

**Β' ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΘΝΙΚΟΥ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Μ. ΤΣΟΛΙΑ**

&

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ - ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Δ. ΓΟΥΡΓΙΩΤΗΣ**



**«Μέτρηση μορίων απόπτωσης στον ορό του αίματος
παιδιών με σπασμούς»**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΠΡΙΜΙΚΥΡΗΣ
ΝΕΥΡΟΧΕΙΡΟΥΡΓΟΣ**

ΑΘΗΝΑ 2017

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δ. Καφετζής: Ομότιμος Καθηγητής- Επιβλέπων

Αν. Κωνσταντόπουλος: Ομότιμος Καθηγητής

Αγγ. Σκαρδούτσου: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μ. Τσολιά: Καθηγήτρια

Δ. Γουργιώτης: Καθηγητής

Αν. Γαρούφη: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Γ. Βάρτζελης: Επίκουρος Καθηγητής

Π. Ξεπαπαδάκη: Επίκουρη Καθηγήτρια

Αλ. Σολδάτου: Επίκουρη Καθηγήτρια

Ν. Σπυρίδης: Επίκουρος Καθηγητής

«Η έγκριση διδακτορικής διατριβής υπό της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνώμων του συγγραφέως» (Νόμος 5343/1932, άρθρο 202, παρ.2)

ΟΡΚΟΣ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃς κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε. Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ οὐτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξῃς τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξῃς. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. ὁμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἀγνῶς δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίας, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἡγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ξυγγέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιорκοῦντι, τάναντία τουτέων.

Στους γονείς, στην σύζυγο, στις κόρες μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε εκείνους που προσέφεραν καθοριστικά στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής κ. Αγγελική Σκαρδούτσου χωρίς την καθοδήγηση, επιμονή και ενθάρρυνση της οποίας δεν θα είχε ολοκληρωθεί η συγκεκριμένη μελέτη. Η αρωγή της υπήρξε πολύπλευρη, διαρκής και δε θα την ξεχάσω ποτέ.

Καθοριστική υπήρξε επίσης η συμβολή του Καθηγητή Κλινικής Βιοχημείας κ. Δημήτριου Γουργιώτη με την ενεργό πολυποίκιλη υποστήριξη του οποίου κατέστη δυνατή η επεξεργασία των συλλεχθέντων δειγμάτων, η αξιοποίηση των αποτελεσμάτων και η ολοκλήρωση της διατριβής.

Τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Παιδιατρικής κ. Ανδρέα Κωνσταντόπουλο που ως Διευθυντής της Β΄ Παιδιατρικής Κλινικής οργάνωσε αρχικά και υποστήριξε την προσπάθεια αυτή.

Επίσης ευχαριστώ τον Καθηγητή Παιδιατρικής κ. Δημήτριο Καφετζή που ως διάδοχος Διευθυντής της Κλινικής και επιβλέπον μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, προσέφερε σταθερά τις συμβουλές του προκειμένου να ολοκληρωθεί η προσπάθεια.

Ευχαριστώ θερμά τον συνεργάτη του Εργαστηρίου Κλινικής Βιοχημείας-Μοριακής Διαγνωστικής, βιολόγο κ. Αντώνη Μαρμαρινό για τη διαρκή του υποστήριξη καθώς και τον Ενδοκρινολόγο και Βιοστατιστικό κ. Χαράλαμπο Τσεντίδη για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων που επέτρεψε την αξιοποίηση τους.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για την υποστήριξη, αγάπη και κατανόηση που εισέπρατα πάντα από τους δικούς μου ανθρώπους στην προσπάθεια μου να αρχικά να γίνω ιατρός και ακολούθως να ασκήσω την επιστήμη αυτή με επιστημονική επάρκεια και αξιοπρέπεια.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	8
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	19
A) ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	22
1. ΕΠΙΛΗΨΙΑ	23
2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΣΤΡΕΣ – ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ	26
2.1. Γενικά	26
2.2. Τύποι κυτταρικού θανάτου προκαλούμενοι από το κυτταρικό στρες.....	26
2.2.1. Αποπτωτικός ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος τύπου I	26
2.2.2. Αυτοφαγία- Κυτταρικός θάνατος τύπου II	27
2.2.3. Νέκρωση- Κυτταρικός θάνατος τύπου III.....	28
3. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΑΝΤΗΣΕΩΝ ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΣΤΡΕΣ.....	30
3.1. Απάντηση στον σχηματισμό των αδίπλωτων πρωτεϊνών.....	30
(unfolded protein response -UPR).....	30
3.2. Απάντηση στο οξειδωτικό στρες- Τα ενεργά είδη οξυγόνου (ROS).....	31
3.3. Απάντηση στο ισχαιμικό στρες	32
3.4. Απάντηση στη βλάβη του DNA- Επιδιόρθωση του DNA	33
4. ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ p53 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ.....	35
5. ΒΛΑΒΗ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΙΤΑΙ ΑΠΟ ΤΙΣ ΕΠΙΛΗΠΤΙΚΕΣ ΚΡΙΣΕΙΣ ΣΤΟΝ ΩΡΙΜΟ ΚΑΙ ΑΝΩΡΙΜΟ ΕΓΚΕΦΑΛΟ	36
5.1. Ανατομία και παθολογία των ιπποκάμπων.....	36
5.2. Επίδραση των υποτροπιάζουσών επιληπτικών κρίσεων στον ιππόκαμπο του ενήλικα- Σκλήρυνση των ιπποκάμπων (mesial temporal lobe sclerosis) .	37
5.3. Μηχανισμός του κυτταρικού θανάτου από τις επιληπτικές κρίσεις- Τοξικότητα από υπερδιέγερση (διεγερσιμοτοξικότητα)	38
5.4. Επίδραση του status epilepticus στον ανώριμο εγκέφαλο.....	39
6. ΑΠΟΠΤΩΣΗ – ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ	40
7. ΚΑΣΠΑΣΕΣ	42
7.1. Γενικά χαρακτηριστικά.....	42
7.2. Δομή και φυσιολογική λειτουργία των κασπασών.....	43
7.3. Μοριακή βάση της ενεργοποίησης των κασπασών.....	45
7.4. Λειτουργίες των διαφόρων κασπασών της απόπτωσης.....	47
7.4.1. Κασπάση- 9	47
7.4.2 Κασπάση- 8	48
7.4.3. Κασπάσες-3, -6, -7.....	48
8. ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ Bcl-2.....	49

9. ΟΔΟΙ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ – ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥΣ ΑΠΟ ΤΙΣ ΕΠΙΛΗΠΤΙΚΕΣ ΚΡΙΣΕΙΣ	52
9.1. Εξωτερική οδός της απόπτωσης.....	52
9.2. Εσωτερική οδός της απόπτωσης.....	53
9.3. Ενεργοποίηση πολλαπλών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 από τις επιληπτικές κρίσεις.....	55
10. ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ ΤΩΝ ΝΕΥΡΩΝΩΝ ΕΝΟΡΧΗΣΤΡΩΜΕΝΗ ΣΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ	58
11. ΕΠΙΛΗΠΤΟΓΕΝΕΣΗ.....	61
11.1. Γενικά	61
11.2. Αντιεπιληπτογένεση	62
11.3. Βιοδείκτες (βιολογικοί δείκτες).....	63
12. MICRO RNAs (miRNAs).....	67
12.1. Γενικά	67
12.2. MicroRNAs στην επιληψία	69
B) ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	72
13. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	73
14. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	74
14.1. Υλικό	74
14.2. Αναλυτική περιγραφή του υλικού- Ασθενείς και μάρτυρες	76
14.3. Μέθοδοι προσδιορισμού.....	85
14.4. Στατιστική Ανάλυση.....	86
15. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	88
15.1. Προσδιορισμός μεθόδου στατιστικής ανάλυσης.....	88
15.2. Σύγκριση τιμών Bcl-2 και κασπάσης-9 βάσει φύλου ασθενών.....	89
15.3. Σύγκριση τιμών Bcl-2 και κασπάσης-9 μεταξύ ασθενών και υγιών μαρτύρων	89
15.4. Σύγκριση τιμών Bcl-2 και κασπάσης-9 στις υποομάδες των ασθενών ..	95
16. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	113
17. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	119
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	120
ABSTRACT	122
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	124
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	127

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Προσωπικά στοιχεία

Όνομα/ Επώνυμο	Παναγιώτης Πριμικύρης
Όνομα Πατρός:	Κωνσταντίνος
Όνομα Μητρός:	Σουλτάνα
Ημερομηνία Γέννησης:	10 Μαρτίου 1979
Τόπος Γέννησης:	Αμαρούσιο Αττικής
Ειδικότητα:	Νευροχειρουργός
Τηλέφωνο:	6974284767 & 2109902952

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

➤ Δεκέμβριος 2014:

Απόκτηση τίτλου ειδικότητας στη Νευροχειρουργική
Γενική Διεύθυνση Δημόσιας Υγείας και Κοινωνικής Μέριμνας-
Περιφέρεια Αττικής

➤ Ιούνιος 2013:

“29ο Σεμινάριο Μικροχειρουργικής και 3ο Σεμινάριο Χειρουργικής
Περιφερικών Νευρών και Βραχιονίου Πλέγματος”
Ορθοπαιδικό Κέντρο Έρευνας και Εκπαίδευσης “Παναγιώτης Ν. Σουκάκος”,
Π.Γ.Ν. “Αττικόν”, Αθήνα

➤ Μάιος 2012:

“16th International Endoscopic Neurosurgery Workshop”, Γάνδη, Βέλγιο

➤ Μάρτιος 2008:

Advanced Trauma Life Support, American College of Surgeons-
Hellenic Chapter, Αθήνα

➤ Φεβρουάριος 2005:

Άδεια άσκησης ιατρικού επαγγέλματος-Βαθμός Εξέτασης 265/270
Γραφείο Κρατικών Εξετάσεων

Università degli Studi di Napoli “Federico II”, Νάπολη, Ιταλία

➤ Ιούλιος 2004:

Πτυχιούχος Ιατρικής Σχολής- Βαθμός 110/110 και Έπαινος,

Università degli Studi di Napoli “Federico II”, Νάπολη, Ιταλία

Αναγνώριση από το Δ.Ο.Α.Τ.Α.Π. με βαθμολογική αντιστοιχία 9,02 “Άριστα”-

Πτυχιακή εργασία: “Chirurgia endoscopica ipofisaria. Valutazione dei risultati su una serie consecutiva di pazienti nell’ arco di cinque anni”

(«Ενδοσκοπική χειρουργική υπόφυσης. Αξιολόγηση αποτελεσμάτων σε μια συνεχή σειρά ασθενών σε διάστημα 5 ετών»)

➤ Σεπτέμβριος 1998:

Επιτυχείς εισαγωγικές εξετάσεις στην Ιατρική Σχολή

Università degli Studi di Napoli “Federico II”, Νάπολη, Ιταλία

➤ Ιούνιος 1996:

Απολυτήριο από το 2ο Λύκειο Ηλιούπολης Αττικής με βαθμό 19 και 2/11, “Άριστα”

ΠΡΟΥΠΗΡΕΣΙΑ (ΕΘΕΛΟΝΤΙΚΗ)

➤ Σεπτέμβριος 2002- Φεβρουάριος 2005:

Πανεπιστημιακή Νευροχειρουργική Κλινική,

Azienda Ospedaliera Universitaria “Federico II”, Νάπολη, Ιταλία

➤ Αύγουστος 2004:

Πανεπιστημιακή Νευροχειρουργική Κλινική,

Universitätsklinikum, Heinrich Heine Universität, Ντύσσελντορφ, Γερμανία

ΠΡΟΥΠΗΡΕΣΙΑ (ΕΜΜΙΣΘΗ)

➤ Ιούλιος 2015- σήμερα:

Νευροχειρουργός- Εξωτερικός Συνεργάτης, “Ιασώ Παίδων”, Αθήνα

➤ Φεβρουάριος 2015- σήμερα:

Νευροχειρουργός- Εξωτερικός Συνεργάτης, Β' Νευροχειρουργική Κλινική, "Ερρίκος Ντυνάν Hospital Center", Αθήνα

➤ Ιανουάριος 2010- Σεπτέμβριος 2014:

Ειδικευόμενος ιατρός, Νευροχειρουργική Κλινική, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών "Γ. Γεννηματάς"- Απονομή Εύφημης Μνείας στις 17/2/2012

➤ Φεβρουάριος 2008- Μάιος 2009:

Εικευόμενος ιατρός, Β' Χειρουργική Κλινική, 1ο Νοσοκομείο ΙΚΑ Αθηνών

➤ Σεπτέμβριος 2006-Φεβρουάριος 2008:

Αγροτικός ιατρός, Περιφερειακό Ιατρείο Προυσσού, Γενικό Νοσοκομείο Καρπενησίου Ευρυτανίας (απόσπαση για τις εφημερίες στο Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών του νοσοκομείου)

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

➤ Ιούνιος 1994:

Αγγλικά: "Certificate of Proficiency in English", University Of Cambridge

➤ Μάιος 1993:

Ιταλικά: "Certificato Superiore", Esami di Lingua Italiana, Palso

ΣΤΡΑΤΙΩΤΙΚΗ ΘΗΤΕΙΑ

➤ Μάιος 2005- Μάιος 2006:

Στρατιώτης Υγειονομικού, Ιατρός Μονάδος αρχικά στο Όπλο Τεθωρακισμένων και ακολούθως στο Γεωγραφικό Σώμα Στρατού Ξηράς

ΛΙΘΟΝΕΙΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Skardoutsou A, Primikiris P, Tsentidis C, Marmarinos A, Gourgiotis D. Bcl-2 and Caspase-9 serum levels in children and adolescents with idiopathic epilepsy

and active seizures. *Minerva Pediatr.* 2017 Jun 22. doi: 10.23736/S0026-4946.17.04787-9. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28643990.

2. Gkekas N, Primikiris P, Georgakoulias N. Postoperative rhinorrhea without intraoperative cerebrospinal fluid leak after endoscopic transnasal transphenoidal surgery for pituitary macroadenomas. *World Neurosurg.* 2014 Nov;82(5):e658-9.

3. Gkekas N, Primikiris P, Sfikas S, Vyziotis A, Georgakoulias N. Endoscopic transoral decompression of cervicomedullary junction: a rational alternative to the traditional microscopic transoral approach. *World Neurosurg.* 2014 Sep-Oct;82(3-4):e573-5.

4. Gkekas N, Primikiris P, Georgakoulias N. Acute onset of trigeminal neuralgia, facial paresis and dysphagia after mild head injury. *Br J Neurosurg.* 2014 Jan;28(1):122-4.

5. Gkekas N, Primikiris P, Georgakoulias N. Untethering of herniated left optic nerve after dopamine agonist treatment for giant prolactinoma. *Acta Neurochir (Wien).* 2013 Mar;155(3):495-6.

6. Luigi Maria Cavallo, Andrea Messina, Isabella Esposito, Andrea Elefante, Panagiotis Primikiris, Francesco Briganti, Paolo Cappabianca, Enrico de Divitiis. *Neuroanatomia: Passato, presente e futuro.* Poseidonia Medicina. 2003 Dicembre; Anno V- N. 19.

ΔΙΕΘΝΕΙΣ ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

7. G.A. Piscopo, L.M. Cavallo, M. Esposito, A. Messina, D. Solari, P. Primikiris, G. Iaconetta, F. Maiuri, E. de Divitiis.

“Duplicazione del sesto nervo cranico: studio anatomico”.

Dipartimento di Scienze Neurologiche, Cattedra di Neurochirurgia, Università degli studi di Napoli “Federico II”, 53o Congresso Nazionale-Società Italiana di Neurochirurgia, Μιλάνο, Ιταλία, Νοέμβριος 2004.

8. M. Esposito, G. Piscopo, L.M. Cavallo, A. Messina, L. di Somma, D. Solari, P. Primikiris, I. Esposito, G. Iaconetta.

“Anatomia chirurgica della giunzione cranio-cervicale”.

Dipartimento di Scienze Neurologiche, Cattedra di Neurochirurgia, Università degli studi di Napoli “Federico II”, Giornate scientifiche del polo delle Scienze e delle Tecnologie per la vita, Νάπολη, Ιταλία, Μάιος 2004.

9. M. Esposito, G. Piscopo, L.M. Cavallo, A. Messina, L. di Somma, P. Primikiris, I. Esposito, G. Iaconetta.

“Approcci alla cerniera cranio cervicale: studio anatomico”

Dipartimento di Scienze Neurologiche, Cattedra di Neurochirurgia, Università degli studi di Napoli “Federico II”, XVII Congresso Nazionale- Società Polispecialistica Italiana dei Giovani Chirurghi, Σιένα, Ιταλία, Μάιος 2004.

10. C. Peca, A. Messina, F. Esposito, L.M. Cavallo, M. Esposito, I. Romano, I. Esposito, P. Primikiris, P. Cappabianca, E. de Divitiis.

“Una scossa elettrica percorre il viso ed ha inizio l’ odissea trigeminale”.

Dipartimento di Scienze Neurologiche, Clinica Neurochirurgica, Università degli Studi di Napoli “Federico II”, Giornate scientifiche del polo delle Scienze e delle Tecnologie per la vita, Νάπολη, Ιταλία, Ιούνιος 2003.

ΛΟΙΠΕΣ ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

11. A. Βυζιώτης, Ν. Γκέκας, Δ. Κατσιάνης, Π.Πριμικύρης, Ν. Γεωργακούλιας.

“Δυσκολίες χειρουργικής των γλοιωμάτων χαμηλής κακοήθειας της περιοχής της νήσου του Reil”.

Αναρτημένη ανακοίνωση- 28ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής με διεθνή συμμετοχή, Καβάλα, Ιούνιος 2014.

12. A. Βυζιώτης, Ν. Γκέκας, Δ. Κατσιάνης, Π. Πριμικύρης, Ν. Γεωργακούλιας.

“Ενδοσκοπική διαρρινική διασφηνοειδική αφαίρεση κρανιοφαρυγγιωμάτων”.

Αναρτημένη ανακοίνωση- 28ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής με

διεθνή συμμετοχή, Καβάλα, Ιούνιος 2014.

13. Κ. Οικονόμου, Ν. Γκέκας, Α. Βυζιώτης, Π. Πριμικύρης, Ν. Γεωργακούλιας.
“Αφαίρεση όγκου επίφυσης με πλάγια υπερπαραεγκεφαλιδική υποσκηνίδια προσπέλαση με τη βοήθεια ενδοσκοπίου και νευροπλοήγησης”.

Αναρτημένη ανακοίνωση- 28ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής με διεθνή συμμετοχή, Καβάλα, Ιούνιος 2014.

14. Α. Βυζιώτης, Ν. Γκέκας, Σ. Σφήκας, Π. Πριμικύρης, Ν. Γεωργακούλιας.
“Ενδοσκοπική τρίτη κοιλιοστομία μετά από αφαίρεση βαλβίδων κοιλιοπεριτοναϊκής παροχέτευσης εγκεφαλονωτιαίου υγρού λόγω λοίμωξης κεντρικού νευρικού συστήματος σε ασθενή με επικοινωνούντα υδροκέφαλο”.

Αναρτημένη ανακοίνωση- 28ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής με διεθνή συμμετοχή, Καβάλα, Ιούνιος 2014.

15. Ν. Γκέκας, Π. Πριμικύρης, Α. Βυζιώτης, Κ. Κασάπας, Ν. Γεωργακούλιας.
“Πολυεστιακό (multifocal) γλοίωμα χαμηλής κακοήθειας”.

Αναρτημένη ανακοίνωση- 28ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής με διεθνή συμμετοχή, Καβάλα, Ιούνιος 2014.

16. Ν. Γκέκας, Δ. Κατσιάνης, Π. Πριμικύρης, Α. Βυζιώτης, Ν. Γεωργακούλιας.
“Ιδιοπαθής κήλη νωτιαίου μυελού: μια σπάνια παρουσίαση του συνδρόμου καθήλωσης νωτιαίου μυελού”.

Αναρτημένη ανακοίνωση- 28ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής με διεθνή συμμετοχή, Καβάλα, Ιούνιος 2014.

17. Ν. Γκέκας, Α. Βυζιώτης, Δ. Κατσιάνης, Π. Πριμικύρης, Ν. Γεωργακούλιας.
“Ενδοσκοπική διαρρινική αφαίρεση αδενώματος υποφύσεως: χειρουργική τεχνική, τεχνολογική υποστήριξη, αποτέλεσμα, οφέλη και επιπλοκές”.

Προφορική ανακοίνωση- 28ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής με διεθνή συμμετοχή, Καβάλα, Ιούνιος 2014.

18. Ν. Γκέκας, Π. Πριμικύρης, Α. Βυζιώτης, Σ. Σφήκας, Ν. Γεωργακούλιας.
“Modified orbitozygomatic extradural intradural transcavernous approach σε παθολογίες του σηραγγώδους κόλπου”.

Προφορική ανακοίνωση- 28ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής με διεθνή συμμετοχή, Καβάλα, Ιούνιος 2014.

19. Κ. Κασάπας, Σ. Σφήκας, Π. Πριμικύρης, Ν. Γκέκας, Ν. Γεωργακούλιας, Γ. Ορφανίδης.

“Υδροκέφαλος σε έδαφος μεταλοιμώδους απόφραξης του τρήματος Magendie”. Αναρτημένη ανακοίνωση- 27ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής με διεθνή συμμετοχή, Αθήνα, Ιούνιος 2013.

20. Ν. Γκέκας, Π. Πριμικύρης, Α. Βυζιώτης, Ν. Γεωργακούλιας, Γ. Ορφανίδης. “Ενδείξεις χειρουργικής αντιμετώπισης προλακτινωμάτων σε περίπτωση νοσηρότητας της θεραπείας με αγωνιστές ντοπαμίνης”.

Αναρτημένη ανακοίνωση- 27ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής με διεθνή συμμετοχή, Αθήνα, Ιούνιος 2013.

21) Α. Βυζιώτης, Π. Πριμικύρης, Δ. Βαρθαλίτης, Δ. Κατσιάνης, Ν. Γεωργακούλιας, Ε. Αντωνίου.

“Διεγχειρητική χρήση Doppler για την αναγνώριση της ενδοσηραγγώδους μοίρας της έσω καρωτίδας κατά την ενδοσκοπική διαρρινική προσπέλαση αδενωμάτων υπόφυσης που επεκτείνονται στο σηραγγώδη κόλπο”.

Αναρτημένη ανακοίνωση- 27ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής με διεθνή συμμετοχή, Αθήνα, Ιούνιος 2013.

22) Π. Πριμικύρης, Δ. Βαρθαλίτης, Α. Βυζιώτης, Ν. Γκέκας, Κ. Κασάπας, Ν. Γεωργακούλιας.

“Μετεγχειρητική ρινόρροια χωρίς διεγχειρητική εκροή ENY μετά από ενδοσκοπική διαρρινική αφαίρεση μακροαδενώματος υπόφυσης: αιτίες και πρόληψη”.

Αναρτημένη ανακοίνωση- 27ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής με διεθνή συμμετοχή, Αθήνα, Ιούνιος 2013.

23) Π. Πριμικύρης, Δ. Βαρθαλίτης, Α. Βυζιώτης, Ν. Γκέκας, Δ. Κατσιάνης, Ν. Γεωργακούλιας.

“Χειρουργική αντιμετώπιση μηνιγγιωμάτων συμβολής ελεύθερου χείλους

σκηνιδίου- δρεπάνου: παρουσίαση δύο περιστατικών”.

Προφορική ανακοίνωση- 27ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής με διεθνή συμμετοχή, Αθήνα, Ιούνιος 2013.

24) Δ. Κατσιάνης, Π. Πριμικύρης, Α. Βυζιώτης, Κ. Κασάπας, Ν. Γεωργακούλιας.

“Ενδοσκοπική διαρρινική αφαίρεση αδενώματος υποφύσεως: χειρουργική τεχνική, τεχνολογική υποστήριξη, αποτέλεσμα, οφέλη και επιπλοκές”.

Προφορική ανακοίνωση- 27ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής με διεθνή συμμετοχή, Αθήνα, Ιούνιος 2013.

25) Δ. Βαρθαλίτης, Α. Βυζιώτης, Π. Πριμικύρης, Ν. Γεωργακούλιας, Γ. Ορφανίδης.

“Οξεία υδροκεφαλία μετά από αραχνοειδίτιδα στην περιοχή του τρήματος Magendie”.

Αναρτημένη ανακοίνωση- 26ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής με διεθνή συμμετοχή, Θεσσαλονίκη, Μάιος- Ιούνιος 2012.

26) Ν. Γκέκας, Α. Βυζιώτης, Π. Πριμικύρης, Β. Βαλαδάκης, Γ. Ορφανίδης.

“Πρωτοπαθής PNET (primitive neuroectodermal tumor) οσφυϊκής μοίρας σπονδυλικής στήλης”.

Αναρτημένη ανακοίνωση- 26ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής με διεθνή συμμετοχή, Θεσσαλονίκη, Μάιος- Ιούνιος 2012.

27) Ν. Γκέκας, Π. Πριμικύρης, Δ. Βαρθαλίτης, Κ. Οικονόμου, Γ. Ορφανίδης

“Οξύ υποσκληρίδιο αιμάτωμα εγκεφάλου σε έδαφος αρτηριοφλεβώδους δυπλασίας της σκληράς μήνιγγας (dural arteriovenous fistula)”.

Αναρτημένη ανακοίνωση- 26ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής με διεθνή συμμετοχή, Θεσσαλονίκη, Μάιος- Ιούνιος 2012.

28) Δ. Βαρθαλίτης, Α. Βυζιώτης, Π. Πριμικύρης, Ν. Γεωργακούλιας, Γ. Ορφανίδης.

“Μικροαγγειακή αποσυμπίεση με καθήλωση του αγγείου με χρήση κλιπ για αντιμετώπιση νευραλγίας τριδύμου”.

Αναρτημένη ανακοίνωση- 26ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής με διεθνή συμμετοχή, Θεσσαλονίκη, Μάιος- Ιούνιος 2012.

29) Σ. Σφήκας, Π. Πριμικύρης, Δ. Φελέκης, Γ. Ορφανίδης.

“Επίσταξη ρινός σε έδαφος ραγέντος ανευρύσματος της σπαραγγώδους μοίρας της έσω καρωτίδας: αναφορά περιστατικών. Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας”.

Αναρτημένη ανακοίνωση- 26ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής με διεθνή συμμετοχή, Θεσσαλονίκη, Μάιος- Ιούνιος 2012.

30) Α. Βυζιώτης, Δ. Βαρθαλίτης, Π. Πριμικύρης, Β. Βαλαδάκης, Γ. Ορφανίδης.

“Επιπλοκές χειρουργικής όγκων οπισθίου κρανιακού βόθρου”.

Προφορική ανακοίνωση- 26ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής με διεθνή συμμετοχή, Θεσσαλονίκη, Μάιος- Ιούνιος 2012.

31) Φ. Μπουρλογιάννης, Α. Βυζιώτης, Π. Πριμικύρης, Ν. Γεωργακούλιας, Χ. Σταματόπουλος, Δ. Βαρθαλίτης, Ν. Γκέκας, Σ. Σφήκας, Κ. Οικονόμου, Β. Βαλαδάκης, Ε. Αντωνίου, Π. Σιούτος, Γ. Ορφανίδης, Α. Σερέτης.

“Επείγουσα αντιμετώπιση ρήξεως ανευρυσμάτων με ενδοεγκεφαλικό αιμάτωμα, ο ρόλος της αγγειογραφίας, η έκβαση των περιστατικών”.

Προφορική ανακοίνωση- 25ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής με διεθνή συμμετοχή, Αθήνα, Ιούνιος 2011.

32) Δ. Βαρθαλίτης, Ν. Γεωργακούλιας, Χ. Σταματόπουλος, Φ. Μπουρλογιάννης, Α. Βυζιώτης, Π. Πριμικύρης, Σ. Σφήκας, Ν. Γκέκας, Κ. Οικονόμου, Γ. Ορφανίδης, Α. Σερέτης.

“Σύνδρομο καθήλωσης νωτιαίου μυελού ενηλίκων”.

Αναρτημένη ανακοίνωση- 25ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής με διεθνή συμμετοχή, Αθήνα, Ιούνιος 2011.

33) Φ. Μπουρλογιάννης, Π. Σιούτος, Ν. Γεωργακούλιας, Β. Βαλαδάκης, Ε. Αντωνίου, Ν. Γκέκας, Σ. Σφήκας, Π. Πριμικύρης, Α. Βυζιώτης, Β. Βαρθαλίτης, Γ. Ορφανίδης, Α. Σερέτης.

“Ενδοκράνια υπόταση και αυτόματα υποξέα- χρόνια υποσκληρίδια αιματώματα: μια ασυνήθιστη νευροχειρουργική οντότητα”.

Αναρτημένη ανακοίνωση- 25ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής με διεθνή συμμετοχή, Αθήνα, Ιούνιος 2011.

34) Σ. Σφήκας, Χ. Σταματόπουλος, Π. Πριμικύρης, Ν. Γκέκας, Ν. Γεωργακούλιας, Γ. Ορφανίδης, Α. Σερέτης.

“Ανασκόπηση της τρέχουσας μικροχειρουργικής αντιμετώπισης των γλοιωμάτων της νήσου του Reil και αναφορά περιστατικού”.

Αναρτημένη ανακοίνωση- 25ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής με διεθνή συμμετοχή, Αθήνα, Ιούνιος 2011.

35) Ν. Γκέκας, Ν. Γεωργακούλιας, Π. Πριμικύρης, Α. Βυζιώτης, Δ. Βαρθαλίτης, Σ. Σφήκας, Γ. Ορφανίδης, Α. Σερέτης.

“Πρωτοπαθή αλλήλως παρακείμενα ενδοκράνια νεοπλάσματα σε περιοχή αφαιρέντος ενδοεγκεφαλικού αιματώματος”.

Αναρτημένη ανακοίνωση- 25ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής με διεθνή συμμετοχή, Αθήνα, Ιούνιος 2011.

36) Π. Πριμικύρης, Ν. Γεωργακούλιας, Φ. Μπουρλογιάννης, Χ. Σταματόπουλος, Δ. Βαρθαλίτης, Α. Βυζιώτης, Ν. Γκέκας, Σ. Σφήκας, Κ. Παπαχρήστου, Γ. Ορφανίδης, Α. Σερέτης.

“Νόσος Cushing: Αποτελέσματα υποχείλιας διασφηνοειδικής αφαίρεσης εξεργασίας σε ασθενείς με αρνητική βιοψία”.

Αναρτημένη ανακοίνωση- 25ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής με διεθνή συμμετοχή, Αθήνα, Ιούνιος 2011.

37) Π. Πριμικύρης, Ν. Γεωργακούλιας, Φ. Μπουρλογιάννης, Χ. Σταματόπουλος, Δ. Βαρθαλίτης, Α. Βυζιώτης, Ν. Γκέκας, Κ. Οικονόμου, Κ. Παπαχρήστου, Γ. Ορφανίδης, Α. Σερέτης.

“Νόσος Cushing: Αποτελέσματα υποχείλιας διασφηνοειδικής αφαίρεσης εξεργασίας σε ασθενείς με αρνητική μαγνητική τομογραφία τουρκικού εφιπίου”.

Αναρτημένη ανακοίνωση- 25ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής με διεθνή συμμετοχή, Αθήνα, Ιούνιος 2011.

38) Α. Βυζιώτης, Ν. Γεωργακούλιας, Χ. Σταματόπουλος, Φ. Μπουρλογιάννης, Π. Πριμικήρης, Δ. Βαρθαλίτης, Ν. Γκέκας, Σ. Σφήκας, Κ. Οικονόμου, Β. Βαλαδάκης, Ε. Αντωνίου, Π. Σιούτος, Γ. Ορφανίδης, Α. Σερέτης.

“Σηραγγώδες αιμαγγείωμα της περιοχής του τμήματος του Μονγο- Αναφορά περιστατικού και ανασκόπηση της βιβλιογραφίας”.

Αναρτημένη ανακοίνωση- 25ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής με διεθνή συμμετοχή, Αθήνα, Ιούνιος 2011.

39) Α. Βυζιώτης, Π. Πριμικήρης, Χ. Σταματόπουλος, Φ. Μπουρλογιάννης, Δ. Βαρθαλίτης, Ν. Γκέκας, Σ. Σφήκας, Κ. Οικονόμου, Β. Βαλαδάκης, Ε. Αντωνίου, Π. Σιούτος, Γ. Ορφανίδης, Α. Σερέτης.

“Ενδοκοιλιακοί όγκοι εγκεφάλου- Παρουσίαση μιας σειράς περιστατικών στην κλινική μας και της χειρουργικής αντιμετώπισης τους”.

Ελευθερη ανακοίνωση- 25ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής με διεθνή συμμετοχή, Αθήνα, Ιούνιος 2011.

40) Δ. Βαρθαλίτης, Ν. Γεωργακούλιας, Χ. Σταματόπουλος, Φ. Μπουρλογιάννης, Α. Βυζιώτης, Κ. Παπαχρήστου, Κ. Ματαλιωτάκης, Π. Πριμικήρης, Ε. Αντωνίου, Π. Σιούτος, Β. Βαλαδάκης, Γ. Ορφανίδης, Α. Σερέτης.

“Νευραλγία τριδύμου: χειρουργική αντιμετώπιση”.

Ελεύθερη ανακοίνωση- 24ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής με διεθνή συμμετοχή, Ηράκλειο, Μάιος 2010.

41) Π. Πριμικήρης, Ν. Γεωργακούλιας, Φ. Μπουρλογιάννης, Χ. Σταματόπουλος, Δ. Βαρθαλίτης, Α. Βυζιώτης, Κ. Παπαχρήστου, Κ. Ματαλιωτάκης, Γ. Ορφανίδης, Α. Σερέτης.

“Ενδοκοιλιακοί όγκοι εγκεφάλου: χειρουργική αντιμετώπιση”.

Ελεύθερη ανακοίνωση- 24ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής με διεθνή συμμετοχή, Ηράκλειο, Μάιος 2010.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η επιληψία αποτελεί το συχνότερο νευρολογικό νόσημα που αφορά το 1-2% του πληθυσμού ιδιαίτερα τα παιδιά [1]. Οι επιληπτικές κρίσεις- σπασμοί αφορούν σύνθετες αλληλοεπιδράσεις σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου. Παρά τη χορήγηση αντιεπιληπτικών φαρμάκων, το ένα τρίτο των πασχόντων συνεχίζει να παρουσιάζει κρίσεις. Οι παρατεταμένες επιληπτικές κρίσεις (status epilepticus) προκαλούν σε ανθρώπους αλλά και ζώα προοδευτική ατροφία και σκλήρυνση (γλοίωση) των ιππόκαμπων του κροταφικού λοβού [2-4].

Ο θάνατος των κυττάρων προκαλείται από τη διεγερσιμοτοξικότητα δηλαδή την αυξημένη απελευθέρωση των γλουταμινικών νευροδιαβιβαστών στις συνάψεις με αποτέλεσμα την αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου το οποίο οδηγεί σε οξειδωτικό στρες και θάνατο των νευρώνων. Ο μηχανισμός του θανάτου είναι η νέκρωση κυρίως λόγω ενεργειακής ανεπάρκειας αλλά ρόλο έχει και η απόπτωση [5]. Η απόπτωση αποτελεί ελεγχόμενο προγραμματισμένο τύπο κυτταρικού θανάτου. Μορφολογικά χαρακτηρίζεται από την συρρίκνωση του κυττάρου, διατήρηση της κυτταρικής μεμβράνης και κατακερματισμό του DNA του πυρήνα μέσω των οδών της μεταγραφής και της μετάφρασης πρωτεϊνών. Έχουν αναγνωρισθεί δύο οδοί στο μηχανισμό της απόπτωσης: η εξωτερική οδός, που ενεργοποιείται από εξωκυτταρικούς παράγοντες σε υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης, και η εσωτερική ή μιτοχονδριακή οδός [6]. Η τελευταία είναι η κύρια οδός στον κυτταρικό θάνατο των νευρώνων στην επιληψία και προκαλείται από διαταραχές της ενδοκυττάριας ομοιόστασης [7]. Οι πρωτεΐνες Bcl-2 είναι οι βασικοί ρυθμιστές στην ενδογενή ή μιτοχονδριακή οδό της απόπτωσης [8, 9]. Η απόφαση για το θάνατο στην εσωτερική οδό απόπτωσης που είναι ο βασικός δρόμος στην επιληψία ρυθμίζεται από τον ανταγωνισμό μεταξύ των προ- και αντιαποπτωτικών μελών της Bcl-2 ομάδας πρωτεϊνών οι οποίες ελέγχουν την ακεραιότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Λύση της μιτοχονδριακής μεμβράνης ενεργοποιεί την ενδοπρωτεάση κασπάση-9 {η οποία

αυξάνεται σημαντικά και σε νευροεκφυλιστικά νοσήματα [10]} και την κασπάση-3 οι οποίες απελευθερώνουν τις ενδοπυρηνικές νουκλεάσες που κατακερματίζουν το DNA του πυρήνα. Σε μία μοναδική στη βιβλιογραφία μελέτη 30 παιδιών και εφήβων με ιδιοπαθή επιληψία {El-Hodhod MA et al. [210]} ανακοινώθηκε ότι οι πάσχοντες είχαν σημαντικά αυξημένο επίπεδο των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών της ομάδος Bcl-2 στο αίμα που θα μπορούσε να αποτελέσει βιολογικό δείκτη της επιληψίας στα παιδιά.

Δεν υπάρχει σήμερα φάρμακο το οποίο να προλαμβάνει την ανάπτυξη της επιληψίας σε όσους βρίσκονται σε κίνδυνο παρά την αυξανόμενη κατανόηση των υποκείμενων μοριακών και κυτταρικών οδών. Κύριοι παράγοντες οι οποίοι εμποδίζουν την πρόοδο σε αυτόν τον τομέα είναι η σύνθετη και πολυπαραγοντική φύση της επιληψίας καθώς και η ετερογένειά της. Κατά συνέπεια αυξάνεται η εντύπωση ότι χρειάζονται αμφότερα αντισπασμωδικά φάρμακα που στοχεύουν τη θεραπεία και αντιεπιληπτογόνα φάρμακα που στοχεύουν την ανάπτυξη της επιληψίας ή την εξέλιξή της. Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει πρόοδος στην παθογένεια της επιληψίας με την ανακάλυψη και μελέτη των mRNAs (microRNAs) τα οποία ελέγχουν και ρυθμίζουν την μεταγραφή και τη μετάφραση των πρωτεϊνών στις συνάψεις των νευρώνων ώστε να μην διαιωρίζονται οι παθολογικές πρωτεΐνες που σχετίζονται με τις κρίσεις. Μερικά από τα mRNAs σε πάσχοντες έχουν συσχετισθεί με το νευρωνικό θάνατο από απόπτωση. Συνεπώς η αναγνώριση βιολογικών δεικτών στο αίμα πασχόντων (βιοδείκτες) που μπορεί να καθοδηγήσουν τη διάγνωση και την πορεία της θεραπείας βρίσκεται στο κέντρο της ερευνητικής προσπάθειας τα τελευταία χρόνια. Σήμερα δεν υπάρχει μεμονωμένος διαγνωστικός βιοδείκτης για την επιληψία [182]. Πιθανότερος θεωρείται ο συνδυασμός περισσότερων βιοδεικτών για τη διάγνωση όσο και την παρακολούθηση της θεραπείας.

Η παρούσα μελέτη έχει ως στόχο τη μέτρηση των επιπέδων της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 και της προαποπτωτικής κασπάσης -9 στο

αίμα παιδιών και εφήβων με ιστορικό επιληψίας ή μεμονωμένων κρίσεων προκειμένου να διερευνηθεί αν αποτελούν εν δυνάμει διαγνωστικούς βιολογικούς δείκτες επιληψίας καθώς και να συσχετισθούν με κλινικά χαρακτηριστικά των κρίσεων.

A) ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΠΙΛΗΨΙΑ

Η επιληψία είναι όρος προερχόμενος από την ελληνική γλώσσα: «επιλαμβάνομαι» σημαίνει «παίρνω υπό τον έλεγχο μου» και καταγράφηκε για πρώτη φορά σε Βαβυλωνιακό κείμενο. Ο Ιπποκράτης, 400 π.Χ. περίπου, περιγράφει την επιληψία ως ιερό νόσημα ενώ άλλοι πολιτισμοί θεωρούσαν ως αιτία της το δαιμόνιο. Ο Άγγλος νευρολόγος John Hughlings Jackson, μόλις το 1874, αναγνώρισε την επιληψία σαν διαταραχή της ηλεκτρικής δραστηριότητας του εγκεφάλου. Η επιληψία είναι το συχνότερο σοβαρό νευρολογικό νόσημα στον κόσμο και αφορά όλες τις ηλικίες [11]. Περίπου 50 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως πάσχουν από επιληψία με ετήσια επίπτωση 50-70 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα. Η συχνότητα της νόσου ποικίλλει ανάλογα με την ηλικία, με τη μεγαλύτερη συχνότητα να καταγράφεται στη βρεφική και παιδική ηλικία, βαθμιαία πτώση στον ενήλικα και πάλι μεγάλη άνοδο πάνω από τα 65 χρόνια της ζωής. Καθοριστικό χαρακτηριστικό κλινικό γνώρισμα της επιληψίας είναι η προδιάθεση να εκδηλωθούν υποτροπιάζοντα απρόκλητα επεισόδια κρίσεων. Η επιληπτική κρίση είναι αποτέλεσμα μιας προσωρινής δυσλειτουργίας του εγκεφάλου, συνέπεια ανώμαλου συγχρονισμού των νευρωνικών εκφορτίσεων, που απορυθμίζει τη λειτουργία της εγκεφαλικής περιοχής (ή περιοχών) από την οποία (τις οποίες) προέρχεται ή την οποία (τις οποίες) διατρέχει.

Όταν η αιτιολογία της νόσου είναι άγνωστη αυτή αναφέρεται σαν κρυπτογενής (υπάρχει υποψία αιτίας που δε μπορεί όμως να τεκμηριωθεί βάσει των επί του παρόντος γνώσεων μας) ή ιδιοπαθής (χωρίς γνωστή αιτία). Όταν συνδυάζεται με διεγνωσμένες παθολογικές καταστάσεις όπως κάκωση ή όγκος, χαρακτηρίζεται σαν συμπτωματική ή επίκτητος [2].

Τα επιληπτικά φαινόμενα προκαλούν στον πάσχοντα ένα φάσμα εκδηλώσεων όπως ψευδαισθήσεις, διαταραχές του αυτόνομου συστήματος, κινητικές εκδηλώσεις και γενικευμένες συσπάσεις (σπασμοί), αισθητικές εκδηλώσεις,

απώλεια συνείδησης. Αν και στο 70% περίπου των περιπτώσεων τα συμπτώματα προοδευτικά εμφανίζουν ύφεση έως διακοπής, ιδιαίτερα στα παιδιά, περίπου 30-40% των περιπτώσεων συνεχίζουν να υποφέρουν από συμπτώματα που ποικίλλουν σε συχνότητα και βαρύτητα.

Αν και έχουν περιγραφεί τουλάχιστον 40 διαφορετικά επιληπτικά σύνδρομα, οι επιληπτικές κρίσεις ταξινομούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τις γενικευμένες και τις εστιακές κρίσεις [13, 14]. Η πρώτη κατηγορία περιγράφει διαταραχές οι οποίες έχουν έναρξη ταυτόχρονα σε αμφότερα τα εγκεφαλικά ημισφαίρια ενώ στη δεύτερη κατηγορία οι διαταραχές προέρχονται από μία ή περισσότερες εστιακές εντοπίσεις αλλά δύνανται να διασπείρονται ώστε να περιλάβουν αμφότερα τα ημισφαίρια (δευτεροπαθής γενίκευση) [15]. Πειραματικές αλλά και κλινικές μελέτες έχουν τεκμηριώσει ότι οι παρατεταμένοι επιληπτικοί σπασμοί όπως και το status epilepticus μπορεί να προκαλέσουν τον θάνατο εγκεφαλικών νευρώνων στον εγκέφαλο, ιδιαίτερα στους ιππόκαμπους αλλά και την παρεγκεφαλίδα και το φλοιό. Δεν είναι εύκολα διακριτό εάν οι επιληπτικές κρίσεις προκαλούν βλάβη ή αν αυτή σχετίζεται με τα αίτια της επιληψίας. Ο έλεγχος με υψηλής ανάλυσης νευροαπεικονιστικές μεθόδους αποκάλυψε ότι οι βλάβες εξελίσσονται στις περιπτώσεις που οι κρίσεις συνεχίζονται. Αυτό αποτέλεσε την αφορμή ώστε να καθορισθούν οι οδοί που σχετίζονται με το νευρωνικό θάνατο όπως η νέκρωση και η απόπτωση.

Αν και οι περισσότερες περιπτώσεις γενικευμένης επιληψίας έχουν σύνθετο τύπο κληρονομικότητας, μερικές χαρακτηρίζονται από κληρονομικό τύπο που περιλαμβάνει μεταλλάξεις μονογονιδιακές. Σχεδόν όλες οι μεταλλάξεις έχουν εντοπιστεί σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες των διαύλων των ιόντων, κυρίως των ιόντων νατρίου, ή του υποδοχέα GABARG2 του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA). Οι μηχανισμοί που σχετίζονται με την εστιακού τύπου επιληψία είναι λιγότερο γνωστοί παρότι οι εστιακές κρίσεις είναι ο συχνότερος τύπος στους ενήλικες και συχνά οφείλεται σε επίκτητες βλάβες όπως ο τραυματισμός του εγκεφάλου, τα αγγειακά επεισόδια και οι όγκοι.

Ο συχνότερος τύπος εστιακής επιληψίας είναι με εντόπιση στον κροταφικό λοβό. Οι κρίσεις αρχίζουν συχνά από την έσω επιφάνεια (μοίρα) του κροταφικού λοβού (mesial temporal lobe- MTL) και ειδικότερα από δομές όπως ο ιππόκαμπος, η αμυγδαλή και ο εφαπτόμενος παραιπποκάμπειος φλοιός. Κλινικά χαρακτηρίζονται από οσφρητικές ή γευστικές ψευδαισθήσεις, επιγαστρική τάση ή έμετο, ψυχικά συμπτώματα όπως φόβος ή αποπροσωποποίηση. Όταν το επίπεδο συνείδησης διαταραχθεί ο ασθενής παραμένει ακίνητος, με απλανές βλέμμα, ασυνάρτητο λόγο ή στοματικούς αυτοματισμούς.

Δεν υπάρχει σήμερα φάρμακο το οποίο να προλαμβάνει την ανάπτυξη της επιληψίας σε όσους βρίσκονται σε κίνδυνο παρά την αυξανόμενη κατανόηση των υποκειμένων μοριακών και κυτταρικών οδών. Κύριοι παράγοντες οι οποίοι εμποδίζουν την πρόοδο σε αυτόν τον τομέα είναι η σύνθετη και πολυπαραγοντική φύση της επιληψίας καθώς και η ετερογένεια της. Κατά συνέπεια αυξάνεται η εντύπωση ότι χρειάζονται αμφότερα αντισπασμωδικά (φάρμακα που θεραπεύουν τις επιληπτικές κρίσεις) και αντιεπιληπτογόνα (φάρμακα που προλαμβάνουν την ανάπτυξη της επιληψίας ή την εξέλιξη της). Οι θεραπείες πρέπει να αναπτύσσονται και να εφαρμόζονται σε εξατομικευμένη βάση. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για τα αντιεπιληπτογόνα φάρμακα τα οποία θα έπρεπε ιδανικά να ταιριάζουν με την αιτιολογία της ανάπτυξης της επιληψίας. Συνεπώς η αναγνώριση βιολογικών δεικτών-σηματοδοτών (biomarkers) οι οποίοι μπορεί να βοηθήσουν την καθοδήγηση της διάγνωσης και της θεραπείας βρίσκεται στο κέντρο της ερευνητικής προσπάθειας τα τελευταία δέκα χρόνια [16, 17]. Είναι αναγκαίο να διερευνηθούν τα άτομα με το πρώτο επεισόδιο σπασμών ή την αρχική βλάβη, ώστε να υπάρξουν λεπτομερή κατανοητά κλινικοπαθολογικά δεδομένα.

2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΣΤΡΕΣ – ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ

2.1. Γενικά

Τα κύτταρα αντιδρούν στο στρες με διαφορετικούς τρόπους οι οποίοι κυμαίνονται από την ενεργοποίηση των οδών που προάγουν την επιβίωση μέχρι τον προγραμματισμό του κυτταρικού θανάτου, με επακόλουθη απομάκρυνση των τραυματισμένων κυττάρων. Η αρχική απάντηση στο επιθετικό (στρεσογόνο) ερέθισμα στοχεύει στο να βοηθήσει το κύτταρο να αμυνθεί και να συνέλθει από την επίθεση. Αν εν τούτοις το ερέθισμα δεν υποχωρήσει ενεργοποιούνται οδοί θανάτου ώστε να απομακρυνθούν τα κατεστραμμένα κύτταρα και να εξασφαλισθεί η κυτταρική ομοιόσταση [18]. Υπάρχουν πολλά είδη στρες και η αντιμετώπιση τους εξαρτάται από τον τύπο (του στρες) και το βαθμό της επίθεσης. Ο όρος προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος αναφέρεται στον ελεγχόμενο τύπο θανάτου που σχετίζεται με μια σειρά από βιοχημικές και μορφολογικές μεταβολές [19].

Σήμερα αναγνωρίζονται 3 τύποι κυτταρικού θανάτου. Η απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος τύπου I, η αυτοφαγία ή τύπος II και η νέκρωση ή τύπος III [20, 21].

2.2. Τύποι κυτταρικού θανάτου προκαλούμενοι από το κυτταρικό στρες

2.2.1. Αποπτωτικός ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος τύπου I

Ο αποπτωτικός προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ή τύπος I επιτρέπει την “αυτοκτονία” του κυττάρου. Η απόπτωση έχει μέγιστη σημασία για την επιβίωση των πολυκύτταρων οργανισμών επειδή απομακρύνει τα προσβεβλημένα κύτταρα που μπορεί να επηρεάσουν τη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού [22].

Το τελικό πρόγραμμα στα θηλαστικά εξαρτάται από την ενεργοποίηση των ενδοκυτταρικών κασπασών που προκαλούν τροποποίηση των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων μέσα στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα [23]. Δύο οδοί προηγούνται αυτής της ενεργοποίησης των κασπασών. Η πρώτη είναι η ενεργοποίηση της εξωτερικής οδού της απόπτωσης που αρχίζει με τη μεσολάβηση ενός υποδοχέα στην επιφάνεια του κυττάρου και που τελικά ενεργοποιεί την κασπάση-8 και αυτή με τη σειρά της την κασπάση-3 [24]. Η τελευταία αποδομεί τον πυρήνα μέσω ενδονουκλεασών. Η δεύτερη ή εσωτερική οδός κατευθύνεται από το μιτοχόνδριο, πού είναι ο κεντρικός στόχος για το ενδοκυτταρικό οξειδωτικό στρες [25]. Η απορρύθμιση του μιτοχονδρίου απελευθερώνει ένα σύνολο από προαποπτωτικά μόρια όπως τα κυτόχρωμα C, και Apaf-1 (apoptosis initiating factor) τα οποία συμμετέχουν στη δημιουργία ενός μοριακού αθροίσματος (το αποπτώσωμα). Το αποπτώσωμα ενεργοποιεί την κασπάση-9 και μέσω αυτής την κασπάση-3 [26]. Η οδός αυτή επηρεάζεται σημαντικά από αμφότερα τα προαποπτωτικά και αντιαποπτωτικά μέλη της Bcl-2 οικογένειας πρωτεϊνών τα οποία κινούνται σε στενή συσχέτιση και τα οποία με τη σειρά τους τροποποιούνται σε απάντηση τοπικών παραγόντων επιβίωσης μέσω της κινάσης της 3-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (PI3-K) και του Akt (Protein Kinase B) [26]. Τα αποπτωτικά κύτταρα είναι συρρικνωμένα και το DNA τους καταταμημένο για να υποστεί τελικά φαγοκυττάρωση από τα πέριξ κύτταρα.

2.2.2. Αυτοφαγία- Κυτταρικός θάνατος τύπου II

Η αυτοφαγία είναι διαδικασία μέσω της οποίας το κύτταρο ανακυκλώνει μη θεμελιώδη, κατεστραμμένα οργανύλλια και μακρομόρια σε ένα νέο “οικοδόμημα”. Είναι αντίδραση προσαρμογής σε μη θανατηφόρο stress, όπως η στέρηση τροφής, ώστε να προμηθεύει το κύτταρο με μεταβολίτες ως ενεργειακό υπόστρωμα. Το φορτίο κατατέμεται μέσα σε μία δομή με διπλή μεμβράνη (αυτοφαγοσωμάτιο) το οποίο εγκολλώνεται στο λυσοσωμάτιο. Υδρολάσες

καταβολίζουν ακολούθως το περιεχόμενό του σε μεταβολικά συστατικά του υποστρώματος [27, 28]. Ο σχηματισμός του αυτοφαγοσωματίου ρυθμίζεται από την Atg-6 πρωτεΐνη γνωστή ως Beclin-1 [29]. Η αυτοφαγία ενεργοποιείται ως απάντηση σε αποπτωτικά σήματα ώστε να αποτρέψει αρχικά την απόπτωση. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της απομάκρυνσης κατεστραμμένων μιτοχονδρίων από την αύξηση των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (Ros- reactive oxygen species) και την απομάκρυνση του προαποπτωτικού Bax πριν αυτό προλάβει να απελευθερώσει το κυτόχρωμα c. Η λειτουργική σχέση μεταξύ της αυτοφαγίας και του κυτταρικού θανάτου είναι σύνθετη υπό την έννοια ότι σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες η αυτοφαγία λειτουργεί ως προσαρμογή στο στρες ενώ σε άλλες περιπτώσεις αποτελεί εναλλακτική οδό που οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο. Η αναστολή της απόπτωσης προωθεί τον κυτταρικό θάνατο που σχετίζεται ή εξαρτάται από την αυτοφαγία [30]. Υπάρχει διασταυρούμενη αλληλεπίδραση μεταξύ απόπτωσης και αυτοφαγίας σε μοριακό επίπεδο, ιδιαίτερα με την οικογένεια της Bcl-2 πρωτεΐνης. Η Bcl-2 πρωτεΐνη εκτός από το ρόλο της στην αναστολή της απόπτωσης αναστέλλει και τον αυτοφαγικό θάνατο. Αυτή η δράση ερμηνεύεται λόγω της ιδιότητας της Bcl-2 να αλληλεπιδρά με την Beclin-1, τη βασική πρωτεΐνη για το σχηματισμό του αυτοφαγοσωματίου [30].

2.2.3. Νέκρωση- Κυτταρικός θάνατος τύπου III

Η νέκρωση ή τύπος III προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου δεν προκύπτει σαν τυχαία βλάβη, π.χ από τραυματισμό, αλλά ρυθμίζεται μέσω μίας αλληλουχίας σημάτων ως απάντηση σε σοβαρό στρες, από παρατεταμένη ισχαιμία ή σοβαρή διαταραχή της ομοιόστασης [31]. Τα ίδια ερεθίσματα που, όταν είναι μικρότερης έντασης, οδηγούν σε απόπτωση, μπορούν να προκαλέσουν και τη νέκρωση όταν είναι μεγαλύτερης βαρύτητας [32]. Πρόκειται για διαδικασία που ρυθμίζεται γενετικά και αποτελεί εναλλακτική

οδό κυτταρικού θανάτου όταν η αποπτωτική οδός δεν ενεργοποιείται [32]. Προκύπτει από τη γρήγορη κατανάλωση του ATP που οδηγεί σε ιστική ισχαιμία και από την αύξηση ιόντων Ca^{2+} από εσωτερικές ή εξωτερικές αιτίες όπως η τοξικότητα του γλουταμινικού οξέος στους νευρώνες. Η νέκρωση χαρακτηρίζεται από οίδημα του κυττάρου και καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης αλλά και της ακεραιότητας των οργανυλλίων λόγω ωσμωτικών δυνάμεων που προκύπτουν από το άνοιγμα των υποδοχέων ανιόντων που αναστέλλονται από τη γλυκίνη [33]. Η αποδόμηση των οργανυλλίων απελευθερώνει ένζυμα (καθεψίνες) από τα λυσοσώμια που εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα και προκαλούν ποικίλες ιστικές μορφολογικές εκδηλώσεις όπως υγροποίηση, τήξη, τυροειδοποίηση και αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, ανάλογα με την υποκείμενη αιτιολογία και τη χρονική σειρά.

3. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΑΝΤΗΣΕΩΝ ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

3.1. Απάντηση στον σχηματισμό των αδίπλωτων πρωτεϊνών (unfolded protein response -UPR)

Το ενδοπλασματικό δίκτυο του κυττάρου (ΕΔ) είναι σημαντικό για τη σύνθεση, τη γλυκοζυλίωση, την πύκωση και τη μορφοποίηση των πρωτεϊνών. Επίσης εξυπηρετεί την αποθήκευση ιόντων Ca^{++} , τη βιοσύνθεση των στερινοειδών και λιπιδίων και έχει σημαντικό ρόλο στη βιογένεση των οργανυλλίων και της σήμανσης [34]. Διαταραχή των ανωτέρω λειτουργιών προκαλεί στρες στο κύτταρο και άθροιση πρωτεϊνών που δε “διπλώθηκαν” σωστά στον αυλό του ΕΔ (σύνδρομο των αδίπλωτων πρωτεϊνών ή UPR– unfolded protein response). Η τυπική μορφολογία του χαρακτηρίζει τη διαταραχή των λειτουργιών [35]. Κυτταρικές βλάβες που οδηγούν στο ανωτέρου τύπου στρες είναι η στέρηση γλυκόζης, διαταραχές της αναπνευστικής αλυσίδας ή της συγκέντρωση των ενδοκυτταρικών ιόντων Ca^{++} . Τρεις διαφορετικές οδοί σήμανσης ενεργοποιούνται από κυτταρικές πρωτεΐνες υποδοχείς στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου οι οποίες ανιχνεύουν την κατάσταση της πύκωσης στον αυλό του ΕΔ και ευνοούν την επιβίωση. Οι υποδοχείς ενεργοποιούν τον παράγοντα μεταγραφής PKR-like ER kinase (PERK) ο οποίος αναστέλλει την πρωτεϊνική μετάφραση [36] και ενεργοποιεί την έκφραση των αντιοξειδωτικών γόνων. Ο δεύτερος υποδοχέας ενεργοποιεί τον παράγοντα μεταγραφής ATF6 (Activating Transcription Factor 6) που αναστέλλει τη μεταγραφή των πεπτιδικών αλύσεων που εισέρχονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τη δισουλφιδική ισομεράση (PDI) η οποία αυξάνει την ικανότητα πύκωσης του ενδοπλασματικού δικτύου [37]. Επίσης ενεργοποιείται και η πρωτεΐνη ERAD (endoplasmic reticulum associated degradation) μέσω της οποίας οι αδίπλωτες πρωτεΐνες επιστρέφουν από τον αυλό του ΕΔ στο κυτταρόπλασμα όπου αποδομούνται [38]. Η πρωτεΐνη ERAD προωθεί την αυτοφαγία μέσω της

οποίας περιοχές του ΕΔ στοχοποιούνται στα λυσοσώμια ή κενοτόπια προκειμένου να αποδομηθούν μέρη του κατεστραμμένου ΕΔ ή να περιορισθεί ο ρυθμός επέκτασης του, προωθώντας με τον τρόπο αυτό την επιβίωση [39]. Η Beclin-1 είναι θεμελιώδης για την έναρξη της αυτοφαγίας και ρυθμίζεται από Bcl-2 πρωτεΐνες στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου.

Όταν το στρες είναι παρατεταμένο ή σοβαρό και η ομοιόσταση δεν είναι δυνατόν να εξασφαλισθεί, πυροδοτείται ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος για να προστατευθεί ο οργανισμός από κύτταρα που περιέχουν ένα δυνητικά τοξικό φορτίο αδίπλων πρωτεϊνών. Στην περίπτωση αυτή κινητοποιούνται προαποπτωτικές πρωτεΐνες όπως η πρωτεΐνη CHOP/GADD [40] η οποία κινητοποιεί τις προαποπτωτικές πρωτεΐνες Bim και Bax από το πρωτόπλασμα στο μιτοχόνδριο [41]. Η τελευταία φαίνεται ότι συνδέεται και με τις UPR μέσω του p53.

3.2. Απάντηση στο οξειδωτικό στρες- Τα ενεργά είδη οξυγόνου (ROS)

Τα ενεργά είδη οξυγόνου αποτελούν την πιο ισχυρή απειλή που αντιμετωπίζει το κύτταρο. Αποτελούνται από το ανιόν του υπεροξειδίου του οξυγόνου, το υπεροξειδίο του υδρογόνου, το μονήρες οξυγόνο και το νιτρικό οξείδιο. Φυσιολογικά στο κύτταρο υπάρχει ισορροπία μεταξύ των προοξειδωτικών ειδών και της φυσιολογικής άμυνας που μεταβολίζει τα ROS (reactive oxygen species) όπως η καταλάση και η γλουταθειόνη. Το οξειδωτικό στρες προκύπτει όταν η αντιοξειδωτική άμυνα είναι ανεπαρκής και προκαλείται μεταβολική βλάβη σε κυτταρικά μακρομόρια όπως DNA, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και λιπίδια, οπότε ακολουθεί κυτταρικός θάνατος [42]. Το είδος του θανάτου εξαρτάται από τη βαρύτητα της προσβολής [43]. Πλήθος εξωτερικών ερεθισμάτων πυροδοτεί τη γέννηση των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), όπως η ακτινοβολία, αλλά επίσης και φυσιολογικές μεταβολικές εξεργασίες όπως στην περίπτωση των ηλεκτρονίων που διαφεύγουν από την αναπνευστική

αλυσίδα στο μιτοχόνδριο και αντιδρούν με το οξυγόνο [44]. Ο μηχανισμός αυτός είναι μείζονα πηγή παραγωγής ROS στο νευρικό σύστημα. Σε χαμηλή δόση οξειδωτικού στρες οι νευρώνες είναι ικανοί να αρχίσουν την κυτταρική απόπτωση [45] με την ενεργοποίηση του παράγοντα p53 ο οποίος στην συνέχεια ενεργοποιεί την Bcl-2 πρωτεΐνη PUMA (p53 up-regulated modulator of apoptosis) που με τη σειρά της μετακινεί το προαποπτωτικό Bax στο μιτοχόνδριο και ξεκινά την απόπτωση [46]. Κάτω από μεγαλύτερης έντασης οξειδωτικό στρες μπορεί να ενεργοποιηθούν και κασπάσες και να προκληθεί και μείωση του ATP λόγω της μιτοχονδριακής βλάβης. Ενεργοποιούνται τότε εναλλακτικοί οδοί προγραμματισμένου θανάτου όπως ο τύπος II (αυτοφαγία) ή ο τύπος III (νέκρωση).

3.3. Απάντηση στο ισχαιμικό στρες

Ισχαιμία προκύπτει σε πλήρη διακοπή της κυκλοφορίας του αίματος. Στο ισχαιμικό εγκεφαλικό έμφρακτο έχει διαπιστωθεί ένας μικτός τύπος κυτταρικού θανάτου με την απόπτωση να επικρατεί στην περιφέρεια (penumbra) και τη νέκρωση στο κέντρο του εμφράκτου. Η ισχαιμία προκαλεί μείωση της γλυκόζης και μείωση της μιτοχονδριακής αναπνοής και της παραγωγής ενέργειας μέσω του ATP που οδηγούν με τη σειρά τους σε ενεργειακή κρίση [47]. Η ενεργειακή κρίση καταστέλλει με τη σειρά της τη λειτουργία των αντλιών των ιόντων στην κυτταρική μεμβράνη ενώ προκαλείται αύξηση του κυτταρικού και μιτοχονδριακού ασβεστίου λόγω υπερδραστηριότητας των γλουταμινικών υποδοχέων [48, 49]. Το αποτέλεσμα είναι αύξηση των ROS και ενεργοποίηση της PARP (Poly ADP-Ribose Polymerase) [49]. Ενεργοποιείται η εσωτερική ή μιτοχονδριακή οδός απόπτωσης. Στην ισχαιμία ενεργοποιούνται πολλά γονίδια που συμμετέχουν στην κυτταροπροστασία αλλά και την απόπτωση ή και σε αμφότερες [50]. Η ερμηνεία είναι ότι στον ισχαιμικό κυτταρικό θάνατο λειτουργούν δύο ανεξάρτητοι ή και επικαλυπτόμενοι οδοί κυτταρικού θανάτου

που χαρακτηρίζονται από ένα συνεχές φάσμα βαρύτητας μεταξύ απόπτωσης και νέκρωσης ανάλογα με το βαθμό της έλλειψης ενέργειας [51].

3.4. Απάντηση στη βλάβη του DNA- Επιδιόρθωση του DNA

Κατά τη διάρκεια του διπλασιασμού και της μεταγραφής του DNA δημιουργούνται ρήξεις της διπλής έλικας (double strand DNA breaks- DSBs) και κυρίως της μονής έλικας (single strand breaks- SSBs), που είναι και περισσότερο ευαίσθητη, και μπορεί να απειλήσουν τη σταθερότητα του γονιδιώματος [52]. Μετά τη βλάβη του DNA αρχίζει η επιδιόρθωση του σε κύτταρα τα οποία έχουν χαρακτηριστεί ότι προορίζονται να πεθάνουν [53]. Για την επιδιόρθωση κινητοποιούνται πρωτεϊνικές κινάσες “αισθητήρες” (sensors) που είναι ευαισθητοποιημένες στην ανίχνευση των θανατηφόρων βλαβών στα ελεύθερα άκρα του DNA, όπως η οικογένεια ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) των ανιχνευτών της βλάβης του DNA [54]. Η ATM όπως και η DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit) είναι μέλη της σημαντικής ομάδας των PI3-σχετιζόμενων κινασών (phosphoinositide 3-kinase) [55]. Η ATM κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη μεγάλου μοριακού βάρους που περιέχει ένα πεδίο σύνδεσης με το DNA και ένα PI3-Kinase καταλυτικό πεδίο. Αμφότερες οι κινάσες αυτές, μέσω φωσφορυλίωσης, στέλνουν σήματα βλάβης στα σημεία ελέγχου, το σύστημα p53 και τις επιδιορθωτικές πρωτεΐνες. Ανάλογα με τον τύπο της βλάβης του DNA αρχίζει μία από διάφορες οδούς επιδιόρθωσης η οποία τελικά αποκαθιστά τη συνέχεια της διπλής αλυσού. Υπάρχουν δύο κύριες οδοί για την επιδιόρθωση των διπλών ελίκων, εκείνη που συνδέει μη ομόλογα τελικά τμήματα και η άλλη η οποία συνδέει ομόλογα τελικά τμήματα των αλυσών [56]. Η πρώτη αποτελεί την κύρια οδό επιδιόρθωσης του DNA στον άνθρωπο και περιλαμβάνει πρωτεΐνες όπως τις DNA-PK (DNA-dependent protein kinase), KU70 και KU80 [57]. Η βλάβη των βάσεων επιδιορθώνεται είτε μέσω ενζυματικής αναστροφής είτε εναλλακτικά

μέσω αφαίρεσης. Πολλά μόρια της ATM κινάσης που αποτελούν συστατικά του υποστρώματος της περιλαμβάνονται ως συστατικά της επιδιόρθωσης του DNA. Συστατικά μέρη της ATM ενεργοποιούνται γύρω από τη χρωματίνη στο σημείο της ρήξης σε συνδυασμό με ιστόνες γH2AX οι οποίες συνδέουν το σύστημα επιδιόρθωσης του DNA με το σημείο ρήξης των χρωματοσωμάτων [58]. Άλλη κατηγορία ενζύμων όπως οι Chk-1 και Chk-2 κινάσες επιδιόρθωσης (checkpoint kinases) που τυποποιούνται από τα σημεία ελέγχου (checkpoints) κινούνται ελεύθερα στον πυρήνα και δρουν ως υλικά επιδιόρθωσης [59]. Η κινάση Chk-2 μπορεί να αποτελεί μέρος του σήματος που πληροφορεί το σωματίο PML (σωμάτια προμυελωτικής λευχαιμίας- promyelocytic leukemia nuclear domain) για την ενδοπυρηνική ύπαρξη ρήξεων του DNA. Ταυτόχρονα με την επιδιόρθωση γίνεται και εκτίμηση της βλάβης από το σωματίο PML που βρίσκεται στον πυρήνα. Το σωματίο PML αποτελείται από ένα κέλυφος πολυμερισμένης πρωτεΐνης μαζί με ένα φορτίο άλλων περιφερόμενων νουκλεοπρωτεϊνών σε σειρά που καλύπτουν όλο το φάσμα των λειτουργιών του πυρήνα [60]. Ο ρόλος του PML είναι να εκτιμηθεί ο βαθμός της αποκατάστασης της βλάβης του DNA κατά τη διάρκεια της επιδιόρθωσης καθώς και εάν υπάρχει ανταπόκριση στην επιδιόρθωση ή όχι, βάσει της μείωσης του ρυθμού της. Τα PML σωματίδια διασπώνται σε μικρότερα ίσως για να αυξηθεί η επιφάνεια εργασίας ή για να βελτιωθεί η επικοινωνία μεταξύ των πρωτεϊνών του φορτίου ή ακόμη να εξασφαλισθεί η πλησιέστερη θέση τους προς το σημείο της βλάβης [61]. Μία από αυτές τις πρωτεΐνες, η ελικάση, είναι απαραίτητη για την συμπλήρωση των ελίκων της διπλής αλύσου του DNA [62]. Μία άλλη πρωτεΐνη, η DAXX (Death Domain Associated Protein), καταστέλλει τη μεταγραφή ώστε να ευνοηθεί η ενδεχόμενη απόπτωση [63]. Ο ακριβής συντονισμός του σύνθετου δικτύου επιδιόρθωσης και επίβλεψης συντελείται στα κέντρα ελέγχου του πυρήνα (checkpoints) τα οποία συνδέονται τόσο με τον κύκλο του κυττάρου όσο και με τους μηχανισμούς θανάτου μέσω του συστήματος p53 [64]. Λάθη ή πλήρης αποτυχία στην επιδιόρθωση, όχι μόνον

οδηγούν σε μετάλλαξη αλλά μπορεί να εκκινήσουν τις οδούς του θανάτου. Έχουν ανακαλυφθεί διάφορες πρωτεΐνες με την εξειδικευμένη λειτουργία να εγγυηθούν την υψηλή πιστότητα επιδιόρθωσης του DNA [64].

4. ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ p53 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

Η έκθεση του κυττάρου σε στρες κινητοποιεί το σύστημα p53, καταστολέα της ογκογένεσης, που είναι μία ειδική αλληλουχία παραγόντων μεταγραφής οι οποίοι πυροδοτούν είτε τη διακοπή της κυτταρικής αύξησης είτε την απόπτωση. Το σύστημα ελέγχεται από το p53 γονίδιο που είναι ο φύλακας του γονιδιώματος [65]. Απομακρύνει τα παθολογικά κατεστραμμένα κύτταρα του οργανισμού για να μην προκύψουν μεταλλάξεις. Ο κομβικός μηχανισμός δράσης του p53 στα κέντρα ελέγχου του πυρήνα συνίσταται στην καταστολή της μεταγραφής και της μετάφρασης πολλών πρωτεϊνών, όπως της RNA πολυμεράσης, και η μείωση της σύνδεσης του γονιδίου p53 με το γονίδιο GADD (Growth Arrest and DNA Damage- παλίνδρομη σύνδεση) ώστε να ευνοείται η επιδιόρθωση του DNA [66,67]. Επίσης προωθεί τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου μέσω της p1 πρωτεΐνης, ενός ισχυρού αναστολέα της κινάσης κυκλίνης που βρίσκεται στη μεμβράνη του κυττάρου [68]. Οι διαδικασίες αυτές έχουν σαν σκοπό να μην αναπαραχθεί η βλάβη και να δοθεί χρόνος για να δράσουν οι επιδιορθωτικές πρωτεΐνες του κυττάρου.

Η επιλογή μεταξύ αυτών των κυτταρικών απαντήσεων επηρεάζεται από το άθροισμα των εισερχομένων σημάτων όπως ο τύπος του σήματος, το είδος του στρες και η κατάσταση αλλά και το είδος του κυττάρου. Ο p53 ενεργοποιεί επίσης ένα ευρύ δίκτυο σημείων τα οποία επηρεάζουν τόσο την εξωτερική όσο και την εσωτερική οδό της απόπτωσης [69]. Η ενεργοποίηση αυτών των δύο αποπτωτικών οδών συγκλίνει στην ενεργοποίηση του Bid που είναι ο στόχος του p53 στο μιτοχόνδριο.

5. ΒΛΑΒΗ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΙΤΑΙ ΑΠΟ ΤΙΣ ΕΠΙΛΗΠΤΙΚΕΣ ΚΡΙΣΕΙΣ ΣΤΟΝ ΩΡΙΜΟ ΚΑΙ ΑΝΩΡΙΜΟ ΕΓΚΕΦΑΛΟ

5.1. Ανατομία και παθολογία των ιπποκάμπων

Ο ιππόκαμπος εντοπίζεται στην έσω επιφάνεια του κροταφικού λοβού. Ιστολογικά ο φλοιός του χαρακτηρίζεται ως αμμώνιο κέρασ, από το λατινικό Cornu Ammonis (CA), και διαιρείται σε 3 τομείς (CA1 έως CA3). Αποτελείται από πυραμιδικά κύτταρα τα μεγαλύτερα από τα οποία βρίσκονται στον τομέα CA3. Σε στενή επαφή με το αμμώνιο κέρασ βρίσκεται μία λεπτή στιβάδα φαιάς ουσίας, η οδοντωτή έλικα, μία περιοχή της οποίας η θύρα ή διάυλος (hilus) περιβάλλει επιλεκτικά τον τομέα CA3. Οι περιοχές αυτές συνδέονται με ένα πλέγμα διεγερτικών και ανασταλτικών ως και παράπλευρων συνάψεων [70]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η οδοντωτή έλικα επιτρέπει τη δίοδο μιας πολύ μικρής συνιστώσας [71], περίπου 2,5 %, της εισερχομένης ροής από το ρινικό φλοιό που έχει στόχο την ιπποκάμπεια περιοχή CA3. Το φαινόμενο αυτό χαρακτηρίζεται ως θύρα της οδοντωτής έλικας. Η θύρα λειτουργεί σαν κωδικός που επιλέγει τις σημαντικές πληροφορίες για τον υπολογισμό προτύπων. Επιπλέον η θύρα προστατεύει την εν λόγω περιοχή από την υπερβολική διέγερση και τοξικότητα που θα προκαλούσε μία υπερσύγχρονη έκτοπη ενδορινική δραστηριότητα. Ο μηχανισμός της θύρας περιλαμβάνει τις ηλεκτροφυσιολογικές δραστηριότητες των κοκκιωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας και πολλαπλών μορφών αναστολή που τη χειρίζονται εντός της έλικας ανασταλτικοί GABA-εργικοί διάμεσοι νευρώνες, τα καλαθοειδή κύτταρα. Υπάρχουν δεδομένα ότι η δυσλειτουργία της θύρας μετά από status epilepticus τροποποιεί τους υποδοχείς των καλαθοειδών κυττάρων μέσα στην οδοντωτή έλικα με επικράτηση σε αυτήν της διέγερσης [72].

Σε φυσιολογικές συνθήκες τα πυραμιδικά κύτταρα της περιοχής CA1 δεν έχουν μετασυναπτικό δυναμικό επειδή η περιοχή αυτή βρίσκεται κάτω από τον

ανασταλτικό έλεγχο μετασυναπτικών GABA-νευρώνων στη οδοντωτή έλικα (κροταφοαμμώνεια οδός) [73]. Ο ανασταλτικός μηχανισμός καταργείται μετά από status epilepticus το οποίο καταστρέφει τους ενδιάμεσους ανασταλτικούς νευρώνες στην CA1. Προκύπτει υπερδιέγερση των πυραμιδικών κυττάρων της CA1 από την συνεχή επίδραση του ρινικού φλοιού του ιππόκαμπου η οποία οδηγεί με τη σειρά της σε επιληπτογένεση [74].

5.2. Επίδραση των υποτροπιάζουσών επιληπτικών κρίσεων στον ιππόκαμπο του ενήλικα- Σκλήρυνση των ιππόκαμπων (mesial temporal lobe sclerosis)

Οι παρατεταμένες επιληπτικές κρίσεις, όπως είναι το status epilepticus των γενικευμένων τονικοκλονικών σπασμών, προκαλούν βλάβες στον ανθρώπινο εγκέφαλο τουλάχιστον στο επίπεδο των ιππόκαμπων [75,76]. Οι βλάβες προκαλούνται από διεγερσιμοτοξικότητα στους νευρώνες. Στην έσω μοίρα του κροταφικού λοβού παρατηρούνται χαρακτηριστικές βλάβες οι οποίες χαρακτηρίζονται περιληπτικά ως σκλήρυνση των ιππόκαμπων [77]. Ιστολογικά παρατηρείται εκλεκτική εκφύλιση και απώλεια των πυραμιδικών κυττάρων στο αμμώνιο κέρασ στην υποπεριοχή CA3 και CA1 και στην πυλαία περιοχή της οδοντωτής έλικας [78]. Η υποπεριοχή CA2 και τα κοκκιώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας συνήθως εμφανίζουν πολύ μικρότερες απώλειες κυττάρων. Οι βλάβες ποικίλλουν σε βαρύτητα από τη γλοΐωση και μικρή μείωση των νευρώνων μέχρι την πλήρη νέκρωση και καταστροφή των ιππόκαμπων. Παρατηρείται επίσης μεγάλη αντιροπιστική ανάπτυξη της νευρογλοΐας που προκαλεί συρρίκνωση και σκλήρυνση του ιστού. Άλλες μεταβολές που παρατηρούνται είναι η σημαντική υπερπλασία και διασπορά των αξόνων των κοκκιωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας (mossy fibers) οι οποίοι επιστρέφουν στην οδοντωτή στιβάδα πιθανόν επειδή τα πυραμιδικά κύτταρα στα οποία κατευθύνονται έχουν χαθεί. Μέσα σε ορισμένα κύτταρα παρατηρείται κατακερματισμός του DNA ως σημάδι απόπτωσης [79]. Μετά

από μία λανθάνουσα περίοδο μερικών εβδομάδων μπορεί να ακολουθήσουν σε πειραματόζωα αυτόματες επιληπτικές κρίσεις. Αυτό σε συνδυασμό με μορφολογικές μεταβολές στη σκλήρυνση των ιππόκαμπων οδήγησε σε υποθέσεις σχετικά με την επιληπτογένεση.

5.3. Μηχανισμός του κυτταρικού θανάτου από τις επιληπτικές κρίσεις-Τοξικότητα από υπερδιέγερση (διεγερσιμοτοξικότητα)

Η διεγερσιμοτοξική βλάβη εκλύεται σε κυτταρικό επίπεδο από την υπερβολική είσοδο των ιόντων ασβεστίου μέσα στο κύτταρο κατά τη διάρκεια των επιληπτικών σπασμών [80]. Το ενδοκυτταρικό ασβέστιο αυξάνεται σαν αποτέλεσμα της εισόδου του μέσω των υποδοχέων ιόντων του γλουταμινικού NMDA (N-methyl-D-aspartate) [81] ή μέσω των τασεουποδοχέων του ασβεστίου οι οποίοι ανοίγουν σε απάντηση της εκπόλωσης της μεμβράνης τους που προκαλείται από το γλουταμινικό οξύ. Το τελευταίο απελευθερώνεται σε μεγάλες ποσότητες από τη συναπτική διέγερση [82]. Τα υψηλά ενδοκυτταρικά επίπεδα του ασβεστίου πυροδοτούν μία αλληλουχία ενδοκυτταρικών γεγονότων που καταλήγουν είτε σε νεκρωτικό-μεταβολικό κυτταρικό θάνατο είτε σε απόπτωση- προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Το υψηλό επίπεδο ασβεστίου στο κύτταρο ενεργοποιεί τη συνθετάση του νιτρικού οξειδίου, που συμμετέχει στον οξειδωτικό μεταβολισμό, και οδηγεί στην γένεση των ελευθέρων ριζών που με τη σειρά τους καταστρέφουν την κυτταρική μεμβράνη. Τα υψηλά ενδοκυτταρικά επίπεδα του ασβεστίου ενεργοποιούν τις πρωτεΐνες των κασπασών οι οποίες αρχίζουν την απόπτωση [81]. Αν και ο μείζων μηχανισμός νευρωνικού θανάτου στους ιππόκαμπους κατά τη διάρκεια status epilepticus πιστεύεται ότι είναι η νέκρωση εν τούτοις μερικοί νεκρωτικοί νευρώνες παρουσιάζουν δείκτες απόπτωσης όπως είναι ο κατακερματισμός του DNA και η χρώση με tunnel [5]. Απεικόνιση του ενδοκυττάρου ασβεστίου μετά από επιληπτική δραστηριότητα δείχνει ότι η συγκέντρωση του διατηρείται και δεν

επανέρχεται στο προηγούμενο επίπεδο. Τα επίπεδα του ασβεστίου επίσης αυξάνονται και μέσα στον πυρήνα του κυττάρου όπου μπορεί να επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων [83].

5.4. Επίδραση του status epilepticus στον ανώριμο εγκέφαλο

Αν και τα φυσιολογικά ανώριμα ζώα είναι ανθεκτικά σε κάποιο βαθμό βλάβης που προκαλούν οι σπασμοί σε μεγαλύτερης ηλικίας ζώα, η προστασία δεν ισχύει για τα ανώριμα ζώα με προϋπάρχουσες νευρολογικές ανωμαλίες. Στον άνθρωπο το ιστορικό πυρετικών σπασμών σε παιδιά με νευρολογική βλάβη αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο για υποτροπιάζοντες σπασμούς και την ανάπτυξη επιληψίας [84]. Οι μελέτες αυτές όμως δεν καθορίζουν αν οι πυρετικοί σπασμοί σε παιδιά προκαλούν επιληπτική βλάβη σε άτομα με προϋπάρχουσα νευρολογική ανωμαλία ή αν κάποια προϋπάρχουσα νευρολογική ανωμαλία/βλάβη μειώνει τον ουδό για την ανάπτυξη πυρετικών σπασμών και επιληψίας. Σε μικρό αριθμό περιπτώσεων φυσιολογικών παιδιών με πρώτο επεισόδιο πυρετικών σπασμών έχει περιγραφεί οίδημα στην περιοχή των ιππόκαμπων και ίσως και βλάβη η οποία δεν έχει τα χαρακτηριστικά της σκλήρυνσης που παρατηρείται στον ενήλικα. Με πιο προηγμένες απεικονιστικές τεχνικές και παρακολούθηση μπορεί να αποδειχθεί ότι οι περιοχές αυτές εξελίσσονται σε σκλήρυνση καθώς και εάν οι αρχικές αυτές μεταβολές στον ιππόκαμπο μπορεί να χρησιμοποιηθούν σαν βιολογικοί δείκτες [85].

6. ΑΠΟΠΤΩΣΗ – ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

Τα κύτταρα των πολυκυττάρων οργανισμών είναι μέλη μιας καλά οργανωμένης κοινότητας. Ο αριθμός των κυττάρων της κοινότητας είναι στενά καθορισμένος όχι μόνον μέσω του ρυθμού της διαίρεσης τους αλλά επίσης μέσω του ελέγχου του θανάτου τους [86]. Τα κύτταρα που δεν είναι πια χρήσιμα αυτοκτονούν μέσω της ενεργοποίησης ενός ενδοκυτταρικά προγραμματισμένου θανάτου με την κατανάλωση ενέργειας [87]. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος τύπου I αν και συχνά χρησιμοποιείται ο όρος απόπτωση (από την ελληνική φράση: «φύλλα που πέφτουν»). Στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα των σπονδυλωτών περισσότερα από τα μισά κύτταρα πεθαίνουν αμέσως μόλις σχηματισθούν. Στον ώριμο άνθρωπο δισεκατομμύρια υγιή κύτταρα πεθαίνουν στο μυελό των οστών και το έντερο κάθε μία ώρα. Σε ορισμένες περιπτώσεις πεθαίνουν όταν η δομή την οποία σχηματίζουν δεν χρησιμεύει πλέον (π.χ για να σχηματισθούν οι μεσοδακτύλιοι χώροι πρέπει να αφαιρεθούν οι ιστοί μεταξύ των δακτύλων). Σε πολλές άλλες περιπτώσεις ο κυτταρικός θάνατος βοηθά να ρυθμιστεί ο αριθμός των κυττάρων. Για παράδειγμα στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα ο κυτταρικός θάνατος προσαρμόζει τον αριθμό των νευρικών κυττάρων ώστε να ταιριάζει με τον αριθμό των κυττάρων στόχων που χρειάζονται νύρωση. Στους ώριμους ιστούς ο αριθμός των θανάτων ισορροπεί ακριβώς την κυτταρική διαίρεση. Ειδάλλως ο ιστός συνεχίζει να αυξάνει ή να συρρικνώνεται. Με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου η απόπτωση περιγράφηκε σαν μία σειρά από σαφώς καθορισμένες και στερεότυπες μορφολογικές μεταβολές στα κύτταρα μετά από ορισμένα ερεθίσματα, συμπεριλαμβανομένης και της στέρσης παραγόντων αύξησης. Θεμελιώδη μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης είναι η συρρίκνωση και συμπύκνωση του κυττάρου, η καθίζηση του κυτταρικού σκελετού, η καταστροφή της πυρηνικής μεμβράνης, η κατάτμηση του DNA του πυρήνα και η διασπορά του κυτταρικού περιεχομένου στα περίξ για

φαγοκυττάρωση [8]. Σε αντίθεση με τη νέκρωση που χαρακτηρίζεται από πρόιμη απώλεια της κυτταρικής μεμβράνης και οίδημα του κυττάρου από ενεργειακή ανεπάρκεια, στην απόπτωση η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης διατηρείται έως αργά χωρίς να προκαλείται φλεγμονή και βλάβη των πέριξ ιστών [88]. Αποφεύγονται έτσι τα βλαβερά αποτελέσματα της νέκρωσης – όπως η βλάβη των πέριξ ιστών ενώ επίσης τα οργανικά συστατικά του αποπτωτικού κυττάρου ανακυκλώνονται από το κύτταρο που το έχει πέψει. Η απόπτωση εκτελείται από ένα διατεταγμένο μοριακό καταρράκτη με την κατανάλωση ενέργειας. Τα κύρια γονίδια που προωθούν (ced-3, ced-4) ή αναστέλλουν (ced-9) την απόπτωση έχουν διαπιστωθεί και στο νηματώδη σκώληκα [89].

Η απόφαση για απόπτωση είναι σύνθετη διαδικασία και απαιτεί τη δραστηριότητα πολλών γονιδίων που επηρεάζουν την απόφαση του κυττάρου να ενεργοποιήσει το πρόγραμμα της αυτοκαταστροφής του. Όταν ληφθεί η απόφαση, η εκτέλεση του αποπτωτικού προγράμματος απαιτεί την συντονισμένη ενεργοποίηση και εκτέλεση πολλών υπο-προγραμμάτων.

Η απόφαση διευκολύνεται ή αναστέλλεται μέσω της ολοκλήρωσης μιας ποικιλίας ερεθισμάτων εντός και γύρω του κυττάρου.

Η έναρξη της απόπτωσης συμβαίνει όταν το προαποπτωτικό σήμα έχει αποκτήσει σημαντική ένταση και διάρκεια. Αυτό εξαρτάται από την ισορροπία προ και αντί-αποπτωτικών μηχανισμών [9]. Η πιο συχνά αναφερόμενη στρατηγική επιβίωσης είναι ο άμεσος ανταγωνισμός των αντιαποπτωτικών με τις προαποπτωτικές πρωτεΐνες και η αύξηση του επιπέδου των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών και αντιαποπτωτικών γονιδίων [90]. Μελέτες, σε θηλαστικά, ομόλογων περιοχών αυτών των γονιδίων οδήγησε στον χαρακτηρισμό δύο βασικών οικογενειών γονιδίων που ρυθμίζουν την απόπτωση: τις κασπάσες και τις πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 [90] που περιγράφονται ακολούθως.

7. ΚΑΣΠΑΣΕΣ

7.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Οι μορφολογικές ανωμαλίες που προκύπτουν στην απόπτωση είναι αποτέλεσμα της δράσης μιας ομάδας πρωτεασών της κυστεΐνης οι οποίες ενεργοποιούνται ειδικά στα αποπτωτικά κύτταρα [91]. Οι πρωτεΐνες αυτές του θανάτου είναι ομόλογες μεταξύ τους και είναι μέλη μιας οικογένειας γνωστής σαν κασπάσες. Οι κασπάσες είναι αυστηρά διατηρημένες μέσω της εξέλιξης και εκτός από τον άνθρωπο βρίσκονται και σε κατώτερα είδη όπως έντομα και την ύδρα. Δεκατέσσερις (14) κασπάσες έχουν ταυτοποιηθεί στον άνθρωπο από τις οποίες τα δύο τρίτα θεωρείται ότι λειτουργούν στην απόπτωση [92]. Όλες οι γνωστές κασπάσες περιέχουν μία κυστεΐνη στην ενεργή τους περιοχή η οποία υδρολύει πεπτιδικούς δεσμούς και τέμνει το υπόστρωμα σε περιοχές που υπάρχει ασπαρτικό οξύ και κατά προτίμηση ακολουθεί γλυκίνη, σερίνη ή αλανίνη [93]. Η ξεχωριστή ειδικότητα μιας κασπάσης καθορίζεται από τα τέσσερα τελευταία αμινοξέα στην περιοχή της τομής [94]. Οι κασπάσες διαιρούνται σε οικογένειες με βάση την προτίμηση τους ως προς το υπόστρωμα καθώς και δομικές ομοιότητες [95]. Η ενεργοποίηση των κασπασών δεν οδηγεί σε ολική αποδόμηση των κυτταρικών πρωτεϊνών. Επιλεκτικά τέμνουν έναν περιορισμένο στόχο της κυτταρικής πρωτεΐνης συνήθως σε μία ή λίγες θέσεις της βασικής ακολουθίας, πάντα στο υπόλειμμα του ασπαρτικού οξέος. Σε περισσότερες περιπτώσεις η πρωτεϊνική “χειρουργική” μέσω της κασπάσης έχει σαν αποτέλεσμα την απενεργοποίηση της πρωτεΐνης στόχου [96] όμως οι κασπάσες μπορεί και να ενεργοποιήσουν πρωτεΐνες “τέμνοντας” και απομακρύνοντας μια περιοχή που ρυθμίζει την πρωτεΐνη αρνητικά. Η τομή των σχετικών υποστρωμάτων από τις κασπάσες δεν σημαίνει ενεργοποίηση του μείζονα μηχανισμού που οδηγεί στο θάνατο. Γίνεται έτσι κατανοητό γιατί διαφορετικό είδος κασπασών στρατολογείται σε διαφορετικά παραδείγματα στον κυτταρικό

θάνατο καθώς και γιατί η απώλεια μίας μεμονωμένης κασπάσης έχει μόνο τοπικά και μερικά αποτελέσματα. Με εξαίρεση την ισχυρή κασπάση-3, η λειτουργία των άλλων κασπασών που μετέχουν στη διαδικασία του κυτταρικού θανάτου είναι συλλογική ώστε να δημιουργηθεί ένα συνθετικό πρωτεολυτικό θανατηφόρο αποτέλεσμα [97].

7.2. Δομή και φυσιολογική λειτουργία των κασπασών

Ειδικότερα, οι κασπάσες αποτελούν μία οικογένεια ενδονουκλεασών που μοιράζονται έναν αριθμό κοινών χαρακτηριστικών. Αυτά περιλαμβάνουν την καταλυτική τριάδα που αποτελεί την ενεργή περιοχή με την κυστεΐνη (Cyst 285) καθώς και έναν σκελετό από καρβονύλιο [98] που δημιουργεί ενεργά μόρια σηματοδότησης τα οποία συμμετέχουν σε διατεταγμένες διαδικασίες όπως είναι η απόπτωση και η φλεγμονή [99].

Όλες οι κασπάσες συντίθενται στο κύτταρο σαν αδρανείς μονομερείς προκασπάσες ή ζυμογόνα που μοιράζονται μία κοινή δομή από p-20, μεγάλες, και p-10, μικρές, καταλυτικές υπομονάδες που ξεχωρίζουν από ένα συνδετικό πεδίο και μία μη καταλυτική N- πρόδρομη περιοχή ποικίλλου μεγέθους [98 – 100]. Οι ανενεργείς προκασπάσες περιμένουν αδρανείς το σήμα για να καταστρέψουν τα κύτταρα. Η δραστηριότητα τους ελέγχεται από αναστολές ώστε να εξασφαλίζεται ότι το πρόγραμμα παραμένει ελεγχόμενο έως ότου χρειασθεί [101]. Η ενεργοποίηση της προκασπάσης ξεκινάει με το διαχωρισμό των μεγάλων και μικρών υπομονάδων και την άθροισή τους σε διμερή. Η ώριμη κασπάση είναι ένα τετραμερές (p20p10)x2 μετά την αφαίρεση της πρόδρομικής N περιοχής κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης.

Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης ο μηχανισμός λειτουργίας των κασπασών πυροδοτείται από ποικίλα εξωτερικά και εσωτερικά σήματα. Μερικές κασπάσες έχουν εξελιχθεί στο να συνδέουν σήματα που ξεκινούν “άνωθεν” με τα βήματα της εκτέλεσης που οδηγούν προς τα κάτω. Τα μέλη της οικογένειας που

ακολουθούν άνωθεν εντολές καλούνται εναρκτήριες (initiators) κασπάσες (κασπάσες -8 και -9). Οι εναρκτήριες κασπάσες έχουν μακρά πρόδρομη περιοχή-N που περιέχει έναν από δύο ομότυπους αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης: τον ομότυπο ενεργοποίησης και στρατολόγησης CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain) για την κασπάση-9, που αποτελεί τη βάση για σύνδεση και ενεργοποίηση με άνωθεν προσαρμοστικά μόρια (adaptors), και τον ομότυπο DED (Death Effector Domain) για την κασπάση-8. Ο δεύτερος τύπος κασπασών, οι εκτελεστικές κασπάσες, έχουν βραχεία πρόδρομη περιοχή και ενεργοποιούνται από τις εναρκτήριες με τομή [102].

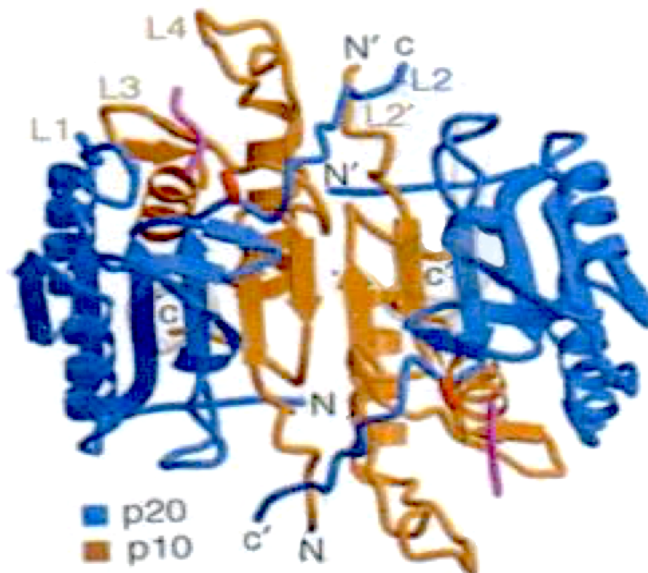
Οι κασπάσες -8 και -10 είναι τυπικά κυτταροπλασματικές, ενώ η κασπάση-9 συνδέεται με το μιτοχόνδριο. Το ερέθισμα που προωθεί το θάνατο τυπικά ενεργοποιεί τις εναρκτήριες κασπάσες μέσω της στρατολόγησης τους σε ειδικά πρωτεϊνικά συμπλέγματα (adaptors). Στην περίπτωση της κασπάσης-8 το πεδίο DED της πρόδρομης περιοχής της προκασπάσης 8 συνδέεται με το ομόλογο DED της πρωτεΐνης προσαρμογής (adaptor) του υποδοχέα Fadd (Fas associated death domain) μέσω της σύνδεσης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης [103]. Όταν ενεργοποιηθεί μία μονήρης εναρκτήρια κασπάση αυτοκαταλύεται και αρχίζει να τέμνει και να ενεργοποιεί άλλες εναρκτήριες προκασπάσες με επακόλουθη επιτάχυνση της ενεργοποίησης τους που καλείται πρωτεολυτικός καταρράκτης [104]. Στην κασπάση-9 ο ομότυπος CARD της πρόδρομης περιοχής μεσολαβεί στην στρατολόγηση και ενεργοποίηση της από τον APAF-1 (Apoptosis Protease Activating Factor-1). Ο άλλος τύπος κασπασών, οι εκτελεστικές κασπάσες (-3, -6, -7), υπάρχουν σαν διμερείς προκασπάσες οι οποίες ενεργοποιούνται από τις εναρκτήριες με τομή του ασπαρτικού οξέος και χαρακτηρίζονται από μία βραχεία πρόδρομη περιοχή. Αποδομούν θεμελιώδεις πρωτεΐνες του κυττάρου. Μερικές τέμνουν τις πυρηνικές λαμίνες και αποδομούν την πυρηνική μεμβράνη, άλλες την ακτίνη, και άλλες τέμνουν μία πρωτεΐνη που συνδέεται με ένα ένζυμο το οποίο αποδομεί το DNA (μία DNAση σε αδρανή μορφή) απελευθερώνοντας την DNAση ώστε να τέμνει το DNA στον πυρήνα. Με αυτόν τον τρόπο το

κύτταρο αποδομείται ταχέως και καθαρά, συλλαμβάνεται και καταναλώνεται από ένα άλλο κύτταρο [95, 105].

7.3. Μοριακή βάση της ενεργοποίησης των κασπασών

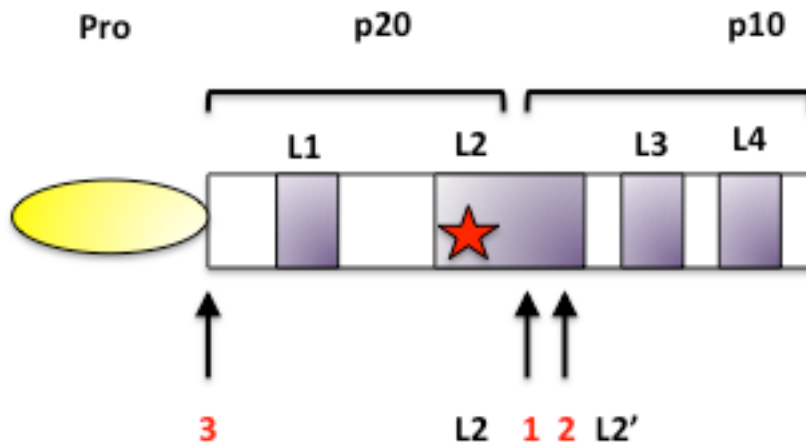
Όπως προαναφέρθηκε, όλες οι κασπάσες εκφράζονται σαν ανενεργείς μονομερείς προκασπάσες ή ζυμογόνα. Για την ενεργοποίηση της η προκασπάση πρέπει να διαιρεθεί σε μεγάλη και μικρή υπομονάδα (διμερισμός) [106]. Το ώριμο ένζυμο είναι τελικά ένα τετραμερές, με δύο ενεργές θέσεις κυστεΐνης [107]. Έξι αντιπαράλληλες β-έλικες κάθε μονομερούς αποτελούν μία συνεχή ταινία από 12 β-έλικες στο ενεργό ένζυμο με ένα ξεχωριστό ενεργό κέντρο που σχηματίζεται από κάθε μονομερές τοποθετημένο συμμετρικά στις απέναντι πλευρές του ενζύμου.

Η σχηματική απεικόνιση της δομής και του μηχανισμού ενεργοποίησής τους παρουσιάζεται στις Εικόνες 1 και 2.



Εικόνα 1: Δομή των κασπασών.

Αναπαράσταση της δομής των κασπασών ως μπλε ταινίες με τη θέση του ενεργού κέντρου (έλικες L1, L4, L2') στις μικρές και μεγάλες υπομονάδες. Ο αναστολέας απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα.



Εικόνα 2: Μηχανισμός ενεργοποίησης των κασπασών.

Τα βέλη δείχνουν τα σημεία που γίνονται οι τομές και οι αριθμοί τη σειρά των τομών στην πορεία που οδηγεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης. Η θέση της ενεργού κυστεΐνης -Cyst- απεικονίζεται με τον κόκκινο αστερίσκο. Η διαδικασία αρχίζει από την έλικα L2. Το τμήμα της L2 έλικας που προέκυψε μετά την τομή στη μεγάλη υπομονάδα και το κομμάτι της L2' έλικας του άλλου μονομερούς ενώνονται και σχηματίζουν μία στενή και βαθιά θηλειά (τσέπη) η οποία στρέφεται κατά 90 μοίρες προς τα άνω έτσι ώστε η κυστεΐνη να βρεθεί στην εξωτερική επιφάνεια σε επαφή με το υπόστρωμα.

Οι εικόνες 1 και 2 είναι τροποποιημένες από Degterev et al. "A decade of caspases" [94].

Το καταλυτικό κέντρο με την κυστεΐνη βρίσκεται στις έλικες L1-L2-L2'-L3-L4 στη μεγάλη και μικρή υπομονάδα. Ο αναστολέας βρίσκεται στην L2 έλικα όπου βρίσκεται η κυστεΐνη [105]. Η επιλεκτικότητα των διαφόρων κασπασών εξαρτάται από την υποπεριοχή S4 που σχηματίζεται από την L4 έλικα της μικρής υποομάδος [108]. Για την ενεργοποίηση της κυστεΐνης γίνονται μεταβολές στην ενεργή θέση του καταλυτικού κέντρου. Οι καταλυτικές έλικες L2-L4 βρίσκονται μακριά η μία από την άλλη και αυτό δεν διευκολύνει την σύνδεση τους με το υπόστρωμα. Για να ενεργοποιηθεί η κασπάση γίνεται τομή στην έλικα L2, στην περιοχή L2'. Γίνεται ένωση του τμήματος του υπόλοιπου της L2 έλικας που βρίσκεται στη μεγάλη υπομονάδα με το μικρό κομμάτι της L2 στη μικρή υπομονάδα. Στο χάσμα που δημιούργησε η τομή της L2 γίνεται αναδιάταξη των αμινοξέων των γειτονικών ελίκων και

επαναδιαμόρφωση της περιοχής έτσι ώστε το ασπαρτικό οξύ να βρίσκεται σε μία στενή θήκη απέναντι στο υπόστρωμα. Ακολουθεί η συνένωση των ελίκων L1-L4 [109]. Αυτές οι μεταβολές της προσαρμογής στην ενεργή περιοχή προκαλούν στροφή της L2' έλικας κατά 90 μοίρες προς τα άνω κάτι που επιτρέπει στην καταλυτική κυστεΐνη να μετακινηθεί και να τοποθετηθεί απέναντι από την αργινίνη στο υπόστρωμα [110].

7.4. Λειτουργίες των διαφόρων κασπάσων της απόπτωσης

7.4.1. Κασπάση- 9

Η κασπάση-9 είναι σημαντικός ευοδωτικός μεγεθυντής της μετάδοσης των σημάτων της απόπτωσης “κάτωθεν” του μιτοχονδρίου [111]. Απενεργοποίηση της κασπάσης-9 μπορεί να οδηγήσει σε απενεργοποίηση της κασπάσης-3 και της κασπάσης-6. Αντίθετα με τις άλλες κασπάσες η πρωτεολυτική της εξέλιξη έχει μικρό αποτέλεσμα στην καταλυτική της δραστηριότητα [112]. Η θεμελιώδης προϋπόθεση για την ενεργοποίησή της είναι η σύνδεση της προκασπάσης με το ισχυρό πρωτεϊνικό συνένζυμο Araf-1 (Apoptosis protein activating factor-1) με το οποίο σχηματίζει ένα ολοένζυμο στο αποπτοσωμάτιο [113] και γίνεται 1000 φορές περισσότερο ενεργή (από την προκασπάση-9). Το αποπτοσωμάτιο αποτελεί μία επταμερή πλατφόρμα από καρβονύλιο πάνω στο οποίο 7 μόρια ενεργοποιημένου Araf-1, που σχηματίζουν ένα δακτύλιο, συνδέονται με 5 έως 7 προκασπάσες-9 μέσω των προσαρμοστικών τους πεδίων CARD-CARD και μέσω αυτών με το πεδίο των νουκλεοτιδίων του αποπτοσωμάτιου [114]. Η προκασπάση-9 ενεργοποιείται με διμερισμό, αυτοκαταλύεται και ενεργοποιεί την κασπάση-3 με πρωτεόλυση [115]. Η προκασπάση-9 έχει 10 φορές μεγαλύτερη χημική συγγένεια με το αποπτοσωμάτιο σε σχέση με την ενεργοποιημένη κασπάση-9 την οποία μπορεί έτσι να την απομακρύνει και να κλείσει τον αποπτωτικό της κύκλο.

Η ενεργοποιημένη κασπάση-3 μπορεί επίσης να συνδεθεί με το αποπτοσωμάτιο και να ανταγωνιστεί την προκασπάση-9 [116].

7.4.2 Κασπάση- 8

Η κασπάση-8 είναι η βασική εναρκτήριοις κασπάση της σήμανσης μέσω των υποδοχέων θανάτου στην επιφάνεια του κυττάρου. Οι προκασπάσες-8 ενεργοποιούνται με αυτοκατάλυση και στη συνέχεια ενεργοποιούν η μία την άλλη [117]. Εκτός από το ρόλο της ως εναρκτήριοις κασπάση μπορεί να ενεργοποιηθεί από κασπάσες πιο χαμηλά στην ακολουθία όπως από την κασπάση- 6 με την οποία μπορεί να σχηματίσει μία αναστομωτική έλικα που στοχεύει την Bid και μέσω αυτής το μιτοχόνδριο [118]. Μπορεί να υποκαταστήσει τη λειτουργία της κασπάσης-3 σε ποντίκια. Έχει επίσης ρόλο στην οδό της σήμανσης στην ανοσοποίηση [119] και την αιματοποίηση.

7.4.3. Κασπάσες-3, -6, -7

Οι τρεις αυτές ομόλογες κασπάσες αποτελούν την εκτελεστική ομάδα των κασπασών. Η κασπάση-3 ειδικά είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της CAD ενδονουκλεάσης (Caspase activated DNase) που προκαλεί την κατάτμηση του DNA και την αποδόμηση του πυρήνα του κυττάρου [120]. Η απώλεια της κασπάσης-3 μπορεί να υποκατασταθεί από την κασπάση-8 με αμοιβαία αναστομωτική έλικα [121] και επίσης από την κασπάση-6. Απενεργοποίηση της κασπάσης-9 οδηγεί σε απώλεια της ενεργοποίησης της κασπάσης-3 και -6 όχι όμως της -7 [122].

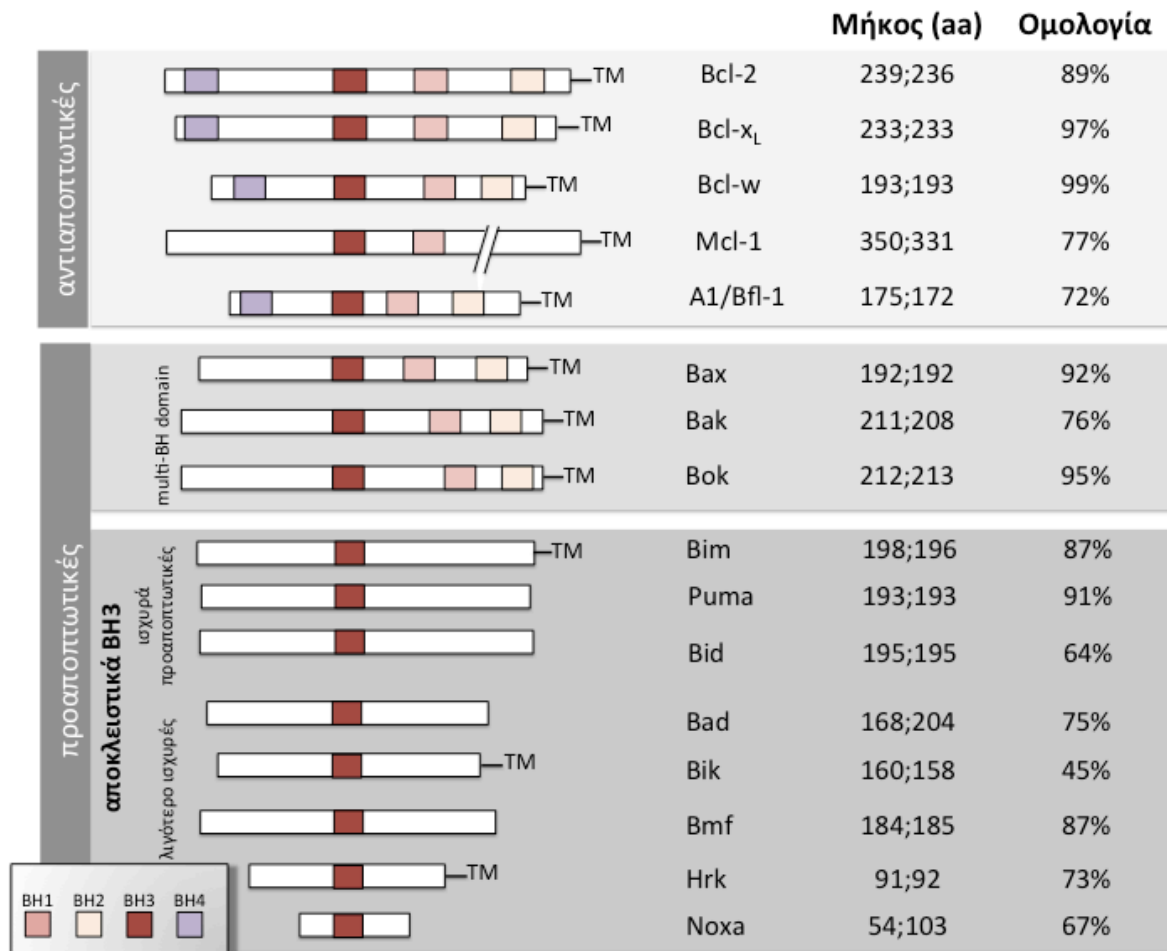
8. ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ Bcl-2

Οι πρωτεΐνες της ομάδας αυτής έλαβαν το όνομα τους από την ανακάλυψη ενός μέλους τους που απομονώθηκε σε ένα γονίδιο που εμπλέκεται στο λέμφωμα (B cell lymphoma- Bcl) [123]. Η οικογένεια αυτή αριθμεί περισσότερα από είκοσι διαφορετικά μέλη από τα οποία τα δώδεκα ρυθμίζουν την απόπτωση θετικά ή και αρνητικά [124]. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 είναι τυπικά μικρές (20-30 Da) και καθορίζονται από την παρουσία ενός ή περισσοτέρων BH ομόλογων πεδίων (α-έλικες) υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση των μελών μέσω πρωτεΐνης-πρωτεΐνης.

Ταξινομούνται σε 3 ομάδες. Τα μέλη της πρώτης ομάδας, οι αντιαποπτωτικές δηλαδή πρωτεΐνες όπως οι Bcl-2, Bcl-x και Bcl-w κατέχουν τέσσερα τέτοια πεδία (BH 1, 2, 3 και 4) τα οποία χαρακτηρίζονται από μία υδροφοβική αύλακα και μία βραχεία BH3 περιοχή που συνδέεται με την αύλακα. Κατέχουν επίσης ένα διαμεμβρανικό πεδίο, την τελική υδροφοβική έλικα, η οποία εντοπίζει τις πρωτεΐνες στην εξωτερική επιφάνεια των μιτοχονδρίων [126] και ενίοτε του ενδοπλασματικού δικτύου με το κύριο μέρος τους να αντικρύζει το κυτταρόπλασμα. Το βασικό χαρακτηριστικό της αντιαποπτωτικής ομάδας ή ομάδας Bcl-2 είναι η αντιαποπτωτική λειτουργία και η επακόλουθη προστασία από το θάνατο. Σε αντίθεση, η δεύτερη ομάδα αποτελείται από μέλη της Bcl-2 οικογένειας που έχουν προαποπτωτική δραστηριότητα. Τα μέλη αυτής της ομάδας, στην οποία ανήκουν οι πρωτεΐνες Bax και Bak, έχουν σχετικά όμοια δομή με την ομάδα των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών που περιλαμβάνει την υδροφοβική αύλακα και όλα τα πεδία εκτός από το N-τερματικό τελικό BH4 πεδίο. Η προαποπτωτική δραστηριότητα καθορίζεται από σχετικά μεγάλες περιοχές της πρωτεΐνης, που περιέχουν 2 μεγάλες α-έλικες οι οποίες υποστηρίζεται ότι συμμετέχουν στην διείσδυση της μεμβράνης του μιτοχονδρίου. Η τρίτη ομάδα περιλαμβάνει μια ομάδα διαφορετικών πρωτεϊνών

των οποίων το μόνο κοινό χαρακτηριστικό με τις προηγούμενες είναι η παρουσία του πεδίου BH3 [127].

Στην εικόνα 3 που ακολουθεί παρουσιάζεται η σχηματική αναπαράσταση των χαρακτηριστικών της οικογένειας των πρωτεϊνών Bcl-2.



Εικόνα 3: Οικογένεια των πρωτεϊνών Bcl-2, οργάνωση, λειτουργία και χαρακτηριστικά.

Σχηματική απεικόνιση των κύριων πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 στον άνθρωπο και τον ποντικό, μαζί με τις κύριες διατηρηθείσες δομές (BH πεδία) ομαδοποιημένες με βάση τη λειτουργία τους, το μήκος των αμινοξέων και την ομολογία μεταξύ των δύο ειδών. Στην κατηγορία «μήκος αμινοξέων» στην αριστερή πλευρά παρουσιάζεται ο Homo sapiens και δεξιά ο ποντικός. Ομολογία σημαίνει αντιστοιχία της αλληλουχίας των αμινοξέων μεταξύ των δύο ειδών. TM: διαμεμβρανικό πεδίο.

Η εικόνα είναι τροποποιημένη από Henshall et al. “Contribution of apoptosis-associated signaling pathways to epileptogenesis: lessons from Bcl-2 family knockouts” [125].

Σε συνθήκες ομοιόστασης τα αντιαποπτωτικά μέλη διαφυλάσσουν την ακεραιότητα του μιτοχονδρίου εμποδίζοντας τα προαποπτωτικά μέλη Bax και Bak να προκαλέσουν βλάβη της μεμβράνης του [128]. Κατά τη διάρκεια στρες οι BH3 μόνον πρωτεΐνες ενεργοποιούνται και ανταγωνίζονται τα αντιαποπτωτικά Bcl-2 μέλη της οικογένειας. Η αναστολή που ασκούν οι αντιαποπτωτικές στις Bax/Bak αίρεται και τους επιτρέπεται να διεισδύσουν στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη [129,130]. Αμφότερες οι προαποπτωτικές και αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες συνδέονται με τη λειτουργία του ενδοπλασματικού δικτύου με ρόλους όπως η ομοιόσταση του Ca^{++} και η απόπτωση που προκαλείται από το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου [131]. Μερικά μέλη της οικογένειας εκφράζονται φυσιολογικά στα κύτταρα ενώ άλλα για να ενεργοποιηθούν χρειάζονται απελευθέρωση από τα συνοδευτικά chaperones ή μετα-μεταφραστική τροποποίηση ή δεν υπάρχουν φυσιολογικά και χρειάζονται μεταγραφική αναβάθμιση.

9. ΟΔΟΙ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ – ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥΣ ΑΠΟ ΤΙΣ ΕΠΙΛΗΠΤΙΚΕΣ ΚΡΙΣΕΙΣ

Όπως προαναφέρθηκε, στα κύτταρα των θηλαστικών η απόπτωση μπορεί να αρχίσει με την ενεργοποίηση υποδοχέων θανάτου της μεγάλης οικογένειας του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF) στην επιφάνεια του κυττάρου (εξωτερική οδός) ή κατόπιν διατάραξης της λειτουργίας των ενδοκυτταρικών οργανυλλίων (εσωτερική οδός).

9.1. Εξωτερική οδός της απόπτωσης

Η εξωτερική οδός της απόπτωσης πυροδοτείται από τη σύνδεση χαμηλού μοριακού βάρους πρωτεϊνικών συνδέσμων (ligands) με έναν ή περισσότερους υποδοχείς στη επιφάνεια του κυττάρου. Οι υποδοχείς είναι μέλη της μεγάλης οικογένειας του παράγοντα νέκρωσης των όγκων TNF και περιλαμβάνουν τον υποδοχέα TNF-1 CD95/Fas καλούμενο επίσης Fas και τον TRAIL-R1 καλούμενο και DR4 (Death Receptor 4) [132].

Οι υποδοχείς CD95/Fas βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου ενώ το ουραίο τμήμα τους βρίσκεται εντός του κυττάρου και περιέχει τα μόρια αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης γνωστά σαν DED (Death associated signaling complex Domain). Οι υποδοχείς αφού ενεργοποιηθούν από εξωτερικά ερεθίσματα προκαλούν το σχηματισμό του συμπλέγματος DISC (Death Inducing Signaling Complex) [134]. Το DISC περιέχει πολλά μόρια προσαρμογής συμπεριλαμβανομένης και της πρωτεΐνης FADD (Fas Associated Death Domain). Η FADD αλληλοεπιδρά μέσω του τελικού της πεδίου DED με το πεδίο DED της προκασπάσης-8 και την στρατολογεί. Η αλληλεπίδραση οδηγεί την προκασπάση-8 σε αυτοκατάλυση, διμερισμό και την ενεργοποιεί σαν εναρκτήρια κασπάση [135]. Η πορεία της ενεργοποιημένης κασπάσης-8 εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου. Στα λεγόμενα κύτταρα τύπου I η

κασπάση-8 αρχίζει άμεσα την απόπτωση με την τομή και ενεργοποίηση της προ-κασπάσης-3 η οποία οδηγεί σε ένα καταρράκτη ενεργοποίησης των γειτονικών προκασπασών-3. Ο καταρράκτης αυτός χρησιμεύει στη μεγέθυνση του αποπτωτικού σήματος λόγω της αδυναμίας της εναρκτήριας κασπάσης-8 να ολοκληρώσει μόνη της την αποπτωτική σηματοδότηση. Η εκτελεστική κασπάση-3 καταστρέφει το κύτταρο μέσω της πολλαπλής πρωτεολυτικής της ικανότητας να αποδομεί το DNA, τα επιδιορθωτικά του ένζυμα και τον κυτταρικό σκελετό. Αντίθετα στα λεγόμενα κύτταρα τύπου II η κασπάση-8 ενεργοποιεί πρώτα την εσωτερική οδό σήμανσης μέσω του μιτοχονδρίου λόγω της ανεπαρκούς ποσότητας της κασπάσης -8 ή των κασπασών κάτωθεν αυτής της οδού. Στον τύπο αυτό κυττάρων η κασπάση-8 ενεργοποιεί το προαποπτωτικό μέλος της οικογένειας Bcl-2, Bid που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και στοχεύει το μιτοχόνδριο [136]. Η εξωτερική οδός εντούτοις ρυθμίζεται και αρνητικά ώστε να προληφθεί ο υπερβολικός κυτταρικός θάνατος. Ο πιο γνωστός αναστολέας της εξωτερικής οδού είναι η FLIP (FLICE-Inhibitory Protein) [126]. Η FLIP περιέχει το ίδιο DED-πεδίο με την κασπάση-8 και μπορεί να προλάβει την ανάμειξη της εμποδίζοντας την στρατολόγηση της στον ενεργοποιό υποδοχέα [138].

9.2. Εσωτερική οδός της απόπτωσης

Η εσωτερική οδός ενεργοποιείται μετά από στρες στο εσωτερικό του κυττάρου από διάφορα ερεθίσματα όπως η βλάβη του DNA, αυξημένο ενδοκυτταρικό ασβέστιο, αντιδραστικά είδη οξυγόνου, στέρηση των παραγόντων αύξησης, τα οποία διαταράσσουν τη λειτουργία των μιτοχονδρίων που ελέγχονται από την οικογένεια των Bcl-2 πρωτεϊνών [139,140]. Υπό συνθήκες ομοιόστασης τα αντιαποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2 διατηρούν την ακεραιότητα του μιτοχονδρίου εμποδίζοντας τα δραστικά προαποπτωτικά μέλη Bax και Bak, να προκαλέσουν βλάβη της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης

[141,142]. Η πρωτεΐνη Bak βρίσκεται σταθερά στην μιτοχονδριακή μεμβράνη κάτω από τον έλεγχο των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών [143] ενώ η πρωτεΐνη Bax βρίσκεται διαμοιρασμένη μεταξύ του κυτταροπλάσματος και της επιφάνειας του μιτοχονδρίου σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας [144]. Κατά τη διάρκεια στρες η πρωτεΐνη Bax ενεργοποιείται μέσω της σύνδεσής της με την πρωτεΐνη Bid η οποία είναι ανιχνευτής του στρες [145]. Αυτό προκαλεί μετασχηματισμό της δομής της σε tBax (truncated Bax) που επιτρέπει τον ολιγομερισμό της και τη διείσδυση της στη μιτοχονδριακή μεμβράνη δια του σχηματισμού ενός πόρου μέσω των λιπιδίων της μεμβράνης [146] και την επακόλουθη αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης [147, 148]. Αντίθετα όταν επικρατήσουν τα σήματα για επιβίωση αυξάνεται ο ρυθμός αποδέσμευσης της Bax από τη μιτοχονδριακή μεμβράνη οπότε επιστρέφει στο κυτταρόπλασμα όπου κρύβει την υδροφοβική της έλικα. Συνεπώς η ευαισθησία της αποπτωτικής διαδικασίας προσαρμόζεται στη διακύμανση των σημάτων επιβίωσης.

Από τον πόρο στη μεμβράνη του μιτοχονδρίου απελευθερώνεται το κυτόχρωμα c και εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα. Το κυτόχρωμα c στο κυτταρόπλασμα συνδέεται με την Araf-1 (Apoptotic protease activating factor-1), την κασπάση-9 και με το ATP και σχηματίζουν μία πλατφόρμα, το αποπτοσωμάτιο, το οποίο ενεργοποιεί την κασπάση-9 [149, 150]. Η ενεργός κασπάση-9 ενεργοποιεί τις κάτωθεν στην οδό εκτελεστικές κασπάσες -3 -6 και -7 οι οποίες έχουν θεμελιώδη δράση στην απόπτωση. Η πορεία αυτή μπορεί να διακοπεί από την ανασταλτική πρωτεΐνη της απόπτωσης IAP (Inhibitors of Apoptosis Protein), ένα μοριακό “φρένο” [151], αλλά μπορεί και να ενισχυθεί από την απελευθέρωση της πρωτεΐνης Smac (Second mitochondria-derived activator of caspase) γνωστής και ως Diablo (Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding protein with LOw pI) μέσω του Bid οι οποίες δεσμεύουν και εξουδετερώνουν την ανασταλτική δράση της IAP στην κασπάση-9 και -3 [152]. Τελικά ο παράγων ευόδωσης της απόπτωσης AIF (Apoptosis Inducing Factor) από τη μεσολάβηση

της καλπαΐνης μετακινείται προς το μιτοχόνδριο και τον πυρήνα και προκαλεί συμπύκνωση της χρωματίνης και απόπτωση, ανεξάρτητα από την οδό των κασπασών. Η σύνδεση των Smac/DIABLO με άλλες πρωτεΐνες όπως η cIAP1 (cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1) και cIAP2 (cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 2) αντίθετα δεν αναστέλλει άμεσα τις κασπάσες. Αυτές αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα TNF1 με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της κινάσης RIP1 (Receptor Interacting Protein 1) από το σύμπλεγμα II DISC του υποδοχέα Fas με ενεργοποίηση της κασπάσης-8 [153]. Έτσι προκύπτει δεύτερη ενεργοποίηση της κασπάσης-3 και ενίσχυση της απόπτωσης. Αυτή η συνεργασία μεταξύ των οδών στα κύτταρα τύπου I και II δείχνει τη διασταυρούμενη σήμανση μεταξύ των οδών της απόπτωσης.

9.3. Ενεργοποίηση πολλαπλών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 από τις επιληπτικές κρίσεις

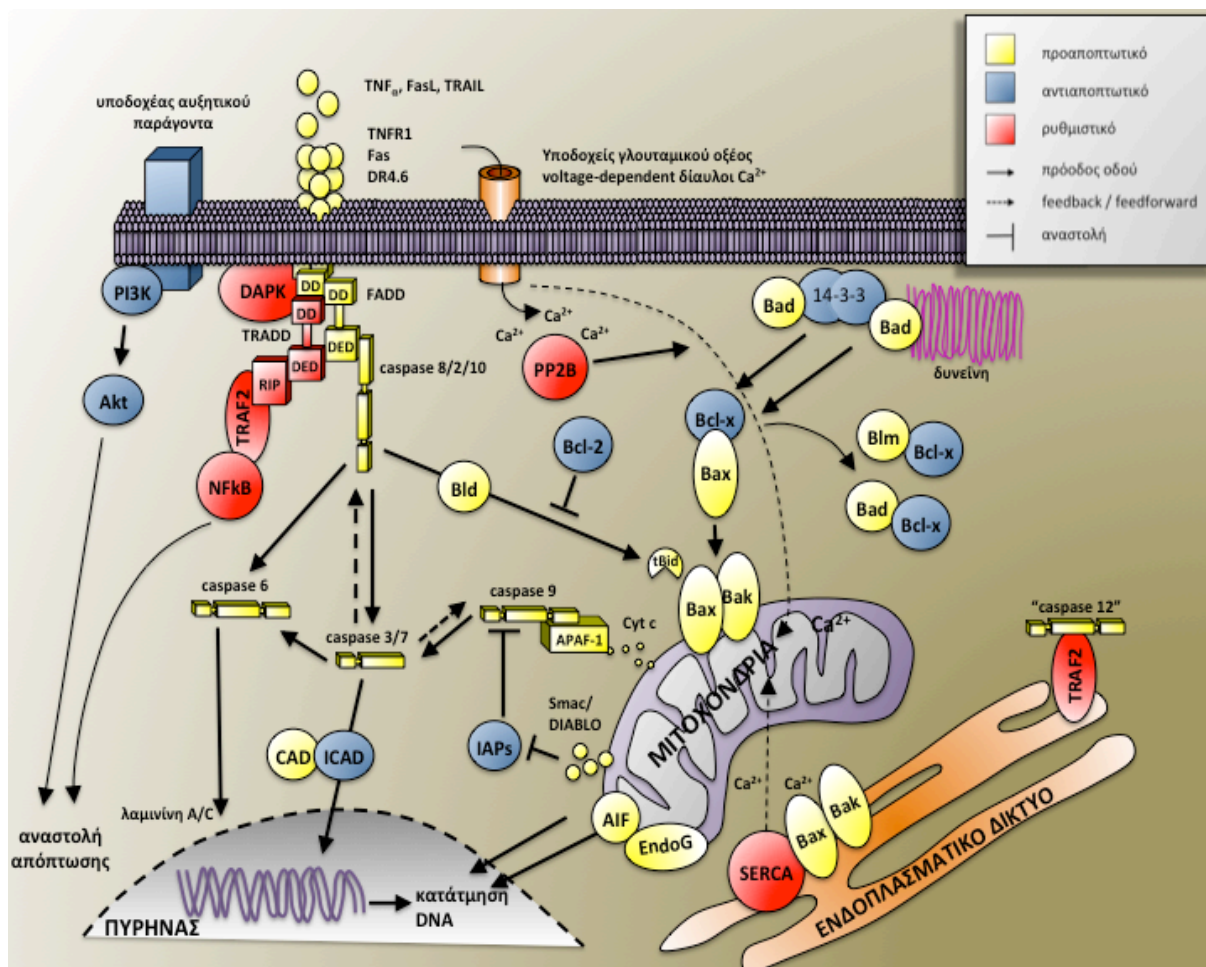
Έρευνες, κυρίως μετά από πειραματικό status epilepticus, διαπίστωσαν ταχεία ενεργοποίηση άμεσων πρώιμων γονιδίων (immediate early genes) συνήθως παραγόντων μεταγραφής όπως c-fos, mRNA και Jun στον εγκέφαλο τρωκτικών. Επίσης διαπιστώθηκε ότι πολλά μέλη των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 παρουσίαζαν μεταγραφική και μεταφραστική απάντηση στους νευρώνες [153]. Οι κρίσεις προκάλεσαν αύξηση της έκφρασης των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-w [154,155] και Mcl-1 (Myeloid cell leukemia protein 1) [155,156]. Επίσης αύξηση του προαποπτωτικού Bax [157], πυροδότηση της μεταβολής του Bid στην πιο ενεργή του μορφή [158], αποδέσμευση του Bad από την σύνδεση του και αύξηση σε μεταφραστικό και πρωτεϊνικό επίπεδο των Bim [159] και Puma [160].

Στο μιτοχόνδριο μετά τον κυτταρικό θάνατο παρατηρήθηκε άθροιση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών και λειτουργική στόχευση των αντιαποπτωτικών [158,159].

Αυτό ερμηνεύθηκε ως πρόβλεψη για την απελευθέρωση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών από το μιτοχόνδριο και κάτωθεν της οδού, για τον κυτταρικό θάνατο μέσω των κασπασών. Ο χρόνος της ενεργοποίησης των προαποπτωτικών πρωτεϊνών ήταν 1-4 ώρες και συμπίπτει χρονικά με το χρόνο της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c και του AIF από το μιτοχόνδριο [158]. Δεν διαπιστώθηκε εντούτοις ότι η διακοπή της δράσης των Bcl-2 πρωτεϊνών μεταβάλλει και τη σήμανση της απόπτωσης κάτωθεν του μιτοχονδρίου μετά από status epilepticus.

Στον ιππόκαμπο και το φλοιό ανθρώπων πασχόντων από φαρμακοανθεκτική επιληψία του κροταφικού λοβού διαπιστώθηκαν υψηλότερα επίπεδα των Bcl-2, Bcl-x, Bcl-w και χαμηλότερο του Bax [161]. Το μοριακό ρεπερτόριο δείχνει προσαρμογή προς την αντιαποπτωτική πλευρά ώστε να υπάρξει αντίσταση στην απώλεια περαιτέρω νευρώνων σε πάσχοντες με συχνές κρίσεις [161]. Στους μελετηθέντες ιστούς διαπιστώθηκε αύξηση της έκφρασης και ενεργοποίηση των κασπασών-2, -3, -6, -7 και -9. Αποπτωτικές κασπάσες -2 και -6 διαπιστώθηκαν και σε δενδρίτες στους ιππόκαμους κάτι που μπορεί να υποδηλώνει ένα ρόλο στην πλαστικότητα των συνάψεων [162].

Στην Εικόνα 4 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι μείζονες οδοί της απόπτωσης που ενεργοποιούνται από τις επιληπτικές κρίσεις.



Εικόνα 4: Μείζονες οδοί της απόπτωσης ενεργοποιούμενες από τις επιληπτικές κρίσεις.

Ο κυτταρικός θάνατος πυροδοτείται από την ενεργοποίηση των γλουταμινικών υποδοχέων και/ή συνδέσμων των υποδοχέων. Το αυξημένο ενδοκυτταρικό Ca^{2+} πυροδοτεί άμεσα τη λειτουργία του μιτοχονδρίου (εσωτερική οδός). Ενεργοποιείται η φωσφατάση του ασβεστίου (καλσινευρίνη) η οποία απελευθερώνει το προαποπρωτικό Bad που οδηγεί το Bax στα μιτοχόνδρια. Στη συνέχεια το κυτόχρωμα c απελευθερώνεται, συνδέεται με τον Araf-1 και προκαλεί την ενεργοποίηση της κασπάσης-9. Εναλλακτικά η ενεργοποίηση των υποδοχέων θανάτου οδηγεί στο σχηματισμό του DISC και την εξέλιξη της κασπάσης-8 (εξωτερική οδός). Αμφότεροι οι οδοί συγκλίνουν στις εκτελεστικές κασπάσες οι οποίες στοχοποιούν το υπόστρωμα. Οι οδοί μπορεί να διακοπούν πριν το μιτοχόνδριο από τις Bcl-2 πρωτεΐνες, και μετά το μιτοχόνδριο από τις ανασταλτικές πρωτεΐνες της απόπτωσης (IAPs).

Εικόνα τροποποιημένη από Henshall DC, Simon RP “Epilepsy and apoptosis pathways” [6].

10. ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ ΤΩΝ ΝΕΥΡΩΝΩΝ ΕΝΟΡΧΗΣΤΡΩΜΕΝΗ ΣΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

Οι νευρώνες υπόκεινται σε διαφορετικές μορφές κυτταρικού θανάτου ανάλογα με τη φύση και την βαρύτητα του στρες. Υπάρχουν διάφοροι τύποι κυτταρικού θανάτου περιλαμβανομένων της απόπτωσης, της αυτοφαγίας και της νέκρωσης. Το στρες ενεργοποιεί οδούς θανάτου που δεν είναι εύκολο να ταξινομηθούν ως αποκλειστικά απόπτωση ή νέκρωση. Αρχικά σχηματίζεται μία πρωτοπαθής απάντηση στο ερέθισμα το οποίο μπορεί να είναι εξωτερικό, όπως τοξικοί παράγοντες, ή εσωτερικό (ανώμαλη άθροιση πρωτεϊνών). Εάν η διαταραχή της κυτταρικής βιοχημείας και φυσιολογίας δεν επιδιορθωθεί από το κύτταρο άμεσα και αποτελεσματικά αυτό κινητοποιεί οδούς σήμανσης (δευτεροπαθής απάντηση) που συγκλίνουν στο μιτοχόνδριο [7]. Η σήμανση πριν από το μιτοχόνδριο περιλαμβάνει την συνεργατική και ανταγωνιστική αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2. Οι μηχανισμοί αυτοί σε συνδυασμό με οποιαδήποτε τυχόν διαταραχή της λειτουργίας των μιτοχονδρίων εκείνη την στιγμή συγκροτούν ένα συλλογικά επεξεργασμένο σήμα (την απόφαση). Η απόφαση ενεργοποιεί τα μιτοχόνδρια να συνεχίσουν την περαιτέρω προς τα κάτω σήμανση εκκινώντας μία ή περισσότερες οδούς θανάτου [40]. Όλες αυτές οι διαφορετικοί οδοί σήμανσης τόσο πριν όσο και μετά από το μιτοχόνδριο φαίνεται ότι αλληλεπιδρούν επειδή λειτουργούν παράλληλα και σε σημαντικό βαθμό επηρεάζουν θετικά ή αρνητικά η μία τη λειτουργία της άλλης λόγω του ότι μοιράζονται κοινούς παράγοντες της εσωτερικής οδού απόπτωσης καθώς και την στρατολόγηση διαφόρων κασπασών [163, 164]. Η εξέλιξη της μίας οδού μπορεί να επηρεάσει (θετικά ή αρνητικά) την ταυτόχρονη εξέλιξη μιας άλλης. Το αποτέλεσμα αυτών των συνθέτων αλληλεπιδράσεων είναι τέτοιο ώστε η απάντηση των κυττάρων ενός αρχικά ομοιογενούς πληθυσμού νευρώνων που εκτίθενται στην ίδια προσβολή να είναι ετερογενής, δηλαδή να δείχνουν μερικά μόνο από τα χαρακτηριστικά

ενός σαφώς καθορισμένου τύπου θανάτου (τύπο I ή II ή III). Συνεπώς τα διαφορετικά κύτταρα στον ίδιο πληθυσμό που έχουν υποστεί την ίδια προσβολή τοποθετούνται σε διαφορετική θέση μέσα στο ίδιο συνεχές φάσμα απόπτωσης- νέκρωσης [165,166]. Αυτό μπορεί να εξηγήσει την παρουσία τόσο νεκρωτικών όσο και αποπτωτικών νευρώνων σε ανθρώπους που έχουν χειρουργηθεί για επιληψία του κροταφικού λοβού, όσο και σε ζώα μετά από πειραματικούς σπασμούς [165].

Σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στο είδος του κυτταρικού θανάτου έχει το οξειδίο του αζώτου. Το οξειδίο του αζώτου είναι δεύτερος μοριακός μεσολαβητής στη δευτεροπαθή απάντηση με τη μοναδική χαρακτηριστική ιδιότητα να είναι αέριο που μετακινείται ελεύθερα από το ένα κύτταρο στο άλλο. Ο χρόνος υποδιπλασιασμού του είναι μερικά μικροδευτερόλεπτα [166]. Το NO είναι ελεύθερη ρίζα με πολλές μορφές Redox (NO, NO⁺, NO⁻) και διαφορετική χημική αντιδραστικότητα που εξηγεί την πλειοτροπική του αποτελεσματικότητα σε καθορισμένους στόχους στα βιολογικά συστήματα. Το NO δρα ανασταλτικά στην απόπτωση και ρυθμίζει τη στροφή από την απόπτωση στη νέκρωση. Ρυθμίζει τη μεταβίβαση των σημάτων επειδή επηρεάζει τις πρωτεΐνες της σήμανσης των κυττάρων όπως την P21 και την Junk-N terminal kinase [167] καθώς και τις πρωτεΐνες των υποδοχέων NMDA οπότε μειώνει τη διεγερσιμοτοξικότητα των νευρικών κυττάρων [168]. Αναστέλλει άμεσα τη δραστηριότητα των αποτελεσματικών κασπασών-8 και -3. Ρυθμίζει τον ουδό της απελευθέρωσης των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών όπως του κυτοχρώματος c, AIF, Diablo/Smac και έτσι ρυθμίζει την ευαισθησία του μιτοχονδρίου [169]. Αυτές οι ρυθμίσεις είναι ικανές να οδηγήσουν το κύτταρο στο θάνατο. Σε μεγάλη συγκέντρωση αναστέλλει την κυτοχρωμοξειδάση και αναστέλλει τα συμπλέγματα I και III της αναπνευστικής αλυσίδας καθώς και διακόπτει τη δημιουργία του ATP στο μιτοχόνδριο. Όταν η συγκέντρωση του ATP μειωθεί σημαντικά κατά την περίοδο της ενεργοποίησης των κασπασών, που χρειάζεται πολλή ενέργεια, το αποπτωτικό πρόγραμμα κάτωθεν διακόπτεται [170]. Τα

διεγερμένα κύτταρα εμφανίζουν τα χαρακτηριστικά της νέκρωσης. Φυσιολογικοί μεσολαβητές όπως το NO έχουν αναδυθεί ως έχοντες ισχυρό ρόλο και μπορεί να δρουν σαν αποτελεσματικοί διακόπτες των οδών θανάτου *in vivo*. Υπάρχει ερώτημα ως προς το ποιός είναι ο “διακόπτης” που καθορίζει την στροφή από την επιβίωση στο θάνατο. Υπάρχουν αυτόματοι κυτταρικοί διακόπτες οι οποίοι αποφασίζουν για προσαρμογή ή θάνατο αφού λάβουν σήματα από το εσωτερικό του τραυματισμένου κυττάρου. Ένα παράδειγμα είναι η έναρξη της απόπτωσης μετά από βαρύ στρες του ενδοπλασματικού δικτύου. Εκεί ο παράγων μεταγραφής CHOP (για την C/EBP ομόλογη πρωτεΐνη) που συμμετέχει στην πρωτεϊνική υπερφόρτωση και την προσαρμογή, είναι παράγων επιβίωσης. Εντούτοις ο μηχανισμός της συμπεριλαμβάνεται και στην έναρξη της απόπτωσης [167]. Η P13 κινάση Akt συμμετέχει στην σύνθεση πρωτεϊνών και την αυτοφαγία άρα είναι παράγων επιβίωσης. Εν τούτοις ο μηχανισμός της συμπεριλαμβάνεται και στην έναρξη της απόπτωσης επειδή περιέχει ένα ενδοπυρηνικό στοιχείο το οποίο την ενσωματώνει στο PML σωματίο που καθορίζει την πορεία της μέσω της φωσφορυλίωσης [171].

Σήμερα θεωρείται ότι ο έλεγχος των οδών θανάτου είναι πολύπλοκος. Περιλαμβάνει πολλές οικογένειες γονιδίων και πολλά κυκλώματα ανάδρασης (feedback) τα οποία δίνουν διάφορες πιθανότητες έναρξης, ελέγχου και εκτέλεσης. Το κύριο σημείο αυτής της άποψης είναι ο αποκλεισμός ενός απαραίτητα κυρίαρχου αρχικού βήματος. Φαίνεται ότι η άθροιση βλάβης ασύμβατης με την επιβίωση απαιτεί την καταστροφή αρκετών ζωτικών κυτταρικών λειτουργιών. Όταν ξεπεραστεί ένας τέτοιος ουδός πολλές θετικές αναδράσεις (κυκλώματα) θα ενισχύσουν τον προγραμματισμένο θάνατο μέχρι το τέλος και την ασφαλή αποβολή των κατεστραμμένων κυττάρων.

11. ΕΠΙΛΗΠΤΟΓΕΝΕΣΗ

11.1. Γενικά

Σε ορισμένα άτομα που έχουν εκδηλώσει ένα επεισόδιο σπασμών μετά από τραύμα εγκεφάλου, ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο ή με ιστορικό πυρετικών σπασμών, καθώς και σε ζώα μετά από πειραματικό status epilepticus, μπορεί να εκδηλωθούν αυτόματες επιληπτικές κρίσεις και επιληψία μετά από ένα μεσοδιάστημα ηρεμίας, τη λανθάνουσα περίοδο [16,172]. Έχει προταθεί ότι στη λανθάνουσα περίοδο συμβαίνει ένας καταρράκτης μοριακών μεταβολών όπως νέκρωση νευρώνων, γλοίωση και αναδιάταξη των νευρικών κυκλωμάτων μέσω των οποίων, και παρά τους φυσικούς αυτοπροστατευτικούς μηχανισμούς του οργανισμού εξελίσσεται μία διαδικασία η οποία χαρακτηρίστηκε ως επιληπτογένεση [173]. Επιληπτογένεση είναι η ανάπτυξη και επέκταση ιστού ικανού να γεννήσει αυτόματους σπασμούς με αποτέλεσμα την ανάπτυξη επιληπτικής κατάστασης και την πρόοδο της επιληψίας μετά την εγκατάσταση της [17]. Οι προτάσεις αυτές βασίστηκαν στις βλάβες στον ιππόκαμπο του ανθρώπου με επιληψία του κροταφικού λοβού και σε ζώα μετά από πειραματικό status epilepticus [17]. Κατά τη διάρκεια της επιληπτογένεσης τα φυσιολογικά δίκτυα του εγκεφάλου τροποποιούν τη λειτουργία τους ώστε να αποκτούν δυνατότητα να γεννούν αυτόματα επιληπτικές κρίσεις [174]. Απαραίτητο χαρακτηριστικό των επιληπτικών κυκλωμάτων είναι η θετική ανατροφοδότηση διεγερτικών δικτύων. Αυτή επιτυγχάνεται είτε λόγω της αποκάλυψης της προυπάρχουσας θετικής ανατροφοδότησης λόγω της μείωσης των ανασταλτικών δικτύων [175] είτε μέσω ενίσχυσης της φυσιολογικής θετικής ανατροφοδότησης λόγω της αύξησης των συνάψεων που αναπτύσσονται μεταξύ των επιζώντων νευρώνων και την υπερίσχυση της διείσδυσης των γλουταμινεργικών νευρώνων στους διάμεσους νευρώνες σε σχέση με τους GABA-εργικούς [176]. Μείζων παράγων στην επιληπτογένεση αποτελεί η

φλεγμονή. Οι επιληπτικές κρίσεις προκαλούν την απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτταροκινών οι οποίες ενεργοποιούν την ανοσολογική απάντηση που σχετίζεται με την επανοργάνωση των συνάψεων και τη ρύθμιση των υποδοχέων AMPA και των διαύλων του Ca^{++} [177]. Ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να συμβάλλει στην επιληπτογένεση μέσω της νέκρωσης και της απόπτωσης νευρώνων που προκαλούν οι κρίσεις διά της ενεργοποίησης των προαποπτωτικών πρωτεϊνών. Η λανθάνουσα περίοδος η οποία αποτέλεσε τη βάση για τη θεωρία της επιληπτογένεσης έχει αναθεωρηθεί προκειμένου να διευκρινισθεί εάν στο διάστημα αυτό μεσολαβούν υποκλινικές επιληπτικές κρίσεις τις οποίες ο πάσχων δεν αντιλαμβάνεται και επίσης αν υπάρχει ηλεκτρική διέγερση σε περιοχές όπως ο ενδορινικός φλοιός οι οποίες δεν αποκαλύπτονται παρά μόνον με ενδοεγκεφαλικά ηλεκτρόδια. Τα τελευταία έτη γίνεται μία εκτεταμένη διερεύνηση της τροποποίησης των γονιδίων που προκαλείται από τις επιληπτικές κρίσεις.

11.2. Αντιεπιληπτογένεση

Αντιεπιληπτογένεση είναι η διαδικασία η οποία εξουδετερώνει το αποτέλεσμα της επιληπτογένεσης περιλαμβανομένης της πρόληψης, τροποποίησης των κρίσεων και της ίασης [17]. Η ενίσχυση της αντιεπιληπτογένεσης με μοριακούς χειρισμούς των οδών της σήμανσης της απόπτωσης, όπως η χορήγηση ανασταλτικών των κασπασών κατά και μετά το status epilepticus σε ποντίκια, δεν είχε σημαντικό αποτέλεσμα [178, 179]. Η ενδοεγκεφαλική χορήγηση, μέσω ιών, του γονιδίου της αντιαποπτωτικής Bcl-2 πρωτεΐνης σε ποντίκια επίσης δεν τροποποίησε τη λειτουργία των επιζώντων νευρώνων [180]. Αντιεπιληπτικά φάρμακα τα οποία χορηγήθηκαν προ και μετά πειραματικό status epilepticus σε ζώα απέτυχαν να προσφέρουν ένα ελκυστικό υπόδειγμα για την τροποποίηση της επιληψίας στον άνθρωπο. Οι προσπάθειες που έχουν γίνει και στοχεύουν φαρμακευτικά την επιληπτογένεση σε

ανθρώπους, τόσο μεμονωμένα αλλά και σε συνδυασμό, ήταν ελάχιστες και γενικά ανεπιτυχείς έως σήμερα [16,181]. Επειδή η επιληψία είναι πολυπαραγοντική διαδικασία όπου οι μεταβολές μπορεί να αφορούν ένα ολόκληρο επιληπτικό δίκτυο, πρέπει να διερευνηθεί η τυχόν επίδραση συνδυασμού των υπαρχόντων αλλά και νεωτερικών φαρμάκων τα οποία να στοχεύουν διαφορετικούς μηχανισμούς ή ένα βασικό στόχο που να ρυθμίζει τις διαφορετικές οδούς. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τα παιδιά όπου η αιτιολογία της επιληψίας είναι σύνθετη. Αυξάνεται επομένως η αντίληψη ότι πρέπει να αναπτυχθούν αμφότερα τόσο τα αντισπασμωδικά φάρμακα (που χρησιμεύουν στην αντιμετώπιση των επιληπτικών κρίσεων) όσο και τα αντιεπιληπτογόνα (χρησιμοποιούνται για να προλάβουν την ανάπτυξη της επιληψίας της ή την εξέλιξής της) ώστε οι θεραπείες να εξατομικεύονται. Γι' αυτό η ταυτοποίηση των βιοδεικτών, δηλαδή βιολογικών δεικτών (biomarkers) οι οποίοι μπορούν να βοηθήσουν τη διάγνωση και τη θεραπεία της επιληψίας αποτέλεσε το κέντρο της έρευνας την τελευταία δεκαετία. Οι προσπάθειες που έχουν γίνει και στοχεύουν την επιληπτογένεση και την πρόληψη αυτής μέχρι σήμερα ήταν γενικά ανεπιτυχείς [17].

11.3. Βιοδείκτες (βιολογικοί δείκτες)

Ως βιοδείκτες (βιολογικοί δείκτες) ορίζονται οι κυτταρικές, βιοχημικές ή μοριακές μεταβολές οι οποίες είναι μετρήσιμες στα βιολογικά μέσα όπως οι ανθρώπινοι ιστοί, κύτταρα ή βιολογικά υγρά και μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την ενίσχυση της διάγνωσης μιας νόσου όπως και της επιληπτογένεσης. Οι βιοδείκτες πρέπει να είναι αντικειμενικά μετρήσιμα και αξιόπιστα μεγέθη ώστε να εκτιμώνται σαν δείκτες μιας φυσιολογικής βιολογικής πορείας, μιας παθολογικής πορείας ή μιας φαρμακολογικής απάντησης σε θεραπευτική παρέμβαση [182]. Θα πρέπει ιδανικά να επιτρέπουν τη εύκολη λήψη δείγματος (π.χ αίμα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, σίελο, ούρα). Οι τιμές τους θα πρέπει να

εμφανίζουν απόσταση από τις τιμές σε υγιή άτομα, με μεγάλο εύρος στην ποσοτική διασπρωμάτωση ώστε οι μεταβολές των επιπέδων τους να είναι εύκολα ανιχνεύσιμες. Οι βιολογικοί δείκτες στην επιληψία θα έχουν δυνητικά πολλές χρησιμότητες συμπεριλαμβανομένης της δυνατότητας πρόβλεψης της ανάπτυξης επιληψίας μετά από εγκεφαλική βλάβη και/ή μετά από ένα πρώτο επεισόδιο σπασμών (προγνωστικοί βιοδείκτες), της πρόβλεψης της εξέλιξης των κρίσεων (διαγνωστικοί βιοδείκτες) και της αντοχής στα αντιεπιληπτικά φάρμακα μετά τη διάγνωση, όπως επίσης και την επίβλεψη της θεραπείας προβλέποντας την επιρρέπεια του ασθενή σε ανεπιθύμητες παρενέργειες του φαρμακού [183].

Σήμερα δεν υπάρχουν αξιόπιστοι βιολογικοί δείκτες οι οποίοι να μπορούν να εκτιμήσουν τους τομείς της επιληπτογένεσης με τον ίδιο τρόπο όπως το σάκχαρο στο σακχαρώδη διαβήτη στον άνθρωπο [182,183]. Υπάρχουν λίγες μελέτες μέχρι σήμερα οι οποίες έχουν εξετάσει διάφορους υποψήφιους περιφερικούς βιολογικούς δείκτες. Η ιδεώδης κατάσταση θα είναι η ταυτοποίηση μιας ομάδας διαφόρων βιολογικών δεικτών οι οποίοι θα εκτιμούν τη συνολική επιληπτογόνο πορεία καλύπτοντας την άμεση επιληπτογόνο περίοδο μετά τη βλάβη και επιπλέον το διάστημα με τις κρίσεις αλλά και το μεσοδιάστημα μεταξύ των κρίσεων.

Πρόσφατες πειραματικές μελέτες συνηγορούν ότι υπάρχει ένας θετικός κύκλος αλληλεπίδρασης μεταξύ κρίσεων, επιληπτογένεσης, και φλεγμονής του εγκεφάλου. Η πειραματική ηλεκτρική διέγερση προκαλεί επιληπτικές κρίσεις συνοδευόμενες από έντονες φλεγμονώδεις απαντήσεις στον εγκέφαλο τρωκτικών. Οι κρίσεις προκαλούν την απελευθέρωση από τα αστροκύτταρα και τη μικρογλοία προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η ιντερλευκίνη -1β (IL-1β) και το HMGB1 (High Mobility Group Box-1) οι οποίες ενεργοποιούν τους αντίστοιχους υποδοχείς IL-1R και Toll-like 4. Μεταβάλλεται έτσι η σήμανση στους νευρώνες και η συναπτική νευρομετάδοση μέσω μεταβολών σε ιόντα και την απελευθέρωση του γλουταμινικού οξέος από τη μικρογλοία. Προκύπτει

μείωση της παραγωγής του GABA, μείωση της ροής εξόδου του Ca⁺ από το κύτταρο, αύξηση της διαπερατότητας του υποδοχέα NMDA στο ασβέστιο και αύξηση της διεγερσιμοτοξικότητας [184, 185]. Επιπλέον η φλεγμονή των ενδοθηλιακών κυττάρων στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό επιτρέπει την είσοδο λευκών αιμοσφαιρίων από το περιφερικό αίμα τα οποία ενισχύουν τη φλεγμονώδη αντίδραση.

Πάσχοντες από εστιακή επιληψία και αντοχή στα αντιεπιληπτικά φάρμακα παρουσιάζουν αύξηση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών της ιντερλευκίνης (IL-1β) στον υποδοχέα της ιντερλευκίνης (IL-1R) σε σχέση με τις ανταγωνιστικές ιντερλευκίνες (IL-Ra):(IL-1β/ IL-Ra) ratio. Η IL-1β είναι μεσολαβητής της φλεγμονής στον εγκέφαλο. Άτομα με τραύμα εγκεφάλου και αναλογικά υψηλότερα επίπεδα της IL-1β στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό σε σχέση με το αίμα έχουν αυξημένο κίνδυνο για μετατραυματική επιληψία για μεγάλο χρονικό διάστημα [176]. Ανοσορυθμιστικά φάρμακα, συμπεριλαμβανομένων των στεροειδών και των ανοσοσφαιρινών, τα οποία είναι αντιφλεγμονώδη, έχουν αποδεδειγμένη στρατηγική σε παιδιά με βρεφικούς σπασμούς και επιληπτικές εγκεφαλοπάθειες. Στόχος των στεροειδών θεωρείται ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός. Τεχνικές μοριακής απεικόνισης όπως το PET και η MRI εγκεφάλου που επιτρέπουν την οπτική απεικόνιση φλεγμονωδών κυττάρων όπως και η μέτρηση των φλεγμονωδών μεσολαβητών στο αίμα είναι υποσχόμενοι τρόποι για τη βοήθεια της ρύθμισης της νευροφλεγμονής στα άτομα με επιληψία [179]. Βιολογικοί δείκτες σε λειτουργίες όπως η φλεγμονή του εγκεφάλου, παράγοντες της αύξησης, microRNA's, το οξειδωτικό στρες και η μεταβολική δυσλειτουργία μπορεί να προωθήσουν την πρόωμη διάγνωση των πασχόντων οι οποίοι θα μπορούσαν να ωφεληθούν από την αντιφλεγμονώδη θεραπεία [186].

Νεότερες απεικονιστικές τεχνικές όπως είναι η τεχνική της διαφοράς της μαγνητικής ευαισθησίας και άλλες, μπορεί να απεικονίσουν μικροδομικές αλλοιώσεις οι οποίες είναι χαρακτηριστικές ορισμένων επιληψιών, όπως των ιππόκαμπων, και ειδικότερα μικροαιμορραγίες, αποτιτανώσεις και βλάβες της λευκής ουσίας που μπορεί να είναι υποσχόμενοι βιολογικοί δείκτες [182]. Μεταβολικές παράμετροι όπως η προοδευτική αύξηση της μυοινοσιτόλης και της γλουταθειόνης μετά από status epilepticus σε ποντίκια και η προοδευτική τους μείωση πριν την ανάπτυξη των κρίσεων μελετώνται με την προοπτική να αποτελέσουν μεταβολικούς βιοδείκτες στην επιληψία [183].

12. MICRO RNAs (miRNAs)

12.1. Γενικά

Ανάλυση του εγκεφαλικού ιστού σε πάσχοντες από επιληψία τύπου κροταφικού λοβού συνηγορεί σε ευρείας έκτασης απορρύθμιση της έκφρασης γονιδίων η οποία σχετίζεται με τη μεταβολή διαφόρων συστατικών της βιογένεσης των micro RNAs (miRNAs) στον εγκέφαλο [187].

Τα miRNAs είναι μία κατηγορία μικρών (~20-22 νουκλεοτίδια) ενδογενών μη κωδικοποιητών RNAs τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο σε φυσιολογικές και παθολογικές βιολογικές επεξεργασίες με το να ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου στόχου. Συνδέονται με το μεταγραφόμενο mRNA των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και ελέγχουν τη μεταγραφή τους. Προκαλούν μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνών στα κύτταρα μέσω αρνητικού ελέγχου της μεταγραφής και της μετάφρασης τους ώστε να μην διαβιώνονται τυχόν παθολογικές πρωτεΐνες. Τα miRNAs ρυθμίζουν ευεργετικά μία ομάδα κυτταρικών διαδικασιών περιλαμβανομένων της κυτταρικής αύξησης, θανάτου και μεταβολισμού. Η διαδικασία αυτή έχει σαν αποτέλεσμα τον επανασχεδιασμό εγκεφαλικών δικτύων τα οποία ελέγχουν τις μικροδομές των νευρώνων σε νοσήματα του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος και την επιληψία [188]. Τα miRNAs είναι θεμελιώδη για τη φυσιολογική ανάπτυξη, εγκατάσταση και διατήρηση του φαινοτύπου του κυττάρου. Σχεδόν το 50% των ταυτοποιημένων miRNA εκφράζονται στον εγκέφαλο των θηλαστικών όπου έχουν ειδική κατανομή μέσα στους νευρώνες. Η κατανομή αντανακλά το ρόλο που έχουν στην έκφραση του γονιδίου που κατευθύνει τη λειτουργική ειδίκευση των νευρώνων και τη μορφολογική απάντηση στην οποία πρέπει να προσαρμοστούν, κατά τη διάρκεια της συνεχώς μεταβαλλόμενης δραστηριότητας τους [189]. Τα miRNAs είναι εμπλουτισμένα στους δενδρίτες πράγμα που επιτρέπει την τοπική ρύθμιση της πρωτεΐνης βάσει των εκάστοτε

αναγκών. Στον πυρήνα του κυττάρου το αρχικό στέλεχος, η πρωτογενής ακολουθία pri-miRNA, αναγνωρίζεται από τον μικροεπεξεργαστή Dicer, μία άλλη RNase, και δημιουργείται το πρόδρομο miRNA (precursor-miRNA- pre-miR) που εξάγεται στο κυτταρόπλασμα. Εκεί γίνεται περαιτέρω επεξεργασία από μία άλλη RNase σε ένα μονήρες στέλεχος, το ώριμο miRNA. Μία έλικα του ώριμου miRNA (οδηγός) επιλέγεται και φορτίζεται στο σύμπλεγμα RISC (RNA-Induced Silencing Complex) όπου και συνδέεται με την πρωτεΐνη “Αργοναύτης -2” (Ago-2) η οποία είναι ειδικός ανιχνευτής νευρώνων. Σε νοσήματα ή μετά από τραυματισμό, τα mRNAs προέρχονται από παθολογικές εξεργασίες μέσα στους ιστούς [185, 186] για παράδειγμα σαν παραπροϊόντα των νεκρωτικών ή αποπτωτικών κυττάρων [187]. Υπάρχει επίσης απόδειξη ότι τα miRNAs συσκευάζονται και απελευθερώνονται στα εξωσώμια, λειτουργώντας κατά κάποιον τρόπο όμοια με τις ορμόνες και τις κυτταροκίνες σε απομακρυσμένη επικοινωνία κυττάρου-κυττάρου [188]. Εξωσώμια περιέχοντα miRNAs πιθανόν να περνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να προσφέρουν μία περιφερική πηγή ως βιολογικοί δείκτες σε νοσήματα του ΚΝΣ και την επιληψία. Το φορτισμένο miRNA είναι η λειτουργική και ενεργός μορφή του miRNA η οποία καθοδηγείται να “σιωπήσει” ένα mRNA-στόχο με συμπληρωματικές περιοχές [189,190]. Όταν εντοπιστεί μία συμβατή “ταιριαστή” περιοχή μεταξύ miRNA και mRNA, το σύμπλεγμα πυροδοτεί την αποδόμηση του mRNA ή την αναστολή της μετάφρασης μέσω των σχετικών ενζύμων. Ένα δεδομένο miRNA μπορεί να έχει πολλές θέσεις σύνδεσης στο ίδιο mRNA και ένα μονήρες mRNA μπορεί να στοχοποιηθεί από πολλαπλά miRNAs ώστε να ρυθμίζει πιθανόν την έκφραση εκατοντάδων γόνων. Στα βιολογικά υγρά (αίμα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό) τα miRNAs κυκλοφορούν σε διάφορες μορφές όπως κλεισμένα σε μικροσωμάτια, ή σε σύμπλεγμα με Ago-2 και αυτό τους προσδίδει σταθερότητα και μεγάλη αξιοπιστία. Υπάρχουν αποδείξεις ότι τα κυκλοφορούντα miRNA στο αίμα μπορεί να χρησιμεύσουν ως βιολογικοί δείκτες εγκεφαλικής βλάβης [191]. Αυτή η δεξαμενή των miRNAs

μπορεί να προέρχεται από ελεγχόμενη απελευθέρωση τους από τα εξωσώμια ή από βλάβη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού που επιτρέπει τη δίοδο μικρής ποσότητας του miRNA που εκφράζεται στον εγκέφαλο. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων δεν είναι γνωστό τι προάγει ή τι καταστέλλει την έκφραση των miRNA. Έχουν προταθεί παράγοντες μεταγραφής οι οποίοι ενεργοποιούνται από τη νευρωνική δραστηριότητα, όπως και ο μηχανισμός της επιγενετικής μέσω της μεθυλίωσης του DNA και της τροποποίησης ιστονών [191, 192].

Οι μελλοντικές θεραπείες για την τροποποίηση της νόσου μπορεί να χρειαστεί να τροποποιούν κομβικά σημεία αυτών των οδών. Τα φάρμακα μπορεί να στοχοποιούν ρυθμιστές της μεταγραφής και της πορείας του RNA όπως επίσης και παράγοντες της επιγενετικής.

12.2. MicroRNAs στην επιληψία

Στον εγκέφαλο ανθρώπων και ζώων με επιληψία κροταφικού λοβού έχουν διαπιστωθεί μεταβολές στα επίπεδα ορισμένων miRNAs στους ιππόκαμπους σε σύγκριση με μάρτυρες [193, 194]. Πρώιμες μελέτες σε ζώα έδειξαν ότι η σιώπηση του miR-134 στον εγκέφαλο με τη χορήγηση ανταγωνιστικών ολιγονουκλεοτιδίων (antagomirs) είχε ισχυρό αντιεπιληπτικό αποτέλεσμα, ενώ η γενετική απομάκρυνση του miR-128 προκάλεσε μοιραία επιληψία σε ποντίκια [195]. Τα προηγούμενα 2 χρόνια με λειτουργικές μελέτες ταυτοποιήθηκαν 9 νέα miRNAs τα οποία φαίνεται ότι επηρεάζουν τους σπασμούς ή την παθολογία των ιππόκαμπων [195]. Οι στόχοι τους περιλαμβάνουν παράγοντες μεταγραφής [196], συστατικά της σήμανσης των νευροδιαβιβαστών [197], μεσολαβητές της νευροφλεγμονής [198] και το νευρωνικό θάνατο μετά από status epilepticus [199, 200]. Ορισμένα miR όπως τα miR- 34 σε ποντίκια [201] και miR- 181 σε ποντίκια και παιδιά με επιληψία κροταφικού λοβού [197] σχετίστηκαν με το θάνατο από την απόπτωση.

Η σιώπηση του miR-34 συνοδεύθηκε από προστασία των νευρώνων του ιππόκαμπου από το θάνατο συνεπεία απόπτωσης σε υπόδειγμα ποντικών [201] και η σιώπηση του miR-181 σχετίστηκε με νευροπροστασία από απόπτωση μετά status σε ποντίκια και σε παιδιά με επιληψία κροταφικού λοβού [197]. Στην τελευταία περίπτωση η προστασία σχετίστηκε με τη μείωση της πρωτεΐνης της κασπάσης-3. Η σιώπηση του miR-134 συνοδεύτηκε από παρατεταμένη καταστολή των κρίσεων και πρόληψη του status σε ποντίκια [202] ενώ η σιώπηση του miR-203 πρόσφατα συνοδεύτηκε από μακροχρόνια νευροπροστασία και μείωση των αυτομάτων κρίσεων σε ποντίκια [203].

Από τα 14 miRNAs τα οποία έχουν διερευνηθεί με antagomirs αλλά και με μιμητικά ολιγονουκλεοτίδια (agomirs) σε υποδείγματα ζώων με επιληψία, μέχρι σήμερα τα περισσότερα (12) έδειξαν βελτίωση των σπασμών και των ιστοπαθολογικών ευρημάτων [195]. Επίσης τα επίπεδα ορισμένων miRNAs στο αίμα είχαν τροποποιηθεί μετά τους σπασμούς [195]. Τα ανωτέρω συνηγορούν υπέρ του ότι τα miRNAs αποτελούν μια ευρεία και ευέλικτη ομάδα στόχων για τη διάγνωση και τη θεραπεία της επιληψίας. Στα βιολογικά υγρά πασχόντων με επιληψία διαπιστώθηκαν διαφορές στην ποσότητα των κυκλοφορόντων miRNAs σε σύγκριση με μάρτυρες, εύρημα που σημαίνει ότι μπορεί να είναι χρήσιμες ως βιολογικοί δείκτες της νόσου [204]. Φαίνονται ιδεώδεις βιοσηματοδότες λόγω της ειδικής τους έκφρασης στους ιστούς και του ρόλου τους σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Μοριακοί βιολογικοί δείκτες της λειτουργίας των νευρώνων ή της νευρογλοίας στα κύτταρα αυτά θα σημαίνουν τεράστιο όφελος για τη διάγνωση, κλινική παρακολούθηση, εκτίμηση του κινδύνου της επιληψίας και τη ρύθμιση της απάντησης στη θεραπεία [182]. Οι διαπιστώσεις αυτές μπορεί να οδηγήσουν σε θεραπευτικές προσεγγίσεις. Θα πρέπει να αντιμετωπιστεί το ενδεχόμενο των πολλαπλών στοχεύσεων των miRNAs, με απρόβλεπτες συνέπειες, όπως και το γεγονός ότι δεν περνούν εύκολα τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό [192].

Η αιτία της απορρύθμισης των miRNAs σε πάσχοντες από επιληψία είναι άγνωστη. Πιθανόν κάποια απορρύθμιση να είναι έμμεση: όπως μεταβολές του αριθμού ή της λειτουργίας των νευρώνων ή της νευρογλοίας στα κύτταρα αυτά. Σήμερα έχει διαμορφωθεί η πρώτη βάση δεδομένων των miRNA στην επιληψία (Erimi Base). Παρέχει πληροφορίες για τις μεταβολές στην έκφραση των miRNA στον εγκέφαλο και το αίμα, όπως και λεπτομέρειες από λειτουργικές μελέτες [194]. Δεν είναι γνωστό ποιος είναι ο κεντρικός ρυθμιστής της έκφρασης αυτών των γονιδίων ο οποίος θα μπορούσε και να στοχοποιηθεί θεραπευτικά. Ως υποψήφιοι ρυθμιστές έχουν προταθεί παράγοντες μεταγραφής οι οποίοι ελέγχουν πολλά γονίδια. Για παράδειγμα ο Cyclic AMP response element ο οποίος ασκεί τον έλεγχο γονιδίων στον επιληπτικό φλοιό του ανθρώπου [199].

Υπάρχει ισχυρή και επείγουσα ανάγκη για βιολογικούς δείκτες στην επιληψία. Ένας βιολογικός δείκτης ή ομάδα δεικτών που βρίσκονται στα βιολογικά υγρά, όπως το αίμα, θα επιτρέψουν την πρόβλεψη της εμφάνισης σπασμών στους κατάλληλους ασθενείς, θα ενισχύσουν τη διάγνωση και θα προσφέρουν συνδυασμό θεραπευτικών προσεγγίσεων, με ταυτόχρονη ανάπτυξη μοριακών διαγνωστικών στην επιληψία.

B) ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

13. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσης μελέτης είναι:

- 1) Να διερευνηθούν τα επίπεδα της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 και της προαποπτωτικής κασπάσης-9 στον ορό του αίματος παιδιών και εφήβων με ιδιοπαθή επιληψία σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες και να γίνει η συσχέτιση των επιπέδων αυτών με διάφορες κλινικές παραμέτρους όπως ηλικία, φύλο, τύπος, συχνότητα, διάρκεια, έλεγχος των κρίσεων καθώς και λήψη φαρμακευτικής αγωγής.
- 2) Να διερευνηθούν τα επίπεδα ορού αίματος των Bcl-2 και της κασπάσης-9 τον πρώτο μήνα μετά την πρώτη κρίση σπασμών (ενεργές κρίσεις- active seizures) παιδιών και εφήβων.
- 3) Να διερευνηθεί τέλος εάν τα επίπεδα της Bcl-2 και της κασπάσης-9 στον ορό του αίματος των ασθενών είναι δυνατόν να χρησιμεύσουν σαν διαγνωστικοί βιολογικοί δείκτες της επιληψίας.

14. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

14.1. Υλικό

Η μελέτη περιέλαβε εκατόν δέκα οκτώ (118) παιδιά και εφήβους (63 αγόρια και 55 κορίτσια) με ιστορικό σπασμών (82 παιδιά με επιληψία και 36 παιδιά που εκτιμήθηκαν με επεισόδια σπασμών τον πρώτο μήνα μετά την πρώτη κρίση), που κατηγοριοποιήθηκαν βάσει του τύπου των κρίσεων, αριθμού κρίσεων, πρόσφατης ή μη εκδήλωσης των σπασμών. Επίσης τριάντα (30) υγιή παιδιά, με αντιστοίχιση ηλικίας και φύλου, χωρίς ιστορικό νευρολογικής ή ψυχιατρικής νόσου, αξιοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

Η ηλικία των παιδιών κυμαίνονταν από δύο (2) έως δεκαέξι (16) έτη. Όπως προαναφέραμε, εκ των εκατό δέκα οκτώ (118) ασθενών, τριάντα έξι (36) παιδιά είχαν διαγνωσθεί πρόσφατα (νέες περιπτώσεις), παρουσίασαν δηλαδή ένα επεισόδιο σπασμών τον τελευταίο μήνα προ της εισαγωγής τους στο νοσοκομείο (ενεργείς σπασμοί- active seizures).

Χωρίς έλεγχο χαρακτηρίστηκαν οι ασθενείς που είχαν επεισόδια σπασμών τον τελευταίο μήνα (96 ασθενείς), υπό έλεγχο οι ασθενείς που ήταν ελεύθεροι κρίσεων κατά τα τελευταία 1,5-6 έτη (6 ασθενείς) και ως έχοντες υποτροπή των κρίσεων χαρακτηρίστηκαν οι ασθενείς που εμφάνισαν μία κρίση μετά από διάστημα ελέγχου διάρκειας 6 μηνών έως 2 έτη (16 ασθενείς).

Η διάγνωση τους βασίστηκε στα κριτήρια ταξινόμησης των επιληπτικών κρίσεων σύμφωνα με τη «Διεθνή Οργάνωση κατά της Επιληψίας» (ILAE- «International League Against Epilepsy) [205, 206, 207], έτη 1989 και 2010, την κλινική εικόνα και τα ευρήματα από το ηλεκτροεγκεφαλογράφημα.

Τα παιδιά εντάχθηκαν στη μελέτη από το Νοέμβριο του 2008 έως το Σεπτέμβριο του 2010. Επιλέγονταν από τα παιδιά που εισήχθησαν στη Β' Πανεπιστημιακή Παιδιατρική Κλινική του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στο Γενικό Νοσοκομείο Παίδων Αθηνών «Παναγιώτη & Αγλαΐας Κυριακού» με ιστορικό σπασμών. Επίσης από το Παιδονευρολογικό

εξωτερικό ιατρείο της κλινικής όπου προσέρχονταν για παρακολούθηση. Προηγούνταν πάντα έγγραφη ενημέρωση και συναίνεση των γονέων βάσει των κανόνων δεοντολογίας που διέπουν τις κλινικές μελέτες, με έντυπα εγκεκριμένα από την αρμόδια Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του νοσοκομείου.

Αποκλείστηκαν από τη μελέτη ασθενείς με συμπτωματική ή κρυπτογενή επιληψία, με παθολογικά ευρήματα στη μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου (πλην σκλήρυνσης ιππόκαμπου), με συνοδές λοιμώξεις ή άλλες χρόνιες ασθένειες, ιδιαίτερα αυτές που σχετίζονται με διαταραχή των μηχανισμών της απόπτωσης (όπως για παράδειγμα αυτοάνοσα νοσήματα). Εκ των παιδιών σχολικής ηλικίας κανένα δε φοιτούσε σε σχολείο ειδικής αγωγής. Λεπτομερές ιστορικό των ασθενών ελήφθη από τους γονείς ιδιαίτερα ως προς το οικογενειακό ιστορικό, την περιγεννητική περίοδο, την ανάπτυξη, τις σχολικές επιδόσεις καθώς και τυχόν κάκωση κεφαλής. Πλήρεις λεπτομέρειες ως προς τα χαρακτηριστικά των κρίσεων καταχωρούνταν ανά ασθενή μετά τη λήψη του ιστορικού από τον ίδιο τον ασθενή (όταν ήταν δυνατόν), τους γονείς ή τυχόν αυτόπτες μάρτυρες του συμβάντος. Οι λεπτομέρειες εστίαζαν στον τύπο των σπασμών, τον αριθμό των κρίσεων, τη διάρκεια τους καθώς και τυχόν μετακριτικά φαινόμενα. Ιδιαίτερα σε ό,τι αφορά τον αριθμό των κρίσεων αυτός καταγράφεται ανά μήνα και έτη.

Οι ασθενείς διαιρέθηκαν επιπλέον σε 2 ομάδες, η πρώτη περιλαμβάνοντας εκείνους που εμφάνιζαν έως 1 επεισόδιο ανά μήνα και η δεύτερη ομάδα εκείνους με 2 ή περισσότερα επεισόδια ανά μήνα.

Επίσης και η διάρκεια της ασθένειας καταγράφηκε σε μήνες και έτη.

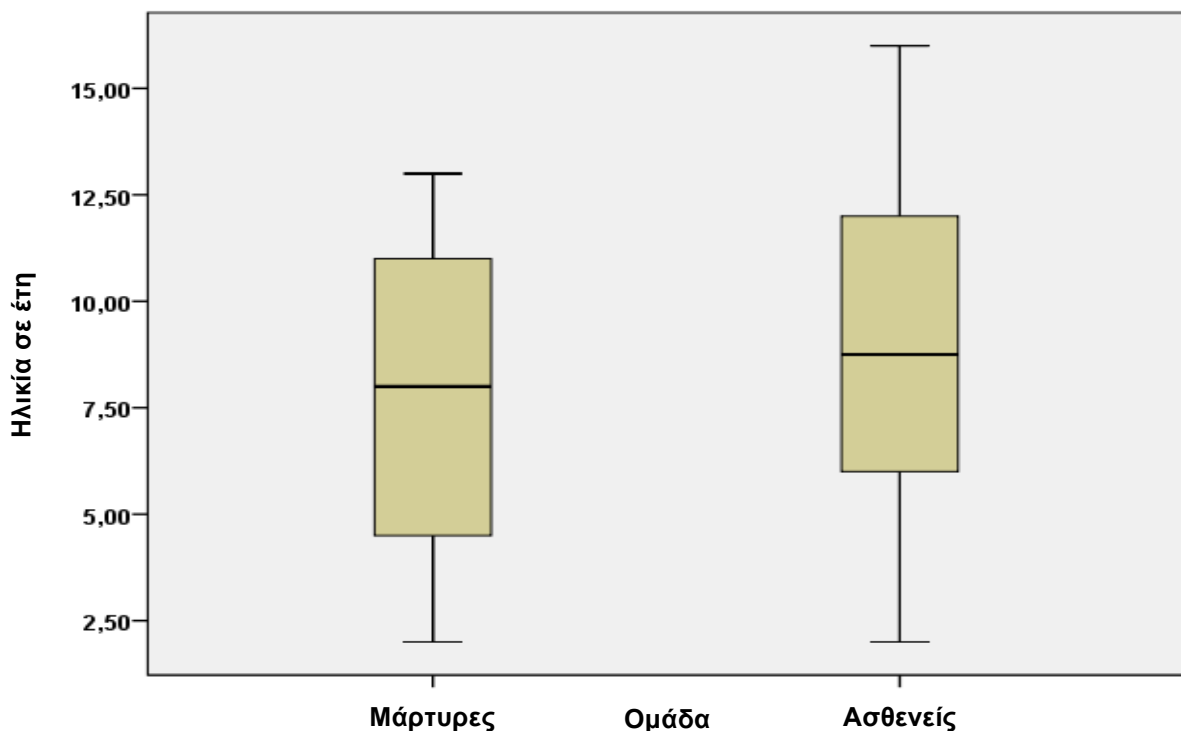
Όλοι οι ασθενείς υποβάλλονταν σε πλήρη κλινική παιδιατρική και νευρολογική εξέταση από την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδονευρολογίας κ. Σκαρδούτσου. Όλοι οι ασθενείς υπεβλήθησαν σε έλεγχο με ηλεκτροεγκεφαλογράφημα (HEΓ) εγρήγορσης και ύπνου, δοκιμασία με διαλείποντα φωτεινά ερεθίσματα και υπέρπνοια (όταν ήταν δυνατόν). Επισημαίνεται ότι κατά τη διενέργεια του HEΓ παρατηρήθηκαν συνοδές κρίσεις

στο περίπου 15-20% των ασθενών, που καταγράφηκαν και κατηγοριοποιήθηκαν. Επίσης όλοι οι ασθενείς υπεβλήθησαν σε απεικονιστικό έλεγχο με μαγνητική τομογραφία (MRI) εγκεφάλου (1,5 Tesla).

Υπεβλήθησαν τέλος σε αιματολογικό έλεγχο που περιελάμβανε γενική αίματος, καθορισμό ηλεκτρολυτών ορού, εργαστηριακό έλεγχο λειτουργίας ήπατος και νεφρών, ταχύτητα καθίζησης ερυθρών (ΤΚΕ- Westergren method), C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP).

14.2. Αναλυτική περιγραφή του υλικού- Ασθενείς και μάρτυρες

Διάγραμμα 14.1: Μέση τιμή ηλικίας (σε έτη) και η διακύμανση της ανά ομάδα εξεταζομένων



Πίνακας 14.1: Διμεταβλητή κατανομή φύλου στις ομάδες των ασθενών και των μαρτύρων

Ομάδα και φύλο					
			φύλο		Σύνολο
			Αγόρια	Κορίτσια	
Ομάδα	Μάρτυρες	Αριθμός	15	15	30
		%	10,1%	10,1%	20,2%
	Ασθενείς	Αριθμός	63	55	118
		%	42,6%	37,2%	79,8%
Σύνολο		Αριθμός	78	70	148
		%	52,7%	47,3%	100,0%

Από τα δεδομένα του πίνακα 14.1, η κατανομή του φύλου ανά ομάδα εξεταζομένων είναι ίδια (p -τιμή=0,449).

Η κατανομή ηλικίας των ασθενών είναι κανονική (πίνακας 14.2).

Η μέση τιμή της ηλικίας ανά φύλο στην ομάδα των ασθενών με την αντίστοιχη p -τιμή από τον t -έλεγχο παρουσιάζεται στο πίνακα όπου διαπιστώνεται ότι αγόρια και κορίτσια έχουν κατά μέσο όρο την ίδια ηλικία.

Πίνακας 14.2: Μέση τιμή ηλικίας (σε έτη) ανά φύλο με την αντίστοιχη p-τιμή στην ομάδα των ασθενών

Ηλικία σε έτη, ανά φύλο, στην ομάδα των ασθενών					
	Φύλο	N	Μέση τιμή	Τυπ. Απόκλιση	P-τιμή
Ηλικία	Αγόρια	63	8,78	3,22	0,93
	Κορίτσια	55	8,49	3,89	

Εκ των εκατόν δέκα οκτώ (118) ασθενών, οι εβδομήντα (70) παρουσίασαν εστιακές κρίσεις (20 εκ των οποίων με δευτεροπαθή γενίκευση) και σαρανταοκτώ (48) ασθενείς παρουσίασαν γενικευμένες κρίσεις.

Ειδικότερα, εκ των ασθενών με εστιακές κρίσεις, δέκα (10) εμφάνισαν απλές εστιακές (όλες κινητικές), είκοσι οκτώ (28) σύνθετες εστιακές εξωκροταφικές, δεκαεπτά (17) εστιακές έξω μοίρας κροταφικού λοβού (lateral temporal lobe seizures- LTL) και δεκαπέντε (15) εστιακές έσω μοίρας κροταφικού λοβού (mesial temporal lobe seizures- MTL). Εκ των τελευταίων δεκαπέντε (15) ασθενών (MTL), οι έξι (6) παρουσίαζαν σκλήρυνση έσω μοίρας κροταφικού λοβού- ιππόκαμπου (MTL-HS), με χαρακτηριστική εικόνα ετερόπλευρης ή αμφοτερόπλευρης σκλήρυνσης και ατροφίας στη μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου.

Οι ασθενείς με σύνθετες εστιακές εξωκροταφικές κρίσεις παρουσίασαν χαρακτηριστικά μεταβολή του επιπέδου συνείδησης και ταυτόχρονα συμπτώματα κινητικά, στάσης, αισθητικά, οπτικής αμαύρωσης ή απλών οπτικών ψευδαισθήσεων. Οι ασθενείς με εστιακές κρίσεις τύπου κροταφικού λοβού παρουσίασαν χαρακτηριστική μεταβολή επιπέδου συνείδησης και συμπτώματα νοητικά, ψυχικά, ακουστικές ψευδαισθήσεις, επαναλαμβανόμενες κινήσεις, κοιλιακό άλγος ή έμετο.

Η κατανομή βάσει του τύπου της κρίσης παρουσιάζεται στο πίνακα 14.3.

Πίνακας 14.3: Κατανομή ασθενών βάσει του τύπου κρίσεων

	Αριθμός	Αναλογία %
Γενικευμένες	48	40,7
Κροταφικές έξω μοίρας (LTL)	17	14,4
Κροταφικές έσω μοίρας χωρίς σκλήρυνση ιππόκαμπου (MTL)	9	7,6
Κροταφικές έσω μοίρας με σκλήρυνση ιπποκάμπου (MTL)	6	5,1
Εστιακές σύνθετες εξωκροταφικές	28	23,7
Εστιακές απλές κινητικές	10	8,5
Σύνολο	118	100,0

Στον πίνακα 14.4 που ακολουθεί, παρουσιάζεται η κατανομή βάσει φύλου στους διαφορετικούς τύπους κρίσεων στην ομάδα των ασθενών.

Πίνακας 14.4: Διμεταβλητή κατανομή του τύπου κρίσεων και του φύλου στην ομάδα των ασθενών

		Φύλο		Σύνολο		
		Αγόρι	Κορίτσι			
Τύπος κρίσεων	Γενικευμένες	Αριθμός	26	22	48	
		%	22,0%	18,6%	40,6%	
	Κροταφικές έξω και έσω μοίρας (και με σκλήρυνση ιππόκαμπου)	Αριθμός	14	18	32	
		%	11,9%	15,3%	27,2%	
	Εστιακές σύνθετες εξωκροταφικές	Αριθμός	13	15	28	
		%	11,0%	12,7%	23,7%	
	Εστιακές απλές κινητικές	Αριθμός	10	0	10	
		%	8,5%	0,0%	8,5%	
	Σύνολο		Αριθμός	63	55	118
			%	53,4%	46,6%	100,0%

Στον πίνακα 14.5 που ακολουθεί παρουσιάζεται η ομάδα των ασθενών κατανεμημένη βάσει του τύπου και του αριθμού των κρίσεων ανά μήνα. Ειδικότερα ως προς τον αριθμό των κρίσεων, οι ασθενείς κατανεμήθηκαν σε 2 ομάδες με την πρώτη να περιλαμβάνει αυτούς που εκδήλωσαν έως μία κρίση ανά μήνα και η δεύτερη ομάδα να περιλαμβάνει αυτούς που εκδήλωσαν δύο και περισσότερες κρίσεις ανά μήνα.

Πίνακας 14.5: Διμεταβλητή κατανομή τύπου και αριθμού κρίσεων ανά μήνα στην ομάδα των ασθενών

			Επιληπτικές κρίσεις		Σύνολο	
			Έως μία/ μήνα	Δύο και περισσότερες /μήνα		
Τύπος κρίσεων	Γενικευμένες	Αριθμός	19	29	48	
		%	16,1%	24,6%	40,7%	
	Κροταφικές (έξω, έσω μοίρας και με σκλήρυνση ιπποκάμπου)	Αριθμός	22	10	32	
		%	18,6%	8,5%	27,1%	
	Εστιακές σύνθετες εξωκροταφικές	Αριθμός	21	7	28	
		%	17,8%	5,9%	23,7%	
	Εστιακές απλές κινητικές	Αριθμός	2	8	10	
		%	1,7%	6,8%	8,5%	
	Σύνολο		Αριθμός	64	54	118
			%	54,2%	45,8%	100,0%

Στον πίνακα 14.6 περιγράφεται η κατανομή βάσει νέων και παλαιών περιπτώσεων ασθενών, με τις νέες περιπτώσεις να αντιπροσωπεύουν τους ασθενείς που εκδήλωσαν μία πρώτη κρίση έως 1 μήνα πριν την εισαγωγή στη μελέτη.

Πίνακας 14.6: Κατανομή νέων και παλαιών περιπτώσεων στην ομάδα των ασθενών

	Αριθμός	Αναλογία %
Νέες περιπτώσεις	36	30,5
Παλαιές περιπτώσεις	82	69,5
Σύνολο	118	100,0

Φαρμακευτική θεραπεία έλαβαν τριάντα εννέα (39) ασθενείς, εκ των οποίων τριάντα τρεις (33) έλαβαν μονοθεραπεία (βαλπροϊκό νάτριο, οξκαρβαζεπίνη, λεβετιρακετάμη), τέσσερα (4) παιδιά έλαβαν 2 φάρμακα και δύο (2) παιδιά έλαβαν 3 φάρμακα.

Στον πίνακα 14.7 καταγράφονται συγκεντρωτικά τα βασικά χαρακτηριστικά ασθενών- μαρτύρων.

Πίνακας 14.7. Χαρακτηριστικά ασθενών-μαρτύρων

	Ασθενείς (118)	Μάρτυρες (30)
Ηλικία (έτη ±SD):	8.8 ±3,54	7,66 ±3,41
Εύρος (έτη):	2-16	2-13
Φύλο ασθενών		
Αγόρια:	63 (42,6 %)	15 (10,1%)
Κορίτσια:	55 (37,2 %)	15 (10,1 %)
Διάρκεια κρίσεων		
Μήνες:	0,03 -144	
Μέσος όρος (μήνες):	24, 27 ± 32,56	
Συνολικός αριθμός κρίσεων:	1,00- 3240	
Μέσος όρος:	81,97 ± 374,5	
Αριθμός κρίσεων/ μήνα		
Εύρος:	0,01 – 90	
Μέσος όρος:	9,26 ± 15,9	
Νέοι ασθενείς:	36 (30.5%)	
Ένα επεισόδιο (κρίση)	28	
Δύο επεισόδια	08	
Παλαιοί ασθενείς:	82 (69.5%)	

Συνεχίζεται...

Πίνακας 14.7. (συνέχεια):

Τύπος κρίσεων (αριθμός ασθενών/
ποσοστό επί του συνόλου)

Γενικευμένες:	48	(40,67 %)
<u>Τονικοκλονικές:</u>	35	
<u>Αφαιρέσεις:</u>	11	
1) Τυπικές	2	
2) Άτυπες	6	
3) Αφαιρέσεις με ειδικά χαρακτηριστικά (Μυοκλονικές)	3	
<u>Μυοκλονικές:</u>	2	
Εστιακές:	70	(59,3 %)
<u>Απλές (κινητικές):</u>	10	(8,5 %)
<u>Σύνθετες εξωκροταφικές:</u>	28	
<u>Σύνθετες κροταφικές:</u>	32	
1) Έσω μοίρας κροταφικού λοβού (MTL)	9	(7,6%)
2) Έσω μοίρας κροταφικού λοβού με σκλήρυνση ιπποκάμπου (MTL-HS)	6	(5,1%)
3) Έξω μοίρας κροταφικού λοβού (LTL)	17	(14,40%)
Εστιακές δευτεροπαθώς γενικευμένες:	20	(28 %)
Έλεγχος νόσου (απόλυτος αριθμός ασθενών)		
Χωρίς έλεγχο (κρίση και τον τελευταίο μήνα):	96	
Υπό έλεγχο (ελεύθεροι κρίσεων τα τελευταία 1,5-6 έτη):	6	
Μία υποτροπή μετά από έλεγχο 0.5-2 έτη:	16	

14.3. Μέθοδοι προσδιορισμού

Τα επίπεδα των Bcl-2 και Caspase-9 προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο ELISA (“sandwich method”, eBioscience, Bender MedSystems GmbH Campus Vienna Biocenter 2 1030 Vienna, Austria). Η μέθοδος μη ανταγωνιστικής ELISA «σάντουιτς» έχει μεγάλη ευαισθησία, χαρακτηριζόμενη από ικανότητα μέτρησης πολύ μικρών ποσοτήτων ακόμη και σε μολυσματικά δείγματα. Βασίζεται στη χρήση δύο αντισωμάτων, σύλληψης και ανίχνευσης (capture and detection), τα οποία συνδέονται στο αντιγόνο ενδιαφέροντος (Bcl-2 ή κασπάση-9 στην περίπτωση μας). Χρησιμοποιήθηκε μικροπλάκα της οποίας οι κυψέλες ήταν προ-επικαλυμμένες με μονοκλωνικό αντίσωμα (Bcl-2 ή κασπάση-9) και τα μη ειδικά σημεία δέσμευσης ήταν αποκλεισμένα. Με την εισαγωγή του δείγματος στη μικροπλάκα, το αντιγόνο ενδιαφέροντος (Bcl-2 ή κασπάση-9) που υπάρχει στο δείγμα, δεσμεύεται από το αντίσωμα σύλληψης (capture antibody) το οποίο είναι προ-επικαλυμμένο στις κυψέλες της μικροπλάκας. Μετά τη διαδικασία πλυσίματος προστίθεται το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα ανίχνευσης (detection) anti- (Bcl-2 ή κασπάση-9), το οποίο είναι συνδεδεμένο με ένζυμο και συνδέεται στο δεύτερο υποδοχέα του αντιγόνου ενδιαφέροντος (Bcl-2 ή κασπάση-9). Λόγω του ενζύμου καταλύει αντίδραση με κατάλληλο υπόστρωμα (streptavidin- horseradish peroxidase- SA-HRP) δημιουργώντας κίτρινο χρώμα ως αποτέλεσμα της αντίδρασης.

Η ένταση του κίτρινου χρώματος που προκύπτει από την ενζυμική αντίδραση είναι ευθέως ανάλογη της ποσότητας του συμπλόκου (βιοτινυλιωμένο πεπτιδίο-SA-HRP) και άρα με την ποσότητα του αντιγόνου ενδιαφέροντος (Bcl-2 ή κασπάση-9). Από την τιμή της απορρόφησης του άγνωστου δείγματος και με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς υπολογίζεται η συγκέντρωση του πεπτιδίου στο άγνωστο δείγμα.

Κατά την συλλογή του αίματος (3 ml) χρησιμοποιήθηκε ένα σωληνάριο διαχωρισμού ορού (SST) το οποίο επιτρέπει στο δείγμα να πήξει μετά από επώαση τριάντα (30) λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση για δέκα (10) λεπτά στα 1600 x g (4°C).

Ο ορός αφαιρείται, κλασματώνεται σε φιαλίδια eppendorf των δύο (2) ml και αποθηκεύεται άμεσα στους -80°C μέχρι την στιγμή του προσδιορισμού. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε ένα κύκλο ψύξης- απόψυξης.

Χρησιμοποιήθηκαν φασματοφωτόμετρο Tecan Infinite M200 Multimode Reader, βαθιά κατάψυξη Scien Temp -80°C και φυγόκεντρος Thermo Megafuge 16R. Τα χαρακτηριστικά του kit για τη Bcl-2 ήταν όριο ανίχνευσης (detection limit) <0,5ng/ml, 8,6% CV (within assay precision), 12% CV (between assay precision). Για την κασπάση-9 το όριο ανίχνευσης (detection limit) ήταν <0,4ng/ml, 6,6% CV (within assay precision) και 9% CV (between assay precision). Τα αποτελέσματα καταγράφονται σε ng/ml.

Η ανάλυση των υποομάδων των δεδομένων μας έγινε post hoc.

14.4. Στατιστική Ανάλυση

Χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS, version 20 (SPSS, Chicago, IL, USA). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή (mean) και τυπική απόκλιση (+/- SD) για κανονική κατανομή και μη παραμετρικά δεδομένα.

Ως μέθοδος στατιστικής ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε το Student t-test για σύγκριση δεδομένων κανονικής κατανομής μεταξύ διαφορετικών ομάδων. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης ο κατά Kolmogorov-Smirnov έλεγχος περί κανονικότητας των κατανομών, ο μη παραμετρικός έλεγχος Mann Whitney εκεί όπου οι κατανομές δεν ήταν κανονικές και το Kruskal Wallis test για τη μελέτη της συσχέτισης μεταξύ πολλαπλών μεταβλητών.

Ο συντελεστής συσχέτισης του Spearman (Spearman's correlation coefficient) χρησιμοποιήθηκε για την συσχέτιση των διαφορετικών μεταβλητών στις υπό εξέταση ομάδες. Ο συντελεστής συσχέτισης του Pearson χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογηθεί η συσχέτιση μεταξύ των μεταβλητών Bcl-2 και κασπάση-9.

Η τιμή $p < 0,05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική σε κάθε περίπτωση. Ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης χρησιμοποιήθηκε για όλους τους ασθενείς και τους μάρτυρες.

Η στατιστική μελέτη έγινε από τον Ενδοκρινολόγο και Βιοστατιστικό κ. Χαράλαμπο Τσεντίδη.

15. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

15.1. Προσδιορισμός μεθόδου στατιστικής ανάλυσης

Πριν την ανάλυση ελέγχθηκε η κατανομή των υπό εξέταση μεγεθών περί της κανονικότητας της, για την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου ανάλυσης.

Οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις μαζί με την αντίστοιχη p-τιμή από τον Kolmogorov Smirnov έλεγχο περί κανονικότητας των κατανομών παρουσιάζονται στον Πίνακα 15.1.

Πίνακας 15.1: Μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις των υπό εξέταση ποσοτικών χαρακτηριστικών και η p-τιμή περί κανονικότητας των κατανομών (Kolmogorov Smirnov έλεγχος)

Υπό εξέταση μεταβλητή	N	Μέση τιμή	Τυπ. Απόκλιση	P-τιμή
Ηλικία	118	8,81	3,54	0,230
Bcl-2	118	15,96	33,41	0,000
Κασπάση-9	118	3,86	2,70	0,000
Αριθμός κρίσεων	118	81,97	374,52	0,000
Συχνότητα κρίσεων ανά μήνα	118	9,26	15,96	0,000

Από τα δεδομένα του πίνακα διαπιστώνεται ότι μόνο η κατανομή της ηλικίας είναι κανονική.

15.2. Σύγκριση τιμών Bcl-2 και κασπάσης-9 βάσει φύλου ασθενών

Συγκρίναμε τα επίπεδα της Bcl-2 μεταξύ των αγοριών (17,26±40,35ng/ml) και κοριτσιών (14,48±23,32ng/ml) ασθενών και δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0,481). Δε βρήκαμε διαφορά ούτε και για τα επίπεδα της κασπάσης-9 μεταξύ αγοριών (3,78±3,09ng/ml) και κοριτσιών (3,96±2,20ng/ml) ασθενών (p=0,461).

Τα ευρήματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 15.2.

Πίνακας 15.2. Σύγκριση των τιμών των Bcl-2 και κασπάσης-9 (ng/ml) μεταξύ αγοριών και κοριτσιών ασθενών (Mann Whitney έλεγχος)

		N	Μέση τιμή	Τυπ. απόκλιση	p-τιμή*
Bcl-2	Αγόρι	63	17,261854	40,3565247	0,481
	Κορίτσι	55	14,489242	23,3278339	
Κασπάση-9	Αγόρι	63	3,781063	3,0918663	0,461
	Κορίτσι	55	3,968313	2,2029881	

15.3. Σύγκριση τιμών Bcl-2 και κασπάσης-9 μεταξύ ασθενών και υγιών μαρτύρων

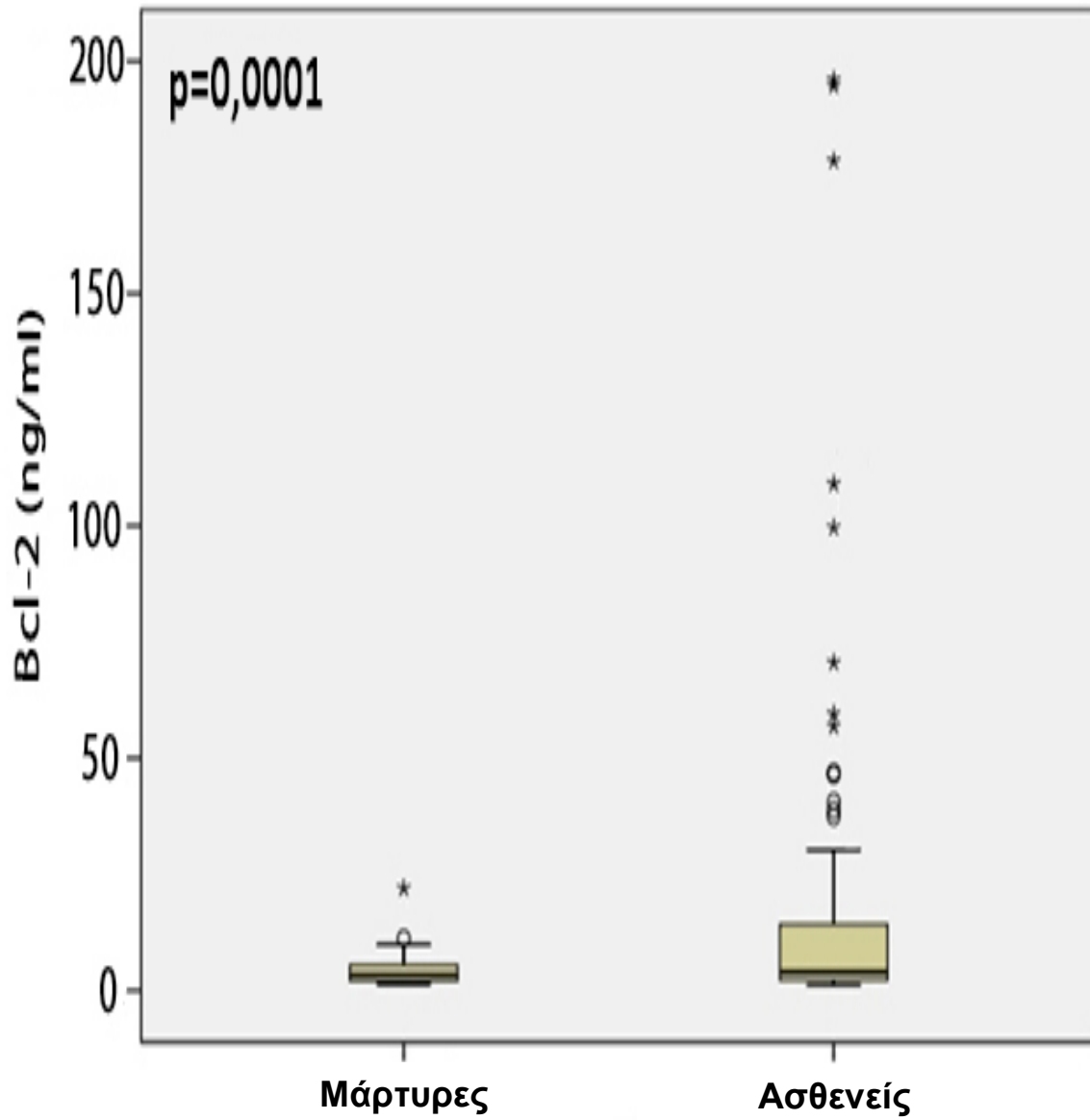
Η μέση τιμή της Bcl-2 ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένη στο ορό του αίματος της ομάδας των ασθενών (15,96±33,408 ng/ml) συγκριτικά με την ομάδα των μαρτύρων (4,53±4,11 ng/ml) (p<0,0001). Αντίθετα δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά της μέσης τιμής της κασπάσης-9 μεταξύ των ομάδων ασθενών (3,86±2,70 ng/ml) και μαρτύρων (3,85±2,63 ng/ml) (p= 0,987). Τα ευρήματα παρουσιάζονται στον πίνακα 15.3.

Πίνακας 15.3. Μέση τιμή και τυπική απόκλιση των επιπέδων (ng/ml) της Bcl-2 και της κασπάσης-9 στον ορό αίματος ανά ομάδα (ασθενείς και μάρτυρες) και η αντίστοιχη p-τιμή

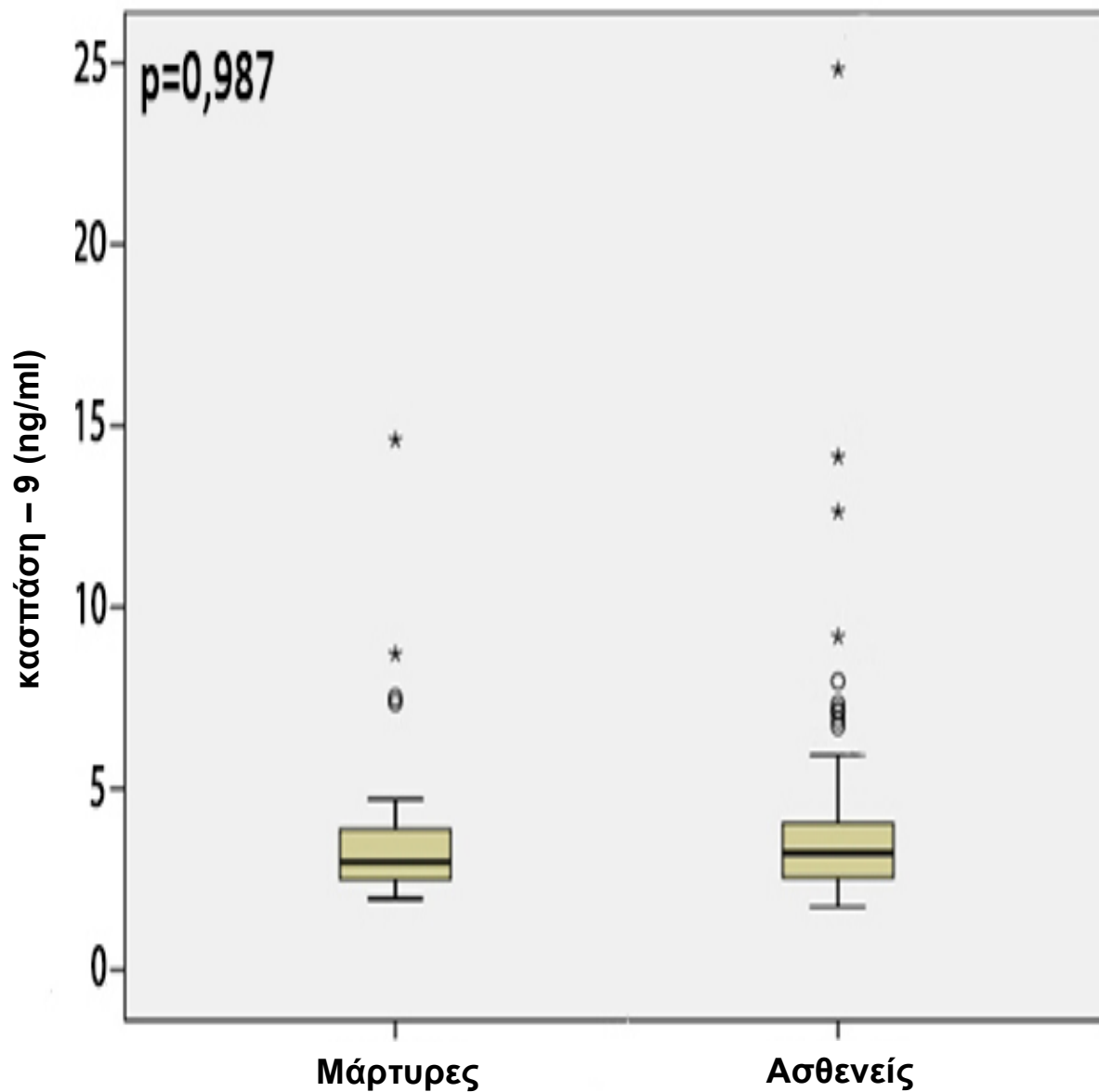
	Ομάδα	N	Μέση τιμή (ng/ml)	Τυπ. απόκλιση	p-τιμή
Bcl-2	Μάρτυρες	30	4,539950	4,1153000	
	Ασθενείς	118	15,969535	33,4086484	0,0001
Κασπάση-9	Μάρτυρες	30	3,859023	2,6325006	
	Ασθενείς	118	3,868341	2,7045349	0,987

Στα διαγράμματα 15.1. και 15.2. απεικονίζονται η μέση τιμή των Bcl-2 και κασπάσης-9 (ng/ml) στην ομάδα των ασθενών και στην ομάδα των μαρτύρων με την αντίστοιχη διακύμανση τους.

Διάγραμμα 15.1. Μέση τιμή και διακύμανση των επιπέδων της Bcl-2 (ng/ml) στον ορό αίματος ανά ομάδα εξεταζομένων (ασθενείς και μάρτυρες)



Διάγραμμα 15.2. Μέση τιμή και διακύμανση των επιπέδων της κασπάσης-9 (ng/ml) στον ορό αίματος ανά ομάδα εξεταζομένων (ασθενείς και μάρτυρες)



Δε διαπιστώθηκε συσχέτιση (correlation) μεταξύ των επιπέδων Bcl-2 και κασπάσης-9 στον ορό του αίματος των ασθενών και φύλου, ηλικίας, διάρκειας επιληψίας, αριθμού κρίσεων ανά μήνα και συνολικού αριθμού κρίσεων ανεξαρτήτως διάρκειας.

Τα ευρήματα παρουσιάζονται στον πίνακα 15.4.

Πίνακας 15.4: Συσχέτιση (correlation) των Bcl-2 και κασπάσης-9 με φύλο, ηλικία, διάρκεια επιληψίας, αριθμό κρίσεων ανά μήνα και συνολικό αριθμό κρίσεων ανεξαρτήτως διάρκειας

		Συσχετίσεις				Συνολικός αριθμός κρίσεων ανεξαρτήτως διάρκειας
		Φύλο	Ηλικία	Διάρκεια επιληψίας	Αριθμός κρίσεων ανά μήνα	
Bcl-2	p-τιμή	0,481	0,184	0,405	0,559	0,806
	r-τιμή	-0,068	-0,123	-0,077	0,054	-0,023
Κασπάση-9	p-τιμή	0,461	0,368	0,560	0,903	0,985
	r-τιμή	-0,180	-0,084	-0,054	0,011	0,002

Στην ομάδα των μαρτύρων η μέση τιμή επιπέδων Bcl-2 με τη αντίστοιχη τυπική απόκλιση ήταν 4,54+/-4,11ng/ml. Κατά συνέπεια η μέση τιμή μαρτύρων (mean) + 2 SD (δύο τυπικές αποκλίσεις από τη μέση τιμή μαρτύρων) δίνει την τιμή 12,76ng/ml [αναλυτικά: 4,54 + (2 x 4,11)]. Με βάση το εύρημα αυτό η ομάδα των ασθενών διαιρείται στα άτομα με επίπεδα Bcl-2 έως 12,76ng/ml και στα άτομα με επίπεδα μεγαλύτερα από 12,76ng/ml.

Μεταξύ των εκατον δέκα οκτώ (118) ασθενών, οι ογδόντα έξι (86) ασθενείς (73% επί του συνόλου) είχαν επίπεδα Bcl-2 μικρότερα από 12,76ng/ml, λιγότερο από 2 τυπικές αποκλίσεις από τη μέση τιμή των μαρτύρων, ενώ τριάντα δύο (32) ασθενείς (27% επί του συνόλου) είχαν επίπεδα μεγαλύτερα

από 12,76ng/ml, περισσότερο από 2 τυπικές αποκλίσεις από τη μέση τιμή των μαρτύρων.

Πίνακας 15.5:

Κατανομή της ομάδας των ασθενών

(ως προς τη μέση τιμή Bcl-2 μαρτύρων + 2 Τυπικές Αποκλίσεις από τη μέση τιμή Bcl-2 μαρτύρων)

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 0,00 Ασθενείς: Bcl-2<2,0*stdDev(Μαρτύρων)	86	58,1	72,9	72,9
1,00 Ασθενείς: Bcl-2>2,0*stdDev(Μαρτύρων)	32	21,6	27,1	100,0
Total	118	79,7	100,0	
Missing -1,00 Μάρτυρες	30	20,3		
Total	148	100,0		

Από τους τριάντα (32) αυτούς ασθενείς (με επίπεδα ορού Bcl-2>12,76ng/ml), είκοσι τρεις (23) ασθενείς είχαν επιληψία και εννέα (9) είχαν μία κρίση που εκδηλώθηκε έως 30 ημέρες πριν από τη λήψη του δείγματος αίματος.

Στην ανάλυση με λογιστική παλινδρόμηση (logistic regression analysis) βρέθηκε ότι (μόνο) η Bcl-2 είναι στατιστικά σημαντικός παράγοντας ($p=0,038$) ο οποίος επηρεάζει την προσαύξηση της πιθανότητας πρόβλεψης να ανήκει το παιδί στους ασθενείς. Ειδικότερα, για κάθε 1ng/ml αύξηση του Bcl-2 πάνω από την τιμή 12,76ng/ml υπάρχει 12% μεγαλύτερη πιθανότητα το παιδί να ανήκει στους ασθενείς- odds ratio 1,12 (95% C.I, όπου C.I το διάστημα εμπιστοσύνης, και συντελεστής συσχέτισης 1,01-1,24). Κατά συνέπεια τα επίπεδα της πρωτεΐνης Bcl-2 στις περιπτώσεις αυτές μπορούν να θεωρηθούν ως εν δυνάμει μοριακός βιολογικός δείκτης στον ορό του αίματος για την επιληψία και τις ενεργές κρίσεις.

Η αναλυτική στατιστική ανάλυση ακολουθεί στον πίνακα 15.6.

Πίνακας 15.6: Στατιστική ανάλυση

Για κάθε 1ng/ml αύξηση των επιπέδων ορού αίματος Bcl-2 ύπερθεν της τιμής 12,76ng/ml, το παιδί έχει σχετικό κίνδυνο (Odds ratio) 12% (μεγαλύτερη πιθανότητα) να είναι ασθενής (95% CI και συντελεστής συσχέτισης 1,01-1,24).

Μεταβλητές της εξίσωσης

	B	S.E	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Caspase-9	-0,003	0,076	0,002	1	0,967	0,997	0,859	1,157
Bcl-2	0,111	0,054	4,312	1	0,038	1,118	1,006	1,241
Constant	0,742	0,437	2,883	1	0,090	2,100		

15.4. Σύγκριση τιμών Bcl-2 και κασπάσης-9 στις υποομάδες των ασθενών

Τα επίπεδα της Bcl-2 δεν ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένα σε ασθενείς με 2 ή περισσότερες κρίσεις ανά μήνα (μέση τιμή 53,94ng/ml) συγκριτικά με αυτούς που εμφάνισαν μία κρίση ανά μήνα (μέση τιμή 50,66ng/ml) ($p=0,584$). Αντιθέτως, τα επίπεδα της κασπάσης-9 ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένα σε ασθενείς με 2 ή περισσότερες κρίσεις ανά μήνα (μέσος όρος 59,60ng/ml) συγκριτικά με αυτούς που εμφάνισαν μία κρίση ανά μήνα (μέσος όρος 47,69ng/ml) ($p=0,048$).

Τα ευρήματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 15.7.

Πίνακας 15.7. Σύγκριση των επιπέδων της Bcl-2 και της κασπάσης-9 ανάλογα με την συχνότητα των κρίσεων ανά μήνα στην ομάδα των ασθενών (Mann Whitney test)

	Αριθμός κρίσεων ανά μήνα	N	Μέση τιμή (ng/ml)	p-τιμή
Bcl-2	Μέχρι μία κρίση	69	50,66	0,584
	Δύο και πάνω	49	53,94	
Κασπάση-9	Μέχρι μία κρίση	69	47,69	0,048
	Δύο και πάνω	49	59,60	

Τα επίπεδα της κασπάσης-9 ήταν επίσης αυξημένα, παρότι όχι στατιστικά σημαντικά, μεταξύ των νέων ασθενών που εκδήλωσαν μία ή δύο κρίσεις τον πρώτο μήνα (μέσος όρος 70,26ng/ml) σε σύγκριση με αυτούς με 1 έτος διάρκεια (52,34 ng/ml) και περισσότερο από 1 έτος διάρκεια (56,33 ng/ml) ($p=0,067$) της επιληψίας.

Τα επίπεδα της Bcl-2 δεν εμφάνισαν στατιστιστικά σημαντική αύξηση μεταξύ των νέων ασθενών που εκδήλωσαν μία ή δύο κρίσεις τον πρώτο μήνα (μέσος όρος 62,51ng/ml) και αυτών με 1 έτος διάρκεια (56,61ng/ml) και περισσότερο από 1 έτος διάρκεια (57,95ng/ml)($p=0,745$) της επιληψίας.

Τα ευρήματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 15.8.

Πίνακας 15.8. Σύγκριση των επιπέδων Bcl-2 και κασπάσης-9 βάσει της διάρκειας των κρίσεων (Kruskal-Wallis test)

	Διάρκεια κρίσεων	Αριθμός ασθενών	Μέση τιμή (ng/ml)	p-τιμή
Bcl-2	Μέχρι 30 μέρες	36	62,51	0,745
	Μέχρι ένα έτος	32	56,61	
	Πάνω από ένα έτος	50	57,95	
Κασπάση-9	Μέχρι 30 μέρες	36	70,26	0,067
	Μέχρι ένα έτος	32	52,34	
	Πάνω από ένα έτος	50	56,33	

Στην ομάδα των ασθενών συμπεριλαμβάνονται ασθενείς υπό έλεγχο κρίσεων (χωρίς κρίση για 1,5 έως 6 έτη), ασθενείς με μία υποτροπή μετά από έλεγχο κρίσεων (πρότερα χωρίς κρίση για 6 μήνες έως 2 έτη) και ασθενείς χωρίς έλεγχο κρίσεων. Στους ασθενείς που παρουσίασαν μία υποτροπή μετά από έλεγχο κρίσεων, τα επίπεδα των Bcl-2 και κασπάσης-9 αυξήθηκαν οξέως συγκριτικά με αυτά των ασθενών υπό έλεγχο και αυτά των ασθενών χωρίς έλεγχο κρίσεων. Δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ασθενών χωρίς έλεγχο, υπό έλεγχο και με μία μοναδική υποτροπή μετά από έλεγχο, πιθανότατα λόγω της μεγάλης τυπικής απόκλισης στο μέσο όρο τιμών, των Bcl-2 και κασπάσης-9, στους χωρίς έλεγχο ασθενείς.

Οι τιμές ήταν αντίστοιχα (16,106 +/- 34,81)ng/ml (χωρίς έλεγχο κρίσεων), (9,73+/-11,51)ng/ml (υπό έλεγχο κρίσεων) και (17,68 +/- 30,50)ng/ml (μία πρόσφατη υποτροπή μετά από έλεγχο) για τη Bcl-2 (p=0,908). Επίσης ήταν αντίστοιχα (4,01 +/- 2,94)ng/ml, (2,98 +/- 0,5)ng/ml και (3,82 +/- 1,87) ng/ml για την κασπάση-9 (p=0,48). Ένα μοναδικό δείγμα αίματος ελήφθη από κάθε

ασθενή που εμφάνισε υποτροπή μεταξύ των ημερών 1 έως 5, συνηθέστερα τις πρώτες 3 ημέρες. Επισημαίνεται ότι τα υψηλότερα επίπεδα Bcl-2 και κασπάσης-9 παρατηρήθηκαν τις πρώτες 24 ώρες.

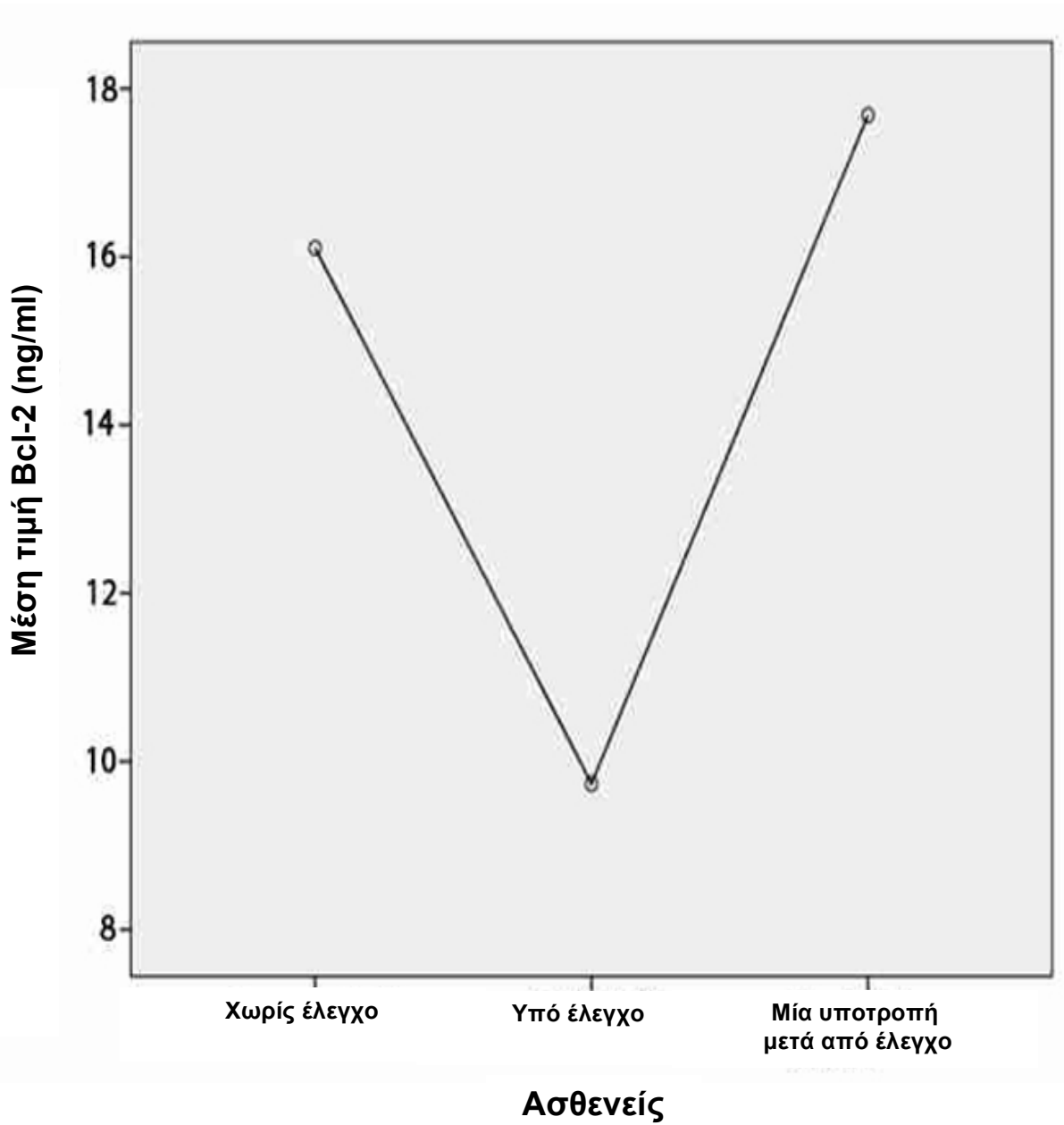
Τα ευρήματα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 15.9. που ακολουθεί.

Πίνακας 15.9. Σύγκριση της μέσης τιμής των επιπέδων Bcl-2 και κασπάσης-9 (ng/ml) στις ομάδες των ασθενών χωρίς έλεγχο κρίσεων, υπό έλεγχο των κρίσεων και μετά μία μοναδική πρόσφατη υποτροπή μετά από έλεγχο (Kruskal-Walis test)

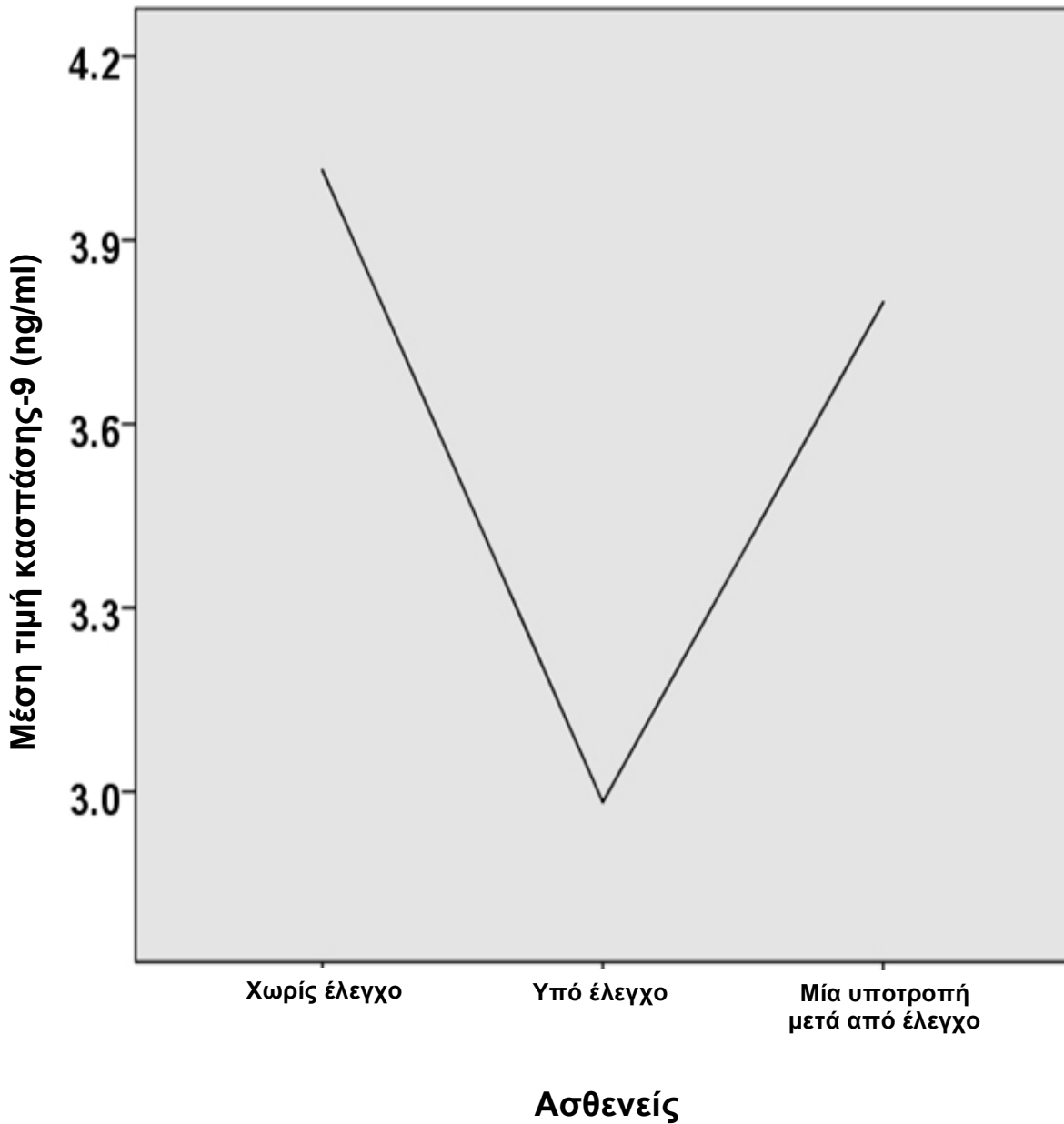
		N	Μέση τιμή (ng/ml)	Τυπ. απόκλιση	p-τιμή
Bcl-2	Χωρίς έλεγχο κρίσεων	96	16,106	34,8115	0,908
	Υπό έλεγχο κρίσεων	6	9,734	11,5162	
	Μία πρόσφατη υποτροπή μετά από έλεγχο	16	17,684	30,5083	
Κασπάση-9	Χωρίς έλεγχο κρίσεων	96	4,014	2,94	0,48
	Υπό έλεγχο κρίσεων	6	2,982	0,5003	
	Μία πρόσφατη υποτροπή μετά από έλεγχο	16	3,82	1,87	

Τα ευρήματα περιγράφονται επίσης στο διάγραμμα 15.3. για τη Bcl-2 και στο διάγραμμα 15.4. για την κασπάση-9.

Διάγραμμα 15.3. Μέση τιμή της Bcl-2 (ng/ml) σε ασθενείς χωρίς έλεγχο κρίσεων, υπό έλεγχο κρίσεων και με μία υποτροπή κρίσης μετά από έλεγχο



Διάγραμμα 15.4. Μέση τιμή της κασπάσης-9 (ng/ml) σε ασθενείς χωρίς έλεγχο κρίσεων, υπό έλεγχο κρίσεων και με μία υποτροπή κρίσης μετά από έλεγχο



Τα επίπεδα Bcl-2 και κασπάσης-9 δεν ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετικά μεταξύ των διαφόρων τύπων κρίσεων. Ειδικότερα, η υψηλότερη μέση τιμή Bcl-2 και κασπάσης-9 παρατηρήθηκε στις γενικευμένες επιληπτικές κρίσεις, (19,88 +/- 40,35 ng/ml) και (3,89 +/- 2,16 ng/ml) αντίστοιχα, καθώς και στις εστιακές σύνθετες εξωκροταφικές, (23,04 +/- 40,89 ng/ml) και (3,80 +/- 2,24 ng/ml)

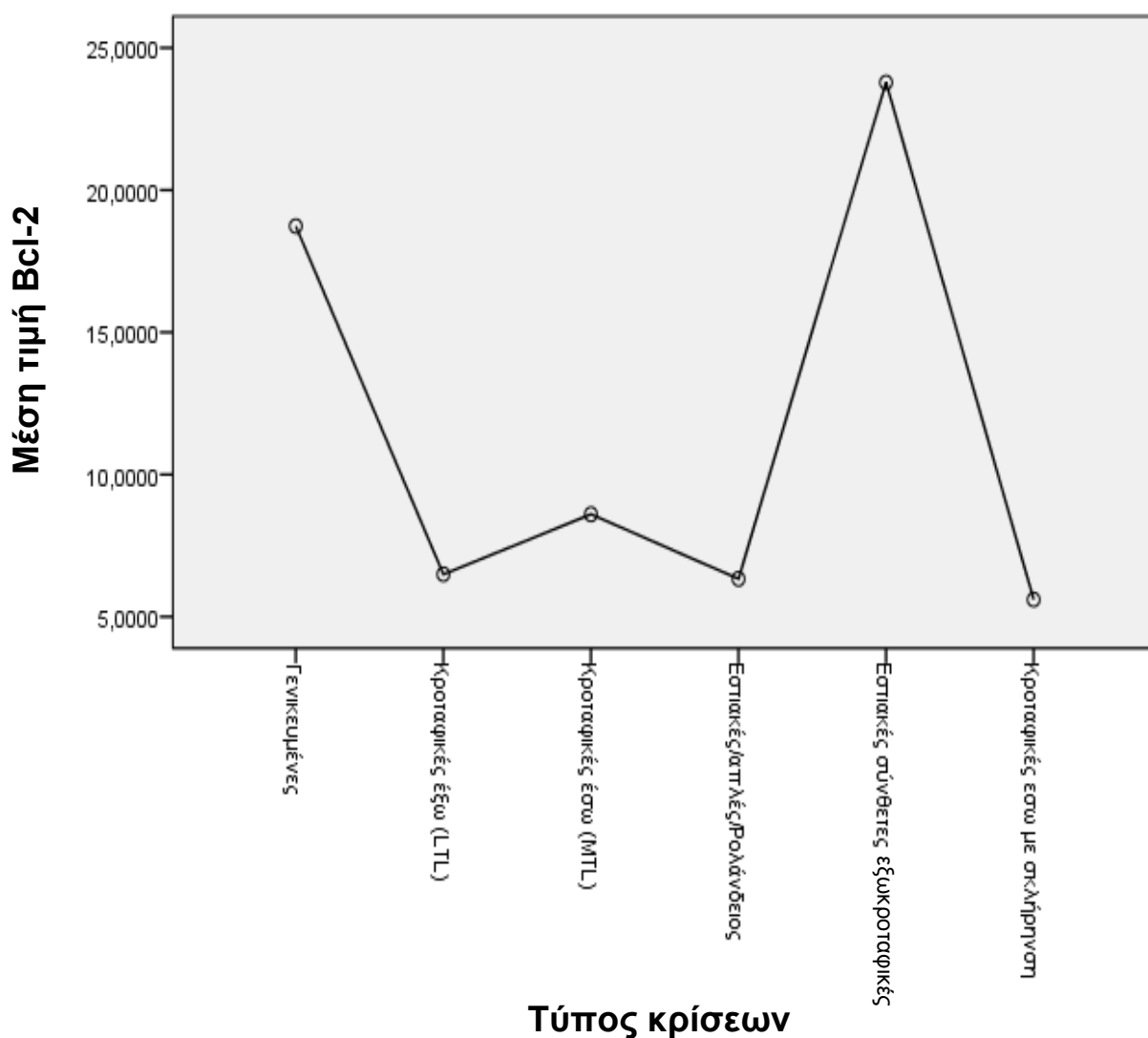
αντίστοιχα. Ωστόσο δεν ήταν στατιστικά σημαντική η διαφορά συγκριτικά με τους άλλους τύπους επιληψίας, ($p=0,217$) και ($p=0,986$), λόγω του μεγέθους των τυπικών αποκλίσεων. Τα ευρήματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 15.10.

Πίνακας 15.10: Συγκριτικός πίνακας μέσης τιμής επιπέδων (ng/ml) Bcl-2 και κασπάσης-9 για τους διαφορετικούς τύπους επιληψίας (Kruskal-Walis test)

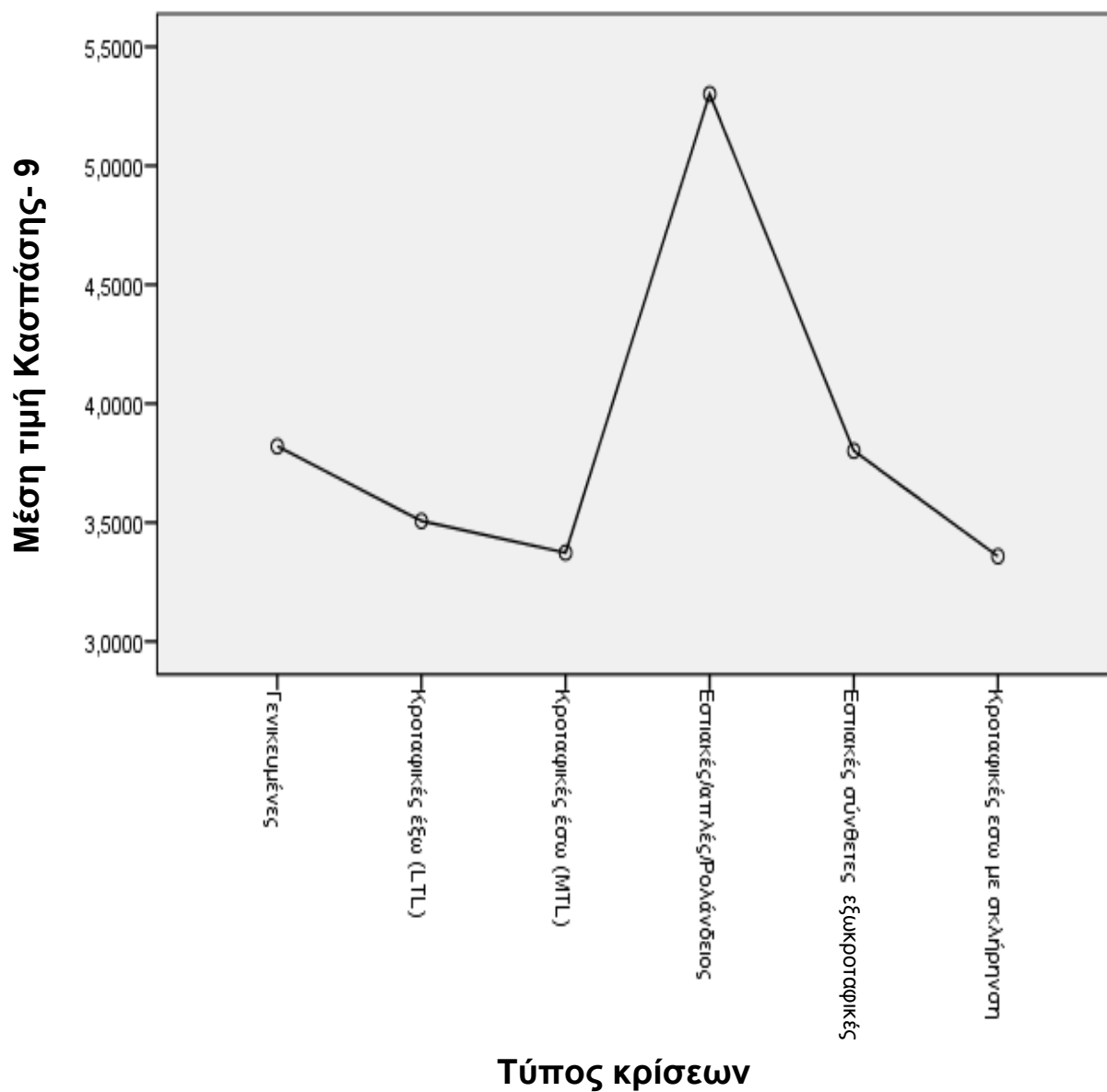
		N	Μέση τιμή (ng/ml)	Τυπική απόκλιση	p-τιμή
Bcl-2	Γενικευμένες	48	19,886229	40,3517286	0,217
	Κροταφικές έξω μοίρας (LTL)	17	6,492629	8,7689349	
	Κροταφικές έσω μοίρας χωρίς σκλήρυνση ιππόκαμπου (MTL)	9	8,601500	12,6334193	
	Κροταφικές έσω μοίρας με σκλήρυνση ιππόκαμπου (MTL-HS)	6	5,603583	6,1112332	
	Εστιακές σύνθετες εξωκροταφικές	28	23,040793	40,8987014	
	Εστιακές απλές κινητικές	10	6,331420	7,2837365	
Κασπάση-9	Γενικευμένες	48	3,893667	2,1668609	0,986
	Κροταφικές έξω μοίρας (LTL)	17	3,506524	1,4236238	
	Κροταφικές έσω μοίρας χωρίς σκλήρυνση ιππόκαμπου (MTL)	9	3,373011	1,1695474	
	Κροταφικές έσω μοίρας με σκλήρυνση ιππόκαμπου (MTL- HS)	6	3,357817	,3844194	
	Εστιακές σύνθετες εξωκροταφικές	28	3,801314	2,2435789	
	Εστιακές απλές κινητικές	10	5,301650	6,8993071	

Στα διαγράμματα 15.5, 15.6, 15.7 και 15.8 που ακολουθούν γίνεται σχηματική αναπαράσταση των ανωτέρω ευρημάτων.

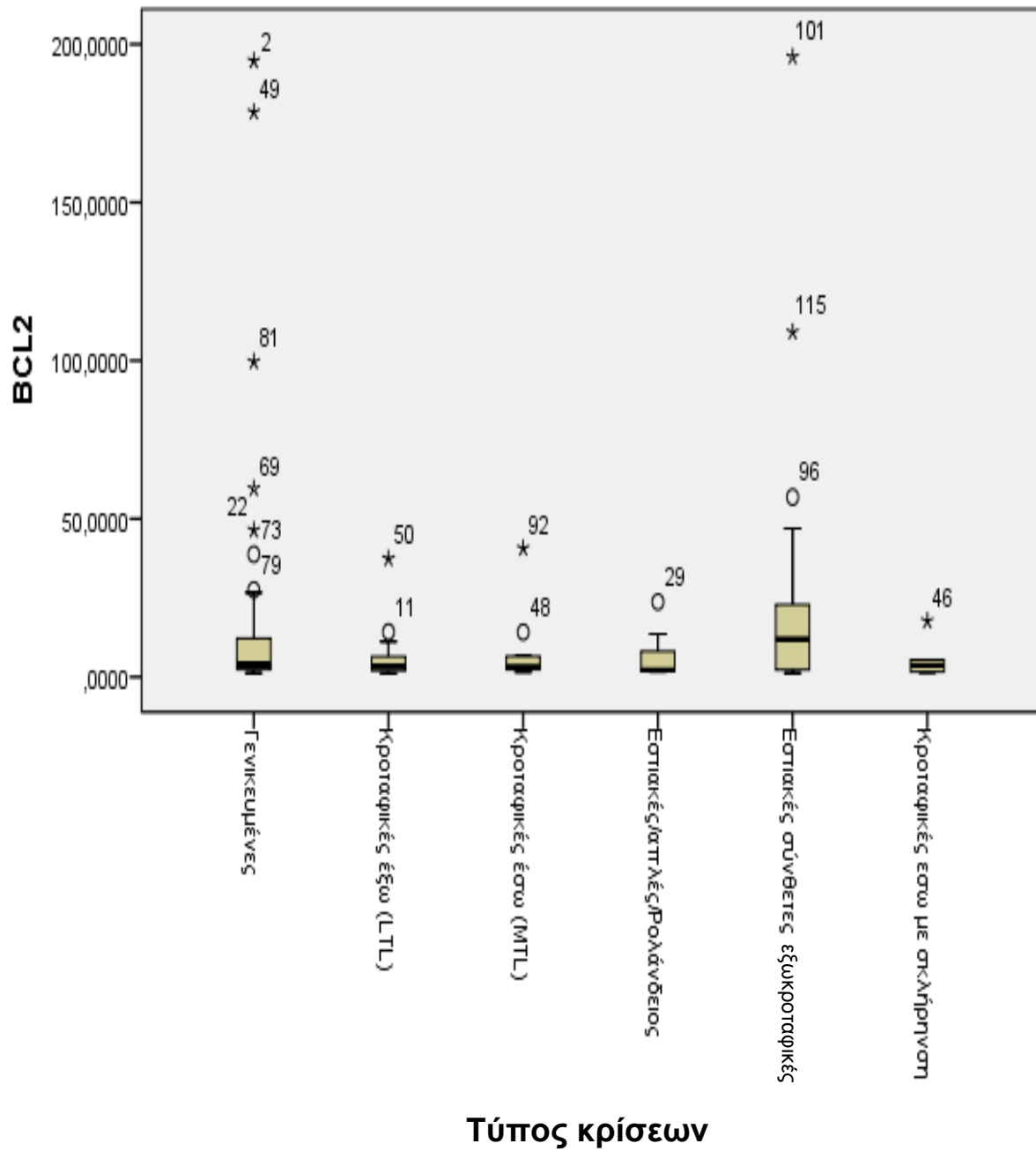
Διάγραμμα 15.5. Μέση τιμή Bcl-2 (ng/ml) ανά τύπο κρίσεων



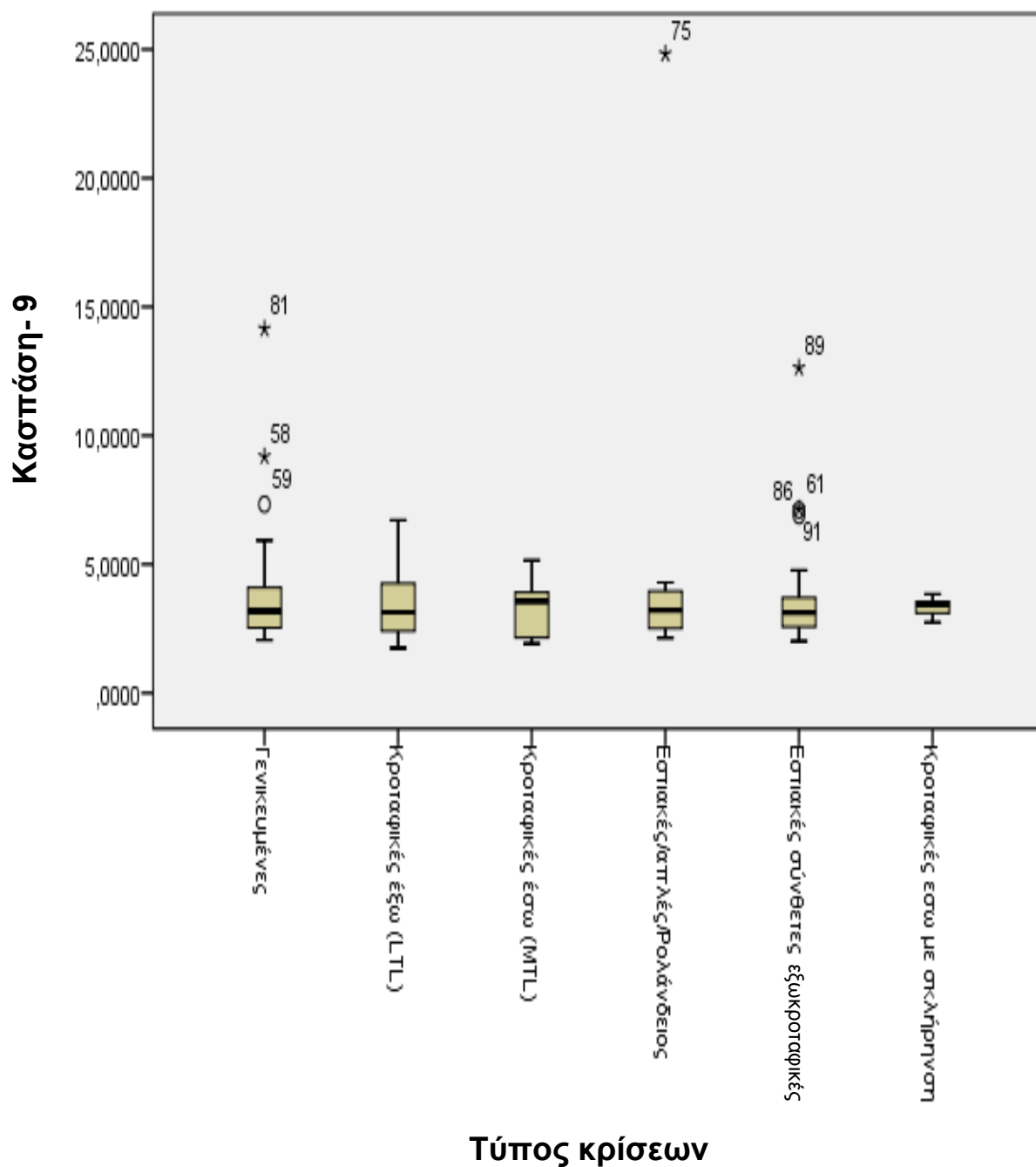
Διάγραμμα 15.6. : Μέση τιμή της κασπάσης-9 (ng/ml) ανά τύπο κρίσεων



Διάγραμμα 15.7. Διακείμεση τιμών (ng/ml) της Bcl-2 ανά τύπο κρίσεων



Διάγραμμα 15.8. Διακύμανση τιμών (ng/ml) της κασπάσης-9 ανά τύπο κρίσεων



Δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση τιμή της Bcl-2 μεταξύ των γενικευμένων (19,88 +/- 40,35ng/ml) και εστιακών (13,28 +/- 27,66 ng/ml) τύπων (p=0,294) αλλά ούτε και στη μέση τιμή της κασπάσης-9 μεταξύ γενικευμένων (3,89 +/- 2,16 ng/ml) και εστιακών (3,85 +/- 3,03 ng/ml) τύπων (p=0,933).

Τα ευρήματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 15.11.

Πίνακας 15.11: Συγκριτικός έλεγχος για τα επίπεδα Bcl-2 και κασπάσης-9 (ng/ml) μεταξύ γενικευμένων και εστιακών κρίσεων

	Κατηγορίες	N	Μέση τιμή (ng/ml)	Τυπ. απόκλιση	p-τιμή
Bcl-2	Γενικευμένες	48	19,886	40,3517	0,294
	Εστιακές	70	13,283	27,6674	
Κασπάση-9	Γενικευμένες	48	3,893	2,1668	0,933
	Εστιακές	70	3,850	3,0337	

Διερευνήθηκαν επίσης οι εστιακές κρίσεις με και χωρίς δευτεροπαθή γενίκευση και δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση τιμή των Bcl-2 και κασπάση-9 (p=0,321 και p=0,293 αντίστοιχα).

Δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση τιμή των επιπέδων Bcl-2 μεταξύ των σύνθετων έσω μοίρας κροταφικών κρίσεων χωρίς και με σκλήρυνση ιπποκάμπου, (8,60 +/- 12,63) και (5,60 +/- 6,11ng/ml) (p=0,955) ούτε και της κασπάσης-9 (3,37 +/- 1,16 ng/ml) και (3,35 +/- 0,38 ng/ml) (p=0,776) αντίστοιχα.

Το εύρημα παρουσιάζεται στον πίνακα 15.12.

Πίνακας 15.12. Σύγκριση της μέσης τιμής της Bcl-2 και της κασπάσης-9 (ng/ml) στις κρίσεις έξω μοίρας κροταφικού λοβού χωρίς (MTL) και με σκλήρυνση ιπποκάμπου (MTL-HS) (Mann-Whitney test)

	Τύπος	N	Μέση τιμή (ng/ml)	Τυπ. απόκλιση	p-τιμή
Bcl-2	Κροταφικές έξω μοίρας χωρίς σκλήρυνση ιπποκάμπου (MTL)	9	8,601500	12,6334193	0,955
	Κροταφικές έξω μοίρας με σκλήρυνση (MTL-HS)	6	5,603583	6,1112332	
Κασπάση-9	Κροταφικές έξω μοίρας χωρίς σκλήρυνση ιπποκάμπου (MTL)	9	3,373011	1,1695474	0,776
	Κροταφικές έξω μοίρας με σκλήρυνση (MTL-HS)	6	3,357817	0,3844194	

Δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της μέσης τιμής των επιπέδων Bcl-2 των σύνθετων κρίσεων έξω μοίρας κροταφικού λοβού (6,49 +/- 8,76 ng/ml) όταν συγκρίθηκαν με το άθροισμα των έξω μοίρας κροταφικού λοβού με και χωρίς σκλήρυνση ιπποκάμπου (7,40 +/- 10,33 ng/ml) ($p=0,789$) ούτε και στη μέση τιμή της κασπάσης-9 μεταξύ των κρίσεων έξω (3,50 +/- 1,42 ng/ml) και έξω (3,36 +/- 0,91 ng/ml) μοίρας κροταφικού λοβού αντίστοιχα ($p=0,747$). Τα ευρήματα παρουσιάζονται στον πίνακα 15.13.

Πίνακας 15.13: Σύγκριση της μέσης τιμής των επιπέδων της Bcl-2 και κασπάσης-9 (ng/ml) μεταξύ των κρίσεων έξω μοίρας κροταφικού λοβού (LTL) και των κρίσεων έσω μοίρας κροταφικού λοβού αθροιστικά (με και χωρίς σκλήρυνση ιπποκάμπου- MTL και MTL-HS) (Mann Whitney test)

	Τύπος	N	Μέση τιμή (ng/ml)	Τυπ. απόκλιση	P-τιμή
Bcl-2	LTL	17	6,492629	8,7689349	0,789
	MTL και MTL-HS	15	7,402333	10,3368866	
Κασπάση-9	LTL	17	3,506524	1,4236238	0,747
	MTL και MTL-HS	15	3,366933	0,9134882	

Στατιστικά σημαντική διαφορά διαπιστώθηκε μεταξύ των επιπέδων της Bcl-2 στις απλές εστιακές κινητικές κρίσεις (6,33 +/- 7,28 ng/ml) όταν συγκρίθηκαν με τις σύνθετες εξωκροταφικές κρίσεις (23,04 +/- 40,98 ng/ml) (**p=0,047**). Δε διαπιστώθηκε διαφορά μεταξύ των επιπέδων της κασπάσης-9 στις εστιακές απλές κινητικές (5,30 +/- 6,89 ng/ml) και τις εστιακές σύνθετες εξωκροταφικές (3,80 +/- 2,24 ng/ml) (p=0,311) αντίστοιχα.

Τα ευρήματα παρουσιάζονται στον πίνακα 15.14.

Πίνακας 15.14: Σύγκριση των επιπέδων της Bcl-2 και κασπάσης-9 (ng/ml) στις απλές εστιακές κινητικές και στις εστιακές σύνθετες εξωκροταφικές κρίσεις (Mann- Whitney test)

	Τύπος	N	Μέση τιμή (ng/ml)	Τυπ. Απόκλιση	p-τιμή
BCL2	Εστιακές απλές κινητικές	10	6,33	7,28	0,047
	Εστιακές σύνθετες εξωκροταφικές	28	23,04	40.98	
Κασπάσης-9	Εστιακές απλές κινητικές	10	5,30	6,89	0,311
	Εστιακές σύνθετες εξωκροταφικές	28	3,80	2,24	

Στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της Bcl-2 διαπιστώθηκε στην σύγκριση μεταξύ των εστιακών σύνθετων εξωκροταφικών κρίσεων (23,04 +/- 40,98 ng/ml) και το άθροισμα όλων των κροταφικών τύπων (σύνθετες έξω μοίρας κροταφικού λοβού και έσω μοίρας κροταφικού λοβού με και χωρίς σκλήρυνση ιππόκαμπου) (6,49 +/- 8,76 ng/ml) (**p= 0,034**). Δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές της κασπάσης-9 μεταξύ εστιακών σύνθετων εξωκροταφικών (3,80 +/- 2,24 ng/ml) και το άθροισμα όλων των κροταφικών τύπων (7,40 +/- 10,33 ng/ml) (p=0,312) αντίστοιχα. Τα ευρήματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 15.15.

Πίνακας 15.15: Σύγκριση των επιπέδων της Bcl-2 και της κασπάσης-9 (ng/ml) μεταξύ των εστιακών σύνθετων εξωκροταφικών και του συνόλου των εστιακών σύνθετων κροταφικών κρίσεων (Mann- Whitney test)

	Τύποι	N	Μέση τιμή (ng/ml)	Τυπ. απόκλιση	p-τιμή
Bcl-2	Εστιακές σύνθετες εξωκροταφικές	28	23,04	40,98	0,034
	Εστιακές σύνθετες κροταφικές (LTL, MTL, MTL-HS)	32	6,49	8,76	
Κασπάση-9	Εστιακές σύνθετες εξωκροταφικές	28	3,80	2,24	0,312
	Εστιακές σύνθετες κροταφικές (LTL, MTL, MTL-HS)	32	7,40	10,33	

Δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση τιμή της Bcl-2 μεταξύ των γενικευμένων (19,88 +/- 40,35ng/ml) και των εστιακών σύνθετων εξωκροταφικών κρίσεων (23,04 +/- 40,89 ng/ml) (p=0,742). Δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ούτε και για την κασπάση-9 μεταξύ των γενικευμένων (3,89 +/- 2,16 ng/ml) και των εστιακών σύνθετων εξωκροταφικών κρίσεων (3,80 +/- 2,24 ng/ml) (p=0,86) αντίστοιχα.

Τα ευρήματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 15.16.

Πίνακας 15.16. Σύγκριση των επιπέδων της Bcl-2 και της κασπάσης-9 (ng/ml) μεταξύ των γενικευμένων και των εστιακών σύνθετων εξωκροταφικών κρίσεων (Mann Whitney test)

	Τύπος	N	Μέση τιμή (ng/ml)	Τυπ. Απόκλιση	P-τιμή
Bcl-2	Γενικευμένες	48	19,88	40,35	0,742
	Εστιακές σύνθετες εξωκροταφικές	28	23,04	40,89	
κασπάση-9	Γενικευμένες	48	3,89	2,16	0,86
	Εστιακές σύνθετες εξωκροταφικές	28	3,80	2,24	

Φαρμακευτική θεραπεία έλαβαν τριάντα εννέα (39) ασθενείς, εκ των οποίων τριάντα τρεις (33) έλαβαν μονοθεραπεία (βαλπροϊκό νάτριο, οξκαρβαζεπίνη, λεβετιρακετάμη), τέσσερα (4) παιδιά έλαβαν 2 φαρμακευτικά σκευάσματα και δύο (2) παιδιά έλαβαν 3 σκευάσματα.

Δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επιπέδων της Bcl-2 στους ασθενείς υπό και χωρίς φαρμακοθεραπεία ($p=0,170$) αλλά ούτε και της κασπάσης-9 αντίστοιχα ($p=0,072$).

Τα ευρήματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 15.17.

Πίνακας 15.17. Σύγκριση της μέσης τιμής Bcl-2 και κασπάσης-9 (ng/ml) μεταξύ των ασθενών υπό και χωρίς φαρμακοθεραπεία (Mann Whitney test)

	Φαρμακοθεραπεία	N	Μέση τιμή (ng/ml)	P-τιμή
Bcl-2	Υπό	39	27,44	0,170
	Χωρίς	43	29,82	
Κασπάση-9	Υπό	39	3,79	0,072
	Χωρίς	43	3,71	

16. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών της σήμανσης της απόπτωσης συμπεριλαμβάνεται στο μηχανισμό του νευρωνικού θανάτου που ακολουθεί τις περιπτώσεις ιδιοπαθών σπασμών [2,208]. Έχει διαπιστωθεί αύξηση αμφοτέρων προαποπτωτικών και αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένης της Bcl-2 και των κασπασών στον κροταφικό λοβό ασθενών οι οποίοι υποβλήθηκαν θεραπευτικά σε κροταφική λοβεκτομή λόγω χρόνιας επιληψίας τύπου κροταφικού λοβού, μεταξύ των οποίων και παιδιά [2,3]. Μετά από πειραματική πρόκληση εγκεφαλικής ισχαιμίας διαπιστώθηκε αυξημένη ενεργοποίηση της Bcl-2 πρωτεΐνης στους επιζήσαντες νευρώνες [209]. Αυτό μπορεί να αποτελεί μία απάντηση προσαρμογής με σκοπό να προστατευθούν οι ιστοί από την συνεχιζόμενη απώλεια των νευρώνων.

Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε τα επίπεδα των πρωτεϊνών Bcl-2 και της κασπάσης-9 στο αίμα 118 παιδιών και εφήβων, εκ των οποίων 82 ασθενείς έπασχαν από ιδιοπαθή επιληψία και 36 ασθενείς είχαν εκδηλώσει ένα ή δύο πρώτα επεισόδια κρίσεων τον τελευταίο μήνα πριν την αιμοληψία (ενεργείς σπασμοί-active seizures). Οι ασθενείς δεν είχαν ιστορικό λοίμωξης, συστηματικό νόσημα, αυτοάνοσο νόσημα ή αλλεργία. Λόγω του τρόπου συλλογής των ασθενών, η ανάλυση των δεδομένων μας έγινε post hoc. Διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της Bcl-2 στον ορό του αίματος των 118 ασθενών σε σύγκριση με την ομάδα 30 υγιών μαρτύρων ($p=0,0001$). Σχεδόν το 30% των ασθενών είχαν επίπεδα Bcl-2 πάνω από 12,76 ng/ml (πάνω δηλαδή από δύο σταθερές αποκλίσεις από τη μέση τιμή της Bcl-2 στην ομάδα των μαρτύρων) και σημαντικά αυξημένη πιθανότητα να έχουν ταξινομηθεί στην ομάδα των ασθενών. Τα επίπεδα της Bcl-2 επηρεάζουν σημαντικά την προσάυξη της πιθανότητας της πρόβλεψης να ανήκει το παιδί στην ομάδα των ασθενών. Ειδικότερα, για κάθε αύξηση της Bcl-2 κατά 1ng/ml πάνω από

την τιμή 12,76 ng/ml η πιθανότητα του παιδιού να ανήκει στην ομάδα των ασθενών αυξάνεται κατά 12%. Τα επίπεδα της Bcl-2 στο αίμα μπορεί να αποτελούν συνεπώς ένα δυνητικό διαγνωστικό μοριακό βιολογικό δείκτη (βιοδείκτη) για τους ενεργούς σπασμούς (active seizures) και την επιληψία. Κλινικά, το εύρημα αυτό μπορεί να βοηθήσει στη διάγνωση των ενεργών σπασμών σε περιπτώσεις με άτυπη κλινική εκδήλωση, στις περιπτώσεις αναξιόπιστων, στην περιγραφή του ιστορικού, ασθενών και γονέων όπως και στη διαφοροδιάγνωση της επιληψίας από ψευδοσπασμούς. Η προοπτική παρακολούθηση των παιδιών με πρώτο επεισόδιο σπασμών και αυξημένο επίπεδο Bcl-2 στο αίμα και/ή σε συνδυασμό με άλλους βιολογικούς δείκτες π.χ μεταβολή της έκφρασης γονιδίων στην επιληψία (όπως τα miRNA), μπορεί να βοηθήσει την πρόγνωση επιπλέον κρίσεων στο μέλλον σε ορισμένα παιδιά [183].

Δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της κασπάσης-9 στο αίμα μεταξύ των ασθενών και την ομάδα των μαρτύρων ($p=0,986$).

Δε διαπιστώθηκε επίσης συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της Bcl-2 και της κασπάσης-9 με την ηλικία, φύλο, αριθμό των κρίσεων ανά μήνα, τον συνολικό αριθμό των κρίσεων και τη διάρκεια της επιληψίας. Παρόμοιο αποτέλεσμα αναφέρεται από τον Henshall et al., ο οποίος δε διαπίστωσε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της πρωτεΐνης Bcl-2 και την συχνότητα των κρίσεων σε δείγματα κροταφικού λοβού ανθρώπων με επιληψία [2].

Υπάρχουν δύο μελέτες στη βιβλιογραφία στις οποίες διερευνήθηκαν τα επίπεδα της Bcl-2 στο αίμα παιδιών με ιδιοπαθή επιληψία. Στην πρώτη μελέτη (El Hodhod et al.) αναφέρεται σημαντική αύξηση των επιπέδων της Bcl-2 στο αίμα 30 παιδιών και εφήβων που έπασχαν από γενικευμένη και εστιακή επιληψία, μέσος όρος παρακολούθησης 18 μήνες, σε σύγκριση με τους μάρτυρες καθώς και υψηλότερη τιμή στους ασθενείς χωρίς έλεγχο των κρίσεων [210]. Η πρόσθετη μελέτη των ανωτέρω ασθενών μαζί με 30 ακόμη περιπτώσεις παιδιατρικών ασθενών με επιληψία κροταφικού λοβού, όπως αναφέρεται σε

άλλη μελέτη (Kilani et al.), έδειξε επίσης σημαντική αύξηση των επιπέδων της Bcl-2 στο αίμα, τα οποία είχαν συσχέτιση με την συχνότητα και τη διάρκεια των κρίσεων [208]. Αναφορικά με την πολύ σημαντική αύξηση των επιπέδων της Bcl-2 στο αίμα των ασθενών μας, η δική μας μελέτη είναι συμβατή με αμφότερες τις παραπάνω μελέτες και ενισχύει την πρόταση του Kilani ότι η πρωτεΐνη Bcl-2 στο αίμα μπορεί να αποτελεί έναν περιφερικό βιολογικό δείκτη της απόπτωσης στα παιδιά που πάσχουν τόσο από γενικευμένο όσο και από εστιακό τύπο επιληψίας, τα επίπεδα των οποίων (γενικευμένων και εστιακών κρίσεων) είναι συγκρίσιμα, εύρημα που συμφωνεί με τη μελέτη του El Hodhod [210].

Δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της Bcl-2 και της κασπάσης-9 μεταξύ των γενικευμένων και των εστιακών κρίσεων, με ή χωρίς δευτεροπαθή γενίκευση, στη μελέτη μας. Περίπου τετραπλάσια αύξηση των επιπέδων της Bcl-2 στο αίμα διαπιστώθηκε στις γενικευμένες και στις εστιακές σύνθετες εξωκροταφικές κρίσεις σε σύγκριση με τους άλλους τύπους κρίσεων, αν και στατιστικά μη σημαντική λόγω του μεγάλου μεγέθους των τυπικών αποκλίσεων. Στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της Bcl-2 αλλά όχι της κασπάσης-9 διαπιστώθηκε στη σύγκριση μεταξύ των εστιακών σύνθετων εξωκροταφικών κρίσεων και των εστιακών απλών κινητικών κρίσεων, όπως επίσης μεταξύ των εστιακών σύνθετων εξωκροταφικών κρίσεων και όλων των κροταφικών τύπων μαζί. Εφόσον κανείς από τους ασθενείς δεν είχε συμπτωματική επιληψία οι διαφορές στον τύπο των κρίσεων φαίνεται ότι σχετίζονται με την ίδια την επιληψία. Εν τούτοις η αιτιολογία αυτών των διαφορών δεν είναι ακόμη κατανοητή, εφόσον η γνώση πάνω στα δίκτυα τα οποία στηρίζουν τις διαφορετικές οδούς των σπασμών [211,212] όπως και τα αποπτωτικά στάδια στους νευρώνες είναι περιορισμένη [213,214]. Επισημαίνουμε ότι ασθενείς με αρνητική μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου που έπασχαν από εξωκροταφική επιληψία του νεοφλοιού, κυρίως τύπου μετωπιαίου λοβού, και δευτεροπαθή γενίκευση, οι οποίοι διερευνήθηκαν περαιτέρω με MRI

απεικόνιση τανυστή διάχυσης (diffusion tensor imaging) διαπιστώθηκε ότι όλοι παρουσίαζαν υποφλοιώδεις ανωμαλίες της φαιάς ουσίας [215].

Τα επίπεδα της Bcl-2 στο αίμα στη μελέτη μας διέφεραν σημαντικά σε ορισμένους τύπους των εστιακών σπασμών. Αυτό μπορεί να είναι ενδεικτικό της διαφορετικής ανταποπρωτικής έκφρασης διαφορετικών πληθυσμών νερώνων μεταξύ των εστιακών σπασμών. Το εύρημα αυτό όμως μπορεί και να αντανακλά διαφορές στη λειτουργία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού ή στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών. Επιπλέον στην περίπτωση της σκλήρυνσης των υποκάμπων που διαπιστώθηκε με τη μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου σε έξι από τους ασθενείς της μελέτης μας, η νευρωνική βλάβη μπορεί να ήταν περιορισμένη επειδή ο αριθμός των ευαίσθητων νευρώνων ήταν ήδη μειωμένος. Τα επίπεδα της κασπάσης-9 δε διέφεραν σημαντικά μεταξύ των ασθενών και της ομάδος των μαρτύρων. Εν τούτοις ήταν οριακά αυξημένα σε ασθενείς με πρώτο επεισόδιο κρίσεων κατά τον τελευταίο μήνα πριν την αιμοληψία-ενεργείς σπασμοί- και επίσης στατιστικά σημαντικά αυξημένα σε όλους τους ασθενείς με δύο ή περισσότερα επεισόδια κρίσεων το μήνα σε σύγκριση με εκείνους με ένα επεισόδιο τον μήνα. Τα επίπεδα της κασπάσης -9 αυξήθηκαν απότομα αλλά όχι στατιστικά σημαντικά τις πρώτες πέντε ημέρες μετά από μία υποτροπή σε ασθενείς με προηγούμενο έλεγχο κρίσεων (χωρίς κρίση εκ του ιστορικού από 6 μήνες έως 2 έτη). Στη μελέτη των Henshall et al. διαπιστώθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της κασπάσης-3 σε δείγμα του κροταφικού λοβού ασθενών με χρόνια κροταφική επιληψία και τη διάρκεια της επιληψίας οπότε εξήχθη το συμπέρασμα ότι είναι δυνατόν ένας ανασταλτικός ανατροφοδοτικός μηχανισμός να λειτουργεί σε αυτή τη σχέση [2]. Δεν είναι γνωστό επί του παρόντος εάν ένας ανάλογος μηχανισμός μπορεί να ισχύει για τη μειωμένη έκφραση του επιπέδου της κασπάσης-9 στο αίμα μετά την αρχική περίοδο από την έναρξη των σπασμών, ειδικά μετά τις πρώτες 30 ημέρες, όπως παρατηρήθηκε στην ομάδα των δικών μας ασθενών.

Δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της Bcl-2 και της κασπάσης-9 μεταξύ των ασθενών χωρίς έλεγχο των κρίσεων, με έλεγχο των κρίσεων και σε αυτούς με μονήρη υποτροπή μετά από έλεγχο. Επειδή τα επίπεδα της Bcl-2 και της κασπάσης -9 στους πάσχοντες με έλεγχο των κρίσεων ήταν πολύ χαμηλότερα σε σύγκριση με εκείνων χωρίς έλεγχο, το αποτέλεσμα αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στο μεγάλο εύρος της τυπικής απόκλισης των ασθενών χωρίς έλεγχο. Στην ομάδα των ασθενών με μία υποτροπή μετά από προηγούμενο έλεγχο (16 περιπτώσεις) τα επίπεδα αμφοτέρων των Bcl-2 και κασπάσης-9 αυξήθηκαν απότομα και παράλληλα όταν μετρήθηκαν άπαξ στο χρονικό διάστημα 1-5 ημέρες μετά την υποτροπή και συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα επίπεδα ασθενών με έλεγχο των κρίσεων (χωρίς κρίση εκ του ιστορικού τα τελευταία 1,5 έως 6 χρόνια) που δεν παρουσίασαν υποτροπή (βλ. διάγραμμα 15.3 και 15.4).

Η κασπάση-9 θεωρείται η κανονική κασπάση της εσωτερικής, μιτοχονδριακής οδού της απόπτωσης [112]. Εξ' όσων γνωρίζουμε, αυτή η μελέτη είναι η πρώτη στην οποία περιγράφεται η συγκέντρωση της κασπάσης-9 στο αίμα σε ασθενείς με επιληψία, καθώς και μετά από μία υποτροπή, στον άνθρωπο. Περαιτέρω μελέτες με διαδοχικές μετρήσεις δειγμάτων θα προσφέρουν ενδεχομένως περισσότερες διευκρινίσεις σχετικά με πιθανό ρόλο της κασπάσης-9 σαν βιολογικό δείκτη υποτροπής. Ενεργοποίηση της κασπάσης -9 έχει εκφραστεί στους ιππόκαμπους ασθενών με μη ελεγχόμενη επιληψία κροταφικού λοβού [3] και επίσης σε κυτταρικές καλλιέργειες ιππόκαμπων ποντικών 24 ώρες μετά από σπασμούς [214, 216]. Μελέτες σε ανθρώπους πάσχοντες από χρόνια νευροεκφυλιστικά νοσήματα όπως η νόσος Parkinson και η πλάγια μυατροφική σκλήρυνση έδειξαν επίσης σημαντική αύξηση της κασπάσης-9 στο αίμα των ασθενών [217].

Δεν είναι ακόμη ξεκάθαρο εάν η Bcl-2 αντιπροσωπεύει μία πρωτεΐνη που απελευθερώνεται στο αίμα κατόπιν βλάβης του κεντρικού νευρικού συστήματος ή σαν αυξημένη γονιδιακή απάντηση [218]. Εν τούτοις η ταυτόχρονη αύξηση της Bcl-2 και της κασπάσης -9 στο αίμα μετά μία μονήρη υποτροπή στη μελέτη μας συνηγορεί υπέρ της ύπαρξης μιας ελεγχόμενης κυτταρικής ομοιόστασης στην επιληψία και προσφέρει στόχους για δυνητική νευροπροστατευτική θεραπεία [219,220].

17. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μελέτη αυτή συνηγορεί υπέρ της διαπίστωσης ότι τα επίπεδα της Bcl-2 αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης στο αίμα αποτελούν ένα δυνητικό διαγνωστικό βιολογικό δείκτη ενεργών σπασμών και επιληψίας σε παιδιά και εφήβους.

Η Bcl-2 στο αίμα είναι στατιστικά σημαντικός παράγων ο οποίος συνδέεται με την προσαύξηση της πιθανότητας πρόβλεψης του κινδύνου το παιδί να ανήκει στην ομάδα των πασχόντων.

Στη μελέτη μας δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά της Bcl-2 μεταξύ των γενικευμένων και των εστιακών κρίσεων. Υπάρχει πάντως στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων της Bcl-2 στο αίμα μεταξύ ορισμένων τύπων εστιακών επιληπτικών κρίσεων.

Τα επίπεδα της κασπάσης-9 δεν αποτελούν δυνητικό διαγνωστικό δείκτη στο αίμα παιδιών με επιληψία. Τα επίπεδα της κασπάσης-9 αυξάνονται ωστόσο απότομα στο αίμα πασχόντων με προηγούμενο έλεγχο των κρίσεων μετά από μία υποτροπή.

Η φαρμακευτική αγωγή δεν επηρεάζει τα επίπεδα της Bcl-2 και της κασπάσης-9 στο αίμα των ασθενών.

Επισημαίνουμε ότι αυτή είναι η πρώτη μελέτη στη βιβλιογραφία των επιπέδων της κασπάσης-9 στον άνθρωπο και θεωρούμε ότι είναι δυνατόν να προσφέρει στη συνεχιζόμενη διερεύνηση των ομάδων των περιφερικών βιολογικών δεικτών στην επιληψία.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη διερευνήσαμε τα επίπεδα της αντιαποπρωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 και της προαποπρωτικής κασπάσης-9 στον ορό του αίματος 118 παιδιών και εφήβων, εκ των οποίων 82 ασθενείς έπασχαν από ιδιοπαθή επιληψία και 36 ασθενείς είχαν εκδηλώσει ένα ή δύο πρώτα επεισόδια κρίσεων τον τελευταίο μήνα πριν την αιμοληψία. Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν βάσει του τύπου των κρίσεων, αριθμού κρίσεων, έλεγχου ή μη αυτών. Τα επίπεδα ορού αίματος στους ασθενείς συγκρίθηκαν με αυτά ομάδας 30 υγιών μαρτύρων και διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της Bcl-2 ($p=0,0001$) αλλά όχι της κασπάσης-9 ($p=0,987$). Για κάθε αύξηση της Bcl-2 κατά 1ng/ml πάνω από την τιμή 12,76 ng/ml (πάνω από δύο σταθερές αποκλίσεις από τη μέση τιμή της Bcl-2 στην ομάδα των μαρτύρων) η πιθανότητα του παιδιού να ανήκει στην ομάδα των ασθενών αυξάνεται κατά 12%. Τα επίπεδα της Bcl-2 στο αίμα αποτελούν συνεπώς ένα δυνητικό διαγνωστικό μοριακό βιολογικό δείκτη (βιοδείκτη) για τους ενεργούς σπασμούς και την επιληψία. Τετραπλάσια τιμή των επιπέδων της Bcl-2 στο αίμα διαπιστώθηκε στις γενικευμένες και στις εστιακές σύνθετες εξωκροταφικές κρίσεις σε σύγκριση με τους άλλους τύπους κρίσεων, αν και στατιστικά μη σημαντική η διαφορά λόγω του μεγάλου μεγέθους των τυπικών αποκλίσεων. Στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων της Bcl-2 αλλά όχι της κασπάσης-9 διαπιστώθηκε στη σύγκριση μεταξύ των εστιακών σύνθετων εξωκροταφικών κρίσεων και των εστιακών απλών κινητικών κρίσεων ($p=0,047$), όπως επίσης στη σύγκριση μεταξύ των εστιακών σύνθετων εξωκροταφικών κρίσεων και όλων των κροταφικών κρίσεων μαζί ($p=0,034$). Δε διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων Bcl-2 και κασπάσης-9 στον ορό του αίματος των ασθενών με το φύλο, ηλικία, διάρκεια επιληψίας, αριθμό κρίσεων ανά μήνα και συνολικό αριθμό κρίσεων ανεξαρτήτως διάρκειας.

Τα επίπεδα της κασπάσης-9 ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς με δύο ή περισσότερα επεισόδια κρίσεων το μήνα σε σύγκριση με εκείνους με ένα επεισόδιο τον μήνα ($p=0,048$). Μετά από υποτροπή κρίσεως (σε ασθενείς προηγουμένως υπό έλεγχο), τα επίπεδα των Bcl-2 και κασπάσης-9 αυξήθηκαν οξέως και παράλληλα σε σύγκριση με τους χωρίς έλεγχο κρίσεων ασθενείς. Δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της Bcl-2 και της κασπάσης-9 μεταξύ των ασθενών χωρίς έλεγχο των κρίσεων, με έλεγχο των κρίσεων και σε αυτούς με μονήρη υποτροπή μετά από έλεγχο. Δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ασθενών υπό και χωρίς φαρμακοθεραπεία ($p=0,170$ και $p=0,072$ αντίστοιχα).

ABSTRACT

This study investigates the blood serum levels of antiapoptotic Bcl-2 and proapoptotic caspase-9 proteins in 118 children and adolescents, of which 82 suffered from idiopathic epilepsy and 36 had, for the first time, one or two seizures in the last month before the blood sampling. Patients were categorized according to type, number of seizures, control of seizures. Mean serum levels of Bcl-2 and caspase-9 in patients were compared to those of 30 healthy controls and were found significantly higher for Bcl-2 ($p < 0,0001$) but not caspase-9 ($p = 0,987$). Data analysis showed that for every 1ng/ml of increased Bcl-2 above 12,76ng/ml (more than 2 standard deviations above mean value of Bcl-2 in control's group) there is a 12% higher possibility in the prediction for the child to be classified in the patient's group. Therefore Bcl-2 serum level can be regarded as a potential diagnostic molecular biomarker for epilepsy and active seizures. Higher mean serum levels of Bcl-2 and caspase-9 (fourfold) were observed in generalized seizures as well as in focal complex extratemporal seizures but there was no statistically significant difference compared to the other types of seizures, possibly due to the large size of standard deviations. Significantly increased levels of Bcl-2 but not caspase-9 were found in the focal complex extratemporal seizures compared to simple focal motor seizures ($p = 0,047$) and also in the focal complex extratemporal seizures compared to all types of temporals added together ($p = 0,034$). No correlations were found between Bcl-2 and caspase-9 serum levels concerning the gender, age, seizure duration, number of seizures per month and the total number of seizures independently of duration.

Serum levels of caspase-9 were statistically significantly increased in patients with two or more seizures per month compared to those with one seizure per month ($p=0,048$). After a single relapse (in previously controlled patients), Bcl-2 and caspase-9 serum levels were increased acutely and in parallel compared to controlled patients. There was no statistically significant difference of Bcl-2 and caspase-9 serum levels between uncontrolled patients, controlled patients and controlled single-relapse patients. Levels of Bcl-2 and caspase-9 presented with no significant difference between patients with and without treatment ($p=0,170$ and $p=0,072$ respectively).

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- AIF**= Παράγοντας ευόδωσης της απόπτωσης (Apoptosis Inducing Factor)
- APAF1**= Ενεργοποιημένος παράγοντας 1 προ-αποπτωτικής πρωτεάσης (apoptotic protease activating factor 1)
- ATM**= Αταξία-τηλεαγγειεκτασία κινάση (ataxia-telangiectasia mutated kinase)
- Bcl-2**= B-cell lymphoma 2
- CA**= Αμμώνιο κέρασ υπόκαμπου (Cornu Ammonis)
- Ca⁺⁺**= Ιόντα ασβεστίου
- CAD**= Ενδονουκλεάση ενεργοποιούμενη από την κασπάση (Caspase activated DNase)
- CARD**= Ομότυπος ενεργοποίησης και στρατολόγησης κασπάσης (Caspase Activation and Recruitment Domain)
- Chk-1** και **Chk-2**= Κινάση σημείου ελέγχου -1 και -2 κυτταρικού κύκλου (Checkpoint kinase -1 and -2)
- CHOP**= Παράγων μεταγραφής για την C/EBP ομόλογη πρωτεΐνη
- C.I**= Διάστημα εμπιστοσύνης
- cIAP1** και **cIAP2**= Κυτταρικός πρωτεϊνικός αναστολέας της απόπτωσης 1 και 2 (cellular Inhibitor of Apoptosis Protein)
- CRP**= C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
- DED**= Ομότυπος ενεργοποίησης κυτταρικού θανάτου (Death Effector Domain)
- DIABLO**= Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding protein with LOw pI (γνωστή και ως Smac)
- DISC**= Σύμπλεγμα σηματοδότησης θανάτου (Death Inducing Signaling Complex)
- DNA**= Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
- DNA-PKcs**= Εξαρτώμενη από το DNA πρωτεΐνη κινάση, καταλυτική υποενοότητα (DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit)

DR4 (TRAIL-R1)= Υποδοχέας θανάτου 4 (Death Receptor 4)

DSBs= Ρήξεις της διπλής έλικας (double strand breaks) του DNA

EA= Ενδοπλασματικό δίκτυο

ELISA=Ενζυμοσύνθετη ανοσορροφητική δοκιμασία (enzyme-linked immunosorbent assay)

ERAD= Endoplasmic- reticulum associated degradation

FADD= Fas associated death domain

FLIP= FLICE-inhibitory protein

GADD= Growth Arrest and DNA Damage (γονίδια)

HEΓ= Ηλεκτροεγκεφαλογράφημα

HMGB1= High Mobility Group Box-1

LTL= Έξω μοίρα κροταφικού λοβού (lateral temporal lobe)

Mcl-1= Myeloid cell leukemia protein 1

miRNA= μικρο- RNA (micro-RNA)

MTL= Έσω μοίρα κροταφικού λοβού (medial temporal lobe)

MTL-HS= Έσω μοίρα κροταφικού λοβού- σκλήρυνση ιππόκαμπου (medial temporal lobe- hippocampal sclerosis)

NMDA= N-μεθυλ-D-ασπαρτικό (N-methyl-D-aspartate)

PARP= Πολυμεράση της πολυ ADP- ριβόζης (Poly ADP-Ribose Polymerase)

PDI= Δισουλφιδική ισομεράση

PERK= PKR- όπως ενδοπλασματικό δίκτυο κινάση (PKR-like endoplasmic reticulum kinase)

PI3-K= Κινάση της 3-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (phosphatidylinositol-3 kinase)

PML= Σωματία προμυελωτικής λευχαιμίας (promyelocytic leukemia nuclear bodies)

PUMA= p53 up-regulated modulator of apoptosis

RIP1= Receptor Interacting Protein 1

RISC= RNA-Induced Silencing Complex

ROS= Ενεργά είδη οξυγόνου (reactive oxygen species)

RT= Θερμοκρασία δωματίου (room temperature)

SA-HRP= Στρεπταβιδίνη-χρενουπεροξειδάση (streptavidin- horseradish peroxidase)

Smac= Second mitochondria-derived activator of caspase (γνωστή και ως DIABLO)

SSBs= Ρήξεις της μονής έλικας (single strand breaks) του DNA

stdDev= Τυπική απόκλιση

TKE= Ταχύτητα καθίζησης ερυθρών

TNF= Παράγοντας νέκρωσης των όγκων (tumor necrosis factor)

UPR= Απάντηση των αδίπλωτων πρωτεϊνών (unfolded protein response)

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bell GS, Sander JW. The epidemiology of epilepsy: the size of the problem. *Seizure*. 2002;11SupplA:306-14; quiz 315-6.
2. Henshall DC, Clark RS, Adelson PD, Chen M, Watkins SC, Simon RP. Alterations in bcl-2 and caspase gene family protein expression in human temporal lobe epilepsy. *Neurology*. 2000;55(2):250-7.
3. Yamamoto A, Murphy N, Schindler CK, So NK, Stohr S, Taki W, Prehn JH, Henshall DC. Endoplasmic reticulum stress and apoptosis signaling in human temporal lobe epilepsy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006;65(3):217-25.
4. Bengzon J, Mohapel P, Ekdahl CT, Lindvall O. Neuronal apoptosis after brief and prolonged seizures. *Prog Brain Res*. 2002;135:111-9.
5. Fujikawa DG, Shinmei SS, Cai B. Seizure-induced neuronal necrosis: implications for programmed cell death mechanisms. *Epilepsia*. 2000;41(Suppl 6):S9-13.
6. Henshall DC, Simon RP. Epilepsy and apoptosis pathways. *J Cereb Flow Metab*. 2005;25(12):1557-72.
7. Polster BM, Fiskum G. Mitochondrial mechanisms of neural cell apoptosis. *J Neurochem*. 2004;90(6):1281-1289.
8. Liou AK, Clark RS, Henshall DC, Yin XM, Chen J. To die or not to die for neurons in ischemia, traumatic brain injury and epilepsy: a review on the stress-activated signaling pathways and apoptotic pathways. *Prog Neurobiol*. 2003;69(2):103-142.
9. Youle R, Strasser A. The Bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(1):47-59.
10. Iłżecka J. Serum caspase-9 levels are increased in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Sci*. 2012;33(4):825-9.
11. Chang BS, Lowenstein DH. Epilepsy. *New Engl J Med*. 2003;349:1257-66.

12. Panayiotopoulos C.P. Absence epilepsies. In Engel J Jr, Pedley TA (eds). *Epilepsy a comprehensive textbook*, Philadelphia: Lippincott-Raven. 1997: 2327-46.
13. Commission on Classification and Terminology of the International League against Epilepsy. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia* 1981;22(4):489-501.
14. Benbadis SR. Epileptic seizures and syndromes. *Neurol Clin.* 2001;19(2): 251-70.
15. Kostopoulos GK. Involvement of the thalamocortical system in epileptic loss of consciousness. *Epilepsia.* 2001;42(Suppl 3):13-9.
16. Pitkänen A, Lukasiuk K. Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *Lancet Neurol.* 2011;10(2):173-86.
17. Pitkänen A, Engel J Jr. Past and present definitions of epileptogenesis and its biomarkers. *Neurotherapeutics.* 2014;11(2):231-241.
18. Lockshin R, Zakeri Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2001;2(7):545-550.
19. Lockshin RA, Williams CM. Programmed cell death—I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the Pernyi silkmoth. *J Insect Physiol.* 1965;11:123-33.
20. Degterev A, Yuan J. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(5):378-90.
21. Kroemer G, Galluzi L, Vandenabeele R et al. Classification of cell death. Recommendations of the Nomenclature Committee of Cell Death. *Cell Death Differ.* 2009;16:3-11.
22. Samali A. Apoptosis a mapped path to cell death. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 2007;11(6):1212-1213.
23. Samali A, Zhivotovsky B, Jones D, Nagata S, Orrenius S. Apoptosis cell death defined by caspase activation. *Cell Death Differ.* 1999;6(6):495-6.

24. Ashkenazi A. Targeting the extrinsic apoptotic pathway in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008;19(3-4):325-331.
25. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med.* 2000;6(5):513-519.
26. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science.* 1997;275(5303):1132 -1136.
27. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev. Genet.* 2009;43:67-93.
28. Eskelinen EL. New insights into the mechanisms of macroautophagy in mammalian cells. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2008;266:207-247.
29. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature.* 1999;402(6762):672-6.
30. Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A. Cellular stress responses: Cell Survival and Cell Death. *International Journal of Cell Biology.* 2010;2010: 214074. doi:10.1155/2010/214074.
31. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci.* 2007;32(1):37-43.
32. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 1995;146(1):3–15.
33. Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Krysko DV, Festjens N, Vandenabeele P. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Curr Mol Med.* 2008;8(3):207-20.
34. Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:739-89.
35. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(7):519-29.

36. Cullinan SB, Zhang D, Hannick M, Arvisais E, Kaufman RJ, Diehl JA. Nrf2, is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol Cell Biol.* 2003;23(20):7198-209.
37. Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Davè UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell.* 2000;6(6):1355-1364.
38. Cox JS, Walter P. A novel mechanism for regulating activity of transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell.* 1996;87(3):391-404.
39. Park J, Liu AY. JNK phosphorylates the HSF1 transcriptional activation domain: role of JNK in the regulation of the heat shock response. *J Cell Biochem.* 2001;82(2):326-38.
40. Smith DJ, Ng H, Kluck RM, Nagley P. The mitochondrial gateway to cell death. *IUBMB Life.* 2008;60(6):383-9.
41. Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P et al. ER stress triggers apoptosis by activating BH-3 only protein Bim. *Cell.* 2007;129(7):1337-49.
42. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(8):1343-74.
43. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovski B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:143-83.
44. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. *J Neurochem.* 2006;97(6):1634-58.
45. Nishitoh H, Kadowaki H, Nagai A, Maruyama T, Yokota T et al. ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress–and ASK1– dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes Dev.* 2008;22(11):1451-64.
46. Steckley D, Karajgikar M, Dale LB, Fuerth B, Swan P, Drummond-Main C et al. Puma is a dominant regulator of oxidative stress induced Bax activation and neuronal apoptosis. *J. Neurosci.* 2007;27(47):12989-99.
47. Gill MB, Perez-Polo JR. Hypoxia ischemia- mediated cell death in neonatal rat brain. *Neurochem Res.* 2008;33(12):2379-89.

48. Rizzuto R, Pozzan T. Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev.* 2006;86(1):369-408.
49. Moroni F. Poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) and postischemic brain damage. *Curr Opin Pharmacol.* 2008;8(1):96-103.
50. Mitsios N, Saka M, Krupinski J, Penucci R, Sanfeliu C, Wang Q, Rubio F, Gaffney J et al. A microarray study of gene and protein regulation in human and rat brain following middle cerebral artery occlusion. *BMC Neurosci.* 2007;8:93.
51. Nakka VP, Gusain A, Mehta SL, Raghurir R. Molecular mechanisms of apoptosis in cerebral ischemia: multiple neuroprotective opportunities. *Mol Neurobiol.* 2008;37(1):7-38.
52. Roos WP, Kaina B. DNA damage- induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med.* 2006;12(9):440-50.
53. Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology.* 2003;193(1-2):3-34.
54. Khanna KK, Lavin MF, Jackson SP, Mulhern TD. ATM a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell Death Differ.* 2001;8(11):1052-65.
55. Ashkenazi A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008;19(3-4):325-31.
56. Valerie K, Povirk LF. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene.* 2003;22(37):5792-812.
57. Tomimatsu N, Tahimic CG, Otsuki A et al. KU70/80 modulates ATM and ATR signaling pathways in response to DNA double strand breaks. *J Biol Chem.* 2007;282(14):10138-45.
58. Stucki M, Jackson SP. Gamma H2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA repair (Amst).* 2006;5(5):534-43.
59. Bekker-Jensen S, Lucas C, Kitagawa R, Melander F, Kastan M, Bartek J, Lukas J. Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J Cell Biol.* 2006;173(2):195-206.

60. Bernardi R, Pandolfi PP. Structure, dynamics and function of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(12):1006-16.
61. Dellaire G, Ching RW, Ahmed K et al. Promyelocytic nuclear bodies behave as DNA damage sensors whose response to DNA double-strand breaks is regulated by NBS1 and the kinases ATM, Chk2 and ATR. *J Cell Biol.* 2006;175(1):55-66.
62. Wang XW, Tseng A, Ellis NA, Spillare EA, Linke SP, Robles AI et al. Functional interaction of p53 and BLM DNA helicase in apoptosis. *J Biol Chem.* 2001;276(35):32948-55.
63. Ishov AM, Sotnikov AG, Negorev D, Vladimirova OV, Neff N, Kamitani T, Yeh ET, Strauss JF 3rd, Maul GG. PML is critical for ND 10 formation and recruits PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J Cell Biol.* 1999;147(2):221-34.
64. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* 2001;411(6835):366-74.
65. Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis- the p53 network. *J Cell Sci.* 2003; 116(Pt 20):4077-85.
66. Rosemary Siafakas A, Richardson DR. Growth arrest and DNA damage-45 alfa (GADD45alpha). *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(5):986-9.
67. Bálint EE, Vousden KH. Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein. *Br J Cancer.* 2001;85(12):1813-23.
68. Gudkov AV. Converting p53 from a killer to a healer. *Nat Med.* 2002;8:1196-1198.
69. Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell.* 2003;11(3):577-90.
70. Braak H, Braak E, Yilmazer D, Bohl J. Functional anatomy of human hippocampal formation and related structures. *J Child Neurol.* 1996;11(4):265-75.

71. Coulter DA, Carlson GC. Functional regulation of the dentate gyrus by GABA-mediated inhibition. *Prog Brain Res.* 2007;163:235-43.
72. Ewell LA, Jones MV. Frequency-tuned distribution of inhibition in the dentate gyrus. *J Neurosci.* 2010;30(38):12597-607.
73. Ang CW, Carlson GC, Coulter DA. Hippocampal CA1 circuitry dynamically gates direct cortical inputs preferentially at theta frequencies. *J Neurosci.* 2005;25(42):9567-80.
74. Wu K, Leung LS. Increased dendritic excitability in hippocampal CA1 in vivo in the kainic acid model of temporal lobe epilepsy; a study using current source density analysis. *Neuroscience.* 2003;116(2):599-616.
75. Jackson GD, Chambers BR, Berkovic SF. Hippocampal sclerosis: development in adult life. *Dev Neurosci.* 1999;21(3-5):207-14.
76. DeGiorgio CM, Tomiyasu U, Gott PS, Treiman DM. Hippocampal pyramidal cell loss in human status epilepticus. *Epilepsia* 1992;33(1):23-7.
77. Sloviter RS. Epileptic brain damage in rats induced by sustained electrical stimulation of the perforant path. I. Acute electrophysiological and light microscopic studies. *Brain Res Bull.* 1983;10(5):675-697.
78. Represa A, Ben-Ari Y. Kindling is associated with the formation of novel mossy fiber synapses in the CA3 region. *Exp Brain Res.* 1992;92(1):69-78.
79. Kondratyev A, Gale K. Temporal and spatial patterns of DNA fragmentation following focally or systemically-evoked status epilepticus in rats. *Neurosci Lett.* 2001;310(1):13-6.
80. Choi DW. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol.* 1992;23(9):1261-76.
81. Orrenius S, Nicotera P. The calcium ion and cell death. *J Neural Transm Suppl.* 1994;43:1-11.
82. Pal S, Sombati S, Limbrick DD Jr, DeLorenzo RJ. In vitro status epilepticus causes sustained elevation of intracellular calcium levels in hippocampal neurons. *Brain Res.* 1999;851(1-2):20-31.

83. Lado FA, Laureta EC, Moshè SL. Seizure-induced hippocampal damage in the mature and immature brain. *Epileptic Disord.* 2002;4(2):83-97.
84. Shinnar S, Berg AT, Moshè L et al. Risk of seizure recurrence following a first unprovoked seizure in childhood: a prospective study. *Pediatrics.* 1990;85(6):1076-85.
85. VanLandingham KE, Heinz ER, Cavazos JE, Lewis DV. Magnetic resonance imaging evidence of hippocampal injury after prolonged focal febrile convulsions. *Ann Neurol.* 1998;43(4):413-26.
86. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239-57.
87. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9(3):231-41.
88. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980;68:251-306.
89. Ellis HM, Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell.* 1986;44(6):817-29.
90. Hengartner MO, Horvitz HR. *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell.* 1994;76(4):665-76.
91. Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Caspases— an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2008;151(1):10-27.
92. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Ann Rev Biochem.* 1999;68:383-424.
93. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science.* 1998;281(5381):1312-6.
94. Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene.* 2003;22(53):8543-67.

95. Kumar S. The apoptotic cysteine protease CPP32. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997;29(3):393-6.
96. Nunez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene.* 1998;17(25):3237-45.
97. Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ.* 2017;24(8):1380-1389.
98. Salvesen GS. Caspases and apoptosis. *Essays Biochem.* 2002;38:9-19.
99. Creagh EM, Martin SJ. Caspases: cellular demolition experts. *Biochem Soc Trans.* 2001;29(Pt 6):696-702.
100. Wang J, Lenardo MJ. Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. *J Cell Sci.* 2000;113(Pt 5):753-7.
101. Roy S, Bayly CI, Gareau Y, Houtzager VM, Kargman S et al. Maintenance of caspase-3 proenzyme dormancy by an intrinsic “safety catch” regulatory tripeptide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(11):6132-37.
102. Stennicke HR, Salversen GS. Catalytic properties of the caspases. *Cell Death Differ.* 1999;6(11):1054-9.
103. Zhivotosky B. Caspases: the enzymes of death. *Essays Biochem.* 2003;39:25-40.
104. Shi Y. Caspase activation: revisiting the induced proximity model. *Cell* 2004;117(7):855-8.
105. Donepudi M, Grütter MG. Structure and zymogen activation of caspases. *Biophys Chem.* 2002;101-102:145-53.
106. Vaculova A, Zhivotovsky B. Caspases: determination of their activities in apoptotic cells. *Methods Enzymol.* 2008;442:157-81.
107. Chan SL, Mattson MP. Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and death. *J Neurosci Res.* 1999;58(1):167-90.

108. Chai J, Wu Q, Shiozaki E, Srinivasula SM, Alnemri ES, Shi Y. Crystal structure of a procaspase-7 zymogen: mechanisms of activation and substrate binding. *Cell*. 2001;107(3):399-407.
109. Wei Y, Fox T, Chambers SP, Sintchak J, Coll JT, Gollec JM, Swenson L, Wilson KP, Charifson PS. The structures of caspases -1, -3, -7 and -8 reveal the basis for substrate and inhibitor selectivity. *Chem Biol*. 2000;7(6):423-32.
110. Renatus M, Stennicke HR, Scott FL, Liddington RC, Salvesen G. Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(25):14250-5.
111. Li P, Zhou L, Zhao T, Liu X, Zhang P, Liu Y, Zheng X, Li Q. Caspase 9: structure, mechanisms and clinical application. *Oncotarget*. 2017;8(14):23996-24008.
112. Kuida K. Caspase 9. *Int J Biochem Cell Biol*. 2000;32(2):121-4.
113. Rodriguez J, Lazebnik Y. Caspase 9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev*. 1999;13(24):3179-3184.
114. Reubold TF, Wohlgemuth S, Eschenburg S. Crystal structure of full-length Apaf-1: how the death signal is relayed in the mitochondrial pathway of apoptosis. *Structure*. 2011;19(8):1074-1083.
115. Würstle ML, Laussmann MA, Rehm M. The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome. *Exp Cell Res*. 2012;318(11):1231-20.
116. Yuan S, Yu X, Asara JM, Heuser JE, Ludtke SJ, Akey CW. The holo-apoptosome: activation of procaspase-9 and interactions with caspase-3. *Structure*. 2011;19(8):1084-96.
117. Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem*. 1998;273(5):2926-30.

118. Cowling V, Downward J. Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c– induced apoptosis pathway: absolute requirement for removal of caspase -6 prodomain. *Cell Death Differ.* 2002;9(10):1046-56.
119. Chun HJ, Zheng L, Ahmad M, Wang J, Speirs CK et al. Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature.* 2002;419(6905):395-9.
120. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6 and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem.* 2001;276(10):7320-26.
121. Le DA, Wu Y, Huang Z, Matsushita K, Plesnila N, Augustinack JC et al. Caspase activation and neuroprotection in caspase-3-deficient mice after in vivo cerebral ischemia and in vitro oxygen glucose deprivation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(23):15188-93.
122. Marsden VS, O'Connor L, O'Reilly LA, Silke J, Metcalf D et al. Apoptosis initiated by Bcl-2– regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf -1/caspase -9 apoptosome. *Nature.* 2002;419(6907):634-637.
123. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the Bcl-23 gene in human follicular lymphoma. *Science.* 1985;228(4706):1440-1443.
124. Cory S, Adams JM. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(9):647-56.
125. Henshall DC, Engel T. Contribution of apoptosis-associated signaling pathways to epileptogenesis: lessons from Bcl-2 family knockouts. *Front Cell Neurosci.* 2013;7:110.
126. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(1):47-59.
127. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Eng J Med.* 2009;361(16):1570-1583.
128. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell.* 2004;116(2):205 -19.

129. Galluzi L, Blomgren K, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(7):481-94.
130. Kuwana T, Mackey M, Perkins G et al. Bid, Bax and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*. 2002;111(3):331-42.
131. Demarex N, Distelhorst C. *Cell Biology*. Apoptosis--the calcium connection. *Science*. 2003;300(5616):65-7.
132. Peter ME, Krammer PH. The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ*. 2003;10(1):26-35.
133. Wilson NS, Dixit V, Askenazi A. Death receptor signal transducers; nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat Immunol*. 2009;10(4):348-55.
134. Walczak H, Sprick MR. Biochemistry and function of the DISC. *Trends Biochem Sci*. 2001;26(7):452-453.
135. Boatright KM, Renatus M, Scott FL et al. A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell*. 2003;11(2):529-541.
136. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 1998;94(4):491-501.
137. Sprick MR, Walczak H. The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Acta*. 2004;1644(2-3):125-32.
138. Krueger A, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2001;21(24):8247-54.
139. Tsujimoto Y. Bcl-2 family of proteins: life-or-death switch in mitochondria. *Biosci Rep*. 2002;22(1):47-58.
140. Engel T, Henshall DC. Apoptosis, Bcl-2 family proteins and caspases: the ABCs of seizure-damage and epileptogenesis?. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2009;1(2):97-115.

141. Duprez L, Wirawan E, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect.* 2009;11(13):1050-62.
142. Wyllie AH. "Where, O death is thy sting?" A brief review of apoptosis biology. *Mol Neurobiol.* 2010;42(1):4-9.
143. Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem.* 2011;351(1-2):41-58.
144. Schellenberg B, Wang P, Keeble JA et al. Bax exists in a dynamic equilibrium between the cytosol and mitochondria to control apoptotic priming. *Mol Cell.* 2013;49(5):959-971.
145. Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M et al. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ.* 2000;7(12):1166-73.
146. Shamas-Din A, Bindner S, Chi X et al. Distinct lipid effects on tBid and Bim activation of membrane permeabilization by pro-apoptotic Bax. *Biochem J.* 2015;467(3):495-505.
147. Galluzzi L, Blomgren K, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10(7):481-94.
148. Renault TT, Manon S. Bax: Addressed to kill. *Biochimie.* 2011;93(9):1379-91.
149. Henshall DC, Bonislawski SL, Skradski SL, Araki T et al. Formation of the Apaf-1/cytochrome c complex precedes activation of caspase-9 during seizure-induced neuronal death. *Cell Death Differ.* 2001;8(12):1169-81.
150. Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(5):405-13.
151. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(6):401-10.
152. Shiozaki EN, Chai J, Rigotti DJ, Riedl SJ, Li P et al. Mechanisms of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell.* 2003;11(2):519-27.

153. Graham SH, Chen J, Stetler RA, Zhu RL, Jin KL, Simon RP. Expression of the proto-oncogene bcl-2 is increased in the rat brain following kainate induced seizures. *Restor Neurol Neurosci*. 1996;9(4):243-250.
154. Hensall DC, Skradski SL, Lan JQ, Ren T, Simon RP. Increased Bcl-w expression following focally evoked limbic seizures in the rat. *Neurosci Lett*. 2001;305(3):153-6.
155. Murphy B, Dunleavy M, Shinoda S, Schindler C, Meller R et al. Bcl-w protects hippocampus during experimental status epilepticus. *Am J Pathol*. 2007;171(4):1258–1268.
156. Mori M, Burgess DL, Gefrides LA, Foreman PJ et al. Expression of apoptosis inhibitor protein Mc11 linked to neuroprotection in CNS neurons. *Cell Death Differ*. 2004;11(11):1223-33.
157. Ananth C, Thameem Dheen S, Gopalakrishnakone P, Kaur C. Domoic acid-induced neuronal damage in the rat hippocampus: changes in apoptosis related genes (bcl-2, bax, caspase-3) and microglial response. *J Neurosci Res*. 2001;66(2):177-90.
158. Engel T, Caballero-Caballero A, Schindler CK, Plesnila N, Strasser A, Prehn JH, Hensall DC. BH3-only protein Bid is dispensable for seizure-induced neuronal death and the associated nuclear accumulation of apoptosis-inducing factor. *J Neurochem*. 2010;115(1):92-101.
159. Shinoda S, Shindler C, Meller R, So NK, Araki T, Yamamoto A et al. Bim regulation may determine hippocampal vulnerability after injurious seizures and in the temporal lobe. *J Clin Invest*. 2004;113(7):1059-68.
160. Engel T, Murphy BM, Hatazaki S, Jimenez-Mateos EM et al. Reduced hippocampal damage and epileptic seizures after status epilepticus in mice lacking proapoptotic Puma. *FASEB J*. 2010;24(3):853-61.
161. Henshall DC, Meldrum BS. Cell death and survival mechanisms after single and repeated brief seizures” in “Jasper’s Basic Mechanisms of the

Epilepsies (4th ed.)”: Chapter 28. National Center for Biotechnology Information (US);2012.

162. D’Amelio M, Cavallucci V, Cecconi F. Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death Differ.* 2010;17(7):1104-14.

163. Nagley P, Higgins GC, Atkin JD, Beart PM. Multifaceted deaths orchestrated by mitochondria in neurones. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1802(1):167-85.

164. Beart PM, Lim ML, Chen B, Diwakarla S, Mercer LD, Cheung NS, Nagley P. Hierarchical recruitment by AMPA but not staurosporine of pro-apoptotic mitochondrial signaling in cultured cortical neurons: evidence for caspase-dependent/independent cross-talk. *J Neurochem.* 2007;103(6):2408-27.

165. Cheung NS, Pascoe CJ, Giardina SF, John CA, Beart PM. Micromolar L-glutamate induces extensive apoptosis in an apoptotic-necrotic continuum of insult-dependent, excitotoxic injury in cultured cortical neurones. *Neuropharmacology.* 1998;37(10-11):1419-29.

166. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science.* 1992;258(5090):1898-902.

167. Nicotera P, Melino G. Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene.* 2004;23(16):2757-65.

168. Melino G, Bernassola F, Knight RA, Corasaniti MT, Nistico G, Finazzi – Agro A. S-nitrosylation regulates apoptosis. *Nature.* 1997;388(6641):432-3.

169. Vieira HL, Belzacq AS, Haouzi D, Bernassola F, Cohen I, Jacotot E, Ferri KF, EL Hamel C, Barte LM, Melino G et al. The adenine nucleotide translocator: a target of nitric oxide, peroxynitrite and 4-hydroxynonenal. *Oncogene.* 2001;20(32):4305-16.

170. Bolanos JP, Heales SJ, Land JM, Clark JB. Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility on neurones and astrocytes in primary culture. *J Neurochem.* 1995;64(5):1965-72.

171. Trotman LC, Alimondi A, Scaglioni PP, Koutcher JA et al. Identification of a tumour suppressor network opposing nuclear Akt function. *Nature*. 2006;441(7092):523-7.
172. Sloviter RS. Hippocampal epileptogenesis in animal models of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: the importance of the ‘latent period’ and other concepts. *Epilepsia*. 2008;49 Suppl 9:85-92.
173. Pitkänen A, Nissinen J, Nairismägi J, Lukasiuk K, Gröhn OH et al. Progression of neuronal damage after status epilepticus and during spontaneous seizures in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Prog Brain Res*. 2002;135:67-83.
174. Jirsa VK, Stacey WC, Quilichini PP, Ivanov AI, Bernard C. On the nature of seizure dynamics. *Brain* 2014;137(Pt 8):2210-30.
175. Dudek FE, Staley KJ. The time course of acquired epilepsy: implications for therapeutic intervention to suppress epileptogenesis. *Neurosci Lett*. 2011;497(3):240-6.
176. Zhang W, Yamawaki R, When X et al. Surviving hilar somatostatin interneurons enlarge, sprout axons, and form new synapses with granule cells in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*. 2009;29(45):14247-56.
177. Löscher W, Hirsch LJ, Schmidt D. The enigma of the latent period in the development of symptomatic acquired epilepsy- Traditional view versus new concepts. *Epilepsy Behav*. 2015;52(Pt A):78-92.
178. Mori A, Yokoi I, Noda Y, Willmore LJ. Natural antioxidants may prevent posttraumatic epilepsy: a proposal based on experimental animal studies. *Acta Med Okayama*. 2004;58(3):111-8.
179. Narkilahti S, Nissinen J, Pitkänen A. Administration of caspase 3 inhibitor during and after status epilepticus in rat: effect on neuronal damage and epileptogenesis. *Neuropharmacology*. 2003;44(8):1068-88.

180. Phillips RG, Lawrence MS, Ho DY, Sapolsky RM. Limitations in the neuroprotective potential of gene therapy with Bcl-2. *Brain Res.* 2000;859(2):2000;202–6.
181. Mani R, Pollard J, Dichter M. Human clinical trials in antiepileptogenesis. *Neurosci Lett.* 2011;497(3):251-256.
182. Pitkänen A, Löscher W, Vezzani A, Becker AJ, Simonato M, Lukasiuk K et al. Advances in the development of biomarkers for epilepsy. *Lancet Neurol.* 2016;15(8):843-856.
183. Walker LE, Janigro D, Heinemann U, Riikonen R, Bernard C, Patel M. WONOEP appraisal: Molecular and cellular biomarkers for epilepsy. *Epilepsia.* 2016;57(9):1354-62.
184. Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ. The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol.* 2011;7(1):31-40.
185. Shimada T, Takemiya T, Sugiura H, Yamagata K. Role of inflammatory mediators in the pathogenesis of epilepsy. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:901902.
186. Pulli B, Chen JW. Imaging Neuroinflammation- from Bench to Bedside. *J Clin Cell Immunol.* 2014;5.pii:226.
187. Brooks-Kayal AR, Raol YH, Russek SJ. Alteration of Epileptogenesis Genes. *Neurotherapeutics.* 2009;6(2):312-8.
188. Jimenez-Mateos EM. Role of MicroRNAs in innate neuroprotection mechanisms due to preconditioning of the brain. *Front Neurosci.* 2015;9:118.
189. O’Carroll D, Schaefer A. General principles of miRNA biogenesis and regulation in the brain. *Neuropharmacology.* 2013;38(1):39-54.
190. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell.* 2004;116(2):281-97.
191. Cattani AA, Allene C, Seifert V, Rosenow F, Henshall DC, Freiman TM: Involvement of microRNAs in epileptogenesis. *Epilepsia.* 2016;57(7):1015-26.

192. Kobow K, Blümcke I. Epigenetic mechanisms in epilepsy. *Prog Brain Res.* 2014;213:279-316.
193. Mc Kiernan RC, Jimenez-Mateos EM, Bray I et al. Reduced mature microRNA levels in association with dicer loss in human temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *PLoS One.* 2012;7(5):e35921.
194. Bot AM, Debski KJ, Lukasiuk K. Alterations in miRNA levels in the dentate gyrus in epileptic rats. *PLoS One.* 2013;8(10):e76051.
195. Henshall DC, Hamer HM, Pasterkamp RJ, Goldstein DB et al. MicroRNAs in epilepsy: pathophysiology and clinical utility. *Lancet Neurol.* 2016;15(13):1368-1376.
196. McClelland S, Brennan GP, Dubè C et al. The transcription factor NRSF contributes to epileptogenesis by selective repression of a subset of target genes. *Elife.* 2014;3:e01267.
197. Ren L, Zhu R, Li X. Silencing miR-181a produces neuroprotection against hippocampus neuron cell apoptosis post-status epilepticus in a rat model and in children with temporal lobe epilepsy. *Genet Mol Res.* 2016;15(1):doi:10.4238/gmr.15017798.
198. Kan AA, van Erp S, Derijck AA, de Wit M et al. Genome-wide microRNA profiling of human temporal lobe epilepsy identifies modulators of the immune response. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(18):3127-45.
199. Sano T, Reynolds JP, Jimenez-Mateos EM, Matsushima S, Taji W, Henshall DC. MicroRNA-34a upregulation during seizure-induced neuronal death. *Cell Death Dis.* 2012;3:e287.
200. McKiernan RC, Jimenez-Mateos EM, Sano T et al. Expression profiling the microRNA response to epileptic preconditioning identifies miR-184 as a modulator of seizure-induced neuronal death. *Exp Neurol.* 2012;237(2):346-54.
201. Hu K, Xie Y, Zhang C, et al. 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.* 2012;13:115.

202. Jimenez-Mateos EM, Engel T, Merino-Serrais P et al. Antagomirs targeting microRNA-134 increase hippocampal pyramidal neuron spine volume in vivo and protect against pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Struct Funct.* 2015;220(4):2387-99.

203. Lee ST, Jeon D, Chu K et al. Inhibition of miR-203 reduces spontaneous recurrent seizures in mice. *Mol Neurobiol.* 2017;54(5):3300-3308.

204. Wang J, Yu JT, Tan L, Tian Y, Ma J, Tan CC, Wang HF et al. Genome-wide circulating microRNA expression profiling indicates biomarkers for epilepsy. *Sci Rep.* 2015;5:9522.

205. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia.* 1989;30(4):389-99.

206. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J 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(4):676-85.

207. Boon PAJM. The epilepsies, seizures, syndromes and management, based on the ILAE classification and practice parameter guidelines. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006;77(9):1102.

208. Kilany A, Raouf ER, Gaber AA, Aloush TK, Aref HA, Anwar M, Henshall DC, Abdulghani MO. Elevated serum Bcl-2 in children with temporal lobe epilepsy. *Seizure.* 2012;21(4):250-3.

209. Chen J, Graham SH, Nakayama M, Zhu RL, Jin K, Stetler RA, Simon RP. Apoptosis repressor genes Bcl-2 and Bcl-x-long are expressed in the rat brain following global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997;17(1):2-10.

210. El-Hodhod MA, Tomoum HY, Abd Al-Aziz MM, Samaan SM. Serum Fas and Bcl-2 in patients with epilepsy. *Acta Neurol Scand.* 2006;113(5):315-21.

211. Bertram EH. Neuronal circuits in epilepsy: do they matter?. *Exp Neurol.* 2013;244:67-74.
212. Bertram EH. Extratemporal lobe circuits in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2014;38:13-8.
213. Mathern GW, Babb TL, Mischel PS, Vinters HV, Pretorius JK, Leite JP, Peacock WJ. Childhood generalized and mesial temporal epilepsies demonstrate different amounts and patterns of hippocampal neuron loss and mossy fibre synaptic reorganization. *Brain.* 1996;119(Pt3):965-87.
214. Lopez-Meraz ML, Niquet J, Wasterlain CG. Distinct caspase pathways mediate necrosis and apoptosis in subpopulations of hippocampal neurons after status epilepticus. *Epilepsia.* 2010;51 Suppl 3:56-60.
215. Peng SJ, Harnod T, Tsai JZ, Ker MD, Chiou JC, Chiueh H et al. Evaluation of subcortical grey matter abnormalities in patients with MRI-negative cortical epilepsy determined through structural and tensor magnetic resonance imaging. *BMC Neurol.* 2014;14:104.
216. Meller R, Clayton C, Torrey DJ, Schindler CK, Lan JQ, Cameron JA, Chu XP, et al. Activation of the caspase 8 pathway mediates seizure-induced cell death in cultured hippocampal neurons. *Epilepsy Res.* 2006;70(1):3-14.
217. Blandini F, Sinforiani E, Pacchetti C, Samuele A, Bazzini E et al. Peripheral proteasome and caspase activity in Parkinson disease and Alzheimer disease. *Neurology.* 2006;66(4):529-34.
218. Tang Y, Nee AC, Lu A, Ran R, Sharp FR. Blood genomic expression profile for neuronal injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003;23(3):310-9.
219. Rideout HJ, Stefanis L. Caspase inhibition: a potential therapeutic strategy in neurological diseases. *Histol Histopathol.* 2001;16(3):895-908.
220. Hamed SA. The multimodal prospects for neuroprotection and disease modification in epilepsy: relationship to its challenging neurobiology. *Restor Neurol Neurosci.* 2010;28(3):323-48.