειδικά στη διπλή έλικα του DNA και ανιχνεύουν όλα τα δίκλινα μόρια που ενισχύονται κατά την αντίδραση, ενώ στα ειδικά συστήματα ανίχνευσης φθορισμού επιτυγχάνεται διαχωρισμός μεταξύ των μη ειδικά ενισχυμένων προϊόντων και της επιθυμητής αλληλουχίας του προϊόντος της PCR.

❖ Μη ειδικές φθορίζουσες χρωστικές

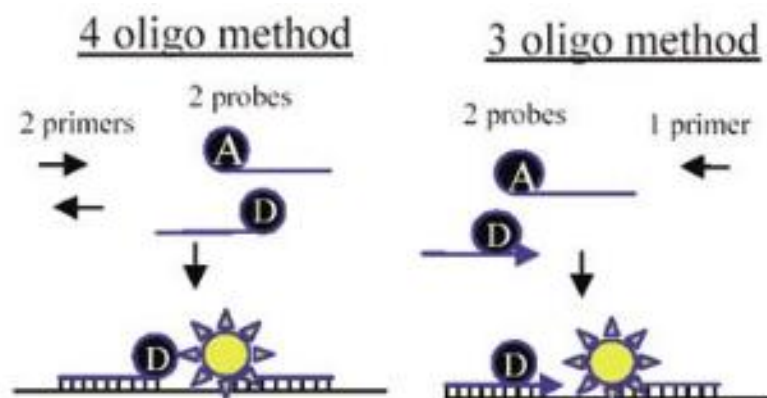
Οι μη ειδικές φθορίζουσες χρωστικές εκπέμπουν φθορισμό όταν προσδεθούν σε δίκλινο DNA. Καθώς το δίκλινο προϊόν PCR συσσωρεύεται κατά τη διάρκεια των κύκλων ολοένα και περισσότερη χρωστική μπορεί να προσδεθεί και να εκπέμπει φθορισμό. Με αυτόν τον τρόπο η ένταση του φθορισμού αυξάνεται αναλογικά με τη συγκέντρωση των PCR προϊόντων [338]. Η τεχνική αυτή είναι πολύ ευέλικτη, γιατί μία χρωστική μπορεί να χρησιμοποιηθεί για δοκιμασίες σε διαφορετικά γονίδια. Επειδή οι χρωστικές αυτές δεν προσδένονται σε μία αλληλουχία με ειδικό τρόπο, αυτές οι δοκιμασίες είναι επιρρεπείς σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα [339]. Γι' αυτό το λόγο ακολουθεί συνήθως ανάλυση της καμπύλης αποδιάταξης των προϊόντων της αντίδρασης όπου η ενίσχυση των επιθυμητών PCR προϊόντων διακρίνεται από την ενίσχυση μη-ειδικών προϊόντων και διμερών εκκινητών με μελέτη των κορυφών των καμπυλών τήξης [340]. Υπάρχει μία μεγάλη ποικιλία χρωστικών που προσδένονται στο dsDNA, όπως η SYBR Green I, η SYBR Gold, η Eva Green, η SYTO κ.ά. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη χρωστική είναι η SYBR Green I, η οποία αποτελεί μία ασύμμετρη χρωστική κυανίνης που διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497 nm και εκπέμπει στα 520 nm. Η SYBR Green I όταν βρίσκεται ελεύθερη σε διάλυμα δε φθορίζει [341].



Εικόνα 11. Δράση της SYBR Green I όταν προσδένεται στο δίκλωνο DNA [342]

❖ Ιχνηθέτες υβριδοποίησης

Οι ιχνηθέτες υβριδοποίησης μπορούν να χρησιμοποιήσουν τέσσερα ή τρία ολιγονουκλεοτίδια. Η μέθοδος των τεσσάρων ολιγονουκλεοτιδίων αποτελείται από δύο PCR εκκινητές και δύο ιχνηθέτες ειδικούς για την αλληλουχία (ανωρροϊκός και κατωρροϊκός), οι οποίοι προσδένονται ο ένας δίπλα στον άλλον με μία διάταξη κεφαλής-ουράς. Ο ανωρροϊκός ιχνηθέτης είναι σημασμένος με μία χρωστική δέκτη στο 3' άκρο, ενώ ο κατωρροϊκός ιχνηθέτης είναι σημασμένος με μία χρωστική δότη στο 5' άκρο επιτρέποντας στα φθορισμοφόρα μόρια του δότη και του δέκτη να υπόκεινται μία αύξηση μεταφοράς ενέργειας φθορισμού (φαινόμενο FRET, Fluorescence Resonance Energy Transfer) όταν προσδεθούν [343, 344]. Η μέθοδος των τριών ολιγονουκλεοτιδίων είναι παρόμοια με εκείνη των τεσσάρων ολιγονουκλεοτιδίων με εξαίρεση ότι ο ανωρροϊκός PCR εκκινητής είναι σημασμένος με μία χρωστική δέκτη στο 3' άκρο και έτσι αντικαθιστά τη λειτουργία του ενός ιχνηθέτη από αυτούς στη μέθοδο των τεσσάρων ολιγονουκλεοτιδίων. Και στις δύο περιπτώσεις ο κατωρροϊκός ιχνηθέτης μπορεί να σχεδιαστεί, ώστε να καλύπτει κάποιο σημείο μετάλλαξης και να διακρίνει γνωστά αλληλόμορφα, ενώ ταυτόχρονα να μπορεί να ανιχνεύει και νέα [345]. Τα αλληλόμορφα ταυτοποιούνται και διαφοροποιούνται μέσω της καμπύλης αποδιάταξης [343].



Εικόνα 12. Διαγραμματική απεικόνιση της δράσης των ιχνηθετών υβριδοποίησης [336]

❖ Ανιχνευτές υδρόλυσης

Οι ιχνηθέτες υδρόλυσης, χαρακτηριστικό παράδειγμα των οποίων αποτελούν οι TaqMan ανιχνευτές (TaqMan probes), εκπέμπουν φθορισμό κατά την υδρόλυση τους, για να ανιχνεύσουν τη συσσώρευση του προϊόντος της PCR. Ο ειδικός για την αλληλουχία ανιχνευτής είναι σημασμένος με μία χρωστική αναφοράς στο 5' άκρο και μία χρωστική απόσβεσης στο 3' άκρο, που επιτρέπει στον αποσβέστη να μειώνει την ένταση φθορισμού της χρωστικής αναφοράς μέσω του φαινομένου FRET όταν ο ιχνηθέτης είναι ανέπαφος [346, 347].

Παρόλο που οι ανιχνευτές υδρόλυσης και οι ιχνηθέτες υβριδοποίησης βασίζονται στο φαινόμενο FRET, για να αλλάξουν την ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού, η μεταφορά ενέργειας δουλεύει με διαφορετικό τρόπο σε αυτές τις δύο χημείες. Το φαινόμενο FRET μειώνει την ένταση φθορισμού στους ιχνηθέτες υδρόλυσης και αυξάνει την ένταση στους ιχνηθέτες υβριδοποίησης. Όταν ενωθεί με την συμπληρωματική αλληλουχία-στόχο ο προσδεδμεμένος ανιχνευτής θα αποικοδομηθεί από την 5'→3' ενεργότητα εξωνουκλεάσης της DNA πολυμεράσης κατά το στάδιο επιμήκυνσης της PCR. Η αποικοδόμηση του ιχνηθέτη επιτρέπει το διαχωρισμό της χρωστικής αναφοράς από τη χρωστική του αποσβέστη με αποτέλεσμα την εκπομπή φθορισμού [347, 348].

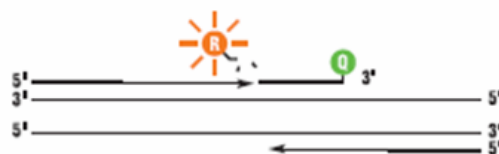
1. Polymerization: A fluorescent reporter (R) dye and a quencher (Q) are attached to the 5' and 3' ends of a TaqMan[®] probe, respectively.



2. Strand displacement: When the probe is intact, the reporter dye emission is quenched.



3. Cleavage: During each extension cycle, the DNA polymerase cleaves the reporter dye from the probe.



4. Polymerization completed: Once separated from the quencher, the reporter dye emits its characteristic fluorescence.

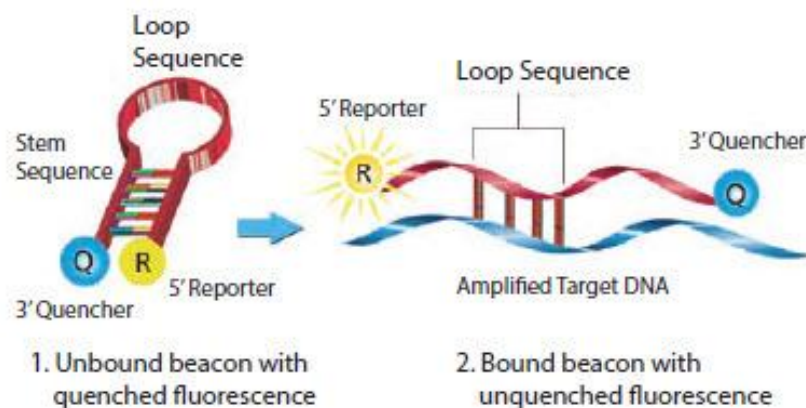


Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση της δράσης των ιχνηθετών TaqMan στη real-time PCR [349]

❖ Μοριακοί φάροι

Οι μοριακοί φάροι (molecular beacons) είναι η πιο απλή κατηγορία ανιχνευτών με δομή φουρκέτας [350]. Αποτελούνται από μία περιοχή ειδική για μία αλληλουχία (περιοχή βρόχου), η οποία πλαισιώνεται από δύο ανεστραμμένες αλληλουχίες επαναλήψεις (Εικόνα 14). Οι χρωστικές αναφοράς και απόσβεσης είναι προσκολλημένες σε κάθε άκρο του μορίου μειώνοντας την εκπομπή φθορισμού μέσω απόσβεσης εξαιτίας στενής επαφής τους (φαινόμενο FRET), όταν ο φάρος βρίσκεται ελεύθερος σε διάλυμα. Όταν ο μοριακός φάρος προσδεθεί στην αλληλουχία-στόχο ο αποσβέστης και η χρωστική αναφοράς διαχωρίζονται επιτρέποντας από τη χρωστική αναφοράς την εκπομπή φθορισμού. Οι ανιχνευτές με δομή φουρκέτας τείνουν να παρουσιάζουν μεγαλύτερη ειδικότητα από τους

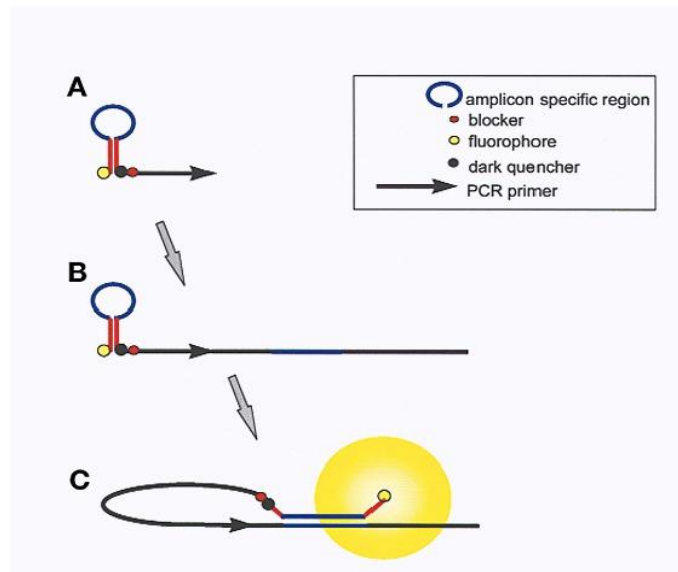
γραμμικούς ανιχνευτές, καθώς το σύμπλοκο ιχνηθέτη-στόχου πρέπει να είναι θερμοδυναμικά πιο σταθερό από την ίδια τη δομή φουρκέτας [351].



Εικόνα 14. Σχεδιάγραμμα απεικόνισης της δομής και λειτουργίας των μοριακών φάρων [342]

❖ Ιχνηθέτες τύπου σκορπιού

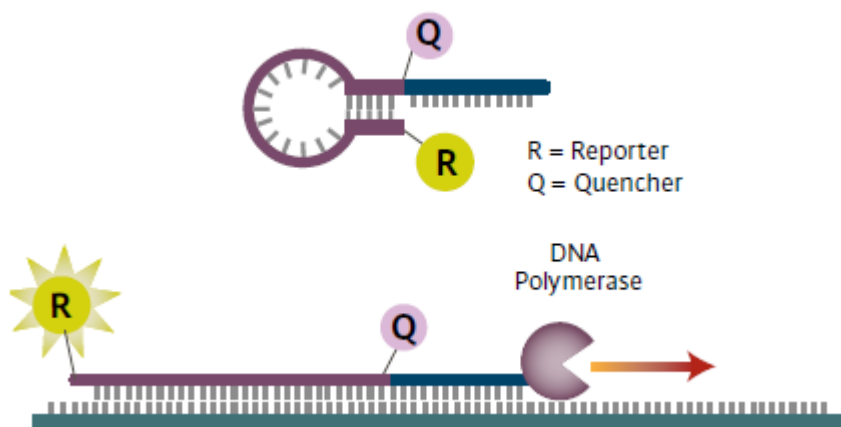
Οι ιχνηθέτες τύπου σκορπιού συνδυάζουν τον ειδικό ανιχνευτή με τον ανωρροϊκό PCR εκκινητή και αποτελούνται από ένα φθορισμοφόρο στο 5' άκρο, που ακολουθείται από μία δομή φουρκέτας από συμπληρωματικές αλληλουχίες, μία ειδική αλληλουχία του ιχνηθέτη που περιέχεται στη δομή φουρκέτας, μία χρωστική απόσβεσης, έναν αναστολέα της DNA πολυμεράσης και έναν εκκινητή PCR στο 3' άκρο [352]. Η αλληλουχία του ανιχνευτή που περιέχεται στη δομή φουρκέτας επιτρέπει στο σκορπιό να υβριδοποιηθεί στο υπόστρωμα-στόχο, γεγονός που διαχωρίζει τον αποσβέστη από το φθορισμοφόρο και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Η παρουσία του αναστολέα είναι σημαντική, γιατί διαφορετικά θα επιτρεπόταν η μη ειδική αποδιάταξη της δομής φουρκέτας και συνεπώς η παραγωγή μη ειδικών προϊόντων. Οι ιχνηθέτες τύπου σκορπιού χαρακτηρίζονται από ειδικότητα στη διάκριση αλληλομόρφων και μπορεί να χρησιμοποιούνται σε αντιδράσεις πολλαπλής PCR [353].



Εικόνα 15. Σχηματική απεικόνιση της δράσης των ιχνηθετών τύπου σκορπιού [352]

❖ Sunrise εκκινήτες

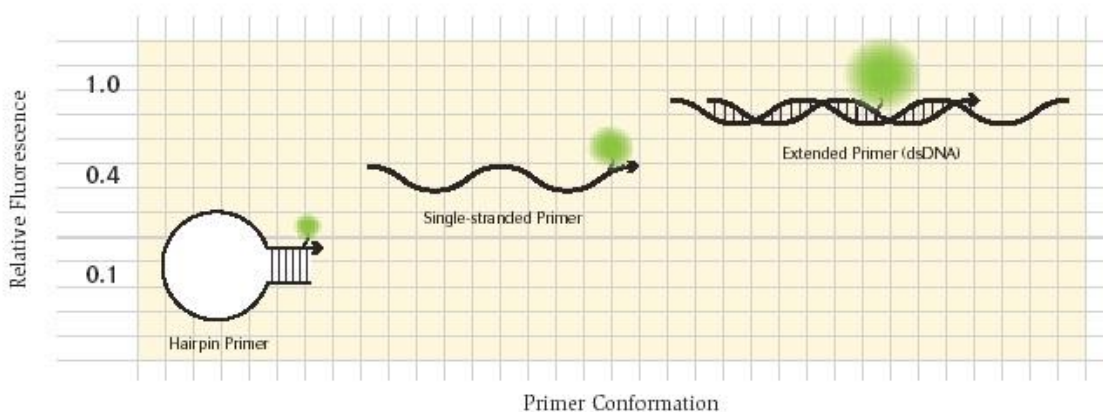
Οι εκκινήτες sunrise είναι παρόμοιοι με τους ιχνηθέτες μοριακούς φάρους, καθώς συνδυάζουν και τον εκκινήτη της PCR και το μηχανισμό ανίχνευσης στο ίδιο μόριο [354]. Αυτοί οι ιχνηθέτες αποτελούνται από ένα διπλά σημασμένο (χρωστικές αναφοράς και απόσβεσης) βρόχο από δομή φουρκέτας στο 5' άκρο, ενώ το 3' άκρο υποδύεται τον εκκινήτη της PCR. Όταν είναι ελεύθεροι η δομή φουρκέτας είναι ανέπαφη προκαλώντας στη χρωστική αναφοράς απόσβεση μέσω FRET. Μετά την ένταξη στο νεοσχηματισμένο προϊόν PCR τα μόρια αναφοράς και απόσβεσης είναι αρκετά μακριά, ώστε να παράγεται φθορισμός.



Εικόνα 16. Σχηματική απεικόνιση της δράσης των sunrise εκκινήτων [355]

❖ LUX fluorogenic primers

Οι LUX (Light Upon Extention) εκκινητές είναι ιχνηθέτες σημασμένοι με ένα φθορισμοφόρο μόριο, λειτουργούν με αυτό-απόσβεση και είναι σχεδόν ταυτόσημοι με τους εκκινητές sunrise. Ωστόσο, αντί να χρησιμοποιούν μία χρωστική απόσβεσης, η δευτεροταγής δομή στο 3' άκρο μειώνει το φθορισμό στην ελάχιστη ποσότητα [356]. Επειδή αυτή η χημεία ανίχνευσης δεν απαιτεί χρωστική απόσβεσης, είναι πολύ πιο οικονομική από τους διπλά σημασμένους ιχνηθέτες. Καθώς το σύστημα αυτό βασίζεται σε δύο μόνο ολιγονουκλεοτίδια η καμπύλη αποδιάταξης δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση μη ειδικών προϊόντων ενίσχυσης όπως σε άλλα συστήματα. Για να εξασφαλισθεί η παρουσία έστω και ενός μόνο προϊόντος PCR θα χρησιμοποιηθεί πήκτωμα αγαρόζης.



Εικόνα 17. Διαγραμματική απεικόνιση της λειτουργίας των LUX εκκινητών [357]

5.6.3. Real – Time PCR για cel-miR-39

Το cel-miR-39 λειτουργεί στην αντίδραση ως ενδογενής μάρτυρας (control) στην έκφραση των hsa-miR-34a και hsa-miR-146a. Η αλληλουχία και τα χαρακτηριστικά των qPCR εκκινητών και TaqMan MGB-probe που χρησιμοποιήθηκαν για το cel-miR-39 παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5. Η αλληλουχία και τα χαρακτηριστικά των qPCR εκκινήτων και MGB-probe για το cel-miR-39

Όνομα	Αλληλουχία (5' – 3')	Μήκος (bases)	T _m (°C)	GC (%)
cel-miR-39 F	ACACTCCAGCTGGGTCACCGGGTGTAATC	30	74,4	57
Universal R	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGC	24	70	63
PCR amplicon (bp)				
cel-miR-39 MGB probe (FAM-MGB)	TTCAGTTGAGAACCCATG			

Το μίγμα της αντίδρασης για την ενίσχυση του spiked cel-miR-39 αποτελείται από 5,0 μl 2X TaqMan mix (Καρα), 250 nM του cel-miR-39 F, 100 nM του universal R εκκινήτη, 62,5 nM του cel-miR-39 MGB-probe, 0,5 μl cDNA και συμπληρώνεται με DEPC-H₂O μέχρι 10 μl. Το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο της αντίδρασης περιλαμβάνει ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του υποστρώματος και ενεργοποίησης του ενζύμου στους 95 °C για 10 min, το οποίο ακολουθείται από 45 κύκλους αποτελούμενοι από στάδιο αποδιάταξης στους 95 °C για 15 sec και το στάδιο υβριδοποίησης/ενίσχυσης στους 60 °C για 60 sec. Η αντίδραση πραγματοποιείται στον 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Κάθε δείγμα ελέγχεται εις διπλούν (duplicate reaction).

5.6.4. Real – Time PCR για miR-34a

Για το hsa-miR-34a χρησιμοποιήθηκαν συνολικά δύο F εκκινητές, ο miR-34a F και ο miR-34a F' εκκινητής στα πλαίσια της διερεύνησης βελτιωμένης έκφρασης του συγκεκριμένου microRNA. Η αλληλουχία και τα χαρακτηριστικά των qPCR εκκινητών και TaqMan MGB-probe που χρησιμοποιήθηκαν για το hsa-miR-34a παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6. Η αλληλουχία και τα χαρακτηριστικά των qPCR εκκινητών και TaqMan MGB-probe για το miR-34a

Όνομα	Αλληλουχία (5' – 3')	Μήκος (bases)	Tm (°C)	GC (%)
hsa-miR-34a F1	ACACTCCAGCTGGGTGGCAGTGTCTTAGCT	30	72,2	57
hsa-miR-34a F2	ACACTCCAGCTGGGTGGCAGTGTCTTAGCTGG	32	76,7	59
Universal R	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGC	24	70	63
PCR amplicon (bp)				
hsa-miR-34a MGB probe (FAM-MGB)	TTCAGTTGAGACAACCAG			

Το μίγμα της αντίδρασης για την ενίσχυση του hsa-miR-34a αποτελείται από 5,0 μl 2X TaqMan mix (Kapa), 250 nM του hsa-miR-34a F, 100 nM του universal R εκκινητή, 62,5 nM του hsa-miR-34a MGB-probe, 0,5 μl cDNA και συμπληρώνεται με DEPC-H₂O μέχρι 10 μl. Το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο της αντίδρασης περιλαμβάνει ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του υποστρώματος και ενεργοποίησης του ενζύμου στους 95 °C για 10 min, το οποίο ακολουθείται από 45 κύκλους αποτελούμενοι από στάδιο αποδιάταξης στους 95 °C για 15 sec και το στάδιο υβριδοποίησης/ενίσχυσης στους 60 °C για 60 sec. Η αντίδραση πραγματοποιείται στον 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Κάθε δείγμα ελέγχεται εις διπλούν (duplicate reaction).

5.6.5. Real – Time PCR για miR-146a

Η αλληλουχία και τα χαρακτηριστικά των qPCR εκκινητών και TaqMan MGB-probe που χρησιμοποιήθηκαν για το hsa-miR-146a παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 7. Η αλληλουχία και τα χαρακτηριστικά των qPCR εκκινητών και TaqMan MGB-probe για το miR-146a

Όνομα	Αλληλουχία (5' – 3')	Μήκος (bases)	T _m (°C)	GC (%)
hsa-miR-146a F	ACACTCCAGCTGGGTGAGAACTGAATTCCA	30	72,4	50
Universal R	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGC	24	70	63
PCR amplicon (bp)				
hsa-miR-146a MGB probe (FAM-MGB)	TTCAGTTGAGAACCCATG			

Το μίγμα της αντίδρασης για την ενίσχυση του hsa-miR-146a αποτελείται από 5,0 μl 2X TaqMan mix (Kapa), 250 nM του hsa-miR-146a F, 100 nM του universal R εκκινητή, 62,5 nM του hsa-miR-146a MGB-probe, 0,5 μl cDNA και συμπληρώνεται με DEPC-H₂O μέχρι 10 μl. Το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο της αντίδρασης περιλαμβάνει ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του υποστρώματος και ενεργοποίησης του ενζύμου στους 95 °C για 10 min, το οποίο ακολουθείται από 45 κύκλους αποτελούμενοι από στάδιο αποδιάταξης στους 95 °C για 15 sec και το στάδιο υβριδοποίησης/ενίσχυσης στους 60 °C για 60 sec. Η αντίδραση πραγματοποιείται στον 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Κάθε δείγμα ελέγχεται εις διπλούν (duplicate reaction).

5.7. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ miRNAs ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΧΕΤΙΚΗΣ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ $2^{-\Delta\Delta CT}$

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων και miRNAs με την μέθοδο σύγκρισης των C_T , $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Comperative C_T method, $2^{-\Delta\Delta CT}$).

Για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των *hsa-miR-34a* και *hsa-miR-146a* μορίων στόχων, η καρκινική κυτταρική σειρά προστάτη DU145 χρησιμοποιήθηκε ως βαθμονομητής, ενώ ως μόριο αναφοράς, για την κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης, το *cel-miR-39*. Κατά συνέπεια, οι μονάδες σχετικής ποσοτικοποίησης (Relative Quantification units/RQ units) για τα υπό εξέταση δείγματα, οι οποίες αποτελούν την τελική τιμή, εκφρασμένη σε αυθαίρετες μονάδες, των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη miRNAs και οι οποίες χρησιμοποιούνται στη στατιστική ανάλυση, προκύπτουν από τον τύπο:

$$RQ \text{ units, δείγματος} = 2^{-\Delta\Delta C_T},$$

όπου $\Delta\Delta C_T$:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T, \text{δείγματος} - \Delta C_T, \text{DU145} = (C_T^{miRNA \text{ μελέτης}} - C_T^{cel-miR-39}), \text{δείγματος} - (C_T^{miRNA \text{ μελέτης}} - C_T^{cel-miR-39}), \text{DU145},$$

miRNA μελέτης: *hsa-miR-34a* και *hsa-miR-146a*

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 24 δείγματα ορού ασθενών με φαρμακοανθεκτική επιληψία και 24 δείγματα ορού ασθενών που δεν εμφανίζουν φαρμακοανθεκτική επιληψία. Επίσης, στο πλαίσιο της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν για τους σκοπούς της ανάπτυξης και βελτιστοποίησης των μεθοδολογιών ποσοτικού προσδιορισμού miRNAs στον ορό μέσω real - time PCR οι ακόλουθες κυτταρικές σειρές: α. DU145, κυτταρική σειρά καρκίνου του προστάτη, β. BT-20, κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού, γ. AGS, κυτταρική σειρά καρκίνου του στομάχου και δ. DLD-1, κυτταρική σειρά καρκίνου του παχέος

εντέρου. Στα ανώτερα δείγματα πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικού RNA του ορού μέσω του αντιδραστηρίου TRI Reagent BD, το οποίο αποτελεί μία προσαρμογή της μεθόδου Chomczynski - Sacchi και εκχύλιση με τη βοήθεια χλωροφορμίου - ισοπροπανόλης.

6.1. Εκτίμηση της ποιότητας και της συγκέντρωσης του απομονωμένου ολικού RNA

Η εκτίμηση της ποιότητας και της συγκέντρωσης του απομονωμένου ολικού RNA επιχειρήθηκε φασματοφωτομετρικά. Κατά την φασματοφωτομετρική ανάλυση, ο λόγος των απορροφήσεων του ολικού RNA στα 260nm και 280nm (A_{260}/A_{280}) αποτελεί το μέτρο της καθαρότητας του ολικού RNA από την παρουσία γενωμικού DNA και πρωτεϊνών. Λόγοι A_{260}/A_{280} μεταξύ 1,6 - 2,0 δηλώνουν την απομόνωση ολικού RNA ελεύθερου DNA και πρωτεϊνών. Αντίθετα, λόγοι $A_{260}/A_{280} < 1,6$ ή $> 2,0$ δηλώνουν την παρουσία σημαντικής ποσότητας πρωτεϊνών ή DNA αντίστοιχα και κατ' επέκταση την όχι καλή ποιότητα του απομονωμένου RNA.

Η φασματοφωτομετρική ανάλυση επιχειρήθηκε στα πρώτα δέκα (10) δείγματα της μελέτης, ωστόσο δεν επιτεύχθηκε η ανίχνευση του στα 260nm και 280nm (αδυναμία δημιουργίας φάσματος) εξαιτίας της πολύ μικρής συγκέντρωσης του ολικού RNA σε δείγματα ορού. Για το λόγο αυτό, η φασματοφωτομετρική ανάλυση δεν πραγματοποιήθηκε στα επόμενα δείγματα της μελέτης.

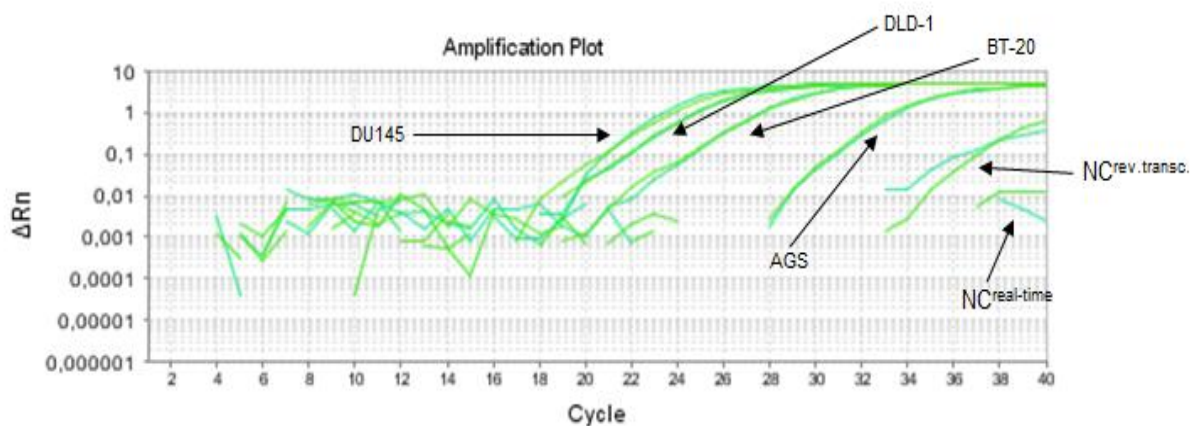
Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με ήδη δημοσιευμένες μελέτες και προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου μας, όπου καταλήγουν στην ιδιαίτερα χαμηλή συγκέντρωση ολικού RNA σε δείγματα ορού.

6.2. Έλεγχος έκφρασης miR-34a και miR-146a σε κυτταρικές σειρές

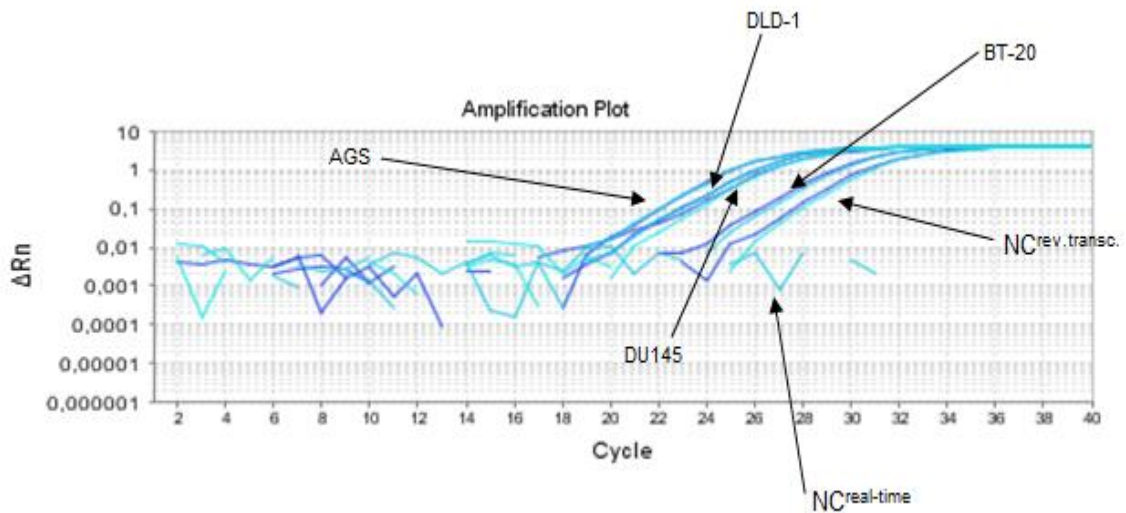
Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση των μεθοδολογιών προσδιορισμού των hsa-miR-34a και hsa-miR-146a στις τέσσερις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, DU145, BT-20, AGS και DLD-1.

6.2.1. Εφαρμογή single miR-specific reverse transcription (μονή miR-ειδικής αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής)

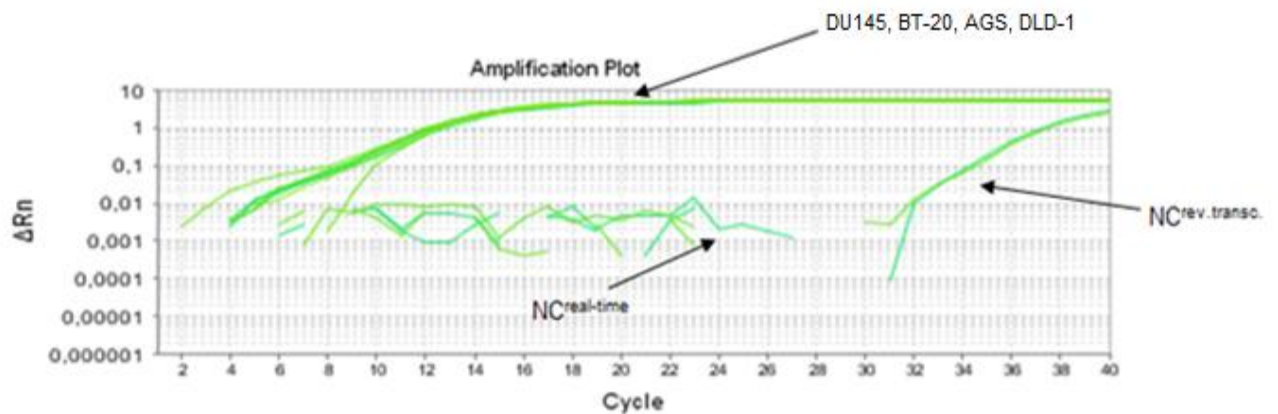
Τα δείγματα RNA των κυτταρικών σειρών είχαν εμβολιστεί (spiked) πριν την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής με 100 fmol cel-miR-39. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε single miR-specific reverse transcription των cel-miR-39, hsa-miR-34a και hsa-miR-146a με συγκέντρωση RT εκκινητή ίση με 100 nM ανά αντίδραση. Η συγκέντρωση των πρόσθιων (F) και ανάστροφων (R) εκκινητών της real - time qPCR αντίδρασης για κάθε μόριο στόχο ήταν 500 nM, ενώ των ειδικών TaqMan probes 125 nM. Στις εικόνες 17, 18 και 19 που ακολουθούν, παρουσιάζονται οι καμπύλες ενίσχυσης (καμπύλες φθορισμού) των μορίων στόχων στις τέσσερις κυτταρικές σειρές, καθώς και τα control δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.



Εικόνα 18. Γραφική παράσταση του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της Real – Time PCR αντίδρασης (καμπύλες ενίσχυσης) του hsa-miR-146a για τις κυτταρικές σειρές DU145, BT-20, AGS και DLD-1. Επισημαίνονται και τα control δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.



Εικόνα 19. Γραφική παράσταση του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της *Real – Time PCR* αντίδρασης (καμπύλες ενίσχυσης) του *hsa-miR-34a* για τις κυτταρικές σειρές *DU145*, *BT-20*, *AGS* και *DLD-1*. Επισημαίνονται και τα *control* δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.



Εικόνα 20. Γραφική παράσταση του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της *Real – Time PCR* αντίδρασης (καμπύλες ενίσχυσης) του *cel-miR-39* για τις κυτταρικές σειρές *DU145*, *BT-20*, *AGS* και *DLD-1*. Επισημαίνονται και τα *control* δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.

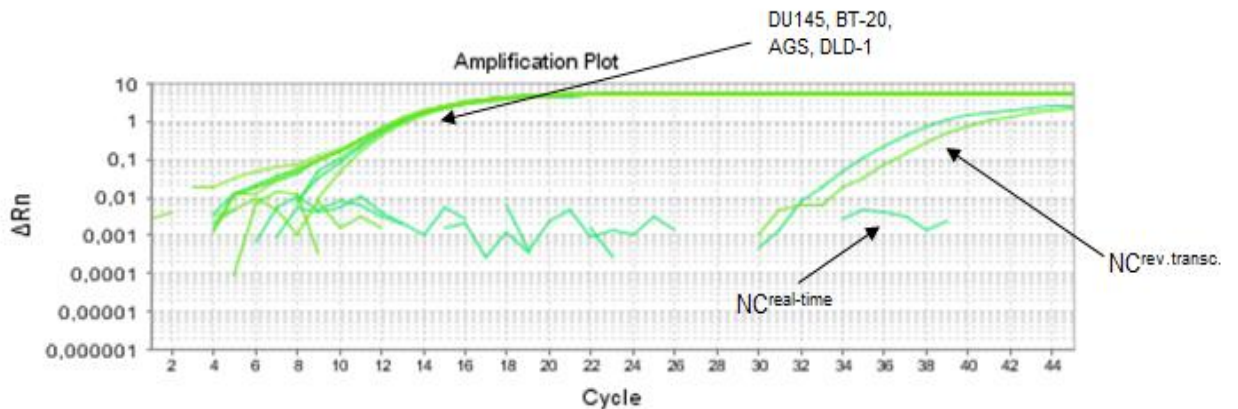
Παρατηρούμε την ικανοποιητική ενίσχυση των μορίων-στόχων cel-miR-39, hsa-miR-146a και hsa-miR-34a στις κυτταρικές σειρές της μελέτης μας. Το C_T των $NC^{rev.transc.}$ δειγμάτων για το hsa-miR-146a είναι >36 αναδεικνύοντας την απουσία/μικρή ενίσχυση μη ειδικών προϊόντων από τη μεθοδολογία μας. Στην περίπτωση του hsa-miR-34a παρατηρείται σημαντική καμπύλη ενίσχυσης στο control $NC^{rev.transc.}$ <30 και απουσία καμπύλης ενίσχυσης στο control $NC^{real-time}$. Το αποτέλεσμα αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα σημαντικής ενίσχυσης μη ειδικού προϊόντος κατά την μέθοδο προσδιορισμού του hsa-miR-34a. Η περίπτωση επιμόλυνσης αποκλείεται εξαιτίας της απουσίας καμπύλης ενίσχυσης στο control $NC^{real-time}$. Στην περίπτωση του cel-miR-39 παρατηρείται πως υπάρχει ενίσχυση και για τις τέσσερις κυτταρικές σειρές στα ίδια επίπεδα, όπως ήταν αναμενόμενο, αφού προστέθηκε στην ίδια ποσότητα το γονίδιο cel-miR-39 στα δείγματα ορού.

6.2.2. Εφαρμογή multiple miR-specific reverse transcription (πολλαπλή miR-ειδικής αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής)

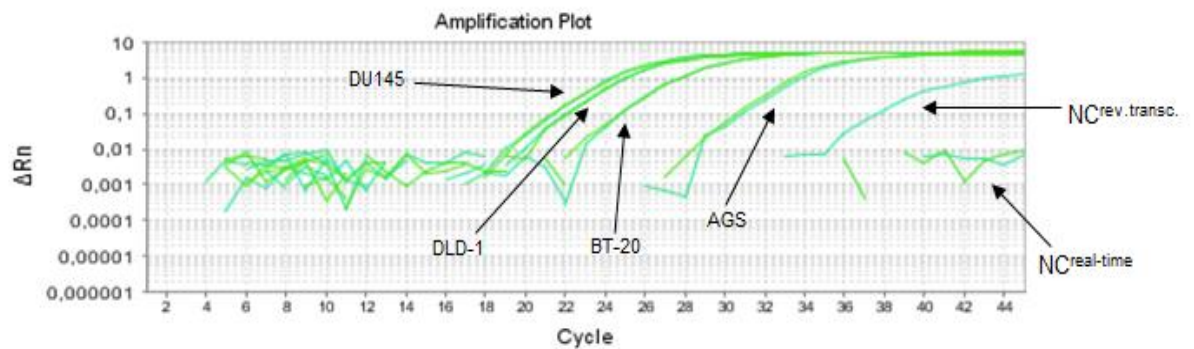
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε έλεγχος απόδοσης της μεθοδολογίας προσδιορισμού των υπό μελέτη cel-miR-39, hsa-miR-34a και hsa-miR-146a με τη βοήθεια multiple miR-specific reverse transcription (πολλαπλή miR-ειδικής αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής). Η χρήση multiple reverse transcription (πολλαπλή αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής) μειώνει σημαντικά το κόστος της μεθόδου προσδιορισμού πολλαπλών miRNA στόχων στο ίδιο δείγμα, ενώ συγχρόνως ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο σχετικών αποκλίσεων μεταξύ των miRNA μορίων στόχων από φαινόμενα αναστολής των αντιδράσεων ή/και τυχαία σφάλματα.

Τα δείγματα RNA των κυτταρικών σειρών είχαν εμβολιστεί (spiked) πριν την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής με 100 fmol cel-miR-39. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε multiple miR-specific reverse transcription των cel-miR-39, hsa-miR-34a και hsa-miR-146a στην ίδια αντίδραση, με συγκέντρωση RT εκκινητή ίση με 100 nM για κάθε μόριο στόχο. Η συγκέντρωση των πρόσθιων (F) και ανάστροφων (R) εκκινητών της real-time qPCR αντίδρασης για κάθε μόριο στόχο ήταν 500 nM, ενώ των ειδικών TaqMan probes 125 nM. Στις ακόλουθες εικόνες παρουσιάζονται οι καμπύλες ενίσχυσης (καμπύλες φθορισμού) των μορίων

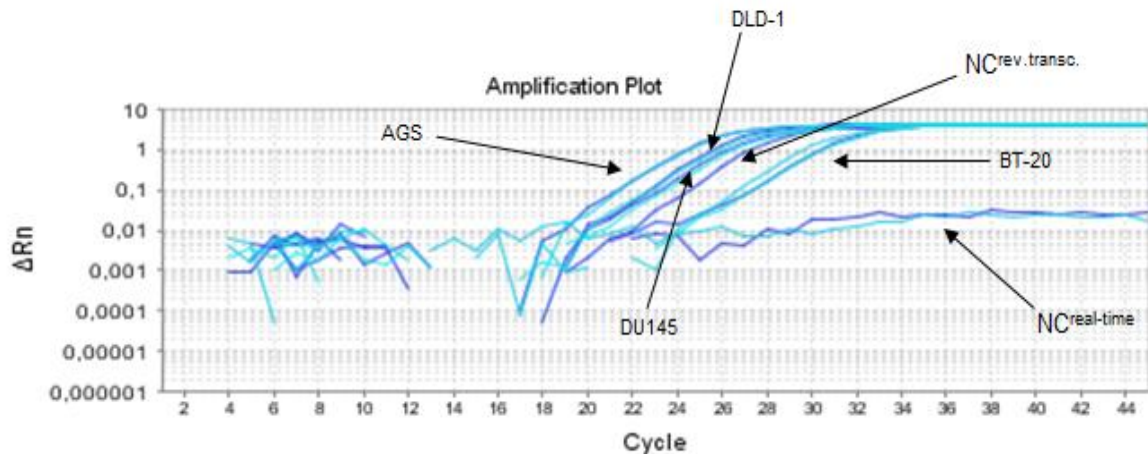
στόχων στις τέσσερις κυτταρικές σειρές, καθώς και τα control δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.



Εικόνα 21. Γραφική παράσταση του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της Real – Time PCR αντίδρασης (καμπύλες ενίσχυσης) του cel-miR-39 για τις κυτταρικές σειρές DU145, BT-20, AGS και DLD-1. Επισημαίνονται και τα control δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.



Εικόνα 22. Γραφική παράσταση του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της Real – Time PCR αντίδρασης (καμπύλες ενίσχυσης) του hsa-miR-146a για τις κυτταρικές σειρές DU145, BT-20, AGS και DLD-1. Επισημαίνονται και τα control δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.



Εικόνα 23. Γραφική παράσταση του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της Real – Time PCR αντίδρασης (καμπύλες ενίσχυσης) του *hsa-miR-34a* για τις κυτταρικές σειρές *DU145*, *BT-20*, *AGS* και *DLD-1*. Επισημαίνονται και τα control δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.

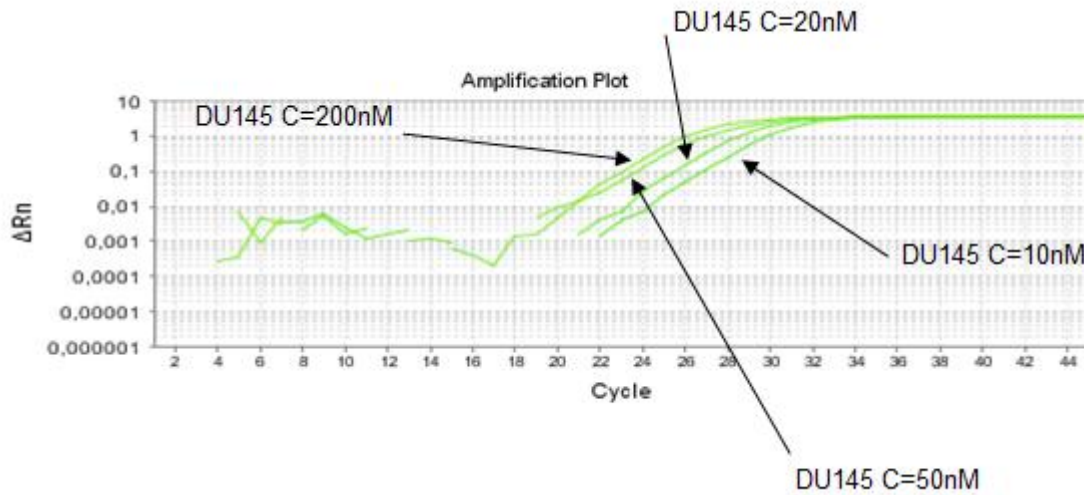
Γενικότερα από τον έλεγχο των υπό μελέτη μορίων *cel-miR-39*, *hsa-miR-146a* και *hsa-miR-34a* στις κυτταρικές σειρές της μελέτης μας, συμπεραίνουμε την ικανοποιητική ενίσχυση των ανώτερων μορίων-στόχων τόσο από την χρήση single- όσο και της multiple- *miR-specific reverse transcription*, καθώς και την απουσία φαινομένων αναστολής στις qPCR αντιδράσεις. Ωστόσο, ο έλεγχος των *NC^{rev.transc.}* ανέδειξε την ενίσχυση μη ειδικών προϊόντων, ειδικά στην περίπτωση του *hsa-miR-34a* απαιτώντας την περαιτέρω βελτιστοποίηση των μεθόδων.

6.2.3. Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης *miR*-ειδικών RT εκκινητών για τον προσδιορισμό του *miR-34a*

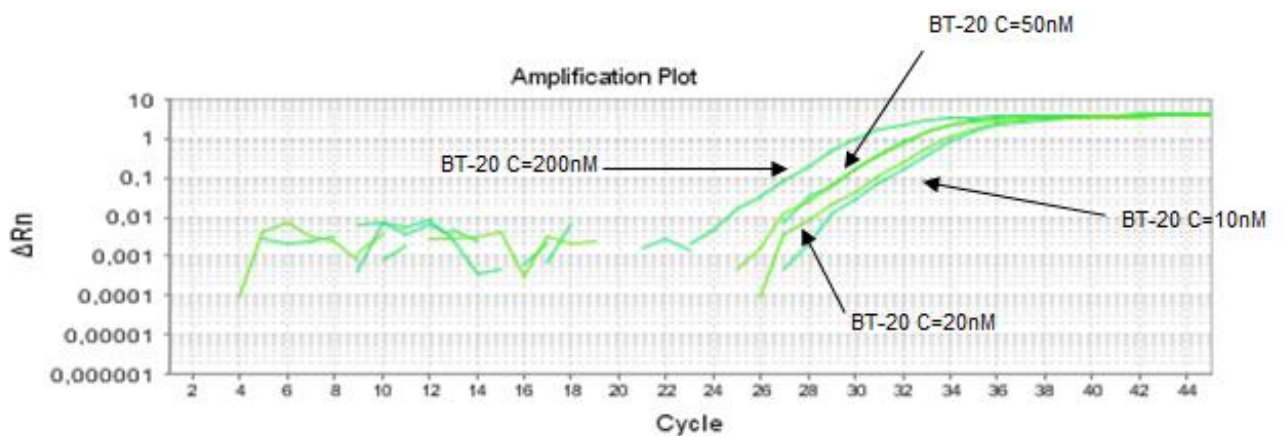
Στη συνέχεια, επιχειρήθηκε η βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης των *miR*-ειδικών RT εκκινητών στην αντίδραση αντίστροφής μεταγραφής με στόχο την μείωση παραγωγής μη ειδικού προϊόντος στη μεθοδολογία προσδιορισμού του *hsa-miR-34a*.

Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε single *miR-specific reverse transcription* του *hsa-miR-34a* στις κυτταρικές σειρές *DU145* και *BT-20* με συγκεντρώσεις RT εκκινητών 200 nM, 50 nM, 20 nM και 10 nM ανά αντίδραση. Η συγκέντρωση του *miR-34a* ειδικού πρόσθιου (F) εκκινητή και του ανάστροφου (R) εκκινητή της real - time qPCR αντίδρασης ήταν 500 nM, ενώ του *miR-34a* ειδικού

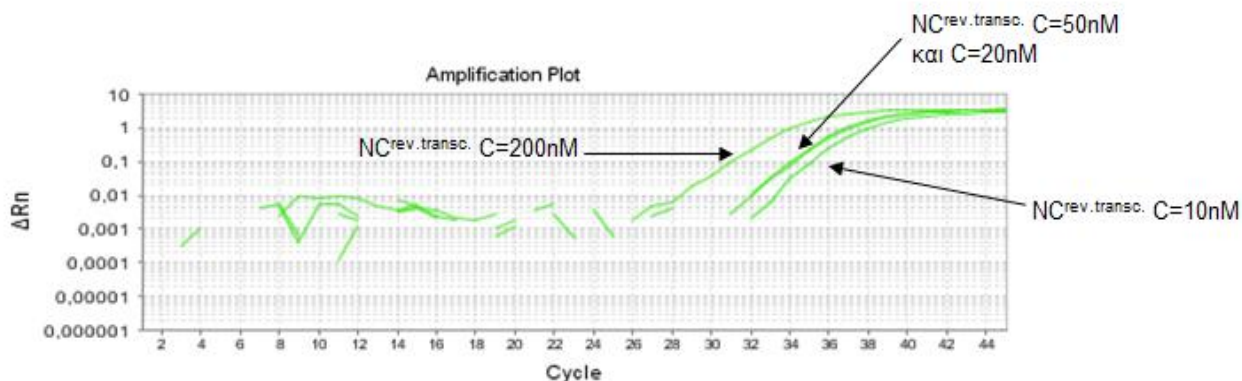
ΤaqMan probe 125 nM. Στις εικόνες 23 – 26 που ακολουθούν παρουσιάζονται οι καμπύλες ενίσχυσης (καμπύλες φθορισμού) του hsa-miR-34a σε αυτές τις δύο κυτταρικές σειρές, καθώς και τα control δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.



Εικόνα 24. Γραφική παράσταση της μεταβολής του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της Real – Time PCR κατά την ενίσχυση του hsa-miR-34a για την κυτταρική σειρά DU145. Επισημαίνονται με βέλη οι συγκεντρώσεις των RT εκκινήτων.



Εικόνα 25. Γραφική παράσταση της μεταβολής του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της Real – Time PCR κατά την ενίσχυση του hsa-miR-34a για την κυτταρική σειρά BT-20. Επισημαίνονται με βέλη οι συγκεντρώσεις των RT εκκινήτων.



Εικόνα 26. Γραφική παράσταση της μεταβολής του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της Real – Time PCR κατά την ενίσχυση του *hsa-miR-34a* για τα control NC^{rev.transc.}. Επισημαίνονται με βέλη οι συγκεντρώσεις των RT εκκινήτων.

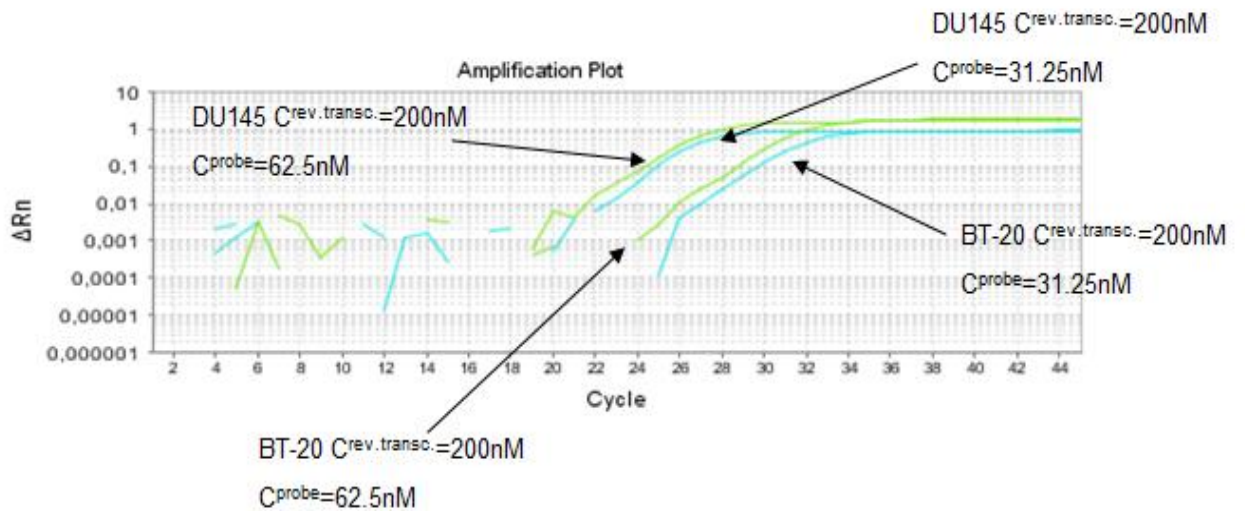
Παρατηρούμε αύξηση των C_T στις DU145 και BT-20 κυτταρικές σειρές από την μείωση των συγκεντρώσεων των RT εκκινήτων, όπως ήταν αναμενόμενο, ωστόσο λαμβάνονται ικανοποιητικές εικόνες των καμπυλών ενίσχυσης σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν (200nM-10nM). Ο έλεγχος των NC^{rev.transc.} ανέδειξε την ενίσχυση μη ειδικών προϊόντων κατά την μεθοδολογία προσδιορισμού του *hsa-miR-34a*, παρόλο που το σήμα τους μειώνεται, απαιτώντας περαιτέρω βελτιστοποίηση των μεθόδων. Η περίπτωση επιμόλυνσης αποκλείεται εξαιτίας της απουσίας καμπύλης ενίσχυσης στο control NC^{real-time}.

6.2.4. Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης miR-ειδικού MGB TaqMan probe για τον προσδιορισμό του miR-34a

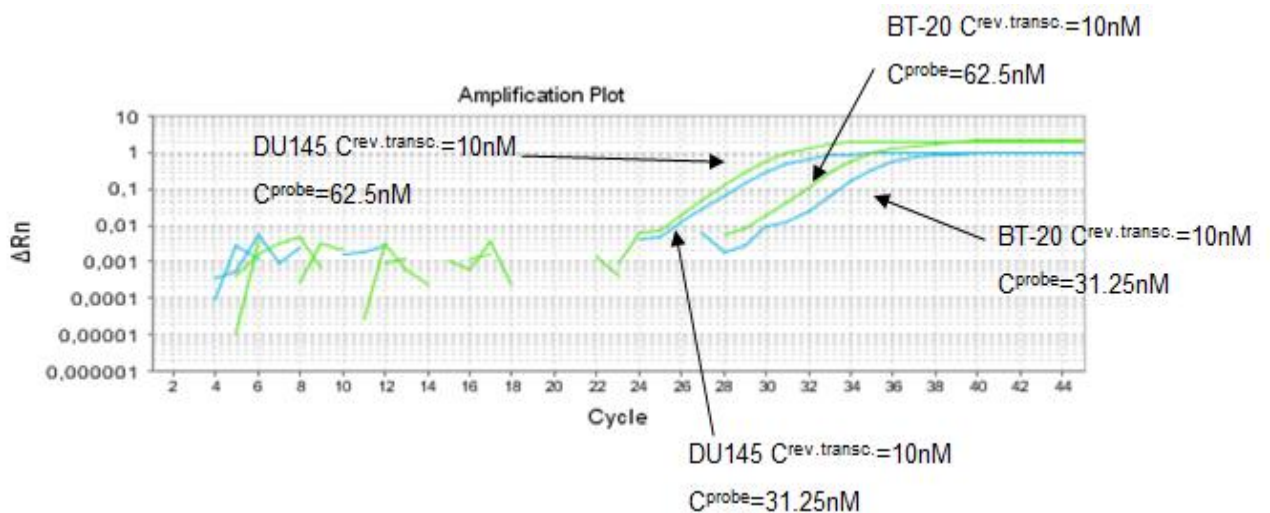
Στη συνέχεια, επιχειρήθηκε η βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης του miR-ειδικού TaqMan probe στη real-time qPCR αντίδραση με στόχο τη μείωση παραγωγής μη ειδικού προϊόντος στη μεθοδολογία προσδιορισμού του *hsa-miR-34a*.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε single miR-specific reverse transcription για το *hsa-miR-34a* στις κυτταρικές σειρές DU145 και BT-20 με συγκεντρώσεις RT εκκινήτων 200 nM, 50 nM, 20 nM και 10 nM ανά αντίδραση. Η συγκέντρωση του miR-34a-ειδικού πρόσθιου (F) εκκινήτη και του ανάστροφου (R) εκκινήτη της real-time qPCR αντίδρασης ήταν 500 nM. Στο πλαίσιο της βελτιστοποίησης της

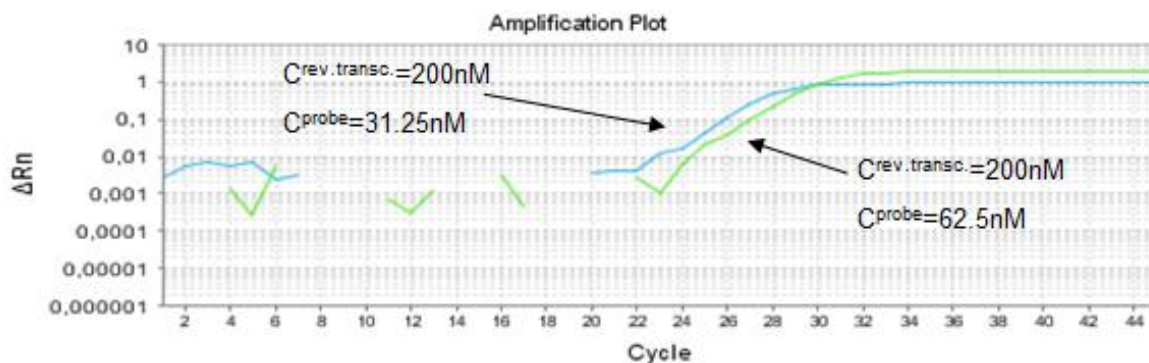
συγκέντρωσης του miR-34a MGB TaqMan probe, χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 62,5 nM και σε 31,25 nM σε κάθε αντίδραση. Στις εικόνες που ακολουθούν, παρουσιάζονται οι καμπύλες ενίσχυσης (καμπύλες φθορισμού) του hsa-miR-34a σε αυτές τις δύο κυτταρικές σειρές, καθώς και τα control δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.



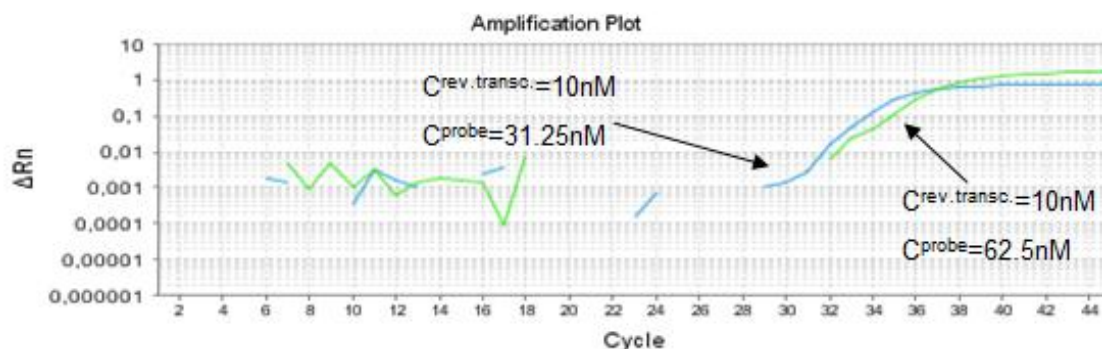
Εικόνα 27. Γραφική παράσταση της μεταβολής του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της Real – Time PCR κατά την ενίσχυση του hsa-miR-34a για τις κυτταρικές σειρές DU145 και BT-20. Επισημαίνονται με βέλη οι συγκεντρώσεις των RT εκκινήτων, καθώς και των ειδικών TaqMan probes.



Εικόνα 28. Γραφική παράσταση της μεταβολής του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της Real – Time PCR κατά την ενίσχυση του hsa-miR-34a για τις κυτταρικές σειρές DU145 και BT-20. Επισημαίνονται με βέλη οι συγκεντρώσεις των RT εκκινήτων, καθώς και των ειδικών TaqMan probes.



Εικόνα 29. Γραφική παράσταση της μεταβολής του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της Real – Time PCR κατά την ενίσχυση του hsa-miR-34a για τα control $NC^{rev.transc.}$. Επισημαίνονται με βέλη οι συγκεντρώσεις των RT εκκινήτων και των ειδικών TaqMan probes.



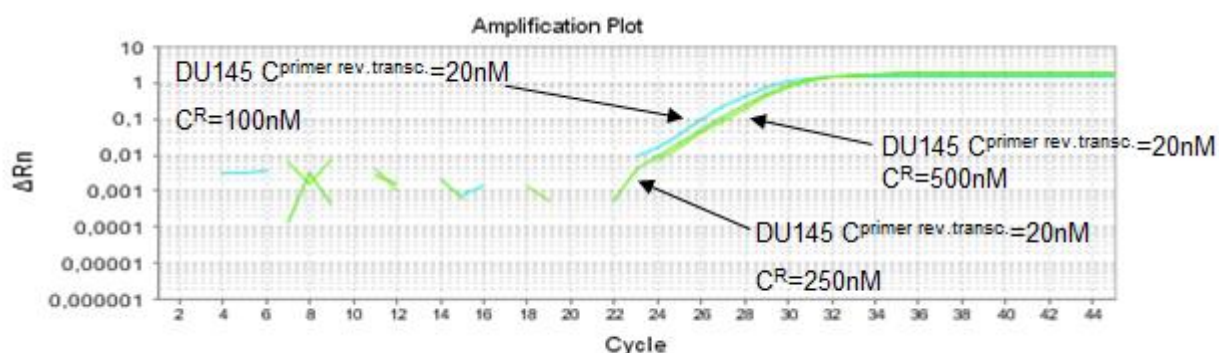
Εικόνα 30. Γραφική παράσταση της μεταβολής του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της Real – Time PCR κατά την ενίσχυση του hsa-miR-34a για τα control $NC^{rev.transc.}$. Επισημαίνονται με βέλη οι συγκεντρώσεις των RT εκκινήτων και των ειδικών TaqMan probes.

Παρατηρείται μικρή διαφοροποίηση της ενίσχυσης του hsa-miR-34a μεταξύ των δυο χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων του miR-34a-ειδικού MGB probe στις δυο κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν (DU145 και BT-20). Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση στο σχηματισμό του μη ειδικού προϊόντος κατά των προσδιορισμό του hsa-miR-34a, παρόλο που το σήμα του μειώνεται, απαιτώντας περαιτέρω βελτιστοποίηση των μεθόδων. Η περίπτωση επιμόλυνσης αποκλείεται εξαιτίας της απουσίας καμπύλης ενίσχυσης στο control $NC^{real-time}$.

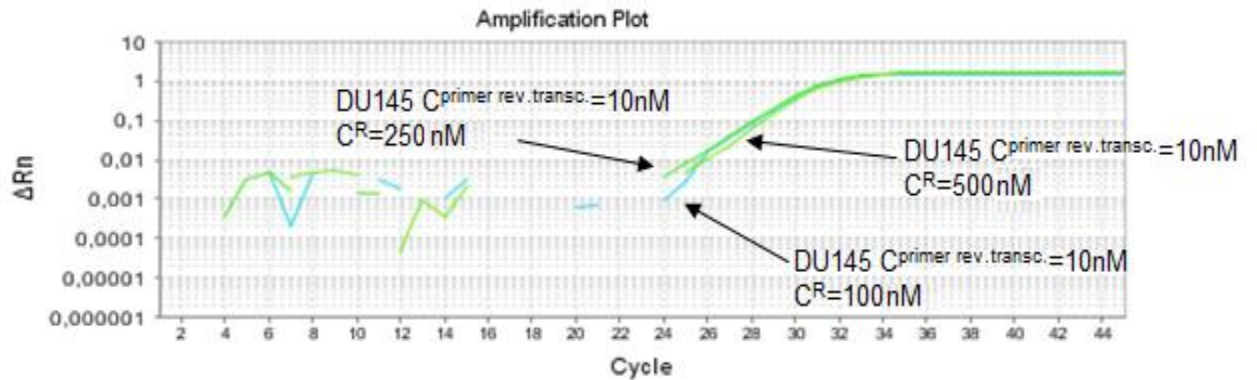
6.2.5. Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης του universal ανάστροφου R εκκινητή για τον προσδιορισμό του miR-34a

Στη συνέχεια, επιχειρήθηκε η βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης του universal ανάστροφου R εκκινητή στη real-time qPCR αντίδραση με στόχο τη μείωση παραγωγής μη ειδικού προϊόντος στη μεθοδολογία προσδιορισμού του hsa-miR-34a.

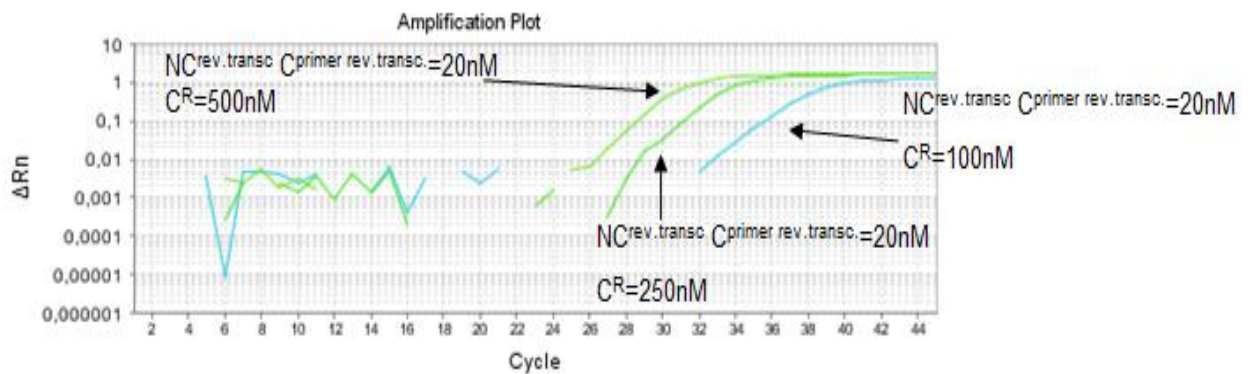
Στο πλαίσιο αυτό, πραγματοποιήθηκε single miR-specific reverse transcription μόνο για το hsa-miR-34a στις κυτταρικές σειρές DU145 και BT-20 με συγκεντρώσεις RT εκκινητών 20 nM και 10 nM ανά αντίδραση. Η επιλογή των ανώτερων συγκεντρώσεων του RT εκκινητή πραγματοποιήθηκε από την παρατήρηση της βελτίωσης/μείωσης του μη ειδικού σήματος από την μείωση της χρησιμοποιούμενης ποσότητας κατά την RT αντίδραση (βλ. 6.2.3. παραπάνω). Η συγκέντρωση του miR-34a ειδικού πρόσθιου (F) εκκινητή της real - time qPCR αντίδρασης ήταν 500 nM, και του miR-34a-ειδικού MGB probe 62,5 nM. Στο πλαίσιο της βελτιστοποίησης της ποσότητας του universal ανάστροφου (R) εκκινητή χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις 500 nM, 250 nM και 100 nM ανά αντίδραση. Στις εικόνες 31- 35 που ακολουθούν παρουσιάζονται οι καμπύλες ενίσχυσης (καμπύλες φθορισμού) του hsa-miR-34a σε αυτές τις δύο κυτταρικές σειρές, καθώς και τα control δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.



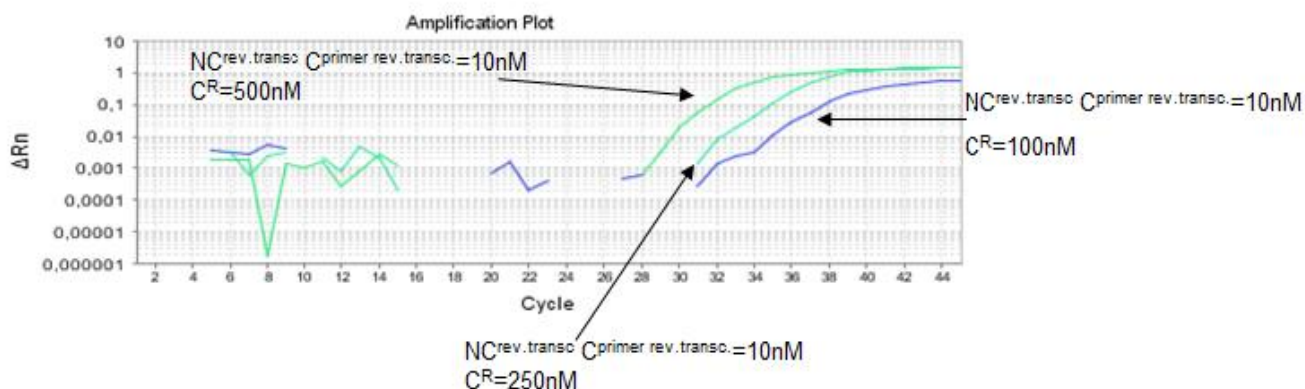
Εικόνα 31. Γραφική παράσταση της μεταβολής του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της Real – Time PCR κατά την ενίσχυση του hsa-miR-34a για την κυτταρική σειρά DU145. Επισημαίνονται με βέλη οι συγκεντρώσεις των RT εκκινητών, καθώς και των ανάστροφων (R) εκκινητών.



Εικόνα 32. Γραφική παράσταση της μεταβολής του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της Real – Time PCR κατά την ενίσχυση του hsa-miR-34a για την κυτταρική σειρά DU145. Επισημαίνονται με βέλη οι συγκεντρώσεις των RT εκκινήτων, καθώς και των ανάστροφων (R) εκκινήτων.



Εικόνα 33. Γραφική παράσταση της μεταβολής του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της Real – Time PCR κατά την ενίσχυση του hsa-miR-34a για τα control NC^{rev.transc.}. Επισημαίνονται με βέλη οι συγκεντρώσεις των RT εκκινήτων, καθώς και των ανάστροφων (R) εκκινήτων.



Εικόνα 34. Γραφική παράσταση της μεταβολής του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της Real – Time PCR κατά την ενίσχυση του hsa-miR-34a για τα control NC^{rev.transc.}. Επισημαίνονται με βέλη οι συγκεντρώσεις των RT εκκινητών, καθώς και των ανάστροφων (R) εκκινητών.

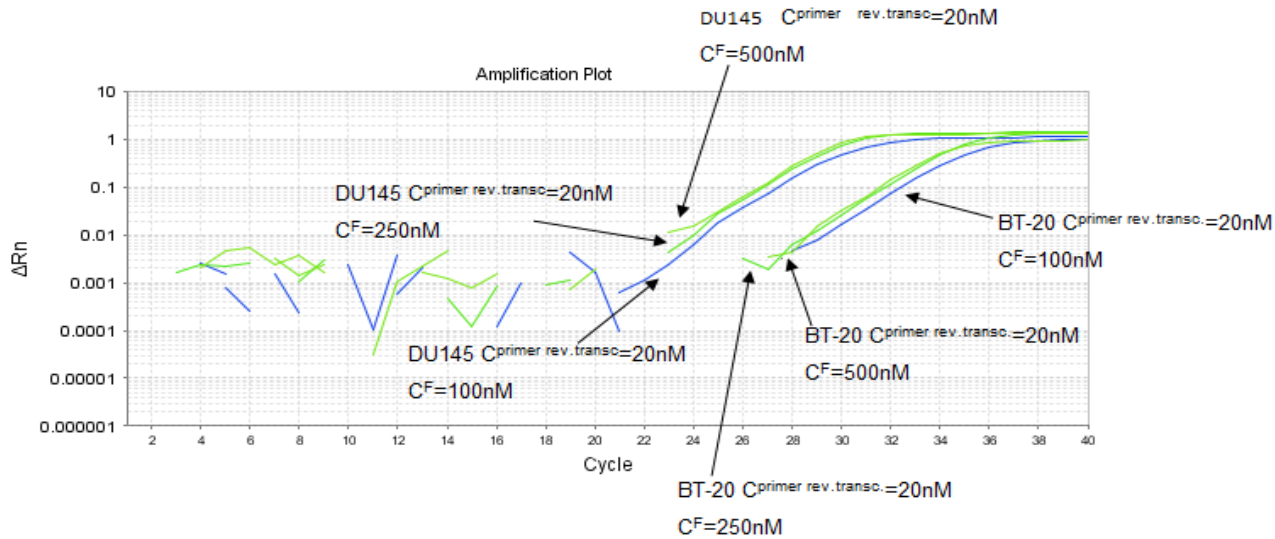
Από την ανώτερη διαδικασία βελτιστοποίησης παρατηρείται η πολύ μικρή διαφοροποίηση της ενίσχυσης του hsa-miR-34a μεταξύ των χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων του ανάστροφου (R) εκκινητή στις δυο κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν (DU145 και BT-20), επιβεβαιώνοντας την ικανότητα προσδιορισμού του hsa-miR-34a σε όλο το εύρος των χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων (500nM-100nM). Παράλληλα, παρατηρούμε τη σημαντική μείωση της παραγωγής μη ειδικού προϊόντος από τη διαδοχική μείωση της ποσότητας του χρησιμοποιούμενου R εκκινητή, αναδεικνύοντας την ανάγκη χρήσης του σε μικρές συγκεντρώσεις.

6.2.6. Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης του πρόσθιου F εκκινητή για τον προσδιορισμό του miR-34a

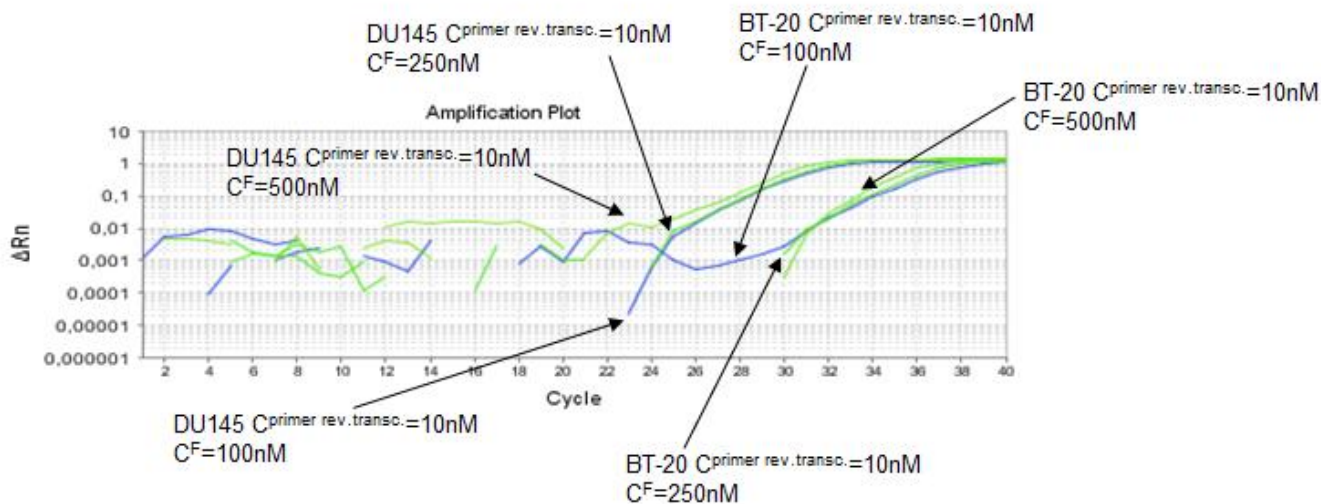
Στη συνέχεια, επιχειρήθηκε η βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης του πρόσθιου F εκκινητή στη real-time qPCR αντίδραση με στόχο τη μείωση παραγωγής μη ειδικού προϊόντος στη μεθοδολογία προσδιορισμού του hsa-miR-34a.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε single miR-specific reverse transcription μόνο για το hsa-miR-34a στις κυτταρικές σειρές DU145 και BT-20 με συγκεντρώσεις RT εκκινητών 20 nM και 10 nM ανά αντίδραση. Στο πλαίσιο της βελτιστοποίησης της ποσότητας του πρόσθιου (F) εκκινητή της real - time qPCR αντίδρασης

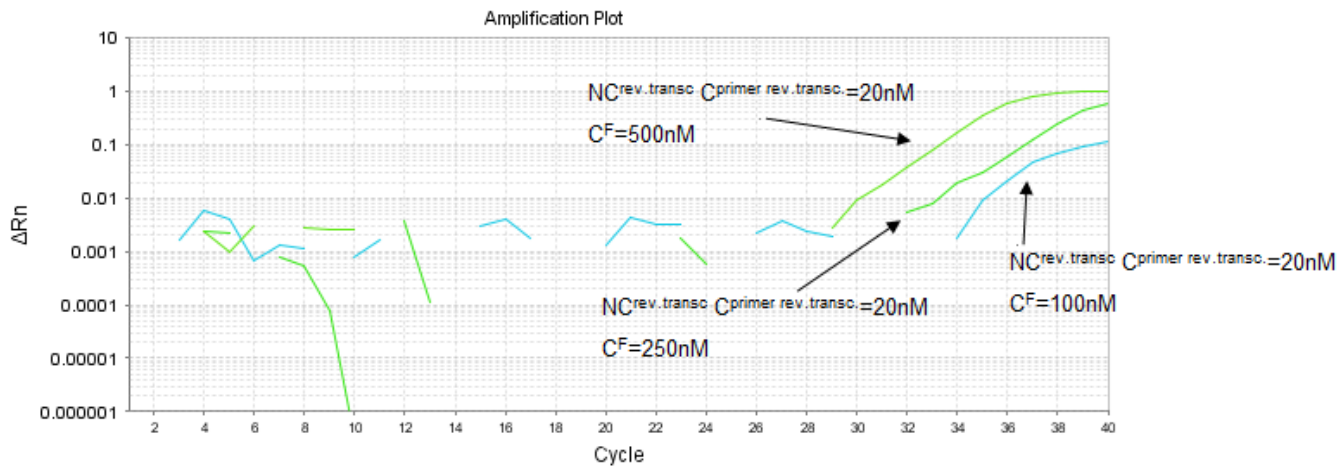
χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις 500 nM, 250 nM και 100 nM ανά αντίδραση. Η συγκέντρωση του universal ανάστροφου (R) εκκινήτη ήταν 100 nM και του miR-34a-ειδικού MGB probe 62,5 nM. Στις ακόλουθες εικόνες παρουσιάζονται οι καμπύλες ενίσχυσης (καμπύλες φθορισμού) του hsa-miR-34a σε αυτές τις δύο κυτταρικές σειρές, καθώς και τα control δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.



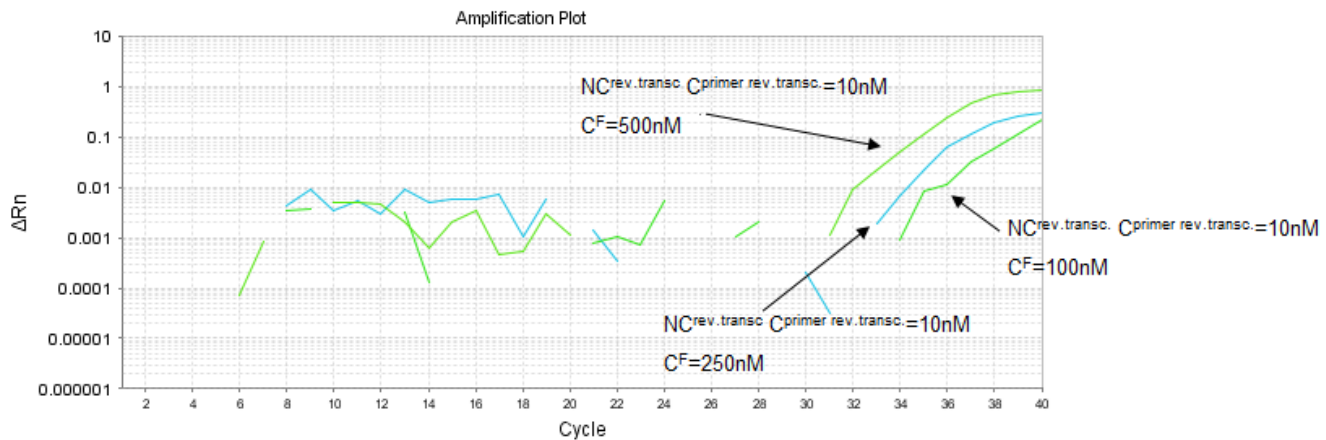
Εικόνα 35. Γραφική παράσταση της μεταβολής του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της Real – Time PCR κατά την ενίσχυση του hsa-miR-34a για τις κυτταρικές σειρές DU145 και BT-20. Επισημαίνονται με βέλη οι συγκεντρώσεις των RT εκκινήτων, καθώς και των πρόσθιων (F) εκκινήτων.



Εικόνα 36. Γραφική παράσταση της μεταβολής του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της Real – Time PCR κατά την ενίσχυση του hsa-miR-34a για τις κυτταρικές σειρές DU145 και BT-20. Επισημαίνονται με βέλη οι συγκεντρώσεις των RT εκκινήτων, καθώς και των πρόσθιων (F) εκκινήτων.



Εικόνα 37. Γραφική παράσταση της μεταβολής του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της Real – Time PCR κατά την ενίσχυση του hsa-miR-34a για τα control NC^{rev.transc.}. Επισημαίνονται με βέλη οι συγκεντρώσεις των RT εκκινήτων, καθώς και των πρόσθιων (F) εκκινήτων.



Εικόνα 38. Γραφική παράσταση της μεταβολής του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της Real – Time PCR κατά την ενίσχυση του hsa-miR-34a για τα control NC^{rev.transc.}. Επισημαίνονται με βέλη οι συγκεντρώσεις των RT εκκινήτων, καθώς και των πρόσθιων (F) εκκινήτων.

Από την ανώτερη διαδικασία βελτιστοποίησης παρατηρήθηκε ελάχιστη διαφοροποίηση της ενίσχυσης του hsa-miR-34a μεταξύ των χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων του πρόσθιου (F) εκκινήτη της real - time qPCR αντίδρασης στις

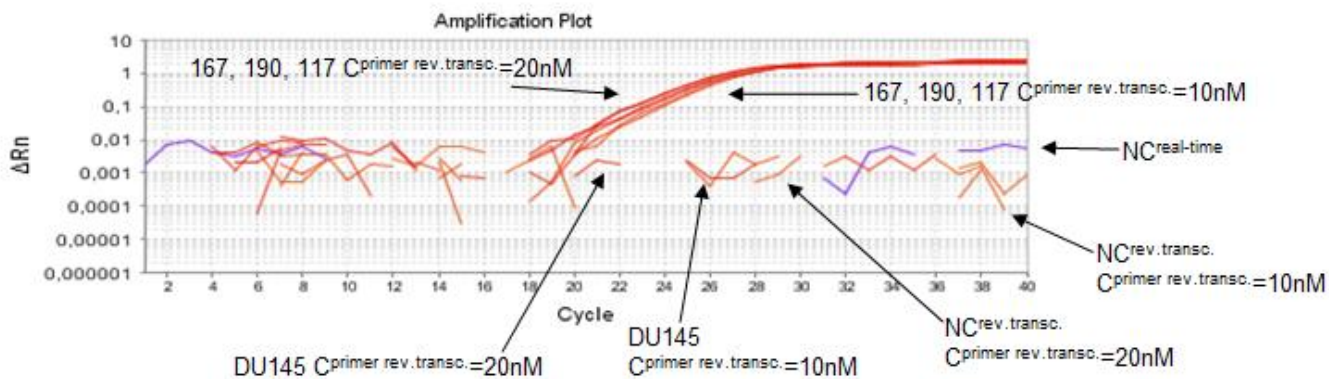
δύο κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν (DU145 και BT-20), επιβεβαιώνοντας με αυτόν τον τρόπο την ικανότητα προσδιορισμού του miR-34a σε όλο το εύρος των χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων (500nM-100nM). Παράλληλα, παρατηρούμε τη σημαντική μείωση της παραγωγής μη ειδικού προϊόντος από τη διαδοχική μείωση της ποσότητας του χρησιμοποιούμενου F εκκινητή, αναδεικνύοντας την ανάγκη χρήσης του σε μικρές συγκεντρώσεις.

6.3. Έλεγχος έκφρασης miR-34a και miR-146a σε δείγματα ορού ασθενών με επιληψία

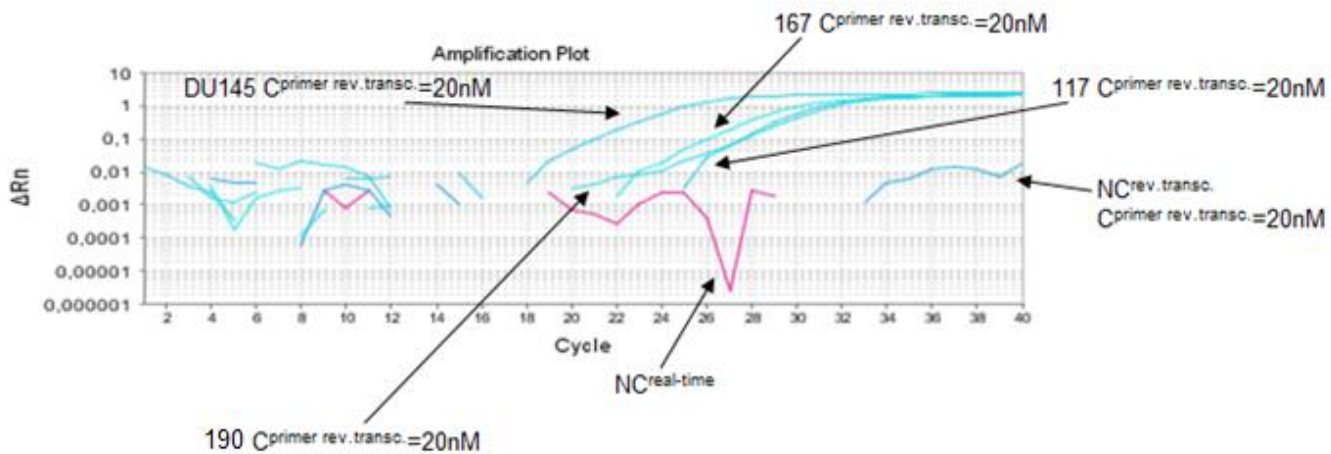
Στο σημείο αυτό, πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση των μεθοδολογιών προσδιορισμού των hsa-miR-34a και hsa-miR-146a σε δείγματα ορού ασθενών με επιληψία (ανθεκτικών και μη ανθεκτικών στη φαρμακοθεραπεία), καθώς και της κυτταρικής σειράς DU145.

6.3.1. Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης stem-loop RT εκκινητή στην αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

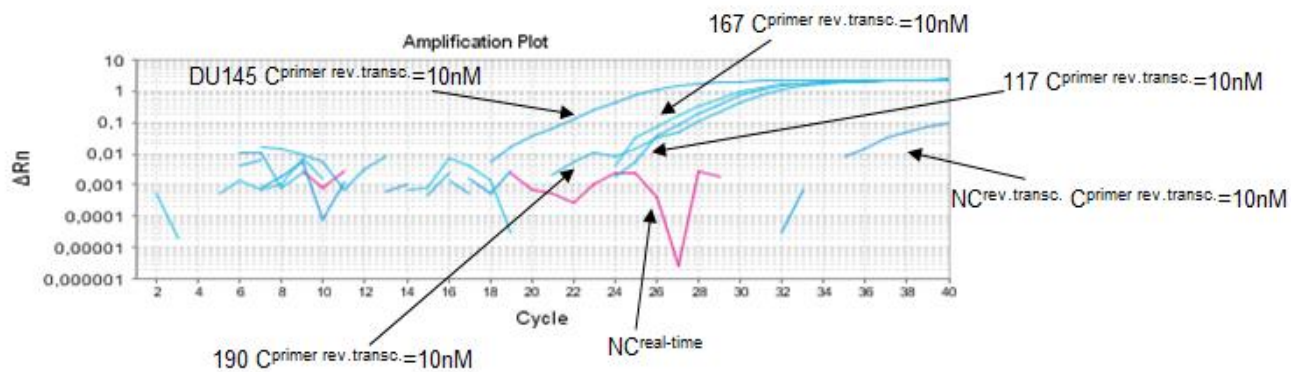
Τα δείγματα RNA από τον ορό ασθενών με επιληψία είχαν εμβολιστεί (spiked) πριν την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής με 100 fmol cel-miR-39. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε multiple miR-specific reverse transcription των cel-miR-39, hsa-miR-34a και hsa-miR-146a και της κυτταρικής σειράς DU145. Ελέγχθηκε η μεθοδολογία τόσο από την χρήση συγκέντρωσης RT εκκινητών 20 nM ανά αντίδραση όσο και 10 nM ανά αντίδραση. Η συγκέντρωση των πρόσθιων (F) εκκινητών της real - time qPCR αντίδρασης για κάθε μόριο στόχο ήταν 250 nM, των ανάστροφων (R) εκκινητών 100 nM και των ειδικών TaqMan probes 62,5 nM. Στις εικόνες 38 - 42 που ακολουθούν, παρουσιάζονται οι καμπύλες ενίσχυσης (καμπύλες φθορισμού) των μορίων στόχων σε δείγματα ορού ασθενών με επιληψία και την κυτταρική σειρά DU145, καθώς και τα control δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.



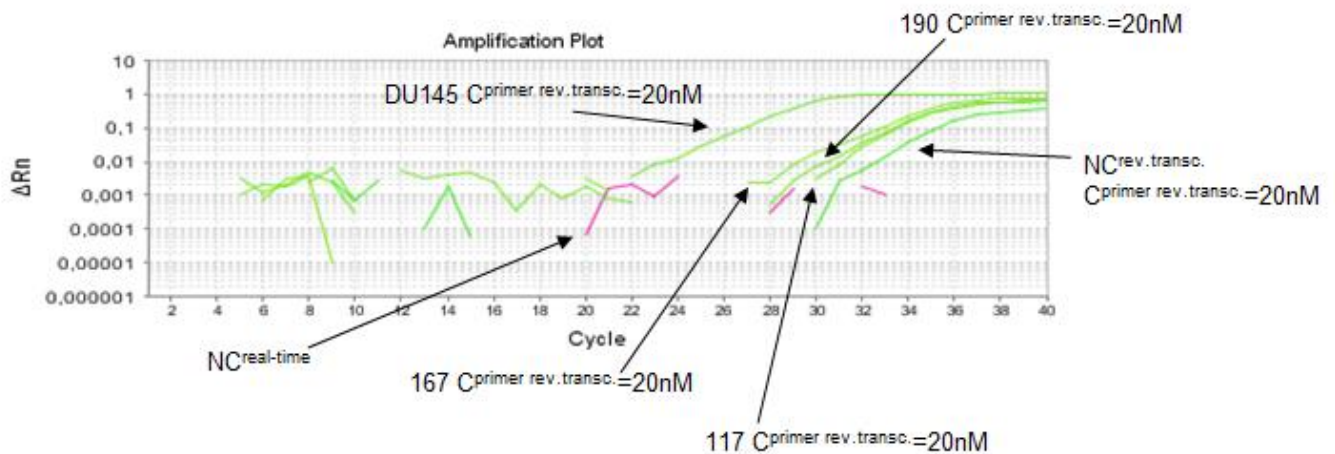
Εικόνα 39. Γραφική παράσταση του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της Real – Time PCR αντίδρασης (καμπύλες ενίσχυσης) του *cel-miR-39* για δείγματα ορού (167,190,117) ασθενών με επιληψία και για την κυτταρική σειρά DU145. Επισημαίνονται με βέλη οι συγκεντρώσεις των RT εκκινήτων, καθώς και τα control δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.



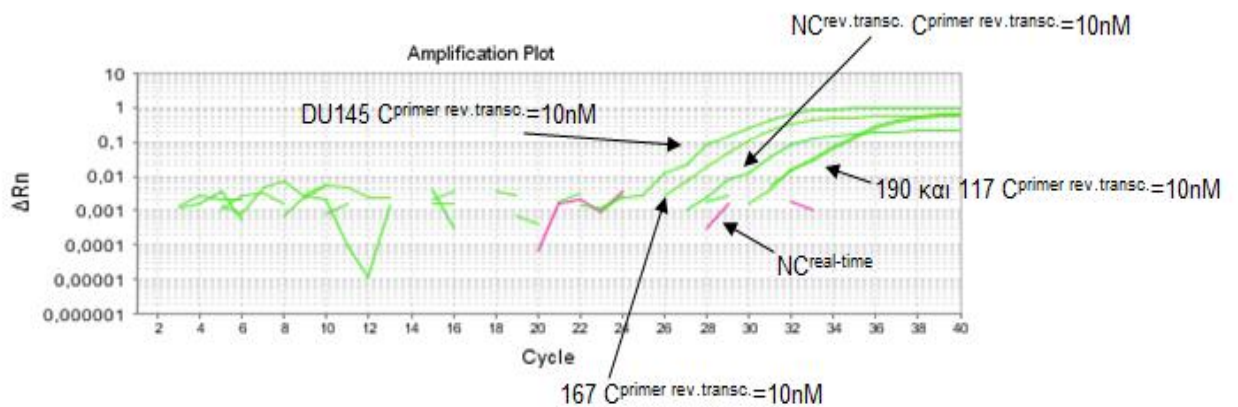
Εικόνα 40. Γραφική παράσταση του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της Real – Time PCR αντίδρασης (καμπύλες ενίσχυσης) του *hsa-miR-146a* για δείγματα ορού (167,190,117) ασθενών με επιληψία και για την κυτταρική σειρά DU145. Επισημαίνονται με βέλη οι συγκεντρώσεις των RT εκκινήτων, καθώς και τα control δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.



Εικόνα 41. Γραφική παράσταση του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της Real – Time PCR αντίδρασης (καμπύλες ενίσχυσης) του hsa-miR-146a για δείγματα ορού (167,190,117) ασθενών με επιληψία και για την κυτταρική σειρά DU145. Επισημαίνονται με βέλη οι συγκεντρώσεις των RT εκκινήτων, καθώς και τα control δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.



Εικόνα 42. Γραφική παράσταση του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της Real – Time PCR αντίδρασης (καμπύλες ενίσχυσης) του hsa-miR-34a για δείγματα ορού (167,190,117) ασθενών με επιληψία και για την κυτταρική σειρά DU145. Επισημαίνονται με βέλη οι συγκεντρώσεις των RT εκκινήτων, καθώς και τα control δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.



Εικόνα 43. Γραφική παράσταση του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της Real – Time PCR αντίδρασης (καμπύλες ενίσχυσης) του hsa-miR-34a για δείγματα ορού (167,190,117) ασθενών με επιληψία και για την κυτταρική σειρά DU145. Επισημαίνονται με βέλη οι συγκεντρώσεις των RT εκκινήτων, καθώς και τα control δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.

Παρατηρούμε την ικανοποιητική ενίσχυση των μορίων-στόχων cel-miR-39, hsa-miR-146a και hsa-miR-34a σε όλα τα δείγματα ορού ασθενών με επιληψία της μελέτης μας. Παρατηρείται επίσης πολύ μικρή διαφορά των C_T μεταξύ των δειγμάτων από την χρήση 20 nM και 10 nM miR-ειδικών RT εκκινήτων, αναδεικνύοντας την ικανοποιητική απόδοση της μεθοδολογίας μας και στις δυο συγκεντρώσεις. Η ελάχιστη αύξηση του C_T από την χρήση 10 nM RT εκκινήτη σε σχέση με τα 20 nM είναι αναμενόμενη.

Ειδικότερα, ικανοποιητική ενίσχυση του cel-miR-39 στο σύνολο των δειγμάτων μας επιβεβαιώνει την παρόμοια απόδοση απομόνωσης του ολικού RNA από τα δείγματα ορού, την παρόμοια απόδοση των RT και real-time qPCR αντιδράσεων μεταξύ των δειγμάτων και την απουσία αναστολέων των αντιδράσεων. Δεν παρατηρείται καμπύλη ενίσχυσης του cel-miR-39 στην κυτταρική σειρά DU145, όπως αναμενόταν, εφόσον δεν είχε εμβολιστεί (spiked) πριν την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής με το εν λόγω miRNA.

Σχετικά με τη μέθοδο προσδιορισμού του hsa-miR-146a, παρατηρούμε την ικανοποιητική ενίσχυση του hsa-miR-146a στο σύνολο των δειγμάτων ορού και την κυτταρική σειρά DU145. Επίσης, ο έλεγχος των $NC^{rev.transc.}$ δειγμάτων για το hsa-miR-146a ανέδειξε την απουσία μη ειδικών προϊόντων από τη μεθοδολογία

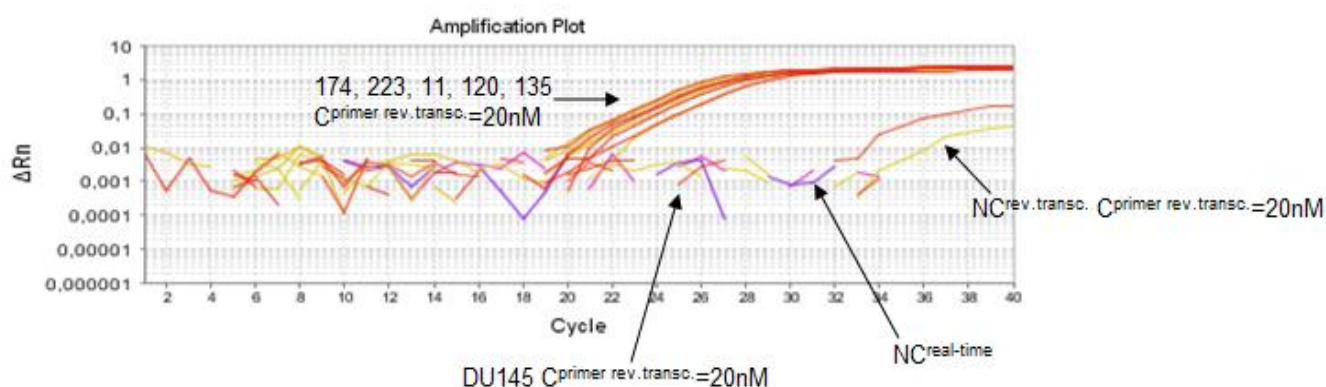
μας, επιτρέποντας την υιοθέτησή της για τον ποσοτικό προσδιορισμό του σε δείγματα ορού ασθενών με επιληψία.

Σχετικά με το hsa-miR-34a παρατηρούνται καμπύλες ενίσχυσης στο σύνολο των ελεγχθέντων δειγμάτων, ωστόσο σε σχετικά μεγάλες τιμές C_T αναδεικνύοντας είτε τη μικρή συγκέντρωσή του στον ορό των ασθενών είτε τη μη ικανοποιητική απόδοση της μεθοδολογίας προσδιορισμού μας. Ταυτόχρονα, παρατηρείται ενίσχυση και μη ειδικού προϊόντος από τον έλεγχο των $NC^{rev.transc.}$ δειγμάτων επιβεβαιώνοντας την περαιτέρω βελτιστοποίηση της μεθοδολογίας.

6.3.2. Έλεγχος επιπέδων miR-146a και miR-34a σε σημαντικό αριθμό δειγμάτων ορού ασθενών με επιληψία

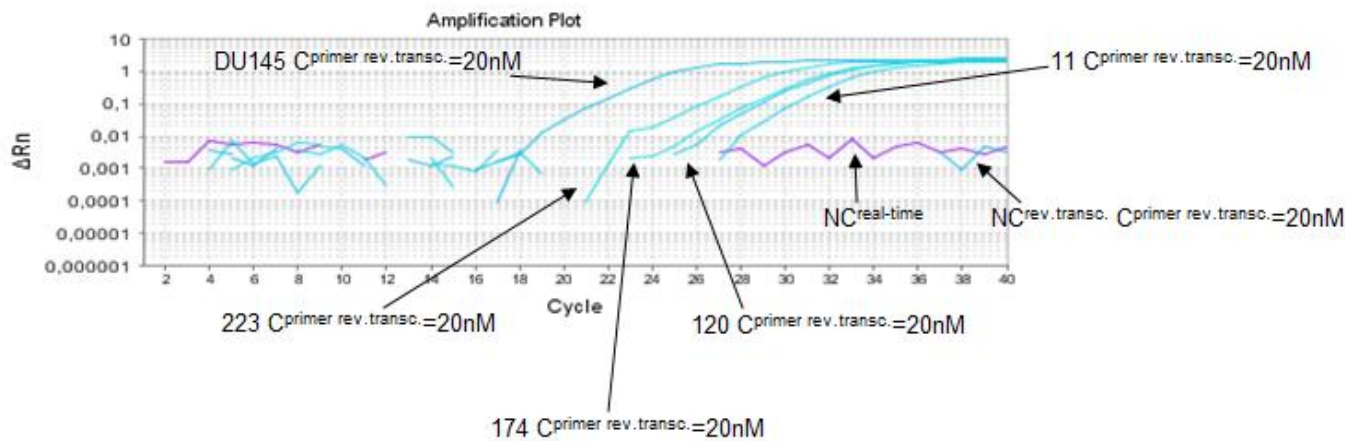
Διατηρώντας τη μεθοδολογία/πρωτόκολλο προσδιορισμού των cel-miR-39 και hsa-miR-146a, όπως παρουσιάζεται παραπάνω, επιχειρήθηκε ο έλεγχος των cel-miR-39, hsa-miR-146a και hsa-miR-34a σε σύνολο 20 δειγμάτων ορού ασθενών με επιληψία, για την επιβεβαίωση της ικανοποιητικής απόδοσής/λειτουργίας του σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων.

Στο σύνολο των δειγμάτων αυτών πραγματοποιήθηκε multiple miR-specific reverse transcription των cel-miR-39, hsa-miR-34a και hsa-miR-146a με συγκέντρωση RT εκκινητών 20 nM ανά αντίδραση. Η συγκέντρωση των πρόσθιων (F) εκκινητών της real-time qPCR αντίδρασης για κάθε μόριο στόχο ήταν 250 nM, των ανάστροφων (R) εκκινητών 100 nM και των ειδικών TaqMan probes 62,5 nM. Στις εικόνες που ακολουθούν, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ελέγχου των υπό μελέτη miRNAs σε ενδεικτικό αριθμό δειγμάτων.

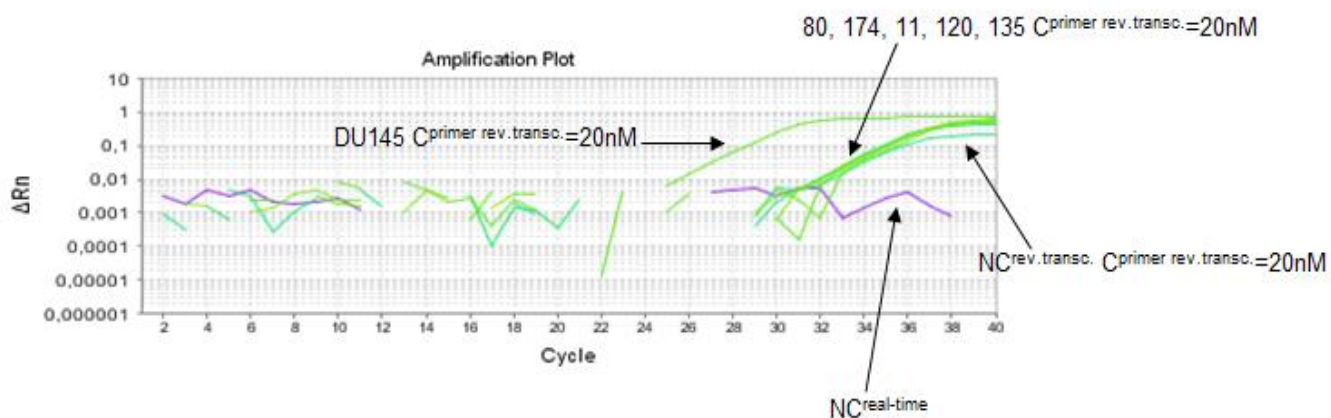


Εικόνα 44. Γραφική παράσταση του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της Real – Time PCR αντίδρασης (καμπύλες ενίσχυσης) του cel-miR-39 για

δείγματα ορού (174, 223, 11, 120 και 135) ασθενών με επιληψία και για την κυτταρική σειρά DU145. Επισημαίνονται με βέλη οι συγκεντρώσεις των RT εκκινήτων, καθώς και τα control δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.



Εικόνα 45. Γραφική παράσταση του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της Real – Time PCR αντίδρασης (καμπύλες ενίσχυσης) του hsa-miR-146a για δείγματα ορού (174, 223, 11 και 120) ασθενών με επιληψία και για την κυτταρική σειρά DU145. Επισημαίνονται με βέλη οι συγκεντρώσεις των RT εκκινήτων, καθώς και τα control δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.



Εικόνα 46. Γραφική παράσταση του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της Real – Time PCR αντίδρασης (καμπύλες ενίσχυσης) του hsa-miR-34a για δείγματα ορού (80, 174, 11, 120 και 135) ασθενών με επιληψία και για την κυτταρική σειρά DU145. Επισημαίνονται με βέλη οι συγκεντρώσεις των RT εκκινήτων, καθώς και τα control δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.

Από τον έλεγχο των ανώτερων δειγμάτων ορού επιβεβαιώνεται η ικανοποιητική απόδοση και ειδικότητα της μεθόδου μας για τον προσδιορισμό του

hsa-miR-146a μορίου στόχου και του cel-miR-39 μορίου αναφοράς σε δείγματα ορού ασθενών με επιληψία. Ενίσχυση τόσο του cel-miR-39 μορίου αναφοράς, όσο και του hsa-miR-146a μορίου στόχου παρατηρήθηκε στο σύνολο των υπό μελέτη δειγμάτων, ενώ ο έλεγχος των NC^{rev.transc.} δειγμάτων ανέδειξε την απουσία μη ειδικών προϊόντων από τη μεθοδολογία μας.

Ως προς το hsa-miR-34a, η ενίσχυσή του στο σύνολο των δειγμάτων μας πραγματοποιείται σε σχετικά μεγάλες τιμές C_T και χωρίς σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των υπό μελέτη δειγμάτων. Ταυτόχρονα, από τον έλεγχο των NC^{rev.transc.} δειγμάτων παρατηρείται σημαντική ενίσχυση μη ειδικών προϊόντων σε παρόμοια επίπεδα με την ενίσχυση του hsa-miR-34a στα δείγματα, αναδεικνύοντας την απουσία ειδικότητας στη μεθοδολογία μας. Για το λόγο αυτό αποφασίστηκε ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων miR-34a-ειδικών RT εκκινητών και πρόσθιου (F) εκκινητή της real - time qPCR αντίδρασης.

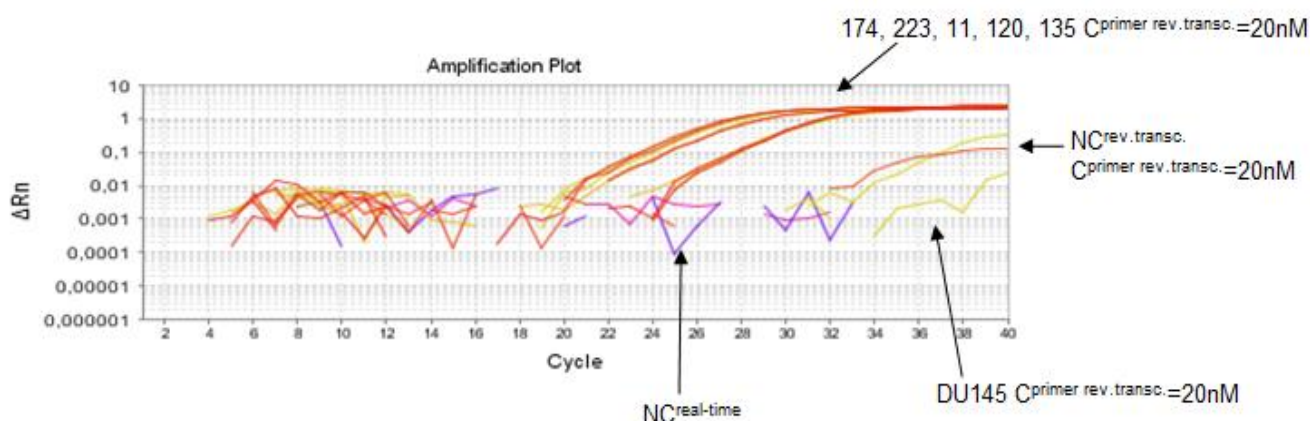
6.3.3. Σχεδιασμός και έλεγχος ειδικότητας και απόδοσης νέου stem-loop RT εκκινητή για το miR-34a

Σε πρώτο στάδιο σχεδιάστηκε και συντέθηκε νέος miR-34a specific stem-loop RT εκκινητής (5'-CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGACAACCAGCTA-3'), ο οποίος και χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των επιπέδων του miR-34a σε δείγματα ορού. Ο νέος αυτός RT εκκινητής φέρει στο 3'-άκρο του τρία (3) επιπλέον συμπληρωματικά του miR-34a νουκλεοτίδια σε σχέση με τον αρχικό RT εκκινητή που είχε χρησιμοποιηθεί μέχρι τώρα. Ο σχεδιασμός αυτός επιχειρεί την αύξηση της miR-34a ειδικής αλληλουχίας του RT εκκινητή και με αυτό τον τρόπο την αύξηση της ειδικότητάς του για το miR-34a υπόστρωμα.

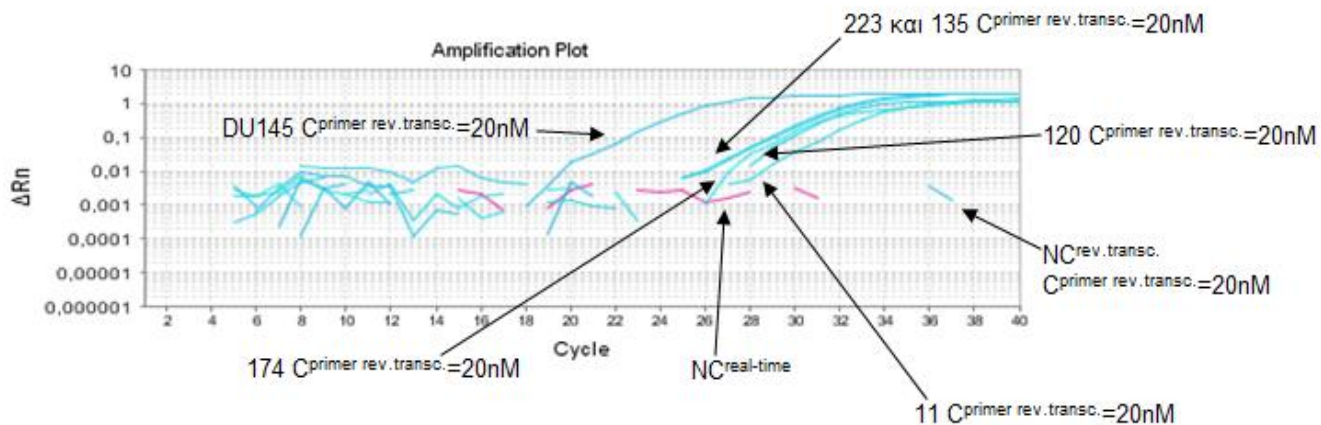
Διατηρώντας τα πρωτόκολλα προσδιορισμού των cel-miR-39 και hsa-miR-146a, όπως παρουσιάζεται παραπάνω, επιχειρήθηκε ο έλεγχος των cel-miR-39, hsa-miR-146a και hsa-miR-34a σε δείγματα ορού ασθενών με επιληψία που χρησιμοποιήθηκαν και στην προηγούμενη υποενότητα της εργασίας, με τη χρήση του νέου RT εκκινητή.

Στο σύνολο των δειγμάτων αυτών πραγματοποιήθηκε multiple miR-specific reverse transcription των cel-miR-39, hsa-miR-34a και hsa-miR-146a με συγκέντρωση RT εκκινητών 20 nM ανά αντίδραση. Η συγκέντρωση των πρόσθιων

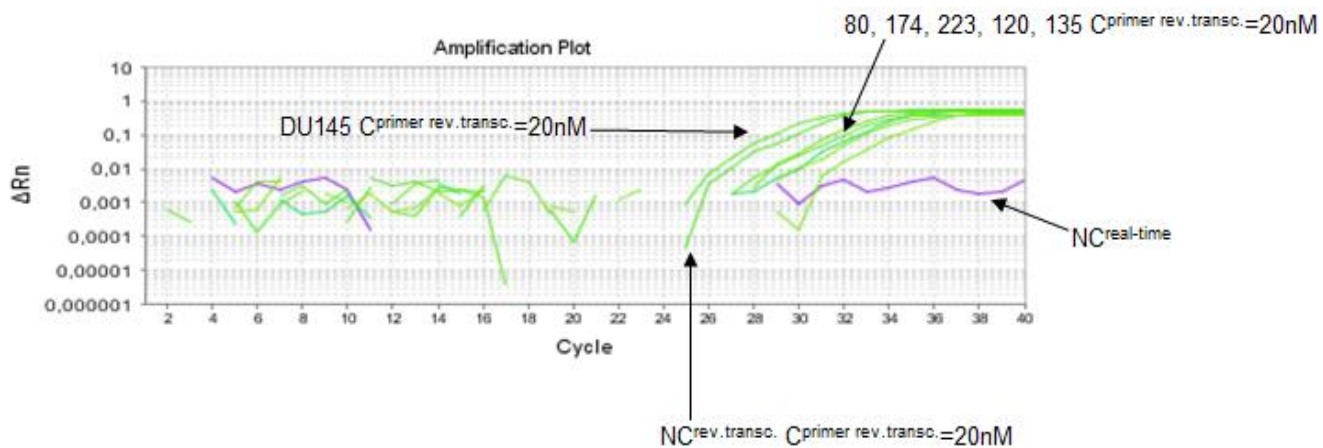
(F) εκκινήτων της real - time qPCR αντίδρασης για κάθε μόριο στόχο ήταν 250 nM, των ανάστροφων (R) εκκινήτων 100 nM και των ειδικών TaqMan probes 62,5 nM. Στις ακόλουθες εικόνες παρουσιάζονται οι καμπύλες ενίσχυσης (καμπύλες φθορισμού) των υπό μελέτη miRNAs στα δείγματα ορού ασθενών με επιληψία και την κυτταρική σειρά DU145, καθώς και τα control δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της απόδοσης και της ειδικότητας του νέου RT εκκινήτη.



Εικόνα 47. Γραφική παράσταση του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της Real – Time PCR αντίδρασης (καμπύλες ενίσχυσης) του *cel-miR-39* για δείγματα ορού (174, 223, 11, 120 και 135) ασθενών με επιληψία και για την κυτταρική σειρά DU145. Επισημαίνονται με βέλη οι συγκεντρώσεις των RT εκκινήτων, καθώς και τα control δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.



Εικόνα 48. Γραφική παράσταση του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της *Real – Time PCR* αντίδρασης (καμπύλες ενίσχυσης) του *hsa-miR-146a* για δείγματα ορού (174, 223, 11, 120 και 135) ασθενών με επιληψία και για την κυτταρική σειρά DU145. Επισημαίνονται με βέλη οι συγκεντρώσεις των RT εκκινήτων, καθώς και τα control δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.



Εικόνα 49. Γραφική παράσταση του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της *Real – Time PCR* αντίδρασης (καμπύλες ενίσχυσης) του *hsa-miR-34a* για δείγματα ορού (80, 174, 223, 120 και 135) ασθενών με επιληψία και για την κυτταρική σειρά DU145. Επισημαίνονται με βέλη οι συγκεντρώσεις των RT εκκινήτων, καθώς και τα control δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.

Από τον έλεγχο των ανώτερων δειγμάτων ορού επιβεβαιώνεται η ικανοποιητική απόδοση και ειδικότητα της μεθόδου μας για τον προσδιορισμό του *hsa-miR-146a* μορίου στόχου και του *cel-miR-39* μορίου αναφοράς σε δείγματα ορού ασθενών με επιληψία. Ενίσχυση τόσο του *cel-miR-39* μορίου αναφοράς, όσο και του *hsa-miR-146a* μορίου στόχου παρατηρήθηκε στο σύνολο των υπό μελέτη

δειγμάτων, ενώ ο έλεγχος των NC^{rev.transc.} δειγμάτων ανέδειξε την απουσία μη ειδικών προϊόντων από τη μεθοδολογία μας.

Η χρήση του νέου miR-34a specific stem-loop RT εκκινητή, δε βελτίωσε την εικόνα σχηματισμού μη ειδικών προϊόντων της μεθόδου προσδιορισμού τους, όπως φανερώνεται από τον έλεγχο των NC^{rev.transc.} δειγμάτων του. Συγχρόνως, δεν παρατηρείται βελτίωση (μείωση) των τιμών C_T των δειγμάτων ορού των ελεγχθέντων ασθενών. Τα αποτελέσματα αυτά δεν επιτρέπουν τη χρήση του νέου RT εκκινητή στη μέθοδο προσδιορισμού του miR-34a. Για τη βελτίωση της παραγωγής μη ειδικού προϊόντος επιχειρήθηκε στην συνέχεια ο σχεδιασμός νέου πρόσθιου (F) εκκινητή της real - time qPCR αντίδρασης.

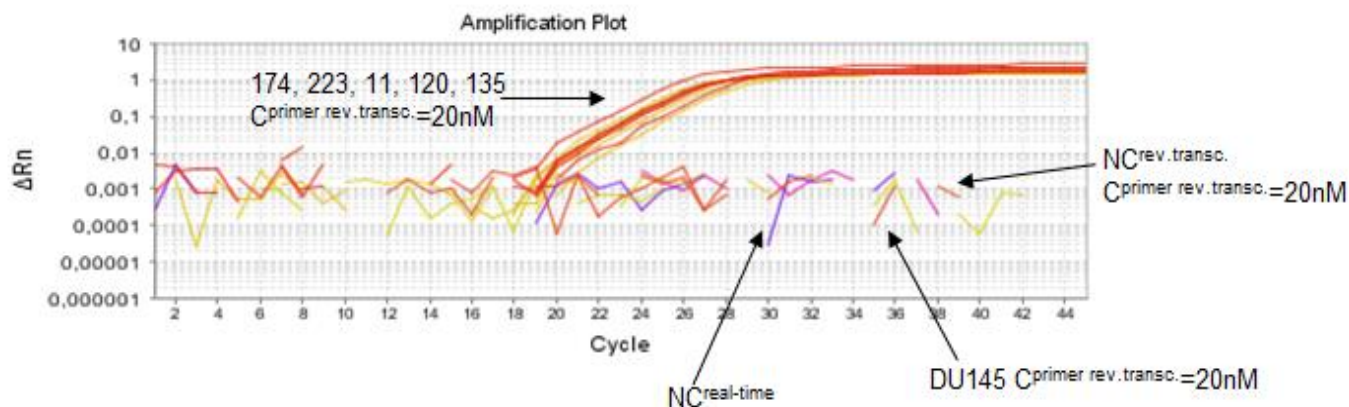
6.3.4. Σχεδιασμός και έλεγχος ειδικότητας και απόδοσης νέου πρόσθιου F εκκινητή για το miR-34a

Στη συνέχεια επιχειρήθηκε ο σχεδιασμός νέου πρόσθιου (F) εκκινητή της real - time qPCR αντίδρασης (5'-ACACTCCAGCTGGGTGGCAGTGTCTTAGCTGG-3'), ο οποίος και χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των επιπέδων του miR-34a. Ο νέος αυτός πρόσθιος (F) εκκινητής φέρει στο 3'-άκρο του δύο (2) επιπλέον συμπληρωματικά του miR-34a νουκλεοτίδια σε σχέση με τον αρχικό F εκκινητή που είχε χρησιμοποιηθεί μέχρι τώρα. Ο σχεδιασμός αυτός επιχειρεί την αύξηση της miR-34a ειδικής αλληλουχίας του F εκκινητή και με αυτό τον τρόπο την αύξηση της ειδικότητάς του για το miR-34a υπόστρωμα.

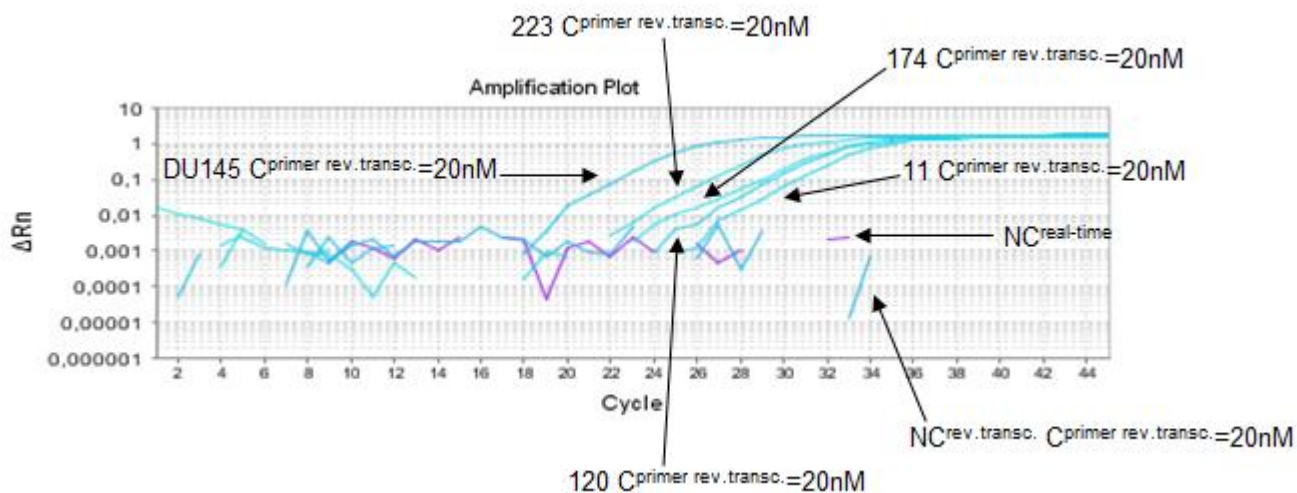
Διατηρώντας το πρωτόκολλο προσδιορισμού των cel-miR-39 και hsa-miR-146a, όπως παρουσιάζεται παραπάνω, πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος των cel-miR-39, hsa-miR-146a και hsa-miR-34a σε δείγματα ορού ασθενών με επιληψία με τη χρήση του νέου F εκκινητή στην qPCR αντίδραση.

Στο σύνολο των δειγμάτων αυτών πραγματοποιήθηκε multiple miR-specific reverse transcription των cel-miR-39, hsa-miR-34a και hsa-miR-146a με συγκέντρωση RT εκκινητών 20 nM ανά αντίδραση. Η συγκέντρωση των πρόσθιων (F) εκκινητών της real - time qPCR αντίδρασης για κάθε μόριο στόχο ήταν 250 nM, των ανάστροφων (R) εκκινητών 100 nM και των ειδικών TaqMan probes 62,5 nM. Στις ακόλουθες εικόνες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ελέγχου των υπό μελέτη

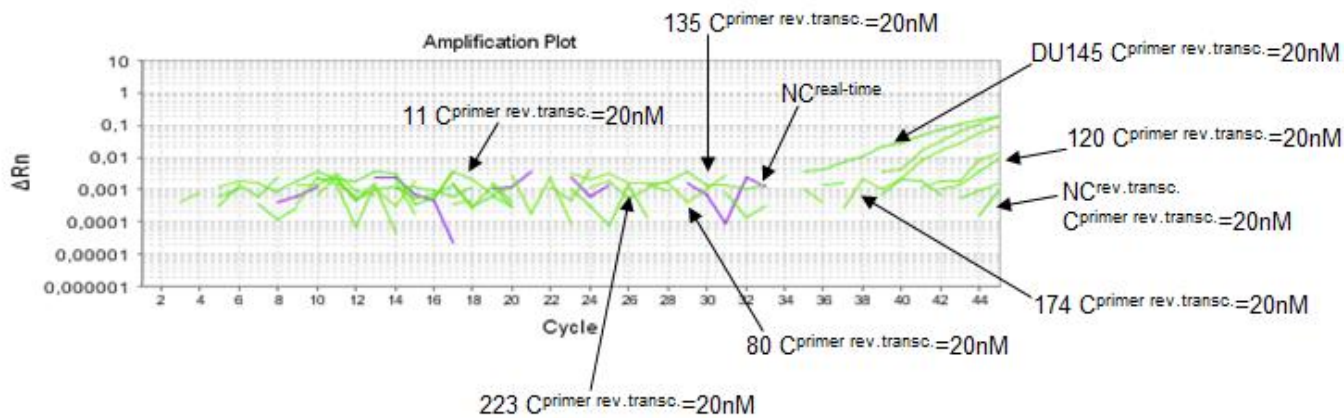
miRNAs στα δείγματα ορού ασθενών με επιληψία και την κυτταρική σειρά DU145, καθώς και τα control δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.



Εικόνα 50. Γραφική παράσταση του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της Real – Time PCR αντίδρασης (καμπύλες ενίσχυσης) του *cel-miR-39* για δείγματα ορού (174, 223, 11, 120 και 135) ασθενών με επιληψία και για την κυτταρική σειρά DU145. Επισημαίνονται με βέλη οι συγκεντρώσεις των RT εκκινήτων, καθώς και τα control δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.



Εικόνα 51. Γραφική παράσταση του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της Real – Time PCR αντίδρασης (καμπύλες ενίσχυσης) του *hsa-miR-146a* για δείγματα ορού (174, 223, 11 και 120) ασθενών με επιληψία και για την κυτταρική σειρά DU145. Επισημαίνονται με βέλη οι συγκεντρώσεις των RT εκκινήτων, καθώς και τα control δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.



Εικόνα 52. Γραφική παράσταση του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της *Real – Time PCR* αντίδρασης (καμπύλες ενίσχυσης) του *hsa-miR-34a* για δείγματα ορού (80, 174, 223, 120 και 135) ασθενών με επιληψία και για την κυτταρική σειρά DU145. Επισημαίνονται με βέλη οι συγκεντρώσεις των RT εκκινήτων, καθώς και τα *control* δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.

Παρατηρήθηκε η ικανοποιητική απόδοση και ειδικότητα της μεθόδου μας για τον προσδιορισμό του *hsa-miR-146a* μορίου στόχου και του *cel-miR-39* μορίου αναφοράς σε δείγματα ορού ασθενών με επιληψία. Ενίσχυση τόσο του *cel-miR-39* μορίου αναφοράς, όσο και του *hsa-miR-146a* μορίου στόχου παρατηρήθηκε στο σύνολο των υπό μελέτη δειγμάτων, ενώ ο έλεγχος των $NC^{rev.transc.}$ δειγμάτων ανέδειξε την απουσία μη ειδικών προϊόντων από τη μεθοδολογία μας.

Ως προς το *hsa-miR-34a* δεν παρατηρήθηκε καμπύλη ενίσχυσης στα δείγματα ορού της μελέτης μας αναδεικνύοντας έτσι ότι ο νέος πρόσθιος (F) εκκινήτης της *real - time qPCR* αντίδρασης δεν αποδίδει στη συγκεκριμένη περίπτωση.

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η επιληψία αποτελεί μία από τις συχνότερες νευρολογικές διαταραχές παγκοσμίως. Οι περισσότερες προσπάθειες που βασίστηκαν στη στόχευση ενός γονιδίου με σκοπό τη διακοπή και την πρόληψη της επιληψίας, έπεσαν στο κενό. Σε αυτό το σημείο τα miRNAs αποτέλεσαν μία καλή εναλλακτική για διάφορους λόγους. Ατομικά miRNAs μπορούν να ρυθμίσουν πολλούς στόχους στο ίδιο κύτταρο και να επηρεάσουν περισσότερα από ένα μονοπάτια. Πράγματι, πάνω από το 60% των πρωτεϊνών αποτελούν προβλεπόμενους στόχους των miRNA [279]. Επίσης διάφορες παθολογικές διαδικασίες που διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην επιληψία, όπως ο νευρωνικός θάνατος, η φλεγμονή και η γλοίωση βρίσκονται υπό τον έλεγχο των miRNAs [280].

Η επιληψία του κροταφικού λοβού (Temporal Lobe Epilepsy, TLE) αποτελεί μία από τις πιο μελετημένες κατηγορίες επιληψίας. Η πιο κοινή μορφή της είναι η επιληψία μέσου κροταφικού λοβού (Mesial Temporal Lobe Epilepsy, MTLE) και πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι τα miRNAs πιθανόν να διαδραματίζουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο σε μονοπάτια φλεγμονής στη MTLE [284, 285]. Σε ασθενείς με αυτόν τον τύπο επιληψίας έχουν παρατηρηθεί σημαντικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης του miR-146a [286, 287].

Τα miRNAs αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές του νευρωνικού θανάτου που επάγεται από επιληπτικές κρίσεις και είναι πολύ πιθανόν αυτά τα μικρά μόρια και να αποτελέσουν νέους θεραπευτικούς στόχους για την επιληψία. Συγκεκριμένα, πρόσφατα παρατηρήθηκε πως το miR-34a φαίνεται να παίζει ρόλο κλειδί στο μηχανισμό για την επαγωγή κρίσεων που επάγουν το θάνατο των νευρώνων [283, 296, 297]. Τα miRNAs εντοπίζονται σε ένα ευρύ φάσμα ιστών και εξωκυττάρων υγρών, όπως ο ορός και το πλάσμα του αίματος, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, τα δάκρυα, το σάλιο, τα ούρα και το αμνιακό υγρό [297, 298]. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το ότι είναι πολύ μικρά σταθερά μόρια τα καθιστούν πολύ καλούς βιοδείκτες για την επιληπτογένεση ή ακόμα και για την πρόγνωση της επιληψίας. Ειδικότερα, miRNAs που έχουν απομονωθεί από το αίμα έχει βρεθεί ότι μπορούν αξιοποιηθούν κλινικά ως νέοι βιοδείκτες της ασθένειας.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση νέων μοριακών μεθοδολογιών προσδιορισμού των επιπέδων των hsa-miR-34a και hsa-miR-146a σε δείγματα ορού ασθενών με επιληψία. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές: α. DU145, κυτταρική σειρά καρκίνου του προστάτη, β. BT-20, κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού, γ. AGS, κυτταρική σειρά καρκίνου του στομάχου και δ. DLD-1, κυτταρική σειρά καρκίνου του παχέος εντέρου, καθώς και 24 δείγματα ορού ασθενών με φαρμακοανθεκτική επιληψία και 24 δείγματα ορού ασθενών που δεν εμφανίζουν φαρμακοανθεκτική επιληψία. Ταυτόχρονα, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν miRNA-ειδικοί stem-loop εκκινητές της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής (miRNA-specific stem-loop RT primers), miRNA-ειδικοί πρόσθιοι (F) εκκινητές και universal ανάστροφου (R) εκκινητή της qPCR αντίδρασης, καθώς και miRNA-ειδικών TaqMan-MGB ανιχνευτών (TaqMan-MGB probes). Τελικά επιχειρήθηκε η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση νέων ευαίσθητων και επαναλήψιμων μοριακών μεθοδολογιών ποσοτικού προσδιορισμού των miRNA μορίων στόχων σε δείγματα ορού ασθενών με επιληψία.

Αναλυτικότερα, στα ανώτερα δείγματα πραγματοποιήθηκε αρχικά απομόνωση ολικού RNA του ορού μέσω του αντιδραστήριου TRI Reagent BD, το οποίο αποτελεί μία προσαρμογή της μεθόδου Chomczynski - Sacchi και εκχύλιση με τη βοήθεια χλωροφορμίου - ισοπροπανόλης. Ακολούθησε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής του RNA σε cDNA με χρήση ειδικών για τα miRNA-στόχους stem-loop εκκινητές (miRNA-specific primers), η οποία πραγματοποιήθηκε σε δύο φάσεις και τελικά πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των cDNA μορίων με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real – time PCR) με χρήση miRNA-ειδικών TaqMan-MGB ανιχνευτών (TaqMan-MGB probes). Ως ενδογενής μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε cel-miR-39. Τα δείγματα RNA των κυτταρικών σειρών όπως και τα δείγματα RNA από τον ορό ασθενών με επιληψία είχαν εμβολιστεί (spiked) πριν την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής με συγκεκριμένη ποσότητα από το cel-miR-39.

Πρώτα ελέγχθηκε η απόδοση της μεθοδολογίας μας με χρήση single miR-specific reverse transcription (μονή miR-ειδικής αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής) και έπειτα με multiple miR-specific reverse transcription (πολλαπλή miR-ειδικής αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής) για τα cel-miR-39, hsa-miR-

146a και hsa-miR-34a με ίδια συγκέντρωση RT εκκινητή για κάθε μόριο στόχο στις τέσσερις κυτταρικές σειρές της μελέτης μας. Παρατηρήθηκε η ικανοποιητική ενίσχυση των μορίων-στόχων μας, τόσο από τη χρήση της single- ,όσο και από της multiple- miR-specific reverse transcription, καθώς και η απουσία φαινομένων αναστολής στις qPCR αντιδράσεις. Στο hsa-miR-146a με $C_T > 36$ για τα NC^{rev.transc.} δείγματα αναδεικνύει την απουσία/μικρή ενίσχυση μη ειδικών προϊόντων από τη μεθοδολογία μας. Για το cel-miR-39 παρατηρήθηκε ενίσχυση και για τις τέσσερις κυτταρικές σειρές στα ίδια επίπεδα, όπως αναμενόταν, αφού προστέθηκε στην ίδια ποσότητα το γονίδιο cel-miR-39 στα δείγματα ορού. Ωστόσο, ως πόρισμα από τον έλεγχο των NC^{rev.transc.} αναδείχθηκε η ενίσχυση μη ειδικών προϊόντων στην περίπτωση του hsa-miR-34a απαιτώντας την περαιτέρω βελτιστοποίηση των μεθόδων.

Προκειμένου λοιπόν να μειωθεί η παραγωγή του μη ειδικού προϊόντος στη μεθοδολογία προσδιορισμού του hsa-miR-34a ακολούθησε βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης των miR-ειδικών RT εκκινητών στην αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής. Χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις RT εκκινητών 200 nM, 50 nM, 20 nM και 10 nM ανά αντίδραση για το hsa-miR-34a στις κυτταρικές σειρές DU145 και BT-20. Παρατηρήθηκαν ικανοποιητικές εικόνες καμπυλών ενίσχυσης σε όλες τις συγκεντρώσεις. Ο έλεγχος των NC^{rev.transc.} όμως, ανέδειξε και εδώ την ενίσχυση μη ειδικών προϊόντων κατά την μεθοδολογία προσδιορισμού του hsa-miR-34a, παρόλο που το σήμα τους μειώνεται, οδηγώντας μας στο συμπέρασμα ότι απαιτείται περαιτέρω βελτιστοποίηση των μεθόδων.

Στη συνέχεια, επιχειρήθηκε η βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης του miR-34a-ειδικού TaqMan probe στη real-time qPCR αντίδραση. Ο miR-34a MGB TaqMan probe χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 62,5 nM και σε 31,25 nM σε κάθε αντίδραση. Η διαφοροποίηση της ενίσχυσης του hsa-miR-34a μεταξύ των δυο χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων του miR-34a-ειδικού MGB probe στις δυο κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μικρή. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση στο σχηματισμό του μη ειδικού προϊόντος κατά τον προσδιορισμό του hsa-miR-34a, παρόλο που το σήμα του μειώνεται, απαιτώντας με αυτόν τον τρόπο περαιτέρω βελτιστοποίηση.

Ακολούθησαν οι βελτιστοποιήσεις πρώτα της συγκέντρωσης του universal ανάστροφου R εκκινητή και έπειτα του πρόσθιου F εκκινητή στη real-time qPCR

αντίδραση, με στόχο τη μείωση παραγωγής μη ειδικού προϊόντος στη μεθοδολογία προσδιορισμού του hsa-miR-34a. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τη βελτιστοποίηση της ποσότητας του universal ανάστροφου (R) εκκινητή και του πρόσθιου (F) εκκινητή της real - time qPCR αντίδρασης ήταν 500 nM, 250 nM και 100 nM ανά αντίδραση. Παρατηρήθηκε πολύ μικρή διαφοροποίηση της ενίσχυσης του hsa-miR-34a μεταξύ των δυο χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων τόσο του ανάστροφου (R) εκκινητή όσο και πρόσθιου (F) εκκινητή στις δυο κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν. Τα παραπάνω συμπεράσματα επιβεβαιώνουν την ικανότητα προσδιορισμού του hsa-miR-34a σε όλο το εύρος των χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων. Επίσης ως προς την παραγωγή μη ειδικού προϊόντος παρατηρήθηκε σημαντική μείωσή του, λόγω της διαδοχικής μείωσης της ποσότητας των χρησιμοποιούμενων R και F εκκινητών. Ένα συμπέρασμα λοιπόν που μπορεί να διεξαχθεί σε αυτό το σημείο είναι η αναγκαία χρήση των εν λόγω εκκινητών της real - time qPCR αντίδρασης σε μικρές ποσότητες.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση των μεθοδολογιών προσδιορισμού των hsa-miR-34a και hsa-miR-146a σε δείγματα ορού ασθενών με επιληψία (ανθεκτικών και μη ανθεκτικών στη φαρμακοθεραπεία), καθώς και της κυτταρικής σειράς DU145. Έγινε έλεγχος της μεθοδολογίας μας τόσο από τη χρήση συγκέντρωσης RT εκκινητών 20 nM ανά αντίδραση όσο και 10 nM ανά αντίδραση με χρήση multiple miR-specific reverse transcription (πολλαπλή miR-ειδικής αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής) για τα cel-miR-39, hsa-miR-34a και hsa-miR-146a και την κυτταρική σειρά DU145. Παρατηρήθηκε λοιπόν ικανοποιητική ενίσχυση των μορίων-στόχων σε όλα τα δείγματα ορού ασθενών με επιληψία της μελέτης μας. Η μικρή διαφορά των C_T μεταξύ των δειγμάτων από τη χρήση 20 nM και 10 nM miR-ειδικών RT εκκινητών μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η μεθοδολογία μας και στις δυο συγκεντρώσεις παρουσιάζει ικανοποιητική απόδοση. Η ελάχιστη αύξηση του C_T από την χρήση 10 nM RT εκκινητή σε σχέση με τα 20 nM είναι αναμενόμενη.

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά στο cel-miR-39, η ικανοποιητική ενίσχυση του στο σύνολο των δειγμάτων μας, επιβεβαιώνει την παρόμοια απόδοση απομόνωσης του ολικού RNA από τα δείγματα ορού, την παρόμοια απόδοση των

RT και real-time qPCR αντιδράσεων μεταξύ των δειγμάτων και την απουσία αναστολέων των αντιδράσεων.

Για το hsa-miR-146a, παρατηρήσαμε την ικανοποιητική ενίσχυσή του στο σύνολο των δειγμάτων ορού και την κυτταρική σειρά DU145. Ο έλεγχος των NC^{rev.transc.} δειγμάτων για το hsa-miR-146a ανέδειξε την απουσία μη ειδικών προϊόντων από τη μεθοδολογία μας, επιτρέποντας την υιοθέτησή της για τον ποσοτικό προσδιορισμό του σε δείγματα ορού ασθενών με επιληψία.

Όσον αφορά στο hsa-miR-34a παρατηρήθηκαν καμπύλες ενίσχυσης στο σύνολο των ελεγχθέντων δειγμάτων, ωστόσο σε σχετικά μεγάλες τιμές C_T αναδεικνύοντας, είτε τη μικρή συγκέντρωσή του στον ορό των ασθενών, είτε τη μη ικανοποιητική απόδοση της μεθοδολογίας προσδιορισμού μας. Επίσης η ενίσχυση και μη ειδικού προϊόντος από τον έλεγχο των NC^{rev.transc.} δειγμάτων μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι χρειάζεται η περαιτέρω βελτιστοποίηση της μεθοδολογίας.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος των cel-miR-39, hsa-miR-146a και hsa-miR-34a σε σύνολο 20 δειγμάτων ορού ασθενών με επιληψία, για την επιβεβαίωση της ικανοποιητικής απόδοσής του σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων ακολουθώντας την ίδια μεθοδολογία προσδιορισμού με την προηγούμενη φορά για τα συγκεκριμένα microRNAs. Ο έλεγχος των δειγμάτων ορού επιβεβαίωσε την ικανοποιητική απόδοση και ειδικότητα της μεθόδου μας για τον προσδιορισμό του hsa-miR-146a μορίου στόχου και του cel-miR-39 μορίου αναφοράς σε δείγματα ορού ασθενών με επιληψία. Ενίσχυση τόσο του cel-miR-39 μορίου αναφοράς, όσο και του hsa-miR-146a μορίου στόχου παρατηρήθηκε στο σύνολο των υπό μελέτη δειγμάτων, ενώ ο έλεγχος των NC^{rev.transc.} δειγμάτων ανέδειξε την απουσία μη ειδικών προϊόντων από τη μεθοδολογία μας.

Ως προς το hsa-miR-34a, η ενίσχυσή του στο σύνολο των δειγμάτων μας πραγματοποιήθηκε σε σχετικά μεγάλες τιμές C_T και χωρίς σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των υπό μελέτη δειγμάτων. Συγχρόνως, από τον έλεγχο των NC^{rev.transc.} δειγμάτων παρατηρήσαμε σημαντική ενίσχυση μη ειδικών προϊόντων σε παρόμοια επίπεδα με την ενίσχυση του hsa-miR-34a στα δείγματα, αναδεικνύοντας την απουσία ειδικότητας στη μεθοδολογία μας. Για το λόγο αυτό αποφασίστηκε ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων miR-34a-ειδικών RT εκκινήτων και πρόσθιου (F) εκκινήτη της real - time qPCR αντίδρασης.

Για το σκοπό αυτό σχεδιάστηκε και συντέθηκε νέος miR-34a specific stem-loop RT εκκινητής (5'-CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGACAACCAGCTA-3'), ο οποίος και χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των επιπέδων του miR-34a σε δείγματα ορού. Ο νέος αυτός RT εκκινητής φέρει στο 3'-άκρο του τρία (3) επιπλέον συμπληρωματικά του miR-34a νουκλεοτίδια σε σχέση με τον αρχικό RT εκκινητή που είχε χρησιμοποιηθεί τις προηγούμενες φορές. Ο σχεδιασμός αυτός επιχειρεί την αύξηση της miR-34a ειδικής αλληλουχίας του RT εκκινητή και με αυτό τον τρόπο την αύξηση της ειδικότητάς του για το miR-34a υπόστρωμα.

Επιχειρήθηκε ο έλεγχος των cel-miR-39, hsa-miR-146a και hsa-miR-34a σε δείγματα ορού ασθενών με επιληψία που χρησιμοποιήθηκαν και στο προηγούμενο πείραμα, με τη χρήση του νέου RT εκκινητή. Από τον έλεγχο των δειγμάτων ορού επιβεβαιώθηκε η ικανοποιητική απόδοση και ειδικότητα της μεθόδου μας για τον προσδιορισμό του hsa-miR-146a μορίου στόχου και του cel-miR-39 μορίου αναφοράς σε δείγματα ορού ασθενών με επιληψία. Ενίσχυση τόσο του cel-miR-39 μορίου αναφοράς, όσο και του hsa-miR-146a μορίου στόχου παρατηρήθηκε στο σύνολο των υπό μελέτη δειγμάτων, ενώ ο έλεγχος των NC^{rev.transc.} δειγμάτων ανέδειξε την απουσία μη ειδικών προϊόντων από τη μεθοδολογία μας.

Η χρήση του νέου miR-34a specific stem-loop RT εκκινητή, δε βελτίωσε την εικόνα σχηματισμού μη ειδικών προϊόντων της μεθόδου προσδιορισμού τους, όπως φάνηκε από τον έλεγχο των NC^{rev.transc.} δειγμάτων του. Συγχρόνως, δεν παρατηρήθηκε μείωση των τιμών C_T των δειγμάτων ορού των ελεγχθέντων ασθενών. Συμπεραίνουμε λοιπόν από αυτά τα αποτελέσματα ότι ο νέος RT εκκινητής δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη μέθοδο προσδιορισμού του miR-34a. Για τη βελτίωση της παραγωγής μη ειδικού προϊόντος επιχειρήθηκε στη συνέχεια ο σχεδιασμός νέου πρόσθιου (F) εκκινητή της real - time qPCR αντίδρασης.

Ο νέος αυτός πρόσθιος (F) εκκινητής φέρει στο 3'-άκρο του δύο (2) επιπλέον συμπληρωματικά του miR-34a νουκλεοτίδια σε σχέση με τον αρχικό F εκκινητή που είχε χρησιμοποιηθεί μέχρι τώρα. Με το σχεδιασμό αυτό θελήσαμε να αυξήσουμε τη miR-34a ειδική αλληλουχία του F εκκινητή και κατ' επέκταση την αύξηση της ειδικότητάς του για το miR-34a υπόστρωμα. Η χρήση του νέου F εκκινητή στην qPCR αντίδραση ανέδειξε την ικανοποιητική απόδοση και ειδικότητα της μεθόδου μας για τον προσδιορισμό του hsa-miR-146a μορίου στόχου και του

cel-miR-39 μορίου αναφοράς σε δείγματα ορού ασθενών με επιληψία. Ενίσχυση τόσο του cel-miR-39 μορίου αναφοράς, όσο και του hsa-miR-146a μορίου στόχου παρατηρήθηκε στο σύνολο των υπό μελέτη δειγμάτων, ενώ από τον έλεγχο των NC^{rev.transc.} δειγμάτων παρατηρήθηκε απουσία μη ειδικών προϊόντων από τη μεθοδολογία μας. Σχετικά με το hsa-miR-34a δεν παρατηρήθηκε καμπύλη ενίσχυσης στα δείγματα ορού της μελέτης μας. Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι ο νέος πρόσθιος (F) εκκινητής της real - time qPCR αντίδρασης δεν αποδίδει στη συγκεκριμένη περίπτωση.

Εν κατακλείδι, τόσο από τα βιβλιογραφικά δεδομένα όσο και από τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας διαφαίνεται ότι το hsa-miR-146a εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε ανθρώπινες καρκινικές σειρές, όπως και σε δείγματα ορού ασθενών με επιληψία (ανθεκτικών και μη ανθεκτικών στη φαρμακοθεραπεία). Οι βελτιστοποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν έδωσαν ικανοποιητικές εικόνες για το συγκεκριμένο miRNA επιβεβαιώνοντας την ειδικότητα και την απόδοση των μεθοδολογιών προσδιορισμού που ακολουθήθηκαν. Αυτό δίνει τη δυνατότητα υιοθέτησής τους σε περιπτώσεις ποσοτικού προσδιορισμού του hsa-miR-146a είτε σε καρκινικές κυτταρικές σειρές είτε σε δείγματα ορού ασθενών με επιληψία.

Από την άλλη το hsa-miR-34a δεν εκφράζεται ικανοποιητικά σε δείγματα ορού ασθενών με επιληψία (ανθεκτικών και μη ανθεκτικών στη φαρμακοθεραπεία). Το miRNA αυτό σε όσες περιπτώσεις βελτιστοποιήσεων επιχειρήθηκαν δεν απέδωσε. Η ανάπτυξη των μοριακών μεθοδολογιών προσδιορισμού των hsa-miR-34a και hsa-miR-146a σε δείγματα ορού ασθενών με επιληψία που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία θα μπορούσε να βελτιστοποιηθεί, ώστε να εφαρμοστεί για τη διερεύνηση της έκφρασης των επιπέδων των συγκεκριμένων μορίων στόχων και σε άλλα υγρά (πλάσμα αίματος, ούρα). Απομένει να διεξαχθεί μεταγενέστερη μελέτη με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών και τη χρήση μαρτύρων που θα επιτρέπει τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για τα miRNAs που μελετήθηκαν. Επίσης μένει να απαντηθεί κατά πόσο αυτά τα μόρια μπορούν να συμβάλλουν στη βελτιστοποίηση της πρόγνωσης της επιληψίας.

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ MicroRNAs ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΕΠΙΛΗΨΙΑ

Παπαγρηγορίου Μαρία Ελένη, Βιολόγος, Πανεπιστημίου Πατρών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η επιληψία ορίζεται ως η διαταραχή του εγκεφάλου που χαρακτηρίζεται από τη διαρκή προδιάθεση για την εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων και από τις νευροβιολογικές, γνωστικές, ψυχολογικές και κοινωνικές συνέπειες αυτής της κατάστασης, σύμφωνα με τη Διεθνή Ένωση κατά της Επιληψίας (International League Against Epilepsy - ILAE) το 2005. Πρόσφατα ωστόσο (ILAE 2014), διατυπώθηκε και ένας δεύτερος ορισμός με βάση τον οποίο επιληψία είναι η ασθένεια του εγκεφάλου, η οποία ορίζεται από οποιαδήποτε από τις ακόλουθες συνθήκες: i) ιστορικό δύο τουλάχιστον επεισοδίων σπασμών με περισσότερες από 24 ώρες διαφορά μεταξύ τους, ii) ένα απρόκλητο επεισόδιο σπασμών και η πιθανότητα περαιτέρω επεισοδίων με τον κίνδυνο επανεμφάνισης να αγγίζει τουλάχιστον το 60% μετά από δύο απρόκλητα επεισόδια σπασμών, που μπορεί να συμβούν μέσα στα επόμενα 10 χρόνια και iii) διάγνωση ενός επιληπτικού συνδρόμου. Η επιληψία αποτελεί μία από τις παλαιότερες καταστάσεις που έχει γνωρίσει η ανθρωπότητα, η οποία επηρεάζει άτομα όλων των ηλικιών. Υπολογίζεται ότι περίπου 50.000.000 άτομα παγκοσμίως έχουν διαγνωσθεί με επιληψία με συχνότητα εμφάνισης 24-53/100.000 σε άτομα στις αναπτυγμένες χώρες, αποτελώντας έτσι μία από τις πιο κοινές νευρολογικές διαταραχές σε παγκόσμιο επίπεδο.

Τα miRNAs είναι μία κατηγορία μικρών μη κωδικών μορίων, τα οποία ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση εμποδίζοντας τη διαδικασία της πρωτεϊνικής έκφρασης και κατ' επέκταση της μετάφρασης κυρίως με την πρόσδεσή τους στην 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA στόχου. Η απορρύθμισή τους έχει συνδεθεί με ένα μεγάλο αριθμό σημαντικών ασθενειών στον ανθρώπινο οργανισμό, ανάμεσα στις οποίες συγκαταλέγεται και η επιληψία. Τα miRNAs εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό στον ανθρώπινο εγκέφαλο σε σχέση με άλλα όργανα. Έχουν

παρατηρηθεί αλλαγές στα επίπεδα των miRNAs του εγκεφάλου μετά από παρατεταμένη επιληπτική κρίση (SE) σε πειραματικά μοντέλα. Παθολογικές διαδικασίες που διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην επιληψία, όπως ο νευρωνικός θάνατος, η φλεγμονή και η γλοίωση βρίσκονται υπό τον έλεγχο των miRNAs. Εντοπίζονται σε ένα ευρύ φάσμα ιστών και εξωκυττάρων υγρών, όπως ο ορός και το πλάσμα του αίματος και έτσι μπορούν να αξιοποιηθούν κλινικά ως νέοι βιοδείκτες για την επιληπτογένεση ή ακόμα και για την πρόγνωση της επιληψίας.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη και βελτιστοποίηση νέων μοριακών μεθοδολογιών προσδιορισμού των επιπέδων των hsa-miR-34a και hsa-miR-146a σε δείγματα ορού ασθενών με επιληψία. Χρησιμοποιήθηκαν για το λόγο αυτό οι καρκινικές κυτταρικές σειρές DU145, BT-20, AGS και DLD-1, καθώς και 24 δείγματα ορού ασθενών με φαρμακοανθεκτική επιληψία και 24 δείγματα ορού ασθενών που δεν εμφανίζουν φαρμακοανθεκτική επιληψία. Το πειραματικό πρωτόκολλο περιλαμβάνει την απομόνωση ολικού RNA, την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription/RT) του RNA σε cDNA με χρήση ειδικών για τα miRNA-στόχους stem-loop εκκινητές (miRNA-specific primers) και ποσοτικοποίηση των cDNA μορίων με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qReal – time PCR) με χρήση miRNA-ειδικών TaqMan-MGB ανιχνευτών (TaqMan-MGB probes). Ως ενδογενής μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε cel-miR-39.

Ο έλεγχος της απόδοσης της μεθοδολογίας μας πραγματοποιήθηκε αρχικά με εφαρμογή single miR-specific reverse transcription (μονή miR-ειδικής αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής) και έπειτα με multiple miR-specific reverse transcription (πολλαπλή miR-ειδικής αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής) για τα cel-miR-39, hsa-miR-146a και hsa-miR-34a στις τέσσερις κυτταρικές σειρές της μελέτης μας. Παρατηρήθηκε ικανοποιητική ενίσχυση των μορίων-στόχων μας, τόσο από τη χρήση της single- ,όσο και από της multiple- miR-specific reverse transcription, όπως και η απουσία φαινομένων αναστολής στις qPCR αντιδράσεις. Ωστόσο, ο έλεγχος των NC^{rev.transc.} ανέδειξε την ενίσχυση μη ειδικών προϊόντων, ειδικά στην περίπτωση του hsa-miR-34a απαιτώντας την περαιτέρω βελτιστοποίηση των μεθόδων.

Για τη μείωση της παραγωγής του μη ειδικού προϊόντος στη μεθοδολογία προσδιορισμού του hsa-miR-34a ακολούθησε βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης

των miR-ειδικών RT εκκινητών στην αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής και οι εικόνες των καμπυλών ενίσχυσης σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν (200nM-10nM) ήταν ικανοποιητικές. Εντούτοις ο έλεγχος των NC^{rev.transc.} ανέδειξε και εδώ την ενίσχυση μη ειδικών προϊόντων κατά την μεθοδολογία προσδιορισμού του hsa-miR-34a οδηγώντας μας στο συμπέρασμα ότι απαιτείται περαιτέρω βελτιστοποίηση των μεθόδων.

Ακολούθησαν λοιπόν βελτιστοποιήσεις πρώτα της συγκέντρωσης του universal ανάστροφου R εκκινητή και έπειτα του πρόσθιου F εκκινητή στη real-time qPCR αντίδραση, με στόχο τη μείωση παραγωγής μη ειδικού προϊόντος στη μεθοδολογία προσδιορισμού του hsa-miR-34a. Και στις δύο περιπτώσεις επιβεβαιώθηκε η ικανότητα προσδιορισμού του hsa-miR-34a σε όλο το εύρος των χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων, ενώ ως προς την παραγωγή μη ειδικού προϊόντος παρατηρήθηκε σημαντική μείωσή του.

Ο έλεγχος της απόδοσης της μεθοδολογίας μας συνεχίστηκε για τα δείγματα ορού ασθενών με επιληψία και την κυτταρική σειρά DU145, με εφαρμογή multiple miR-specific reverse transcription (πολλαπλή miR-ειδικής αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής και χρήση συγκέντρωσης RT εκκινητών 20 nM ανά αντίδραση όσο και 10 nM ανά αντίδραση για τα cel-miR-39, hsa-miR-146a και hsa-miR-34a. Η απόδοση της μεθόδου μας ήταν ικανοποιητική και για τις δύο συγκεντρώσεις. Για το hsa-miR-146a, παρατηρήσαμε την ικανοποιητική ενίσχυση του hsa-miR-146a στο σύνολο των δειγμάτων ορού και την κυτταρική σειρά DU145, ενώ για το hsa-miR-34a παρατηρήθηκαν καμπύλες ενίσχυσης στο σύνολο των ελεγχθέντων δειγμάτων σε σχετικά μεγάλες τιμές C_T αναδεικνύοντας, είτε τη μικρή συγκέντρωσή του στον ορό των ασθενών, είτε τη μη ικανοποιητική απόδοση της μεθοδολογίας προσδιορισμού μας. Ο έλεγχος των NC^{rev.transc.} δειγμάτων μας, ανέδειξε την ενίσχυση και μη ειδικού προϊόντος και επομένως την ανάγκη για περαιτέρω βελτιστοποίηση.

Μετά από τον έλεγχο της μεθοδολογίας μας σε σύνολο 20 δειγμάτων ορού ασθενών με επιληψία επιβεβαιώθηκε η ικανοποιητική απόδοσή του σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων ακολουθώντας την ίδια μεθοδολογία προσδιορισμού με πριν. Όμως η σημαντική ενίσχυση μη ειδικών προϊόντων σε παρόμοια επίπεδα με την ενίσχυση του hsa-miR-34a στα δείγματα, ανέδειξε την απουσία ειδικότητας στη μεθοδολογία μας και γι' αυτό αποφασίστηκε ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων

miR-34a-ειδικών stem-loop RT εκκινητών και πρόσθιου (F) εκκινητή της real - time qPCR αντίδρασης. Ο νέος miR-34a-ειδικός stem-loop RT εκκινητής δε βελτίωσε την εικόνα σχηματισμού μη ειδικών προϊόντων της μεθόδου, όπως φάνηκε από τον έλεγχο των NC^{rev.transc.} δειγμάτων του. Με το νέο πρόσθιο (F) εκκινητή για το hsa-miR-34a δεν παρατηρήθηκε καμπύλη ενίσχυσης στα δείγματα ορού της μελέτης μας και έτσι συμπεραίνουμε ότι δεν αποδίδει στη συγκεκριμένη περίπτωση.

Συνοπτικά, αναπτύξαμε κι επικυρώσαμε τη μεθοδολογία για την ποσοτικοποίηση του hsa-miR-146a σε δείγματα ορού ασθενών με επιληψία, χρησιμοποιώντας το cel-miR-39 ως γονίδιο αναφοράς για σκοπούς κανονικοποίησης. Η ανάπτυξη ειδικής μεθόδου προσδιορισμού για το hsa-miR-34a δεν ήταν ικανοποιητική. Απαιτούνται μελλοντικές μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών, ώστε να βελτιωθεί η εγκυρότητα για την έκφρασή του σε δείγματα ορού ασθενών με επιληψία.

RESEARCH OF MicroRNAs EXPRESSION LEVELS SERUM OF PATIENTS WITH EPILEPSY

Papagrigoriou Maria Eleni, Biologist, University of Patras

ABSTRACT

Epilepsy is a disorder of the brain characterized by an enduring predisposition to generate epileptic seizures and by the neurobiologic, cognitive, psychological and social consequences of this condition as it was defined by the International League Against Epilepsy (ILAE) in 2005. Recently though (ILAE 2014) epilepsy is also considered as a disease of the brain defined by any of the following conditions: i) at least two unprovoked (or reflex) seizures occurring >24 h apart, ii) one unprovoked (or reflex) seizure and a probability of further seizures similar to the general recurrence risk (at least 60%) after two unprovoked seizures, occurring over the next 10 years and iii) diagnosis of an epilepsy syndrome. Epilepsy is one of the oldest conditions in humanity which affects individuals of all ages. It has been reported that approximately 50,000,000 people worldwide have epilepsy, with an incidence of 24-53/100,000 in developed regions, making it one of the most common neurological diseases globally.

MicroRNAs (miRNAs) is a class of small non-coding RNA which regulates gene expression by preventing the process of protein expression as they bind to the 3'-UTR of the mRNA target. A dysregulation in their expression has been linked to a number of clinically important diseases including epilepsy. MiRNAs are highly expressed in human brain relatively to other organs. Changes to brain miRNA levels following prolonged seizures (status epilepticus) in animal models is a fact. Pathogenic situations which have main role in epilepsy such as neuronal death, inflammation and gliosis are under miRNAs' control. They exist in a wide range of tissues and extracellular body fluids including serum and blood plasma and so they can be used for clinical purpose as new biomarkers for epileptogenesis or even for the prognosis of epilepsy.

In the present study the development and optimization of new molecular assay methods for hsa-miR-34a and hsa-miR-146a levels in serum of patients with

epilepsy has been performed. For this purpose we used tumor cell lines DU145, BT-20, AGS and DLD-1, as well as 24 serum samples from patients with drug-resistant epilepsy and 24 serum samples from patients with no drug-resistant epilepsy. The experiment protocol involved the isolation of total RNA, the reverse transcription of RNA to cDNA using miRNA-specific stem-loop RT primers and quantitation of cDNA with quantitative real time PCR (qPCR), using TaqMan-MGB probes. The cel-miR-39 was used as endogenous control.

The efficacy control of our method was conducted initially by performing single miR-specific reverse transcription and then by multiple miR-specific reverse transcription for cel-miR-39, hsa-miR-146a and hsa-miR-34a in all four cell lines of our study. It was observed satisfactory amplification of our target-molecules either the use of single- or multiple-miR-specific reverse transcription. However, negative control samples revealed the enhancement of non-specific products, specially in hsa-miR-34a requiring further optimization of the method.

Aiming the reduction of non-specific product in hsa-miR-34a assay method we conducted optimization of the miR-specific primers concentration in reverse transcription reactions. The amplification curves for the total of the concentration that have been used were satisfactory. Yet negative control samples showed once more the enhancement of non specific products for hsa-miR-34a, requiring further optimization of the method.

Therefore more optimizations were performed initially for the concentration of the universal R primer and then for the forward primer of the qPCR reaction, aiming to the reduction of non specific product in hsa-miR-34a assay method. In both cases the ability of the assay for hsa-miR-34a was confirmed in the total range of the used concentrations, while a significant reduction for the non specific product was observed.

The efficacy control of our method was evaluated also in serum samples from patients with epilepsy and for the cell line DU145, using multiple miR-specific RT for cel-miR-39, hsa-miR-146a και hsa-miR-34a. The efficacy of our method was satisfactory all the concentrations tested. More precisely, hsa-miR-146a it was observed satisfactory amplification in the vast majority of the serum samples tested as well as for the cell line DU145.

After testing our method in 20 serum samples from patients with epilepsy, a satisfactory efficacy in samples tested following the same assay method was confirmed. However, the significant amplification of non-specific products in similar amplification levels with hsa-miR-34a in samples, indicated the lack of specificity in our assay method and therefore we decided the design of novel miR-34a-specific stem-loop RT primer and forward qPCR primer. The use of the new miR-34a specific stem-loop RT primer did not result in the reduction of non-specific product accumulation, while the use of the new forward qPCR hsa-miR-34a primer did not produce suitable amplification curves.

In summary, we have developed and validated the methodology for the quantification of hsa-miR-146a in serum samples from patients with epilepsy, using cel-miR-39 as endogenous reference gene for normalization purposes. The development of miR-34a specific assay was not satisfactory. Further studies using larger number of patients are required, in order to improve validity for its expression in serum samples from patients with epilepsy.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Menche N. (ed.) *Biologie Anatomie Physiologie*. Munich: Urban & Fischer/ Elsevier; 2012.
2. How does the nervous system work?, PubMed Health – NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0072574/>)
3. [Suzana Herculano-Houzel](#), The Human Brain in Numbers: A Linearly Scaled-up Primate Brain, *Frontiers in Human Neuroscience*, 2009; 3: 31
4. *Discovering the Brain*. Ackerman S. Washington (DC): National Academies Press (US); 1992.
5. *Rosdahl, Caroline; Kowalski, Mary (2008). [Textbook of Basic Nursing \(9th ed.\)](#). Lippincott Williams & Wilkins. p. 189.*
6. [The brain and its main anatomical subdivisions in living hominoids using magnetic resonance imaging.](#), Semendeferi, K, and Damasio H , *J Hum Evol*, 2000 Feb, Volume 38, Issue 2, p.317-32, (2000)
7. [Filley CM](#), Chapter 35: the frontal lobes., [Handb Clin Neurol](#). 2010;95:557-70
8. [Chayer C](#), [Freedman M](#). Frontal Lobe Functions, [Curr Neurol Neurosci Rep](#). 2001 Nov;1(6):547-52.
9. Kolb & Wishaw, Chap. 16, p.392-394
10. Review of Clinical and Functional Neuroscience, Rand S. Swenson, M.D., Ph.D
11. PubMed Health – NCBI, Parietal Lobe, (Source: NIH - National Institute of Neurological Disorders and Stroke) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0024756/>)
12. Blakemore & Frith (2005). *The Learning Brain*. Blackwell Publishing.
13. Penfield, W., & Rasmussen, T. (1950). *The cerebral cortex of a man: A clinical study of localization of function*. New York: Macmillan.
14. [J. A. Kiernan](#), Anatomy of the Temporal Lobe, Department of Anatomy and Cell Biology, The University of Western Ontario, London, ON, Canada N6A 5C1, [Epilepsy Res Treat](#). 2012; 2012: 176157.

15. Smith; Kosslyn (2007). *Cognitive Psychology: Mind and Brain*. New Jersey: Prentice Hall. pp. 21, 194–199, 349.
16. Schacter, Daniel L.; Gilbert, Daniel T.; Wegner, Daniel M. (2010). *Psychology (2nd ed.)*. New York: Worth Publishers.
17. PubMed Health - NCBI, Occipital Lobe, (Source: NIH - National Institute of Neurological Disorders and Stroke) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0024753/>)
18. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, Lamantia AS, McNamara JO, White LE. *Neuroscience*. 4th ed. Sunderland, MA. Sinauer Associates; 2008
19. Vanderah TW, Gould DJ. Nolte's The Human Brain. 7th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2016.
20. Thomas P, Αρζιμάνογλου Α. Επιληψίες. Εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα 2002
21. Magiorkinis E, Kalliopi S, Diamantis A (January 2010). "Hallmarks in the history of epilepsy: epilepsy in antiquity". *Epilepsy & behavior : E&B*. 17 (1): 103–108.
22. Saraceno, B; Avanzini, G; Lee, P, eds. (2005). [Atlas: Epilepsy Care in the World \(PDF\)](#). World Health Organization.
23. History of Epilepsy in Chinese Traditional Medicine, [Epilepsia](#) 32(3):299-302 · June 1991
24. Hallmarks in the History of Epilepsy: From Antiquity Till the Twentieth Century, Emmanouil Magiorkinis, Kalliopi Sidiropoulou and Aristidis Diamantis
25. German Epilepsy Museum Kork - museum for epilepsy and the history of epilepsy - Therapy in the Ancient World (<http://www.epilepsiemuseum.de/english/therapie.html#text1>)
26. John Oxbury "epilepsy" The Oxford Companion to the Mind. Richard L. Gregory. , ό.π, (Περί ιερής νόσου 7, 8, 10, 11, 12. Αφορισμοί Τμήμα πέμπτον 7. Περί αέρων, υδάτων και τόπων, 3, Προρρητικόν 9, 10) ΔΗΜ. ΚΑΡΑΜΠΕΡΟΠΟΥΛΟΣ «Το παιδί στην Ιπποκράτειο Συλλογή»

27. K. Sidiropoulou, A. Diamantis, and E. Magiorkinis, "Hallmarks in 18th- and 19th-century epilepsy research," *Epilepsy and Behavior*, vol. 18, no. 3, pp. 151–161, 2010.
28. F. Gibbs, H. Davis, and W. Lennox, "The electroencephalogram in epilepsy and in conditions of impaired consciousness," *Archives of Neurology and Psychiatry*, vol. 34, no. 6, pp. 1133–1148, 1935.
29. *Highlights in the History of Epilepsy: The Last 200 Years*, Emmanouil Magiorkinis, Aristidis Diamantis, Kalliopi Sidiropoulou, and Christos Panteliadis, *Epilepsy Research and Treatment Volume 2014* (2014)
30. Blumer D (2002). "[The illness of Vincent van Gogh.](#)". *The American Journal of Psychiatry*. 159 (4): 519–26
31. "[Fyodor Dostoevsky](#)". *Charge - The experience of Epilepsy*. Retrieved 2 February 2006
32. Hughes JR (2005). "Did all those famous people really have epilepsy?". *Epilepsy & Behavior*. 6 (2): 115–39.
33. Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 2005;46:470–472.
34. <https://el.wikipedia.org/wiki/Επιληψία>, (last visit March 2017)
35. Pandolfo, M. (Nov 2011). "Genetics of epilepsy.". *Semin Neurol*. 31 (5): 506–18.
36. Ropper AH, Samuels MA. *Adams and Victor's Principles of Neurology*. 9th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2009. Epilepsy and other seizure disorders; pp. 304–338.
37. McNamara JO. Drugs effective in the therapy of the epilepsies. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, editors. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9th ed. New York: McGraw-Hill; 1999. pp. 461–486.

38. Bazil CW, Morrell MJ, Pedley TA. Epilepsy. In: Rowland LP, editor. *Merritt's Neurology*. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. pp. 990–1008.
39. Lowenstein DH. Seizures and epilepsy. In: Fauci AS, Kasper DL, Longo DL, editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 17th ed. New York: McGraw-Hill; 2008. pp. 2498–2512. Section 2: Diseases of the Central Nervous System.
40. Epilepsy Foundation (National Office) <http://www.epilepsyfoundation.org> or <http://www.efa.org/education.firstaid.html>
41. Camfield PR, Camfield CS, Dooley JM, Tibbles J, Fung T, Garner B. Epilepsy after a first unprovoked seizure in childhood. *Neurology* 1985; 35 : 1657-60.
42. Shinnar S, Berg AT, O'Dell C, Newstein D, Moshe SL, Hauser WA. Predictors of multiple seizures in a cohort of children prospectively followed from the time of their first unprovoked seizure. *Ann Neurol* 2000; 48 : 140-7
43. [Fisher RS](#), [Acevedo C](#), [Arzimanoglou A](#), [Bogacz A](#), [Cross JH](#), [Elger CE](#), [Engel J Jr](#), [Forsgren L](#), [French JA](#), [Glynn M](#), [Hesdorffer DC](#), [Lee BI](#), [Mathern GW](#), [Moshé SL](#), [Perucca E](#), [Scheffer IE](#), [Tomson T](#), [Watanabe M](#), [Wiebe S](#). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 2014 Apr;55(4):475-82
44. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia*. 1989;30:389–99.
45. Panayiotopoulos CP. Importance of specifying the type of epilepsy. *Lancet*. 1999;354:2002–3.
46. Holmes GL. Classification of seizures and the epilepsies. In: Schachter SC, Schomer DL, eds. *The comprehensive evaluation and treatment of epilepsy*. San Diego, CA: Academic Press; 1997. p. 1-36
47. Commission of Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia*. 1981;22:489–501.
48. <http://www.neurocenter.com/the-epilepsy-center.aspx>, (last visit March 2017)

49. www.epilepsy.com/learn/types-epilepsy-syndrome, (last visit March 2017)
50. Epilepsy Foundation About epilepsy and seizures. Available at: www.epilepsyfoundation.org/about/statistics.cfm. Accessed January 10, 2010.
51. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. *Epilepsia*. 2010;51:676–685.
52. "[Epilepsy](#)". *Fact Sheets*. [World Health Organization](#). October 2012. Retrieved January 24, 2013.
53. Bhalla, D.; Godet, B.; Druet-Cabanac, M.; Preux, PM. (Jun 2011). "Etiologies of epilepsy: a comprehensive review.". *Expert Rev Neurother*. **11** (6): 861–76
54. National Clinical Guideline Centre (January 2012). [The Epilepsies: The diagnosis and management of the epilepsies in adults and children in primary and secondary care](#) (PDF). National Institute for Health and Clinical Excellence. pp. 119–129.
55. Liigant A, Haldre S, Oun A et al. **Seizure disorders in patients with brain tumors. *Eur. Neurol.* 45(1), 46–51 (2001).**
56. National Clinical Guideline Centre (January 2012). [The Epilepsies: The diagnosis and management of the epilepsies in adults and children in primary and secondary care](#) (PDF). National Institute for Health and Clinical Excellence. pp. 21–28.
57. Shorvon S. *Handbook of Epilepsy Treatment: Forms, Causes and Therapy in Children and Adults*. Blackwell Publishing, Oxford, UK (2005).
58. Karatas H, Gurer G, Pinar A et al. Investigation of HSV-1, HSV-2, CMV, HHV-6 and HHV-8 DNA by real-time PCR in surgical resection materials of epilepsy patients with mesial temporal lobe sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 264(1–2), 151–156 (2008).
59. Dhavendra Kumar, ed. (2008). [Genomics and clinical medicine](#). Oxford: Oxford University Press. p. 279. [ISBN 978-0-19-972005-7](#).

60. Assis TMR, Bacellar A, Costa G, Nascimento OJM. Mortality predictors of epilepsy and epileptic seizures among hospitalized elderly. *Arq Neuropsiquiatr*. 2015;73:510–515.
61. The causes of new-onset epilepsy and seizures in the elderly, [Shasha Liu](#), [Weihua Yu](#), and [Yang Lü](#), *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2016; 12: 1425–1434.
62. Tallis RC, Fillit HM, Brocklehurst JC. Brocklehurst's textbook of geriatric medicine and gerontology. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2003.
63. Franson KL, Hay DP, Neppe V, et al. Drug-induced seizures in the elderly. Causative agents and optimal management. *Drugs Aging*. 1995;7:38–48.
64. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2016; 12: 1425–1434.
65. Pradhan S, Yadav R. Seizures and epilepsy in central nervous system infections. *Neurology Asia*. 2004;9:4–9
66. The causes of new-onset epilepsy and seizures in the elderly, [Shasha Liu](#), [Weihua Yu](#), and [Yang Lü](#), *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2016; 12: 1425–1434.
67. Imfeld P, Bodmer M, Schuerch M, Jick SS, Meier CR. Seizures in patients with Alzheimer's disease or vascular dementia: a population-based nested case-control analysis. *Epilepsia*. 2013;54:700–707.
68. WHO. Epilepsy: aetiology, epidemiology and prognosis (Vol. Fact Sheet N 165) 2001a
69. WHO. World Health Organization: epilepsy: epidemiology, aetiology and prognosis. WHO Factsheet 2001b
70. Atlas: epilepsy care in the world. Geneva: World Health Organization; 2005.
71. Noronha ALA, Borges MA, Marques LHN, Zanetta DMT, Fernandes PT, de Boer H, Espindola J, Miranda CT, Prilipko L, Bell GS, Sander JW, Li LM. Prevalence and Pattern of Epilepsy Treatment in Different Socioeconomic Classes in Brazil. *Epilepsia*. 2007;48(5):880–885.
72. Birbeck G, Chomba E, Atadzhanov M, Mbewe E, Haworth A. The social and economic impact of epilepsy in Zambia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol*. 2007;6(1):39–44.

73. Kelvin EA, Hesdorffer DC, Bagiella E, Andrews H, Pedley TA, Shih TT, Leary L, Thurman DJ, Hauser WA. Prevalence of self-reported epilepsy in a multiracial and multiethnic community in New York City. *Epilepsy Research*. 2007;77(2–3):141–150.
74. Hauser, W. A. and Annegers, J. F., in *A Textbook of Neurology* (eds Laidlaw, J., Richens, A. and Chadwick, D.), Churchill Livingstone, Edinburgh, 1993, 4th edn, pp. 23–45.
75. Lavados J, Germain L, Morales A, Campero M, Lavados P. A descriptive study of epilepsy in the district of El Salvador, Chile, 1984–1988. *Acta Neurol Scand*. 1992;85(4):249–256.
76. Basch EM, Cruz ME, Tapia D, Cruz A. Prevalence of epilepsy in a migrant population near Quito, Ecuador. *Neuroepidemiology*. 1997;16(2):94–98
77. Olafsson E, Hauser WA. Prevalence of epilepsy in rural Iceland: a population-based study. *Epilepsia*. 1999;40(11):1529–1534
78. Birbeck GL, Kalichi EM. Epilepsy prevalence in rural Zambia: a door-to-door survey. *Trop Med Int Health*. 2004;9(1):92–95.
79. Forsgren L. Prevalence of epilepsy in adults in northern Sweden. *Epilepsia*. 1992;33(3):450–458.
80. Bharucha NE, Bharucha EP, Bharucha AE, Bhise AV, Schoenberg BS. Prevalence of epilepsy in the Parsi community of Bombay. *Epilepsia*. 1988;29(2):111–115.
81. Hauser AW, Hesdorffer DC. *Epilepsy: frequency, causes and consequences*. New York, Demos Publications, 1990
82. Heaney DC, MacDonald BK, Everitt A, Stevenson S, Leonardi GS, Wilkinson P, Sander JW. Socioeconomic variation in incidence of epilepsy: prospective community based study in south east England 2002.
83. Hesdorffer DC, Tian H, Anand K, Hauser WA, Ludvigsson P, Olafsson E, Kjartansson O. Socioeconomic status is a risk factor for epilepsy in Icelandic adults but not in children. *Epilepsia*. 2005;46(8):1297–1303.
84. Li X, Sundquist J, Sundquist K. Socioeconomic and occupational risk factors for epilepsy: A nationwide epidemiological study in Sweden. *Seizure*. 2008;17(3):254–260.

85. R. Sridharan, Epidemiology of epilepsy, Department of Neurology, Apollo Hospitals, Chennai 600 006, India
86. Forsgren L, Bucht G, Eriksson S, Bergmark L. Incidence and clinical characterization of unprovoked seizures in adults: a prospective population-based study. *Epilepsia*. 1996;37(3):224–229
87. Granieri E, Rosati G, Tola R, Pavoni M, Paolino E, Pinna L, Monetti VC. A descriptive study of epilepsy in the district of Copparo, Italy, 1964–1978. *Epilepsia*. 1983;24(4):502–514
88. Hauser WA, Annegers JF, Kurland LT. Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935–1984. *Epilepsia*. 1993;34(3):453–468.
89. Olafsson E, Ludvigsson P, Gudmundsson G, Hesdorffer D, Kjartansson O, Hauser WA. Incidence of unprovoked seizures and epilepsy in Iceland and assessment of the epilepsy syndrome classification: a prospective study. *The Lancet Neurology*. 2005;4(10):627–634.
90. Sidenvall R, Forsgren L, Blomquist HK, Heijbel J. A community-based prospective incidence study of epileptic seizures in children. *Acta Paediatr*. 1993;82(1):60–65.
91. Mani KS, Rangan G, Srinivas HV, Kalyanasundaram S, Narendran S, Reddy AK. The Yelandur study: a community-based approach to epilepsy in rural South India--epidemiological aspects. *Seizure*. 1998;7(4):281–288.
92. Rwiza HT, Kilonzo GP, Haule J, Matuja WB, Mteza I, Mbena P, Kilima PM, Mwaluko G, Mwang'ombola R, Mwaijande F, et al. Prevalence and incidence of epilepsy in Ulanga, a rural Tanzanian district: a community-based study. *Epilepsia*. 1992;33(6):1051–1056.
93. Tekle-Haimanot R, Forsgren L, Ekstedt J. Incidence of epilepsy in rural central Ethiopia. *Epilepsia*. 1997;38(5):541–546.
94. Benn EK, Hauser WA, Shih T, Leary L, Bagiella E, Dayan P, Green R, Andrews H, Thurman DJ, Hesdorffer DC. Estimating the incidence of first unprovoked seizure and newly diagnosed epilepsy in the low-income urban community of Northern Manhattan, New York City. *Epilepsia* 2008

95. Cockerell OC, Johnson AL, Sander JW, Hart YM, Goodridge DM, Shorvon SD. Mortality from epilepsy: results from a prospective population-based study. *Lancet* 1994;344:918-921
96. Hauser WA, Annegers JR, Elveback LR. Mortality in patients with epilepsy. *Epilepsia* 1980;21:399-412.
97. Nilsson L, Tomson T, Farahman BY, Diwan V, Persson PG. Cause-specific mortality in epilepsy: a cohort study of more than 9,000 patients once hospitalized for epilepsy. *Epilepsia* 1997;38:1062-1068.
98. Sperling MR, Feldman H, Kinman J, Liporace JD, O'Connor MJ. Seizure control and mortality in epilepsy. *Ann Neurol* 1999; 46:45-50.
99. Walczak TS, Leppik IE, D'Amelio M, Rarick J, So E, Ahman P, Ruggles K, Cascino GD, Annegers JR, Hauser WA. Incidence and risk factors in sudden unexpected death in epilepsy. A prospective cohort study. *Neurology* 2001;56:519-525.
100. Donner EJ, Smith CR, Snead OC. Sudden unexplained death in children with epilepsy. *Neurology* 2001;57:430-434.).
101. PubMed Health – NCBI, Epilepsy, (Source: NIH - National Institute of Neurological Disorders and Stroke) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0023036/>)
102. <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/epilepsy/symptoms-causes/dxc-20117207>, (last visit March 2017)
103. An Introduction to Epilepsy, Bromfield EB, Cavazos JE, Sirven JI, editors. West Hartford (CT): American Epilepsy Society; 2006
104. Smith D, Defalla BA, Chadwick DW. The misdiagnosis of epilepsy and the management of refractory epilepsy in a specialist clinic. *QJM* 1999;92(1):15-23]
105. Scheepers B, Clough P, Pickles C. The misdiagnosis of epilepsy: findings of a population study. *Seizure* 1998;7(5):403-6.
106. Royal College of Physicians of Edinburgh. Consensus conference on better care for children and adults with epilepsy. Final consensus statement. Edinburgh: The College; 2002.
107. Thompson JL, Ebersole JS. Long-term inpatient audiovisual scalp EEG monitoring. *J Clin Neurophysiol* 1999;16(2):91-9.

108. Zaidi A, Clough P, Cooper P, Scheepers B, Fitzpatrick AP. Misdiagnosis of epilepsy: many seizure-like attacks have a cardiovascular cause. *JAm Coll Cardiol* 2000;36(1):181-4.
109. www.epilepsycenter.gr, (last visit March 2017)
110. Θέματα Αναισθησιολογίας και Εντατικής Ιατρικής, Επιληπτική Κρίση, ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΤΣΑΠΑΡΙΔΟΥ, ΙΩΑΝΝΗΣ ΡΕΜΠΑΣ, ΘΕΟΔΩΡΑ ΓΕΩΡΓΙΑΔΟΥ, ΠΑΓΩΝΑ ΝΤΙΟΥΔΗ, ΣΟΦΙΑ ΣΑΦΡΑΝΟΓΛΟΥ, ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΙΝΤΕΜΠΑΤΖΑΚΗ
111. Επιληψία, Διάγνωση, Θεραπεία, Πρώτες Βοήθειες, <http://www.epilepsy-greece.gr/>, (last visit March 2017)
112. King MA, Newton MR, Jackson GD, Fitt GJ, Mitchell LA, Silvapulle MJ, et al. Epileptology of the first-seizure presentation: a clinical, electroencephalographic, and magnetic resonance imaging study of 300 consecutive patients. *Lancet* 1998;352(9133):1007-11.
113. Fowle AJ, Binnie CD. Uses and abuses of the EEG in Epilepsy. *Epilepsia* 2000;41(suppl 3):S10-S8.
114. Diagnosis and management of epilepsy in adults. Edinburgh: SIGN; 2015. A national clinical guideline
115. Oddo M, Carrera E, Claassen J, Mayer SA, Hirsch LJ. Continuous electroencephalography in the medical intensive care unit. *Crit Care Med.* 2009;37(6):2051–6.
116. Commission on Diagnostic Strategies: recommendations for functional neuroimaging of persons with epilepsy. *Epilepsia.* 2000;41:1350–6.
117. Recommendations for neuroimaging of patients with epilepsy. Commission on Neuroimaging of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 1997;38(11):1255-6
118. Guidelines for neuroimaging evaluation of patients with uncontrolled epilepsy considered for surgery. Commission on Neuroimaging of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 1998;39(12):1375-6.
119. The Epilepsies. Seizures, Syndromes and Management. CP Panayiotopoulos, MD, PhD, FRCP. Oxfordshire (UK), 2005.
120. Sander JW. Some aspects of prognosis in the epilepsies: a review. *Epilepsia* 1993;34:1007-16.

121. Wan P, Sander JW. The natural history of epilepsy: an epidemiological view. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75:1376-81.
122. Epilepsy prognosis, Review By: Gordon R. Kelley, M.D. (<http://www.healthcommunities.com/epilepsy-seizures/prognosis.shtml>)
123. Blom, S., Heijbel, J. and Bergfors, P. G. Incidence of epilepsy in children: a follow-up study three years after the first seizure. *Epilepsia* 1978;19: 343–350
124. Sillanpaa, M., Jalava, M., Kaleva, O. and Shinnar, S. Long-term prognosis of seizures with onset in childhood [see comments]. *New England Journal of Medicine* 1998;338:1715–1722
125. Mattson, R. H., Cramer, J. A., Collins, J. F. et al. Comparison of carbamazepine, phenobarbital, phenytoin and primidone in partial and secondarily generalised tonic-clonic seizures. *New England Journal of Medicine* 1985; 313: 145–151.
126. Juul-Jensen, P. and Foldspang, A. Natural history of epileptic seizures. *Epilepsia* 1983; 24:297–312.
127. Shinnar, S., Vinning, E. P., Mellits, E. D. et al. Discontinuing antiepileptic medication in children with epilepsy after two years without seizures: a prospective study. *New England Journal of Medicine* 1985; 313: 976–980
128. Braathen, G., Andersson, T., Gylje, H. et al. Comparison between one and three years of treatment in uncomplicated childhood epilepsy: a prospective study. I. Outcome in different seizure types. *Epilepsia* 1996; 37: 822–832
129. Brorson, L. O. and Wranne, L. Long-term prognosis in childhood epilepsy: survival and seizure prognosis. *Epilepsia* 1987;28: 324–330
130. Collaborative Group for the Study of Epilepsy. Prognosis of epilepsy in newly referred patients: a multicenter prospective study of the effects of monotherapy on the long-term course of epilepsy. *Epilepsia* 1992; 33: 45–51.
131. Thurston, J. H., Thurston, D. L., Hixon, B. B. and Keller, A. J. Prognosis in childhood epilepsy: additional follow-up of 148 children 15 to 23 years after withdrawal of anticonvulsant therapy. *New England Journal of Medicine* 1982; 306: 831–837.

132. Berg, A. T., Levy, S. R., Novotny, E. J. and Shinnar, S. Predictors of intractable epilepsy in childhood: a case-control study. *Epilepsia* 1996; 37: 24–30.
133. Shafer, S. Q., Hauser, W. A., Annegers, J. F. and Klass, D. W. EEG and other early predictors of epilepsy remission: a community study. *Epilepsia* 1988; 29: 590–600
134. Sillanpaa, M. Remission of seizures and predictors of intractability in long-term follow-up. *Epilepsia* 1993; 34: 930–936.
135. Hesdorffer, D. C., Logroscino, G., Cascino, G., Annegers, J. F. and Hauser, W. A. Risk of unprovoked seizure after acute symptomatic seizure: effect of status epilepticus. *Annals of Neurology* 1998; 44: 908–912.
136. Casetta, I., Granieri, E., Monetti, V. C. et al. Prognosis of childhood epilepsy: a community-based study in Copparo, Italy. *Neuroepidemiology* 1997; 16: 22–28.
137. Cockerell, O. C., Johnson, A. L., Sander, J. W. A. S., Hart, Y. M. and Shorvon, S. D. Remission of epilepsy: results from the national general practice study of epilepsy. *Lancet* 1995; 346: 140–144.
138. Aidan Neligan and J.W. Sander, The prognosis of epilepsy, Homerton University Hospital Foundation Trust, London, and UCL Institute of Neurology, Queen Square, London and Epilepsy Society, Chalfont St Peter, Buckinghamshire, Chapter 36, *Epilepsy 2015 from channels to commissioning, A practical guide to epilepsy* edited by F.J. Rugg-Gunn & J.E. Smalls
139. Robb, P: Focal epilepsy: the problem, prevalence, and contributing factors. In *Advances in Neurology*, eds. D. Purpura, J. Penry, R.D. Walter, pp. 11-22. New York: Raven Press, 1975.
140. McKhann GM, Dourgeois BF, Goodman RR. Epilepsy surgery: indications, approaches, and results. *Semin Neurol* 2002;22:269–78
141. Shaefi S, Harkness W. Current status of surgery in the management of epilepsy. *Epilepsia* 2003;20:1195–215.
142. Stem JM. Overview of evaluation and treatment guidelines for epilepsy. *Gun-Treat Options Neurol.* 2009; 11:273-84.

143. Ν. Τριανταφύλλου, Γενικές αρχές χορήγησης αντιεπιληπτικών φαρμάκων, Νευρολογική Κλινική, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αιγινήτειο Νοσοκομείο, Αρχ Ελλ Ιατρ, 17(5), Σεπτέμβριος-Οκτώβριος 2000, 518-523
144. Livingston S. *Comprehensive Management of Epilepsy in Infancy, Childhood and Adolescence*. Thomas, Springfield, Illinois, 1972:332–343
145. Treiman DM. Current treatment strategies in selected situations in epilepsy. *Epilepsia* 1993, 34(Suppl 5):S17–S23
146. Reynolds EH, Shorvon SD. Monotherapy or polytherapy for epilepsy? *Epilepsia* 1981, 22:1–10.
147. Wilder BJ. Treatment consideration in anticonvulsant monotherapy. *Epilepsia* 1987, 28(Suppl 6):S1–S7
148. Sander JWAS. Some aspects of prognosis in the epilepsies: a review. *Epilepsia* 1993, 34:1007–1016
149. Annegers JF, Hauser WA, Elveback LR. Remission of seizures and relapse in patients with epilepsy. *Epilepsia* 1979, 20:729–737
150. Goodridge DMG, Shorvon SD. Epilepsy in a population 6,000. *Br Med J* 1983, 287:643–646
151. Reynolds EH, Elwes RDC, Shorvon SD. Why does epilepsy come intractable? *Lancet* 1983, ii:952–954
152. Trimble MR. Anticonvulsant drugs and cognitive function: a review of the literature. *Epilepsia* 1987, 28:S37–S45
153. Schmidt D. Discontinuation of antiepileptic drugs. In: Porter RJ, Morselli PL (eds) *The Epilepsies*. Butterworth, London, 1985: 227–241
154. Chadwick D. The discontinuation of antiepileptic therapy. In: Pedley TA, Meldrum BS (eds) *Recent Advances in Epilepsy*. Churchill-Livingstone, Edinburgh, 1985:111–124
155. Arts WFM, Visser LH, Loonen MCB. Follow-up of 164 children with epilepsy after withdrawal of antiepileptic therapy. *Epilepsia* 1988, 29:244–250],
156. Mastropaolo C, Tondi M. Prognosis after therapy discontinuation in children with epilepsy. *Eur Neurol* 1992, 32:141–145
157. Annegers JF. Epidemiology and genetics of epilepsy. *Neurol Clin* 1994, 12:15–29

158. St. Louis EK, Minimizing AED Adverse Effects: Improving Quality of Life in the Interictal State in Epilepsy Care, [Curr Neuropharmacol](#). 2009 Jun; 7(2): 106–114.
159. [Marvin M. Goldenberg](#), PhD, RPh, MS, Overview of Drugs Used For Epilepsy and Seizures, Etiology, Diagnosis, and Treatment, [P T](#). 2010 Jul; 35(7): 392–415.
160. Bazil CW, Morrell MJ, Pedley TA. Epilepsy. In: Rowland LP, editor. Merritt's Neurology. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. pp. 990–1008.
161. Epilepsy Surgery: Historical Highlights 1909–2009, [Epilepsia](#). 2009 Mar;50 Suppl 3:131-51. [Feindel W](#), [Leblanc R](#), [de Almeida AN](#).
162. The Epilepsies: Seizures, Syndromes and Management. Chapter 4 Principles of Therapy in Epilepsies. Panayiotopoulos CP. Oxfordshire (UK) 2005.
163. An Introduction to Epilepsy, Bromfield EB, Cavazos JE, Sirven JI, editors. West Hartford (CT): American Epilepsy Society; 2006
164. Rausch R. Integrative neuropsychology in the preoperative workup of the epilepsy surgery patient. In Miller JW, Silbergeld DL, editors. , eds. Epilepsy surgery: principles and controversies. New York, NY: Taylor and Francis, 2006: 183– 199.
165. Surgical Treatment of Epilepsy, [John W. Miller](#), MD, PhD and [Shahin Hakimian](#), MA, MD, [Continuum \(Minneap Minn\)](#). 2013 Jun; 19(3 Epilepsy): 730–742.
166. Surgery for childhood epilepsy, Sita Jayalakshmi, Manas Panigrahi, Subrat Kumar Nanda, and Rammohan Vadapalli, [Ann Indian Acad Neurol](#). 2014 Mar; 17(Suppl 1): S69–S79.
167. Ben Menachem E. Vagus-nerve stimulation for the treatment of epilepsy. *Lancet Neurol*. 2002;1:477–82.
168. Boon P, Vonck K, De Reuck J, Caemaert J. Vagus nerve stimulation for refractory epilepsy. *Seizure*. 2002;11(Suppl A):448–55.

169. George MS, Nahas Z, Bohning DE, Kozel FA, Anderson B, Chae JH, et al. Vagus nerve stimulation therapy: a research update. *Neurology*. 2002;59:S56–S61
170. Henry TR. Therapeutic mechanisms of vagus nerve stimulation. *Neurology*. 2002;59:S3–14.
171. Frost M, Gates J, Helmers SL, Wheless JW, Levisohn P, Tardo C, et al. Vagus nerve stimulation in children with refractory seizures associated with Lennox-Gastaut syndrome. *Epilepsia*. 2001;42:1148–52
172. Binnie CD. Vagus nerve stimulation for epilepsy: a review. *Seizure*. 2000;9:161–9.
173. Fisher RS, Krauss GL, Ramsay E, Laxer K, Gates J. Assessment of vagus nerve stimulation for epilepsy: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 1997;49:293–7.
174. Wilder RM. The effect of ketonaemia on the course of epilepsy. *Mayo Clin Bulletin* 1921; 2:307-8
175. Kossoff EH, Zupec-Kania BA, Rho JM. Ketogenic diets: an update for child neurologists. *J Child Neurol*. 2009; 24:979-88.
176. Mechanisms of Ketogenic Diet Action, Susan A. Masino and Jong M. Rho. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*. 4th edition. 2012
177. Adam L, Hartman and Eileen P.G. Vining. Clinical Aspects of the Ketogenic Diet. *Epilepsia* 2007; 48(1):31-42.
178. Kossoff EH. More fat and fewer seizures: dietary therapies for epilepsy. *The Lancet Neurology* Vol 3, July 2004
179. Kang HC, Kim YJ, Kim DW, Kim HD. Efficacy and safety of the ketogenic diet for intractable childhood epilepsy: Korean multicentric experience. *Epilepsia* 2005; 46:272-79.
180. The ketogenic diet: from molecular mechanisms to clinical effects. Freeman J, Veggiotti P, Lanzi G, Tagliabue A, Perucca E, Institute of Neurology IRCCS C. Mondino Foundation. *Epilepsy Res*. 2006 Feb; 68(2):145-80.
181. Chronic ketosis and cerebral metabolism. DeVivo DC, Leckie MP, Ferrendelli JS, McDougal DB Jr *Ann Neurol*. 1978 Apr; 3(4):331-37.

182. A randomized trial of classical and medium-chain triglyceride ketogenic diets in the treatment of childhood epilepsy. Neal EG, Chaffe H, Schwartz RH, Lawson MS, Edwards N, Fitzsimmons G, Whitney A, Cross JH *Epilepsia*. 2009 May; 50(5):1109-17.
183. The modified atkins diet in refractory epilepsy. Sharma S, Jain P *Epilepsy Res Treat*. 2014; 2014():404202.
184. Efficacy, safety, and tolerability of the low glycemic index treatment in pediatric epilepsy. Muzykewicz DA, Lyczkowski DA, Memon N, Conant KD, Pfeifer HH, Thiele EA *Epilepsia*. 2009 May; 50(5):1118-26.
185. Non-coding RNA , [John S. Mattick](#), [Igor V. Makunin](#), *Hum Mol Genet* (2006) 15 (suppl_1): R17-R29.
186. A Guide to Epigenetics, abcam
187. Noncoding RNAs database (ncRNAdb), [Maciej Szymanski](#), [Volker A. Erdmann](#), and [Jan Barciszewski](#), *Nucleic Acids Res*. 2007 Jan; 35(Database issue): D162–D164
188. Szymanski M., Barciszewski J. Regulation by RNA. *Int. Rev. Cytol*. 2003;231:197–258.
189. Wenbo Li, Dimple Notani & Michael G. Rosenfeld, Enhancers as non-coding RNA transcription units: recent insights and future perspectives, *Nature Reviews Genetics* 17, 207–223, (2016)
190. MicroRNAs Regulate Key Effector Pathways of Senescence, Andrea Feliciano, Beatriz Sánchez-Sendra, Hiroshi Kondoh, and Matilde E. LLeonart
191. M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, A. Yalcin, J. Meyer, W. Lendeckel, T. Tuschl, Identification of tissue-specific microRNAs from mouse, *Curr Biol*, 12 (2002), pp. 735–739
192. Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression, Cinzia Sevignani, George A. Calin, Linda D. Siracusa, Carlo M. Croce, *Mammalian Genome*, March 2006, Volume 17, [Issue 3](#), pp 189–202
193. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116:281–297.

194. Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843–854.
195. Ruvkun, G. Molecular Biology: Glimpses of a Tiny RNA World. *Science* **2001**, 294, 797–799.
196. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001 Oct 26;294(5543):853-8.
197. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294:858–862.
198. Ε. Σκούρτη, Ι. Χριστοδούλου, Σ. Λογοθέτη, Β. Ζουμπουρλής, MicroRNAs, καρκίνος και καρκινικά βλαστοκύτταρα. Από την έρευνα στη θεραπεία, Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής 2013, 30(4):391-405
199. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 2004;14: 10A:1902–10.
200. Leigh-Ann MacFarlane, and Paul R. Murphy, “MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer,” *Current Genomics*, vol. 11, no. 7, pp. 537–561, 2010.
201. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN; Kim; Han; Yeom; Lee; Baek; Kim (October 2004). ["MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II"](#). *EMBO J.* **23** (20): 4051–60
202. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2005;6:376–385.
203. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR; Hagedorn; Cullen (December 2004). ["Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs"](#). *RNA.* **10** (12): 1957–66.
204. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. 2004;432:235–240.

205. Lee, Y; Ahn, C; Han, J; Choi, H; Kim, J; Yim, J; Lee, J; Provost, P; Rådmark, O; Kim, S; Kim, VN (25 September 2003). "The nuclear RNase III *Drosha* initiates microRNA processing.". *Nature*. **425** (6956): 415–9.
206. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*. 2004;18:3016–3027
207. Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, Sohn SY, Cho Y, Zhang BT, Kim VN. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*. 2006;125:887–901.
208. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*. 2002;21:4663–4670.
209. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004;431:350–355.
210. Allawi, H.T., Dahlberg, J.E., Olson, S., Lund, E., Olson, M., Ma, W.P., Takova, T., Neri, B.P., and Lyamichev, V.I. 2004. Quantitation of microRNAs using a modified Invader assay. *RNA* 10: 1153–1161.
211. Bohnsack, M.T., Czaplinski, K., and Gorlich, D. 2004. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10: 185–191.
212. *Esquela-Kerscher A, Johnson SM, Bai L, Saito K, Partridge J, Reinert KL, Slack FJ: Post-embryonic expression of C. elegans microRNAs belonging to the lin-4 and let-7 families in the hypodermis and the reproductive system. Dev Dyn. 2005, 234 (4): 868-877.*
213. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R: Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*. 2005, 123: 631-640.
214. Maniataki E, Mourelatos Z. A human ATP-independent RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev*. 2005;19:2979–2990.
215. Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR, Kim VN. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J*. 2006;25:522–532.
216. Macrae IJ, Ma E, Zhou M, Robinson CV, Doudna JA. *In vitro* reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008;105(2):512–7.

217. Achard P, Herr A, Baulcombe DC, Harberd NP. Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development*. 2004 Jul;131(14):3357-65.
218. Gregory RI, Chendrimada TP, Shiekhata R. MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex. *Methods Mol Biol*. 2006;342:33-47. Review.
219. M.A. Valencia-Sanchez, J. Liu, G.J. Hannon, R. Parker. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.*, 20 (2006), pp. 515–524
220. I. Behm-Ansmant, J. Rehwinkel, T. Doerks, A. Stark, P. Bork, E. Izaurralde. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.*, 20 (2006), pp. 1885–1898
221. A.J. Giraldez, Y. Mishima, J. Rihel, R.J. Grocock, S.V. Dongen, K. Inoue, A.J. Enright, A.F. Schier. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science*, 312 (2006), pp. 75–79
222. L. Wu, J. Fan, J.G. Belasco. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 103 (2006), pp. 4034–4039
223. Mattick JS, Makunin IV. Small regulatory RNAs in mammals. *Hum Mol Genet*. 2005;14(Suppl 1):R121–R132.
224. Berezikov E, Plasterk RH. Camels and zebrafish, viruses and cancer: a microRNA update. *Hum Mol Genet*. 2005;14(Suppl 2):R183–R190
225. Bartel B. MicroRNAs directing siRNA biogenesis. *Nat Struct Mol Biol*. 2005;12(7):569–571.
226. Zamore PD, Haley B. Ribo-genome: the big world of small RNAs. *Science*. 2005;309(5740):1519–1524.
227. Croce CM, Calin GA. miRNAs, cancer, and stem cell division. *Cell*. 2005;122(1):6–7.
228. Klein ME, Impey S, Goodman RH. Role reversal: the regulation of neuronal gene expression by microRNAs. *Curr Opin Neurobiol*. 2005;15(5):507–513.

229. Giraldez AJ, Cinalli RM, Glasner ME, Enright AJ, Thomson JM, Baskerville S, et al. MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science*. 2005;308(5732):833–838.
230. Naguibneva I, Ameyar-Zazoua M, Polesskaya A, Ait-Si-Ali S, Groisman R, Souidi M, et al. The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nat Cell Biol*. 2006;8:278–284
231. Hatfield SD, Shcherbata HR, Fischer KA, Naka-hara K, Carthew RW, Ruohola-Baker H. Stem cell division is regulated by the microRNA pathway. *Nature*. 2005;435:974–978.
232. Wurdinger T, Costa FF. Molecular therapy in the microRNA era. *Pharmacogenomics J* 2007; 7: 297–304.
233. Li M, Mülle CM, Bharadwaj U, Chow KH, Yao Q, Chen C. MicroRNAs: control and loss of control in human physiology and disease. *World J Surg*. 2009;33(4):667–684
234. MicroRNAs in Common Human Diseases. [Yu Li](#) , [Kris V. Kowdley](#), *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, Volume 10, Issue 5, October 2012, Pages 246–253
235. Moslemi Naeini M, Ardekani AM. Noncoding RNAs and Cancer. *Avicenna J Med Biotech*. 2009;1(2):55–70
236. Ikeda S, Kong SW, Lu J, Bisping E, Zhang H, Allen PD, et al. Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiol Genomics*. 2007;31:367–373.
237. Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature*. 2005;436:214–220.
238. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*. 2007;129(7):1401–1414.
239. Thum T, Catalucci D, Bauersachs J. MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease. *Cardiovas Res*. 2008;79:562–570.

240. Baskerville S, Bartel DP. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA*. 2005;11:241–247.
241. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*. 2002;12(9):735–739.
242. Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet*. 2006;38:228–233.
243. Van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a micro RNA. *Science*. 2007;316(5824):575–579.
244. Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1–2. *Cell*. 2007;129(2):303–317.
245. Care A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med*. 2007;13:613–618.
246. Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y, Luo X, Li B, et al. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med*. 2007;13:486–491.
247. Babak T, Zhang W, Morris Q, Blencowe BJ, Hughes TR. Probing microRNAs with microarrays: tissue specificity and functional inference. *RNA*. 2004;10:1813–1819.
248. Beuvink I, Kolb FA, Budach W, Garnier A, Lange J, Natt F, et al. A novel microarray approach reveals new tissue-specific signatures of known and predicted mammalian microRNAs. *Nucl Acids Res*. 2007;35(7):52.
249. Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol*. 2004;5:R13.

250. Berezikov E, Thuemmler F, van Laake LW, Kondova I, Bontrop R, Cuppen E, et al. Diversity of microRNAs in human and chimpanzee brain. *Nat Genet.* 2006;38:1375–1377.
251. Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Townsend M, Yoshii A, Sestan N, Rakic P, et al. Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biol.* 2004;5:R68.
252. Nelson PT, Baldwin DA, Kloosterman WP, Kaup-pinen S, Plasterk RH, Mourelatos Z. RAKE and LNA-ISH reveal microRNA expression and localization in archival human brain. *RNA.* 2006;12:187–191.
253. Singh SK. miRNAs: from neurogeneration to neurodegeneration. *Pharmacogenomics.* 2007;8(8):971–978.
254. Ehninger D, Li W, Fox K, Stryker MP, Silva AJ. Reversing neurodevelopmental disorders in adults. *Neuron.* 2008;60(6):950–960.
255. Chang S, Wen S, Chen D, Jin P. Small regulatory RNAs in neurodevelopmental disorders. *Hum Mol Genet.* 2009;18:R18–R26.
256. Pauley KM, Cha S, Chan EKL. MicroRNA in auto-immunity and autoimmune diseases. *J Autoimmun.* 2009;32(3-4):189–194.
257. Nakasa T, Shigeru Miyaki S, Okubo A, Hashimoto M, Nishida K, Ochi M, et al. Expression of micro RNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 2008;58(5):1284–1292.
258. Leirisalo-Repo M. Early arthritis and infection. *Curr Opin Rheumatol.* 2005;17(4):433–439.], [Callan MF. Epstein–Barr virus, arthritis, and the development of lymphoma in arthritis patients. *Curr Opin Rheumatol.* 2004;16(4):399–405.
259. Stern-Ginossar N, Elefant N, Zimmermann A, Wolf DG, Saleh N, Biton M, et al. Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science.* 2007;317(5836):376–381.
260. Stanczyk J, Pedrioli DML, Brentano F, Pernaute OS, Kolling C, Gay RE. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008;58(4):1001–1009.

261. Pauley KM, Satoh M, Chan AL, Bubb MR, Reeves WH, Chan EKL. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther*. 2008;10:R101.
262. Tili E, Michaille JJ, Costinean S, Croce CM. Micro RNAs, the immune system and rheumatic disease. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2008;4:534–541.
263. Dai Y, Huang YS, Tang M, Lv TY, Hu CX, Tan YH, et al. Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*. 2007;16(12):939–946
264. Dai Y, Sui W, Lan H, Yan Q, Huang H, Huang Y. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in renal biopsies of lupus nephritis patients. *Rheumatol Int*. 2009;29(7):749–54.
265. Chen XM. MicroRNA signatures in liver diseases. *World J Gastroenterol*. 2009;15(14):1665–1672.
266. Chu AS, Friedman JR. A role for microRNA in cystic liver and kidney diseases. *J Clin Invest*. 2008;118(11):3585–3587.
267. McCarthy JJ, Esser KA. MicroRNA-1 and micro RNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol*. 2007;102(1):306–313.
268. Eisenberg I, Eran A, Nishino I, Moggio M, Lamperti C, Amato AA, et al. Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(43):17016–17021.
269. Eisenberg I, Alexander MS, Kunkel LM. miRNAs in normal and diseased skeletal muscle. *Cell Mol Med*. 2009;13(1):2–11.
270. Zavadil J, Narasimhan M, Blumenberg M, Schneider RJ. Transforming growth factor-beta and micro RNA: mRNA regulatory networks in epithelial plasticity. *Cells Tissues Organs*. 2007;185(1-3):157–161.
271. Gu J, Iyer VR. PI3K signaling and miRNA expression during the response of quiescent human fibro-blasts to distinct proliferative stimuli. *Genome Biol*. 2006;7:R42.
272. Shilo S, Roy S, Khanna S, Sen CK. MicroRNA in cutaneous wound healing: a new paradigm. *DNA Cell Biol*. 2007;26(4):227–37.

273. Sonkoly E, Wei T, Janson PCJ, Saaf A, Lundeberg L, Linder MT, et al. MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis? *PLoS ONE*. 2007;2(7):610.
274. Yi R, O'Carroll D, Pasolli HA, Zhang Z, Dietrich FS, Tarakhovskiy A, et al. Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs. *Nat Genet*. 2006;38:356–362.
275. Krasna M, Domanović D, Tomsic A, Svajger U, Jeras M. Platelet gel stimulates proliferation of human dermal fibroblasts in vitro. *Acta Dermatoven Alp Panonica Adriat*. 2007;16(3):105–110.
276. Bostjancic E, Glavac D. Importance of microRNAs in skin morphogenesis and diseases. *Acta Dermatoven Alp Panonica Adriat*. 2008;17(3):95–102.
277. Lebowitz M. Psoriasis. *Lancet*. 2003;361(9364):1197–1204.
278. Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature*. 2007;445:866–873.
279. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009;19:92–105.
280. Henshall DC (2014) MicroRNA and epilepsy: profiling, functions and potential clinical applications. *Curr Opin Neurol* 27: 199–205.
281. You, G., Yan, W., Zhang, W., Wang, Y., Bao, Z., Li, S., et al. (2012). Significance of miR-196b in tumor-related epilepsy of patients with gliomas. *PloS ONE* 7:e46218.
282. Peng, J., Omran, A., Ashhab, M. U., Kong, H., Gan, N., He, F., et al. (2013). Expression Patterns of miR-124, miR-134, miR-132, and miR-21 in an immature rat model and children with mesial temporal lobe epilepsy. *J. Mol. Neurosci*. 50, 291–297.
283. Dogini DB, Avansini SH, Vieira AS and Lopes-Cendes I (2013). MicroRNA regulation and dysregulation in epilepsy. *Front. Cell. Neurosci*.7: 172.
284. Engel, J. Jr. (2001). Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? *Neuroscientist* 7, 340–352.
285. Vezzani, A., Friedman, A., and Dingledine, R. J. (2013). The role of inflammation in epileptogenesis. *Neuropharmacology* 69, 16–24.

286. Aronica, E., Fluiter, K., Iyer, A., Zurolo, E., Vreijling, J., van Vliet, E. A., et al. (2010). Expression pattern of miR-146a, an inflammation-associated microRNA, in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Eur. J. Neurosci.* 31, 1100–1107.
287. Omran, A., Peng, J., Zhang, C., Xiang, Q. L., Xue, J., Gan, N., et al. (2012). Interleukin-1beta and microRNA-146a in an immature rat model and children with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 53, 1215–1224.
288. Ashhab, M. U., Omran, A., Kong, H., Gan, N., He, F., Peng, J., et al. (2013). Expressions of tumor necrosis factor alpha and microRNA-155 in immature rat model of status epilepticus and children with mesial temporal lobe epilepsy. *J. Mol. Neurosci.*
289. Shaked I, Meerson A, Wolf Y, Avni R, Greenberg D, Gilboa-Geffen A, Soreq H (2009) MicroRNA-132 potentiates cholinergic anti-inflammatory signaling by targeting acetylcholinesterase. *Immunity* 31:965–973.
290. Volvert, M. L., Rogister, F., Moonen, G., Malgrange, B., and Nguyen, L. (2012). MicroRNAs tune cerebral cortical neurogenesis. *Cell Death Differ.* 19, 1573–1581.
291. Krichevsky, A. M., Sonntag, K. C., Isacson, O., and Kosik, K. S. (2006). Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem Cells* 24, 857–864.
292. Makeyev, E. V., Zhang, J., Carrasco, M. A., and Maniatis, T. (2007). The microRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Mol. Cell* 27, 435–448.
293. Silber, J., Lim, D. A., Petritsch, C., Persson, A. I., Maunakea, A. K., Yu, M., et al. (2008). miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med.* 6:14.
294. Liu, C., Teng, Z. Q., Santistevan, N. J., Szulwach, K. E., Guo, W., Jin, P., et al. (2010a). Epigenetic regulation of miR-184 by MBD1 governs neural stem cell proliferation and differentiation. *Cell Stem Cell* 6, 433–444.
295. Zhao, C., Sun, G., Li, S., Lang, M. F., Yang, S., Li, W., et al. (2010). MicroRNA let-7b regulates neural stem cell proliferation and differentiation by

- targeting nuclear receptor TLX signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 1876–1881.
296. Hu, K., Xie, Y. Y., Zhang, C., Ouyang, D. S., Long, H. Y., Sun, D. N., et al. (2012). MicroRNA expression profile of the hippocampus in a rat model of temporal lobe epilepsy and miR-34a-targeted neuroprotection against hippocampal neurone cell apoptosis post-status epilepticus. *BMC Neurosci.* 13:115.
297. Sano, T., Reynolds, J. P., Jimenez-Mateos, E. M., Matsushima, S., Taki, W., and Henshall, D. C. (2012). MicroRNA-34a upregulation during seizure-induced neuronal death. *Cell Death Dis.* 3:e287.
298. Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., 2008a. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research* 18, 997–1006.
299. Rajendran, L., Honsho, M., Zahn, T. R., Keller, P., Geiger, K. D., Verkade, P., et al. (2006). Alzheimer's disease β -amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 11172–11177.
300. Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D. H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., et al. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumor growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* 10, 1470–1476.
301. Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Schapira, A. H., Gardiner, C., Sargent, I. L., Wood, M. J., et al. (2011). Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. *Neurobiol. Dis.* 42, 360–367.
302. Hu, G., Yao, H., Chaudhuri, A., Duan, M., Yelamanchili, S. V., Wen, H., et al. (2012b). Exosome-mediated shuttling of microRNA-29 regulates HIV Tat and morphine-mediated Neuronal dysfunction. *Cell Death Dis.* 3, e381.
303. Li, M. M., Li, X. M., Zheng, X. P., Yu, J. T. & Tan, L. *MicroRNAs dysregulation in epilepsy. Brain Res* 10.1016/j.brainres.2013.09.049 (2013).
304. Hermeking, H., 2009. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 17, 193–199.

305. Wang, X., Liu, P., Zhu, H., Xu, Y., Ma, C., Dai, X., Huang, L., Liu, Y., Zhang, L., Qin, C., 2009. miR-34a, a microRNA up-regulated in a double transgenic mouse model of Alzheimer's disease, inhibits bcl2 translation. *Brain Research Bulletin* 80, 268–273.
306. Lodygin, D., Tarasov, V., Epanchintsev, A., Berking, C., Knyazeva, T., Körner, H., Knyazev, P., Diebold, J., Hermeking, H., 2008. Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell cycle* 7, 2591–2600.
307. Bommer, G.T., Gerin, I., Feng, Y., Kaczorowski, A.J., Kuick, R., Love, R.E., Zhai, Y., Giordano, T.J., Qin, Z.S., Moore, B.B., 2007. p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Current Biology* 17, 1298–1307.
308. Riley, T., Sontag, E., Chen, P., Levine, A., 2008. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 9, 402–412.
309. Hermeking, H. (2010). The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ.* 17, 193–199.
310. Welch, C., Chen, Y., Stallings, R., 2007. MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene* 26, 5017–5022.
311. Raver-Shapira, N., Marciano, E., Meiri, E., Spector, Y., Rosenfeld, N., Moskovits, N., Bentwich, Z., Oren, M., 2007. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Molecular Cell* 26, 731.
312. Jimenez-Mateos, E. M. & Henshall, D. C. *Epilepsy and microRNA. Neuroscience* **238**, 218–29 (2013).
313. Hu K, Zhang C, Long L, Long X, Feng L, Li Y, Xiao B (2011) Expression profile of microRNAs in rat hippocampus following lithium-pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurosci Lett* 488:252–257.
314. Song YJ, Tian XB, Zhang S, Zhang YX, Li X, Li D, Cheng Y, Zhang JN, Kang CS, Zhao W (2011) Temporal lobe epilepsy induces differential expression of hippocampal miRNAs including let-7e and miR-23a/b. *Brain Res* 1387:134–140.

315. Hu K, Xie YY, Zhang C, Ouyang DS, Long HY, Sun DN, Long LL, Feng L, Li Y, Xiao B (2012b) MicroRNA expression profile of the hippocampus in a rat model of temporal lobe epilepsy and miR-34a-targeted neuroprotection against hippocampal neurone cell apoptosis post-status epilepticus. *BMC Neurosci* 13:115.
316. Kan AA, van Erp S, Derijck AA, de Wit M, Hessel EV, O'Duibhir E, de Jager W, Van Rijen PC, Gosselaar PH, de Graan PN, Pasterkamp RJ (2012) Genome-wide microRNA profiling of human temporal lobe epilepsy identifies modulators of the immune response. *Cell Mol Life Sci* 69:3127–3145.
317. McKiernan RC, Jimenez-Mateos EM, Sano T, Bray I, Stallings RL, Simon RP, Henshall DC (2012b) Expression profiling the microRNA response to epileptic preconditioning identifies miR-184 as a modulator of seizure-induced neuronal death. *Exp Neurol* 237:346–354.
318. Sano T, Reynolds JP, Jimenez-Mateos EM, Matsushima S, Taki W, Henshall DC (2012) MicroRNA-34a upregulation during seizure-induced neuronal death. *Cell Death Dis* 3:e287.
319. Aronica E, Fluiter K, Iyer A, Zurolo E, Vreijling J, et al. (2010) Expression pattern of miR-146a, an inflammation-associated microRNA, in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci* 31: 1100–1107.
320. Vilardo E, Barbato C, Ciotti M, Cogoni C, Ruberti F. MicroRNA-101 regulates amyloid precursor protein expression in hippocampal neurons. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(24):18344–18351.
321. Omran A, Peng J, Zhang C, Xiang QL, Xue J, Gan N, Kong H, Yin F. Interleukin-1beta and microRNA-146a in an immature rat model and children with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 2012;53:1215–1224.
322. Iyer A, Zurolo E, Prabowo A, Fluiter K, Spliet WG, van Rijen PC, Gorter JA, Aronica E. MicroRNA-146a: A Key Regulator of Astrocyte-Mediated Inflammatory Response. *PLoS One*. 2012;7:e44789.
323. Manna, I., Labate, A., Mumoli, L., Pantusa, M., Ferlazzo, E., Aguglia, U., Quattrone, A., Gambardella, A., 2012. Relationship between genetic variant in pre-microRNA-146a and genetic predisposition to Temporal Lobe Epilepsy: A case-control study. *Gene*.

324. Chomczynski P. and Sacchi N. 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol- chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162, 156-159.
325. TRI Reagent® BD – RNA, DNA, protein isolation reagent. Manufacturer's protocol (1995), Molecular Research Center, Inc. Cincinnati, OH
326. Reverse Transcription (cDNA Synthesis) NEB. New England Biolabs Inc. (<https://www.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-preparation/reverse-transcription-cdna-synthesis>)
327. Best Principles of RT-qPCR, ThermoFisher Scientific
328. PCR Protocols & Applications, QIAGEN
329. qPCR vs. Digital PCR vs. Traditional PCR, ThermoFisher Scientific
330. Pfaffl, M.W., Vandesompele, J., and Kubista, M. (2009) Real-time PCR technology. In *Data Analysis Software*, Logan, J., Edwards, K., and Saunders, N., eds (Caister Academic Press, Norwich), pp. 65-83.
331. Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE (1990). ["Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro"](#). *Nucl Acids Res.* 18 (21): 6409–6412
332. Tichopad, A., M. Dilger, G. Schwarz, and M.W. Pfaffl. 2003. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res.* 31:e122
333. Heid, C.A., J. Stevens, K.J. Livak, and P.M. Williams. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6:986-994
334. von Ahsen, N., E. Schutz, V.W. Armstrong, and M. Oellerich. 1999. Rapid detection of prothrombotic mutations of prothrombin (G20210A), factor V (G1691A), and methylenetetrahydrofolate reductase (C677T) by real-time fluorescence PCR with the LightCycler. *Clin. Chem.* 45:694-696
335. Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25:169-193
336. Wong, M.L. and J. Medrano. 2005. Real-Time PCR for mRNA quantification. *BioTechniques* 39:75-85.
337. Robert B. Page and Arnold J. Stromberg, *Linear Methods for Analysis and Quality Control of Relative Expression Ratios from Quantitative Real-Time*

- Polymerase Chain Reaction Experiments. *TheScientificWorldJOURNAL* Volume 11 (2011), Pages 1383-1393
338. Wittwer, C.T., M.G. Herrmann, A.A. Moss, and R.P. Rasmussen. 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques* 22:130-138
339. Simpson, D.A., S. Feeney, C. Boyle, and A.W. Stitt. 2000. Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR. *Mol. Vis.* 6:178-183
340. Ririe, K.M., R.P. Rasmussen, and C.T. Wittwer. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 245:154-160
341. Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta.* 2015;**439**:231-250.
342. Quantitative PCR and Digital PCR Detection Methods, A Technical Guide to PCR Technologies, SIGMA-ALDRICH
343. Bernard, P.S. and C.T. Wittwer. 2000. Homogeneous amplification and variant detection by fluorescent hybridization probes. *Clin. Chem.* 46:147-148
344. Bernard, P.S., R.S. Ajioka, J.P. Kushner, and C.T. Wittwer. 1998. Homogeneous multiplex genotyping of hemochromatosis mutations with fluorescent hybridization probes. *Am. J. Pathol.* 153:1055-1061
345. Lay, M.J. and C.T. Wittwer. 1997. Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR. *Clin. Chem.* 43:2262-2267
346. Clegg, R.M. 1992. Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. *Methods Enzymol.* 211:353-388
347. Gibson, U.E., C.A. Heid, and P.M. Williams. 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 6:995-100
348. Heid, C.A., J. Stevens, K.J. Livak, and P.M. Williams. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6:986-994
349. Wang, Y., C. Barbacioru, F. Hyland, W. Xiao, K.L. Hunkapiller, J. Blake, F. Chan, C. Gonzalez. 2006. Large scale real-time PCR validation on gene expression measurements from two commercial long-oligonucleotide microarrays. *BMC Genomics* 7:59.

350. Tyagi, S. and F.R. Kramer. 1996. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.* 14:303-308
351. Bonnet, G., S. Tyagi, A. Libchaber, and F.R. Kramer. 1999. Thermodynamic basis of the enhanced specificity of structured DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:6171-6176
352. Whitcombe, D., J. Theaker, S.P. Guy, T. Brown, and S. Little. 1999. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nat. Biotechnol.* 17:804-807
353. Thelwell, N., S. Millington, A. Solinas, J. Booth, and T. Brown. 2000. Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.* 28:3752-3761
354. Nazarenko, I.A., S.K. Bhatnagar, and R.J. Hohman. 1997. A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucleic Acids Res.* 25:2516-2521
355. Designing Real-Time Assays on the SmartCycler® II System, Cepheid Technical Support
356. Nazarenko, I., B. Lowe, M. Darfler, P. Ikonomi, D. Schuster, and A. Rashtchian. 2002. Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. *Nucleic Acids Res.* 30:e37
357. LUX™ Fluorogenic Primers, Invitrogen