



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΩΝ  
ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ  
ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D ΣΤΗ ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ**

**ΣΤΥΛΙΑΝΟΣ Π.ΠΑΠΑΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ  
ΙΑΤΡΟΣ ΝΕΥΡΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2023**



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



**Ημερομηνία αίτησης του κ. Παπακωνσταντίνου Στυλιανού:** 18/10/2007

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** Γ.Σ. αριθμ. 619α/30-10-2007

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπουσα:

Πελίδου Συγκλητή-Ερριέττα, Επίκουρη Καθηγήτρια Νευρολογίας

Μέλη:

Κυρίτσης Αθανάσιος, Καθηγητής Νευρολογίας

Δασκαλόπουλος Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Πνευμονολογίας

**Ημερομηνία ορισμού θέματος:** 28-02-2008

«Μελέτη της διαταραχής ύπνου σε ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση και μικροαγγειοπάθεια εγκεφάλου»

**Ημερομηνία αλλαγής θέματος:** 12-09-2008

«Μελέτη της βιταμίνης D και της οστεοπόρωσης σε ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση»

**Ημερομηνία ανασυγκρότησης Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** Γ.Σ. αριθμ. 644α/23-09-2008

Επιβλέπουσα:

Πελίδου Συγκλητή-Ερριέττα, Επίκουρη Καθηγήτρια Νευρολογίας

Μέλη:

Κυρίτσης Αθανάσιος, Καθηγητής Νευρολογίας

Γεωργίου Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας

**Ημερομηνία ανασυγκρότησης Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** Γ.Σ. αριθμ. 960<sup>α</sup>/21-04-2021

Επιβλέπων:

Κυρίτσης Αθανάσιος, Καθηγητής Νευρολογίας

Μέλη:

Γιαννόπουλος Σωτήριος, Καθηγητής Νευρολογίας-Νευροψυχολογίας του ΕΚΠΑ

Αλεξίου Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Νευροχειρουργικής

**Ημερομηνία τροποποίησης τίτλου θέματος:** Γ.Σ. αριθμ. 995<sup>α</sup>/25-1-2022

«Πολυμορφισμοί του γονιδίου της βιταμίνης D στην πολλαπλή σκλήρυνση»

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 1043<sup>α</sup>/14-02-2023**

1. Κυρίτσης Αθανάσιος, Ομότιμος Καθηγητής Νευρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Γιαννόπουλος Σωτήριος, Καθηγητής Νευρολογίας-Νευροψυχολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ
3. Αλεξίου Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Νευροχειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Φωτόπουλος Ανδρέας, Ομότιμος Καθηγητής Πυρηνικής Ιατρικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Ράγκος Βασίλειος, Καθηγητής Γναθοπροσωπικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου



Ιωαννίνων

6. Γαλάνη Βασιλική, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Σιόκα Χρύσα, Επίκουρη Καθηγήτρια Πυρηνικής Ιατρικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 09-06-2023

Ιωάννινα 26-06-2023

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Σπυρίδων Κονιτσιώτης**

Καθηγητής Νευρολογίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

**ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ**





# Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....	1
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	3
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	5
ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ .....	7
ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ.....	9
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ .....	11
ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ.....	13
ΠΟΡΕΙΑ ΝΟΣΟΥ .....	15
ΔΙΑΓΝΩΣΗ .....	19
ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΗΡΙΑΣ ΜΕ ΤΗΝ ΚΛΙΜΑΚΑ EDSS (EXPANDED DISABILITY STATUS SCALE) .....	21
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ-ΦΥΛΟΥ- ΟΣΤΙΚΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ .....	23
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ- ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗΣ ΑΓΩΓΗΣ- ΟΣΤΙΚΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ .....	25
ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D .....	31
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	33
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	35
ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	37
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ .....	43
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	45
ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	49
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	51
ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ .....	53
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	55
ABSTRACT .....	57
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	59



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η διατριβή που ακολουθεί είναι έργο πολλών ανθρώπων, όπως κάθε πνευματικό πόνημα. Κλινικοί νευρολόγοι, πυρηνικοί ιατροί, μοριακοί γενετιστές, στατιστικολόγοι υπήρξαν αρωγοί του γράφοντος στην ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Σιόκα Χρύσα η επιμονή και η υπομονή της οποίας οδήγησαν στη συλλογή και οργάνωση των περιστατικών.

Την κα Ιωάννα Κουρή, της οποίας η συνεισφορά ήταν καθοριστική τόσο στο εργαστήριο όσο και στην κλινική, στη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

Τον καθηγητή κ. Ι. Γεωργίου, που βοήθησε στη μοριακή γενετική.

Τον καθηγητή κο Αθανάσιο Κυρίτση που με στήριξε κατά τη διάρκεια αυτού του δρόμου και με τίμησε ανεπιφύλακτα τόσο στην κλινική όσο και στο εργαστήριο. Χωρίς τη βοήθειά του δε θα είχε περατωθεί η μελέτη.

Τέλος θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους ασθενείς και στους υγιείς της ομάδας ελέγχου που δέχθηκαν να συμπεριληφθούν στην παρούσα μελέτη.



# **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Η πολλαπλή σκλήρυνση είναι μια χρόνια φλεγμονώδης, απομυελινωτική και νευροεκφυλιστική νόσος του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Χαρακτηρίζεται από την ιδιάζουσα γεωγραφική της κατανομή, τη διάσπαρτη προσβολή του νευρικού συστήματος και την ανά «ώσεις» εμφάνισή της. (Peterson et al 2005).

Πρόκειται για μια συχνή αιτία μη τραυματικής αναπηρίας σε νεαρούς ενήλικες με σημαντικές κοινωνικοοικονομικές επιπτώσεις, οι οποίες έχουν σημαντικές συνέπειες στη ζωή των πασχόντων.





## ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η πολλαπλή σκλήρυνση έχει ανισότιμη χωροταξική κατανομή και ο επιπολασμός της ανευρίσκεται αυξημένος, στη Β.Δ. Ευρώπη, το Ν.Καναδά, τις βόρειες Η.Π.Α., την Αυστραλία και τη Ν. Ζηλανδία. Έχει παρατηρηθεί ότι η συχνότητα της νόσου αυξάνει όσο απομακρύνεται κανείς από τον Ισημερινό. Η λευκή φυλή προσβάλλεται συχνότερα της μαύρης και της κίτρινης, οι δε γυναίκες περισσότερο από τους άνδρες, σε μια σχέση συνήθως 2:1 ή και περισσότερο.

Η πολλαπλή σκλήρυνση προσβάλλει νέα άτομα (15-50 ετών). Τα πρώτα συμπτώματα εμφανίζονται συνήθως κατά την 3<sup>η</sup> δεκαετία της ζωής.

Ο κίνδυνος εμφάνισης πολλαπλής σκλήρυνσης σε συγγενείς πασχόντων είναι σχετικός μεγαλύτερος εκείνου του γενικού πληθυσμού και τα μονοζυγωτικά δίδυμα εμφανίζουν και τα δύο τη νόσο σε πολύ μεγαλύτερη αναλογία από ότι τα διζυγωτικά. Επομένως, πιθανώς να ενέχονται γενετικοί παράγοντες στην αιτιολογία της νόσου. (Ascherio 2016)



## **ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ**

Η αιτιοπαθογένεια της πολλαπλής σκλήρυνσης είναι άγνωστη. Φαίνεται να είναι πολυπαραγοντική. Πιθανώς ένας άγνωστος λοιμογόνος παράγοντας δρα επί γενετικώς προδιατεθειμένων ατόμων και επιφέρει την έκλυση παθολογικών αντιδράσεων του ανοσοποιητικού συστήματος, οι οποίες τελικά προκαλούν τη βλάβη του ελύτρου της μυελίνης.

Το ανοσοποιητικό σύστημα παίζει σημαντικό ρόλο στην αιτιοπαθογένεια της νόσου, όπως προκύπτει από τη στενή σχέση της πάθησης προς το σύστημα μείζονος ιστοσυμβατότητας (HLA), την παρουσία κυτοκινών (ιντερφερόνες, ιντερλευκίνες, TNFα κ.ά), πλασματοκυττάρων και διαφόρων λεμφοκυττάρων στις πλάκες, όπως επίσης και από την παρουσία αυξημένων τίτλων αντισωμάτων και αυτοαντισωμάτων στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. (Kantarci 2006)

Είναι αναγκαίο να υπογραμμιστεί ότι δεν έχει ακόμα προσδιοριστεί το υπεύθυνο για την πάθηση αντιγόνο, ούτε έχει αναπτυχθεί πειστικό πειραματικό της πρότυπο.

Η ύπαρξη οικογενών περιπτώσεων πολλαπλής σκλήρυνσης αναφέρεται στο 5% περίπου των ασθενών. Η συσχέτιση της πάθησης με κάποια αντιγόνα μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας και οι μελέτες σε δίδυμους συνηγορούν στην συμμετοχή γενετικών παραγόντων στην αιτιοπαθογένεια της νόσου. (Kantarci 2008)



## ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Υπάρχουν περιβαλλοντικοί παράγοντες που σχετίζονται με την πολλαπλή σκλήρυνση. (Ascherio 2016)

Ως πρώτος αναφέρεται η βιταμίνη D. Ο κίνδυνος μειωνόταν κατά 62% σε αυτούς που είχαν υψηλότερα επίπεδα βιταμίνης. Γυναίκες που ελάμβαναν βιταμίνη D είχαν 40% μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου. (Munger 2004). Σημειώνεται ότι σε γυναίκες που ελάμβαναν βιταμίνη D κατά την εγκυμοσύνη τα παιδιά τους είχαν 40% μειωμένο κίνδυνο για πολλαπλή σκλήρυνση. (Mirzaei 2011). Υπάρχει επίσης συσχέτιση της βιταμίνης D και της επιθετικότητας της πολλαπλής σκλήρυνσης. Μετά την πάροδο 12 μηνών επίπεδα υψηλότερα των 25nmol/L προδιαθέτουν για μειωμένο κίνδυνο νέων βλαβών στην MRI εγκεφάλου και υποτροπών. (Ascherio 2014)

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η Υπόθεση της Υγιεινής κατά την οποία οι συχνές λοιμώξεις στην παιδική ηλικία μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης πολλαπλής σκλήρυνσης γιατί τροποποιούν την ανοσολογική αντίδραση διαμέσου των Th2 και κατασταλτικών κυττάρων T εξασθενώντας την Th1 κυτταρική ανοσία. (Sewell 2002). Εντυπωσιακή είναι ακόμη η συσχέτιση της λοίμωξης του ιού EBV και του κινδύνου εμφάνισης για πολλαπλή σκλήρυνση. (Ascherio 2000).

Όσο πιο νωρίς εκτίθεται κάποιος στον ιό τόσο και μικρότερος ο κίνδυνος εμφάνισης πολλαπλής σκλήρυνσης. Φαίνεται ότι τα κυκλοφορούντα αντισώματα IgG της πυρηνικής μεμβράνης 1 του EBV (EBNA-1) ήταν ισχυρός παράγοντας για τη μελλοντική εμφάνιση της πολλαπλής σκλήρυνσης (Rand 2000).

Ένας ακόμη παράγοντας φαίνεται να είναι η νεανική παχυσαρκία σε συνδυασμό με χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D. Φαίνεται να διπλασιάζει τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. (Hedstrom 2012)

Το κάπνισμα ενοχοποιείται για την αύξηση του κινδύνου εμφάνισης της νόσου. (Hedstrom 2009). Ισχυρότερη συσχέτιση με τους άνδρες και την επιθετικότητα της νόσου.



## ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Η κλινική εικόνα των ασθενών ποικίλλει σημαντικά καθώς αντανακλά την υφιστάμενη διαφορετική προσβολή του ΚΝΣ, ενός εκάστου των ασθενών.

### *Αισθητικές διαταραχές*

Οι αισθητικές διαταραχές είναι συχνές και χαρακτηριστικές στην πολλαπλή σκλήρυνση και εμφανίζονται είτε ως εναρκτήρια συμπτώματα, είτε ως επιμέρους εκδηλώσεις κατά την πορεία της νόσου.

Είναι χρήσιμο να ταξινομηθούν σε υποκειμενικές (αιμωδίες, μυρμηκιάσεις, νυγμοί, βελονισμοί, αίσθημα ψύχους, σημείο Lhermitte, ριζιτικοί πόνοι κλπ) και αντικειμενικές (διαταραχές εν τω βάθει αισθητικότητας, περιοχές υπαισθησίας κλπ)

### *Κινητικές διαταραχές*

Οι κινητικές διαταραχές προκαλούνται ως επί το πλείστον, από βλάβες του πυραμιδικού συστήματος, της παρεγκεφαλίδας και ως συνέπεια διαταραχής της εν τω βάθει αισθητικότητας.

Όταν η βλάβη αφορά το πυραμιδικό σύστημα, η αδυναμία (μονοπάρεση, παραπάρεση, παραπληγία κ.ο.κ.) όπως και η σπαστικότητα, είναι βαρύτερη στα κάτω άκρα απ'ότι στα άνω.

Όταν η βλάβη αφορά την παρεγκεφαλίδα, εμφανίζεται με σημειολογία συνδρόμου σκώληκος, (κορμική αταξία, δυσαρθρία, νυσταγμός) και συνδρόμου ημισφαιρίων (τρόμος ενέργειας, ασυνέργεια, δυσδιαδοχοκινησία, δυσμετρία κλπ).

Σε βλάβη των οπισθίων δεσμών του νωτιαίου μυελού οι ασθενείς εμφανίζουν αισθητική αταξία.

### *Προσβολή εγκεφαλικών νεύρων*

Η οπτική νευρίτιδα είναι η πιο συχνή εκδήλωση προσβολής της οπτικής οδού από την πολλαπλή σκλήρυνση. Επίσης η μεμονωμένη προσβολή νεύρων στο εγκεφαλικό στέλεχος έχει σαν συνέπεια την εμφάνιση διπλωπίας ή στραβισμού. Η διαπυρηνική οφθαλμοπληγία όταν είναι αμφοτερόπλευρη είναι παθολογική για την πολλαπλή σκλήρυνση. Στην πολλαπλή σκλήρυνση μπορούν να εμφανιστούν όλα τα είδη νυσταγμού.

Σε ό,τι αφορά το τρίδυμο νεύρο, οι αιμωδίες και η υπαισθησία στο πρόσωπο παρουσιάζονται συχνά, καθώς και η νευραλγία του τριδύμου, με όλα τα κλινικά της χαρακτηριστικά, σε νέους ανθρώπους, σε αντιδιαστολή με την ιδιοπαθή νευραλγία η οποία εμφανίζεται σε ηλικιωμένους.

Αναφέρονται επίσης συχνά σφοδροί και παρατεταμένοι ίλιγγοι, που συνοδεύονται από αταξία και εμέτους.

### *Ορθοκυστικές και γενετήσιες διαταραχές*

Αναφέρονται συχνά επιτακτικές ουρήσεις, αλλά και κατακράτηση ούρων. Η δυσκοιλιότητα είναι πιο συχνή από την ακράτεια κοπράνων. Οι σεξουαλικές διαταραχές είναι συχνές.

### *Έκπτωση νοητικών λειτουργιών-Ψυχικές διαταραχές*

Οι ασθενείς συχνά παρουσιάζουν πτωχή μνήμη και μειωμένη ικανότητα παρατεταμένης νοητικής προσπάθειας. Οι ψυχικές διαταραχές είναι απόρροια της νόσου και των συνεπειών της. Εκφράζονται υπό την μορφή αντιδραστικής κατάθλιψης, φόβων, υστερικών συμπτωμάτων.



## ΠΟΡΕΙΑ ΝΟΣΟΥ

Το 1996 υπήρξε η κάτωθι κατάταξη από την Διεθνή Εταιρία Πολλαπλής Σκλήρυνσης.

### A. Διαλείπουσα μορφή

Χαρακτηρίζεται από σαφώς καθοριζόμενες υποτροπές, με πλήρη ή μερική αποκατάσταση. Οι περίοδοι μεταξύ των υποτροπών χαρακτηρίζονται από την κλινική σταθερότητα της νόσου.

### B. Πρωτοπαθής προϊούσα μορφή

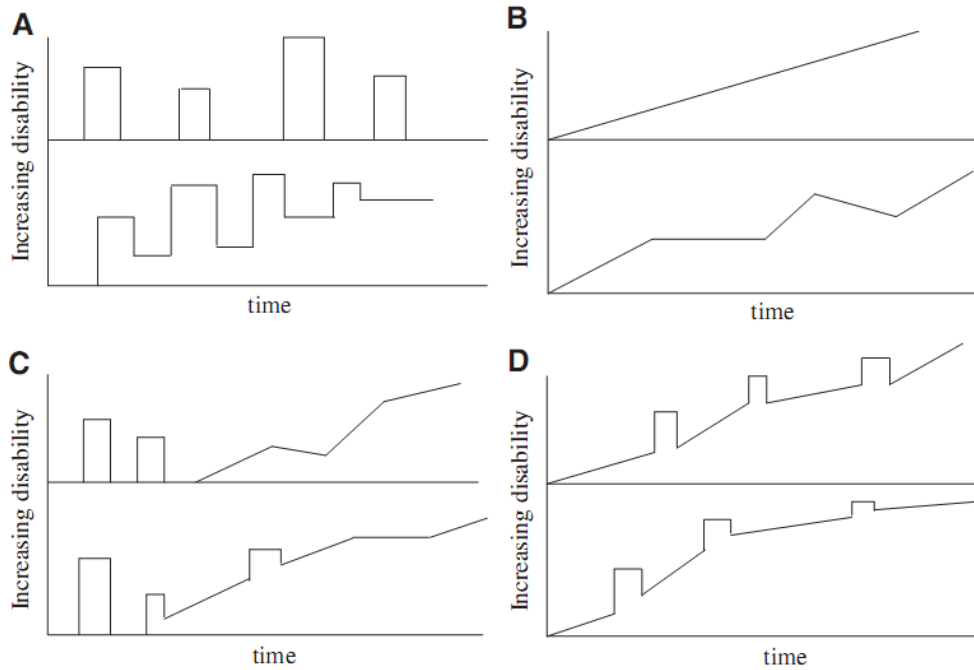
Χαρακτηρίζεται από προοδευτικώς επιδεινούμενη συμπτωματολογία ευθύς εξαρχής, η οποία μπορεί να διακόπτεται από μικρές περιόδους σταθερότητας, βελτίωσης ή επιδείνωσης.

### C. Δευτεροπαθής προϊούσα μορφή

Η αρχική πορεία της νόσου χαρακτηρίζεται από εξάρσεις και υφέσεις αλλά μετά από χρόνια διαπιστώνεται προοδευτική εξέλιξη, κατά την οποία μπορεί να εμφανιστούν υποτροπές, περίοδοι σταθερότητας ή και ήπιες υφέσεις των συμπτωμάτων.

### D. Προοδευτική-υποτροπιάζουσα μορφή

Χαρακτηρίζεται από προοδευτική εξέλιξη των συμπτωμάτων της νόσου, ευθύς εξαρχής, αλλά και με σαφείς, οξείες υποτροπές, οι οποίες υφίστανται πλήρως ή μερικώς. Η πορεία της νόσου μεταξύ των υποτροπών χαρακτηρίζεται από προοδευτική επιδείνωση.



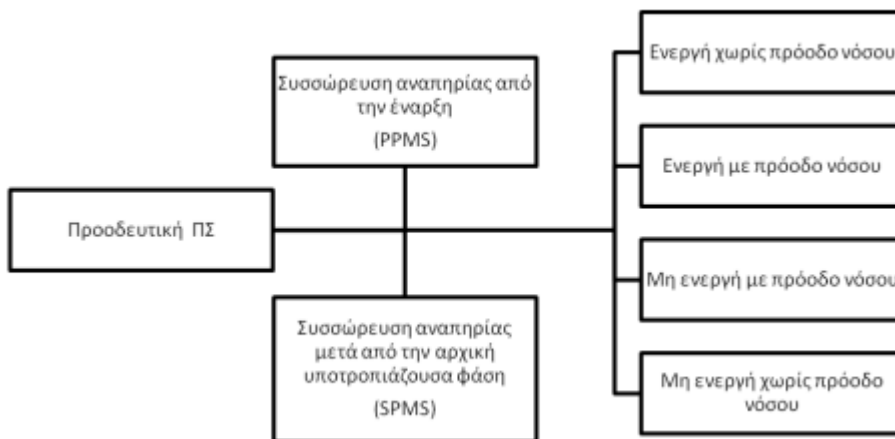
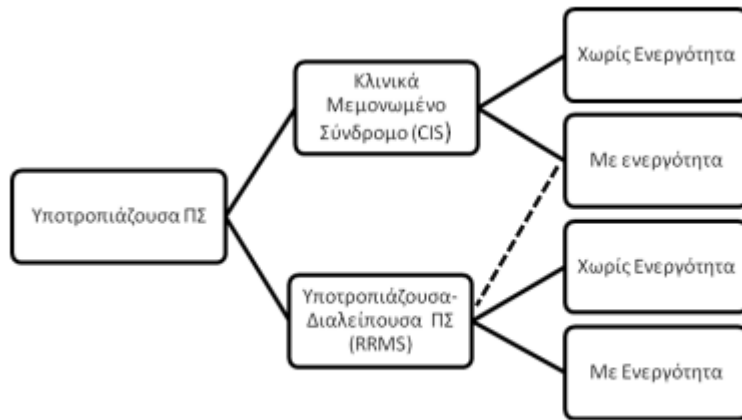
Τον Οκτώβριο του 2012 επανεξετάστηκαν οι μορφές ερευνώντας απεικονιστικά, βιοδείκτες αλλά και την υποκλινική ενεργότητα της νόσου. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν (Lublin 2013):

#### A. Κλινικά μεμονωμένο σύνδρομο.

Πρώτη εκδήλωση της νόσου χωρίς να πληρεί όλα τα κριτήρια της πάθησης. Έχει χαρακτηριστικά φλεγμονώδους απομυελίνωσης και θα μπορούσε να είναι πολλαπλή σκλήρυνση.

#### B. Ακτινολογικά μεμονωμένο σύνδρομο.

Πιο επιπλεγμένη κατάσταση στην οποία υπάρχουν ακτινολογικά ευρήματα φλεγμονώδους απομυελίνωσης χωρίς όμως κλινικά σημεία ή συμπτώματα.





## ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Τα διαγνωστικά κριτήρια για την πολλαπλή σκλήρυνση περιλαμβάνουν κλινικά, απεικονιστικά και εργαστηριακά δεδομένα στην πορεία του χρόνου και του χώρου.

Ο W. Ian Mc Donald ήταν πρόεδρος της πρώτης επιτροπής διαγνωστικών κριτηρίων (Mc Donald 2001).

Στην πορεία του χρόνου η παρακλινική αρωγή, ιδίως της απεικόνισης ανανέωσε τα κριτήρια (Polman 2005).

Στη συνέχεια υπήρξαν και διάφορες τροποποιήσεις με σκοπό το διαχωρισμό

άλλων παθήσεων που μπορεί να αλληλοκαλύπτονται ή να προσομοιάζουν με πολλαπλή σκλήρυνση, όπως το φάσμα της οπτικής νευρομυελίτιδας αλλά και τη διάγνωση των ασθενών με κλινικά μεμονωμένο σύνδρομο. (Polman 2011, Filippi 2016)

Η τελευταία αναθεώρηση (Thomson A. 2018) διαφοροποιείται από την προηγούμενη στα εξής:

- 1) Ολιγοκλονικές δέσμες που ανιχνεύονται στο ENY υποκαθιστούν την απαίτηση της διασποράς στο χρόνο.
- 2) Συμπτωματικές ή ασυμπτωματικές βλάβες ως διασπορά στο χρόνο και το χώρο με εξαίρεση την οπτική νευρίτιδα.
- 3) Οι φλοιώδεις βλάβες είναι ισοδύναμες με υποφλοιώδεις

Συνεπώς τα τελευταία κριτήρια είναι όπως απεικονίζονται στον ακόλουθο πίνακα.

<b>ΑΝΑΘΕΩΡΗΜΕΝΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ MC DONALD 2017 ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ</b>	
<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΣΤΙΩΝ ΜΕ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΙΚΑ ΚΛΙΝΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ</b>	<b>ΕΠΙΠΡΟΣΘΕΤΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ</b>
<b>≥ 2 κλινικά σύνδρομα            2</b>	κανένα
<b>≥ 2 κλινικά σύνδρομα            1 –</b>  (και επιπρόθετα ένα κλινικό σύμβαμα ξεκάθαρο του παρελθόντος με απεικονιστική βλάβη σε διαφορετική ανατομική περιοχή)	κανένα
<b>≥ 2 κλινικά σύνδρομα            1</b>	Διασπορά στο χώρο που πιστοποιείται από διαφορετικό κλινικό σύνδρομο σε άλλη θέση ή ευρήματα στη Μαγνητική
<b>1 κλινικό σύνδρομο                ≥ 2</b>	Διασπορά στο χρόνο, που πιστοποιείται από επιπλέον προσβολή ή ευρήματα στη Μαγνητική ή εύρεση ολιγοκλωνικών δεσμών στο ENY
<b>1 κλινικό σύνδρομο                1</b>	Διασπορά στο χώρο, που πιστοποιείται από ένα επιπλέον επεισόδιο διαφορετικής θέσης ή ευρήματα στη Μαγνητική ΚΑΙ Διασπορά στο χρόνο (επιπλέον επεισόδιο ή ευρήματα στη Μαγνητική ή εύρεση ολιγοκλωνικών δεσμών στο ENY)

#### Αξιολόγηση των οπτικών προκλητών δυναμικών

Παθολογικά θεωρούνται τα οπτικά προκλητά δυναμικά (ΟΠΔ) όταν ανευρίσκεται παράταση του λανθάνοντος χρόνου με διατήρηση της μορφολογίας των κυματομορφών (McDonald et al 2001)

## **ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΗΡΙΑΣ ΜΕ ΤΗΝ ΚΛΙΜΑΚΑ EDSS (EXPANDED DISABILITY STATUS SCALE)**

Η εκτίμηση του βαθμού αναπηρίας στην παρούσα μελέτη έγινε με την κλίμακα EDSS του Kurtzke, η οποία καθορίζεται από τα ευρήματα της αντικειμενικής νευρολογικής εξέτασης και από την αξιολόγηση της βάδισης του ασθενούς (Kurtzke et al 1983). Αποτελεί την ευρύτερα χρησιμοποιούμενη κλίμακα εκτίμησης αναπηρίας στην πολλαπλή σκλήρυνση (Sharrack et al 1996).

Πιο συγκεκριμένα, η κλίμακα EDSS λαμβάνει τιμές από 0.0 (απουσία αντικειμενικών ευρημάτων) έως 10.0 (θάνατος από πολλαπλή σκλήρυνση). Αποτελείται από συνολικά 20 βαθμίδες που αντιπροσωπεύουν σταδιακά αυξανόμενο νευρολογικό έλλειμμα ή/ και αναπηρία (0.0,1.0,1.5,2.0 κοκ μέχρι το 10.0). Αρχικά η αντικειμενική νευρολογική εξέταση ποσοτικοποιείται με βάση τα ευρήματα σε 8 λειτουργικά συστήματα (πυραμιδικό, παρεγκεφαλιδικό, στελεχιαίο, νοητικό, ουροποιητικό, αισθητικό, οπτικό και «άλλες λειτουργίες») λαμβάνοντας έναν βαθμό από 0 έως 5 ή 6 στο καθένα από αυτά. Με βάση το συνδυασμό των βαθμών στα διάφορα λειτουργικά συστήματα προσδιορίζεται η κλίμακα EDSS από 0.0 έως και 3.5. Για τον ασθενή με αναπηρία στη βάδιση, η EDSS υπολογίζεται με βάση τη μέγιστη απόσταση που μπορεί να βαδίσει χωρίς διακοπή (500,300,200 ή 100 μέτρα) και λαμβάνει τιμές 4.0, 4.5, 5.0 και 5.0 αντίστοιχα. Όταν ο ασθενής απαιτεί ετερόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη στήριξη για να βαδίσει η EDSS υπολογίζεται στο 6.0 ή 6.5 αντίστοιχα, ενώ όταν είναι πλέον καθηλωμένος σε αναπηρικό καροτσάκι υπολογίζεται στο 7.0 ή 7.5. Για τον ασθενή που είναι καθηλωμένος στο κρεβάτι η EDSS είναι 8.0 ή παραπάνω.

### Πολλαπλή σκλήρυνση και οστική πυκνότητα

Τα άτομα με πολλαπλή σκλήρυνση έχουν πολλές αιτίες για μείωση της οστικής μάζας και συνεπώς αυξημένο κίνδυνο κατάγματος από οστεοπόρωση.

Η μείωση της οστικής μάζας μπορεί να είναι αποτέλεσμα ακινητοποίησης, οξείας ή χρόνιας λήψης γλυκοκορτικοειδών και της ανεπάρκειας της βιταμίνης D.

Υπάρχουν μελέτες στη βιβλιογραφία με μείωση της οστικής πυκνότητας και της βιταμίνης D σε ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση σε σχέση με τους υγιείς.(Sioka 2009).

Ο σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου φαίνεται να είναι η εξέλιξη της νόσου και όχι η χρήση γλυκοκορτικοειδών (Hearn 2010)



## **ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ-ΦΥΛΟΥ-ΟΣΤΙΚΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ**

Η χαμηλή οστική πυκνότητα αφορά και τα δύο φύλα. Οι ασθενείς με την προιούσα μορφή της νόσου παρουσιάζουν μεγαλύτερη μείωση της οστικής πυκνότητας σε σχέση με τους ασθενείς που έχουν τη μορφή με τις εξάρσεις και υφέσεις (Zikan 2011).

Σε μία μελέτη 80 γυναικών με πολλαπλή σκλήρυνση, η οστική πυκνότητα αναφέρεται σημαντικά μειωμένη σε σχέση με υγιείς μάρτυρες (Nieves J et al 1994). Αντίστοιχα, μελέτη 40 ανδρών με πολλαπλή σκλήρυνση καταλήγει στο συμπέρασμα ότι το ποσοστό των άρρενων ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση και μειωμένη οστική μάζα είναι υψηλό και δυσανάλογο ως προς την ηλικία και την κινητικότητά τους, γεγονός που υποστηρίζει την σύνδεση μεταξύ της πολλαπλής σκλήρυνσης και της απώλειας οστικής μάζας. Πιο συγκεκριμένα, μειωμένη οστική πυκνότητα αναφέρεται σε 80% των ασθενών (42.5% με οστεοπενία και 37.5% με οστεοπόρωση). Μεταξύ αυτών 21% εμφάνιζαν κατάγματα. Η πολυπαραγοντική γραμμική ανάλυση εξάρτησης (multivariate linear regression analysis) κατέληξε στο ότι η κλίμακα EDSS και ο δείκτης μάζας σώματος (BMI) συσχετίζονται σημαντικά με χαμηλή οστική πυκνότητα στην κεφαλή του μηριαίου οστού (Sioka 2009).



## **ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ- ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗΣ ΑΓΩΓΗΣ- ΟΣΤΙΚΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ**

Ανοσοτροποποιητικές θεραπείες

Οι θεραπείες έχουν σκοπό την καθυστέρηση της εξέλιξης της νόσου.

Οι ιντερφερόνες φαίνεται να αναστέλλουν την οστεοκλαστογένεση και τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών ανάλογα με το χρόνο θεραπείας (Weistock-Guttman 2006)

Η οξική γλατιμέρη, μία άλλη θεραπεία πρώτης γραμμής δε γνωρίζουμε πως επιδρά στο μεταβολισμό των οστών.

Η φινγκολιμόδη αναφέρεται ότι επηρεάζει τη μετανάστευση των πρόδρομων των οστεοκλαστών. Ερευνητές αναφέρουν ότι η φινγκολιμόδη αυξάνει τον πολλαπλασιασμό του οστού στα ποντίκια.

Χρειάζεται περαιτέρω μελέτη για τις άλλες θεραπείες όπως φουμαρικού διμεθυλεστέρα, τεριφλουνομίδη, αλεμτουζουμάμπη, ναταλιζουμάμπη.

### *Κορτικοστεροειδή*

Χορηγούνται συνήθως στις ώσεις της πάθησης. Οι παρενέργειες είναι ότι αναστέλλουν τη δράση των οστεοβλαστών, που οδηγούν σε μείωση του σχηματισμού του οστού και συνεπώς απορρόφηση του οστού από επαγόμενο υπερπαραθυρεοειδισμό και δυσλειτουργία του ασβεστίου.

Μια μελέτη του Zorcon et al όμως έδειξε ότι ούτε οι συνεχόμενες δόσεις, ούτε περιστασιακά κορτικοστεροειδή σχετίζονταν με αυξημένες πιθανότητες για οστεοπόρωση.

Αρκετές μελέτες συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι η οστεοπόρωση σε ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση είναι ανεξάρτητη από τη βραχεία χορήγηση κορτικοστεροειδών (Sioka 2009)

## Παθογένεια της πολλαπλής σκλήρυνσης και βιταμίνη D

Η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία κατά την παιδική και εφηβική ηλικία σχετίζεται με χαμηλή επίπτωση για πολλαπλή σκλήρυνση. Σε περιπτώσεις περιορισμένης έκθεσης στον ήλιο η χορήγηση ελαίου σολομού μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης πολλαπλής σκλήρυνσης.

Η βιταμίνη D<sub>3</sub> προσλαμβάνεται από την διαίτα ή συντίθεται στο δέρμα από την 7-δευδροχοληστερόλη υπό την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας. Προκειμένου να είναι βιολογικά ενεργής, θα πρέπει να υποστεί κάποιες μετατροπές. Η βιταμίνη D μεταφέρεται στο ήπαρ με την αντίστοιχη δεσμευτική πρωτεΐνη. Εκεί υδροξυλιώνεται από το ένζυμο 25-υδροξυλάση και έτσι προκύπτει η 25-υδροξυβιταμίνη D<sub>3</sub> {25(OH) D<sub>3</sub>}, την κύρια κυκλοφορούσα μορφή της βιταμίνης D.

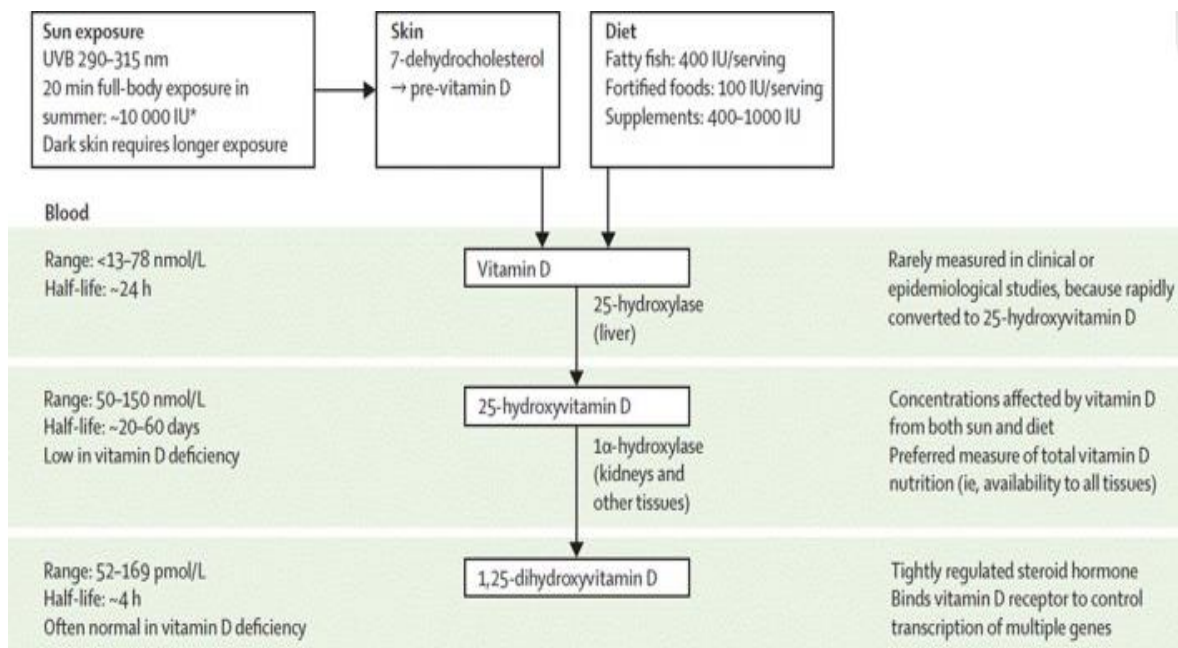
Με την ίδια συζευκτική πρωτεΐνη η 25(OH) D<sub>3</sub> μεταφέρεται στους νεφρούς. Στο εγγύς εσπειραμμένο σωληνάριο και στα ευθέα σωληνάκια των νεφρώνων η 25(OH) D<sub>3</sub> μετατρέπεται στην ενεργό μορφή της βιταμίνης D 1,25-διυδροξυβιταμίνη D<sub>3</sub> {1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>} από το ένζυμο 1-αλφα-υδροξυλάση (Sioaka 2009).

Στα νευρικά κύτταρα εκφράζεται ο υποδοχέας της βιταμίνης D (VDR) 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> που σχηματίζεται από νευρώνες και τη μικρογλοία. Στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό η συγκέντρωση της 25(OH)D είναι χαμηλότερη όμως υπάρχει αναλογική συσχέτιση μεταξύ του ορού και του πλάσματος.

Η 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> τροποποιεί νευροτροφικούς παράγοντες και ρυθμίζει την είσοδο του ασβεστίου στους νευρώνες. (Miclea 2020)

Το επίπεδο της βιταμίνης D στον ορό επηρεάζει τον κίνδυνο εμφάνισης πολλαπλής σκλήρυνσης και τροποποιεί τη δραστηριότητα της νόσου. Φαίνεται από νεότερα δεδομένα ότι υπάρχει αιτιολογική συσχέτιση χαμηλών επιπέδων βιταμίνης D και πολλαπλής σκλήρυνσης.

Δεν υπάρχει συμφωνία για το ποια είναι τα επαρκή επίπεδα. Πολλαπλές μελέτες προτείνουν τα 40 ng/ml (100nmol/L) ως τα κατώτερα για τον έλεγχο κλινικής και απεικονιστικής δραστηριότητας της πολλαπλής σκλήρυνσης. (Sintzel 2018)



### Μελέτες *in vitro* και σε ζώα

Η εναλλακτική κατανόηση της πολλαπλής σκλήρυνσης γίνεται μέσα από μοντέλα προσομοίωσης.

Τρία είναι τα χαρακτηριστικά: α) η πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα, β) η ιογενής εγκεφαλομυελίτιδα των τρωκτικών (λοίμωξη του Theiler), γ) εγκεφαλομυελίτιδα επαγόμενη από τοξίνες. Η πρώτη προσομοιάζει περισσότερο την πολλαπλή σκλήρυνση και βοηθά στη μελέτη των θεραπειών.

Η πολλαπλή σκλήρυνση είναι μια αυτοάνοση νόσος που καθοδηγείται από CD4 T λεμφοκύτταρα. Τα Th1 κύτταρα καθοδηγούνται από την IL-12 και μπορεί να ενέχονται στην παθογένεια της πολλαπλής σκλήρυνσης και της πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας.

Αναφέρεται στην βιβλιογραφία ότι η βιταμίνη D<sub>3</sub> και η 1,25-διυδροξυβιταμίνη D<sub>3</sub> {1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>} αναστέλλει την ανάπτυξη της πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας σε ποντίκια. Αρκετοί μελετητές υπογραμμίζουν τον αντιφλεγμονώδη ρόλο της βιταμίνης D ιδιαίτερα για τα αυτοάνοσα νοσήματα μέσω Th1 κυττάρων.

Οι Ramagoralan et al δημοσίευσαν μελέτη σύμφωνα με την οποία εντοπίστηκε μια περιοχή που ανταποκρίνεται στην βιταμίνη D (vitamin D response element) στον προμότορα του γονιδίου HLA-DRB1. Η εν λόγω περιοχή διατηρείται στους ομοζυγότες HLA-DRB1 ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση, όχι όμως στους απλότυπους που δεν σχετίζονται με την πολλαπλή σκλήρυνση. Οι ερευνητές καταλήγουν πως υπάρχει ένδειξη ότι το αλληλίο HLA-DRB1\*1501, το οποίο και σχετίζεται με την αιτιοπαθογένεια της πολλαπλής σκλήρυνσης, ρυθμίζεται από την βιταμίνη D (Ramagoralan A et al 2008).

Επίσης, η βιταμίνη D<sub>3</sub> και η 1,25-διυδροξυβιταμίνη D<sub>3</sub> {1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>} ανέστειλαν την επαγωγή πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας σε ποντίκια, χωρίς όμως να συμβεί το ίδιο σε ποντίκια με διαταραχή στο γονίδιο IL-10 ή IL-10R. Επομένως προκύπτει ότι ο ρόλος της βιταμίνης D στην επαγωγή πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας σχετίζεται με την ιντερλευκίνη 10 ή τον υποδοχέα της

Η ίδια ομάδα ερευνητών υποστηρίζει σε άλλη μελέτη ότι η 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> αναστέλλει την ανάπτυξη της πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας με την επαγωγή απόπτωσης (Sioka 2009).

Η 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> επάγει την ανοσολογική ανοχή στα δενδριτικά κύτταρα και στα Treg περιφερικά και ακολούθως μειώνει τον αριθμό των αυτοάνοσων T κυττάρων στο κεντρικό νευρικό σύστημα.

Η 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> μειώνει την απομυελίνωση δια μέσου της ενεργοποίησης της μικρογλοίας οδηγώντας σε κάθαρση των υπολειμμάτων της μυελίνης, φαγοκυττάρωσης των παθολογικών πρωτεϊνών, όπως το πεπτιδίο του β-αμυλοειδούς και μείωση της έκφρασης της επαγόμενης συνθετάσης του νιτρικού οξέος, που είναι προφλεγμονώδες ένζυμο.

Βρέθηκε ότι η 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> δρα στα CD4 T κύτταρα (Th1, Th2, Th17, INF-γ) και διεγείροντας αντιφλεγμονώδες κυτοκίνες (IL-4, IL-10). (Miclea 2020)

Μια μελέτη αναφέρει ότι η φωσφορική σφιγγοσίνη 1 (SP1) είναι αυξημένη στον ορρό και το μυελό των ποντικών με πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα. Χορηγώντας όμως βιταμίνη D αναστρέφεται η αύξηση και ανακουφίζεται η φλεγμονή (Zhu 2014)

Σημειώνεται ότι τροποποιητές του υποδοχέα SP1, όπως φινγκολιμόδη, σιπονιμόδη έχουν εγκριθεί για την πολλαπλή σκλήρυνση.

### *Συσχέτιση επιπέδων βιταμίνης D και πολλαπλής σκλήρυνσης*

Αναφέρεται στην βιβλιογραφία ότι υψηλά επίπεδα βιταμίνης D σχετίζονται με μειωμένη επίπτωση πολλαπλής σκλήρυνσης, ιδιαίτερα όταν τα επίπεδα 25-OH-D μετρήθηκαν πριν την ηλικία των 25 χρόνων (Sioka 2009).

Φαίνεται ότι επίπεδα βιταμίνης D κάτω από 12,02 ng/ml εγκύων γυναικών διπλασιάζουν την πιθανότητα για πολλαπλή σκλήρυνση στα παιδιά τους.

Νεογνά με επίπεδα βιταμίνης D κάτω από 8,28 ng/ml έχουν υψηλότερη πιθανότητα για πολλαπλή σκλήρυνση από τα νεογνά που έχουν επίπεδα μεγαλύτερα 19,56 ng/ml. Τα άτομα που αναπτύσσουν κλινικά μεμονωμένο σύνδρομο έχουν ελαττωμένη συγκέντρωση 25(OH) D σε σχέση με τους υγιείς.

Σημειώνεται ότι η υποβιταμίνωση D αυξάνει την αυτοανοσία που προκαλείται από τη λοίμωξη EBV και άρα τον κίνδυνο ανάπτυξης πολλαπλής σκλήρυνσης. Σε νέους ασθενείς με χαμηλά επίπεδα 25(OH) D αυξάνεται η αντιδραστικότητα έναντι του EBNA1. Ακολούθως οι συγκεντρώσεις του αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης anti- EBNA1 μειώνεται μετά τη χορήγηση συμπληρώματος βιταμίνης D. (Miclea 2020)

Σε μελέτη 29 ασθενών και 22 μαρτύρων δεν διαπιστώθηκε διαφορά ως προς τα επίπεδα παραθορμόνης, 25-OH-D και 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. ωστόσο γυναίκες με πολλαπλή σκλήρυνση εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις 25-OH-D και 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> σε σχέση με τους άνδρες ασθενείς.

Σε μελέτη 132 ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση και 60 μαρτύρων, οι ασθενείς με διαλείπουσα μορφή της νόσου είχαν σημαντικότερα χαμηλότερες τιμές 25-OH-D και 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> κυρίως κατά την διάρκεια της ώσης.

Αυστραλοί ερευνητές μελέτησαν 136 ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση και 272 υγιείς μάρτυρες. Αναφέρουν ότι οι ασθενείς έχουν μειωμένα επίπεδα βιταμίνης D. Επίσης, στην ομάδα των ασθενών υψηλότερες τιμές EDSS σχετίζονται με χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D και μειωμένη έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία (Sioka 2009)





## ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D

### *Συσχέτιση πολυμορφισμών υποδοχέα βιταμίνης D και πολλαπλής σκλήρυνσης*

Η βιταμίνη D ενεργεί δια του υποδοχέα της βιταμίνης D (VDR), έναν ενδοκυττάριο υποδοχέα, που εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα του σώματος.

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον VDR είναι στο χρωμόσωμα 12 (12q13.11) και περιλαμβάνει εννέα εξόνια.

Η βάση δεδομένων Entrez SNP του Εθνικού Κέντρου για τη Βιοτεχνολογική Πληροφορία αναφέρει μία λίστα με πάνω από 30 πολυμορφισμούς για το γονίδιο του υποδοχέα της βιταμίνης D (VDR).

Τέσσερις πολυμορφισμοί είναι οι περισσότερο μελετημένοι Apa-I (rs7975232), Bsm-I (rs1544410), Taq-I (rs731236) και Fok-I (rs10735810).

Οι Apa-I (rs7975232) (υποκατάσταση G/T), Bsm-I (rs1544410) (υποκατάσταση A/G) εδράζονται στο ιντρόνιο μεταξύ του εξονίου 8-9 και δεν έχουν συνέπειες στη δομή της πρωτεΐνης του υποδοχέα της βιταμίνης D.

Ενώ ο Taq-I (rs731236) (υποκατάσταση T/C) εδράζεται στο εξόνιο 9 και συμβαίνει μία σιωπηρή αλλαγή σε ένα κωδικόνιο. Αυτοί οι 3 πολυμορφισμοί είναι οι πιο συχνές στους Καυκάσιους.

Ο Fok-I (rs10735810) πολυμορφισμός (T/C υποκατάσταση). Εδράζεται σε μια μεταγραφική αρχική θέση στο εξόνιο 2 του υποδοχέα της βιταμίνης D.

Όταν το αποτέλεσμα της πρωτεΐνης που σχηματίζεται είναι 427 αμινοξέα ορίζεται ως f, ενώ αν το τελικό αποτέλεσμα της μεταγραφής είναι 424 αμινοξέα τότε το ορίζουμε ως F.) (Smolders 2009).

Αρκετές κοινές παραλλαγές έχουν ανακαλυφθεί και κάποιες από αυτές μπορεί να επηρεάσουν την λειτουργία και το μεταβολισμό της βιταμίνης D.

Υπάρχουν πολυάριθμες μελέτες που υποστηρίζουν συσχέτιση του γονιδίου του υποδοχέα της βιταμίνης D (VDR) και της επίπτωσης της οστεοπόρωσης και της πολλαπλής σκλήρυνσης. Επομένως έχει θέση η αξιολόγηση των πολυμορφισμών του γονιδίου VDR σε μελέτες συσχέτισης πολλαπλής σκλήρυνσης και βιταμίνης D.

Καμία σημαντική συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών Fok1T>C και Taq1C>T και πολλαπλής σκλήρυνσης δεν παρατηρήθηκε.

Όμως μια σημαντική αλληλεπίδραση παρατηρήθηκε μεταξύ της έκθεσης στο χειμερινό ήλιο στην παιδική ηλικία και του πολυμορφισμού Cdx-2A>G και του κινδύνου για πολλαπλή σκλήρυνση, όταν υπάρχει έκθεση για λιγότερες από 2 ώρες ημερησίως.

Τρεις πολυμορφισμοί του γονιδίου VDR εξετάστηκαν σε 136 ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση και 235 μάρτυρες και προηγούμενη ηλιακή έκθεση. Δεν αναδείχθηκαν συσχετισμοί μεταξύ των πολυμορφισμών rs 11574010, rs 10735810 και rs 731236 και την επίπτωση της πολλαπλής σκλήρυνσης. Σημειώθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκθεσης σε ηλιακή ακτινοβολία κατά τους χειμερινούς μήνες κατά την διάρκεια της παιδικής ηλικίας, rs 11574010 και επίπτωσης πολλαπλής σκλήρυνσης. Συγκεκριμένα, οι φέροντες το αλληλίο G σε συνδυασμό με μειωμένη ηλιακή έκθεση έχουν υψηλό κίνδυνο εμφάνισης πολλαπλής σκλήρυνσης. Οι συγγραφείς καταλήγουν ότι το γονίδιο VDR παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της πολλαπλής σκλήρυνσης, η οποία φαίνεται να αλληλεπιδρά με την έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία (Sioka 2009).

Αξίζει να σημειωθεί ότι το γονίδιο VDR δεν συσχετίζεται μόνο με την επίπτωση της πολλαπλής σκλήρυνσης, αλλά και με την βαρύτητα της νόσου όπως αυτή εκφράζεται με την κλίμακα EDSS (expanded disability status scale). Σε μελέτη ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση παρατηρήθηκε μειωμένη συχνότητα ff γονοτύπου σε ασθενείς με EDSS  $\geq$  6.0 (Mamutse et al 2008).

Σε άλλη μελέτη ο γονότυπος Fok I ff του γονιδίου VDR συνδέεται με μειωμένη επίπτωση πολλαπλής σκλήρυνσης. Η συσχέτιση αυτή δεν επιβεβαιώθηκε σε μελέτη 212 ασθενών και 289 μαρτύρων που εκπονήθηκε από τους Smolders και συνεργάτες. Ωστόσο οι φέροντες το F αλληλίο τόσο στην ομάδα των ασθενών όσο και στην ομάδα των μαρτύρων είχαν υψηλότερο λόγο  $1,25 \text{ (OH)}_2\text{D}/25\text{(OH)D}$ , γεγονός που υποδεικνύει την συσχέτιση του εν λόγω πολυμορφισμού και του μεταβολισμού της βιταμίνης D. Επίσης οι πολυμορφισμοί Bsm I και Apa I του γονιδίου VDR συσχετίζονται με υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης πολλαπλής σκλήρυνσης (Sioka 2009)

# **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η πολλαπλή σκλήρυνση είναι μία προϊούσα απομυελινωτική νόσος του κεντρικού νευρικού συστήματος που εμφανίζεται κυρίως σε νεαρούς ενήλικες και συχνά οδηγεί σε σημαντική αναπηρία αρκετά χρόνια μετά την διάγνωση (Sioka C et al 2009). Η βιταμίνη D παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοίωση των οστών και έχει ανοσορυθμιστικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Adorini L et al 2008). Διαταραχές στην ρύθμιση του μεταβολισμού της βιταμίνης D έχουν συσχετιστεί με την πολλαπλή σκλήρυνση και άλλες ασθένειες όπως ο διαβήτης τύπου 1, καρκίνος, και οστεοπόρωση (Alpert et al 2007; Holick MF et al 2005; Lips P et al 2006; Peterlick M et al 2005; Peterlick M et al 2006). Η βιταμίνη D δρα μέσω του υποδοχέα της βιταμίνης D (VDR) και του σχετιζόμενου με την μεμβράνη υποδοχέα δέσμωσης στεροειδών ταχείας ανταπόκρισης (MARRS) (Fernandes de Abreu DA et al 2009). Κάποιοι πολυμορφισμοί του γονιδίου VDR πιθανώς τροποποιούν την λειτουργία της βιταμίνης D και έχουν γίνει αντικείμενο μελέτης σε ότι αφορά την συσχέτιση της βιταμίνης D με την πολλαπλή σκλήρυνση (Smolders J et al 2009).

Έχει μελετηθεί εκτεταμένα ο ρόλος διαφόρων πολυμορφισμών της βιταμίνης D σε διαφορετικές εθνικές ομάδες με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Ιάπωνες ερευνητές αναφέρουν ότι υπάρχει συσχέτιση του πολυμορφισμού Bsm-I του γονιδίου VDR και της πολλαπλής σκλήρυνσης (Fukazawa T et al 1999). Σε μία μελέτη από την Αυστραλία καταδεικνύεται σημαντική διαφορά στην κατανομή γονοτύπων του πολυμορφισμού Taq-I σε ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση (Tajouri L et al 2005). Σε μελέτη από το Ηνωμένο Βασίλειο αναφέρεται συσχέτισμός πολυμορφισμού του γονιδίου VDR με την επίπτωση της πολλαπλής σκλήρυνσης (Partridge JM et al 2004). Ωστόσο άλλοι ερευνητές δεν καταλήγουν σε συσχέτιση πολυμορφισμών της βιταμίνης D με την πολλαπλή σκλήρυνση (Dickinson JL et al 2009, Smolders J et al 2009, Steckley JL et al 2000). Οι Dickinson et al, αν και δεν συνδέουν τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς του γονιδίου VDR με την πολλαπλή σκλήρυνση, σημειώνουν ότι ενδέχεται να σχετίζονται με την έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία κατά τους χειμερινούς μήνες. Σε άλλη μελέτη αναφέρεται σημαντική συσχέτιση μεταξύ της διαιτητικής πρόσληψης βιταμίνης D και της επίπτωσης της πολλαπλής σκλήρυνσης σε άτομα με συγκεκριμένο γονότυπο ως προς το γονίδιο VDR (Simon KC et al 2010).

Λόγω των αντιφατικών αποτελεσμάτων στην βιβλιογραφία, αποφασίσαμε να μελετήσουμε πολυμορφισμούς του γονιδίου VDR στον ελληνικό πληθυσμό.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήσαμε τους πολυμορφισμούς Taq-I και Bsm-I του γονιδίου VDR σε κοόρτη ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση και σε ομάδα ελέγχου στην Βορειοδυτική Ελλάδα.

# ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

## ΑΣΘΕΝΕΙΣ

### Προέλευση ασθενών

Οι ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη έπασχαν από πολλαπλή σκλήρυνση και παρακολουθούνταν από την Νευρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Ως προς τη διάγνωση, στο σύνολό τους πληρούσαν τα αναθεωρημένα κριτήρια Mc Donald (Polman et al 2005). Πρόκειται για 69 ασθενείς που παραπέμφθηκαν διαδοχικά στο τμήμα Πυρηνικής Ιατρικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, στα πλαίσια προγράμματος εξέτασης ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση για οστεοπενία και οστεοπόρωση. Όλοι οι ασθενείς, μετά από ενδελεχή ενημέρωση, έδωσαν γραπτή συγκατάθεση για τη διενέργεια γενετικού ελέγχου και την συμμετοχή τους στην παρούσα μελέτη.

### Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών

Έγινε καταγραφή των ακολούθων δημογραφικών και κλινικών παραμέτρων σε σύνολο 69 ασθενών: φύλο, ηλικία, δείκτης μάζας σώματος (Body Mass Index, BMI), κάπνισμα σε χρόνια, οστική πυκνότητα στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης, οστική πυκνότητα στην κατ' ισχίον άρθρωση, και βαθμός αναπηρίας στην κλίμακα Expanded Disability Status Scale (EDSS).

## MARTYΡΕΣ

### Προέλευση μαρτύρων

Στην μελέτη συμπεριλήφθηκαν 81 υγιή άτομα κατά αντιστοίχιση ηλικίας και φύλου με τους ασθενείς. Πρόκειται για άτομα που συνόδευαν τους ασθενείς κατά την επίσκεψή τους στα τμήματα Νευρολογίας και Πυρηνικής Ιατρικής του Νοσοκομείου και δεν είχαν συγγένεια εξ αίματος. Όλοι οι μάρτυρες, μετά από ενδελεχή ενημέρωση, έδωσαν γραπτή συγκατάθεση για τη διενέργεια γενετικού ελέγχου και την συμμετοχή στην παρούσα μελέτη.

Δημογραφικά χαρακτηριστικά μαρτύρων

Έγινε καταγραφή των ακολούθων δημογραφικών παραμέτρων στο σύνολο των 81 μαρτύρων: φύλο, ηλικία, δείκτης μάζας σώματος (Body Mass Index, BMI), κάπνισμα σε χρόνια, οστική πυκνότητα στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης και οστική πυκνότητα στην κατ' ισχίον άρθρωση.

#### ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ ΑΣΘΕΝΩΝ-ΜΑΡΤΥΡΩΝ

Από την μελέτη αποκλείστηκαν ασθενείς ή μάρτυρες εάν πληρούσαν οποιαδήποτε παράμετρο που θα μπορούσε να επηρεάσει τον μεταβολισμό των οστών. Ενδεικτικά αναφέρονται υπερθυρεοειδισμός, ρευματοειδής αρθρίτιδα, θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης, λήψη αντισυλληπτικών φαρμάκων για περισσότερους από 6 μήνες, πρόσφατη ορμονοθεραπεία, καθώς και χρόνια λήψη κορτικοστεροειδών, διφωσφωνικών ή εκλεκτικών τροποποιητών των οιστρογονικών υποδοχέων (SERMs).

Το πρωτόκολλο της μελέτης και η φόρμα συγκατάθεσης εγκρίθηκαν από την Ερευνητική Επιτροπή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

#### ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΣΤΙΚΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ

Η μέτρηση οστικής πυκνότητας έγινε με DXA χρησιμοποιώντας τον επεξεργαστή Hologic Discovery W scanner (Hologic, Bedford, MA, United States). Όλοι οι ασθενείς και μάρτυρες υπεβλήθησαν σε μέτρηση οστικής πυκνότητας στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης (O1-O4) και αριστερή κατ' ισχίον άρθρωση σε κατακεκλιμένη θέση. Μετρήθηκαν οστική περιεκτικότητα σε μέταλλα (Bone Mineral content, BMC) και οστική πυκνότητα στις εξεταζόμενες περιοχές. Όλες οι μετρήσεις έγιναν από τον ίδιο τεχνικό υπάλληλο. Η ανάλυση δεδομένων έγινε με το λογισμικό (v.12.3:7, Hologic, Bedford, MA, United States) όπως υποδεικνύεται από την κατασκευάστρια εταιρία.

#### ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

Όλες οι μοριακές γενετικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η ανάλυση έγινε τυφλά ως προς την ομάδα (ασθενείς ή μάρτυρες) που ανήκε το εκάστοτε δείγμα.



## Επιλογή πολυμορφικών δεικτών

Γονοτυπήθηκαν 2 πολυμορφικοί δείκτες στο γονίδιο του υποδοχέα της βιταμίνης D.

Πρόκειται για τον πολυμορφισμό Taq I T/C (rs 731236) που εδράζεται στο εξόνιο 9, ο οποίος έχει ως αποτέλεσμα σιωπηλή μετάλλαξη. Παράλληλα ο πολυμορφισμός Bsm I G/A (rs 1544410) στην θέση 10,583,292 στην χρωμοσωμική θέση 12q12-q14 εδράζεται σε ιντρόνιο μεταξύ των εξονίων 8 και 9. Από την μετάλλαξη αυτή δεν προκύπτουν αλλαγές στην δομή της πρωτεΐνης του υποδοχέα της βιταμίνης D.

## Γονοτύπηση

Και για τους δύο πολυμορφικούς δείκτες εφαρμόστηκε η ακόλουθη μέθοδος γονοτύπησης

1. Απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα
2. Ενίσχυση της υπό μελέτη περιοχής με την χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

## Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

### Η αρχή λειτουργίας της αντίδρασης της PCR

Η Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια *in vitro* μέθοδος που επιτυγχάνει τον πολλαπλασιασμό προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA σε πολλά αντίγραφα σε σύντομο χρόνο. Πρόκειται για μία τεχνική της μοριακής βιολογίας που εφαρμόζεται εκτενώς τόσο στο χώρο της μοριακής βιολογίας όσο και της ιατρικής. Εφευρέτης της μεθόδου αυτής είναι ο Kerry Mullis, ο οποίος ανακοίνωσε την εφεύρεσή του το 1984 και τιμήθηκε γι' αυτήν με βραβείο Νόμπελ το 1993 Ghannam MG, Varacallo M. Biochemistry, Polymerase Chain Reaction. 2022 May 8. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 30571074.

Πιο αναλυτικά η μέθοδος της PCR βασίζεται στην συνεχή επανάληψη ενός κύκλου που αποτελείται από τρία διαδοχικά στάδια. Σε κάθε στάδιο γίνεται επώαση του δείγματος σε διαφορετική κάθε φορά θερμοκρασία, με την βοήθεια ενός ειδικού μηχανήματος, του θερμικού κυκλοποιητή (thermal cycler). Ο κυκλοποιητής έχει την δυνατότητα να θερμάνει και να ψύχει τα δείγματα σε σύντομο χρόνο (Βερβερίδης, 2003).

Τα στάδια που συγκροτούν τον επαναλαμβανόμενο κύκλο είναι τα εξής:

- 1) Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation)
- 2) Υβριδοποίηση εκκινητών (primer annealing) στις αλληλουχίες του DNA-στόχου
- 3) Επιμήκυνση εκκινητών (extension).

Στο πρώτο στάδιο, σε θερμοκρασία 94°C οι αλυσίδες του δίκλωνου DNA διαχωρίζονται. (αποδιάταξη/denaturation).

Στο δεύτερο στάδιο η θερμοκρασία μειώνεται στους 50-60°C και έτσι επιτυγχάνεται η ένωση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA σε κάθε αλυσίδα (υβριδοποίηση εκκινητών/primer annealing).

Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C και με την βοήθεια της DNA πολυμεράσης, που προσθέτει τα δεοδουριβονουκλεοτίδια στο 3' άκρο των εκκινητών, επιτυγχάνεται η σύνθεση των νέων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA. Η σύνθεση των νέων αλυσίδων γίνεται από την DNA πολυμεράση πάντα με κατεύθυνση 5' προς 3'.

Οι εκκινητές (primers) είναι ολιγονουκλεοτίδια και έχουν συνήθως μήκος 15-20 νουκλεοτιδίων ο καθένας. Πρέπει να είναι συμπληρωματικοί στις αλυσίδες του DNA. Οριοθετούν την επιθυμητή προς αντιγραφή περιοχή του DNA από όπου και το ένζυμο DNA πολυμεράση θα αρχίσει την σύνθεση της διπλής αλυσίδας του επιθυμητού DNA προϊόντος. Απαραίτητη προϋπόθεση για βέλτιστο αποτέλεσμα είναι να έχουν την ίδια θερμοκρασία αποδιάταξης (melting temperature,  $T_m$ ).

Η DNA πολυμεράση (Taq polymerase) είναι απαραίτητο ένζυμο για την σύνθεση της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας που θα είναι συμπληρωματική της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA μέσω της προσθήκης νουκλεοτιδίων. Τα νουκλεοτίδια σχηματίζουν ζευγάρια βάσεων με τα νουκλεοτίδια από την αρχική αλληλουχία DNA και η DNA πολυμεράση δημιουργεί τους δεσμούς που τα ενώνει μεταξύ τους. Η προσθήκη των νουκλεοτιδίων γίνεται από το 3' άκρο του εκκινητή (Berg et al, 2002).

## REAL TIME PCR

Η αρχή λειτουργίας της Real Time PCR

Η Real Time PCR αποτελεί παραλλαγή της συμβατικής PCR και χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό, την ανίχνευση καθώς και την ποσοτικοποίηση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA σε πραγματικό χρόνο.

Η μέθοδος της Real time PCR στηρίζεται στις βασικές αρχές της συμβατικής PCR. Ωστόσο παρουσιάζει μεγαλύτερη ακρίβεια, αποδοτικότητα και σε μικρότερο χρόνο, καθώς και δίδει την δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας σύνθεσης του DNA σε κάθε κύκλο της αντίδρασης (Houghton et al, 2006). Το διάλυμα της αντίδρασης της Real Time PCR αποτελείται από τα ίδια αντιδραστήρια με αυτά της συμβατικής PCR εκτός από τους μηχανισμούς ανίχνευσης DNA που αφορούν την προσθήκη συγκεκριμένων χρωστικών (Houghton et al, 2006).

Τα δείγματα προς ανάλυση παρακολουθούνται με την βοήθεια αυτοποιημένου μηχανήματος ειδικού για την Real time PCR που είναι συνδεδεμένο με υπολογιστή και το οποίο παρέχει την δυνατότητα ανάλυσης και ποσοτικοποίησης του σήματος ανίχνευσης του DNA μετά από κάθε κύκλο της αντίδρασης.

Η γονοτύπηση των πολυμορφισμών Taq-I (rs 731236) και Bsm-I (rs 1544410) πραγματοποιήθηκε με την δοκιμασία TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping. Η δοκιμασία αυτή αποτελείται από προσχεδιασμένο μείγμα από μη σημασμένους primers για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και το TaqMan<sup>®</sup> minor groove binding group (MGB) probe (FAM<sup>™</sup> and VIC<sup>®</sup> dye-labeled).

Όλες οι δοκιμασίες TaqMan SNP Genotyping είναι σχεδιασμένες για να δουλεύουν με το TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR MasterMix. Το τελευταίο μείγμα περιέχει DNA Πολυμεράση, Δεοξυριβονουκλεοτίδια, βελτιστοποιημένες αναλογίες των υπόλοιπων συστατικών ώστε να χρησιμοποιηθούν στις ίδιες θερμικές συνθήκες. Τα υλικά προέρχονται από την εταιρία ABI (Applied Biosystems). Χρησιμοποιήθηκε θερμοεπιταχυντής Real Time PCR Rotor-Gene RG3000 (Corbett).

Ο πολυμορφισμός Taq 1 T/C εδράζεται στο εξόνιο 9 και καταλήγει σε σιωπηλή μετάλλαξη. Γονοτυπήθηκε με την βοήθεια της Real-Time PCR. Ο ένας ιχνηλάτης (probe) έχει σημανθεί με VIC<sup>®</sup> και ανιχνεύει το T αλληλίο. Ο δεύτερος ιχνηλάτης (probe) έχει σημανθεί με FAM<sup>™</sup> και ανιχνεύει το C αλληλίο.

Παράλληλα ο πολυμορφισμός Bsm-I στην θέση 10,583,292 στην χρωμοσωμική θέση 12q12-q14, ο οποίος εδράζεται σε ιντρόνιο μεταξύ των εξονίων 8 και 9. γονοτυπήθηκε επίσης με την βοήθεια της Real-Time PCR. Χρησιμοποιήθηκε εκκινητής (probe) VIC<sup>®</sup> για την ανίχνευση του G αλληλίου και εκκινητής (probe) FAM<sup>™</sup> για την ανίχνευση του A αλληλίου.

## PCR

Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

1. TaqMan<sup>®</sup> Genotyping Master Mix (2x)= 7.5 μl
2. TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assay (TaqMan probes) (20x)= 0.75μl
3. Dnase =5.75μl
4. dH<sub>2</sub>O και 1μl DNA (1-10ng), ώστε ο συνολικός όγκος αντίδρασης να είναι 15μl.

Πρόγραμμα θερμικού κυκλοποιητή που ακολουθήθηκε για τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς

<b>Βήμα</b>	<b>Στάδιο PCR</b>	<b>Θερμοκρασία σε (°C)</b>	<b>Χρόνος Επώασης</b>
1	Initial denaturing	95°C	10 min
2	denaturing	96°C	15 sec
3	annealing/extension).	60°C	1 min
4	Επανάληψη κύκλων 40 φορές από βήμα 2		

Όλα τα αντιδραστήρια TaqMan SNP Genotyping χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και τις πληροφορίες στην ιστοσελίδα της Applied Biosystems (<http://www.appliedbiosystems.com>)

## ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Τα συνεχή δεδομένα παρουσιάζονται με μέσες τιμές (σταθερή απόκλιση), ενώ τα κατηγορικά δεδομένα με ποσοστά. Προκειμένου να συγκριθούν οι μέσες τιμές μεταξύ ασθενών και μαρτύρων, έγινε στατιστική ανάλυση με t-test. Τα κατηγορικά δεδομένα αναλύθηκαν και ελέχθησαν αν οι αναλογίες δύο ομάδων ήταν ίσες ως προς τον παράγοντα διερεύνησης. Έγινε ανάλυση πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης (multiple linear regression analysis) με εξαρτημένες μεταβλητές τον Ταq-I και τον Bsm-I του γονιδίου του υποδοχέα της βιταμίνης D, βάσει ενός συνόλου ανεξάρτητων μεταβλητών σύμφωνα με την οποία εκτιμήθηκε η σημαντικότητα ( $p$ ) και η ένταση ( $\beta$ ) της επίδρασης της εκάστοτε μεταβλητής στην πρόβλεψη των τιμών των εξαρτημένων μεταβλητών στα αντίστοιχα γραμμικά μοντέλα. Ως ανεξάρτητες μεταβλητές ορίστηκαν το φύλο, η ηλικία, ο δείκτης μάζας σώματος, η διάγνωση της πολλαπλής σκλήρυνσης ή όχι, η διάρκεια του καπνίσματος σε έτη, η οστική πυκνότητα στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης και στην κατ' ισχίον άρθρωση. Ορίστηκε ως επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha=0,05$ . Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για την στατιστική ανάλυση ήταν της STATISTICA (Stat Soft, Tulsa, OK).



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα δημογραφικά και κλινικά στοιχεία ασθενών και μαρτύρων συνοψίζονται στους ακόλουθους 2 πίνακες:

Πίνακας 1

	Γυναίκες		Άνδρες	
	Ασθενείς (46)	Μάρτυρες (58)	Ασθενείς (23)	Μάρτυρες (23)
<b>Ηλικία (έτη)</b>	38.5 ± 9.9 (21-58)	38.6 ± 10.8 (20-60)	39.5 ± 11.8 (21-60)	38.838.8 ± 10.5 (23-60)
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	24.9 ± 4.6 (16.8-34)	24.9 ± 5.1 (18.5-45.7)	25.1 ± 3.7 (17.4-36.4)	27.6 ± 3.2 (21.2- 31.9)
<b>Κάπνισμα (έτη)</b>	9.1 ± 10.8 (0-39)	8 ± 9.8 (0-33)	17 ± 12.4 (0-44)	12.4 12.4 ± 12.3 (0-38)
<b>ΟΠ (ΟΜΣΣ)</b>	0.996 ± 0.16 (0.675-1.329)	1.025 ± 0.135 (0.738-1.29)	0.956 ± 0.12 (0.774-1.215)	1.021.028 ± 0.13 (0.71-1.26)
<b>ΟΠ (ΙΣ)</b>	0.857 ± 0.14 (0.542-1.132)	0.947 ± 0.123 (0.661-1.244)	0.915 ± 0.14 (0.615-1.286)	1.022 ± 0.1 (0.745-1.191)
<b>EDSS</b>	1.5 ± 1.8 (0 –5.5)		2.76 2.76 ± 2.5 (0 – 8)	

BMI: body mass index

EDSS: expanded disability scale score

ΟΠ: οστική πυκνότητα

ΟΜΣΣ: οσφυϊκή μοίρα σπονδυλικής στήλης

ΙΣ: κατ' ισχίον άρθρωση

Πίνακας 2

Παράμετρος	Ασθενείς	Μάρτυρες	p
<b>Φύλο</b>	<b>46 γυναίκες</b> <b>23 άνδρες</b>	<b>58 γυναίκες</b> <b>23 άνδρες</b>	
<b>Μέση ηλικία (έτη)</b>	39.0 ± 10.5	38.7 ± 10.7	0.86
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	24.8 ± 4.2	25.7 ± 4.8	0.23
<b>Κάπνισμα (έτη)</b>	11.9 ± 11.8	9.3 ± 10.7	0.18
<b>ΟΠ (ΟΜΣΣ)</b>	0.981 ± 0.15	1.025 ± 0.13	0.06
<b>ΟΠ (ΙΣ)</b>	0.875 ± 0.14	0.969 ± 0.12	<0.001*

BMI: body mass index

EDSS: expanded disability scale score

ΟΠ: οστική πυκνότητα

ΟΜΣΣ: οσφυϊκή μοίρα σπονδυλικής στήλης

ΙΣ: κατ' ισχίον άρθρωση

\*: στατιστικά σημαντικό

Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της σύγκρισης των γονοτύπων και των αλληλίων των πολυμορφισμών Ταq-I (T>C) και Bsm-I (G>A) σε ασθενείς και μάρτυρες. Δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών ασθενών και μαρτύρων.



Πίνακας 3

	<b>Ασθενείς</b> (69)	<b>Μάρτυρες</b> (81)	<b>P</b>
<b>Taq-I</b> πολυμορφισμός			
Γονότυπος			
<b>TT</b>	30 (43.5%)	33 (44.8%)	0.91
<b>CT</b>	30 (43.5%)	36 (44.4%)	0.94
<b>CC</b>	9 (13%)	12 (14.8%)	0.9
Αλλήλιο			
<b>T</b>	65.2%	63%	0.78
<b>C</b>	34.8%	37%	0.80
<b>Bsm-I</b> πολυμορφισμός			
Γονότυπος			
<b>GG</b>	28 (40%)	26 (32%)	0.54
<b>GA</b>	41 (60%)	55 (68%)	0.42
<b>AA</b>	0	0	0
Αλλήλιο			
<b>G</b>	70%	66%	0.60
<b>A</b>	30%	34%	0.6

Ακολουθεί η παρουσίαση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την σύγκριση ανεξάρτητων μεταβλητών και των υπό μελέτη πολυμορφισμών.

Προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά σε ό,τι αφορά την οστική πυκνότητα στην κατ'ισχίον άρθρωση μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. Επίσης παρατηρήθηκε χαμηλότερη οστική πυκνότητα στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης στην ομάδα των

ασθενών, η οποία όμως δεν έφτασε σε επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας ( $p=0.06$ ). Όπως προκύπτει από την πολλαπλή γραμμική ανάλυση εξάρτησης, οι γονοτυπικές συχνότητες Taq-I και Bsm-I είναι ανεξάρτητες από τους εξής παράγοντες: διάγνωση της πολλαπλής σκλήρυνσης, ηλικία, φύλο, ιστορικό καπνίσματος, δείκτης μάζας σώματος, οστική πυκνότητα στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης και στην κατ'ισχίον άρθρωση.

Πίνακας 4

<b>Ανάλυση πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης (multiple linear regression analysis)</b>				
	<b>Taq-I</b>		<b>Bsm-I</b>	
<b>Independent variable</b>	<b>Beta</b>	<b>p</b>	<b>Beta</b>	<b>p</b>
<b>Ασθενείς /μάρτυρες</b>	0.05	0.95	0.04	0.62
<b>Φύλο</b>	-0.70	0.44	0.07	0.44
<b>Ηλικία (έτη)</b>	-0.40	0.7	0.11	0.32
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	0.05	0.63	0.00	0.99
<b>Κάπνισμα (έτη)</b>	0.12	0.19	0.07	0.40
<b>ΟΠ (ΟΜΣΣ)</b>	0.05	0.69	0.00	0.99
<b>ΟΠ (ΙΣ)</b>	-0.27	0.12	0.29	0.20

BMI: body mass index (Δείκτης μάζας σώματος)

ΟΠ: οστική πυκνότητα

ΟΜΣΣ: οσφυϊκή μοίρα σπονδυλικής στήλης

ΙΣ: κατ' ισχίον άρθρωση

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα προοπτική μελέτη, εξετάσαμε τους πολυμορφισμούς Taq-I και Bsm-I του γονιδίου του υποδοχέα της βιταμίνης D (VDR), κοντά στο μη μεταφραζόμενο 3' άκρο. Παρόλο που οι πολυμορφισμοί δεν οδηγούν σε δομικές αλλαγές της πρωτεΐνης VDR, διαταραχή ισορροπίας σύνδεσης (linkage disequilibrium) στο 3' μη μεταφραζόμενο άκρο του υποδοχέα της βιταμίνης D μπορεί να οδηγήσει σε τροποποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης (Ingles SA et al 1997). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας, δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών Taq-I και Bsm-I του γονιδίου VDR ανάμεσα στους 69 ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση και 81 μάρτυρες.

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας προκύπτει ετερογένεια στα αποτελέσματα μελετών γενετικών συσχετίσεων σε ό,τι αφορά το γονίδιο του υποδοχέα της βιταμίνης D. Η ετερογένεια αυτή θα μπορούσε να είναι απότοκος εθνικών ή γενετικών διαφορών (Sioka C et al 2009, Smolders J et al 2009). Ιάπωνες ερευνητές αναφέρουν ότι σε μελέτη 77 ασθενών και 95 μαρτύρων, ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση εμφανίζουν πιο συχνά το αλληλίο G Bsm-I και ομοζυγωτία GG, ομοίως και το αλληλίο A και ομοζυγωτία Apa-I AA (Fukazawa T et al 1999, Niino M et al 2000). Επίσης, Αυστραλοί ερευνητές σε μελέτη που περιελάμβανε 104 ασθενείς και 104 μάρτυρες κατέληξαν σε στατιστικά σημαντική διαφορά αναφορικά με Taq-I πολυμορφισμούς (Tajouri L et al 2005). Οι Partridge και συνεργάτες αναφέρουν χαμηλή έκφραση του γονοτύπου Fok-I ff στο γονίδιο VDR σε μελέτη 419 ασθενών και 422 μαρτύρων (Partridge JM et al 2004). Θα ήταν χρήσιμο να σημειώσουμε ότι οι προαναφερθείσες μελέτες αφορούν πληθυσμούς με υψηλά επίπεδα βιταμίνης D, είτε λόγω διαιτητικής πρόσληψης, είτε λόγω έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία.

Από την άλλη πλευρά υπάρχουν πολλές μελέτες που δεν κατέληξαν σε συσχέτιση των πολυμορφισμών βιταμίνης D και της επίπτωσης της πολλαπλής σκλήρυνσης. Αμερικανοί ερευνητές, σε μελέτη που περιελάμβανε 214 ασθενείς και 428 μάρτυρες δεν ανέδειξαν συσχέτιση πολυμορφισμών του γονιδίου VDR με την επίπτωση της πολλαπλής σκλήρυνσης. Επισημαίνουν όμως την σύνδεση διαιτητικής πρόσληψης βιταμίνης D και της επίδρασης του Fok-I πολυμορφισμού του γονιδίου VDR στην επίπτωση της πολλαπλής σκλήρυνσης. Πιο συγκεκριμένα άτομα με ff γονότυπο είχαν μειωμένη επίπτωση πολλαπλής σκλήρυνσης με υψηλότερη πρόσληψη βιταμίνης D (Simon KC et al 2010). Σε μια πρόσφατη μελέτη 136 ασθενών και 235 μαρτύρων δεν αναφέρεται συσχέτιση επίπτωσης

της πολλαπλής σκλήρυνσης και των πολυμορφισμών Cdx-2, Fok-I, Taq-I. Ωστόσο καταδεικνύεται σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκθεσης σε ήλιο κατά τους χειμερινούς μήνες κατά την διάρκεια της παιδικής ηλικίας, του γονοτύπου Cdx-2 και της επίπτωσης της πολλαπλής σκλήρυνσης. Πιο συγκεκριμένα, το G αλληλίο συνδέεται με υψηλότερο κίνδυνο για πολλαπλή σκλήρυνση στην ομάδα με χαμηλή έκθεση σε ήλιο ( $\leq 2$  ώρες την ημέρα). Οι ερευνητές υποστηρίζουν ότι αυτό υποδεικνύει συσχέτιση των πολυμορφισμών του γονιδίου VDR και της πολλαπλής σκλήρυνσης σε συνάρτηση με την έκθεση σε ηλιακή ακτινοβολία (Dickinson JL et al 2009). Σε μία μελέτη σε 212 ασθενείς και 289 μάρτυρες αναφέρεται ότι δεν υπάρχει συσχέτιση των πολυμορφισμών Apa-I και Taq-I του γονιδίου VDR και των επιπέδων 25(OH)D και 1,25(OH)<sub>2</sub>D και της επίπτωσης της πολλαπλής σκλήρυνσης (Smolders J et al 2009). Η ίδια ομάδα ερευνητών προσθέτει την έλλειψη συσχέτισης του Fok-I πολυμορφισμού του γονιδίου VDR, αν και το f αλληλίο απαντάται συχνότερα σε ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση και χαμηλά επίπεδα 25(OH)D καθ'όλη την διάρκεια του έτους και χαμηλά επίπεδα 25(OH)D σε υγιείς μάρτυρες. Επιπρόσθετα, οι φορείς του F αλληλίου έχουν υψηλότερο λόγο 1,25(OH)<sub>2</sub>D προς 25(OH)D σε σχέση με τους φορείς του f αλληλίου. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να αποτελέσει ένδειξη ότι ο πολυμορφισμός Fok-I VDR παίζει κάποιο ρόλο στον μεταβολισμό της βιταμίνης D (Smolders J et al 2009). Επομένως ορισμένοι πολυμορφισμοί του γονιδίου της βιταμίνης D μπορεί να παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στον μεταβολισμό και την λειτουργία της βιταμίνης D και μπορεί να συσχετίζεται με την επίπτωση της πολλαπλής σκλήρυνσης, σε συνάφεια με την λήψη της βιταμίνης D (Smolders J et al 2009).

Στην παρούσα μελέτη, οι ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση είχαν χαμηλότερη οστική πυκνότητα από τους μάρτυρες, σε ό,τι αφορά την κατ'ισχίον άρθρωση και λιγότερο την οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης. Υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές σύμφωνα με τις οποίες ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση παρουσιάζουν χαμηλή οστική πυκνότητα, οστεοπόρωση και χαμηλά επίπεδα της βιταμίνης D (Nieves J et al 1994, Ozgocmen S et al 2005). Η πολλαπλή γραμμική ανάλυση εξάρτησης που πραγματοποιήθηκε δεν ανέδειξε συσχέτιση της οστικής πυκνότητας με τους πολυμορφισμούς Taq-I και Bsm-I του γονιδίου VDR, αποτέλεσμα που συμφωνεί με προηγούμενες δημοσιευμένες μελέτες (Macdonald HM et al 2006, Lim SK et al 1995). Σε άλλη μελέτη, ο πολυμορφισμός Fok-I του γονιδίου VDR συνδέεται με την επίπτωση της οστεοπόρωσης (Ban Y et al 2000).

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την μελέτη συσχέτισης των πολυμορφισμών Ταq-I και Bsm-I του γονιδίου της βιταμίνης D σε ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση σε αντιδιαστολή με υγιή άτομα δεν προκύπτει σύνδεση των εν λόγω πολυμορφισμών και της επίπτωσης της πολλαπλής σκλήρυνσης, καθώς και της οστικής πυκνότητας σε δείγμα πληθυσμού από την Βορειοδυτική Ελλάδα.

Από την μέτρηση της οστικής πυκνότητας σε ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση και μάρτυρες, προκύπτει ότι οι ασθενείς έχουν χαμηλότερη οστική πυκνότητα στην κατ'ισχίον άρθρωση κυρίως, αλλά και στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης σε μικρότερη έκταση.

Από την μέτρηση της οστικής πυκνότητας σε γυναίκες με πολλαπλή σκλήρυνση και υγιείς γυναίκες, προέκυψε ότι οι πρώτες έχουν χαμηλότερη οστική πυκνότητα στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης και στην κατ'ισχίον άρθρωση. Και οι δύο οστικές περιοχές αφορούν σπογγώδη οστίτη ιστό. Είναι σκόπιμο γυναίκες με πολλαπλή σκλήρυνση να υποβάλλονται περιοδικά σε μέτρηση οστικής πυκνότητας και να γίνονται παρεμβάσεις όπου αυτό είναι αναγκαίο ώστε να μειωθεί η πιθανότητα καταγμάτων.



## ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Χρειάζεται να μελετηθούν περισσότεροι πολυμορφισμοί του υποδοχέα της βιταμίνης D και των ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση και να συσχετιστούν με τη χειμερινή έκθεση στον ήλιο που είχαν στην παιδική ηλικία.

Να εξεταστεί η μεθυλίωση του υποδοχέα και των πολυμορφισμών της βιταμίνης D σε ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση, δηλαδή έρευνα και για την πιθανή συσχέτιση πολυμορφισμών και την ενδεχόμενη μεθυλίωσή τους με τις μορφές πολλαπλής σκλήρυνσης.

Εργασίες με πιθανή συσχέτιση καταγμάτων και περιοχής κατάγματος με συγκεκριμένους πολυμορφισμούς του υποδοχέα της βιταμίνης D, σε ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση.

Μελέτες σε σχέση με τα νέα φάρμακα (όπως ναταλιζουμάμπη) για την πολλαπλή σκλήρυνση και το μεταβολισμό της βιταμίνης D αλλά και των πολυμορφισμών του υποδοχέα της. Την επίδραση που έχουν αυτά τα φάρμακα στη μεθυλίωση του υποδοχέα της, αλλά και στους πολυμορφισμούς του υποδοχέα, αναζητώντας πιθανή συσχέτιση για καλύτερο έλεγχο της θεραπείας.

Συσχέτιση άλλων βιταμινών που λειτουργούν στο μηχανισμό της απόπτωσης, όπως B17 με τα επίπεδα της βιταμίνης D και των πολυμορφισμών του υποδοχέα της βιταμίνης D.

Έρευνα για το ποια είναι τα καλύτερα επίπεδα της βιταμίνης D σε σχέση με τους πολυμορφισμούς που έχει ο ασθενής και σε σχέση με τη μορφή της πολλαπλής σκλήρυνσης.

Προοπτικές μελετών με χορήγηση σκευασμάτων βιταμίνης D και άλλων βιταμινών όπως βιταμίνης K2 και C σε ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση, συσχέτιση τους με τους πολυμορφισμούς του υποδοχέα της βιταμίνης D.





## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πολλαπλή σκλήρυνση είναι μία προϊούσα απομυελινωτική νόσος του κεντρικού νευρικού συστήματος με αυξημένο κίνδυνο για χαμηλή οστική πυκνότητα. Υπάρχουν άλλοτε άλλοι συσχετισμοί μεταξύ των πολυμορφισμών του υποδοχέα της βιταμίνης D, και του κινδύνου ανάπτυξης πολλαπλής σκλήρυνσης.

Σκοπός αυτής της μελέτης είναι να εξεταστούν γενετικοί πολυμορφισμοί του γονιδίου του υποδοχέα της βιταμίνης D με την πολλαπλή σκλήρυνση που έχουν συσχετιστεί με άλλοτε άλλα αποτελέσματα. Η ετερογένεια αυτών των μελετών είναι αποκύημα είτε εθνικών είτε γενετικών διαφορών.

Αναζητούμε τη συχνότητα των ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση που έχουν υποδοχείς Bsm-I και Taq-I στον ελληνικό πληθυσμό κοντά στο μη μεταφρασμένο άκρο 3', γιατί αυτό το άκρο μπορεί να οδηγήσει σε τροποποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης.

Εξετάστηκαν 69 ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση και 81 υγιείς. Έγινε αντιστοίχιση με βάση την ηλικία και το φύλο. Καταγράφησαν επίσης ο δείκτης μάζας σώματος, το κάπνισμα σε χρόνια, η οστική πυκνότητα στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης και η οστική πυκνότητα στην κατ' ισχίον άρθρωση.

Γονοτυπήθηκαν οι Taq-I (rs731236), που εδράζεται στο εξόνιο 9 και Bsm-I (rs1544410), που εδράζεται σε ιντρόνιο μεταξύ των εξονίων 8 και 9, πολυμορφισμοί του υποδοχέα της βιταμίνης D χρησιμοποιώντας την TaqMan SNP Γονοτυπική Σειρά.

Τα δημογραφικά και κλινικά στοιχεία ασθενών και μαρτύρων αφορούν την ηλικία, μέσος όρος ήταν 39, με απόκλιση  $\pm 10,5$  έτη, ενώ της ομάδας ελέγχου  $38,7 \pm 10,7$  έτη ( $p=0,86$ ). Ο δείκτης μάζας σώματος των ασθενών ήταν  $24,8 \pm 4,2$  Kg/m<sup>2</sup> και της ομάδας ελέγχου  $25,7 \pm 4,8$  Kg/m<sup>2</sup> ( $p=0,23$ ). Η οστική πυκνότητα στην οσφυϊκή μοίρα των ασθενών ήταν  $0,981 \pm 0,15$  σε σύγκριση με το  $1,025 \pm 0,13$  της ομάδας ελέγχου ( $p<0,06$ ). Η οστική πυκνότητα στην κατ' ισχίον άρθρωση ήταν  $0,875 \pm 0,14$  των ασθενών ενώ των μαρτύρων  $0,969 \pm 0,12$  ( $p<0,001$ ). Στην πολλαπλή γραμμική ανάλυση εξάρτησης οι πολυμορφισμοί Taq-I και Bsm-I είναι ανεξάρτητες από τους παράγοντες: διάγνωση πολλαπλής σκλήρυνσης, ηλικία, φύλο, ιστορικό καπνίσματος, δείκτης μάζας σώματος, οστική πυκνότητα στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης και της κατ' ισχίον άρθρωσης.

Από τη μελέτη του Ελληνικού πληθυσμού Βορειοδυτικής Ελλάδος προκύπτει ότι οι πολυμορφισμοί Ταq-I και Bsm-I του υποδοχέα της βιταμίνης D δεν αυξάνουν τον κίνδυνο για πολλαπλή σκλήρυνση ούτε συσχετίζονται με το δείκτη μάζας σώματος, το κάπνισμα ή την οστεοπόρωση. Ενώ η μέτρηση της οστικής πυκνότητας σε γυναίκες με πολλαπλή σκλήρυνση ανέδειξε χαμηλότερη οστική πυκνότητα στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης και στην κατ' ισχίον άρθρωση.

## ABSTRACT

Vitamin D gene polymorphisms in multiple sclerosis

by

Stylios Papakonstantinou

Multiple sclerosis is a progressive demyelinating disease of the central nervous system with an increased risk of low bone density. There are other associations between vitamin D receptor polymorphisms, and the risk of developing multiple sclerosis.

The purpose of this study is to examine genetic polymorphisms of the vitamin D receptor gene with multiple sclerosis that have been associated with other outcomes. The heterogeneity of these studies is a reflection of either national or genetic differences.

We are looking for the frequency of multiple sclerosis patients with Bsm-I and Taq-I receptors in the Greek population near the untranslated 3' end, because this end may lead to modification of protein expression.

Sixty-nine patients with multiple sclerosis and 81 healthy subjects were examined. Matching by age and gender was performed. Body mass index, chronic smoking, bone density at the lumbar spine and bone density at the hip joint were also recorded.

Taq-I (rs731236), based on exon 9, and Bsm-I (rs1544410), based on an intron between exons 8 and 9, vitamin D receptor polymorphisms were genotyped using the TaqMan SNP Genotyping Kit.

Demographic and clinical data of patients and witnesses regarding age, mean was 39, with a deviation of  $\pm 10.5$  years, while the control group was  $38.7 \pm 10.7$  years ( $p=0.86$ ). The body mass index of the patients was  $24.8 \pm 4.2$  Kg/m<sup>2</sup> and of the control group was  $25.7 \pm 4.8$  Kg/m<sup>2</sup> ( $p=0.23$ ). The bone density in the lumbar spine of the patients was  $0.981 \pm 0.15$  compared to  $1.025 \pm 0.13$  of the control group ( $p<0.06$ ). Bone density at the hip joint was  $0.875 \pm 0.14$  of patients while  $0.969 \pm 0.12$  of controls ( $p<0.001$ ). In multiple linear dependence analysis, Taq-I and Bsm-I polymorphisms were independent of the factors: diagnosis of multiple sclerosis, age, sex, smoking history, body mass index, bone density in the lumbar spine and hip joint.

The study of the Greek population of Northwestern Greece shows that the Taq-I and Bsm-I polymorphisms of the vitamin D receptor do not increase the risk of multiple sclerosis nor are they associated with body mass index, smoking or osteoporosis. While measurement of bone density in women with multiple sclerosis showed lower bone density in the lumbar spine and hip joint.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Achiron A, Edelstein S, Ziev-Ner Y, Givon U, Rotstein Z, Barak Y (2004) Bone strength in multiple sclerosis: cortical midtibial speed-of-sound assessment. *Mult Scler* 10:488-493.

Adorini L, Penna G (2008) Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4:404-412.

Alpert PT, Shaikh U (2007) The effects of vitamin D deficiency and insufficiency on the endocrine and paracrine systems. *Biol Res Nurs* 9:117-129.

Altintas A, Saruhan-Direskeneli G, Benbir G, Demir M, Purisa S (2009) The role of osteopontin: a shared pathway in the pathogenesis of multiple sclerosis and osteoporosis? *J Neurol Sci* 276:41-44.

Arnson Y, Amital H, Shoenfeld Y (2007) Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations. *Ann Rheum Dis* 66:1137-1142.

Ascherio A, Munger KLEpidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention-An Update. Review.*JAMA Neurol.* 2014 Mar;71(3):306-14..*Semin Neurol.* 2016 Apr;36(2):103-14. doi: 10.1055/s-0036-1579693. Epub 2016 Apr 26.PMID: 27116717

Alberto Ascherio 1, Kassandra L Munger 1, Rick White 2, Karl Köchert 3, Kelly Claire Simon 1, Chris H Polman 4, Mark S Freedman 5, Hans-Peter Hartung 6, David H Miller 7, Xavier Montalbán 8, Gilles Edan 9, Frederik Barkhof 4, Dirk Pleimes 10, Ernst-Wilhelm Radü 11, Rupert Sandbrink 12, Ludwig Kappos 11, Christoph Pohl 13

Vitamin D as an early predictor of multiple sclerosis activity and progression. *JAMA Neurol.* 2014 Mar;71(3):306-14.PMID: 24445558

Ascherio A, Munch M. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Epidemiology.* 2000 Mar;11(2):220-4. doi: 10.1097/00001648-200003000-00023.PMID: 11021623

Ascherio A, Munger KL (2007) Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol* 61:288-299.

Ban Y, Taniyama M, Ban Y (2000) Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with Graves' disease in the Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4639-4643.

Barcellos LF, Caillier S, Dragone L, Elder M, Vittinghoff E, Bucher P, Lincoln RR, Pericak-Vance M, Haines JL, Weiss A, Hauser SL, OksenbergJR (2001) PTPRC (CD45) is not associated with the development of multiple sclerosis in U.S. patients. *Nat Genet* 29:23-24.

Barnes MS, Bonham MP, Robson PJ, Strain JJ, Lowe-Strong AS, Eaton-Evans J, Ginty F, Wallace JM (2007) Assessment of 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> concentrations in male and female multiple sclerosis patients and control volunteers. *Mult Scler* 13:670-672.

Bourahoui A, De SJ, Gutierrez R, Onraed B, Hennache B, Ferriby D, Stojkovic T, Vermersch P (2004) CSF isoelectrofocusing in a large cohort of MS and other neurological diseases. *Eur J Neurol* 11:525-529.

Christakos S, Dhawan P, Liu Y, PengX, Porta A (2003) New insights into the mechanisms of vitamin D action. *J Cell Biochem* 88:695-705.

Correale J, Ysraelit MC, Gaitan MI (2009) Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. *Brain* 132:1146-1160.

Cosman F, Nieves J, Komar L, Ferrer G, Herbert J, Formica C, Shen V, Lindsay R (1998) Fracture history and bone loss in patients with MS. *Neurology* 51:1161-1165.

De Jager PL, et al. (2009) Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nat Genet* 41:776-782.

Dean G (1967) Annual incidence, prevalence, and mortality of multiple sclerosis in white South-African-born and in white immigrants to South Africa. *Br Med J* 2:724-, 730.

Debouverie M, Pittion-Vouyovitch S, Louis S, Roeder er T, Guillemin F (2007) Increasing incidence of multiple sclerosis among women in Lorraine, Eastern France. *Mult Scler* 13:962-967.

DeLuca HF (2004) Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *AmJ Clin Nutr* 80:1689S-1696S.

Dickinson JL, Perera DI, van der Mei AF, Ponsonby AL, Polanowski AM, Thomson RJ, Taylor BV, McKay JD, Stankovich J, Dwyer T (2009b) Past environmental sun exposure and risk of multiple sclerosis: a role for the Cdx-2 Vitamin D receptor variant in this interaction. *Mult Scler* 15:563-570.

Dickinson JL, Perera DI, van der Mei AF, Ponsonby AL, Polanowski AM, Thomson RJ, Taylor BV, McKay JD, Stankovich J, Dwyer T (2009a) Past environmental sun exposure and risk of multiple sclerosis: a role for the Cdx-2 Vitamin D receptor variant in this interaction. *Mult Scler* 15:563-570.

Dyment DA, Yee IM, Ebers GC, Sadovnick AD (2006) Multiple sclerosis in stepsiblings: recurrence risk and ascertainment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77:258-259.

Ebers GC, Sadovnick AD, Dyment DA, Yee IM, Wilier CJ, Risch N (2004) Parent-of-origin effect in multiple sclerosis: observations in half-siblings. *Lancet* 363:1773-1774.

Ebers GC, Sadovnick AD, Risch NJ (1995) A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature* 377:150-151.

Ebers GC, Yee IM, Sadovnick AD, Duquette P (2000) Conjugal multiple sclerosis: population-based prevalence and recurrence risks in offspring. Canadian Collaborative Study Group. *Ann Neurol* 48:927-931.

Fernandes de Abreu DA, Eyles D, Feron F (2009) Vitamin D, a neuro-immunomodulator: implications for neurodegenerative and autoimmune diseases. *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1:S265-77. Epub: S265-S277.

Formica CA, Cosman F, Nieves J, Herbert J, Lindsay R (1997) Reduced bone mass and fat-free mass in women with multiple sclerosis: effects of ambulatory status and glucocorticoid Use. *Calcif Tissue Int* 61:129-133.

Frohman EM, Racke MK, Raine CS (2006) Multiple sclerosis-the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 354:942-955.

Fukazawa T, Yabe I, Kikuchi S, Sasaki H, Hamada T, Miyasaka K, Tashiro K (1999b) Association of vitamin D receptor gene polymorphism with multiple sclerosis in Japanese. *J Neurol Sci* 166:47-52.

Fukazawa T, Yabe I, Kikuchi S, Sasaki H, Hamada T, Miyasaka K, Tashiro K (1999c) Association of vitamin D receptor gene polymorphism with multiple sclerosis in Japanese. *J Neurol Sci* 166:47-52.

Fukazawa T, Yabe I, Kikuchi S, Sasaki H, Hamada T, Miyasaka K, Tashiro K (1999a) Association of vitamin D receptor gene polymorphism with multiple sclerosis in Japanese. *J Neurol Sci* 166:47-52.

- Giesser BS (2011) Diagnosis of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 29:381-388.
- Giovannoni G, Ebers G (2007) Multiple sclerosis: the environment and causation. *Curr Opin Neurol* 20:261-268.
- Hawkes CH (2007) Smoking is a risk factor for multiple sclerosis: a metaanalysis. *Mult Scler* 13:610-615.
- Hawkes CH (2005) Are multiple sclerosis patients risk-takers? *QJM* 98:895-911.
- Hearn AP, Silber E. Osteoporosis in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2010 Sep;16(9):1031-43. doi: 10.1177/1352458510368985. Epub 2010 Jun 15. PMID: 20551086 Review. *Neurology*. 2009 Sep 1;73(9):696-701. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181b59c40.
- Anna K Hedström 1, Maria Bäärnhielm, Tomas Olsson, Lars Alfredsson Tobacco smoking, but not Swedish snuff use, increases the risk of multiple sclerosis *Mult Scler*. 2012 Sep;18(9):1334-6. Doi 10.1177/1352458512436596. Epub 2012 Feb 10. PMID: 19720976
- Anna K Hedström 1, Tomas Olsson, Lars Alfredsson High body mass index before age 20 is associated with increased risk for multiple sclerosis in both men and women *Mult. Scler* 2012 Sept;18(9):1334-6. Epub 2012 2012 Feb 10 PMID 22328681
- Holick MF (2005) The vitamin D epidemic and its health consequences. *J Nutr* 135:2739S-2748S. PMID: 22328681
- Holmoy T, Hestvik AL (2008) Multiple sclerosis: immunopathogenesis and controversies in defining the cause. *Curr Opin Infect Dis* 21:271-278.
- Houghton SG, Cockerill FR, III (2006) Real-time PCR: overview and applications. *Surgery* 139:1-5.
- Islam T, Gauderman WJ, Cozen W, Mack TM (2007) Childhood sun exposure influences risk of multiple sclerosis in monozygotic twins. *Neurology* 69:381-388.
- Jacobsen M, Schweer D, Ziegler A, Gaber R, Schock S, Schwinzer R, Wonigeit K, Lindert RB, Kantarci O, Schaefer-Klein J, Schipper HI, Oertel WH, Heidenreich F, Weinshenker BG, Sommer N, Hemmer B (2000) A point mutation in PTPRC is associated with the development of multiple sclerosis. *Nat Genet* 26:495-499.
- Kampman MT, Brustad M (2008) Vitamin D: a candidate for the environmental effect in multiple sclerosis - observations from Norway. *Neuroepidemiology* 30:140-146.



Kantarci O, Wingerchuk D (2006) Epidemiology and natural history of multiple sclerosis: new insights. *Curr Opin Neurol* 19:248-254.

Kragt J, van AB, Killestein J, Dijkstra C, Uitdehaag B, Polman C, Lips P (2009) Higher levels of 25-hydroxyvitamin D are associated with a lower incidence of multiple sclerosis only in women. *Mult Scler* 15:9-15.

Kurtzke JF (1980) Geographic distribution of multiple sclerosis: An update with special reference to Europe and the Mediterranean region. *Acta Neurol Scand* 62:65- 80.

Kurtzke JF (1983) Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33:1444-1452.

Lim SK, Park YS, ParkJM, Song YD, Lee EJ, Kim KR, Lee HC, Huh KB (1995) Lack of association between vitamin D receptor genotypes and osteoporosis in Koreans. *J Clin Endocrinol Metab* 80:3677-3681.

Lips P (2006) Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol* 92:4-8.

Lublin FD (2005) Clinical features and diagnosis of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 23:1-15, v.

Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, Wolinsky JS, Balcer LJ, Banwell B, Barkhof F, Bebo B Jr, Calabresi PA, Clanet M, Comi G, Fox RJ, Freedman MS, Goodman AD, Inglese M, Kappos L, Kieseier BC, Lincoln JA, Lubetzki C, Miller AE, Montalban X, O'Connor PW, Petkau J, Pozzilli C, Rudick RA, Sormani MP, Stüve O, Waubant E, Polman CH. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*. 2014 Jul 15;83(3):278-86. doi: 10.1212/WNL.0000000000000560. Epub 2014 May 28. PMID: 24871874

Macdonald HM, McGuigan FE, Stewart A, Black AJ, Fraser WD, Ralston S, Reid DM (2006) Large-scale population-based study shows no evidence of association between common polymorphism of the VDR gene and BMD in British women. *J Bone Miner Res* 21:151-162.

Mamutse G, Woolmore J, Pye E, Partridge J, Boggild M, Young C, Fryer A, Hoban PR, Rukin N, Alldersea J, Strange RC, Hawkins CP (2008b) Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with reduced disability in multiple sclerosis. *Mult Scler* 14:1280-1283.

Mamutse G, Woolmore J, Pye E, Partridge J, Boggild M, Young C, Fryer A, Hoban PR, Rukin N, Aldersea J, Strange RC, Hawkins CP (2008a) Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with reduced disability in multiple sclerosis. *Mult Scler* 14:1280-1283.

Mattner F, Smirolto S, Galbiati F, Muller M, Di LP, Poliani PL, Martino G, Panina-Bordignon P, Adorini L (2000) Inhibition of Th1 development and treatment of chronic-relapsing experimental allergic encephalomyelitis by a non-hypercalcemic analogue of 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Eur J Immunol* 30:498-508.

McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den NS, Weinshenker BY, Wolinsky JS (2001a) Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50:121-127.

McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den NS, Weinshenker BY, Wolinsky JS (2001b) Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50:121-127.

Fariba Mirzaei 1, Karin B Michels, Kassandra Munger, Eilis O'Reilly, Tanuja Chitnis, Michele R Forman, Edward Giovannucci, Bernard Rosner, Alberto Ascherio Gestational vitamin D and the risk of multiple sclerosis in offspring *Ann Neurol*. 2011 Jul;70(1):30-40. doi: 10.1002/ana.22456.PMID: 2178629

Miclea A, Bagnoud M, Chan A, Hoepner R. A Brief Review of the Effects of Vitamin D on Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2020 May 6;11:781. doi: 10.3389/fimmu.2020.00781. eCollection 2020.PMID: 32435244

Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A (2006a) Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA* 296:2832-2838.

Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A (2006b) Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA* 296:2832-2838.

Nieves J, Cosman F, Herbert J, Shen V, Lindsay R (1994) High prevalence of vitamin D deficiency and reduced bone mass in multiple sclerosis. *Neurology* 44:1687-1692.

Niino M, Fukazawa T, Yabe I, Kikuchi S, Sasaki H, Tashiro K (2000b) Vitamin D receptor gene polymorphism in multiple sclerosis and the association with HLA class II alleles. *J Neurol Sci* 177:65-71.

Niino M, Fukazawa T, Yabe I, Kikuchi S, Sasaki H, Tashiro K (2000a) Vitamin D receptor gene polymorphism in multiple sclerosis and the association with HLA class II alleles. *J Neurol Sci* 177:65- 71.

Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG (2000a) Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343:938-952.

Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG (2000b) Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343:938-952.

Ozgoemen S, Bulut S, Hhan N, Gulkesen A, Ardicoglu O, Ozkan Y (2005) Vitamin D deficiency and reduced bone mineral density in multiple sclerosis: effect of ambulatory status and functional capacity. *J Bone Miner Metab* 23:309-313.

Partridge JM, Weatherby SJ, Woolmore JA, Highland DJ, Fryer AA, Mann CL, Boggild MD, Ollier WE, Strange RC, Hawkins CP (2004a) Susceptibility and outcome in MS: associations with polymorphisms in pigmentation-related genes. *Neurology* 62:2323-2325.

Partridge JM, Weatherby SJ, Woolmore JA, Highland DJ, Fryer AA, Mann CL, Boggild MD, Ollier WE, Strange RC, Hawkins CP (2004b) Susceptibility and outcome in MS: associations with polymorphisms in pigmentation-related genes. *Neurology* 62:2323-2325.

Partridge JM, Weatherby SJ, Woolmore JA, Highland DJ, Fryer AA, Mann CL, Boggild MD, Ollier WE, Strange RC, Hawkins CP (2004c) Susceptibility and outcome in MS: associations with polymorphisms in pigmentation-related genes. *Neurology* 62:2323-2325.

Pedersen LB, Nashold FE, Spach KM, Hayes CE (2007) 1,25-dihydroxyvitamin D3 reverses experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting chemokine synthesis and monocyte trafficking. *JNeurosci Res* 85:2480-2490.

Perez Castrillon JL, Cano-del PM, Sanz-Izquierdo S, Velayos-Jimenez J, Dib- Wobakin W (2003) [Bone mineral density in patients with multiple sclerosis: the effects of interferon]. *Rev Neurol* 36:901-903.

PeterlikM, Cross HS (2005) Vitamin D and calcium deficits predispose for multiple chronic diseases. *Eur J Clin Invest* 35:290-304.

Peterlik M, Cross HS (2006) Dysfunction of the vitamin D endocrine system as common cause for multiple malignant and other chronic diseases. *Anticancer Res* 26:2581-2588.

Peterson JW, Trapp BD (2005) Neuropathobiology of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 23:107-vii.

Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW, Sandberg-Wollheim M, Thompson A J, Weinshenker BG, Wolinsky JS (2005) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 58:840-846.

Pugliatti M, Harbo HF, Holmoy T, Kampman MT, Myhr KM, Riise T, Wolfson C (2008) Environmental risk factors in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand Suppl* 188:34-40.:34-40.

Ramagopalan SV, Maugeri NJ, Handunnetthi L, Lincoln MR, Orton SM, Dymment DA, Deluca GC, Herrera BM, Chao MJ, Sadovnick AD, Ebers GC, Knight JC (2009) Expression of the multiple sclerosis-associated MHC class II Allele HLA-DRB1 \*1501 is regulated by vitamin D. *PLoS Genet* 5:e1000369.

Ramagopalan SV, Sadovnick AD (2011) Epidemiology of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 29:207-217.

Rand KH, Houck H, Denslow ND, Heilman KM. Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 (EBNA-1) associated oligoclonal bands in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2000 Feb 1;173(1):32-9. doi: 10.1016/s0022-510x(99)00298-1.PMID: 10675577

SchwidSR, Goodman AD, PuzasJE, McDermott MP, Mattson DH (1996) Sporadic corticosteroid pulses and osteoporosis in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 53:753-757.

Sewell DL, Reinke EK, Hogan LH, Sandor M, Fabry Z. Immunoregulation of CNS autoimmunity by helminth and mycobacterial infections. *Immunol Lett.* 2002 Jun 3;82(1-2):101-10. doi: 10.1016/s0165-2478(02)00025-1.PMID: 12008041 Review.

SharrackB, Hughes RA (1996) Clinical scales for multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 135:1-9.

Shuhaibar M, McKenna MJ, Au-Yeong M, Redmond JM (2009) Favorable effect of immunomodulator therapy on bone mineral density in multiple sclerosis. *Ir J Med Sci* 178:43-45.

Simon KC, Munger KL, Xing Y, Ascherio A (2010) Polymorphisms in vitamin D metabolism related genes and risk of multiple sclerosis. *Mult Scler* 16:133-138.

Sintzel MB, Rametta M, Reder AT. Vitamin D and Multiple Sclerosis: A Comprehensive Review. *Neurol Ther*. 2018 Jun;7(1):59-85. doi: 10.1007/s40120-017-0086-4. Epub 2017 Dec 14. PMID: 29243029 Review.

Sioka C, Kyritsis AP, Fotopoulos A (2009) Multiple sclerosis, osteoporosis, and vitamin D. *J Neurol Sci* 287:1-6.

Smolders J, Damoiseaux J, Menheere P, Tervaert JW, Hupperts R (2009a) Fok-I vitamin D receptor gene polymorphism (rs10735810) and vitamin D metabolism in multiple sclerosis. *JNeuroimmunol* 207:117-121.

Smolders J, Damoiseaux J, Menheere P, Tervaert JW, Hupperts R (2009b) Fok-I vitamin D receptor gene polymorphism (rs10735810) and vitamin D metabolism in multiple sclerosis. *JNeuroimmunol* 207:117-121.

Smolders J, Damoiseaux J, Menheere P, Tervaert JW, Hupperts R (2009c) Fok-I vitamin D receptor gene polymorphism (rs10735810) and vitamin D metabolism in multiple sclerosis. *JNeuroimmunol* 207:117-121.

Smolders J, Peelen E, Thewissen M, Menheere P, Tervaert JW, Hupperts R, Damoiseaux J (2009d) The relevance of vitamin D receptor gene polymorphisms for vitamin D research in multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* 8:621-626.

Soilu-Hanninen M, Laaksonen M, Laitinen I, Eralinna JP, Lilius EM, Mononen I (2008) A longitudinal study of serum 25-hydroxyvitamin D and intact parathyroid hormone levels indicate the importance of vitamin D and calcium homeostasis regulation in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79:152-157.

Spach KM, Nashold FE, Dittel BN, Hayes CE (2006) IL-10 signaling is essential for 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-mediated inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 177:6030-6037.

Spach KM, Pedersen LB, Nashold FE, Kayo T, Yandell BS, Prolla TA, Hayes CE (2004) Gene expression analysis suggests that 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> reverses experimental autoimmune encephalomyelitis by stimulating inflammatory cell apoptosis. *Physiol Genomics* 18:141-151.

Steckley JL, Dymont DA, Sadovnick AD, Risch N, Hayes C, Ebers GC (2000) Genetic analysis of vitamin D related genes in Canadian multiple sclerosis patients. Canadian Collaborative Study Group. *Neurology* 54:729-732.

Stepan JJ, Havrdova E, Tyblova M, Horakova D, Ticha V, Novakova I, Zikan V (2004) Markers of bone remodeling predict rate of bone loss in multiple sclerosis patients treated with low dose glucocorticoids. *Clin Chim Acta* 348:147-154.

Sutton AL, MacDonald PN (2003) Vitamin D: more than a "bone-a-fide" hormone. *Mol Endocrinol* 17:777- 791.

Tajouri L, Ovcarić M, Curtain R, Johnson MP, Griffiths LR, Csurhes P, Pender MP, Lea RA (2005) Variation in the vitamin D receptor gene is associated with multiple sclerosis in an Australian population. *J Neurogenet* 19:25-38.

Thacker EL, Mirzaei F, Ascherio A (2006) Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Ann Neurol* 59:499-503.

Tremlett H, van dM, I, Pittas F, Blizzard L, Paley G, Mesaros D, Woodbaker R, Nunez M, Dwyer T, Taylor BV, Ponsonby AL (2008) Monthly ambient sunlight, infections and relapse rates in multiple sclerosis. *Neuroepidemiology* 31:271-279.

Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, Correale J, Fazekas F, Filippi M, Freedman MS, Fujihara K, Galetta SL, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Marrie RA, Miller AE, Miller DH, Montalban X, Mowry EM, Sorensen PS, Tintoré M, Traboulsee AL, Trojano M, Uitdehaag BMJ, Vukusic S, Waubant E, Weinshenker BG, Reingold SC, Cohen JA. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. 2018 Feb;17(2):162-173. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2. Epub 2017 Dec 21. PMID: 29275977 Review

Tuzun S, Altintas A, Karacan I, Tangurek S, Saip S, Siva A (2003) Bone status in multiple sclerosis: beyond corticosteroids. *Mult Scler* 9:600-604.

van dM, I, Ponsonby AL, Dwyer T, Blizzard L, Taylor BV, Kilpatrick T, Butzkueven H, McMichael AJ (2007a) Vitamin D levels in people with multiple sclerosis and community controls in Tasmania, Australia. *J Neurol* 254:581-590.

van dM, I, Ponsonby AL, Dwyer T, Blizzard L, Taylor BV, Kilpatrick T, Butzkueven H, McMichael AJ (2007b) Vitamin D levels in people with multiple sclerosis and community controls in Tasmania, Australia. *J Neurol* 254:581-590.

VanAmerongen BM, Dijkstra CD, Lips P, Polman CH (2004) Multiple sclerosis and vitamin D: an update. *Eur J Clin Nutr* 58:1095-1109.

Vorechovsky I, Kralovicova J, Tchilian E, Masterman T, Zhang Z, Ferry B, Misbah S, Chapel H, Webster D, Hellgren D, Anvret M, Hillert J, Hammarstrom L, Beverley PC (2001) Does 77C→G in PTPRC modify autoimmune disorders linked to the major histocompatibility locus? *Nat Genet* 29:22-23.

Wallin MT, Page WF, Kurtzke JF (2004) Multiple sclerosis in US veterans of the Vietnam era and later military service: race, sex, and geography. *Ann Neurol* 55:65- 71.

Weinstock-Guttman B, Gallagher E, Baier M, Green L, Feichter J, Patrick K, Miller C, Wrest K, Ramanathan M (2004) Risk of bone loss in men with multiple sclerosis. *Mult Scler* 10:170-175.

Wilier CJ, Dymont DA, Sadovnick AD, Rothwell PM, Murray TJ, Ebers GC (2005) Timing of birth and risk of multiple sclerosis: population based study. *BMJ* 330:120.

Yeo TW, et al. (2007) A second major histocompatibility complex susceptibility locus for multiple sclerosis. *Ann Neurol* 61:228-236.

Zamboni P, Galeotti R, Menegatti E, Malagoni AM, Giancesini S, Bartolomei I, Mascoli F, Salvi F (2009a) A prospective open-label study of endovascular treatment of chronic cerebrospinal venous insufficiency. *J Vase Surg* 50:1348-1358.

Zamboni P, Galeotti R, Menegatti E, Malagoni AM, Tacconi G, Dall'Ar a S, Bartolomei I, Salvi F (2009b) Chronic cerebrospinal venous insufficiency in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80:392-399.

Vit Zikan Bone health in patients with multiple sclerosis *J Osteoporos.* 2011;2011:596294. doi: 10.4061/2011/596294. Epub 2011 Mar 30. PMID 21603140

Zivadinov R, Schirda C, Dwyer MG, Haacke ME, Weinstock-Guttman B, Menegatti E, Heininen-Brown M, Magnano C, Malagoni AM, Wack DS, Hojnacki D, Kennedy C, Carl E, Bergsland N, Hussein S, Poloni G, Bartolomei I, Salvi F, Zamboni P (2010) Chronic cerebrospinal venous insufficiency and iron deposition on susceptibility-weighted imaging in patients with multiple sclerosis: a pilot casecontrol study. *Int Angiol* 29:158-175.

Zorzon M, Zivadinov R, Locatelli L, Giuntini D, Toncic M, Bosco A, Nasuelli D, Bratina A, Tommasi MA, Rudick RA, Cazzato G (2005) Long-term effects of intravenous high dose methylprednisolone pulses on bone mineral density in patients with multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 12:550-556.

<https://www.moh.gov.gr/articles/health/domes-kai-draseis-gia-thn-ygeia/kwdikopoihseis/therapeytika-prwtokolla-syntagografshs/diagnwstika-kai-therapeytika-prwtokolla-syntagografshs/5414-diagnwstika-kai-therapeytika-prwtokolla-syntagografshs-neyrologikwn-noshmatwn>



