



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικό και Καποδιστριακό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών

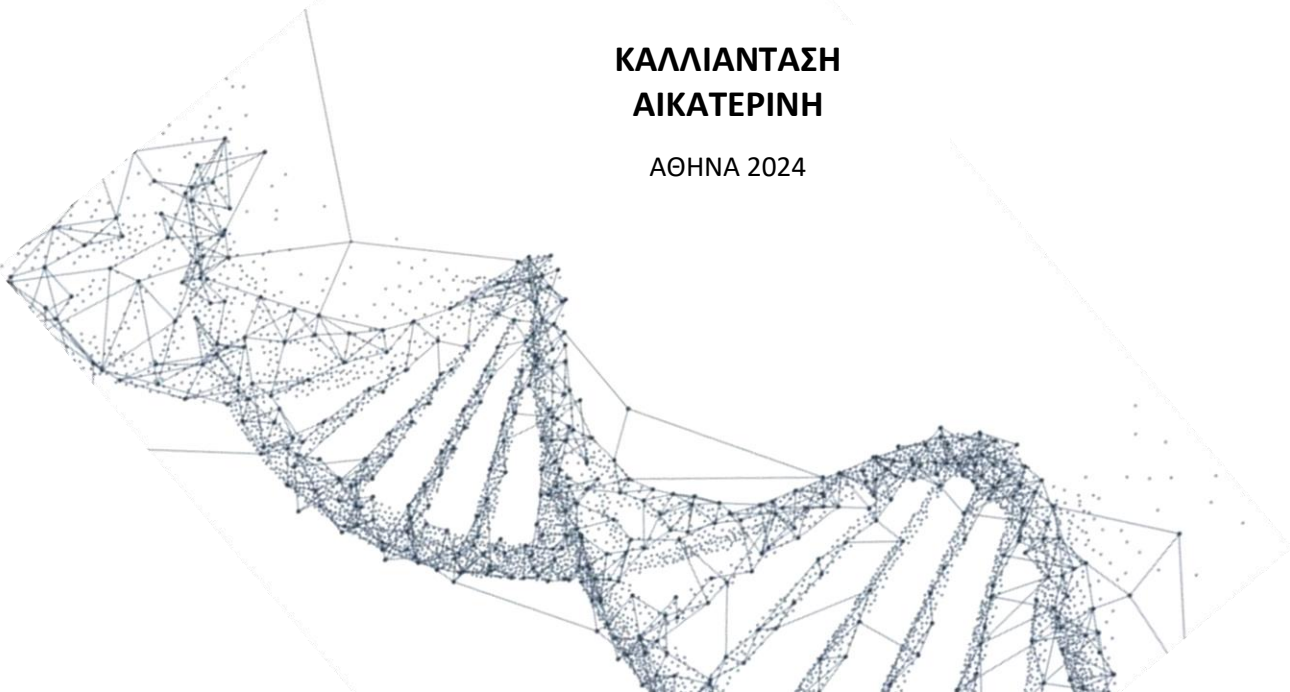
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ:

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ-  
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ «ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ»

Μελέτη της συσχέτισης των  
πολυμορφισμών rs1801131 και  
rs1801133 του γονιδίου MTHFR  
με την εμφάνιση επιληψίας.

**ΚΑΛΛΙΑΝΤΑΣΗ  
ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ**

ΑΘΗΝΑ 2024



#### ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- **Νικόλαος Δρακούλης, (Επιβλέπων)** Καθηγητής του τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Επιβλέπων)
- **Ανδρεάδου Ιωάννα,** Καθηγήτρια του τομέα Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- **Παπαπετρόπουλος Ανδρέας,** Καθηγητής του τομέα Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Σχεδιασμός και Ανάπτυξη Νέων Φαρμακευτικών Ενώσεων – Κατεύθυνση: Φαρμακολογία» του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στο Εργαστήριο της Ερευνητικής Ομάδας Κλινικής Φαρμακολογίας και Φαρμακογονιδιωματικής.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κο Δρακούλη Νικόλαο, επιβλέποντα και επιστημονικό υπεύθυνο της μελέτης για την καθοδήγηση, τις συμβουλές και τη βοήθειά του καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας μου. Η στήριξή του και η εμπιστοσύνη του, υπήρξαν καθοριστικές ώστε να ολοκληρώσω το στόχο μου.

Συνεχίζοντας, ιδιαίτερες ευχαριστίες για τα μέλη του εργαστηρίου Άννα-Μαρία Λυγερού, Άννια Τσολάκου, Μαρία Παπασάββα και Μάρθα Κατσαρού για τη βοήθεια και την άριστη συνεργασία και τις όμορφες αναμνήσεις.

Ακόμη, ευχαριστώ ολόθερμα τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον καθηγητή κο. Ανδρέα Παπαπετρόπουλο, και την καθηγήτρια κα. Ιωάννα Ανδρεάδου, για την αξιολόγηση της παρούσας εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στα μέλη της οικογένειάς μου και τους φίλους μου (παρόντες και απόντες) για τη στήριξη και τη συμπαράστασή τους.

## **ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ:**

**AMPA:** α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

**CHRNA / nAChR:** Nicotinic Acetylcholine Receptor alpha 1

**CI:** Confidence Intervals

**CLCN:** Chloride channels

**dNTPs:** Deoxyribonucleotide triphosphates

**EMA:** European Medicines Agency

**FDA:** Food and Drug Administration

**FAD:** flavin adenine dinucleotide

**GABA:** Gamma-Aminobutyric Acid

**GABRG2:** Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Receptor Sumbunit Gamma 2

**GAT1:** GABA Transporter1

**ILAE:** International League Against Epilepsy

**GLUT:** Glucose transporter

**KASP:** method based on competitive allele-specific PCR

**KCNQ:** potassium channels

**LGS:** Lennox Gastaut Syndrome

**MTHFR:** Methylenetetrahydrofolate Reductase

**NMDA:** N-methyl-D-aspartate receptor

**OR:** Odds Ratio

**P:** p-value

**PCDH19:** Protocadherin 19

**PCR:** Polymerase Chain Reaction

**SAM:** S-adenosylmethionine

**SCN1A:** Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 1

**SNP:** Single Nucleotide Polymorphism

**SV2A:** Synaptic vesicle glycoprotein 2A

**VRK2:** VRK Serine/Threonine Kinase 2

**ΑΕ:** Ανεπιθύμητες Ενέργειες

**ΑΕΦ:** Αντι-Επιληπτικά Φάρμακα

**ΚΝΣ:** Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

## Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	6
ABSTRACT .....	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	8
1.1. Ορισμός της επιληψίας.....	8
1.2. Επιδημιολογικά δεδομένα.....	9
1.3. Διάκριση κατηγοριών επιληψίας.....	9
1.3.1. Γενικευμένη επιληψία.....	10
1.3.2. Εστιακή επιληψία .....	11
1.4. Αίτια .....	11
1.4.1. Κυτταρικοί και μοριακοί μηχανισμοί επιληπτογένεσης .....	12
1.4.2. Γενετικό υπόβαθρο επιληψίας.....	13
1.5. Συμπτώματα.....	18
1.6. Διάγνωση της επιληψίας .....	18
1.7. Φαρμακευτική αγωγή στην επιληψία .....	18
1.7.1. 1 <sup>ης</sup> γενιάς αντιεπιληπτικά .....	20
1.7.2. 2 <sup>ης</sup> γενιάς αντιεπιληπτικά.....	20
1.7.3. Νεότερα αντιεπιληπτικά φάρμακα .....	21
1.8. Ανεπιθύμητες ενέργειες .....	24
1.9. Το ένζυμο 5,10-μεθυλοτραϊδροφυλλικής αναγωγάσης (MTHFR).....	27
1.9.1. Ο σημειακός νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός MTHFR C677T.....	29
1.9.2. Ο σημειακός νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός MTHFR A1298C .....	30
1.9.3. Δημογραφικά στοιχεία .....	31
1.10 Σκοπός της εργασίας .....	34
2. Υλικά και Μέθοδοι .....	35
2.1. Δείγματα ασθενών.....	35
2.1.1. Κριτήρια εισαγωγής.....	37
2.1.2. Κριτήρια αποκλεισμού .....	37
2.1.3. Συναίνεση συμμετεχόντων.....	38
2.2. Λήψη δείγματος και μεταφορά .....	39
2.3. Πειραματική διαδικασία.....	39
2.3.1. Επεξεργασία αίματος .....	39
2.3.2. Απομόνωση DNA .....	39
2.3.3. Φωτομέτρηση δειγμάτων.....	39
2.3.4. Γονοτυπική ανάλυση .....	41
2.3.5 Στατιστική Ανάλυση .....	43
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	45

3.1.	Κατανομή συχνοτήτων των πολυμορφισμών rs1801131 και rs1801133, μεταξύ επιληπτικών ασθενών και ομάδας ελέγχου. ....	45
3.1.1.	Κατανομή του πολυμορφισμού rs1801131 μεταξύ επιληπτικών ασθενών και ομάδας ελέγχου.....	45
3.1.2.	Κατανομή του πολυμορφισμού rs1801133 (C677T) μεταξύ επιληπτικών ασθενών και ομάδας ελέγχου.....	46
3.2.	Συσχέτιση των δύο πολυμορφισμών του MTHFR με την εμφάνιση επιληψίας. ..	48
3.2.1.	Συσχέτιση του πολυμορφισμού rs1801131 (A1298C) με την εμφάνιση επιληψίας. ....	48
3.2.2.	Συσχέτιση του πολυμορφισμού rs1801133 (C677T) με την εμφάνιση επιληψίας. ....	50
3.2.3.	Διάρθρωση της ομάδας των ασθενών σε υπο-ομάδες και μελέτη της κατανομής των πολυμορφισμών rs1801131, rs1801133 σε παιδιά με ηλικία εμφάνισης πρώτων επιληπτικών κρίσεων από 0-5 ετών. ....	52
3.2.4.	Διάρθρωση της ομάδας των ασθενών σε υπο-ομάδες και μελέτη της κατανομής των πολυμορφισμών rs1801131, rs1801133 σε παιδιά με ηλικία εμφάνισης πρώτων επιληπτικών κρίσεων από 6-10 ετών.....	58
3.2.5.	Διάρθρωση της ομάδας των ασθενών σε υπο-ομάδες και μελέτη της κατανομής των πολυμορφισμών rs1801131, rs1801133 σε παιδιά με ηλικία εμφάνισης πρώτων επιληπτικών κρίσεων από 11-15 ετών. ....	64
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	70
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	75
	Περιορισμοί μελέτης.....	75
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	77

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η επιληψία, μια διαδεδομένη νευρολογική διαταραχή με σημαντική γενετική συμμετοχή, επηρεάζει πάνω από 50 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως. Το ένζυμο αναγωγή του 5,10-μεθυλο-τετραϋδροφυλλικού οξέος (MTHFR) εμπλέκεται στη ρύθμιση των κυτταρικών λειτουργιών επηρεάζοντας ποικίλες βιολογικές διεργασίες, ενώ είναι απαραίτητο στο μεταβολισμό της ομοκυστεΐνης. Ειδικότερα, έχει αναφερθεί ότι οι παραλλαγές C677T και A1298C του γονιδίου MTHFR, μειώνουν τη δράση του ενζύμου. Προηγούμενες μελέτες υπέδειξαν μια πιθανή συσχέτιση μεταξύ της μειωμένης δραστηριότητας του MTHFR και της προδιάθεσης ανάπτυξης επιληψίας.

Στην παρούσα μελέτη, συλλέχθηκαν δείγματα αίματος από 214 ασθενείς με γενικευμένη ή/και εστιακή επιληψία, τα οποία υποβλήθηκαν σε απομόνωση DNA και γονοτύπηση για τους πολυμορφισμούς C677T και A1298C με τη χρήση του πρωτοκόλλου KASP. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με μια ομάδα ελέγχου 1411 ατόμων γενικού πληθυσμού. Η στατιστική ανάλυση, χρησιμοποιώντας το τεστ odds ratio μέσω του λογισμικού MedCalc, δεν αποκάλυψε ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών MTHFR και της επιδεκτικότητας στην επιληψία συνολικά.

Ωστόσο, είναι ενδιαφέρον ότι η ανάλυση του πολυμορφισμού C677T του γονιδίου MTHFR έδειξε πιθανή συσχέτιση με την πρώιμη εμφάνιση επιληψίας, ιδίως σε ασθενείς ηλικίας 0-5 ετών. Το μη φυσικό αλληλόμορφο T παρουσίασε στατιστικά σημαντική υψηλότερη συχνότητα κατά 2,5 φορές σε αυτή την υποομάδα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (30% έναντι 18%, OR=2,5, p-value=0,02). Στην ίδια υποομάδα ο γονότυπος AA φαίνεται επίσης να εμφανίζεται σε διπλάσια συχνότητα συγκριτικά με τους υγιείς. (60% έναντι 44,7%, OR=2, p-value=0.1)

Ακόμη, υπήρξε άλλη μία στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού A1298C και την εμφάνιση επιληψίας μεταξύ των ηλικιών 0-5 ετών. Πιο συγκεκριμένα φάνηκε πως ο γονότυπος A:A, έχει την τάση να εμφανίζεται σχεδόν 2 φορές συχνότερα σε άτομα που εμφάνισαν επιληπτικές κρίσεις στο συγκεκριμένο ηλικιακό εύρος εν σχέσει με τους υγιείς(60% έναντι 44%, OR=1,85, p-value=0.1).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποκάλυψαν πως οι πολυμορφισμοί του MTHFR τείνουν να συνδέονται ισχυρά με την εμφάνιση της επιληψίας στην παιδική ηλικία (early onset). Για το λόγο αυτό απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση σχετικά με τις δύο παραλλαγές του ενζύμου και την εμφάνιση της επιληψίας σε πρώιμες ηλικίες έναρξης.

## ABSTRACT

Epilepsy, a prevalent neurological disorder with a substantial genetic component, affects over 50 million individuals worldwide. The methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) enzyme, essential in homocysteine metabolism and influencing diverse biological processes, has been implicated in regulating cellular functions. Notably, MTHFR gene mutations, specifically C677T and A1298C, have been reported to reduce enzyme activity. Previous studies suggested a potential correlation between decreased MTHFR activity and epilepsy susceptibility.

In this study, blood samples from 214 patients with generalized and/or focal epilepsy were collected and subjected to DNA isolation and genotyping for MTHFR C677T and A1298C polymorphisms using the KASP assay. Results were compared with a control group of 1411 individuals. Statistical analysis, employing the chi-square test via MedCalc software, revealed no strong correlation between MTHFR polymorphisms and epilepsy susceptibility overall.

However, intriguingly, an analysis of MTHFR C677T polymorphism indicated a potential association with early-onset epilepsy, particularly in patients aged 0-5 years. The T allele exhibited higher frequency in this subgroup compared to the control group (30% vs. 18%, OR=2.5, p-value=0.02). However, AA genotype has a tendency to appear more frequently in this specific subgroup. (60% vs 44,7%, OR=2, p-value=0.1)

There is also one more statistically significant correlation between A1298C polymorphism and early-onset epilepsy in patients added 0-5 years. AA genotype appears to be almost 2 times more frequent in epilepsy patients comparing with control group. (60% vs 4%, OR=1.85, p-value=0.1).

This study suggests that, on a general scale, MTHFR polymorphisms may not significantly impact epilepsy susceptibility. Nevertheless, the observed association with early-onset epilepsy warrants further investigation. Future research could elucidate the specific role of the MTHFR C677T polymorphism in this subgroup, providing valuable insights into the genetic underpinnings of early-onset epilepsy.



# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. Ορισμός της επιληψίας

Σύμφωνα με τη Διεθνή Οργάνωση Ενάντια στην Επιληψία (ILAE), ορίζεται ως επιληπτική κρίση η αιφνίδια, μαζική εκφόρτιση νευρώνων του εγκεφάλου, που συνοδεύεται από διαταραχή της συνείδησης, της κινητικότητας, της αισθητικότητας, της συμπεριφοράς, των ψυχικών λειτουργιών ή και του συνδυασμού τους, που συνήθως διαρκεί λιγότερο από 2 λεπτά. Σε ένα γενικό πλαίσιο, η επιληψία είναι το αποτέλεσμα της μη φυσιολογικής, συγχρονισμένης εκφόρτισης νευρώνων (παροξυσμός) ή σε υπερδιέγερση των νευρώνων λόγω μειωμένης αναστολής ή αυξημένης διέγερσης. Η διάρκεια της ηλεκτρικής διέγερσης των νευρώνων μπορεί να διαρκέσει από 30 δευτερόλεπτα έως και 2 λεπτά. Η επιληπτική κρίση αποτελεί ένα μεμονωμένο σύμπτωμα και δεν υποδηλώνει απαραίτητα την πάθηση της επιληψίας. [1] Τα εκάστοτε εμφανιζόμενα συμπτώματα εξαρτώνται από τη λειτουργία της περιοχής του εγκεφάλου που έχει επηρεαστεί, επεξηγηματικά αν επηρεάζεται ο κινητικός φλοιός προκαλούνται σπασμοί, στην περίπτωση της συμμετοχής του υποθαλάμου έχουμε περιφερική εκφόρτιση του αυτόνομου συστήματος, ενώ αν συμμετέχει ο δικτυωτός σχηματισμός του ανώτερου εγκεφαλικού στελέχους, έχουμε την απώλεια συνείδησης. [2] [3]

Ως επιληψία ορίζεται η διαταραχή του εγκεφάλου κατά την οποία υπάρχει μία διαρκής προδιάθεση για την εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων και πρακτικά, χαρακτηρίζεται με μια από τις ακόλουθες καταστάσεις

1. Τουλάχιστον δύο μη προκλητές (ή αντανεκλαστικές) κρίσεις σε απόσταση >24 ώρες.
2. Μία μη προκλητή (ή αντανεκλαστική) κρίση και πιθανότητα για περαιτέρω κρίσεις >60% (στα επόμενα 10 έτη, έπειτα από δύο μη προκλητές κρίσεις).
3. Διάγνωση επιληπτικού συνδρόμου. [1]

Η «ίαση» της επιληψίας θεωρείται πως επέρχεται έπειτα από 10 έτη απουσία συμπτωμάτων κρίσεων και τουλάχιστον 5 έτη χωρίς αντιεπιληπτική φαρμακευτική αγωγή. Ενώ για τα άτομα με μορφή επιληψίας που σχετίζεται με συγκεκριμένο ηλικιακό πλαίσιο, θεωρείται πως έπειτα από την ηλικία εκδήλωσης της συνδρόμου, ο κίνδυνος έχει παρέλθει.

Η διάγνωση της επιληπτικής μορφής, διακρίνεται σε τρία επίπεδα, στον τύπο των κρίσεων, στον τύπο της επιληψίας και στο επιληπτικό σύνδρομο. [1]

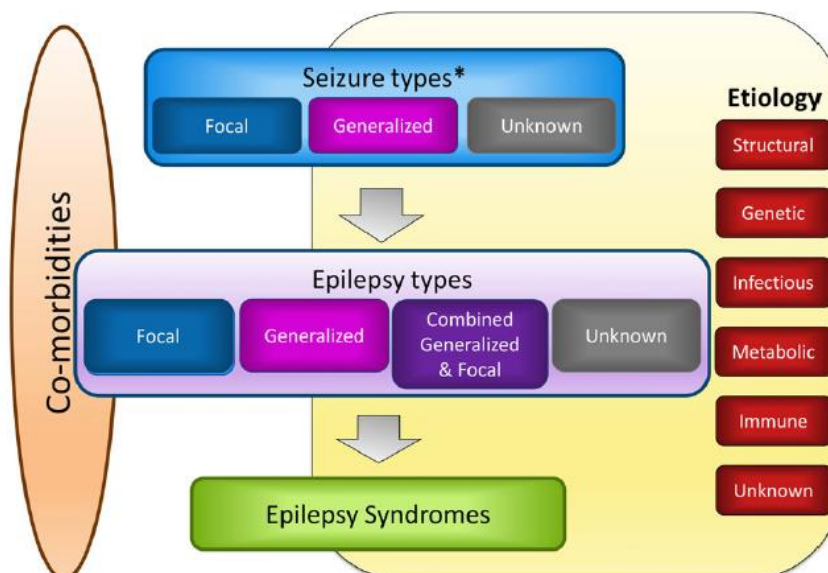
## 1.2. Επιδημιολογικά δεδομένα

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, η επιληψία αποτελεί μία από τις συχνότερες νευρολογικές νόσους, καθώς απαντάται σε περισσότερους από 50 εκατομμύρια ανθρώπους ανά τον κόσμο. Σύμφωνα με στατιστικές μελέτες κάθε χρόνο διαγιγνώσκονται με επιληψία τουλάχιστον 5 εκατομμύρια ασθενείς, σε χώρες με υψηλό κατά κεφαλή εισόδημα, το ποσοστό ανέρχεται στους 14 ανά 100.000, ενώ σε χώρες με χαμηλό κατά κεφαλή εισόδημα τα ποσοστά αυξάνονται σε 139 ανά 100.000. Η αύξηση αυτή είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ύπαρξη ασθενειών όπως η ελονοσία ή η κυστικέρκωση που επηρεάζουν τμήματα του εγκεφάλου, οι οποίες βρίσκονται σε έξαρση στις χώρες αυτές.

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>

## 1.3. Διάκριση κατηγοριών επιληψίας

Αν και η επιληψία διακρίνεται σε πολλές υποκατηγορίες, η Διεθνής Οργάνωση Εναντία στη Επιληψία (ILAE), το 2017 δημοσίευσε το ανανεωμένο σχήμα ταξινόμησης της νόσου, που όπως φαίνεται και στην εικόνα 1, κατατάσσονται σε τρεις κύριες κατηγορίες, τις εστιακές, όπου η ηλεκτρική δραστηριότητα ξεκινάει σε ένα σημείο του εγκεφάλου, τις γενικευμένες όπου ηλεκτρική δραστηριότητα ξεκινά και στα δύο ημισφαίρια ταυτόχρονα και τέλος, τις μορφές επιληψίας αγνώστου προέλευσης της κρίσης. (Εικόνα 1)



**Εικόνα 1: Σχεδιάγραμμα ταξινόμησης των τύπων επιληψίας. [4]**



**Εικόνα 2: Κύρια συμπτώματα των 3 τύπων επιληψίας.**

### 1.3.1. Γενικευμένη επιληψία

Οι γενικευμένες επιληπτικές κρίσεις εμπλέκουν νευρωνικά δίκτυα και των δύο ημισφαιρίων, τα οποία μπορεί να περιλαμβάνουν φλοικές και υποφλοικές περιοχές και όχι απαραίτητα ολόκληρο το φλοιό. Όταν οι εκφορτίσεις προκαλούνται προς το νωτιαίο μυελό δημιουργούνται οι γενικευμένοι τονικοί σπασμοί οι οποίοι ακολουθούνται από εναλλασσόμενες τονικές και συσπαστικές μυϊκές συστολές, τους τονικοκλονικούς σπασμούς (Εικόνα 2). Η διάρκεια της κρίσης αυτού του τύπου μπορεί να είναι από κάποια δευτερόλεπτα έως 3 ή 4 λεπτά, αλλά ακολουθεί η μεταεπιληπτική καταστολή ολόκληρου του νευρικού συστήματος για 1 ή περισσότερα λεπτά, όπου ο ασθενής παραμένει σε κατάσταση ληθάργου ή έντονης κόπωσης. [3][1]

### 1.3.2. Εστιακή επιληψία

Οι εστιακές κρίσεις εμφανίζονται σε νευρωνικά δίκτυα του ενός ημισφαιρίου και μπορεί να είναι τοπικά περιορισμένες ή και πιο εκτεταμένες, ακόμη ενδέχεται να αφορούν σχεδόν οποιοδήποτε τμήμα του εγκεφάλου, είτε εντοπισμένες περιοχές του εγκεφαλικού φλοιού είτε βαθύτερα στοιχεία του εγκεφάλου και του εγκεφαλικού στελέχους. Σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις, η εστιακή επιληψία προκαλείται από εντοπισμένη οργανική βλάβη ή λειτουργική ανωμαλία. Ωστόσο, μπορεί η έναρξη των κρίσεων αυτής της μορφής να εντοπίζεται σε μία μόνο περιοχή του εγκεφάλου, συχνά τα σήματα από τον προσβληθέντα φλοιό διεγείρουν το μεσεγκεφαλικό τμήμα του σε τέτοιο βαθμό, ώστε να εκλύεται η προσβολή γενικευμένη επιληψίας. Σε αυτή τη μορφή επιληψίας, έχουμε και την ψυχοκινητική προσβολή, κατά την οποία είναι δυνατό να προκληθούν βραχεία αμνησία, παθολογική μανία, αιφνίδια δυσφορία ή φόβος και, τέλος, ακατάληπτος λόγος ή δυσδιάκριτο μουρμουρητό τετριμμένης φάσης. Στην περίπτωση αυτή επηρεάζεται κυρίως το μεταιχμιακό τμήμα του εγκεφάλου (λόγου χάριν υπόκαμπος, αμυγδαλή κτλ.) και το άτομο είτε δεν έχει καμία συνείδηση της πραγματικότητας, είτε αντιλαμβάνεται την κρίση, όμως αδυνατεί πλήρως να ελέγξει τις πράξεις του. [3] Οι εστιακές κρίσεις διακρίνονται περαιτέρω σε απλές, σύμπλοκες, με διαταραχή συνείδησης και δευτερογενώς γενικευμένες. Οι γενικευμένες διακρίνονται στις αφαιρέσεις, τις μυοκλονικές, τις κλονικές, τις τονικές και τις τονικο-κλονικές. [4] (Εικόνα 2)

### 1.4. Αίτια

Τα αίτια της επιληψίας ποικίλουν, καθώς αποτελεί μία πολυπαραγοντική διαταραχή και μπορεί να είναι συγγενή ή επίκτητα. Στα συγγενή αίτια περιλαμβάνονται οι περιπτώσεις όπου έχει συμβεί τραυματισμός του εγκεφάλου του εμβρύου, καθώς και κληρονομικοί παράγοντες. [1]

Αντιθέτως, στα επίκτητα αίτια περιλαμβάνονται βλάβες στον εγκεφαλικό ιστό, λόγω τραυματισμών, αγγειακών δυσπλασιών, φλεγμονών, όγκων ή ισχαιμικών επεισοδίων. Επιπρόσθετα, συναντούμε και παράγοντες που επηρεάζουν την εγκεφαλική δραστηριότητα όπως είναι το αλκοόλ, η λήψη φαρμάκων ή ναρκωτικών ουσιών ή και η απότομη διακοπή τους. Ακόμη, υπάρχουν νόσοι, όπως λόγου χάριν η νόσος του Alzheimer, που μπορούν να προκαλέσουν επιληπτικές κρίσεις. Σε άτομα που έχουν διαγνωσθεί με επιληψία, υπάρχουν παράγοντες οι οποίοι αυξάνουν την πιθανότητα εκδήλωσης κρίσης (triggering factors), αυτοί είναι: [4]

- Διακοπή των αντιεπιληπτικών φαρμάκων (ή άλλων φαρμάκων που δρουν στο ΚΝΣ)
- Μέθη
- Έλλειψη ύπνου
- Σωματική εξάντληση
- Ψυχική καταπόνηση
- Εμπύρετο νόσημα
- Έμμηνος ρύση

### 1.4.1. Κυτταρικοί και μοριακοί μηχανισμοί επιληπτογένεσης

Η σωστή λειτουργία του εγκεφάλου εξαρτάται άμεσα από τη σωστή επικοινωνία και λειτουργία των νευρικών κυττάρων, η οποία είναι αποτέλεσμα των ηλεκτρικών σημάτων που διαδίδονται μέσω των μεμβρανών των κυττάρων. [5] Πιο αναλυτικά, η μετακίνηση ιόντων και άλλων νευροδιαβιβαστών, προκαλεί αλλαγές στο δυναμικό της μεμβράνης δημιουργώντας δύο είδη δυναμικών, το δυναμικό ενέργειας και το συναπτικό δυναμικό. Με τη σωστή εναλλαγή των δυναμικών καθώς και τη συντονισμένη φόρτιση και εκφόρτιση των νευρώνων, είναι δυνατή η ορθή λειτουργία του εγκεφάλου. Κατ'επέκταση ο,τιδήποτε διαταράσσει τη φυσιολογική νευρωνική λειτουργία και ιδιαίτερα τη φυσιολογική ισορροπία μεταξύ αναστολής και διέγερσης των νευρώνων, μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση επιληψίας. Οι επιληπτικές κρίσεις εμφανίζονται μετά την πυροδότηση μη φυσιολογικών δυναμικών (ακόμη και 500 φορές το δευτερόλεπτο) από κάποιες ομάδες κυττάρων. Ως αποτέλεσμα, λόγω της διακοπής της νευρωνικής δραστηριότητας, προκαλούνται τα συμπτώματα των κρίσεων (περίεργες συμπεριφορές, σπασμοί, απώλεια συνείδησης κ. ά.) [3] Αρχικά, αυξημένα επίπεδα διεγερτικών νευροδιαβιβαστών, όπως είναι το γλουταμικό οξύ ή πολύ χαμηλά επίπεδα των ανασταλτικών νευροδιαβιβαστών, όπως το GABA, μπορούν να αυξήσουν ή να μειώσουν αντίστοιχα, τη νευρική δραστηριότητα του εγκεφάλου. Σε κυτταρικό επίπεδο ανωμαλίες στις παθητικές ή ενεργητικές ιδιότητες των κυττάρων μπορούν να προκαλέσουν την έναρξη της δραστηριότητας. [6]

Ωστόσο, περίπου το 1% των ατόμων εμφανίζουν επιληπτικές κρίσεις χωρίς κάποιο προφανές αίτιο (π.χ. τραυματισμό της κεφαλής) ή με κάποια άλλη νευρολογική ανωμαλία.

Στις περιπτώσεις αυτές η αιτιολογία βρίσκεται στην κληρονόμηση αλληλομόρφων που σχετίζονται με την εμφάνιση της νόσου και αφορούν συνήθως παραλλαγές σε γονίδια που κωδικοποιούν υπομονάδες ιοντικών καναλιών. Οι ιοντικοί δίαυλοι είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες σχηματίζουν πόρους στη μεμβράνη επιτρέποντας την επιλεκτική μετακίνηση ιόντων μέσα και έξω από τα κύτταρα. [7]

Οποιαδήποτε δυσλειτουργία στις πρωτεΐνες αυτές, δημιουργεί προβλήματα στη φυσιολογική μετακίνηση των ιόντων και κατ'επέκταση σε ανισορροπία μεταξύ των μηχανισμών διέγερσης και αναστολής. Ως αποτέλεσμα δημιουργείται ανεξέλεγκτη διεγερσιμότητα των κυττάρων. [8]

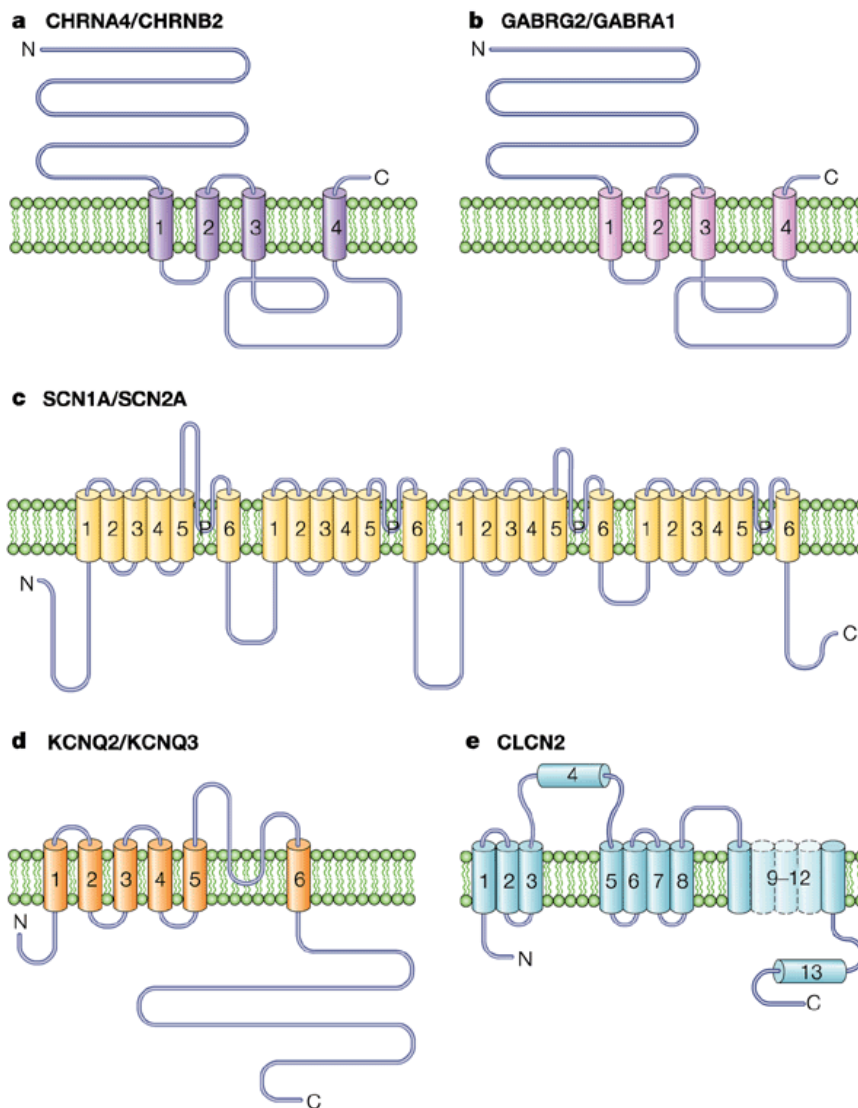
#### 1.4.2. Γενετικό υπόβαθρο επιληψίας

Η εμφάνιση της επιληψίας σχετίζεται σε ένα σημαντικό ποσοστό, της τάξεως του 70%, αποκλειστικά σε γονιδιακούς παράγοντες ή σε συνδυασμό γενετικών και επιγενετικών παραγόντων. Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs), ελλείψεις, προσθήκες ή αλλαγές που επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων έχουν σχετιστεί με την εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων και βοηθούν στην πρόβλεψη της εμφάνισης συγκεκριμένων φαινοτύπων. Ωστόσο, μεταξύ γονότυπου και φαινότυπου, υπάρχει και ο ενδο-φαινότυπος, ο οποίος αφορά ενδογενή στοιχεία του οργανισμού, όπως βιοχημικά, ορμονικά ή άλλα φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Οι γενετικοί παράγοντες σε συνδυασμό με τις απεικονιστικές μεθόδους μπορούν να συνδράμουν στην προβλεψιμότητα του κινδύνου εμφάνισης της νόσου. Για το λόγο αυτό τα τελευταία χρόνια έχουν ιδρυθεί αρκετοί οργανισμοί, οι οποίοι στοχεύουν στη δημιουργία μεγάλων βάσεων δεδομένων, συγκεντρώνοντας γονοτυπήσεις από μεγάλα πληθυσμιακά μεγέθη, που μπορούν να βοηθήσουν στη μελέτη και διάγνωση της επιληψίας. [9]

Πρώτη θέση στις μελέτες αυτές, λαμβάνουν γονίδια που σχετίζονται με διαύλους ιόντων. Η ανισορροπία στη ροή των ιόντων Νατρίου, Ασβεστίου και Καλίου εντός κι εκτός των κυττάρων, οδηγεί στην αυξημένη ή μειωμένη πρόσληψη των νευροδιαβιβαστών και επομένως στην αυξημένη διέγερση των κυττάρων. Κατά συνέπεια, διαβάλλεται η ισορροπημένη συναπτική διαβίβαση κι επομένως η νευρολογική ομοιόσταση, δημιουργώντας ένα περιβάλλον φιλικό στην εκδήλωση επιληπτικών συμβάντων. [10] (Εικόνα 3)

Πληθώρα εργασιών μελετά την κληρονομικότητα της νόσου, καθώς τα ποσοστά εμφάνισής της μεταξύ συγγενών πρώτου βαθμού είναι αρκετά υψηλά. [11]

Πλέον, είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε πως αρκετά γονίδια που σχετίζονται με τις κυτταρικές δομές καθώς και τις κυτταρικές λειτουργίες παίζουν κρίσιμο ρόλο στην εμφάνιση και διάρκεια των επιληπτικών κρίσεων.



Nature Reviews | Neuroscience

**Εικόνα 3:** Απεικόνιση των κύριων καναλιών ιόντων και των υπομονάδων τους. [8]

- a.** Ο νικοτινικός υποδοχέας ακετυλοχολίνης (nAChRs) (CHRNA4/CHRNB2), πρόκειται για πενταμερείς πρωτεΐνες με 4 διαμεμβρανικές επικράτειες σε κάθε υπομονάδα.
- b.** Ο υποδοχέας γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABRG2/GABRA1), αρκετά όμοιος δομικά με τον υποδοχέα ακετυλοχολίνης, εκλεκτικός για μικρά ανιόντα, όπως τα ιόντα χλωρίου.
- c.** Οι τασοελεγχόμενοι διάυλοι νατρίου (SCN1A/SCN2A) αποτελούνται από 4 επαναλαμβανόμενες επικράτειες που μοιάζουν αρκετά με τη δομή των διαύλων καλίου.
- d.** Οι τασοελεγχόμενοι διάυλοι καλίου (KCNQ2/KCNQ3) είναι τετραμερείς και κάθε υπομονάδα διαθέτει 6 διαμεμβρανικές επικράτειες. Η 4<sup>η</sup> επικράτεια αποτελείται από θετικά φορτισμένα αμινοξέα που προκαλούν αλλαγή στη διαμόρφωση του υποδοχέα κατά τη διάρκεια της εκπόλωσης της μεμβράνης.

- ε. Τα τασοελεγχόμενα κανάλια χλωρίου (CLCN) αποτελούνται από ομοδιμερείς πρωτεΐνες οι οποίες δημιουργούν πόρους στη μεμβράνη. Επιτρέπουν τη διέλευση ιόντων χλωρίου επηρεάζοντας την ηλεκτρική αγωγιμότητα των μεμβρανών.**

Πιο αναλυτικά, γονίδια των οποίων μεταλλάξεις εμπλέκονται στην εμφάνιση ιδιοπαθών επιληψιών είναι:

• *Γονίδια που εκφράζουν διαύλους Νατρίου:*

Οι διαύλοι νατρίου είναι υπεύθυνοι για την εμφάνιση των δυναμικών ενεργείας στους νευρώνες. Αποτελούνται από μία υπομονάδα  $\alpha$  που σχηματίζει τον πόρο για τη ροή των  $\text{Na}^+$  και 3 βοηθητικές  $\beta$  υπομονάδες που ελέγχουν το ρυθμό απενεργοποίησης και τον ενδοκυττάριο εντοπισμό του καναλιού. Μελέτες σε οικογένειες με ιστορικό επιληψίας (γενικευμένη επιληψία, βαριά μυοκλονική επιληψία νηπιακής ηλικίας) και γενετικά μοντέλα επιληψίας κροταφικού λοβού μυών, έχουν συνδεθεί με παραλλαγές σε διάφορους τύπους  $\alpha$  υπομονάδων των καναλιών  $\text{Na}^+$ . Σημειακοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί του γονιδίου SCN1A ευθύνονται για την εμφάνιση κρίσεων, και συγκεκριμένα για πολλές από τις περιπτώσεις του συνδρόμου Dravet. [3] [8]

• *Γονίδια των τασο-εξαρτώμενων διαύλων Καλίου:*

Δύο κατηγορίες τασο-εξαρτώμενων καναλιών  $\text{K}^+$  έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση επιληψίας, οι τύποι  $\text{Kv}$  και  $\text{KCNQ}$ . Και οι δύο τύποι εμπλέκονται στη φάση επαναπόλωσης, αμέσως μετά το δυναμικό ενεργείας. Η καλοήθης νεογνική επιληψία, μία κατάσταση που εκδηλώνεται από της 1η εβδομάδα έως και τον 6ο μήνα ζωής, σχετίζεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο  $\text{KCNQ2}$  και  $\text{KCNQ3}$ , γονίδια του καναλιού Καλίου, οι οποίες μεταβιβάζονται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο. [8]

• *Τασο-εξαρτώμενοι διαύλοι Ασβεστίου:*

Οι τασο-ελεγχόμενοι διαύλοι ασβεστίου επιτρέπουν την εισροή  $\text{Ca}^{2+}$  στο κύτταρο, η οποία ελέγχει την ηλεκτρική διεγερσιμότητα και τα  $\text{Ca}$ -εξαρτώμενα ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια. Στο θαλαμοφλοιϊκό κύκλωμα, η παραγωγή δυναμικών ενεργείας προκαλείται από την ενεργοποίηση των καναλιών  $\text{Ca}^{2+}$  και ενδεχομένως να σχετίζονται με τις επιληπτικές αφαιρέσεις. [12] [3]



- Υποδοχείς GABA (γ-αμινοβουτυρικού οξέος)

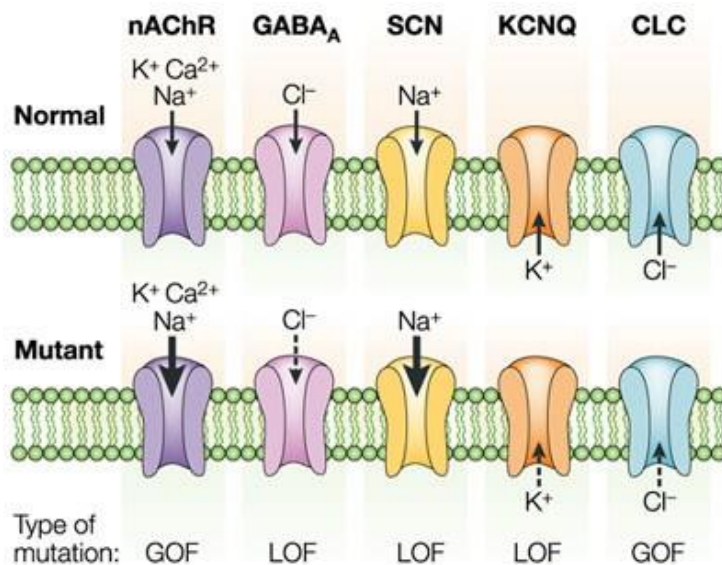
Οι ιοντοτρόποι υποδοχείς GABA είναι πενταμερείς διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που ενεργοποιούνται από το νευροδιαβιβαστή GABA και λειτουργούν ως δίαυλοι Cl<sup>-</sup>. Αποτελούνται από 2α και 2β υπομονάδες και από μία από τις υπομονάδες γ, δ, ε, θ ή π.

Η δράση τους στον εγκέφαλο είναι κυρίως ανασταλτική και επηρεάζεται από τη συγκέντρωση ιόντων χλωρίου εντός των κυττάρων. Οι γνωστές παραλλαγές των υποδοχέων GABA-A (GABA-A και GABA-B ) συνδέονται με 3 τύπους ιδιοπαθούς επιληψίας που εμφανίζονται στην παιδική ηλικία (παιδική επιληψία με αφαιρέσεις, αυτοσωμική επικρατής επιληψία με εμπύρετους σπασμούς, αυτοσωμική επικρατής νεανική μυοκλονική επιληψία). Υπάρχουν παραλλαγές των γονιδίων που κωδικοποιούν τη γ υπομονάδα του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA), όπως το GABRG2, οι οποίες επηρεάζουν την εμφάνιση αφαιρέσεων κυρίως στην παιδική ηλικία, αλλά δεν ευθύνονται πλήρως για την εμφάνιση Γενετικών Γενικευμένων Επιληψιών.

Οι περισσότερες παραλλαγές οδηγούν σε μειωμένη ενεργότητα των GABA υποδοχέων και έτσι σε μειωμένη ανασταλτική δράση στα εγκεφαλικά κύτταρα. Κατά συνέπεια, αυξάνεται η διάρκεια της διεγερσιμότητας των νευρικών κυττάρων που μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση επιληπτικών επεισοδίων. Ένα ακόμη πιθανό σενάριο είναι οι αλλαγές αυτές στους υποδοχείς να επηρεάζουν την πλαστικότητα του εγκεφάλου ευνοώντας την εμφάνιση επιληπτικών συμπτωμάτων. [13][3]

- *Νικοτινικοί υποδοχείς ακετυλοχολίνης (nAChR):*

Οι νικοτινικοί υποδοχείς ακετυλοχολίνης των νευρικών κυττάρων αποτελούνται από 5 διαμεμβρανικές υπομονάδες: δύο α, μία υπομονάδα β, μία γ και μία δ. Οι υπομονάδες τοποθετούνται συμμετρικά, σχηματίζοντας ένα δίαυλο με επιλεκτικότητα προς τα K<sup>+</sup> και Na<sup>+</sup>. Κάποιοι συνδυασμοί υπομονάδων σχηματίζουν διαύλους, οι οποίοι είναι διαπερατοί και σε κατιόντα Ca<sup>2+</sup>. Συνοπτικά, ο δίαυλος ανοίγει μετά από την πρόσδεση 2 μορίων Ach και ακολουθεί εισροή Na<sup>+</sup> και εκροή K<sup>+</sup>, με αποτέλεσμα την εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης. Η εκπόλωση αυτή ανοίγει παρακείμενους τασεο-ελεγχόμενους διαύλους Na<sup>+</sup>, ώστε να ξεπεραστεί ο ουδός του κυττάρου. Μία μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί την α4 υπομονάδα του υποδοχέα (CHRNA4), προκαλεί μια κληρονομήσιμη μορφή επιληψίας. Ήταν η πρώτη παραλλαγή που βρέθηκε να αφορά σε ανθρώπινη ασθένεια που συνδεόταν με nAChR. Οι επιληψίες που βασίζονται σε αυτούς τους υποδοχείς, έχουν σαν κύριο χαρακτηριστικό την εμφάνιση κρίσεων κατά τη διάρκεια κυρίως της non-REM φάσης ύπνου και έχουν εστία έναρξης το μετωπιαίο λοβό, γι' αυτό και αποκαλούνται αυτοσωμικές επικρατείς νυχτερινές επιληψίες μετωπιαίου λοβού. [14] (Εικόνα 4)



Nature Reviews | Neuroscience

**Εικόνα 4:** Αυξημένη και μειωμένη λειτουργικότητα έπειτα από μεταλλάξεις σε πρωτεΐνες καναλιών ιόντων. Αυξημένη λειτουργία (Gain of Function/GOF) και μειωμένη λειτουργία (Loss of Function/ LOF) Από αριστερά προς τα δεξιά: νικοτινικός υποδοχέας ακετυλοχολίνης (nAChR) (γονίδια: *CHRNA4* και *CHRN2*), υποδοχέας γ-αμινοβουτυρικού οξέος, υποτύπος A) GABA<sub>A</sub> (γονίδια: *GABRG2* και *GABRA1*), κανάλι νατρίου (SCN) (γονίδια: *SCN1A*, *SCN2A* και *SCN1B*), κανάλι Καλίου (KCNQ) (γονίδια: *KCNQ2* και *KCNQ3*) και κανάλι χλωρίου (CLC) (γονίδιο: *CLCN2*). Τα κύρια ρεύματα ιόντων υποδεικνύονται με βέλη. [8]

Επιπρόσθετα, υπάρχουν γονίδια τα οποία αν και δεν επηρεάζουν την ηλεκτρική αγωγιμότητα, επηρεάζουν σημαντικά την εγκεφαλική λειτουργία.

Το γονίδιο *SLC2A1*, φαίνεται να είναι μείζονος σημασίας, καθώς κωδικοποιεί το μεταφορέα γλυκόζης GLUT1, κύριος μεταφορέας γλυκόζης στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Απώλεια του ενός εκ των 2 αντιγράφων, ευθύνεται για την ανεπάρκεια του υποδοχέα και κατ' επέκταση ανεπάρκεια στην ποσότητα γλυκόζης που προσλαμβάνουν τα κύτταρα. Ως αποτέλεσμα, εμφανίζεται εγκεφαλοπάθεια, σοβαρή μορφή επιληψίας καθώς και νοητική αναπηρία. Ήπιας μορφής ανεπάρκεια των μεταφορέων γλυκόζης σχετίζεται επίσης με την εμφάνιση επιληψίας, καθώς συναντάται σε ένα ποσοστό του 10% σε παιδιά που εμφανίζουν τυπικές αφαιρετικές κρίσεις σε ηλικία μικρότερη των 4 ετών και σε ενήλικες σε ποσοστό 1% αυτών που εμφανίζουν γενετική γενικευμένη επιληψία. [6][3]

Επίσης, παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *PCDH19*, που κωδικοποιεί μόρια των καντερινών, πρωτεΐνες της κυτταρικής επικοινωνίας, έχουν σημειωθεί ως σημαντική αιτία της εμφάνισης της νόσου, και συγκεκριμένα σε γυναίκες. Στο γονίδιο *VRK2*, που κωδικοποιεί κινάσες θρεονίνης/σερίνης, φάνηκε μέσα από μελέτες αλληλούχισης ολόκληρου του γονιδιώματος, ότι υπάρχουν γονότυποι που προδιαθέτουν στην εμφάνιση γενετικής γενικευμένης επιληψίας, ενώ παράλληλα προστατεύουν από την εμφάνιση σχιζοφρένειας. [10]

## 1.5. Συμπτώματα

Χαρακτηριστικά συμπτώματα των επιληπτικών κρίσεων είναι τα παρακάτω:

- Σπασμοί, τονικοί ή κλονικοί ή μυοκλονικοί
- Σπασμοί στους βλεφαρικούς μύες (ανοιγοκλείνουν τα μάτια με ταχύ ρυθμό) ή βολβοστροφή
- Διαταραχές αισθητικές, οπτικές, ακουστικές ή οσφρητικές
- Σπασμοί στους μύες της στοματικής κοιλότητας με αποτέλεσμα τη διατάραξη της ομιλίας, τη σιελόρροια, το τρίξιμο των δοντιών και το δάγκωμα της γλώσσας
- Απώλεια ούρων ή κοπράνων
- Στερεοτυπικές κινήσεις σε συνδυασμό με την καθήλωση του βλέμματος
- Αιφνίδια απώλεια μυϊκού τόνου, που έχει ως αποτέλεσμα ο ασθενής να πέφτει στο έδαφος [15]

## 1.6. Διάγνωση της επιληψίας

Αρχικά για τη διάγνωση της νόσου είναι απαραίτητη η λήψη ιστορικού και καταγραφή των επιληπτικών κρίσεων, τη διάρκειά τους και την ακριβή συμπτωματολογία, κυρίως από κάποιο μάρτυρα, καθώς το άτομο δε δύναται από μόνο του να περιγράψει το επιληπτικό περιστατικό. Στη συνέχεια ακολουθεί το ηλεκτροεγκεφαλογράφημα, το οποίο θα δώσει μία σαφή εικόνα της ηλεκτρικής διέγερσης του εγκεφάλου καθώς και των μοτίβων των ηλεκτρικών κυμάτων που αναπτύσσονται. Στη συνέχεια, πρόσθετοι απεικονιστικοί έλεγχοι όπως η αξονική, μαγνητική τομογραφία, η μαγνητο-εγκεφαλογραφία και η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων μπορούν να φανούν εξαιρετικά χρήσιμες στον εντοπισμό των περιοχών της βλάβης. Για τη διεξαγωγή της διάγνωσης θα ληφθούν υπ' όψιν επίσης τα αποτελέσματα των αιματολογικών, καρδιολογικών και βιοχημικών εξετάσεων. Έπειτα, ανάλογα με τον τύπο των κρίσεων και τη συχνότητα εμφάνισής τους, θα αξιολογηθεί η κατάσταση του ασθενούς και το σχέδιο θεραπείας που θα πρέπει να ακολουθήσει. [4]

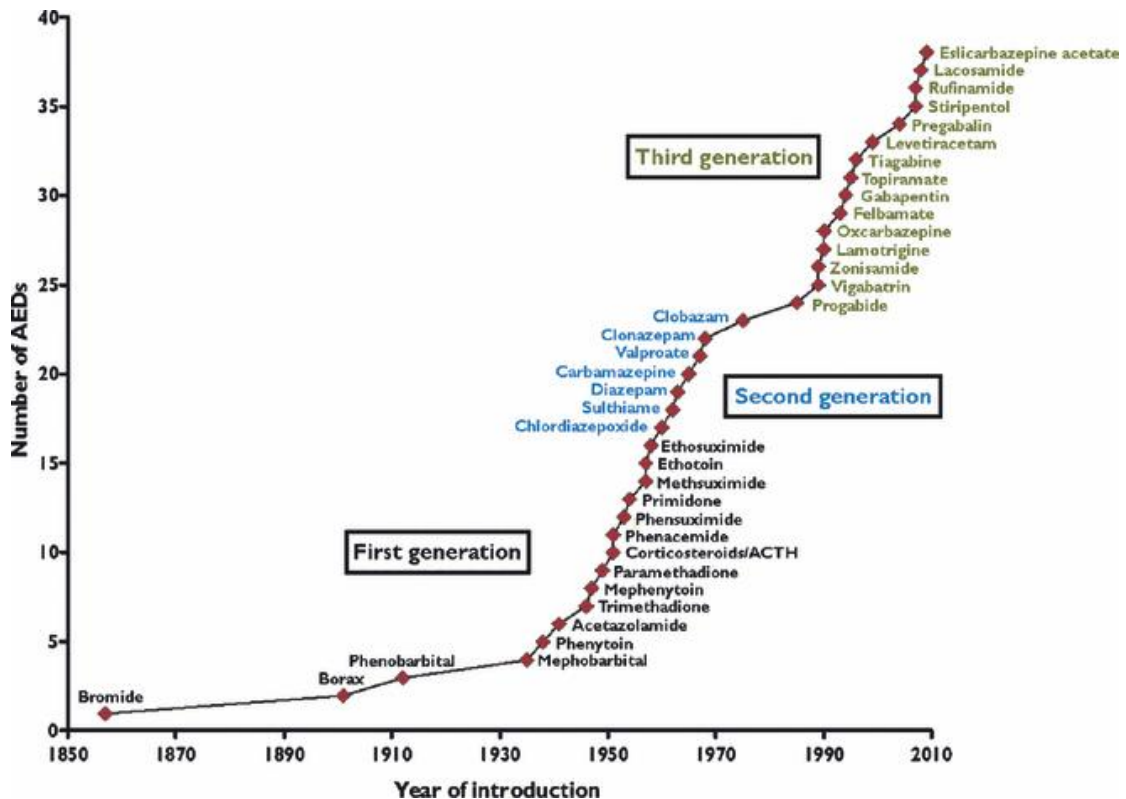
## 1.7. Φαρμακευτική αγωγή στην επιληψία

Η επιληψία είναι μία ασθένεια η οποία προκύπτει από τη μη φυσιολογική νευρωνική εκφόρτιση, επομένως, οι φαρμακευτικές αγωγές στοχεύουν κυρίως στη ρύθμιση της κυτταρικής αγωγιμότητας και όχι στη διόρθωση της αιτίας που τη δημιουργεί. Οι κύριοι μηχανισμοί δράσης των αντιεπιληπτικών είναι οι εξής:

- 1) Ενίσχυση ανασταλτικής δράσης των υποδοχέων του γ-αμινοβουτυρικού οξέος.

- 2) Μείωση της διεγερτικής δράσης του γλουταμινικού οξέος.
- 3) Τροποποίηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας των μεμβρανών, επηρεάζοντας τα κανάλια μεταφοράς  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ .
- 4) Τροποποίηση της συναπτικής λειτουργίας. [2][16]

Με την πάροδο των ετών έρχονται στο προσκήνιο ολοένα και περισσότερες φαρμακευτικές ουσίες που μπορούν να δράσουν θεραπευτικά. Πλέον ανάλογα με τη χρονολογία εισαγωγής τους στην αγορά, διακρίνονται σε αντιεπιληπτικά 1<sup>ης</sup>, 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> γενιάς. (Εικόνα 5) (Πίνακας 1)



**Εικόνα 5: Κατηγοριοποίηση των ΑΕΦ βάσει χρονολογίας ανάπτυξης τους[17]**

Το 1857 το βρωμιούχο κάλιο ήταν η πρώτη ένωση που χρησιμοποιήθηκε ως αντιεπιληπτικό φάρμακο, προκαλούσε όμως πολύ έντονη καταστολή και άλλες παρενέργειες, με αποτέλεσμα να απορριφθεί. Το 1938 έρχονται στο προσκήνιο τα πρώτης γενιάς αντιεπιληπτικά φάρμακα με πρωταγωνιστή το βόρακα και τη φαινοβαρβιτάλη. Ο βόρακας αν και φαινόταν αποτελεσματικός, σταμάτησε να συνταγογραφείται περίπου το 1950 γιατί αφ' ενός φάνηκε να έχει αρκετές ανεπιθύμητες ενέργειες όπως, διάρροια, εξανθήματα ή απώλεια των μαλλιών. [18] παρακάτω θα δούμε πιο αναλυτικά κάποια από τα πιο δημοφιλή αντιεπιληπτικά, τα οποία κυκλοφορούν μέχρι και σήμερα.

### 1.7.1. 1<sup>ης</sup> γενιάς αντιεπιληπτικά

- *Φαινοβαρβιτάλη*

Ανήκει στην ομάδα των βαρβιτουρικών και άρχισε να χρησιμοποιείται ως αντιεπιληπτικό από το 1912. Η δράση της είναι παρόμοια με αυτή της φαινυτοΐνης, όμως εμφανίζει σημαντική ανασταλτική δράση, γεγονός που έχει δημιουργήσει αμφιβολίες για την κλινική της χρήση. Ωστόσο, σύμφωνα με τους Brodie & Kwan, εν συγκρίσει με τα υπόλοιπα σκευάσματα δε φαίνεται να έχει πιο αυξημένες ανεπιθύμητες ενέργειες και σε συνδυασμό με το μέγιστο εύρος αποτελεσματικότητάς της, η χρήση της είναι ακόμη και σήμερα αρκετά συχνή. [19][20][21]

- *Φαινυτοΐνη*

Ανήκει στην ομάδα των υδαντοϊνών, δομικά όμοια με τα βαρβιτουρικά, δρα στα κανάλια  $\text{Na}^+$  και είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική σε πολλές μορφές κρίσεων εκτός από αυτές των αφαιρέσεων, τις οποίες τείνει να επιδεινώνει. Ωστόσο η δράση της εμφανίζει πολλές διακυμάνσεις καθώς ο μεταβολισμός της μπορεί είτε να διεγερθεί είτε να ανασταλεί με απρόβλεπτο τρόπο, λόγω των πολλών συναγωνιστών για τα ηπατικά ένζυμα. Το εύρος μεταξύ της αποτελεσματικής της συγκέντρωσης και της συγκέντρωσης όπου εμφανίζονται πολλές ανεπιθύμητες ενέργειες, είναι αρκετά στενό. Επομένως, είναι απαραίτητο να παρακολουθείται στενά η διακύμανση της συγκέντρωσής της στο πλάσμα κάθε ασθενούς ξεχωριστά. [22] [23]

- *Αιθοσουξιμίδη*

Αναπτύχθηκε με την τροποποίηση της δομής δακτυλίου του βαρβιτουρικού οξέος και χρησιμοποιείται κλινικώς για την εκλεκτική της δράσης στις τυπικές αφαιρέσεις. Η δράση της εστιάζει στην αναστολή των καναλιών  $\text{Ca}^{2+}$  τύπου T. [24]

### 1.7.2. 2<sup>ης</sup> γενιάς αντιεπιληπτικά

Λίγο μετά το 1960 έρχεται η ανακάλυψη των βενζοδιαζεπινών, ανοίγοντας ένα νέο δρόμο στη φαρμακοθεραπεία της επιληψίας. Έχουμε πλέον τα αντιεπιληπτικά φάρμακα 2<sup>ης</sup> γενιάς με κύριους αντιπροσώπους τα παρακάτω:

- *Βενζοδιαζεπίνες*

Ομάδα ουσιών που αναστέλλουν του υποδοχείς GABA και χρησιμοποιούνται ευρέως ακόμη και στις πιο σοβαρές καταστάσεις επιληψίας. Κύριοι εκπρόσωποι της κατηγορίας αυτής, η διαζεπάμη, η λοραζεπάμη και η κλοναζεπάμη. Με τη διαζεπάμη να εμφανίζει την πιο ταχεία δράση και την κλοναζεπάμη να εμφανίζει μία επιπλέον δράση, αναστέλλοντας τα κανάλια  $\text{Ca}^{2+}$ . Παρά της αποτελεσματικότητάς τους, οι βενζοδιαζεπίνες είναι ισχυρά κατασταλτικά φάρμακα και εμφανίζουν πολύ σοβαρά συμπτώματα όπως σύνδρομο στέρησης και επιδείνωση των κρίσεων κατά την απότομη διακοπή τους. [25][24]

- *Καρβαμαζεπίνη*

Αποτελεί χημικό παράγωγο των τρικυκλικών αντικαταθλιπτικών, δρα στα κανάλια  $\text{Na}^+$  και η δράση της ομοιάζει με αυτή της φαινυτοΐνης. Επίσης είναι επαγωγέας των ηπατικών ενζύμων, ενισχύοντας το μεταβολισμό άλλων αντιεπιληπτικών και όχι μόνο φαρμάκων. Για το λόγο αυτό η συνδυαστική χορήγησή της, συνήθως αποφεύγεται. Η οξικαρβαμαζεπίνη είναι ένα προφάρμακο ο μεταβολίτης του οποίου μοιάζει αρκετά με την καρβαμαζεπίνη, φαίνεται όμως να έχει λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες. [26][19]

- *Βαλπροϊκό οξύ*

Είναι μονοκαρβοξυλικό οξύ το οποίο δε συντάσσεται σε άλλη κατηγορία αντιεπιληπτικών φαρμάκων. Φαίνεται να δρα τόσο στα κανάλια  $\text{Na}^+$  και  $\text{Ca}^{+2}$ , ενώ εμφανίζει και μία επιπλέον δράση, ως αναστολέας της τρανσαμινάσης του GABA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσής του στον εγκέφαλο και επομένως την παρατεταμένη δράση του. [27][24]

### 1.7.3. Νεότερα αντιεπιληπτικά φάρμακα

Πρόκειται για νέες χημικές ουσίες οι οποίες δρουν μέσω ποικίλων μηχανισμών και όχι απαραίτητα όμοιων με τους προηγούμενους. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν:

- *Βιγκαμπατρίνη*

Το πρώτο φάρμακο που προέκυψε από σχεδιασμό του μορίου ειδικά για το χώρο της επιληψίας και αποτελεί βινυλο-υποκατάστατο ανάλογο του GABA, αναστολέας της τρανσαμινάσης του καθώς και του μεταβολισμού του. Παρουσιάζει εξαιρετική ειδικότητα για το ένζυμο αυτό και λειτουργεί μέσω δημιουργίας σταθερού ομοιοπολικού δεσμού. [24][17]

- *Λαμοτριγίνη*

Από φαρμακολογικής πλευράς μοιάζει στη φαινυτοΐνη και τη καρβαμαζεπίνη αφού δρα στα κανάλια Νατρίου και Ασβεστίου και πιθανά να εμποδίζει την απελευθέρωση διεγερτικών αμινοξέων. Έχει ένα ευρύ θεραπευτικό προφίλ και είναι αποτελεσματική ακόμη και εναντίον των αφαιρέσεων. [28]

- *Φελβαμάτη*

Είναι χημικό ανάλογο της μεπροβαμάτης, αγχολυτικό φάρμακο που δε χρησιμοποιείται πλέον. Φαίνεται να δρα ποικιλοτρόπως τόσο σε κανάλια νατρίου, στο GABA και παράλληλα προκαλεί μερική αναστολή στον NMDA υποδοχέα. Αν και συνήθως δεν προκαλεί σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες, μπορεί περιστασιακά να προκαλέσει αναιμίες ή ακόμη και ηπατίτιδα γεγονός που έχει περιορίσει την κλινική της χρήση στις φαρμακοανθεκτικές μορφές επιληψίας. [29]

- *Γκαμπαπεντίνη και Πρεγκαμπαλίνη*

Αποτελούν φάρμακο και προ-φάρμακο αντίστοιχα, με την πρεγκαμπαλίνη να εμφανίζει ισχυρότερη δράση. Ιδιαίτερα αποτελεσματικό φάρμακο σε κρίσεις μερικής επιληψίας το οποίο μάλιστα εμφανίζει λιγότερο επικίνδυνες ανεπιθύμητες ενέργειες από τα άλλα αντιεπιληπτικά φάρμακα. [30]

- *Τιαγκαμπίνη*

Ανάλογο του GABA που μπορεί και διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, αναστέλλει τον GAT1, μεταφορέα του GABA που βρίσκεται στους νευρώνες, αυξάνοντας έτσι τη συγκέντρωση του GABA στη σύναψη. [16]

- *Τοπιραμάτη*

Μία ουσία με πολλαπλές δράσεις καθώς αποκλείει τα κανάλια Νατρίου και Ασβεστίου, ενισχύει τη δράση του GABA, αποκλείει τους υποδοχείς AMPA και αναστέλλει ασθενώς την καρβονική ανυδράση. Αν και έχει λιγότερο σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες από άλλα αντιεπιληπτικά φάρμακα, είναι τερατογόνος ουσία, επομένως η χρήση της έχει περιοριστεί σε ανθεκτικές μορφές της νόσου. [16]

- *Λεβεκετιράμη*

Ανάλογο της πιρακετάμης, φαρμάκου αρχικά σχεδιασμένου για τη βελτίωση της νοητικής λειτουργίας. Προσδένεται στην πρωτεΐνη 2A των συναπτικών κυστιδίων (SV2A), πρωτεΐνη για την αγκυροβόληση και συγχώνευση κυστιδίων στην προσυναπτική μεμβράνη και με τον τρόπο αυτό παρεμβαίνει στην απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών. [2][16]

- *Ζονισαμίδη*

Σουλφοναμίδιο αρχικά σχεδιασμένο ως αντιβακτηριδιακό φάρμακο. Η δράση της στοχεύει στα κανάλια νατρίου και ασβεστίου, ίσως όμως ενισχύει και τη λειτουργία του GABA. [16]

- *Ρουφίναμίδη*

Ένα νεότερο ορφανό φάρμακο αντισπασμωδικό φάρμακο, παράγωγο τριαζόλης, φαίνεται να είναι αρκετά δραστικό έναντι φαρμακοανθεκτικών επιληψιών. Εγκρίθηκε το 2004 από τον EMA και FDA για τη θεραπεία του συνδρόμου Lennox-Gastaut (LGS) Η δράση της εστιάζει στη ρύθμιση των διαύλων Νατρίου, διατηρώντας τους ανενεργούς καθώς εμποδίζει την επαναπρόσληψη του GABA. Η οξυκαρβαμαζεπίνη και κυρίως η μεθοσουξιμίδη φαίνεται πως συμβάλλει στη μείωση της ρουφίναμίδης στον ορό του αίματος. [16]

- Στιριπεντόλη

Χρησιμοποιείται ως αντισπασμωδικό για τις κρίσεις του συνδρόμου Dravet, δρώντας κυρίως στους GABA υποδοχείς. Παράλληλα, φαίνεται πως αναστέλλει τη δράση των κυτοχρωμικών ισοενζύμων που συμμετέχουν στον ηπατικό μεταβολισμό των άλλων αντιεπιληπτικών φαρμάκων (π.χ. καρβαμαζεπίνη, βαλπροϊκό νάτριο και πολλών βενζοδιαζεπινών) ενισχύοντας με τον τρόπο αυτό τη δράση τους. [24]

**Πίνακας 1: ενδεικτικά αντιεπιληπτικά φάρμακα και ο μηχανισμός δράσης τους.**

ΑΕΦ	Γενιά	Μηχανισμός Δράσης
Φαινοβαρβιτάλη	1 <sup>η</sup>	Θετική ρύθμιση των υποδοχέων GABA, εισροή ιόντων Cl <sup>-</sup> στο εσωτερικό του κυττάρου και υπερπόλωση των κυτταρικών μεμβρανών
Φαινυντοΐνη	1 <sup>η</sup>	Παρατείνει την αδρανοποίηση των καναλιών νατρίου, μειώνεται η εισροή ιόντων Na <sup>+</sup> με αποτέλεσμα τη μείωση των δυναμικών ενεργείας
Αιθοσουξιμίδη	1 <sup>η</sup>	Αναστολέας των καναλιών Ασβεστίου
Βαλπροϊκό	2 <sup>η</sup>	Αναστολέας καναλιών Νατρίου, Ασβεστίου και παρεμποδίζει την απακετυλάση ιστονών
Καρβαμαζεπίνη	2 <sup>η</sup>	Ενίσχυση της αδρανοποίησης των καναλιών Νατρίου
Κλοναζεπάμη	2 <sup>η</sup>	Ισχυρός αγωνιστής του υποδοχέα GABA, μείωση της κατανάλωσης σεροτονίνης
Βιγκαμπατρίνη	3 <sup>η</sup>	Μη αναστρεπτός αναστολέας της τρانشαμινάσης του GABA
Λαμοτριγίνη	3 <sup>η</sup>	Συνδέτης των τασεο-εξαρτώμενων καναλιών Νατρίου
Γκαμπαπεντίνη	3 <sup>η</sup>	Συνδέτης της α <sub>2</sub> δ υπομονάδας των καναλιών νατρίου
Φελβαμάτη	3 <sup>η</sup>	Ανταγωνιστής των NMDA υποδοχέων, παρεμποδίζει τη σύνδεση του GABA στον υποδοχέα
Τοπιραμάτη	3 <sup>η</sup>	Ανταγωνιστής των AMPA υποδοχέων και ενισχύει τη δράση του GABA
Τιαγκαμπίνη	3 <sup>η</sup>	Παρεμποδίζει την επαναπρόσληψη του GABA
Λεβετιρακετάμη	3 <sup>η</sup>	Συνδέτης της πρωτεΐνης SV2A
Ζονισαμίδη	3 <sup>η</sup>	Τροποποιεί το κατώφλι του δυναμικού των τασεο-εξαρτώμενων διαύλων νατρίου
Πρεγκαμπαλίνη	3 <sup>η</sup>	Συνδέτης της α <sub>2</sub> δ υπομονάδας των καναλιών ασβεστίου
Λακοζαμίδη	3 <sup>η</sup>	Ενισχύει επιλεκτικά την αργή αδρανοποίηση των τασεο-εξαρτώμενων διαύλων νατρίου



Ρουφιναμίδη	3 <sup>η</sup>	Τροποποίηση της ενεργότητας των διαύλων νατρίου
Εσλικαρβαζεπίνη	3 <sup>η</sup>	Παρεμπόδιση των τασεο-εξαρτώμενων διαύλων Νατρίου
Στριπεντόλη	3 <sup>η</sup>	Ενίσχυση της δράσης του GABA

### 1.8. Ανεπιθύμητες ενέργειες

Αν και έχουν ανακαλυφθεί πολυάριθμες φαρμακευτικές ουσίες και με ποικίλους μηχανισμούς δράσης, η ίαση της νόσου δεν είναι πάντα επιτυχής. Πολλοί ασθενείς εμφανίζουν σύντομα ανθεκτικότητα ή ανεπιθύμητες ενέργειες, με αποτέλεσμα η θεραπεία να αποτυγχάνει. (Πίνακας 2)

Ως ανεπιθύμητη ενέργεια ορίζεται οποιαδήποτε επιβλαβής και ακούσια απόκριση η οποία σχετίζεται με τη λήψη φαρμάκου. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με τη φαρμακοθεραπεία κατά της επιληψίας μπορούν να διακριθούν βάσει συχνότητας, σοβαρότητας, συμπτωματολογίας, παθοφυσιολογικού μηχανισμού και οργάνου/ ιστού που έχει επηρεαστεί. Αναφορικά με τα αντιεπιληπτικά φάρμακα οι ανεπιθύμητες ενέργειες πολύ συχνά εστιάζουν στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα, ενδεχομένως να επηρεάζεται η γνωστική λειτουργία του ατόμου ή η ψυχική του υγεία. Βέβαια, αρκετά σημαντικές είναι και οι ανεπιθύμητες ενέργειες που αφορούν στη γενικότερη παθοφυσιολογία του ατόμου, όπως η τοξικότητα, η απώλεια ή πρόσληψη βάρους κ.ά.[31] Πιο αναλυτικά, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, οι ανεπιθύμητες ενέργειες ταξινομούνται σε 5 τύπους:

Τύπος Α: οξείες αντιδράσεις που σχετίζονται με το μηχανισμό δράσης της ουσίας, σε αυτές περιλαμβάνονται η ύπνωση, η ζάλη, η αστάθεια, η διπλωπία, ευερεθιστότητα και κατάθλιψη. Ξεκινούν με την έναρξη λήψης θεραπείας και υποχωρούν συνήθως μετά τη διακοπή ή μείωση της δόσης. (Πίνακας 2)

Τύπος Β: ιδιοσυγκρασιακές αντιδράσεις οι οποίες δε σχετίζονται με το μηχανισμό δράσης του φαρμάκου, αλλά κυρίως με τα χαρακτηριστικά του έκαστου οργανισμού, μπορεί λόγου χάριν να συνδέονται με κάποια υπερευαισθησία ή το μεταβολισμό του ατόμου. Τα συμπτώματα του τύπου αυτού είναι τα εξανθήματα, σοβαρές βλεννογονοδερματικές αντιδράσεις, ηπατοτοξικότητα, αναμίες. Εμφανίζονται συνήθως λίγες εβδομάδες μετά τη λήψη του φαρμάκου και υποχωρούν μετά τη διακοπή του φαρμάκου και λήψη υποστηρικτικής θεραπείας. (Πίνακας 2)

Τύπος Γ: περιλαμβάνονται οι χρόνιες ανεπιθύμητες ενέργειες που συνήθως εμφανίζονται μετά από παρατεταμένη λήψη της αγωγής. Για παράδειγμα, η λήψη ή η απώλεια βάρους, η μείωση της οστικής πυκνότητας, η αλωπεκία είναι συμπτώματα που συγκαταλέγονται στις χρόνιες ανεπιθύμητες ενέργειες. (Πίνακας 2)

Τύπος Δ: αφορούν ανεπιθύμητες ενέργειες οι οποίες εμφανίζονται στους απογόνους έπειτα από έκθεση σε ΑΕΦ κατά τη διάρκεια της κύησης (ιδιαίτερα στο

1<sup>ο</sup> τρίμηνο) ή λίγο πριν. Σε αυτές περιλαμβάνονται τερατογενέσεις, καρκινογενέσεις ή ακόμη και ο εμβρυϊκός θάνατος. (Πίνακας 2)

Τύπος Ε: αφορά σε ανεπιθύμητες ενέργειες που προκαλούνται κυρίως λόγω αλληλεπιδράσεων στις περιπτώσεις συνδυαστικής λήψης φαρμάκων και είναι πιο συχνές στις περιπτώσεις όπου συνδυάζονται ΑΕΦ της 1<sup>ης</sup> γενιάς. [32] [33] [31] (Πίνακας 2)

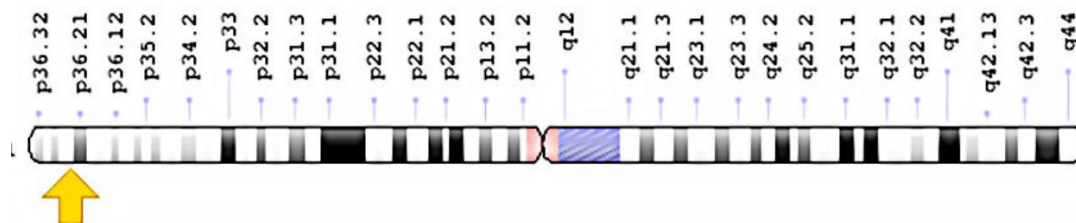
**Πίνακας 2: Σύνοψη ανεπιθύμητων ενεργειών των ΑΕΦ**

ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ	ΘΕΡΑΠΕΙΑ
<b>ΤΥΠΟΣ Α</b>	Οξεία αντίδραση σχετική με το φάρμακο	Υπνηλία, λήθαργος, κόπωση, κόπωση, αϋπνία, ζάλη, αστάθεια, ίλιγγος, ανισορροπία, αταξία, διπλωπία, τρόμος, γνωστική δυσλειτουργία, ευερεθιστότητα, επιθετική συμπεριφορά, κατάθλιψη, γαστρεντερικές διαταραχές, υπονατρίαζα, παραισθήσεις	Μείωση δοσολογίας ή αντικατάσταση αντιεπιληπτικής αγωγής
<b>ΤΥΠΟΣ Β</b>	Αντίδραση λόγω ευαισθησίας στην αγωγή	Δερματικά εξανθήματα, σοβαρές βλεννογονοδερματικές αντιδράσεις (εξάνθημα φαρμάκου με ηωσινοφιλία και συστηματικά συμπτώματα, τοξική επιδερμική νεκρόλυση, σύνδρομο Stevens-Johnson), απλαστική αναιμία, ακοκκιοκυτταραιμία, ηπατοτοξικές επιδράσεις, παγκρεατίτιδα, γλαύκωμα, ασηπτική μηνιγγίτιδα	Άμεση διακοπή του φαρμάκου, υποστηρικτική αγωγή βάσει των αντίστοιχων συμπτωμάτων, αντικατάσταση του ΑΕΦ με κάποιο χαμηλού κινδύνου για διασταυρούμενες αντιδράσεις
<b>ΤΥΠΟΣ Γ</b>	Ανεπιθύμητες ενέργειες λόγω παρατεταμένης έκθεσης στην αγωγή	Μειωμένη οστική πυκνότητα, αύξηση ή απώλεια βάρους, ανεπάρκεια φυλλικού οξέος, διαταραχές συνδετικού ιστού, υπερτρίχωση, υπερπλασία των ούλων, αλωπεκία, απώλεια οπτικού πεδίου	Αγωγή για τις αντίστοιχες ανεπιθύμητες ενέργειες (π.χ. Ασβέστιο, βιταμίνη D) και διακοπή του φαρμάκου αν κρίνεται απαραίτητο
<b>ΤΥΠΟΣ Δ</b>	Ανεπιθύμητες ενέργειες μετά από προγεννητική έκθεση	Γεννητικές ανωμαλίες, νευροαναπτυξιακή καθυστέρηση, ψευδολέμφωμα	Αποφυγή λήψης φαρμάκων κατά το 1 <sup>ο</sup> τρίμηνο ή λίγο πριν την εγκυμοσύνη
<b>ΤΥΠΟΣ Ε</b>	Συνδυαστικές αλληλεπιδράσεις	Αυξημένος κίνδυνος δερματικού εξανθήματος μετά την προσθήκη λαμοτριγίνης σε αγωγή με Βαλπροϊκό, μειωμένος έλεγχος των κρίσεων μετά το συνδυασμό αντισυλληπτικής αγωγής με λαμοτριγίνη, μείωση αποτελεσματικότητας της βαρφαρίνης με την προσθήκη καρβαμαζεπίνης, αυξημένος κίνδυνος νευροτοξικότητας του ΚΝΣ μετά από συνδυασμό ΑΕΦ αναστολέων του καναλιού νατρίου	Προσαρμογή της δόσης σύμφωνα με την κλινική εικόνα του ασθενούς και τις συγκεντρώσεις του φαρμάκου στο αίμα

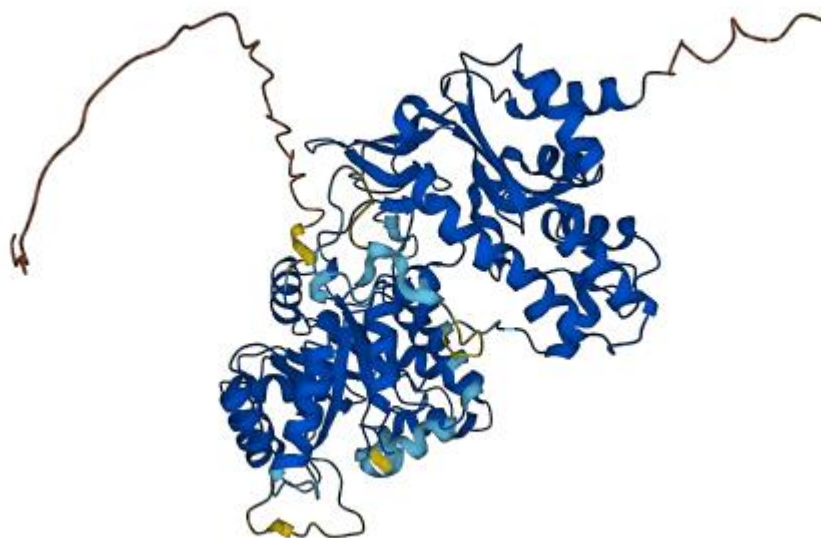
Καταληκτικά, το σχέδιο θεραπείας προκειμένου να είναι αποτελεσματικό περιλαμβάνει πολλές φορές ένα συνδυασμό φαρμάκων. Για το λόγο αυτό, είναι αναγκαία η σταδιακή τιτλοδότηση του φαρμάκου στον ασθενή με ταυτόχρονη παρακολούθηση τόσο της συμπεριφοράς του όσο και των βιοδεικτών του στο πλάσμα (π.χ. η συγκέντρωση του φαρμάκου στο αίμα ή η μέτρηση των ηπατικών ενζύμων). Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η βέλτιστη και χαμηλότερη δυνατή δοσολογία με τις λιγότερες πιθανότητες για ανάπτυξη ανεπιθύμητων ενεργειών. [31]

### 1.9. Το ένζυμο 5,10-μεθυλοτραϊδροφυλλικής αναγωγάσης (MTHFR)

Το ένζυμο της 5,10-μεθυλοτραϊδροφυλλικής αναγωγάσης είναι μία διμερής πρωτεΐνη βάρους 70-77 kDa, το γονίδιο της οποίας εδράζεται στο χρωμόσωμα 1 (1p36.3). [34] (Εικόνα 6, Εικόνα 7)

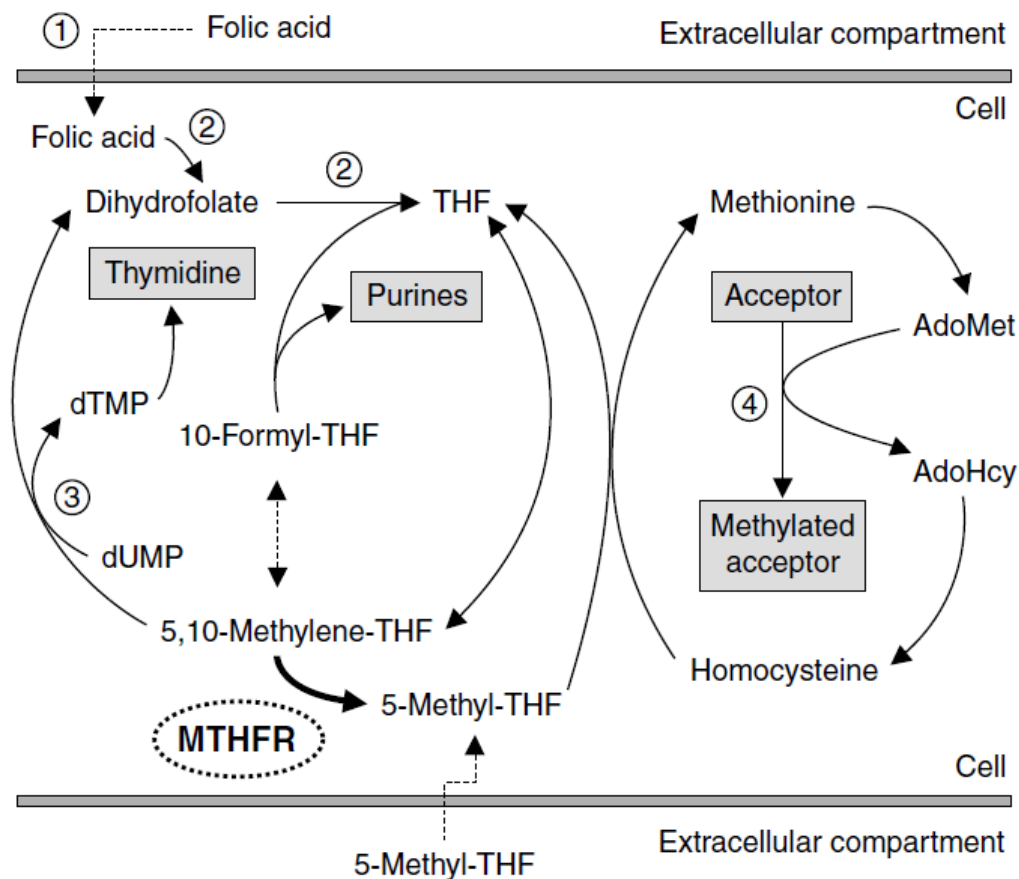


**Εικόνα 6: Αναπαράσταση του σημείου όπου εντοπίζεται το γονίδιο του ενζύμου, στο χρωμόσωμα1.**  
([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/genome/?id=GCF\\_000001405.40](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/genome/?id=GCF_000001405.40))



**Εικόνα 7: Η δομή του ενζύμου MTHFR όπως προκύπτει από την Protein Data Bank**  
(<https://www.rcsb.org/3d-view/6FCX/1>)

Η δράση του ενζύμου είναι μείζονος σημασίας για τη λειτουργία του οργανισμού καθώς σχετίζεται με τη σύνθεση των πουρινών και πυριμιδινών των νουκλεϊκών οξέων. Πιο συγκεκριμένα, καταλύει τη μετατροπή του 5-10 μεθυλοτετραϋδροφυλλικού σε 5-μεθυλοτετραϋδροφυλλικό, το οποίο λειτουργεί ως δότης μεθυλίου για τη μετατροπή της ομοκυστεΐνης σε μεθειονίνη. Η μετατροπή αυτή θα γίνει από τη συνθετάση της μεθειονίνης, ένζυμο το οποίο βρίσκεται σε όλους τους ιστούς των θηλαστικών και χρησιμοποιεί ως συμπράγοντα τη βιταμίνη B<sub>12</sub> (κοβαλαμίνη). Μέσω των μονοπατιών αυτών επηρεάζονται κύριες βιολογικές διαδικασίες όπως η σύνθεση και η επιδιόρθωση του DNA. [35] [36] Η δράση του ενζύμου φαίνεται να σχετίζεται σημαντικά με την εύρυθμη λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος, την πορεία της κύησης και κυρίως βλάβες του νευρικού σωλήνα του εμβρύου. Ακόμη, βιβλιογραφικά συνδέεται με νευρολογικές και ψυχιατρικές διαταραχές και πιθανώς καρκινογενέσεις. [37] (Εικόνα 8)



**Εικόνα 8: Διαγραμματική απεικόνιση το μονοπατιού του MTHFR [36]**

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν καταγεγραμμένες αρκετές σημειακές νουκλεοτιδικές παραλλαγές, οι οποίες έχουν ως συνέπεια τη μειωμένη ενεργότητα του ενζύμου, ωστόσο στην παρούσα μελέτη θα ασχοληθούμε με τις δύο κυριότερες.

### 1.9.1. Ο σημειακός νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός MTHFR C677T

Η σημειακή αυτή νουκλεοτιδική παραλλαγή παρουσιάζεται στο εξόνιο 4, στη θέση 677 της γονιδιακής αλληλουχίας και αφορά στην αντικατάσταση μίας Κυτοσίνης από Θυμίνη (C677T). Σε επίπεδο πρωτεΐνης αυτό μεταφράζεται ως αλλαγή του αμινοξέος της Αλανίνης σε Βαλίνη στη θέση 222 (A222V), γεγονός που οδηγεί σε ένα λιγότερο θερμοανθεκτικό μόριο. Συγκεκριμένα, σε άτομα ομόζυγα για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο παρατηρείται μειωμένη δραστηριότητα της τάξης του 50-60% σε θερμοκρασία 37°C και σε ποσοστό 65% σε θερμοκρασία 42°C. Αυτή η ισομορφή του ενζύμου χαρακτηρίζεται από μειωμένη συγγένεια με το Φλαβινο-αδενινο δινουκλεοτίδιο (FAD) και άρα μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου, τόσο σε ομόζυγους όσο και ετερόζυγους. [38]

Η παραλλαγμένη πρωτεΐνη χάνει τη σύνδεσή της με το FAD 3 φορές πιο γρήγορα σε σχέση με την κανονική πρωτεΐνη. [39] Κατά συνέπεια, οδηγούμαστε σε μειωμένη μετατροπή του υποστρώματος της ομοκυστεΐνης σε μεθειονίνη, η οποία συγκεντρώνεται στο πλάσμα και χαμηλά επίπεδα φυλλικού οξέος. Τα επίπεδα ομοκυστεΐνης στο πλάσμα είναι αρκετά υψηλά στους ομόζυγους για το μη φυσιολογικό αλληλόμορφο και μέτρια για τους ετερόζυγους εν συγκρίσει με τους ομόζυγους για το αγρίου τύπου αλληλόμορφο. [40]

Τα υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης στο αίμα, έχουν συσχετιστεί πρωτίστως με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων και ισχαιμικών επεισοδίων. Η συγκεκριμένη παραλλαγή φαίνεται ωστόσο να εμπλέκεται σε μία πληθώρα ασθενειών, μεταξύ των οποίων ο καρκίνος, ο διαβήτης και η ψωρίαση. Σε νευρολογικό επίπεδο, η ανεπάρκεια φυλλικού οξέος και βιταμίνης B<sub>12</sub> έχει συσχετιστεί με παθογενείς καταστάσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος. Πιο συγκεκριμένα, στον Καυκάσιο και Ασιατικό πληθυσμό, ο πολυμορφισμός C677T, συνδέεται εξίσου με την ασθένεια του Parkinson, ενώ μόνο στον Ασιατικό και όχι στον Καυκάσιο, σχετίζεται και με τη νόσο του Alzheimer. Ακόμη σε Ασιατικό και Αφρικανικό πληθυσμό, βρίσκεται να σχετίζεται επιπλέον με τη διπολική διαταραχή και τη σχιζοφρένεια, κάτι που επίσης δεν ισχύει για τον Καυκάσιο πληθυσμό.

Στη συνέχεια, η συγκέντρωση φυλλικού/ ομοκυστεΐνης στο πλάσμα, φαίνεται να συνδέεται και με σύνδρομο του φάσματος του αυτισμού, γεγονός που έχει φέρει το ένζυμο MTHFR στο προσκήνιο των μελετών. Μάλιστα, το αλληλόμορφο T, θεωρείται υψηλού κινδύνου τόσο σε παιδιά Καυκάσιου όσο και Ασιατικού πληθυσμού. [38]

Στον τομέα μελέτης της επιληψίας, το ένζυμο MTHFR έχει αρχίσει να μελετάται ευρέως, καθώς οι συγκεντρώσεις της ομοκυστεΐνης φαίνεται να παίζουν καθοριστικό ρόλο στην εύρυθμη λειτουργία του εγκεφάλου. Μιας και οι αυξημένες συγκεντρώσεις της ομοκυστεΐνης, επηρεάζουν σημαντικά τη μεθυλίωση του DNA, αυτό μοιάζει να επιδρά θετικά στην εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων. Επίσης, τα αντιεπιληπτικά φάρμακα επιδρούν στο μεταβολισμό της ομοκυστεΐνης, επομένως το ένζυμο της MTHF αναγωγής συνδέεται άρρηκτα με τις αντιεπιληπτικές αγωγές. [28]

Υποστηρικτικά σε αυτό είναι τα αποτελέσματα της έρευνας των Munisamy et al. που συμπεραίνουν πως οι γονότυποι του *mthfr* μπορούν να καθορίσουν την πορεία της αγωγής. [26] Χαρακτηριστικά, οι Hujar et al. αναφέρουν πως το αλληλόμορφο T, ιδιαίτερα σε ομόζυγη κατάσταση, έναντι του C, είναι πιο συχνό σε επιληπτικούς ασθενείς εν συγκρίσει με τους υγιείς. Να σημειωθεί σε αυτό το σημείο πως ο γονότυπος του MTHFR δε σχετίζεται αποκλειστικά με τα συμπτώματα της ασθένειας, καθώς είναι πιθανό να επηρεάζει τη φαρμακοδυναμική των θεραπευτικών ουσιών. Τα άτομα με γονότυπο TT εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA, επομένως ενδέχεται να επηρεάζεται ο μεταβολισμός και η δράση των φαρμάκων που χρειάζεται να μεθυλιωθούν προκειμένου να δράσουν. [41] Παραδείγματος χάριν, σε ασθενείς με γονότυπο TT που έλαβαν καρβαμαζεπίνη ως θεραπεία παρατηρήθηκαν πολύ χαμηλά επίπεδα φυλλικού οξέος και πολύ υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης στο πλάσμα σε αντίθεση με τους ετερόζυγους και ομόζυγους για το αλληλόμορφο C. [27]

Επιπλέον, στατιστικές αναλύσεις έχουν δείξει συσχετίσεις μεταξύ των γονότυπων TT και CT, όχι μόνο στην εμφάνιση των επιληπτικών κρίσεων, αλλά και στην ανταπόκριση των ασθενών στα αντιεπιληπτικά φάρμακα. Πιο συγκεκριμένα, ο γονότυπος TT επηρεάζει το μεταβολισμό της οξυκαρβαμαζεπίνης και την ομοιοστάση της ομοκυστεΐνης. Στην ίδια έρευνα οι συγγραφείς υποδεικνύουν ότι σε ηλικιακές ομάδες που αφορούν τους νέους από 18-45 ετών, υπάρχει σύνδεση μεταξύ ετερόζυγων και ομόζυγων για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο και την εμφάνιση επιληπτικών επεισοδίων. [41]

### 1.9.2. Ο σημειακός νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός MTHFR A1298C

Αυτή η σημειακή νουκλεοτιδική παραλλαγή παρουσιάζεται στο εξόνιο 7 του γονιδίου και αφορά την αντικατάσταση της A από C, στη θέση 1298. Σε πρωτεϊνικό επίπεδο, έχουμε αλλαγή του γλουταμινικού οξέος σε αλανίνη στη θέση 429 που αφορά ρυθμιστική περιοχή του καρβοξυτελικού άκρου, ελαττώνοντας της συγγένεια σύνδεσης για το NAD(P). [35] Τόσο τα ετερόζυγα όσο και τα ομόζυγα για το C αλληλόμορφο άτομα, εμφανίζουν επίσης μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα. Οι αλλαγές αφορούν κυρίως στην επικράτεια σύνδεσης με το SAM (S-adenosylmethionine), προϊόν της δράσης του *mthfr*, το οποίο μπλοκάρει τη δράση του. [42] Ωστόσο, πρόκειται για παραλλαγή, με λιγότερο σοβαρές συνέπειες στη δραστηριότητα του ενζύμου. Επεξηγηματικά, σε άτομα ομόζυγα για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο αυτού του πολυμορφισμού, έχουν το 68% της ενεργότητας του ενζύμου, συγκριτικά με τους ομόζυγους για το T αλληλόμορφο, του πολυμορφισμού C677T που έχουν το 45% της ενεργότητας. [36] Οι συνέπειες της παραλλαγής φαίνεται να είναι εντονότερες όταν εμφανίζονται και στους 2 πολυμορφισμούς C677T και A1298C. Κατ'επέκταση, ο πολυμορφισμός σπάνια μελετάται μεμονωμένος.

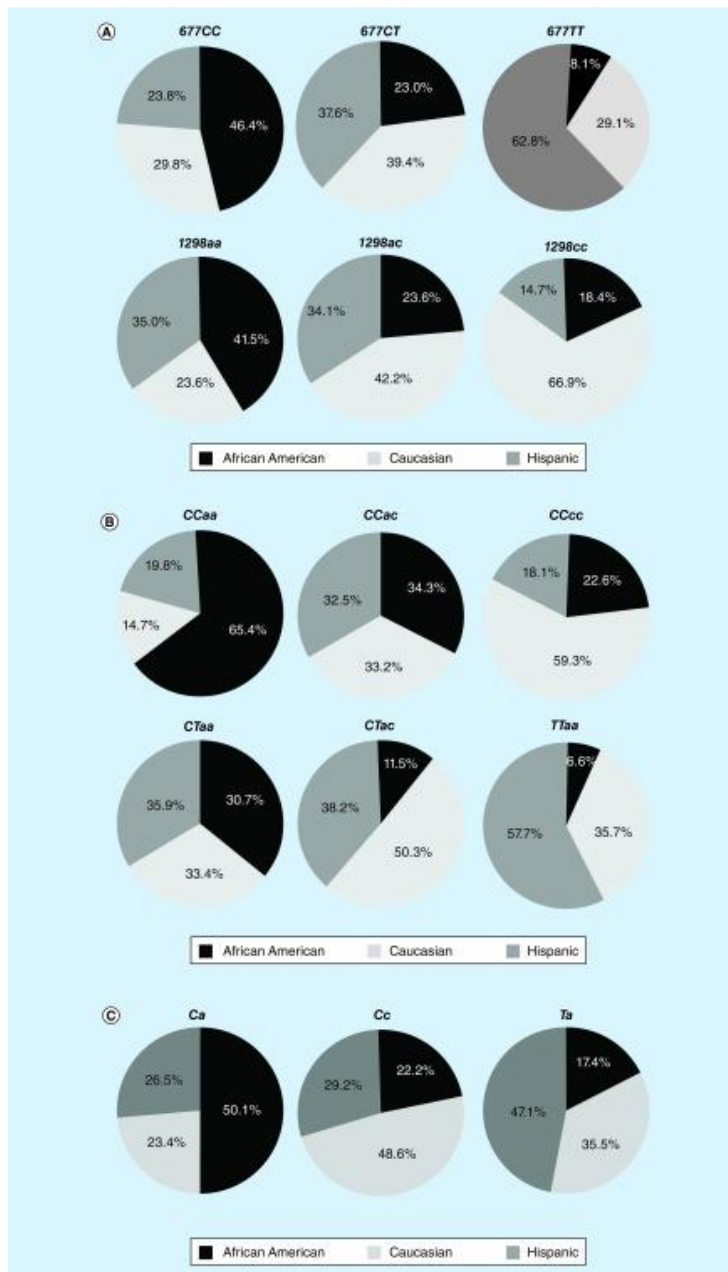
Επίσης, ο πολυμορφισμός A1298C συνδέεται με ποικίλες ασθένειες, όπως καρδιαγγειακά νοσήματα, νευρολογικές ασθένειες και μάλιστα θεωρείται παράγοντας κινδύνου για εμφάνιση εγκεφαλικών επεισοδίων καθώς και για καρκίνο του εγκεφάλου. [43] Σε Ασιατικό πληθυσμό φαίνεται να σχετίζεται στενά με

την εμφάνιση σχιζοφρένειας. [37] Ταυτόχρονα, μελέτες σε Ασιατικό και Καυκάσιο πληθυσμό, αποδεικνύουν συσχέτιση του A1298C πολυμορφισμού με αμφιβληστροειδοπάθεια και την εξέλιξη της νεφρικής νόσου, λόγω του διαβήτη. [44] Αντίθετα με τον πολυμορφισμό C677T, ο A1298C δε φαίνεται να αποτελεί παράγοντα κινδύνου για σύνδρομο στο φάσμα του αυτισμού. Συνεχίζοντας, ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός έχει γίνει στόχος ερευνών σχετικά με το ρόλο του στην ανάπτυξη κατάθλιψης αλλά και στη θεραπεία αυτής. Η ομοζυγωτία για το C αλληλόμορφο φαίνεται παράλληλα με το μεταβολισμό της ομοκυστεΐνης, να επηρεάζει και το μονοπάτι σύνθεσης και επαναπρόσληψης σεροτονίνης, αποτελώντας έτσι παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση της κατάθλιψης και σημαντικό στοιχείο για τη θεραπευτική αγωγή κατά αυτής. Μάλιστα, έχει προταθεί η ένταξη του πολυμορφισμού αυτού σε αλγόριθμο για την κλινική χρήση από ειδικούς θεραπευτές ψυχικής υγείας. [45]

### 1.9.3. Δημογραφικά στοιχεία

Σύμφωνα με τους Graydon, Claudio, Baker et al. η κατανομή των συχνοτήτων σε τρεις κύριες εθνικότητες, έχει ως εξής: στους Καυκάσιους παρατηρούμε παρόμοια συχνότητα μεταξύ των ομόζυγων για τον πολυμορφισμό C677T, ενώ σε υψηλότερη συχνότητα εμφανίζονται οι ετερόζυγοι για τον πολυμορφισμό αυτό. Αντιθέτως, σχετικά με τον πολυμορφισμό A1298C, οι Καυκάσιοι εμφανίζονται να είναι ομόζυγοι για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο σε ποσοστό της τάξης του 66,9%, πολύ υψηλότερα από τις άλλες εθνικότητες. [39] (Εικόνα 9)





**Εικόνα 9: Κατανομή των συχνοτήτων βάσει εθνικότητας: (A) των γονοτύπων, (B) των διπλότυπων και (C) των απλοτύπων [39]**

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1.10 Σκοπός της εργασίας

Στο πλαίσιο της Φαρμακογονιδιωματικής και εξατομικευμένης θεραπείας ολοένα και περισσότερες μελέτες συνηγορούν στην ανάγκη εύρεσης βιοδεικτών, οι οποίοι θα μπορούσαν να εκτιμήσουν τον κίνδυνο εμφάνισης μιας νόσου. Το γενετικό υπόβαθρο μπορεί να αποτελέσει ισχυρό εργαλείο για την προδιάθεση της εμφάνισης ποικίλων ασθενειών, όπως και της επιληψίας.

Σκοπός της διπλωματικής αυτής εργασίας είναι η μελέτη τη συσχέτισης των πολυμορφισμών C677T (rs1801133) και A1298C (rs1801131) του γονιδίου MTHFR σε ασθενείς με γενικευμένη, εστιακή και εστιακή δευτεροπαθώς γενικευμένη επιληψία στον ευρωπαϊκό καυκάσιο πληθυσμό.

Πιο συγκεκριμένα:

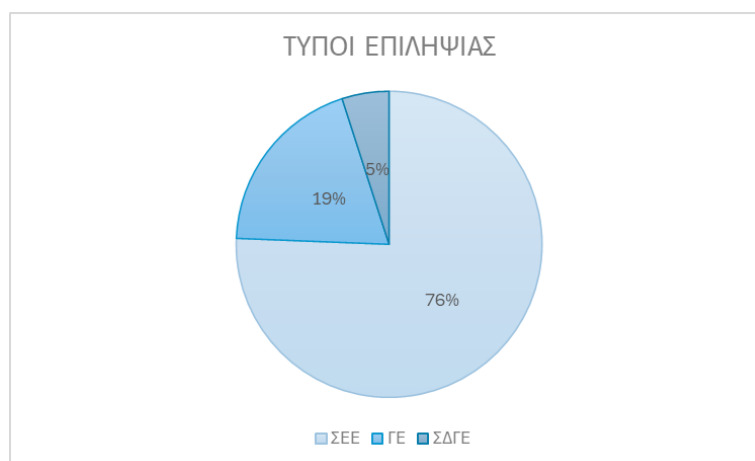
- 1) Η μελέτη της συχνότητας κατανομής των πολυμορφισμών C677T και A1298C του MTHFR μεταξύ επιληπτικών καυκάσιων ασθενών από την Νοτιοανατολική Ευρώπη, που περιλαμβάνει και την Ελλάδα.
- 2) Η μελέτη της κατανομής των πολυμορφισμών C677T και A1298C του MTHFR μεταξύ καυκάσιων επιληπτικών ασθενών από την Νοτιοανατολική Ευρώπη και ομάδας ελέγχου από την ίδια γεωγραφική περιοχή.
- 3) Η μελέτη της κατανομής των πολυμορφισμών C677T και A1298C του MTHFR μεταξύ των ηλικιακών ομάδων επιληπτικών ασθενών.

Η μελέτη της συχνότητας των πολυμορφισμών C677T και A1298C του MTHFR με στόχο πιθανή συσχέτιση με την επιληπτική νόσο, θα μπορούσε να αναδείξει τους πολυμορφισμούς αυτούς σε προδιαθετικούς δείκτες για την εκδήλωση επιληπτικών επεισοδίων, την αναμενόμενη σοβαρότητα αυτών καθώς και για το ηλικιακό πλαίσιο στο οποίο τείνουν να εμφανιστούν. Απώτερο κίνητρο της εργασίας αυτής είναι η συμβολής της στην εξατομικευμένη ιατρική και θεραπεία. Μελετώντας το γονιδιακό του προφίλ, θα είναι δυνατό να αναγνωριστεί έγκαιρα ο κίνδυνος νόσησης από επιληψία προκειμένου να προληφθεί η εκδήλωσή της. Στη συνέχεια, η γενετική ταυτότητα θα μπορούσε να αποτελέσει σημαντικό στοιχείο για την ανάπτυξη ενός αποτελεσματικότερου εξατομικευμένου θεραπευτικού σχήματος.

## 2. Υλικά και Μέθοδοι

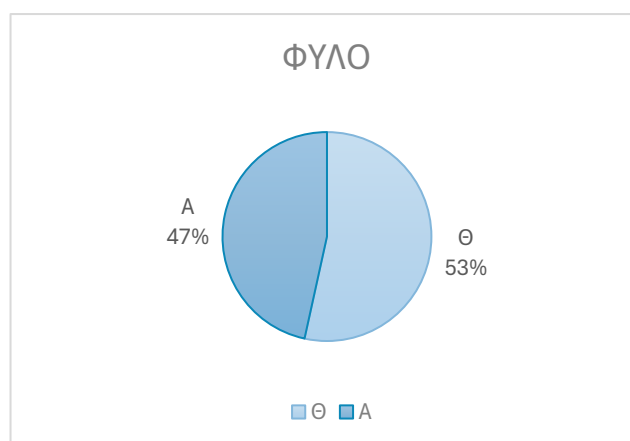
### 2.1. Δείγματα ασθενών

Στη μελέτη συμμετείχαν 218 ασθενείς, οι 152 είχαν διαγνωστεί με σύνθετη εστιακή επιληψία, οι 39 με γενικευμένη επιληψία και τέλος, 10 ασθενείς διαγνώστηκαν με εστιακή δευτεροπαθώς γενικευμένη επιληψία, οι οποίοι συγκρίθηκαν ως προς δύο πολυμορφισμούς με την ομάδα ελέγχου. Στη μελέτη συμμετείχαν 17 ασθενείς για τους οποίους δεν είχε καταγραφεί ο ακριβής τύπος της νόσου. (Εικόνα 10)



**Εικόνα 10: Κατανομή των τύπων επιληψίας στους ασθενείς.**

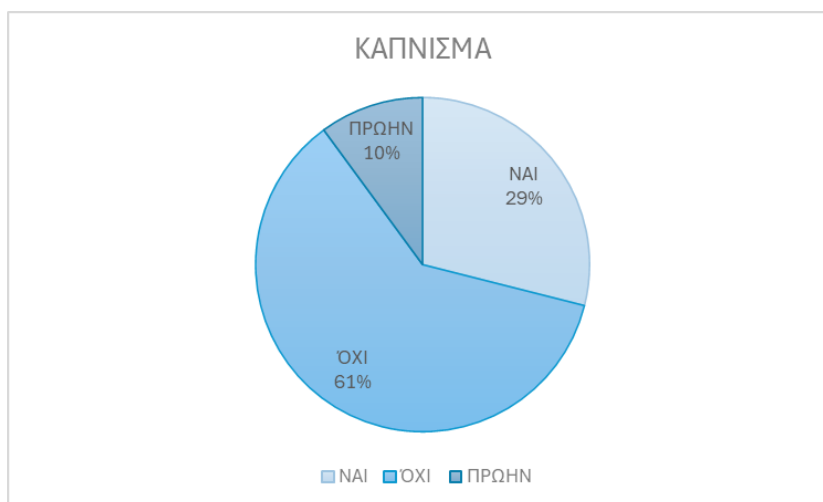
Αναφορικά με το φύλο, το 53% του δείγματός μας αποτελείται από θήλεα άτομα ενώ το 47% των ασθενών, είναι άνδρες. Όπως φαίνεται η αναλογία των φύλων είναι σχεδόν 1:1. (Εικόνα 11)



**Εικόνα 11: ποσοστά των φύλων στην ομάδα ασθενών**

Οι ασθενείς διακρίθηκαν σε ενεργούς καπνιστές, μη καπνιστές ή πρώην καπνιστές και τα ποσοστά τους φαίνονται στο παρακάτω γράφημα της εικόνας 12. Βλέπουμε

πως η πλειονότητα των ασθενών ασθενών, 61%, είναι μη καπνιστές, το 29% είναι ενεργοί καπνιστές και το 10% είναι πρώην καπνιστές. (Εικόνα 12)



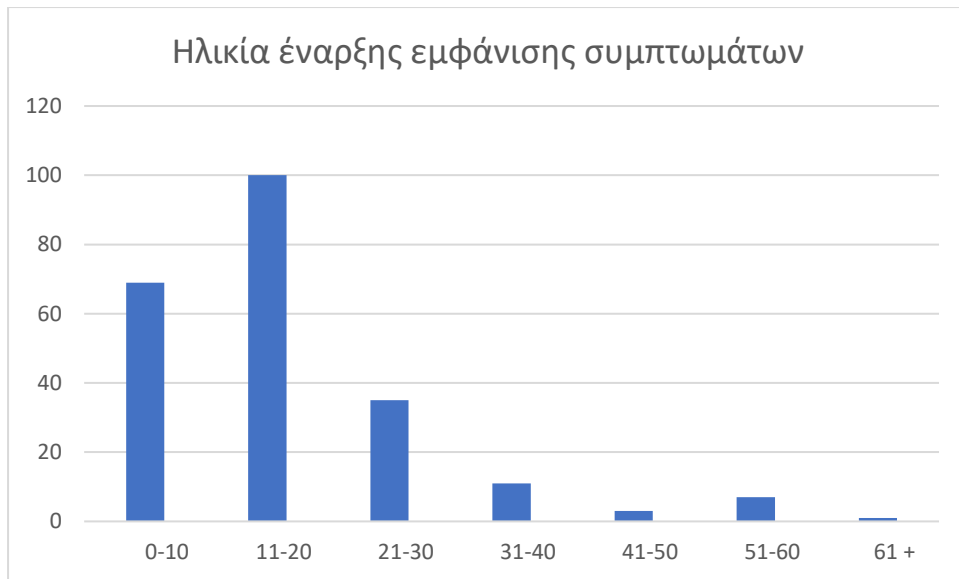
**Εικόνα 12 : Ποσοστό καπνιστών ή μη στην έρευνα**

Τέλος, από το σύνολο των ασθενών μόνο το 23% δήλωσε πως υπάρχουν περιστατικά επιληψίας στον οικογενειακό κύκλο, ενώ το 77% δεν ανέφερε κάποιο προηγούμενο περιστατικό επιληψίας στο οικογενειακό περιβάλλον. (Εικόνα 13)



**Εικόνα 13: ποσοστά με προαναφερθέν οικογενειακό ιστορικό**

Στο παρακάτω ραβδόγραμμα (Εικόνα 14) απεικονίζεται η κατανομή των ηλικιών εμφάνισης πρώτων συμπτωμάτων της ασθένειας. Παρατηρούμε πως η συντριπτική πλειοψηφία, έχει εμφανίσει τα πρώτα συμπτώματα της νόσου μέχρι την ηλικία των 20 ετών.



**Εικόνα 13: Απεικόνιση της ηλικίας έναρξης συμπτωμάτων.**

Οι ασθενείς εισήχθησαν στη μελέτη προοδευτικά, είτε κατά την προγραμματισμένη επίσκεψή τους στα εξωτερικά ιατρεία της Α' Νευροχειρουργικής Κλινικής του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Ο Ευαγγελισμός» είτε κατά την επίσκεψή τους ιατρείο του Καθηγητή Νευρολογίας και Χειρουργικής Θεραπείας Νευρολογικών Νοσημάτων, Ιατρικής Σχολής Αθηνών, ΕΚΠΑ, Στέργιου-Στυλιανού Γκατζώνη. Η μελέτη είχε πάρει έγκριση από την επιστημονική επιτροπή του του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Ο Ευαγγελισμός»

### 2.1.1. Κριτήρια εισαγωγής

Με βάση το πρωτόκολλο της Μελέτης, τα κριτήρια εισαγωγής των ασθενών σε αυτήν ήταν:

- Άνδρες και γυναίκες ηλικίας όλων των ηλικιών.
- Βεβαιωμένη διάγνωση επιληψίας.
- Απουσία άλλης παθολογικής κατάστασης που ενδεχομένως να επηρεάζει την κλινική εικόνα του ασθενούς.
- Υπογραφή εντύπου ενημερωμένης συγκατάθεσης για συμμετοχή στην παρούσα μελέτη. Σε περίπτωση ανήλικου ασθενούς, το έντυπο συγκατάθεσης υπογράφηκε από το γονέα ή κηδεμόνα.

### 2.1.2. Κριτήρια αποκλεισμού

Από τη μελέτη απορρίφθηκαν οι ασθενείς για τους οποίους ισχύουν τα παρακάτω:

- Μη επιβεβαιωμένη διάγνωση επιληψίας.
- Ασθενείς οι οποίοι δεν είχαν συναινέσει για την ένταξή τους στη μελέτη.

### 2.1.3. Συναίνεση συμμετεχόντων

Οι ασθενείς συμμετείχαν εθελοντικά στη μελέτη, αφού προηγουμένως είχαν μελετήσει και υπογράψει το ειδικό έντυπο ενυπόγραφης συγκατάθεσης (Informed Consent – IC). Το συγκεκριμένο έγγραφο στοχεύει στην ενημέρωση του ασθενούς για τη μελέτη και το σκοπό της, το είδος του δείγματος που χρειάζεται να παραληφθεί και το ρόλο του ασθενούς στη μελέτη. Ενώ ταυτόχρονα διαβεβαιώνει τον ασθενή πως θα τηρηθεί η εχεμύθεια και η εμπιστευτικότητα των προσωπικών του δεδομένων καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης.

Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί, πως στο έντυπο ενυπόγραφης συγκατάθεσης δεν αναφέρεται ο κωδικός του δείγματος παρά μόνο το ονοματεπώνυμο και η υπογραφή του ώστε να μην μπορούν να ταυτιστούν τα δείγματα και να τηρηθεί η ανωνυμία. Τέλος, ο γιατρός υπογράφει βεβαιώνοντας πως συναινεί στη διαδικασία. Τα έγγραφα αυτά φυλάσσονται στη νευρολογική κλινική του Ευαγγελισμού.

Παράλληλα για τον κάθε ασθενή συμπληρώνεται από το γιατρό, η «φόρμα συλλογής δειγμάτων», έγγραφο στο οποίο αναφέρονται τα εξής στοιχεία:

- Ημερομηνία και ώρα δειγματοληψίας
- Ηλικία
- Επάγγελμα
- Φύλο
- Καταγωγή
- Οικογενειακό ιστορικό ασθένειας
- Βάρος
- Ύψος
- Κάπνισμα (και αν ναι πόσα τσιγάρα ανά ημέρα)
- Σύντομο ιστορικό συμπτωμάτων
- Ηλικία πρώτων συμπτωμάτων
- Η φαρμακευτική που λαμβάνει ο ασθενής
- Ανεπιθύμητες ενέργειες σε κάποιο φάρμακο
- Αντίσταση σε κάποιο προηγούμενο φάρμακο

Στο έγγραφο αυτό αναφέρεται ο κωδικός του δείγματος βάσει του οποίου θα χρησιμοποιηθεί στη μελέτη, ενώ πουθενά δεν αναγράφεται το όνομά του. Τα έγγραφα αυτά φυλάσσονται σε ειδικά σημεία αποθήκευσης στο εργαστήριο της Ερευνητικής Ομάδας Κλινικής Φαρμακολογίας και Φαρμακογονιδιωματικής, διασφαλίζοντας την τήρηση της ανωνυμίας.

## 2.2. Λήψη δείγματος και μεταφορά

Μετά την ενημέρωση και συγκατάθεση των ασθενών για τη μελέτη, ο γιατρός πραγματοποίησε την αιμοληψία κατά την οποία παρελήφθησαν 3ml αίματος σε φιαλίδιο με αντιπηκτικό EDTA. Ενώ στη συνέχεια τοποθετήθηκε ο ειδικός κωδικός του ασθενούς, ώστε να μη γνωρίζει η ερευνητική μας ομάδα κανένα στοιχείο της ταυτότητάς του.

## 2.3. Πειραματική διαδικασία

### 2.3.1. Επεξεργασία αίματος

Από τα 3 ml περιφερικού αίματος τα 500μl φυλάσσονται στην κατάψυξη (-20°C) και τα υπόλοιπα φυλάσσονται σε υπερκατάψυξη (-80°C) για μελλοντικές αναλύσεις. Στη συνέχεια χρησιμοποιούμε τα 500μl ολικού περιφερικού αίματος για την απομόνωση του DNA με ειδικά extraction kits και στη συνέχεια ακολουθεί η γονοτυπική ανάλυση. Τελικό στάδιο της μελέτης είναι η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

### 2.3.2. Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA έγινε με εξειδικευμένες στήλες εκχύλισης νουκλεϊκών οξέων των εταιρειών PureLink™ Genomic DNA Mini Kit της εταιρείας Thermo Fisher Scientific και NucleoSpin Tissue, Mini kit for DNA from cells and tissue της εταιρείας Macherey Nagel. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί συγκεκριμένα διαλύματα πρωτεΐνάσης K, η οποία διασπά τους δεσμούς των μεμβρανών για την απελευθέρωση των ενδοκυττάρων ουσιών. Στη συνέχεια το υγρό μεταγγίζεται σε φιαλίδια με στήλες κατακράτησης του νουκλεϊκού οξέος. Μέσω ρυθμιστικών διαλυμάτων το DNA προσκολλάται στις μεμβράνες των στηλών και με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις αποβάλλονται οι πρωτεΐνες και λοιπές προσμίξεις. Σε τελικό στάδιο χρησιμοποιούνται διαλύματα απελευθέρωσης του DNA από τις στήλες και έκλουσης σε τελικό φιαλίδιο τύπου Eppendorf για την φύλαξή του.

### 2.3.3. Φωτομέτρηση δειγμάτων

Μετά την απομόνωση του DNA ακολουθεί η φωτομέτρηση του δείγματος σε φασματοφωτόμετρο (UV/Vis) προκειμένου να ελεγχθεί η ποσότητα και η καθαρότητά του. Με τον τρόπο αυτό ελέγχουμε την ποιότητα και την απόδοση της μεθόδου εκχύλισης που ακολουθήσαμε.

Η φασματοφωτομετρία βασίζεται στην ιδιότητα των χημικών μορίων να απορροφούν συγκεκριμένα μήκη ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, ωστόσο στο φάσμα της υπεριώδους ακτινοβολίας υπάρχει ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος χαρακτηριστικό για κάθε ουσία, στο οποίο εμφανίζει τη μέγιστη δυνατή

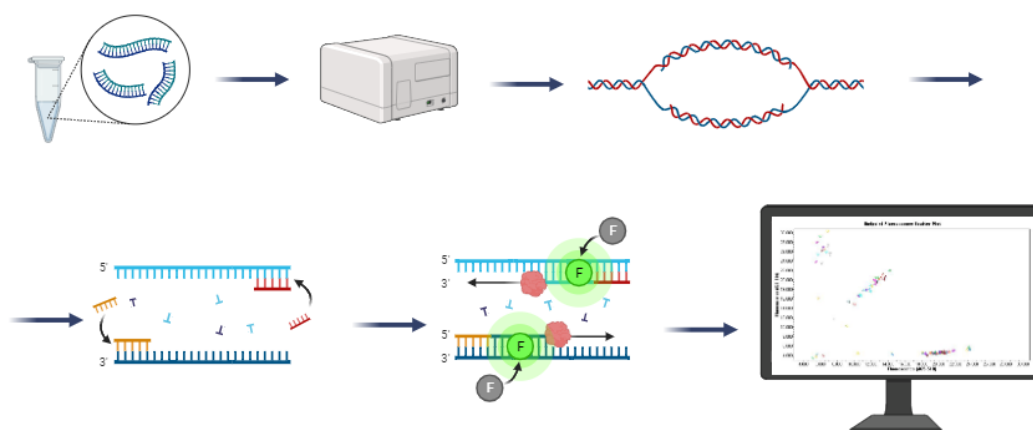


απορρόφηση. Το μήκος αυτό για τα νουκλεϊκά οξέα είναι ίσο με  $\lambda_{\max}=260 \text{ nm}$ , επομένως σε αυτό το μήκος γίνεται η μέτρηση της απορρόφησης. Έπειτα βάσει του νόμου Lambert-Beer,  $A = \epsilon Lc$ , όπου  $A$  η απορρόφηση στα  $260\text{nm}$ ,  $\epsilon$  ο μοριακός δεκαδικός συντελεστής απορρόφησης,  $L$  το μήκος κύματος σε  $\text{nm}$  και  $c$  η συγκέντρωση σε  $[M \equiv \text{mole/lit}]$ , υπολογίζεται η συγκέντρωση του DNA στο διάλυμα. Το πρωτόκολλο γονοτύπησης που θα εφαρμοστεί στη συνέχεια απαιτεί συγκεκριμένο εύρος συγκέντρωσης DNA, επομένως οι αποδεκτές τιμές κυμαίνονται από  $5-50 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{L}$ .



**Εικόνα 14:** Το φασματοφωτόμετρο της εταιρείας Eppendorf το οποίο χρησιμοποιήθηκε.

Στη συνέχεια προκειμένου να εκτιμήσουμε την καθαρότητα του δείγματος μετράται η απορρόφηση και στα  $280 \text{ nm}$  και υπολογίζεται ο λόγος  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ . Αν ο λόγος αυτός είναι μεταξύ  $1,8$  και  $2$ , τότε είναι αποδεκτός και υποδεικνύει ένα διάλυμα υψηλής περιεκτικότητας σε DNA. Αντιθέτως αν είναι μικρότερος του  $1,7$  τότε υποδηλώνει πως το διάλυμα περιέχει αρκετές προσμίξεις όπως πρωτεΐνες και ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία της απομόνωσης.



**Εικόνα 14 : Συνοπτική απεικόνιση των βημάτων της πειραματικής διαδικασίας.**

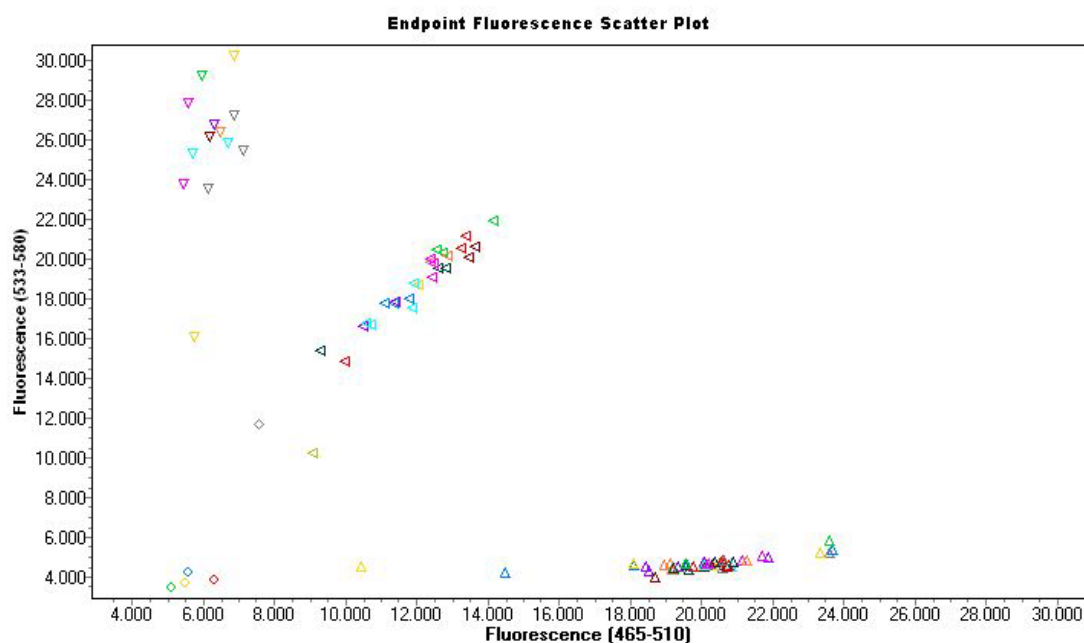
#### 2.3.4. Γονοτυπική ανάλυση

Η ανάλυση των γονοτύπων για τους 2 πολυμορφισμούς έγινε με τη μέθοδο KASP της εταιρείας LGC η οποία βασίζεται στην PCR. Κατ' αρχάς η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι η κύρια μέθοδος με την οποία συντίθενται *in vitro* μεγάλες ποσότητες νουκλεϊκών οξέων και πλέον αποτελεί τη βασικότερη μέθοδο όλων των μοριακών τεχνικών. (Εικόνα 14)

Βασική αρχή της είναι η αντιγραφή του DNA καθώς «μιμείται» τη βιολογική αυτή αντίδραση για την αντιγραφή-ενίσχυση συγκεκριμένων πλέον τμημάτων και όχι ολόκληρου του DNA. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται DNA πολυμεράση, το ένζυμο που θα συνθέσει τα νέα τμήματα, μείγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) για τη σύνθεση των νέων κλώνων, ένα μείγμα εκκινητών οι οποίοι θα καθορίσουν το εύρος του τμήματος που θέλουμε να ενισχυθεί και ρυθμιστικά διαλύματα ιόντων μαγνησίου και χλωρίου που είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του ενζύμου της πολυμεράσης.

Η διαδικασία της ενίσχυσης πραγματοποιείται σε ειδικό θερμοκυκλοποιητή ο οποίος έχει τη δυνατότητα αυξομείωσης της θερμοκρασίας σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα προκειμένου να παρέχει τις συνθήκες που χρειάζεται η αντιγραφή. Πιο συγκεκριμένα, χρειαζόμαστε υψηλή θερμοκρασία προκειμένου να σπάσουν οι δεσμοί υδρογόνου και να αποχωριστούν οι συμπληρωματικές πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες, στη συνέχεια πρέπει να υβριδοποιηθούν στα συμπληρωματικά τμήματα οι εκκινητές και πολυμεράση να συνεχίσει τη σύνθεση των νέων κλώνων. Αυτοί οι κύκλοι συνεχίζουν να επαναλαμβάνονται αρκετές φορές έως ότου παραχθούν πολλά τμήματα της επιθυμητής αλληλουχίας.

Η KASP αποτελεί μέθοδο της ενίσχυσης ανταγωνιστικών αλληλομόρφων μέσω της PCR (polymerase chain reaction) για την ανίχνευση σημειακών μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNP). Χρησιμοποιεί 2 εκκινητές σχεδιασμένους για το κάθε αλληλόμορφο και έναν εκκινητή αντίθετου προσανατολισμού κοινό και για τις δύο αλληλουχίες. Με τον τρόπο αυτό αναλόγως με το νουκλεοτίδιο που βρίσκεται στο συγκεκριμένο σημείο θα προσκολληθεί και ο συγκεκριμένος εκκινητής για αυτό και θα ενισχυθεί το αντίστοιχο τμήμα. Οι δύο εκκινητές είναι σημασμένοι ο ένας με ολιγονουκλεοτίδια που απορροφούν στο φάσμα του FAM καναλιού (485-520 nm) και ο άλλος αντίστοιχα στο HEX κανάλι (535-566 nm). Στον πρώτο κύκλο οι σημασμένοι εκκινητές «κολλάνε» στο αντίστοιχο σημείο-στόχο, με τον κοινό εκκινητή να έρχεται να επιμηκύνει την αλληλουχία στόχο. Συνεχίζοντας τους κύκλους αντιγραφής, τα σημασμένα ολιγονουκλεοτίδια έρχονται και συνδέονται στα άκρα των τμημάτων, στη συνέχεια η χρωστική συσσωρεύεται με αποτέλεσμα να αποδίδει φθορισμό. Το σήμα του φθορισμού αναλύεται από το ειδικό λογισμικό του μηχανήματος που χρησιμοποιείται, τα αποτελέσματα αποδίδονται σε ένα γράφημα δύο αξόνων με τη μορφή κουκκίδων (cluster analysis) η οποία αποδίδει το γονότυπο του ατόμου ως εξής: όταν υπάρχει φθορισμός μόνο σε ένα κανάλι HEX/FAM το άτομο είναι ομόζυγο για το HEX/FAM αλληλόμορφο αντιστοίχως και αυτό φαίνεται σαν ένα σημείο στον άξονα των Y ή X και αντιθέτως αν έχει δώσει σήμα και στα δύο κανάλια, πρόκειται για γονότυπο ετερόζυγου ατόμου. Επίσης όλα τα άτομα του ίδιου γονότυπου φαίνονται σαν μία συστάδα σημείων, όπως φαίνεται στην Εικόνα 15.



**Εικόνα 15: τα αποτελέσματα της γονοτύπησης με τη χρήση του λογισμικού ανάλυσης**

Για τις ανάγκες των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε ο LightCycler 480 της εταιρείας Roche, στον οποίο στήθηκε το πρόγραμμα για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και την ανάλυση των αποτελεσμάτων βάσει της εταιρείας LGC στην

οποία ανήκει η μέθοδος KASP. Έγινε endpoint genotyping analysis και καταγραφή των αποτελεσμάτων γονοτύπησης. (Εικόνα 16)



**Εικόνα 16: Ο θερμοκυκλοποιητής LightCycler 480 της εταιρείας Roche**

### 2.3.5 Στατιστική Ανάλυση

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε ο λόγος πιθανοτήτων odds ratio, που εκφράζει τη δύναμη της συσχέτισης μεταξύ δύο μεταβλητών. Το odds θεωρείται ιδανικός μέσος όρος για τη μοντελοποίηση της πιθανότητας ενός αποτελέσματος και στην εκτίμηση του στοχαστικού κινδύνου. Η εκτίμηση της ακρίβειας του OR πραγματοποιήθηκε στο 95% διάστημα εμπιστοσύνης (95% Confidence Interval, CI). Τα όρια εμπιστοσύνης υποδεικνύουν την ακρίβεια του OR, συγκεκριμένα μεγάλο CI υποδηλώνει χαμηλό επίπεδο ακρίβειας του OR, ενώ ένα μικρό CI δείχνει υψηλότερη ακρίβεια του OR. Οι τιμές του OR αξιολογούνται ως εξής:

OR = 1: καμία επίδραση των μελετώμενων γονοτύπων στην εμφάνιση της ασθένειας.

OR > 1: σημαίνει πως υπάρχει υψηλός σχετικός κίνδυνος του έκαστου μελετώμενου γενετικού πολυμορφισμού με την εμφάνιση της ασθένειας.

OR < 1: σημαίνει σχετικός κίνδυνος μεταξύ του μελετώμενου γενετικού παράγοντα και της εμφάνισης της νόσου είναι χαμηλός.

Το επίπεδο σημαντικότητας βρίσκεται στο  $\alpha=0,05$ , γεγονός που σημαίνει πως αν η τιμή του p-value είναι μικρότερη του 0,05, η αρχική μας υπόθεση  $H_0$  (null hypothesis) πως δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των δύο μεταβλητών απορρίπτεται, και αποδεχόμαστε την εναλλακτική υπόθεση  $H_1$  (alternative hypothesis) ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των δύο μεταβλητών και ο έλεγχος χαρακτηρίζεται ως στατιστικά σημαντικός.

Οι υπολογισμοί του OR έγιναν με πίνακες συνάφειας 2x2 ως εξής:

	Ασθένεια	
Παράγοντας κινδύνου	+	-
+	α	β
-	γ	δ

Όπου,

α = Πληθυσμός που φέρει την ασθένεια και εκτίθεται στον παράγοντα κινδύνου

β = Πληθυσμός που δεν φέρει την ασθένεια και εκτίθεται στον παράγοντα κινδύνου

γ = Πληθυσμός που φέρει την ασθένεια και δεν εκτίθεται στον παράγοντα κινδύνου

δ = Πληθυσμός που δεν φέρει την ασθένεια και δεν εκτίθεται στον παράγοντα κινδύνου

στη συνέχεια ο συντελεστής odds ratio υπολογίστηκε ως εξής:  $OR = \frac{\frac{a}{\gamma}}{\frac{\beta}{\delta}} = \frac{a\delta}{\beta\gamma}$

Προκειμένου να μελετηθούν οι συχνότητες κατανομής των πολυμορφισμών και να διερευνηθεί η πιθανότητα συσχέτισής τους με την εμφάνιση επιληψίας δημιουργήθηκαν πίνακες συχνοτήτων για τους διαφορετικούς γονοτύπους των πολυμορφισμών του ενζύμου MTHFR καθώς και για τα αλληλόμορφα τους. Η αξιολόγηση έγινε για κάθε πολυμορφισμό ξεχωριστά, χρησιμοποιώντας τα υπολογιστικά φύλλα του excel και επιβεβαιώθηκαν με τη χρήση του λογισμικού MedCalc. [https://www.medcalc.org/calc/odds\\_ratio.php](https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php)

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

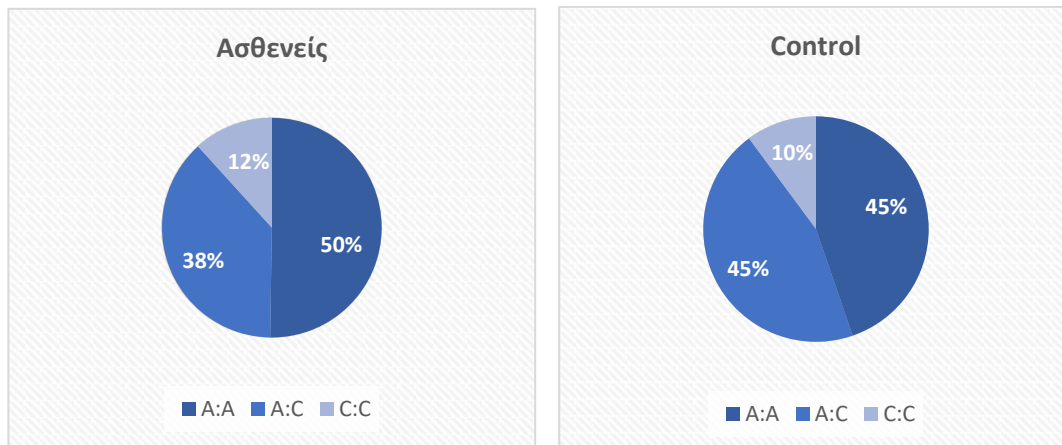
3.1. Κατανομή συχνότητας των πολυμορφισμών rs1801131 και rs1801133, μεταξύ επιληπτικών ασθενών και ομάδας ελέγχου.

3.1.1. Κατανομή του πολυμορφισμού rs1801131 μεταξύ επιληπτικών ασθενών και ομάδας ελέγχου.

Για τον πολυμορφισμό rs1801131 (A1298C) εξετάστηκαν 213 ασθενείς εκ των οποίων οι 107 βρέθηκαν ομόζυγοι για το αλληλόμορφο A, οι 81 ετερόζυγοι και οι 25 βρέθηκαν ομόζυγοι για το αλληλόμορφο C. Η ομάδα ελέγχου για τον ίδιο πολυμορφισμό αποτελείται από 1411 άτομα, εκ των οποίων οι 631 βρέθηκαν ομόζυγοι για το αλληλόμορφο A, οι 637 ετερόζυγοι και οι 143 βρέθηκαν ομόζυγοι για το αλληλόμορφο C. (Πίνακας 3) (Εικόνα 16)

Γονότυποι	Ασθενείς		Ομάδα Ελέγχου	
	n	%	n	%
A:A	107	50%	631	45%
A:C	81	38%	637	45%
C:C	25	12%	143	10%
Σύνολο	213		1411	

**Πίνακας 3: Συχνότητα των γονοτύπων του πολυμορφισμού A1298C**



**Εικόνα 16: Κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού A1298C στους ασθενείς (αριστερά) και στην ομάδα ελέγχου(δεξιά)**

Στην εικόνα 16, αριστερά φαίνεται το ποσοστό κατανομής των γονοτύπων του πολυμορφισμού A1298C στους ασθενείς. Ο γονότυπος A:A αποτελεί το 50% , ο γονότυπος A:C το 38% και ο γονότυπος C:C το 12%. Στο δεξιά τμήμα φαίνεται η κατανομή των γονοτύπων στην ομάδα ελέγχου, ο γονότυπος A:A αποτελεί το 45%, ο γονότυπος A:C 45% και τέλος ο γονότυπος C:C απαντάται στο 10% των ατόμων. (Εικόνα 16)

Στον πίνακα 4, παρουσιάζονται οι συχνότητες των αλληλομόρφων του rs1801131 μεταξύ επιληπτικών ασθενών και ομάδας ελέγχου. Στους ασθενείς το αλληλόμορφο A (AA+AC) εμφανίζεται 295 φορές, ενώ στην ομάδα ελέγχου 1899 φορές. Το αλληλόμορφο C στους ασθενείς εμφανίζεται 131 φορές, ενώ στην ομάδα ελέγχου 2822 φορές. (Πίνακας 4)

Αλληλόμορφο	Ασθενείς	Ομάδα Ελέγχου
A (AA+AC)	295 (69%)	1899 (67%)
C (AC+CC)	131 (31%)	923 (33%)
Σύνολο	426	2822

**Πίνακας 4: Συχνότητα αλληλομόρφων του πολυμορφισμού A1298C.**



**Εικόνα 17: Κατανομή των αλληλομόρφων του πολυμορφισμού A1298C στους ασθενείς (αριστερά) και στην ομάδα ελέγχου (δεξιά)**

Στην εικόνα 17, αντικατοπτρίζεται η κατανομή των αλληλικών συχνοτήτων του πολυμορφισμού A1298C, μεταξύ της ομάδας των ασθενών και των υγιών ατόμων, σε μορφή πίτας. Στους ασθενείς το αλληλόμορφο A βρίσκεται στο 69% των ατόμων, ενώ στους υγιείς στο 67%. Το αλληλόμορφο C το συναντούμε στο 31% των ασθενών ατόμων, ενώ στη ομάδα ελέγχου στο 33%. (Εικόνα 17)

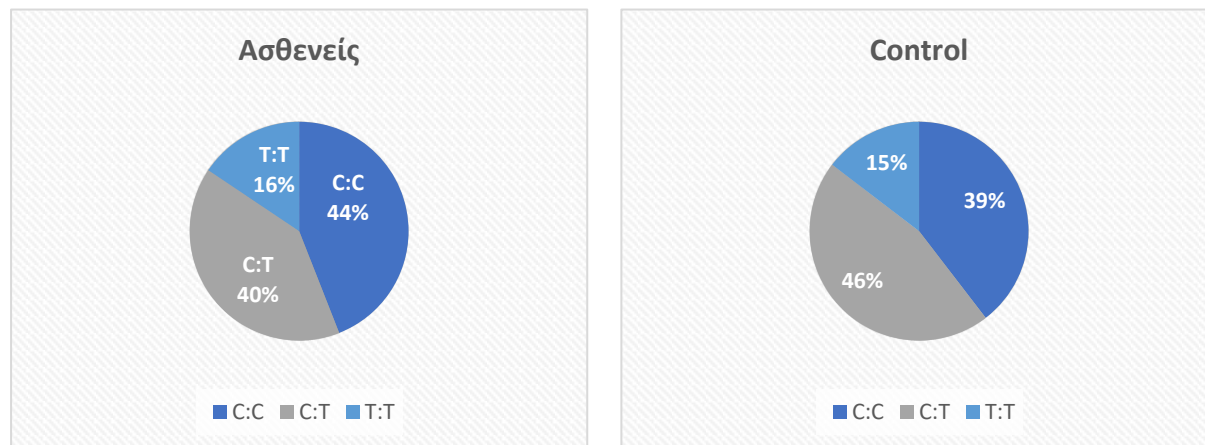
### 3.1.2. Κατανομή του πολυμορφισμού rs1801133 (C677T) μεταξύ επιληπτικών ασθενών και ομάδας ελέγχου.

Για τον πολυμορφισμό rs1801133 εξετάστηκαν 218 ασθενείς με επιληψία, όπως φαίνεται και στον πίνακα 5, οι 96 βρέθηκαν ομόζυγοι για το αλληλόμορφο C, οι 88 ετερόζυγοι και οι 34 ομόζυγοι για το αλληλόμορφο T. Στην ομάδα ελέγχου εξετάστηκαν 1410 άτομα εκ των οποίων οι 558 βρέθηκαν ομόζυγοι για το αλληλόμορφο C, οι 646 ετερόζυγοι και οι 206 ομόζυγοι για το αλληλόμορφο T. (Πίνακας 5)

Γονότυποι	Ασθενείς	Ομάδα Ελέγχου
C:C	96 (44%)	558 (39%)
C:T	88 (40%)	646 (46%)

<b>T:T</b>	34 (16%)	206 (15%)
<b>Σύνολο</b>	218	1410

**Πίνακας 5:** Συχνότητες γονότυπων για τον πολυμορφισμό C677T μεταξύ ασθενών και ομάδας ελέγχου.



**Εικόνα 18:** Κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού C677T σε ασθενείς (αριστερά) και ομάδα ελέγχου (δεξιά)

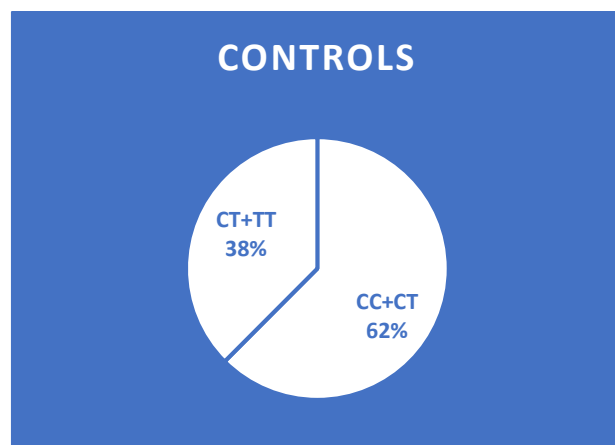
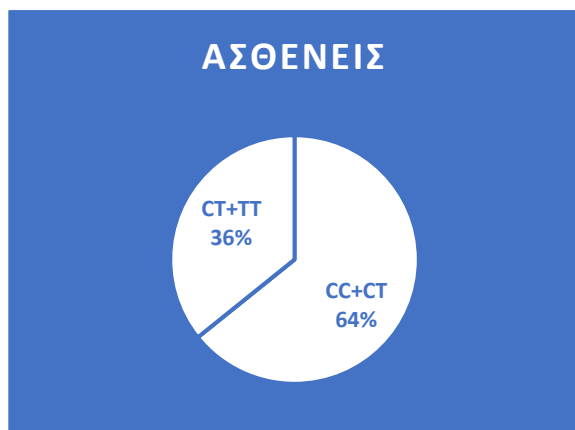
Στην εικόνα 18, βλέπουμε την κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού rs1801133 για τους ασθενείς αριστερά και για την ομάδα ελέγχου δεξιά. Στους ασθενείς ο γονότυπος C:C είναι στο 44%, ενώ στους υγιείς βρίσκεται σε ποσοστό 39%. Ο γονότυπος C:T συναντάται στο 40% των ασθενών και στο 46% των υγιών. Ο γονότυπος T:T βρίσκεται στο 16% των ασθενών και στο 15% των ατόμων της ομάδας ελέγχου. (Εικόνα 18)

<b>Αλληλόμορφο</b>	<b>Ασθενείς</b>	<b>Ομάδα Ελέγχου</b>
<b>C (CC+ CT)</b>	280 (64%)	1762 (62%)
<b>T (CT+ TT)</b>	156 (36%)	1058 (38%)
<b>Σύνολο</b>	436	2820

**Πίνακας 6:** Συχνότητα αλληλικών συχνοτήτων του C677T μεταξύ των ασθενών και της ομάδας ελέγχου.

Στον πίνακα 6, φαίνονται οι αλληλικές συχνότητες του πολυμορφισμού C677T στους ασθενείς αλλά και στην ομάδα ελέγχου. Το αλληλόμορφο C εμφανίζεται 280 φορές στην ομάδα των ασθενών, ενώ στους υγιείς 1762. Το αλληλόμορφο T εμφανίζεται 156 φορές στη ομάδα των ασθενών με επιληψία και 1058 φορές στην ομάδα των υγιών. (Πίνακας 6)





**Εικόνα 19:** Κατανομή των αλληλικών συχνοτήτων για τον πολυμορφισμό C677T μεταξύ των ασθενών (αριστερά) και της ομάδας ελέγχου (δεξιά)

Στην εικόνα 19, φαίνεται η κατανομή των αλληλικών συχνοτήτων του πολυμορφισμού rs1801133 στην ομάδα των ασθενών αριστερά και στην ομάδα ελέγχου δεξιά. Στην ομάδα των ατόμων με επιληψία το αλληλόμορφο C βρίσκεται σε ποσοστό 64% ενώ στην ομάδα ελέγχου στο 62%. Το αλληλόμορφο T, απαντάται στο 36% των ασθενών και στο 38% της ομάδας ελέγχου.

### 3.2. Συσχέτιση των δύο πολυμορφισμών του MTHFR με την εμφάνιση επιληψίας.

#### 3.2.1. Συσχέτιση του πολυμορφισμού rs1801131 (A1298C) με την εμφάνιση επιληψίας.

Σε πρώτο επίπεδο, μελετήθηκαν οι συχνότητες του πολυμορφισμού A1298C και ο υπολογισμός του σχετικού λόγου (odds ratio), στην ομάδα των ασθενών και στην ομάδα ελέγχου.

Συχνότητα αλληλομόρφων							
rs1801131 1 A>C	Ασθενείς		Controls		OR	95% CI	P
	Count	%	Count	%			
A	295	69.24%	1899	67.29%	0.8	0.88 – 1.36	0.42
C	131	24.41%	923	32.71%			

**Πίνακας 7:** Μελέτη συσχέτισης των αλληλικών συχνοτήτων του A1298C και της εμφάνισης επιληψίας

Στον πίνακα 7, παρουσιάζονται οι συχνότητες των 2 αλληλομόρφων A και C του πολυμορφισμού A1298C. Το αλληλόμορφο A στους ασθενείς παρουσιάζεται 295 φορές στους ασθενείς (69.24%) και 1899 φορές στους μάρτυρες (67.29%). Αντίστοιχα, το αλληλόμορφο C εμφανίζεται σε 131 ασθενείς (24.4%) και σε 923 υγιείς (32.71%). Το odds ratio υπολογίζεται στο 0,8 επομένως για τους ασθενείς είναι 20% πιθανότερο να φέρουν το αλληλόμορφο A. Ακόμη, το διάστημα εμπιστοσύνης εκτείνεται από 0.88 έως 1.36 και η τιμή p-value=0.42. (Πίνακας 7)

Στη συνέχεια, έγινε σύγκριση μεταξύ του γονότυπου CC και των άλλων δύο AC+AA, προκειμένου να ελεγχθεί το υπολειπόμενο μοντέλο.(πίνακας 8) Αρχικά εξετάστηκε Στη συνέχεια, έγινε σύγκριση μεταξύ του γονότυπου CC και των άλλων δύο AC+AA, προκειμένου να ελεγχθεί το υπολειπόμενο μοντέλο.(πίνακας 8) Αρχικά εξετάστηκε ο γονότυπος CC ως παράγοντας κινδύνου για την ασθένεια. Στον πίνακα 8, φαίνεται πως ο γονότυπος C:C συναντάται σε 25 ασθενείς με επιληψία (11.74%) και σε 143 άτομα της ομάδας ελέγχου (10.13%). Αθροιστικά οι άλλοι δύο γονότυποι, εμφανίζονται σε 188 ασθενείς (88.26%) και 1268 υγιείς μάρτυρες. Ο σχετικός λόγος OR υπολογίστηκε ίσος με 1.18, τα όρια εμπιστοσύνης από 0.75 έως 1.85 και η τιμή p-value ίση με 0.475.(Πίνακας 8)

Συχνότητα γονοτύπων							
rs180113 1 A>C	Ασθενείς		Controls		OR	95% CI	P
	Count	%	Count	%			
CC	25	11.74%	143	10.13%	1.18	0.7506-1.8523	0.475
AC+AA	188	88.26%	1268	89.87%			

**Πίνακας 8: Μελέτη συσχέτισης του γονότυπου CC vs AC+AA του πολυμορφισμού A1298C και της εμφάνισης επιληψίας.**

Συχνότητα γονοτύπων							
rs180113 1 A>C	Ασθενείς		Controls		OR	95% CI	P
	Count	%	Count	%			
AA	107	50.23%	631	44.72%	1.25	0.6-1.1	0.132
AC+CC	106	49.77%	780	55.28%			

**Πίνακας 9: Μελέτη συσχέτισης των γονοτυπικών συχνοτήτων AA vs AC+CC του A1298C και της εμφάνισης επιληψίας**

Στη συνέχεια, εξετάστηκε το επικρατές μοντέλο AA vs AC+CC του A1298C, όπως φαίνεται στον πίνακα 9. Στους ασθενείς ο γονότυπος A:A εμφανίζεται 107 φορές (50.23%) ενώ στους υγιείς 631 φορές (44.72%). Από την άλλη, το σύνολο των γονοτύπων AC+CC συναντάται 106 φορές στους ασθενείς (49.7%) και 780 φορές στους υγιείς (55.28%). Ο σχετικός λόγος OR είναι ίσος με 1.25, τα όρια εμπιστοσύνης κυμαίνονται από 0.94 έως 1.66 ενώ το p-value=0.132. Αν λάβουμε υπόψιν μας το τρίτο επίπεδο εμπιστοσύνης στο  $\alpha=0.15$ , η σχέση αυτή έχει στατιστική σημασία και μπορούμε να ισχυριστούμε πως ο γονότυπος AA έχει την τάση να εμφανίζεται 0.25 φορές συχνότερα σε ασθενείς με επιληψία. (Πίνακας 9)

Συχνότητα γονοτύπων							
rs180113 1 A>C	Ασθενείς		Controls		OR	95% CI	P
	Count	%	Count	%			
AC	81	38%	637	45%%	0.75	0.55-1.00	0.05
CC+AA	132	62%%	774	55%%			

**Πίνακας 10: : Μελέτη συσχέτισης των γονοτυπικών συχνοτήτων AC vs AA+CC του A1298C και της εμφάνισης επιληψίας**

Στον πίνακα 10 φαίνονται οι γονοτυπικές συχνότητες του γονότυπου AC έναντι των άλλων δύο. Οι ετερόζυγοι ασθενείς είναι 81 (38%) ενώ οι ετερόζυγοι υγιείς 637 (45%). Το σύνολο των ομόζυγων ασθενών είναι 132 (62%) ενώ στους υγιείς οι γονότυποι CC+AA απαντώνται 774 φορές (55%). Ο λόγος OR υπολογίστηκε ίσος με 0.75, τα όρια εμπιστοσύνης από 0.55-1.00 και το p-value=0.052. Σε αυτό το σημείο παρατηρούμε πως ο ετερόζυγος γονότυπος εμφανίζεται 0.25 φορές σπανιότερα στους ασθενείς της μελέτης μας. Η παρατήρηση αυτή έχει στατιστική σημασία, καθώς αφ' ενός τα όρια εμπιστοσύνης εκτείνονται από 0.55 έως 1 και αφ' ετέρου η τιμή του p-value είναι ίση με 0.05. (Πίνακας 10)

3.2.2. Συσχέτιση του πολυμορφισμού rs1801133 (C677T) με την εμφάνιση επιληψίας.

Στη συνέχεια, εξετάστηκε ο δεύτερος πολυμορφισμός του ενζύμου MTHFR με στόχο την εύρεση πιθανής συσχέτισης με την εμφάνιση επιληψίας. Αντιστοίχως με τον πρώτο πολυμορφισμό, υπολογίστηκαν οι συχνότητες και οι σχετικοί λόγοι τόσο για τα δύο αλληλόμορφα όσο και για όλους τους γονότυπους σε ασθενείς και υγιείς.

Αλληλικές συχνότητες							
rs1801133 C>T	Ασθενείς		Ομάδα ελέγχου		OR	95% CI	P value
	Count	%	Count	%			
C	280	64.22%	1762	62.48%	1.08	(0.87-1.33)	P=0.485
T	156	35.78%	1058	37.52%			
total	436		2820				

**Πίνακας 11: Μελέτη συσχέτισης των αλληλικών συχνοτήτων του C677T και της εμφάνισης επιληψίας**

Αρχικά μελετήθηκαν οι συχνότητες των αλληλομόρφων, βάσει του μοντέλου αντίθεση αλληλίων. Όπως φαίνεται στον πίνακα 11, το αλληλόμορφο C το βλέπουμε 280 φορές στους ασθενείς (64.22%) και 1762 φορές στους υγιείς (62.48%). Το αλληλόμορφο T το συναντούμε 156 φορές στην ομάδα των ασθενών με επιληψία (35.78%) και 1058 φορές στους υγιείς μάρτυρες (37.52%). Ο λόγος OR ισούται με

1.08, το διάστημα εμπιστοσύνης από 0.87 έως 1.33 και η τιμή p-value=0.485. (Πίνακας 11)

Συχνότητα γονοτύπων							
rs1801133 C>T	Ασθενείς		Ομάδα ελέγχου		OR	95% CI	P value
	n	%	n	%			
TT	34	15.6%	206	18.44%	1.08	0.7279	p=0.702
TC+CC	184	84.4	1204	81.56%		1.6025	

**Πίνακας 12: Μελέτη συσχέτισης του γονότυπου TT vs TC+CC με την εμφάνιση επιληψίας**

Στον πίνακα 12 φαίνονται οι γονοτυπικές συχνότητες για το γονότυπο TT καθώς και για το άθροισμα των 2 γονοτύπων TC+CC. Οι ασθενείς με γονότυπο TT είναι 34 (15.6%) και αντίστοιχα οι υγιείς 206 (18.44%). Οι γονότυποι TC+CC συναντώνται 184 φορές στους ασθενείς (84.4%) και 1204 φορές στην ομάδα ελέγχου. Ο λόγος OR=1.08, το διάστημα εμπιστοσύνης είναι μεταξύ 0.73 και 1.6, ενώ το p-value=0.7. (Πίνακας 12)

Συχνότητα γονοτύπων							
rs1801133 C>T	Ασθενείς		Ομάδα ελέγχου		OR	95% CI	P value
	n	%	n	%			
CC	96	44%	558	39.6%	1.11	0.836-	p=0.469
TC+TT	132	56%	852	60.4%		1.47	

**Πίνακας 13: Μελέτη συσχέτισης του γονότυπου CC vs TT+TC με την εμφάνιση επιληψίας.**

Στη συνέχεια μελετήθηκε το επικρατές μοντέλο, υπολογίζοντας τις συχνότητες του γονότυπου CC έναντι των TC+TT. Στον πίνακα 13 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα και βλέπουμε πως ο γονότυπος CC βρίσκεται σε 96 ασθενείς (44%) και 558 υγιείς (39.6%). Οι γονότυποι TC+TT εμφανίζονται σε 132 ασθενείς (56) και σε 852 άτομα στην ομάδα ελέγχου(60.4%). Η τιμή του σχετικού λόγου OR=1.11, τα όρια εμπιστοσύνης CI είναι από 0.84 έως 1.47 και η τιμή p-value=0.47. (Πίνακας 13)

Συχνότητα γονοτύπων							
rs1801133 C>T	Ασθενείς		Ομάδα ελέγχου		OR	95% CI	P value
	n	%	n	%			
TC	88	40%	646	46%	0.8	0.6- 1.07	p=0.133
CC+TT	130	60%	764	54%			

**Πίνακας 14:** Μελέτη συσχέτισης του γονότυπου TC vs TT+CC με την εμφάνιση επιληψίας.

Τέλος, διερευνήθηκαν οι γονοτυπικές συχνότητες συγκρίνοντας πλέον τους ετερόζυγους έναντι των ομόζυγων για το αγρίου τύπου αλληλόμορφο συνδυαστικά με τους ομόζυγους για την παραλλαγή T. Στον πίνακα 14 φαίνεται πως έχουμε 88 (40%) ετερόζυγους ασθενείς ενώ οι ετερόζυγοι υγιείς ανέρχονται στους 646 (46%). Οι γονότυποι CC+TT εμφανίζονται 130 φορές (60%) στην ομάδα των ασθενών με επιληψία και 764 φορές (54%) στην ομάδα ελέγχου. Ο σχετικός λόγος OR=0.8, τα όρια εμπιστοσύνης από 0.6 έως 1.07 και η τιμή p-value ίση με p=0.133. Εκτιμώντας τη συγκεκριμένη παρατήρηση βάσει του τρίτου ορίου εμπιστοσύνης ( $\alpha=0.15$ ), μπορεί να στηριχθεί στατιστικά πως ο ετερόζυγος γονότυπος τείνει να εμφανίζεται λιγότερο συχνά σε ασθενείς με επιληψία. (Πίνακας 14)

3.2.3. Διάρθρωση της ομάδας των ασθενών σε υπο-ομάδες και μελέτη της κατανομής των πολυμορφισμών rs1801131, rs1801133 σε παιδιά με ηλικία εμφάνισης πρώτων επιληπτικών κρίσεων από 0-5 ετών.

Καθώς τα μέχρι τώρα αποτελέσματα της μελέτης δεν είναι απολύτως ξεκάθαρα, προχωρήσαμε μελετώντας μικρότερες υπο-ομάδες του δείγματός μας (sub-group analysis). Βιβλιογραφικά, φαίνεται να υπάρχει κάποια συσχέτιση του ενζύμου MTHFR και την έναρξη των κρίσεων στην παιδική ηλικία. Για το λόγο αυτό, διαχωρίστηκαν οι ασθενείς σε υπο-ομάδες με κριτήριο την ηλικία εμφάνισης πρώτης κρίσης από 0-15 ετών. Οι ομάδες διαχωρίστηκαν ανά 5 χρόνια, δηλαδή στην 1η υπο-ομάδα τα πρώτα συμπτώματα εμφανίστηκαν από 0-5 ετών, στη 2η υπο-ομάδα εμφανίστηκαν από 6-10 ετών και τέλος στην 3η υπο-ομάδα ξεκίνησαν μεταξύ των 11 και 15 ετών. Σε κάθε υπο-ομάδα μελετήθηκαν και οι δύο πολυμορφισμοί ξεχωριστά σε επίπεδο συχνότητας και σχετικού λόγου. [46]

3.2.3.1. Κατανομή του rs1801131 σε παιδιά με ηλικία εμφάνισης πρώτων επιληπτικών κρίσεων από 0-5 ετών και πιθανότητα συσχέτισης.

Γονότυποι	Ασθενείς	Ομάδα Ελέγχου
A:A	18 (60%)	631 (45%)
A:C	9 (30%)	637 (45%)
C:C	3 (10%)	143 (10%)
Σύνολο	30	1411

**Πίνακας 15: Γονοτυπικές συχνότητες του πολυμορφισμού A1298C στην 1<sup>η</sup> ηλικιακή υπο-ομάδα(0-5 έτη).**

Στον πίνακα 15, φαίνονται οι γονοτυπικές συχνότητες του πολυμορφισμού A1298C, στους ασθενείς όπου τα πρώτα συμπτώματα ξεκίνησαν στα πρώτα 5 έτη. Ο γονότυπος A:A στους ασθενείς παρουσιάζεται 18 φορές (60%) και στους υγιείς 631 φορές (45%). Ο γονότυπος A:C απαντάται 9 φορές (30%) στους ασθενείς και 637 φορές (45%) στην ομάδα ελέγχου. Τέλος, ο γονότυπος C:C εμφανίζεται 3 φορές (10%) στην υπο-ομάδα των ασθενών και 143 φορές (10%) στην ομάδα ελέγχου. Παρατηρούμε αυξημένη συχνότητα του γονοτύπου A:A στους ασθενείς (60%) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (45%). Επίσης διαφορά παρατηρούμε στη συχνότητα των ετερόζυγων όπου στους ασθενείς είναι στο 30%, ενώ στην ομάδα ελέγχου (45%). Η συχνότητα του γονοτύπου A:A είναι ίδια και στις δύο ομάδες. (Πίνακας 15)

Αλληλόμορφο	Ασθενείς	Ομάδα Ελέγχου
AA+AC	45 (75%)	1899 (67%)
AC+CC	15 (25%)	923 (33%)
Σύνολο	60	2822

**Πίνακας 16: Αλληλικές συχνότητες του πολυμορφισμού A1298C στην 1<sup>η</sup> ηλικιακή ομάδα (0-5 έτη).**

Στον πίνακα 16 φαίνονται οι αλληλικές συχνότητες της αντίστοιχης υπο-ομάδας. Το αλληλόμορφο A απαντάται 45 φορές στους ασθενείς (75%) και 1899 φορές στους υγιείς (67%), ενώ το αλληλόμορφο C παρατηρείται 15 φορές στους ασθενείς (25%) και 923 φορές στους υγιείς (33%). Παρατηρούμε μία μικρή αύξηση στη συχνότητα του αλληλομόρφου αγρίου τύπου στην ομάδα των ασθενών, συγκριτικά με την ομάδα των υγιών. (πίνακας 16)

Αλληλικές συχνότητες							
rs1801131 A>C	Ασθενείς		Ομάδα ελέγχου		OR	95% CI	P
	Count	%	Count	%			
A	25	62.5%	1899	67.29%	0.81	0.43- 1.54	0.52
C	15	37.5%	923	32.71%			
Total	40		2822				

**Πίνακας 17: Συσχέτιση των αλληλικών συχνοτήτων με την έναρξη επιληπτικών κρίσεων από 0-5 ετών.**

Στον πίνακα 17 φαίνονται οι αλληλικές συχνότητες και ο σχετικός λόγος για τον πολυμορφισμό A1298C για την 1<sup>η</sup> υπο-ομάδα με έναρξη συμπτωμάτων από 0 έως 5 ετών. Το αλληλόμορφο A εμφανίζεται 25 φορές (62.5%) στην υπο-ομάδα των ασθενών και 1899 (67.29%) στην ομάδα των υγιών μαρτύρων. Το αλληλόμορφο C εμφανίζεται 15 φορές σε ασθενείς (37.5%) και 923 φορές (32.71%) στην ομάδα ελέγχου. Ο σχετικός λόγος OR εκτιμήθηκε ίσος με 0.81, το διάστημα εμπιστοσύνης από 0.43 έως 1.54 και η τιμή p-value=0.52. (Πίνακας 17)

Συχνότητα γονοτύπων							
rs1801131 A>C	Ασθενείς		Controls		OR	95% CI	P value
	n	%	n	%			
CC	3	10%	143	10.13%	0.99	0.3- 3.29	p=0.98
AC+AA	27	90%	1268	89.87%			

**Πίνακας 18: Μελέτη συσχέτισης του γονότυπου CC vs AC+AA στη 1<sup>η</sup> υπο-ομάδα**

Στον πίνακα 18 φαίνονται οι γονοτυπικές συχνότητες καθώς και ο σχετικός λόγος των γονοτύπων βάσει του υπολειπόμενου μοντέλου, CC έναντι AC+AA. Ο γονότυπος AA εμφανίζεται 3 φορές (10%) στους ασθενείς και 143 φορές στους υγιείς (10.1%). Οι γονότυποι AC+AA εμφανίζονται 27 φορές (90%) στην υπο-ομάδα αυτή και 1268 φορές (89.9%) στην ομάδα ελέγχου. Ο σχετικός λόγος OR=0.99, το διάστημα εμπιστοσύνης εκτείνεται από 0.3 έως 3.29 και τη τιμή p-value, p=0.98. (Πίνακας 18)

Συχνότητα γονοτύπων							
rs1801131 A>C	Ασθενείς		Controls		OR	95% CI	P value
	n	%	n	%			
AA	18	60%	631	44.72%	1.85	0.89- 3.88	p=0.10
AC+CC	12	40%	780	55.28%			

**Πίνακας 19: Μελέτη συσχέτισης του γονότυπου AA vs AC+ CC στη 1<sup>η</sup> υπο-ομάδα**

Στον πίνακα 19 φαίνονται οι γονοτυπικές συχνότητες για το γονότυπο AA έναντι των AC+CC (επικρατές μοντέλο). Ο γονότυπος AA απαντάται σε 18 ασθενείς (60%) και 631 υγιή άτομα (44.7%). Οι γονότυποι AC+CC εμφανίζονται σε 12 άτομα (40%) της 1<sup>ης</sup> υπο-ομάδας και 780 άτομα (55.3%) της ομάδας ελέγχου. Ο σχετικός λόγος OR=1.85, το διάστημα εμπιστοσύνης CI 0.89-3.88 και το p-value είναι ίσο με p=0.10. Βλέπουμε λοιπόν μία τάση του γονότυπου AA, να εμφανίζεται σχεδόν δύο φορές συχνότερα στους ασθενείς της υπο-ομάδας αυτή, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. (Πίνακας 19)

Συχνότητα γονοτύπων							
rs1801131 A>C	Ασθενείς		Controls		OR	95% CI	P
	Count	%	Count	%			
AC	9	30%	637	45%	0.52	0.24-1.14	P=0.11
CC+AA	21	70%	774	55%			

**Πίνακας 20: Μελέτη συσχέτισης του γονότυπου AA vs AC+ CC στην 1η υπο-ομάδα**

Στον πίνακα 20 φαίνεται η συχνότητα του ετερόζυγου γονότυπου έναντι των άλλων δύο (CC+AA). Στην ομάδα των ασθενών ο γονότυπος AC παρουσιάζεται 9 φορές (30%) ενώ στους υγιείς 637 φορές (45%). Οι γονότυποι CC+AA εμφανίζονται 21 φορές (70%) σε ασθενείς και 774 φορές (55%) στα άτομα της ομάδας ελέγχου. Ο σχετικός λόγος OR=0.52, τα όρια εμπιστοσύνης κυμαίνονται από 0.24 έως 1.14 και τη τιμή του p-value είναι ίση με 0.11. (Πίνακας 20)

3.2.3.2. Κατανομή και συσχέτιση του rs1801133 σε παιδιά με ηλικία εμφάνισης πρώτων επιληπτικών κρίσεων από 0-5 ετών.

Κατ' αναλογία μελετήθηκε ο πολυμορφισμός C677T στην 1<sup>η</sup> υπο-ομάδα, με έναρξη επιληπτικών κρίσεων από 0-5 ετών. Στον πίνακα 21 φαίνονται οι γονοτυπικές συχνότητες μεταξύ ασθενών και ομάδας ελέγχου. Ο γονότυπος C:C εμφανίζεται σε 9 ασθενείς (30%) και 558 υγιείς (39%), ο γονότυπος C:T βρίσκεται σε 12 ασθενείς (40%) και 646 άτομα (46%) της ομάδας ελέγχου. Τέλος, ο γονότυπος T:T συναντάται σε 9 άτομα της ομάδας ασθενών (30) και 206 άτομα της ομάδας ελέγχου(15%). Παρατηρούμε πως ο γονότυπος T:T παρουσιάζει τη διπλάσια συχνότητα εμφάνισης στους ασθενείς εν συγκρίσει με τους υγιείς. (Πίνακας 21)

Γονότυποι	Ασθενείς	Ομάδα Ελέγχου
C:C	9 (30%)	558 (39%)
C:T	12 (40%)	646 (46%)
T:T	9 (30%)	206 (15%)
Σύνολο	30	1410

**Πίνακας 21: Γονοτυπικές συχνότητες των ασθενών της 1<sup>ης</sup> υπο-ομάδας και ομάδας ελέγχου.**

Αλληλόμορφο	Ασθενείς	Ομάδα Ελέγχου
CC+ CT	30 (50%)	1762 (62%)
CT+ TT	30 (50%)	1058 (38%)
Σύνολο	60	2820

**Πίνακας 22: Αλληλικές συχνότητες των ασθενών της 1ης υπο-ομάδας και ομάδας ελέγχου για τον πολυμορφισμό rs1801133**



Στον πίνακα 22 αντικατοπτρίζονται οι αλληλικές συχνότητες στην 1<sup>η</sup> υπο-ομάδα. Το αλληλόμορφο C εμφανίζεται 30 φορές (50%) στους ασθενείς και 1762 φορές (62%) στην ομάδα ελέγχου. Το αλληλόμορφο T εμφανίζεται 30 φορές (50%) στους ασθενείς και 1058 φορές (38%) στους ασθενείς. Παρατηρούμε σημαντικά αυξημένη συχνότητα του T αλληλομόρφου στην υπο-ομάδα των ασθενών συγκριτικά με τους υγιείς. (Πίνακας 22)

Γονοτυπικές συχνότητες							
rs1801133 C>T	Ασθενείς		Ομάδα ελέγχου		OR	95% CI	P value
	n	%	n	%			
TT	9	30%	206	18.44%	2.5	1.13- 5.5	p=0.02
TC+CC	21	70%	1204	81.56%			

**Πίνακας 23: Γονοτυπικές συχνότητες του πολυμορφισμού rs1801133 στην 1<sup>η</sup> υπο-ομάδα**

Στον πίνακα 23 φαίνονται οι γονοτυπικές συχνότητες του γονότυπου T:T έναντι των C:C+T. Ο γονότυπος TT εμφανίζεται 9 φορές(30%) στην υπο-ομάδα των ασθενών και 206 φορές (18.44%) στην ομάδα ελέγχου. Το σύνολο των TC+CC το βλέπουμε 21 φορές στους ασθενείς (70%) και 1204 φορές (81.56%) στους υγιείς. Ακόμη η τιμή του σχετικού λόγου OR βρίσκεται στο 2.5, τα όρια εμπιστοσύνης στο 1.13 έως 5.5 και η τιμή p-value ίση με 0.02. Αυτό σημαίνει πως οι ασθενείς έχουν 2.5 φορές αυξημένη πιθανότητα να είναι ομόζυγοι T:T, παρά να έχουν κάποιον άλλο γονότυπο. Η αρκετά χαμηλή τιμή του p-value=0.02<0.05, δείχνει πως αυτή η υπόθεση είναι στατιστικά σημαντική. Επομένως μπορούμε δεν μπορούμε να απορρίψουμε πως ο γονότυπος T:T συσχετίζεται με την εμφάνιση επιληψίας στα πρώτα 5 έτη ζωής. (Πίνακας 23)

Genotypic Frequencies							
rs1801133 C>T	Patients		Control group		OR	95% CI	P value
	n	%	n	%			
CC	9	30%	558	39.6%	0.65	0.3- 1.44	p=0.291
TC+TT	21	70%	852	60.4%			

**Πίνακας 24:Γονοτυπικές συχνότητες του πολυμορφισμού rs1801133 στην 1η υπο-ομάδα**

Στον πίνακα 24 φαίνονται οι συχνότητες του γονότυπου C:C σε αντιδιαστολή με τους άλλους δύο TC+TT. Ο γονότυπος C:C απαντάται σε 9 άτομα της ομάδας των ασθενών (30%) και 558 άτομα της ομάδας ελέγχου (39.6%). Το σύνολο των TC+TT το βλέπουμε σε 21 άτομα (70%) στην υπο-ομάδα αυτή και σε 852 άτομα (60.4%) της ομάδας των υγιών. Ο σχετικός λόγος OR=0.65, το διάστημα εμπιστοσύνης από 0.3 έως 1.44 και το p-value=0.29. Παρατηρούμε πως η συχνότητα του γονότυπου C:C στους ασθενείς είναι μικρότερη εν σχέσει με τους υγιείς. (Πίνακας 24)

Αλληλικές συχνότητες							
rs1801133 C>T	Ασθενείς		Ομάδα ελέγχου		OR	95% CI	P value
	Count	%	Count	%			
C	30	64.22%	1762	62.48%	0.6	(0.36-1)	P=0.05
T	30	35.78%	1058	37.52%			
total	60		2820				

**Πίνακας 25: Αλληλικές συχνότητες του πολυμορφισμού rs1801133 στην 1η υπο-ομάδα**

Στον πίνακα 25 παρουσιάζονται οι αλληλικές συχνότητες των δύο αλληλομόρφων για την 1<sup>η</sup> υπο-ομάδα. Το αλληλόμορφο C το βλέπουμε 30 φορές στους ασθενείς (64.22%) και 1762 φορές (62.48%) στην ομάδα των υγιών. Το αλληλόμορφο T εμφανίζεται 30 φορές (35.78%) στην υπο-ομάδα των ασθενών και 1058 φορές (37.52%) στην ομάδα ελέγχου. Ο σχετικός λόγος εμφάνισης του αλληλομόρφου C OR=0.6, με διάστημα εμπιστοσύνης CI (0.36-1.00) και P=0.051. Βλέπουμε πως το αλληλόμορφο C εμφανίζεται πιο σπάνια στους ασθενείς συγκριτικά με τους υγιείς. Στην πραγματικότητα, το αλληλόμορφο C έχει 0.4 φορές λιγότερες πιθανότητες να εμφανίζεται σε ένα ασθενές άτομο παρά σε ένα υγιές. (Πίνακας 25)

Genotypic Frequencies							
rs1801133 C>T	Patients		Control group		OR	95% CI	P value
	n	%	n	%			
TC	12	40%	646	46%	0.8	0.38-1.65	p=0.53
CC+TT	18	60%	764	54%			

**Πίνακας 26: Γονοτυπικές συχνότητες για το γονότυπο TC vs CC+TT του πολυμορφισμού rs1801133 στην 1<sup>η</sup> υπο-ομάδα.**

Στον πίνακα 26 φαίνονται οι γονοτυπικές συχνότητες του γονότυπου TC έναντι των δύο ομόζυγων CC+TT. Οι ετερόζυγοι ασθενείς ανέρχονται στους 12 (40%) ενώ στην ομάδα ελέγχου στους 646 (46%). Οι γονότυποι CC+TT εμφανίζονται σε 18 άτομα της υποομάδας των ασθενών και σε 764 άτομα της ομάδας ελέγχου. ο σχετικός λόγος OR=0.8, τα όρια εμπιστοσύνης από 0.38 έως 1.65 και η τιμή p-value ισούται με p=0.53. (Πίνακας 26)

Σε αυτό το σημείο της εργασίας φαίνεται πως υπάρχει μία συσχέτιση του γονότυπου TT του πολυμορφισμού C677T σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο. Μάλιστα, φαίνεται πως τα άτομα με έναρξη των πρώτων συμπτωμάτων επιληψίας σε ηλικία 0-5 ετών, εμφανίζουν το γονότυπο TT 2.5 φορές συχνότερα από την ομάδα ελέγχου. Η συσχέτιση αυτή υποστηρίζεται και από τη συχνότητα των αλληλομόρφων καθώς βλέπουμε πως σε επίπεδο αλληλομόρφου, το αλληλόμορφο T συναντάται 1.67 φορές συχνότερα στην ομάδα των ασθενών.

3.2.4. Διαίρεση της ομάδας των ασθενών σε υπο-ομάδες και μελέτη της κατανομής των πολυμορφισμών rs1801131, rs1801133 σε παιδιά με ηλικία εμφάνισης πρώτων επιληπτικών κρίσεων από 6-10 ετών. Η 2<sup>η</sup> υπο-ομάδα αφορά τους ασθενείς στους οποίους τα πρώτα συμπτώματα εμφανίστηκαν από την ηλικία των 6 έως 10 ετών. Ομοίως αναλύθηκαν οι γονοτυπικές και αλληλικές συχνότητες καθώς και ο σχετικός λόγος σε κάθε πολυμορφισμό ξεχωριστά.

3.2.4.1. Κατανομή του rs1801131 σε παιδιά με ηλικία εμφάνισης πρώτων επιληπτικών κρίσεων από 6-10 ετών.

Γονότυποι	Ασθενείς	Ομάδα Ελέγχου
<b>A:A</b>	16 (46%)	631 (45%)
<b>A:C</b>	12 (34%)	637 (45%)
<b>C:C</b>	7 (20%)	143 (10%)
<b>Σύνολο</b>	35	1411

**Πίνακας 27: Γονοτυπικές συχνότητες του πολυμορφισμού A1298C στη 2<sup>η</sup> υπο-ομάδα.**

Στον πίνακα 27 φαίνεται η κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού A1298C στα άτομα όπου το πρώτο επιληπτικό επεισόδιο έλαβε χώρα σε ηλικία 6 έως 10 ετών. Παρατηρείται ότι ο γονότυπος C:C εμφανίζεται 16 φορές (46%) στους ασθενείς και 631 φορές (45%) στους υγιείς. Ο γονότυπος A:C σε 12 ασθενείς (34%) και σε 637 υγιείς (45%) και τέλος ο γονότυπος C:C σε 7 ασθενείς (20%) και 143 ασθενείς (10%). Ο γονότυπός C:C βλέπουμε πως εμφανίζεται σε διπλάσια συχνότητα στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. (Πίνακας 27)

Αλληλόμορφο	Ασθενείς	Ομάδα Ελέγχου
<b>AA+AC</b>	44 (63%)	1899 (67%)
<b>AC+CC</b>	26 (37%)	923 (33%)
<b>Σύνολο</b>	70	2822

**Πίνακας 28: Αλληλικές συχνότητες του πολυμορφισμού A1298C στην ηλικιακή αυτή ομάδα.**

Στον πίνακα 28 βλέπουμε τις αλληλικές συχνότητες μεταξύ των ασθενών της 2<sup>ης</sup> υπο-ομάδας και της ομάδας ελέγχου. Το αλληλόμορφο A εμφανίζεται 44 φορές στην ομάδα των ασθενών (63%) και 1899 φορές στην ομάδα ελέγχου. Το αλληλόμορφο C εμφανίζεται 26 φορές στους ασθενείς (37%) και 923 φορές στην ομάδα ελέγχου (33%). (Πίνακας 28)

3.2.4.2. Συσχέτιση του πολυμορφισμού A1298C με την ηλικία έναρξης συμπτωμάτων από 6-10ετών.

Στη συνέχεια μελετήθηκαν αλληλικές και οι γονοτυπικές συχνότητες του πολυμορφισμού A1298C και υπολογίστηκαν οι σχετικοί λόγοι προκειμένου να διερευνησουμε κάποια πιθανή συσχέτισή του με την εμφάνιση επιληψίας.

Αλληλικές συχνότητες							
rs1801131 A>C	Ασθενείς		Ομάδα ελέγχου		OR	95% CI	P value
	Count	%	Count	%			
A	44	62.9%	1899	67.29%	0.8225	0.5033 to 1.3442	P= 0.44
C	26	37.1%	923	32.71%			
Total	66		2822				

**Πίνακας 29: Μελέτη συσχέτισης αλληλικών συχνοτήτων του πολυμορφισμού A1298C στη 2η υπο-ομάδα**

Στον πίνακα 29 φαίνονται οι αλληλικές συχνότητες για τον πολυμορφισμό rs1801131 στη 2<sup>η</sup> υπο-ομάδα με έναρξη συμπτωμάτων από 6-10 ετών. Το αλληλόμορφο A εμφανίζεται 44 φορές στους ασθενείς (62.9%) και 1899 στους υγιείς (67.29%). Το αλληλόμορφο C εμφανίζεται 26 φορές στους ασθενείς (37.1%) και 923 φορές στους υγιείς (32.71%). Η τιμή OR=0.82, τα όρια εμπιστοσύνης από 0.5 έως 1.34 και τη τιμή του p-value ίση με P= 0.44. (Πίνακας 29)

Συχνότητα γονοτύπων							
rs1801131 A>C	Ασθενείς		Controls		OR	95% CI	P value
	n	%	n	%			
CC	7	20%	143	10%	2.2	0.95- 5.17	p=0.065
AC+AA	28	80%	1268	90%			

**Πίνακας 30: Μελέτη συσχέτισης γονοτυπικών συχνοτήτων του πολυμορφισμού A1298C, στο πάνω μέρος του πίνακα ο γονότυπος CC vs AC+AA.**

Στον πίνακα 30, φαίνονται οι συχνότητες του γονότυπου CC έναντι των AC+AA. Ο γονότυπος C:C εμφανίζεται σε 7 ασθενείς (20%) και 143 υγιείς(10%). Οι γονότυποι AC+AA εμφανίζονται σε 28 ασθενή (80%) και 1268 υγιή άτομα. Ο σχετικός λόγος OR=2.2, το διάστημα εμπιστοσύνης από 0.95 έως 5.17 και το p=0.065. Παρατηρούμε πως η συχνότητα του γονότυπου C:C στους ασθενείς είναι διπλάσια από την αντίστοιχη συχνότητα στην ομάδα ελέγχου. Ο σχετικός λόγος ίσος με 2.2, υποδεικνύει πως ο γονότυπος C:C είναι 2.2 φορές πιο πιθανό να εμφανιστεί σε ασθενή παρά σε άτομο που δε φέρει επιληψία.(Πίνακας 30)

Συχνότητα γονοτύπων							
rs1801131 A>C	Ασθενείς		Controls		OR	95% CI	P value
	n	%	n	%			
AA	16	45%	631	44%	1.04	0.531 to 2.041	p=0.907
AC+CC	19	55%	780	56%			

**Πίνακας 31: Μελέτη συσχέτισης γονοτυπικών συχνοτήτων του πολυμορφισμού A1298C, για το γονότυπο AA vs CC+AC.**

Στον πίνακα 31 βλέπουμε τις γονοτυπικές συχνότητες για το γονότυπο AA έναντι των CC+AC αθροιστικά. Ο γονότυπος AA εμφανίζεται σε 16 ασθενείς (45%) και σε 631 υγιείς (44%). Το σύνολο των γονοτύπων CC+AC εμφανίζεται 19 φορές στην υποομάδα των ασθενών (55%) και 780 φορές στην ομάδα ελέγχου (56%). Ο σχετικός λόγος είναι ίσος με 1.04, το εύρος των ορίων εμπιστοσύνης είναι από 0.53 έως 2.04 και το p-value είναι ίσο με p=0.9. (Πίνακας 31)

Συχνότητα γονοτύπων							
rs1801131 A>C	Ασθενείς		Controls		OR	95% CI	P
	Count	%	Count	%			
AC	12	34%	637	45%	0.63	0.31-1.28	0.21
CC+AA	23	66%	774	55%			

**Πίνακας 32: Μελέτη συσχέτισης γονοτυπικών συχνοτήτων του πολυμορφισμού A1298C, για το γονότυπο AC vs CC+AA.**

Στον πίνακα 32 βλέπουμε τις συχνότητες του γονότυπου AC έναντι των CC+AA. Στους ασθενείς ο γονότυπος AC εμφανίζεται 12 φορές (34%) ενώ στην ομάδα ελέγχου 637 (45%). Το άθροισμα των 2 ομόζυγων γονοτύπων CC+AA στην ομάδα των ασθενών εμφανίζεται 23 φορές (66%), ενώ στην ομάδα ελέγχου εμφανίζεται 774 φορές (55%). Ο σχετικός λόγος είναι ίσος με 0.63 τα όρια εμπιστοσύνης κυμαίνονται από 0.31 έως 1.28 και το p-value είναι ίσο με 0.21. (Πίνακας 32)

3.2.4.3. Κατανομή του rs1801133 σε παιδιά με ηλικία εμφάνισης πρώτων επιληπτικών κρίσεων από 6-10 ετών.

Συνεχίζοντας, μελετήθηκαν και οι συχνότητες του δεύτερου πολυμορφισμού για τη δεύτερη υπο-ομάδα, που περιλαμβάνει ασθενείς με έναρξη πρώτων συμπτωμάτων από 6-10 ετών. Στον πίνακα 33 καταγράφονται οι συχνότητες των γονότυπων στους ασθενείς της υπο-ομάδας και στην ομάδα ελέγχου. Παρατηρούμε πως ο γονότυπος C:C εμφανίζεται σε 19 ασθενείς (53%) και 558 υγιείς (39%). Ο γονότυπος C:T, εμφανίζεται σε 13 ασθενείς (36%) και 646 υγιείς (46%). Τέλος, το γονότυπο T:T τον βλέπουμε σε 4 ασθενείς (11%) και 206 άτομα της ομάδας ελέγχου (15%). Γενικά, φαίνεται πως ο γονότυπος C:C εμφανίζεται συχνότερα στους ασθενείς της υπο-ομάδας αυτής συγκριτικά με τους μη έχοντες επιληψία. (Πίνακας 33)

Γονότυποι	Ασθενείς	Ομάδα Ελέγχου
C:C	19 (53%)	558 (39%)
C:T	13 (36%)	646 (46%)
T:T	4 (11%)	206 (15%)
Σύνολο	36	1410

**Πίνακας 33:** Γονοτυπικές συχνότητες του πολυμορφισμού C677T στην 2η υπο-ομάδα (6-10 ετών).

Αλληλόμορφο	Ασθενείς	Ομάδα Ελέγχου
CC+ CT	51 (71%)	1762 (62%)
CT+ TT	21 (29%)	1058 (38%)
Σύνολο	72	2820

**Πίνακας 34:** Αλληλικές συχνότητες του πολυμορφισμού C677T στη 2<sup>η</sup> υπο-ομάδα(6-10ετών).

Στον πίνακα 34 παρουσιάζονται οι συχνότητες των 2 αλληλομόρφων μεταξύ υγιών και ατόμων της 2<sup>ης</sup> υπο-ομάδας των ασθενών. Το αλληλόμορφο C εμφανίζεται 51 φορές στην υπο-ομάδα των ασθενών (71%) και 1762 φορές στην ομάδα ελέγχου (62%). Το αλληλόμορφο T εμφανίζεται 21 φορές (29%) στην υπο-ομάδα των ασθενών και 1058 φορές (38%) στην ομάδα ελέγχου. Φαίνεται πως το αλληλόμορφο C έχει μία τάση να εμφανίζεται συχνότερα στην ομάδα των ασθενών συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. (Πίνακας 34)

3.2.4.4. Συσχέτιση πολυμορφισμού C677T με την ηλικία εμφάνισης συμπτωμάτων 6-10 ετών.

Προχωρήσαμε στη μελέτη των συχνοτήτων και εκτίμηση των σχετικών λόγων προκειμένου να διερευνήσουμε την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ του πολυμορφισμού rs1801133 και την εμφάνιση επιληψίας από την ηλικία των 6 έως 10 ετών.

Αλληλικές συχνότητες							
rs1801133 C>T	Ασθενείς		Ομάδα ελέγχου		OR	95% CI	P value
	Count	%	Count	%			
C	51	70.8%	1762	62.48%	1.46	(0.87- 2.43)	P=0.15
T	21	29.2%	1058	37.52%			
total	72		2820				

**Πίνακας 35: Μελέτη συσχέτισης των αλληλικών συχνοτήτων του πολυμορφισμού C677T στη 2<sup>η</sup> υπο-ομάδα (6-10ετών).**

Στον πίνακα 35 φαίνονται οι αλληλικές συχνότητες του πολυμορφισμού C677T στην υπο-ομάδα με τους ασθενείς για τους οποίους τα πρώτα συμπτώματα επιληπτικών κρίσεων ξεκίνησαν από 6 έως 10 ετών. Το αλληλόμορφο C εμφανίζεται 51 φορές στην υπο-ομάδα των ασθενών (70.8%) και 1762 φορές στην ομάδα ελέγχου (62.5%). Το αλληλόμορφο T εμφανίζεται 21 φορές (29.2%) στην υπο-ομάδα των ασθενών και 1058 φορές (37.5%) στην ομάδα ελέγχου. Ο σχετικός λόγος OR=1.46, τα όρια εμπιστοσύνης από 0.87 έως 2.43 και η τιμή p-value=0.15. στις συχνότητες υπάρχει μία τάση αυξημένης εμφάνισης του αλληλομόρφου C στην ομάδα των ασθενών. Πιο συγκεκριμένα, ο σχετικός λόγος OR=1.46 δείχνει πως υπάρχει 0.46 φορές αυξημένη πιθανότητα για τους ασθενείς να φέρουν το αλληλόμορφο C σε σχέση με τους υγιείς. Ακόμη, σε συνδυασμό με το p-value=0.15, που είναι ίσο με το δεύτερο επίπεδο σημαντικότητας, δεν μπορούμε να απορρίψουμε τη συσχέτιση του αλληλομόρφου C με την εμφάνιση επιληψίας μεταξύ των 6 και 10 ετών. (Πίνακας 35)

Γονοτυπικές συχνότητες							
rs1801133 C>T	Ασθενείς		Ομάδα ελέγχου		OR	95% CI	P value
	n	%	n	%			
TT	4	11%	206	18.44%	0.73	0.26- 2.09	p=0.56
TC+CC	32	89%	1204	81.56%			

**Πίνακας 36: Γονοτυπικές συχνότητες για το γονότυπο TT vs TC+CC του πολυμορφισμού rs1801133 στη 2<sup>η</sup> υπο-ομάδα.**

Στον πίνακα 36 παρουσιάζονται οι γονοτυπικές συχνότητες για το γονότυπο TT έναντι των TC+CC. Στους ασθενείς 4 φορές (11%) εμφανίζεται ο γονότυπος TT, ενώ στους υγιείς εμφανίζεται 206 φορές (18.44%). Οι δύο γονότυποι TC+CC εμφανίζονται 32 φορές (89%) στους ασθενείς και 1204 φορές (81.56%) στα άτομα της ομάδας ελέγχου. ο σχετικός λόγος odds ratio είναι ίσος με 0.73, το διάστημα εμπιστοσύνης μεταξύ 0.26 και 2.09 και το p-value ίσο με 0.56. (Πίνακας 36)

Γονοτυπικές συχνότητες							
rs1801133 C>T	Ασθενείς		Ομάδα ελέγχου		OR	95% CI	P-value
	n	%	n	%			
CC	19	0.53	558	39.6%	1.71	0.88- 3.31	p=0.11
TC+TT	17	0.47	852	60.4%			

**Πίνακας 37:** Γονοτυπικές συχνότητες για το γονότυπο CC vs TC+TT του πολυμορφισμού rs1801133 στη 2η υπο-ομάδα.

Στον πίνακα 37 φαίνονται οι γονοτυπικές συχνότητες του γονότυπου CC έναντι των δύο άλλων γονοτύπων TC+TT. Ο γονότυπος CC εμφανίζεται σε 19 άτομα της υπο-ομάδας των ασθενών(53%) και σε 558 άτομα της ομάδας ελέγχου (39.6%). Στους 17 ασθενείς (47%)της υπο-ομάδας αυτής συναντούμε τους γονότυπους TC+TT, όπως επίσης και στα 852 άτομα της ομάδας ελέγχου (60.4%). Ο σχετικός λόγος odds ratio είναι ίσος με 0.71, με διάστημα εμπιστοσύνης από 0.88 έως 3.31 και τιμή p-value=0.11. Σε αυτή την υπο-ομάδα παρατηρούμε πώς ο γονότυπος CC έχει την τάση να εμφανίζεται σχεδόν σε διπλάσια συχνότητα στους ασθενείς.(Πίνακας 37)

Γονοτυπικές συχνότητες							
rs1801133 C>T	Ασθενείς		Ομάδα ελέγχου		OR	95% CI	P-value
	n	%	n	%			
TC	13	36%	646	46%	0.34	0.34- 1.33	p=0.25
CC+TT	23	64%	764	54%			

**Πίνακας 38:** Γονοτυπικές συχνότητες για το γονότυπο TC vs CC+TT του πολυμορφισμού rs1801133 στη 2η υπο-ομάδα.

Ολοκληρώνοντας τη μελέτη της 2ης υπο-ομάδας, βλέπουμε στον πίνακα 38 τις γονοτυπικές συχνότητες για το μοντέλο TC vs CC+TT. Οι ετερόζυγοι ασθενείς ανέρχονται στους 13 (36%) ενώ στην ομάδα ελέγχου έχουμε 66 ετερόζυγα άτομα (46%). Αντίστοιχα 23 άτομα της 2<sup>ης</sup> υπο-ομάδας των ασθενών (54%) έχουν γονότυπο CC ή TT. Ο λόγος OR=0.34, τα όρια εμπιστοσύνης είναι μεταξύ 0.34 έως 1.33 και το p-value ίσο με p=0.25. (Πίνακας 38)



3.2.5. Διαίρεση της ομάδας των ασθενών σε υπο-ομάδες και μελέτη της κατανομής των πολυμορφισμών rs1801131, rs1801133 σε παιδιά με ηλικία εμφάνισης πρώτων επιληπτικών κρίσεων από 11-15 ετών.

3.2.5.1. Κατανομή του πολυμορφισμού rs1801131 (A1298C) σε παιδιά με ηλικία εμφάνισης πρώτων επιληπτικών κρίσεων από 11-15 ετών.

Στο επόμενο κομμάτι της εργασίας, αναλύθηκαν οι γονοτυπικές και αλληλικές συχνότητες του πολυμορφισμού A1298C στην 3<sup>η</sup> υπο-ομάδα των ασθενών, που περιλαμβάνει άτομα με πρώτα συμπτώματα επιληψίας μεταξύ 10-11 ετών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Γονότυποι	Ασθενείς	Ομάδα Ελέγχου
A:A	29 (51%)	631 (45%)
A:C	23 (40%)	637 (45%)
C:C	5 (9%)	143 (10%)
Σύνολο	57	1411

**Πίνακας 38:** Οι γονοτυπικές συχνότητες στα άτομα με εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων της νόσου μεταξύ 11 και 15 ετών.

Στον πίνακα 38 φαίνονται οι γονοτυπικές συχνότητες του πολυμορφισμού A1298C μεταξύ ασθενών και ομάδας ελέγχου. Ο γονότυπος A:A βρέθηκε σε 29 ασθενείς (51%) και 631 υγιείς (45%). Ο γονότυπος A:C βρέθηκε σε 23 ασθενείς (40%) και 637 υγιείς (45%). Τέλος, ο γονότυπος C:C βρέθηκε σε 5 ασθενείς (9%) και 143 άτομα της ομάδας ελέγχου (10%). (Πίνακας 38)

Αλληλόμορφο	Ασθενείς	Ομάδα Ελέγχου
A (AA+AC)	81 (71%)	1899 (67%)
C (AC+CC)	33 (29 %)	923 (33%)
Σύνολο	114	2822

**Πίνακας 39:** Οι αλληλικές συχνότητες στα άτομα με εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων της νόσου μεταξύ 11 και 15 ετών.

Στον πίνακα 39, παρουσιάζονται οι συχνότητες των αλληλομόρφων του rs1801131 μεταξύ επιληπτικών ασθενών και ομάδας ελέγχου. Στους ασθενείς το αλληλόμορφο A (AA+AC) εμφανίζεται 81 φορές(71%), ενώ στην ομάδα ελέγχου 1899 φορές (67%). Το αλληλόμορφο C στους ασθενείς εμφανίζεται 33 φορές (67%), ενώ στην ομάδα ελέγχου 923 φορές (33%). Στους παραπάνω πίνακες φαίνεται πως οι συχνότητες μεταξύ των ατόμων της ομάδας των ασθενών είναι παραπλήσιες των συχνοτήτων των ατόμων της ομάδας control. (Πίνακας 39)

3.2.5.2. Συσχέτιση του πολυμορφισμού A1298C με την ηλικία έναρξης συμπτωμάτων από 11-15ετών.

Ακολούθησε η μελέτη των συχνοτήτων κι ο υπολογισμός του σχετικού λόγου, των ορίων εμπιστοσύνης και του επιπέδου σημαντικότητας.

Αλληλικές συχνότητες							
rs1801131 A>C	Ασθενείς		Ομάδα ελέγχου		OR	95% CI	P value
	Count	%	Count	%			
A	81	71.1%	1899	67.29%	1.193	0.7899 to 1.8019	P= 0.4
C	33	28.9%	923	32.71%			
Total	114		2822				

**Πίνακας 40: Μελέτη συσχέτισης των αλληλικών συχνοτήτων του A1298C στην 3<sup>η</sup> ηλικιακή ομάδα.**

Στον πίνακα 40, παρουσιάζονται οι συχνότητες των 2 αλληλομόρφων A και C του πολυμορφισμού A1298C. Το αλληλόμορφο A στους ασθενείς παρουσιάζεται 81 φορές στους ασθενείς (71.1%) και 1899 φορές στους μάρτυρες (67.29%) . Αντίστοιχα, το αλληλόμορφο C εμφανίζεται σε 33 ασθενείς (28.9%) και σε 923 υγιείς(32.71%). Το odds ratio υπολογίζεται στο 1.19 , επομένως για τους ασθενείς είναι 20% πιθανότερο να φέρουν το αλληλόμορφο A. Ακόμη, το διάστημα εμπιστοσύνης εκτείνεται από 0.79 έως 1.8 και η τιμή p-value=0.4 (Πίνακας 40).

Συχνότητα γονοτύπων							
rs1801131 A>C	Ασθενείς		Controls		OR	95% CI	P value
	n	%	n	%			
CC	5	9%	143	10.13%	0.85	0.34- 2.17	0.74
AC+AA	52	91%	1268	89.87%			

**Πίνακας 41: Μελέτη συσχέτισης του γονότυπου CC vs AC+AA του πολυμορφισμού A1298C και της εμφάνισης επιληψίας.**

Στον πίνακα 41, φαίνεται πως ο γονότυπος C:C συναντάται σε 5 ασθενείς με επιληψία (9%) και σε 143 άτομα της ομάδας ελέγχου (10.13%). Αθροιστικά οι άλλοι δύο γονότυποι, εμφανίζονται σε 52 ασθενείς (91%) και 1268 υγιείς μάρτυρες (89.87%). Ο σχετικός λόγος OR υπολογίστηκε ίσος με 0.85, τα όρια εμπιστοσύνης από 0.34 έως 2.17 και η τιμή p-value ίση με 0.74.(Πίνακας 41)

Συχνότητα γονοτύπων							
rs1801131 A>C	Ασθενείς		Controls		OR	95% CI	P value
	n	%	n	%			
AA	29	51%	631	44.72%	1.28	0.75- 2.17	0.36
AC+CC	28	49%	780	55.28%			

**Πίνακας 42: Μελέτη συσχέτισης των γονοτυπικών συχνοτήτων AA vs AC+CC του A1298C και της εμφάνισης επιληψίας.**

Στη συνέχεια, εξετάστηκε το επικρατές μοντέλο AA vs AC+CC του A1298C, όπως φαίνεται στον πίνακα 42. Στους ασθενείς ο γονότυπος A:A εμφανίζεται 29 φορές (51%) ενώ στους υγιείς 631 φορές (44.72%). Από την άλλη, το σύνολο των γονοτύπων AC+CC συναντάται 28 φορές στους ασθενείς (49%) και 780 φορές στους υγιείς (55.28%). Ο σχετικός λόγος OR είναι ίσος με 1.28, τα όρια εμπιστοσύνης κυμαίνονται από 0.75 έως 2.17 ενώ το p-value=0.36. (Πίνακας 42)

Συχνότητα γονοτύπων							
rs1801131 A>C	Ασθενείς		Controls		OR	95% CI	P
	Count	%	Count	%			
AC	23	40%	637	45%	0.82	0.48-1.41	0.48
CC+AA	34	60%	774	55%			

**Πίνακας 43: Μελέτη συσχέτισης των γονοτυπικών συχνοτήτων AC vs AA+CC του A1298C και της εμφάνισης επιληψίας**

Στον πίνακα 43 φαίνονται οι γονοτυπικές συχνότητες του γονότυπου AC έναντι των άλλων δύο. Οι ετερόζυγοι ασθενείς είναι 23 (40%) ενώ οι ετερόζυγοι υγιείς 637 (45%). Το σύνολο των ομόζυγων ασθενών είναι 34 (60%) ενώ στους υγιείς οι γονότυποι CC+AA απαντώνται 774 φορές (55%). Ο λόγος OR υπολογίστηκε ίσος με 0.82, τα όρια εμπιστοσύνης από 0.48-1.41 και το p-value=0.48. (Πίνακας 43)

Από στατιστικής πλευράς, δεν μπορούμε να πούμε με βεβαιότητα πως υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τα αλληλόμορφα του γονότυπου A1298C και την εμφάνιση επιληψίας σε ηλικίες 11-15 ετών.

3.2.5.3. Κατανομή και συσχέτιση του πολυμορφισμού rs1801133 (C677T) σε παιδιά με ηλικία εμφάνισης πρώτων επιληπτικών κρίσεων από 11-15 ετών. Οι γονοτυπικές και αλληλικές συχνότητες στα άτομα με εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων της νόσου μεταξύ 11 και 15 ετών.

Τέλος, μελετήθηκαν οι συχνότητες του δεύτερου πολυμορφισμού ενδιαφέροντός μας για την 3<sup>η</sup> ηλικιακή ομάδα.

Γονότυποι	Ασθενείς	Ομάδα Ελέγχου
C:C	26 (45%)	558 (39%)
C:T	23 (40%)	646 (46%)
T:T	9 (16%)	206 (15%)
<b>Σύνολο</b>	<b>58</b>	<b>1410</b>

**Πίνακας 44: Γονοτυπικές συχνότητες του πολυμορφισμού C677T στην 3<sup>η</sup> ηλικιακή ομάδα.**

Όπως φαίνεται και στον πίνακα 44, στην ομάδα των ασθενών οι 26 βρέθηκαν ομόζυγοι για το αλληλόμορφο C (45%), οι 23 ετερόζυγοι (40%) και οι 9 ομόζυγοι για το αλληλόμορφο T (16%). Στην ομάδα ελέγχου οι 558 (39%) βρέθηκαν ομόζυγοι για το αλληλόμορφο C, οι 646 (46%) ετερόζυγοι και οι 206 (15%) ομόζυγοι για το αλληλόμορφο T. (Πίνακας 44)

Αλληλόμορφο	Ασθενείς	Ομάδα Ελέγχου
CC+ CT	75 (65%)	1762 (62%)
CT+ TT	41 (35%)	1058 (38%)
<b>Σύνολο</b>	<b>116</b>	<b>2820</b>

**Πίνακας 45: Αλληλικές συχνότητες του πολυμορφισμού C677T στην 3<sup>η</sup> ηλικιακή ομάδα**

Στον πίνακα 45, φαίνονται οι αλληλικές συχνότητες του πολυμορφισμού C677T στους ασθενείς αλλά και στην ομάδα ελέγχου. Το αλληλόμορφο C εμφανίζεται 75 φορές (65%) στην ομάδα των ασθενών, ενώ στους υγιείς 1762 (62%). Το αλληλόμορφο T εμφανίζεται 41 φορές (35%) στη ομάδα των ασθενών με επιληψία και 1058 φορές (38%) στην ομάδα των υγιών. (Πίνακας 45)

Τόσο, οι γονοτυπικές, όσο και οι αλληλικές συχνότητες παρατηρούμε πως πλησιάζουν αρκετά μεταξύ των δύο ομάδων (ασθενών-controls).

Αλληλικές συχνότητες							
rs1801133 C>T	Ασθενείς		Ομάδα ελέγχου		OR	95% CI	P value
	Count	%	Count	%			
C	75	65%	1762	62.48%	1.1	0.74-1.62	0.64
T	41	35%	1058	37.52%			
total	116		2820				

**Πίνακας 46: Μελέτη συσχέτισης αλληλικών συχνοτήτων πολυμορφισμού C677T στην 3<sup>η</sup> ηλικιακή ομάδα**

Όπως φαίνεται στον πίνακα 46, το αλληλόμορφο C το βλέπουμε 75 φορές στους ασθενείς (65%) και 1762 φορές στους υγιείς (62.48%). Το αλληλόμορφο T το συναντούμε 41 φορές στην ομάδα των ασθενών με επιληψία (35%) και 1058 φορές στους υγιείς μάρτυρες (37.52%). Ο λόγος OR ισούται με 1.1, το διάστημα εμπιστοσύνης από 0.74 έως 1.62 και η τιμή p-value=0.64. (Πίνακας 46)

Γονοτυπικές συχνότητες							
rs1801133 C>T	Ασθενείς		Ομάδα ελέγχου		OR	95% CI	P value
	n	%	n	%			
TT	9	16%	206	18.44%	1.07	0.52- 2.22	0.85
TC+CC	49	84%	1204	81.56%			

**Πίνακας 47: Μελέτη συσχέτισης του γονότυπου TT vs TC+CC με την εμφάνιση επιληψίας**

Στον πίνακα 47 φαίνονται οι γονοτυπικές συχνότητες για το γονότυπο TT καθώς και για το άθροισμα των 2 γονοτύπων TC+CC. Οι ασθενείς με γονότυπο TT είναι 9 (16%) και αντίστοιχα οι υγιείς 206 (18.44%). Οι γονότυποι TC+CC συναντώνται 49 φορές (84%) στους ασθενείς και 1204 φορές στην ομάδα ελέγχου. Ο λόγος OR=1.07, το διάστημα εμπιστοσύνης είναι μεταξύ 0.52 και 2.22, ενώ το p-value=0.85. (Πίνακας 47)

Γονοτυπικές συχνότητες							
rs1801133 C>T	Ασθενείς		Ομάδα ελέγχου		OR	95% CI	P value
	n	%	n	%			
CC	26	45%	558	39.6%	1.24	0.73- 2.1	0.44
TC+TT	32	55%	852	60.4%			

**Πίνακας 48: Μελέτη συσχέτισης του γονότυπου CC vs TT+TC με την εμφάνιση επιληψίας.**

Στον πίνακα 48 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα και βλέπουμε πως ο γονότυπος CC βρίσκεται σε 26 ασθενείς (45%) και 558 υγιείς (39.6%). Οι γονότυποι TC+TT εμφανίζονται σε 32 ασθενείς (55%) και σε 852 άτομα στην ομάδα ελέγχου (60.4%). Η τιμή του σχετικού λόγου OR=1.24, τα όρια εμπιστοσύνης CI είναι από 0.73 έως 2.1 και η τιμή p-value=0.44. (Πίνακας 48)

Γονοτυπικές συχνότητες							
rs1801133 C>T	Ασθενείς		Ομάδα ελέγχου		OR	95% CI	P value
	n	%	n	%			
TC	23	40%	646	46%	0.78	0.45- 1.33	0.36
CC+TT	35	60%	764	54%			

**Πίνακας 49: Μελέτη συσχέτισης του γονότυπου TC vs TT+CC με την εμφάνιση επιληψίας.**

Στον πίνακα 49 φαίνεται πως έχουμε 23 (40%) ετερόζυγους ασθενείς ενώ οι ετερόζυγοι υγιείς ανέρχονται στους 646 (46%). Οι γονότυποι CC+TT εμφανίζονται 35 φορές (60%) στην ομάδα των ασθενών με επιληψία και 764 φορές (54%) στην ομάδα ελέγχου. Ο σχετικός λόγος OR=0.78, τα όρια εμπιστοσύνης από 0.45 έως 1.33 και η τιμή p-value ίση με p=0.36. (Πίνακας 49)

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η επιληψία είναι μία από τις πιο σημαντικές νευρολογικές ασθένειες, καθώς εμφανίζεται σε τουλάχιστον 50,000,000 ασθενείς ανά τον κόσμο. Παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια συμπτωμάτων καθώς μπορεί να εμφανίζεται σε οποιοδήποτε σημείο του εγκεφάλου και να προκαλεί διαφορετικά συμπτώματα ανάλογα με την περιοχή η οποία επηρεάζεται κάθε φορά. Η αιτιολογία της νόσου επίσης ποικίλει καθώς μπορεί να προκαλείται από τον τρόπο ζωής, από φαρμακευτικές ουσίες, από ασθένειες του εγκεφάλου ή ακόμη και από κληρονομήσιμες γενετικές μεταλλάξεις. Στη σημερινή εποχή, υπάρχουν αρκετές μέθοδοι υψηλής τεχνολογίας (όπως MRI) που συνεισφέρουν στη διάγνωση της νόσου και μία πληθώρα φαρμακευτικών ουσιών για την αντιμετώπισή της. Ωστόσο, αν και η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που γεννούν τις επιληπτικές κρίσεις έχει φτάσει σε αρκετά υψηλά επίπεδα, η ίαση της αποτελεί ένα μεγάλο στοίχημα για την επιστημονική κοινότητα. Η πολυπλοκότητα της επιληπτικής νόσου, απαιτεί ολοένα και περισσότερους δείκτες προκειμένου να συνδράμουν στην αξιολόγηση κάθε περιστατικού, αλλά και στη σχεδίαση ενός αποτελεσματικού σχεδίου θεραπείας. Η ανάπτυξη των αντιεπιληπτικών φαρμάκων ενισχύει ολοένα και περισσότερο τα όπλα για την αντιμετώπιση της νόσου, καθώς πλέον έχουμε περάσει στην Τρίτη γενιά αντιεπιληπτικών φαρμάκων τα οποία εμφανίζονται δραστικότερα και με λιγότερες παρενέργειες. Ωστόσο, συχνά η αντιμετώπιση της επιληπτικής νόσου αποτελεί ακόμη ένα στοίχημα.

Σε αυτό το σημείο, φτάνουμε στο πεδίο της Φαρμακογονιδιωματικής και Εξατομικευμένης Θεραπείας. Η προοπτική της γνώσης του γενετικού μας υποβάθρου, μπορεί να συνεισφέρει στη διάγνωση, στην πρόβλεψη, καθώς και στη θεραπεία των περισσότερων μορφών ασθενειών. Επομένως, γεννάται η ανάγκη για διαρκή αναζήτηση και διερεύνηση πιθανών γονιδίων που επηρεάζουν την εμφάνιση αλλά και έκβαση πολυπαραγοντικών νοσημάτων.

Στην ανάπτυξη της επιληψίας έχουν βρεθεί αρκετοί γονιδιακοί παράγοντες οι οποίοι φαίνεται να συνδράμουν στην εμφάνιση της ασθένειας. Πρόκειται κατά κύριο λόγο για πρωτεΐνες διαύλους που επιδρούν στην ηλεκτρική αγωγιμότητα των κυττάρων και κατ' επέκταση στη μετάδοση των ηλεκτρικών σημάτων επάγοντας συμπτώματα επιληπτικής κρίσης. Κατ' αρχάς οι τύποι K<sub>v</sub> και KCNQ των τασεο-εξαρτώμενων διαύλων καλίου, εμπλέκονται στη φάση επαναπόλωσης της μεμβράνης και συνδέονται με την καλοήγη νεογνική επιληψία που εμφανίζεται μεταξύ της 1ης εβδομάδας και 6ου μήνα ζωής. Πολυμορφισμοί του γονιδίου KCNQ2 και KCNQ3 φαίνεται να είναι υπεύθυνες για αυτό τον τύπο επιληψίας. [7]

Συνεχίζοντας, οι υποδοχείς του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA-A και GABA-B) που ρυθμίζουν τη συγκέντρωση ιόντων χλωρίου συνδέονται με ορισμένους τύπους επιληψίας που εμφανίζονται κατά την παιδική ηλικία. Παραλλαγές των καναλιών αυτών όπως η GABRG2, φέρονται να εντείνουν την εμφάνιση τυπικών αφαιρέσεων και άλλων επιληπτικών συμπτωμάτων συνεισφέροντας στην ανάπτυξη Γενετικών Γενικευμένων Επιληψιών. Αντίστοιχα, παραλλαγές σε γονίδια που σχετίζονται με τους υπόλοιπους ιοντικούς διαύλους Νατρίου και Ασβεστίου καθώς και υποδοχείς νευροδιαβιβαστών όπως αυτός της ακετυλοχολίνης μπορούν να δημιουργήσουν επιπλοκές στη διεγερσιμότητα των κυττάρων προκαλώντας επιληπτικές κρίσεις. [7]

Πέραν όμως των γονιδίων που σχετίζονται με τα ιοντικά κανάλια, είναι χρήσιμο να εξετάσουμε γονίδια τα οποία κωδικοποιούν που ρυθμίζουν τη σωστή λειτουργία του κυττάρου. Το ένζυμο της ρεδοκτάσης του μεθυλοτετραϋδροφυλλικού οξέος (MTHFR) αποτελεί ένα σημαντικό ένζυμο για την ευρυθμία των κυττάρων και επομένως για την ομαλή λειτουργία όλου του οργανισμού. Μετατρέπει το 5-10 μεθυλοτετραϋδροφυλλικό σε 5-μεθυλοτετραϋδροφυλλικό, το οποίο λειτουργεί ως δότης μεθυλίου για τη μετατροπή της ομοκυστεΐνης σε μεθειονίνη. Η δράση του ενζύμου καθορίζει σημαντικές βιολογικές διαδικασίες, όπως η σύνθεση, η επιδιόρθωση και η μεθυλίωση του DNA. Έρευνες έχουν δείξει πως η μειωμένη λειτουργικότητα του ενζύμου συνδέεται με σοβαρές συνέπειες για την υγεία του ατόμου. Υπάρχει ένα μεγάλο εύρος ασθενειών που δύνανται να επηρεάζονται από την εν λόγω πρωτεΐνη, όπως λόγου χάριν ασθένειες του καρδιαγγειακού συστήματος, νευροεκφυλιστικές νόσοι, ενώ σε περιπτώσεις κύησης μπορεί να προκληθεί ακόμη και αποβολή του εμβρύου. [46]

Οι 2 κύριες παραλλαγές του ενζύμου είναι οι C677T, η οποία σε πρωτεϊνικό επίπεδο προκαλεί αντικατάσταση της Αλανίνης από Βαλίνη, και A1298C που προκαλεί αντικατάσταση του γλουταμινικού οξέος σε αλανίνη στην πρωτεϊνική αλληλουχία. Οι δύο αυτές μεταλλάξεις έχουν αρνητικό αντίκτυπο στο ένζυμο, μιας και μειώνουν την αποτελεσματικότητά του. Η μέχρι στιγμής βιβλιογραφία υποδεικνύει πως το αλληλόμορφο T είναι συχνότερο σε επιληπτικούς ασθενείς συγκριτικά με τους υγιείς.[26] Αξιοσημείωτο δε είναι το γεγονός πως το ένζυμο MTHFR δε συνδέεται αποκλειστικά με τη συμπτωματολογία της επιληψίας, αλλά ενδέχεται να επηρεάζει τη φαρμακοδυναμική των αντιεπιληπτικών ουσιών, ιδιαιτέρως αυτών που χρειάζεται να μεθυλιωθούν προκειμένου να δράσουν, όπως λόγου χάριν η καρβαμαζεπίνη και το βαλπροϊκό. [27] Έρευνες έχουν δείξει πως η χορήγηση καρβαμαζεπίνης σε ασθενείς που είναι ομόζυγοι TT για την παραλλαγή C677T, έχουν σημαντικά αυξημένες συγκεντρώσεις ομοκυστεΐνης στο αίμα τους και παράλληλα μειωμένα επίπεδα φυλλικού οξέος. Δημιουργείται λοιπόν η ανάγκη για διερεύνηση της ύπαρξης πιθανής σύνδεσης του MTHFR με την επιληψία.

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκαν οι γονοτυπικές και αλληλικές συχνότητες του γονιδίου του mthfr με στόχο εύρεση την πιθανής συσχέτισης των δύο αυτών πολυμορφισμών του γονιδίου mthfr με την εμφάνιση επιληψίας. Για τις ανάγκες της μελέτης συλλέχθηκαν δείγματα αίματος από 218 ασθενείς, απομονώθηκε το γενετικό υλικό και εφαρμόστηκε διαδικασία γονοτύπησης με τη μέθοδο της KASP. και στατιστικής επεξεργασίας των αποτελεσμάτων με στόχο τη διερεύνηση πιθανής συσχέτισης των δύο παραλλαγών με την εμφάνιση της επιληψίας. Τα αποτελέσματα αυτά συγκρίθηκαν με τους γονότυπους της ομάδας ελέγχου (1411 άτομα).

Η αρχική διερεύνηση πιθανής συσχέτισης του γονότυπου AA του πολυμορφισμού A1298C έναντι των άλλων δύο γονότυπων AC+CC, έδειξε πως υπάρχει μία τάση ένας ασθενής έχει 25% αυξημένες πιθανότητες να έχει το γονότυπο AA (OR=1.25, p=0.13). Επίσης, αντιπαραβάλλοντας το γονότυπο AC έναντι των AA+CC, φάνηκε πως ένας ασθενής έχει 25% μειωμένη πιθανότητα να φέρει τον ετερόζυγο γονότυπο (OR=0.75, p=0.05). Είναι επομένως αντιληπτό, πως ο ετερόζυγος γονότυπος είναι παράγοντας που δρα προστατευτικά έναντι της εμφάνισης της νόσου. Από φαρμακολογικής άποψης, γνωρίζοντας πως ο γονότυπος AA, ο οποίος έχει την τάση να εμφανίζεται συχνότερα σε επιληπτικούς ασθενείς, δε συνδέεται με ιδιαίτερα



αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης, η αντιεπιληπτική αγωγή είναι πιθανό να μη δημιουργήσει υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης στο πλάσμα.

Συνεχίζοντας, συγκρίνοντας τις αλληλικές και γονοτυπικές συχνότητες του πολυμορφισμού C677T μεταξύ της ομάδας των ασθενών και της ομάδας ελέγχου, η μελέτη του ετερόζυγου γονότυπου CT έναντι των CC+TT, έδειξε πως ο ετερόζυγος γονότυπος εμφανίζεται κατά 0.2 φορές λιγότερο συχνά στους ασθενείς με επιληψία (OR=0.8, p=0.13). Επομένως, μπορούμε να ισχυριστούμε πως η ύπαρξη της φυσιολογικής παραλλαγής της πρωτεΐνης, έστω και σε χαμηλότερα επίπεδα, είναι αρκετή ώστε να λειτουργήσει προφυλακτικά έναντι της νόσου.

Στο επόμενο στάδιο της μελέτης έγινε διαχωρισμός της ομάδας των ασθενών σε υπο-ομάδες και μελετήθηκαν οι πολυμορφισμοί σε σχέση με την ηλικία έναρξης της νόσου. Στην πρώτη υπο-ομάδα, όπου τα πρώτα συμπτώματα εμφανίστηκαν κατά την ηλικία των 0-5 ετών (early onset) τα αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό A1298C, έδειξαν και πάλι την τάση του ομόζυγου AA γονότυπου να εμφανίζεται σχεδόν στο διπλάσιο στους ασθενείς της ομάδας αυτής. Ωστόσο, ο ετερόζυγος γονότυπος φαίνεται ξανά να λειτουργεί ενάντια στην εμφάνιση των επιληπτικών συμπτωμάτων.

Στη συγκεκριμένη υπο-ομάδα, επίσης αξιολογήθηκαν τα αποτελέσματα αναφορικά με τον πολυμορφισμό C677T. Το αλληλόμορφο της θυμίνης φαίνεται να εμφανίζεται κατά 40% περισσότερο στους ασθενείς με έναρξη συμπτωμάτων στα πρώτα 5 έτη (OR=0.6, p=0.05). Ενισχυτικά σε αυτή την παρατήρηση, έρχεται το γεγονός πως ο γονότυπος TT βρέθηκε να εμφανίζεται αρκετά συχνότερα στους ασθενείς, ένας ασθενής είναι 2.5 φορές πιθανότερο να είναι ομόζυγος για το γονότυπο TT (OR=2.5, p=0.02). Είναι λοιπόν αντιληπτό, πως η ύπαρξη του συγκεκριμένου αλληλομόρφου και ειδικά σε ομόζυγη κατάσταση, πιθανά συνδέεται στενά με την εμφάνιση επιληψίας, αποτελώντας παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων σε ηλικία από 0 έως 5 ετών. Θα πρέπει στο σημείο αυτό να εκτιμηθεί πως από τη στιγμή που ένας ασθενής είναι πιθανότερο να είναι ομόζυγος για τη μη φυσική παραλλαγή του γονιδίου, θα χαρακτηρίζεται από χαμηλότερη δράση του MTHFR και κατ' επέκταση υψηλότερα επίπεδα ομοκυστεΐνης στο αίμα. [28] Επομένως, η αντι-επιληπτική αγωγή, ειδικά με βαλπροϊκό ή καρβαμαζεπίνη, θα μπορούσε να αυξήσει ακόμη περισσότερο τα επίπεδα ομοκυστεΐνης οδηγώντας σε υπερομοκυστεϊναιμία. Ως εκ τούτου, θα ήταν βέλτιστο να μην προτιμηθεί η συγκεκριμένη κατηγορία αντι-επιληπτικών φαρμάκων στους ασθενείς με έναρξη συμπτωμάτων από 0-5 ετών.

Υποστηρικτικά σε αυτό, υποδεικνύουν τη σύνδεση της επιληπτικής νόσου με το γονίδιο *MTHFR*, που όπως επισημαίνουν οι Wu, Yang et al., ειδικότερα ο πολυμορφισμός C677T και ο γονότυπος TT αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση της ασθένειας. [46] Ακόμη, οι Zhu, Ni et al. καθώς και οι Munisamy et al., πραγματοποιώντας μελέτη σε ασιατικό πληθυσμό, αναφέρουν πως η χορήγηση αντι-επιληπτικών φαρμάκων συσχετίζεται με αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης. [28][26][47]

Συνεχίζοντας, στη 2η υπο-ομάδα με ασθενείς στους οποίους τα συμπτώματα ξεκίνησαν από 6 έως 10 ετών. Η μελέτη του πρώτου πολυμορφισμού rs1801131

έδειξε μία αυξημένη τάση στη συχνότητα του γονότυπου CC στους ασθενείς συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Συγκεκριμένα ο γονότυπος CC είναι 2.2 φορές πιο πιθανό να βρεθεί σε κάποιον ασθενή της υπο-ομάδας σε σχέση με τους γονότυπους AC+AA (OR=2.2, CI: 0.95-5.17 και p-value=0.065). Η τάση αυτή υποδεικνύει πως ενδεχομένως ο γονότυπος CC, να αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων μεταξύ 6-10 ετών. Ωστόσο, ο γονότυπος αυτός επίσης συνδέεται με μειωμένη δράση του ενζύμου και υψηλές συγκεντρώσεις ομοκυστεΐνης στο αίμα. Επομένως, θα πρέπει να χορηγηθεί αντι-επιληπτική αγωγή η οποία να μην εντείνει τις υψηλές συγκεντρώσεις ομοκυστεΐνης.

Συνεχίζοντας, στον πολυμορφισμό rs1801133 υπάρχουν δύο παρατηρήσεις οι οποίες πρέπει να σημειωθούν. Πιο συγκεκριμένα, το αλληλόμορφο C και ο γονότυπος C:C φαίνεται να εμφανίζονται συχνότερα στους ασθενείς της ομάδας αυτής. Το αλληλόμορφο C είναι 0.46 φορές συχνότερο στους ασθενείς (OR=1.46, CI: 0.84-2.43, p-value=0.15) και ακόμη, ένας ασθενής έχει 71% αυξημένη πιθανότητα να έχει το γονότυπο CC (OR=1.71, CI: 0.88-3.31, p=0.11). Σε αυτή την υπο-ομάδα φαίνεται πως το αλληλόμορφο αγρίου τύπου, τείνει να εμφανίζεται συχνότερα στους ασθενείς, άρα ενδέχεται ο κίνδυνος για αυξημένες συγκεντρώσεις ομοκυστεΐνης να είναι μειωμένος.

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να σχολιαστεί πως τα αποτελέσματα της πρώτης υπο-ομάδας έρχονται σε αντίθεση με αυτά της δεύτερης. Αυτό ενδεχομένως να είναι απόρροια της διαφοράς στη δράση του MTHFR στα συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια. Ωστόσο, και στις δύο υπο-ομάδες κυριαρχεί μία από τις δύο παραλλαγές με μειωμένη ενεργότητα της πρωτεΐνης. Αρκετές έρευνες υποδεικνύουν πως το ένζυμο αυτό είναι καταλυτικό για την εμφάνιση διαφόρων νευρολογικών διαταραχών στα πρώιμα στάδια της ζωής. [48] Επίσης, τα επίπεδα φυλλικού οξέος στις μικρές ηλικίες έχουν καθοριστικό ρόλο στη σωστή ανάπτυξη και λειτουργία του εγκεφάλου. [49] [50] Επομένως, η μειωμένη λειτουργία του ενζύμου την οποία επιφέρουν οι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί έχουν σοβαρότερο αντίκτυπο στα πρώτα χρόνια ανάπτυξης.

Η 3η υπο-ομάδα αποτελείται από άτομα στα οποία τα πρώτα συμπτώματα ξεκίνησαν από 11-15 ετών. Στην ομάδα αυτή έγιναν μελέτες των συχνοτήτων και εκτίμηση των σχετικών λόγων. Ωστόσο, δεν υπήρξε σε κανέναν από τους δύο πολυμορφισμούς κάποια στατιστικά σημαντική ένδειξη. Γεγονός το οποίο συνηγορεί ίσως στην παρατήρηση πως η λειτουργία του ενζύμου MTHFR δεν είναι εξίσου καθοριστική καθώς σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο.

Θα πρέπει βέβαια να σημειωθεί, πως καθώς οι ασθενείς της παρούσας μελέτης ανήκουν στον Νοτιοανατολικό Καυκάσιο πληθυσμό, τα αποτελέσματα και οι συχνότητες της έρευνάς μας, ενδέχεται να μην ομοιάζουν με συχνότητες πληθυσμών πέραν του συγκεκριμένου εύρους κατανομής.

Αναφορικά με τη Δυναμική της μελέτης αυτής στη φαρμακοθεραπεία της επιληψίας, θα πρέπει να εστιάσουμε κυρίως στο μεταβολισμό των φαρμάκων, όπως η καρβαμαζεπίνη και το βαλπροϊκό, όπου η δράση τους εξαρτάται άμεσα από τη μεθυλίωση και επομένως από τη δράση του mthfr ενζύμου. [27] Συγκεκριμένα, ο πολυμορφισμός C677T, αποκαλύφθηκε πως παίζει σημαντικό ρόλο, καθώς ο

γονότυπος TT, ο οποίος συνδέεται με μειωμένη δράση του ενζύμου, είναι 2.5 φορές πιθανότερο να εμφανίζεται σε ένα άτομο που εμφανίζει επιληπτικά συμπτώματα σε ηλικία 0 έως 5 ετών. Η χορήγηση καρβαμαζεπίνης ή βαλπροϊκού στην περίπτωση αυτή, θα ήταν καλό να γίνει έπειτα από γονιδιακό έλεγχο του ατόμου. Καταληκτικά, συμπληρωματικά με τη χορήγηση των αντι-επιληπτικών φαρμάκων επιβάλλεται η συχνή παρακολούθηση των επιπέδων φυλλικού οξέος, ομοκυστεΐνης και βιταμίνης B12, μιας και οι παράγοντες αυτοί είναι ζωτικής σημασίας για την ευρυθμία των κυττάρων. Ελέγχοντας τις τιμές των βιοδεικτών ανά τακτά χρονικά διαστήματα, θα γίνεται συχνά αναπροσαρμογή των δόσεων και τροποποίησή τους με βάση τις μοναδικές ανάγκες του κάθε ασθενούς.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα εργασία αποτελεί μία μελέτη για τη διερεύνηση των 2 κύριων παραλλαγών του γονιδίου *mthfr* ως πιθανούς βιοδείκτες συσχέτισης με την εμφάνιση επιληψίας. Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής έδειξαν ορισμένες πιθανές συσχετίσεις των πολυμορφισμών με την εμφάνιση ασθένειας. Αξιοσημείωτες είναι οι παρακάτω παρατηρήσεις. Εν πρώτοις, υπήρξε αυξημένη συχνότητα του μη φυσιολογικού αλληλομόρφου T, για τον πολυμορφισμό C677T στην ομάδα των ασθενών που εμφάνισαν τα πρώτα επιληπτικά επεισόδια έως τα πρώτα 5 έτη της ζωής τους. Στους ασθενείς το αλληλόμορφο T εμφανίζεται 2.5 φορές συχνότερα, που οδηγεί στο συμπέρασμα πως το μη φυσικό αλληλόμορφο, αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων από 0-5 ετών. Στη συνέχεια, αναφορικά με τον πολυμορφισμό A1298C, το αλληλόμορφο A στην ίδια υπο-ομάδα τείνει να εμφανίζεται συχνότερα στην ομάδα των ασθενών, γεγονός που σημαίνει πως το αλληλόμορφο αυτό εντείνει τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Στη 2η υπο-ομάδα, για τον πολυμορφισμό A1298C, φαίνεται πως ο γονότυπος C:C εμφανίζεται 2.2 φορές συχνότερα σε άτομα στα οποία η επιληψία προκλήθηκε μεταξύ 6-10 ετών. Ενώ για τον πολυμορφισμό C677T, το αλληλόμορφο C φαίνεται να έχει αυξημένη συχνότητα εμφάνισης στους ασθενείς κατά 46%. Συμπερασματικά, αλλάζοντας ηλικιακή ομάδα και καθώς μεταβάλλεται το αναπτυξιακό στάδιο παρατηρούμε πως οι γενετικές παραλλαγές που δημιουργούν την προδιάθεση για εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων αντιστρέφονται. Στην ηλικιακή ομάδα από 6-10 ετών παράγοντα κινδύνου αποτελεί το μη φυσικό αλληλόμορφο του πολυμορφισμού A1298C και το αγρίου τύπου αλληλόμορφο για τον πολυμορφισμό C677T.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τη σύνδεση του ενζύμου MTHFR με σημαντικούς βιοδείκτες όπως η ομοκυστεΐνη και το φυλλικό οξύ, τα οποία επηρεάζονται από την αντι-επιληπτική αγωγή, αποκαλύπτεται η ανάγκη της γνώσης του γενετικού υποβάθρου πριν κανείς προχωρήσει στη χορήγηση αγωγής.

Τα αποτελέσματα της μελέτης υποδεικνύουν πως ενδεχομένως το ένζυμο MTHFR συνδέεται με την εμφάνιση επιληψίας, αποτελώντας παράγοντα κινδύνου κυρίως στην επιληψία πρώιμης ανάπτυξης, δηλαδή κατά την παιδική ηλικία. Η έρευνα αυτή μπορεί να αποτελέσει εφαλτήριο για την περαιτέρω διερεύνηση της συσχέτισης των παραλλαγών αυτών στην εμφάνιση επιληψίας στα συγκεκριμένα ηλικιακά πλαίσια, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η συσχέτιση σε μεγαλύτερο εύρος δείγματος.

### Περιορισμοί μελέτης

Οφείλουμε να σημειώσουμε πως το μέγεθος του δείγματος της παρούσας εργασίας είναι σχετικά μικρό. γεγονός που μπορεί να επηρεάσει την αξιολόγηση γενετικών πολυμορφισμών που απαντώνται σε μειωμένη συχνότητα. Επίσης, ο διαχωρισμός του σε υπο-ομάδες ακόμη μικρότερου πληθυσμού αποτελεί σημαντικό περιοριστικό παράγοντα για την επισφάλεια της μελέτης. Ακόμη, οι ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη ανήκουν στο Νοτιοανατολικό Καυκάσιο πληθυσμό, επομένως τα συμπεράσματα της παρούσας εργασίας ενδεχομένως δεν μπορούν να εφαρμοστούν στο γενικό πληθυσμό. Τέλος θα πρέπει να αναλογιστούμε πως η επιληψία αποτελεί μία πολυπαραγοντική ασθένεια στην οποία συντελούν αρκετοί

γενετικοί, φυσιολογικοί αλλά και περιβαλλοντικοί παράγοντες, οφείλουμε λοιπόν να διερευνήσουμε περαιτέρω τα αποτελέσματα αυτά για την εξαγωγή συμπερασμάτων.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Fisher, R.S.; Acevedo, C.; Arzimanoglou, A.; Bogacz, A.; Cross, J.H.; Elger, C.E.; Engel, J.; Forsgren, L.; French, J.A.; Glynn, M.; et al. ILAE Official Report: A Practical Clinical Definition of Epilepsy. *Epilepsia* **2014**, *55*, 475–482, doi:10.1111/epi.12550.
2. *Rang and Dale's Pharmacology, 7th Edition*; 2013; ISBN 978-960-394-923-7.
3. Σιδηροπούλου, Κ. (2015). Βασικές Αρχές Λειτουργίας Του Νευρικού Συστήματος [Προπτυχιακό Εγχειρίδιο]. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις.  
<https://Dx.Doi.Org/10.57713/Kallipos-549>.
4. Scheffer, I.E.; Berkovic, S.; Capovilla, G.; Connolly, M.B.; French, J.; Guilhoto, L.; Hirsch, E.; Jain, S.; Mathern, G.W.; Moshé, S.L.; et al. ILAE Classification of the Epilepsies: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* **2017**, *58*, 512–521, doi:10.1111/epi.13709.
5. Staley, K. Molecular Mechanisms of Epilepsy. *Nat. Neurosci.* **2015**, *18*, 367–372, doi:10.1038/nn.3947.
6. Sumadewi, K.T.; Harkitasari, S.; Tjandra, D.C. Biomolecular Mechanisms of Epileptic Seizures and Epilepsy: A Review. *Acta Epileptol.* **2023**, *5*, doi:10.1186/s42494-023-00137-0.
7. Thakran, S.; Guin, D.; Singh, P.; Singh, P.; Kukal, S.; Rawat, C.; Yadav, S.; Kushwaha, S.S.; Srivastava, A.K.; Hasija, Y.; et al. *Genetic Landscape of Common Epilepsies: Advancing towards Precision in Treatment*; 2020; Vol. 21; ISBN 9111276622.
8. Steinlein, O.K. Genetic Mechanisms That Underlie Epilepsy. *Nat. Rev. Neurosci.* **2004**, *5*, 400–408, doi:10.1038/nrn1388.
9. Schauwecker, P.E. The Relevance of Individual Genetic Background and Its Role in Animal Models of Epilepsy. *Epilepsy Res.* **2011**, *97*, 1–11, doi:10.1016/j.epilepsyres.2011.09.005.
10. Mullen, S.A.; Berkovic, S.F.; Lowenstein, D.H.; Kato, M.; Cross, H.; Satishchandra, P.; De Jonghe, P.; Goldman, A.; Petrou, S.; Tan, N.C.K.; et al. Genetic Generalized Epilepsies. *Epilepsia* **2018**, *59*, 1148–1153, doi:10.1111/epi.14042.
11. Peljto, A.L.; Barker-Cummings, C.; Vasoli, V.M.; Leibson, C.L.;

- Hauser, W.A.; Buchhalter, J.R.; Ottman, R. Familial Risk of Epilepsy: A Population-Based Study. *Brain* **2014**, *137*, 795–805, doi:10.1093/brain/awt368.
12. Zamponi, G.W.; Lory, P.; Perez-Reyes, E. Role of Voltage-Gated Calcium Channels in Epilepsy. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **2010**, *460*, 395–403, doi:10.1007/s00424-009-0772-x.
  13. Galanopoulou, A.S. Mutations Affecting GABAergic Signaling in Seizures and Epilepsy. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* **2010**, *460*, 505–523, doi:10.1007/s00424-010-0816-2.
  14. Scheffer, I.E.; Bhatia, K.P.; Lopes-Cendes, I.; Fish, D.R.; Marsden, C.D.; Andermann, E.; Andermann, F.; Desbiens, R.; Keene, D.; Cendes, F.; et al. Autosomal Dominant Nocturnal Frontal Lobe Epilepsy. *Brain* **1995**, *118*, 61–73, doi:10.1093/brain/118.1.61.
  15. ΤΣΑΠΑΡΙΔΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ Επιληπτική Κρίση. In *ΘΕΜΑΤΑ ΑΝΑΙΣΘΗΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΝΤΑΤΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ*.
  16. Sankaraneni, R.; Lachhwani, D. Antiepileptic Drugs-a Review. *Pediatr. Ann.* **2015**, *44*, e36–e42, doi:10.3928/00904481-20150203-10.
  17. Löscher, W.; Schmidt, D. Modern Antiepileptic Drug Development Has Failed to Deliver: Ways out of the Current Dilemma. *Epilepsia* **2011**, *52*, 657–678, doi:10.1111/j.1528-1167.2011.03024.x.
  18. Jensen, J.P.A. The Rise and Fall of Borax as an Antiepileptic Drug. *Arch. Neurol.* **2006**, *63*, 621–622, doi:10.1001/archneur.63.4.621.
  19. Brodie, M.J.; Kwan, P. Current Position of Phenobarbital in Epilepsy and Its Future. *Epilepsia* **2012**, *53 Suppl 8*, 40–46, doi:10.1111/epi.12027.
  20. Kale, R.; Perucca, E. Revisiting Phenobarbital for Epilepsy. *Br. Med. J.* **2004**, *329*, 1199–1200, doi:10.1136/bmj.329.7476.1199.
  21. Nelson, A.C.; Kaucher, K.A.; Sankoff, J.; Mintzer, D.; Taub, J.; Kehoe, J. Incorporating Phenobarbital into Your Symptom-Based Benzodiazepine Alcohol Withdrawal Protocol in the Emergency Department. *Am. J. Emerg. Med.* **2018**, *36*, 2120–2121, doi:10.1016/j.ajem.2018.03.049.
  22. Patocka, J.; Wu, Q.; Nepovimova, E.; Kuca, K. Phenytoin – An Anti-Seizure Drug: Overview of Its Chemistry, Pharmacology and

- Toxicology. *Food Chem. Toxicol.* **2020**, *142*, 111393, doi:10.1016/j.fct.2020.111393.
23. Keppel Hesselink, J.M. Phenytoin: A Step by Step Insight into Its Multiple Mechanisms of Action—80 Years of Mechanistic Studies in Neuropharmacology. *J. Neurol.* **2017**, *264*, 2043–2047, doi:10.1007/s00415-017-8465-4.
  24. Urzì Brancati, V.; Pinto Vraca, T.; Minutoli, L.; Pallio, G. Polymorphisms Affecting the Response to Novel Antiepileptic Drugs. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, doi:10.3390/ijms24032535.
  25. Zhao, Y.; Wang, Z.; Dai, J.; Chen, L.; Huang, Y.; Zhan, Z. Beneficial Effects of Benzodiazepine Diazepam on Chronic Stress-Induced Impairment of Hippocampal Structural Plasticity and Depression-like Behavior in Mice. *Behav. Brain Res.* **2012**, *228*, 339–350, doi:10.1016/j.bbr.2011.12.013.
  26. Munisamy, M.; Al-Gahtany, M.; Tripathi, M.; Subbiah, V. Impact of MTHFR (C677T) Gene Polymorphism on Antiepileptic Drug Monotherapy in North Indian Epileptic Population. *Ann. Saudi Med.* **2015**, *35*, 51–57, doi:10.5144/0256-4947.2015.51.
  27. Vilaseca, M.A.; Monrós, E.; Artuch, R.; Colomé, C.; Farré, C.; Valls, C.; Cardo, E.; Pineda, M. Anti-Epileptic Drug Treatment in Children: Hyperhomocysteinaemia, B-Vitamins and the 677C → T Mutation of the Methylene tetrahydrofolate Reductase Gene. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* **2000**, *4*, 269–277, doi:10.1053/ejpn.2000.0379.
  28. Zhu, S.; Ni, G.; Sui, L.; Zhao, Y.; Zhang, X.; Dai, Q.; Chen, A.; Lin, W.; Li, Y.; Huang, M.; et al. Genetic Polymorphisms in Enzymes Involved in One-Carbon Metabolism and Anti-Epileptic Drug Monotherapy on Homocysteine Metabolism in Patients With Epilepsy. *Front. Neurol.* **2021**, *12*, 1–8, doi:10.3389/fneur.2021.683275.
  29. Jacob, S.; Nair, A.B. An Updated Overview on Therapeutic Drug Monitoring of Recent Antiepileptic Drugs. *Drugs R D* **2016**, *16*, 303–316, doi:10.1007/s40268-016-0148-6.
  30. Fattore, C.; Perucca, E. Novel Medications for Epilepsy. *Drugs* **2011**, *71*, 2151–2178, doi:10.2165/11594640-000000000-00000.
  31. Cramer, J.A.; Mintzer, S.; Wheless, J.; Mattson, R.H. Adverse Effects of Antiepileptic Drugs: A Brief Overview of Important Issues. *Expert Rev. Neurother.* **2010**, *10*, 885–891, doi:10.1586/ern.10.71.



32. Perucca, P.; Gilliam, F.G. Adverse Effects of Antiepileptic Drugs. *Lancet Neurol.* **2012**, *11*, 792–802, doi:10.1016/S1474-4422(12)70153-9.
33. Toledano, R.; Gil-Nagel, A. Adverse Effects of Antiepileptic Drugs. *Semin. Neurol.* **2008**, *28*, 317–327, doi:10.1055/s-2008-1079336.
34. Goyette, P.; Pai, A.; Milos, R.; Frosst, P.; Tran, P.; Chen, Z.; Chan, M.; Rozen, R. Gene Structure of Human and Mouse Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR). *Mamm. Genome* **1998**, *9*, 652–656, doi:10.1007/s003359900838.
35. Savojardo, C.; Babbi, G.; Baldazzi, D.; Martelli, P.L.; Casadio, R. A Glance into Mthfr Deficiency at a Molecular Level. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1–9, doi:10.3390/ijms23010167.
36. Schwahn, B.; Rozen, R. Polymorphisms in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene: Clinical Consequences. *Am. J. Pharmacogenomics* **2001**, *1*, 189–201, doi:10.2165/00129785-200101030-00004.
37. Levin, B.L.; Varga, E. MTHFR: Addressing Genetic Counseling Dilemmas Using Evidence-Based Literature. *J. Genet. Couns.* **2016**, *25*, 901–911, doi:10.1007/s10897-016-9956-7.
38. Li, Y.; Qiu, S.; Shi, J.; Guo, Y.; Li, Z.; Cheng, Y.; Liu, Y. Association between MTHFR C677T/A1298C and Susceptibility to Autism Spectrum Disorders: A Meta-Analysis. *BMC Pediatr.* **2020**, *20*, 449, doi:10.1186/s12887-020-02330-3.
39. Graydon, J.S.; Claudio, K.; Baker, S.; Kocherla, M.; Ferreira, M.; Roche-Lima, A.; Rodríguez-Maldonado, J.; Duconge, J.; Rúaño, G. Ethnogeographic Prevalence and Implications of the 677C>T and 1298A>C MTHFR Polymorphisms in US Primary Care Populations. *Biomark. Med.* **2019**, *13*, 649–661, doi:10.2217/bmm-2018-0392.
40. Liew, S.C.; Gupta, E. The Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T Polymorphism: Epidemiology, Metabolism and the Associated Diseases. *Eur. J. Med. Genet.* **2015**, *58*, 1–10, doi:10.1016/j.ejmg.2014.10.004.
41. Sarecka-Hujar, B. Is There a Relation between 677c>t Polymorphism in the Mthfr Gene and the Susceptibility to Epilepsy in Young Patients? A Meta-Analysis. *Brain Sci.* **2021**, *11*, doi:10.3390/brainsci11101327.

42. Froese, D.S.; Kopec, J.; Rembeza, E.; Bezerra, G.A.; Oberholzer, A.E.; Suormala, T.; Lutz, S.; Chalk, R.; Borkowska, O.; Baumgartner, M.R.; et al. Structural Basis for the Regulation of Human 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase by Phosphorylation and S-Adenosylmethionine Inhibition. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–13, doi:10.1038/s41467-018-04735-2.
43. Dong, X.; Wang, J.; Wang, G.; Wang, J.; Wang, L.; Du, Y. MTHFR A1298C Gene Polymorphism on Stroke Risk: An Updated Meta-Analysis. *Genes Environ.* **2021**, *43*, 1–11, doi:10.1186/s41021-021-00208-z.
44. Raghubeer, S.; Matsha, T.E. Methylenetetrahydrofolate (MTHFR), the One-Carbon Cycle, and Cardiovascular Risks. **2021**.
45. Cho, K.; Amin, Z.M.; An, J.; Rambaran, K.A.; Johnson, T.B.; Alzghari, S.K. Methylenetetrahydrofolate Reductase A1298C Polymorphism and Major Depressive Disorder. *Cureus* **2017**, *9*, 1–8, doi:10.7759/cureus.1734.
46. Wu, Y. Le; Yang, H.Y.; Ding, X.X.; Zhao, X.; Chen, J.; Bi, P.; Sun, Y.H. Association between Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism and Epilepsy Susceptibility: A Meta-Analysis. *Seizure* **2014**, *23*, 411–416, doi:10.1016/j.seizure.2014.01.018.