

lek. Urszula Łagan-Jędrzejczyk

Polimorfizmy genu *ABCB1/MDR1* a poziom czynników apoptotycznych u chorych na padaczkę leczonych lekami przeciwpadaczkowymi

**Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych
w dyscyplinie medycyna**

Promotor: prof. dr hab. Jolanta Dorszewska

Pracownia Neurobiologii Katedry Neurologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu



Wydział Lekarski I

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2018

Spis treści

1. Wprowadzenie.....	8
1.1 Definicja padaczki.....	9
1.2 Epidemiologia padaczki.....	10
1.3 Przyczyny padaczki.....	10
1.4 Klasyfikacja napadów padaczkowych.....	11
1.5 Leczenie padaczki.....	13
1.5.1 Podział leków przeciwpadaczkowych (LPP).....	13
1.5.2 Mechanizmy działania LPP.....	14
1.5.3 Możliwe działania niepożądane LPP.....	15
1.5.4 Interakcje między LPP.....	15
1.5.5 Strategia leczenia padaczki LPP.....	16
1.6 Gen ABCB1/MDR1 i jego polimorfizmy.....	19
1.6.1 Rola genu ABCB1/MDR1.....	19
1.6.2 Glikoproteina P.....	19
1.6.3 Polimorfizmy genu a zapadalność na choroby i skuteczność leczenia.....	21
1.6.4 Polimorfizm ABCB1/MDR1 C1236T a padaczka.....	21
1.6.5 Polimorfizm ABCB1/MDR1 C3435T a padaczka.....	21
1.6.6 Polimorfizm ABCB1/MDR1 G2677(A/T) a padaczka.....	23
1.7 Apoptoza.....	23
1.7.1 Główne drogi apoptozy.....	24
1.7.2 Szlak zewnętrzny apoptozy.....	25
1.7.3 Szlak wewnętrzny apoptozy.....	25
1.7.4 Inne szlaki apoptozy.....	26
1.7.5 Rola kaspaz w procesie apoptozy.....	26
1.7.6 Rola białek rodziny Bcl-2 w procesie apoptozy.....	26
1.7.7 Rola białka p53 w procesie apoptozy.....	27
1.7.8 Homocysteina jako czynnik apoptotyczny.....	29
1.7.9 Padaczka a proces apoptozy.....	32
1.7.10 Leki przeciwpadaczkowe a proces apoptozy.....	32
1.8 Autofagia.....	34
1.8.1 Leki przeciwpadaczkowe a proces autofagii.....	35
2. Cel pracy.....	36
3. Materiał i metody.....	37

3.1 Materiał.....	37
3.1.1 Grupy badane.....	37
3.1.2 Kryteria włączenia do badań.....	38
3.2 Metody.....	39
3.2.1 Przygotowanie krwi do badań.....	39
3.2.2 Odczynniki.....	39
3.2.3 Aparatura laboratoryjna.....	40
3.2.4 Analiza wybranych polimorfizmów genu ABCB1/MDR1 metodą HRM.....	40
3.2.5 Oznaczenie poziomu komórek apoptotycznych.....	42
3.2.6 Analiza stężenia osoczowej homocysteiny i metioniny.....	43
3.3 Analiza statystyczna wyników.....	44
4. Wyniki.....	45
4.1 Analiza polimorfizmu C1236T genu ABCB1/MDR1.....	45
4.2 Analiza polimorfizmu C3435T genu ABCB1/MDR1.....	47
4.3 Analiza polimorfizmu G2677(A/T) genu ABCB1/MDR1.....	48
4.4 Analiza częstości występowania polimorfizmów C1236T, C3435T, G2677(A/T) genu ABCB1/MDR1.....	50
4.5 Analiza stężenia Hcy i Met oraz poziomu komórek z aktywnymi kaspazami u chorych na padaczkę leczonych LPP [LPP(+)], u chorych przed włączeniem LPP [LPP(-)] oraz u osób z grupy kontrolnej.....	51
4.6 Analiza stężenia Hcy i Met oraz poziomu komórek z aktywnymi kaspazami w zależności od genotypów genu ABCB1/MDR1: C1236T, C3435T, G2677(A/T) u chorych [(LPP(+)] oraz u osób z grupy kontrolnej.....	56
4.7 Analiza stężenia Hcy i Met oraz poziomu komórek z aktywnymi kaspazami w zależności od genotypów genu ABCB1/MDR1: C1236T, G3435T oraz G2677(A/T) u chorych LPP (+) z napadami ogniskowymi oraz w grupie kontrolnej.....	59
4.8 Analiza stężenia Hcy i Met oraz poziomu komórek z aktywnymi kaspazami w zależności od genotypów genu ABCB1/MDR1: C1236T, G3435T oraz G2677(A/T) u chorych na padaczkę LPP(+) z napadami uogólnionymi oraz w grupie kontrolnej.....	62
4.9 Analiza stężenia Hcy i Met oraz poziomu komórek z aktywnymi kaspazami w zależności od rodzaju stosowanej farmakoterapii u chorych na padaczkę LPP(+) oraz w grupie kontrolnej.	66
4.10 Analiza stężenia Hcy i Met oraz poziomu komórek z aktywnymi kaspazami w zależności od czasu trwania leczenia LPP u chorych na padaczkę oraz w grupie kontrolnej.....	69
5. Dyskusja.....	70
6. Wnioski.....	77

7. Streszczenie.....	78
8. Abstract.....	80
9. Piśmiennictwo.....	82
10. Spis rycin.....	99
11. Spis tabel.....	101

Słowa kluczowe:

padaczka, leki przeciwpadaczkowe, gen *ABCB1/MDR1*, apoptoza, homocysteina, metionina, komórki apoptotyczne

epilepsy, antiepileptic drugs, ABCB1/MDR1 gene, apoptosis, homocysteine, methionine, apoptotic cells

Wykaz zastosowanych skrótów

ABCB1/MDR1- gen oporności wielolekowej (ang. *multidrug resistance -1- gene*)

AIF- czynnik indukujący apoptozę (ang. *apoptosis inducing factor*)

AMPA- kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy (ang. *alfa-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor*)

Apaf-1- czynnik 1 aktywujący proteazy apoptotyczne (ang. *apoptotic protease activating factor1*)

Atg5- białko 5 autofagii (ang. *autophagy protein 5*)

Atg7- białko 7 autofagii (ang. *autophagy protein 7*)

Bcl-2- (ang. *B cell leukemia/ lymphoma-2*)

BH3- białka BH3 (ang. *BH3 only proteins*)

BZD- benzodiazepiny

CAD- deoxyrybonukleaza aktywująca kaspazę (ang. *caspase-activated deoxyribonuclease*)

CBZ- karbamazepina

CBS- β -syntaza cystationinowa (ang. *cystathionine beta-synthase*)

chA- choroba Alzheimerera

chP- choroba Parkinsona

CREB- białko wiążące cAMP (ang. *cAMP response element-binding protein*)

DD- receptor śmierci (ang. *death receptor*)

DED- (ang. *death effector domain*)

DISC- kompleks sygnalizujący apoptozę (ang. *death-inducing signaling complex*)

ESM- etosuksymid

FA- kwas foliowy

FAM- karboksyfluoresceina, (ang. *carboxyfluorescein*)

FLICA- znakowane fluorochromem inhibitory kaspaz (ang. *fluorochrome labeled inhibitors of caspases*)

GABA- kwas γ -aminomasłowy

GBP- gabapentyna

HCTL- tiolakton homocysteiny (ang. *homocysteine thiolactone*)

Hcy- homocysteina
hHcy- hiperhomocysteinemia
HPLC/EC- wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją elektrochemiczną (ang. *High Pressure Liquid Chromatography/Electrochemical Detection*)
HRM- denaturacja DNA z wysoką rozdzielczością (ang. *High Resolution Melting*)
IAPs – inhibitory proteaz apoptozy (ang. *inhibitors of apoptotic proteases*)
ILAE- Międzynarodowa Liga Przeciwpadaczkowa (ang. *International League Against Epilepsy*)
LCM- lakozamid
LEV- lewetiracetam
LPP- leki przeciwpadaczkowe
LPP(+)- chorzy leczeni LPP
LPP(-)- chorzy oczekujący na włączenie LPP
LPP NG- leki przeciwpadaczkowe nowej generacji
LPP SG- leki przeciwpadaczkowe starej generacji
LTG- lamotrygina
MAPK- kinazy aktywowane mitogenami (ang. *mitogen-activated protein kinases*)
MOMP- przepuszczalność zewnętrznej błony mitochondrialnej (ang. *mitochondrial outer membrane permeabilization*)
MTHFR- reduktaza metylenotetrahydrofolianowa (ang. *methylenetetrahydrofolate reductase*)
MTLE-HS- padaczka skroniowa ze stwardnieniem hipokampa (ang. *mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis*)
mTOR- (ang. *mammalian target of rapamycin kinase*)
MTR- metylotransferaza homocysteinowa (ang. *5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase*)
NF-κB- jądrowy czynnik transkrypcyjny
NMDA- receptor kwasu N-metylo-D-asparaginowego
OXCZ- oxkarbazepina
PCD- programowana śmierć komórki (ang. *programmed cell death*)
PB- fenobarbital
P-gp- glikoproteina P
PI- jodek propidionowy (ang. *propidium iodide*)
PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*)
PGB- pregabalina
PHT- fenytoina
PMP- perampanel

PTE- Polskie Towarzystwo Epileptologii

RFLP- polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *restriction fragment length polymorphism*)

ROS- reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*)

SNP- polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide polymorphism*)

TGB- tiagabina

TPM- topiramat

VGB- vigabatryna

VPA- kwas walproinowy

ZNS- zonisamid

1. Wprowadzenie

W trakcie odbywania stażu specjalizacyjnego w dziedzinie neurologii, miałam pod swoją opieką wielu pacjentów chorych na padaczkę. Często jednak stosowana w różnych modyfikacjach terapia przeciwpadaczkowa nie była u nich skuteczna. Rodziło to i nadal powoduje duże rozczarowanie zarówno po stronie pacjenta, jak i leczącego go lekarza. Jako neurolog mam świadomość, że chorzy na padaczkę to szczególna grupa pacjentów, narażona na liczne ograniczenia zdrowotne, które przekładają się również na duże problemy w funkcjonowaniu społecznym. Chęć niesienia pomocy szczególnie tej grupie chorych przełożyła się na pogłębianie wiedzy w dziedzinie epileptologii oraz zainteresowanie się skutkami prowadzonej farmakoterapii, możliwościami jej ulepszania, a w szczególności wprowadzeniem personalizacji leczenia. Uważam, że indywidualne podejście do terapii pacjentów z padaczką jest przyszłością medycyny, a u jego podstaw najprawdopodobniej będą leżały odpowiednio dostosowane badania genetyczne.

Genem kandydackim, wykazującym prawdopodobny związek ze skutecznością leczenia padaczki jest *ABCB1/MDR1*, tzw. gen oporności wielolekowej, znany głównie z badań nad lekoopornością chorób nowotworowych. Istnieją prace wskazujące na istnienie korelacji pomiędzy polimorfizmami tego genu z rozwojem padaczki lekoopornej, są one jednak niespójne i wymagają szerszej zakrojonych analiz [1,2]. Co więcej, z danych literaturowych wynika, że gen ten może mieć związek z wejściem komórek na drogę apoptozy [3]. Zagadnienie to jest szczególnie ważne w kontekście stosowania leków przeciwpadaczkowych (LPP), gdyż dotychczasowe badania na liniach komórek nowotworowych i na modelach zwierzęcych wykazały zdolność LPP do indukowania kontrolowanej genetycznie śmierci komórek (apoptozy) [4]. Zgodnie z najlepszą wiedzą autorki, jak dotąd nie opublikowano jednak żadnego badania potwierdzającego czy proces ten przebiega również u pacjentów chorych na padaczkę leczonych LPP (LPP+). Co więcej, brakuje również prac dotyczących związku polimorfizmów w genie *ABCB1/MDR1* z modulowaniem apoptozy u pacjentów chorujących na padaczkę, zarówno przyjmujących LPP, jak i oczekujących na włączenie terapii tymi lekami (LPP-). Z kolei z licznych danych literaturowych wynika, że LPP mogą prowadzić do wzrostu stężenia homocysteiny (Hcy), natomiast hiperhomocysteinemia (hHcy) może indukować proces apoptozy [5,6]. Jak do tej pory nie analizowano jednak hHcy jako czynnika apoptotycznego u chorych na padaczkę leczonych LPP. Stąd tematem niniejszej pracy jest badanie poziomu wybranych czynników związanych z indukowaniem apoptozy w zależności od posiadanego genotypu w polimorficznym genie *ABCB1/MDR1* u pacjentów chorujących na padaczkę i stosujących LPP.

1.1. Definicja padaczki

Padaczka jest zespołem objawów somatycznych, wegetatywnych i psychicznych, mogącym występować na podłożu różnych zmian morfologicznych i metabolicznych mózgu. Do napadu padaczkowego dochodzi natomiast w wyniku przejściowego, stereotypowego zaburzenia jego czynności wskutek nadmiernych, gwałtownych wyładowań bioelektrycznych neuronów [6].

W 2014 roku grupa zadaniowa Międzynarodowej Ligi Przeciwpadaczkowej (ILAE, ang. *International League Against Epilepsy*) opublikowała nową, **praktyczną definicję padaczki**, formułując tym samym trochę inne spojrzenie na rozpoznawanie tej choroby. Zgodnie z najnowszą koncepcją padaczka jest chorobą mózgu, którą można rozpoznać w jednej z trzech następujących sytuacji klinicznych:

- A) Gdy wystąpią co najmniej dwa nieprovokowane (bądź odruchowe) napady padaczkowe pojawiające się w odstępie co najmniej 24 godzin,
- B) Gdy wystąpi jeden nieprovokowany (bądź odruchowy) napad, a prawdopodobieństwo pojawienia się kolejnych jest porównywalne do ogólnego ryzyka nawrotu (co najmniej 60%), takiego jak po dwóch nieprovokowanych napadach, mogących wystąpić w ciągu 10 następnych lat,
- C) Gdy można rozpoznać zespół padaczkowy.

Nowością w nomenklaturze padaczki było pojawienie się pojęcia „*epilepsy resolved*”, które niestety nie oznacza „wyleczenia”. Odnosi się raczej do sytuacji, gdy w danym momencie pacjent nie jest chory na padaczkę, ale nie można wykluczyć powrotu choroby. Przykładowo: pacjenci z zespołem padaczkowym zależnym od wieku, gdy osiągnęli wiek ustąpienia napadów, bądź też pacjenci wolni od napadów od 10 lat, w tym nie pobierający LPP przez 5 lat. Wydaje się, że najważniejszą korzyścią wprowadzenia nowej definicji padaczki jest możliwość przyspieszenia diagnozy w szczególnych sytuacjach klinicznych i co za tym idzie, możliwość szybszego włączenie skutecznego leczenia, w tym również, w warunkach polskich, refundowanego przez Narodowy Fundusz Zdrowia [8].

Padaczka lekooporna definiowana jest według ILAE jako nieskuteczność dwóch dobrze tolerowanych, odpowiednio dobranych i stosowanych LPP zarówno w mono, jak i politerapii w osiągnięciu remisji napadów [9]. Dane literaturowe wskazują, że pomimo istnienia wielu LPP o różnych mechanizmach działania nadal 25% do nawet 40% pacjentów w zależności od przyjętej definicji rozwija padaczkę lekooporną [10].

1.2. Epidemiologia padaczki

Padaczka jest jedną z najczęściej występujących chorób neurologicznych na świecie i dotyczy około 1-1,5% populacji. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) choruje na nią ponad 50 milionów osób na świecie, w Polsce jest to ok. 400 tys chorych [11]. Rozpowszechnienie padaczki jest największe w przedziale wiekowym do 10 lat, a szczególnie w pierwszych miesiącach życia i po 65 r.ż., częściej też rozpoznaje się ją u płci męskiej oraz w krajach rozwijających się [12]. Ostatnie badania epidemiologiczne pokazują jednak, że maleje liczba pacjentów z padaczką okresu dziecięcego, natomiast rośnie zapadalność w wieku starczym, szczególnie po 75 r.ż. Zatrważające dane WHO wskazują, że 3/4 pacjentów chorujących na padaczkę w krajach rozwijających się nie otrzymuje odpowiedniego leczenia.

1.3. Przyczyny padaczki

Padaczka jest zespołem objawów, której przyczynę może stanowić wiele czynników. Zgodnie z najnowszą klasyfikacją etiologiczną, padaczki dzieli się na:

- A) Padaczki uwarunkowane genetycznie (dawniej zwane idiopatycznymi), gdy choroba klinicznie objawia się głównie napadami padaczkowymi i jest bezpośrednim wynikiem znanego lub przypuszczalnego defektu genetycznego (bądź też kilku mutacji), np. gen *SCN1A* leżący u podłoża zespołu Dravet,
- B) Padaczki o etiologii strukturalnej/metabolicznej (dawniej zwane objawowymi), spowodowane uwarunkowanym genetycznie, bądź też nabytym stanem patologicznym zwiększającym ryzyko napadów,
- C) Padaczki o nieznannej przyczynie (dawniej zwane kryptogennymi), będące konsekwencją niewyjaśnionego jak dotąd stanu patologicznego [13].

1.4. Klasyfikacja napadów padaczkowych

Najbardziej znana i wciąż używana klasyfikacja napadów padaczkowych Międzynarodowej Ligi Przeciwpadaczkowej pochodzi z 1981 roku (Tab.1.) i doczekała się jak dotąd kilkukrotnej modyfikacji, w tym w 2010 i 2017 roku.

Tab.1. Klasyfikacja napadów padaczkowych według ILAE z 1981 r. [14]

I. Napady częściowe (rozpoczynające się ogniskowo)
I. A. Napady częściowe proste
1. Z objawami ruchowymi
2. Z zaburzeniami somatosensorycznymi
3. Z objawami autonomicznymi
4. Z zaburzeniami psychicznymi
I. B. Napady częściowe złożone
1. Początek częściowy prosty, po czym dołącza się zaburzenie świadomości:
Napady częściowe rozpoczynające się ogniskowo
a) z cechami napadów częściowych i dołączającymi się zaburzeniami świadomości
b) z automatyzmami
2. Z zaburzeniami świadomości od początku:
a) tylko z zaburzeniami świadomości
b) z automatyzmami
I. C. Napady częściowe rozwijające się w uogólnione
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
II. Napady uogólnione (drgawkowe lub niedrgawkowe)
II. A. Napady nieświadomości
1. Napady nieświadomości
2. Nietypowe napady nieświadomości
II. B. Napady miokloniczne
II. C. Napady kloniczne
II. D. Napady toniczne
II. E. Napady toniczno-kloniczne
II. F. Napady atoniczne
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)

W nowszej klasyfikacji opracowanej w 2010 roku, zmianie uległy głównie definicje napadów ogniskowych i uogólnionych [13] (Tab.2.)

Tab.2. Klasyfikacja napadów padaczkowych według ILAE z 2010 r. [13]

Napady uogólnione	Napady ogniskowe	Napady o nieznanym początku
Toniczno-kloniczne	Napady ogniskowe bez zaburzeń świadomości (dawniej częściowe proste) • z zauważalnymi objawami ruchowymi lub wegetatywnymi • z doznaniem subiektywnymi (czuciowymi lub psychicznymi)	Napady zgięciowe Inne
Nieświadomości • Typowe • Nietypowe • Ze szczególnymi cechami -miokloniczne napady nieświadomości -mioklonie powiek	Napady ogniskowe z zaburzeniami świadomości (dawniej napady częściowe złożone)	
Miokloniczne • Miokloniczne • Miokloniczno-atoniczne • Miokloniczno-toniczne	Napady ogniskowe przechodzące w obustronny napad drgawkowy (toniczny, kloniczny, toniczno-kloniczny, dawniej napady wtórnie uogólnione)	
Kloniczne		
Toniczne		
Atoniczne		

Z kolei najnowsza, operacyjna klasyfikacja napadów padaczkowych opracowana w 2017 roku (Tab.3.) odzwierciedla nowoczesną wiedzę epileptologiczną, ale jej punktem wyjścia jest nadal struktura podziału napadów z 1981 roku. Klasyfikacja ta niesie bez wątpienia wiele korzyści, ale nadal pozostawia sporo niejasności i przed wprowadzeniem do rutynowej praktyki klinicznej wymaga przetestowania i dyskusji [15].

Tab.3. Podstawowa klasyfikacja napadów padaczkowych według ILAE z 2017 r. [15]

Ogniskowy początek		Uogólniony początek	Nieznany początek
Świadomość zachowana	Świadomość zaburzona		
Początek ruchowy		Ruchowy: -tonicznie-kloniczny -o innej manifestacji	Ruchowy: -tonicznie-kloniczny -o innej manifestacji
Początek bez manifestacji ruchowej		Bez manifestacji ruchowej (absence)	Bez manifestacji ruchowej
Ogniskowy z ewolucją do dwustronnego tonicznie-klonicznego			Niesklasyfikowane

1.5. Leczenie padaczki

1.5.1. Podział leków przeciwpadaczkowych

Leki przeciwpadaczkowe są jednymi z najczęściej stosowanych leków w neurologii. Pomimo istnienia ponad 20 LPP, dobór odpowiedniego leku jest nadal wyzwaniem nawet dla doświadczonego neurologa/epileptologa i uważa się, że u około 1/3 pacjentów nie udaje się opanować napadów padaczkowych [10]. LPP dzielimy na leki starej (LPP SG), czyli pierwszej generacji oraz nowej (LPP NG), drugiej i trzeciej generacji. Powszechnie uważa się, że LPP NG wyróżniają się lepszą tolerancją, bezpieczeństwem stosowania oraz wykazują mniej działań niepożądanych w porównaniu z LPP SG. Niestety nie wykazano ich lepszej skuteczności w porównaniu z LPP SG, takimi jak: kwas walproinowy (VPA) i karbamazepina (CBZ) [16]. Do leków pierwszej generacji zaliczamy oprócz CBZ i VPA, fenytoinę (PHT), fenobarbital (PB), etosuksymid (ESM) i benzodiazepiny (BZD). Druga generacja LPP obejmuje lamotryginę (LTG), topiramę (TPM), gabapentynę (GBP), okskarbazepinę (OXCZB), lewetyracetam (LEV), pregabalinę (PGB), tiagabinę (TGB), wigaibatrynę (VGB), styrypentol (STR) oraz zonisamid (ZNS). Natomiast trzecią generację LPP stanowią m.in.: retigabina (lek wycofany w czerwcu 2017 roku z przyczyn komercyjnych), lakozamid (LCM), rufinamid (RUF), perampanel (PMP), eslikarbazepina (ESL) oraz briwaracetam (BRV) [17].

1.5.2. Mechanizmy działania LPP

LPP różnią się między sobą mechanizmami działania, farmakokinetyką, skutecznością, tolerancją oraz działaniami niepożądanymi [18]. Leki te można podzielić, biorąc pod uwagę ich główny sposób oddziaływania. Należy jednak pamiętać, że mechanizm działania niektórych LPP nie do końca jest jasny, a większość z nich posiada więcej niż jeden sposób oddziaływania (w szczególności: VPA, TPM, PB). Przykładowo: CBZ, PHE, LTG, OXCBZ, ZNS uważane są za blokery potencjałozależnych kanałów sodowych, podczas gdy ESM, GBP i PG modulują kanały wapniowe [19]. Z kolei wzrost transmisji gabaergicznej przez wpływ na receptory GABA A, zmniejszanie degradacji kwasu γ -aminomasłowego (GABA, ang. *γ -aminobutyric acid*), bądź też hamowanie wychwytu synaptycznego, jest charakterystyczny dla VGB, TGB, BZD oraz STR [20]. Natomiast hamowanie pobudzenia glutaminergicznego przez niekompetycyjny, antagonistyczny wpływ na jonotropowe receptory AMPA (ang. *alfa-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor*, kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy) wyróżnia jeden z najnowszych leków: PMP [21,22]. Innym mechanizmem działania, charakterystycznym dla LCM, jest nasilanie powolnej inaktywacji zależnych od napięcia kanałów sodowych, co prowadzi do stabilizacji błon komórkowych nadmiernie pobudliwych neuronów. W końcu, LEV i BRV posiadają zdolność wiązania synaptycznego białka SV2A (ang. *synaptic vesicle glycoprotein 2A*), modulującego egzocytózę neuroprzekaźników [23]. Z kolei leki o złożonym mechanizmie działania, a więc VPA i TPM pobudzają przekazywanie gabaergiczne, blokują kanały sodowe oraz hamują szlaki glutaminergiczne, inaktywując receptory NMDA (ang. *N-methyl-D-aspartate receptor*, receptor N-metylo-D-asparaginowy) i AMPA (odpowiednio: VPA i TPM) [24]. Co ciekawe, charakterystyczną cechą VPA jest ponadto zwiększanie ekspresji białka Bcl-2 w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) [25].

Z powyższych przykładów wynika, że LPP modulują procesy związane z pobudliwością neuronów, ale niestety żaden z nich nie wpływa na mechanizmy leżące u podstawy epileptogenezy. Dlatego uważa się, że przełomem w leczeniu padaczki byłoby opracowanie terapii mogącej modyfikować przebieg choroby/zespołu padaczkowego, bądź też wykazującej skuteczność w terapii pacjentów z padaczką lekooporną [26].

1.5.3. Możliwe działania niepożądane LPP

Dokonując wyboru LPP, lekarz neurolog powinien wziąć pod uwagę nie tylko wskazania do leczenia zdiagnozowanych napadów lub zespołu padaczkowego, ale również możliwe interakcje lekowe i działania niepożądane LPP. Ich wystąpienie może mieć wpływ na skuteczność terapii, jakość życia pacjenta, a nawet prowadzić do przerwania leczenia. Uważa się, że działania niepożądane LPP są najczęściej zależne od zastosowanej dawki leku i zwykle odwracalne [27]. W początkowym okresie leczenia prawie wszystkie LPP mogą powodować senność i zawroty głowy, ale niektóre z nich mogą wywoływać też specyficzne efekty uboczne. Przykładowo, VPA może powodować drżenie, wzrost masy ciała i łysienie; CBZ i LTG reakcje skórne; CBZ i OXCZB hiponatremię; terapia TPM może wiązać się z upośledzeniem funkcji poznawczych i utratą wagi, a LEV łączony jest z drażliwością [28]. Dane literaturowe wskazują, że skórne reakcje nadwrażliwości (m.in. zespół Stevensa-Johnsona) związane z pobieraniem CBZ są uwarunkowane genetycznie i związane z genami ludzkiego układu zgodności tkankowej HLA: HLA-B*15:02 i HLA-A*31:01 [29]. Dlatego najnowsze opublikowane rekomendacje zalecają wykonywanie badań genetycznych u wszystkich pacjentów- kandydatów do włączenia CBZ w kierunku HLA-A*31:01 (zalecenia klasy B) oraz HLA-B*15:02 (zalecenia klasy A i C w zależności od pochodzenia etnicznego) [30].

Co wydaje się być szczególnie ważne, istnieje szereg badań wskazujących na związek leczenia LPP z podwyższonym ryzykiem wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych, w tym zawału serca i udaru mózgu [31,32,33]. Uważa się, że istotną rolę odgrywa w tym procesie podwyższony poziom osoczowej homocysteiny (Hcy), asymetrycznej dimetyloargininy (ang., *asymmetric dimethylarginine*, ADMA) [34], lipidów [35], kwasu moczowego, CRP oraz masy ciała w następstwie stosowania LPP [36].

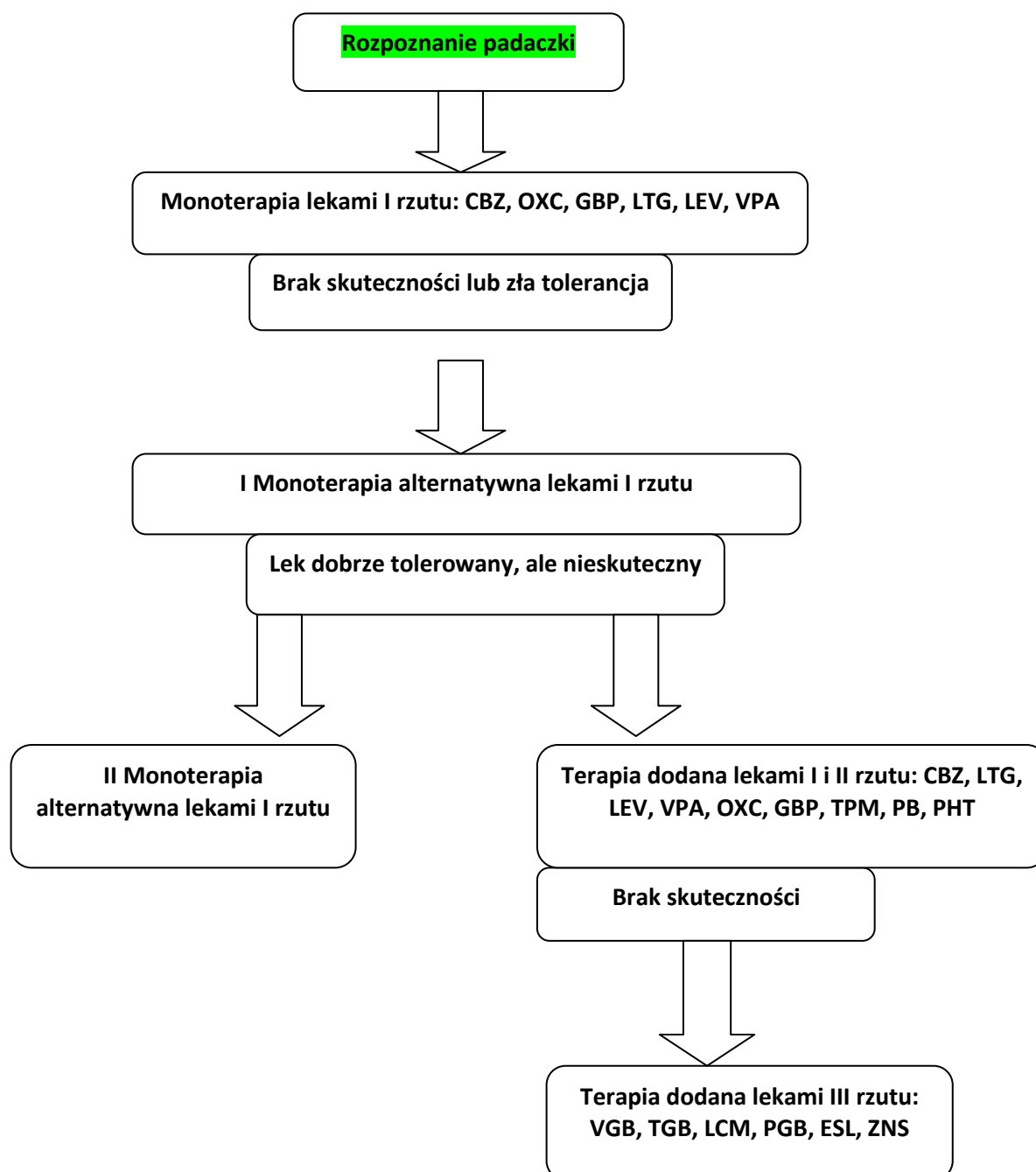
1.5.4. Interakcje między LPP

U chorych na padaczkę mogą pojawiać się podczas leczenia LPP interakcje międzylekowe, które w znaczący sposób przyczyniają się do obniżenia skuteczności działania LPP lub nasilenia działania niepożądanego. Oddziaływania międzylekowe dzielą się na interakcje farmakokinetyczne oraz farmakodynamiczne. Pierwsze z nich wpływają na parametry farmakokinetyczne leków i mogą zachodzić na etapie wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu bądź też wydalania leku. W praktyce najczęściej wiążą się ze zmianą stężenia stosowanej substancji [37]. Drugie z kolei są trudne do zmierzenia, gdyż nie wpływają na stężenie leków i zachodzą głównie w docelowym miejscu działania. Mogą mieć one charakter synergistyczny bądź antagonistyczny zarówno pod względem skuteczności leczenia, jak i możliwych działań niepożądanych [38]. W przypadku LPP interakcje farmakokinetyczne najczęściej związane są z indukowaniem (CBZ, PHT, PB), bądź też hamowaniem (VPA) wątrobowego enzymu-

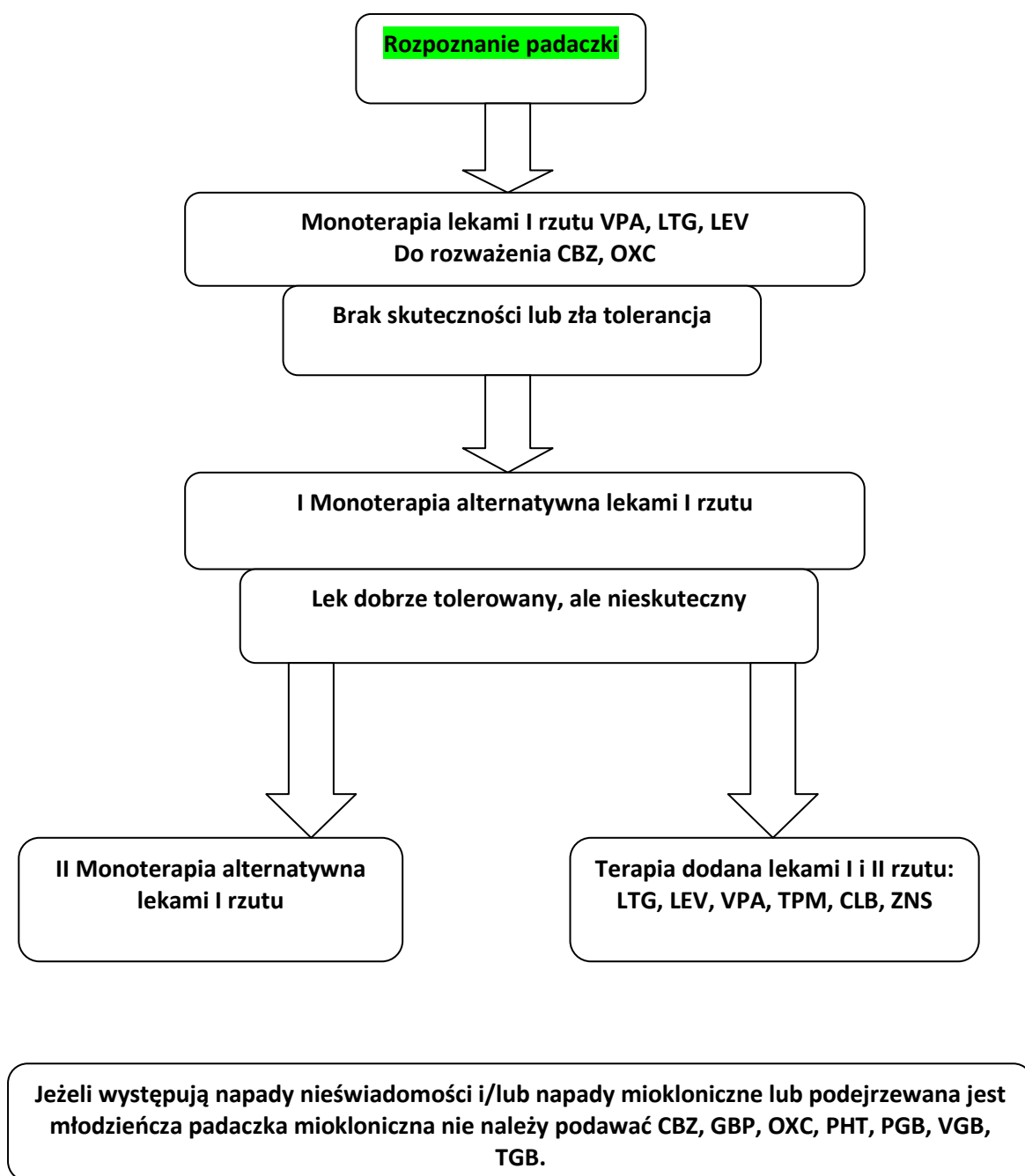
cytochromu P450 [39] oraz z różnym wiązaniem się z białkami surowicy. Wykazano, że leki nie podlegające metabolizmowi wątrobowemu nie wykazują poważnych interakcji. Wydają się być więc bezpieczną formą terapii m.in. u osób starszych, które często stosują jednocześnie wiele preparatów z powodu różnych chorób [37]. Uważa się ponadto, że LPP NG wykazują mniej interakcji międzylekowych w porównaniu z LPP SG. Mają też korzystniejszą farmakokinetkę, w minimalnym stopniu wiążą się z białkami krwi oraz są wydalone głównie przez nerki.

1.5.5. Strategia leczenia padaczki LPP

Leczenie padaczki najczęściej polega na długoletnim przyjmowaniu LPP, bądź też na zastosowaniu w określonych zespołach padaczkowych metod niefarmakologicznych, takich jak: leczenie operacyjne, stymulacja nerwu błędnego czy też postępowanie dietetyczne (dieta ketogenna). Celem leczenia padaczki jest dążenie do uwolnienia pacjenta od napadów padaczkowych. Gdy jest to niemożliwe, dąży się do zmniejszenia ich częstości. Coraz większą uwagę przywiązuje się do indywidualizacji leczenia, co jest szczególnie istotne w tzw. grupach specjalnej troski, czyli u dzieci, u kobiet w ciąży i w wieku prokreacyjnym oraz u osób po 65 r.ż. Optymalnym leczeniem farmakologicznym padaczki jest stosowanie monoterapii w najmniejszej skutecznej dawce LPP, a w razie jej nieskuteczności, zastosowanie tzw. racjonalnej politerapii. Umieszczone poniżej schematy przedstawiają aktualne zalecenia Polskiego Towarzystwa Epileptologii (PTE) dotyczące leczenia nowo zdiagnozowanych napadów padaczkowych o ogniskowym i uogólnionym początku u dorosłych (Ryc.1. i 2.) [40].



Ryc.1. Schemat leczenia nowo zdiagnozowanych napadów ogniskowych u dorosłych według [40].

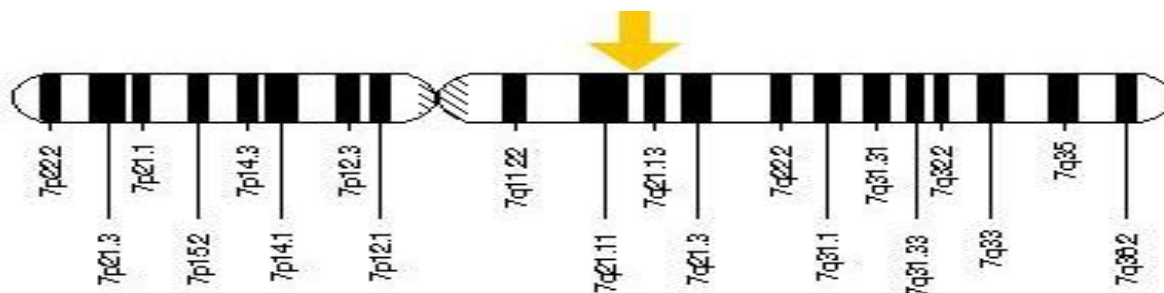


Ryc.2. Schemat leczenia nowo zdiagnozowanych napadów toniczno-klonicznych u dorosłych według [40].

1.6. Gen *ABCB1/MDR1* i jego polimorfizmy

1.6.1. Rola genu *ABCB1/MDR1*

Gen *ABCB1/MDR1* nazywany jest genem oporności wielolekowej typu 1 (MDR1, ang. *multidrug resistance-1 gene*) i należy do nadrodziny genów *ABCB* (ang. *ATP binding cassette subfamily B member 1*). Zlokalizowany jest na długim ramieniu 7 chromosomu w pozycji 21.12 (7q21.12) i posiada 28 eksonów (Ryc.3.). Pierwotnie wiązano go głównie z lekoopornością chorób nowotworowych, natomiast w świetle najnowszych badań wykazano, że gen ten może wpływać zarówno na zapadalność na różne choroby, jak też na skuteczność ich leczenia. Szczególne miejsce zajmuje tu leczenie padaczki. *ABCB1/MDR1* jest genem wysoce polimorficznym, jak do tej pory wykryto ponad 100 polimorfizmów pojedynczych nukleotydów, SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*), a do najczęściej występujących w populacji kaukaskiej i azjatyckiej należą trzy SNP znajdujące się w regionie kodującym genu: C1236T (ekson 12), C3435T (ekson 26) oraz G2677(A/T) (ekson 21) [41].

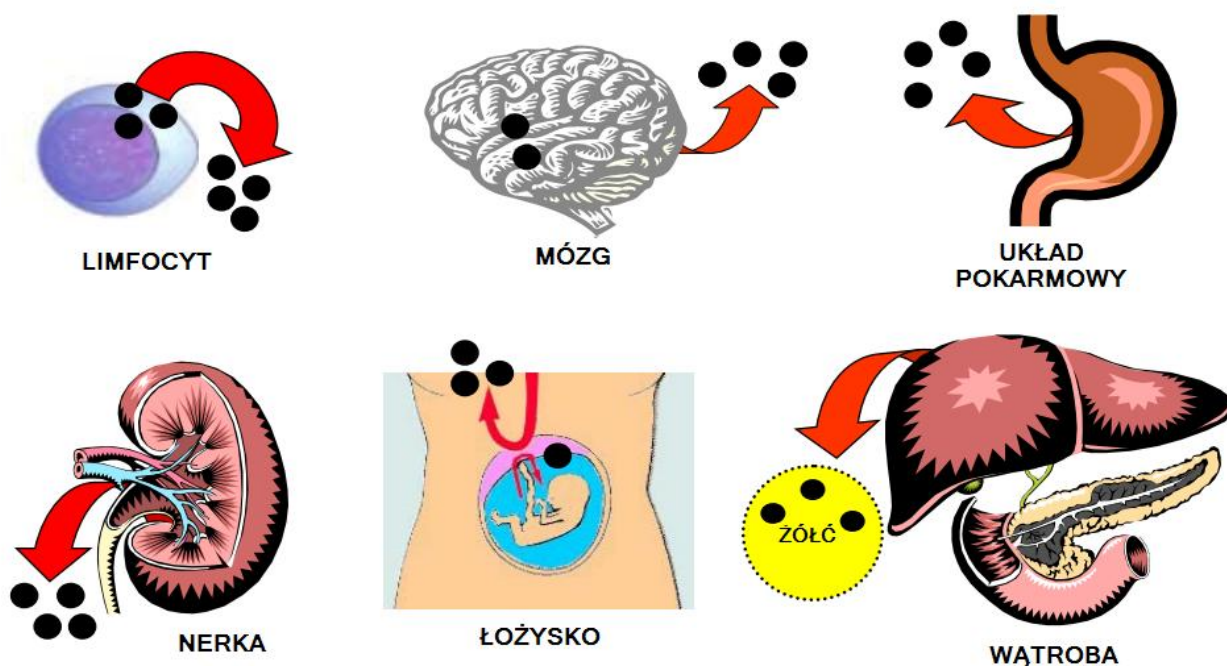


Ryc.3. Lokalizacja genu *ABCB1/MDR1* na długim ramieniu 7 chromosomu według Genetics Home Reference: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/ABCB1>.

1.6.2. Glikoproteina P

Produktem białkowym genu *ABCB1/MDR1* jest glikoproteina P (P-gp) należąca do rodziny transporterów białkowych ABC. Białka te biorą udział w przenoszeniu różnych cząsteczek przez błony cytoplazmatyczne z udziałem energii powstającej podczas hydrolizy ATP [42], chroniąc tym samym organizm przed działaniem wielu ksenobiotyków. W warunkach fizjologicznych, wysoką ekspresję glikoproteiny P-gp wykazano w nabłonku jelit, wątroby, nerek, łożysku, w limfocytach oraz w barierze krew-mózg; pozostałe tkanki posiadają bardzo niski jej poziom [43] (Ryc.4.). Z kolei w warunkach patologicznych nadekspresję tej glikoproteiny zaobserwowano w barierze krew-mózg [44], w komórkach

nowotworowych [45] oraz ognisku padaczkorodnym u pacjentów z padaczką lekooporną. Wydaje się, że u chorych z padaczką może to mieć związek z mechanizmami leżącymi u podłoża nieskuteczności ich leczenia [46].



Ryc.4. Narządy wykazujące wysoką ekspresję glikoproteiny P w warunkach fizjologicznych według Drug Interactions, S.Penzak, Online Presentation.

P-gp, będąc ATP-zależnym transporterem ksenobiotyków, działa jak „odkurzacz molekularny”. Wyrzucając swoje substraty do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, bierze udział w absorpcji, dystrybucji, metabolizmie i wydalaniu różnych leków, w tym leków przeciwnowotworowych, immunosupresyjnych, kardiologicznych, przeciwdepresyjnych i LPP. Jak do tej pory wykazano, że P-gp może wpływać na przezłonowy transport następujących LPP: PHT, PB [47,48], GBP, LTG [49,50], LEV [48]. Nie wykazano natomiast takiej zależności dla VPA [51] oraz OXC [52], a odnośnie CBZ istnieją sprzeczne doniesienia [48,52].

Co ciekawe, istnieją prace wskazujące, że gen *ABCB1/MDR1* może modyfikować proces apoptozy [3] poprzez hamowanie przez P-gp, kaspazozależnej drogi w komórkach nowotworowych [53].

1.6.3. Polimorfizmy genu *ABCB1/MDR1* a zapadalność na choroby i skuteczność leczenia

Z danych literaturowych wynika, że polimorfizmy genu *ABCB1/MDR1* mogą być związane zarówno z zapadalnością na wiele chorób, w tym na nowotwory i padaczkę, jak również ze skutecznością ich leczenia. Jak do tej pory najwięcej badań dotyczyło analizy polimorfizmu C3435T genu *ABCB1/MDR1*. Wykazano jego związek ze wzrostem ryzyka zachorowania na wrzodziejące zapalenie jelit [54], różne nowotwory [55]: białaczkę [56], raka wątrobowokomórkowego [57] i raka prostaty [58], a także na padaczkę [59]. Ponadto, wykazano jego wpływ na skuteczność działania wielu leków m.in. LPP [60], przeciwnowotworowych [61] oraz przeciwdepresyjnych [62].

Natomiast, polimorfizmy C1236T oraz G2677(A/T) genu *ABCB1/MDR1* są mniej przebadane i istnieje ograniczona liczba metaanaliz [41]. Wykazano jednak związek polimorfizmu C1236T z zachorowaniem na chorobę Parkinsona (chP) [63], colitis ulcerosa [64] oraz z leczeniem pacjentów populacji azjatyckiej cierpiących na kostniakomięsaka, bądź raka piersi [65].

1.6.4. Polimorfizm *ABCB1/MDR1* C1236T a padaczka

Dane literaturowe wskazują na brak związku polimorfizmu *ABCB1/MDR1* C1236T ze skutecznością leczenia padaczki u chorych populacji chińskiej, zarówno u dzieci [66], jak i u dorosłych [67]. Nie wykazano też jego wpływu na stężenie wybranych LPP, w tym: LTG w populacji chorwackiej [49] oraz CBZ, VPA oraz PHT w populacji azjatyckiej [67,68,69].

1.6.5. Polimorfizm *ABCB1/MDR1* C3435T a padaczka

Polimorfizm *ABCB1/MDR1* C3435T zlokalizowany jest w eksonie 26. Wykazano, że może zmieniać ekspresję genu *ABCB1/MDR1* i wiązać się ze zmniejszoną aktywnością P-gp w jelicie, limfocytach oraz komórkach śródbłonna kanalików nerkowych [70,71]. Ponadto, wiadomo, że osoby z genotypem nieprawidłowym TT C3435T wykazują obniżoną ekspresję jelitowej P-gp w porównaniu do osobników homozygotycznych z genotypem prawidłowym CC C3435T [72]. Jednocześnie wykazano, że obniżona ekspresja P-gp w jelicie może być związana ze zmianą stężenia w osoczu niektórych LPP [73].

Istnieją doniesienia literaturowe dotyczące związku polimorfizmu *ABCB1/MDR1* C3435T z lekoopornością padaczki podczas stosowania LPP. Większość z przeprowadzonych dotąd metaanaliz nie wykazała pozytywnej korelacji pomiędzy polimorfizmem C3435T a rozwijaniem lekooporności w

populacji azjatyckiej [2], w tym koreańskiej [75], tureckich dzieci [74], azjatyckiej i europejskiej [76,77]. Natomiast dwie metaanalizy wykazały taką zależność jedynie dla rasy kaukaskiej [1,2]. W metaanalizie przeprowadzonej przez Li i wsp. [2015], wykazano istotnie mniejsze ryzyko rozwinięcia się padaczki lekoopornej u pacjentów rasy kaukaskiej posiadających allel T C3435T.

Analizie poddano również haplotypy genu *ABCB1/MDR1* w populacji indyjskiej i azjatyckiej, nie uzyskując jednak istotności statystycznej [2]. W świetle danych literatury wydaje się, że niebywałe znaczenie dla farmakoterapii LPP może mieć pochodzenie etniczne osób chorujących na padaczkę [78].

W kilku pracach wskazywano na większe ryzyko wystąpienia padaczki lekoopornej u pacjentów posiadających genotyp TT w porównaniu do pacjentów z genotypem CC C3435T [79,80]. Zależność ta została potwierdzona w najnowszej metaanalizie opublikowanej w 2017 roku. W pracy tej zasugerowano, że wprowadzenie genetycznych badań przesiewowych w kierunku polimorfizmu *ABCB1/MDR1* C3435T może być pomocne w przewidywaniu skuteczności leczenia pacjentów z padaczką [60].

Polimorfizm C3435T był również badany pod kątem wzrostu ryzyka zachorowania na padaczkę. W przeciwieństwie do metaanalizy nie wykazującej korelacji pomiędzy *ABCB1/MDR1* C3435T i predyspozycją do zachorowania na padaczkę przeprowadzoną przez Nurmohamed i wsp. [81], badanie przeprowadzone przez Balan i wsp., wykazało, że wariant genetyczny C3435T może zwiększyć ryzyko zapadalności na padaczkę, szczególnie na padaczkę skroniową ze stwardnieniem hipokampa (MTLE-HS, ang. *mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis*) w populacji południowo-indyjskiej z Kerala [59].

W populacji polskiej jak do tej pory przeprowadzono jedynie badania dotyczące skuteczności leczenia LPP w zależności od posiadanych wariantów genetycznych genu *ABCB1/MDR1* u pacjentów chorych na padaczkę, zarówno u dzieci, jak i u osób dorosłych. W populacji polskich dzieci nie zaobserwowano jednak różnicy w częstości występowania genotypów oraz alleli pomiędzy pacjentami chorymi na padaczkę a grupą kontrolną [82]. Wykazano natomiast, że allel C C3435T występował częściej u pacjentów z padaczką lekooporną w porównaniu z pacjentami z padaczką z dobrą kontrolą napadów [73,82]. Ponadto, w badaniu Stasiołka i wsp. [2016], zaobserwowano, że allel C może zwiększać ryzyko zachorowania na padaczkę, natomiast allel T wydaje się pełnić funkcję ochronną przed zachorowaniem na tę chorobę neurologiczną. Natomiast, we wcześniejszym badaniu w populacji polskich dzieci i osób dorosłych nie zaobserwowano żadnej korelacji omawianego polimorfizmu genu *ABCB1/MDR1* z padaczką lekooporną, nawet przy uwzględnieniu kilku definicji tego schorzenia [83].

1.6.6. Polimorfizm *ABCB1/MDR1* G2677(A/T) a padaczka

Dane literaturowe wskazują na brak związku polimorfizmu *ABCB1/MDR1* G2677(A/T) z lekoopornością padaczki w populacji tureckich dzieci [74] oraz w populacji irańskiej. Zaobserwowano natomiast związek pomiędzy genotypem homozygotycznym nieprawidłowym TT, a opornością na leczenie CBZ u pacjentów z napadami o ogniskowym początku [84]. Co ciekawe, przeprowadzona metaanaliza przez Yu i wsp., [85] wykazała, że polimorfizm G2677(A/T) może wiązać się ze wzrostem ryzyka wystąpienia padaczki lekoopornej u Azjatów, ale nie zaobserwowano takiej zależności u rasy kaukaskiej.

Uważa się, że badania dotyczące zależności pomiędzy wariantami genetycznymi *ABCB1/MDR1* i skutecznością leczenia LPP powinny być nadal prowadzone ze względu na brak jednoznacznych wyników oraz potencjalnie ważne znaczenie tego genu w poprawie skuteczności leczenia padaczki. Natomiast dalsze analizy powinny raczej uwzględniać różne definicje padaczki lekoopornej, występowanie różnych zespołów padaczkowych, różnorodność etniczną i brać pod uwagę stosowanie u wielu pacjentów leczenia politerapią. Wydaje się, że właśnie wymienione wyżej czynniki mogłyby tłumaczyć sprzeczności uzyskiwane w dotychczasowych badaniach.

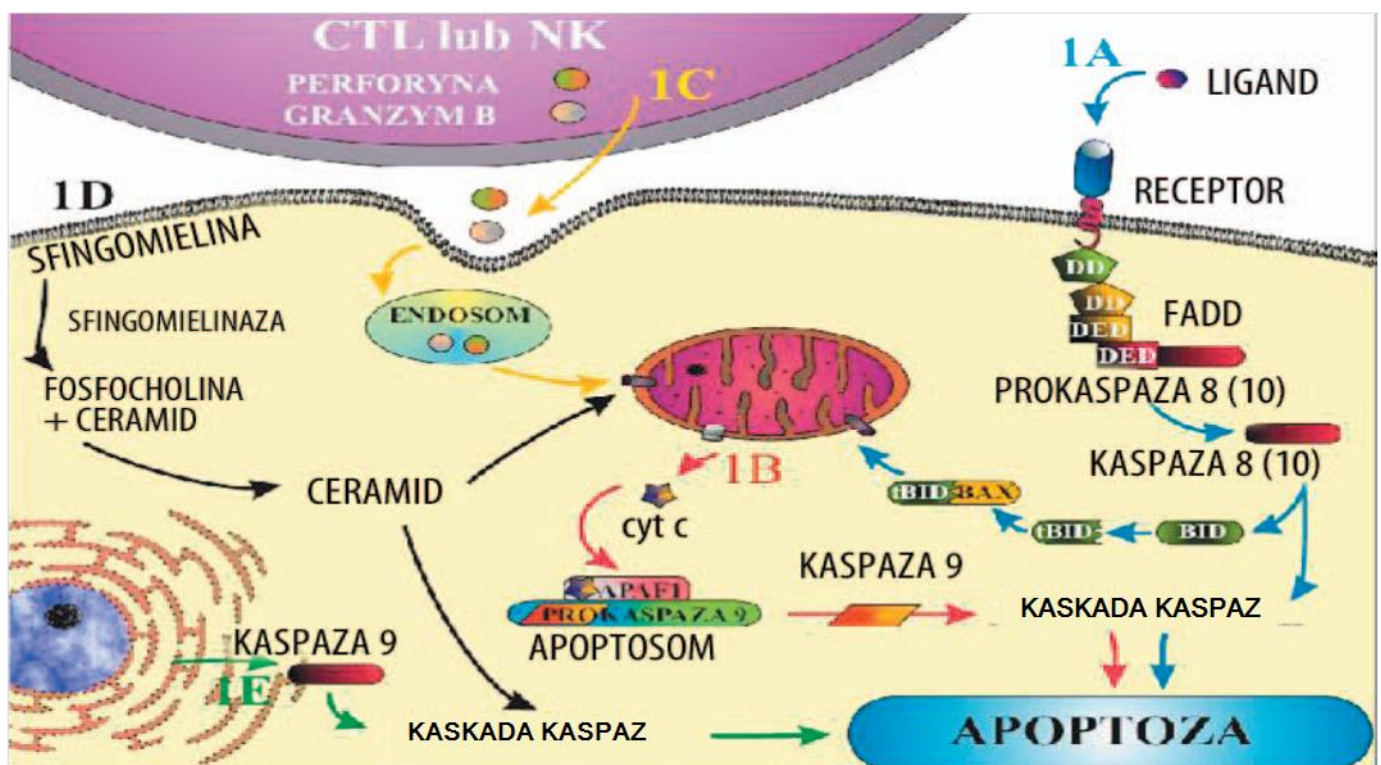
1.7. Apoptoza

Termin „apoptoza” pochodzi z greckiego słowa *apoptosis* i oznacza opadanie liści lub płatków kwiatów. Po raz pierwszy użyto go w 1972 roku, w przełomowej pracy grupy naukowców Kerra, Wylie i Currie [86]. Apoptoza to aktywny, fizjologiczny proces samobójczej, zaprogramowanej śmierci komórki (PCD, ang. *programmed cell death*). W wyniku aktywacji kaspaz dochodzi do rozpadu komórki na łatwe do fagocytozy ciała apoptotyczne. PCD, pełniąc kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy komórki, odpowiada za eliminację uszkodzonych, zmutowanych bądź też preneoplastycznych komórek i ma wielkie znaczenie w przebiegu embriogenezy, organogenezy czy też inwolucji narządów. Zaburzenia w przebiegu procesu apoptozy, (nadmierna bądź niewystarczająca) leżą u podstaw chorób neurodegeneracyjnych, autoimmunologicznych, nowotworowych, a także sercowo- naczyniowych, zakaźnych i wielu innych [87]. Uważa się, że umiejętna ingerencja w punkty kontrolne procesu apoptozy mogłaby być mechanizmem działania nowych terapii lekowych.

1.7.1. Główne drogi apoptozy

Apoptoza jako skomplikowany i wieloetapowy proces podlega wieloczynnikowej regulacji. Przebiega w trzech fazach: inicjacji, indukcji oraz w fazie wykonawczej. W komórce dochodzi do przemian morfologicznych, które można zaobserwować w mikroskopie świetlnym i elektronowym, takich jak: zaokrąglenie, zmniejszenie objętości komórki i jądra komórkowego (piknoza), kondensacji chromatyny, fragmentacji jądra (karioreksja), niewielkich zmian w zakresie organelli cytoplazmatycznych, utrzymania ciągłości błony komórkowej do końcowego stadium procesu i w końcu do powstania ciałek apoptotycznych, ulegających fagocytozie [86,88]. Z fizjologicznego punktu widzenia ważne jest, że z umierających komórek nie wydostają się enzymy proteolityczne, a co za tym idzie nie dochodzi do destrukcji otaczających tkanek i nie wytwarza się reakcja zapalna (martwica).

Do najlepiej opisanych szlaków apoptozy zaliczamy szlak wewnętrzny (mitochondrialny) i zewnętrzny (receptorowy), ale opisuje się też dodatkowe: pseudoreceptorowy, sfingomielinowo-ceramidowy oraz szlak indukowany reakcją stresową (Ryc.5.) [89].



Ryc.5. Szlaki apoptozy; 1A – szlak zewnętrzny, 1B – szlak wewnętrzny, 1C – szlak pseudoreceptorowy, 1D – szlak sfingomielinowo-ceramidowy, 1E – szlak indukowany stresem [89].

1.7.2. Szlak zewnętrzny apoptozy

Zewnętrzny szlak apoptozy aktywowany jest przez połączenie liganda z tzw. receptorami śmierci, należącymi do nadrodziny receptorów TNF (ang. *tumor necrosis factor*, czynnik martwicy nowotworów). Są one białkami transbłonowymi zawierającymi cytoplazmatyczną 80-aminokwasową domenę, zwaną domeną śmierci (DD, ang. *death domain*). Przykładami najczęściej opisywanych ligandów i korespondujących z nimi receptorów są: FasL/FasR (CD95/Apo1), TNF α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4, Apo2L/DR5 [90]. Przekazanie sygnału śmierci odbywa się przez utworzenie kompleksu sygnalizującego apoptozę, tzw. DISC (ang. *death-inducing signaling complex*). DISC powstaje przez przyłączenie C-końcowej domeny DD białka adaptorowego (np. FADD bądź TRADD) z domeną DD receptora oraz N-końcowej domeny DED (ang. *death effector domain*) z prokaspazą-8 lub -10. W następstwie tego połączenia prokaspazy ulegają proteolizie, a główna kaspaza wykonawcza, kaspaza-3 podlega bezpośredniej aktywacji [91]. Niektóre komórki tzw. komórki typu 2 wytwarzają zbyt małą ilość kaspazy-8, a do apoptotycznej śmierci potrzebują wzmocnienia sygnału przez aktywację białka Bid i pobudzanie szlaku wewnętrznego apoptozy [92]. Aktywne białko Bid, tzw. t-Bid (ang. *truncated Bid*) wzmacnia aktywację innych białek proapoptotycznych i uwalnianie mitochondrialnego cytochromu c [93].

1.7.3. Szlak wewnętrzny apoptozy

Wewnętrzny szlak apoptozy zwany jest także szlakiem mitochondrialnym. Uruchamiany jest w wyniku pojawienia się tzw. stresorów wewnątrzkomórkowych: uszkodzeń DNA, stresu oksydacyjnego, niedotlenienia, wzrostu poziomu jonów wapnia, promieniowania UV, a także chemioterapeutyków [94,95]. Czynniki te doprowadzają do wzrostu przepuszczalności zewnętrznej błony mitochondrialnej (MOMP, ang. *mitochondrial outer membrane permeabilization*) i następczego uwolnienia do cytoplazmy dwóch głównych grup białek proapoptotycznych. Grupę pierwszą stanowią: cytochrom c, Smac/Diablo oraz proteaza serynowa HtrA2/Omi. Najważniejszy z nich, cytochrom c tworzy duży kompleks białkowy zwany apoptosomem, w skład którego wchodzi m.in. związane Apaf-1 (czynnik 1 aktywujący proteazy apoptotyczne, ang. *apoptotic protease activating factor-1*) oraz prokaspaza-9. Prokaspaza-9 z kolei ulega aktywacji do kaspazy-9, która to może aktywować kaspazy wykonawcze, a w szczególności kaspazę-3. Kaspazy doprowadzają ostatecznie do proteolizy białek, zmian morfologicznych komórki i w efekcie końcowym do jej śmierci. Z kolei czynniki Smac/Diablo oraz HtrA2/Omi posiadają właściwości hamowania aktywności inhibitorów apoptozy tzw. IAPs (ang. *inhibitors of apoptotic proteases*) [96,90]. Druga grupa uwolnionych białek zawiera: AIF czyli czynnik aktywujący apoptozę (ang. *apoptosis*

inducing factor), endonukleazę G oraz CAD- deoxyrybonukleazę aktywującą kaspazę (ang. *caspase-activated deoxyribonuclease*). Białka AIF oraz endonukleaza G wzbudzają proces apoptozy na drodze niezależnej od kaspaz. Szlak ten posiada niektóre cechy typowej apoptozy, ale jest znacznie dłuższy [91].

1.7.4. Inne szlaki apoptozy

Szlak pseudoreceptorowy (szlak perforyny/granzymów) jest związany z cytotoksycznymi limfocytami T oraz komórkami NK. Perforyna tworzy kanały w błonie docelowej komórki, gdzie wpuszczane są granzymy A lub B. Granzym B, podobnie jak szlaki wewnętrzny i zewnętrzny apoptozy, jest związany z aktywacją kaspazy-3, natomiast granzym A wzbudza drogę niezależną od kaspaz [97,98].

Szlak sfingomielinowo-ceramidowy natomiast indukowany jest aktywacją kwaśnej lub obojętnej sfingomielinazy i prowadzi do wzrostu poziomu ceramidu w komórce. Ceramid w tym procesie pełni rolę lipidowego przekaznika śmierci [89,99].

Z kolei szlak indukowany stresem wzbudzany jest z udziałem siateczki wewnątrzplazmatycznej, będącej centrum regulacji śmierci komórki oraz kaspazy-12 [89,95,100].

1.7.5. Rola kaspaz w procesie apoptozy

Kluczowymi enzymami apoptozy są kaspazy, proteazy cysteinowe, które występują w komórkach w formie nieczynnych zymogenów czyli prokaspaz. Wyróżniamy kaspazy indukujące proces apoptozy: kaspaza-2,-8,-9,-10; wykonawcze (efektorowe): kaspaza-3,-6,-7 oraz zapalne (kaspaza-1,-4,-5,-11,-12,-13,-14). Enzymy te zbudowane są z trzech podjednostek, połączonych tzw. łącznikiem, w obrębie którego dochodzi do proteolizy, oligomeryzacji i aktywacji [101]. Uważa się ponadto, że kaspazy stanowią molekularny przełącznik pomiędzy apoptozą i autofagią [102].

1.7.6. Rola białek rodziny Bcl-2 w procesie apoptozy

Rodzina białek Bcl-2 zaangażowana jest w regulację wewnętrznego szlaku apoptozy poprzez sprawowanie kontroli nad przepuszczalnością tzw. poryn mitochondrialnych i zawiera zarówno inhibitory jak i promotory kontrolowanej genetycznie śmierci komórki. Nazwa pochodzi od linii komórkowej, z której po raz pierwszy wyizolowano te czynniki (ang. *B cell leukemia/ lymphoma-2*). Jak dotąd zidentyfikowano około 25 białek, a wśród nich do proapoptycznych należą m.in.: Bax, Bak, Bid, Bim, Bik, Blk; a antyapoptycznych: Bcl-2, Bax-XL, Bax-X, Bcl-XS, Bcl-w. Pierwsze zlokalizowane są zwykle w cytozolu, a drugie na błonie zewnętrznej mitochondrium. Równowaga pomiędzy białkami pro- i

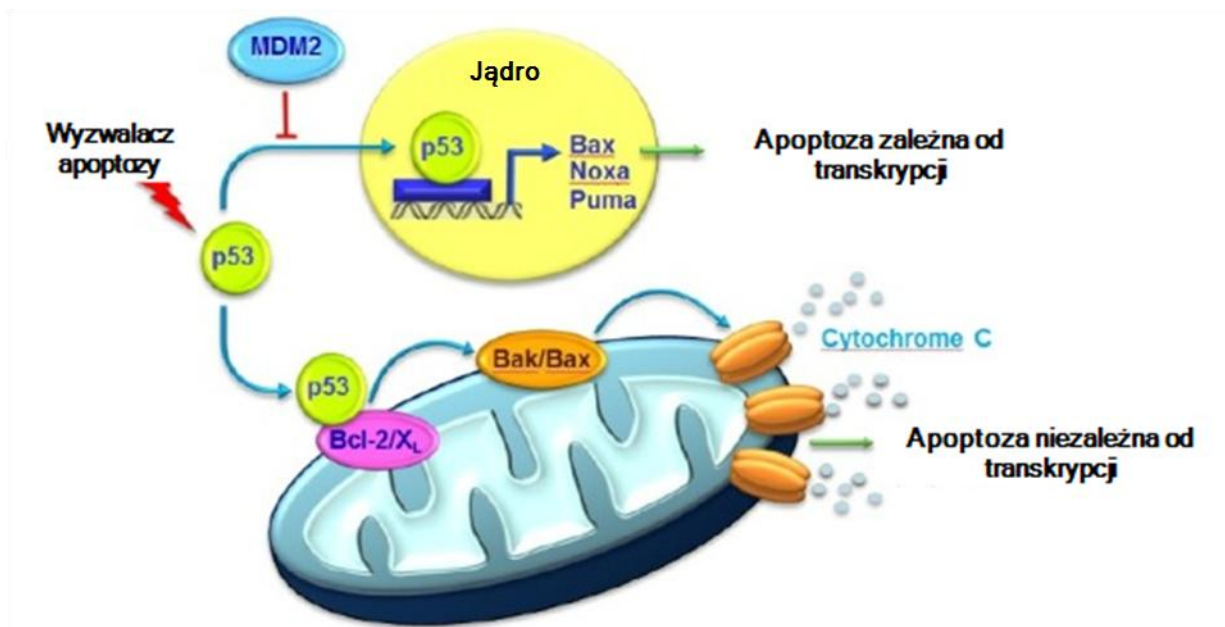
antyapoptotycznymi odpowiada za podatność komórki na przeżycie, bądź też na wejście na drogę apoptozy [103]. Białka z rodziny Bcl-2 charakteryzują się posiadaniem co najmniej jednego z czterech wspólnych regionów, tzw. domen homologii BH: BH1, BH2, BH3, BH4. Charakterystyczne dla białek antyapoptotycznych jest posiadanie wszystkich 4 domen, natomiast wśród białek promujących apoptozę istnieją posiadające kilka domen Bax i Bak oraz tylko domenę BH3 (ang. *BH3 only proteins*): Bik, Bad, Bid, Bim, Noxa, Puma [104]. Wzbudzają one proces apoptozy albo przez bezpośrednią aktywację białek z grupy Bax, albo inaktywując białka antyapoptotyczne [105].

1.7.7. Rola białka p53 w procesie apoptozy

Białko p53 kodowane jest przez gen *TP53*, zlokalizowany na chromosomie 17p13.1. Pełni on nadrzędną rolę w regulacji procesu apoptozy wyzwanego zniszczeniem DNA [106]. Gen *TP53* jest także jednym z najbardziej znanych genów supresorowych nowotworów [87] i jednocześnie leży u podstawy rozwoju wielu nowotworów ludzkich (więcej niż 50% przypadków) [107]. Badania nad możliwością farmakologicznego przywrócenia prawidłowej funkcji białka p53 wydają się być obiecującą terapią przeciwnowotworową [108].

W warunkach fizjologicznych białko p53 występuje w formie nieaktywnej, „zdrowej”, a jego poziom w komórce jest niski, bądź też niewykrywalny. Szeroko pojęty „stres komórkowy” związany np. z uszkodzeniem DNA, niedotlenieniem, aktywacją onkogenów wywołuje jego wzbudzenie przez oligomeryzację, fosforylację, acetylację i doprowadza do wzrostu jego poziomu w komórce [109]. W zależności od stopnia uszkodzenia DNA, białko p53 może wyzwać jeden z trzech procesów:

- a) zahamować cykl komórkowy w jednym z dwóch punktów kontrolnych G1/S lub G2/M i prowadzić do ewentualnej naprawy DNA przy udziale enzymów naprawczych,
- b) uruchomić proces apoptozy,
- c) a w przypadku uszkodzenia telomerów, doprowadzić do wejścia komórki na drogę starzenia [110].



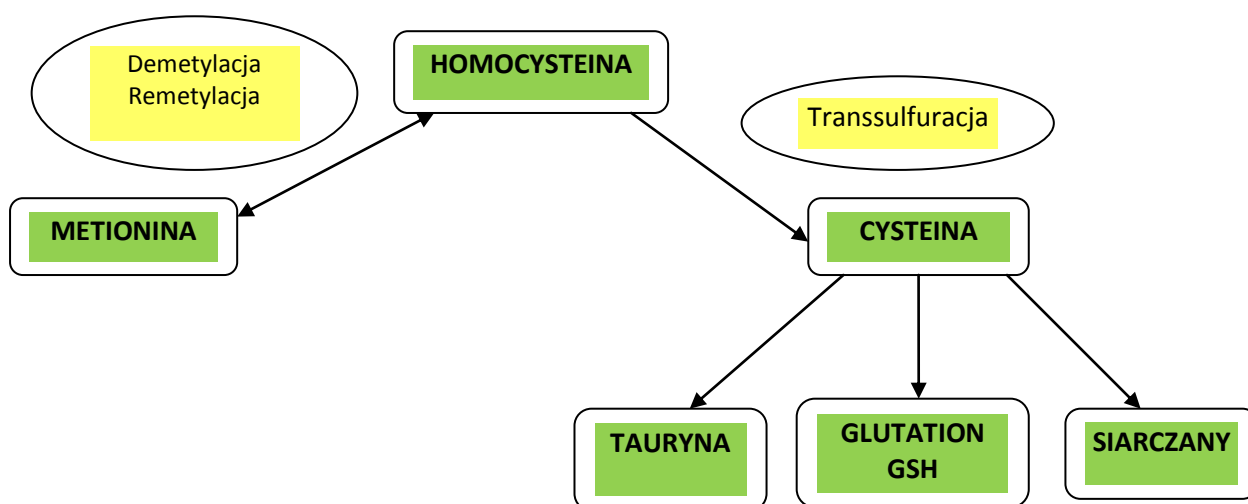
Ryc.6. Podwójna rola białka p53 w indukowaniu apoptozy w zależności od kompartmentu komórkowego według [111].

Wykazano, że białko p53 w zależności od kompartmentu komórkowego może aktywować wewnętrzny szlak apoptozy w dwojaki sposób. Oddziaływanie pomiędzy białkiem p53 i koaktywatorem transkrypcji CBP/p300 w jądrze komórkowym prowadzi do transaktywacji białek proapoptotycznych, takich jak: Bax, Noxa, Puma i wzbudzania apoptozy zależnej od transkrypcji [111]. Proces ten podlega regulacji przez białkowy produkt genu MDM2, posiadający zdolność hamowania działania p53 na zasadzie sprzężenia zwrotnego [112]. Z kolei w mitochondriach, białko p53 może też wyzwać apoptozę niezależną od transkrypcji, wiążąc białka antyapoptotyczne: Bcl-2, Bcl-XL i uwalniając z kompleksów proapoptotyczne Bak/Bax. Prowadzi to do wzrostu przepuszczalności błony mitochondrialnej i uwalniania cytochromu c (Ryc.6.) [111]. Białko p53 może również uruchamiać szlak zewnętrzny apoptozy, wpływając na przemieszczanie receptorów śmierci na powierzchnię komórki.

Dane literaturowe wskazują również na udział białka p53 w procesie autofagii (PCD 2). Wykazano, że w zależności od lokalizacji oraz od poziomu stresu komórkowego, p53 może być zarówno aktywatorem, bądź też inhibitorem tego procesu. Uważa się, że p53 w jądrze komórkowym, będąc czynnikiem transkrypcyjnym moduluje wiele regulatorów autofagii. Natomiast w cytozolu hamuje proces autofagii w komórkach nie narażonych na stres oksydacyjny [113].

1.7.8. Homocysteina jako czynnik apoptotyczny

Homocysteina (Hcy) obok cysteiny i metioniny (Met) należy do aminokwasów siarkowych i powstaje we wszystkich komórkach organizmu z Met. Met z kolei organizm otrzymuje zarówno w produktach pochodzenia zwierzęcego, jak i roślinnego. Metabolizm Hcy może przebiegać w dwóch szlakach: remetylacji i transsulfuracji z udziałem następujących kofaktorów: kwasu foliowego (FA), witaminy B6 i B12 (Ryc.7.). Z kolei hiperhomocysteinemia (hHcy), czyli podwyższony poziom osoczowej Hcy (powyżej 16 μM) uważany jest za czynnik ryzyka wielu chorób, w tym chorób naczyniowych, neurozwyrodnieniowych, nowotworowych oraz wad cewy nerwowej. Do powstania hHcy mogą przyczyniać się zarówno czynniki genetyczne, jak i środowiskowe. Wykazano, że za genetyczną predyspozycję do podwyższonego poziomu Hcy odpowiadają mutacje i polimorfizmy w genach zaangażowanych w jej metabolizm m.in.: β -syntazy cystationinowej, CBS (ang. *cystathionine beta-synthase*), reduktazy metylenotetrahydrofolianowej, MTHFR (ang. *methylenetetrahydrofolate reductase*) oraz metylotransferazy homocysteinowej, MTR (ang. *5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase*). Natomiast do wtórnych, nabytych przyczyn hHcy zaliczamy: dietę (i związane z nią niedobory witamin FA, B6, B12), styl życia (palenie papierosów, spożywanie w nadmiarze alkoholu i kawy), choroby przewlekłe (niewydolność nerek i wątroby), a także stosowanie leków, w tym głównie LPP i L-dopy [87].



Ryc.7. Główne kierunki przemiany homocysteiny według [87].

Badania przeprowadzone w wielu ośrodkach na świecie wskazują, że przewlekłe stosowanie LPP może prowadzić do wzrostu stężenia osoczowej Hcy, a proces ten prawdopodobnie dotyczy nawet 10-

40% pacjentów chorych na padaczkę pobierających LPP [114,34]. Za przyczynę generowania Hcy u pacjentów stosujących LPP uznaje się m.in. zaburzenie jelitowego wchłaniania kofaktorów jej remetylacji oraz transsulfuracji (FA, witaminy B6 i B12), jak też pobudzanie enzymów wątrobowych warunkujących ich poziom. Uważa się ponadto, że duże znaczenie ma również czas trwania leczenia, stosowana dieta, predyspozycje genetyczne i wiek pacjentów [87]. Co więcej, proces ten w dużej mierze może zależeć od rodzaju stosowanej terapii, gdyż wykazano, że niektóre LPP, a zwłaszcza LPP NG, takie jak: LTG i LEV nie powodują wzrostu poziomu osoczowej Hcy i nie zmniejszają przy tym stężeń witaminy B12 i FA, w odróżnieniu od LPP SG [34,115,116].

Z danych literatury wynika, że podwyższony poziom Hcy może wzbudzać apoptozę w wielu liniach komórkowych [5,6]. Uważa się, że kluczowym elementem w tym procesie może być generowanie wolnych rodników (ROS, ang. *reactive oxygen species*). Przykładowo, w badaniach na komórkach neuroblastoma, egzogennie podana Hcy stymulowała enzym oksydazę NADPH, co prowadziło do wzrostu poziomu anionu nadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$), a w efekcie końcowym do apoptozy [117]. Co więcej, właściwości proapoptotyczne Hcy tłumaczy się w oparciu o zjawisko ekscytotoksyczności i pobudzenie receptorów NMDA, co w konsekwencji prowadzi do wzrostu poziomu jonów wapnia, generowania ROS i wzbudzania apoptozy [118].

Innym potencjalnym mechanizmem wzbudzenia apoptozy przez Hcy jest jej wpływ na szlak kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK, ang. *mitogen-activated protein kinases*). Wykazano, że główną rolę w tym procesie pełni białko p38 MAPK. W badaniach *in vitro* przeprowadzonych przez Wang i wsp. [2012a] na kardiomiocytach zaobserwowano, że indukcja apoptozy związana była z aktywacją białka p38 MAPK i generowaniem ROS, jak również obniżeniem poziomu białek antyoksydacyjnych, takich jak tioredoksyna (TRX). Natomiast dodanie do hodowli komórkowych inhibitora p38 MAPK zapobiegało temu procesowi. Warto zaznaczyć, że w tym modelu doświadczalnym dochodziło również do zmiany potencjału błonowego mitochondrium, a więc prawdopodobnie do stymulacji drogi wewnętrznej apoptozy [119]. Z kolei w badaniu przeprowadzonym na szczurzych kardiomiocytach z udziałem Hcy, potwierdzono również udział innych kinaz MAPK w indukowaniu apoptozy, takich jak: ERK i JNK [120]. Co więcej, uważa się, że asymetryczna dimetyloarginina (ADMA), która jest czynnikiem ryzyka chorób sercowo-naczyniowych, może także mieć udział w apoptozie indukowanej z udziałem Hcy. W badaniach przeprowadzonych w komórkach mięśni gładkich naczyń wykazano, że Hcy prowadziła do wewnątrzkomórkowego generowania ROS i aktywacji szlaków JNK/p38 MAPK [121].

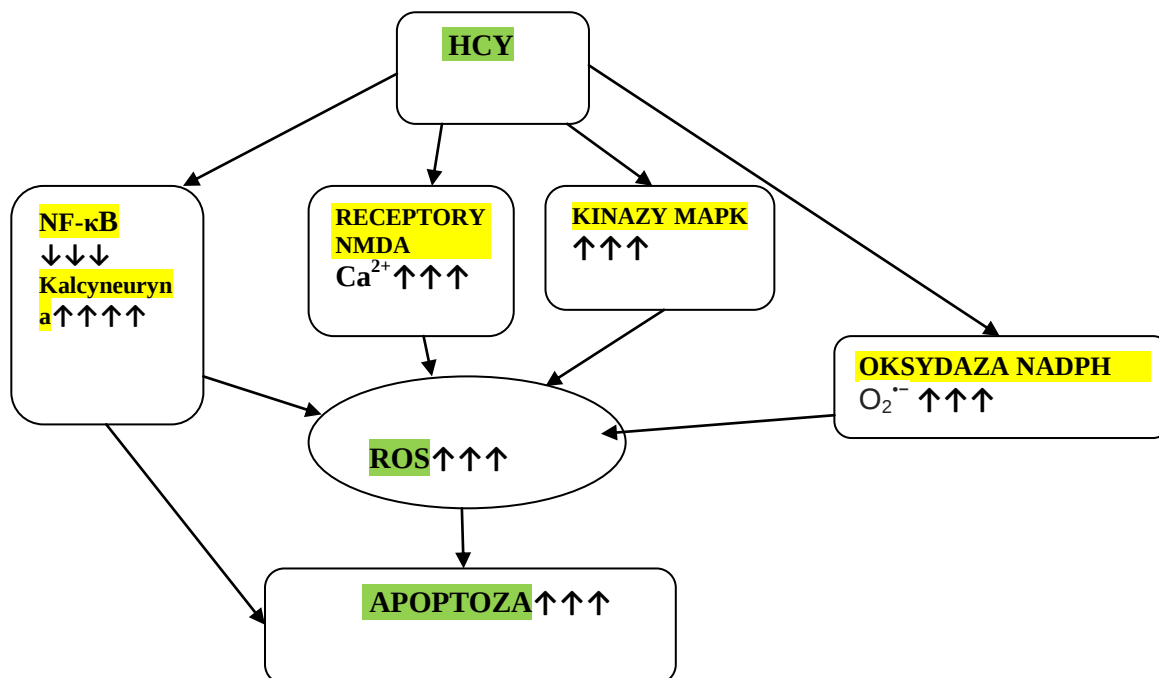
W proces apoptozy z udziałem Hcy prawdopodobnie zaangażowany jest również jądrowy czynnik transkrypcyjny, NF- κ B, który bierze udział w procesach zapalnych oraz immunologicznych. Przykładowo, w badaniach na komórkach neuroblastoma, aktywacja NF- κ B była związana ze wzrostem poziomu czynników apoptotycznych, takich jak: Bax, kaspazy-3 i białka p53 [122]. Podobną zależność zaobserwowano w ludzkich komórkach szpiku kostnego, gdzie apoptoza indukowana z udziałem Hcy

miała związek z aktywacją NF-κB i wzbudzaniem szlaku apoptozy związanego z generowaniem ROS [123]. Inne prace wskazują jednak, że czynnik NF-κB może mieć właściwości neuroprotekcyjne, a obniżenie jego poziomu może prowadzić do neurodegeneracji [124].

Innym czynnikiem biorącym udział w procesie apoptozy z udziałem Hcy jest białko 14-3-3ε. Wang i wsp. [2012b] wykazali, że indukowana przez Hcy apoptoza w szczurzych neuronach hipokampa była związana ze zmniejszonym stężeniem tego białka i jednoczesną stymulacją kalcyneuryny [125].

Co ciekawe, istnieją również doniesienia wskazujące na możliwość aktywacji przez Hcy szlaku apoptozy związanego z siateczką wewnątrzplazmatyczną. Potwierdzają to badania przeprowadzone na płytkach krwi pacjentów z cukrzycą [126], jak również w komórkach osteoblastów. Wykazano, że spośród wszystkich przebadanych komórek najbardziej podatne na apoptozę indukowaną przez Hcy są osteoblasty [127].

Interesujące, w odniesieniu do farmakoterapii pacjentów, wydają się być dane wskazujące, że statyny mogą hamować proces apoptozy z udziałem Hcy. W progenitorowych komórkach endotelialnych atorwastatyna znosiła proapoptotyczne działanie Hcy przez zmniejszenie stresu oksydacyjnego i hamowanie szlaku p38MAPK/kaspaza-3 [128]. Simwastatyna z kolei, w ludzkich komórkach śródbłónki żyły pępowinowej (HUVECs, ang. *human umbilical vein endothelial cells*) prowadziła do wzrostu stężenia c-IAP1 i c-IAP2 i przez to hamowała apoptozę indukowaną przez Hcy [129]. Główne szlaki wzbudzania apoptozy przez Hcy przedstawiono na poniższym schemacie (Ryc.8.).



Ryc.8. Główne drogi wzbudzania apoptozy z udziałem homocysteiny, ↑↑↑-wzrost, ↓↓↓- spadek stężenia.

1.7.9. Padaczka a proces apoptozy

Badania doświadczalne oraz neuroobrazowe pokazują, że nawracające napady padaczkowe oraz rozwinięty stan padaczkowy powodują generowanie stresu oksydacyjnego w neuronach, co może prowadzić do ich śmierci w różnych mechanizmach [130]. Uważa się, że do śmierci neuronów może dochodzić w drodze martwicy, apoptozy, bądź też uruchamiania zjawiska ekscytotoksyczności [131]. Procesy te najczęściej dotyczą neuronów hipokampa, ale również układu limbicznego, mózdzku oraz kory mózgowej [132,133]. Wykazano ponadto, że proces utraty komórek nerwowych może mieć wpływ na epileptogenezę i wiązać się z rozwojem określonego typu padaczki, jak również prowadzić do zaburzeń funkcji poznawczych. Z danych piśmiennictwa wynika, że w przypadku apoptozy komórek nerwowych, u chorych na padaczkę aktywacji może ulegać zarówno jej szlak wewnętrzny, jak i zewnętrzny [134].

Z kolei inne badania wykazały, że u chorych na padaczkę apoptozie mogą podlegać nie tylko komórki nerwowe, ale też komórki pęcherzyków płucnych. Zjawisko to obserwowano u tych osób, u których rozwinął się neurogeny obrzęk płuc [135].

1.7.10. Leki przeciwpadaczkowe a proces apoptozy

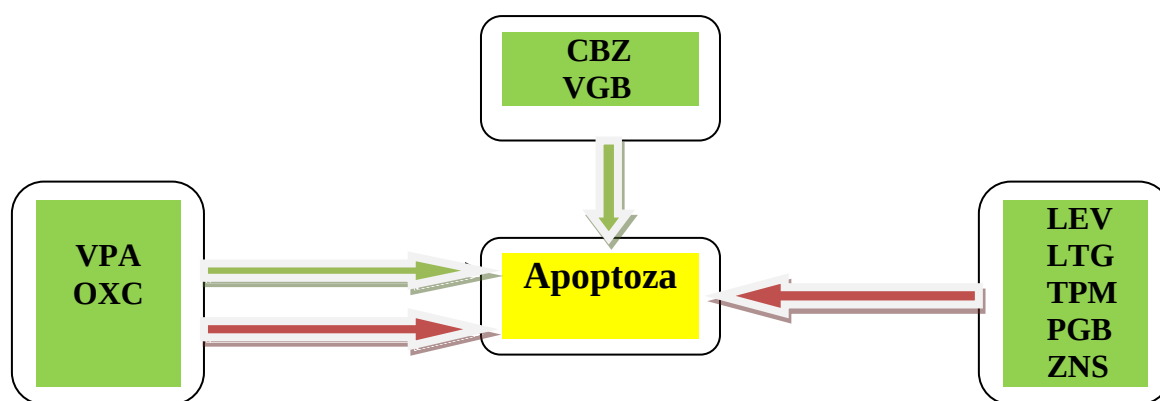
W wielu badaniach na liniach komórkowych oraz na modelach zwierzęcych wykazano, że LPP w zależności od ich rodzaju mogą modulować proces apoptozy.

Dane dotyczące związku VPA z procesem apoptozy są sprzeczne. Wykazano, że VPA może indukować apoptozę w wielu liniach komórek nowotworowych, wykazując potencjalne właściwości leku przeciwnowotworowego, np. w komórkach: raka tarczycy [4], przewlekłej białaczki limfatycznej [136], raka wątrobowokomórkowego [137], raka żołądka [138], raka prostaty [139], glejaka [140,141], raka płuc [142], a także w badaniach *in vitro* i *in vivo* na embrionalnych komórkach mysich [143]. Co ciekawe, w badaniach Zhao i wsp. [2011] wykazano, że VPA uaktywnia głównie szlak wewnętrzny apoptozy, ale również zewnętrzny może ulec wzbudzeniu [144]. Ponadto, uważa się, że za występowanie deficytów poznawczych u dzieci matek stosujących w ciąży VPA, odpowiada wzbudzona apoptoza neuronów i nieprawidłowa synaptogeneza rozwijającego się mózgu [145]. Z drugiej strony istnieje szereg prac wskazujących na możliwy antyapoptotyczny wpływ VPA na komórki nerwowe, wskazując na jego możliwe właściwości neuroprotektoryjne, a więc potencjalną szansę terapii chorób neurodegeneracyjnych. Przykładowo, w zwierzęcym modelu udaru niedokrwionego mózgu, stosowanie VPA prowadziło do zmniejszenia obszaru niedokrwienia oraz deficytu neurologicznego [146], a w niedokrwionych

komórkach siatkówki hamował on szlak wewnętrzny apoptozy [147]. W świetle danych literatury inne LPP SG (CBZ, PHE) wykazują działanie proapoptotyczne [148,149,150]. Natomiast wśród analizowanych LPP NG, OXC wykazywała zarówno działanie pro-, jak i antyapoptotyczne [151,152,153]; TPM, PGB i ZNS głównie antyapoptotyczne oraz neuroprotektoryjne [154,155,156,157,158]. VGB z kolei nasilała apoptozę komórek [159,160], a z kolei LEV i LTG w większości przeprowadzonych badań przeciwdziałały apoptozie. LEV nie powodował apoptozy ludzkich komórek kosmówczaka (choriocarcinoma) [161] oraz neuronów noworodków szczurzych [162]. Natomiast w zwierzęcym modelu chP wykazano neuroprotektoryjne działanie LTG na komórki dopaminergiczne, a w badaniach na szczurzych neuronach hipokampa i kory przedczołowej osłabiała ona proapoptotyczne działanie kwasu kainowego i metamfetaminy [163]. W świetle powyższych badań zasadne wydaje się więc stosowanie właśnie LTG i LEV u kobiet w ciąży oraz w okresie prekonceptyjnym. Wpływ LPP na proces apoptozy przedstawiono na schemacie (Ryc.9.).

Jednak zgodnie z wiedzą autorki, jak dotychczas nie przeprowadzono badań dotyczących wpływu LPP na proces apoptozy u pacjentów chorych na padaczkę pobierających te leki.

Uważa się, że pro- bądź antyapoptotyczny potencjał LPP zależy od rodzaju komórek poddanych ich działaniu, a w przyszłości właściwość ta mogłaby być wykorzystywana zarówno w terapii chorób nowotworowych, jak i neurodegeneracyjnych oraz niedokrwiennych mózgowia. Wymaga to jednak pogłębionych badań.



Ryc.9. Wpływ wybranych LPP na proces apoptozy.

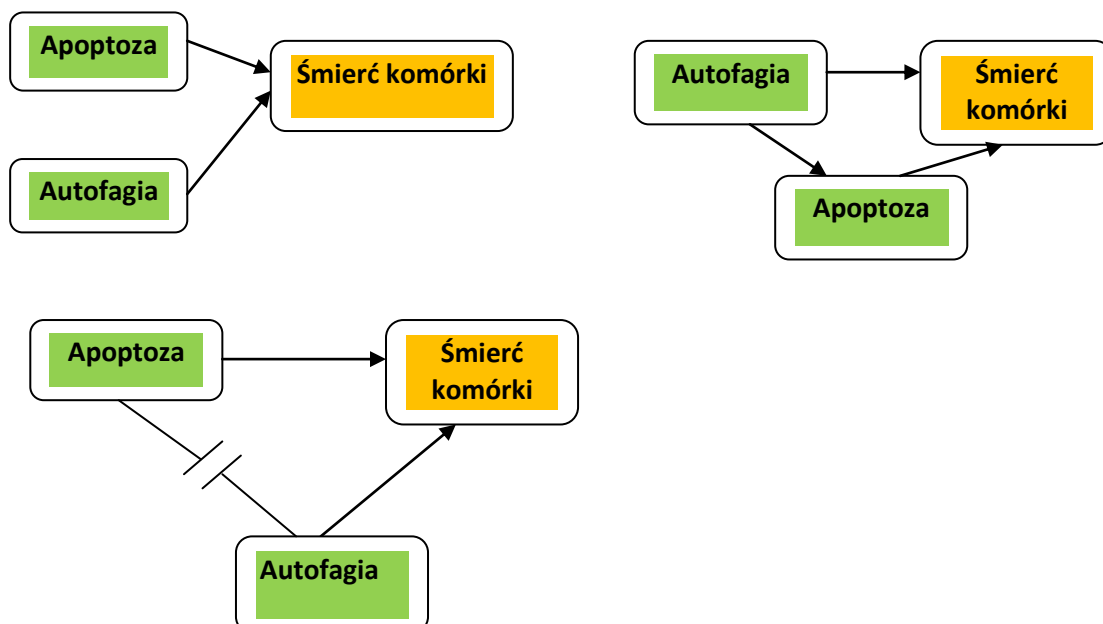
Strzałka zielona– pobudzanie, strzałka czerwona- hamowanie procesu. VPA- kwas walproinowy, OXC- oxkarbazepina, CBZ- karbamazepina, LEV- levetiracetam, LTG- lamotrygina, TPM- topiramat, PGB- pregabalina, ZNS- zonisamid.

1.8. Autofagia

Autofagia jest wysoce konserwatywnym procesem recyklingu komórkowego u Eucaryota, który aktywowany jest czynnikami stresowymi. Degradacji ulegają niepotrzebne, bądź nieprawidłowe białka cytoplazmatyczne, jak też może dochodzić do usuwania całych organelli. W rezultacie uwalnianiu ulegają aminokwasy, kwasy tłuszczowe oraz nukleotydy i zachodzi synteza ATP. W przypadku niedoboru składników odżywczych, autofagia może stanowić strategię przetrwania komórki, ale gdy występuje nadmiernie, może prowadzić do jej śmierci. Stąd zwana jest także typem 2 PCD [164,165,166]. Podobnie do apoptozy, autofagia bierze udział w utrzymaniu homeostazy organizmu poprzez wpływ na metabolizm komórkowy, a nieprawidłowy proces autofagii może przyczyniać się do rozwoju nowotworów, chorób neurodegeneracyjnych oraz do starzenia się.

W komórkach ssaków wyróżniamy 3 typy autofagii, różniące się między sobą sposobem regulacji oraz przemieszczania substratów do lizosomów: makroautofagię, mikroautofagię oraz autofagię związaną z białkami opiekuńczymi (ang. *chaperone-mediated autophagy*) [166]. Makroautofagia jest najlepiej poznana, a proces ten prowadzi do powstawania autofagosomu, jego fuzji z lizosomem oraz następczej degradacji i trawieniu [167].

Związek szlaków apoptozy i autofagii wydaje się być bardzo skomplikowany i nie jest do końca poznany, ale uważa się, że oba procesy mogą być indukowane przez podobne czynniki, mogą współdzielić mechanizmy regulacji, a co więcej, mogą modulować wzajemną aktywność. W określonych warunkach autofagia może stanowić szlak przetrwania komórki hamując apoptozę, w innych może sama prowadzić do śmierci albo współdziałając z apoptozą, przez udział w określonych zmianach morfologicznych i komórkowych, bądź też na drodze niezależnej, gdy apoptoza jest wadliwa [168]. Przykładowo, aktywne kaspazy poza prowadzeniem do śmierci komórki na drodze apoptozy, mogą jednocześnie hamować apoptozę typu 2 przez degradację białek zaangażowanych w jej proces, takich jak: Beclin-1, Atg5 (ang. *autophagy protein 5*) i Atg7 (ang. *autophagy protein 7*), bądź też przez przekształcanie białek proautofagowych w proapoptotyczne [102]. Co ciekawe, w regulację autofagii zaangażowane jest też kluczowe dla apoptozy białko p53, które wraz z białkiem ARF w sytuacji stresu komórkowego pozytywnie reguluje autofagię, a negatywnie, gdy tego stresu brak [169].



Ryc.10. Przykładowe szlaki wzajemnego oddziaływania apoptozy i autofagii. Zmodyfikowano według [168].

1.8.1. LPP a proces autofagii

W kilku badaniach wykazano, że niektóre LPP, takie jak: VPA, CBZ oraz LTG mogą wzmacniać proces autofagii. VPA indukował autofagię w modelu zwierzęcym nefropatii cukrzycowej, zmniejszając uszkodzenia podocytów i komórek nerkowych [170]. Natomiast w modelu zwierzęcym stwardnienia zanikowego bocznego, najprawdopodobniej hamował apoptozę związaną z siateczką wewnątrzplazmatyczną [171]. Z kolei CBZ wzmacniała autofagię neuronów w modelu choroby Alzheimera (chA) i w komórkach wątroby z chorobą spichrzeniową [172,173], a LTG wzbudzała autofagię przez hamowanie szlaku sygnalizacji mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin kinase*) i aktywację szlaku CREB (ang. *cAMP response element-binding protein*) [174]. Powyższe badania dowodzą, że LPP uruchamiając procesy autofagii, mogą prowadzić do eliminacji złogów niepożądanych białek, a przez to do ograniczenia liczby eliminowanych komórek na drodze apoptozy. Może stanowić to interesujący kierunek badań poszukiwania leków na choroby neurodegeneracyjne [171,172].

2. Cel pracy

Celem pracy była analiza częstości występowania polimorfizmów C1236T, C3435T oraz G2677(A/T) genu *ABCB1/MDR1* u pacjentów z padaczką o nieznanej etiologii leczonych LPP, jak również u chorych z tą chorobą neurologiczną przed włączeniem terapii LPP oraz u kontrolnych ochotników w populacji polskiej. U tych osób analizie poddano również stężenie osoczowych biotoli: homocysteiny (Hcy) i metioniny (Met) oraz poziom komórek z aktywnymi kaspazami.

Celem pracy była także analiza korelacji pomiędzy uzyskanymi wynikami badań genetycznych i biochemicznych u chorych z padaczką i u osób kontrolnych.

3. Materiał i metody

3.1. Materiał

3.1.1. Grupy badane

Grupę chorych z rozpoznaną padaczką o nieznanej etiologii (dawniej z padaczką kryptogenną) stanowiło 85 osób w wieku 18-69 lat (średnia wieku $35,8 \pm 13,0$), w tym 38 kobiet w wieku 18-66 lat oraz 47 mężczyzn w wieku od 18-69 lat. Chorzy z padaczką byli hospitalizowani w Klinice Neurologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu lub leczeni w Przyklinicznej Poradni Neurologicznej w latach 2011-2016. Szczegółowe kryteria włączenia oraz wyłączenia z badań zostały przedstawione w tabeli 4.

Wśród badanych chorych z padaczką, 11 osób: 4 kobiety i 7 mężczyzn w wieku od 18 do 65 lat (średnia wieku $33,5 \pm 15,2$ lat) oczekiwało na włączenie leczenia z powodu nowo zdiagnozowanej choroby, natomiast 74 pacjentów: 36 kobiet i 38 mężczyzn w wieku od 18 do 69 lat (średnia wieku $36,1 \pm 12,7$) otrzymywało leczenie różnymi LPP. W grupie chorych z padaczką leczonych LPP 37 osób, co stanowiło 50% pacjentów otrzymywało politerapię i tyle samo leczonych było jednym LPP. Wśród chorych stosujących monoterapię najwięcej osób było leczonych VPA (17 osób tj. 46%), 9 osób czyli 24% otrzymywało CBZ, 1 osoba tj. 3% pobierała PHE, a 10 chorych czyli 27% LPP NG (LTG, OXC, TPM lub LEV). Z kolei wśród osób stosujących politerapię 89% chorych otrzymywało kombinację LPP NG i LPP SG, natomiast 11% LPP NG. W grupie chorych leczonych LPP, 36% badanych przyjmowało LPP przez okres krótszy niż 5 lat, natomiast 64% było leczonych dłużej niż 5 lat.

Wśród osób z padaczką leczonych LPP, chorzy z napadami ogniskowymi stanowili 46% osób, a z napadami uogólnionymi 54%. Natomiast wśród chorych z padaczką przed włączeniem leczenia 44% miało napady ogniskowe, a 56% uogólnione.

U chorych przyjmujących VPA i/lub CBZ średnie stężenia leków utrzymywały się w granicach wartości referencyjnych.

Grupę kontrolnych ochotników stanowiło 84 osoby: 42 kobiety i 42 mężczyzn w wieku od 21 do 66 lat (średnia wieku $33,8 \pm 10,6$). Kryteria włączenia oraz wyłączenia osób kontrolnych z badań zostały przedstawione w tabeli 4.

3.1.2. Kryteria włączenia do badań

Szczegółowe kryteria włączenia i wyłączenia do badań zostały przedstawione w tabeli 4 (Tab.4.).

Tab.4. Szczegółowe kryteria włączenia oraz wyłączenia z badań w grupie badanej i kontrolnej

	Grupa badana	Grupa kontrolna
Kryteria włączenia	• Pisemna zgoda pacjenta • Rozpoznanie padaczki o nieznanym przyczynie (dawniej padaczki kryptogennej) zgodnie z wytycznymi • Rozpoznanie padaczki z napadami ogniskowymi bądź uogólnionymi • Uzyskanie odpowiedniej ilości oraz jakości materiału do badań genetycznych oraz biochemicznych • Wykluczenie innych chorób neurologicznych, cech otępienia, chorób nerek, chorób wątroby • Poziom leukocytów w granicach wartości referencyjnych • Brak pobierania witamin z grupy B oraz kwasu foliowego	• Pisemna zgoda pacjenta • Uzyskanie odpowiedniej ilości materiału do badań genetycznych oraz biochemicznych • Wykluczenie chorób neurologicznych, cech otępienia, chorób nerek, chorób wątroby • Poziom leukocytów w granicach wartości referencyjnych • Brak pobierania witamin z grupy B oraz kwasu foliowego
Kryteria wyłączenia	• Brak pisemnej zgody • Nieodpowiednia ilość i/lub jakość materiału do badań • Rozpoznanie padaczki o etiologii genetycznej bądź strukturalnej/metabolicznej • Rozpoznanie padaczki z napadami o nieznanym początku • Rozpoznanie innych chorób neurologicznych, cech otępienia, chorób wątroby, nerek • Stwierdzenie nieprawidłowego poziomu leukocytów w krwi • Przyjmowanie preparatów witaminy B lub kw. foliowego	• Brak pisemnej zgody • Nieodpowiednia ilość i/lub jakość materiału do badań • Rozpoznanie choroby neurologicznej, cech otępienia, choroby nerek, wątroby • Stwierdzenie nieprawidłowego poziomu leukocytów w krwi • Przyjmowanie preparatów witaminy B lub kw. foliowego

Rodzaj padaczki weryfikowano w oparciu o kryteria i terminologię rekomendowaną przez ILAE opracowaną w 2010 roku [13].

Badanie odbyło się za zgodą Lokalnej Komisji Bioetycznej (uchwała nr146/15).

3.2. Metody

3.2.1. Przygotowanie krwi do badań

Od osób z grupy kontrolnej i chorych z padaczką pobierano ok. 8-10 ml krwi na wersenian potasu (EDTA). Pobraną krew pełną oddzielano do badań genetycznych i biochemicznych. Do badań genetycznych pobraną krew zamrażano w temperaturze -80°C i przechowywano w tych warunkach do czasu izolacji DNA. W celu uzyskania osocza krew wirowano przez 10 min. przy 3000 g i zamrażano w temp. -80°C do dalszej analizy. Jednocześnie w celu oceny poziomu komórek w apoptozie od osób z grupy kontrolnej i chorych z padaczką pobrano ok. 2 ml krwi na heparynę. Próbkę przechowywano w ciemnym miejscu do czasu analizy.

3.2.2. Odczynniki chemiczne

- Inhibitor FAM-VAD-FMK (Immunochemistry Technologies LLC, Bloomington, MN USA)
- Jodek propidyny
- Bufor zawierający chlorek amonu (NH_4Cl)
- Agaroza (Prona)
- Barwnik fluorescencyjny do żeli agarozowych- Simply Safe (EURx)
- Bufor obciążający (Novazym)
- Bufor TBE 10x stężony
- ✓ Tris pH 8,3- 108 g
- ✓ Kwas borowy- 55 g
- ✓ 0,5 M Na_2EDTA pH 8,0-40 ml
- dNTP MIX (Novazym)
- enzymy restrykcyjne- Sau3AI, HaeIII (Thermo Scientific)
- HiFi Taq Polimeraza DNA (Novazym)
- Kit do izolacji DNA- Genomic Micro AX Blood Gravity (A&A Biotechnology)
- Kit do reakcji HRM Real-Time PCR- SsoFastTM EvaGreen® Supermix (Bio-Rad)
- Marker wielkości DNA- Nova 100 bp DNA ladder (Novazym)

- Oligonukleotydy (Oligo, Pracownia Sekwencjonowania DNA IBB PAN)
- Standardy do analizy HPLC: Hcy (Fluka, Niemcy); Met (Sigma, USA)
- TCEP (Tris-(2- carboxylethyl)-phosphin-hydrochlorid, Applichem, Niemcy)
- Kolumna chromatograficzna, Thermo Hypersil BDS C18 (250 mm x 4,6 mm x 5µm, Niemcy)
- 0,15 M bufor fosforanowy o pH 2,9 (Sigma)
- Acetonitryl (Sigma).

3.2.3. Aparatura laboratoryjna

- Zestaw HPLC- pompa P580A (Dionex, Germany) połączona z detektorem elektrochemicznym (CoulArray 5600, ESA, USA)
- Mieszadło magnetyczne
- Cytometr Partec CyFlow® Space (Sysmex Partec GmbH)
- Termocykler CFX Connect Bio-Rad (USA)
- Termocykler MJ Mini Bio-Rad (USA)
- Aparat do elektroforezy poziomej Bio-Rad (USA)
- System dokumentacji żeli Photo Doc UVP (Kanada)
- Wirówka Mini Spin Eppendorf (Niemcy)
- Bio Vortex V1 BIOSAN (Polska)
- Waga analityczna Kern (Niemcy)
- Pipety automatyczne Eppendorf (Niemcy)
- Sprzęt jednorazowy

3.2.4. Analiza wybranych polimorfizmów genu *ABCB1/MDR1* metodą HRM

Izolacja DNA Izolację DNA przeprowadzono metodą grawitacyjną, która opiera się na zastosowaniu kolumnienek z membraną jonowymienną, selektywnie wiążącą kwasy nukleinowe. Wykorzystanie kolumnienek przyczynia się do ograniczenia wirowania i umożliwia wykorzystanie siły grawitacyjnej do izolacji DNA.

Do 100 µl krwi pełnej dodawano 400 µl buforu lizującego w celu lizy komórek oraz 20 µl proteiny K przeznaczonej do degradacji białek. Całość dokładnie mieszano i inkubowano przez 10 minut w temperaturze 50°C. W trakcie inkubacji przygotowywano kolumnę Micro AXD przez zamocowanie jej do próbówki odbieralnikowej, umieszczenie w statywie w pozycji pionowej i

aktywowano przez naniesienie po 500 µl roztworu równoważącego. Po zakończeniu inkubacji, próbkę intensywnie mieszano przez 2 minuty przy 1000 RPM. Etap ten był kluczowy dla wydajności izolacji DNA. Następnie próbkę wirowano w celu usunięcia resztek materiału z wieczka próbówki i наносzono na zrównoważoną uprzednio kolumnę. Czekano 10 minut, aby lizat przepłynął przez kolumnę pod wpływem sił grawitacji i izolowane DNA zostało związane z membraną jonowymienną znajdującą się w kolumnie. Na kolumnę наносzono 600 µl pierwszego roztworu płuczącego w celu dokładnego wymycia zanieczyszczeń lipidowych i czekano aż wypłynie z kolumny. Kolejno dodawano 500 µl drugiego roztworu płuczącego i również czekano, aż wypłynie z kolumny. Po tym czasie dodawano do kolumny 60 µl roztworu elucyjnego w celu zmniejszenia całkowitej objętości eluatu (martwa objętość kolumny wynosi 60 µl) i czekano 5 minut. W trakcie oczekiwania, przygotowywano jałową próbówkę 1,5 ml typu Eppendorf i dodawano na dno 5 µl buforu zobojętniającego w celu zapobiegania degradacji DNA po elucji. Przenoszono kolumny do przygotowanych probówek i eluowano przez 10 minut przez dodanie na złożę kolumny 120 µl roztworu elucyjnego. Na końcu usuwano kolumnę i zamykano próbówkę elucyjną. Wyizolowane w ten sposób DNA przechowywano w zamrażarce w temperaturze -80°C do dalszej analizy.

Analiza HRM Analizę polimorfizmów C1236T, C3435T oraz G2677(A/T) genu *ABCB1/MDR1* przeprowadzono metodą HRM (ang. *High Resolution Melting*, denaturacja DNA z wysoką rozdzielczością), z zastosowaniem starterów wybranych na podstawie danych literatury [83]. W celu identyfikacji analizowanych polimorfizmów, wyizolowane z krwi DNA doprowadzono do równych stężeń (około 15 ng/µl) i dodawano mieszaninę reakcyjną o składzie przedstawionym w tabeli 5 oraz sekwencję starterów prezentowaną w tabeli 6. W kolejnym etapie DNA amplifikowano metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, ang. *polymerase chain reaction*) w obecności barwnika fluorescencyjnego EvaGreen interkalującego do dwuniciowej cząsteczki DNA. Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 10 µl. Temperaturę przyłączania starterów ustalono przez przeprowadzenie reakcji PCR w gradiencie temperaturowym.

Tab.5. Skład mieszaniny reakcyjnej wykorzystanej w analizie polimorfizmów *ABCB1/MDR1* C1236T, C3435T oraz G2677(A/T) metodą HRM

Składnik	Stężenie końcowe	Objętość [µl]
SsoFast TM EvaGreen® Supermix	-	5
Starter F	2,5 µM	1
Starter R	2,5 µM	1
Woda	-	1
DNA	15 ng/µl	2
Objętość końcowa	-	10

W poniższej tabeli przedstawiono sekwencje starterów dla analizowanych polimorfizmów genu *ABCB1/MDR1* (Tab.6.).

Tab.6. Sekwencje starterów dla polimorfizmów *ABCB1/MDR1* C1236T, C3435T oraz G2677(A/T), temperatura ich przyłączania oraz długość uzyskanego produktu

Polimorfizm	Sekwencja startera	Temperatur a wiązania starterów [°C}	Długość produktu [pz]
C1236T F C1236T R	5'-TTTTTCTCACGGTCCTGGTAG-3' 5'-CATCCCCTCTGTGGGGTCATA-3'	59	147
C3435T F C3435T R	5'-TTGATGGCAAAGAAATAAAGC-3' 5'-CTTACATTAGGCAGTGAAGTCG-3'	59	207
G2677G F G2677G R G2677T R G2677A R	5'-TACCCATCATTGCAATAGCAG-3' 5'-TTTAGTTTGACTCACCTTGCTAG-3' 5'-TTTAGTTTGACTCACCTTTCTAG-3' 5'-TTTAGTTTGACTCACCTTCCC-3'	57	107

Reakcje PCR/HRM prowadzono w następujących warunkach:

- Denaturacja wstępna: 95°C, 30 s;
- Amplifikacja (45 cykli);
 - Denaturacja: 95°C, 10 s,
 - Wiązanie starterów i elongacja 59°C /57°C przez 30 s;
- HRM- topnienie produktu i analiza krzywej topnienia: 30 s, 95°C , obniżenie temperatury do 60°C, a następnie stopniowy wzrost do 95°C z cyklicznym pomiarem zmniejszającej się florescencji co 0,2°C

W wyniku przeprowadzenia powyższych reakcji uzyskano krzywe topnienia pozwalające na identyfikację genotypów. Otrzymane wyniki potwierdzano sekwencjonowaniem.

3.2.5. Oznaczenie poziomu komórek apoptotycznych

Analizę poziomu komórek apoptotycznych wykonano metodą cytometrii przepływowej, przez identyfikację komórek wykazujących obecność aktywnych kaspaz (m.in. kaspazy-3, -6, -7). Posłużono się badaniem wykorzystującym znakowane fluorochromem inhibitory kaspaz, FLICA (ang. *Fluorochrome Labeled Inhibitors of Caspases*). FLICA są ligandami posiadającymi fragment fluorometylketonowy (FMK) sprzężony z karboksyfluoresceiną (FAM). Dzięki obecności fragmentu

ketonowego dochodzi do permeabilizacji błony i penetracji FLICA do wnętrza komórki. Część FMK odpowiada również za nieodwracalne, kowalencyjne wbudowywanie się inhibitora do centrum aktywnego kaspaz. W badaniach posłużono się inhibitorem FAM-VAD-FMK (Immunochemistry Technologies LLC, Bloomington, MN USA) rozpoznawanym przez różne typy aktywnych kaspaz. Jednocześnie niezwiązany inhibitor FLICA usuwano z komórek pozbawionych aktywnych kaspaz za pomocą buforu płuczącego. Wyznakowaniu ulegały zatem wyłącznie komórki, w których doszło do aktywacji kaspaz. Równocześnie te same próbki były poddawane barwieniu jodkiem propidyny (PI), który jest fluorochromem niezdolnym do przenikania przez błony żywych komórek, ale zdolnym do penetracji komórek martwych lub uszkodzonych i interkalującym między zasady DNA i RNA. Dzięki temu dokonano identyfikacji czterech rodzajów komórek (Ryc.17.B.): 1- komórki żywe niewybarwione (FAM-/PI-), 2- komórki na wczesnym etapie apoptozy (FAM+/PI-), 3- komórki na późnym etapie apoptozy (FAM+/PI+) oraz 4- komórki martwicze (FAM-/PI+). Barwienia prowadzone były na próbkach krwi pełnej, poddawanych działaniu buforu zawierającego chlorek amonu (NH_4Cl) lizujący krwinki czerwone. Pomiarów cytometrycznych dokonano za pomocą cytometru Partec CyFlow® Space (Sysmex Partec GmbH). Do analizy komórek w apoptozie wykorzystano program FloMax 3.0 (Sysmex Partec GmbH).

3.2.6. Analiza stężenia osoczowej homocysteiny i metioniny

Przygotowanie próbek. Analizowane związki tiolowe i odpowiednie standardy (Hcy i Met) rozcieńczano wodą w stosunku 2:1 i redukowano za pomocą 1% TCEP w stosunku 1:9. W celu odbiałczenia próbek dodano 1 M HClO_4 w stosunku 2:1 i podawano je do układu HPLC/EC (z ang. *High Pressure Liquid Chromatography/Electrochemical Detection*, wysokosprawną chromatografię cieczową z detekcją elektrochemiczną). Analizę przeprowadzono według krzywej jednopunktowej. Standardy przygotowano w rozcieńczeniach 30 μM dla Hcy oraz 60 μM dla Met.

Oznaczanie stężenia analizowanych biotioili. Próbkę podawano do układu HPLC (P580A, Dionex, Niemcy) połączonego z detektorem elektrochemicznym (CoulArray 5600, ESA, USA). Analizę przeprowadzano na kolumnie Thermo Hypersil BDS C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μm) w warunkach izokratycznych używając jako fazę ruchomą 0,15 M bufor fosforanowy o pH 2,9 z dodatkiem 17% acetonitrylu. Do sterowania układem, zbierania i obróbki danych użyto oprogramowania Chromeleon (Dionex, Niemcy).

3.3. Analiza statystyczna wyników

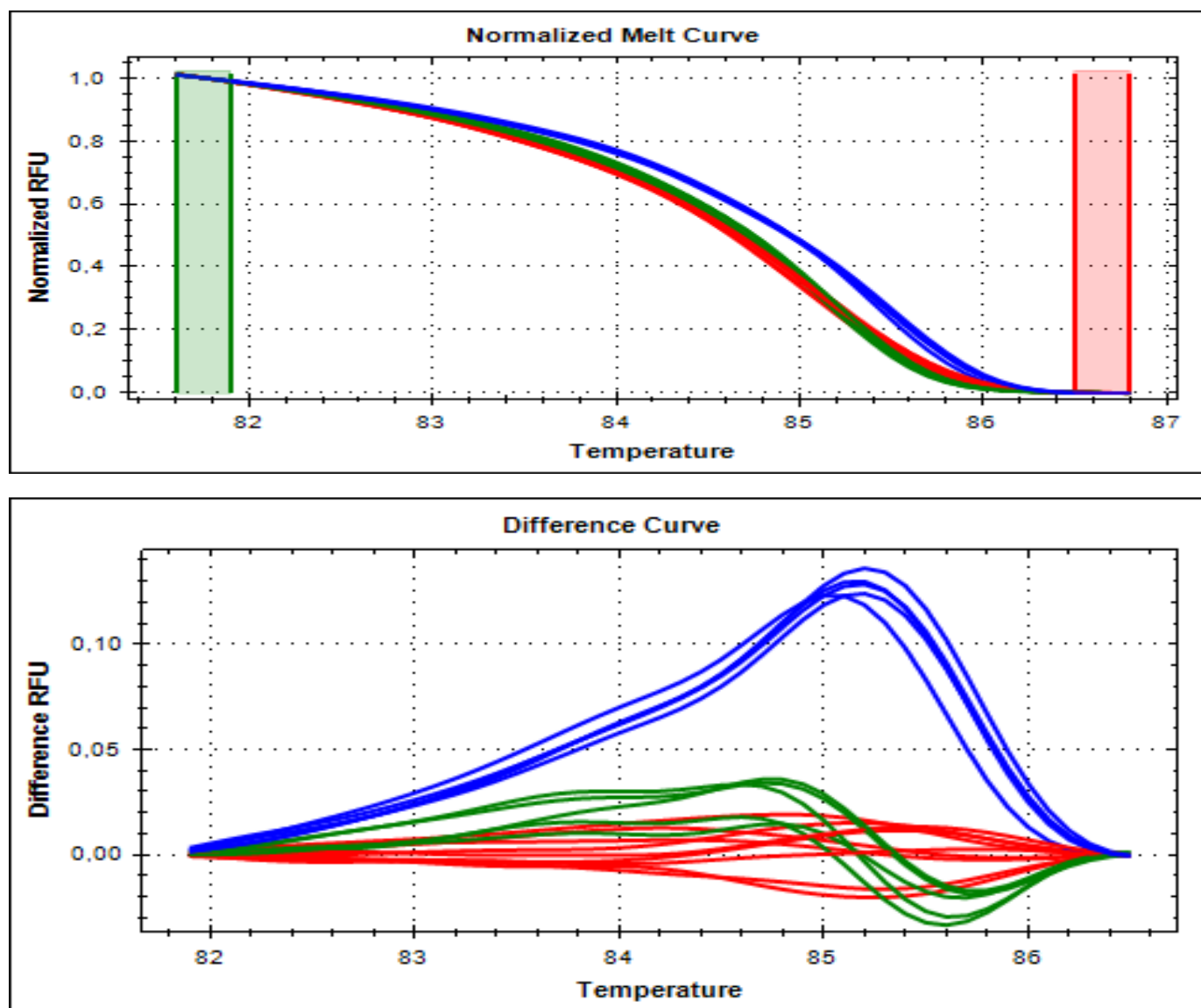
Uzyskane wyniki badań analizowano za pomocą testów nieparametrycznych Manna-Whitney'a oraz Kruskala-Wallisa dla zmiennych niepowiązanych. Korelacje pomiędzy uzyskanymi wynikami oceniano testem Spearmana. Do oceny częstości występowania genotypów użyto dokładnego testu Fishera i χ^2 . Dla zastosowanych testów statystycznych przyjęto poziom istotności $\alpha = 0,05$. Do oceny statystycznej wyników użyto oprogramowania Statistica for Windows (StatSoft, USA) oraz GraphPad (Instat, USA).

4. Wyniki

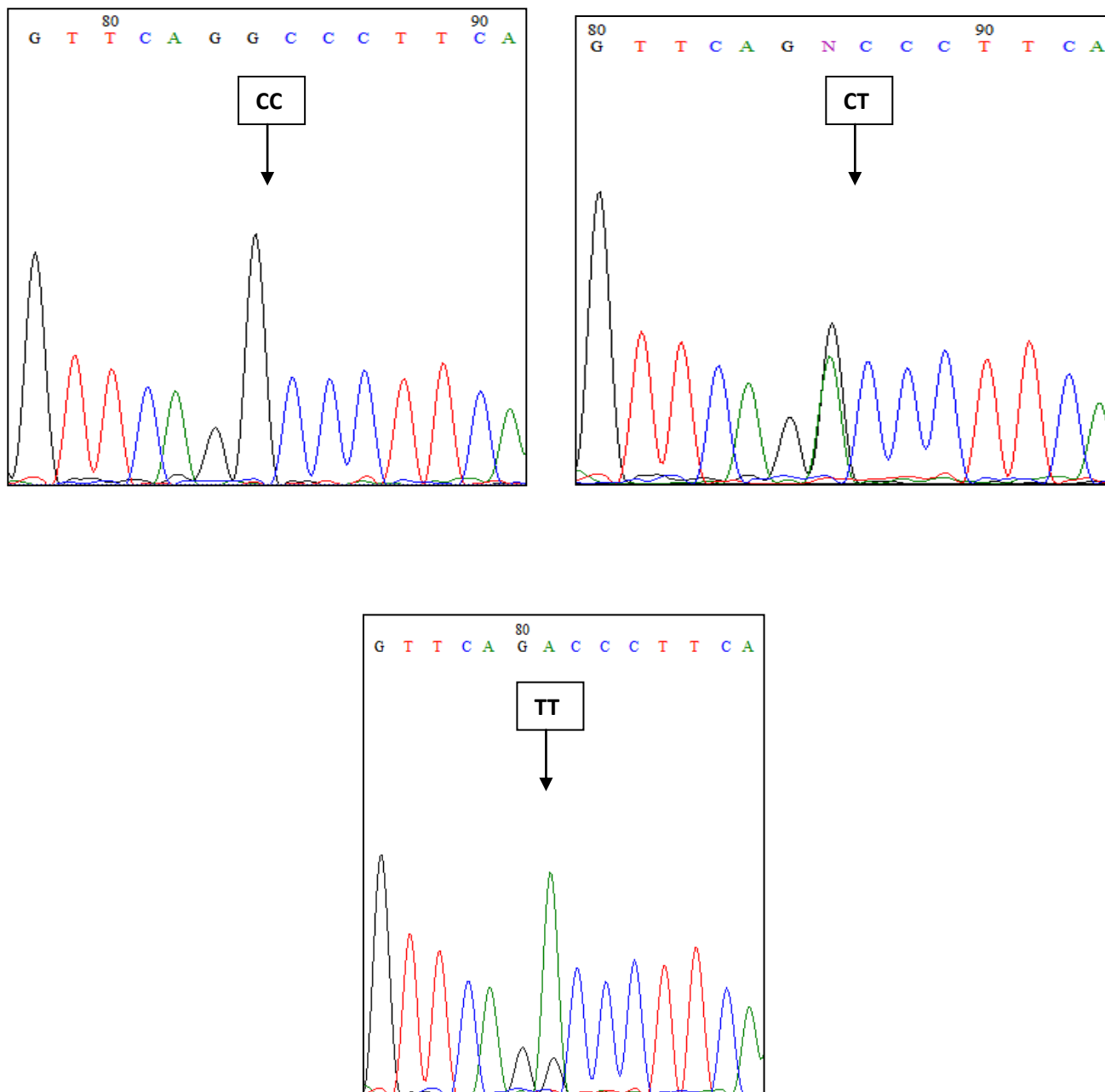
Badaniu poddano częstość występowania genotypów trzech polimorfizmów genu *ABCB1/MDR1*: C1236T, C3435T oraz G2677(A/T) u chorych na padaczkę leczonych LPP w monoterapii (VPA, CBZ, NG) i w politerapii (NG, SG+NG), przed włączeniem LPP oraz w grupie kontrolnej. U tych osób przeprowadzono również analizę stężenia osoczowych biotioili: homocysteiny (Hcy) i metioniny (Met) oraz oznaczono poziom komórek z aktywnymi kaspazami (komórki w apoptozie).

4.1. Analiza polimorfizmu C1236T genu *ABCB1/MDR1*

W wyniku przeprowadzonej analizy metodą HRM potwierdzonej sekwencjonowaniem wykazano obecność trzech genotypów *ABCB1/MDR1* C1236T: CC, CT, TT. Przykładowe wyniki pokazano na poniższych rycinach (Ryc. 11-12.).



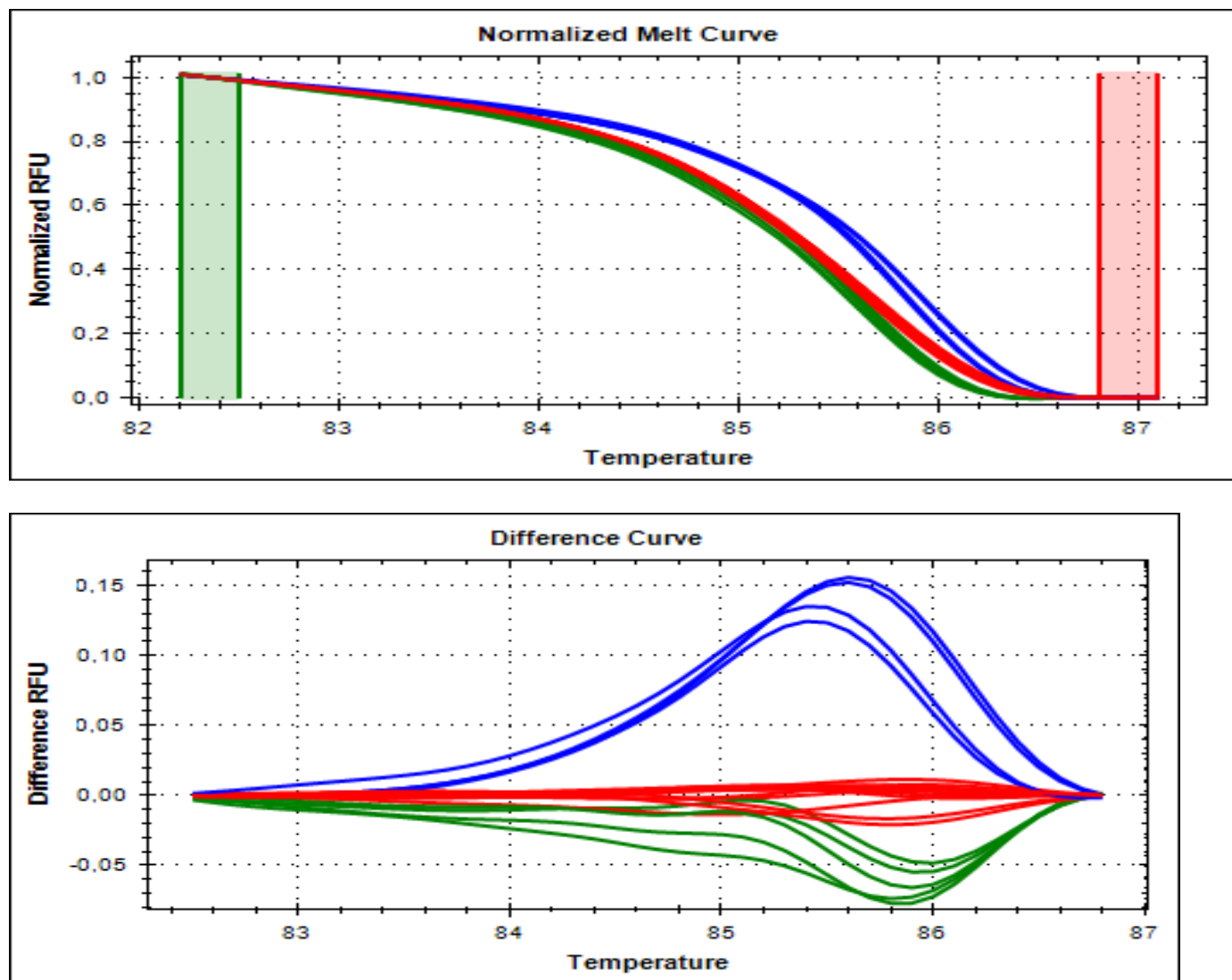
Ryc.11. Przykładowe wyniki analizy HRM dla polimorfizmu C1236T genu *ABCB1/MDR1*. Krzywa w kolorze niebieskim odpowiada genotypowi CC, czerwona - CT, zielona – TT



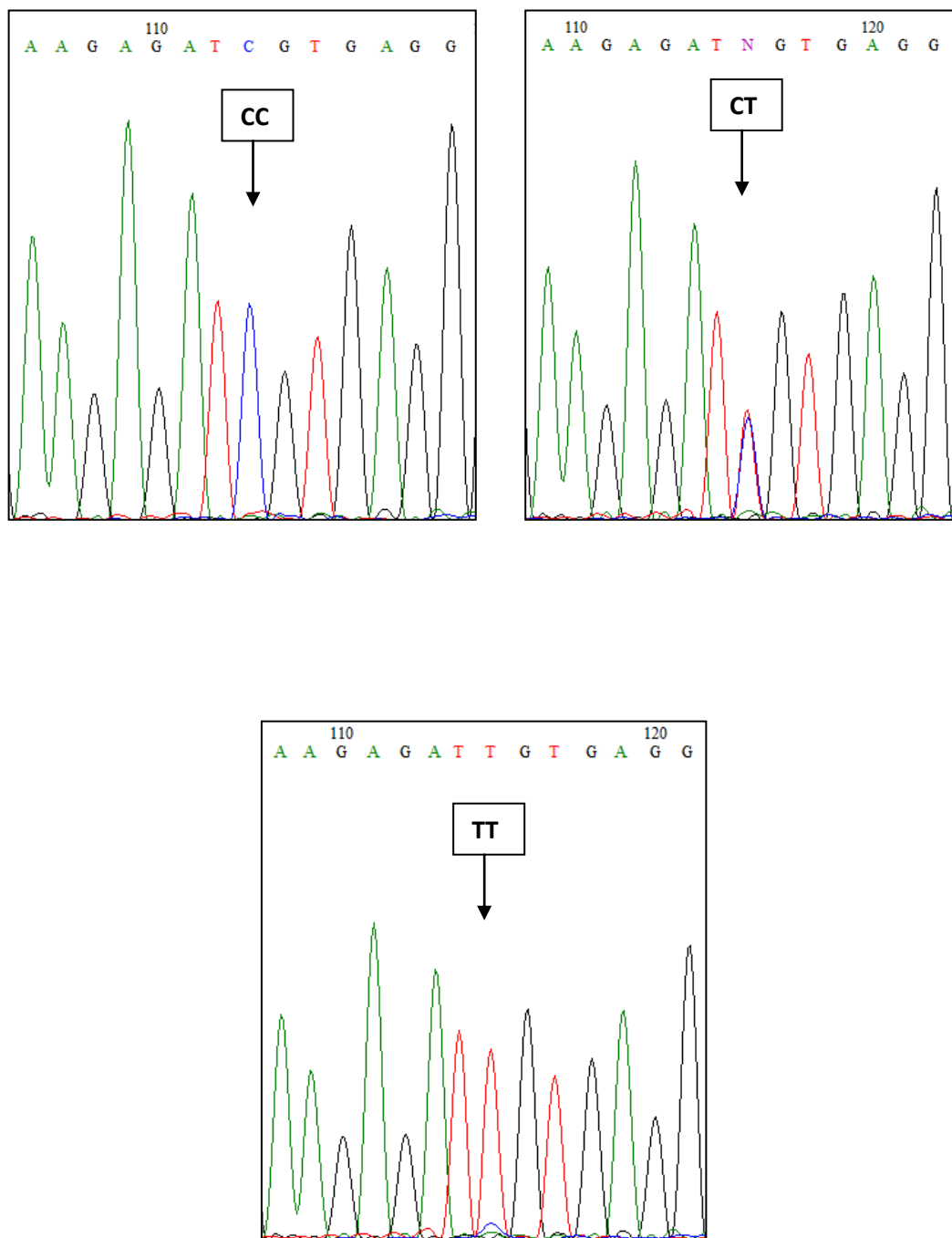
Ryc.12. Przykładowe fluorogramy uzyskane w wyniku sekwencjonowania eksonu 12 genu *ABCB1/MDR1*. Odczyt względem startera reverse, komplementarnego do nici zstępującej. Strzałkami oznaczono genotypy polimorfizmu C1236T.

4.2. Analiza polimorfizmu C3435T genu *ABCB1/MDR1*

Analiza metodą HRM potwierdzona sekwencjonowaniem wykazała obecność trzech genotypów *ABCB1/MDR1* C3435T: CC, CT oraz TT. Przykładowe wyniki pokazano na poniższych rycinach (Ryc. 13-14.).



Ryc.13. Przykładowe wyniki analizy HRM dla polimorfizmu C3435T genu *ABCB1/MDR1*. Krzywa w kolorze niebieskim odpowiada genotypowi CC, czerwona - CT, zielona – TT

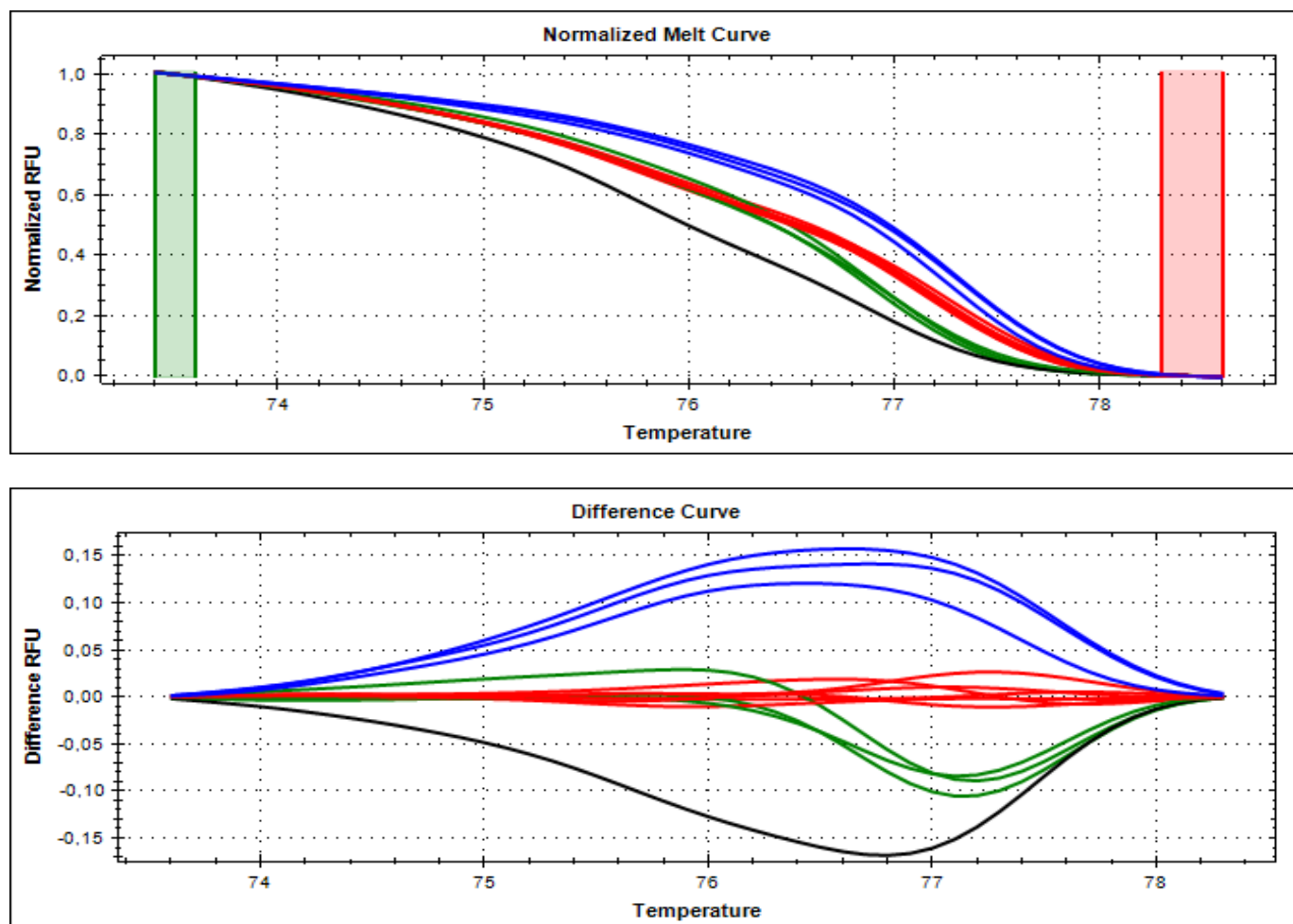


Ryc.14. Przykładowe fluorogramy uzyskane w wyniku sekwencjonowania eksonu 26 genu *ABCB1/MDR1*. Strzałkami oznaczono genotypy polimorfizmu C3435T.

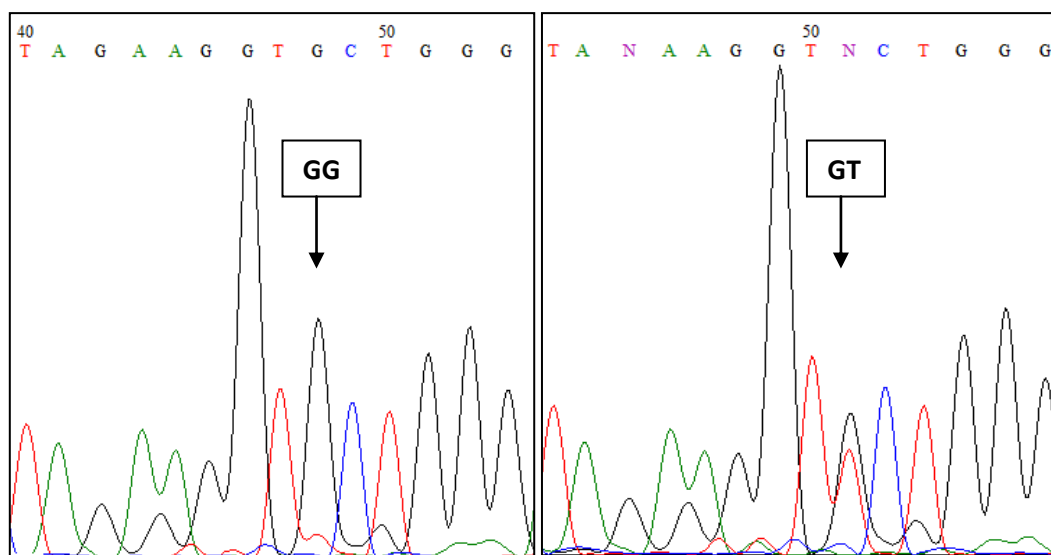
4.3. Analiza polimorfizmu G2677(A/T) genu *ABCB1/MDR1*

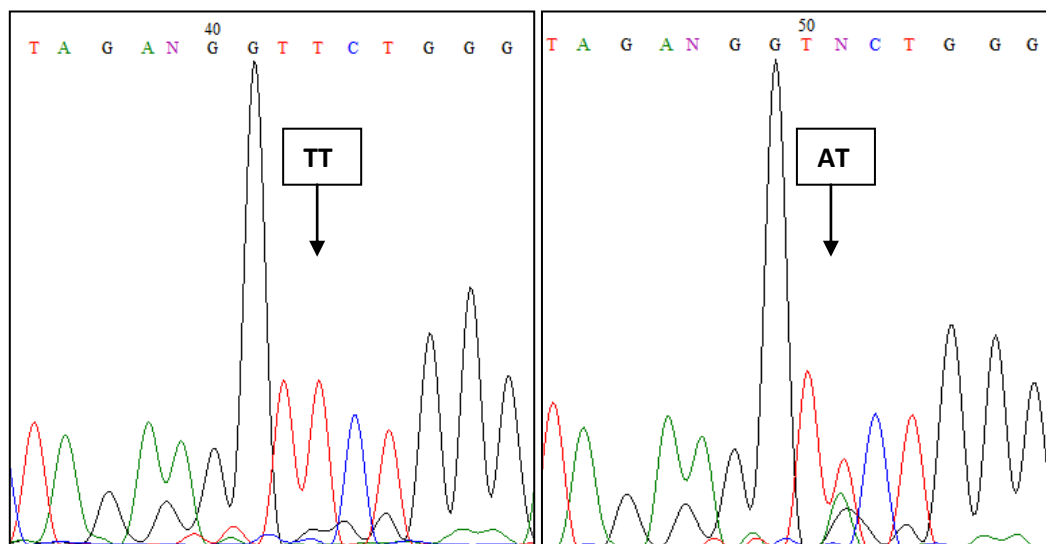
W przypadku ostatniego z analizowanych polimorfizmów G2677(A/T) genu *ABCB1/MDR1* metodą HRM potwierdzoną sekwencjonowaniem wykazano obecność czterech genotypów: GG, GT, TT, AT. Natomiast nie wykazano obecności genotypu GA oraz AA u żadnej z poddanych badaniu osób.

Przykładowe wyniki analizy HRM oraz sekwencjonowania przedstawiono na poniższych rycinach (Ryc. 15-16.).



Ryc.15. Przykładowe wyniki analizy HRM dla polimorfizmu G2677(A/T) genu *ABCB1/MDR1*. Krzywa w kolorze niebieskim odpowiada genotypowi GG, czerwona - GT, zielona - TT, czarna - AT.





Ryc.16. Przykładowe fluorogramy uzyskane w wyniku sekwencjonowania eksonu 21 genu *ABCB1/MDR1*. Strzałkami oznaczono genotypy polimorfizmu G2677(A/T).

4.4. Analiza częstości występowania polimorfizmów C1236T, C3435T oraz G2677(A/T) genu *ABCB1/MDR1*

Częstość występowania poszczególnych genotypów analizowanych polimorfizmów genu *ABCB1/MDR1* przedstawiono w poniższej tabeli (Tab.7.)

Tab.7. Lokalizacja i częstość występowania polimorfizmów genu *ABCB1/MDR1*: C1236T, C3435T oraz G2677(A/T) u chorych na padaczkę i u osób z grupy kontrolnej

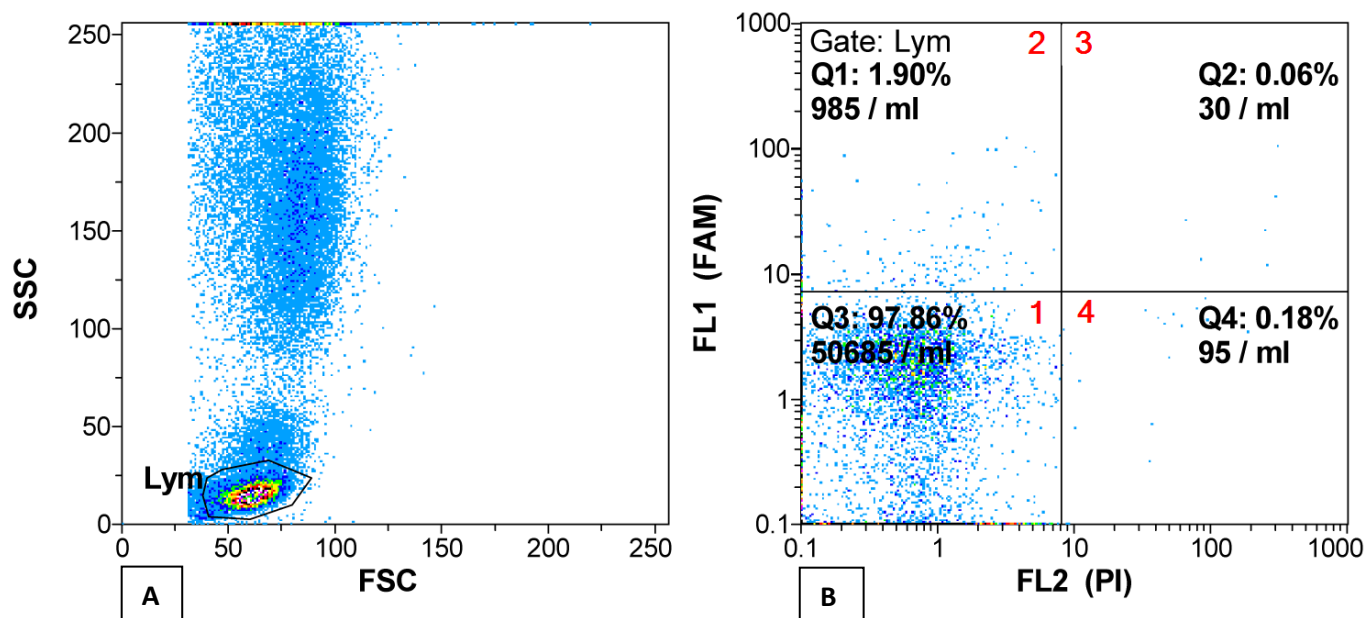
Gen/ Wariant genetyczny	Genotypy	Kontrola N/ [%]	Padaczka N/ [%]	p
<i>ABCB1/MDR1</i> C1236T	CC	26/ [33%]	21/ [31%]	0,7519
	CT	46/ [59%]	34/ [50%]	0,8107
	TT	6 / [8 %]	13/ [19%]	0,0806
<i>ABCB1/MDR1</i> C3435T	CC	11 / [14%]	16/ [23%]	0,1686
	CT	60 / [77%]	43/ [61%]	0,1038
	TT	7/ [9%]	11/ [16%]	0,9011
<i>ABCB1/MDR1</i> G2677(A/T)	GG	15/ [22%]	13/ [19%]	0,6709
	GT	41/ [61%]	38/ [56%]	0,8780
	TT	11/ [17%]	16/ [24%]	0,3407
	AT	0 [0%]	1 [1%]	
	GA	0/[0%]	0/ [0%]	
	AA	0/[0%]	0/[0%]	

N- liczba osób. Użyto dokładnego testu Fishera i χ^2 .

W wyniku przeprowadzonych badań (Tab.7.) zaobserwowano tendencję, bliską istotności statystycznej do ponad 2-krotnie większej częstości występowania nieprawidłowego homozygotycznego genotypu TT C1236T genu *ABCB1/MDR1* u pacjentów z padaczką w porównaniu z grupą kontrolną. Jednocześnie w przypadku tego polimorfizmu, u chorych na padaczkę genotyp prawidłowy homozygotyczny CC i heterozygotyczny CT wykazywał tendencję do obniżenia częstości. Z kolei w przypadku polimorfizmu C3435T zarówno u chorych na padaczkę, jak i w grupie kontrolnej najczęściej występował heterozygotyczny genotyp CT, najrzadziej natomiast homozygotyczny nieprawidłowy wariant genetyczny TT. Ponadto, u chorych na padaczkę jedynie genotyp heterozygotyczny CT C3435T wykazywał tendencję do mniejszej częstości występowania w porównaniu z osobami kontrolnymi. Analizując polimorfizm G2677(A/T) wykazano, że najczęściej zarówno w grupie kontrolnej, jak i u chorych na padaczkę występował genotyp heterozygotyczny GT, natomiast najrzadziej występującym genotypem w przypadku grupy kontrolnej był nieprawidłowy homozygotyczny genotyp TT, a u chorych na padaczkę prawidłowy homozygotyczny genotyp GG. W przypadku tego polimorfizmu jedynie u jednej osoby chorej na padaczkę wykazano obecność genotypu AT. W przebadanej populacji nie wykazano obecności genotypów AA i GA G2677(A/T).

4.5. Analiza stężenia Hcy i Met oraz poziomu komórek z aktywnymi kaspazami u chorych na padaczkę leczonych LPP [LPP(+)], u chorych przed włączeniem LPP [LPP(-)] oraz u osób z grupy kontrolnej

Analizie poddano również wybrane czynniki apoptotyczne, osoczowe biotiole: Hcy i Met oraz komórki z aktywnymi kaspazami w limfocytach krwi obwodowej. Przykładowe wyniki analizy poziomu komórek apoptotycznych przedstawiono poniżej (Ryc.17).



Ryc.17. A: Obraz próbki leukocytów krwi obwodowej z wybramkowaną populacją limfocytów (Lym). **B:** Wiązanie znacznika FLICA i jodku propidyny przez limfocyty: 1-komórki żywe, 2-wczesna apoptoza, 3- późna apoptoza, 4-martwica

FL1- intensywność fluorescencji FAM, FL2- intensywność fluorescencji PI

FSC – rozproszenie czołowe, ang. *forward scatter*, SSC – rozproszenie boczne, (ang. *side scatter*),

FAM – karboksylfluoresceina, (ang. *carboxyfluorescein*),

PI – jodek propidyny, (ang. *propidium iodide*).

Wyniki analizy stężenia Hcy, Met i poziomu komórek apoptotycznych u osób poddanych badaniu przedstawiono w tabeli 8 i na poniższym wykresie (Ryc.18.).

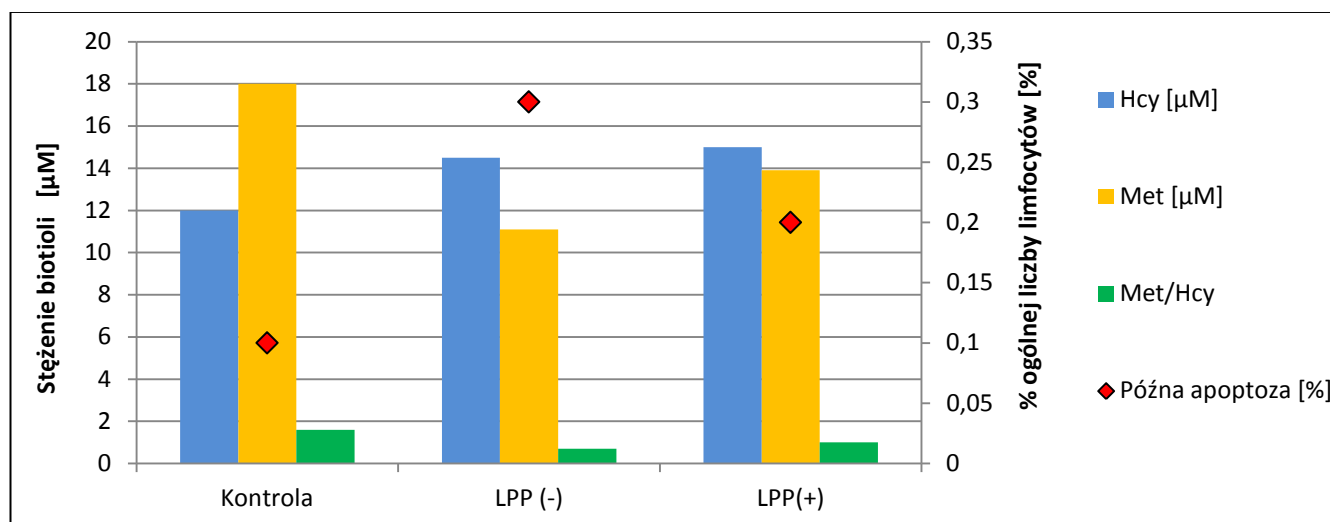
Tab.8. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek apoptotycznych u chorych na padaczkę LPP(+) i LPP(-) oraz u osób kontrolnych

Parametry	Kontrola	Padaczka		p
		LPP (-)	LPP(+)	
Hcy [μM]	12,0± 3,5	14,5 ±2,5*	15,0 ± 7,5**	0,0017
Met [μM]	18,0 ± 6,0	11,1 ±6,8*	13,9 ± 7,0***	0,0001
Met/Hcy	1,6± 0,7	0,7± 0,5***	1,0 ±0,6***	<0,0001
Wczesna apoptoza [%]	1,1± 0,7	0,7± 0,5	1,2± 1,1	0,1920
Późna apoptoza [%]	0,1± 0,1	0,3± 0,3	0,2± 0,2*	0,0243
Σ apoptoza [%]	1,3± 0,7	1,0± 0,7	1,5± 1,1	0,2656

Średnia ± SD. Poziom komórek z aktywnymi kaspazami przedstawiono jako % ogólnej liczby limfocytów.

Użyto testu Kruskala-Wallisa. Statystycznie istotne różnice przy poziomie istotności: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 w porównaniu z kontrolą.

Ryc.18. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek apoptotycznych u chorych na padaczkę LPP(+) i LPP(-) oraz u osób kontrolnych



Średnia $\pm$ SD. Poziom komórek z aktywnymi kaspazami przedstawiono jako % ogólnej liczby limfocytów.

W wyniku przeprowadzonych badań, u osób z padaczką zarówno przed włączeniem leczenia LPP, jak i pobierających LPP (Tab.8., Ryc.18.) zaobserwowano statystycznie istotny wzrost stężenia Hcy w porównaniu do osób kontrolnych (test Kruskala-Wallisa, odpowiednio: $p < 0,01$ i $p < 0,05$). Ponadto, u osób z padaczką pobierających LPP i oczekujących na włączenie LPP zauważono istotne statystycznie obniżenie stężenia Met (test Kruskala-Wallisa, odpowiednio: $p < 0,001$ i $p < 0,05$ w porównaniu z kontrolą) oraz istotny statystycznie spadek poziomu stosunku Met/Hcy (test Kruskala-Wallisa, $p < 0,001$ w porównaniu z kontrolą). Natomiast, biorąc pod uwagę poziom komórek apoptotycznych, zauważono tendencję do wzrostu poziomu komórek w późnej apoptozie u wszystkich badanych pacjentów z padaczką [LPP(+) i LPP(-)], ale tylko u pacjentów otrzymujących LPP uzyskano istotność statystyczną (test Kruskala-Wallisa, $p < 0,05$ w porównaniu z kontrolą). Natomiast, zarówno w przypadku komórek we wczesnej apoptozie, jak i całkowitej liczby komórek z aktywnymi kaspazami, tendencja do wzrostu poziomu komórek apoptotycznych występowała jedynie u osób chorych na padaczkę leczonych LPP w porównaniu z osobami kontrolnymi.

Jednocześnie analizowano korelacje pomiędzy uzyskanymi wynikami w badaniach biochemicznych, zarówno u chorych z padaczką, jak i osób kontrolnych (Tab.9.).

Tab.9. Statystycznie istotne różnice w teście Spearmana w grupie chorych na padaczkę LPP(-) i LPP(+) oraz w grupie kontrolnej

Kontrola	Współczynnik R Spearmana	P
Hcy i Met/Hcy	-0,5904	<0,0001
Met i Met/Hcy	+0,7189	<0,0001
Wczesna apoptoza i późna apoptoza	+0,3152	0,0049
Wczesna apoptoza i całkowita apoptoza	+0,9666	<0,0001
Późna apoptoza i całkowita apoptoza	+0,4869	<0,0001

Chorzy na padaczkę LPP (-)	Współczynnik R Spearmana	P
Hcy i wczesna apoptoza	-0,6073	0,0475
Hcy i całkowita apoptoza	-0,6196	0,0420
Met i Met/Hcy	+0,9263	<0,0001
Wczesna apoptoza i późna apoptoza	+0,5959	0,0530
Wczesna apoptoza i całkowita apoptoza	+0,9613	0,0001
Późna apoptoza i całkowita apoptoza	+0,7159	0,0133

Chorzy na padaczkę LPP+	Współczynnik R Spearmana	P
Hcy i Met	+0,4616	0,0001
Hcy i Met/Hcy	-0,2939	0,0184
Hcy i późna apoptoza	+0,3473	0,0004
Met i Met/Hcy	+0,6444	<0,0001
Met/Hcy i późna apoptoza	-0,2992	0,0265
Wczesna apoptoza i późna apoptoza	+0,4237	0,0013
Wczesna apoptoza i całkowita apoptoza	+0,9814	<0,0001

U osób kontrolnych w teście Spearmana wykazano ujemną korelację pomiędzy stężeniem Hcy a poziomem stosunku Met/Hcy (R Spearmana -0,5904, $p < 0,0001$). Zależność ta była zachowana również u chorych na padaczkę leczonych LPP (R Spearmana -0,2939, $p < 0,05$), ale nie obserwowano jej u chorych oczekujących na włączenie terapii tymi lekami. Jednocześnie zarówno w grupie kontrolnej, jak i w grupie chorych na padaczkę niezależnie od stosowania leczenia [LPP(+) lub LPP(-)], zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy stężeniem Met a poziomem stosunku Met/Hcy [R Spearmana +0,7189, $p < 0,0001$ w grupie kontrolnej; R Spearmana +0,9263, $p < 0,0001$, LPP(-); R Spearmana +0,6444, $p < 0,0001$, LPP(+)]. Ponadto, we wszystkich analizowanych grupach wykazano dodatnią korelację pomiędzy poziomem komórek we wczesnej i późnej apoptozie oraz we wczesnej i całkowitej apoptozie (w grupie kontrolnej odpowiednio: R Spearmana +0,3152, $p < 0,01$; R Spearmana +0,9666, $p < 0,0001$; w grupie chorych na

padaczkę, (LPP-): R Spearmana +0,5959, $p=0,0530$, R Spearmana +0,9613, $p<0,001$; w przypadku LPP(+): R Spearmana +0,4237, $p<0,01$, R Spearmana +0,9814, $p<0,0001$). Jednocześnie w grupie kontrolnej zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy poziomem komórek w późnej apoptozie a całkowitej apoptozie (R Spearmana +0,4869, $p<0,0001$), która była zachowana również u chorych na padaczkę przed włączeniem LPP (R Spearmana +0,7159, $p<0,05$). Ponadto, u chorych na padaczkę przed włączeniem LPP(-) wykazano ujemną korelację zarówno pomiędzy stężeniem Hcy a poziomem komórek we wczesnej apoptozie (R Spearmana -0,6073, $p<0,05$), jak też pomiędzy stężeniem Hcy a całkowitym poziomem komórek apoptotycznych (R Spearmana -0,6196, $p<0,05$). Jednocześnie, stosowanie LPP u chorych na padaczkę prowadziło do pojawienia się dodatkowych dodatnich korelacji pomiędzy stężeniem Hcy i stężeniem Met (R Spearmana +0,4616, $p<0,001$) oraz stężeniem Hcy a poziomem komórek w późnej apoptozie (R Spearmana +0,3473, $p<0,001$) oraz ujemnej zależności pomiędzy poziomem stosunku Met/Hcy i poziomem komórek w późnej apoptozie (R Spearmana -0,2992, $p<0,05$).

4.6. Analiza stężenia Hcy i Met oraz poziomu komórek z aktywnymi kaspazami w zależności od genotypów genu *ABCB1/MDR1*: C1236T, C3435T, G2677(A/T) u chorych z padaczką leczonych LPP(+) oraz u osób z grupy kontrolnej

Analizie poddano poziom wybranych czynników apoptotycznych w zależności od oznaczonego wariantu genetycznego genu *ABCB1/MDR1* u chorych na padaczkę leczonych LPP i osób kontrolnych.

Tab.10. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek apoptotycznych w zależności od genotypów *ABCB1/MDR1* C1236T u chorych na padaczkę leczonych LPP(+) i w grupie kontrolnej

Parametry	Kontrola			Padaczka LPP(+)			P
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	
Hcy [μ M]	12,0 $\pm$ 3,8	11,8 $\pm$ 3,0	14,1 $\pm$ 5,8	12,1 $\pm$ 4,2	13,2 $\pm$ 3,7	20,0 $\pm$ 15,5	0,4348 0,0709 0,2280
Met [μ M]	20,02 $\pm$ 6,0	16,6 $\pm$ 5,7	19,6 $\pm$ 6,4	11,7 $\pm$ 7,4***	12,4 $\pm$ 6,6**	17,0 $\pm$ 6,6	0,0003 0,0015 0,3445
Met/Hcy	1,8 $\pm$ 0,8	1,5 $\pm$ 0,6	1,6 $\pm$ 0,9	1,0 $\pm$ 0,8***	1,0 $\pm$ 0,5***	1,1 $\pm$ 0,5	0,0005 0,0002 0,1361
Wczesna apoptoza [%]	0,9 $\pm$ 0,5	1,3 $\pm$ 0,8	1,1 $\pm$ 0,4	0,9 $\pm$ 0,7	0,9 $\pm$ 0,7*	2,3 $\pm$ 2,1*	0,2917 0,0234 0,0466
Późna apoptoza [%]	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,2	0,1741 0,1711 0,0637
Σ apoptoza [%]	1,1 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,9	1,2 $\pm$ 0,4	1,2 $\pm$ 0,9	1,1 $\pm$ 0,8	2,6 $\pm$ 2,1*	0,4031 0,0567 0,0466

Średnia $\pm$ SD. Poziom komórek z aktywnymi kaspazami przedstawiono jako % ogólnej liczby limfocytów.

Użyto testu Manna-Whitney'a. Statystycznie istotne różnice przy poziomie istotności: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 w porównaniu z kontrolą.

Uwzględniając polimorfizm *ABCB1/MDR1* C1236T (Tab.10.) zaobserwowano tendencję do wzrostu stężenia Hcy w przypadku wszystkich analizowanych genotypów, z największą jego wartością w przypadku genotypu homozygotycznego TT u pacjentów z padaczką leczonych LPP (wartość odpowiadająca łagodnej hHcy) w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast stężenie Met było statystycznie istotnie obniżone w przypadku genotypów CC i CT u osób z padaczką LPP(+) (test Manna-Whitney'a, odpowiednio p<0,001, p<0,01 w porównaniu z kontrolą), co jednocześnie wyrażone było istotnym spadkiem wartości stosunku Met/Hcy (test Manna-Whitney'a, p<0,001). W przypadku nieprawidłowych homozygot TT u chorych na padaczkę leczonych LPP obserwowano statystycznie istotny wzrost poziomu komórek we wczesnej apoptozie (test Manna-Whitney'a, p<0,05 w porównaniu z kontrolą) i całkowitego poziomu komórek apoptotycznych (test Manna-Whitney'a, p<0,05 w porównaniu

z kontrolą). U tych chorych obserwowano również bliski istotności statystycznej wzrost poziomu komórek w późnej apoptozie w porównaniu z kontrolą. Jedynie u heterozygot CT chorych na padaczkę leczonych LPP następowało obniżenie poziomu komórek we wczesnej apoptozie (test Manna-Whitney'a, $p < 0,05$ w porównaniu z kontrolą).

Tab.11. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek apoptotycznych w zależności od genotypów *ABCB1/MDR1* C3435T u chorych na padaczkę leczonych LPP(+) i w grupie kontrolnej

Parametry	Kontrola			Padaczka LPP(+)			p
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	
Hcy [μ M]	13,4 $\pm$ 2,6	11,6 $\pm$ 3,4	13,5 $\pm$ 5,3	15,2 $\pm$ 13,0	13,2 $\pm$ 3,8*	15,7 $\pm$ 5,6	0,2171 0,0230 0,2317
Met [μ M]	18,3 $\pm$ 4,5	17,6 $\pm$ 6,3	20,0 $\pm$ 6,3	12,1 $\pm$ 4,8**	12,2 $\pm$ 7,9***	19,4 $\pm$ 5,6	0,0038 0,0005 0,5225
Met/Hcy	1,4 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 0,7	1,7 $\pm$ 1,0	1,0 $\pm$ 0,7**	0,9 $\pm$ 0,6***	1,3 $\pm$ 0,4	0,0054 <0,0001 0,3063
Wczesna apoptoza [%]	1,2 $\pm$ 0,6	1,1 $\pm$ 0,7	1,2 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,7*	1,0 $\pm$ 0,6	2,4 $\pm$ 2,2	0,0440 0,1840 0,0688
Późna apoptoza [%]	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,2*	0,2 $\pm$ 0,1	0,3497 0,0473 0,2669
Σ apoptoza [%]	1,3 $\pm$ 0,6	1,3 $\pm$ 0,8	1,4 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,9	1,2 $\pm$ 0,8	2,7 $\pm$ 2,2	0,0582 0,3491 0,0903

Średnia $\pm$ SD. Poziom komórek z aktywnymi kaspazami przedstawiono jako % ogólnej liczby limfocytów.

Użyto testu Manna-Whitney'a. Statystycznie istotne różnice przy poziomie istotności: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ w porównaniu z kontrolą.

Analizując natomiast polimorfizm *ABCB1/MDR1* C3435T (Tab.11.) u chorych na padaczkę LPP(+) posiadających genotyp CT zaobserwowano statystycznie istotny wzrost stężenia osoczowej Hcy (test Manna-Whitney'a, $p < 0,05$ w porównaniu z kontrolą). Natomiast statystycznie istotne obniżenie stężenia Met (test Manna-Whitney'a, $p < 0,01$ w porównaniu z kontrolą) i spadek poziomu stosunku Met/Hcy (test Manna-Whitney'a, $p < 0,001$ w porównaniu z kontrolą) obserwowano zarówno u osób chorych na padaczkę z genotypem homozygotycznym prawidłowym CC, jak i heterozygotycznym CT. Jednocześnie u chorych na padaczkę z genotypem homozygotycznym prawidłowym CC wykazano istotne statystycznie obniżenie poziomu komórek we wczesnej apoptozie (test Manna-Whitney'a, $p < 0,05$ w porównaniu z kontrolą), a u heterozygot CT statystycznie istotny wzrost komórek w późnej apoptozie (test Manna-Whitney'a, $p < 0,05$ w porównaniu z kontrolą).

Tab.12. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek apoptotycznych w zależności od genotypów *ABCB1/MDR1* G2677(A/T) u chorych na padaczkę leczonych LPP(+) i w grupie kontrolnej

Parametry	Kontrola			Padaczka LPP(+)			p
	GG	GT	TT	GG	GT	TT	
Hcy [μ M]	12,5 $\pm$ 4,4	11,8 $\pm$ 2,9	12,6 $\pm$ 4,7	11,3 $\pm$ 3,4	14,8 $\pm$ 9,6	14,7 $\pm$ 5,5	0,3230 0,1018 0,2169
Met [μ M]	18,7 $\pm$ 5,2	17,1 $\pm$ 4,8	17,0 $\pm$ 5,1	11,0 $\pm$ 7,6***	12,9 $\pm$ 6,7***	15,9 $\pm$ 7,8	0,0008 0,0008 0,8977
Met/Hcy	1,7 $\pm$ 0,7	1,5 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,7	1,01 $\pm$ 0,9*	1,0 $\pm$ 0,5***	1,1 $\pm$ 0,5	0,0102 0,0001 0,1330
Wczesna apoptoza [%]	0,9 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,8	1,1 $\pm$ 0,4	0,9 $\pm$ 0,6	1,1 $\pm$ 0,7*	2,0 $\pm$ 2,1	0,4726 0,0442 0,3154
Późna apoptoza [%]	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,4	0,2 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,1	0,4726 0,0734 0,1564
Σ apoptoza [%]	1,1 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 0,9	1,2 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 0,9	1,3 $\pm$ 0,9	2,2 $\pm$ 2,1	0,4453 0,0965 0,2110

Średnia $\pm$ SD. Poziom komórek z aktywnymi kaspazami przedstawiono jako % ogólnej liczby limfocytów.

Użyto testu Manna-Whitney'a. Statystycznie istotne różnice przy poziomie istotności: *p<0,05, ***p<0,001 w porównaniu z kontrolą.

Uwzględniając z kolei ostatni z analizowanych polimorfizmów genu *ABCB1/MDR1* G2677(A/T) (Tab.12.), zaobserwowano tendencję do spadku stężenia osoczowej Hcy w przypadku homozygot prawidłowych GG oraz jej wzrostu u chorych z padaczką posiadających genotyp heterozygotyczny GT lub nieprawidłowy homozygotyczny TT. Jednocześnie u homozygot GG i heterozygot GT wykazano statystycznie istotny spadek stężenia osoczowej Met (test Manna-Whitney'a, p<0,001 w porównaniu z kontrolą) oraz istotne obniżenie poziomu stosunku Met/Hcy (test Manna-Whitney'a, odpowiednio p<0,05 oraz p<0,001 w porównaniu z kontrolą). Ponadto, u chorych na padaczkę z genotypem heterozygotycznym GT zaobserwowano istotne obniżenie poziomu komórek we wczesnej apoptozie (test Manna –Whitney'a, p<0,05 w porównaniu z kontrolą) oraz bliskie istotności statystycznej obniżenie całkowitego poziomu komórek z aktywnymi kaspazami w porównaniu z kontrolą. U tych chorych jednocześnie obserwowano bliskie istotności statystycznej podwyższenie poziomu komórek w późnej apoptozie.

4.7. Analiza stężenia Hcy i Met oraz poziomu komórek z aktywnymi kaspazami w zależności od genotypów genu *ABCB1/MDR1*: C1236T, G3435T oraz G2677(A/T) u chorych leczonych LPP (+) z napadami ogniskowymi oraz w grupie kontrolnej

Badaniu poddano poziom wybranych czynników apoptotycznych w zależności od oznaczonego wariantu genetycznego genu *ABCB1/MDR1* u chorych na padaczkę leczonych LPP, uwzględniono napady ogniskowe.

Tab.13. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek apoptotycznych w zależności od genotypów *ABCB1/MDR1* C1236T u chorych na padaczkę leczonych LPP+ z napadami ogniskowymi i w grupie kontrolnej

Parametry	Kontrola			Padaczka-napady ogniskowe			p
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	
Hcy [μ M]	12,0 $\pm$ 3,8	11,8 $\pm$ 3,0	14,1 $\pm$ 5,8	10,8 $\pm$ 2,2	13,8 $\pm$ 3,9	23,6 $\pm$ 18,3	0,3523 0,0644 0,1970
Met [μ M]	20,02 $\pm$ 6,0	16,6 $\pm$ 5,7	19,6 $\pm$ 6,4	10,3 $\pm$ 6,6*	13,9 $\pm$ 7,9	16,8 $\pm$ 7,1	0,0258 0,0734 0,2944
Met/Hcy	1,8 $\pm$ 0,8	1,5 $\pm$ 0,6	1,6 $\pm$ 0,9	0,9 $\pm$ 0,4*	1,0 $\pm$ 0,6**	0,9 $\pm$ 0,5	0,0119 0,0080 0,0898
Wczesna apoptoza [%]	0,9 $\pm$ 0,5	1,3 $\pm$ 0,8	1,1 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,6	1,0 $\pm$ 0,6	2,9 $\pm$ 2,5*	0,3997 0,1277 0,0476
Późna apoptoza [%]	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,2*	0,2 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,2*	0,0421 0,1428 0,0476
Σ apoptoza [%]	1,1 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,9	1,2 $\pm$ 0,4	1,1 $\pm$ 0,7	1,2 $\pm$ 0,6	3,3 $\pm$ 2,4*	0,5145 0,2116 0,0476

Średnia $\pm$ SD. Poziom komórek z aktywnymi kaspazami przedstawiono jako % ogólnej liczby limfocytów.

Użyto testu Manna-Whitney'a. Statystycznie istotne różnice przy poziomie istotności: *p<0,05, **p<0,01 w porównaniu z kontrolą.

Analizując grupę chorych z padaczką leczonych LPP z napadami ogniskowymi (Tab.13.), w przypadku genotypu homozygotycznego prawidłowego CC *ABCB1/MDR1* C1236T zaobserwowano tendencję do spadku stężenia Hcy oraz istotnie statystycznie zarówno obniżenie stężenia Met, jak i poziomu stosunku Met/Hcy (test Manna-Whitney'a, p<0,05 w porównaniu z kontrolą). Ponadto, u tych homozygot zauważono istotny statystycznie wzrost poziomu komórek w późnej apoptozie (test Manna-Whitney'a, p<0,05 w porównaniu z kontrolą). Z kolei w przypadku chorych z padaczką z nieprawidłowym homozygotycznym genotypem TT obserwowano najwyższe stężenia Hcy oraz istotny wzrost poziomu komórek wczesno-i późno-apoptotycznych, jak i całkowitej ich liczby (test Manna-

Whitney'a, $p < 0,05$ w porównaniu z kontrolą). Analizując natomiast chorych z genotypem heterozygotycznym CT wykazano bliski istotności statystycznej wzrost stężenia Hcy i spadek stężenia Met oraz istotne statystycznie obniżenie poziomu stosunku Met/Hcy (test Manna-Whitney'a, $p < 0,01$ w porównaniu z kontrolą).

Tab.14. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek apoptotycznych w zależności od genotypów *ABCB1/MDR1* C3435T u chorych na padaczkę leczonych LPP+ z napadami ogniskowymi oraz w grupie kontrolnej

Parametry	Kontrola			Padaczka- napady ogniskowe			P
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	
Hcy [μM]	13,4 $\pm$ 2,6	11,6 $\pm$ 3,4	13,5 $\pm$ 5,3	22,7 $\pm$ 24,1	14,1 $\pm$ 4,0*	15,8 $\pm$ 7,5	0,3304 0,0111 0,3939
Met [μM]	18,3 $\pm$ 4,5	17,6 $\pm$ 6,3	20,0 $\pm$ 6,3	10,1 $\pm$ 1,7***	13,8 $\pm$ 8,1	19,5 $\pm$ 6,2	0,0007 0,0638 0,3939
Met/Hcy	1,4 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 0,7	1,7 $\pm$ 1,0	0,7 $\pm$ 0,3**	1,0 $\pm$ 0,6***	1,3 $\pm$ 0,4	0,0015 0,0007 0,3242
Wczesna apoptoza [%]	1,2 $\pm$ 0,6	1,1 $\pm$ 0,7	1,2 $\pm$ 0,4	0,5 $\pm$ 0,2*	1,1 $\pm$ 0,6	4,0 $\pm$ 2,9*	0,0302 0,4701 0,0119
Późna apoptoza [%]	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,1	0,0632 0,0513 0,3571
Σ apoptoza [%]	1,3 $\pm$ 0,6	1,3 $\pm$ 0,8	1,4 $\pm$ 0,3	0,7 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 0,8	4,2 $\pm$ 2,7*	0,0632 0,3982 0,0119

Średnia $\pm$ SD. Poziom komórek z aktywnymi kaspazami przedstawiono jako % ogólnej liczby limfocytów.

Użyto testu Manna-Whitney'a. Statystycznie istotne różnice przy poziomie istotności: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ w porównaniu z kontrolą.

Z kolei analizując polimorfizm *ABCB1/MDR1* C3435T u osób z padaczką leczonych LPP z napadami ogniskowymi (Tab.14.) obserwowano tendencję do wzrostu stężenia osoczowej Hcy w przypadku wszystkich badanych genotypów, ale istotne statystycznie różnice uzyskano jedynie w przypadku heterozygot CT (test Manna-Whitney'a, $p < 0,05$ w porównaniu z kontrolą). Jednocześnie u tych chorych odnotowano bliski istotności statystycznej spadek stężenia Met oraz istotne statystycznie obniżenie poziomu stosunku Met/Hcy (test Manna-Whitney'a, $p < 0,001$ w porównaniu z kontrolą). Z kolei u prawidłowych homozygot CC obserwowano tendencję do wzrostu stężenia Hcy oraz istotne obniżenie stężenia Met (test Manna-Whitney'a, $p < 0,001$ w porównaniu z kontrolą) i poziomu stosunku Met/Hcy (test Manna-Whitney'a, $p < 0,01$ w porównaniu z kontrolą). Analizując natomiast poziom komórek apoptotycznych wykazano u tych chorych istotne obniżenie poziomu komórek wczesno-

apoptotycznych (test Manna-Whitney'a, $p < 0,05$ w porównaniu z kontrolą) oraz bliską istotności statystycznej tendencję do obniżenia poziomu całkowitej ich liczby oraz do podwyższania poziomu komórek późno-apoptotycznych. Z kolei u homozygot nieprawidłowych TT zauważono istotny statystycznie wzrost zarówno poziomu komórek wczesno-apoptotycznych, jak i całkowitej ich liczby (test Manna-Whitney'a, $p < 0,05$ w porównaniu z kontrolą).

Tab.15. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek apoptotycznych w zależności od genotypów *ABCB1/MDR1* G2677(A/T) u chorych na padaczkę leczonych LPP+ z napadami ogniskowymi oraz w grupie kontrolnej

Parametry	Kontrola			Padaczka-napady ogniskowe			p
	GG	GT	TT	GG	GT	TT	
Hcy [μM]	12,5 $\pm$ 4,4	11,8 $\pm$ 2,9	12,6 $\pm$ 4,7	10,5 $\pm$ 3,8	17,1 $\pm$ 12,5*	16,3 $\pm$ 5,9	0,1104 0,0208 0,0782
Met [μM]	18,7 $\pm$ 5,2	17,1 $\pm$ 4,8	17,0 $\pm$ 5,1	7,7 $\pm$ 4,1***	14,7 $\pm$,5	17,3 $\pm$ 7,5	0,0003 0,0626 0,5908
Met/Hcy	1,7 $\pm$ 0,7	1,5 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,7	0,0 $\pm$ 0,5**	1,0 $\pm$ 0,6**	1,1 $\pm$ 0,5	0,0098 0,0018 0,1802
Wczesna apoptoza [%]	0,9 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,8	1,1 $\pm$ 0,4	0,5 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,7*	3,3 $\pm$ 2,7**	0,1250 0,0402 0,0080
Późna apoptoza [%]	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,1	0,2488 0,0516 0,1059
Σ apoptoza [%]	1,1 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 0,9	1,2 $\pm$ 0,5	0,7 $\pm$ 0,4	1,3 $\pm$ 0,8	3,6 $\pm$ 2,5**	0,1507 0,1202 0,0040

Średnia $\pm$ SD. Poziom komórek z aktywnymi kaspazami przedstawiono jako % ogólnej liczby limfocytów.

Użyto testu Manna-Whitney'a. Statystycznie istotne różnice przy poziomie istotności: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ w porównaniu z kontrolą.

Analizując ostatni z badanych polimorfizmów *ABCB1/MDR1* G2677(A/T) (Tab.15.) zaobserwowano istotny statystycznie wzrost stężenia Hcy w przypadku heterozygotycznego wariantu GT (test Manna-Whitney'a, $p < 0,05$ w porównaniu z kontrolą), wyrażony jednocześnie bliskim istotności statystycznej obniżeniem stężenia Met oraz istotnym zmniejszeniem poziomu stosunku Met/Hcy (test Manna-Whitney'a, $p < 0,01$ w porównaniu z kontrolą). W grupie tej zaobserwowano również istotny wzrost poziomu komórek we wczesnej apoptozie (test Manna-Whitney'a, $p < 0,05$ w porównaniu z kontrolą) oraz bliski istotności statystycznej wzrost poziomu komórek późno-apoptotycznych. Z kolei u chorych z genotypem homozygotycznym GG wykazano tendencję do najniższych stężeń Hcy oraz istotny statystycznie spadek stężenia zarówno Met, jak i poziomu stosunku Met/Hcy (test Manna-Whitney'a, odpowiednio: $p < 0,001$, $p < 0,01$ w porównaniu z kontrolą). Jednocześnie analizując homozygoty

nieprawidłowe TT zauważono bliski istotności statystycznej wzrost stężenia Hcy oraz istotny wzrost poziomu komórek wczesno-apoptotycznych oraz całkowitej ich liczby (test Manna-Whitney’a, $p < 0,01$ w porównaniu z kontrolą).

4.8. Analiza stężenia Hcy i Met oraz poziomu komórek z aktywnymi kaspazami w zależności od genotypów genu *ABCB1/MDR1*: C1236T, G3435T oraz G2677(A/T) u chorych na padaczkę leczonych LPP(+) z napadami uogólnionymi oraz w grupie kontrolnej

Analizowano również parametry biochemiczne w zależności od oznaczonego wariantu genetycznego genu *ABCB1/MDR1* u chorych na padaczkę leczonych LPP, uwzględniono napady uogólnione.

Tab.16. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek apoptotycznych w zależności od genotypów *ABCB1/MDR1* C1236T u chorych na padaczkę leczonych LPP(+) z napadami uogólnionymi i w grupie kontrolnej

Parametry	Kontrola			Padaczka – napady uogólnione			p
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	
Hcy [μ M]	12,0 $\pm$ 3,8	11,8 $\pm$ 3,0	14,1 $\pm$ 5,8	12,4 $\pm$ 4,5	11,9 $\pm$ 2,9	12,9 $\pm$ 4,5	0,3652 0,4630 0,4524
Met [μ M]	20,02 $\pm$ 6,0	16,6 $\pm$ 5,7	19,6 $\pm$ 6,4	12,0 $\pm$ 7,8***	11,0 $\pm$ 4,5**	17,5 $\pm$ 7,1	0,0007 0,0045 0,5476
Met/Hcy	1,8 $\pm$ 0,8	1,5 $\pm$ 0,6	1,6 $\pm$ 0,9	1,1 $\pm$ 0,9**	0,9 $\pm$ 0,4**	1,4 $\pm$ 0,5	0,0019 0,0047 0,4524
Wczesna apoptoza [%]	0,9 $\pm$ 0,5	1,3 $\pm$ 0,8	1,1 $\pm$ 0,4	0,9 $\pm$ 0,7	1,0 $\pm$ 0,8	1,4 $\pm$ 0,7	0,2889 0,1372 0,1964
Późna apoptoza [%]	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,2	0,2470 0,2881 0,2857
Σ apoptoza [%]	1,1 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,9	1,2 $\pm$ 0,4	1,2 $\pm$ 0,9	1,2 $\pm$ 1,0	1,5 $\pm$ 0,9	0,4057 0,1856 0,1964

Średnia $\pm$ SD. Poziom komórek z aktywnymi kaspazami przedstawiono jako % ogólnej liczby limfocytów.

Użyto testu Manna-Whitney’a. Statystycznie istotne różnice przy poziomie istotności: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ w porównaniu z kontrolą.

Z kolei u chorych z padaczką leczonych LPP, którzy doznają uogólnionych napadów padaczkowych nie zaobserwowano ani istotnego wzrostu stężenia Hcy ani też wzrostu poziomu komórek apoptotycznych dla żadnego z analizowanych genotypów *ABCB1/MDR1* C1236T (Tab.16.). Wykazano natomiast istotne obniżenie stężenia Met oraz spadek poziomu stosunku Met/Hcy w przypadku

homozygot prawidłowych CC (test Manna-Whitney’a, odpowiednio $p<0,001$, $p<0,01$ w porównaniu z kontrolą) i heterozygot CT (test Manna-Whitney’a, $p<0,01$ w porównaniu z kontrolą).

Tab.17. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek apoptotycznych w zależności od genotypów *ABCB1/MDR1* C3435T u chorych na padaczkę leczonych LPP(+) z napadami uogólnionymi i w grupie kontrolnej

Parametry	Kontrola			Padaczka – napady uogólnione			p
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	
Hcy [μ M]	13,4 $\pm$ 2,6	11,6 $\pm$ 3,4	13,5 $\pm$ 5,3	12,2 $\pm$ 4,2	11,8 $\pm$ 3,7	15,7 $\pm$ 4,0	0,2339 0,4330 0,2061
Met [μ M]	18,3 $\pm$ 4,5	17,6 $\pm$ 6,3	20,0 $\pm$ 6,3	12,9 $\pm$ 5,5*	10,5 $\pm$ 7,5***	19,3 $\pm$ 6,0	0,0305 0,0002 0,3939
Met/Hcy	1,4 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 0,7	1,7 $\pm$ 1,0	1,2 $\pm$ 0,7*	0,9 $\pm$ 0,7***	1,3 $\pm$ 0,5	0,0423 0,0006 0,3939
Wczesna apoptoza [%]	1,2 $\pm$ 0,6	1,1 $\pm$ 0,7	1,2 $\pm$ 0,4	0,9 $\pm$ 0,9	0,9 $\pm$ 0,7	1,3 $\pm$ 0,6	0,1361 0,1351 0,3810
Późna apoptoza [%]	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,1	0,3890 0,0859 0,2381
Σ apoptoza [%]	1,3 $\pm$ 0,6	1,3 $\pm$ 0,8	1,4 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 1,0	1,2 $\pm$ 0,9	1,5 $\pm$ 0,6	0,1361 0,2729 0,4571

Średnia $\pm$ SD. Poziom komórek z aktywnymi kaspazami przedstawiono jako % ogólnej liczby limfocytów.

Użyto testu Manna-Whitney’a. Statystycznie istotne różnice przy poziomie istotności: * $p<0,05$, *** $p<0,001$ w porównaniu z kontrolą.

Również w przypadku badanych genotypów *ABCB1/MDR1* C3435T (Tab.17.) nie wykazano istotnych statystycznie różnic w stężeniu Hcy oraz w poziomie komórek apoptotycznych u chorych z padaczką leczonych LPP z napadami uogólnionymi w porównaniu z osobami kontrolnymi. Jednocześnie stężenie Met i poziom stosunku Met/Hcy ulegały istotnemu obniżeniu u chorych z genotypami: prawidłowym homozygotycznym CC (test Manna-Whitney’a, $p<0,05$ w porównaniu z kontrolą) i heterozygotycznym CT (test Manna-Whitney’a, odpowiednio $p<0,001$, w porównaniu z kontrolą). W przypadku heterozygot CT zauważono też bliski istotności statystycznej wzrost poziomu komórek w późnej apoptozie.

Tab.18. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek apoptotycznych w zależności od genotypów *ABCB1/MDR1* G2677(A/T) u chorych na padaczkę leczonych LPP(+) z napadami uogólnionymi i w grupie kontrolnej

Parametry	Kontrola			Padaczka- napady uogólnione			p
	GG	GT	TT	GG	GT	TT	
Hcy [μ M]	12,5 $\pm$ 4,4	11,8 $\pm$ 2,9	12,6 $\pm$ 4,7	11,8 $\pm$ 3,3	12,3 $\pm$ 4,2	12,7 $\pm$ 4,8	0,4183 0,4747 0,9130
Met [μ M]	18,7 $\pm$ 5,2	17,1 $\pm$ 4,8	17,0 $\pm$ 5,1	12,9 $\pm$ 8,8*	11,0 $\pm$ 5,3***	14,3 $\pm$ 8,8	0,0233 0,0002 0,7427
Met/Hcy	1,7 $\pm$ 0,7	1,5 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,7	1,2 $\pm$ 1,1	0,9 $\pm$ 0,5**	1,1 $\pm$ 0,6	0,0708 0,0024 0,3196
Wczesna apoptoza [%]	0,9 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,8	1,1 $\pm$ 0,4	0,9 $\pm$ 0,7	1,1 $\pm$ 0,8	0,9 $\pm$ 0,8	0,4548 0,1759 0,5941
Późna apoptoza [%]	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,4	0,2 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,2	0,2846 0,2550 0,5135
Σ apoptoza [%]	1,1 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 0,9	1,2 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 1,0	1,4 $\pm$ 1,0	1,1 $\pm$ 0,9	0,4849 0,1940 0,7679

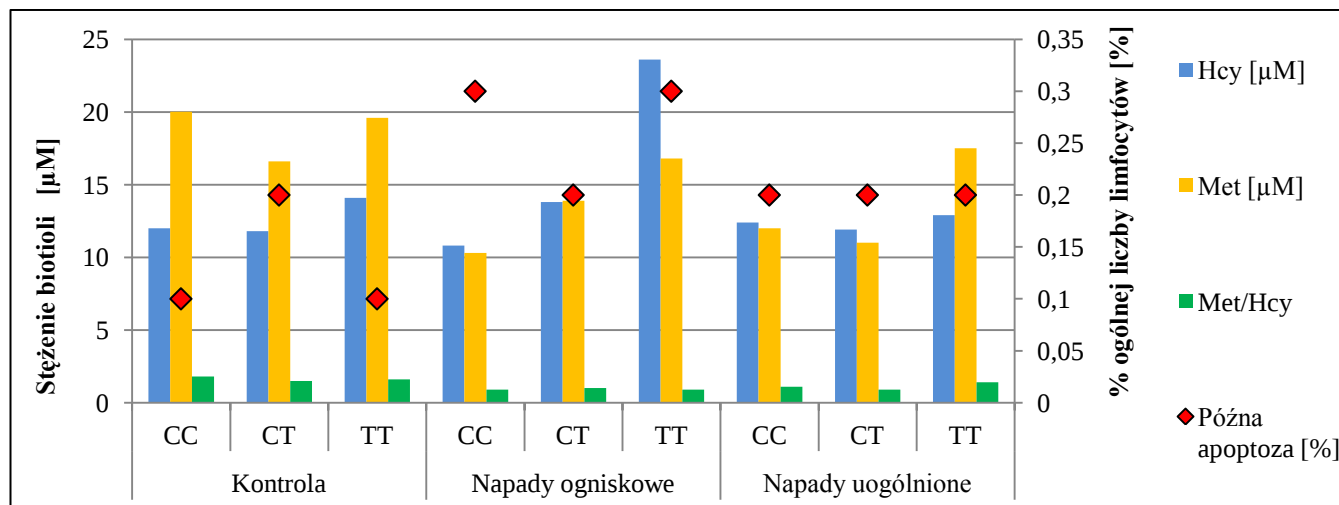
Średnia $\pm$ SD. Poziom komórek z aktywnymi kaspazami przedstawiono jako % ogólnej liczby limfocytów.

Użyto testu Manna-Whitney'a. Statystycznie istotne różnice przy poziomie istotności: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 w porównaniu z kontrolą.

Biorąc pod uwagę ostatni z analizowanych polimorfizmów *ABCB1/MDR1* G2677(A/T) (Tab.18.) również nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic stężenia Hcy oraz w poziomie komórek apoptotycznych dla żadnego z analizowanych genotypów w porównaniu z kontrolą. Zaobserwowano natomiast istotny spadek stężenia Met w przypadku genotypów GG i GT (test Manna-Whitney'a, odpowiednio p<0,05, p<0,001 w porównaniu z kontrolą), któremu w przypadku drugiego genotypu towarzyszył również spadek poziomu stosunku Met/Hcy (test Manna-Whitney'a, p<0,01, w porównaniu z kontrolą).

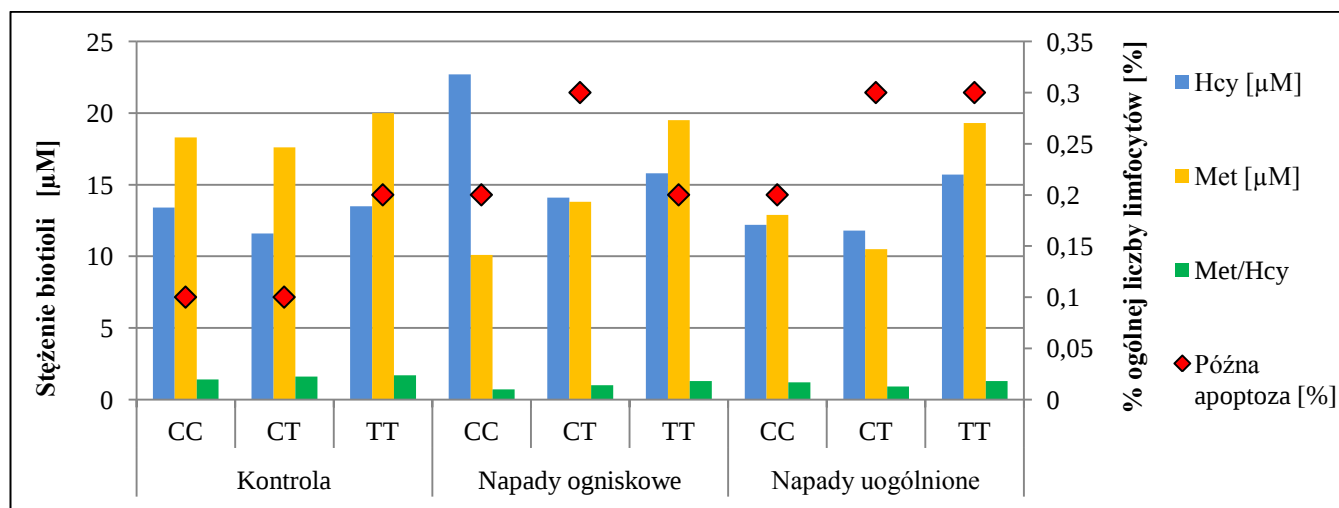
Wyniki analizy stężenia Hcy, Met i poziomu komórek w późnej apoptozie u chorych z napadami ogniskowymi i uogólnionymi oraz w grupie kontrolnej w zależności od genotypów analizowanych trzech polimorfizmów przedstawiono na poniższych wykresach (Ryc.19.-21.)

Ryc.19. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek w późnej apoptozie u chorych na padaczkę LPP(+) z napadami ogniskowymi i uogólnionymi oraz w grupie kontrolnej w zależności od genotypów ABCB1/MDR1 C1236T



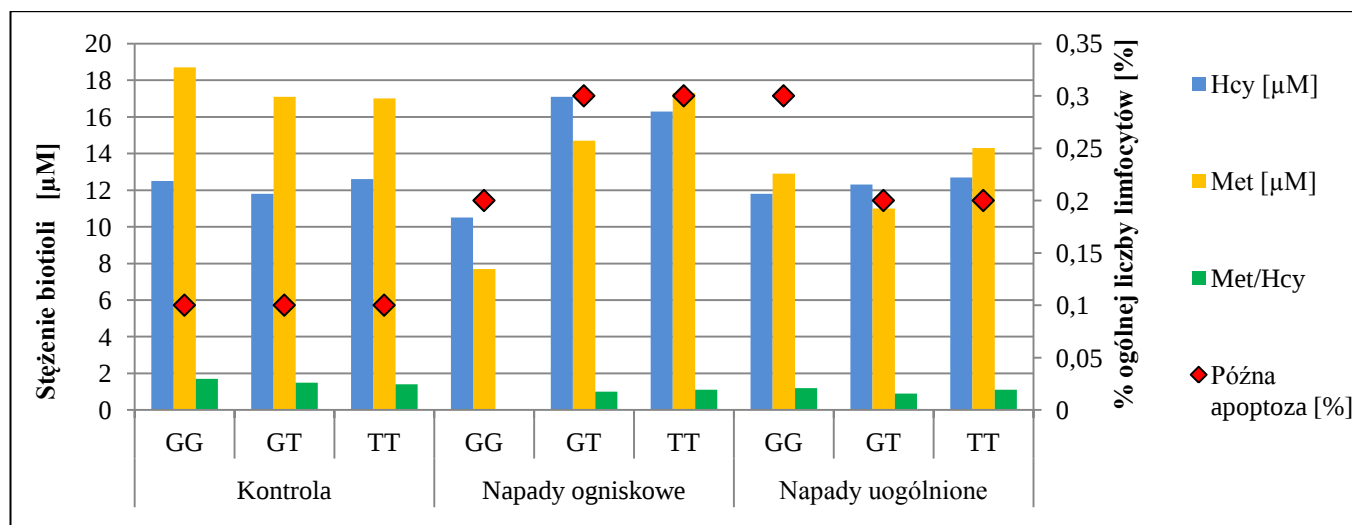
Średnia ± SD. Poziom komórek z aktywnymi kaspazami przedstawiono jako % ogólnej liczby limfocytów.

Ryc.20. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek w późnej apoptozie u chorych na padaczkę LPP(+) z napadami ogniskowymi i uogólnionymi oraz w grupie kontrolnej w zależności od genotypów ABCB1/MDR1 C3435T



Średnia ± SD. Poziom komórek z aktywnymi kaspazami przedstawiono jako % ogólnej liczby limfocytów.

Ryc.21. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek w późnej apoptozie u chorych na padaczkę LPP(+) z napadami ogniskowymi i uogólnionymi oraz w grupie kontrolnej w zależności od genotypów ABCB1/MDR1 G2677(A/T)



Średnia ± SD. Poziom komórek z aktywnymi kaspazami przedstawiono jako % ogólnej liczby limfocytów.

4.9. Analiza stężenia Hcy i Met oraz poziomu komórek z aktywnymi kaspazami w zależności od rodzaju stosowanej farmakoterapii u chorych na padaczkę oraz w grupie kontrolnej

W badaniach uwzględniono rodzaj stosowanej farmakoterapii u chorych z padaczką.

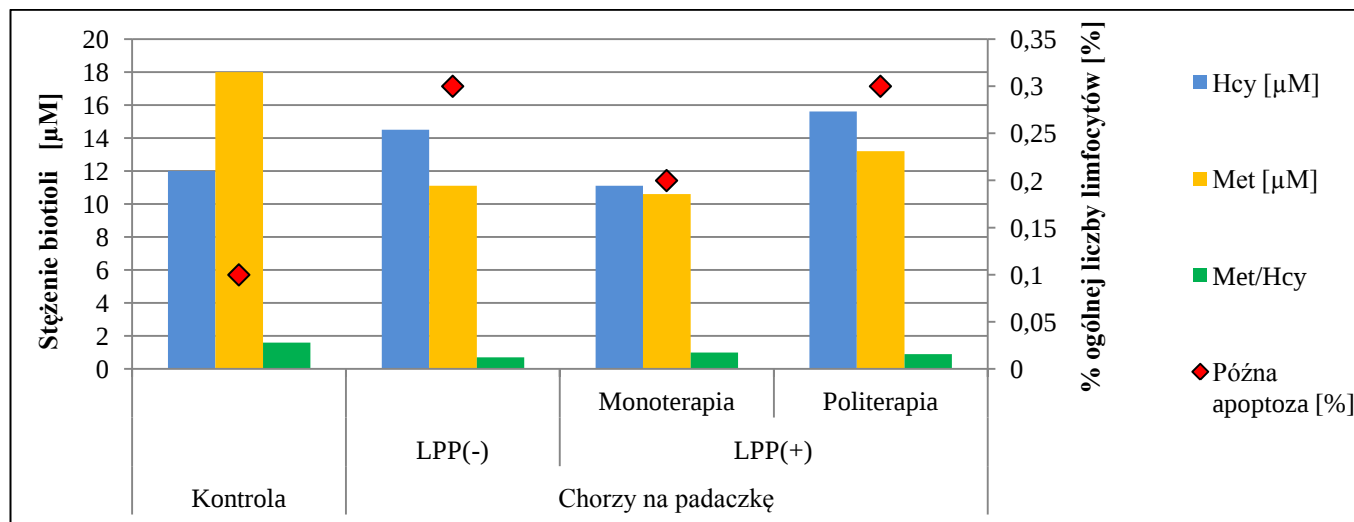
Tab.19. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek apoptotycznych u chorych na padaczkę leczonych monoterapią i politerapią oraz w grupie kontrolnej

Parametry	Kontrola	Chorzy na padaczkę			p
		LPP (-)	LPP(+)		
			Monoterapia	Politerapia	
Hcy [μM]	12,0± 3,5	14,5± 2,5	11,1± 8,5	15,6±9,3	0,0277
Met [μM]	18,0± 6,0	11,1± 6,8*	10,6± 8,7***	13,2±7,7**	<0,0001
Met/Hcy	1,6± 0,7	0,7± 0,5***	1,0± 0,5***	0,9±0,5***	<0,0001
Wczesna apoptoza [%]	1,1± 0,7	0,7± 0,5	1,2± 1,3	1,2± 0,7	0,2018
Późna apoptoza [%]	0,1± 0,1	0,3± 0,3	0,2± 0,2	0,3±0,2*	0,0413
Σ apoptoza [%]	1,3± 0,7	1,0± 0,7	1,4 ±1,4	1,5± 0,8	0,2627

Średnia ± SD. Poziom komórek z aktywnymi kaspazami przedstawiono jako % ogólnej liczby limfocytów.

Użyto testu Kruskala-Wallisa. Statystycznie istotne różnice przy poziomie istotności: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 w porównaniu z kontrolą.

Ryc.22. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek w późnej apoptozie u chorych na padaczkę leczonych monoterapią i politerapią oraz w grupie kontrolnej



Średnia ± SD. Poziom komórek z aktywnymi kaspazami przedstawiono jako % ogólnej liczby limfocytów.

Analizując stężenie wybranych osoczowych biotoli oraz poziom komórek apoptotycznych w zależności od stosowanego leczenia nie zaobserwowano istotnych różnic w poziomie powyższych parametrów pomiędzy pacjentami leczonymi jednym a wieloma LPP (Tab.19, Ryc.22.). Zauważono natomiast tendencję do wzrostu stężenia Hcy u pacjentów z padaczką oczekujących na włączenie LPP oraz u osób stosujących politerapię. Trend wzrostowy dotyczył również komórek w późnej apoptozie u wszystkich pacjentów cierpiących na padaczkę, ale istotne zwiększenie poziomu tych komórek zaobserwowano jedynie u chorych leczonych politerapią (test Kruskala-Wallisa, $p < 0,05$ w porównaniu z kontrolą). U chorych z padaczką bardziej nasilone zmiany obserwowano natomiast w przypadku spadku stężenia Met (test Kruskala-Wallisa, LPP(-), $p < 0,05$; Monoterapia, $p < 0,001$; Politerapia, $p < 0,01$ w porównaniu z kontrolą) i poziomu stosunku Met/Hcy (test Kruskala-Wallisa, $p < 0,001$ w porównaniu z kontrolą).

Tab.20. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek apoptotycznych u chorych na padaczkę leczonych monoterapią oraz w grupie kontrolnej

Parametry	Kontrola	Chorzy na padaczkę				p
		LPP (-)	LPP(+) Monoterapia			
			NG	SG		
			NG	VPA	CBZ	
Hcy [μM]	12,0± 3,5	14,5± 2,5	8,4± 8,0	10,1±9,0	15,1± 8,6	0,0123
Met [μM]	18,0± 6,0	11,1± 6,8	8,7± 8,5*	10,2±8,9*	12,5± 10	0,0005
Met/Hcy	1,6± 0,7	0,7± 0,5***	1,0± 0,6	1,0± 0,6*	0,9± 0,5	<0,0001
Wczesna apoptoza [%] WA	1,1± 0,7	0,7± 0,5	0,9± 0,5	1,3± 1,9	1,3 ±0,8	0,2588
Późna apoptoza [%]PA	0,1± 0,1	0,3± 0,3	0,3± 0,3	0,2 ±0,1	0,2 ±0,1	0,3996
Σ apoptoza [%] CA	1,3± 0,7	1,0± 0,7	1,2 ±0,7	1,5± 1,9	1,5 ±0,9	0,4370

Średnia $\pm$ SD. Poziom komórek z aktywnymi kaspazami przedstawiono jako % ogólnej liczby limfocytów.

Użyto testu Kruskala-Wallisa. Statystycznie istotne różnice przy poziomie istotności: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 w porównaniu z kontrolą.

Jednocześnie w przypadku chorych leczonych w monoterapii (Tab.20.) zaobserwowano tendencję do największego wzrostu stężenia Hcy u osób otrzymujących CBZ i największego jej spadku u chorych otrzymujących LPP NG. Z kolei stężenie Met było istotnie obniżone u pacjentów pobierających LPP NG oraz VPA (test Kruskala-Wallisa, p<0,05 w porównaniu z kontrolą). Jednocześnie zaobserwowano istotne obniżenie poziomu stosunku Met/Hcy u chorych LPP(-) oraz leczonych VPA. Poziom komórek w późnej apoptozie miał tendencję do wzrostu u wszystkich osób z padaczką zarówno leczonych, jak i nie leczonych LPP, i osiągał najwyższe wartości w przypadku stosowania LPP NG oraz u chorych przed włączeniem leczenia.

Tab.21. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek apoptotycznych u chorych na padaczkę leczonych politerapią oraz w grupie kontrolnej

Parametry	Kontrola	Chorzy na padaczkę			p
		LPP (-)	LPP(+) Politerapia		
			NG	SG+NG	
Hcy [μM]	12,0± 3,5	14,5± 2,5	13,3± 3,0	15,9± 9,8	0,0150
Met [μM]	18,0± 6,0	11,1± 6,8*	14,2± 7,5	13,0± 7,9**	0,0008
Met/Hcy	1,6± 0,7	0,7± 0,5***	1,0± 0,3	0,9± 0,5***	<0,0001
Wczesna apoptoza [%] WA	1,1± 0,7	0,7± 0,5	1,1± 0,6	1,2± 0,7	0,2293
Późna apoptoza [%]PA	0,1± 0,1	0,3± 0,3	0,2± 0,1	0,3± 0,2	0,0637
Σ apoptoza [%] CA	1,3± 0,7	1,0± 0,7	1,3± 0,4	1,5± 0,8	0,2504

Średnia $\pm$ SD. Poziom komórek z aktywnymi kaspazami przedstawiono jako % ogólnej liczby limfocytów.

Użyto testu Kruskala-Wallisa. Statystycznie istotne różnice przy poziomie istotności: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 w porównaniu z kontrolą.

W przypadku chorych stosujących politerapię (Tab.21.) nie zauważono istotnych różnic w zakresie stężenia Hcy pomiędzy chorymi stosującymi LPP NG oraz LPP SG w skojarzeniu z LPP NG oraz w porównaniu z kontrolnymi ochotnikami. Zaobserwowano natomiast istotne zmniejszenie stężenia Met oraz spadek poziomu stosunku Met/Hcy u chorych na padaczkę LPP(-) (test Kruskala-Wallisa, odpowiednio: $p<0,05$ i $p<0,001$) oraz u osób leczonych politerapią obejmującą zarówno LPP NG, jak i SG (test Kruskala-Wallisa, odpowiednio $p<0,01$ i $p<0,001$). Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic analizując poziom komórek apoptotycznych pomiędzy pacjentami leczonymi wieloma lekami w porównaniu z kontrolą.

4.10. Analiza stężenia Hcy i Met oraz poziomu komórek z aktywnymi kaspazami w zależności od czasu trwania leczenia LPP chorych na padaczkę oraz w grupie kontrolnej

Tab.22. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek apoptotycznych w zależności od czasu leczenia LPP chorych na padaczkę oraz w grupie kontrolnej

Parametry	Kontrola	Chorzy na padaczkę			p
		LPP (-)	LPP(+)		
			<5 lat	>5 lat	
Hcy [μM]	12,0± 3,5	14,5± 2,5	12,3± 8,9	14,0± 9,2	0,0693
Met [μM]	18,0± 6,0	11,1± 6,8*	11,4± 8,4**	12,2± 8,2***	<0,0001
Met/Hcy	1,6± 0,7	0,7± 0,5***	1,0± 0,5***	0,9± 0,5***	<0,0001
Wczesna apoptoza [%] WA	1,1± 0,7	0,7± 0,5	1,2± 0,7	1,2± 1,3	0,3389
Późna apoptoza [%] PA	0,1± 0,1	0,3± 0,3	0,2± 0,2	0,2± 0,2	0,0489
Σ apoptoza [%] CA	1,3± 0,7	1,0± 0,7	1,4± 0,8	1,5± 1,3	0,4194

Średnia $\pm$ SD. Poziom komórek z aktywnymi kaspazami przedstawiono jako % ogólnej liczby limfocytów.

Użyto testu Kruskala-Wallisa. Statystycznie istotne różnice przy poziomie istotności: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ w porównaniu z kontrolą.

Uwzględniając czas trwania leczenia (Tab.22.) zauważono tendencję do wzrostu stężenia Hcy u osób leczonych LPP przez okres dłuższy niż 5 lat oraz u osób oczekujących na włączenie LPP. Stężenie Met oraz poziom stosunku Met/Hcy ulegały istotnemu obniżeniu zarówno u chorych przed włączeniem LPP (test Kruskala-Wallisa, odpowiednio: $p<0,05$, $p<0,001$ w porównaniu z kontrolą), jak i u chorych LPP(+) leczonych krócej niż 5 lat (test Kruskala-Wallisa, odpowiednio $p<0,01$, $p<0,001$ w porównaniu z kontrolą) oraz dłużej niż 5 lat (test Kruskala-Wallisa $p<0,001$ w porównaniu z kontrolą). Jednocześnie biorąc pod uwagę komórki z aktywnymi kaspazami zaobserwowano tendencję do wzrostu poziomu komórek w późnej apoptozie u wszystkich chorych na padaczkę z tendencją do najwyższych wartości u chorych przed włączeniem terapii.

5. Dyskusja

Epileptogeneza jest złożonym, przewlekłym i nadal nie do końca poznanym procesem, który prowadzi do transformacji prawidłowego mózgu, w mózg generujący nieprovokowane napady padaczkowe [175,176]. Uważa się, że biorą w nim udział zarówno czynniki genetyczne, jak i nabyte (środowiskowe). Patofizjologia tworzenia się ogniska padaczkowego, a więc obszaru neuronalnego potrzebnego i wystarczającego do rozpoczęcia napadu padaczkowego, obejmuje wiele procesów molekularnych, mogących przebiegać jednocześnie i/lub kolejno po sobie [177].

Jak wynika z piśmiennictwa, jednym z mechanizmów leżących u podłoża epileptogenezy mogą być nieprawidłowości dotyczące ekspresji, lokalizacji bądź też funkcji kanałów jonowych; zarówno sodowych, wapniowych, jak i potasowych. Kanały te przez obecność w błonach komórek nerwowych i glejowych uczestniczą w regulacji aktywności elektrycznej [178]. Wśród innych mechanizmów związanych z tworzeniem ogniska padaczkowego wyróżnia się udział nadmiernej aktywności szlaku glutaminergicznego [179] oraz upośledzenie hamowania GABA-ergicznego [180]. Uważa się, że nadmierna aktywność szlaku glutaminergicznego przyczynia się do zjawiska ekscytotoksyczności, które powstaje w wyniku wzmożonej stymulacji receptorów glutaminergicznych i prowadzi do depolaryzacji neuronów przez napływ do komórek jonów wapnia. Wykazano ponadto, że stres oksydacyjny, będący wynikiem nadmiernego wytwarzania ROS, może również odgrywać ważną rolę w zapoczątkowaniu oraz rozwoju epileptogenezy z udziałem komórek nerwowych [181]. Co więcej, w badaniach na modelach doświadczalnych padaczki oraz w badaniach sekcyjnych u ludzi stwierdzono, że przedłużające się napady padaczkowe, a w szczególności stan padaczkowy, mogą prowadzić do utraty neuronów, m.in. kory nowej i hipokampa [182,183]. W badaniach u chorych z padaczką przyśrodkowego płata skroniowego, zaobserwowano, że proces śmierci neuronów hipokampa dotyczy głównie obszaru jego wnęki oraz neuronów piramidowych CA1 i CA3 [184,185]. Jedne z najnowszych badań wskazują, że w proces epileptogenezy mogą być również zaangażowane komórki glejowe, m.in. astrocyty. Ich udział tłumaczy się w oparciu o teorię zwaną „hipotezą kinazy adenozyiny”, związanej z występowaniem astrogliozą w wyniku zadziałania szkodliwego bodźca, jakim może być np. stan padaczkowy. W konsekwencji może on prowadzić do stymulacji enzymu i obniżenia poziomu endogennej adenozyiny, posiadającej właściwości antydrgawkowe [186]. Mechanizmy uczestniczące w procesie utraty komórek OUN nie są do końca poznane, ale uważa się, że jednym z nich może być śmierć komórek na drodze apoptozy [130].

Z drugiej strony, doniesienia z badań na liniach komórek nowotworowych oraz na modelach zwierzęcych, wskazują na możliwość wzbudzania apoptozy przez LPP, jako efekt uboczny działania tych leków [4,136]. Wykazano, że zwłaszcza wieloletnie stosowanie LPP może prowadzić do wystąpienia działań niepożądanych, takich jak: zwiększone ryzyko rozwoju zmian miażdżycowych i chorób naczyniowych [187,188,189], w tym głównie przez podwyższanie stężenia osoczowej Hcy, ADMA,

lipoproteiny (a) oraz modyfikację profilu lipidów, zarówno u dzieci, jak i u dorosłych chorych na padaczkę [190,191,192,193,34]. Co więcej, uważa się, że podwyższone stężenie Hcy może indukować proces kontrolowanej genetycznie śmierci komórki m.in. przez indukowanie ROS [5,6]. Komórki nerwowe są jednymi z najbardziej wrażliwych komórek organizmu na stres oksydacyjny, a przedłużające się pobudzenie neuronów podczas napadów padaczkowych może prowadzić do ich utraty na drodze apoptozy bądź też martwicy. W badaniach przeprowadzonych przez Gorgone i wsp. [2009] wykazano, że hHcy jest czynnikiem ryzyka atrofii mózgu, a proces ten może dotyczyć od 20 do nawet 50% chorych na padaczkę [194].

W badaniach własnych zaobserwowano istotny wzrost stężenia osoczowej Hcy, zarówno u chorych leczonych LPP, jak i oczekujących na włączenie leczenia tymi lekami. Potwierdzają to wcześniejsze prace, w których podwyższone stężenie tego biotiolu opisywano m.in. u chorych dorosłych w populacji polskiej [34,195] oraz u dzieci i dorosłych w populacji włoskiej [196,116]. Podwyższone stężenie Hcy w badaniach własnych, obserwowano również u pacjentów przed włączeniem leczenia LPP. Wzrost stężenia tego biotiolu przed kuracją LPP wydaje się wynikać z doboru grupy, stosowanej przez badane osoby diety bądź też być następstwem toczącego się procesu epileptogenezy.

W literaturze pojawiło się jednak znacznie więcej prac wskazujących na udział LPP w generowaniu hHcy u chorych z padaczką. Dane literaturowe wskazują ponadto, że hHcy dotyczyć może nawet znacznego odsetka chorych na padaczkę leczonych LPP [197]. W pracy Agnati i wsp. [2005] wykazano, że Hcy może przechodzić przez barierę krew-mózg, a stężenie w osoczu tego biotiolu odzwierciedla jego poziom w OUN [198]. Ponadto, wykazano, że hHcy jest czynnikiem ryzyka wielu chorób, w tym: udaru niedokrwinnego mózgu, chorób neurodegeneracyjnych (chA, chP), nowotworów oraz stanowi ryzyko poronień [87]. Jednocześnie, na modelach zwierzęcych padaczki wykazano, że hHcy przyczynia się do nieskutecznej kontroli napadów padaczkowych [199]. Prawdopodobnie wynika to z prodrzewkowego działania jej metabolitu, tiolaktonu homocysteiny (HCTL, ang. *homocysteine thiolactone*), z udziałem syntazy tlenu azotu [200,201]. Inna z teorii zakłada, że L-izomer Hcy i produkt jej oksydacji, kwas L-homocysteinowy są potencjalnymi agonistami receptora NMDA oraz metabotropowego receptora glutaminergicznego (mGlu), które są zaangażowane bezpośrednio w proces epileptogenezy [202]. Z kolei w badaniach u ludzi wykazano, że podwyższone stężenie Hcy może być czynnikiem predykcyjnym drgawek abstynencyjnych u osób z zespołem zależności alkoholowej (ZZA) [203,204,205].

Wykazano, że na podwyższenie stężenia Hcy u pacjentów chorych na padaczkę wpływa wiele czynników. Do najważniejszych należą: dieta uboga w kofaktory przemiany Hcy, styl życia, czynniki genetyczne (głównie polimorfizmy w genach *MTHFR*, *MTR*, *CBS*), wiek oraz wspomniana wcześniej terapia LPP [34]. Jednak mechanizmy związane z generowaniem hHcy przez LPP są nadal do końca niepoznane. Z danych literatury wynika, że LPP podwyższają stężenie Hcy przez obniżanie poziomu

kofaktorów jej przemian: kwasu foliowego (FA) oraz witaminy B12 [206]. Przykładowo, zaobserwowano wzrost stężenia Hcy związany z obniżeniem stężenia FA podczas stosowania CBZ, natomiast w przypadku stosowania VPA podwyższonemu stężeniu Hcy towarzyszył zarówno spadek, jak i prawidłowy poziom FA [207,208,209]. Aktualnie niedobór folianów u chorych na padaczkę pobierających LPP tłumaczy się w oparciu o kilka mechanizmów: zaburzeniem ich wchłaniania, upośledzeniem ich transportu do tkanek oraz indukowaniem enzymów wątrobowych i związanym z tym procesem zwiększonego katabolizmu folianów [210]. Co ciekawe, dane literaturowe wskazują, że leki nie indukujące enzymów wątrobowych, takie jak: LEV, LTG, zasadniczo nie podwyższają stężenia Hcy oraz nie wpływają na zmianę stężenia witaminy B12 i FA [116,211]. Potwierdzają to badania własne, w których wykazano, że u chorych stosujących monoterapię CBZ, obserwowano tendencję do wyższych stężeń Hcy, natomiast w przypadku LPP NG obserwowano niższe stężenia tego biotiolu. Podobne wyniki uzyskano również w innych badaniach m.in. podwyższone stężenie Hcy w przypadku stosowania CBZ w monoterapii u dzieci [207,212] oraz prawidłowe jej stężenie podczas terapii LEV i LTG u dorosłych [116,211]. Z pracy Śnieżawskiej i wsp. [2011] oraz Huemer i wsp. [2005] wynika, że do generowania Hcy prowadzi również politerapia. Potwierdzają to wyniki uzyskane w niniejszej pracy, pacjenci stosujący politerapię wykazywali tendencję do wyższych stężeń Hcy, niż chorzy stosujący jeden LPP [34,197].

Ponadto, podobnie jak w pracy Ono i wsp. [1997] w przeprowadzonych badaniach u chorych na padaczkę zarówno leczonych, jak i oczekujących na włączenie leczenia LPP, istotnemu obniżeniu ulegało stężenie Met. Wydaje się, że spadek stężenia tego biotiolu związany był z obniżeniem efektywności procesu remetylacji Hcy w następstwie stosowanej farmakoterapii, najprawdopodobniej wpływającej na zaburzenie procesów matabolicznych, bądź skutkiem procesu epileptogenezy. Jednocześnie w niniejszej pracy wykazano, że obniżeniu ulegał poziom stosunku Met/Hcy[213]. Uważa się, że spadek poziomu tego stosunku może być związany z transformacją Hcy do jej metabolitu HCTL w komórkach śródbłonna. Jak wiadomo, związek ten pośredniczy w tworzeniu zmian miażdżycowych indukowanych przez Hcy [201,2015].

Z danych piśmiennictwa wynika, że hHcy oraz LPP mogą wzbudzać apoptozę w liniach komórkowych [5,6]. Jak do tej pory jednak nie badano wpływu LPP na indukowanie apoptozy w komórkach krwi obwodowej u chorych na padaczkę. Z przeprowadzonych badań u chorych z padaczką leczonych LPP wynika, że terapia tymi lekami mogła wpływać na wzrost poziomu komórek apoptotycznych (limfocytów krwi obwodowej), co istotne, późno-apoptotycznych. Uważa się, że późne stadium apoptozy, w odróżnieniu od wczesnego, jest procesem nieodwracalnym, gdyż w jego przebiegu oprócz aktywacji kaskady kaspaz, dochodzi również do przerywania ciągłości błony komórkowej. Z badań na zwierzęcych modelach padaczki oraz badań klinicznych wynika, że przedłużające się napady padaczkowe, a szczególnie stan padaczkowy prowadzą do uszkodzenia mózgu i śmierci komórek

nerwowych i glejowych [216]. Mimo, że mechanizmy leżące u podłoża tego zjawiska pozostają nadal niewyjaśnione, jednym z nich może być proces apoptotycznej śmierci neuronów. Potwierdza to wzrost poziomu białek z rodziny Bcl-2 w resekowanych strukturach mózgu pacjentów poddanych operacji z powodu padaczki skroniowej [217]. Jak wiadomo, niektóre LPP mogą indukować apoptozę [4,136,218], co w świetle terapii pacjentów wydaje się mieć istotne znaczenie, gdyż nasilony proces apoptozy komórek pod wpływem stosowania LPP, w tym komórek OUN, może przyczyniać się do intensyfikacji mechanizmów zaangażowanych w proces epileptogenezy [219]. Uważa się, że utrata neuronów u chorych na padaczkę może prowadzić do zaburzenia równowagi pomiędzy neuronami pobudzającymi i hamującymi w sieci neuronalnej, np. w wyniku obumierania neuronów hamujących, bądź też pobudzających, które z kolei aktywują hamujące i nasilać proces chorobowy [220,221].

Jak wiadomo, limfocyty krwi obwodowej są komórkami układu odpornościowego i pełnią istotną rolę w wytwarzaniu swoistej odpowiedzi immunologicznej. Biorą udział w zwalczaniu infekcji, jak też pełnią funkcję ochronną organizmu przed procesami nowotworowymi. Nasiloną apoptozą limfocytów mogłaby prowadzić do zwiększonej podatności na infekcje u chorych z padaczką poddanych leczeniu LPP, a nawet prowadzić do rozwoju chorób nowotworowych. Z piśmiennictwa wynika, że u chorych na padaczkę istnieje wyższe ryzyko rozwoju określonych nowotworów. Badania przeprowadzone w populacji duńskiej wykazały silną korelację pomiędzy zachorowaniem na padaczkę, a zwiększoną częstością występowania nowotworów OUN, jamy ustnej i gardła, a umiarkowaną pomiędzy padaczką a nowotworami układu oddechowego, niezależnie od stosowanych LPP. Wydaje się jednak, że to raczej nie LPP posiadają potencjał kancerogeny, ale aspekty związane z padaczką: m.in. jej przyczyny [222]. Z kolei badania Singh i wsp. [2012] wykazały, że u chorych na padaczkę leczonych VPA obserwowano tendencję do występowania nowotworów prostaty, ale nie obserwowano zachorowań na nowotwory piersi [223]. W licznych badaniach na komórkach nowotworowych, w tym linii komórek raka piersi [224] potwierdzono, że VPA posiada potencjalne właściwości leku antynowotworowego. Mogłoby to tłumaczyć zmniejszoną liczbę zachorowań na ten rodzaj nowotworu u pacjentów leczonych LPP, wśród których VPA jest nadal jednym z najczęściej stosowanych leków. W pracy własnej przeprowadzonej na grupie chorych na padaczkę nie stwierdzono występowania nowotworów, ani też zwiększonej zapadalności na infekcje. Wydaje się, że okres obserwacji tych chorych jest zbyt krótki, a badana populacja zbyt mała, by wyciągać jednoznaczne wnioski.

Ponadto, z niniejszej pracy wynika, że chorzy z napadami ogniskowymi leczeni LPP wykazywali większą tendencję do wzbudzania apoptozy komórek, niż pacjenci rozwijający napady uogólnione. Już we wcześniejszych pracach wykazano aktywację procesu apoptozy w padaczce z napadami ogniskowymi. W badaniach tych zaobserwowano wzrost poziomu białka z rodziny Bcl-2 w surowicy pacjentów z padaczką skroniową, a w szczególności był on najwyższy u pacjentów z niesatysfakcjonującą kontrolą napadów [225]. Ponadto, wykazano, że lekooporna padaczka skroniowa

związana była ze zmianą ekspresji białek rodziny Bcl-2 w płacie skroniowym oraz wzrostem aktywności kaspazy-3 i -4 [226]. Z danych literatury wynika również, że u osób dorosłych jednym z najczęściej występujących zespołów padaczkowych jest padaczka płata skroniowego, a występujące w jej przebiegu napady ogniskowe w wielu przypadkach są lekooporne. Leczenie tego zespołu wymaga więc często zastosowania politerapii [227].

Uważa się również, że proces apoptozy u chorych na padaczkę może dotyczyć nie tylko OUN, ale również innych narządów. W pracy Zhao i wsp. [2014] zaobserwowano rozwinięcie się neurogennego obrzęku płuc, związanego z procesem genetycznie kontrolowanej śmierci komórek [135]. Dane literaturowe wskazują ponadto, że LPP, które w stężeniach terapeutycznych w monoterapii nie wykazywały efektu apoptotycznego (z wyjątkiem LEV), stosowane w politerapii z lekiem o właściwościach proapoptotycznych mogą potęgować proces apoptozy [149,162]. Wydają się to potwierdzać badania własne, w których poziom komórek w późnej apoptozie wzrastał głównie u pacjentów otrzymujących politerapię i nie zależał od czasu trwania leczenia LPP. Warto nadmienić, że terapia chorych z zastosowaniem kilku LPP w skojarzeniu jest stosowana głównie w przypadku chorych z padaczką lekooporną. Kontrola napadów padaczkowych jest u tych chorych niesatysfakcjonująca, a napady powtarzają się, mimo pobierania LPP. W świetle badań własnych, wydaje się, że stosowana politerapia może potęgować efekt uszkodzenia komórek w drodze apoptozy.

Z danych literaturowych wynika, że gen lekooporności *ABCB1/MDR1*, analizowany głównie w kontekście nieskuteczności terapii chorób nowotworowych oraz leczenia padaczki, może również modulować proces apoptozy podczas leczenia LPP [3].

Co więcej, liczne dane literaturowe wskazują, że czynniki genetyczne mogą też wpływać na skuteczność leczenia oraz na występowanie niepożądanych skutków terapii LPP [1,2,34,228]. Z przeprowadzonych badań wynika, że na regulację stężenia osoczowej Hcy u chorych z padaczką leczonych LPP mogły wpływać polimorfizmy genu *ABCB1/MDR1*. Wydaje się, że szczególnie do wzrostu stężenia Hcy predysponowało posiadanie heterozygotycznego genotypu CT *ABCB1/MDR1* C3435T i dotyczyło to w szczególności chorych z napadami ogniskowymi. Ponadto, chorzy z napadami ogniskowymi i genotypem homozygotycznym nieprawidłowym TT C1236T, prawidłowym CC C3435T, nieprawidłowym TT oraz heterozygotycznym GT G2677(A/T) genu *ABCB1/MDR1* wykazywali średnie stężenia Hcy na poziomie łagodnej hHcy. Według najlepszej wiedzy autorki jest to pierwsze doniesienie świadczące o udziale tego genu w regulacji stężenia Hcy u chorych na padaczkę. Ponadto, z przeprowadzonych badań wynika, że proces apoptozy przy współudziale Hcy zachodzi szczególnie u pacjentów posiadających genotyp heterozygotyczny CT *MDR1/ABCB1* C3435T. Wydaje się więc, że wyżej wymieniona grupa chorych z padaczką jest szczególnie narażona na działania niepożądane LPP i powinna zostać otoczona szczególną opieką podczas leczenia. Uważa się ponadto, że różna ekspresja

genu *MDR1/ABCB1* i związana z nią aktywność P-gp, może zależeć od stężenia FA [229] oraz kobalaminy [230], które mogą być zaburzone u pacjentów z padaczką w wyniku stosowania LPP.

Obecnie istnieją nieliczne doniesienia dotyczące częstości występowania polimorfizmów genu *ABCB1/MDR1* C3435T oraz G2677(A/T) w populacji polskiej u chorych na padaczkę [82,83,231]. W ostatnim czasie pojawiło się natomiast kilka prac dotyczących tego genu w populacji polskiej w innych chorobach [62,232,233]. Jak dotąd nie badano polimorfizmu *ABCB1/MDR1* C1236T w populacji polskich chorych z padaczką, a jedyne doniesienie o częstości występowania tego polimorfizmu pochodzi z badania u polskich chorych z chP [234].

W przedstawionych badaniach własnych na grupie 169 osób, w tym 85 chorych z padaczką i 84 osobach kontrolnych, nie zaobserwowano istotnej różnicy w częstości występowania genotypów dla żadnego z analizowanych polimorfizmów genu *ABCB1/MDR1* C1236T, C3435T oraz G2677(A/T) u chorych na padaczkę w porównaniu z kontrolnymi ochotnikami. Potwierdzają to przeprowadzone wcześniej badania Stasiołka i wsp. [2016] w populacji polskich dzieci dotyczące polimorfizmu C3435T oraz Smolarza i wsp. [2017] w populacji dorosłych dotyczące G2677(A/T). Dodatkowo, w pracach tych nie zaobserwowano różnicy w częstości występowania alleli pomiędzy osobami z padaczką a grupą kontrolną. Wykazano natomiast, że allel C C3435T był częstszy u pacjentów z padaczką lekooporną w porównaniu z pacjentami z dobrą kontrolą napadów oraz zwiększał ryzyko zachorowania na tę chorobę neurologiczną. Z kolei obecność allelu T chroniła przed zachorowaniem na padaczkę [75,82,231]. Podobne wnioski wysunięto w przeprowadzonej metaanalizie dotyczącej rasy kaukaskiej. Wykazano w niej istotnie mniejsze ryzyko rozwinięcia się padaczki lekoopornej u chorych posiadających allel T C3435T [2], chociaż we wcześniejszym badaniu w populacji polskiej nie zaobserwowano żadnej korelacji omawianego polimorfizmu z występowaniem padaczki lekoopornej, przy uwzględnieniu kilku jej definicji [83]. W badaniach własnych, podobnie jak w pracy Alpman i wsp. [2010] nie wykazano obecności osób z genotypem GA oraz AA *ABCB1/MDR1* G2677(A/T). Najprawdopodobniej wynika to z niewielkiej częstotliwości występowania allelu A u osób z populacji europejskiej (2%) [235]. Ponadto, tylko u jednego pacjenta z padaczką oznaczono genotyp AT. Chory ten cierpiał na padaczkę z napadami uogólnionymi toniczno-klonicznymi, rozpoznaną w 12 r.ż. Od co najmniej 5 lat leczony był z zastosowaniem terapii skojarzonej LPP SG (VPA) oraz LPP NG (GBP, LEV) i doznawał średnio 1 napadu co 2 miesiące. Choroba spełniała kryteria definicji padaczki lekoopornej, a w rodzinie pacjenta nikt do tej pory nie chorował na tę chorobę neurologiczną. U opisywanego chorego oznaczone stężenie Hcy mieściło się w granicach wartości referencyjnych (13,5 µM), a poziom komórek w późnej apoptozie nie był wysoki i wynosił 0,5% limfocytów krwi obwodowej.

Uważa się, że ze względu na małą liczebność populacji badanej uzyskane wyniki częstości polimorfizmów *ABCB1/MDR1* wymagają potwierdzenia na większej grupie osób, bądź w badaniach objętych metaanalizą.

Z badań własnych wynika, że dalsza analiza polimorfizmów genu *ABCB1/MDR1* wraz z oznaczaniem poziomu czynników apoptotycznych może przyczynić się w przyszłości do stosowania korzystniejszych terapii u chorych na padaczkę i do personalizacji leczenia.

6. Wnioski

1. Warianty genetyczne analizowanych polimorfizmów genu *ABCB1/MDR1* występują z różną częstością u chorych na padaczkę i osób kontrolnych.
2. Sugeruje się, że farmakoterapia LPP u chorych na padaczkę prowadzi do jednoczesnego wzrostu stężenia osoczowej homocysteiny oraz poziomu komórek w późnej apoptozie.
3. Uważa się, że homocysteina indukuje proces apoptozy u chorych z padaczką jedynie podczas leczenia LPP.
4. Szczególnie narażeni na generowanie osoczowej homocysteiny i indukowanie apoptozy wydają się być chorzy z padaczką posiadający heterozygotyczny genotyp CT *ABCB1/MDR1* C3435T.
5. Sugeruje się, że chorzy z napadami ogniskowymi leczeni LPP wykazują większą tendencję do wzbudzania apoptozy, niż pacjenci rozwijający napady uogólnione.
6. Raczej politerapia niż długotrwała terapia (powyżej 5 lat) zwiększa tendencję do wzrostu stężenia osoczowej homocysteiny i wpływa na poziom komórek apoptotycznych.
7. Dalsza analiza polimorfizmów genu *ABCB1/MDR1* wraz z oznaczaniem poziomu czynników apoptotycznych może przyczynić się w przyszłości do stosowania korzystniejszych terapii u chorych na padaczkę.

7. Streszczenie

Padaczka jest chorobą ośrodkowego układu nerwowego (OUN) o wieloczynnikowym pochodzeniu. Będąc schorzeniem przewlekłym, wymaga stosowania farmakoterapii przez wiele lat, a czasami przez całe życie. Długotrwałe leczenie lekami przeciwpadaczkowymi (LPP) niesie z sobą ryzyko wystąpienia działań niepożądanych. Ponadto, mimo obecnych na rynku ponad 20 LPP, zarówno LPP starej generacji (LPP SG), jak i LPP nowej generacji (LPP NG), nadal 30-40% pacjentów rozwija lekooporność. Z danych piśmiennictwa wynika, że LPP mogą prowadzić do podwyższania stężenia osoczowej homocysteiny (Hcy), która jest czynnikiem ryzyka m.in. chorób sercowo-naczyniowych, neurodegeneracyjnych oraz może zwiększać ryzyko poronień. Z kolei badania na liniach komórek nowotworowych wykazały, że LPP mogą indukować apoptozę. Uważa się ponadto, że genetycznie kontrolowana śmierć komórki (apoptoza) może być jedną z dróg obumierania neuronów hipokampa w przypadku przedłużających się napadów padaczkowych, a w szczególności, gdy dojdzie do rozwinięcia się stanu padaczkowego. Co więcej, z danych piśmiennictwa wynika, że *ABCB1/MDR1*, gen lekooporności typu-1 (ang. *multidrug resistance-1 gene*), analizowany głównie w kontekście nieskuteczności leczenia chorób nowotworowych, może również modulować szlaki apoptozy.

Celem pracy była analiza częstości występowania polimorfizmów C1236T, C3435T oraz G2677(A/T) genu *ABCB1/MDR1* u pacjentów z padaczką o nieznanej etiologii leczonych LPP, jak również u chorych przed włączeniem terapii tymi lekami oraz u kontrolnych ochotników w populacji polskiej. U tych osób analizie poddano również stężenie osoczowych biotioili: Hcy i metioniny (Met) oraz poziom komórek z aktywnymi kaspazami w limfocytach krwi obwodowej.

Badaniu poddano 85 osób z rozpoznaną padaczką o nieznanej etiologii (dawniej z padaczką kryptogenną) w wieku 18-69 lat (średnia wieku $35,8 \pm 13,0$), w tym 38 kobiet i 47 mężczyzn. Wśród badanych chorych: 11 osób oczekiwało na włączenie leczenia LPP z powodu nowo zdiagnozowanej choroby, natomiast 74 pacjentów otrzymywało leczenie różnymi LPP (LPP SG oraz LPP NG), zarówno w monoterapii, jak i w politerapii. Grupę kontrolnych ochotników stanowiły 84 osoby: 42 kobiety i 42 mężczyzn w wieku od 21 do 66 lat (średnia wieku $33,8 \pm 10,6$).

Badanie polimorfizmów C1236T, C3435T oraz G2677(A/T) genu *ABCB1/MDR1* przeprowadzono metodą HRM (ang. *High Resolution Melting*), potwierdzoną sekwencjonowaniem. Analizę poziomu komórek apoptotycznych wykonano metodą cytometrii przepływowej, przez identyfikację komórek wykazujących obecność aktywnych kaspaz (m.in. kaspazy-3, -6, -7). Stężenie osoczowej Hcy i Met oznaczono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją elektrochemiczną (HPLC/EC, ang. *High Pressure Liquid Chromatography/Electrochemical Detection*).

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że u chorych na padaczkę zarówno schorzenie ($p < 0,05$), jak też stosowana farmakoterapia LPP ($p < 0,01$) prowadzą do wzrostu stężenia osoczowej Hcy

oraz, że LPP wpływają na poziom komórek w późnej apoptozie ($p < 0,05$). Stwierdzono również, że do zwiększania poziomu komórek z aktywnymi kaspazami predysponują: wariant CT *ABCB1/MDR1* C3435T ($p < 0,05$), napady ogniskowe ($p < 0,05$) oraz stosowanie politerapii ($p < 0,05$). Wydaje się ponadto, że chorzy z genotypem CT C3435T są bardziej narażeni na rozwinięcie hiperhomocysteinemii (Hcy, $p < 0,05$). Co więcej, w proces wzbudzania kontrolowanej genetycznie śmierci komórki u chorych na padaczkę podczas leczenia LPP ($p < 0,001$) wydaje się być zaangażowana Hcy przez indukowanie późnej apoptozy.

Dalsza analiza polimorfizmów genu *ABCB1/MDR1* wraz z oznaczaniem poziomu czynników apoptotycznych może przyczynić się w przyszłości do stosowania korzystniejszych terapii u chorych na padaczkę i do personalizacji leczenia.

8. Abstract

ABCB1/MDR1 gene polymorphisms and the level of apoptotic factors in epilepsy patient treated with antiepileptic drugs.

Epilepsy is a disease of the brain of multifactorial etiology. As a chronic disorder it requires a long- term or even life- long antiepileptic drug (AED) therapy. AEDs may cause many side effects and at the cellular level may disturb the metabolism of specific compounds. Despite more than 20 AEDs available, including older (OG) and newer generation (NG) drugs, still 30-40% of the patients develop an intractable epilepsy. Literature data has shown that AEDs may lead to an increase of homocysteine (Hcy) concentration which is a well- known risk factor of the cardiovascular and neurodegenerative diseases and may cause greater miscarriage risk. Moreover, studies on neoplastic cell lines have revealed that some AEDs may also induce cell apoptosis. It is also known that programmed cell death (PCD) may be one of the possible pathways of neurons death as a result of the prolonged seizures or mainly status epilepticus. Moreover, the literature data has indicated that *ABCB1/MDR1*, multidrug resistance-1 gene, known from studies on cancer treatment failure, may also modulate pathways of suicidal cell death.

The aim of the study was to analyze the frequency of C1236T, C3435T and G2677(A/T) polymorphisms of *ABCB1/MDR1* gene in DNA isolated from peripheral blood in epilepsy patients treated with AEDs as well as in patients before initiating the therapy and in healthy volunteers. Plasma Hcy and methionine (Met) concentrations as well as the level of cells with active caspases among peripheral blood lymphocytes were also analyzed.

The study involved 85 patients at the age of 18 – 69 years (mean age $35,8 \pm 13,0$), diagnosed of epilepsy of unknown etiology: 38 women and 47 men. Among studied patients: 11 people were awaiting the therapy because of newly diagnosed disease, 74 were treated with various AEDs (OG and NG AEDs), both in mono- and in polytherapy. Control group consisted of 84 volunteers: 42 women and 42 men at the age of 21-66 years (mean age $33,8 \pm 10,6$).

The plasma Hcy and Met concentrations were analyzed by high pressure liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC/EC). The level of lymphocyte apoptotic cells were conducted by active caspases detection by flow cytometry. Genetic study of C1236T, C3435T and G2677(A/T) *ABCB1/MDR1* polymorphisms was analyzed using high resolution melting method (HRM) which was confirmed with sequencing.

The study revealed that AEDs therapy in epilepsy patients leads to an increase in plasma Hcy concentration and the level of late stage apoptotic cells. It seems that mainly focal seizures and polytherapy may predispose to an elevated level of cells with active caspases. Moreover, *ABCB1/MDR1* gene may modulate these processes and patients with *ABCB1/MDR1* 3435CT genotype are at the highest

risk of developing hyperhomocysteinemia (hHcy) and cell apoptosis induction. It seems also that Hcy is involved in programmed cell death in epilepsy patients.

Genetic analysis of *ABCB1/MDR1* gene polymorphisms in combination with plasma biothiols and apoptotic cells in patients with epilepsy may lead to the more successful and individualised anticonvulsive therapy.

9. Piśmiennictwo

1. Lv R.J., Shao X.Q., Cui T., i wsp.: *Significance of MDR1 gene C3435T polymorphism in predicting childhood refractory epilepsy*. Epilepsy Res. 2017; 132: 21-8
2. Li S.X., Liu Y.Y., Wang Q.B.: *ABCB1 gene C3435T polymorphism and drug resistance in epilepsy: evidence based on 8,604 subjects*. Med. Sci. Monit. 2015; 21: 861-8
3. Buda G., Orciuolo E., Maggini V. i wsp.: *MDR1 modulates apoptosis in CD34+ leukemic cells*. Ann. Hematol. 2008; 87: 1017-8
4. Xu Y., Xu D., Zhu S.J. i wsp.: *Induction of apoptosis and autophagy in metastatic thyroid cancer cells by valproic acid (VPA)*. Int. J. Clin. Exp. Pathol. 2015; 8: 8291-7
5. Ho P.I., Ortiz D., Rogers E. i wsp.: *Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage*. J. Neurosci. Res. 2002; 70: 694-702
6. Mattson M.P., Shea T.B.: *Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders*. Trends Neurosci. 2003; 26: 137-46
7. Jędrzejczak J., Mazurkiewicz-Bęldzinska M.: *Padaczka. Obraz kliniczny napadów padaczkowych*. PZWL Warszawa 2017: 4-12
8. Fisher R.S., Acevedo C., Arzimanoglou A. i wsp.: *ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy*. Epilepsia 2014; 55: 475-82
9. Kwan P., Arzimanoglou A., Berg A.T., Brodie M. i wsp.: *Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies*. Epilepsia 2010; 51: 1069-77
10. Sinha S., Siddiqui K.A.: *Definition of intractable epilepsy*. Neurosciences 2011; 16: 3-9
11. Jędrzejczak J.: *Padaczka najtrudniejsze są odpowiedzi na proste pytania*. Termedia Poznań 2008: 6-7
12. Ngugi A.K., Kariuki S.M., Bottomley C. i wsp.: *Incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis*. Neurology 2011; 77: 1005-1012
13. Berg A.T., Berkovic S.F., Brodie M.J. i wsp.: *Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology 2005-2009*. Epilepsia 2010; 51: 676-85
14. *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
15. Fisher R.S., Cross J.H., French J.A. i wsp.: *Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology*. Epilepsia 2017; 58: 522-30

16. Perucca E.: *The pharmacology of new antiepileptic drugs: does a novel mechanism of action really matter?* CNS Drugs 2011; 25: 907–12
17. Mula M.: *Third generation antiepileptic drug monotherapies in adults with epilepsy.* Expert. Rev. Neurother. 2016; 16: 1087-92
18. Santulli L., Coppola A., Balestrini S. i wsp.: *The challenges of treating epilepsy with 25 antiepileptic drugs.* Pharmacol. Res. 2016; 107: 211-9
19. Foldvary-Schaefer N., Fong J.S., Morrison S. i wsp.: *Lacosamide tolerability in adult patients with partial-onset seizures: Impact of planned reduction and mechanism of action of concomitant antiepileptic drugs.* Epilepsy Behav. 2016; 57: 155-60
20. Kossoff E.: *Stiripentol for Dravet Syndrome: Is It Worth It?* Epilepsy Curr. 2014; 14: 22-23
21. Pack A.M.: *Perampanel: Another Choice for Patients With Idiopathic Generalized Epilepsy Who Have Tonic-Clonic Seizures.* Epilepsy Curr. 2016; 16: 27-8
22. Kwan P., Brodie M.J., Laurenza A. i wsp.: *Analysis of pooled phase III trials of adjunctive perampanel for epilepsy: Impact of mechanism of action and pharmacokinetics on clinical outcomes.* Epilepsy Res. 2015; 117: 117-24
23. Lynch B.A., Lambeng N., Nocka K. i wsp.: *The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004; 101: 9861-6
24. Löscher W., Schmidt D.: *Epilepsy: perampanel-new promise for refractory epilepsy?* Nat. Rev. Neurol. 2012; 8: 661-2
25. Chen G., Zeng W.Z., Yuan P.X. i wsp.: *The Mood-Stabilizing Agents Lithium and Valproate Robustly Increase the Levels of the Neuroprotective Protein bcl-2 in the CNS.* J. Neurochem. 1999; 72: 879–82
26. Galanopoulou A.S., Buckmaster P.S., Staley K.J. i wsp.: *American Epilepsy Society Basic Science Committee And The International League Against Epilepsy Working Group On Recommendations For Preclinical Epilepsy Drug Discovery. Identification of new epilepsy treatments: issues in preclinical methodology.* Epilepsia 2012; 53: 571-82
27. Perucca E., Meador K.J.: *Adverse effects of antiepileptic drugs.* Acta Neurol. Scand. 2005; 181: 30-5
28. Perucca P., Gilliam F.G.: *Adverse effects of antiepileptic drugs.* Lancet Neurol. 2012; 11: 792-802
29. Amstutz U., Ross C.J., Castro-Pastrana L.I. i wsp.: *CPNDS Consortium.. HLA-A 31:01 and HLA-B 15:02 as genetic markers for carbamazepine hypersensitivity in children.* Clin. Pharmacol. Ther. 2013; 94: 142-9
30. Amstutz U., Shear N.H., Rieder M.J. i wsp.: *CPNDS clinical recommendation group. Recommendations for HLA-B*15:02 and HLA-A*31:01 genetic testing to reduce the risk of carbamazepine-induced hypersensitivity reactions.* Epilepsia 2014; 55: 496-506

31. Olesen J.B., Abildstrøm S.Z., Erdal J. i wsp.: *Effects of epilepsy and selected antiepileptic drugs on risk of myocardial infarction, stroke, and death in patients with or without previous stroke: a nationwide cohort study*. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* 2011; 20: 964-71
32. Renoux C., Dell'Aniello S., Saarela O. i wsp.: *Antiepileptic drugs and the risk of ischaemic stroke and myocardial infarction: a population-based cohort study*. *BMJ Open* 2015; 12: 5(8)
33. Dorszewska J., Łagan-Jedrzejczyk U., Kowalska M. i wsp.: *Antiepileptic Drugs and Risk Factors of Vascular Diseases. Epileptology- The Modern State of Science*. InTech 2016: 195-209
34. Sniezawska A., Dorszewska J., Rozycka A. i wsp.: *MTHFR, MTR, and MTHFD1 gene polymorphisms compared to homocysteine and asymmetric dimethylarginine concentrations and their metabolites in epileptic patients treated with antiepileptic drugs*. *Seizure* 2011; 20: 533-40
35. Vyas M.V., Davidson B.A., Escalaya L. i wsp.: *Antiepileptic drug use for treatment of epilepsy and dyslipidemia: Systematic review*. *Epilepsy Res.* 2015; 113: 44-67
36. Sarangi S.C., Tripathi M., Kakkar A.K. i wsp.: *Comparison of body composition in persons with epilepsy on conventional & new antiepileptic drugs*. *Indian J. Med. Res.* 2016; 143: 323-30
37. Steinborn B.: *Leczenie padaczki u dzieci i młodzieży*. Termedia Poznań 2011: 57-59
38. Zaccara G., Perucca E.: *Interactions between antiepileptic drugs, and between antiepileptic drugs and other drugs*. *Epileptic Disord.* 2014; 16: 409-31
39. Patsalos P.N., Perucca E.: *Clinically important drug interactions in epilepsy: general features and interactions between antiepileptic drugs*. *Lancet Neurol.* 2003; 2: 347-56
40. Jędrzejczak J., Majkowska-Zwolińska B., Ryglewicz D.: *Zalecenia Polskiego Towarzystwa Epileptologii dotyczące leczenia napadów padaczkowych u dorosłych*. *J. Epileptology* 2014; 22: 3-11
41. Brambila-Tapia A.J.: *MDR1 (ABCB1) polymorphisms: functional effects and clinical implications*. *Rev. Invest. Clin.* 2013; 65: 445-54
42. Panczyk M., Sałagacka A., Mirowski M.: *Gen MDR1 (ABCB1) kodujący glikoproteinę P (P-gp) z rodziny transporterów błonowych ABA: znaczenie dla terapii i rozwoju nowotworów*. *Post. Bioch.* 2007; 53: 361-73
43. Thiebaut F., Tsuruo T., Hamada H. i wsp.: *Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1987; 84: 7735-8
44. Tishler D.M., Weinberg K.I., Hinton D.R. i wsp.: *MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy*. *Epilepsia* 1995; 36: 1-6
45. Löscher W., Potschka H.: *Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002; 301: 7-14
46. Feldmann M., Koeppe M.: *P-glycoprotein imaging in temporal lobe epilepsy: in vivo PET experiments with the Pgp substrate [11C]-verapamil*. *Epilepsia* 2012; 53: 60-3

47. Ortega-Vázquez A., Dorado P., Fricke-Galindo I. i wsp.: *CYP2C9, CYP2C19, ABCB1 genetic polymorphisms and phenytoin plasma concentrations in Mexican-Mestizo patients with epilepsy.* Pharmacogenomics J. 2016; 16: 286-92
48. Luna-Tortós C., Fedrowitz M., Löscher W.: *Several major antiepileptic drugs are substrates for human P-glycoprotein.* Neuropharmacology 2008; 55: 1364-75
49. Lovrić M., Božina N., Hajnšek S. i wsp.: *Association between lamotrigine concentrations and ABCB1 polymorphisms in patients with epilepsy.* Ther. Drug Monit. 2012; 34: 518-25
50. Zhou Y., Wang X., Li H. i wsp.: *Polymorphisms of ABCG2, ABCB1 and HNF4 α are associated with Lamotrigine trough concentrations in epilepsy patients.* Drug Metab. Pharmacokinet. 2015; 30: 282-7
51. Baltes S., Fedrowitz M., Tortós C.L. i wsp.: *Valproic acid is not a substrate for P-glycoprotein or multidrug resistance proteins 1 and 2 in a number of in vitro and in vivo transport assays.* J. Pharmacol. Exp. Ther. 2007; 320: 331-43
52. Wang P., Yin T., Ma H.Y. i wsp.: *Effects of CYP3A4/5 and ABCB1 genetic polymorphisms on carbamazepine metabolism and transport in Chinese patients with epilepsy treated with carbamazepine in monotherapy and bitherapy.* Epilepsy Res. 2015; 117: 52-7
53. Zu Y., Yang Z., Tang S. i wsp.: *Effects of P-glycoprotein and its inhibitors on apoptosis in K562 cells.* Molecules 2014; 19: 13061-75
54. Zhao J.J., Wang D., Yao H. i wsp.: *CTLA-4 and MDR1 polymorphisms increase the risk for ulcerative colitis: A meta-analysis.* World J. Gastroenterol. 2015; 21: 10025-40
55. Sheng X., Zhang L., Tong N. i wsp.: *MDR1 C3435T polymorphism and cancer risk: a meta-analysis based on 39 case-control studies.* Mol. Biol. Rep. 2012; 39: 7237-49
56. Zhang B.B., Xuan C., Deng K.F. i wsp.: *Association between the MDR1 gene variant C3435T and risk of leukaemia: a meta-analysis.* Eur. J. Cancer 2013; 22: 617-25
57. Wang Z.C., Liu L.Z., Liu X.Y. i wsp.: *Genetic polymorphisms of the multidrug resistance 1 gene MDR1 and the risk of hepatocellular carcinoma.* Tumour Biol. 2015; 36: 7007-15
58. Shen F.R., Yan C.Y., Liu M. i wsp.: *Relationship between multidrug resistance 1 polymorphisms and the risk of prostate cancer in Chinese populations.* Genet. Mol. Res. 2013; 19: 12(3)
59. Balan S., Bharathan S.P., Vellichiramal N.N.: *Genetic Association Analysis of ATP Binding Cassette Protein Family Reveals a Novel Association of ABCB1 Genetic Variants with Epilepsy Risk, but Not with Drug-Resistance.* PLoS ONE 2014; 9 (2)
60. Chouchi M., Kaabachi W., Klaa H. i wsp.: *Relationship between ABCB1 3435TT genotype and antiepileptic drugs resistance in Epilepsy: updated systematic review and meta-analysis.* BMC Neurol. 2017; 17: 32

61. Fajac A., Gligorov J., Rezai K. i wsp.: *Effect of ABCB1 C3435T polymorphism on docetaxel pharmacokinetics according to menopausal status in breast cancer patients*. Br. J. Cancer 2010; 103: 560-6
62. Jeleń A.M., Sałagacka A., Żebrowska M.K. i wsp.: *The Influence of C3435T Polymorphism of the ABCB1 Gene on Genetic Susceptibility to Depression and Treatment Response in Polish Population - Preliminary Report*. Int. J. Med. Sci. 2015; 12: 974-79
63. Ahmed S.S., Husain R.S., Kumar S. i wsp.: *Association between MDR1 gene polymorphisms and Parkinson's disease in Asian and Caucasian populations: a meta-analysis*. J. Neurol. Sci. 2016; 368: 255-62
64. Cao Y., Qu C., Chen Y. i wsp.: *Association of ABCB1 polymorphisms and ulcerative colitis susceptibility*. Int. J. Clin. Exp. Pathol. 2015; 8: 943-7
65. Zhou Z., Chen Q., Zuo D. i wsp.: *ABCB1 (rs1128503) polymorphism and response to chemotherapy in patients with malignant tumors-evidences from a meta-analysis*. Int. J. Clin. Exp. Med. 2015; 8: 265-72
66. Dong L., Luo R., Tong Y. i wsp.: *Lack of association between ABCB1 gene polymorphisms and pharmaco-resistant epilepsy: an analysis in a western Chinese pediatric population*. Brain Res. 2011; 1391: 114-24
67. Meng H., Guo G., Ren J. i wsp.: *Effects of ABCB1 polymorphisms on plasma carbamazepine concentrations and pharmaco-resistance in Chinese patients with epilepsy*. Epilepsy Behav. 2011; 21: 27-30
68. Haerian B.S., Lim K.S., Tan H.J. i wsp.: *Association between ABCB1 polymorphism and response to sodium valproate treatment in Malaysian epilepsy patients*. Epileptic Disord. 2011; 13: 65-75
69. Sun F., Cao B.Q., Wang B. i wsp.: *Association between ABCB1 genetic polymorphism and the effect on epilepsy following phenytoin treatment*. Exp. Ther. Med. 2016; 12: 1780-4
70. Hitzl M., Drescher S., Van der Kuip H. i wsp.: *The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells*. Pharmacogenetics 2001; 11: 293-8
71. Siegmund M., Brinkmann U., Schäffeler E. i wsp.: *Association of the P-glycoprotein transporter MDR1(C3435T) polymorphism with the susceptibility to renal epithelial tumors*. J. Am. Soc. Nephrol. 2002; 13: 1847-54
72. Hoffmeyer S., Burk O., von Richter O. i wsp.: *Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo*. P. Natl. Acad. Sci. USA 2000; 97: 3473-8

73. Skalski D., Wendorff J., Romanowicz H. i wsp.: *Associations between MDR1 C3435T polymorphism and drug-resistant epilepsy in the Polish population*. Acta Neurol. Belg. 2017; 117: 153-8
74. Seven M., Batar B., Unal S. i wsp.: *The drug-transporter gene MDR1 C3435T and G2677T/A polymorphisms and the risk of multidrug-resistant epilepsy in Turkish children*. Mol. Biol. Rep. 2014; 41: 331-6
75. Kim D.W., Kim M., Lee S.K. i wsp.: *Lack of association between C3435T nucleotide MDR1 genetic polymorphism and multidrug-resistant epilepsy*. Seizure 2006; 15: 344-7
76. Bournissen F.G., Moretti M.E., Juurlink D.N. i wsp.: *Polymorphism of the MDR1/ABCB1 C3435T drug-transporter and resistance to anticonvulsant drugs: a meta-analysis*. Epilepsia 2009; 50: 898-903
77. Sun G., Sun X., Guan L.: *Association of MDR1 gene C3435T polymorphism with childhood intractable epilepsy: a meta-analysis*. J. Neural. Transm. 2014; 121: 717-24
78. Cheng J.W., Zhang L.J., Hou Y.Q. i wsp.: *Association between MDR1 C3435T polymorphism and refractory epilepsy in the Chinese population: a systematic review and meta-analysis*. Epilepsy Behav. 2014; 36: 173-9
79. Shaheen U., Prasad D.K., Sharma V. i wsp.: *Significance of MDR1 gene polymorphism C3435T in predicting drug response in epilepsy*. Epilepsy Res. 2014; 108: 251-6
80. Keangpraphun T., Towanabut S., Chinvarun Y. i wsp.: *Association of ABCB1 C3435T polymorphism with phenobarbital resistance in Thai patients with epilepsy*. J. Clin. Pharm. Ther. 2015; 40: 315-9
81. Nurmohamed L., Garcia-Bournissen F., Buono R.J. i wsp.: *Predisposition to epilepsy-does the ABCB1 gene play a role?* Epilepsia 2010; 51: 1882-5
82. Stasiołek M., Romanowicz H., Połatyńska K. i wsp.: *Association between C3435T polymorphism of MDR1 gene and the incidence of drug-resistant epilepsy in the population of Polish children*. Behav. Brain Funct. 2016; 12: 21
83. Emich-Widera E., Likus W., Kazek B. i wsp.: *Polymorphism of ABCB1/MDR1 C3435T in children and adolescents with partial epilepsy is due to different criteria for drug resistance - preliminary results*. Med. Sci. Monit. 2014; 20: 1654-61
84. Subenthiran S., Abdullah N.R., Muniandy P.K. i wsp.: *G2677T polymorphism can predict treatment outcome of Malaysians with complex partial seizures being treated with Carbamazepine*. Genet. Mol. Res. 2013; 12: 5937-44
85. Yu L., Liao W.P., Yi Y.H. i wsp.: *ABCB1 G2677T/A polymorphism is associated with the risk of drug-resistant epilepsy in Asians*. Epilepsy Res. 2015; 115: 100-8

86. Kerr J. F., Wyllie A.H., Currie A.R.: *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics*. Br. J. Cancer 1972; 26: 239-57
87. Kozubski W., Dorszewska J.: *Homocysteina a farmakoterapia w neurologii*. UMP Poznań 2012: 167-8
88. Kroemer G., Galluzi L., Vandenabeele P. i wsp.: *Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2009*. Cell Death Differ. 2009; 16: 3-11
89. Stępień A., Izdebska M., Grzanka A.: *Rodzaje śmierci komórki*. Postepy Hig. Med. Dosw. 2007; 61: 420-8
90. Elmore S.: *Apoptosis: A Review of Programed Cell Death*. Toxicol. Pathol. 2007; 35: 495-516
91. Kozubski W., Dorszewska J.: *Apoptoza w chorobach ośrodkowego układu nerwowego*. Czelej 2008: 50-6
92. Pistritto G., Trisciuglio D., Ceci C. i wsp.: *Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies*. Aging 2016; 8: 603-19
93. Peter M.E., Krammer P.H.: *The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond*. Cell Death Differ. 2003; 10: 26-35
94. Johnstone R.W., Cretney E., Smyth M.J.: *Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy*. Cell 2002; 108: 153-64
95. Łabędzka K., Grzanka A., Izdebska M.: *Mitochondrium a śmierć komórki*. Postepy Hig. Med. Dosw. 2006; 60: 439-46
96. Wang X.: *The expanding role of mitochondria in apoptosis*. Genes Dev. 2001; 15: 2922-33
97. Trapani J.A., Smyth M.J.: *Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway*. Nat. Rev. Immunol. 2002; 2: 735-47
98. Pardo J., Wallich R., Martin P. i wsp.: *Granzyme B induced cell death exerted by ex vivo CTL: discriminating requirements for cell death and some of its signs*. Cell Death Differ. 2008; 15: 567-79
99. Seideman J.H., Stancevic B., Rotolo J.A. i wsp.: *Alpha particles induce apoptosis through the sphingomyelin pathway*. Radiat. Res. 2011; 176: 434-46
100. Nakagawa T., Zhu H., Morishima N. i wsp.: *Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum- specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta*. Nature 2000; 403: 98-103
101. Korzeniewska- Dyl I.: *Kaspazy struktura i funkcja*. Pol. Merk. Lek., 2007; XXIII, 138: 403
102. Wu H., Che X., Zheng Q. i wsp.: *Caspases: a molecular switch node in the crosstalk between autophagy and apoptosis*. Int. J. Biol. Sci. 2014; 10: 1072-83
103. Ola M.S., Nawaz M., Ahsan H.: *Role of BCL-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis*. Mol. Cell Biochem. 2011; 351: 41-58

104. Doerflinger M., Glab J.A., Puthalakath H.: *BH3-only proteins: a 20-year stock-take*. FEBS J. 2015; 282: 1006-16
105. Huang Q., Petros A.M., Virgin H.W. i wsp.: *Solution structure of a Bcl-2 homolog from Kaposi sarcoma virus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002; 99: 3428-33
106. Zhang X., Jiang Y., Yang J.: *p53-independent signaling pathway in DNA damage-induced cell apoptosis*. Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 2013; 42: 217-23
107. Coutant C., Rouzier R., Qi Y. i wsp.: *Distinct p53 gene signatures are needed to predict prognosis and response to chemotherapy in ER-positive and ER-negative breast cancers*. Clin. Cancer Res. 2011; 17: 2591-601
108. Sznarkowska A., Olszewski R., Zawacka-Pankau J.: *Farmakologiczna aktywacja supresora nowotworu, natywnego białka p53 jako obiecująca strategia zwalczania nowotworów*. Postepy Hig. Med. Dosw. 2010; 64: 396-407
109. Xu J., Lian L.J., Wu C. i wsp.: *Lead induces oxidative stress, DNA damage and alteration of p53, Bax, Bcl2 expressions in mice*. Food Chem. Toxicol. 2008; 46: 1488-94
110. Bielak-Żmijewska A.: *Mechanizmy oporności komórek nowotworowych na apoptozę*. Kosmos 2003; 52: 157-71
111. Chi S.W.: *Structural insights into the transcription-independent apoptotic pathway of p53*. BMB Rep. 2014; 47: 167-72
112. Hernández-Monge J., Rousset-Roman A.B., Medina-Medina I. i wsp.: *Dual function of MDM2 and MDMX toward the tumor suppressors p53 and RB*. Genes & Cancer 2016; 7: 278-87
113. Balaburski G.M., Hontz R.D., Murphy M.E.: *p53 and ARF: Unexpected players in autophagy*. Trends Cell Biol. 2010; 20: 363-9
114. Apeland T., Mansoor M.A., Pentieva K. i wsp.: *The effect of B- vitamins on hyperhomocysteinemia in patients on antiepileptic drug*. Epilepsy Res. 2002; 51: 237-47
115. Gidal B., Tamura T., Hamer A. i wsp.: *Blood homocysteine, folate and vitamin B12 concentrations in patients with epilepsy receiving lamotrigine or sodium valproate for initial monotherapy*. Epilepsy Res. 2005; 64: 161-6
116. Belcastro V., Striano P., Gorgone G. i wsp.: *Hyperhomocysteinemia in epileptic patients on new antiepileptic drugs*. Epilepsia 2010; 51: 274-9
117. Fujiki Y., Hirashima Y., Seshimo S. i wsp.: *Homocysteine induced SH-SY5Y apoptosis through activation of NADPH oxidase in U251MG cells*. Neurosci. Res. 2012; 72: 9-15
118. Boldyrev A.A.: *Molecular mechanisms of homocysteine toxicity*. Biochemistry 2009; 74: 589-98

119. Wang X., Cui L., Joseph J. i wsp.: *Homocysteine induces cardiomyocyte dysfunction and apoptosis through p38MAPK-mediated increase in oxidant stress*. J. Mol. Cell Cardiol. 2012a; 52: 753-60
120. Levrand S., Pacher P., Pesse B. i wsp.: *Homocysteine induces cell death in H9C2 cardiomyocytes through the generation of peroxynitrite*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007; 359: 445-50
121. Yuan Q., Jiang D.J., Chen Q.Q. i wsp.: *Role of asymmetric dimethylarginine in homocysteine-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007; 356: 880-5
122. Ferlazzo N., Condello S., Currò M. i wsp.: *NF-kappa B activation is associated with homocysteine-induced injury in Neuro2a cells*. BMC Neurosci. 2008; 7: 9-62
123. Kim R., Emi M., Tanabe K. i wsp.: *Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death*. J. Pathol. 2006; 208: 319-26
124. Fridmacher V., Kaltschmidt B., Goudeau B. i wsp.: *Forebrain-specific neuronal inhibition of nuclear factor-kappaB activity leads to loss of neuroprotection*. J. Neurosci. 2003; 23: 9403-8
125. Wang J., Bai X., Chen Y. i wsp.: *Homocysteine Induces Apoptosis of Rat Hippocampal Neurons by Inhibiting 14-3-3 ϵ Expression and Activating Calcineurin*. PLoS ONE 2012b; 7(11)
126. Zbidi H., Redondo P.C., López J.J. i wsp.: *Homocysteine induces caspase activation by endoplasmic reticulum stress in platelets from type2 diabetics and healthy donors*. Thromb. Haemost. 2010; 103: 1022-32
127. Park S.J., Kim K.J., Kim W.U. i wsp.: *Involvement of endoplasmic reticulum stress in homocysteine-induced apoptosis of osteoblastic cells*. J. Bone Miner. Metab. 2012; 30: 474-84
128. Bao X.M., Wu C.F., Lu G.P.: *Atorvastatin attenuates homocysteine-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells via inhibiting NADPH oxidase-related oxidative stress-triggered p38MAPK signaling*. Acta Pharmacol. Sin. 2009; 30: 1392-8
129. Xu Z., Lu G., Wu F.: *Simvastatin suppresses homocysteine-induced apoptosis in endothelial cells: roles of caspase-3, cIAP-1 and cIAP-2*. Hypertens. Res. 2009; 32: 375-80
130. Nobili P., Colciaghi F., Finardi A. i wsp.: *Continuous neurodegeneration and death pathway activation in neurons and glia in an experimental model of severe chronic epilepsy*. Neurobiol. Dis. 2015; 83: 54-66
131. Waldbaum S., Patel M.: *Mitochondrial Oxidative Stress in Temporal Lobe Epilepsy*. Epilepsy Res. 2010; 88: 23-45
132. Meldrum B.S., Bruton C.J.: *Epilepsy. Greenfield's Neuropathology*. Oxford University Press 1992: 1246-83

133. Liu R.S., Lemieux L., Bell G.S. i wsp.: *Progressive neocortical damage in epilepsy*. Ann. Neurol. 2003; 53: 312-24
134. Henshall D.C.: *Apoptosis signalling pathways in seizure-induced neuronal death and epilepsy*. Biochem. Soc. Trans. 2007; 35: 421-3
135. Zhao H., Lin G., Shi M. i wsp.: *The mechanism of neurogenic pulmonary edema in epilepsy*. J. Physiol. Sci. 2014; 64: 65-72
136. Lagneaux L., Gillet N., Stamatopoulos B. i wsp.: *Valproic acid induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells through activation of the death receptor pathway and potentiates TRAIL response*. Exp. Hematol. 2007; 35: 1527-37
137. Philips A., Bullock T., Plant N.: *Sodium valproate induces apoptosis in the rat hepatoma cell line*. Toxicology 2003; 192: 219-27
138. Yagi Y., Fushida S., Harada S. i wsp.: *Effects of valproic acid on the cell cycle and apoptosis through acetylation of histone and tubulin in a scirrhous gastric cancer cell line*. J. Exp. Clin. Cancer Res. 2010; 29: 149
139. Fortson W.S., Kayarthodi S., Fujimura Y. i wsp.: *Histone deacetylase inhibitors, valproic acid and trichostatin-A induce apoptosis and affect acetylation status of p53 in ERG-positive prostate cancer cells*. Int. J. Oncol. 2011; 39: 111-9
140. Roy Choudhury S., Karmakar S., Banik N.L. i wsp.: *Valproic acid induced differentiation and potentiated efficacy of taxol and nanotaxol for controlling growth of human glioblastoma LN18 and T98G cells*. Neurochem. Res. 2011; 36: 2292- 305
141. Zhang C., Liu S., Yuan X. i wsp.: *Valproic Acid Promotes Human Glioma U87 Cells Apoptosis and Inhibits Glycogen Synthase Kinase-3 β Through ERK/Akt Signaling*. Cell Physiol. Biochem. 2016; 39: 2173-85
142. Kaminsky V.O., Surova O.V., Vaculova A. i wsp.: *Combined inhibition of DNA methyltransferase and histone deacetylase restores caspase-8 expression and sensitizes SCLC cells to TRAIL*. Carcinogenesis 2011; 32: 1450-8
143. Tung E.W., Winn L.M.: *Valproic acid increases formation of reactive oxygen species and induces apoptosis in postimplantation embryos: a role for oxidative stress in valproic acid-induced neural tube defects*. Mol. Pharmacol. 2011; 80: 979-87
144. Zhao X., Yang W., Shi C. i wsp.: *The G1 phase arrest and apoptosis by intrinsic pathway induced by valproic acid inhibit proliferation of BGC-823 gastric carcinoma cells*. Tumour Biol. 2011; 32: 335-46
145. Turski C.A., Ikonomidou C.: *Neuropathological sequelae of developmental exposure to antiepileptic and anesthetic drugs*. Front. Neurol. 2012; 3: 120

146. Chuang D.M.: *The antiapoptotic actions of mood stabilizers: molecular mechanisms and therapeutic potentials*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2005; 1053: 195-204
147. Zhang Z., Qin X., Tong N.: *Valproic acid-mediated neuroprotection in retinal ischemia injury via histone deacetylase inhibition and transcriptional activation*. Exp. Eye Res. 2012; 94: 98-108
148. Gao X.M., Margolis R.L., Leeds P. i wsp.: *Carbamazepine induction of apoptosis in cultured cerebellar neurons: effects of N-methyl-D-aspartate, aurointricarboxylic acid and cycloheximide*. Brain Res. 1995; 703: 63-71
149. Katz I., Kim J., Gale K. i wsp.: *Effects of lamotrigine alone and in combination with MK-801, phenobarbital, or phenytoin on cell death in the neonatal rat brain*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2007; 322: 494-500
150. Forcelli P.A., Kim J., Kondratyev A. i wsp.: *Pattern of antiepileptic drug-induced cell death in limbic regions of the neonatal rat brain*. Epilepsia 2011; 52: 207-11
151. Cansu A., Giray S.G., Serdaroglu A. i wsp.: *Effects of chronic treatment with valproate and oxcarbazepine on ovarian folliculogenesis in rats*. Epilepsia 2008; 49: 1192-201
152. Cansu A., Erdogan D., Serdaroglu A. i wsp.: *Histologic and morphologic effects of valproic acid and oxcarbazepine on rat uterine and ovarian cells*. Epilepsia 2010; 51: 98-107
153. Das A., McDowell M., O'Dell C.M. i wsp.: *Post-treatment with voltage-gated Na(+) channel blocker attenuates kainic acid-induced apoptosis in rat primary hippocampal neurons*. Neurochem. Res. 2010; 35: 2175-83
154. Mao X., Ji C., Sun C. i wsp.: *Topiramate attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils via activating GABAergic signaling and inhibiting astrogliosis*. Neurochem. Int. 2012; 60: 39-46
155. Huang S., Wang H., Xu Y. i wsp.: *The protective action of topiramate on dopaminergic neurons*. Med. Sci. Monit. 2010; 1: 307-12
156. Kurul S.H., Yiş U., Kumral A. i wsp.: *Protective effects of topiramate against hyperoxic brain injury in the developing brain*. Neuropediatrics 2009; 40: 22-7
157. Ha K.Y., Carragee E., Cheng I. i wsp.: *Pregabalin as a neuroprotector after spinal cord injury in rats: biochemical analysis and effect on glial cells*. J. Korean Med. Sci. 2011; 247: 404-11
158. Kawajiri S., Machida Y., Saiki S. i wsp.: *Zonisamide reduces cell death in SH-SY5Y cells via an anti-apoptotic effect and by upregulating MnSOD*. Neurosci. Lett. 2010; 481: 88-91
159. Bittigau P., Sifringer M., Genz K. i wsp.: *Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002; 99: 15089-94

160. Duboc A., Hanoteau N., Simonutti M. i wsp.: *Vigabatrin, the GABA-transaminase inhibitor, damages cone photoreceptors in rats*. Ann. Neurol. 2004; 55: 695-705
161. Kwiecińska P., Wiśniewska J., Gregoraszczyk E.Ł.: *Effects of valproic acid (VPA) and levetiracetam (LEV) on proliferation, apoptosis, and hormone secretion of the human choriocarcinoma BeWo cell Line*. Pharmacol. Rep. 2011; 63: 1195-202
162. Kim J.S., Kondratyev A., Gale K.: *Antiepileptic drug-induced neuronal cell death in the immature brain: effects of carbamazepine, topiramate, and levetiracetam as monotherapy versus polytherapy*. JPET 2007; 323: 165-73
163. Nakato Y., Abekawa T., Ito K. i wsp.: *Lamotrigine blocks apoptosis induced by repeated administration of high-dose methamphetamine in the medial prefrontal cortex of rats*. Neurosci. Lett. 2011; 49: 161-4
164. Xu T., Nicolson S., Denton D. i wsp.: *Distinct requirements of Autophagy-related genes in programmed cell death*. Cell Death Differ. 2015; 22: 792-802
165. Parzych K.R., Klionsky D.J.: *An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism and Regulation*. Antioxid. Redox Signal. 2014; 20: 460-73
166. Rudnicka K.W., Szczesna E., Miszczyk E. i wsp.: *Apoptoza i autofagia mechanizmy i metody detekcji*. Postępy Biol. Komórki 2011; 38: 247-65
167. Polewska J.: *Autofagia mechanizm molekularnym apoptoza i nowotwory*. Postepy Hig. Med. Dosw. 2012; 66: 921-36
168. Eisenberg-Lerner A., Bialik S., Simon H.U. i wsp.: *Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them*. Cell Death Differ. 2009; 16: 966-75
169. Balaburski G.M., Hontz R.D., Murphy M.E.: *p53 and ARF: Unexpected players in autophagy*. Trends Cell Biol. 2010; 20: 363-9
170. Khan S., Jena G., Tikoo K. i wsp.: *Valproate attenuates the proteinuria, podocyte and renal injury by facilitating autophagy and inactivation of NF- κ B/iNOS signaling in diabetic rat*. Biochimie 2015; 110: 1-16
171. Wang X., Ma M., Teng J. i wsp.: *Valproate Attenuates 25-kDa C-Terminal Fragment of TDP-43-Induced Neuronal Toxicity via Suppressing Endoplasmic Reticulum Stress and Activating Autophagy*. Int. J. Biol. Sci. 2015; 11: 752-61
172. Li L., Zhang S., Zhang X. i wsp.: *Autophagy enhancer carbamazepine alleviates memory deficits and cerebral amyloid- β pathology in amouse model of Alzheimer's disease*. Curr. Alzheimer Res. 2013; 10: 433-41
173. Puls F., Goldschmidt I., Bantel H. i wsp.: *Autophagy-enhancing drug carbamazepine diminishes hepatocellular death in fibrinogen storage disease*. J. Hepatol. 2013; 59: 626-30

174. Wu H., Lu M.H., Wang W. i wsp.: *Lamotrigine Reduces β -Site A β PP-Cleaving Enzyme 1 Protein Levels Through Induction of Autophagy*. J. Alzheimers Dis. 2015; 46: 863-76
175. Jensen F.E.: *Introduction. Posttraumatic epilepsy: treatable epileptogenesis*. Epilepsia 2009; 50: 1-3
176. Pitkänen A., Lukasiuk K., Dudek F.E. i wsp.: *Epileptogenesis*. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2015; 5 (10)
177. Jędrzejczak J.: *Padaczka*. BNP Lublin 2006: 13-17
178. Armijo J.A., Shushtarian M., Valdizan E.M. i wsp.: *Ion channels and epilepsy*. Curr. Pharm. Des. 2005; 11: 1975-2003
179. 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: 157-62
180. Hosford D.A., Crain B.J., Cao Z. i wsp.: *Increased AMPA-sensitive quisqualate receptor binding and reduced NMDA receptor binding in epileptic human hippocampus*. J. Neurosci. 1991; 11: 428-34
181. Shin E.J., Jeong J.H., Chung Y.H. i wsp.: *Role of oxidative stress in epileptic seizures*. Neurochem. Int. 2011; 59: 122-37
182. Fujikawa D.G., Itabashi H.H., Wu A. i wsp.: *Status epilepticus-induced neuronal loss in humans without systemic complications or epilepsy*. Epilepsia 2000; 41: 981-91
183. Karbowski L.M., Parker G.H., Persinger M.A.: *Post-seizure drug treatment in young rats determines clear incremental losses of frontal cortical and hippocampal neurons: the resultant damage is similar to very old brains*. Epilepsy Behav. 2013; 27: 18-21
184. Chang B.S., Lowenstein D.H.: *Epilepsy*. N. Engl. J. Med. 2003; 349: 1257-66
185. Thom M.: *Hippocampal sclerosis: progress since Sommer*. Brain Pathol. 2009; 19: 565-72
186. Boison D.: *The adenosine kinase hypothesis of epileptogenesis*. Progr. Neurobiol. 2008; 84: 249-62
187. Dorszewska J., Winczewska-Wiktor A., Śnieżawska A. i wsp.: *Homocysteine and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in epilepsy*. Przegl. Lek. 2009; 66: 448-52
188. Hamed S.A., Nabeshima T.: *The high atherosclerotic risk among epileptics: the atheroprotective role of multivitamins*. J. Pharmacol. Sci. 2005; 98: 340-53
189. Hamed S.A.: *Atherosclerosis in epilepsy: its causes and implications*. Epilepsy Behav. 2014; 41: 290-6
190. Verrotti A., Domizio S., Angelozzi B. i wsp.: *Changes in serum lipids and lipoproteins in epileptic children treated with anticonvulsants*. J. Paediatr. Child Health. 1997; 33: 242-5

191. Tümer L., Serdaroğlu A., Hasanoğlu A. i wsp.: *Plasma homocysteine and lipoprotein (a) levels as risk factors for atherosclerotic vascular disease in epileptic children taking anticonvulsants*. Acta Paediatr. 2002; 91: 923-6
192. Brämsswig S., Sudhop T., Luers C. i wsp.: *Lipoprotein(a) concentration increases during treatment with carbamazepine*. Epilepsia 2003; 44: 457-60
193. Oz O., Gökçil Z., Bek S. i wsp.: *Is asymmetric dimethylarginine responsible for the vascular events in patients under antiepileptic drug treatment?* Epilepsy Res. 2009; 87: 54-8
194. Gorgone G., Caccamo D., Pisani L.R. i wsp.: *Hyperhomocysteinemia in patients with epilepsy: does it play a role in the pathogenesis of brain atrophy? A preliminary report*. Epilepsia 2009; 50: 33-6
195. Łagan-Jędrzejczyk U., Lianeri M., Kozubski W. i wsp.: *Homocysteine and apoptotic factors in epileptic patients treated with anti-epileptic drugs*. W: *Homocysteine: biosynthesis and health implications*. Nova Science Publishers New York 2014: 83-111
196. Coppola G., Ingrosso D., Operto F.F. i wsp.: *Role of folic acid depletion on homocysteine serum level in children and adolescents with epilepsy and different MTHFR C677T genotypes*. Seizure 2012; 21: 340-3
197. Huemer M., Ausserer B., Graninger G. i wsp.: *Hyperhomocysteinemia in children treated with antiepileptic drugs is normalized by folic acid supplementation*. Epilepsia 2005; 46: 1677-83
198. Agnati L.F., Genedani S., Rasio G. i wsp.: *Studies on homocysteine plasma levels in Alzheimer's patients. Relevance for neurodegeneration*. J. Neural. Transm. 2005; 112: 163-9
199. Baldelli E., Leo G., Andreoli N. i wsp.: *Homocysteine potentiates seizures and cell loss induced by pilocarpine treatment*. Neuromolecular Med. 2010; 12: 248-59
200. Hrnčić D., Rašić-Marković A., Macut D. i wsp.: *Homocysteine thiolactone-induced seizures in adult rats are aggravated by inhibition of inducible nitric oxide synthase*. Hum. Exp. Toxicol. 2014; 33: 496-503
201. Borowczyk K., Shih D.M., Jakubowski H.: *Metabolism and neurotoxicity of homocysteine thiolactone in mice: evidence for a protective role of paraoxonase 1*. J. Alzheimers Dis. 2012; 30: 225-31
202. Bochyńska A., Graban A.: *Wpływ leków przeciwpadaczkowych na metabolizm homocysteiny u chorych z padaczką i jego kliniczne konsekwencje*. Post. Psych. Neurol. 2013; 22: 259-68
203. Bleich S., Degner D., Bandelow B. i wsp.: *Plasma homocysteine is a predictor of alcohol withdrawal seizures*. Neuroreport 2000; 11: 2749-52
204. Kurth C., Wegerer V., Degner D. i wsp.: *Risk assessment of alcohol withdrawal seizures with a Kohonen feature map*. Neuroreport 2001; 12: 1235-8

205. Kim D.W., Kim H.K., Bae E.K. i wsp.: *Clinical predictors for delirium tremens in patients with alcohol withdrawal seizures*. Am. J. Emerg. Med. 2015; 33: 701-4
206. Linnebank M., Moskau S., Semmler A. i wsp.: *Antiepileptic drugs interact with folate and vitamin B12 serum levels*. Ann. Neurol. 2011; 69: 352-9
207. Verrotti A., Pascarella R., Trotta D. i wsp.: *Hyperhomocysteinemia in children treated with sodium valproate and carbamazepine*. Epilepsy Res. 2000; 41: 253-7
208. Attilakos A., Papakonstantinou E., Schulpis K. i wsp.: *Early effect of sodium valproate and carbamazepine monotherapy on homocysteine metabolism in children with epilepsy*. Epilepsy Res. 2006; 71: 229-32
209. Ozdemir O., Yakut A., Dinleyici E.C. i wsp.: *Serum asymmetric dimethylarginine (ADMA), homocysteine, vitamin B(12), folate levels, and lipid profiles in epileptic children treated with valproic acid*. Eur. J. Pediatr. 2011; 170: 873-7
210. Elliott J.O., Jacobson M.P., Haneef Z.: *Homocysteine and bone loss in epilepsy*. Seizure 2007; 16: 22-34
211. Gidal B.E., Tamura T., Hammer A. i wsp.: *Blood homocysteine, folate and vitamin B-12 concentrations in patients with epilepsy receiving lamotrigine or sodium valproate for initial monotherapy*. Epilepsy Res. 2005; 64: 161-6
212. Vurucu S., Demirkaya E., Kul M. i wsp.: *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: 844-8
213. Ono H., Sakamoto A., Eguchi T. i wsp.: *Plasma total homocysteine concentrations in epileptic patients taking anticonvulsants*. Metabolism 1997; 46: 959-62
214. Borowczyk K., Tisończyk J., Jakubowski H.: *Metabolism and neurotoxicity of homocysteine thiolactone in mice: protective role of bleomycin hydrolase*. Amino Acids 2012; 43: 1339-48
215. Toohey J.I.: *Possible involvement of sulfane sulfur in homocysteine-induced atherosclerosis*. Med. Hypotheses. 2001; 56: 259-61
216. Liu R.S., Lemieux L., Bell G.S. i wsp.: *Cerebral damage in epilepsy: a population-based longitudinal quantitative MRI study*. Epilepsia 2005; 46: 1482-94
217. Engel T., Henshall D.C.: *Apoptosis, Bcl-2 family proteins and caspases: the ABCs of seizure-damage and epileptogenesis?* Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol. 2009; 1: 97-115
218. Łagan-Jędrzejczyk U., Oczkowska A., Florczak A. i wsp.: *The level of apoptotic cells and antiepileptic drug (AEDs) pharmacotherapy in epilepsy patients*. Eur. J. Neurol. 2016; 23 Suppl. 2: 772

219. Henshall D.C., Engel T.: *Contribution of apoptosis-associated signaling pathways to epileptogenesis: lessons from Bcl-2 family knockouts*. Front. Cell. Neurosci. 2013; 7:110
220. Pitkänen A.: *Drug-mediated neuroprotection and antiepileptogenesis: animal data*. Neurology 2002; 59: 27-33
221. Löscher W., Brandt C.: *Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research*. Pharmacol. Rev. 2010; 62: 668-700
222. Kaae J., Carstensen L., Wohlfahrt J. i wsp.: *Epilepsy, anti-epileptic medication use and risk of cancer*. Int. J. Cancer. 2014; 134: 932-8
223. Singh G., Bell G.S., Driever P.H. i wsp.: *Cancer risk in people with epilepsy using valproate-sodium*. Acta Neurol. Scand. 2012; 125: 234-40
224. Mawatari T., Ninomiya I., Inokuchi M. i wsp.: *Valproic acid inhibits proliferation of HER2-expressing breast cancer cells by inducing cell cycle arrest and apoptosis through Hsp70 acetylation*. Int. J. Oncol. 2015; 47: 2073-81
225. Kilany A., Raouf E.R., Gaber A.A. i wsp.: *Elevated serum Bcl-2 in children with temporal lobe epilepsy*. Seizure 2012; 21: 250-3
226. Lin R.T., Cai R.R., Zhang P.F. i wsp.: *Apoptosis and expression of Caspase 3 and Caspase 4 in neurocytes of refractory human temporal lobe epilepsy*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi 2016; 96: 522-5
227. Krook-Magnuson E., Armstrong C., Oijala M. i wsp.: *On-demand optogenetic control of spontaneous seizures in temporal lobe epilepsy*. Nat. Commun. 2013; 4:1376
228. Łagan-Jędrzejczyk U., Oczkowska A., Florczak A. i wsp.: *ABCB1/MDR1 gene polymorphisms and the level of apoptotic factors in epilepsy patients treated with antiepileptic drugs*. Eur. J. Neurol. 2015; 22 Suppl.1: 341
229. Guéant J.L., Caillerez-Fofou M., Battaglia-Hsu S. i wsp.: *Molecular and cellular effects of vitamin B12 in brain, myocardium and liver through its role as co-factor of methionine synthase*. Biochimie 2013; 95: 1033-40
230. Marguerite V., Beri-Dexheimer M., Ortiou S. i wsp.: *Cobalamin potentiates vinblastine cytotoxicity through downregulation of mdr-1 gene expression in HepG2 cells*. Cell Physiol. Biochem. 2007; 20: 967-76
231. Smolarz B., Skalski D., Rysz A. i wsp.: *Polymorphism of the multidrug resistance 1 gene MDR1 G2677T/A (rs2032582) and the risk of drug-resistant epilepsy in the Polish adult population*. Acta Neurol. Belg. 2017; 117: 849-55
232. Dudarewicz M., Barańska M., Rychlik-Sych M. i wsp.: *C3435T polymorphism of the ABCB1/MDR1 gene encoding P-glycoprotein in patients with inflammatory bowel disease in a Polish population*. Pharmacol. Rep. 2012; 64: 343-50

233. Bogacz A., Mrozikiewicz P.M., Deka-Pawlik D. i wsp.: *Frequency of G2677T/A and C3435T polymorphisms of MDR1 gene in preeclamptic women*. Ginekol. Pol. 2013; 84: 781-7
234. Tan E.K., Drozdziak M., Bialecka M. i wsp.: *Analysis of MDR1 haplotypes in Parkinson's disease in a white population*. Neurosci. Lett. 2004; 372: 240-4
235. Alpman A., Ozkinay F., Tekgul H. i wsp.: *Multidrug resistance 1 (MDR1) gene polymorphisms in childhood drug-resistant epilepsy*. J. Child Neurol. 2010; 25: 1485-90

10. Spis rycin

Ryc.1. Schemat leczenia nowo zdiagnozowanych napadów ogniskowych u dorosłych.....	17
Ryc.2. Schemat leczenia nowo zdiagnozowanych napadów toniczno-klonicznych u dorosłych.....	18
Ryc.3. Lokalizacja genu <i>ABCB1/MDR1</i> na długim ramieniu 7 chromosomu według Genetics Home Reference: http://ghr.nlm.nih.gov/gene/ABCB1	19
Ryc.4. Narządy wykazujące wysoką ekspresję P-gp w warunkach fizjologicznych według Drug Interactions, S.Penzak, Online Presentation.....	20
Ryc.5. Szlaki apoptozy; 1A – szlak zewnętrzny, 1B – szlak wewnętrzny, 1C – szlak pseudoreceptorowy, 1D – szlak sfi ngomielinowo-ceramidowy, 1E – szlak indukowany stresem.....	24
Ryc.6. Podwójna rola białka p53 w indukowaniu apoptozy.....	28
Ryc.7. Główne kierunki przemian homocysteiny.....	29
Ryc.8. Główne drogi wzbudzania apoptozy z udziałem homocysteiny.....	31
Ryc.9. Wpływ wybranych LPP na proces apoptozy.....	33
Ryc.10. Przykładowe szlaki wzajemnego oddziaływania apoptozy i autofagii.....	35
Ryc.11. Przykładowe wyniki analizy HRM dla polimorfizmu C1236T genu <i>ABCB1/MDR1</i>	45
Ryc.12. Przykładowe fluorogramy uzyskane w wyniku sekwencjonowania eksonu 12 genu <i>ABCB1/MDR1</i>	46
Ryc.13. Przykładowe wyniki analizy HRM dla polimorfizmu C3435T genu <i>ABCB1/MDR1</i>	47
Ryc.14. Przykładowe fluorogramy uzyskane w wyniku sekwencjonowania eksonu 26 genu <i>ABCB1/MDR1</i>	48
Ryc.15. Przykładowe wyniki analizy HRM dla polimorfizmu G2677(A/T) genu <i>ABCB1/MDR1</i>	49
Ryc.16. Przykładowe fluorogramy uzyskane w wyniku sekwencjonowania eksonu 21 genu <i>ABCB1/MDR1</i>	50
Ryc.17. Obraz próbki leukocytów krwi obwodowej z wybramkowaną populacją limfocytów.....	52
Ryc.18. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek w apoptozie u chorych na padaczkę [LPP(+)], [LPP(-)] oraz u osób kontrolnych.....	53
Ryc.19. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek w późnej apoptozie u chorych na padaczkę LPP(+) z napadami ogniskowymi i uogólnionymi oraz w grupie kontrolnej w zależności od genotypów <i>ABCB1/MDR1</i> C1236T.....	65
Ryc.20. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek w późnej apoptozie u chorych na padaczkę LPP(+) z napadami ogniskowymi i uogólnionymi oraz w grupie kontrolnej w zależności od genotypów <i>ABCB1/MDR1</i> C3435T.....	65
Ryc.21. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek w późnej apoptozie u chorych na padaczkę LPP(+) z napadami ogniskowymi i uogólnionymi oraz w grupie kontrolnej w zależności od genotypów <i>ABCB1/MDR1</i> G2677(A/T).....	66

Ryc.22. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek w późnej apoptozie u chorych na padaczkę leczonych monoterapią i politerapią oraz w grupie kontrolnej.....	67
--	----

11. Spis tabel

Tab.1. Klasyfikacja napadów padaczkowych według Międzynarodowej Ligi Przeciwpadaczkowej z 1981r.....	11
Tab.2. Klasyfikacja napadów padaczkowych według Międzynarodowej Ligi Przeciwpadaczkowej z 2010 r.....	12
Tab.3. Klasyfikacja napadów padaczkowych według Międzynarodowej Ligi Przeciwpadaczkowej z 2017 r.....	13
Tab.4. Szczegółowe kryteria włączenia oraz wyłączenia z badań w grupie badanej i kontrolnej.....	38
Tab.5. Skład mieszaniny reakcyjnej wykorzystanej w analizie polimorfizmów C1236T, C3435T oraz G2677(A/T) metodą HRM.....	41
Tab.6. Sekwencje starterów dla polimorfizmów C1236T, C3435T oraz G2677(A/T) temperatura ich przyłączania oraz długość uzyskanego produktu.....	42
Tab.7. Częstość występowania genotypów genu <i>ABCB1/MDR1</i> C1236T, C3435T oraz G2677(A/T) u chorych na padaczkę i u osób z grupy kontrolnej.....	50
Tab.8. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek w apoptozie u chorych na padaczkę [LPP(+)], [LPP(-)] oraz u osób kontrolnych.....	52
Tab.9. Różnice statystycznie istotne w teście Spearmana w grupie kontrolnej, w grupie chorych LPP(-) i LPP(+).	54
Tab.10. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek w apoptozie w zależności od genotypów <i>ABCB1/MDR1</i> C1236T u chorych LPP(+) i w grupie kontrolnej.....	56
Tab.11. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek w apoptozie w zależności od genotypów <i>ABCB1/MDR1</i> C3435T u chorych LPP(+) i w grupie kontrolnej.....	57
Tab.12. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek w apoptozie w zależności od genotypów <i>ABCB1/MDR1</i> G2677(A/T) u chorych LPP(+) i w grupie kontrolnej.....	58
Tab.13. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek w apoptozie w zależności od genotypów <i>ABCB1/MDR1</i> C1236T u chorych LPP+ z napadami ogniskowymi i w grupie kontrolnej.....	59
Tab.14. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek w apoptozie w zależności od genotypów <i>ABCB1/MDR1</i> C3435T u chorych LPP+ z napadami ogniskowymi oraz w grupie kontrolnej.....	60
Tab.15. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek w apoptozie w zależności od genotypów <i>ABCB1/MDR1</i> G2677(A/T) u chorych na padaczkę LPP+ z napadami ogniskowymi oraz w grupie kontrolnej	61
Tab.16. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek w apoptozie w zależności od genotypów <i>ABCB1/MDR1</i> C1236T u chorych na padaczkę LPP(+) z napadami uogólnionymi i w grupie kontrolnej.....	62

Tab.17. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek w apoptozie w zależności od genotypów <i>ABCB1/MDR1</i> C3435T u chorych na padaczkę LPP(+) z napadami uogólnionymi i w grupie kontrolnej.....	63
Tab.18. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek w apoptozie w zależności od genotypów <i>ABCB1/MDR1</i> G2677(A/T) u chorych na padaczkę LPP(+) z napadami uogólnionymi i w grupie kontrolnej.....	64
Tab.19. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek w apoptozie u chorych na padaczkę LPP(+) leczonych monoterapią bądź politerapią oraz w grupie kontrolnej.....	66
Tab.20. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek w apoptozie u chorych na padaczkę LPP(+) leczonych monoterapią oraz w grupie kontrolnej.....	68
Tab.21. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek w apoptozie u chorych na padaczkę LPP(+) leczonych politerapią oraz w grupie kontrolnej.....	68
Tab.22. Stężenie Hcy i Met oraz poziom komórek w apoptozie w zależności od czasu leczenia u chorych na padaczkę LPP(+) oraz w grupie kontrolnej.....	69