

Lek. med. Aleksandra Śnieżawska

**Polimorfizm genów MTHFR, MTHFD1, MTR  
a stężenie homocysteiny i asymetrycznej  
dimetyloargininy oraz ich metabolitów u  
chorych z padaczką leczonych lekami  
przeciwpadaczkowymi**

**Praca doktorska wykonana**

**W pracowni Neurobiologii Katedry Neurologii**

**Uniwersytetu Medycznego**

**Im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu**

**Promotor:**

**Dr hab. Jolanta Dorszewska**

**Poznań 2010**

## Spis Treści

1.	Wprowadzenie .....	1
1.1.	Rys historyczny .....	1
1.2.	Definicja padaczki i rodzaje napadów padaczkowych .....	2
1.3.	Epidemiologia padaczki .....	4
1.4.	Etiologia padaczki .....	4
1.5.	Epileptogeneza i neurochemiczne podstawy napadów padaczkowych .....	4
1.5.1.	Rola kanałów jonowych w patomechanizmie padaczki .....	5
1.5.2.	Znaczenie układu glutaminergicznego w mechanizmie napadów padaczkowych .....	6
1.5.3.	Rola układu GABA-ergicznego w zjawiskach drgawkowych .....	9
1.5.4.	Rola innych neuroprzekaźników w patogenezie padaczki .....	10
1.5.5.	Znaczenie tlenu azotu w patomechanizmie padaczki .....	10
1.6.	Diagnostyka padaczki .....	11
1.7.	Leczenie padaczki .....	11
1.8.	Homocysteina .....	13
1.8.1.	Metabolizm homocysteiny .....	13
1.8.2.	Hiperhomocysteinemia .....	15
1.8.3.	Udział hiperhomocysteinemii w patogenezie chorób sercowo-naczyniowych .....	17
1.8.4.	Wpływ hiperhomocysteinemii na patogenezę chorób neurologicznych, psychiatrycznych, wad rozwojowych i patologię ciąży .....	20
1.8.5.	Hiperhomocysteinemia a rozwój padaczki .....	22
1.8.6.	Hiperhomocysteinemia w terapii lekami przeciwpadaczkowymi u chorych z padaczką .....	23
1.9.	ADMA .....	24
1.9.1.	Metabolizm ADMA .....	24
1.9.2.	Czynniki wpływające na stężenie ADMA w osoczu krwi .....	26
1.9.3.	Udział ADMA w patogenezie chorób naczyniowych .....	28
1.9.4.	ADMA jako czynnik patogenezy innych schorzeń .....	29
1.9.5.	Arginina .....	30
2.	Cel pracy .....	31
3.	Materiał i metody .....	32
3.1.	Materiał .....	32

3.1.1.	Grupy badane .....	32
3.1.2.	Grupa kontrolna .....	32
3.1.3.	Kryteria włączenia do badań .....	32
3.2.	Metody .....	33
3.2.1.	Przygotowanie krwi do badań .....	33
3.2.2.	Analiza stężenia homocysteiny i metioniny .....	33
3.2.3.	Analiza stężenia ADMA i argininy .....	33
3.2.4.	Genotypowanie .....	34
3.3.	Statystyczna ocena wyników .....	35
4.	Wyniki.....	36
5.	Dyskusja.....	51
6.	Wnioski.....	60
7.	Streszczenie.....	61
8.	Summary .....	63

## Alfabetyczny wykaz skrótów zastosowanych w pracy

AEDs- ang. *Antiepileptic Drugs*

ADMA- asymetryczna dimetyloarginina

AMPA- receptory kwasu  $\alpha$ -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego

Arg- L-arginina

BFNC- ang. *Benign Familial Neonatal Convulsions*, łagodne rodzinne drgawki noworodków

BFNIS- ang. *Benign Familial Neonatal- Infantile Seizures*, łagodne rodzinne drgawki noworodków i dzieci

BMI- ang. *Body Mass Index*, wskaźnik masy ciała

CBS- syntaza cystationinowa

CBZ- karbamazepina

ChA- choroba Alzheimerera

ChP- choroba Parkinsona

COMT- katecholotlenometylotransferaza

Cys- cysteina

DDAH- dimetyloaminohydrolaza dimetyloargininy

DPH- fenytoina

EEG- elektroencefalografia

ESM- etosuksymid

FA- foliany

FBM- felbamat

GABA- kwas  $\gamma$ -aminomasłowy

GABA-T- transaminaza GABA

GBP- gabapentyna

GEFS+ - ang. *Generalized Epilepsy with Febrile Sizures plus*, uogólniona padaczka z drgawkami gorączkowymi plus

iGluR- glutaminergiczne receptory jonotropowe

mGluR- glutaminergiczne receptory metabotropowe

HCTL- ang. *Homocysteine Thiolactone*, tiolakton homocysteiny

Hcy- homocysteina

hHcy- hiperhomocysteinemia

HPLC/EC- ang. *High Pressure Liquid Chromatography/Electrochemical Detection*, wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją elektrochemiczną

ILAE- ang. *International League Against Epilepsy*, Międzynarodowa Liga Przeciwpadaczkowa

IMT- ang. *Intima Media Thickness*, kompleks śródbłonek- błona środkowa

LPP- leki przeciwpadaczkowe

LPP NG- leki przeciwpadaczkowe nowej generacji

LTG- lamotrygina

LEV- lewetyracetam

MCP-1- ang. *Monocyte Chemotactic Protein-1*, białko przyciągające monocyty-1

Met- metionina

MMA- ang. *Methylmalonic Acid*, kwas metylomalonowy

NMDA- receptory kwasu N-metylo-D-asparaginowego

MTHFD1- ang. *Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase/ Methenyltetrahydrofolate Cyclohydrolase/ Formyltetrahydrofolate Synthetase*

MTHFR- reduktaza metylenotetrahydrofolianowa

*MTHFR (C677T), MTR (A2756G), MTHFD1 (G1958A)*- polimorfizmy genów *MTHFR, MTR, MTHFD1*

MTR- syntaza metioniny

NO- ang. *Nitric Oxide*, tlenek azotu

NOS- ang. *Nitric Oxide Synthase*, syntaza NO

eNOS- śródbłonkowa syntaza NO

iNOS- indukowana syntaza NO

nNOS- neuronalna syntaza NO

OCBZ- okskarbazepina

OUN- ośrodkowy układ nerwowy

PB- fenobarbital

PCR-RFLP- ang. *Polymerase Chain Reaction– Restriction Fragment Length Polymorphism*, polimerazowa reakcja łańcuchowa z zastosowaniem enzymów restrykcyjnych

PRMT I- N-metylotransferaza argininowa typu I

SAH- S- adenozylohomocysteina

SAM- S- adenozylometionina

TGB- tiagabina

THF- tetrahydrofolian

TNF- $\alpha$ - ang. *Tumor Necrosis Factor*, czynnik martwicy nowotworów

TPM- topiramet

VCAM-1- ang. *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*, naczyniowa molekula adhezyjna-1

VPA- kwas walproinowy

VGB- wigabatryna

# 1. Wprowadzenie

## 1.1. Rys historyczny

Padaczka należy do jednych z najwcześniej udokumentowanych w piśmiennictwie schorzeń człowieka. Wzmianki dotyczące padaczki odnaleziono już w babilońskim kodeksie Hammurabiego z XVIII wieku p.n.e. Napady padaczkowe były także opisywane w staroegipskich papirusach Kahuna i Ebersa z 1550 roku p.n.e. Jednakże na przestrzeni dziejów poglądy na pochodzenie i leczenie tej przypadłości w różnych kulturach zależały od poziomu rozwoju wiedzy medycznej i panującej filozofii. Z powodu braku wytłumaczenia nagłych, często bardzo spektakularnych objawów, przez wiele wieków padaczka uchodziła za świętą chorobę (*morbus sacer*) będącą zemstą bogów. Hipokrates uważał padaczkę za chorobę mózgu, dotyczącą flegmatyków, którą należy leczyć dietą i odpowiednim postępowaniem. Wzmianki o osobach chorych na padaczkę można odnaleźć także w Biblii (na przykład Mk 9, 14-29)<sup>1, 2</sup>. W

Średniowieczu i w Odrodzeniu osoby z padaczką uważano za nawiedzone, opętane przez siły nieczyste i palono je na stosie (Rys. 1). Wraz z upływem wieków padaczka straciła swój magiczny i mistyczny charakter, a poglądy na temat jej pochodzenia i leczenia ulegały zmianom. W ostatnim stuleciu, dzięki



Rysunek 1. Średniowieczna ilustracja przedstawiająca chorego na padaczkę. Les Très Riches Heures du Duc de Berry, folio 166 r "Egzorcyzm", XV w.

<sup>1</sup> Owczarek K.: *Aspekty historyczne padaczki*. EPI 2004; 3: 13-16

<sup>2</sup> Błaszyk B.: *Święta choroba czyli historia padaczki*. Medical Studies 2003; 1: 209-212

nowym metodom molekularnym oraz diagnostycznym, zakres wiedzy na temat etiopatogenezy i leczenia padaczki znacznie się poszerzył.

## 1.2. Definicja padaczki i rodzaje napadów padaczkowych

Padaczka jest zespołem objawów, z których dominującym są powtarzalne wielomodalne incydenty objawów. Natomiast napad padaczkowy jest uważany za przejściowe zaburzenie fizjologii mózgu, powstające na skutek nadmiernych wyładowań populacji komórek nerwowych o dużym stopniu synchronizacji, któremu towarzyszą objawy somatyczne, wegetatywne i psychiczne lub połączenia tych objawów. Według prof. Jerzego Majkowskiego: *Padaczka nie jest swoistą chorobą w powszechnym znaczeniu pojęcia choroby, a jest to raczej zespół kliniczny o różnorodnej etiologii, który może wykazywać cechy regresji, statyczne lub postępujące. Cechą charakterystyczną padaczki jest okresowość występowania nadmiernego pobudzenia neuronów, przejawiająca się podklinicznymi wyładowaniami w zapisie EEG (elektroencefalografia) lub napadami klinicznymi*<sup>3</sup>. Obecnie napady padaczkowe klasyfikuje się według opublikowanej i adoptowanej w 1989 roku „*Proposal revised for classification of epilepsies and epileptic syndromes*”, zaproponowanej w 1981 roku przez Międzynarodową Ligę Przeciwpadaczkową (ILAE- ang. *International League Against Epilepsy*)<sup>4</sup>. Klasyfikacja wg ILAE (Tab. 1) opiera się na ocenie klinicznej rodzaju napadów oraz zapisie EEG śród- i międzynapadowym i dzieli napady padaczkowe, w zależności od inicjacji czynności padaczkowej, na częściowe o ogniskowym początku, uogólnione czyli obejmujące od początku cały mózg oraz niesklasyfikowane. Napady częściowe dalej podzieli się w zależności od stanu świadomości na proste (bez zaburzeń świadomości) i złożone (z zaburzeniami świadomości), napady uogólnione, natomiast, w zależności od obecności i rodzaju objawów ruchowych; napady częściowe proste mogą ewoluować w napady złożone. Napady częściowe, zarówno proste, jak i złożone, mogą z kolei przekształcać się w napady uogólnione. W 1989 roku Komisja ds. Klasyfikacji i Terminologii Międzynarodowej Ligi Przeciwpadaczkowej przedstawiła propozycję klasyfikacji z włączeniem zespołów padaczkowych<sup>5</sup>, w której uwzględniono przyczyny i rodzaj napadów oraz lokalizację ognisk napadowych.

---

<sup>3</sup> Majkowski J.: *Patomechanizm napadów padaczkowych i etiopatogeneza padaczki. W: Padaczka i inne stany napadowe u dzieci.* PZWL Warszawa 1992; 11-22

<sup>4</sup> Commission on classification and terminology of the International League Against Epilepsy: *Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures.* Epilepsia 1981; 22: 489-501

<sup>5</sup> ILAE Commission on classification and terminology of The International League Against Epilepsy: *Proposal for classification of epilepsies and epileptic syndrome.* Epilepsia 1989; 30: 389-399

<b>Klasyfikacja napadów padaczkowych według Międzynarodowej Ligi Przeciwpadaczkowej</b>
<b>I. Napady częściowe (rozpoczynające się ogniskowo)</b>
<b>I. A. Napady częściowe proste</b>
1. Z objawami ruchowymi
2. Z zaburzeniami somatosensorycznymi
3. Z objawami autonomicznymi
4. Z zaburzeniami psychicznymi
<b>I. B. Napady częściowe złożone</b>
1. Początek częściowy prosty, po czym dołącza się zaburzenie świadomości:
a) z cechami napadów częściowych i dołączającymi się zaburzeniami świadomości
b) z automaty zmami
2. Z zaburzeniami świadomości od początku:
a) tylko z zaburzeniami świadomości
b) z automaty zmami
<b>I. C. Napady częściowe rozwijające się w uogólnione</b>
1. Napady częściowe proste przechodzące w uogólnione
2. Napady częściowe złożone przechodzące w uogólnione
3. Napady częściowe proste przechodzące w złożone, a następnie w uogólnione
<b>II. Napady uogólnione (drgawkowe lub niedrgawkowe)</b>
<b>II. A. Napady nieświadomości</b>
1. Napady nieświadomości
2. Nietypowe napady nieświadomości
<b>II. B. Napady miokloniczne</b>
<b>II. C. Napady kloniczne</b>
<b>II. D. Napady toniczne</b>
<b>II. E. Napady toniczno-kloniczne</b>
<b>II. F. Napady atoniczne</b>
<b>III. Napady niesklasyfikowane (należą tu wszystkie napady, które nie mogą być sklasyfikowane z powodu niewystarczających lub niekompletnych danych oraz te, które nie dają się ująć w opisanych kategoriach)</b>

*Tabela 1. Klasyfikacja napadów padaczkowych według Międzynarodowej Ligi Przeciwpadaczkowej<sup>4</sup>*



### 1.3. Epidemiologia padaczki

Padaczka jest jedną z najczęstszych chorób neurologicznych. Liczbę chorych na padaczkę na świecie szacuje się na ok. 50 milionów. Wskaźnik zachorowalności na padaczkę wynosi ok. 60/100 tys. i jest najwyższy u dzieci do 1 r.ż. oraz osób po 60 r.ż., natomiast wskaźnik rozpowszechnienia padaczki określa się na 1000/100 tys. osób. Padaczka występuje 1,1 – 1,5 razy częściej u mężczyzn niż u kobiet. Przyjmuje się, że w Polsce na padaczkę choruje ok. 400 tys. osób<sup>6</sup>.

### 1.4. Etiologia padaczki

Pomimo ciągłego udoskonalania i wprowadzania nowych metod diagnostycznych przyczyna padaczki pozostaje nieznana w 65-75 % przypadków. Etiologia pozostałych, około 1/3, zdiagnozowanych przypadków jest zróżnicowana w zależności od wieku pacjentów. Najczęstsze znane przyczyny padaczki to: choroby naczyniowe, choroby wrodzone, urazy głowy, nowotwory, choroby zwyrodnieniowe i metaboliczne, infekcje oraz predyspozycja genetyczna<sup>7</sup>.

### 1.5. Epileptogeneza i neurochemiczne podstawy napadów padaczkowych

Zjawiska towarzyszące powstawaniu, rozwijaniu się i rozprzestrzenianiu napadu padaczkowego nie zostały dotychczas jednoznacznie wyjaśnione. Uważa się, że napad padaczkowy powstaje w wyniku nieprawidłowych wyładowań neuronów strefy znajdującej się pomiędzy zmienioną na skutek różnych stanów patologicznych strukturą (uszkodzenie epileptogenne) a okolicą zdrową. Obszar ten, nazwany „strefą pośrednią” może indukować czynność bioelektryczną pod postacią napadowych wyładowań depolaryzacyjnych i stać się ogniskiem padaczkowym, które definiuje się jako „obszar neuronalny potrzebny i wystarczający, aby rozpocząć napad padaczkowy”<sup>6</sup>. Uważa się również, że patologiczne wyładowania neuronalne mogą powstawać na podłożu różnych mechanizmów neurochemicznych, w tym działania czynników zewnątrzkomórkowych takich jak: zmiany w biosyntezie i efekcie oddziaływania neuroprzekazników, czynników wewnątrzkomórkowych, do których można zaliczyć zaburzenia gospodarki jonowej i stanu energetycznego komórki oraz czynników błonowych, wśród których wskazuje się na zaburzenia czynności receptorów, pomp i kanałów jonowych.

---

<sup>6</sup> Jędrzejczak J.: *Padaczka*. BNP Lublin 2006: 13-17

<sup>7</sup> Hauser A.W., Annegers J.F., Kurland L.T.: *Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935–1984*. *Epilepsia* 1993; 34(3): 453-468

### 1.5.1. Rola kanałów jonowych w patomechanizmie padaczki

Napadowe wyładowania depolaryzacyjne są wynikiem gwałtownej zmiany potencjałów błonowych grup neuronów. Depolaryzacja błony komórkowej, zmieniająca jej potencjał z -85 mV na +30 mV, następuje na skutek nasilonej aktywności kanałów jonowych i napływu do wnętrza komórki jonów wapnia, aktywujących kanały kationowe. Następnie w wyniku otwarcia kanałów potasowych i chlorkowych oraz działania pompy sodowo-potasowej dochodzi do jej repolaryzacji, która jest tłumiona na skutek szybko następujących po sobie depolaryzacji.

Uważa się, że zmiany w budowie i funkcji kanałów jonowych, zarówno wapniowych, jak i potasowych oraz sodowych, mogą prowadzić do niestabilności potencjałów błonowych, masywnych wyładowań grup neuronów, a w ich następstwie do napadu padaczkowego.

Zarówno wysokonapięciowe (L, N, P/Q, R), jak i niskonapięciowe kanały wapniowe T mogą odgrywać ważną rolę w patogenezie padaczki. Zasadniczo kanały wapniowe złożone są z podjednostki  $\alpha_1$ , która tworzy ścianę kanału oraz podjednostek  $\alpha_2$ ,  $\delta$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  wpływających na kinetykę i amplitudę prądów jonowych. W piśmiennictwie wykazano ekspresję pięciu podstawowych klas podjednostek  $\alpha_1$  (A-E). Jednocześnie uważa się, że mutacja w podjednostce  $\alpha_1A$  kanałów T jest związana z patogenezą napadów nieświadomości, a związki oddziałujące na kanały T (etosuksymid) od ponad 20 lat używane są w ich leczeniu.

W patomechanizmie napadów padaczkowych mogą również brać udział napięciowozależne kanały sodowe. Kanały sodowe są zwykle złożone z jednostki  $\alpha$  zawierającej: 4 podjednostki i 6 domen transbłonowych oraz z jednej lub kilku jednostek  $\beta$  zawierającej 1 domenę transbłonową<sup>8</sup>. W ciągu ostatnich kilkunastu lat w piśmiennictwie ukazały się wyniki badań nad mutacjami w genach dla kanałów sodowych wskazujące na ich udział w zróżnicowanych napadach padaczkowych. Jak wynika z badań mutacje w genie kodującym podjednostkę  $\alpha_1$  (SCN1A) oraz podjednostkę  $\alpha_2$  (SCN2A), a także podjednostkę  $\beta_1$  (SCN1B) są związane z uogólnioną padaczką z drgawkami gorączkowymi plus (GEFS+, ang. *Generalized Epilepsy with Febrile Seizures plus*), w której spektrum mieści się również ciężka padaczka miokloniczna niemowląt oraz zespół Drawet. Natomiast w łagodnych rodzinnych drgawkach noworodków i dzieci (BFNIS, ang. *Benign Familial Neonatal- Infantile Seizures*) opisano mutację w podjednostce  $\alpha_2$  (SCN2A)<sup>9</sup>.

Jak wynika z piśmiennictwa, w powstawaniu napadów padaczkowych mogą także uczestniczyć kanały potasowe. Kanały potasowe są złożone z czterech podjednostek, z których każda ma sześć sekwencji

---

<sup>8</sup> Goldin A.L.: *Resurgence of sodium channel research*. Annu. Rev. Physiol. 2001; 63: 871-894

<sup>9</sup> Mulley J.C., Scheffer I.E., Petrou S., Berkovic S.F.: *Channelopathies as a genetic cause of epilepsy*. Curr. Opin. Neurol. 2003; 16: 171-176

przebłonowych. W stanie fizjologicznym kanały te są odpowiedzialne za repolaryzację błony wywołaną jonami wapnia i sodu, a także neurotransmiterami receptorów bramkowanych ligandami. W repolaryzacji uczestniczy jedynie część kanału potasowego określana jako kanał M. Aktywacja tego kanału znosi hiperpolaryzację błony. Opisano, różne mutacje genów kodujących białka KCNQ2 i KCNQ3<sup>10</sup> kanałów potasowych w łagodnych rodzinnych drgawkach noworodków (BFNC, ang. *Benign Familial Neonatal Convulsions*).

Uważa się, że w patomechanizmie napadów padaczkowych może również odgrywać rolę nieprawidłowe funkcjonowanie ATP-azy sodowo-potasowej. W piśmiennictwie ukazały się wyniki badań na temat mutacji w genie kodującym jej podjednostkę  $\alpha_2$  (ATP1A2), która może prowadzić do występowania rodzinnej migreny hemiplegicznej i łagodnych rodzinnych drgawek niemowląt<sup>11</sup>.

### 1.5.2. Znaczenie układu glutaminergicznego w mechanizmie napadów padaczkowych

Wśród licznych hipotez patomechanizmu padaczki uwzględnia się także mechanizm nadmiernego pobudzenia w układzie glutaminergicznym. Kwas glutaminowy jest jednym z najważniejszych neuroprzebieżników regulujących przebieżnictwo synaptyczne i powolne zmiany plastyczne. Uważa się, że oddziaływanie kwasu glutaminowego odbywa się poprzez dwie grupy receptorów: receptory jonotropowe (iGluR) będące kanałami jonowymi bramkowanymi ligandami oraz receptory metabotropowe (mGluR), których pobudzenie następuje poprzez aktywację białka G i fosfolipazy C, i wywołuje aktywację wewnątrzkomórkowych systemów przebieżnictwa sygnałów. Do receptorów glutaminergicznym jonotropowym zaliczamy (nazwane od ich wybieżczych agonistów): receptory kwasu N-metylo-D-asparaginowego (NMDA), receptory kwasu  $\alpha$ -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego (AMPA) oraz kwasu kainowego.

Receptor NMDA zbudowany jest z czterech podjednostek tworzących heterodimery. Opisano dwie rodziny podjednostek receptora NMDA: NMDAR1 występującą w 8 izoformach oraz NMDAR2, w skład której wchodzi cztery podjednostki (oznaczone A, B, C, D). Jak wykazano, aktywacja receptorów NMDA wymaga przyłączenia agonisty w dwóch miejscach, z których główne stanowi miejsce wiązania NMDA lub glutaminianu. Uważa się, że oprócz miejsca wiążącego NMDA, do którego mają powinowactwo także: kwas L-asparaginowy, kwas chinolinowy, L-homocysteinowy i homocysteina (Hcy), receptor NMDA

---

<sup>10</sup> Graves T.D.: *Ion channels and epilepsy*. QJM 2006; 99(4): 201-217

<sup>11</sup> Vanmolkot K.R., Kors E.E., Hottenga J.J., Terwindt G.M., Haan J., Hoefnagels W.A., Black D.F., Sandkuijl L.A., Frants R.R., Ferrari M.D., van den Maagdenberg A.M.: *Novel mutations in the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase pump gene ATP1A2 associated with familial hemiplegic migraine and benign familial infantile convulsions*. Ann. Neurol. 2003; 54(3): 360-366

posiada szereg oddzielnych miejsc wiążących m.in. glicynę, jony cynku i magnezu, poliamidy (spermina, spermidyna) oraz miejsce redoks wiążące tlenek azotu (NO, ang. *Nitric Oxide*). Ponadto, jak wykazano receptory NMDA podlegają aktywacji poprzez związanie glicyny lub seryny z miejscem glicynowym oraz inhibicji przez jony magnezu i cynku. Glutaminian natomiast wywiera działanie na receptor NMDA poprzez kanały jonowe bramkowane ligandem prowadzące do wzrostu przewodności jonowej. Otwarty kanał jonowy tego receptora jest wysokoprzepuszczalny dla dokomórkowego prądu jonów wapniowych i sodowych oraz potasowych. Napływ jonów wapnia do neuronów i indukcja tzw. sygnału wapniowego aktywuje min. fosfolipazę A<sub>2</sub>, syntazę NO (NOS, ang. *Nitric Oxide Synthase*) oraz proteazy. Na funkcjonowanie receptora NMDA wpływa zatem potranslacyjna fosforylacja białek jego podjednostek, katalizowana przez kinazy białkowe zależne od wapnia. Zaobserwowano, że podczas jego wzbudzenia dochodzi do modyfikacji mRNA kodującego podjednostki receptora NMDA oraz do modyfikacji potranslacyjnej<sup>12</sup>. Modyfikacje te dalej mogą prowadzić do zmiany czasu otwarcia kanałów, czasu ich wzbudzenia oraz do zmniejszenia inhibicji zależnej od jonów magnezu. Wyniki badań klinicznych wykazują także, że w procesie epileptogenezy dochodzi do wzrostu wrażliwości i gęstości receptorów aminokwasów pobudzających w określonych obszarach mózgu<sup>13</sup>. Ponadto uważa się, że receptory NMDA mogą odgrywać kluczową rolę w powstawaniu i utrzymywaniu napadów padaczkowych. Działanie to potwierdzono w badaniach na zwierzętach, wykazując hamującą czynność drgawkową dla antagonistów receptora NMDA<sup>14</sup>.

Poza glutaminianem znajdującym się w tzw. puli przekaźnikowej neuronów, wykazano jego obecność również w tzw. puli metabolicznej znajdującej się w neuronach i w gleju. Jak wiadomo, glutaminian z puli metabolicznej może być uwalniany i ulegać kumulacji w przestrzeni pozakomórkowej, na skutek uszkodzenia neuronów lub upośledzenia jego wychwytu zwrotnego oraz może aktywować receptory poza synapsą lub w sąsiednich synapsach, które mogą być związane z epileptogenezą. W badaniach na zwierzętach domózgowe iniekcje glutaminianu wywoływały drgawki.

W odróżnieniu od receptora NMDA, receptor glutaminergiczny AMPA biorący również udział w szybkim przekaźnictwie synaptycznym, wykazuje dużą przepuszczalność dla jonów sodu i potasu oraz niską dla jonów wapnia. Podwyższony poziom receptorów AMPA, świadczący o jego udziale w patomechanizmie

---

<sup>12</sup> Chapman A.G.: *Glutamate and epilepsy*. J. Nutr. 2000; 130(suppl 4): 1043S-1045S

<sup>13</sup> Steffens M., Huppertz H.J., Zentner J., Chauzit E., Feuerstein T.J.: *Unchanged glutamine synthetase activity and increased NMDA receptor density in epileptic human neocortex: implications for the pathophysiology of epilepsy*. Neurochem. Int. 2005; 47(6): 379-384

<sup>14</sup> Lukomskaya N.Y., Rukoyatkina N.I., Gorbunova L.V., Gmiro V.E., Magazanik L.G.: *Studies of the roles of NMDA and AMPA glutamate receptors in the mechanism of corasole convulsions in mice*. Neurosci. Behav. Physiol. 2004; 34(8): 783-789

padaczki, opisano w badaniach nad hipokampem u pacjentów z padaczką skroniową<sup>15</sup>. Natomiast kanały kainowe są najmniej poznanymi receptorami glutaminianowymi a brak selektywnych agonistów i antagonistów utrudnia odróżnienie ich funkcji od receptora AMPA.

W mechanizmie epileptogenezy mogą również uczestniczyć metabotropowe receptory glutaminergiczne, które zostały podzielone na trzy grupy. Do pierwszej zaliczono postsynaptyczne receptory mGluR1 i mGluR5, do drugiej presynaptyczne receptory mGluR2 i mGluR3, a do trzeciej presynaptyczne receptory mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8. Receptory pierwszej grupy są sprzężone z fosfolipazą C, pozostałe z cyklazą adenylową. Jednocześnie bezpośrednie pobudzenie receptorów grupy pierwszej może wywoływać aktywację nieselektywnych kanałów kationowych, kanałów wapniowych typu L, inaktywację kanałów potasowych oraz nasilenie wymiany sodowo-wapniowej. Ponadto receptory te mogą upośledzać hamujące działanie GABA (kwas  $\gamma$ -aminomasłowy) oraz nasilać uwalnianie glutaminianu i odpowiedź receptorów NMDA i AMPA. Uważa się także, że szczególną rolę w epileptogenezie mogą odgrywać receptory mGluR1, których pobudzenie wydłuża czas trwania potencjałów międzynapadowych i napadowych okolic hipokampa<sup>16</sup>. Natomiast stymulacja receptorów mGluR grupy drugiej zwiększa częstotliwość tylko wyładowań międzynapadowych. Efektem ich pobudzenia jest zatem zahamowanie uwalniania glutaminianu z puli neurotransmitterowej zakończeń presynaptycznych oraz uwalnianie neurotrofin w astrogleju. Uważa się, że w padaczce, a szczególnie w początkowej jej fazie, dochodzi do nasilonej syntezy receptorów tej grupy i następnie jej obniżenia w czasie trwania choroby, co może prowadzić do zaburzenia równowagi pomiędzy neurotransmiterami pobudzającymi nad hamującymi. Największym przedstawicielem neurotransmiterów o charakterze hamującym jest GABA.

---

<sup>15</sup> Hosford D.A., Crain B.J., Cao Z., Bonhaus D.W., Friedman A.H., Okazaki M.M., Nadler J.V., McNamara J.O.: *Increased AMPA-sensitive quisqualate receptor binding and reduced NMDA receptor binding in epileptic human hippocampus*. J. Neurosci. 1991; 11: 428-434

<sup>16</sup> Stoop R., Conquet F., Pralong E.: *Determination of group I metabotropic glutamate receptor subtype involved in the frequency of epileptiform activity in vitro using mGluR1 and mGluR5 mutant mice*. Neuropharmacology 2003; 44(2): 157-162

### 1.5.3. Rola układu GABA-ergicznego w zjawiskach drgawkowych

Kwas  $\gamma$ -aminomasłowy jest głównym neuroprzekaźnikiem hamującym, działającym na trzy typy receptorów: GABA-A, GABA-B i GABA-C. GABA-A i GABA-C są receptorami jonotropowym zbudowanymi z wielu podjednostek tworzących kanał. Najlepiej poznano budowę receptora GABA-A, w skład którego wchodzi pięć podjednostek ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\sigma$ ) wykazujących różne izoformy kodowane przez odrębne geny. Dotychczas z mózgu ssaków udało się sklonować piętnaście różnych podtypów podjednostek receptora GABA-A. Ponadto wykazano, że receptor GABA-A jest kompleksem białkowym integralnie związanym z kanałem chlorkowym. Mechanizm działania tego receptora polega na związaniu liganda GABA i otwieraniu wybiórczego kanału chlorkowego co powoduje zwiększenie wewnątrzneuronalnego ładunku ujemnego i wywołuje szybkie postsynaptyczne potencjały hamujące. W literaturze medycznej opisano mutacje podjednostki  $\gamma_2$  receptora GABA-A upośledzające szybkie hamowanie GABA-ergiczne oraz mutacje w podjednostki  $\alpha_1$  prowadzące do dysfunkcji bramkowania kanału jonowego<sup>17</sup> w padaczce. Uważa się, że mutacja podjednostki  $\gamma_2$  jest sprzężona z zespołem GEFS+. Natomiast rola receptorów GABA-B i GABA-C w zjawiskach padaczkowych jest słabo poznana. Wiadomo, że GABA-B są receptorami metabotropowymi regulującymi czynność kanałów jonowych. Jak wykazano presynaptyczne receptory GABA-B hamują aktywność kanałów wapniowych i uwalnianie neuroprzekaźników (w tym kwasu glutaminowego), natomiast postsynaptyczne receptory GABA-B aktywują kanały potasowe i generują wolny hamujący potencjał synaptyczny. Uważa się również, że poza zmianami strukturalnymi receptorów GABA, ważną rolę w zjawiskach epileptogennych odgrywa także ilość aktywnych receptorów. Wykazano, że podczas stanu padaczkowego dochodzi do zmniejszenia liczby funkcjonalnych receptorów GABA<sup>18</sup>. Upośledzenie hamowania GABA-ergicznego może być także skutkiem zaburzeń funkcji enzymów biorących udział w syntezie GABA. Uważa się, że spadek ekspresji genów kodujących dekarboksylazę glutaminianową daje w efekcie obniżenie poziomu GABA<sup>19</sup>. W niektórych badaniach wykazano, że w stanie padaczkowym hamujące działanie GABA może przekształcić się w efekt pobudzający. Uważa się także, że wzrost uwalniania GABA i nasilenie ekspresji genów kodujących niektóre podjednostki receptora GABA-A może stanowić mechanizm kompensujący w przebiegu padaczki.

W wyjaśnianiu mechanizmów zjawisk drgawkowych, oprócz układu GABA-ergicznego i glutaminergicznego, bierze się także pod uwagę udział innych neuroprzekaźników.

---

<sup>17</sup> Baulac S., Huberfeld G., Gourfinkel-An I., Mitropoulou G., Beranger A., Prudhomme J.F., Baulac M., Brice A., Bruzzone R., LeGuern E.: *First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene*. Nat. Genet. 2001; 28: 46-48

<sup>18</sup> Chen J.W., Naylor D.E., Wasterlain C.G.: *Advances In the pathophysiology of status epilepticus*. Acta Neurol. Scand. 2007; 115(suppl 186): 7-15

<sup>19</sup> Freichel C., Potschka H., Ebert U., Brandt C., Loscher W.: *Acute changes in the neuronal expression of GABA and glutamate decarboxylase isoforms in the rat piriform cortex following status epilepticus*. Neuroscience 2006; 141(4): 2177-2194

#### 1.5.4. Rola innych neuroprzebieżników w patogenezie padaczki

Acetylocholina jest waźnym przebieżnikiem ośrodkowego układu nerwowego (OUN) działającym głównie przez metabotropowe receptory muskarynowe i w mniejszym stopniu, przez receptor nikotynowy. Wykazano, że pobudzenie metabotropowych receptorów muskarynowych w modelach doświadczalnych zmniejsza przebieżnictwo zależne od napięcia jonów potasowych oraz zwiększa napływ jonów wapniowych i sodowych do komórki, co wywołuje depolaryzację błony komórkowej i wystąpienie drgawek. Natomiast neuronalne receptory nikotynowe są receptorami jonotropowymi i cechują się budową heterometryczną. Dotychczas sklonowano ponad 10 genów dla podjednostek  $\alpha 2$ - $\alpha 12$  i  $\beta 2$ - $\beta 4$  receptorów nikotynowych. Uważa się, że receptory te uczestniczą w presynaptycznej regulacji wydzielania innych przebieżników, w tym aminokwasów pobudzających. Według wyników badań za nocne napady padaczkowe mogą odpowiadać mutacje receptora nikotynowego  $\alpha 1$  i  $\beta 2$ <sup>20</sup>, a nocna padaczka z płata czołowego dziedziczona autosomalnie dominująco może być związana z mutacjami podjednostki  $\alpha 4$  lub  $\beta 2$ <sup>21</sup>.

Natomiast katecholaminy i serotonina wywierają głównie hamujący wpływ na neurony kory mózgowej. Jak wykazano, zwiększenie przebieżnictwa monoaminergicznego działa przeciwdrgawkowo zaś obniżenie poziomu monoamin może nasilać lub wywołać stany drgawkowe.

#### 1.5.5. Znaczenie tlenu azotu w patomechanizmie padaczki

Wykazano, że NO bierze udział w procesach neurotransmisji i prawdopodobnie może odgrywać rolę w patogenezie padaczki. Tlenek azotu jest syntezowany z L- argininy (Arg) przy udziale NOS. Badania immunohistochemiczne wykazały obecność NOS w neuronach prądkowia, hipokampa, podwzgórza, przodomózgowia, śródmózgowia oraz mózdku. Ponadto wykazano, że NO uczestniczy w transdukcji sygnału w receptorach glutaminergicznych poprzez presynaptyczne działanie pobudzające uwalniania glutaminianu z zakończeń synaptycznych. W niektórych pracach doświadczalnych obserwowano efekt drgawkowy po podaniu inhibitorów NOS i Arg<sup>22</sup>. Przypuszcza się, że NOS i Arg mogą pośrednio wywoływać drgawki poprzez uczestnictwo w mechanizmach indukowanych pobudzeniem receptorów

---

<sup>20</sup> Hirose S., Okada M., Kaneko S., Mitsudome A.: *Molecular genetics of human familial epilepsy syndromes*. *Epilepsia* 2002; 43(suppl 9): 21-25

<sup>21</sup> Aridon P., Marini C., Di Resta C., Brill E., De Fusco M., Politi F., Parrini E., Manfredi I., Pisano T., Pruna D., Curia G., Cianchetti C., Pasqualetti M., Becchetti A., Guerrini R., Casari G.: *Increased sensitivity of the neuronal nicotinic receptor  $\alpha 2$  subunit causes familial epilepsy with nocturnal wandering and ictal fear*. *Am. J. Hum. Genet.* 2006; 79: 342-350

<sup>22</sup> Khavandgar S., Homayoun H., Dehpour A.R.: *The role of nitric oxide in the proconvulsant effect of  $\delta$ -opioid agonist SNC80 in mice*. *Neurosci. Lett.* 2002; 329: 237-239

NMDA. Jak wykazano, pobudzenie receptorów NMDA w skrawkach hipokampa nasila uwalnianie NO w sposób zależny od jonów wapnia a łatwo dyfundujący przez błony komórkowe NO, z jednej strony wzmacnia presynaptyczne uwalnianie glutaminianu<sup>23</sup>, ale z drugiej strony związek ten może hamować aktywność receptora NMDA, poprzez wpływ na miejsce *redoks* w tym receptorze. Zatem w modelach zwierzęcych, postulowane jest zarówno pro-, jak i przeciwdrgawkowe jego działanie.

## 1.6. Diagnostyka padaczki

Mimo znacznego postępu wiedzy i rozwoju technik diagnostycznych uzyskanie pełnego obrazu stanu chorobowego pacjenta z padaczką nadal jest procesem trudnym i wieloetapowym. W diagnostyce każdego przypadku padaczki niezbędny jest wywiad, badanie przedmiotowe oraz badania laboratoryjne. Prawidłowo przeprowadzony wywiad stanowi podstawę nie tylko dla rozpoznania padaczki, ale powinien także dostarczać informacji na temat możliwych przyczyn i rodzaju napadów bądź zespołu padaczkowego. Badanie przedmiotowe i badania laboratoryjne takie jak: badania biochemiczne, badania neuropsychiatryczne i badania obrazowe są pomocne w diagnostyce różnicowej oraz w określeniu etiologii padaczki.

Podstawowym badaniem dodatkowym w diagnostyce padaczki jest EEG. Dzięki uzupełnieniu klasycznego badania EEG nowoczesnymi technikami wideometrycznymi, metodą długotrwałego monitorowania i technikami mapowania, obecnie EEG jest najważniejszym narzędziem umożliwiającym potwierdzenie rozpoznania, określenia typu napadów, możliwości leczenia i rokowania.

Prawidłowe rozpoznanie rodzaju napadów lub zespołu padaczkowego jest niezwykle ważne dla określenia rokowania, ale przede wszystkim dla wyboru optymalnego leczenia.

## 1.7. Leczenie padaczki

Leczenie padaczki w każdym przypadku ma na celu osiągnięcie u chorego jak najskuteczniejszej kontroli napadów. Zmniejszenie częstości, ciężkości lub całkowite wyeliminowanie napadów padaczkowych można uzyskać dzięki unikaniu czynników wyzwalających, poprzez farmakoterapię lub leczenie chirurgiczne.

Do podstawowych, stosowanych dziś leków przeciwpadaczkowych (LPP) zaliczamy: karbamazepinę (CBZ), kwas walproinowy (VPA), etosuksymid (ESM), fenytoinę (DPH), fenobarbital (PB), prymidon i leki z grupy benzodwuzepiny. W ciągu ostatnich kilkunastu lat rozpoczęto stosowanie leków z grupy tzw. leków przeciwpadaczkowych nowej generacji (LPP NG), wśród których w Polsce zarejestrowano do leczenia:

---

<sup>23</sup> Homayoun H., Khavandgar S., Namirianian K., Gaskari S.A., Dehpour A.R.: *The role of nitric oxide in anticonvulsant and proconvulsant effects of morphine in mice*. Epilepsy Res. 2002; 48(1-2): 33-41



wigabatrynę (VGB), lamotryginę (LTG), felbamat (FBM), topiramát (TPM), tiagabinę (TGB), okskarbazepinę (OCBZ), gabapentynę (GBP) i lewetyracetam (LEV)<sup>24</sup>.

Leki przeciwpadaczkowe stanowią heterogenną grupę leków pod względem parametrów farmakokinetycznych i możliwości regulacji danych funkcji organizmu, zasadniczo opartych na kilku mechanizmach: wzmacnianiu hamującego przekazywania GABAergicznego, hamowaniu pobudzającego działania aminokwasów lub modulowaniu pobudliwości błon komórkowych.

Nasilenie efektu GABA-ergicznego z udziałem LPP, można uzyskać poprzez pobudzenie jonotropowych receptorów GABA-A, zwiększenie ilości GABA w szczelinie synaptycznej lub pobudzającą modulację kompleksu receptorowego GABA-A<sup>25</sup>. W jednym z tych mechanizmów działa VGB, która blokując nieodwracalnie enzym transaminazę GABA (GABA-T) zwiększa pulę dostępnego GABA w szczelinie synaptycznej. Podobny efekt działania wykazuje TGB, która hamuje neuronalny i głojowy wychwyt zwrotny GABA. Natomiast benzodwuzepiny i barbiturany działają w różnych miejscach OUN zwiększając aktywowany GABA hamujący prąd chlorkowy.

Mechanizm hamujący pobudzające działanie aminokwasów wykazuje zarówno FBM, który podwyższa próg drgawkowy prawdopodobnie poprzez blokowanie czynności receptora NMDA, jak i TPM prawdopodobnie przez obniżanie aktywności receptora glutaminianowego bramkowanego kwasem kainowym<sup>26</sup>. Jednakże mechanizm działania przeciwdrgawkowego TPM nie jest jednokierunkowy, może on także działać hamująco na izoenzym anhidrozy węglanowej oraz na napięciowozależne kanały sodowe, a także wzmacniać efekt GABA-ergiczny.

Natomiast stabilizowanie pobudliwości błon komórkowych może następować poprzez oddziaływanie LPP na kanały jonowe sprzężone z receptorami lub kanały jonowe napięciowozależne. Działanie modelujące czynność kanałów sodowych wykazują: DPH, CBZ, OCBZ, LTG oraz VPA. W mechanizmie działania tych leków następuje akumulacja kanałów sodowych, która w stanie inaktywacji ogranicza wyładowania o dużej częstotliwości potencjałów czynnościowych zależnych od sodu i rozprzestrzenianie się napadowości.

Uważa się, że działanie hamujące prądy jonowe związane z kanałami wapniowymi wykazuje ESM, który inaktywuje szybko otwierające się i o niskim progu pobudliwości kanały typu T. Zaś kanały wapniowe o wysokim progu pobudliwości typu: L, N, P mogą hamować min. DPH, PB, LTG.

Standardy diagnostyki i leczenia chorych z padaczką w Polsce zostały opracowane i opublikowane w 2000 roku przez Komisję Polskiego Towarzystwa Epileptologii<sup>27</sup>, a w 2006 roku Komisja Międzynarodowej Ligi Przeciwpadaczkowej opublikowała wytyczne dotyczące stosowania LPP<sup>28</sup>.

---

<sup>24</sup> Jędrzejczak J., Zwoliński P.: *Nowe leki przeciwpadaczkowe*. Fundacja Epileptologii Warszawa 2000

<sup>25</sup> Benetello P.: *New antiepileptic drugs*. Pharmacol. Res. 1995; 314: 155-162

<sup>26</sup> Bradley W.G., Daroff R.B., Fenichel G.M., Jankovic J.: *Neurologia w praktyce klinicznej*. Lublin 2006

<sup>27</sup> Komisja Polskiego Towarzystwa Epileptologii. *Standardy Diagnostyki i Leczenia Chorych z Padaczką w Polsce*. Epileptologia 2002

Obecnie nadal nie istnieją idealne LPP. W świetle najnowszych badań leczenie chorych z padaczką LPP może prowadzić do zmiany poziomu wielu parametrów biochemicznych, w tym związków tiolowych takich jak, homocysteina (Hcy).

## 1.8. Homocysteina

### 1.8.1. Metabolizm homocysteiny

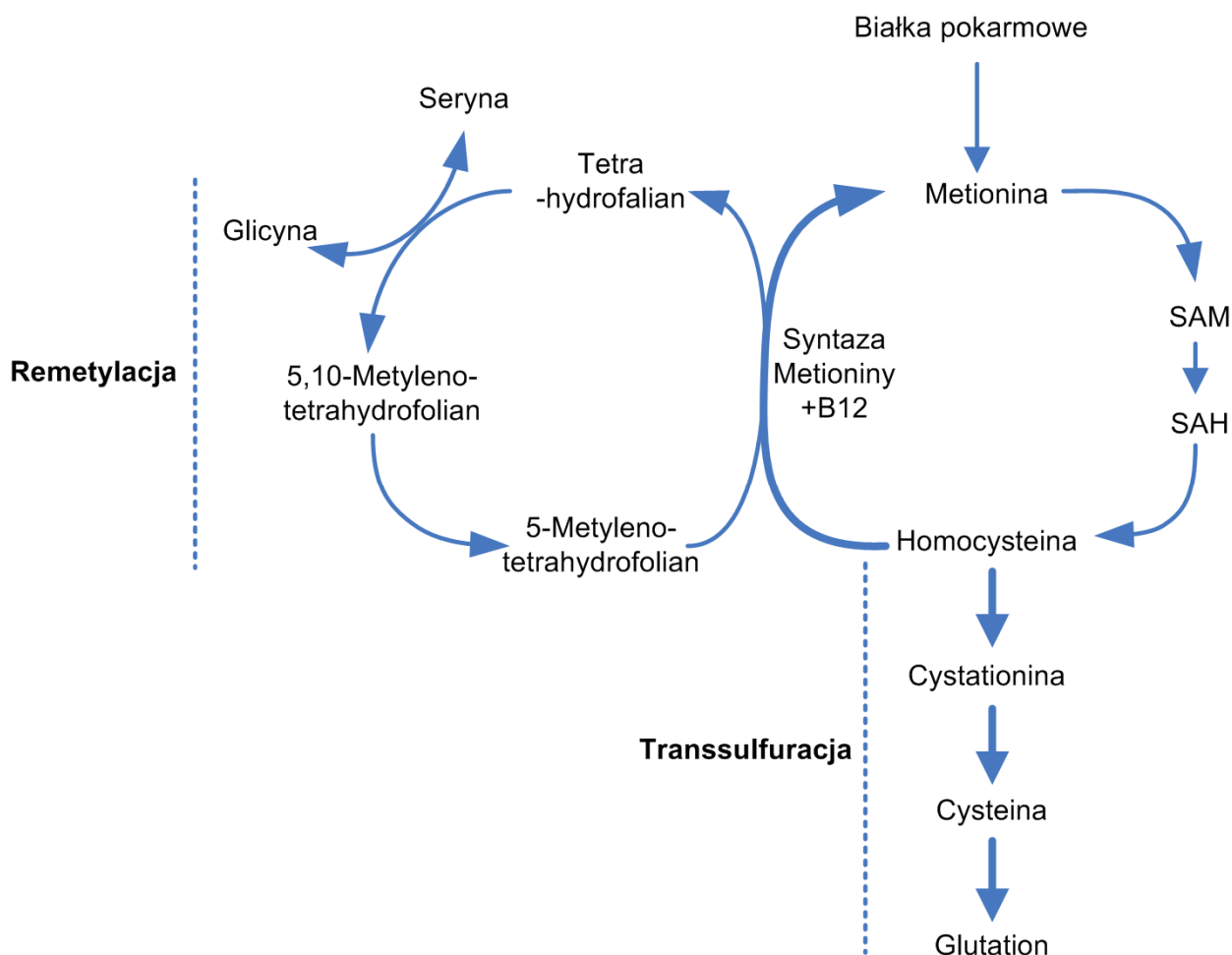
Homocysteina, aminokwas siarkowy, została odkryta w latach trzydziestych ubiegłego stulecia. Powstaje ona w procesie demetylacji metioniny (Met), aminokwasu dostarczanego w diecie. Met w tym procesie, w obecności ATP oraz adenozylotransferazy metioninowej, jest przekształcana w S-adenozylometioninę (SAM), a produktem ubocznym tej reakcji jest S-adenozylhomocysteina (SAH), która zostaje następnie hydrolizowana do Hcy. Uważa się, że SAM jest głównym donorem grup metylowych dla różnych przemian metabolicznych.

Hcy może być rozkładana w dwóch szlakach przemian metabolicznych: w procesie transsulfuracji i remetylacji (Rys. 2).

*Rysunek 2. Cykl przemian homocysteiny*

---

<sup>28</sup> Glauser T., Ben-Menachem E., Bourgeois B., Cnaan A., Chadwick D., Guerreiro C., Kalviainen R., Mattson R., Perucca E., Tomson T.: *ILAE treatment guidelines: evidence-based analysis of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes*. *Epilepsia* 2006; 47(7): 1094-1120



W przypadku niedoboru Met i niskiego stężenia SAM następuje remetylacja Hcy do Met z udziałem syntazy metioniny (MTR). Kofaktorem tej reakcji jest witamina B12, a substratem 5-metylenotetrahydrofolian (MTH), który powstaje w reakcji katalizowanej przez reduktazę metylenotetrahydrofolianową (MTHFR). Substratem dla tej reakcji jest tetrahydrofolian (THF), którego poziom zależy od dostarczanego egzogennie kwasu foliowego (FA). Wiadomo, że w regulowanie poziomu krążącej Hcy jest również zaangażowany trójfunkcyjny enzym MTHFD1 (ang. *Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase/ Methenyltetrahydrofolate Cyclohydrolase/ Formyltetrahydrofolate Synthetase*). Wykazano, że homozygoty *MTHFD1* prowadzą do wzrostu stężenia Hcy w chorobach serca i w niedorozwoju cewy nerwowej, zależnego od poziomu FA, a heterozygoty *MTHFD1* GA (G1958) są związane z regulacją poziomu cysteiny (Cys):Hcy w chorobach zwyrodnieniowych. Brak jest jednak doniesień w piśmiennictwie o udziale MTHFD1 w generowaniu Hcy u chorych z padaczką leczonych LPP.

Jak wykazano, remetylacja Hcy do Met może także przebiegać na drodze reakcji z udziałem metylotransferazy betaina:Hcy, w której betaina jest dawcą grupy metylowej, a produktami są N,N-dimetyloglicyna i Met. W przypadku dodatniego bilansu Met metabolizm Hcy kierowany jest na drogę nieodwracalnej reakcji transsulfuracji przebiegającej przy udziale syntazy cystationinowej (CBS). Kofaktorem tej reakcji jest witamina B6, a powstała w niej cystationina jest przekształcana w reakcji

katalizowanej przez cystationazę do Cys, która jest wykorzystywana do syntezy glutationu lub metabolizowana do siarczków i tauryny, i dalej wydalana z moczem<sup>29</sup>.

Aktywność obu szlaków przemian Hcy w różnych tkankach organizmu nie jest jednakowa. Reakcje remetylacji i transsulfuracji przebiegają z podobną wydajnością w nerkach, wątrobie, trzustce i w jelicie krótkim. Jednak w przypadku niedoboru CBS przemiana cystationiny do Cys nie zachodzi w śledzionie, płucach, nadnerczach i jądrach, a w mózgu i tkance tłuszczowej przy obniżonym poziomie cystationazy<sup>30</sup>. Metabolizm Hcy w ustroju jest regulowany różnymi czynnikami min. dietą i stanem hormonalnym. W zależności od aktywności enzymów, w szczególności od ich  $K_m$  (stała Michaelisa-Mentena), Hcy może być kierowana na szlak remetylacji lub transsulfuracji. Enzymy kierujące Hcy do remetylacji mają niską wartość  $K_m$  dla substratów zawierających siarkę. Cecha ta sprzyja remetylacji przy niskich stężeniach Met i hamuje ją przy wzroście stężenia SAM i SAH (produktów reakcji). Enzymy kierujące Hcy do transsulfuracji charakteryzuje wysoka wartość  $K_m$  dla substratów zawierających siarkę oraz aktywacja wysokim stężeniem SAM i SAH. Wysokie stężenie SAM aktywujące CBS hamuje powstawanie tetrahydrofolianu, natomiast wysokie stężenie SAH hamuje aktywność MTHFR i upośledza syntezę MTH. Zaburzenia w przemianach Hcy mogą prowadzić do jej podwyższonego poziomu w surowicy- hiperhomocysteinemii (hHcy).

### 1.8.2. Hiperhomocysteinemia

Hiperhomocysteinemia oznacza zwiększone stężenia Hcy w osoczu krwi spowodowane czynnikami genetycznymi i niegenetycznymi, zaburzającymi prawidłowy cykl przemian Hcy do Met. Za prawidłową wartość stężenia Hcy w osoczu krwi przyjmuje się 5-15  $\mu\text{M}$ . Stężenia Hcy od 16-30  $\mu\text{M}$  określamy jako łagodną, a 31-100  $\mu\text{M}$  jako średnio zaawansowaną, natomiast powyżej 100  $\mu\text{M}$  jako ciężką hHcy<sup>31</sup>.

Do najważniejszych czynników genetycznych mogących prowadzić do hHcy zalicza się mutacje w genie kodującym: CBS, MTHFR oraz MTR.

---

<sup>29</sup> Bald E.: *Homocysteina, niegdyś egzotyczny metabolit. W: Biotiole w warunkach fizjologicznych, patologicznych i w terapii.* Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego Kraków 2003; 73-108

<sup>30</sup> Finkelstein J.D.: *The metabolism of homocystein.: pathways and regulation.* Eur. J. Pediatr. 1998; 157(Suppl 2): 40-44

<sup>31</sup> Mudd S.H., Finkelstein J.D., Refsum H., Ueland P.M., Malinow M.R., Lentz S.R., Jacobsen D.W., Brattstrom L., Wilcken B., Wilcken D.E., Blom H.J., Stabler S.P., Allen R.H., Selhub J., Rosenberg I.H.: *Homocysteine and its disulfide derivatives: a suggested consensus terminology.* Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2000; 20: 1704-1706

Zidentyfikowano ponad 30 mutacji genu *CBS*<sup>32</sup>. Wykazano, że niedobór CBS dziedziczony autosomalnie recesywnie z *locus* na chromosomie 21q22.3 jest związany z najcięższą postacią hHcy- wrodzoną homocystynurią. Natomiast postać homozygotyczna genu *CBS* wiąże się z upośledzeniem umysłowym, skłonnością do zakrzepów i zatorów oraz osteoporozą o ciężkim przebiegu.

Najczęstszą genetycznie uwarunkowaną przyczyną hHcy są polimorfizmy genu *MTHFR*. Opisano defekty związane z mutacją punktową genu C677T w postaci termolabilnej *MTHFR* oraz mutacje punktowe A1298C i G1783A *MTHFR*<sup>33</sup>. Uważa się, że łącznie heterozygoty genu *MTHFR* występują u 40 % populacji a ich nosiciele mają szczególne predyspozycje do hHcy w przypadku niedoboru FA<sup>34</sup>.

Natomiast niedobór *MTHFR* dziedziczony autosomalnie recesywnie, z *locus* na chromosomie 1p36.6, w postaci homozygotycznej także może prowadzić do homocystynurii o ciężkim przebiegu z objawami mikrocefalii, upośledzenia umysłowego, zaburzeń ruchowych i zaniku mózdzku<sup>33</sup>.

Do niegenetycznych czynników wpływających na wzrost poziomu Hcy zalicza się: styl życia, a w szczególności palenie tytoniu<sup>35</sup>, spożywanie nadmiernych ilości alkoholu<sup>36</sup> i kawy<sup>37</sup>, dietę (ubogą w FA oraz witaminy B6 i B12), wiek (na skutek zaburzeń wchłaniania witaminy B12, osłabienia funkcji wydzielniczych nerek, zaburzeń hormonalnych w wieku postmenopauzalnym<sup>38</sup>), przewlekłe schorzenia (niewydolność nerek, cukrzyca, niedoczynność tarczycy, choroby jelit, łuszczyca i choroby

---

<sup>32</sup> Mudd S.H., Skovby F., Levy H.L., Pettigrew K.D., Wilcken B., Pyeritz R.E., Andria G., Boers G.H., Bromberg I.L., Cerone R.: *The natural history of homocysteinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency*. Am. J. Hum. Genet. 1985; 37: 1-31

<sup>33</sup> Clarke R., Woodhouse P., Ulvik A., Frost C., Sherliker P., Refsum H., Ueland P.M., Khaw K.T.: *Variability and determinants of total homocysteine concentrations in plasma in an elderly population*. Clin. Chem. 1998; 44: 102-107

<sup>34</sup> Van der Put N.M., Gabreels F., Stevens E.M., Smeitink J.A., Trijbels F.J., Eskes T.K., van der Heuvel L.P., Blom H.J.: *A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural tube defects*. Am. J. Hum. Genet. 1998; 62: 1044-1051

<sup>35</sup> Vermaak W.J., Ubbink J.B., Barnard H.C., Potgieter G.M., van Jaarsveld H., Groenewald A.J.: *Vitamin B6 nutrition status and cigarette smoking*. Am. J. Clin. Nutr. 1990; 51: 1058-1061

<sup>36</sup> Cravo M.L., Gloria L.M., Selhub J., Nadeau M.R., Camilo M.E., Resende M.P., Cardoso J.N., Leitao C.N., Mira F.C.: *Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: correlation with folate, vitamin B-12, and vitamin B-6 status*. Am. J. Clin. Nutr. 1996; 63: 220-224

<sup>37</sup> Nygard O., Refsum H., Ueland P.M., Stensvold I., Norderhaug J.E., Kvale G., Vollset S.E.: *Coffee consumption and plasma total homocysteine: The Hordaland Homocysteine Study*. Am. J. Clin. Nutr. 1997; 65: 136-143

<sup>38</sup> Pieprzowska-Białek A., Tomaszewski J., Skorupski P., Rechberger T.: *Hiperhomocysteinemia w przebiegu krótkotrwałej doustnej hormonalnej terapii zastępczej*. Prz. Menopauz. 2003; 5: 31-34

nowotworowe), choroby endokrynologiczne takie jak choroba Cushinga<sup>39</sup> oraz leki takie jak: teofilina (antagonista witaminy B6), metotreksat (antagonista FA)<sup>40</sup>, fibraty<sup>41</sup>, leki przeciwcukrzycowe i antykoncepcyjne oraz D-penicylamina<sup>42</sup>, a także LPP.

Ukazało się wiele prac wskazujących na hHcy u chorych z padaczką leczonych LPP. Według piśmiennictwa hHcy dotyczy 10-40% chorych z padaczką poddawanych kuracji LPP<sup>43,44</sup>.

### 1.8.3. Udział hiperhomocysteinemii w patogenezie chorób sercowo-naczyniowych

W ostatnich latach coraz częściej wskazuje się hHcy jako znaczący, niezależny czynnik ryzyka miażdżycy naczyń wieńcowych, mózgowych, obwodowych oraz zakrzepicy żyłnej.

Uważa się, że udział Hcy w patogenezie chorób naczyniowych wiąże się najprawdopodobniej z obecnością grupy tiolowej, która może modyfikować strukturę białek w reakcji S-homocysteinylacji i przez to upośledzać ich właściwości. W tej reakcji Hcy tworzy wiązania disiarczkowe z grupami tiolowymi białek osocza krwi i przez to może prowadzić do zaburzenia ich funkcji<sup>45</sup>. Hcy może być także nieswoiście aktywowana przez syntazę metionilo- RNA, a następnie przekształcana w cykliczny tioeter- tiolakton homocysteiny (HCTL, ang. *Homocysteine Thiolactone*). Związek ten posiada zdolność reagowania z grupami tiolowymi reszt lizyny białek osocza w reakcji N-homocysteinylacji. Takiej modyfikacji ulegają min. hemoglobina, albuminy,  $\gamma$ -globuliny, transferyna, fibrynogen, antytrypsyna, LDL, HDL<sup>46</sup>.

---

<sup>39</sup> Terzolo M., Allasino B., Bosio S., Brusa E., Daffara F., Ventura M., Aroasio E., Sacchetto G., Reimondo F., Angeli A., Camaschella C.: *Hyperhomocysteinemia in patients with Cushing's syndrome*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2004; 89: 3745–3751

<sup>40</sup> Quinn C.T., Griener J.C., Bottiglieri T., Hyland K., Farrow A., Kamen B.A.: *Elevation of homocysteine and excitatory amino acid neurotransmitters in the CSF of children who receive methotrexate for the treatment cancer*. J. Clin. Onkol. 1997; 15: 2800-2806

<sup>41</sup> Dierkes J., Westphal S., Luley C.: *Serum homocysteine increases after therapy with fenofibrate or bezafibrate*. Lancet 1999; 354: 219-220

<sup>42</sup> Kang S.S., Wong P.W., Glickman P.B., MacLeod C.M., Jaffe I.A.: *Protein-bound homocyst(e)ine in patients with rheumatoid arthritis undergoing D-penicillamine treatment*. J. Clin. Pharmacol. 1986; 26: 712-715

<sup>43</sup> Apeland T., Mansoor M.A., Pentieva K., McNulty H., Seljeflot I., Standjord R.E.: *The effect of B-vitamins on hyperhomocysteinemia in patents on antiepileptic drug*. Epilepsy Res. 2002; 51: 237-247

<sup>44</sup> Huemer M., Ausserer B., Graninger G., Hubmann M., Huemer C., Schlachter K., Tscharrer A., Ulmer H., Simma B.: *Hyperhomocysteinemia in children treated with antiepileptic drugs is normalized by folic acid supplementation*. Epilepsia 2005; 46: 1677-1683

<sup>45</sup> Jakubowski H.: *Protein homocysteinylolation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels*. FASEB J. 1999; 13: 2277-2283

<sup>46</sup> Jakubowski H.: *Protein N-homocysteinylolation: implications for atherosclerosis*. Biomed. Pharmacother. 2001; 55: 443-447

Jednocześnie dodatkowa grupa tiolowa pochodząca od Hcy zmienia reaktywność biologiczną tych białek oraz ich właściwości fizykochemiczne co może prowadzić do zwiększenia podatności na uszkodzenia, proteolizę a także do tworzenia agregatów<sup>47</sup>. Przykładowo modyfikacja składowej LDL- apolipoproteiny apo-B100 przez HCTL z jednej strony nasila agregację LDL oraz ich przyswajanie przez monocyty a także przekształcanie w komórki piankowe, a z drugiej strony indukuje stres oksydacyjny w komórkach śródbłonna naczyń. Uważa się, że Hcy ma także bezpośredni cytotoksyczny wpływ na komórki śródbłonna naczyniowego poprzez hamowanie metylacji białka p21ras przez co może upośledzać syntezę DNA komórki, hamować jej wzrost i procesy naprawcze<sup>48</sup>. Podobny efekt może wywoływać także obniżenie poziomu metylacji laminy B i fosfatazy białkowej 2A<sup>49</sup>. Uważa się także, że nadmiar Hcy pobudza proliferację mięśni gładkich naczyń przez zwiększanie ekspresji genów cyklin A i D, i w konsekwencji zwiększenie produkcji i gromadzenie kolagenu w ścianie naczynia<sup>50</sup>.

Wykazano także, że hHcy może działać promiażdżycowo poprzez hamowanie produkcji adenozyliny w tkankach, która w naturalnych warunkach hamuje ekspresję noradrenaliny, angiotensyny i tkankowego czynnika wzrostu<sup>51</sup>.

Znane jest także aterogenne działanie hHcy polegające na zaburzeniu funkcji czynników krzepnięcia i płytek krwi. Homocysteina zwiększa ekspresję dla chemoatraktanta dla monocytów na komórkach śródbłonna, powoduje wzrost stężenia tromboksanów TXA<sub>2</sub> i TXA<sub>2</sub>, a także wzrost adhezji, agregacji i skrócenie czasu przeżycia płytek krwi. Hcy aktywuje także XII i V czynnik krzepnięcia, hamuje aktywację proteiny C, inaktywuje tkankowy aktywator plazminogenu i trombomodulinę.

Wykazano także, iż hHcy powoduje zahamowanie syntezy NO, a w konsekwencji upośledzenie wazodylatacji i relaksacji naczyniowej.

W ostatnich latach ukazały się także prace wskazujące na dodatnią korelację między stężeniem Hcy a stężeniem TNF- $\alpha$  (ang. *Tumor Necrosis Factor*, czynnik martwicy nowotworów), MCP-1 (ang. *Monocyte Chemoattractant Protein-1*, białko przyciągające monocyty-1) i VCAM-1 (ang. *Vascular Cell Adhesion*

---

<sup>47</sup> Bełtowski J.: *Protein homocysteinylation: a new mechanism of atherogenesis?* Postępy Hig. Med. Dośw. 2005; 59: 392-404

<sup>48</sup> Yi P., Melnyk S., Pogribna M., Pogribny I.P., Hine R.J., James S.J.: *Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation.* J. Biol. Chem. 2000; 275: 29318–29323

<sup>49</sup> Naruszewicz M.: *Aktualne spojrzenie na rolę hiperhomocysteinemii w patogenezie miażdżycy.* Pol. Przegl. Neurol. 2005; 1: 19-22

<sup>50</sup> Rasmussen L.M., Hansen P.R., Ledet T.: *Homocysteine and the production of collagens, proliferation and apoptosis in human arterial smooth muscle cells.* APMIS 2004; 112: 598-604

<sup>51</sup> Medina M., Urdiales J.L., Amores-Sanchez M.I.: *Roles of homocysteine in cell metabolism: old and new functions.* Eur. J. Biochem. 2001; 268: 3871–3882

*Molecule-1*, naczyniowa molekula adhezyjna-1)<sup>52</sup>, czynników indukujących i nasilających proces zapalny<sup>53</sup>, mający istotny wpływ na patogenezę chorób naczyniowych.

Najprawdopodobniej nie są jeszcze znane wszystkie mechanizmy szkodliwego działania Hcy na naczynia ośrodkowe i obwodowe. W ciągu ostatnich kilkunastu lat ukazało się wiele prac, dotyczących różnych dziedzin medycyny i wskazujących na dodatnie korelacje między poziomem osoczowej Hcy a zagrożeniem wystąpienia choroby wieńcowej<sup>54</sup>, zawału serca<sup>55</sup>, udaru mózgu<sup>56</sup> i naczyniopochodnej podkorowej encefalopatii oraz miażdżycą tętnic obwodowych i zakrzepicą żył głębokich<sup>57</sup>.

W piśmiennictwie wykazano, że zmiany naczyniowe mogą pojawiać się już w łagodnej hHcy, która występuje u 7-10% całej populacji ludzkiej i najczęściej nie daje objawów klinicznych do 40 r.ż. oraz jest zasadniczo związana z mutacją C677T genu *MTHFR*. Są jednak doniesienia wskazujące, że przy dostatecznej podaży FA genotyp ten nie powoduje podwyższonego stężenia Hcy i nie jest czynnikiem ryzyka chorób naczyniowych<sup>58</sup>. Ważnym czynnikiem regulującym częstość występowania hHcy i związanych z nią powikłań naczyniowych w różnych rejonach świata, jest także tryb życia a w szczególności spożywana dieta i zawartość w niej kofaktorów procesów remetylacji i transulfuracji Hcy-FA, witaminy: B6, B12<sup>59, 60</sup>.

---

<sup>52</sup> Bogdański P, Pupek-Musialik D, Łuczak M, Cymerys M, Kopczyński J, Bryl W, Jabłeczka A, Miczke A.: *Ocena stężenia homocysteiny i wybranych markerów procesu zapalnego u chorych z klinicznymi cechami insulinooporności*. Diabet. Dośw. Klin. 2003; 3(3): 261-267

<sup>53</sup> Gąsiorowska D., Korzeniowska K., Jabłeczka A.: *Homocysteina*. Farm Współ 2008; 1(3): 169-175

<sup>54</sup> Skibińska E., Sawicki R., Lewczuk A., Prokop J., Musiał W., Kowalska I., Mroczo B.: *Homocysteinemia we krwi a zaawansowanie choroby niedokrwiennej serca*. Kardiolog. Pol. 2004; 60: 202-205

<sup>55</sup> Wald N.J., Watt H.C., Law M.R., Weir D.G., Mc Partlin J., Scott J.M.: *Homocysteine and ischemic heart disease: results of a prospective study with implications regarding prevention*. Arch. Intern. Med. 1998; 158: 862-867

<sup>56</sup> Perry I.J., Refsum H., Morris R.W., Ebrahim S.B., Ueland P.M., Shaper A.G.: *Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men*. Lancet 1995; 346: 1395-1398

<sup>57</sup> Ridker P.M., Hennekens C.H., Selhub J., Miletich J.P., Malinow M.R., Stampfer M.J.: *Interrelation of hyperhomocyst(e)inemia, factor V Leiden, and risk factor of future venous thromboembolism*. Circulation 1997; 95: 1777-1782

<sup>58</sup> Ma J., Stampfer M.J., Hennekens C.H., Frosst P., Selhub J., Horsford J., Malinow M.R., Willett W.C., Rozen R.: *Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine, and risk of myocardial infarction in US physicians*. Circulation 1996; 94: 2410-2416

<sup>59</sup> Abbate R., Sardi I., Pepe G., Marcucci R., Brunelli T., Prisco T., Fatini C., Capanni M., Simonetti I., Gensini G.F.: *The high prevalence of thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) in Italians is not associated to an increased risk for coronary artery disease (CAD)*. Thromb. Haemost. 1998; 79: 727-730

<sup>60</sup> Malinow M.R., Ducimetiere P., Luc G., Evans A.E., Arveiler D., Cambien F., Upson B.M.: *Plasma homocyst(e)ine levels and graded risk for myocardial infarction: findings in two populations at contrasting risk for coronary heart disease*. Atherosclerosis 1996; 126: 27-34



Uważa się, że podwyższone stężenie Hcy jest również czynnikiem ryzyka chorób neurodegeneracyjnych, psychiatrycznych i innych schorzeń.

#### 1.8.4. Wpływ hiperhomocysteinemii na patogenezę chorób neurologicznych, psychiatrycznych, wad rozwojowych i patologię ciąży

Wykazano, że Hcy może przechodzić przez barierę krew-mózg, a jej poziom w mózgu odpowiada poziomowi osoczowej Hcy. Podwyższone stężenie Hcy może prowadzić do zmian naczyniowych OUN i otępienia na podłożu naczyniowym, ale może także być czynnikiem ryzyka chorób neurodegeneracyjnych. Z doniesień piśmiennictwa wynika, że hHcy jest uważana za czynnik ryzyka choroby Alzheimera (ChA)<sup>61</sup> oraz choroby Parkinsona (ChP)<sup>62</sup>. Neurotoksyczny mechanizm działania Hcy w tych schorzeniach nie jest jasny. Jak wiadomo, Hcy jest agonistą receptorów NMDA i słabym aktywatorem kanału NMDA. Przyłączenie Hcy i jej metabolitu – kwasu homocysteinowego do miejsca wiążącego glicynę w receptorze NMDA, powoduje napływ jonów wapnia do komórki i aktywację enzymów uszkodzających błony komórkowe, cytoszkielet i DNA, co jednocześnie może prowadzić do nasilenia stresu oksydacyjnego i procesu apoptozy. Hcy wykazuje także powinowactwo do receptorów mGluR z grupy I. W modelach doświadczalnych wykazano, że receptory glutaminergiczne pośredniczą w wywołanej przez Hcy mobilizacji wapnia w hipokampie (badania prowadzone u królika) oraz w neurotoksyczności Hcy na modelu pierwotnej hodowli neuronów ziarnistych w mózdzku<sup>63, 64</sup>.

W piśmiennictwie ukazały się także doniesienia o niezależnym od aktywności glutaminergicznej działaniu Hcy w patogenezie ChA, związanym z neurotoksycznością miedzi i  $\beta$ -amyloidu<sup>65</sup>.

Uważa się, że pobudzenie receptora NMDA przez kwas homocysteinowy i jego działanie ekscytotoksyczne może także odgrywać ważną rolę w rozwoju ChP<sup>66</sup>. Rozważa się ponadto hipotezę

---

<sup>61</sup> Luchsinger J.A., Tang M.X., Shea S., Miller J., Green R., Mayeux R.: *Plasma homocysteine levels and risk of Alzheimer disease*. Neurology 2004; 62: 1972-1976

<sup>62</sup> Dorszewska J., Florczak J., Różycka A., Kempisty B., Jaroszevska-Kolecka J., Chojnacka K., Trzeciak W.H., Kozubski W.: *Oxidative DNA damage and level of thiols as related to polymorphisms of MTHFR, MTR, MTHFD1 in Alzheimer's and Parkinson's diseases*. Acta Neurobiol. Exp. 2007; 67(2): 113-129

<sup>63</sup> Łazarewicz J.W., Ziembowicz A., Matyja E., Stafiej A., Ziemińska E.: *Homocysteine-evoked <sup>45</sup>Ca release in the rabbit hippocampus is mediated both by NMDA and group I metabotropic glutamate receptors: in vivo microdialysis study*. Neurochem. Res. 2003; 28: 259-269

<sup>64</sup> Ziemińska E., Stafiej A., Łazarewicz J.W.: *Role of group I metabotropic glutamate receptors and NMDA receptors in homocysteine-evoked acute neurodegeneration of cultured cerebellar granule neurons*. Neurochem. Int. 2003; 43(4-5): 481-492

<sup>65</sup> Seshadri S., Beiser A., Selhub J., Jacques P.F., Rosenberg I.H., D'Agostino R.B., Wilson P.W., Wolf P.A.: *Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease*. N. Eng. J. Med. 2002; 346(7): 476-483

uszkodzenia neuronów dopaminergicznych spowodowanego nadmiernym utlenianiem jonów żelaza oraz wolnymi rodnikami powstającymi podczas utleniania Hcy. Opisano także wzrost stężenia Hcy podczas farmakoterapii chorych z ChP L-dopą. Jak wykazano, L-dopa w organizmie ulega O-metylacji katalizowanej przez katecholotlenometylotransferazę (COMT), gdzie donorem grupy metylowej jest SAM a produktem 3-O-metylodopa, przekształcana do SAH, która może być dalej hydrolizowana do Hcy. Uważa się, że w ChP Hcy jest również czynnikiem wywołującym stres oksydacyjny i dysfunkcje mitochondrialne oraz apoptozę neuronów dopaminergicznych<sup>67</sup>. Badania na ludzkich neuronach dopaminergicznych wykazały także wzrost neurotoksyczności przy wysokim poziomie Hcy wywołanym niedoborem FA<sup>68</sup>. Ukazały się również prace prowadzone na modelach zwierzęcych opisujące wpływ Hcy na transmisję dopaminergiczną<sup>69</sup>. Uważa się także, że Hcy jest allosterycznym antagonistą receptora D2 i być może przyczyną słabszego efektu farmakoterapii agonistami receptora D2 chorych z ChP z podwyższonym stężeniem Hcy w surowicy. Opisano także większe nasilenie dyskinez u pacjentów leczonych z powodu ChP, u których wykazano hHcy<sup>70</sup>.

Ponadto z piśmiennictwa wynika, że chorzy, u których wykazano trzykrotnie wyższe stężenie Hcy w surowicy byli dwukrotnie częściej narażeni na zachorowanie na ChA, a z pracy Seshadri i wsp. wynika, że podwyższenie poziomu Hcy o 5  $\mu$ M zwiększa ryzyko ChA o 40%<sup>65</sup>.

W ostatnich latach opisano także korelacje między podwyższonym stężeniem Hcy a chorobami psychiatrycznymi: schizofrenią<sup>71</sup> i depresją<sup>72</sup>. Wykazano także wyższą w schizofrenii, w porównaniu z populacją ogólną, częstość występowania polimorfizmu C677T w genie kodującym MTHFR<sup>73,74</sup>.

---

<sup>66</sup> Isobe C., Murata T., Sato C., Terayama Y.: *Increase of homocysteine concentration in cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's disease and Parkinson's disease*. Life Sci. 2005; 77(15): 1836-1843

<sup>67</sup> Zoccolella S., Lamberti P., Armenise E., de Mari M., Lamberti S.V., Mastronardi R., Fraddosio A., Iliceto G., Livrea P.: *Plasma homocysteine levels in Parkinson's disease: role of antiparkinsonian medications*. Parkinsonism Relat. Disord. 2005; 11(2): 131-133

<sup>68</sup> Duan W., Ladenheim B., Cutler R.G., Kruman I.I., Cadet J.L., Mattson M.P.: *Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease*. J. Neurochem. 2002; 80(1): 101-110

<sup>69</sup> Agnati L.F., Ferre S., Genedani S., Leo G., Guidolin D., Filaferro M., Carriba P., Casado V., Lluís C., Franco R., Woods A.S., Fuxe K.: *Allosteric modulation of dopamine D2 receptors by homocysteine*. J. Proteome. Res. 2006; 5: 3077-3083

<sup>70</sup> Zoccolella S., Lamberti P., Iliceto G., Dell'Aquila C., Diroma C., Fraddosio A., Lamberti S.V., Armenise E., Defazio G., de Mari M., Livrea P.: *Elevated plasma homocysteine levels in L-dopa-treated Parkinson's disease patients with dyskinesias*. Clin. Chem. Lab. Med. 2006; 44: 863-866

<sup>71</sup> Haidemenos A., Kontis D., Gazi A., Kallai E., Allin M., Lucia B.: *Plasma homocysteine, folate and B12 in chronic schizophrenia*. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2007; 31(6): 1289-1296

Ponadto, jak wynika z piśmiennictwa zwiększone stężenie osoczowej Hcy jest czynnikiem ryzyka występowania wad wrodzonych cewy nerwowej, rozszczepu podniebienia, wad stóp u noworodków oraz zaburzeń prawidłowego przebiegu ciąży<sup>75</sup>. Uważa się także, że hHcy może być przyczyną nawykowych poronień<sup>76</sup>. Ukazały się także prace opisujące dodatnie korelacje między narastającym poziomem Hcy a występowaniem wad łożyska oraz stanu przedrzucawkowego<sup>77</sup> kobiet w ciąży a także prace o wpływie hHcy na patogenezę chorób nowotworowych<sup>78</sup>.

### 1.8.5. Hiperhomocysteinemia a rozwój padaczki

Udział hHcy w indukowaniu napadów padaczkowych wykazano zarówno w doświadczalnych modelach zwierzęcych, jak i u ludzi. Z piśmiennictwa wynika, że wysokie dawki Hcy mogą indukować napady padaczkowe u zwierząt doświadczalnych<sup>79</sup>. Natomiast z badań prowadzonych u ludzi wynika, że u 20 % chorych na padaczkę z heterozygotą CBS, przy wzroście krążącej Hcy od 50 do 200  $\mu\text{M}$  obserwuje się wzrost częstości napadów padaczkowych<sup>80</sup>. Uważa się także, że hHcy wykazuje negatywny wpływ na kontrolę napadów u chorych na padaczkę. Przypuszcza się, że Hcy i jej metabolit- kwas homocysteinowy mogą uczestniczyć w indukowaniu napadów padaczkowych przez agonistyczne oddziaływanie na

---

<sup>72</sup> Arinami T., Yamada N., Yamakawa-Kobayashi K., Hamaguchi H., Toru M.: *Methylenetetrahydrofolate reductase variant and schizophrenia/depression*. Am. J. Med. Genet. 1997; 74: 526-528

<sup>73</sup> Muntjewerff J.W., Kahn R.S., Blom H.J., den Heijer M.: *Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase and risk of schizophrenia: a meta-analysis*. Mol. Psychiatry. 2006; 11(2): 143-149

<sup>74</sup> Tan E.C., Chong S.A., Lim L.C. Chan A.O., Teo Y.Y., Tan C.H., Mahendran R.: *Genetic analysis of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in schizophrenia and mood disorders*. Psychiatr. Genet. 2004; 14(4): 227-231

<sup>75</sup> Sztenc S.: *Hyperhomocysteinemia and pregnancy complications*. Ginekol Pol. 2004; 75: 317-325

<sup>76</sup> Wouters M.G., Boers G.H., Blom H.J., Trijbels F.J., Thomas C.M., Borm G.F., Steegers-Theunissen R.P., Eskes T.K.: *Hyperhomocysteinemia- a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss*. Fertil. Steril. 1993; 60: 820-825

<sup>77</sup> Ray J.G., Laskin C.A.: *Folic acid homocyst(e)ine metabolic defects and the risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: A systemic review*. Placenta 1999; 20: 519-529

<sup>78</sup> Wu L.L., Wu J.T.: *Hyperhomocysteinemia is a risk factor for cancer and a new potential tumor marker*. Clin. Chim. Acta 2002; 322: 21-28

<sup>79</sup> Kubova H., Folbergrova J., Mares P.: *Seizures induced by homocysteine in rats during ontogenesis*. Epilepsia 1995; 36: 750-756

<sup>80</sup> Siniscalchi A., Mancuso F., Gallelli L., Ferreri Ibbadu G., Biagio Mercuri N., De Sarro G.: *Increase in plasma homocysteine levels induced by drug treatments in neurologic patients*. Pharmacol. Res. 2005; 52: 367-375

receptor NMDA<sup>81</sup> w miejscu wiążącym glutaminian. Prawdopodobnie kwas homocysteinowy ma także działanie aktywujące metabotropowe receptory glutaminergiczne grupy II i III. Istnieją hipotezy o indukującym napady padaczkowe hamującym wpływie Hcy na działanie Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPazy w komórkach hipokampa oraz hamującym wpływie HCTL na działanie Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPazy w komórkach hipokampa i kory mózgowej<sup>82</sup>. Rozważa się także rolę hHcy w powstawaniu stresu oksydacyjnego i uszkodzeń DNA genów kodujących białka biorące udział w epileptogenezie.

### 1.8.6. Hiperhomocysteinemia w terapii lekami przeciwpadaczkowymi u chorych z padaczką

Uważa się, że istnieje kilka mechanizmów przyczyniających się do generowania hHcy u chorych z padaczką leczonych LPP. Wykazano, że LPP mogą mieć pośredni wpływ na poziom osoczowej Hcy poprzez upośledzanie wchłaniania jelitowego kofaktorów jej remetylacji (FA i witamina B12) oraz indukcję enzymów wątrobowych biorących udział w przemianach i jednocześnie warunkujących poziom FA. Ponadto wykazano, że metabolizm LPP, a w szczególności proces ich hydroksylacji, bezpośrednio zwiększa zużycie FA i obniża ich poziom w osoczu. Uważa się także, LPP mogą wykazywać bezpośredni wpływ na metabolizm Hcy oraz na funkcję nerek.

Wykazano także, że poziom generowanej Hcy zależy od rodzaju stosowanej farmakoterapii<sup>80</sup>. Uważa się, że CBZ, DPH, PB podwyższają stężenie Hcy poprzez obniżenie poziomu FA na drodze zwiększenia aktywności cytochromu P450<sup>83</sup>. Ponadto wykazano, że DPH zarówno u myszy, jak i u szczurów może generować Hcy poprzez hamowanie aktywności MTHFR<sup>84</sup>.

Natomiast terapia CBZ może również prowadzić do zaburzenia procesu remetyzacji Hcy poprzez obniżanie poziomu kofaktorów biorących udział w biosyntezie FA oraz witaminy B12. Ponadto CBZ może wpływać na stężenie Hcy poprzez obniżenie stężenia Met i zaburzenie stosunku stężeń Met:Hcy<sup>85</sup>.

---

<sup>81</sup> Folbergrova J., Haugvicova R., Mares P.: *Behavioral and metabolic changes in immature rats during seizures induced by homocysteic acid: the protective effect of NMDA and non-NMDA receptor antagonists*. Exp. Neurol. 2000; 161: 336-345

<sup>82</sup> Rašić-Marković A., Stanojlović O., Hrnčić D., Krstić D., Čolović M., Šušić V., Radosavljević T., Djuric D.: *The activity of erythrocyte and brain Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> and Mg<sup>2+</sup>-ATPases in rats subjected to acute homocysteine and homocysteine thiolactone administration*. Mol. Cell Biochem. 2009; 327(1-2): 339-345

<sup>83</sup> Apeland T., Mansoor M.A., Strandjord R.E.: *Antiepileptic drugs as independent predictors of plasma total homocysteine levels*. Epilepsy Res. 2001; 47: 27-35

<sup>84</sup> Carl G.F., Smith D.B.: *The effect of chronic phenytoin treatment on tissue folate concentrations and on the activities of the methyl synthetic enzymes in the rat*. J. Nutr. 1983; 113: 2368-2374

<sup>85</sup> Tatarewicz S., Śnieżawska A., Dorszewska J., Kozubski W.: *Poziom homocysteiny i asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA) u chorych leczonych z powodu padaczki*. Farm. Prz. Nauk. 2008; 9-10: 26-29

Zaś terapia VPA, który w odróżnieniu od CBZ nie indukuje mikrosomalnych enzymów wątrobowych, może obniżać poziom FA przez hamowanie enzymu pośredniczącego w jego biosyntezie oraz w syntezie jego pochodnych<sup>86</sup> i prowadzić do wzrostu stężenia Hcy bez zmiany stężenia Met. W badaniach przeprowadzonych u myszy wykazano, że VPA zaburza proces transsulfuracji<sup>87</sup>.

W piśmiennictwie ukazały się także prace wskazujące na brak wpływu LPP NG na poziom Hcy oraz poziom kofaktorów procesu remetylacji Hcy do Met. Wykazano, że np. terapia LTG zasadniczo nie wpływa na poziom witaminy B12 i FA<sup>88</sup>.

Wykazane liczne korelacje podwyższonego stężenia Hcy z wieloma komplikacjami klinicznymi przyczyniły się do coraz większego zainteresowania skutkami hHcy. Uważa się także, że udział hHcy w stanach patologicznych ustroju może odbywać się z udziałem asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA).

## 1.9. ADMA

### 1.9.1. Metabolizm ADMA

Asymetryczna dimetyloarginina, endogenna metyloarginina, jest aminokwasem naturalnie występującym w organizmie człowieka. Jest ona syntetyzowana przez różne komórki, między innymi przez komórki śródbłonna naczyniowego<sup>89</sup>. Powstaje w reakcjach metylacji białek zawierających reszty argininowe (syntetyzowane w cyklu moczniowym) z udziałem N-metylotransferazy argininowej typu I (PRMT I), w której donorem grup metylowych jest SAM. Natomiast w wyniku proteolizy ADMA jest uwalniana z komórki<sup>90</sup> i może być metabolizowana do L-cytruliny i dimetyloaminy przy udziale enzymu dimetyloaminohydrolazy dimetyloargininy (DDAH) lub w postaci niezmienionej wydalona przez nerki. L-cytrulina w toku dalszych przemian może być przekształcana do Arg.

---

<sup>86</sup> Attilakos A., Papakonstantinou E., Schulpis K., Voudris K., Katsarou E., Mastroianni S., Garoufi A.: *Early effect of sodium valproate and carbamazepine monotherapy on homocysteine metabolism in children with epilepsy*. Epilepsy Res. 2006; 71: 229-232

<sup>87</sup> Hishida R., Nau H.: *VPA- induced neural tube defects in mice. I. Altered metabolism of sulfur amino acids and glutathione*. Teratog. Carcinog. Mutagen. 1998; 18: 49-61

<sup>88</sup> Gidal B., Tamura T., Hammer A., Vuong A.: *Blood homocysteine, folate and vitamin B12 concentrations in patients with epilepsy receiving lamotrigine or sodium valproate for initial monotherapy*. Epilepsy Res. 2005; 64(3): 161-166

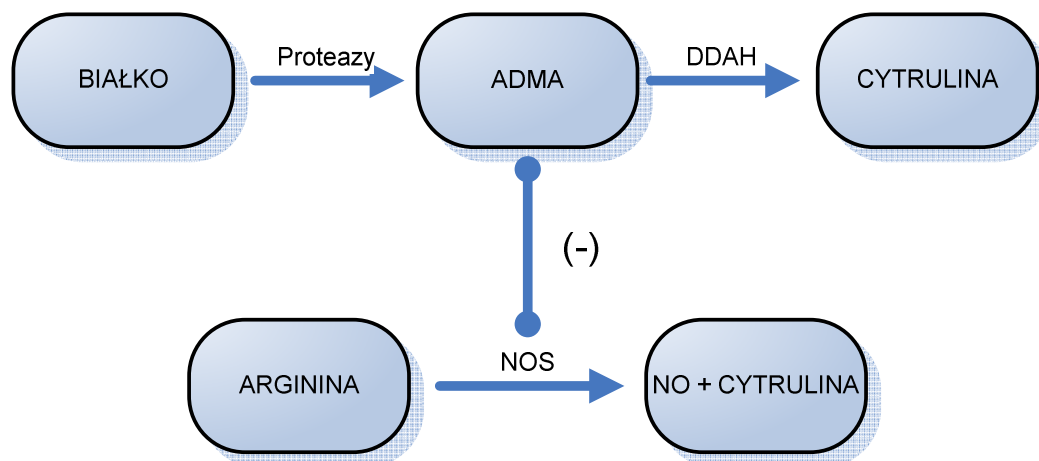
<sup>89</sup> Böger R.H., Sydow K., Borlak J., Thum T., Lenzen H., Schubert B., Tsikas D., Bode-Böger S.M.: *LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases*. Circ. Res. 2000; 87: 99-105

<sup>90</sup> Konieczna-Grzebieniak E., Goss M.: *Znaczenie regulacji stężenia endogennych metyloarginin w praktyce klinicznej*. Prz. Lek. 2005; 62(12): 1494-1501

Największa aktywność DDAH występuje w wątrobie<sup>91</sup> chociaż wykazano ją także w granulocytach, erytrocytach i w monocytach<sup>92</sup>.

Zarówno synteza, jak i degradacja ADMA są procesami aktywnie regulowanymi (Rys. 3).

Rysunek 3. Schemat syntezy i rozkładu ADMA



Wykazano zwiększenie ekspresji PRMT oraz wzrost poziomu syntezy ADMA w komórkach endotelialnych w obecności natywnych i zmodyfikowanych oksydacyjnie frakcji LDL. Synteza ADMA wzrasta także w obecności Met i Hcy, a maleje przy zwiększonym poziomie SAH, dialdehydu adenozyiny i cykloleucyny. W badaniach doświadczalnych wykazano, że Hcy przez oddziaływanie na grupy sulfhydrylowe bezpośrednio hamuje aktywność DDAH i tym samym może regulować stężenie ADMA w komórkach śródbłonna<sup>93</sup>. Wykazano także, że zwiększone stężenie frakcji oksydacyjnego LDL<sup>94</sup> powoduje spadek aktywności

<sup>91</sup> Nijveldt R.J., Teerlink T., Siroen M.P., van Lambalgen A.A., Rauwerda J.A., van Leeuwen P.A.: *The liver is an important organ in the metabolism of asymmetrical dimethylarginine (ADMA)*. Clin. Nutr. 2003; 22: 17-22

<sup>92</sup> Kang E.S., Cates T.B., Harper D.N., Chiang T.M., Myers L.K., Acchiardo S.R., Kimoto M.: *An enzyme hydrolyzing methylated inhibitors of nitric oxide synthase is present in circulating human red blood cells*. Free Radic. Res. 2001; 35: 693-707

<sup>93</sup> Stühlinger M.C., Oka R.K., Graf E.E., Schmölder I., Upson B.M., Kapoor O., Szuba A., Malinow M.R., Wascher T.C., Pachinger O., Cooke J.P.: *Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine*. Circulation 2003; 108: 933-938

<sup>94</sup> Ito A., Tsao P.S.; Adimoolam S., Kimoto M., Ogawa T., Cooke J.P.: *Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase*. Circulation 1999; 99: 3092-3095

DDAH. Uważa się, że obniżeniu aktywności DDAH zapobiegają przeciwutleniacze<sup>95</sup>. W piśmiennictwie ukazały się także doniesienia o upośledzającym wpływie hiperglikemii na funkcje DDAH<sup>96</sup>.

### 1.9.2. Czynniki wpływające na stężenie ADMA w osoczu krwi

W piśmiennictwie wykazano wpływ wielu czynników egzo- i endogennych na stężenie ADMA zarówno u zwierząt doświadczalnych, jak i u ludzi. Jednym z najistotniejszych egzogennych czynników regulującym stężenie ADMA w osoczu wydaje się być spożywana dieta. Uważa się, że pokarmy bogatotłuszczowe<sup>97</sup>, dieta bogatosolna<sup>98</sup>, hipercholesterolemiczna oraz dieta indukująca hHcy<sup>99</sup> mogą powodować wzrost stężenia ADMA w osoczu. Uważa się także, że stężenie osoczowej ADMA wzrasta z wiekiem<sup>100</sup>. Innym ważnym czynnikiem wpływającym na stężenie ADMA wydaje się być farmakoterapia. Wykazano spadek stężenia ADMA podczas terapii lekami przeciwcukrzycowymi (metforminą<sup>101</sup>, rosiglitazonem<sup>102</sup>), neuroleptykami<sup>103</sup>, inhibitorami konwertazy<sup>104</sup>, rosuwastatyną<sup>105</sup> oraz estrogenami<sup>106</sup>.

---

<sup>95</sup> Cooke J.P.: *Does ADMA cause endothelial dysfunction?* Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2000; 20: 2032-2037

<sup>96</sup> Vallance P., Leiper J.: *Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine: dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway.* Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2004; 24: 1023-1030

<sup>97</sup> Fard A., Tuck C.H., Donis J.A., Sciacca R., Di Tullio M.R., Wu H.D., Bryant T.A., Chen N.T., Torres-Tamayo M., Ramasamy R., Berglund L., Ginsberg H.N., Homma S., Cannon P.J.: *Acute elevations of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes.* Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2000; 20: 2039-2044

<sup>98</sup> Fujiwara N., Osanai T., Kamada T., Katoh T., Takahashi K., Okumura K.: *Study on the relationship between plasma nitrite and nitrate level and salt sensitivity in human hypertension: modulation of nitric oxide synthesis by salt intake.* Circulation 2000; 101: 856-861

<sup>99</sup> Böger R.H., Bode-Böger S.M., Sydow K., Heistad D.D., Lentz S.R.: *Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase is elevated in monkey with hyperhomocysteinemia or hypercholesterolemia.* Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2000 ; 20(6): 1557-1564

<sup>100</sup> Miyazaki H., Matsuoka H., Cooke J.P., Usui M., Ueda S., Okuda S., Imaizumi T.: *Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis.* Circulation 1999; 99: 1141-1146

<sup>101</sup> Asagami T., Abbasi F., Stuelinger M., Lamendola C., McLaughlin T., Cooke J.P., Reaven G.M., Tsao P.S.: *Metformin treatment lowers asymmetric dimethylarginine concentrations in patients with type 2 diabetes.* Metabolism 2002; 51: 843-846

<sup>102</sup> Stuhlinger M.C., Abbasi F., Chu J.W., Lamendola C., McLaughlin T.L., Cooke J.P., Reaven G.M., Tsao P.S.: *Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor.* JAMA 2002; 287: 1420-1426

<sup>103</sup> Das I., Khan N.S., Puri B.K., Hirsch S.R.: *Elevated endogenous nitric oxide synthase inhibitor in schizophrenic plasma may reflect abnormalities in brain nitric oxide production.* Neurosci. Lett. 1996; 215: 209-211

Jednak najistotniejszą przyczyną wzrostu stężenia osoczowej ADMA wydają się być schorzenia a nie stosowana w nich farmakoterapia. W ciągu ostatnich lat ukazało się wiele prac wskazujących na ryzyko podwyższonego stężenia ADMA w chorobach przewlekłych w tym w: niewydolności nerek<sup>107</sup>, niewydolności wątroby, cukrzycy, chorobach układu nerwowego (schizofrenia<sup>104</sup>, stwardnienie rozsiane, choroby neurodegeneracyjne) i nadczynności gruczołu tarczowego<sup>108</sup>.

Uważa się, że stężenie osoczowej ADMA koreluje z ryzykiem występowania chorób naczyniowych.

---

<sup>104</sup> Delles C., Schneider M.P., John S., Gekle M., Schmieder R.E.: *Angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin II AT1-receptor blockade reduce the levels of asymmetrical N(G), N(G)-dimethylarginine in human essential hypertension*. Am. J. Hypertens. 2002; 15: 590-593

<sup>105</sup> Lu T.M., Ding Y.A., Leu H.B., Yin W.H., Sheu W.H., Chu K.M.: *Effect of rosuvastatin on plasma levels of asymmetric dimethylarginine in patients with hypercholesterolemia*. Am. J. Cardiol. 2004; 94: 157-161

<sup>106</sup> Post M.S., Verhoeven M.O., Van der Mooren M.J., Kenemans P., Stehouwer C.D., Teerlink T.: *Effect of hormone replacement therapy on plasma levels of the cardiovascular risk factor asymmetric dimethylarginine: a randomized, placebo-controlled 12-week study in healthy early postmenopausal women*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2003; 88: 4221-4226

<sup>107</sup> Zoccali C., Bode-Böger S., Mallamaci F., Benedetto F., Tripepi G., Malatino L., Cataliotti A., Bellanuova I., Fermo I., Frölich J., Böger R.: *Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine and mortality in patients with endstage renal disease: a prospective study*. Lancet 2001; 358: 2113-2117

<sup>108</sup> Hermenegildo C., Medina P., Peiró M., Segarra G., Vila J.M., Ortega J., Lluch S.: *Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in hyperthyroid patients*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2002; 87(12): 5636-5640



### 1.9.3. Udział ADMA w patogenezie chorób naczyniowych

Asymetryczna dimetyloarginina jest endogennym inhibitorem NOS<sup>109</sup>. Uważa się, że hamuje trzy izoformy NOS tj. śródbłonkową (eNOS), neuronalną (nNOS) oraz indukowaną (iNOS). Wiadomo, że nNOS i eNOS są wytwarzane przez: płytki krwi, miocyty, komórki śródbłonka i neurony, w odróżnieniu od iNOS, która jest enzymem aktywowanym w większości komórek ustroju pod wpływem działania endotoksyn bakteryjnych, cytokin i interferonu. Ponadto wymienione trzy izoformy NOS są odpowiedzialne w sposób mniej lub bardziej kontrolowalny za produkcję NO. Tlenek azotu posiada działanie: przeciwzapalne, wazodylatacyjne i antyaterogenne i wywiera silny wpływ na prawidłowe funkcjonowanie układu sercowo-naczyniowego. W warunkach fizjologicznych NO hamuje syntezę endoteliny-1, czynnika o działaniu naczynioobkurczającym i jednocześnie indukującym hiperplazję wewnętrznej błony naczyniowej. Natomiast obniżenie syntezy NO powoduje załamanie równowagi pomiędzy czynnikami obkurczającymi (noradrenaliny, serotoniny i angiotensyny II) i rozszerzającymi ścianę naczyniową na korzyść tych drugich<sup>110</sup>. Niedobór NO zwiększa wytwarzanie MCP-1 (ang. *Monocyte Chemotactic Proteine-1*) co sprzyja adhezji limfocytów i monocytów do ściany naczyniowej. Uważa się, że obniżenie syntezy NO sprzyja agregacji płytek krwi oraz proliferacji i hamowaniu apoptozy miocytów. Przypuszcza się, że deficyt NO może także hamować angiogenezę<sup>111</sup>. NO bierze także udział w transmisji synaptycznej w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym, odgrywa istotną rolę w procesie uczenia się i zapamiętywania. Uważa się, że NO odgrywa także ważną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu układu immunologicznego oraz w regulacji procesów oddychania komórkowego na poziomie łańcucha mitochondrialnego.

Według wielu najnowszych publikacji ADMA jest zaliczana do jednych z najważniejszych markerów ryzyka chorób naczyniowych. W piśmiennictwie ukazało się prace wskazujące na podwyższony poziom ADMA jako czynnika ryzyka choroby niedokrwiennej serca<sup>112</sup> oraz chorób naczyń obwodowych. Uważa się, że główne działanie ADMA w patogenezie chorób naczyniowych polega na upośledzaniu funkcji śródbłonka

---

<sup>109</sup> Azuma H.: *Role of L-arginine-endogenous NOS inhibitors-endothelin-1 pathway for the vascular remodelling*. Folia Pharmac. Jap. 1999; 114: 33-40

<sup>110</sup> Bode-Boger S.M., Boger R.H., Kienke S., Junker W., Frölich J.C.: *Elevated L-arginine/dimethylarginine ratio contributes to enhanced systemic NO production by dietary L-arginine in hypercholesterolemic rabbits*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996; 219: 598-603

<sup>111</sup> Jang J.J., Ho H.K., Kwan H.H., Fajardo L.F., Cooke J.P.: *Angiogenesis is impaired by hypercholesterolemia: role of asymmetric dimethylarginine*. Circulation 2000; 102(12): 1414-1419

<sup>112</sup> Schulze F., Lenzen H., Hanefeld C., Bartling A., Osterziel K.J., Goudeva L., Schmidt-Lucke C., Kusus M., Maas R., Schwedhelm E., Strodtter D., Simon B.C., Mugge A., Daniel W.G., Tillmanns H., Maisch B., Streichert T., Böger R.H.: *Asymmetric dimethylarginine is an independent risk for coronary heart disease: results from the multicenter Coronary Artery Risk Determination investigating the Influence of ADMA Concentration (CARDIAC) study*. Am. Heart J. 2006; 152: 1-8

na skutek hamowania syntezy NO, substancji uważanej obecnie za najsilniejszy czynnik o działaniu przeciwmiażdżycowym.

W piśmiennictwie ukazało się również wiele prac wskazujących na podwyższone stężenie ADMA jako czynnik ryzyka nadciśnienia tętniczego<sup>113</sup>. Poza bezpośrednim, oddziaływaniem ADMA na stężenie NO i w konsekwencji na regulację napięcia ściany naczyniowej, postuluje się także indukujący nadciśnienie tętnicze wpływ podwyższonego poziomu ADMA na wzrost resorpcji zwrotnej jonów sodu w kanalikach nerkowych<sup>114</sup>.

Według publikowanych wyników badań podwyższone stężenie ADMA może być także czynnikiem inicjującym oraz wpływającym na progresję procesu powstawania blaszki miażdżycowej oraz przerostu ściany naczyniowej. Uważa się, że poziom osoczowej ADMA koreluje z grubością kompleksu śródbłonek-błona środkowa (IMT, ang. *Intima Media Thickness*) tętnic szyjnych<sup>115</sup>. Uważa się także, że stężenie osoczowej ADMA koreluje ze stopniem zaawansowania miażdżycy tętnic kończyn dolnych, mierzonym dystansem chromania przestankowego.

Ponadto uważa się, że wzrost stężenia osoczowej ADMA może być także czynnikiem ryzyka innych niż choroby naczyniowe stanów patologicznych organizmu.

#### 1.9.4. ADMA jako czynnik patogenezy innych schorzeń

W piśmiennictwie ukazały się prace wskazujące na dodatnią korelację między stężeniem osoczowej ADMA a insulinoopornością i cukrzycą. Mechanizm tych zależności nie jest dokładnie poznany. Uważa się jednak, że hiperglikemia wykazuje działanie hamujące na DDAH i może przyczyniać się do wzrostu stężenia osoczowej ADMA, ale postuluje się także negatywny wpływ ADMA na tolerancję glukozy<sup>116</sup>.

---

<sup>113</sup> Matsuoka H., Itoh S., Kimoto M., Kohno K., Tamai O., Wada Y., Yasukawa H., Iwami G., Okuda S., Imaizumi T.: *Asymmetrical dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthase Inhibitor, in experimental hypertension*. Hypertension 1997; 29: 242-247

<sup>114</sup> Kielstein J.T, Simmel S., Bode-Böger S.M., Roth H.J., Schmidt-Gayk H., Haller H., Fliser D.: *Subpressor dose asymmetric dimethylarginine modulates renal function in humans through nitric oxide synthase inhibition*. Kidney Blood Press. Res. 2004; 27: 143-147

<sup>115</sup> Ayer J.G., Harmer J.A., Nakhla S., Xuan W., Ng M.K., Raitakari O.T., Marks G.B., Celermajer D.S.: *HDL-cholesterol, blood pressure, and asymmetric dimethylarginine are significantly associated with arterial wall thickness in children*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2009; 29: 943-949

<sup>116</sup> Pilon G., Dallaire P., Marette A.: *Inhibition of inducible nitric-oxide synthase by activators of AMP-activated protein kinase: a new mechanism of action of insulin-sensitizing drugs*. J. Biol. Chem. 2004; 279: 20767-20774

W piśmiennictwie ukazały się także prace wskazujące na udział ADMA w występowaniu stanu przedrzucawkowego u kobiet w ciąży<sup>117</sup> oraz, że monitorowanie stężenia ADMA powinno być przeprowadzone w każdym przypadku ryzyka wystąpienia tej patologii ciąży.

Uważa się także, że wysoki poziom ADMA może mieć znaczenie w powstawaniu zjawisk drgawkowych. Wiadomo, że ADMA indukuje zmiany w metabolizmie Arg, która jest prekursorem ważnych neuroprzekaźników o charakterze pobudzającym (glutaminianu) i hamującym (GABA). ADMA może więc odgrywać rolę w zachowaniu prawidłowego poziomu pobudliwości neuronalnej poprzez wpływ na równowagę pomiędzy pobudzeniem i hamowaniem synaptycznym.

Brak jest jednak doniesień o wpływie LPP u chorych leczonych z powodu padaczki na poziom ADMA, szczególnie w warunkach hHcy.

### 1.9.5. Arginina

L-arginina (kwas 2-amino-5-guanidynowalerianowy) jest aminokwasem syntetyzowanym w cyklu mocznikowym, ale w różnych schorzeniach zalecana jest jej suplementacja. Jak wykazano podawanie egzogennej Arg stymuluje cykl mocznikowy oraz usuwanie toksycznego amoniaku, dlatego uważa się, że może mieć ona działanie detoksykacyjne, hepatoprotekcyjne oraz ochronne na OUN, a w tkankach, w których nie zachodzi cykl mocznikowy, Arg może być substratem dla NOS podczas syntezy NO. Według doniesień piśmiennictwa suplementacja Arg przywraca zaburzoną równowagę stężenia Arg:ADMA oraz w pewnym stopniu ogranicza hamujący wpływ ADMA na syntezę NO<sup>118</sup>. Ukazały się także prace w których wykazano, że suplementacja Arg wywiera korzystny efekt na naczynia w schorzeniach o etiologii miażdżycowej, takich jak choroba niedokrwienna serca<sup>119</sup> czy choroba tętnic obwodowych<sup>120</sup>.

---

<sup>117</sup> Mao D., Che J., Li K., Han S., Yue Q., Zhu L., Zhang W., Li L.: *Association of homocysteine, asymmetric dimethylarginine, and nitric oxide with preeclampsia*. Arch. Gynecol. Obstet. 2010; 282: 371-375

<sup>118</sup> Böger R.H.: *Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and cardiovascular disease: insights from prospective clinical trials*. Vasc. Med. 2005; 10: 19-25

<sup>119</sup> Ceremużyński L., Chamiec T., Herbaczyńska- Cedro K.: *Effect of supplemental oral L-arginine on exercise capacity in patients with stable angina pectoris*. Am. J. Cardiol. 1997; 80: 331-333

<sup>120</sup> Micker M., Chęciński P., Jabłecka A., Krauss H., Zapalski S.: *Influence of L-arginine oral supplementation on oxidative stress in patients with intermittent claudication*. Acta Angiol. 2002; 8: 137-142

## 2. Cel pracy

Celem pracy było oznaczenie częstości występowania polimorfizmów genów: *MTHFR* (C677T), *MTR* (A2756G), *MTHFD1* (G1958A), a także analiza stężenia aminokwasów siarkowych Hcy i Met oraz ADMA i Arg u chorych z padaczką leczonych: VPA, CBZ, LPP NG i w politerapii oraz u chorych z rozpoznaną padaczką przed włączeniem LPP, a także w grupie kontrolnej. W przeprowadzonych badaniach uwzględniono również analizę oznaczonych parametrów biochemicznych w zależności od posiadanego genotypu badanych genów włączonych w przemianę Hcy do Met.

## 3. Materiał i metody

### 3.1. Materiał

#### 3.1.1. Grupy badane

Grupę chorych z rozpoznaną padaczką kryptogenną stanowiły 63 osoby, 28 kobiet i 35 mężczyzn w wieku od 18-65 lat (średnia wieku  $35,3 \pm 13,8$  lat). Do grupy badanej zostali włączeni chorzy z padaczką hospitalizowani w Klinice Neurologii UM w Poznaniu oraz chorzy leczeni w Przyklinicznej Poradni Neurologicznej w latach 2004-2009.

Wśród chorych z padaczką 55 osób, 24 kobiety i 31 mężczyzn, w wieku od 18 do 65 lat (średnia wieku  $35,8 \pm 13,4$  lat), było leczonych różnymi LPP oraz 8 chorych, 4 kobiety i 4 mężczyzn, w wieku od 18 do 65 lat (średnia wieku  $31,7 \pm 17,2$  lat) oczekiwało na włączenie leczenia LPP.

W grupie chorych z padaczką leczonych LPP 56% stanowili chorzy z napadami uogólnionymi i 44% chorzy z napadami częściowymi. Natomiast w grupie chorych przed włączeniem leczenia LPP chorzy z napadami uogólnionymi stanowili 60%, a 40% stanowili chorzy z napadami częściowymi.

Jednocześnie w grupie chorych z padaczką leczonych LPP, 67% chorych było leczonych w monoterapii [VPA 59%; CBZ 27%; LPP NG (w większości LTG) 14%], a 33% chorych w politerapii. Wśród chorych leczonych LPP w politerapii 61% chorych otrzymywało VPA i LPP NG, 22% chorych VPA i CBZ, a 17% chorych CBZ i LPP NG. Jednocześnie w grupie chorych leczonych LPP 31% chorych przyjmowało leki krócej niż 5 lat, a 69% powyżej 5 lat. W grupie chorych z padaczką leczonych LPP średni poziom VPA i CBZ utrzymywał się w granicach wartości referencyjnych i wynosił średnio  $57,01 \mu\text{g/ml}$  i  $6,97 \mu\text{g/ml}$  odpowiednio.

#### 3.1.2. Grupa kontrolna

Grupę kontrolną stanowiło 61 ochotników, 41 kobiet i 20 mężczyzn w wieku od 22 do 67 lat (średnia wieku  $44,3 \pm 14,2$ ).

#### 3.1.3. Kryteria włączenia do badań

Rodzaj padaczki weryfikowano w oparciu o kryteria i terminologię rekomendowaną przez Commission on Classification and Terminology of The International League Against „Proposal for Revised Classification of Epilepsies and Epileptic Syndromes”<sup>5</sup>.

U osób z grupy kontrolnej nie stwierdzono schorzeń neurologicznych i cech otępienia. Jednocześnie u osób kontrolnych i chorych z padaczką nie stwierdzono zaburzeń funkcjonowania: wątroby, nerek i tarczycy, chorzy nie przyjmowali witamin z grupy B oraz FA. W przypadku chorych z padaczką

przyjmujących LPP popranie krwi do badań genetycznych i biochemicznych wykonywano przed przyjęciem kolejnej dawki leku.

Badanie odbyło się za zgodą Lokalnej Komisji Bioetycznej (KB nr 709/07).

## 3.2. Metody

### 3.2.1. Przygotowanie krwi do badań

Krew pobraną od osób z grupy kontrolnej i od chorych z padaczką wirowano przez 10 min. przy 3000 g, następnie zbierano supernatant i zamrażano do dalszych badań w temp. -80°C.

Krew pełną pobraną od osób badanych do analizy genetycznej zamrażano w temp. -80°C.

### 3.2.2. Analiza stężenia homocysteiny i metioniny

Przygotowanie próbek. Analizowane związki tiolowe i odpowiednie standardy (Hcy, Fluka, Niemcy; Met, Sigma, USA) rozcieńczano wodą w stosunku 2:1 i redukowano za pomocą 1% TCEP (Tris-(2-cerboxylethyl)-phosphin-hydrochlorid, Applichem, Niemcy) w stosunku 1:9. Następnie próbki odbiańczano 1 M HClO<sub>4</sub> w stosunku 2:1 i podawano do układu wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją elektrochemiczną (HPLC/EC, ang. *High Pressure Liquid Chromatography/Electrochemical Detection*)<sup>121</sup>. Standardy przygotowano w rozcieńczeniach 5, 10, 15, 20 i 30 μM dla Hcy oraz 10, 20, 30, 40, 60 μM dla Met.

Oznaczanie stężenia analizowanych biotioili. Próbki podawano do układu HPLC (P580A, Dionex, Niemcy) połączonego z detektorem elektrochemicznym (CoulArray 5600, ESA, USA). Analizę przeprowadzano na kolumnie Thermo Hypersil BDS C18 (250 x 4,6 x 5μ, Niemcy) w warunkach izokratycznych używając jako fazę ruchomą 0,15 M bufor fosforanowy o pH 2,9 z dodatkiem 12,5-17% acetonitrylu.

Do sterowania układem, zbierania i obróbki danych użyto oprogramowania Chromeleon (Dionex, Niemcy).

### 3.2.3. Analiza stężenia ADMA i argininy

Przygotowanie próbek i przeprowadzanie derywatyzacji. Analizowane związki i odpowiednie standardy (ADMA, Arg, Sigma, USA) rozcieńczano wodą w stosunku 1,5:1,0 a następnie odbiańczano 8 M HClO<sub>4</sub> w stosunku 1:5. Bezpośrednio przed analizą HPLC próbki poddawano derywatyzacji w roztworze zawierającym 10 mg OPA (Sigma, USA) w 100 μl metanolu z dodatkiem 900 μl 0,4 M buforu boranowego

---

<sup>121</sup> Accinni R., Bartesaghi S., De Leo G., Cursano C.F., Achilli G., Loaldi A., Cellerino C., Parodi O.: *Screening of homocysteine from newborn blood spots by high-performance liquid chromatography with coulometric array detection.* J. Chromatogr. A 2000; 896(1-2): 186-189

o pH 8,5 i 5  $\mu$ l 2-merkaptoetanolu w stosunku 1:1<sup>122</sup>. Standardy przygotowano w rozcieńczeniach 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 i 3,0  $\mu$ M dla ADMA oraz 10, 20, 30, 40 i 60  $\mu$ M dla Arg.

Oznaczanie stężenia ADMA i Arg. Próbkę podawano do układu HPLC (P580A, Dionex, Niemcy) połączonego z detektorem fluoroscencyjnym (RF2000, Dionex, Niemcy). Analizę przeprowadzono na kolumnie Thermo Hypersil BDS C18 (250 x 4,6 x 5 $\mu$ , Niemcy) w warunkach izokratycznych używając jako fazę ruchomą 0,1 M bufor fosforanowy o pH 6,75 z dodatkiem 25% metanolu. Stężenie ADMA i Arg mierzono fluorometrycznie stosując wzbudzenie i emisję przy długości fali 340 i 455 nm odpowiednio. Do sterowania układem, zbierania i obróbki danych użyto oprogramowania Chromeleon (Dionex, Niemcy).

### 3.2.4. Genotypowanie

Badanie polimorfizmów genów *MTHFR* (C677T), *MTR* (A2756G)<sup>123</sup> i *MTHFD1* (G1958A) przeprowadzono metodą reakcji łańcuchowej polimerazy z zastosowaniem enzymów restrykcyjnych (PCR-RFLP, ang. *Polymerase Chain Reaction– Restriction Fragment Length Polymorphism*).

Reakcję PCR przeprowadzono z użyciem 10 ng genomowego DNA. Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 25  $\mu$ l i zawierała 20 mM TrisHCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,11 mM każdego z DTP, 0,3  $\mu$ M każdego ze starterów (Tab. 2) oraz 1u polimerazy Taq DNA.

Produkty reakcji PCR poddawano trawieniu przy użyciu odpowiednich enzymów restrykcyjnych, które rozpoznają i przecinają zmutowany lub też dziki wariant genu. Proces trawienia przeprowadzano w temperaturze 37°C przez 3 godziny. Dla uwidocznienia produktów reakcji w świetle UV otrzymane fragmenty rozdzielano na 2% żelu agarozowym w buforze 0,5xTBE z dodatkiem bromku etydyny. Otrzymane wyniki potwierdzano poprzez bezpośrednie sekwencjonowanie produktów PCR.

---

<sup>122</sup> Pi J., Kumagai Y., Sun G., Shimojo N.: *Improved method for simultaneous determination of L-arginine and its mono- and dimethylated metabolites in biological samples by high-performance liquid chromatography.* J Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 2000; 742(1): 199-203

<sup>123</sup> Mostowska A., Hołysz K.K., Jagodziński P.P.: *Maternal MTR genotype contributes to the risk of non-syndromic cleft lip and palate in the Polish population.* Clin. Gen. 2006; 69: 512–517

Tabela 2. Startery i enzymy restrykcyjne używane do genotypowania wybranych polimorfizmów genów: *MTHFR*, *MTR*, *MTHFD1* u chorych z padaczką i w grupie kontrolnej

Gen	Polimorfizm	Enzym restrykcyjny	Starter		Temperatura przyłączenia starteru (°C)	Wielkość produktu (pz)
			Typ	Sekwencje, 5'–3'		
<b>MTHFR</b>	C677T	HinfI	Sense	AGG CTG TGC TGT GCT GTT G	66	477
			Antisense	CGC TGT GCA AGT TCT GGA C		
<b>MTR</b>	A2756G	HaeIII	Sense	GTT GGT GAA GGG AGA AGA AAT G	56	583
			Antisense	CTG AAG AAT GGG GGT CTG TG		
<b>MTHFD1</b>	G1958A	MspI	Sense	TTC TTC TCA TTC TTC CTC ACA CC	60	416
			Antisense	TCT GCT CCA AAT CCT GCT TC		

### 3.3. Statystyczna ocena wyników

Uzyskane wyniki badań analizowano przy użyciu nieparametrycznego testu Manna-Whitney'a dla zmiennych niepowiązanych oraz parametrycznego testu One-way ANOVA dla zmiennych powiązanych. Korelacje pomiędzy uzyskanymi wynikami oceniano testem R Spearmana.

Do oceny statystycznej wyników użyto oprogramowania GraphPad (Instat, USA) oraz Statistica for Windows (Statsoft, USA).



## 4. Wyniki

Badaniu poddano częstość występowania polimorfizmów genów: *MTHFR* (C677T), *MTR* (A2756G) i *MTHFD1* (G1958A), a także analizę stężenia dwóch związków tiolowych: Hcy i Met oraz ADMA i Arg w osoczu krwi obwodowej u chorych z padaczką leczonych LPP w monoterapii (VPA, CBZ, LPP NG) i w politerapii (VPA+LPP NG, CBZ+LPP NG, VPA+CBZ), przed włączeniem LPP oraz w grupie kontrolnej.

Tabela 3. Stężenie Hcy, Met, ADMA, Arg u chorych z padaczką przed włączeniem leczenia LPP(-) i po włączeniu różnych LPP(+) oraz w grupie kontrolnej

Analizowany związek	Grupa kontrolna	Chorzy z padaczką		P
		LPP(-)	LPP(+)	
Hcy [ $\mu\text{M}$ ]	11,9 $\pm$ 4,0	12,9 $\pm$ 3,2	14,5 $\pm$ 6,7*	<b>0,0383</b>
Met [ $\mu\text{M}$ ]	22,6 $\pm$ 6,0	15,7 $\pm$ 9,2*	19,7 $\pm$ 7,9	<b>0,0180</b>
Met:Hcy	2,1 $\pm$ 0,9	1,4 $\pm$ 0,6	1,5 $\pm$ 0,8**	<b>0,0011</b>
ADMA [ $\mu\text{M}$ ]	1,6 $\pm$ 1,0	1,7 $\pm$ 1,0	2,4 $\pm$ 1,3**	<b>0,0053</b>
Arg [ $\mu\text{M}$ ]	73,7 $\pm$ 25,7	56,8 $\pm$ 29,6	68,2 $\pm$ 29,9	<b>0,3317</b>
Arg:ADMA	85,7 $\pm$ 120,7	45,4 $\pm$ 37,8	42,4 $\pm$ 38,7*	<b>0,0428</b>

Średnia  $\pm$  SD

Użyto parametrycznego testu One-way ANOVA dla zmiennych niepowiązanych  
Statystycznie istotne różnice przy \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  w porównaniu z kontrolą

### Różnice statystycznie istotne w teście Spearmana:

#### Grupa kontrolna:

współczynnik R Spearmana +0,6286,  $p=0,0001$  pomiędzy Met i Met:Hcy

współczynnik R Spearmana +0,3214,  $p=0,0201$  pomiędzy Arg i ADMA

#### Chorzy z padaczką przed włączeniem leczenia LPP(-):

współczynnik R Spearmana -0,9000,  $p=0,0374$  pomiędzy Hcy i Arg:ADMA

współczynnik R Spearmana +0,8108,  $p=0,0269$  pomiędzy Met i Met:Hcy

#### Chorzy z padaczką po włączeniu leczenia LPP(+):

współczynnik R Spearmana -0,3479,  $p=0,0099$  pomiędzy Hcy i Met:Hcy

współczynnik R Spearmana +0,6215,  $p=0,0001$  pomiędzy Met i Met:Hcy

współczynnik R Spearmana -0,8553,  $p=0,0001$  pomiędzy ADMA i Arg:ADMA

współczynnik R Spearmana +0,4530,  $p=0,0007$  pomiędzy Arg i Arg:ADMA

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano (Tab. 3), że u chorych z padaczką leczonych różnymi LPP obserwowano statystycznie istotny wzrost stężenia Hcy (test One-way ANOVA,  $p < 0,05$  w porównaniu z kontrolą). Jednocześnie wykazano, że wzrost ten powyżej dolnej granicy łagodnej hHcy (powyżej  $16 \mu\text{M}$ ) dotyczył 27%, a powyżej górnej granicy wartości referencyjnych (powyżej  $15 \mu\text{M}$ ) 36% chorych z padaczką leczonych LPP.

Ponadto wykazano, że stężenie Met statystycznie istotnie obniżało się jedynie u chorych z padaczką przed włączeniem LPP (test One-way ANOVA,  $p < 0,05$  w porównaniu z kontrolą). Natomiast zarówno u chorych z padaczką leczonych LPP, jak i u oczekujących na włączenie LPP obserwowano spadek poziomu stosunku Met:Hcy, ale istotny statystycznie jedynie u chorych leczonych LPP (test One-way ANOVA,  $p < 0,01$  w porównaniu z kontrolą). Ponadto stwierdzono, że u chorych z padaczką leczonych LPP wzrostowi stężenia Hcy towarzyszył wzrost stężenia ADMA (test One-way ANOVA,  $p < 0,01$  w porównaniu z kontrolą), jednocześnie wyrażony statystycznie istotnym spadkiem poziomu stosunku Arg:ADMA (test One-way ANOVA,  $p < 0,05$  w porównaniu z kontrolą). Natomiast u wszystkich badanych chorych z padaczką stężenie Arg ulegało statystycznie nieistotnemu obniżeniu.

Ponadto w grupie kontrolnej w teście Spearmana wykazano dodatnią korelację zarówno pomiędzy stężeniem Met a poziomem stosunku Met:Hcy ( $R$  Spearmana  $+0,6286$ ,  $p = 0,0001$ ), jak i stężeniem Arg i ADMA ( $R$  Spearmana  $+0,3214$ ,  $p = 0,0201$ ). Jednocześnie wykazano, że dodatnia korelacja pomiędzy stężeniem Met a poziomem stosunku Met:Hcy utrzymywała się u chorych z padaczką zarówno przed włączeniem LPP ( $R$  Spearmana  $+0,8108$ ,  $p = 0,0269$ ), jak i po leczeniu LPP ( $R$  Spearmana  $+0,6215$ ,  $p = 0,0001$ ). Wykazano również, że włączenie LPP u chorych z padaczką prowadziło do pojawienia się dodatkowej dodatniej korelacji pomiędzy stężeniem Arg i poziomem stosunku Arg:ADMA ( $R$  Spearmana  $+0,4530$ ,  $p = 0,0007$ ). Ponadto wykazano, że zarówno u chorych z padaczką przed włączeniem leczenia (Hcy i Arg:ADMA;  $R$  Spearmana  $-0,9000$ ,  $p = 0,0374$ ), jak i po włączeniu LPP (Hcy i Met:Hcy;  $R$  Spearmana  $-0,3479$ ,  $p = 0,0099$  oraz ADMA i Arg:ADMA;  $R$  Spearmana  $-0,8553$ ,  $p = 0,0001$ ) obserwowano ujemne korelacje pomiędzy wybranymi analizowanymi biotiolami a ADMA i jej metabolitem (Arg) lub metabolitem Hcy.

Tabela 4. Stężenie Hcy, Met, ADMA, Arg u chorych z padaczką leczonych różnymi LPP w zależności od rodzaju napadów padaczkowych

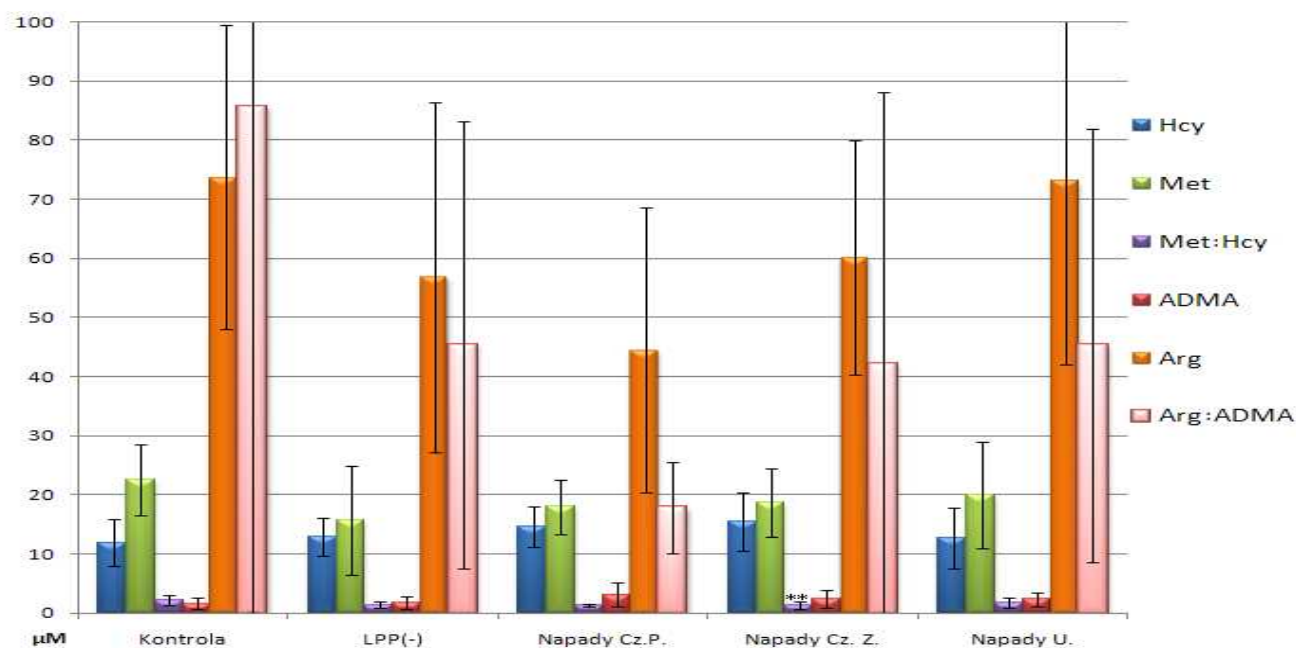
Analizowany związek	Chorzy z padaczką			p
	Napady częściowe proste	Napady częściowe złożone	Napady uogólnione	
Hcy [ $\mu\text{M}$ ]	14,6 $\pm$ 3,5	15,5 $\pm$ 4,9	12,7 $\pm$ 5,1	0,1710
Met [ $\mu\text{M}$ ]	18,0 $\pm$ 4,6	18,7 $\pm$ 5,8	20,0 $\pm$ 9,0	0,8098
Met:Hcy	1,3 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,6	1,7 $\pm$ 0,9	0,1437
ADMA [ $\mu\text{M}$ ]	3,1 $\pm$ 2,0	2,4 $\pm$ 1,5	2,3 $\pm$ 1,2	0,7054
Arg [ $\mu\text{M}$ ]	44,5 $\pm$ 24,1	60,1 $\pm$ 19,8	73,1 $\pm$ 31,0	0,1070
Arg:ADMA	17,8 $\pm$ 7,8	42,2 $\pm$ 45,9	45,3 $\pm$ 36,7	0,5306

Średnia  $\pm$  SD

Użyto parametrycznego testu One-way ANOVA dla zmiennych niepowiązanych

Brak statystycznie istotnych różnic

Rysunek 4. Stężenie Hcy, Met, ADMA, Arg u chorych z padaczką leczonych różnymi LPP z napadami częściowymi i uogólnionymi, przed włączeniem LPP (-) i w grupie kontrolnej



Średnia  $\pm$  SD, użyto testu One-way ANOVA, Met:Hcy, \*\*p<0,01 pomiędzy chorymi leczonymi różnymi LPP z napadami częściowymi złożonymi i kontrolą

Ponadto wykazano (Tab. 4, Rys. 4), że u chorych z padaczką leczonych LPP zarówno z napadami częściowymi (prostymi lub złożonymi), jak i uogólnionymi stężenie Hcy utrzymywało się na porównywalnym, statystycznie nieistotnym, podwyższonym poziomie w porównaniu z osobami kontrolnymi (Tab. 3). Poza tym u tych chorych ulegało obniżeniu stężenie metabolitów Hcy i ADMA, Met i Arg odpowiednio, jednocześnie wyrażone spadkiem poziomu stosunków Met:Hcy (test One-way ANOVA, u chorych z napadami częściowymi złożonymi,  $p < 0,01$  w porównaniu z kontrolą) i Arg:ADMA w porównaniu z osobami zdrowymi.

Tabela 5. Stężenie Hcy, Met, ADMA, Arg u chorych z padaczką leczonych VPA, CBZ, LPP NG i w politerapii

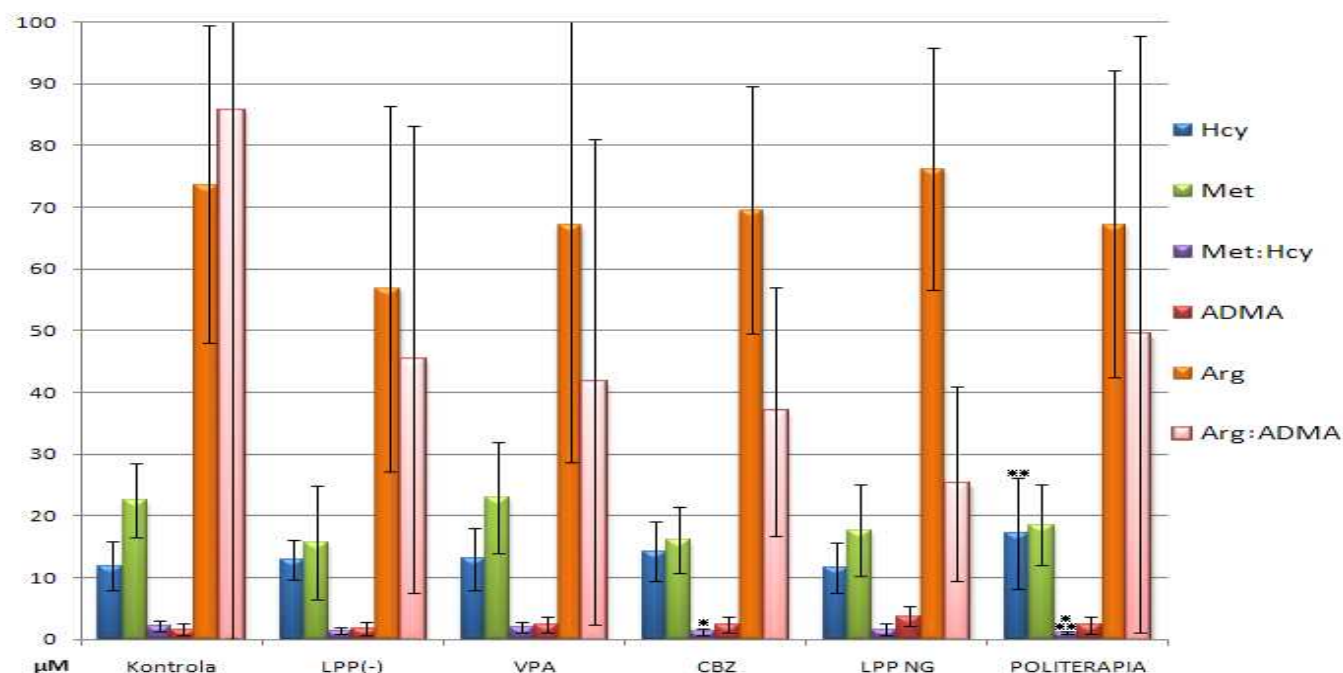
Analizowany związek	Chorzy z padaczką				P
	VPA	CBZ	LPP NG	Politerapia	
Hcy [ $\mu\text{M}$ ]	13,0 $\pm$ 5,0	14,2 $\pm$ 4,8	11,6 $\pm$ 4,1	17,2 $\pm$ 9,0	0,1610
Met [ $\mu\text{M}$ ]	22,9 $\pm$ 9,0	16,1 $\pm$ 5,4	17,6 $\pm$ 7,4	18,5 $\pm$ 6,5	0,0883
Met:Hcy	2,0 $\pm$ 0,9	1,2 $\pm$ 0,5*	1,6 $\pm$ 0,9	1,1 $\pm$ 0,3**	0,0043
ADMA [ $\mu\text{M}$ ]	2,4 $\pm$ 1,3	2,3 $\pm$ 1,3	3,7 $\pm$ 1,6	2,3 $\pm$ 1,4	0,4384
Arg [ $\mu\text{M}$ ]	67,1 $\pm$ 38,4	69,6 $\pm$ 20,0	76,3 $\pm$ 19,6	67,3 $\pm$ 24,9	0,9647
Arg:ADMA	41,7 $\pm$ 39,4	36,9 $\pm$ 20,2	25,2 $\pm$ 15,8	49,4 $\pm$ 48,4	0,7271

Średnia  $\pm$  SD

Użyto parametrycznego testu One-way ANOVA dla zmiennych niepowiązanych

Statystycznie istotne różnice przy  $*p < 0,05$  pomiędzy chorymi leczonymi VPA i CBZ oraz przy  $**p < 0,01$  pomiędzy chorymi leczonymi VPA i w politerapii

Rysunek 5. Stężenie Hcy, Met, ADMA, Arg u chorych z padaczką leczonych VPA, CBZ, LPP NG i w politerapii, przed włączeniem LPP(-) i w grupie kontrolnej



Średnia  $\pm$  SD, użyto testu One-way ANOVA, dla Met:Hcy, \*  $p<0,05$  i \*\*\*  $p<0,001$  pomiędzy chorymi leczonymi CBZ oraz w politerapii i kontrolą odpowiednio; dla Hcy, \*\*  $p<0,01$  pomiędzy chorymi leczonymi w politerapii i kontrolą

Jednocześnie uwzględniając rodzaj stosowanej farmakoterapii u chorych z padaczką wykazano (Tab. 5, Rys. 5), że stężenie Hcy ulegało statystycznie istotnemu podwyższeniu jedynie u chorych z padaczką leczonych w politerapii (test One-way ANOVA,  $p<0,01$  w porównaniu z kontrolą) oraz praktycznie nie ulegało zmianie jedynie u chorych leczonych LPP NG. Natomiast stężenie Met najwyraźniej obniżało się u chorych leczonych CBZ i praktycznie nie zmieniało się podczas terapii VPA. Jednocześnie, jedynie u chorych leczonych VPA poziom stosunku Met:Hcy nie ulegał obniżeniu w porównaniu z kontrolą (test One-way ANOVA, dla chorych leczonych CBZ,  $p<0,05$  w porównaniu z kontrolą i chorymi leczonymi VPA; dla chorych leczonych w politerapii,  $p<0,01$  w porównaniu z chorymi leczonymi VPA,  $p<0,001$  w porównaniu z kontrolą). Natomiast u wszystkich chorych niezależnie od rodzaju stosowanej terapii LPP następował statystycznie nieistotny wzrost stężenia ADMA, oraz spadek stężenia Arg (oprócz chorych leczonych LPP NG) i poziomu stosunku Arg:ADMA, który najwyraźniej był obniżony u chorych leczonych LPP NG.

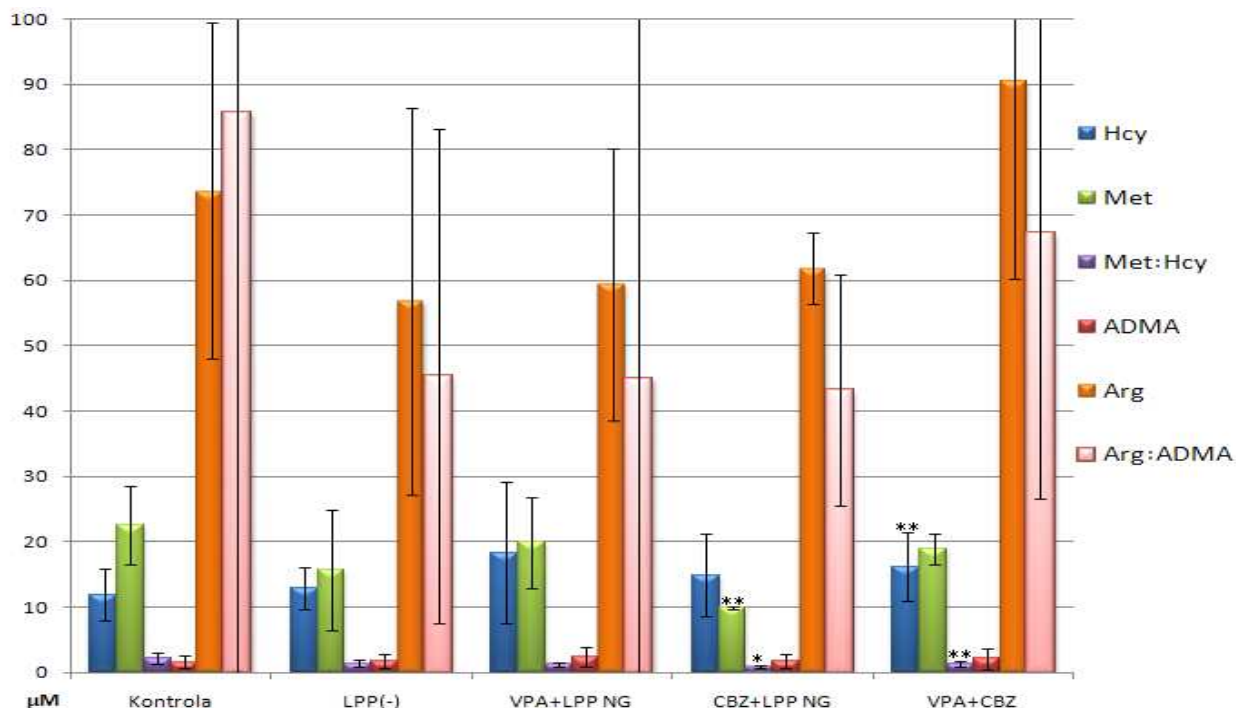
Tabela 6. Stężenie Hcy, Met, ADMA, Arg u chorych z padaczką leczonych w politerapii

Analizowany związek	Chorzy z padaczką			P
	VPA + LPP NG	CBZ + LPP NG	VPA + CBZ	
Hcy [ $\mu\text{M}$ ]	18,3 $\pm$ 10,8	14,9 $\pm$ 6,3	16,2 $\pm$ 5,2	0,8364
Met [ $\mu\text{M}$ ]	19,9 $\pm$ 7,0	9,9 $\pm$ 0,2	18,9 $\pm$ 2,4	0,0527
Met:Hcy	1,2 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,5	0,1516
ADMA [ $\mu\text{M}$ ]	2,4 $\pm$ 1,5	1,7 $\pm$ 1,1	2,1 $\pm$ 1,6	0,7621
Arg [ $\mu\text{M}$ ]	59,5 $\pm$ 20,8	61,9 $\pm$ 5,5	90,5 $\pm$ 30,0	0,0766
Arg:ADMA	45,0 $\pm$ 55,1	43,2 $\pm$ 17,7	67,2 $\pm$ 40,7	0,7233

Średnia  $\pm$  SD

Użyto parametrycznego testu One-way ANOVA dla zmiennych niepowiązanych  
Brak statystycznie istotnych różnic

Rysunek 6. Stężenie Hcy, Met, ADMA, Arg u chorych z padaczką leczonych w politerapii, przed włączeniem LPP(-) i w grupie kontrolnej



Średnia  $\pm$  SD, użyto testu One-way ANOVA, dla Met:Hcy, \*  $p < 0,05$  pomiędzy chorymi leczonymi CBZ+LPP NG i kontrolą; \*\*  $p < 0,01$ ; dla Hcy i Met:Hcy, pomiędzy chorymi leczonymi VPA+LPP NG i kontrolą oraz dla Met, pomiędzy chorymi leczonymi CBZ+LPP NG i kontrolą

Analizując poziom badanych parametrów biochemicznych u chorych z padaczką leczonych w politerapii zarówno w przypadku łączenia leków starej i nowej generacji, jak i jedynie leków starej generacji (Tab. 6, Rys. 6) stwierdzono, że stężenie Hcy ulegało statystycznie istotnemu podwyższeniu jedynie u chorych leczonych VPA+LPP NG (test One-way ANOVA,  $p < 0,01$  w porównaniu z kontrolą), a stężenie Met statystycznie istotnemu obniżeniu jedynie u chorych leczonych CBZ+LPP NG (test One-way ANOVA,  $p < 0,01$  w porównaniu z kontrolą).

Ponadto wykazano, że poziom stosunku Met:Hcy ulegał statystycznie istotnemu obniżeniu u wszystkich chorych leczonych w politerapii (VPA lub CBZ) z lekami NG (test One-way ANOVA, dla CBZ+LPP NG,  $p < 0,05$  w porównaniu z kontrolą; dla VPA+LPP NG,  $p < 0,01$  w porównaniu z kontrolą). Jednocześnie u chorych leczonych CBZ+LPP NG najniższemu wzrostowi stężenia Hcy towarzyszył najniższy wzrost stężenia ADMA.

Ponadto leczenie chorych z padaczką w politerapii lekami starej generacji (VPA+CBZ) wykazywało tendencję do nieobniżania stężenia Arg i utrzymywania stosunku Arg:ADMA na poziomie zbliżonym do kontrolnego.

*Tabela 7. Stężenie Hcy, Met, ADMA, Arg u chorych z padaczką leczonych różnymi LPP w zależności od czasu podawania leków*

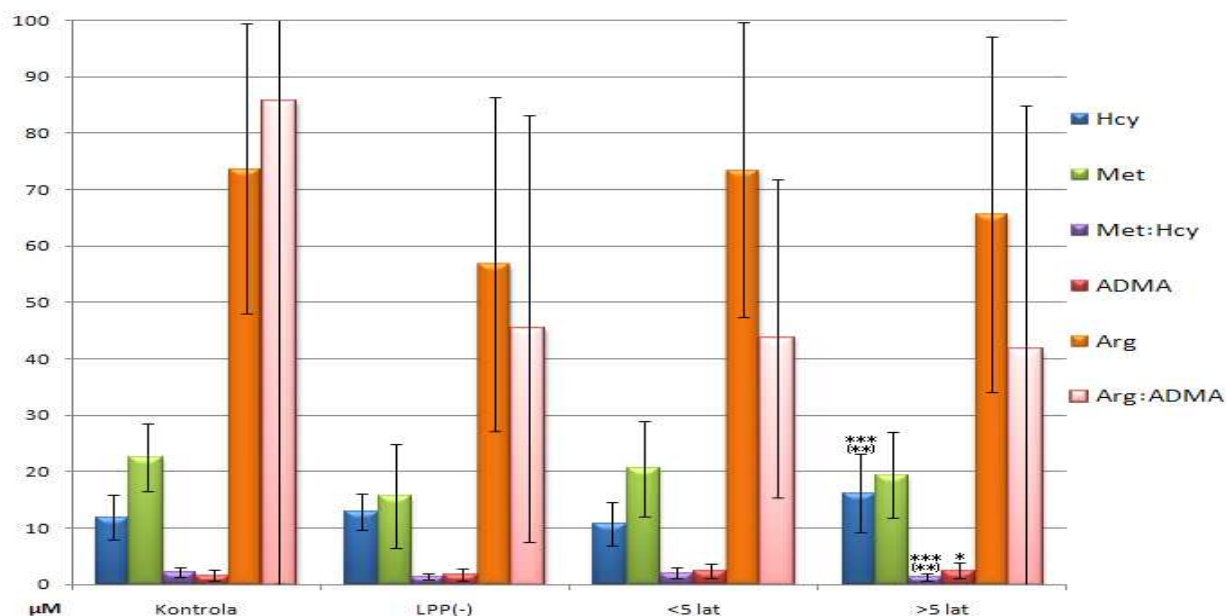
Analizowany związek	Chorzy z padaczką leczeni LPP		p
	Poniżej 5 lat	Powyżej 5 lat	
Hcy [ $\mu\text{M}$ ]	10,7 $\pm$ 3,9	16,2 $\pm$ 7,0 <sup>***</sup>	0,0001
Met [ $\mu\text{M}$ ]	20,5 $\pm$ 8,5	19,4 $\pm$ 7,6	0,2603
Met:Hcy	2,0 $\pm$ 1,0	1,3 $\pm$ 0,6 <sup>***</sup>	0,0010
ADMA [ $\mu\text{M}$ ]	2,3 $\pm$ 1,3	2,4 $\pm$ 1,4	0,3849
Arg [ $\mu\text{M}$ ]	73,5 $\pm$ 26,2	65,6 $\pm$ 31,5	0,0876
Arg:ADMA	43,7 $\pm$ 28,2	41,7 $\pm$ 43,2	0,1529

Średnia  $\pm$  SD

Użyto nieparametrycznego testu Manna-Whitney'a dla zmiennych niepowiązanych

Statystycznie istotne różnice przy <sup>\*\*\*</sup> $p < 0,001$  w porównaniu z chorymi leczonymi LPP poniżej 5 lat

Rysunek 7. Stężenie Hcy, Met, ADMA, Arg u chorych z padaczką leczonych różnymi LPP w zależności od czasu podawania leków, przed włączeniem LPP(-) i w grupie kontrolnej



Średnia  $\pm$  SD, użyto testu One-way ANOVA, dla Hcy, (\*\*) $p < 0,01$  pomiędzy chorymi leczonymi  $< 5$  i  $> 5$  lat i (\*\*\*) $p < 0,001$  pomiędzy chorymi leczonymi  $> 5$  lat i kontrolą; dla Met:Hcy, (\*\*) $p < 0,01$  pomiędzy chorymi leczonymi  $< 5$  i  $> 5$  lat i (\*\*\*) $p < 0,001$  pomiędzy chorymi leczonymi  $> 5$  lat i kontrolą; dla ADMA, (\*) $p < 0,05$  pomiędzy chorymi leczonymi  $> 5$  lat i kontrolą

Ponadto uwzględniając czas trwania leczenia LPP stwierdzono, że długotrwała kuracja chorych z padaczką różnymi LPP (powyżej 5 lat) (Tab. 7, Rys. 7) prowadziła do statystycznie istotnego wzrostu stężenia Hcy (test Manna-Whitney'a,  $p < 0,001$  w porównaniu z chorymi leczonymi LPP poniżej 5 lat i test One-way ANOVA,  $p < 0,001$  w porównaniu z kontrolą) i nie prowadziła do zmiany stężenia ADMA w porównaniu z chorymi leczonymi w kuracji poniżej 5 lat (test One-way ANOVA,  $p < 0,05$  pomiędzy chorymi leczonymi  $> 5$  lat i kontrolą). Równocześnie wykazano, że przyjmowanie LPP w okresie dłuższym niż 5 lat nieznacznie obniżało stężenie Met i Arg oraz statystycznie istotnie poziom stosunku Met:Hcy (test Manna-Whitney'a,  $p < 0,001$  w porównaniu z chorymi leczonymi LPP  $< 5$  lat; test One-way ANOVA,  $p < 0,01$  pomiędzy chorymi leczonymi  $< 5$  i  $> 5$  lat i  $p < 0,001$  pomiędzy chorymi leczonymi  $> 5$  lat i kontrolą). Natomiast poziom stosunku Arg:ADMA u tych chorych ulegał statystycznie nieistotnemu obniżeniu nawet w okresie pierwszych 5 lat przyjmowania leków.



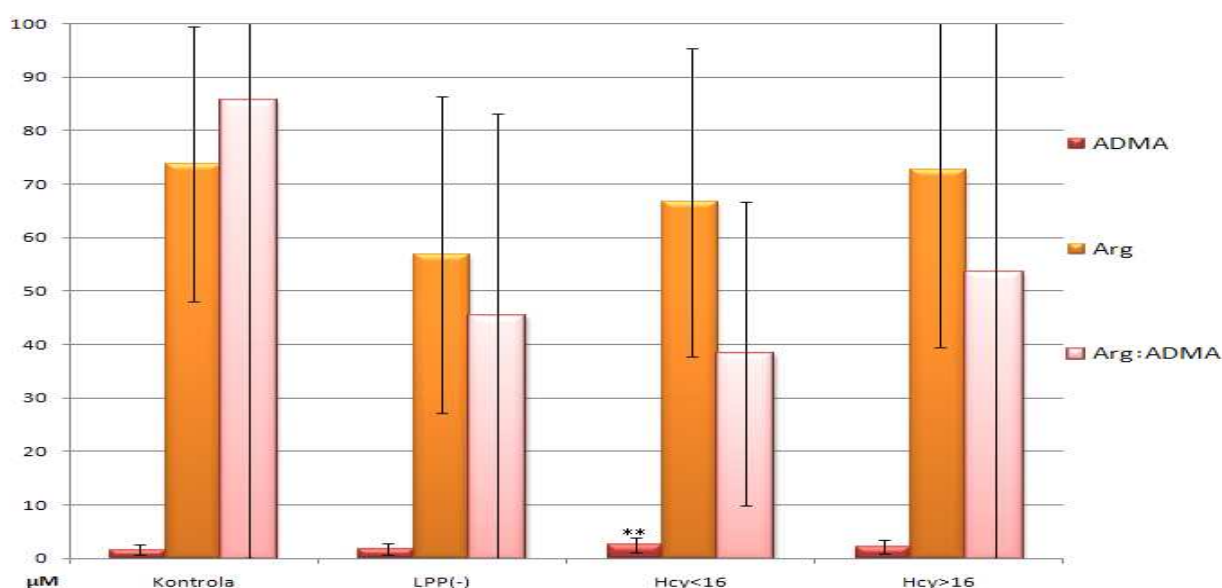
Tabela 8. Stężenie ADMA, Arg u chorych z padaczką leczonych różnymi LPP z Hcy poniżej i powyżej 16  $\mu\text{M}$

Analizowany Związek	Chorzy z padaczką leczeni LPP		P
	Hcy poniżej 16 $\mu\text{M}$	Hcy powyżej 16 $\mu\text{M}$	
ADMA [ $\mu\text{M}$ ]	2,5 $\pm$ 1,4	2,2 $\pm$ 1,3	0,3066
Arg [ $\mu\text{M}$ ]	66,6 $\pm$ 28,9	72,6 $\pm$ 33,1	0,3746
Arg:ADMA	38,3 $\pm$ 28,4	53,4 $\pm$ 58,2	0,2289

Średnia  $\pm$  SD

Użyto nieparametrycznego testu Manna-Whitney'a dla zmiennych niepowiązanych  
Brak statystycznie istotnych różnic

Rysunek 8. Stężenie ADMA i Arg u chorych z padaczką leczonych różnymi LPP z Hcy poniżej i powyżej 16  $\mu\text{M}$ , przed włączeniem LPP(-) i w grupie kontrolnej



Średnia  $\pm$  SD, użyto testu One-way ANOVA,

dla ADMA, \*\* $p < 0,01$  pomiędzy chorymi z Hcy<16  $\mu\text{M}$  i kontrolą

Natomiast analiza stężenia parametrów biochemicznych (ADMA, Arg) u chorych z padaczką leczonych LPP z łagodną hHcy (Hcy>16  $\mu\text{M}$ ) (Tab. 8, Rys. 8) wykazała, że u tych chorych stężenie ADMA nie uległo podwyższeniu (test One-way ANOVA, dla chorych z Hcy<16  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0,01$  w porównaniu z kontrolą), a stężenie Arg i poziom stosunku Arg:ADMA u tych chorych uległo niewielkiemu podwyższeniu w porównaniu z chorymi z Hcy<16  $\mu\text{M}$ .

Tabela 9. Lokalizacja i częstość występowania genotypów genów *MTHFR C677T*, *MTHFRD1 G1958A*, *MTR A2756* u chorych z padaczką i w grupie kontrolnej

Lokalizacja genu	Genotypy	Grupa kontrolna	Chorzy z padaczką
MTHFR C677T	CC	46%	57%
	CT	50%	32%
	TT	4%	11%
MTR A2756	AA	69%	54%
	AG	31%	39%
	GG	0%	7%
MTHFD1 G1958A	GG	27%	25%
	GA	55%	49%
	AA	18%	26%

Analizie poddano również częstość występowania polimorfizmu *C677T* genu kodującego *MTHFR* (Tab. 9) i stwierdzono zróżnicowany rozkład genotypów tego genu zarówno w kontroli, jak i u chorych z padaczką. W grupie kontrolnej obserwowano największą ilość osób z genotypem heterozygotycznym CT oraz najmniejszą ilość osób z homozygotą nieprawidłową TT (*C677T MTHFR*). Natomiast wśród chorych z padaczką wzrastała ilość osób z homozygotą zarówno prawidłową CC, jak i nieprawidłową TT (prawie 3-krotnie więcej niż w grupie kontrolnej) *C677T MTHFR*.

Natomiast w przypadku genu kodującego *MTR* (*A2756G*) (Tab. 9) w grupie kontrolnej najwięcej było osób z genotypem prawidłowym AA (*A2756G MTR*) oraz w grupie tej nie występował genotyp homozygotyczny nieprawidłowy GG (*A2756G MTR*). Wśród chorych z padaczką natomiast wzrastała ilość osób z heterozygotą AG (*A2756G MTR*) i pojawiły się osoby z homozygotą nieprawidłową GG (*A2756G MTR*).

W przypadku polimorfizmu *G1958A MTHFD1*, wśród chorych z padaczką stwierdzono jedynie więcej osób z genotypem homozygotycznym AA (*G1958A MTHFD1*) niż w grupie osób kontrolnych (Tab. 9), chociaż zarówno u osób kontrolnych, jak i wśród chorych z padaczką w przewadze były osoby z genotypem heterozygotycznym GA (*G1958A MTHFD1*). Genotyp homozygotyczny prawidłowy GG (*G1958A MTHFD1*) w obu grupach występował praktycznie na jednakowym poziomie i jedynie w grupie kontrolnej był w przewadze w stosunku do nieprawidłowego AA (*G1958A MTHFD1*).

Tabela 10. Stężenie Hcy, Met, ADMA, Arg w zależności od genotypów *MTHFR* C677T u chorych z padaczką leczonych różnymi LPP i w grupie kontrolnej

Analizowany związek	Grupa kontrolna		Chorzy z padaczką		p
	<i>MTHFR</i> C677T		<i>MTHFR</i> C677T		
	CC	CT	CC	CT	CC CT
Hcy [ $\mu$ M]	12,4 $\pm$ 4,6	11,1 $\pm$ 3,7	13,6 $\pm$ 5,0	13,7 $\pm$ 5,2*	0,1774 0,0360
Met [ $\mu$ M]	23,0 $\pm$ 6,1	22,3 $\pm$ 4,8	20,2 $\pm$ 9,2*	20,1 $\pm$ 4,7	0,0321 0,0562
Met:Hcy	2,1 $\pm$ 1,0	2,2 $\pm$ 0,9	1,7 $\pm$ 1,0*	1,6 $\pm$ 0,5*	0,0472 0,0131
ADMA [ $\mu$ M]	1,6 $\pm$ 0,9	1,3 $\pm$ 1,0	2,1 $\pm$ 1,2	2,9 $\pm$ 1,5***	0,0747 0,0007
Arg [ $\mu$ M]	74,6 $\pm$ 26,6	66,4 $\pm$ 22,3	73,1 $\pm$ 34,1	57,8 $\pm$ 23,2	0,3245 0,1144
Arg:ADMA	75,1 $\pm$ 68,1	124,2 $\pm$ 177,1	46,8 $\pm$ 35,0	35,5 $\pm$ 48,2***	0,0717 <0,0001

Średnia  $\pm$  SD

Użyto nieparametrycznego testu Manna-Whitney'a dla zmiennych niepowiązanych  
Statystycznie istotne różnice przy \* $p < 0,05$  oraz \*\*\* $p < 0,001$  w porównaniu z kontrolą

Analizie poddano również poziom badanych parametrów biochemicznych (Hcy, Met, ADMA i Arg) uwzględniając genotypy genu *MTHFR* (C677T) (Tab. 10). Wykazano, że jedynie u chorych z padaczką leczonych LPP z genotypem heterozygotycznym *MTHFR* CT (C677T) następował statystycznie istotny wzrost stężenia zarówno Hcy (test Manna-Whitney'a,  $p < 0,05$  w porównaniu z kontrolą), jak i ADMA (test Manna-Whitney'a,  $p < 0,001$  w porównaniu z kontrolą).

Natomiast u chorych z padaczką z genotypem homozygotycznym *MTHFR* CC (C677T) statystycznie istotnie obniżało się stężenie Met (test Manna-Whitney'a,  $p < 0,05$  w porównaniu z kontrolą). Zarówno u chorych z homozygotą prawidłową *MTHFR* CC (C677T), jak i heterozygotą *MTHFR* CT (C677T) obniżał się poziom stosunku Met:Hcy (test Manna-Whitney'a,  $p < 0,05$  w porównaniu z kontrolą), a także poziom stosunku Arg:ADMA (test Manna-Whitney'a, u chorych z heterozygotą *MTHFR* CT (C677T),  $p < 0,001$  w

porównaniu z kontrolą). Ze względu na małą liczebność badanych osób z genotypem homozygotycznym *MTHFR* TT (C677T) (2 osoby kontrolne i 6 chorych z padaczką), u tych osób nie poddano analizie statystycznej badanych parametrów biochemicznych.

Tabela 11. Stężenie Hcy, Met, ADMA, Arg w zależności od genotypów *MTR* A2756G u chorych z padaczką leczonych różnymi LPP i w grupie kontrolnej

Analizowany związek	Grupa kontrolna		Chorzy z padaczką		P
	<i>MTR</i> A2756G		<i>MTR</i> A2756G		AA
	AA	AG	AA	AG	AG
Hcy [ $\mu$ M]	12,9 $\pm$ 5,1	10,6 $\pm$ 3,8	14,0 $\pm$ 4,0	14,2 $\pm$ 6,2	0,1321 0,0670
Met [ $\mu$ M]	22,9 $\pm$ 6,8	21,6 $\pm$ 4,3	20,2 $\pm$ 6,7*	19,0 $\pm$ 8,9*	0,0346 0,0247
Met:Hcy	2,1 $\pm$ 1,0	2,2 $\pm$ 1,0	1,5 $\pm$ 0,8*	1,5 $\pm$ 0,9*	0,0174 0,0282
ADMA [ $\mu$ M]	1,6 $\pm$ 1,0	1,4 $\pm$ 1,0	2,4 $\pm$ 1,4*	2,6 $\pm$ 1,4*	0,0111 0,0183
Arg [ $\mu$ M]	70,2 $\pm$ 26,5	82,7 $\pm$ 23,5	66,0 $\pm$ 29,2	69,9 $\pm$ 33,9*	0,1716 0,0495
Arg:ADMA	79,6 $\pm$ 83,1	145,5 $\pm$ 235,0	38,1 $\pm$ 28,5**	45,2 $\pm$ 52,0**	0,0060 0,0057

Średnia  $\pm$  SD

Użyto nieparametrycznego testu Manna-Whitney'a dla zmiennych niepowiązanych  
Statystycznie istotne różnice przy \* $p < 0,05$  oraz \*\* $p < 0,01$  w porównaniu z kontrolą

Natomiast w przypadku chorych z padaczką leczonych LPP zarówno z homozygotą prawidłową *MTR* AA (A2756G), jak i z heterozygotą *MTR* AG (A2756G) nie stwierdzono statystycznie istotnego wzrostu stężenia Hcy, chociaż u tych chorych statystycznie istotnie wzrastało stężenie ADMA (test Manna-Whitney'a,  $p < 0,05$  w porównaniu z kontrolą) ( Tab. 11). Jednocześnie zarówno u chorych z homozygotą prawidłową *MTR* AA (A2756G), jak i z heterozygotą *MTR* AG (A2756G) obniżało się stężenie Met i poziom stosunku Met:Hcy (test Manna-Whitney'a,  $p < 0,05$  w porównaniu z kontrolą) oraz Arg:ADMA (test Manna-Whitney'a,  $p < 0,01$  w porównaniu z kontrolą), a u chorych z *MTR* AG (A2756G) statystycznie istotnie obniżało się również stężenie Arg (test Manna-Whitney'a,  $p < 0,05$  w porównaniu z kontrolą).

Tabela 12. Stężenie Hcy, Met, ADMA, Arg w zależności od genotypów *MTHFD1* G1958A u chorych z padaczką leczonych różnymi LPP i w grupie kontrolnej

Analizowany związek	Grupa kontrolna			Chorzy z padaczką			p
	<i>MTHFD1</i> G1958A			<i>MTHFD1</i> G1958A			
	GG	GA	AA	GG	GA	AA	
Hcy [ $\mu$ M]	10,1	14,4	11,6	13,4	14,1	14,0	0,0465
	$\pm$ 3,4	$\pm$ 4,4	$\pm$ 4,9	$\pm$ 5,0*	$\pm$ 5,2	$\pm$ 4,7	0,3876
							0,0745
Met [ $\mu$ M]	23,2	22,5	18,5	17,7	18,1	23,1	0,0215
	$\pm$ 5,3	$\pm$ 7,0	$\pm$ 5,9	$\pm$ 4,9*	$\pm$ 5,6*	$\pm$ 11,1	0,0235
							0,4279
Met:Hcy	2,6	1,7	1,8	1,4	1,4	1,8	0,0031
	$\pm$ 1,0	$\pm$ 0,8	$\pm$ 0,7	$\pm$ 0,6**	$\pm$ 0,7	$\pm$ 1,0	0,1926
							0,2440
ADMA [ $\mu$ M]	1,0	1,7	2,0	2,8	1,9	3,0	0,0008
	$\pm$ 0,6	$\pm$ 0,8	$\pm$ 1,5	$\pm$ 1,4***	$\pm$ 1,3	$\pm$ 1,2	0,4949
							0,1370
Arg [ $\mu$ M]	67,1	75,2	76,6	60,8	64,5	79,8	0,2339
	$\pm$ 19,1	$\pm$ 21,9	$\pm$ 40,1	$\pm$ 24,4	$\pm$ 25,9*	$\pm$ 39,7	0,0479
							0,4840
Arg:ADMA	146,7	56,7	95,7	26,1	52,2	38,0	0,0003
	$\pm$ 234,2	$\pm$ 37,3	$\pm$ 115,9	$\pm$ 18,8***	$\pm$ 43,0	$\pm$ 41,8*	0,2526
							0,0311

Średnia  $\pm$  SD

Użyto nieparametrycznego testu Manna-Whitney'a dla zmiennych niepowiązanych

Statystycznie istotne różnice przy \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 w porównaniu z kontrolą

Ponadto jedynie u chorych z homozygotą prawidłową *MTHFD1* GG (G1958) leczonych LPP (Tab. 12) statystycznie istotnie wzrastało stężenie Hcy (test Manna-Whitney'a, p<0,05 w porównaniu z kontrolą) wraz ze wzrostem stężenia ADMA (test Manna-Whitney'a, p<0,001 w porównaniu z kontrolą). Natomiast stężenie Met obniżało się zarówno u chorych z homozygotą prawidłową *MTHFD1* GG (G1958), jak i z

heterozygotą *MTHFD1* GA (G1958) (test Manna-Whitney'a,  $p < 0,05$  w porównaniu z kontrolą), chociaż poziom stosunku Met:Hcy (test Manna-Whitney'a,  $p < 0,01$  w porównaniu z kontrolą) i Arg:ADMA (test Manna-Whitney'a,  $p < 0,001$  w porównaniu z kontrolą) jednocześnie obniżał się statystycznie istotnie jedynie u chorych homozygotą prawidłową *MTHFD1* GG (G1958). Istotny spadek poziomu stosunku Arg:ADMA (test Manna-Whitney'a,  $p < 0,05$  w porównaniu z kontrolą) wykazano również u chorych z homozygotą nieprawidłową *MTHFD1* AA (G1958), a u chorych z heterozygotą *MTHFD1* GA (G1958) statystycznie istotny spadek stężenia Arg (test Manna-Whitney'a,  $p < 0,05$  w porównaniu z kontrolą).

Tabela 13. Stężenie Hcy, Met, ADMA, Arg w zależności od genotypów *MTHFR* (C677T), *MTR* A2756G, *MTHFD1* G1958A u chorych z padaczką leczonych różnymi LPP i w grupie kontrolnej

Analizowany związek	Grupa kontrolna			Chorzy z padaczką						p
	1	5	6	1	2	3	4	5	6	
Hcy [ $\mu\text{M}$ ]	15,8 $\pm 5,1$	8,2 $\pm 2,0$	13,2 $\pm 6,3$	13,9 $\pm 4,6$	12,8 $\pm 6,5$	12,6 $\pm 4,1$	17,6 $\pm 7,1$	10,8 $\pm 3,5$	13,4 $\pm 2,9$	0,2394
Met [ $\mu\text{M}$ ]	21,9 $\pm 6,4$	22,2 $\pm 3,8$	25,0 $\pm 6,7$	17,9 $\pm 5,6$	17,2 $\pm 3,4$	28,3 $\pm 10,8$	26,0 $\pm 17,0$	18,6 $\pm 4,0$	22,5 $\pm 4,9$	0,2512
Met:Hcy	1,5 $\pm 0,7$	2,9 $\pm 1,1$	2,3 $\pm 1,2$	1,4 $\pm 0,6$	1,8 $\pm 1,1$	2,6 $\pm 1,5$	1,6 $\pm 1,1$	1,8 $\pm 0,6$	1,7 $\pm 0,2$	0,1891
ADMA [ $\mu\text{M}$ ]	1,7 $\pm 0,8$	1,1 $\pm 0,9$	2,0 $\pm 0,7$	1,6 $\pm 0,8$	2,1 $\pm 1,4$	2,9 $\pm 1,5$	1,9 $\pm 0,7$	3,2 $\pm 1,2$	3,0 $\pm 1,9$	0,0816
Arg [ $\mu\text{M}$ ]	67,0 $\pm 24,7$	81,2 $\pm 13,9$	92,1 $\pm 12,3$	66,3 $\pm 27,9$	63,0 $\pm 38,1$	90,4 $\pm 47,8$	92,7 $\pm 50,3$	62,9 $\pm 24,4$	56,8 $\pm 14,8$	0,4810
Arg:ADMA	53,1 $\pm 40,7$	262,4 $\pm 364,0$	48,1 $\pm 12,4$	49,6 $\pm 27,8$	42,3 $\pm 32,8$	42,8 $\pm 31,9$	64,9 $\pm 68,0$	22,6 $\pm 14,1$	34,4 $\pm 38,9$	0,0867

Średnia  $\pm$  SD

Użyto parametrycznego testu One-way ANOVA dla zmiennych niepowiązanych

Brak statystycznie istotnych różnic

*MTHFR* CC (C677T), *MTHFD1* GA (1958A), *MTR* AA (A2756G)

*MTHFR* CC (C677T), *MTHFD1* GA (1958A), *MTR* AG (A2756G)

*MTHFR* CC (C677T), *MTHFD1* AA (1958A), *MTR* AA (A2756G)

*MTHFR* CC (C677T), *MTHFD1* AA (1958A), *MTR* AG (A2756G)

*MTHFR* CT (C677T), *MTHFD1* GG (1958A), *MTR* AG (A2756G)

*MTHFR* CT (C677T), *MTHFD1* GA (1958A), *MTR* AA (A2756G)

Jednocześnie wykazano, że u wszystkich badanych chorych z padaczką z polimorfizmami genów włączonych w przemianę Hcy do Met, *MTHFR* (C677T), *MTR* (A2756G), *MTHFD1* (G1958A) wraz ze wzrostem (w sposób istotny i/lub nieistotny statystycznie) stężenia osoczowej Hcy wzrastało stężenia osoczowej ADMA (Tab. 10-13).

## 5. Dyskusja

Ukazało się wiele prac wskazujących na wzrost stężenia osoczowej Hcy u chorych z padaczką leczonych LPP. Z prac tych wynika, że u chorych z padaczką na wzrost stężenia krążącej Hcy w następstwie stosowanej farmakoterapii może wpływać wiele czynników, między innymi: dieta, wiek, rodzaj stosowanych preparatów farmaceutycznych, czas trwania leczenia oraz uwarunkowania genetyczne.

Wydaje się, że jednym z istotnych czynników wpływających na generowanie Hcy u chorych z padaczką leczonych LPP jest rodzaj spożywanej diety, a szczególnie obecność w niej kofaktorów niezbędnych do metabolizmu Hcy (witaminy: B6 i B12, FA). Wydaje się również, że wykazany w populacji amerykańskiej brak wzrostu stężenia Hcy w następstwie stosowania LPP<sup>88, 124, 125</sup> w odróżnieniu od populacji Europejczyków (Grecja<sup>86</sup>, Niemcy<sup>126</sup>, Włochy<sup>127</sup>, Norwegia<sup>83</sup>, Polska<sup>62</sup> - przeprowadzone badania własne) oraz Japończyków<sup>128</sup>, Koreańczyków<sup>129</sup>, Turków<sup>130, 131</sup> i Arabów<sup>132</sup> najprawdopodobniej wiąże się ze spożywaną przez większość Amerykanów dietą bogatą w kofaktory niezbędne do remetylacji Hcy do Met (FA)<sup>133</sup>

---

<sup>124</sup> Tamura T., Aiso K., Johnston K.E., Black L., Faught E.: *Homocysteine, folate, vitamin B-12 and vitamin B-6 in patients receiving antiepileptic drug monotherapy*. *Epilepsy Res.* 2000; 40: 7-15

<sup>125</sup> Elliot J.O., Jacobson M.P., Haneef Z.: *Homocysteine and bone loss in epilepsy*. *Seizure* 2007; 16: 22-34

<sup>126</sup> Schwaninger M., Ringleb P., Winter R., Kohl B., Fiehn W., Rieser P.A., Walter-Sack I.: *Elevated plasma concentration of homocysteine in antiepileptic drug treatment*. *Epilepsia* 1999; 40: 345-350

<sup>127</sup> Verrotti A., Pascarella R., Trotta D., Giuva T., Morgese G., Chiarelli F.: *Hyperhomocysteinemia in children treated with sodium valproate and carbamazepine*. *Epilepsy Res.* 2000; 41: 253-257

<sup>128</sup> Ono H., Sakamoto A., Eguchi T., Fujita N., Nomura S., Ueda H., Sakura N., Ueda K.: *Plasma total homocysteine concentrations in epileptic patients taking anticonvulsants*. *Metabolism* 1997; 46: 959-962

<sup>129</sup> Yoo J.H., Hong S.B.: *A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a determinant of hyperhomocysteinemia in epileptic patients receiving anticonvulsants*. *Metabolism* 1999; 48: 1047-1051

<sup>130</sup> Karabiber H., Sonmezgoz E., Ozerol E., Yakinci C., Otlu B., Yologlu S.: *Effect of valproate and carbamazepine on serum levels of homocysteine, vitamin B12, and folic acid*. *Brain Dev.* 2003; 25: 113-115

<sup>131</sup> Sener U., Zorlu Y., Karaguzel O., Ozdamar O., Coker I., Topbas M.: *Effects of common anti-epileptic drug monotherapy on serum levels of homocysteine, vitamin B12, folic acid and vitamin B6*. *Seizure* 2006; 15: 79-85

<sup>132</sup> Hamed S.A., Hamed E.A., Hamdy R., Nabeshima T.: *Vascular risk factors and oxidative stress as independent predictors of asymptomatic atherosclerosis in adult patients with epilepsy*. *Epilepsy Res.* 2007; 74: 183-192

<sup>133</sup> Centers for Disease Control and Prevention. *Recommendations for the use of folic acids to reduce the number of cases of spinal bifida and other neural tube defects*. *MMWR* 41 (RR-14) 1999; 1-7



Wydaje się również, że na generowanie Hcy u chorych z padaczką zasadniczo wpływa nie sama choroba, a raczej stosowana w niej farmakoterapia. Potwierdzają to badania przeprowadzone w populacji greckiej, u dzieci z padaczką w wieku od 4,5 do 14 lat leczonych LPP przez 20 tygodni<sup>86</sup>, jak również badania przeprowadzone u dorosłych chorych z padaczką leczonych w mono- i w politerapii LPP przez ponad 30 dni<sup>126</sup> oraz badania przeprowadzone u osób oczekujących na włączenie LPP zarówno prowadzone u dzieci<sup>127</sup>, jak i w niniejszej pracy u chorych z padaczką w wieku pomiędzy 18 a 65 r.ż. Ponadto, jak wynika z przeprowadzonych badań na generowanie Hcy nie wydają się również wpływać zróżnicowane działania napadowe uzależnione od rozległości i umiejscowienia zaburzeń na poziomie komórkowym i synaptycznym w OUN, chociaż jak wskazują uzyskane w niniejszej pracy dane, chorzy z zaburzeniami ogniskowymi wydają się mieć większą tendencję do zaburzenia metabolizmu Hcy.

Generowanie Hcy u chorych z padaczką, jak wskazują dane z piśmiennictwa jest związane zarówno z LPP indukującymi mikrosomalne enzymy wątrobowe, takimi jak: DPH, PB, prymidon, CBZ, które jednocześnie zwiększają aktywność enzymów cytochromu P450 i prowadzą do obniżenia poziomu FA w surowicy, jak i z LPP takimi jak: VPA, który w mniejszym stopniu indukuje aktywność enzymów wątrobowych i w mniejszym stopniu wpływa na stężenie FA w surowicy krwi<sup>134</sup>. Wzrost stężenia Hcy wraz z obniżeniem stężenia FA u chorych z padaczką po podaniu CBZ wykazano w badaniach Verrotti i wsp.<sup>127</sup>, Karabiber i wsp.<sup>130</sup> i Attilakos i wsp.<sup>86</sup>. Natomiast w przypadku terapii chorych z padaczką VPA wykazano zarówno wzrost stężenia Hcy wraz z obniżeniem poziomu FA<sup>127, 130</sup>, jak i bez obniżenia jego poziomu<sup>86</sup>.

Uważa się, że obniżenie poziomu FA podczas terapii LPP następuje na skutek upośledzonego ich wchłaniania jelitowego, zwiększonego zapotrzebowania na FA do procesu hydroksylacji LPP, aktywacji enzymów wątrobowych prowadzących do końcowego obniżenia poziomu FA, bezpośrednich interakcji pomiędzy FA a LPP jako wynik strukturalnego podobieństwa pomiędzy koenzymami FA a LPP lub bezpośredniego wpływu na metabolizm Hcy i funkcję nerek<sup>80</sup>.

Są jednak również doniesienia w piśmiennictwie świadczące o braku wpływu LPP zarówno indukujących enzymy wątrobowe, jak i niewpływających na aktywność enzymów wątroby na poziom krążącej Hcy. Zarówno w pracy Sener i wsp.<sup>131</sup>, jak i w przeprowadzonych badaniach nie wykazano istotnego wzrostu stężenia Hcy po terapii chorych z padaczką CBZ, a w pracy Apeland i wsp.<sup>135</sup> oraz Unal i wsp.<sup>136</sup> i w niniejszych badaniach również istotnego wzrostu stężenia Hcy po podaniu VPA. Brak istotnego wzrostu stężenia Hcy po terapii chorych z padaczką CBZ i VPA może być związany z nieznacznym wpływem tych LPP na poziom kofaktorów (w piśmiennictwie wykazano niejednoznaczny wpływ tych leków na poziom

---

<sup>134</sup> Moore J.L.: *The significance of folic acid for epilepsy patients*. *Epilepsy Behav.* 2005; 7: 172-181

<sup>135</sup> Apeland T., Froyland E.S., Kristensen O., Strandjord R.E., Mansoor M.A.: *Drug-induced perturbation of the aminothioliol redox-status in patients with epilepsy: improvement by B-vitamins*. *Epilepsy Res.* 2008; 82(1): 1-6

<sup>136</sup> Unal O., Deda G., Teber S., Ertem M., Akar N.: *Thrombophilic risk factors in epileptic children treated with valproic acid*. *Pediatr. Neurol.* 2009; 40: 102-106

FA i witaminy B12) niezbędnych do procesu remetylacji Hcy<sup>86, 130</sup>, a w przypadku VPA, jak wykazano w pracach Apeland i wsp.<sup>83</sup>, Gidal i wsp.<sup>88</sup>, Attilakos i wsp.<sup>86</sup> być może z wpływem tego leku na podwyższanie stężenia witaminy B12 i najprawdopodobniej w ten sposób zapobieganiu nadmiernemu gromadzeniu Hcy w krwi chorych z padaczką.

Uważa się również, że LPP NG takie jak: LTG<sup>88, 131</sup> oraz OCBZ<sup>137</sup>, u chorych z padaczką nie zmieniają poziomu witaminy B12 i FA<sup>88</sup> i nie podwyższają stężenia Hcy. Wydają się to również potwierdzać przeprowadzone w niniejszej pracy badania stężenia Hcy u chorych leczonych LPP NG w monoterapii. Jednocześnie przeprowadzone badania wskazują, że połączenie terapii LPP NG szczególnie z VPA może przyczynić się do zwiększonego generowania Hcy. O tym, że leczenie chorych z padaczką w politerapii przyczynia się zwiększonego generowania Hcy świadczą nie tylko przeprowadzone badania, ale również prace Schwaninger i wsp.<sup>126</sup>, Ono i wsp.<sup>128</sup>, Hamed i wsp.<sup>132</sup> czy Belcastro i wsp.<sup>138</sup>.

Innym czynnikiem predysponującym do zwiększonego generowania osoczowej Hcy wydaje się być długotrwała kuracja chorych z padaczką LPP (powyżej 5 lat). W piśmiennictwie podwyższone stężenie Hcy wykazano u chorych po długotrwałej kuracji zarówno: CBZ, DPH, PB, VPA, jak i w politerapii<sup>128, 132, 139</sup>. Z pracy Hamed i wsp.<sup>132</sup> wynika, że zarówno długotrwała terapia CBZ, jak i VPA są włączone w uszkodzenia naczyń z udziałem zaburzonego metabolizmu Hcy i FA. Udział Hcy w patogenezie chorób naczyniowych nie jest jednokierunkowy i nie został dotychczas w pełni wyjaśniony. Uważa się, że wzrost osoczowej Hcy może indukować zmiany miażdżycowe w kilku mechanizmach. Postuluje się bezpośrednie cytotoksyczne działanie Hcy na komórki śródbłonna naczyniowego<sup>48</sup>, pobudzanie proliferacji mięśni gładkich naczyń<sup>51</sup> oraz aktywację czynników zapalnych mających wpływ na powstawanie chorób naczyniowych<sup>53</sup>. Uważa się także, że Hcy może indukować zmiany aterogenne poprzez zaburzenia funkcji czynników krzepnięcia oraz płytek krwi. Innym patomechanizmem zmian naczyniowych w hHcy wydaje się być modyfikujący wpływ metabolitu Hcy- HCTL na białka osocza (min. fibrynogenu, hemoglobiny), powodujący zmianę ich właściwości: wzrost ich podatności na uszkodzenia oksydacyjne i tworzenia agregatów. Uważa się również, że HCTL może mieć działanie modyfikujące składową LDL- apolipoproteinę apo-100 i w ten sposób indukować agregację LDL oraz powstawanie komórek piankowatych, które są jednym z czynników biorących udział w powstawaniu blaszki miażdżycowej.

Wiadomo również, że niedobory kofaktorów reakcji remetylacji Hcy (witamina B12, FA) mogą przyczynić się obniżenia wydajności tego procesu, a w konsekwencji do spadku poziomu Met. Spadek stężenia Met u chorych z padaczką leczonych w mono- i w politerapii wykazano zarówno w pracy Ono i

---

<sup>137</sup> Badiou S., Breton H., Peyriere H., Charasson V., Crespel A., Gelisse P., Cristol J.P., Hillaire-Buys D.: *Comparison of carbamazepine and oxcarbamazepine effects on aminothiol levels*. Eur. J. Clin. Pharmacol. 2008; 64(1): 83-87

<sup>138</sup> Belcastro V., Gaetano G., Italiano D., Oteri G., Caccamo D., Pisani L.R., Striano P., Striano S., Ientile R., Pisani F.: *Atiepileptic drugs and MTHFR polymorphisms influence hyper-homocysteinemia recurrence In epileptic patients*. Epilepsia 2007; 48(10): 1190-1994

wsp.<sup>128</sup>, jak i w niniejszej pracy, zwłaszcza w przypadku terapii chorych z padaczką lekami obniżającymi poziom FA (CBZ w mono- i w politerapii). W przeprowadzonych badaniach wykazano również, że wraz z obniżeniem stężenia Met u chorych obniżeniu ulegał poziom stosunku Met:Hcy. Według jednej z nowszych teorii<sup>139</sup> spadek poziomu tego stosunku może być związany z transformacją Hcy do HCTL w komórkach śródbłonna i pośredniczyć w tworzeniu zmian miażdżycowych indukowanych przez Hcy. Z pracy Engbursen i wsp.<sup>140</sup> wynika, że na skuteczność procesu remetylacji Hcy do Met silny pośredni wpływ wywiera również enzym MTHFR. Występowanie tej formy enzymu jest związane z mutacją punktową C677T genu kodującego MTHFR. Z doniesień piśmiennictwa i z przeprowadzonych badań wynika, że zarówno w populacji polskiej<sup>62</sup>, jak i w populacji norweskiej<sup>83</sup>, angielskiej<sup>141</sup>, koreańskiej<sup>129</sup>, tureckiej<sup>142</sup> najmniej rozpowszechniony był genotyp homozygotyczny *MTHFR* TT (C677T) i posiadał on tendencję wzrostową częstości występowania u chorych z padaczką. Uważa się, że polimorfizm genu kodującego MTHFR wskutek obniżenia FA-zależnej aktywności tego enzymu prowadzi do upośledzenia procesu remetylacji Hcy do Met i wzrostu poziomu Hcy. Jednocześnie uważa się, że tranzycja C→T w genie *MTHFR* (C677T) obniża aktywność enzymu o 50%<sup>143</sup>, a formy homozygotyczne tego genu obniżają jego aktywność o 30%<sup>144</sup>. Z doniesień piśmiennictwa wynika, że w populacji koreańskiej<sup>129</sup> jedynie genotyp homozygotyczny *MTHFR* TT (C677T) prowadził do istotnego wzrostu stężenia Hcy i tylko u chorych z padaczką leczonych lekami indukującymi enzymy wątrobowe i obniżającymi FA (CBZ). Natomiast z przeprowadzonych badań wynika, że stężenie Hcy istotnie wzrastało również u osobników heterozygotycznych *MTHFR* CT C677T z padaczką leczonych różnymi LPP zarówno w mono-, jak i w politerapii. Wyniki badań na temat współdziałania LPP z polimorfizmem C677T genu kodującego MTHFR

---

<sup>139</sup> Toohey J.I.: *Possible involvement of sulfane sulfur in homocysteine-induced atherosclerosis*. Med. Hypotheses 2001; 56: 256-261

<sup>140</sup> Engbursen A.M., Franken D.G., Boers G.H., Stevens E.M., Trijbels F.J., Blom H.J.: *Thermolabile 5-10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia*. Am. J. Hum. Genet. 1995; 56: 142-150

<sup>141</sup> Dean J.C., Robertson Z., Reid V., Wang Q., Hailey H., Moore S., Rasalam A.D., Turnpenny P., Lloyd D., Shaw D., Little J.: *A high frequency of the MTHFR 677C>T polymorphism in Scottish women with epilepsy: possible role in pathogenesis*. Seizure 2008; 17(3): 269-275

<sup>142</sup> Vurucu S., Demirkaya E., Kul M., Unay B., Gul D., Akin R., Gokçay E.: *Evaluation of the relationship between C677T variants of methylenetetrahydrofolate reductase gene and hyperhomocysteinemia in children receiving antiepileptic drug therapy*. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2008; 32(3): 844-848

<sup>143</sup> Kang S.S., Zhou J., Wong P.W., Kowalisyn J., Strokosch G.: *Intermediate Homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase*. Am. J. Hum. Genet. 1988; 43: 414-421

<sup>144</sup> Frosst P., Blom H.J., Milos R., Goyette P., Sheppard C.A., Matthews R.G., Boers G.J., den Heijer M., Kluijmans L.A., van den Heuvel L.P., Rozen R.: *A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase*. Nat. Genet. 1995; 10: 111-113

w generowaniu Hcy są niejednoznaczne. Synergistyczne działanie LPP indukujących enzymy wątrobowe z heterozygotą *MTHFR* (C677T) potwierdzają badania przeprowadzone przez Apeland i wsp.<sup>83</sup>, chociaż z pracy Vurucu i wsp.<sup>142</sup> wynika, że polimorfizm C677T genu kodującego MTHFR nie jest włączony w hHcy u chorych z padaczką leczonych CBZ, a z pracy Ono i wsp.<sup>145</sup> wynika, że koreluje jedynie z hHcy u chorych z padaczką leczonych w politerapii.

Wykazano również, że w następstwie stosowania fenytoiny może dochodzić zmniejszenia aktywności MTR włączanej w remetylację Hcy do Met i w ten sposób w regulację poziomu Met<sup>146</sup>. Wydaje się jednak, że w przebadanej w niniejszej pracy grupie chorych z padaczką leczonych różnymi LPP w mono- i/lub politerapii nie dochodziło do znacznego obniżenia aktywności tego enzymu.

Jednocześnie z przeprowadzonych badań wynika, że w generowanie osoczowej Hcy u chorych z padaczką leczonych różnymi LPP w mono- i politerapii jest również włączony gen kodujący enzym *MTHFD1* (G1958A), szczególnie homozygota prawidłowa *MTHFD1* GG (G1958A).

Jak również wynika z przeprowadzonych badań, polimorfizmy genów związanych z remetylacją Hcy do Met u chorych z padaczką leczonych LPP, wydają się być także włączone w zaburzenia proporcji pomiędzy poziomem Met i Hcy, i w ten sposób prowadzić do wzrostu stężenia Hcy.

Jak wykazano, podwyższenie stężenia Hcy powyżej 15 µM u chorych z padaczką leczonych LPP może wiązać się z wieloma komplikacjami klinicznymi. Jak wiadomo może trzykrotnie zwiększać ryzyko wystąpienia zawału mięśnia sercowego i dwukrotnie zwiększać ryzyko stenozy naczyń wieńcowych<sup>147</sup>, oraz może prowadzić do rozwoju chorób naczyniowych<sup>148</sup>, neuropsychiatrycznych<sup>80</sup>, jak również jest uważane za czynnik ryzyka napadów padaczkowych oraz oporności na LPP<sup>79</sup>.

W ostatnich latach ukazały się prace podkreślające związek pomiędzy hHcy i stężeniem ADMA w chorobach naczyniowych<sup>149, 94, 150, 151</sup>. Wiele z nich wskazuje na wzrost stężenia osoczowej ADMA w hHcy

---

<sup>145</sup> Ono H., Sakamoto A., Mizoguchi N., Sakura N.: *The C77T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene contributes to hyperhomocysteinemia in patients taking anticonvulsants*. Brain. Dev. 2002; 24: 223-226

<sup>146</sup> Billings R.E.: *Decreased hepatic 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase activity in mice after chronic phenytoin treatment*. Mol. Pharmacol. 1984; 25(3): 459-466

<sup>147</sup> Selhub J., Jacques P.F., Bostom A.G., D'Agostino R.B., Wilson P.W., Belanger A.J., O'Leary D.H., Wolf P.A., Schaefer E.J., Rosenberg I.H.: *Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis*. N. Engl. J. Med. 1995; 332(5): 286-291

<sup>148</sup> Verrotti A., Domizio S., Angelozzi B., Sabatino G., Morgese G., Chiarelli F.: *Changes in serum lipids and lipoproteins in epileptic children treated with anticonvulsants*. J. Paediatr. Child Health 1997; 33: 242-245

<sup>149</sup> Janasson T.F., Hedner T., Hultberg B., Ohlin H.: *Hyperhomocysteinaemia is not associated with increased levels of asymmetric dimethylarginine in patients with ischaemic heart disease*. Eur. J. Clin. Invest. 2003; 33: 543-549

<sup>150</sup> Schmitt B., Wolters M., Kressel G., Hulsmann O., Strohle A., Kuhn-Velten W.N., Lichtinghagen R., Bub A., Barth S.W., Stichtenoth D.O., Hahn A.: *Effects of combined supplementation with B vitamins and antioxidants on plasma*

w chorobach naczyń wieńcowych<sup>152</sup>, w chorobach naczyń obwodowych<sup>153</sup>, udarze<sup>154</sup>. Wzrost stężenia ADMA w warunkach hHcy jest wyjaśniany w oparciu o kilka teorii. Jedna z nich zakłada, że generowanie osoczowej ADMA może się odbywać w środowisku podwyższonego poziomu Met pochodzącej z wyższego poziomu Hcy w hHcy z udziałem SAM, który prowadzi do zwiększonej produkcji ADMA z Arg poprzez wzrost aktywności SAM-zależnej PRMT lub nieprawidłowej regulacji ekspresji tego genu w warunkach hHcy<sup>90</sup>. Inny mechanizm zakłada wzrost stężenia ADMA w hHcy jako wynik obniżonej czynności wydzielniczej nerek<sup>149</sup> lub obniżonej ekspresji i aktywności enzymu DDAH, który jak wiadomo jest odpowiedzialny za rozkład ADMA do L-cytruliny<sup>155</sup>. Wykazano, że w warunkach *in vitro* Hcy może bezpośrednio hamować aktywność enzymu DDAH poprzez oksydacyjną jego inaktywację i prowadzić do wzrostu stężenia ADMA<sup>90</sup>.

Wzrost stężenia ADMA w środowisku wzrastającego poziomu Hcy wydaje się mieć zarówno podłoże organiczne<sup>151, 153</sup>, i jak wynika z przeprowadzonych badań również może być skutkiem farmakoterapii LPP. W niniejszej pracy po farmakoterapii LPP u chorych z padaczką wzrostowi stężenia Hcy towarzyszył istotny lub nieistotny wzrost stężenia ADMA, niezależnie od rodzaju stosowanych leków czy posiadanych polimorfizmów genów kodujących enzymy odpowiedzialne za efektywność metabolizmu Hcy do Met. Jednocześnie zarówno z przeprowadzonych badań (szczególnie podczas przedłużającej się kuracji LPP), jak i z pracy Jonasson i wsp.<sup>149</sup> prowadzonej u chorych z chorobami naczyniowymi wynika, że w warunkach hHcy nie zawsze dochodzi do wzrostu stężenia ADMA. Jak wykazano w chorobach naczyniowych, brak wzrostu stężenia ADMA w hHcy najprawdopodobniej wiąże się ze współistniejącą u tych chorych subtelną dysfunkcją nerek -nieznacznie zwiększa się czynność wydzielnicza nerek.

Ponadto wykazano, że ADMA może pośredniczyć w miażdżycogenym działaniu Hcy<sup>152</sup>. ADMA jest zaliczana do czynników ryzyka chorób krążenia oraz markerów miażdżycy<sup>100</sup>. Uważa się także, że ADMA jako inhibitor NOS może odgrywać pośrednią rolę w powstawaniu zjawisk drgawkowych, poprzez regulację poziomu NO. Jak wykazano, w mózgu wzrost produkcji NO może działać pro- i antydrgawkowo.

---

*levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in subject with elevated risk for cardiovascular disease. Atherosclerosis* 2007; 193: 168-176

<sup>151</sup> Landim M.B.P., Casella Filho A., Chagas A.C.: *Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and endothelial dysfunction: implications for atherogenesis*. *Clinics* 2009; 64(5): 471-478

<sup>152</sup> Holven K.B., Haugstad T.S., Holm T., Aukrust P., Ose L., Nenseter M.S.: *Folic acid treatment reduced elevated plasma levels of asymmetric dimethylarginine in hyperhomocysteinaemic subjects*. *Br. J. Nutr.* 2003; 89: 359-363

<sup>153</sup> Sydow K., Schwedhelm E., Arakawa N., Bode-Böger S.M., Tsikas D., Hornig B., Frölich J.C., Böger R.H.: *ADMA and oxidative stress are responsible for endothelial dysfunction in hyperhomocyst(e)inemia: effects of L-arginine and B vitamins*. *Cardiovasc. Res.* 2003, 57, 244-252

<sup>154</sup> Yoo J.H., Lee S.C.: *Elevated levels of plasma homocyst(e)ine and asymmetric dimethylarginine in elderly patients with stroke*. *Atherosclerosis* 2001; 158: 425-430

<sup>155</sup> Vallance P.: *Importance of asymmetrical dimethylarginine in cardiovascular risk*. *Lancet* 2001, 358: 2096-2097

Większość powstającego ośrodkowo NO jest syntezowane przez nNOS, podczas gdy aktywność iNOS wykazano głównie w stanach patologicznych związanych z cytotoksycznym działaniem NO z udziałem receptorów NMDA. Uważa się, że NO może działać jako inhibitor receptora NMDA i wykazywać z jednej strony działanie prodrżawkowe, a z drugiej strony działanie przeciwdrżawkowe poprzez hamowanie presynaptyczne receptorów glutaminergicznych<sup>22</sup>. Potwierdzają to badania przeprowadzone w modelach doświadczalnych, gdzie wykazano, że wewnątrzprądkowiowa iniekcja Arg powoduje wzrost produkcji prądkowiowego NO i działanie ochronne przed indukowanym MMA (ang. *Methylmalonic Acid*, kwas metylomalonowy) stresem oksydacyjnym i napadem padaczkowym, ale ukazały się także publikacje o prodrżawkowym działaniu Arg<sup>21</sup>.

Jak wiadomo, patologiczne działanie ADMA może wiązać się zarówno z jej podwyższonym poziomem, a także z obniżonym stężeniem jej metabolitu i substratu do produkcji NO, Arg. Jak wynika z przeprowadzonych badań obniżenie poziomu Arg u chorych z padaczką może być związane z pewnymi predyspozycjami genetycznymi. Wśród przebadanych chorych, osoby z heterozygotami *MTR* AG (A2756G) i *MTHFD1* GA (G1958A) wydają się być szczególnie predysponowane do obniżania poziomu tego aminokwasu. Wydaje się również, że obniżenie poziomu Arg u chorych z padaczką leczonych LPP może być związane z mechanizmem epileptogenezy, w którym dochodzi do zwielokrotnienia biosyntezy neurotransmiterów o charakterze pobudzającym (glutaminian) i hamującym (GABA) z udziałem tego aminokwasu<sup>156, 159</sup> lub być skutkiem mobilizacji organizmu do przeciwdziałania nadmiernemu pobudzeniu w mechanizmie działania wielu LPP (wzrost stężenia GABA). Obniżenie stężenia Arg u chorych z padaczką wydaje się również skutkować zaburzeniem proporcji pomiędzy Arg i ADMA, będące zdaniem Dayal i Lentz<sup>157</sup> najprawdopodobniej skutkiem wzrastającego stresu oksydacyjnego towarzyszącego podwyższonemu poziomowi Hcy. Z pracy Maas<sup>158</sup> wynika, że w warunkach stresu oksydacyjnego związanego z interwencją farmakologiczną dochodzi do generowania ADMA poprzez zmianę ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę i rozkład ADMA. Z pracy Matsuoka i wsp.<sup>113</sup> wynika, że zaburzenie proporcji pomiędzy Arg i ADMA może być przyczyną hipercholesterolemii, nadciśnienia tętniczego, chorób mięśnia sercowego i naczyń. W badaniach Bode-Böger i wsp.<sup>159</sup> u szczurów z hipercholesterolemią stwierdzono dwukrotnie wyższe stężenie osoczowej ADMA oraz obniżenie poziomu stosunku Arg:ADMA, który jednocześnie ulegał normalizacji po zastosowaniu diety bogatej w Arg.

---

<sup>156</sup> Wu G., Morris S.M. Jr.: *Arginine metabolism: nitric oxide and beyond*. Biochem. J. 1998; 336: 1-17

<sup>157</sup> Dayal S., Lentz S.R: *ADMA and hyperhomocysteinemia*. Vasc. Med. 2005; 10: 27-33

<sup>158</sup> Maas R.: *Pharmacotherapies and their influence on asymmetric dimethylarginine (ADMA)*. Vasc. Med. 2005; 10: 49-57

<sup>159</sup> Bode-Böger S.M., Böger R.H., Kienke S., Junker W., Frölich J.C: *Elevated L-arginine/dimethylarginine ratio contributes to enhanced systemic NO production by dietary L-arginine in hypercholesterolemic rabbits*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996; 219: 598-603

Natomiast w badaniach Chan i wsp.<sup>160</sup> stwierdzono wzrost poziomu czynników adhezyjnych monocytów i limfocytów T dla komórek śródbłonna u pacjentów z hipercholesterolemią, korelujący z obniżonym poziomem stosunku Arg:ADMA. Jednocześnie wykazano, że suplementacja Arg u tych chorych prowadziła do normalizacji tego stosunku oraz do normalizacji poziomu czynników adhezyjnych. Natomiast na podstawie wyników badań uzyskanych u szczurów z zastoinową niewydolnością serca wynika, że obniżone stężenie osoczowej ADMA koreluje z zaburzeniami relaksacji naczyniowej. Według Feng i wsp.<sup>161</sup> poziom stosunku Arg:ADMA może być uważany za index istotny dla oceny funkcji śródbłonna. W piśmiennictwie ukazały się także doniesienia<sup>162</sup> o obniżonym poziomie stosunku Arg:ADMA u chorych z cukrzycą typu I leczonych insuliną. Z badań tych wynika, że stosunek ten wykazuje ujemną korelację z wartościami BMI (ang. *Body Mass Index*, wskaźnik masy ciała) i wartościami osoczowego stężenia frakcji LDL oraz dodatnią z wartościami frakcji HDL. Wiadomo, że podwyższone wartości BMI oraz frakcji LDL przy obniżonej wartości frakcji HDL należą do czynników ryzyka chorób naczyniowych.

W wielu opublikowanych pracach wykazano skuteczność suplementacji witaminami z grupy B i FA w obniżaniu poziomu Hcy u chorych z padaczką leczonych LPP<sup>135</sup>. Jednakże z pracy Sydow i wsp.<sup>153</sup> prowadzonej u chorych z hHcy z chorobą naczyń obwodowych wynika, że kuracja witaminami z grupy B reguluje tylko poziom Hcy, ale nie jest niewystarczająca do obniżenia poziomu ADMA. Ponadto z pracy Sydow i wsp.<sup>153</sup> oraz Koga i wsp.<sup>163</sup> wynika, że do regulacji obu czynników jednocześnie skuteczniejsza jest terapia skojarzona, witamin z grupy B, FA i Arg. Na skuteczność skojarzonej terapii u chorych z padaczką leczonych LPP wydają się również wskazywać uzyskane w niniejszej pracy dodatnie korelacje z udziałem Met i Arg po leczeniu tymi lekami.

Z przeprowadzonych badań wynika, że farmakoterapia LPP u chorych z padaczką prowadzi do wzrostu stężenia Hcy, szczególnie u chorych leczonych w politerapii oraz przy długotrwałej kuracji. Bardziej podatne na wzrost stężenia Hcy podczas kuracji LPP wydają się być osoby z genotypem *MTHFR* CT (C677T) oraz *MTHFD1* GG (G1958A). Uwarunkowania genetyczne wydają się być również związane z

---

<sup>160</sup> Chan J.R., Böger R.H., Bode-Böger S.M., Tangphao O., Tsao P.S., Blaschke T.F., Cooke J.P.: *Asymmetric dimethylarginine increases mononuclear cell adhesiveness in hypercholesterolemic humans*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20: 1040-1046

<sup>161</sup> Feng Q., Lu X., Fortin A.J., Pettersson A., Hedner T., Kline R.L., Arnold J.M.: *Elevation of an endogenous inhibitor nitric oxide synthesis in experimental congestive heart failure*. *Cardiovasc. Res.* 1998; 37: 667-675

<sup>162</sup> Altinova A.E., Arslan M., Sepici-Dincel A., Akturk M., Altan N., Toruner F.B.: *Uncomplicated type 1 diabetes is associated with increased asymmetric dimethylarginine concentrations*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007; 92: 1881-1885

<sup>163</sup> Koga Y., Akita Y., Nishioka J., Yatsuga S., Povalko N., Tanabe Y., Fujimoto S., Matsuishi T.: *L-Arginine improves the symptoms of stroke-like episodes in Melas*. *Neurology* 2005; 64(4): 710-712

zaburzeniami w proporcjach Hcy i Met oraz Arg i ADMA. W warunkach hHcy związanej z terapią LPP u chorych z padaczką kontrola Hcy nad ADMA wydaje się być zaburzona. Wydaje się również, że jedynie skojarzona suplementacja witaminami z grupy B i FA oraz Arg u chorych z padaczką leczonych LPP może przyczynić się skutecznej regulacji poziomu czynników ryzyka chorób naczyniowych: Hcy i ADMA u tych chorych.



## 6. Wnioski

1. Farmakoterapia lekami przeciwpadaczkowymi u około 27% chorych z padaczką prowadzi do wzrostu stężenia osoczowej homocysteiny powyżej dolnej granicy łagodnej hiperhomocysteinemii.
2. Politerapia i długotrwałe leczenie lekami przeciwpadaczkowymi chorych z padaczką (powyżej 5 lat) przyczyniają się do istotnego wzrostu stężenia osoczowej homocysteiny.
3. W warunkach łagodnej hiperhomocysteinemii u chorych z padaczką leczonych lekami przeciwpadaczkowymi kontrola homocysteiny nad ADMA wydaje się być zaburzona.
4. Szczególne predyspozycje do generowania homocysteiny wraz z ADMA mają chorzy na padaczkę z heterozygotą *MTHFR* CT (C677T) i homozygotą *MTHFD1* GG (G1958T).
5. Geny odpowiedzialne za remetylację homocysteiny do metioniny są najprawdopodobniej włączone w zaburzenia proporcji pomiędzy stężeniem zarówno homocysteiny i metioniny, jak i ADMA i L-argininy.

## 7. Streszczenie

Padaczka jest jedną z najczęstszych chorób neurologicznych, przyjmuje się, że dotyczy ok. 1% populacji polskiej. Mimo ciągłego postępu wiedzy na temat przyczyn i przebiegu padaczki, jej leczenie nadal pozostaje procesem skomplikowanym i najczęściej wieloletnim. Ponadto w świetle najnowszych doniesień piśmiennictwa, uważa się, że przewlekłe stosowanie leków przeciwpadaczkowych (LPP) może wywoływać różnorodne objawy niepożądanych oraz zaburzać metabolizm wielu związków, w tym aminokwasów siarkowych min. homocysteiny (Hcy). Homocysteina, endogenny aminokwas, powstaje w organizmie wyniku demetylacji metioniny (Met) i jest metabolizowany w procesach remetylacji i transsulfuracji z udziałem kofaktorów: kwasu foliowego, witamin B6 i B12. W procesie remetylacji Hcy ulega przekształceniu do Met, która może ulegać ponownie demetylacji do Hcy z udziałem S-adenozylometioniny (SAM) i S-adenozylhomocysteiny (SAH). S-adenozylometionina jest uważana za głównego donora grup metylowych w licznych przemianach metabolicznych, a jednym z produktów jej metylacji jest asymetryczna dimetyloargininina (ADMA), endogenny inhibitor syntazy tlenu azotu (NOS). Asymetryczna dimetyloarginina, podobnie jak Hcy jest istotnym czynnikiem ryzyka chorób naczyniowych i neurodegeneracyjnych. Uważa się, że na poziom osoczowej Hcy u chorych leczonych LPP ma wpływ min. dieta, czas i rodzaj stosowanej terapii, a także czynniki genetyczne.

Celem pracy było oznaczenie częstości występowania polimorfizmów genów *MTHFR* (C677T), *MTR* (A2756G), *MTHFD1* (G1958A) oraz analiza stężenia osoczowej Hcy i Met oraz ADMA i argininy (Arg) u chorych z padaczką przed rozpoczęciem leczenia oraz w trakcie terapii LPP a także u osób z grupy kontrolnej. W przeprowadzonych badaniach uwzględniono również analizę oznaczanych parametrów biochemicznych w zależności od posiadanego genotypu genów włączonych w przemiany Hcy do Met.

Badaniu poddano 63 osoby, 28 kobiet i 35 mężczyzn, w wieku od 18 do 65 lat z padaczką kryptogenną. Wśród chorych z padaczką 55 osób było leczonych LPP, 8 chorych oczekiwało na włączenie terapii LPP. Grupę kontrolną stanowiło 61 osób, 41 kobiet i 20 mężczyzn w wieku od 22 do 67 lat.

Stężenia Hcy i Met w osoczu krwi oznaczono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją elektrochemiczną. Stężenia ADMA i Arg oznaczono metodą HPLC z detekcją fluorocencyjną. Badanie polimorfizmów genów *MTHFR*, *MTR* i *MTHFD1* przeprowadzono przy użyciu techniki reakcji łańcuchowej polimerazy z zastosowaniem enzymów restrykcyjnych (PCR-RFLR).

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że farmakoterapia LPP u około 27% pacjentów z padaczką prowadzi do wzrostu stężenia osoczowej Hcy powyżej dolnej granicy łagodnej hiperhomocysteinemii (hHcy) oraz, że do istotnego generowania osoczowej Hcy przyczynia się szczególnie politerapia i długotrwałe (powyżej 5 letnie) leczenie LPP. Wydaje się również, że szczególne predyspozycje do hHcy i zwiększonego stężenia osoczowej ADMA mają chorzy z heterozygotą *MTHFR* CT

(C677T) i homozygotą MTHFD1 GG (G1958T) a uwarunkowania genetyczne mogą mieć wpływ na zaburzenia proporcji Hcy i Met oraz Arg i ADMA. Ponadto wydaje się również, że w warunkach hHcy związanej z terapią LPP u chorych z padaczką kontrola Hcy nad ADMA jest zaburzona.

Przeprowadzone badania wskazują, że monitorowanie stężenia osoczowej Hcy u pacjentów z padaczką leczonych LPP, a szczególnie z polimorfizmami genów predysponujących do hHcy u tych chorych, może przyczynić się do redukcji czynników ryzyka zmian naczyniowych i zapobiegać rozwojowi chorób neurologicznych.

## 8. Summary

Epilepsy is one of the most common neurological diseases, it is supposed to affect about 1% of general population. In spite of advance knowledge about etiology and course of epilepsy, the treatment is still complicated and usually long term process. Moreover, from last publications there is known, that long-term anticonvulsive therapy can lead to undesirable effects and change metabolism of many compounds, therein sulfur amino acids included i.a. homocysteine (Hcy). Homocysteine, endogenous amino acid, is synthesized in organism by demethylation of methionine (Met) and is metabolized through two pathways: remethylation and transsulfuration with use as co-factors folate, vitamin B6 and B12. In remethylation- pathway Hcy is transformed to Met, with can be again demethylated to Hcy with use s-adenozylometionine (SAM) and S-adenozylhomocysteine (SAH). S-adenozylometionine is the main donor of methyl groups in many metabolic processes and one of the product its methylation is an asymmetric dimethyloarginine (ADMA), endogenous nitrous oxide syntase (NOS) inhibitor. Homocysteine is regarded as an important risk factor of vascular and neurodegenerative diseases. It is considered, that diet, term of using and type of anticonvulsant drug and genetic factors influence on the level of plasma Hcy and ADMA in patients with epilepsy taking antiepileptic drugs (AEDs).

The aim of the study was the estimation of frequency of polymorphisms of genes *MTHFR* (C677T), *MTR* (A2756G), *MTHFD1* (G1958A) and comparing of blood serum concentrations of Hcy, Met, ADMA and arginine (Arg) in patients with epilepsy before treatment and during AEDs therapy versus control group. In assessed subjects the examined biochemical parameters have been also analyzed in course of owned type of genes included in metabolism Hcy to Met.

The study were conducted on 63 patients, 28 women and 35 men, aged from 18 to 65 with cryptogenic epilepsy. Among patients with epilepsy 55 subjects were treated with AEDs, and 8 patients were before the start of the anticonvulsive therapy. Control group included 61 people, 41 women and 20 men, aged from 22 to 67, without symptoms of neurological disorders.

The plasma blood concentrations of Hcy and Met has been identified by high performance liquid chromatography method (HPLC) with electrochemical detection. The concentration of ADMA and Arg has been identified by HPLC method with fluorescence detection. Determination of genes frequency of *MTHFR*, *MTR* and *MTHFR1* was conducted by polymerase chain reaction– restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLR) method.

The study demonstrates that AEDs treatment in about 27% epileptics leads to increase of plasma Hcy concentration above the level of mild hyperhomocysteinemia (hHcy) and, that polytherapy and long-term (above 5 years) using of anticonvulsants are factors that especially generating plasma hHcy. Also seems, that patients heterozygous with *MTHFR* CT (C677T) and homozygous with *MTHFD1* GG (G1958T) have specific predisposition to hHcy and higher concentration of plasma ADMA, and genetic

conditionings can influence to proportions of Hcy to Met and Arg to ADMA. Moreover, it seems that in state of hHcy induced by AEDs in epileptics the control Hcy over ADMA is disturbed.

The study also demonstrates, that monitoring of concentration of plasma Hcy in patients with epilepsy on AEDs, and especially with polymorphism of genes that predispose to hHcy, may contribute to reduction of risk factors of vascular lesions and protect from development of neurological disorders.

## Spis Treści

1.	Wprowadzenie .....	1
1.1.	Rys historyczny .....	1
1.2.	Definicja padaczki i rodzaje napadów padaczkowych .....	2
1.3.	Epidemiologia padaczki .....	4
1.4.	Etiologia padaczki .....	4
1.5.	Epileptogeneza i neurochemiczne podstawy napadów padaczkowych .....	4
1.5.1.	Rola kanałów jonowych w patomechanizmie padaczki .....	5
1.5.2.	Znaczenie układu glutaminergicznego w mechanizmie napadów padaczkowych .....	6
1.5.3.	Rola układu GABA-ergicznego w zjawiskach drgawkowych .....	9
1.5.4.	Rola innych neuroprzekaźników w patogenezie padaczki .....	10
1.5.5.	Znaczenie tlenu azotu w patomechanizmie padaczki .....	10
1.6.	Diagnostyka padaczki .....	11
1.7.	Leczenie padaczki .....	11
1.8.	Homocysteina .....	13
1.8.1.	Metabolizm homocysteiny .....	13
1.8.2.	Hiperhomocysteinemia .....	15
1.8.3.	Udział hiperhomocysteinemii w patogenezie chorób sercowo-naczyniowych .....	17
1.8.4.	Wpływ hiperhomocysteinemii na patogenezę chorób neurologicznych, psychiatrycznych, wad rozwojowych i patologię ciąży .....	20
1.8.5.	Hiperhomocysteinemia a rozwój padaczki .....	22
1.8.6.	Hiperhomocysteinemia w terapii lekami przeciwpadaczkowymi u chorych z padaczką .....	23
1.9.	ADMA .....	24
1.9.1.	Metabolizm ADMA .....	24
1.9.2.	Czynniki wpływające na stężenie ADMA w osoczu krwi .....	26
1.9.3.	Udział ADMA w patogenezie chorób naczyniowych .....	28
1.9.4.	ADMA jako czynnik patogenezy innych schorzeń .....	29
1.9.5.	Arginina .....	30
2.	Cel pracy .....	31
3.	Materiał i metody .....	32

3.1.	Materiał.....	32
3.1.1.	Grupy badane .....	32
3.1.2.	Grupa kontrolna .....	32
3.1.3.	Kryteria włączenia do badań .....	32
3.2.	Metody.....	33
3.2.1.	Przygotowanie krwi do badań .....	33
3.2.2.	Analiza stężenia homocysteiny i metioniny .....	33
3.2.3.	Analiza stężenia ADMA i argininy.....	33
3.2.4.	Genotypowanie .....	34
3.3.	Statystyczna ocena wyników .....	35
4.	Wyniki.....	36
5.	Dyskusja.....	51
6.	Wnioski.....	60
7.	Streszczenie.....	61
8.	Summary .....	63

## Alfabetyczny wykaz skrótów zastosowanych w pracy

AEDs- ang. *Antiepileptic Drugs*

ADMA- asymetryczna dimetyloarginina

AMPA- receptory kwasu  $\alpha$ -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego

Arg- L-arginina

BFNC- ang. *Benign Familial Neonatal Convulsions*, łagodne rodzinne drgawki noworodków

BFNIS- ang. *Benign Familial Neonatal- Infantile Seizures*, łagodne rodzinne drgawki noworodków i dzieci

BMI- ang. *Body Mass Index*, wskaźnik masy ciała

CBS- syntaza cystationinowa

CBZ- karbamazepina

ChA- choroba Alzheimerera

ChP- choroba Parkinsona

COMT- katecholotlenometylotransferaza

Cys- cysteina

DDAH- dimetyloaminohydrolaza dimetyloargininy

DPH- fenytoina

EEG- elektroencefalografia

ESM- etosuksymid

FA- foliany

FBM- felbamat

GABA- kwas  $\gamma$ -aminomasłowy

GABA-T- transaminaza GABA

GBP- gabapentyna

GEFS+ - ang. *Generalized Epilepsy with Febrile Sizures plus*, uogólniona padaczka z drgawkami gorączkowymi plus

iGluR- glutaminergiczne receptory jonotropowe

mGluR- glutaminergiczne receptory metabotropowe

HCTL- ang. *Homocysteine Thiolactone*, tiolakton homocysteiny

Hcy- homocysteina

hHcy- hiperhomocysteinemia

HPLC/EC- ang. *High Pressure Liquid Chromatography/Electrochemical Detection*, wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją elektrochemiczną

ILAE- ang. *International League Against Epilepsy*, Międzynarodowa Liga Przeciwpadaczkowa

IMT- ang. *Intima Media Thickness*, kompleks śródbłonek- błona środkowa

LPP- leki przeciwpadaczkowe



LPP NG- leki przeciwpadaczkowe nowej generacji

LTG- lamotrygina

LEV- lewetyracetam

MCP-1- ang. *Monocyte Chemotactic Protein-1*, białko przyciągające monocyty-1

Met- metionina

MMA- ang. *Methylmalonic Acid*, kwas metylomalonowy

NMDA- receptory kwasu N-metylo-D-asparaginowego

MTHFD1- ang. *Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase/ Methenyltetrahydrofolate Cyclohydrolase/ Formyltetrahydrofolate Synthetase*

MTHFR- reduktaza metylenotetrahydrofolianowa

*MTHFR (C677T), MTR (A2756G), MTHFD1 (G1958A)*- polimorfizmy genów *MTHFR, MTR, MTHFD1*

MTR- syntaza metioniny

NO- ang. *Nitric Oxide*, tlenek azotu

NOS- ang. *Nitric Oxide Synthase*, syntaza NO

eNOS- śródbłonkowa syntaza NO

iNOS- indukowana syntaza NO

nNOS- neuronalna syntaza NO

OCBZ- okskarbazepina

OUN- ośrodkowy układ nerwowy

PB- fenobarbital

PCR-RFLP- ang. *Polymerase Chain Reaction– Restriction Fragment Length Polymorphism*, polimerazowa reakcja łańcuchowa z zastosowaniem enzymów restrykcyjnych

PRMT I- N-metylotransferaza argininowa typu I

SAH- S- adenozylohomocysteina

SAM- S- adenozylometionina

TGB- tiagabina

THF- tetrahydrofolian

TNF- $\alpha$ - ang. *Tumor Necrosis Factor*, czynnik martwicy nowotworów

TPM- topiramet

VCAM-1- ang. *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*, naczyniowa molekula adhezyjna-1

VPA- kwas walproinowy

VGB- wigabatryna