

Polimorfizam apolipoproteina E u djece s epilepsijom

Kukuruzović, Monika

Doctoral thesis / Disertacija

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Dental Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:127:961123>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial 3.0 Unported / Imenovanje-Nekomercijalno 3.0](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

[University of Zagreb School of Dental Medicine
Repository](#)





Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Monika Kukuruzović

Polimorfizam apolipoproteina E u djece s epilepsijom

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2019.



Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Monika Kukuruzović

Polimorfizam apolipoproteina E u djece s epilepsijom

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Prof.dr.sc.Vanja Bašić Kes

Izv.prof.dr.sc.Maša Malenica

Zagreb, 2019.



University of Zagreb

School of Dental Medicine

Monika Kukuruzović

Polymorphism of apolipoprotein E in children with epilepsy

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Prof.dr.sc.Vanja Bašić Kes

Assoc.prof.dr.sc.Maša Malenica

Zagreb, 2019.

Doktorska disertacija je izrađena u Klinici za pedijatriju, Kliničkog bolničkog centra "Sestre milosrdnice" i u Kliničkom zavodu za kemiju, Kliničkog bolničkog centra "Sestre milosrdnice".

Naziv poslijediplomskog doktorskog studija: Dentalna medicina

Mentor rada: prof. dr. sc. Vanja Bašić Kes, dr.med., KBC Sestre milosrdnice; Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Komentor rada: izv. prof. dr. sc. Maše Malenice, dr.med., KBC Sestre milosrdnice, Učiteljski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Lektor hrvatskog jezika: doc. dr. sc. Katarina Aladrović Slovaček, profesor hrvatskog jezika i književnosti i sociologije

Lektor engleskog jezika: Anita Mazej, profesor engleskog jezika

Sastav Povjerenstva za ocjenu doktorskog rada:

1. prof. dr. sc. Arijana Lovrenčić-Huzjan, predsjednica
2. prof. dr. sc. Zlatko Trkanjec, član
3. izv. prof. dr. sc. Milivoj Jovančević, član
4. prof. dr. sc. Neven Ljubičić, član
5. prof. dr. sc. Hrvoje Jurić, član

Sastav Povjerenstva za obranu doktorskog rada:

1. prof. dr. sc. Arijana Lovrenčić-Huzjan, predsjednica
2. prof. dr. sc. Zlatko Trkanjec, član
3. izv. prof. dr. sc. Milivoj Jovančević, član
4. prof. dr. sc. Neven Ljubičić, član
5. prof. dr. sc. Hrvoje Jurić, član

Datum obrane rada: 25. listopada 2019.

Rad sadrži: 106 stranica

24 tablice

12 slika

Zahvaljujem se mentoricama prof. dr. sc. Vanji Bašić Kes, dr. med. i prof. dr. sc. Maši Malenici, dr. med. na edukaciji, pomoći i savjetima tijekom pisanja rada.

Hvala prof. dr. sc. Ljerki Cvitanović-Šojat, dr. med. na ideji i pomoći oko prikupljanja podataka i doc. dr. sc. Mariu Štefanoviću i prof. dr. sc. Nadi Vrkić na izvođenju molekulskih analiza, edukaciji i svim savjetima.

Hvala cijelom timu medicinskih sestara koje su pomogle u prikupljanju podataka.

Hvala mojoj obitelji na podršci i razumijevanju

SAŽETAK

Dijagnostička ispitivanja (laboratorijski nalazi, elektroencefalogram (EEG) i slikovne pretrage glave) trebaju dopuniti anamnestičke podatke i potvrditi kliničku sumnju na epilepsiju, međutim, vjerujemo da i neki drugi biomarkeri pomažu u ranom dijagnosticiranju epilepsije što dovodi i do pravovremenog započinjanja liječenja te u konačnici moguće bolje kvalitete života. Apolipoprotein E kao biomarker sudjeluje u mnogim metaboličkim procesima u mozgu te obzirom na plastičnost mozga u dječjoj dobi mogao bi imati veliku ulogu kod djece s epilepsijom. Glavni ciljevi ovog istraživanja su utvrditi postoji li razlika u pojedinoj vrsti i podvrsti epilepsije ovisno o polimorfizmu gena APOE kod djeteta. Udjeli polimorfizama APOE gena u skladu su s podacima iz europskih istraživanja gdje je genotip e3/e3 podjednako raspoređen u djece oboljele od epilepsije kao i u općoj populaciji. U osoba s polimorfizmom APOE očekivalo bi se raniji početak i teža klinička slika bolesti. Drugi čimbenici, kao što su dob početka napadaja, učestalost napadaja, utjecaj na neuromotorni razvoj i kasnije način života su važniji za predviđanje tijeka bolesti. Kod postavljanja dijagnoze i klasificiranja bolesti nije potrebno koristiti genotipizaciju APOE kod pacijenata s epilepsijom.

Ključne riječi: Apolipoprotein E, polimorfizam gena, djeca s epilepsijom, plastičnost mozga

ABSTRACT

Diagnostic examinations (laboratory findings, electroencephalogram (EEG) and neuro imaging techniques) should complete the medical history and confirm the clinical suspicion of epilepsy. However, we believe that some other biomarkers also help early diagnosis of epilepsy which enables timely initiation of treatment and finally, the possibility of better life quality. Apolipoprotein E as a biomarker takes part in many metabolic processes in the brain and, therefore, considering the plasticity of the brain in children, it could play an important role in children suffering from epilepsy. The main goal of this research is to determine whether there is a difference between particular types and sub-types of epilepsy depending on the APOE gene polymorphism in children. The shares of APOE gene polymorphisms are compliant with the data of European studies showing that the e3/e3 genotype is equally distributed in children suffering from epilepsy and general population. The earlier onset and more severe clinical picture of the disease are expected in persons with APOE polymorphism. Other factors, such as the age at seizure onset, seizure frequency, impact on neuromotor development and later on the lifestyle are more important for predicting the course of the disease. When diagnosing and classifying epilepsy it is not necessary to use the APOE genotyping.

Key words: Apolipoprotein E, gene polymorphism, children with epilepsy, brain plasticity

Polymorphism of apolipoprotein E in children with epilepsy

Background: Epilepsy is a chronic disorder of the brain function with different aetiologies, characterized by recurrent seizures caused by excessive electrical discharges and various clinical features and laboratory findings. Approximately 50 million people worldwide have epilepsy. Epilepsy has a prevalent occurrence in childhood, since 60% of all patients suffering from epilepsy are children under the age of 16. During the history, the classification of epilepsy has greatly changed, a universal opinion not being formed to the present day. We still use the classification system by the International League against Epilepsy (ILAE) from 1989, which is compatible with the International statistical classification of diseases and related health problems - 10th revision, officially in use by Croatian Institute for Health Insurance. According to aetiology, epilepsy can be classified as idiopathic (possibly hereditary, no neuro-radiologically visible neuroanatomic or pathologic abnormalities, no clearly defined genetic basis), symptomatic (secondary epilepsy, acquired or with confirmed brain lesion associated with anatomic and pathologic changes) and cryptogenic (symptomatic epilepsy is suspected, but no brain lesion has been confirmed). In symptomatic epilepsy a cause can be identified and a specific treatment can be applied, while in idiopathic epilepsy no definitive cause can be found. Epileptic seizures are the result of an abnormal and excessive activity and interaction of excitatory and inhibitory inputs from a number of neurons. This can lead to developmental abnormalities due to changes in distribution, transport and movement of ions. All above-mentioned processes can be regulated by apolipoprotein E (APOE). Therefore, it is possible that APOE plays an important role in occurrence and maintenance of epileptic seizures.

APOE is a glycoprotein engaged in transport and metabolism of lipids in the entire body. It appears in three isoforms $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$. APOE $\epsilon 3$ allele is the most common (70%-80%), followed by APOE $\epsilon 4$ (10%-15%) and APOE $\epsilon 2$ (5%-10%). The APOE gene in humans is localized at 19q 13.2. Apart from the liver, which is the main organ for plasma lipoprotein synthesis, APOE is also synthesized in astrocytes and microglia of the brain. In the brain, it takes part in cholesterol distribution during repair, growth and myelination of the nerve cell membrane during the development and aging. Hence, it plays an important role not only in brain injuries, either ischaemic or traumatic, but also during epileptic seizures.

The studies published so far have described the connection between APOE isoforms and their plasma concentration with the occurrence of neurodegenerative diseases, especially Alzheimer's disease. The analysis of the APOE alleles in the patients suffering from Alzheimer's disease showed a significant correlation between APOE allele type 4 and the

development of Alzheimer's disease. An important connection of APOE polymorphism and the outcome of head injury has been reported, with patients carrying APOE ϵ 4 more likely to have unfavourable outcome 6 months after the head injury as opposed to patients with other isoforms of APOE. The authors studying the connection between epilepsy and APOE have found the connection between APOE and an early onset of temporal lobe epilepsy, as well as a higher risk for occurrence of late post-traumatic seizures. However, no previous study in children with different epilepsy aetiology has been published so far. The epilepsy in children usually involves genetic/hereditary, unknown, metabolic and structural changes in the brain, while the acquired conditions, such as head trauma, infection and cerebral stroke are rarely the cause. Considering the participation of apolipoprotein in the brain function and the plasticity of a juvenile brain, we examined the apolipoprotein genotype in childhood epilepsy patients in order to get earlier diagnosis and better therapeutic result.

Aim of this study was to establish relationship between apolipoprotein E polymorphism and epilepsy in children. Hypothesis of the study was: Polymorphism of the apolipoprotein E has an effect on the type of epilepsy in children.

Material and methods: The study is retrospective and prospective, with retrospective data retrieved from medical charts. The study included 254 children aged 0 months to 18 years, divided into two groups: an epilepsy group consisting of 111 children with the diagnosed condition and an age and sex matched control group consisting of 143 children who were observed at our department due to signs and symptoms other than epilepsy (e.g. vertigo, headache, syncope). The study was conducted in the Department of Paediatric Neurology at the Paediatric clinic in the University Hospital Centre Sestre milosrdnice from October 2011 to January 2017. The patients underwent a complete neurological examination. The classification of epilepsy was done according to the criteria recommended by the International League against Epilepsy in 1989.

The study was approved by the local hospital Ethical Committee and performed in accordance with the Helsinki declaration. The informed consent was signed by parents, or legal guardians of the children.

Peripheral blood was collected from all children. The collected blood samples were processed in the Clinical Department for Chemistry of the University Hospital Centre Sestre milosrdnice where the genotyping of APOE and the blood lipid profile were done.

The blood samples (5-7mL) were collected in Vacutainer® tubes (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA) with EDTA. Until DNA isolation, they were kept at -20°C and were analysed within a month.

The leukocyte DNA for genotyping was isolated by the standard salting-out method. The mutation detection kit contained all classic components of the PCR reaction (dNTP, Mg²⁺, polymerase, primers, reaction buffer) and fluorescent probes complementary to the DNA segment located close to the polymorphism. The genotype detection is based on the melting curve analysis. The probes were perfectly complementary either to the wild-type sample or the sample with polymorphism. A computer programme translates the signal to the curve with the maximum at the melting temperature based on which the genotype is identified.

Plasma concentrations of cholesterol (total cholesterol, HDL and LDL) and triglycerides were determined from peripheral blood samples collected from all subjects using standard clinical practice after 18 hours of fasting. Serum was obtained from whole blood without addition of anticoagulants (manufacturers of vacuum tubes Greiner Bio-One, Austria) following centrifugation for 15 min at 3500 rev / min. The instrument, or automatic analyser which analyses can be AU2700 (Beckman, USA) or the Architect c8000 (Abbott, USA), depending whether you have the results before or after 2014. By July 2014, we have worked to Beckman, and since then until today at Abbott. Standard reference range for plasma lipid concentrations were used to determine whether a patient has a low (below or within the reference interval values) or high (above the reference interval values) concentration of every biochemical parameter tested. Reference values were as follows: total cholesterol ≤ 5 mmol/L, HDL ≥ 1 mmol/L for females and for $\geq 1,2$ mmol/L males, LDL ≤ 3 mmol/L; triglycerides ≤ 2 mmol/L. Descriptive statistics are represented by the corresponding proportions and absolute frequencies for the category variables, while the continuous values are displayed through the corresponding media and interquartile ranges. Differences in categorical values were analyzed by χ^2 test, that is, by Fisher-Freeman-Halton's exact test in cases where there were less than 5 subjects per cell. The calculation of Hardy-Weinberg equilibrium for multiple polymorphisms of APOE was made according to the instructions on the web page <http://www.bio.miami.edu/dana/dox/trinomial.html> or via formula $p^2 + 2pq + q^2 + 2pr + 2qr + r^2 = 1.0$ and were compared with the χ^2 test using the data obtained. The differences in the continuous (numerical) values that were bound were analyzed by Mann-Whitney U, Kruskal-Wallis test (when there were more than two comparative groups).

Significant differences are shown in Box and Whisker plotting (standard view: values above the smallest value, 25 centiles, median, 75 centiles, highest value). Outliers (external values on Box and Whisker plot) are defined as values that deviate at least 1.5 interquartile ranges. P values < 0.05 were considered significant. The statistical analysis was done using SPSS Version 25 (IBM SPSS Statistics, New York, USA).

Results: There were 50,3% boys in control group and 45,9% boys in experimental group and 49,7% girls in control group and 54,1% girls in experimental group. The highest proportion of alleles belonged to e3/e3 (50.0% to 62.9%) as wild type while alleles e2/e2 and e4/e4 were 20-25 times smaller in size. There was no statistically significantly difference in the distribution of the individual APOE polymorphisms associated with focal, generalized and unclassified type of epilepsy (P = 0.529). Differences in distribution of the individual APOE gene polymorphisms depending on the epilepsy subtype (focal idiopathic or symptomatic, generalized idiopathic or symptomatic, epileptic syndrome, unclassified) did not show significant differences (P = 0.554) neither did the distribution depending on symptomatic or idiopathic subtype of epilepsy (P = 0.687). There was no significant difference in the observed and expected APOE genotype frequency between the patients with epilepsy and the control group (P = 0.834) and it can be argued that the APOE gene polymorphism is equally distributed in children suffering from epilepsy as well as in the general population. However, there was a statistically significant difference in concentrations of total plasma cholesterol and LDL cholesterol between those groups. The subjects in the control group had higher cholesterol (control group 57,3 % experimental group 35,1%; P<0,01) and LDL levels (control group 40,6% experimental group 21,6%; P<0,01). Looking at the difference in the age of epilepsy onset depending on the child's genotype there was no significant difference P = 0.965.

The difference in total cholesterol and LDL cholesterol depending on the child's genotype did not show significant differences, but analysed as continuous variables of lipidogram there was a significant difference in the level of LDL (highest in polymorphism e2/e4 (P = 0.020)).

The genotype showed a correlation to plasma LDL levels (p=0.02). Depending on the genotype or using medications there was no statistically significant difference in disease control.

Conclusion: our research showed that polymorphisms of apolipoprotein E cannot be strongly correlated to occurrence of epilepsy nor to a type of epilepsy in children and, therefore, these variables cannot be a predictive factor for the outcome of the disease.

Key words: Apolipoprotein E, gene polymorphism, children with epilepsy, brain plasticity

SADRŽAJ

1. UVOD

| | |
|--|----|
| 1.1. EPILEPSIJA | 1 |
| 1.1.1. Definicija epilepsije | 1 |
| 1.1.2. Epidemiologija epilepsije | 1 |
| 1.1.3. Povijest epilepsija | 2 |
| 1.1.4. Podjela epilepsije | 4 |
| 1.1.5. Međunarodna klasifikacija epileptičkih napad (Nova) | 5 |
| 1.1.6.1. Međunarodna klasifikacija epileptičkih napada (Stara) | 6 |
| 1.1.6.2. Međunarodna klasifikacija epileptičkih napada (Stara) | 7 |
| 1.1.7. Patofiziologija epilepsija | 10 |
| 1.1.8. Postavljanje dijagnoze epilepsije | 11 |
| 1.1.9. Liječenje epilepsije | 15 |
| 1.1.9.1. Interakcija među lijekovima | 19 |
| 1.2. APOLIPOROTEINI | 22 |
| 1.2.1. Apolipoproteini A, B, C | 23 |
| 1.2.2. Apolipoprotein E | 24 |
| 1.3. ULOGA APOE I POJEDINIH ALELA | 28 |
| 1.3.1. APO e2 | 28 |
| 1.3.2. APO e3 | 29 |
| 1.3.3. APO e4 | 29 |
| 1.4. ULOGA APOE U EPILEPSIJI | 31 |
| 1.5. ULOGA APOE KOD DJECE | 33 |
| 1.6. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA | 35 |

2. MATERIJAL I METODE

| | |
|---|----|
| 2.1. OPIS ISPITANIKA | 36 |
| 2.1.1. Skupina bolesnika | 36 |
| 2.1.2. Karakteristike bolesnika | 37 |
| 2.1.3. Dijagnoze bolesnika koji su sudjelovali u istraživanju | 37 |
| 2.2. GENOTIPIZACIJA | 38 |
| 2.2.1. Izolacija DNK | 38 |
| 2.2.2. Genotipizacija APOE | 39 |
| 2.3. STATISTIČKA OBRADA | 44 |
| 3. REZULTATI | |
| 3.1. PRIMARNI CILJEVI | 46 |
| 3.1.1. Razlika u pojedinoj vrsti epilepsije ovisno o polimorfizmu gena APOE kod djeteta | 46 |
| 3.1.2. Razlika u pojedinoj podvrsti epilepsije ovisno o polimorfizmu gena APOE kod djeteta | 47 |
| 3.2. SEKUNDARNI CILJEVI | 52 |
| 3.2.1. Razlika u zastupljenosti APOE te ukupnom kolesterolu u eksperimentalnoj i kontrolnoj skupini | 52 |
| 3.2.1.1. Postoji li razlika u zastupljenosti apolipoproteina E u ispitivanoj i Kontrolnoj skupini | 52 |
| 3.2.2.2. Postoji li razlika u zastupljenosti ukupnog i LDL kolesterola u ispitivanoj i kontrolnoj skupini | 53 |
| 3.2.2. Razlika u dobi početka bolesti ovisno o genotipu djeteta | 58 |
| 3.2.3. Razlika u ukupnom kolesterolu i LDL kolesterolu ovisno o vrsti epilepsije kod djece | 59 |
| 3.2.4. Razlika u ukupnom kolesterolu i LDL kolesterolu ovisno o genotipu | |

| | |
|---|-----|
| djeteta | 61 |
| 3.2.5. Razlika u kontroli bolesti ovisno o genotipu koji dijete ima | 64 |
| 3.2.6. Razlika u kontroli bolesti ovisno o primijenjenoj terapiji | 66 |
| 4. RASPRAVA | 68 |
| 5. ZAKLJUČCI | 84 |
| 6. LITERATURA | 85 |
| 7. PRILOZI | 102 |
| 8. ŽIVOTOPIS | 104 |

POPIS KRATICA

A β (amyloid beta) - beta amilod

AEL - antiepileptički lijek

AHS - akutni hepatalni sindrom

APO - apolipoprotein

ASO (od engl. Antistreptolysin O titer) - antistreptolizinski titar

ASTA - antistafilolizinska antitijela

AZM- acetazolamid

BERA (od engl. brainstem evoked response audiometry) - slušni evocirani potencijali moždanog debla

BMI (od engl. Body mass index) – indeks tjelesne mase

BRV - brivaracetam

BZD - benzodiazepini

CBD - kanabidiol

CBF (od engl. cerebral blood flow) - cerebralni krvni protok

CBZ - karbamazepin

CNZ - klonazepam

CLB - klobazam

CT (od engl. Computed tomography) - kompjutorizirana tomografija

CYPs (od engl. Cytochromes P450) - citokrom P450

DNK - deoksiribonukleinska kiselina

DZP - diazepam

EEG (od engl. Electroencephalography) - elektroencefalografija

ENG - elektronistagmogram

ERG - elektroretinogram

ESC ili ESX - etosuksimid

ESL - eslikarbazepin acetat

FBM - felbamat

GABA (od engl. gamma-Aminobutyric acid) - gama-aminobutiratna kiselina

GBP - gabapentin

GT- glukoroniltransferaza

IDL (od engl. Intermediate Density Lipoprotein) - lipoprotein srednje gustoće

ILAE-a (International League Against Epilepsy) - Internacionalna liga protiv epilepsije

HDL (od engl. High Density Lipoprotein) - lipoprotein visoke gustoće

LCAT (od engl. Lecithin-cholesterol acyltransferase) - lecitin kolesterolacil-transferaza

LCM - lakozamid

LDL (od engl. Low Density Lipoprotein) - lipoprotein male gustoće

LEV - levetiracetam

LP - lumbalna punkcija

LTG - lamotrigin

LZP - lorazepam

MDZ - midazolam

MRI (od engl. Magnetic resonance imaging) - magnetna rezonanca

MS - multipla skleroza

MTLE - HS (od engl. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis) - mezijalna temporolobarna epilepsija s hipokampalnom sklerozom

ORL - otorinolaringologija

OXC - okskarbazepin

PB - fenobarbital

PDS (od engl. paroxysmal depolarizing shift) - paroksizmalni depolarizacijski pomak

PER- perampanel

PET (od engl. Positron emission tomography) - pozitronska emisijska tomografija

PGB - pregabalin

PHT - fenitoin

Pr.Kr. - prije Krista

PRM - primidon

RGB - retigabin

RUF - rufinamid

SPECT (od engl. Single photon emission computed tomography) - jednofotonska emisijska kompjutorizirana tomografija

STP - stiripentol

SV2A (od engl. Synaptic vesicle glycoprotein) - sinaptički glikoprotein

SUDEP (od engl. Sudden Unexpected Death in Epilepsy) - iznenadna neočekivana smrt od epilepsije

SŽS – središnji živčani sustav

TGB - tiagabin

TPM - topiramet

VEP - vidni evocirani potencijali

VGB - vigabatrin

VLDL (od engl. Very Low Density Lipoprotein) - lipoprotein vrlo male gustoće

VPA - valproat

WISC (od engl. Wechsler Intelligence Scale for Children) - Wechsler test inteligencije za djecu

WPPSI (od engl. Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence) - Wechsler test inteligencije za djecu predškolske i školske dobi

ZNS - zonisamid

1. UVOD

1.1. EPILEPSIJA

1.1.1. Definicija epilepsije

Prema novim smjernicama ILAE-a (International League Against Epilepsy) iz 2015.g., epilepsija je bolest mozga određena bilo kojim od sljedećih stanja: a) dva neprovocirana napadaja koji se pojavljuju u razmaku većem od 24h; b) jedan neprovocirani napadaj i vjerojatnost pojave sljedećih napadaja sličan općem ponavljajućem riziku (najmanje 60%) nakon dva neprovocirana napadaja u razdoblju 10 godina; c) dijagnoza epileptičkog sindroma.

Epileptički napadaj je klinički simptom koji nastaje nakon abnormalne aktivnosti grupe neurona koja se očituje kao iznenadna ponavljajuća epizoda motornih, osjetnih ili autonomnih abnormalnosti i eventualni poremećaj svijesti i ponašanja. Epilepsija ne mora biti bolest za cijeli život. Smatra se da je kod osoba, koje su 10 godina bez pojave napada i pri tome 5 godina bez antiepileptičke terapije ili koje su prošle dob vezanu za pojavu sindroma, epilepsija „riješena“ (1).

1.1.2. Epidemiologija epilepsije

Na svijetu oko 50 milijuna stanovnika trenutno ima epilepsiju, od čega 80% živi u srednje i slabo razvijenim zemljama. Prevalencija epilepsije je 4-10/1000 stanovnika, s godišnjom incidencijom od 30 do 50/100000 stanovnika u razvijenim zemljama, što je otprilike upola manje od pojavnosti epilepsije u nerazvijenim zemljama. U nerazvijenim zemljama veća je učestalost, najvjerojatnije kao posljedica većeg rizika endemskih zaraznih bolesti i značajno većeg broja prometnih nesreća kao i peri/prenatalnih komplikacija te slabije zdravstvene zaštite. Na ukupnoj svjetskoj populaciji moguće je da će 5 – 10% ljudi imati epileptički napadaj, a od njih će 30% razviti epilepsiju. Od ukupnog broja oboljelih oko 70% imat će dobar odgovor na medikamentoznu terapiju.

U Europi oko 900.000 djece od 0 do 19 godina ima epilepsiju (2, 3). Prema epidemiološkoj studiji provedenoj 2007. godine prevalencija aktivne epilepsije u Hrvatskoj je 4,8 - 5,5/1000, dok je među djecom od 0 do 7 godina 3,5/1000. Godišnja incidencija je od 0,04 do 0,05% te

ona ovisi o dobi, s velikim brojem pojavljivanja u ranom djetinstvu, od 0,75%. Sljedeća velika incidencija je nakon 65 godine života (4).

1.1.3. Povijest epilepsije

Epilepsija je jedna od najstarijih bolesti o čemu govore brojni medicinski zapisi. Osnovni koncepti u vezi s epilepsijom pojavljuju se u staroj indijskoj medicini tijekom razdoblja Veda od 4500 do 1500 godina prije nove ere. Najstariji zapis epileptičkog napadaja zapisan je na akademskom jeziku u staroj Mezopotamiji oko 2000. prije Krista (pr. Kr) (5). U tom zapisu osobi je "dijagnosticiran" utjecaj boga mjeseca te je podvrgnuta egzorcizmu. Slični zapisi pronađeni su i u Hamurabijevom zakoniku (otprilike 1790. pr. Kr.) gdje se navodi kako je zbog epilepsije kupljeni rob mogao biti vraćen uz povrat novca (6). Dokazi babilonskih zapisa o epilepsiji nalaze se na ploči u Britanskom muzeju u Londonu na kojoj su isjecci Babilonske knjige medicine iz 2000. godine pr. Kr. koji su povezivali napadaje s opsjednutošću zlim duhovima te je i liječenje većinom bilo duhovnog karaktera (7).

Stari Grci su u početku smatrali da je bolest opsjednutost duhovima, ali kasnije su vjerovali da je bolest nešto božansko. Epilepsija se pojavljuje u grčkoj mitologiji kao oblik božje kazne. Božica Mjeseca Selena i božica Artemida kažnjavale su epileptičnim napadajima one koji su ih razgnjevili. Grci su vjerovali da su Julije Cezar i Heraklo bolovali od epilepsije. 400 g. pr. Kr. grčki liječnik Hipokrat (otac medicine) prvi je napisao knjigu o epilepsiji "O svetoj bolesti". Odbijajući tvrdnju da je epilepsija prokletstvo ili vidovnjačka moć, Hipokrat je prvi naziva bolesti mozga te predlaže fizičko liječenje, a u slučaju da bolest postane kronična, smatrao ju je neizlječivom (8, 9).

Stari Rimljani su epilepsiju nazivali Morbus comitialis ("bolest skupština") i smatrali su je božjim prokletstvom te su smatrali da epilepsija dolazi od demona i da je zarazna bolest koju epileptičari prenose dodiranjem ili dahom (10). Mnoge religije također su osobe s epilepsijom smatrale „opsjednutima“. Jedan od zapisa nalazi se u Bibliji, u Markovom evanđelju gdje se spominje dijete koje ima kloničko-toničke grčeve, a uzrok je opsjednutost „duhom gluhoće“. Ova priča dovela je do uvjerenja da je epilepsija uzrokovana „nečistim gluhim i nijemim duhom“. U Italiji je tradicionalno bila poznata pod nazivom „bolest svetog Valentina“ (11).

Razdoblje renesanse predstavlja novi pogled prema epilepsiji. Liječnici i svećenici počinju sumnjati u mogućnost opsjednutosti. Smatra se da su uzrok epilepsiji različite kemijske pare koje uništavaju mozak ili neka druga stanja, kao što je ozljeda mozga ili sifilis. Također se smatralo da su izuzetno pametni jer su neki od rimskih velikana, uključujući Julija Cezara i Petraraku, bolovali od epilepsije. No, u običnog naroda epilepsija je svejedno bila teška bolest (5). Počekom 18. stoljeća javlja se ideja da je epilepsija idiopatska bolest koja potječe od mozga ili nekog drugog unutarnjeg organa (jetra). William Cullen (1710. –1790.) i Samuel A. Tissot posebno su zaslužni za tu promjenu i za temelje moderne epileptologije (12, 13).

1857.g. Sir Lock otkrio je antikonvulzivnu važnost kalijeva bromida i počeo ga je primjenjivati kod svojih pacijenata (14). Tijekom razdoblja 18. i 19. stoljeća, eksperimentalna istraživanja dovela su do napretka u patologiji bolesti i povezanosti epilepsije s različitim psihijatrijskim simptomima. U to vrijeme posebno se ističe rad Johna Hughlings Jacksona, neurologa iz Londona, koji zagovora tezu da je epilepsija rezultat iznenadnih kratkih elektro-kemijskih izbijanja u mozgu. On također predstavlja ideju da tip epilepsije ovisi o lokaciji i funkciji mjesta tih izbijanja te njegova učenja predstavljaju temelj nizozemskim, njemačkim, engleskim i francuskim liječnicima koji su razvili znanstveni temelj epilepsije (15).

Početak 20. stoljeća španjolski patolog i neurolog Cajal napravio je važan napredak u području mikroskopske strukture mozga i živčanog sustava opisavši strukturu neurona i sinapsi, što je značajan nalaz u povijesti neurologije. Tijekom 1920. Lennox (1884. – 1960.) i Cobb (1887. – 1968.) proučavali su učinke gladi i započeta je primjena ketogene dijeta (5).

James Kiffin Penry (1929. – 1996.) napravio je niz radova o osnovnim mehanizmima epilepsije, o znanju o antiepilepticima, neurokirurškom liječenju epilepsije i napredcima u epileptologiji (16). U istoj godini Gastaut je uspio organizirati sastanak u Marseilleu gdje je prisustvovalo 120 članova ILAE-a i gdje je prezentirana preliminarna klasifikacija epilepsije, što je i prihvaćeno (17).

Njemački psihijatar Hans Berger obznanio je 1929. godine da postoji metoda bilježenja električnih struja koje proizvodi mozak bez otvaranja lubanje. Tu novu metodu nazvao je elektroencefalografija, koja se i danas koristi (18).

Godine 1912. dva neovisna tima kemičara spoznala su djelotvornost fenobarbitala te se on smatra najstarijim antiepileptikom (AEL) koji je i danas u uporabi (19). U sljedećim godinama razvijaju se lijekovi slični fenobarbitonu uključujući metilfenobarbiton i primidon.

Ubrzo zatim otkrivaju se i odobravaju AEL-i, poput fenitoina (1938), karbamazepina (1953), etosukcimida (1958.), valproata (1963.), felbamata i gabapentina (1993.), lamotrigina (1994.), topiramata (1996.), levetiracetama (1999.) itd. (20)... Prvi koji je izveo operaciju na pacijentu, koji je imao epilepsiju zbog apscesa mozga, bio je Heyman 1831. godine. 1886. godine, Sir Victor Horsley, operirao je prvog čovjeka (22-godišnjeg muškarca s post-traumatskom fokalnom epilepsijom) (21). Uz Horsleyja operirali su i drugi, kao Fedor Krause u Berlinu koji je izveo električnu stimulaciju ljudskog korteksa u svrhu identifikacije fokusa koji je potom resecirao. Otfred Foerster prvi je učinio kortikalni mapping pomoću elektrokortikografije (12).

Tijekom posljednja dva desetljeća proučavaju se različite promjene u pogledu ponovne sinaptičke reorganizacije nakon epileptičkog oštećenja mozga, što je dovelo razumijevanje o mehanizmu bolesti, razvoju učinkovitih lijekova i metoda slikovnog prikazivanja te napredak u molekularnoj biologiji koji povezuje brojne gene s raznim oblicima epilepsije.

1.1.4. Podjela epilepsije

Gledajući kroz povijest, 1969.g. prvi put je predložena podjela i klasifikacija epilepsije temeljena na epileptičkim napadajima popraćenim promjenama na elektroencefalogramu (EEG-u) (22). 1981.g. Internacionalna liga protiv epilepsije (ILAE) prihvatila je i doradila predloženu klasifikaciju (23) te se uz male preinake (1989.g.) (24) ona koristila do ovog stoljeća. Tom su podjelom epileptički napadaji podijeljeni na generalizirane, parcijalne/fokalne i neklasificirane uz detaljniju podjelu, no zbog premalo opširnijeg znanja, ta podjela nije uključivala anatomske supstrate i patofiziološke mehanizme nastanka epilepsije. Napredak u dijagnostici i liječenju, posebno razvoj genetike, doveo je do ponovne revizije i drugačijeg pristupa klasifikaciji epilepsije i epileptičkih napadaja. Kako ne bi došlo do velikih razilaženja, Komisija za klasifikaciju u terminologiju (The Commission on Classification and Terminology of the ILAE) predložila je klasifikaciju gdje su dodane neke nove ideje, a s druge strane nije se odustalo od stare klasifikacije. Novi prijedlog sistematizirao je i objavio Berg i suradnici

Monika Kukuruzović, Disertacija

2010.g. Taj novi koncept ne znači da će biti trajan, ali može omogućiti daljnje razumijevanje klasifikacije epilepsije, što je važno za kliničke i druge svrhe (25).

1.1.5. Međunarodna klasifikacija epileptičkih napadaja (Nova) (26)

I. ŽARIŠNI NAPADAJI (potječu iz mreža ograničenih na jednu hemisferu, a mogu biti diskretno lokalizirani ili šire distribuirani)

A. Motorički

- a) tonički
- b) atonički
- c) mioklonički
- d) klonički
- e) epileptički spazam
- f) hipermotorički

B. Nemotorički

- a) senzorički
- b) kognitivni
- c) emocionalni
- e) autonomni

- a) očuvana svijest; b) poremećena svijest; c) nepoznato stanje svijesti

C. Žarišni napadaji s prelaskom u obostrane kloničko-toničke

II. GENERALIZIRANI NAPADAJI (potječu iz nekog dijela mozga i brzo se uključuju u obostrano distribuirane mreže)

A. Motorički

- a) toničko-klonički
- b) tonički
- c) atonički
- d) miokloni
- e) klonički

Monika Kukuruzović, Disertacija

- f) mioklonički-atonički
- g) epileptički spazmi
- h) drugi

B. Apsansi

- a) tipični
- b) atipični
- c) mioklonički
- d) mioklonija očnog kapka

III. NEPOZNATOG POČETKA

A. Motorički

- a) toničko-klonički
- b) tonički
- c) atonički
- d) epileptički spazmi

B. Nemotorički

IV. NEKLASIFICIRANI NAPADAJI (neprimjereni ili nepotpuni podatci)

1.1.6.1. Međunarodna klasifikacija epilepsija (Stara) (27)

I. EPILEPSIJA KLASIFICIRANA PREMA TIPU NAPADAJA

1. Žarišna
2. Generalizirana
3. Generalizirana i žarišna
4. Neklasificirana

II. EPILEPSIJA KLASIFICIRANA PREMA ETIOLOGIJI

1. Genetska (epilepsija je izravna posljedica genetskog uzroka; primjerice, kanalopatije su najbolji primjer genetske epilepsije).
2. Strukturalno-metabolička (epilepsija je sekundarna posljedica strukturnog ili metaboličkog stanja. Teško ih je odvojiti od genetskih epilepsija s obzirom da mnoge strukturne lezije mozga, uključujući i mnoge malformacije kortikalnog razvoja, često imaju genetski uzrok, a većina metaboličkih poremećaja su genetskog podrijetla).
3. Nepoznate etiologije.

III. EPILEPTIČKI SINDROMI

Iako postoji novi prijedlog klasifikacije epilepsije, u mnogim zdravstvenim ustanovama koristi se stara klasifikacija epilepsije zbog nemogućnosti provođenja dijagnostičkih postupaka kao posljedica nedostatka financijskih sredstava.

Prema staroj podjeli epilepsije dijelimo na:

1. idiopatske (primarne, funkcionalne, nasljedne); 2. simptomatske (epilepsija koja može biti sekundarna, organska, stečena ili radi identificirane lezije mozga) i 3. kriptogene (gdje se sumnja na simptomatsku epilepsiju, ali se nije identificirala lezija mozga). Simptomatska ukazuje na činjenicu da vjerojatno postoji uzrok koji se može utvrditi pa se može primijeniti specifična terapija kojom će se on otkloniti, dok idiopatska znači da nije nađen uzrok. S rastućim mogućnostima genetike i neuroradioloških prikaza smanjuje se i prevalencija kriptogenih epilepsija.

Oko 30-40% bolesnika (a u dječjoj dobi čak do 70%) na početku bolesti imaju napadaje koji su generalizirani toničko-klonički, apsans i miokloni napadaji s genetskom predispozicijom, dakle većinom imaju idiopatsku generaliziranu epilepsiju.

1.1.6.2. Međunarodna klasifikacija epilepsija i epileptičkih sindroma (Stara) (24)

ILAE The International League Against Epilepsy je 1989.g. klasificirala epilepsije i sindrome (ova podjela koristi vrstu napadaja, anatomiju, etiologiju, kliničku sliku i EEG).

I. Vezana za lokalizaciju (zahvaća jedan ili više različitih područja mozga – fokalna ili parcijalna)

- A. Idiopatska (s početkom vezanim za dob)
 - 1. Benigna dječja epilepsija s centrotemporalnim fokusom (Rolandička epilepsija)
 - 2. Dječja epilepsija s okcipitalnim paroksizmima
 - 3. Primarna epilepsija čitanja
- B. Simptomatska
 - 1. Parcijalna kontinuirana epilepsija
 - 2. Sindromi karakterizirani napadima sa specifičnom prezentacijom
- C. Kriptogena

II. Generalizirana (zahvaća obje strane mozga u isto vrijeme)

- A. Idiopatska (s početkom vezanim za dob)
 - 1. Benigne obiteljske neonatalne konvulzije
 - 2. Benigne neonatalne konvulzije
 - 3. Benigna mioklona epilepsija dojenčadi
 - 4. Dječja apsans epilepsija
 - 5. Juvenilna apsans epilepsija
 - 6. Juvenilna mioklona epilepsija
 - 7. Epilepsija s generaliziranim napadajima pri buđenju
 - 8. Napadaji izazvani specifičnim ponašanjem (čitanje, refleksi)
 - 9. Druge idiopatske generalizirane epilepsije koje nisu tu definirane

B. Simptomatska

1. Nespecifična etiologija

- Rana mioklona encefalopatija
- Rana infantilna epileptička encefalopatija
- Druge simptomatske generalizirane epilepsije koje nisu navedene

2. Specifični sindromi/etiologije

- Cerebralne malformacije
- Urođene metaboličke greške

C. Kriptogena

1. Westov sindrom
2. Lennox-Gastaut sindrom
3. Epilepsija s mioklono-astatičkim napadima
4. Epilepsija s mioklonim apsansima

III. Neodređeni sindromi po tome jesu li generalizirani ili lokalizirani

A. Sindromi s generaliziranim i fokalnim napadajima

1. Neonatalni napadaji
2. Teška mioklona epilepsija dojenčadi
3. Epilepsija s kontinuiranim šiljcima tijekom sporo-valnog sna
4. Stečena epileptička afazija
5. Druge neodređene generalizirane epilepsije

B. Sindromi bez jasnih generaliziranih ili fokalnih karakteristika

IV. Specijalni sindromi

A. Prigodni cerebralni napadaji

1. Febrilne konvulzije
2. Izolirani napadaji/status epilepticus
3. Napadaji koji se javljaju samo tijekom akutnog metaboličkog ili toksičnog događaja (alkohol, eklampsija itd.)
4. Refleksna epilepsija

1.1.7. Patofiziologija epilepsije

U podlozi svih vrsta epileptičkih napadaja je paroksizmalni depolarizacijski pomak (paroxysmal depolarizing shift, PDS), tj. stanični događaj u kojemu dolazi do brzog ponavljanja akcijskih potencijala koji dovode do produljene depolarizacije stanične membrane (28, 29). Uključenost pojedinih neurona u podražljivost i dovođenja do epileptičkog napadaja temelji se na intrinzičnim neuronskim svojstvima, kao što su genetski predisponirane određene kanalopatije ili vanjskim mehanizmima, kao što su smanjena koncentracija inhibitornih neurotransmitera ili prekomjerna koncentracija ekscitatornih aminokiselina ili egzogenih ekscitotoksina (30).

Generalizirani napadaji su napadaji koji potječu iz jedne točke, brzo zahvaćaju bilateralne mreže i šire se po cijelom mozgu, zahvaćajući kortikalne i subkortikalne strukture, ali ne i cijeli korteks. Žarišni napadaji nastaju unutar mreža ograničenih na jednu polutku. Mogu biti diskretno lokalizirani ili široko rasprostranjeni. Žarišni napadaji mogu nastati u subkortikalnim strukturama. Za svaki tip napadaja, početak je konzistentan od jednog do drugog napadaja, s mogućnošću propagacije koja može uključivati ipsilateralnu i/ili kontralateralnu hemisferu (31).

1.1.8. Postavljanje dijagnoze epilepsije

Dijagnoza epilepsije je u osnovi klinička prosudba donesena na temelju anamneze i kliničke slike. Točnost dijagnoze ovisi o vještini i iskustvu liječnika te kvaliteti i pouzdanosti informacija svjedoka koji su prisustvovali događaju (32). Nakon anamneze potrebno je učiniti kompletan somatski i neurološki pregled, kao i pretrage koje će nam uz potvrdu dijagnoze pomoći i u otkrivanju oblika epilepsije, a važno je napraviti i pretrage sa svrhom isključivanja drugih poremećaja.

Dijagnostička ispitivanja, uključujući laboratorijske nalaze, elektroencefalogram (EEG) i slikovne pretrage glave, trebaju dopuniti anamnestičke podatke i potvrditi kliničku sumnju na epilepsiju ili odbaciti tu dijagnozu. Ispitivanja i dodatne dijagnostičke metode i postupci će nam pomoći u otkrivanju etiologije i omogućiti odgovarajući odabir liječenja i terapije za svakog pojedinog bolesnika.

EEG je neinvazivna dijagnostička i istraživačka metoda koja registrira bioelektrične aktivnosti mozga elektrodama s kože lubanje gdje se električna aktivnost prenosi na monitor koji je registrira u vidu digitalnog zapisa na papiru (32, 33). Koristi se za potvrdu dijagnoze napadaja i klasifikacije vrste epilepsije i epileptičkih sindroma, a napadaji se definiraju prema abnormalnoj električkoj aktivnosti mozga. Rutinsko snimanje je 30 minuta, ali dijagnostički doprinos EEG-a se povećava prolongiranim snimanjem, u trajanju od 90 minuta ili više kada, osim u budnosti, provodimo snimanje za vrijeme spavanja. Također se vrše snimanja nakon deprivacija spavanja, kada radi umora može uslijediti epileptički napadaj pa se može snimiti iktalni EEG. Aktivacijske metode, kao što je reakcija otvaranja i zatvaranja očiju, hiperventilacija i fotostimulacija također se rutinski koriste, a mogu povećati javljanje epileptičkih izbijanja. Prolongirano EEG snimanje je najbolji, a često i jedini način za postavljanje dijagnoze epilepsije jer ćemo moći analizirati interiktalne i iktalne periode, kao i pojedine faze spavanja, a u postavljanju dijagnoze nam pomaže videozapis i poligrafski ili polisomnografski zapis (34, 35). Telemetrijsko snimanje omogućuje kretanje bolesnika, ali je opseg kretanja ograničen brojem videokamera. Osim ovih neinvazivnih načina snimanja EEG-a, u pojedinim slučajevima se neurokirurški elektrode stavljaju direktno na koru mozga ili se implantiraju pojedine elektrode u mozak, u svrhu točne lokalizacije epileptičkog žarišta i

dobivanja patološkog zapisa na EEG-u. Ovdje se radi o invazivnim pretragama koje najčešće prethode neurokirurškom zahvatu (36).

SLIKOVNE METODE

- MRI snimanje (od engl. Magnetic resonance imaging) je visokorezolutno oslikavanje unutrašnjosti mozga koristeći elektromagnetske signale iz određenih atomskih jezgara unutar tkiva izloženog magnetskom polju, a otkriva postojanje tumora, patoloških krvnih žila, cista i drugih područja strukturnog poremećaja građe mozga ili gubitka moždanih stanica. Ono što ograničava mogućnost korištenja MR-a je činjenica da nisu svi bolesnici pogodni za MR (npr. mala djeca zahtijevaju anesteziju radi trajanja snimanja, ugrađeni implantati (kohlearni implantat, inzulinska pumpa, zglobne proteze) ne mogu u MR aparat, kao ni trudnice te bolesnici s osjećajem klaustrofobije. U zadnje vrijeme sve se više koristi funkcionalni MR čiji se rad temelji na povećanju tijeka krvi kroz lokalno krvožilje vezano uz moždanu neuralnu aktivnost. Koristi se deoksihemoglobin kao endogeni kontrast te služi kao izvor signala za fMR (37, 38).
- SPECT (od engl. Single photon emission computed tomography) je metoda nuklearne medicine koja pomaže u određivanju točnog mjesta epileptičkog izbijanja koristeći izotope koji perfundiraju u neurone mjereći regionalni cerebralni krvni protok (rCBF). Izmjereni protok nam govori o perfuziji odnosno metaboličkoj potrebi određene grupe neurona za energijom, što ukazuje na razinu njihove aktivnosti. Ova metoda izuzetno je korisna kod slabo reguliranih epilepsija jer nam omogućava precizniju lokalizaciju epileptogenih područja (39).
- PET (od engl. Positron emission tomography) pomaže u određivanju mjesta nastanka epileptičkog napadaja tako što pokazuje razliku u potrošnji glukoze ili kisika za pojedine dijelove mozga (39).
- CT (od engl. Computed tomography) se u dijagnostici epilepsija ne koristi osim za dokazivanje kalcifikata kao u npr. Sturge-Weberovom sindromu ili pri sumnji na traumu glave radi isključivanja intrakranijskog krvarenja, odnosno kod neklasificiranih leukodistrofija (38).
- Neuropsihološki testovi: koristi se baterija testova za procjenu svih područja kognitivnog funkcioniranja (motoričke funkcije, ritam, taktilne funkcije, vizualne funkcije,

receptivni govor, ekspresivni govor, pisanje, čitanje, računanje, pamćenje, interpretacija i slično). Za procjenu inteligencije za djecu od 6 do 16 godina koristi se Wechslerova ljestvica inteligencije WISC, a za djecu od 3 do 7 godina WPPSI. Uz te testove koriste se i ciljani testovi koji mogu opisati razinu disfunkcionalnosti pojedinih sposobnosti (test vizualnog zanemarivanja, Hooperov test vizualne organizacije, Bender geštalt vidno-motorički test, Bentonov test vizualne retencije, Minnesota multifazični inventar ličnosti, Wartegg test crteža i mnogi drugi) (40).

- Wada test (po Johnu Wadi koji je primijenio test 1949. godine), odnosno intrakarotidna amobarbitalna procedura kojom se selektivno kratkotrajno anestezira polovica mozga dok se ispituje druga polovica. Koristi se prilikom preoperativne pripreme za temporalnu lobektomiju te se ispituje dostatnost druge polovice mozga za normalno funkcioniranje nakon lobektomije (određuje se i dominantnost hemisfere za govor i memoriju), ali postojanjem fMRI-ja taj se test napušta (41).

LABORATORIJSKE PRETRAGE

Prije postavljanja dijagnoze, a nakon prvog epileptičkog napadaja neophodno je isključiti, odnosno potvrditi i prisutnost neke druge bolesti odnosno poremećaja. Zbog toga se preporučuje načiniti hematološko-biokemijske pretrage, kako je nabrojeno u tablici 1. Kod starije djece preporučuje se načiniti i probir za intoksikaciju lijekovima, drogom ili alkoholom.

Kod odabira antiepileptika pomoći će i molekulska dijagnostika određivanja izoenzima za metabolizam antiepileptika CYP 2C9 i 2C19, kao i P-glikoproteina (42).

Po potrebi treba načiniti i dijagnostiku za infektivno, odnosno heredodegenerativno oboljenje: LP, hematolikovsku barijeru, virusi središnjeg živčanog sustava (SŽS) u likvoru i serumu, imunološki status, ASTO, ASTA, obriske u području uha, grla i nosa.

Kod sumnje na heredodegenerativne metaboličke bolesti i genetske bolesti potrebno je učiniti ciljane pretrage prema kliničkoj slici i nalazima, a neke su pretrage nabrojene u tablici 2.

Tablica 1. Rutinska laboratorijska obrada

| |
|---|
| CRP, SE, KKS, GUK, K, Na, Cl, Ca, P, Mg, AF, AST, ALT, Gama GT, bilirubin, CK, urea, kreatinin, urat, laktat, piruvat, acidobazni status, amonijak, kolesterol, HDL, LDL, trigliceridi, Fe, UIBC, TIBC, Fe saturacija, urin |
| Nivo antiepileptika u krvi ako ga dijete uzima |
| Prolaktin u plazmi <20 min od napadaja |
| Toksikološke analize: lijekovi, droga, alkohol |
| CYP 2C9 i 2C19, PGP; prema nalazima APOE i DNA UGT |
| Dijagnostika infektivnog oboljenja: LP, hematolikvorska barijera, SŽS virusi u likvoru i serumu, imunološki status |
| ASTO, ASTA, obrisci u ORL području |

Tablica 2. Dodatna laboratorijska obrada

| | |
|---|---|
| Kromosomi | Biopsija kože (podlaktica, aksila) i mišića |
| Bakar (Cu), ceruloplazmin, B12 vitamin, folat | Neurotransmiteri u likvoru |
| Aminokiseline, organske kiseline | Molekulske analize: MERRF, MELAS, sindromi |
| | Genska dijagnostika epilepsija |

DODATNE PRETRAGE

Obavezno je kod postavlja dijagnoze epilepsije provesti i neuropsihologijsko testiranje zbog procjenjivanja kognitivnih sposobnosti, memorije, motornih sposobnosti i ostalog. Antiepileptici mogu utjecati na neku od tih sposobnosti, pa je neophodno poznavati točan nalaz prije počimanja terapije. Neophodna je i dodatna okulistička obrada ispitivanje vida, očne pozadine, vidnog polja, elektroretinogram (ERG) i vidnih evociranih potencijala (VEP). Otorinolaringološka (ORL) obrada obuhvaća audiogram, elektronistagmogram (ENG) i slušne evocirane potencijale moždanog debla (BERA).

Često su u obradu uključeni i genetičar, logoped, defektolog, psihijatar, fizijatar, ortoped, ginekolog (43).

1.1.9. Liječenje epilepsije

Postavljanjem dijagnoze epilepsije glavni nam je cilj postići kontrolu napadaja i u konačnici poboljšati kvalitetu života pacijenata. U današnje vrijeme koristimo različite metode kod liječenja epilepsije, kao što su: primjena antiepileptika, kortikosteroida, intravenskih imunoglobulina, ketogene dijeta, stimulacije nervusa vagusa, kirurško liječenje epilepsije te u novije vrijeme primjena kanabidiola kod posebnih epileptičkih sindroma (44, 45). Unatoč raznim metodama liječenja, antiepileptici ostaju osnova i prvi korak u liječenju epilepsije. Cilj je primjena što efikasnijeg antiepileptika sa što manje štetnog djelovanja te primjena jednog lijeka ako je to moguće.

Postavljanjem ispravne dijagnoze epilepsije ili epilepsijskog sindroma započinjemo primjenom jednog od antiepileptika koji po svojim farmakološkim svojstvima najviše odgovara specifičnim karakteristikama svakog pojedinog bolesnika (dob, spol, komorbiditeti, komedikacija, profesija, životne navike i stil, intelektualni kapacitet i slično) (46).

Započimanje primjene antiepileptika treba biti postupno i u niskoj dozi koja se postupno povećava do zadovoljavajućeg učinka ili javljanja nepodnošljivih nuspojava. Primjenom jednog antiepileptika postiže se remisija u oko 50% bolesnika. Ukoliko je prisutan loš klinički odgovor, lijek se mijenja s novim ili se doda drugi lijek. Zamjenskom monoterapijom ili kombinacijskom terapijom može se postići remisijau sljedećih 20-ak% bolesnika (47).

Pacijenti, koji unatoč uzimanju dva ili više adekvatna antiepileptika primijenjena u adekvatnim dozama, i dalje imaju napadaje, imaju farmakorezistentnu epilepsiju te su oni kandidati za neku od drugih metoda liječenja. Najefikasnija metoda je neurokirurško liječenje kojim se kod značajnog broja pacijenata postiže zadovoljavajuća kontrola bolesti, naravno uz nastavak uzimanja AEL-akroz dulje vrijeme (moguće i doživotno) (46, 48).

Bolest se smatra uvedenom u trajnu remisiju ukoliko je bolesnik bez napadaja 10 godina ili je 5 godina bez antiepileptičke terapije, a liječenje se provodi najmanje dvije godine od odsustva napadaja uz uredan EEG. Pacijenti se mogu smatrati izliječenim, ali ovaj termin treba izbjegavati budući da oni i dalje imaju veći rizik od zdrave populacije za ponovno javljanje epilepsije kasnije u životu. Stoga se po preporukama ILAE-e bolest smatra riješenom (eng. solved), a ne izliječenom.

Prva uporaba lijeka koji se smatra prvim antiepileptikom bila je sredinom 19. stoljeća, a to je kalij bromid. Razvojem medicine nakon bromida u upotrebu je početkom 20. stoljeća, 1912.g., ušao i fenobarbital (PB), koji se i dan danas primjenjuje diljem svijeta (poglavito u zemljama nižeg ekonomskog standarda) zbog svoje učinkovitosti i niske cijene te u liječenju epileptičkih napadaja u novorođenačkoj dobi (49, 50). U „staru“ generaciju lijekova još se ubrajaju fenitoin (PHT), primidon (PRM), acetazolamid (AZM), etosuksimid (ESC ili ESX), karbamazepin (CBZ), valproat (VPA), benzodiazepini (BZD) i to diazepam (DZP), klonazepam (CNZ), klobazam (CLB), lorazepam (LZP) i midazolam (MDZ). Napretkom medicine nastali su lijekovi „nove“ generacije, tj. moderni lijekovi koji imaju manje toksičnosti i bolju podnošljivost. U „novu“ generaciju AEL-a ubrajamo zonisamid (ZNS), vigabatrin (VGB), okskarbazepin (OXC), lamotrigin (LTG), felbamat (FBM), gabapentin (GBP), topiramid (TPM), tiagabin (TGB), levetiracetam (LEV), stiripentol (STP), pregabalin (PGB), rufinamid (RUF), lakozamid (LCM), eslikarbazepin acetat (ESL), retigabin (RGB) (povučen sa tržišta 2017.g.), perampanel (PER), brivaracetam (BRV) te kanabidiol (CBD) (51).

Antiepileptici imaju raznolik raspon farmakološkog djelovanja. Modulacijom intrinzične vodljivosti membrane inhibiraju prekomjerno oštećenje neurona prekonatrijskih i kalcijevih kanala preferencijalnim vezanjem na natrijske kanale dovodeći ih u inaktivno stanje. Lijekovi koji se vežu na natrijske kanale su npr. fenitoin, lamotrigin i karbamazepin. Presinaptički proteini moduliraju otpuštanje neurotransmitera pohranjeno unutar vezikula; jedan od njih je

SV2A – a on je vezujuće mjesto za levetiracetam (52). Antiepileptici mogu potencirati i inhibicijske mehanizme putem post-sinaptičke regulacijske modulacije, inhibicijom metabolizma gama-aminobutirične kiseline (GABA) ili blokade GABA transporta te inhibirati ekscitaciju neurona pretežno glutamatskog sustava (53).

S obzirom na različite mehanizme djelovanja poznato je da neki AEL-i mogu i pojačati napadaje, npr. karbamazepin i vigabatrin mogu pogoršati mioklone epilepsije, epilepsije tipa apsans te žarišne s prijelazom u obostrane toničko-kloničke napadaje. Karbamazepin, uz ranije navedene, može pogoršati i generalizirane klonično-toničke napadaje dok se mioklone epilepsije mogu pogoršati primjenom lamotrigina i gabapentina, a epilepsije tipa apsans primjenom fenobarbitona (54). Kao i svi drugi lijekovi, antiepileptici mogu imati i nepoželjne učinke.

Potencijalne nuspojave lijekova prikazane su u sljedećoj tablici.

Tablica 3. Antiepileptici, tip neželjenih reakcija

| <u>Antiepileptici</u> | <u>Neželjene reakcije</u> | <u>Životno ugrožavajuće reakcije</u> |
|-----------------------|--|--|
| Karbamazepin | osip, sedacija, glavobolja, ataksija, nistagmus, diplopija, tremor, hiponatremija | antikonvulzivni hipersenzitivni sindrom (AHS), zatajenje jetre, hematološke komplikacije |
| Klobazam | sedacija, umor, pospanost, ponašanje i kognitivno oštećenje, nemir, poremećaji u koordinaciji, tolerancija | |
| Klonazepam | kao i klobazam | |
| Gabapentin | dobitak težine, periferni edem, promjene u ponašanju, impotencija | akutni pankreatitis, hepatitis, Stevens-Johnsonov sindrom, akutno otkazivanje bubrega |
| Lakozamid | vertoglavica, dvoslike, povremeno može uzrokovati osip | - |

| | | |
|----------------------------|---|---|
| Lamotrigin | osip, nesanica, vrtoglavica, diplopija, glavobolja, ataksija, astenija, zamagljen vid, može pogoršati mioklone napadaje | AHS, zatajenje jetre, hematološke komplikacije, Stevens-Johnsonov sindrom |
| Levetiracetam | promjene u ponašanju i psihotične promjene, astenija, vrtoglavica, somnolencije, glavobolje | |
| Okskarbamazepin | osip, glavobolja, vrtoglavica, mučnina, somnolencija, ataksija, diplopija, hiponatriemija | AHS, hematološke komplikacije |
| Fenobarbital | osip, teška pospanost, sedacija, smanjenje memorije i koncentracije, hiperkinezije i agitacija udjece | AHS, hematološke komplikacije |
| Fenitoin | osip, ataksija, pospanost, letargija, sedacija, encefalopatija, gingivalna hiperplazija, hirsutizam, dismorfizam, osteomalacija | AHS, zatajenje jetre, hematološke komplikacije |
| Topiramat | somnolencija, anoreksija, umor, nervoza, poteškoće koncentracije i pažnje, oštećenje pamćenja, psihomotorno usporavanje, metabolička acidoza, gubitak težine, disfunkcija jezika, bubrežni kamenci, glaukom i drugi očni poremećaji | zatajenje jetre, anhidroza |
| Na valproat | mučnina, povraćanje, dispepsija, | oštećenje jetre i gušterače |
| Valproična kiselina | dobivanje na težini, gubitak kose, sindrom policističnih jajnika | |
| Zonisamid | osip, pospanost, anoreksija, | AHS, anhidroza |

| | | |
|--------------------|--|--------------------------|
| | razdražljivost, fotosenzibilnost, gubitak težine, bubrežni kamenci | |
| Etosuksimid | bol u epigastriju, mučnina, povraćanje, glavobolja, pospanost, osip, iritabilnost, gubitak na težini | hematološke komplikacije |
| Vigabatrin | pospanost, hiperaktivnost, suženje vidnog polja | |
| Diazepam | kao klobazam i klonazepam | |

1.1.9.1. Interakcija među lijekovima

Mnoge štetne posljedice vezane su za interakciju među lijekovima prilikom čega dolazi do promjena u učinku lijeka prethodnim ili istovremenim uzimanjem drugog lijeka. Interakcije lijekovima mogu dovesti do smrtonosnih ishoda i prema literaturi zauzimaju četvrto do šesto mjesto uzroka smrti kod hospitaliziranih bolesnika u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) (55). Mnoge interakcije s lijekovima rezultat su indukcije ili inhibicije enzima sustava citokrom P450 (CYP). Razumijevanje tih mehanizama je važno kako bi se postigla odgovarajuća višestruka terapija lijekovima. Pojedini izoenzimi uključeni su metabolizam različitih lijekova, a indukcija ili inhibicija tih izoenzima dovodi do klinički značajne interakcije liječenja. Interakcije lijekova temeljene na inhibiciji čine glavni dio klinički važnih interakcija lijekova. Lijek može inhibirati CYP izoenzim bez obzira da li je ili nije supstrat za taj izoenzim. Ako su dva lijeka supstrat za isti CYP izoenzim, metabolizam jednog ili obaju lijekova mogu biti odgođeni. Karakteristika koja čini lijek osjetljiv na inhibiciju je da metabolit koji nastane biotransformacijom mora činiti > 30-40% metabolizma lijeka, a metabolički put se odvija preko jednog kataliziranog izoenzima (56). U procesu inhibicije vremenski raspon interakcija lijekova ovisi o polu-životu eliminacije dotičnog lijeka. Inhibitor može smanjiti metabolizam supstrata i općenito dovesti do povećanog učinka lijeka, ako je prethodna koncentracija bila subterapijska, ili do toksičnosti.

Interakcije koje induciraju enzime također su klinički važne, ali se sporije otkrivaju jer zahtijevaju sintezu novog proteina, što je njihov glavni mehanizam. Veliki broj lipofilnih lijekova, kao i čimbenici onečišćenja okoliša, također mogu povećati indukciju enzima (57).

Monika Kukuruzović, Disertacija

Lijek može inducirati i svoj metabolizam, kao što je primjer u slučaju karbamazepina (56) ili mehanizam drugog lijeka. Sve to može dovesti do povećanog ili smanjenog učinka lijeka, što je teško predvidjeti jer ovisi o nekoliko čimbenika, kao što je polu-život ili promet enzima (57, 58).

Glavni enzimi uključeni u metabolizam lijekova su CYP2C, CYP1A, CYP3A i glukoroniltransferaza (GT). S obzirom na mehanizme indukcije ili inhibicije, AEL-i se mogu podijeliti na induktore i inhibitore i one koji nisu uključeni niti u jedan mehanizam. Mnogi AEL-i nove generacije ne podliježu enzimima koji induciraju i inhibiraju aktivnost te su manje skloni uzrokovati klinički važne interakcije. Zbog toga je njihova uporaba osobito korisna kod bolesnika koji zahtijevaju druge lijekove zbog drugih istovremenih medicinskih stanja (59). Prikaz AEL-a, mehanizama djelovanja i enzima navedeni su u tablici 4.

Tablica 4. Antiepileptici, mehanizam djelovanja, enzimi djelovanja

| Antiepileptici | Induktori | Inhibitori |
|------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| Karbamazepin | CYP1A2; CYP3A; GT | CYP2C; - |
| Etosuksimid | - | - |
| Felbamat | CYP3A4 | CYP2C19; beta-oksidacija |
| Gabapentin | - | - |
| Lakozamid | - | - |
| Lamotrigin | GT | - |
| Levetiracetam | - | - |
| Okskarbamazepin | CYP3A4; CYP3A5; GT | CYP2C19 |
| Fenobarbiton | CYP3A; CYP2C; GT | - |
| Fenitoin | CYP3A; CYP2C; GT | - |
| Pregabalin | - | - |
| Rufinamid | CYP3A4 | CYP2E1 |
| Tiagabin | - | - |
| Topiramat | CYP3A | CYP2C19 |
| Valproat | - | CYP2C9, GT |
| Vigabatrin | CYP2C9 | - |
| Zonisamid | - | - |

*Rogers SJ, Cavazos JE. In DiPiro's Pharmacotherapy, 8th Edition, McGraw-Hill, 2011

1.2. APOLIPOPROTEINI

Apolipoproteini su važni strukturni dijelovi lipoproteinskih čestica, sudjeluju u lipoproteinskoj sintezi, sekreciji, razvoju i katabolizmu. Glavna metabolička uloga apolipoproteina je da djeluju kao kofaktori pojedinih enzima koji sudjeluju u metabolizmu lipoproteinskih čestica. Apolipoproteini, vezivanjem za specifične stanične receptore, omogućuju ulazak lipoproteina u stanice, osiguravaju i strukturnu stabilnost lipoproteina, te imaju važnu ulogu u transportu endogeno sintetiziranih lipida (endogeni put) i lipida koji se u organizam unose hranom (egzogeni put). Ovisno o tome sadržavaju li jednu ili više vrsta apolipoproteina, lipoproteini se dijele na jednostavne i složene.

Dosad je u plazmi čovjeka identificirano deset apolipoproteina čija je fiziološka uloga u metabolizmu lipoproteina poznata (tablica 5). Zbog svoje povezanosti sa specifičnim genetski uvjetovanim poremećajima metabolizma lipida, najveći klinički značaj pridaje se lipoproteinima A, B, C i E (60).

Tablica 5. Podjela apolipoproteina

| Apolipoprotein | Izvor | Lipoprotein |
|----------------|------------------------|-----------------------------|
| A-I | Tanko crijevo, jetra | HDL, hilomikroni |
| A-II | Tanko crijevo, jetra | HDL, hilomikroni |
| A-IV | Tanko crijevo | HDL, hilomikroni |
| B-48 | Tanko crijevo, jetra | Hilomikroni |
| B-100 | Jetra | VLDL, IDL, LDL |
| C-I | Jetra | Hilomikroni, VLDL, IDL, LDL |
| C-II | Jetra | Hilomikroni, VLDL, IDL, LDL |
| C-III | Jetra | Hilomikroni, VLDL, IDL, LDL |
| E-2 | Jetra, periferna tkiva | Hilomikroni, VLDL, IDL, LDL |

| | | |
|-----|------------------------|-----------------------------|
| E-3 | Jetra, periferna tkiva | Hilomikroni, VLDL, IDL, LDL |
| E-4 | Jetra, periferna tkiva | Hilomikroni, VLDL, IDL, LDL |

1.2.1. Apolipoproteini A, B, C

Genetskim polimorfizmom, koji je odgovoran za strukturne i funkcionalne abnormalnosti apolipoproteina, mogli bi se objasniti defekti u biosintezi, izlučivanju i katabolizmu lipoproteina, što je povezano s pojavom dislipoproteinemije, a time i mogućeg objašnjenja pojave ateroskleroze te drugih stanja u kojima imaju važnu ulogu. Proteinske anomalije bile su otkrivene za APOA-I, APOE, APOC-II i APOC-III (61).

Apolipoprotein A1 (APOA-I) je protein koji kod čovjeka kodira gen APOA1 i koji ima važnu ulogu u metabolizmu lipida. APOA-I je važan protein u česticama lipoproteina visoke gustoće HDL (od engl. High Density Lipoprotein) u krvi čovjeka. Abnormalnosti APOA-I jednim dijelom su povezane sa smanjenom vrijednošću HDL-a, a drugim dijelom s deficitom kofaktora za aktivnost enzima lecitin kolesterolacil-transferaza (LCAT-a) (61), odgovornog za nastanak većine kolesterolskih estera u krvi. Na taj način mutacije gena za APOA-I mogu povećati rizik nastanka ateroskleroze, čak i ako je koncentracija kolesterola i lipoproteina male gustoće LDL (od engl. Low Density Lipoprotein) jednaka. Nedostatak cirkulirajućih APOA-I i APOC-III povezan je s vrlo niskim vrijednostima HDL-a i pojavom ateroskleroze (62). Kod normolipemičnih osoba APOA-I je najobilniji apolipoprotein u plazmi. Apolipoproteini grupe A sintetiziraju se u jetri i tankom crijevu (61).

Apolipoprotein B (APOB) je glavni apolipoprotein lipoproteina male gustoće (LDL) (63). Ostatak čine APOA, APOC i APOE. Zbog njegove slabe topivosti u vodi i ureji, dugo se nije znalo o strukturi, sastavu i fizikalno-kemijskim osobinama APOB-a. Danas znamo da APOB nije homogena molekula, već da postoje dvije izoforme: APOB-48 i APOB-100, s molekularnim težinama 251 i 25 kDa. Sintetiziraju se iz identičnog APOB gena, jedinstvenim RNA mehanizmom. APOB izoproteini glavni su strukturni apolipoproteini hilomikrona, lipoproteina vrlo male gustoće VLDL (od engl. Very Low Density Lipoprotein), lipoproteina

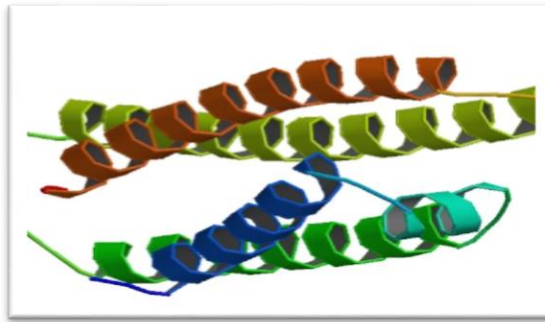
srednje gustoće IDL (od engl. Intermediate Density Lipoprotein) i LDL čestica (64). APOB-48 sadržava 2152 aminokiseline, a nastaje putem APOB-mRNA, s ranijim translacijskim “stop-kodonom”. Sintetizira se u tankom crijevu i nalazi se na površini hilomikrona: APOB-100 sadržava 4536 aminokiseline, translacijski je produkt čitave APOB-mRNA i sintetizira se u jetri. Molekularna masa mu je 550 000 Da, pa se smatra najvećom poznatom humanom proteinskom molekulom. Osim strukturne uloge APOB-100 veže lipoproteine male gustoće na receptore na površini stanice procesom koji se zove receptor-posredovana endocitoza, čime započinje niz zbivanja kojima se regulira homeostaza kolesterola. Aminokiseline lizin i arginin u apolipoproteinu djeluju kao mjesto prepoznavanja i povezivanja kompleksa ligand-receptor. Receptor prepoznaje samo one lipoproteine koji sadrže APOB i APOE, a to su LDL, VLDL i lipoproteini velike gustoće (subpopulacija HDLc) (65). Genetski polimorfizam vezan za APOB prvi je opisao Hegele, skrećući pažnju da pojave abnormalnog proteina ili pak njegova povećana koncentracija u plazmi uz normalne vrijednosti HDL-a, može ukazati, ne samo na pojavu ateroskleroze, već i na stupanj oštećenja arterija. Zato je potrebno i opravdano mjeriti koncentraciju apolipoproteina (66).

Apolipoproteini C (APOC-I, APOC-II i APOC-III) sintetiziraju se u jetri i nalaze se u sklopu hilomikrona, VLDL, IDL i LDL čestica (67).

Apolipoprotein D (APOD) je protein koji kod čovjeka kodira gen APOD. Protein nalazimo u krvi čovjeka kao dio lipoproteinskih čestica lipoproteina velike gustoće (HDL). Radi se o glikoproteinu procijenjene molekularne težine 33kDa, usko povezanim s enzimom lecitina kolesterola aciltransferaze, koji sudjeluje u metabolizmu lipida (68).

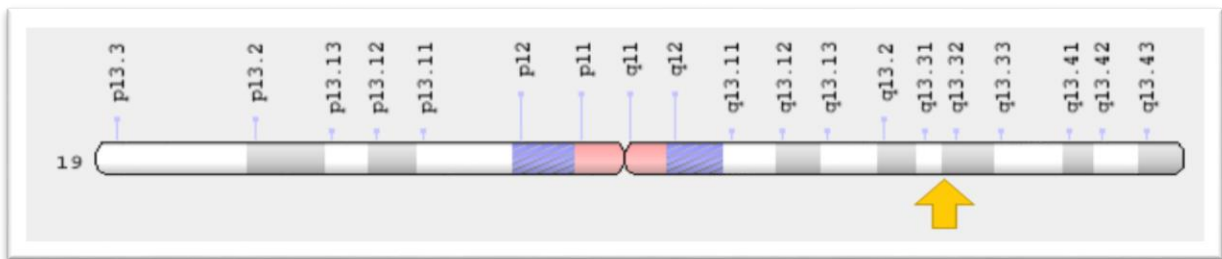
1.2.2. Apolipoprotein E

Apolipoprotein E (APOE) je glikoprotein (slika 1) koji ima ulogu u transportu i metabolizmu lipida u cijelom tijelu. Sastoji od 299 aminokiselina. Nalazi se na površini hilomikrona, VLDL, IDL i LDL čestice (69).



Slika 1. Apolipoprotein E

Gen APOE je lokaliziran na kromosomu 19q 13.2 (slika 2) te se kod ljudi pojavljuje u tri izoforme e2, e3, e4, stoga razlikujemo homozigotne (APOE e2/e2, e3/e3, e4/e4) i heterozigotne genotipove (APOE e3/e2, e4/e3, e4/e2) (70).



Slika 2. Kromosom 19q13.2

APOE e3 alel je najčešći oblik (70% -80%), nakon čega slijedi APOE e4 (10% - 15%) i APOE e2 (5% - 10%) (71). Raspodjele e2, e3 i e4 su različite među rasama. Indijanci, Azijati i meksički Amerikanci imaju najveću učestalost e3 (>84%), Afrikanci i Afroamerikanci imaju najveću učestalost e4 (20,1%, odnosno 31%), Afroamerikanci i bijelci (osim Finaca) imaju najveću učestalost e2 (7,3 - 13,1%) (71). (tablica 6)

Tablica 6. APOE frekvencija gena i genotipa u ljudskoj populaciji

| POPULACIJA | Frekvencija gena | | | Frekvencija genotipa | | | | | |
|--|------------------|-------|-------|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | E2 | E3 | E4 | E2/E2 | E2/E3 | E2/E4 | E3/E3 | E3/E4 | E4/E4 |
| Afroamerikanci | 13.1% | 66.8% | 20.1% | 2.0% | 18.0% | 6.0% | 43.0% | 28.0% | 3.0% |
| Afrikanci (Nigerija) | 2.8% | 66.2% | 31.0% | 0.0% | 3.0% | 3.0% | 46.0% | 37.0% | 11.0% |
| Američki Indijanci (muškarci) | 1.7% | 85.0% | 13.3% | 0.0% | 3.0% | 0.5% | 71.6% | 23.9% | 1.2% |
| Američki Indijanci (žene) | 1.6% | 85.8% | 12.6% | 0.1% | 2.6% | 0.5% | 73.2% | 22.7% | 1.0% |
| Bijelci (Finska) | 3.9% | 76.7% | 19.4% | 0.3% | 5.4% | 1.8% | 58.7% | 30.6% | 3.2% |
| Bijelci (Francuska) | 8.1% | 80.2% | 11.7% | 0.8% | 13.1% | 1.6% | 64.3% | 18.7% | 1.6% |
| Bijelci (Njemačka) | 8.2% | 78.2% | 13.6% | 0.9% | 11.7% | 2.9% | 62.2% | 19.9% | 2.2% |
| Bijelci (Italija) | 7.3% | 82.7% | 10.0% | 0.4% | 12.0% | 16.5% | 68.4% | 1.5% | 1.2% |
| Bijelci Amerikanci (muškarci) | 8.3% | 78.5% | 13.1% | 0.9% | 12.9% | 1.9% | 62.9% | 18.3% | 3.0% |

| | | | | | | | | | |
|----------------------------------|------|-------|-------|------|-------|------|-------|-------|------|
| Bijelci Amerikanci (žene) | 7.7% | 78.9% | 13.3% | 0.3% | 13.3% | 1.4% | 62.6% | 19.3% | 3.0% |
| Kinezi | 7.4% | 84.4% | 8.2% | 1.4% | 12.1% | 0.0% | 70.9% | 14.9% | 0.7% |
| Japanci | 3.7% | 84.6% | 11.7% | 0.3% | 6.1% | 0.7% | 71.9% | 19.3% | 1.7% |
| Američki Meksikanci | 3.9% | 85.9% | 10.2% | 0.2% | 6.7% | 0.7% | 73.8% | 17.3% | 1.1% |

(Eichner i suradnici, 2002. AM J Epidemiol 155: 487-95)

APOE je otkriven 1970-ih kao komponenta lipoproteina važnih za transport masnih kiselina i kolesterola u ljudskoj cirkulaciji krvi. U normalnim fiziološkim uvjetima masne kiseline i kolesterol bitne su komponente stanične membrane, prekursori steroidnih hormona, vitamina D i žučnih kiselina, te imaju vrlo bitnu ulogu u funkcioniranju središnjeg živčanog sustava. Lipoproteini raznose masne kiseline i kolesterol u različita tkiva, a nekorištene dijelove u jetru za katabolizam. Razlikujemo nekoliko vrsta lipoproteina ovisno o veličini, podrijetlu, funkciji i sastavu (72). Glavni tipovi lipoproteina su: hilomikroni, VLDL (lipoproteini vrlo male gustoće), LDL (lipoproteini niske gustoće) i HDL (lipoproteini visoke gustoće). Svi oni sadrže APOE, koji regulira metabolizam lipoproteina u nekoliko aspekata.

APOE posreduje u interakciji lipoproteina s receptorom na površini stanice u različitim tkivima, čime se određuje gdje masne kiseline i kolesterol treba dostaviti. APOE modulira aktivnost lipoprotein lipaze, enzima koji oslobađa masne kiseline i kolesterola iz lipoproteina na mjestu dostave, čime se kontrolira brzina isporuke (73). Dalje, APOE stimulira proizvodnju VLDL-a u jetri, koji je također povezan s povećanom razinom triglicerida i VLDL-a u plazmi. Konačno, APOE igra kritičnu ulogu u regulaciji razine A β (amiloid beta) peptida u mozgu, a nakupljanje A β peptida je obilježje Alzheimerove bolesti (74, 75).

1.3. ULOGA APOE I POJEDINIH ALELA

Ulogu APOE i pojedinih alela važno je shvatiti kao faktor rizika za razvoj nekih bolesti. Temeljna razlika između APOE e2, e3 i e4 je u jednoj aminokiselini na pozicijama 112 i 158. Najčešću varijantu, APOE e3, karakterizira cistein na poziciji 112 i arginin na 158. APOE e2 varijanta ima cistein na oba mjesta, 112 i 158, a APOE e4 varijanta ima arginin na obje pozicije 112 i 158. Te razlike mijenjaju strukturu APOE proteina, što rezultira različitim afinitetom vezanja, stabilnosti proteina i interakcijom, a u konačnici dovodi do promijenjenog metabolizma lipoproteina (73, 76).

1.3.1. APOE e2

APOE e2 slabo se veže na receptore stanične površine i povezan je s povećanim i smanjenim rizikom za aterosklerozu. Osobe s kombinacijom e2/e2 polako razgrađuju masti i mogu imati veći rizik od rane bolesti krvnih žila i hiperlipoproteinemije tipa III - 94,4%, dok samo ~ 2% razvija bolest, što dovodi do zaključka da su za razvoj bolesti vjerojatno ključni i drugi okolišni i genetički čimbenici (poput kolesterola u prehrani i dobi). Hiperlipoproteinemija tipa III uzrokuje povišenu razinu kolesterola, triglicerida i lipoproteina vrlo niske gustoće (VLDL) u krvi, koji nose kolesterol i lipoprotein u krvi. Nakupljanje kolesterola i drugih masnih tvari dovode do stvaranja malih, žutih izraslina na koži koje se nazivaju ksantomi i do razvoja ateroskleroze, što posljedično povećava rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Skupina autora ranije je pokazala da je e2 također povezan sa sporadičnom pojavom Parkinsonove bolesti, međutim to nije potvrđeno (77). Studije su također proučavale e2 kao potencijalni faktor rizika za senilnu makularnu degeneraciju, što je bolest oka koja je vodeći uzrok gubitka vida kod starijih osoba širom svijeta. Neke studije pokazale su da APOE e2 alel može povećati rizik od razvoja bolesti oka ili izazvati ranu pojavu simptoma, dok prisustvo barem jednog primjerka APOE e4 alela može pomoći u zaštiti od senilne makularne degeneracije ili odgoditi pojavu gubitka vida. Međutim, druge studije nisu pronašle povezanost te treba pojasniti kakvu ulogu APOE polimorfizam ima u razvoju senilne makularne degeneracije (78).

1.3.2. APOE e3

APOE e3 je 34 kDa proteinska komponenta serumskih hilomikrona, VLDL i HDL čestica. Posreduje pri vezanju, pridržavanju i katabolizmu ovih čestica kao posljedica interakcija s APOE receptorom i LDL receptorima u jetri i mozgu. On je „neutralni“, „divlji“ tip i sudjeluje u homeostazi masnih kiselina i stvaranju memorije (79).

1.3.3. APOE e4

Različito od prethodna dva alela, e4 ima važnu ulogu kod razvoja različitih bolesti. APOE e4 izoforma povećava rizik pri razvoju ateroskleroze (73), Alzheimerove bolesti (80), smanjuje volumen hipokampusa (81), smanjenu kognitivnu funkciju (81), bržu progresiju multiple skleroze (82), ima nepovoljan ishod nakon traumatske ozljede mozga (83), uzrokuje ishemijsku cerebrovaskularnu bolest (84), apneju u snu (85), ubrzano skraćuje telomere i neuralni razvoj. Jedina značajna prednost e4 alela (u odnosu na e2 i e3) je povezanost s višim razinama vitamina D (86).

Razvoj kardiovaskularnih bolesti nastaje kod nosioca e4 alela akumulacijom masnih naslaga i stvaranjem ožiljka u stjenkama arterija. To progresivno sužava arterije i povećava rizik od srčanog i moždanog udara (84).

Imajući na umu da se osim u jetri, koja je glavno mjesto sinteze proteina, APOE sintetizira u astrocitima i mikrogliju u mozgu, možemo objasniti njegovu ulogu u bolestima vezanima za središnji živčani sustav. U mozgu sudjeluje u raspodjeli kolesterola kod popravka, rasta i mijelinizacije membrane živčanih stanica za vrijeme razvoja i starenja. Također je važan i nakon smrti stanica potaknutoj ozljedama mozga, bilo da se radi o ishemičnim, bilo traumatskim ozljedama, ali i za vrijeme epileptičkih napadaja (87).

Uloga e4 izoforme najbolje je opisana u bolesnika s kasnom pojavom Alzheimerove bolesti. Važno je u početku napomenuti da 40-65% bolesnika s Alzheimerovom bolešću ima najmanje jednu kopiju e4 alela, međutim APOE nije osnovna odrednica bolesti (88). Jedna trećina bolesnika s Alzheimerovom bolešću je APOE e4 negativna, a neki APOE e4 homozigoti nikada ne razvijaju bolest. Procjena rizika ovisno o zastupljenosti e4 alela: pojedinci s dvije kopije e4 alela nalaze se u najvećem riziku. Tipične procjene upućuju na to da jedan e4 alel daje dvostruko

ili trostruko povećanje vjerojatnosti pojave Alzheimerove bolesti, dok dvije kopije (e4 homozigotne) daju 8 do 12 puta veću vjerojatnosti u usporedbi s osobama koje nisu nosioci e4 izoforme (88). Kod koga će se bolest razviti, ovisi o različitim čimbenicima koji mogu utjecati na APOE e4 i povećati rizik za razvoj bolesti, a to su: spol (veća učestalost kod žena), vaskularni čimbenici rizika (pušenje, dijabetes, hipertenzija, hiperkolesterolemija) te drugi geni ili čimbenici okoliša (npr. gen Saitohin (STH) leži unutar introna humanog tau gena i može imati ulogu u reguliranju izoformi) (89).

Mehanizam kojim APOE e4 utječe na razvoj Alzheimerove bolesti nije poznat i može uključivati više putova. Alzheimerovu bolest karakterizira nakupljanje agregata peptida beta-amiloida (90). APOE je u mozgu uključen u homeostazu kolesterola. Pruža neuronsku zaštitu i sudjeluje u popravku oštećenja ulogom nosača koji pomaže uklanjanju amiloid-beta (A β) u krvotok. APOE pojačava proteolitičku razgradnju tog peptida unutar i između stanica, oksidirani e4 veže A β puno brže nego e3 i može utjecati na sekvestraciju A β u plakovima. Međutim, izoforma APOE e4 nije tako učinkovita kao druge izoforme u odvijanju ovih reakcija, što rezultira povećanom osjetljivošću pojedinca na razvoj Alzheimerove bolesti i demencije kod osoba ako su nosioci bilo koje varijante izoforme e4 (91).

Osim Alzheimerove bolesti, dosadašnji radovi pronašli su povezanost između polimorfizma APOE i traumatske ozljede mozga te ishod bolesti. Dokazano je da APOE e4 povezan s lošijim ishodom, tj. težim oporavkom nakon traumatske ozljede mozga, bez obzira na ozbiljnost početne ozljede (92). Isto tako traumatska ozljeda mozga povećava rizik za razvoj Alzheimerove bolesti, što je vidljivo kod bolesnika s APOE e4. To nastaje prvenstveno zbog smanjene sposobnosti popravljivanja sinapsa te zaštite neurona nakon ozljede u usporedbi s nosiocima drugih izoformi. Povećani razvoj demencije kod pacijenata s traumatskom ozljedom mozga pokazuje da trauma mozga precipitira taloženje A β , a povećano taloženje dokazano je postmortem kortikalnim ekstraktima iz akutnih bolesnika s ozljedama mozga (91). Međutim, dokazano je da kod 10% osoba koji nisu nosioci APOE e4, a imaju traumatsku ozljedu mozga, dolazi do razvoja plakova A β , što je nedvojbeno puno manje nego kod bolesnika s jednim ili dva APOE e4 alela (35% i 100%). Na razvoj kronične traumatske encefalopatije ili demencije pugilistike također utječe APOE e4 (92). Akumulirajuće traumatske ozljede rezultiraju tim stanjima, a ishod je lošiji kod nosioca APOE e4. Takav povećan rizik za razvoj kronične

traumatske encefalopatije ili demencije pugilistike opisan je kod nogometnih igrača i boksača (93).

Uzimajući u obzir studije koje povezuju loš ishod traumatske ozljede mozga i lošeg neurološkog ishoda, pretpostavilo se da tijekom cerebrovaskularnih bolesti dolazi do istog rezultata kod nosioca APOE e4. Međutim, višestruke studije unutar različitih etničkih skupina pokazale su da je loš neurološki ishod, kod bolesnika koji nose APOE e4 alel, s ishemijskim infarktom sličan onome kod osoba koji nisu nosioci toga alela (94, 95). Ipak, istraživanjem je dokazana povezanost između nosioca APOE e4 i slabog neurološkog ishoda kod pacijenata koji su imali ili subarahnoidalno krvarenje ili intrakranijalno krvarenje (94).

Uz do sada opisane bolesti povezane s polimorfizmom APOE mozga, veliku pozornost posvetilo se i bolesti koja izaziva kroničnu upalnu i degenerativnu promjenu središnjeg živčanog sustava i kralježničke moždine – multiplu skelrozu (MS). Prvotno istraživanje, rađeno na danskoj populaciji, pokazalo je veću učestalost MS-a u bolesnika s APOE e4 homozigotnim pojedincima (82, 96). Iako su prvi rezultati bili pozitivni, brojne studije nisu ustanovile nikakvu povezanost između APOE alela i MS-a (97). Daljnjim istraživanjem podržana je uloga APOE e4 kao modifikatora progresivnog razvoja MS-a, što ima negativan utjecaj na patologiju mozga, kognitivnu disfunkciju i ozbiljnost (98). Međutim meta-analize nisu podržale ulogu APOE u moduliranju MS-a rizika (99). Različite rezultate vezane uz povezanost APOE i MS-a mnogi su autori opravdali ograničenim uzorkom za analizu pa se smatra da su potrebne nove studije s dužim praćenjem bolesnika s MS-om kako bi se moglo zaključiti postoji li povezanost APOE e4 i progresije MS-a.

1.4. ULOGA APOE U EPILEPSIJI

Kako APOE ima veliku ulogu u održavanju homeostaze lipida središnjeg živčanog sustava i sudjeluje u transportu kolesterola, što omogućuje popravak oštećenja mozga (100), poraslo je zanimanje za njegovu ulogu kod pacijenata s epilepsijom. Dobro je znano da je osnovna karakteristika napadaja povišena podražljivost neurona, sklonost hipersinkronizaciji neuronskog izbijanja te promjene u sinaptičkim funkcijama, što dovodi do promjena u ionskom okruženju, čime se dodatno povisuje njihova podražljivost. Napadaj dovodi do brojnih metaboličkih posljedica, koje se očituju porastom moždanog krvnog protoka, te u

povećanoj potrošnji glukoze i kisika. Zbog dugog trajanja napadaja dolazi do aktivacije anaerobnog metabolizma, nakupljanja lakta i cikličkih nukleotida, inhibira se regionalna sinteza bjelančevina, što rezultira oštećenjem moždanog tkiva (101). Imajući u vidu ulogu APOE i njegovih izoformi u neurodegeneraciji (102) pretpostavilo se da APOE ima i ulogu u epileptogenezi. Smatra se da regulira proizvodnju, metabolizam i klirens β -amiloida, koji pak ima utjecaj na mehanizme popravka u živčanom sustavu tkiva koji predstavlja epileptogeni fokus (103, 104). Mehanizmi kojima APOE utječe na oporavak živčanih stanica nisu potpuno razumljivi. Jedno od mogućih objašnjenja je da je APOE e4 povezan s povećanim amiloidnim taloženjem i posljedično tome degeneracijom živčanih stanica (105). Zatim se smatra da je moguće da povećava osjetljivost CA1 neurona (neuroni u regiji CA1 hipokampusa čine izlazni put važan u dugoročnoj memoriji i prostornim vezama) na traumatu i oksidativni stres putem ekscitotoksičnih mehanizama (106). Kao jedno od mogućih objašnjenja je već ranije spomenuto da APOE e4 povećava A β vezivanje peptida te na taj način smanjuje stabilnost citoskeleta, što dovodi do pomaka mikrotubula i oštećenja neurona, sprječava rast, smanjuje sinaptogenezu i sinaptičku plastičnost nakon neuronske ozljede (107). Navedene mehanizme, koji nastaju kod nosioca APOE e4, potkrepljuju i istraživanja skupina autora koji su istraživali upalne procese i zbivanja u mozgu ovisno o genotipu. Njihov zaključak je da ako osoba ima i jedan APOE e2 alel, zaštićena je od nakupljanja A β plakova, što je u skladu s prethodnim istraživanjima koji vežu ovaj genotip sa zaštitom protiv Alzheimerove bolesti (108). Osobe koje imaju APOE e3, imaju veću sposobnost povećanja ekspresivnosti proteina akutne faze, što dovodi do smanjene mogućnosti oštećenja DNK (deoksiribonukleinske kiseline) stanice i same smrti, dok su osobe s APOE e4 najizloženije u odnosu na druge genotipove jer imaju najlošiji odgovor u akutnoj fazi i veliki rizik za oštećenje i smrt stanica (109).

Dosadašnja istraživanja, koja su nastojala povezati utjecaj APOE i epilepsije, većinom su proučavala povezanost APOE s epilepsijom temporalnog režnja i mezijalnom hipokampalnom sklerozom. Dok kod pojedinih radova nije nađena međusobna povezanost APOE s epilepsijom temporalnog režnja (110-112), kao niti s mezijalnom temporalnom lobarnom epilepsijom s hipokampalnom sklerozom (113), što su uglavnom opravdavali ograničenom veličinom uzorka, kod drugih je ipak pronađeno da postoji povezanost APOE, i to izoforme e4 s povećanim rizikom razvoja posttraumatskih napadaja (114), ranijim početkom temporalne lobarne epilepsije (115), pojavom refraktornih složenih parcijalnih konvulzija (116), pojavom

postiktalne konfuzije (117) i mezijalne temporalne lobarne epilepsije bez lezije (118). Proučavajući pacijente s epilepsijom dokazano je da nosioci APOE ε4 izoforme imaju veće kognitivno oštećenje u odnosu na druge izoforme (119).

1.5. ULOGA APOE KOD DJECE

Neuroplastičnost je sposobnost središnjeg živčanog sustava da se promijeni, preoblikuje i reorganizira kao odgovor na vanjske ili unutarnje čimbenike. Sama neuroplastičnost povezana je i s razvojem mozga kroz cijeli život (120, 121). Razvoj mozga je dugotrajan proces i nastavlja se u odrasloj dobi. Obuhvaća nekoliko procesa: neurulacija, proliferacija, migracija, dendritički razvoj, sinaptogenezu, diferencijaciju i apoptozu. Rani razvoj započinje u drugom tjednu trudnoće formiranjem neuralne cijevi iz neuralne ploče. Između 6. i 8. tjedna trudnoće dolazi do dijeljenja stanica, tj. proliferacije. Nastaju nove stanice/neuroni od kojih neke migriraju u različite dijelove mozga slijedom kemijskih putova uz radijalna vlakna (122, 123). Kada neuroni migriraju, počinje diferencijacija stanica prema njihovoj daljnjoj funkciji te stvaranje veza koje dovode do početne aktivnosti (124). Svi ti razvojni procesi pod utjecajem su različitosti vanjskih i unutarnjih čimbenika (125). Rođenjem djeteta proces sazrijevanja mozga ne staje nego se nastavlja u odrasloj dobi. Sama sinaptogeneza i brz rast dendrita najizraženiji su od 8. mjeseca života do 2,5 godine i dovode do razvoja sinapsi koje su brojnije nego u odrasloj dobi, ali isto tako i selektivnih eliminacija što omogućuje prilagodbu mozga na čimbenike okoliša (126). U tom razdoblju javlja se prekomjerni rast dendrita i njihova selekcija prilikom čega ostaju najfunkcionalnije veze. Nakon toga razdoblja rast dendrita se nastavlja u nešto manjem opsegu do 5. godine života. Prema novim istraživanjima ovaj je rast usporeniji, ali prisutan do 26.-27. godine života (127, 128). Zajedno s dendritičkim razvojem dolazi i do sinaptogeneze koja je također najveća u prve dvije godine života, a zatim slijedi pad do 16. godine (129, 130). Prekomjerna proizvodnja sinapsi dovodi do veće mogućnosti prilagodbe, reorganizacije i oporavka nakon lezije mozga u ranom razvoju (131, 132). Paralelno s ovim procesima odvija se i mijelinizacija, tj. stvaranje mijelinskog omotača važnog za brži prijenos živčanih impulsa. Najintenzivnije razdoblje stvaranja mijelina je nakon rođenja pa do 2. godine života i potom u razdoblju između 7. i 9. godine te 11. i 12. godine (133). Neke studije navode da mijelinizacija završava u kasnoj adolescentskoj dobi, ali druga istraživanja navode da traje do 25. godine života (134). Uzimajući u obzir sve navedene procese, dolazimo do zaključka da

je mozak dugo vremena nezreo i podložan oštećenju, ali i lakšem oporavku. Postoje tri načina kako se mozak mijenja nakon ozljede i pokazuje plastične promjene koje poboljšavaju oporavak, moguće promjene u organizaciji preostalih krugova u mozgu, razvoj novih krugova, što vjerojatno uključuje stvaranje novih sinapsi i proizvodnju živčanih stanica i glije kako bi se zamijenile barem neke živčane stanice (135). Kakav će biti konačan ishod plastičnosti i funkcionalnosti, ovisi o trenutku kada je ozljeda nastala, dobi djeteta i fazi razvoja mozga (136, 137). Sposobnost neuroplastičnosti u dječjoj dobi može se pripisati velikom broju stanica neurona i sinaptičkih veza, a nastaje radi sazrijevanja inhibicije, ekstracelularnog matriksa i mijelinizacije (138). Plastičnost tijekom razvoja može biti adaptivna (prilagodljiva) ili maladaptivna (neprilagodljiva), ali ovisi o dobi. Primjer adaptivne plastičnosti je kada kod djeteta nakon funkcionalne hemisferektomije refraktorne epilepsije druga polutka mozga preuzme motoričku funkciju, ali i sam govor. To nam pokazuje da je najveći potencijal za reorganizaciju mozga kod djece (139) dok se u odrasloj dobi češće radi o maladaptivnoj plastičnosti – na već modeliranom mozgu, što često rezultira neuobičajenom neuralnom organizacijom. Mozak se kroz život mijenja i strukturalno i funkcionalno, a rana dijagnoza i intervencija pruža nam mogućnost sprečavanja oštećenja ili omogućava bolju prilagodbu mozga na okoliš i ozljedu.

1.6. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Hipoteza istraživanja:

Polimorfizam gena apolipoproteina E ima utjecaj na vrstu epilepsije kod djece

Primarni ciljevi - utvrditi

1. postoji li razlika u pojedinoj vrsti epilepsije ovisno o polimorfizmu gena APOE kod djeteta
2. postoji li razlika u pojedinoj podvrsti epilepsije ovisno o polimorfizmu gena APOE kod djeteta.

Sekundarni ciljevi – utvrditi:

1. postoji li razlika u zastupljenosti apolipoproteina E te ukupnom i LDL kolesterolu u eksperimentalnoj i kontrolnoj skupini;
2. postoji li razlika u dobi početka bolesti ovisno o genotipu djeteta;
3. postoji li razlika u ukupnom kolesterolu i LDL kolesterolu ovisno o vrsti epilepsije kod djeteta;
4. postoji li razlika u ukupnom kolesterolu i LDL kolesterolu ovisno o genotipu djeteta;
5. postoji li razlika u kontroli bolesti ovisno o genotipu koji dijete ima;
6. postoji li razlika u kontroli bolesti ovisno o primijenjenoj terapiji kod djeteta.

2. MATERIJALI I METODE

Istraživanje je provedeno u Kliničkom bolničkom centru “Sestre milosrdnice“ na Klinici za pedijatriju, odjelu dječje neurologije s epileptologijom i u Kliničkom zavodu za kemiju. Studija je bila retrospektivna i prospektivna, a retrospektivni dio podataka dobiven je uvidom u povijesti bolesti. Farmakogenetička obrada provedena je u Kliničkom zavodu za kemiju Kliničkog bolničkog centra “Sestre milosrdnice“, Zagreb.

2.1. OPIS ISPITANIKA

2.1.1. Skupina bolesnika

U studiju je bilo uključeno 254 ispitanika oba spola, pacijenata iz Kliničkog bolničkog centra “Sestre milosrdnice“, Klinike za pedijatriju, odjela za dječju neurologiju s epileptologijom. Ispitanici potječu iz raznih dijelova Hrvatske, a u KBC “Sestre milosrdnice“ bili su upućeni od nadležnih liječnika te su ili ambulantno ili stacionarno liječeni. Svi ispitanici su pedijatrijska populacija, dakle u dobi od rođenja do 18 godina, te su u njihovo ime roditelji, uz dobivena detaljna objašnjenja svih procedura i postupaka, potpisali informirane pristanke za sve potrebne i učinjene dijagnostičke obrade i liječenja. Istraživanje je odobreno i od etičkog povjerenstva KBC-a “Sestre milosrdnice“.

Za sve ispitanike će biti prikupljeni sljedeći podaci:

- dob
- spol
- dob javljanja prvih konvulzija odnosno početak bolesti
- profil lipida u krvi (kolesterol, HDL, LDL, trigliceridi)
- glavna i dijagnoze ostalih bolesti
- započeto liječenje
- vrsta lijeka koju uzima
- rezultati genotipizacije
- kontrola bolesti

2.1.2. Karakteristike ispitanika

Ukupan broj ispitanika koji ima dijagnosticiranu epilepsiju je bio 111, od kojih je bilo 60 djevojčica i 51 dječak.

Skupina koja je korištena za kontrolnu usporedbu raspodjele apolipoproteina i relevantnih anamnestičkih podataka sastojala se od ispitanika koji odgovaraju po dobnoj i spolnoj raspodjeli i ispitanicima oboljelim od epilepsije, a sami ne boluju od epilepsije (N=143). U kontrolnoj skupini imali smo 71 djevojčicu i 72 dječaka.

2.1.3. Dijagnoze bolesnika koji su sudjelovali u istraživanju

Ispitanici, koji su ušli u istraživanje, zadovoljili su kriterije za postavljanje dijagnoze epilepsije prema kriterijima Internacionalne lige protiv epilepsije te će biti klasificirani prema kriterijima iz 1989.g. Podjela ispitanika prema podvrsti epilepsije može se pronaći u Tablici 7.

Tablica 7. Podjela ispitanika prema podvrsti epilepsije

| PODVRSTA EPILEPSIJE | BROJ ISPITANIKA(N) | POSTOTAK ISPITANIKA(%) |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|
| Žarišna idiopatska epilepsija | 48 | 43,2 |
| Žarišna simptomatska epilepsija | 13 | 11,7 |
| Generalizirana idiopatska epilepsija | 30 | 27,0 |
| Generalizirana simptomatska epilepsija | 8 | 7,2 |
| Epileptički sindromi | 4 | 3,6 |
| Neklasificirana | 8 | 7,2 |

Antiepileptički lijekovi, kojima su ispitanici liječeni, pokazani su u tablici 8, a podijeljeni su po djelovanju na CYP metabolizam. U tablici 9 prikazana je podjela ispitanika prema vrsti terapije.

Tablica 8. Lijekovi koje su bolesnici uzimali s različitim djelovanjem na CYP metabolizam

| Induciraju | Inhibiraju | Nemaju utjecaj |
|--------------|-----------------|----------------|
| Fenobarbiton | Valproat | Lamotrigin |
| Karbamazepin | Klonazepam | Levetiracetam |
| Fenitoin | Topiramamat | Vigabatrin |
| | Klobazam | Etosukcimid |
| | Okskarbamazepin | |

Tablica 9. Podjela ispitanika prema vrsti terapije

| VRSTA TERAPIJE | BROJ ISPITANIKA (N) | POSTOTAK (%) |
|-----------------------------------|------------------------|--------------|
| Inhibitori | 52 | 46,8 |
| Induktori | 14 | 12,6 |
| Nema utjecaja | 20 | 18,0 |
| Dva različita inhibitora | 2 | 1,8 |
| Inhibitor i induktor | 5 | 4,5 |
| Inhibitor i terapija bez utjecaja | 7 | 6,3 |
| Induktor i terapija bez utjecaja | 4 | 3,6 |
| Dvije terapije bez utjecaja | 1 | 0,9 |
| Sve tri vrste terapije | 2 | 1,8 |
| Bez terapije | 4 | 3,6 |

2.2. GENOTIPIZACIJA

2.2.1. Izolacija DNK-a

Svoj djeci vađena je venska krv iz koje se u Kliničkom zavodu za kemiju KBC-a “Sestre milosrdnice“ učinila genotipizacija apolipoproteina E (APOE) te profil lipida u krvi. Uzorci krvi za analizu apolipoproteina E (5-7mL) izvađeni su u Vacutainer® epruvete (BectonDickinson, MeylanCedex, Francuska) s EDTA antikoagulansom i do izolacije deoksiribonukleinske kiseline (DNK) čuvani su na -20°C te upotrebljeni unutar mjesec dana. Leukocitna DNK za genotipizaciju izolira se standardnom metodom isoljavanja.

Postupak:

Sat prije početka izolacije pripremi se termostat i temperira Elution Buffer otopina na +70°C. Uzorke pune krvi za izolaciju izvadi se iz hladnjaka i temperira na sobnoj temperaturi (+15 do +25°C). Pripremi se obrazac za izolaciju DNK-a u koji se upišu imena i prezimena te šifre uzoraka (oznaka, datum otvaranja svakog korištenog reagensa (cijelog kita)). U stalak se postavi Eppendorfice te označe rednim brojevima. Potrebno je lagano promiješati uzorke pune krvi da se homogeniziraju. Pipetirati 200 µL uzorka u Eppendorficu od 1,5 mL. Dodati 200 µL Binding Buffer otopine u Eppendorficu s uzorkom. Dodati 40 µL otopljene proteinaze K i kratko vortexirati (10 sekundi). Inkubirati na 70°C 10 min. Kratko centrifugirati Eppendorfice, dodati 100 µL izopropanola, kratko vortexirati (10 sekundi). Ponovno kratko centrifugirati Eppendorfice. U stalak postaviti High Filter Tube, označiti ih rednim brojevima te ih postaviti u kivete za sakupljanje (Collection Tube). Homogenizirati sadržaj Eppendorfice laganim uvlačenjem i izvlačenjem sadržaja Eppendorfice u nastavak pipete. Prebaciti sadržaj Eppendorfice u High Filter Tube, začepti tube i centrifugirati 1 min na 8 000 g. Baciti eluat. Postaviti High Filter Tube u nove kivete za sakupljanje, dodati 500 µL Inhibitor Removal Buffer otopine u Filter Tube i centrifugirati 1 min. na 8 000 g. Baciti eluat. Postaviti High Filter Tube u nove kivete za sakupljanje, dodati 500 µL Wash Buffer otopine u Filter Tube i centrifugirati 1 min. na 8 000 g. Baciti eluat. Postaviti High Filter Tube u nove kivete za sakupljanje, dodati 500 µL Wash Buffer otopine u Filter Tube i centrifugirati 1 min. na 8 000 g. Centrifugirati još jednom 10 sekundi na 21 000g. Baciti eluat. U stalak postaviti Eppendorfice te ih označiti šiframa kako je naznačeno na obrascu. Premjestiti High Filter Tube u Eppendorfice označene šiframa i dodati 200 µL prethodno zagrijane Elution Buffer otopine i centrifugirati 1 min na 8 000 g. Baciti High Filter Tube, začepti epruvetu koja sadrži izoliranu DNA i spremi je u kutiju označenu odgovarajućom šifrom, koju je uzorak dobio pri prijemu u Odsjek. Izolirani uzorci DNA pohranjuju se u hladnjak na +4°C.

2.2.2. Genotipizacija APOE

Kit za detekciju mutacije sadrži sve klasične komponente PCR reakcije (dNTP, Mg²⁺, polimerazu, primere, reakcijski pufer) i fluorescentno obilježene sonde koje su komplementarne odsječku DNK-a u blizini polimorfizma. Detekcija fluorescencije u realnom vremenu omogućena je prijenosom energije između donorske i akceptorske boje kada se sonde

Monika Kukuruzović, Disertacija

nalaze u blizini. To se događa kada je DNK uzorak u jednolančanom obliku, tj. nakon denaturacije. Kada dolazi do sinteze novog lanca, DNK polimeraza "izbacuje" probe s kalupa DNK-a i fluorescencija se gasi.

Detekcija genotipa zasniva se na određivanju krivulje taljenja (engl. melting curve analysis). Probe su dizajnirane tako da su savršeno komplementarne ili uzorku divljeg tipa ili uzorku kod kojega je prisutan polimorfizam. Temperatura taljenja ovisit će o stupnju homologije između probi i uzorka - lakše će se rastaliti onaj uzorak kod kojeg probe nisu savršeno komplementarne. Kada dolazi do taljenja, DNK prelazi iz dvolančanog u jednolančani oblik i pojavljuje se fluorescencija, što znači da će se na nižoj temperaturi rastaliti uzorak kod kojeg sparivanje nije 100% komplementarno. Računalni program prevodi signal u krivulju s maksimumom na temperaturi taljenja, na osnovi čega se očitava genotip. Genotipizacija APOE izvodi se na način propisan u korištenom komercijalnom kitu LightMix Kit APOE 16 C112R R158C (TIB Molbiol Syntheslabor GmbH) za rad na uređaju: LightCyclerSystem v1.2 (Roche, Switzerland).

U stalak se prema redoslijedu na obrascu poslože uzorci DNK-a. Postoje dva sustava koja daju iste rezultate LC1.2 ili LC480. Ako se radi na LC1.2: Iz hladnjaka se izvadi hladni blok i u njega se poslože reagensi potrebni za izradu pretrage pazeći da se ne izlažu svjetlu. U hladni blok se sterilnom pincetom postave LightCycler kapilare u kojima se izvodi analiza. Ako se koristi LC480: prema protokolu pripreme se uzorci koji će biti ispipetirani u mikrotitarsku ploču za LC480. U odgovarajućim se obrascima nalaze količine reagensa za pipetiranje. U poljima se automatski izračunavaju količine potrebne za pipetiranje prema formuli:

Jedinična količina x broj uzoraka x (faktor uvećanja 10%) x (% preporučene reakcijske smjese).

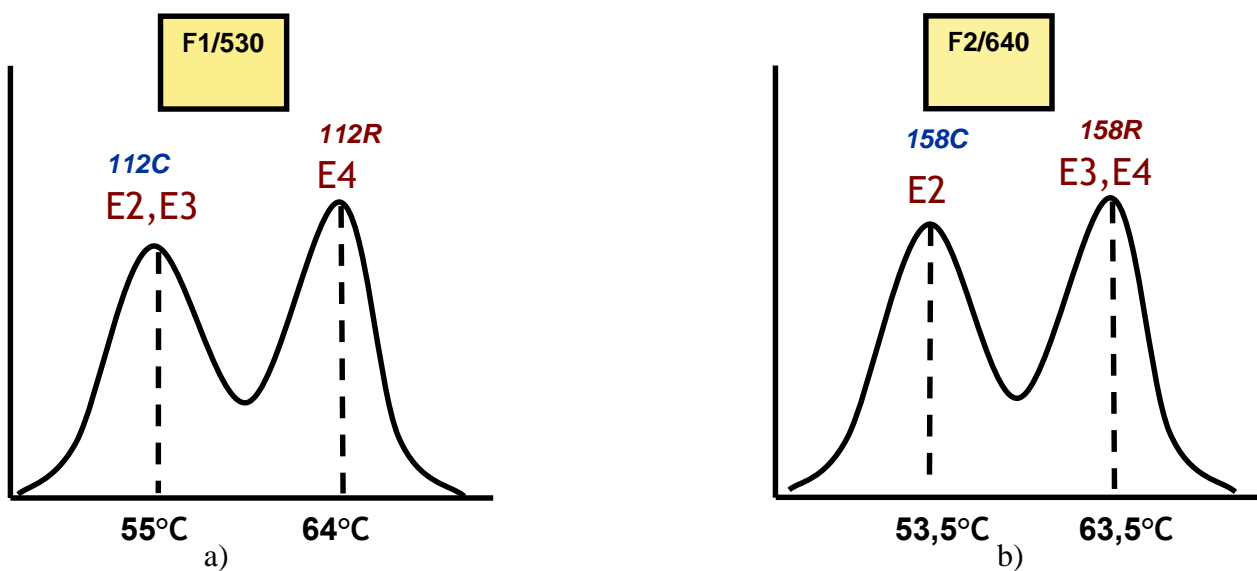
Svi parametri pojedinih analiza upisuju se na jedinstveno mjesto, gdje su definirane postavke, poput volumena, početnih i konačnih koncentracija, faktora razrjeđenja ili % volumena preporučene reakcijske smjese.

Pripremi se reakcijska smjesa (MIX) koja sadrži vodu (bijeli čep), mixprimera i probi (crveni čep iz kita tvrtke Tibmolbiol), Fast Start Mix (crveni čep iz kita tvrtke Roche) i ako je na obrascu tako naznačeno, Mg²⁺ (plavi čep), u količinama kako je naznačeno na obrascima. U svaku se reakcijsku posudu (kapilara ili jažica) ispipetira prvo zadana količina reakcijske smjese (MIX-a), a potom zadana količina DNA. LC1.2: Pincetom se uzme poklopac i oprezno zatvori

kapilare. Kapilare se zajedno s adaptorima postave u centrifugu i kratko centrifugiraju (5 sekundi). Nakon centrifugiranja adaptor se vrata u hladni blok, a kapilare postave na nosač na LightCycler aparatu. Pokrene se odgovarajući protokol za izradu analiza. LC480: Pripreme se uzorci ispipetirani u mikrotitrarskoj ploči na koju se stavlja folija, ploča se propisno obilježi i stavlja u PCR uređaj. Nakon izrade analize rezultat se očitava prema predlošcima rezultata sheme ažuriranog popisa u bazi pacijenata, što je prikazano na slici 3 a i b i u tablici 10.

Aleli: Divlji tip E3

Mutirani tip E2, E4



Slika 3. APOE (E2, E3, E4) Light Cycler

Tablica 10. Rezultati

| F1/530 | F2/640 | C112R | C158R | Rezultat |
|---------------|---------------|--------------|--------------|-----------------|
| E2, E3 | E2 | C | C | E2/E2 |
| E2, E3 | E3, E4 | C | R | E3/E3 |
| E4 | E3, E4 | R | R | E4/E4 |
| E2, E3 | E2, E3, E4 | C | C, R | E2/E3 |
| E2, E3, E4 | E2, E3, E4 | C, R | C, R | E2/E4 |
| E2, E3, E4 | E3, E4 | C, R | R | E3/E4 |

Uzorci krvi za analizu lipida u krvi bit će prikupljeni tijekom istog vađenja. Važno je napomenuti da su svi sudionici bili na tašte, tj. posljednji obrok je bio minimalno 14h prije prikupljanja uzorka krvi. Analize se rade u serumu. Serum je dobiven iz pune krvi bez dodatka antikoagulansa (epruvete s podtlakom proizvođača Greiner Bio-one, Austrija) nakon centrifugiranja kroz 15 min. na 3500 ok/min. Instrument, odnosno automatski analizator na kojem se analizira, može biti AU2700 (Beckman, SAD) ili Architect c8000 (Abbott, SAD). Do srpnja 2014.g. prikupljeni podatci rađeni su na Beckmanu, a odonda do danas na Abbottu.

Metode kojima se dobije pojedini lipid prikazane su u sljedećoj tablici.

Tablica 11. Metode mjerenja lipida

| | |
|---|--|
| Ukupni kolesterol | Enzimatska, kolorimetrijska metoda (CHOD/PAP) s kolesterol-oksidadom; mjerenje absorbancije na valnoj duljini 500 nm |
| Trigliceridi | Enzimatska, kolorimetrijska metoda (GPO/PAP) s glicerol-fosfat-oksidadom; mjerenje absorbancije na valnoj duljini 500 nm |
| HDL-kolesterol | Homogena imunoseparacijska metoda sa sekundarnom enzimatskom kolorimetrijskom CHOD/PAP metodom mjerenje absorbancije na valnoj duljini 500 nm |
| LDL-kolesterol (direktni) koristi se samo kad je koncentracija triglicerida >3,8 mmol/L | Homogena imunoseparacijska metoda sa sekundarnom enzimatskom kolorimetrijskom CHOD/PAP metodom mjerenje absorbancije na valnoj duljini 500 nm |
| LDL-kolesterol (izračun po Friedwaldu) | Na temelju nalaza triglicerida, ukupnog kolesterola i HDL-kolesterola prema Friedwaldu $LDL-kol = ukupni\ kol. - HDL-kol. - \frac{trigl}{2,2}$ |

2.3. STATISTIČKA OBRADA

Statistička obrada dobivenih podataka izvedena je uz pomoć statističkih programa:

Microsoft® Office XP Excel Redmond, SAD

- prikupljanje i priprema podataka

IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY, SAD: IBM Corp, 2017.

- analiza podataka i izrada grafova
- podatci su prikazani tablično i grafički.

Opisna statistika je prikazana kroz odgovarajuće udjele i apsolutne frekvencije za kategorijske varijable, dok su se kontinuirane vrijednosti prikazale kroz pripadajuće medijane i interkvartilne raspone.

Razlike u kategorijskim vrijednostima analizirane su χ^2 testom, odnosno Fisher-Freeman-Haltonovim egzaktnim testom u slučajevima kada je po pojedinoj ćeliji bilo manje od 5 ispitanika.

Izračun Hardy-Weinbergove ravnoteže za multiple polimorfizme APOE načinjene su prema uputama na mrežnoj stranici <http://www.bio.miami.edu/dana/dox/trinomial.html>, odnosno preko formule $p^2 + 2pq + q^2 + 2pr + 2qr + r^2 = 1.0$ te su se pomoću χ^2 testa usporedile s dobivenim podatcima.

Razlike u kontinuiranim (numeričkim) vrijednostima koje su bile granične analizirane su Mann-Whitney U testom, odnosno Kruskal-Wallisovim testom (kada je bilo više od dvije usporedne skupine).

Pojedine značajne razlike prikazane su Box i Whiskerovim plotovima (standardni prikaz: vrijednosti iznad najmanja vrijednost, 25. centila, medijan, 75. centila, najveća vrijednost). Outlieri (vanjske vrijednosti na Box i Whiskerovim plotovima) su definirani kao vrijednosti koje odstupaju najmanje 1,5 interkvartilnog raspona.

Sve P vrijednosti manje od 0,05 su smatrane značajnima.

Monika Kukuruzović, Disertacija

U analizi i grafičkim prikazima koristila se programska podrška IBM SPSS Statistics, verzija 25.0 (www.spss.com).

3. REZULTATI

3.1. PRIMARNI CILJEVI

3.1.1. RAZLIKA U POJEDINOJ VRSTI EPILEPSIJE OVISNO O POLIMORFIZMU GENA APOE KOD DJETETA

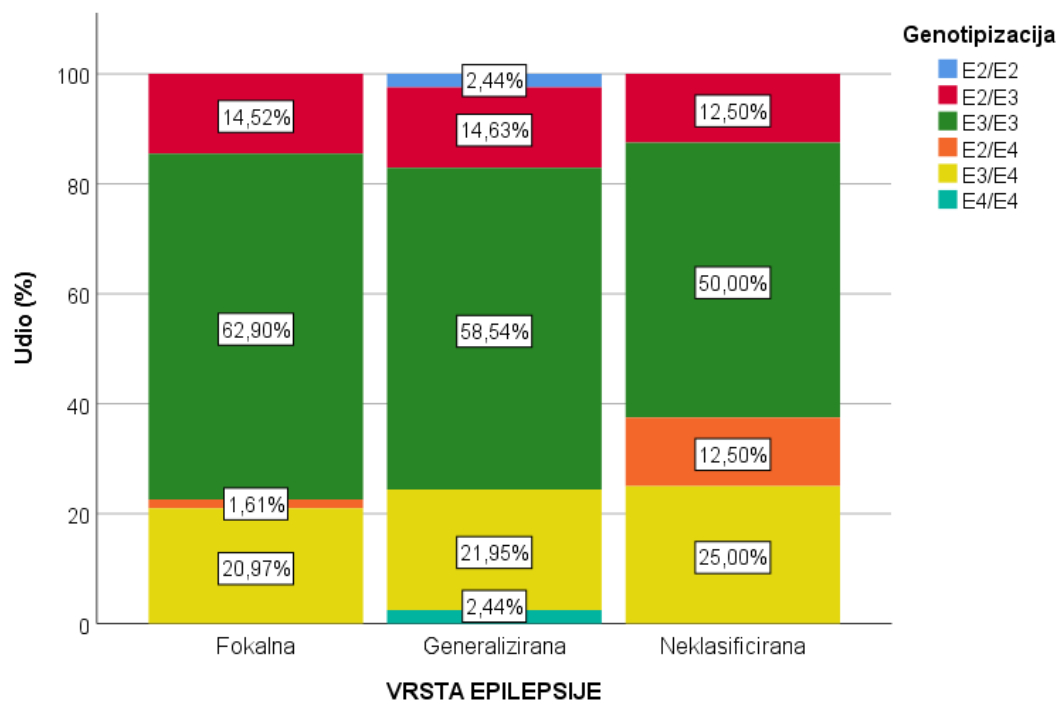
Rezultati u tablici 12 i na slici 4 prikazuju razlike u raspodjeli pojedinih polimorfizama gena APOE ovisno o vrsti epilepsije, što je u stvari odgovor na prvi primarni cilj i hipotezu istraživanja. Najveći udio alela pripada e3/e3 (od 50,0% do 62,9%) kao divljem tipu dok aleli e2/e2 i e4/e4 u 20-25 puta manjem omjeru.

Nije bilo značajnih razlika u raspodjeli pojedinih polimorfizama APOE s obzirom na žarišnu, generaliziranu i neklasificiranu vrstu epilepsije (P=0,529).

Tablica 12. Razlike u raspodjeli pojedinih polimorfizama gena APOE ovisno o vrsti epilepsije: Fisher-Freeman-Haltonov egzaktni test

| | | VRSTA EPILEPSIJE | | | | | |
|------------------------------------|-------|------------------|-------|----------------|-------|-----------------|-------|
| | | Žarišna | | Generalizirana | | Neklasificirana | |
| | | N | % | N | % | N | % |
| Polimorfizmi APOE | e2/e2 | 0 | 0,0% | 1 | 2,4% | 0 | 0,0% |
| | e2/e3 | 9 | 14,5% | 6 | 14,6% | 1 | 12,5% |
| | e3/e3 | 39 | 62,9% | 24 | 58,5% | 4 | 50,0% |
| | e2/e4 | 1 | 1,6% | 0 | 0,0% | 1 | 12,5% |
| | e3/e4 | 13 | 21,0% | 9 | 22,0% | 2 | 25,0% |
| | e4/e4 | 0 | 0,0% | 1 | 2,4% | 0 | 0,0% |

| | Vrijednost | P |
|--|------------|-------|
| Fisher-Freeman-Haltonov egzaktni test | 9,71 | 0,529 |
| N | 111 | |



Slika 4. Razlike u raspodjeli pojedinih polimorfizama gena APOE ovisno o vrsti epilepsije

3.1.2. RAZLIKA U POJEDINOJ PODVRSTI EPILEPSIJE OVISNO O POLIMORFIZMU GENA APOE KOD DJETETA

Odgovor na drugi primarni cilj (*Postoji li razlika u pojedinoj podvrsti epilepsije ovisno o polimorfizmu gena APOE kod djeteta*) prikazan je u tablicama 13 i 14 i slikama 5 i 6.

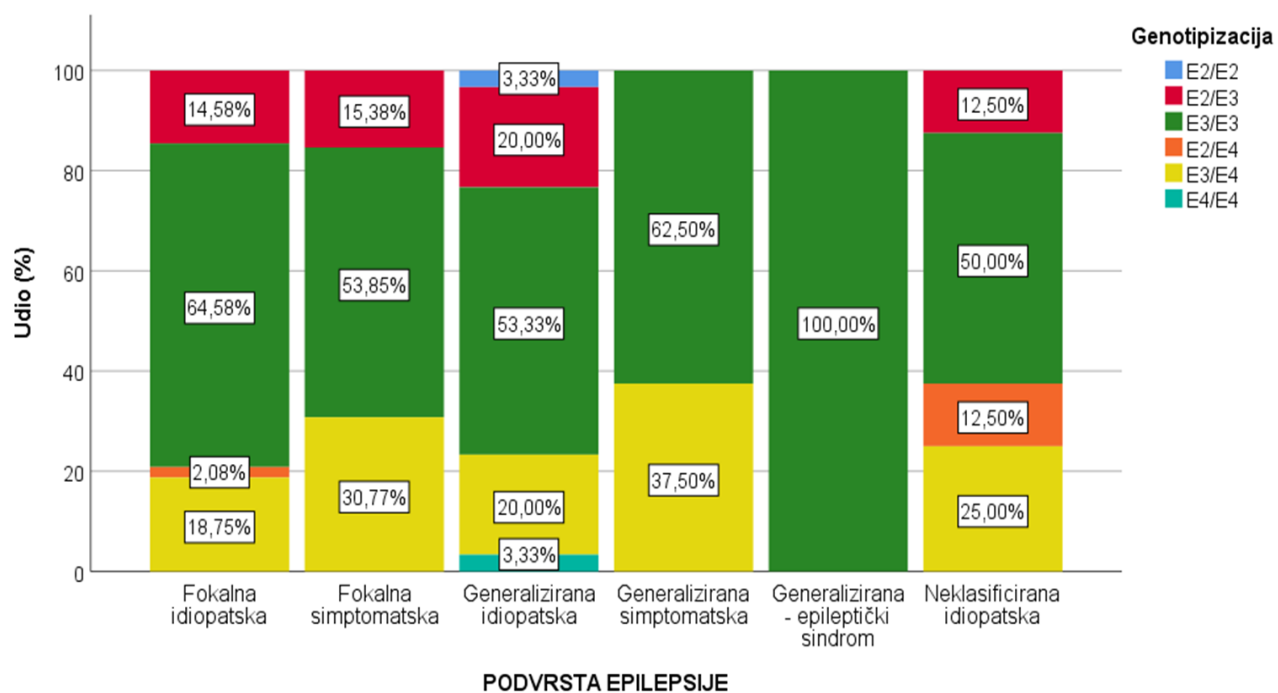
Tablica 13. Razlike u raspodjeli pojedinih polimorfizama gena APOE ovisno o podvrsti epilepsije: Fisher-Freeman-Haltonov egzakti test

| | | PODVRSTA EPILEPSIJE | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|-------|---------------------|-------|----------------------|-------|---------------------------|-------|-----------------------------|-------|--------------------------------------|--------|----------------------------|-------|
| | | Žarišna idiopatska | | Žarišna simptomatska | | Generalizirana idiopatska | | Generalizirana simptomatska | | Generalizirana - epileptički sindrom | | Neklasificirana idiopatska | |
| | | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % |
| Polimorfizmi APOE | e2/e2 | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% | 1 | 3,3% | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% |
| | e2/e3 | 7 | 14,6% | 2 | 15,4% | 6 | 20,0% | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% | 1 | 12,5% |
| | e3/e3 | 31 | 64,6% | 7 | 53,8% | 16 | 53,3% | 5 | 62,5% | 4 | 100,0% | 4 | 50,0% |
| | e2/e4 | 1 | 2,1% | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% | 1 | 12,5% |
| | e3/e4 | 9 | 18,8% | 4 | 30,8% | 6 | 20,0% | 3 | 37,5% | 0 | 0,0% | 2 | 25,0% |
| | e4/e4 | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% | 1 | 3,3% | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% |

| | Vrijednost | P |
|---|------------|-------|
| Fisher-Freeman-Haltonov egzakti test | 0,350 | 0,554 |
| N | 111 | |

Razlike u raspodjeli pojedinih polimorfizama gena APOE ovisno o podvrsti epilepsije prikazani su utablici 13 i na slici 5. Također, kao i u prethodnoj tablici, ovdje nije bilo značajnih razlika (P=0,554).

Razlike u raspodjeli pojedinih polimorfizama gena APOE ovisno radi li se o simptomatskoj ili idiopatskoj epilepsiji prikazane su utablici 14 i na slici 6. Nije bilo značajnih razlika (P=0,687)

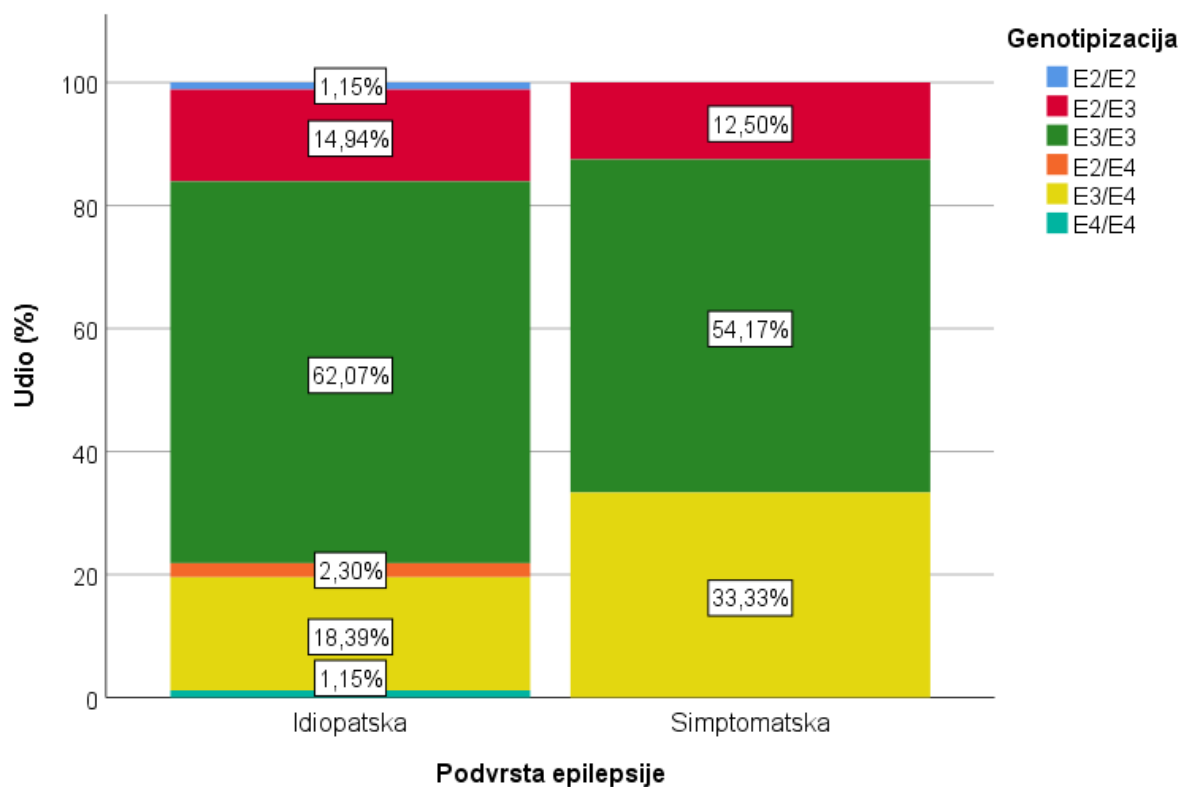


Slika 5. Razlike u raspodjeli pojedinih polimorfizama gena APOE ovisno o podvrsti epilepsije

Tablica 14. Razlike u raspodjeli pojedinih polimorfizama gena APOE ovisno radi li se o simptomatskoj ili idiopatskoj podvrsti epilepsije: Fisher-Freeman-Haltonov egzaktni test

| | | Simptomatska epilepsija | | | |
|------------------------------------|-------|-------------------------|-------|--------------|-------|
| | | Idiopatska | | Simptomatska | |
| | | N | % | N | % |
| Polimorfizmi APOE | e2/e2 | 1 | 1,1% | 0 | 0,0% |
| | e2/e3 | 13 | 14,9% | 3 | 12,5% |
| | e3/e3 | 54 | 62,1% | 13 | 54,2% |
| | e2/e4 | 2 | 2,3% | 0 | 0,0% |
| | e3/e4 | 16 | 18,4% | 8 | 33,3% |
| | e4/e4 | 1 | 1,1% | 0 | 0,0% |

| | Vrijednost | P |
|--|------------|-------|
| Fisher-Freeman-Haltonov egzaktni test | 3,267 | 0,687 |
| N | 111 | |



Slika 6. Razlike u raspodjeli simptomatskih i idiopatskih podvrsta epilepsije ovisno o polimorfizmu gena APOE u ispitivanoj skupini

3.2. SEKUNDARNI CILJEVI

3.2.1. RAZLIKA U ZASTUPLJENOSTI APOE TE UKUPNOM I LDL KOLESTEROLU U EKSPERIMENTALNOJ I KONTROLNOJ SKUPINI

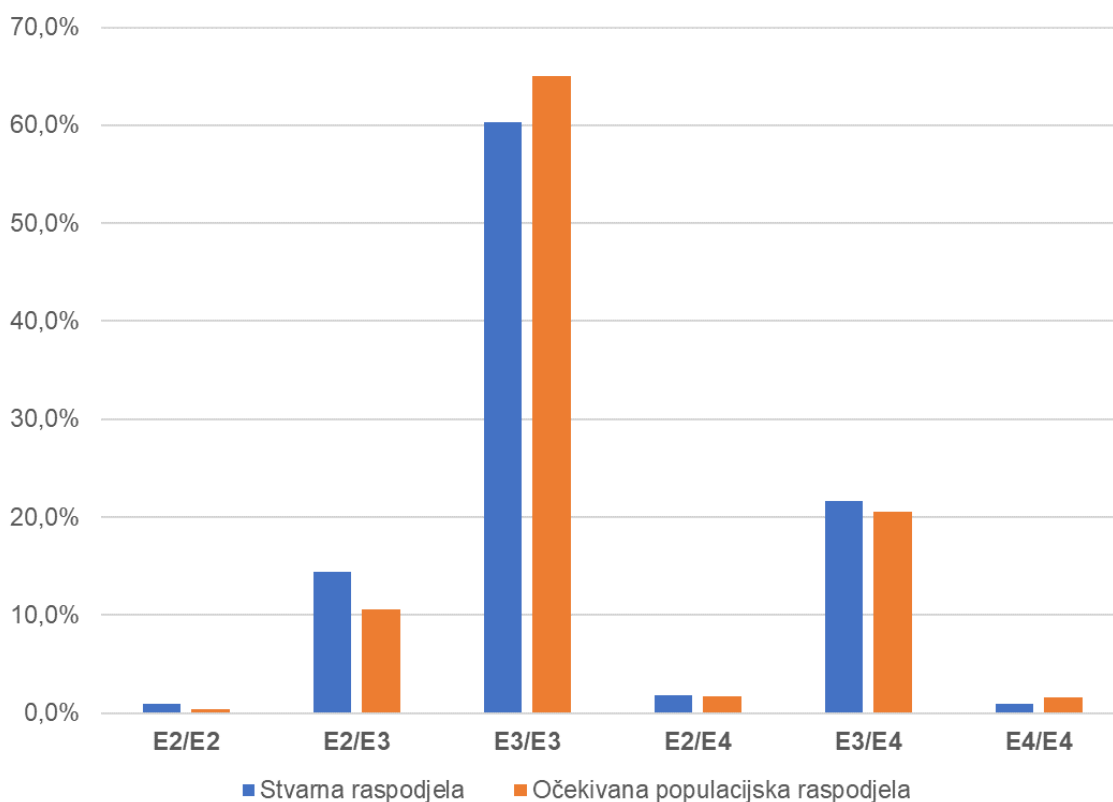
3.2.1.1. Postoji li razlika u zastupljenosti apolipoproteina E u ispitivanoj i kontrolnoj skupini

Tablica 15 i slika 7 prikazuju raspodjelu APOE polimorfizma u ispitivanoj skupini u odnosu na očekivanu raspodjelu u populaciji (Hardy Weinbergova ravnoteža). Nije bilo značajne razlike ($P=0,834$) te se može tvrditi da se polimorfizam APOE gena podjednako raspoređuje u djece oboljele od epilepsije kao i u općoj populaciji.

Tablica 15. Izračun Hardy-Weinbergove ravnoteže polimorfizma gena APOE u ispitivanoj skupini djece s epilepsijom (N=111)

| | | | Stvarna raspodjela | | Očekivana teoretska (populacijska) raspodjela | |
|--------------------------|-------|----------------|--------------------|-------|---|-------|
| | | | N | % | N | % |
| Polimorfizmi APOE | e2/e2 | p ² | 1 | 0,9% | 0 | 0,4% |
| | e2/e3 | 2pq | 16 | 14,4% | 12 | 10,6% |
| | e3/e3 | q ² | 67 | 60,4% | 72 | 65,0% |
| | e2/e4 | 2pr | 2 | 1,8% | 2 | 1,7% |
| | e3/e4 | 2qr | 24 | 21,6% | 23 | 20,6% |
| | e4/e4 | r ² | 1 | 0,9% | 2 | 1,6% |

| | |
|---------------------------------|------------------|
| X² test | 2,106 |
| Df | 5 |
| P | P = 0,834 |
| Koeficijent kontigencije | 0,097 |



Slika 7. Raspodjela APOE polimorfizma u ispitivanoj skupini

3.2.2.2. Postoji li razlika u zastupljenosti ukupnog i LDL kolesterola u ispitivanoj i kontrolnoj skupini

Tablice 16 i 17, zajedno sa slikama 8 i 9, odgovaraju na drugi dio sekundarnog cilja: *Postoji li razlika u zastupljenosti apolipoproteina E te ukupnom i LDL kolesterolu u eksperimentalnoj i kontrolnoj skupini*

Razlike u zastupljenosti djevojčica i dječaka, dobnih skupina, nalazima lipidograma te polimorfizama gena APOE između ispitivane i kontrolne skupine prikazane su u tablici 16. Kontrolna skupina u odnosu na ispitivanu skupinu ima značajno češće povišeni ukupni kolesterol (57,3% naprema 35,1%, $P < 0,001$) te povišeni LDL (40,6% naprema 21,6%, $P = 0,001$).

Dodatno su nalazi lipidograma prikazani i kao kontinuirane vrijednosti te je i tu dobivena značajna razlika (veće vrijednosti u kontrolnoj skupini) u ukupnom kolesterolu ($P < 0,001$) i

LDL-u ($P < 0,001$). Ove su razlike dodatno prikazane na Box i Whiskerovim plotovima (slike 8 i 9).

Tablica 16. Razlike u zastupljenosti djevojčica i dječaka, dobnih skupina, nalazima lipidograma te polimorfizama gena APOE između ispitivane i kontrolne skupine

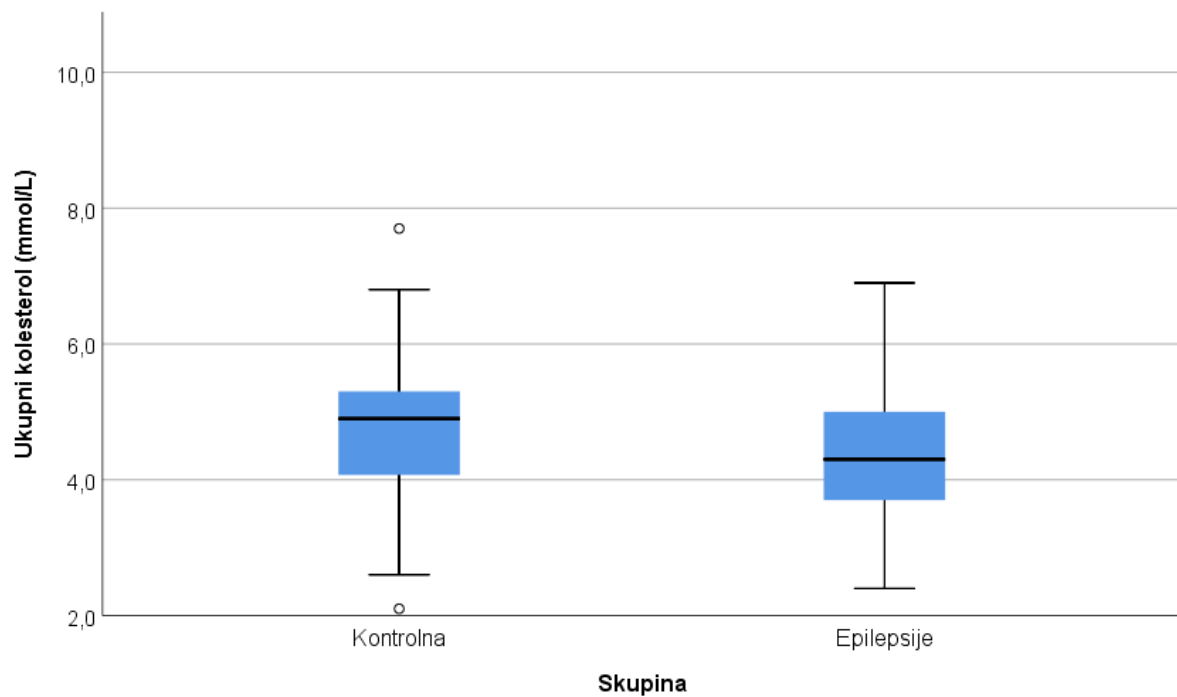
| | | Skupina | | | |
|----------------------------------|--------------|-----------|--------------|------------|--------------|
| | | Kontrolna | | Epilepsije | |
| | | N | % | N | % |
| Spol | Muški | 72 | 50,3% | 51 | 45,9% |
| | Ženski | 71 | 49,7% | 60 | 54,1% |
| Dobne skupine | <5 godina | 13 | 9,1% | 13 | 11,7% |
| | 5-9 godina | 34 | 23,8% | 38 | 34,2% |
| | 10-14 godina | 71 | 49,7% | 39 | 35,1% |
| | >=15 godina | 25 | 17,5% | 21 | 18,9% |
| Povišen ukupni kolesterol | Ne | 61 | 42,7% | 72 | 64,9% |
| | Da | 82 | 57,3% | 39 | 35,1% |
| Snižen HDL | Ne | 119 | 83,2% | 87 | 78,4% |
| | Da | 24 | 16,8% | 24 | 21,6% |
| Povišen LDL | Ne | 85 | 59,4% | 87 | 78,4% |
| | Da | 58 | 40,6% | 24 | 21,6% |
| Povišeni trigliceridi | Ne | 131 | 91,6% | 101 | 91,0% |
| | Da | 12 | 8,4% | 10 | 9,0% |
| Polimorfizmi APOE | e2/e2 | 0 | 0,0% | 1 | 0,9% |
| | e2/e3 | 9 | 6,3% | 16 | 14,4% |
| | e3/e3 | 102 | 71,3% | 67 | 60,4% |
| | e2/e4 | 3 | 2,1% | 2 | 1,8% |
| | e3/e4 | 26 | 18,2% | 24 | 21,6% |
| | e4/e4 | 3 | 2,1% | 1 | 0,9% |

| | | Skupina |
|--------------------------------------|---------------------------|----------------|
| Spol | X ² test | 0,485 |
| | Df | 1 |
| | P | 0,486 |
| Dobne skupine | X ² test | 5,942 |
| | Df | 3 |
| | P | 0,114 |
| Povišen ukupni kolesterol | X ² test | 12,355 |
| | Df | 1 |
| | P | <0,001 |
| Snižen HDL | X ² test | 0,955 |
| | Df | 1 |
| | P | 0,329 |
| Povišen LDL | X ² test | 10,252 |
| | Df | 1 |
| | P | 0,001 |
| Povišeni trigliceridi | X ² test | 0,030 |
| | Df | 1 |
| | P | 0,862 |
| Genotipizacija | Fisherov egzaktni test | 7,462 |
| | P | 0,149 |

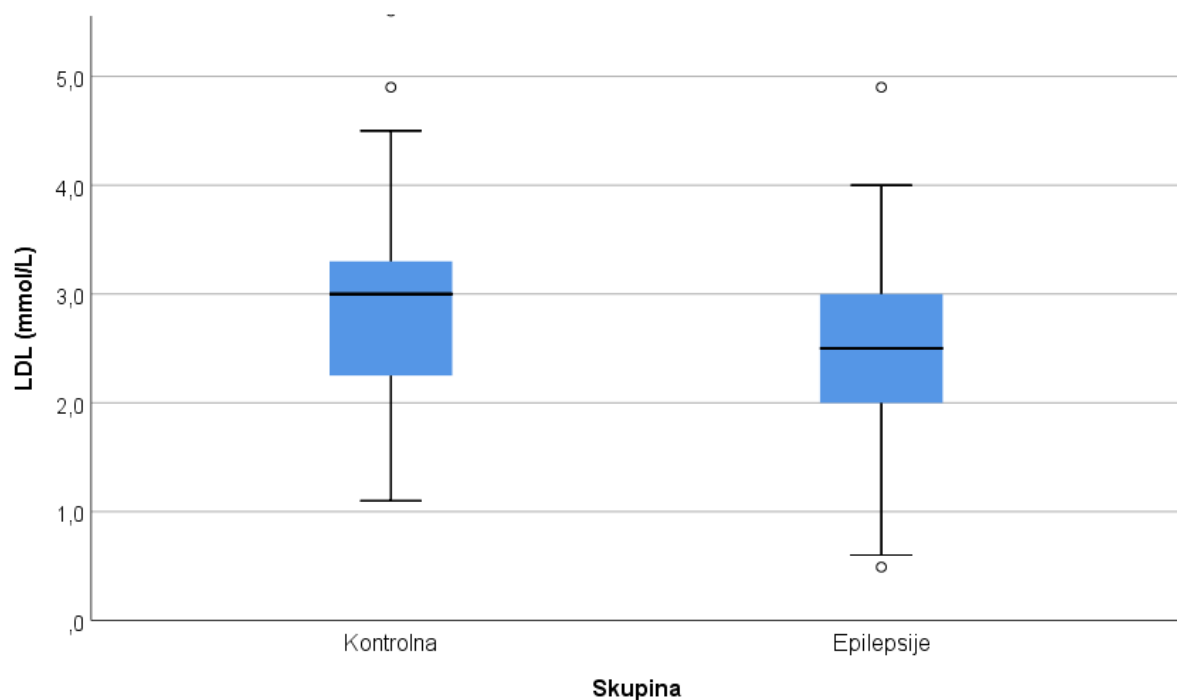
Tablica 17. Razlike u dobi, indeksu tjelesne mase te nalazima lipidograma (promatranima kao kontinuirane varijable) između ispitivane i kontrolne skupine: Mann-Whitney U test

| Skupina | | N | Min | Max | Centile | | |
|-----------------------------------|------------|-----|-------|-------|---------|-------------|-------|
| | | | | | 25. | Medijan | 75. |
| Dob (godine) | Kontrolna | 143 | 1,11 | 17,80 | 8,70 | 11,11 | 13,90 |
| | Epilepsije | 111 | 0,80 | 17,90 | 6,11 | 10,30 | 14,20 |
| BMI (kg/m²) | Kontrolna | 143 | 13,61 | 36,34 | 16,44 | 19,66 | 22,31 |
| | Epilepsije | 110 | 13,17 | 35,47 | 16,01 | 18,69 | 21,63 |
| Ukupni kolesterol (mmol/L) | Kontrolna | 143 | 2,10 | 21,96 | 4,04 | 4,90 | 5,30 |
| | Epilepsije | 111 | 2,40 | 6,90 | 3,70 | 4,30 | 5,00 |
| HDL (mmol/L) | Kontrolna | 143 | 0,72 | 6,90 | 1,29 | 1,50 | 1,70 |
| | Epilepsije | 111 | 0,70 | 2,93 | 1,20 | 1,40 | 1,60 |
| LDL (mmol/L) | Kontrolna | 143 | 1,10 | 9,50 | 2,20 | 3,00 | 3,30 |
| | Epilepsije | 111 | 0,49 | 20,00 | 2,00 | 2,50 | 3,00 |
| Trigliceridi (mmol/L) | Kontrolna | 143 | 0,40 | 4,50 | 0,70 | 0,99 | 1,30 |
| | Epilepsije | 111 | 0,40 | 5,41 | 0,61 | 0,86 | 1,10 |

| | Mann-Whitney U | Z | P |
|-----------------------------------|-------------------|-------|------------------|
| Dob (godine) | 7170,50 | -1,32 | 0,187 |
| BMI (kg/m²) | 7196,00 | -1,16 | 0,248 |
| Ukupni kolesterol (mmol/L) | 5913,00 | -3,49 | <0,001 |
| HDL (mmol/L) | 7146,50 | -1,36 | 0,173 |
| LDL (mmol/L) | 5893,00 | -3,52 | <0,001 |
| Trigliceridi (mmol/L) | 6922,50 | -1,75 | 0,080 |



Slika 8. Razlike u razini ukupnog kolesterola između ispitivane i kontrolne skupine: Mann-Whitney U test, $P < 0,001$



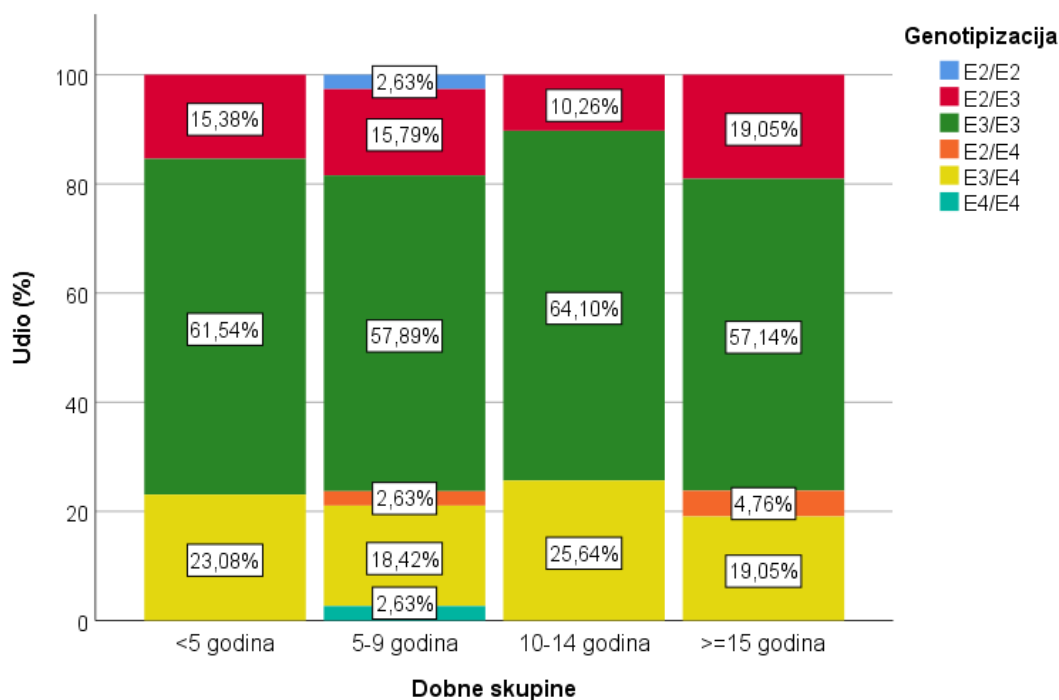
Slika 9. Razlike u razini LDL između ispitivane i kontrolne skupine: Mann-Whitney U test, $P < 0,001$

3.2.2. RAZLIKA U DOBI POČETKA BOLESTI OVISNO O GENOTIPU DJETETA

Tablica 18. Razlike u dobnim skupinama ispitanika obzirom na polimorfizme APOE

| | | Dobne skupine | | | | | | | |
|-----------------------|-------|---------------|-------|------------|-------|--------------|-------|-------------|-------|
| | | <5 godina | | 5-9 godina | | 10-14 godina | | >=15 godina | |
| | | N | % | N | % | N | % | N | % |
| Genotipizacija | e2/e2 | 0 | 0,0% | 1 | 2,6% | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% |
| | e2/e3 | 2 | 15,4% | 6 | 15,8% | 4 | 10,3% | 4 | 19,0% |
| | e3/e3 | 8 | 61,5% | 22 | 57,9% | 25 | 64,1% | 12 | 57,1% |
| | e2/e4 | 0 | 0,0% | 1 | 2,6% | 0 | 0,0% | 1 | 4,8% |
| | e3/e4 | 3 | 23,1% | 7 | 18,4% | 10 | 25,6% | 4 | 19,0% |
| | e4/e4 | 0 | 0,0% | 1 | 2,6% | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% |

| | Vrijednost | P |
|--|------------|-------|
| Fisher-Freeman-Haltonov egzaktni test | 9,460 | 0,965 |
| N | 111 | |



Slika 10. Razlike u dobnim skupinama ispitanika obzirom na polimorfizme APOE

Tablica 18 i slika 10 prikazuju razlike u dobnim skupinama ispitanika s obzirom na polimorfizme APOE te odgovaraju na sekundarni cilj: *Postoji li razlika u dobi početka bolesti ovisno o genotipu djeteta*. Nije bilo značajnih razlika, $P=0,965$.

3.2.3. RAZLIKA U UKUPNOM KOLESTEROLU I LDL KOLESTEROLU OVISNO O VRSTI EPILEPSIJE KOD DJECE

Razlike u nalazima lipidograma s obzirom na vrstu epilepsije (sekundarni cilj: *Postoji li razlika u ukupnom kolesterolu i LDL kolesterolu ovisno o vrsti epilepsije kod djeteta*) prikazane su u tablicama 19 i 20 te nije bilo statistički značajnih razlika.

Tablica 19. Razlike u nalazima lipidograma promatranima kao kategorijske varijable s obzirom na vrstu epilepsije u ispitivanoj skupini: Fisher-Freeman-Haltonov egzaktni test

| | | VRSTA EPILEPSIJE | | | | | | P |
|----------------------------------|----|------------------|-------|----------------|-------|-----------------|--------|-------|
| | | Žarišna | | Generalizirana | | Neklasificirana | | |
| | | N | % | N | % | N | % | |
| Povišen ukupni kolesterol | Ne | 42 | 67,7% | 23 | 56,1% | 7 | 87,5% | 0,195 |
| | Da | 20 | 32,3% | 18 | 43,9% | 1 | 12,5% | |
| Snižen HDL | Ne | 47 | 75,8% | 34 | 82,9% | 6 | 75,0% | 0,663 |
| | Da | 15 | 24,2% | 7 | 17,1% | 2 | 25,0% | |
| Povišen LDL | Ne | 47 | 75,8% | 33 | 80,5% | 7 | 87,5% | 0,766 |
| | Da | 15 | 24,2% | 8 | 19,5% | 1 | 12,5% | |
| Povišeni trigliceridi | Ne | 55 | 88,7% | 38 | 92,7% | 8 | 100,0% | 0,879 |
| | Da | 7 | 11,3% | 3 | 7,3% | 0 | 0,0% | |

Tablica 20. Razlike u nalazima lipidograma promatranima kao kontinuirane varijable obzirom na vrstu epilepsije u ispitivanoj skupini: Kruskal-Wallisov test

| VRSTA EPILEPSIJE | | N | Min | Max | Centile | | |
|-----------------------------------|-----------------|----|-------|-------|---------|---------|-------|
| | | | | | 25. | Medijan | 75. |
| BMI (kg/m²) | Žarišna | 61 | 13,17 | 30,12 | 15,64 | 18,92 | 22,49 |
| | Generalizirana | 41 | 13,71 | 35,47 | 16,61 | 18,55 | 19,85 |
| | Neklasificirana | 8 | 14,47 | 31,33 | 15,96 | 19,57 | 27,03 |
| Ukupni kolesterol (mmol/L) | Žarišna | 62 | 2,60 | 6,80 | 3,78 | 4,25 | 5,00 |
| | Generalizirana | 41 | 2,40 | 6,90 | 3,50 | 4,50 | 5,10 |
| | Neklasificirana | 8 | 2,90 | 5,50 | 3,43 | 3,90 | 4,63 |
| HDL (mmol/L) | Žarišna | 62 | 0,70 | 2,93 | 1,18 | 1,40 | 1,63 |
| | Generalizirana | 41 | 0,80 | 2,30 | 1,20 | 1,40 | 1,70 |
| | Neklasificirana | 8 | 1,06 | 1,60 | 1,13 | 1,20 | 1,53 |
| | Žarišna | 62 | 0,49 | 20,00 | 2,00 | 2,30 | 3,03 |

| | | | | | | | |
|---------------------------------|-----------------|----|------|------|------|------|------|
| LDL (mmol/L) | Generalizirana | 41 | 0,60 | 4,90 | 2,00 | 2,50 | 3,00 |
| | Neklasificirana | 8 | 1,50 | 3,30 | 2,00 | 2,30 | 2,73 |
| Trigliceridi (mmol/L) | Žarišna | 62 | 0,40 | 5,32 | 0,60 | 0,80 | 1,10 |
| | Generalizirana | 41 | 0,40 | 5,41 | 0,65 | 0,90 | 1,10 |
| | Neklasificirana | 8 | 0,40 | 1,40 | 0,82 | 0,95 | 1,28 |

| | Kruskal- Wallis H | df | P |
|--------------------------------------|------------------------------|-----------|----------|
| BMI (kg/m²) | 0,303 | 2 | 0,859 |
| Ukupni kolesterol (mmol/L) | 1,414 | 2 | 0,493 |
| HDL (mmol/L) | 1,658 | 2 | 0,436 |
| LDL (mmol/L) | 0,667 | 2 | 0,717 |
| Trigliceridi (mmol/L) | 0,860 | 2 | 0,651 |

3.2.4. RAZLIKA U UKUPNOM KOLESTEROLU I LDL KOLESTEROLU OVISNO O GENOTIPU DJETETA

Tablica 21 prikazuje razlike u nalazima lipidograma promatranima kao kategorijske varijable s obzirom na polimorfizme APOE u ispitivanoj skupini, te time daje odgovor na sekundarni cilj *Postoji li razlika u ukupnom kolesterolu i LDL kolesterolu ovisno o genotipu djeteta*. Nije bilo značajnih razlika. Dodatno su nalazi lipidograma analizirani i kao kontinuirane varijable (tablica 22) te se tu dobila značajna razlika u razini LDL-a koji je bio najviši kod polimorfizma e2/e4 (P=0,020).

Tablica 21. Razlike u nalazima lipidograma promatranima kao kategorijske varijable s obzirom na polimorfizme APOE u ispitivanoj skupini: Fisher-Freeman-Haltonov egzaktni test

| | | Polimorfizmi APOE | | | | | | | | | | | | P Fisher |
|--|----|-------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------------|
| | | e2/e2 | | e2/e3 | | e3/e3 | | e2/e4 | | e3/e4 | | e4/e4 | | |
| | | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | |
| Povišen ukupni kolesterol | Ne | 0 | 0,0% | 14 | 87,5% | 42 | 62,7% | 1 | 50,0% | 14 | 58,3% | 1 | 100,0% | 0,148 |
| | Da | 1 | 100,0% | 2 | 12,5% | 25 | 37,3% | 1 | 50,0% | 10 | 41,7% | 0 | 0,0% | |
| Snižen HDL | Ne | 1 | 100,0% | 13 | 81,3% | 55 | 82,1% | 2 | 100,0% | 16 | 66,7% | 0 | 0,0% | 0,273 |
| | Da | 0 | 0,0% | 3 | 18,8% | 12 | 17,9% | 0 | 0,0% | 8 | 33,3% | 1 | 100,0% | |
| Povišen LDL | Ne | 1 | 100,0% | 15 | 93,8% | 54 | 80,6% | 1 | 50,0% | 15 | 62,5% | 1 | 100,0% | 0,130 |
| | Da | 0 | 0,0% | 1 | 6,3% | 13 | 19,4% | 1 | 50,0% | 9 | 37,5% | 0 | 0,0% | |
| Povišeni trigliceridi | Ne | 0 | 0,0% | 14 | 87,5% | 60 | 89,6% | 2 | 100,0% | 24 | 100,0% | 1 | 100,0% | 0,090 |
| | Da | 1 | 100,0% | 2 | 12,5% | 7 | 10,4% | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% | |

Tablica 22. Razlike u nalazima lipidograma promatranima kao kontinuirane varijable s obzirom na polimorfizme APOE u ispitivanoj skupini: Kruskal-Wallisov test

| Polimorfizmi APOE | | N | Min | Max | Centile | | |
|-----------------------------------|-------|----|-------|-------|---------|--------|-------|
| | | | | | 25. | Medija | 75. |
| | | | | | n | | |
| BMI (kg/m²) | e2/e2 | 1 | 23,54 | 23,54 | | | |
| | e2/e3 | 16 | 14,13 | 29,29 | 15,49 | 18,83 | 20,33 |
| | e3/e3 | 66 | 13,17 | 31,33 | 16,56 | 18,81 | 21,51 |
| | e2/e4 | 2 | 22,55 | 29,29 | 16,91 | 25,92 | 22,09 |
| | e3/e4 | 24 | 13,92 | 35,47 | 16,06 | 18,02 | 21,36 |
| | e4/e4 | 1 | 13,71 | 13,71 | | | |
| Ukupni kolesterol (mmol/L) | e2/e2 | 1 | 5,20 | 5,20 | | | |
| | e2/e3 | 16 | 2,70 | 4,90 | 3,50 | 3,90 | 4,30 |
| | e3/e3 | 67 | 2,40 | 6,80 | 3,70 | 4,30 | 5,10 |
| | e2/e4 | 2 | 3,50 | 5,20 | 2,63 | 4,35 | 4,02 |
| | e3/e4 | 24 | 2,90 | 6,90 | 3,98 | 4,55 | 4,95 |
| | e4/e4 | 1 | 3,50 | 3,50 | | | |
| HDL (mmol/L) | e2/e2 | 1 | 1,40 | 1,40 | | | |
| | e2/e3 | 16 | 0,90 | 1,94 | 1,20 | 1,38 | 1,70 |
| | e3/e3 | 67 | 0,70 | 2,93 | 1,20 | 1,40 | 1,60 |
| | e2/e4 | 2 | 1,20 | 1,60 | 0,90 | 1,40 | 1,32 |
| | e3/e4 | 24 | 0,94 | 2,40 | 1,10 | 1,40 | 1,70 |
| | e4/e4 | 1 | 1,10 | 1,10 | | | |
| LDL (mmol/L) | e2/e2 | 1 | 2,70 | 2,70 | | | |
| | e2/e3 | 16 | 0,60 | 3,60 | 1,43 | 1,80 | 2,30 |
| | e3/e3 | 67 | 0,49 | 20,00 | 2,00 | 2,50 | 2,90 |
| | e2/e4 | 2 | 2,80 | 3,40 | 2,10 | 3,10 | 2,67 |
| | e3/e4 | 24 | 1,10 | 4,90 | 2,10 | 2,50 | 3,20 |
| | e4/e4 | 1 | 2,10 | 2,10 | | | |
| | e2/e2 | 1 | 2,50 | 2,50 | | | |
| | | | | | | | |

| | | | | | | | |
|---------------------------------|-------|----|------|------|------|------|------|
| Trigliceridi (mmol/L) | e2/e3 | 16 | 0,40 | 3,20 | 0,69 | 0,86 | 1,19 |
| | e3/e3 | 67 | 0,40 | 5,41 | 0,70 | 0,84 | 1,10 |
| | e2/e4 | 2 | 0,70 | 1,00 | 0,53 | 0,85 | 0,87 |
| | e3/e4 | 24 | 0,40 | 1,59 | 0,60 | 0,83 | 1,20 |
| | e4/e4 | 1 | 0,90 | 0,90 | | | |

| | Kruskal- Wallis H | Df | P |
|--------------------------------------|----------------------|----|--------------|
| BMI (kg/m2) | 8,323 | 5 | 0,139 |
| Ukupni kolesterol (mmol/L) | 9,500 | 5 | 0,091 |
| HDL (mmol/L) | 1,626 | 5 | 0,898 |
| LDL (mmol/L) | 13,352 | 5 | 0,020 |
| Trigliceridi (mmol/L) | 3,428 | 5 | 0,634 |

3.2.5. RAZLIKA U KONTROLI BOLESTI OVISNO O GENOTIPU KOJI DIJETE IMA

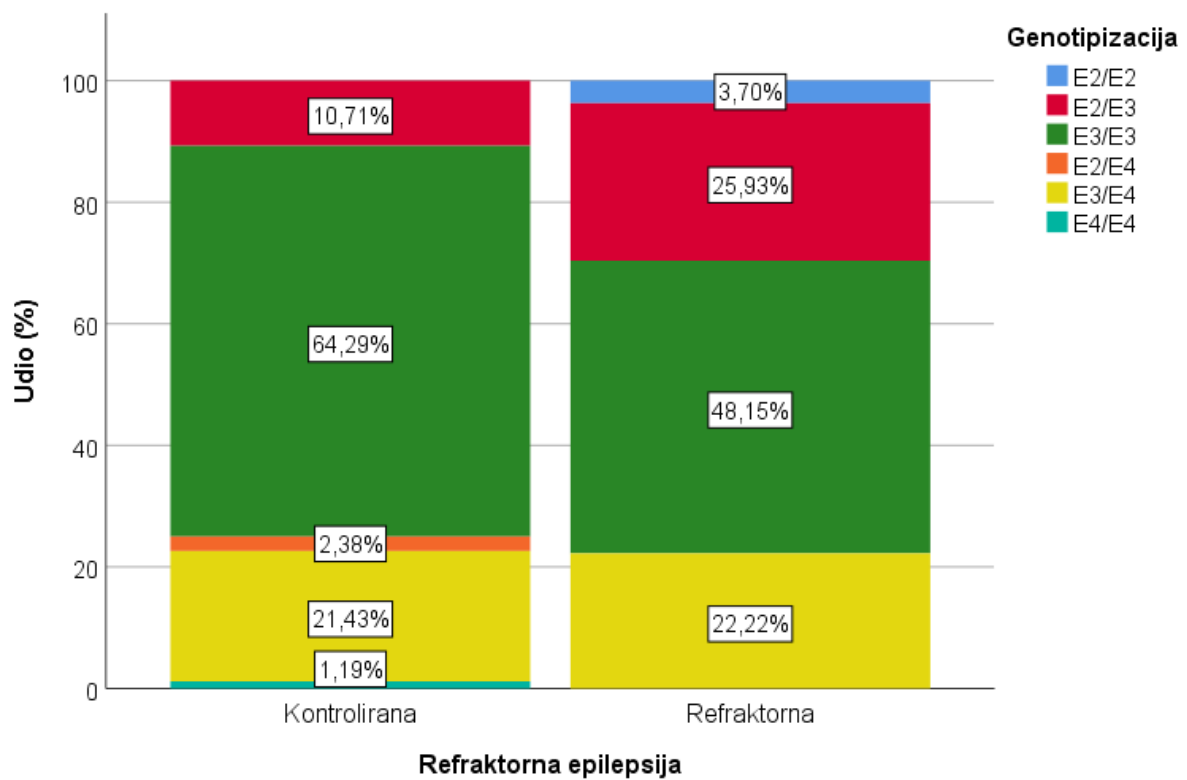
Tablica 23, zajedno sa slikom 11, odgovara na sekundarni cilj (*Postoji li razlika u kontroli bolesti ovisno o genotipu koji dijete ima*).Nije bilo značajnih razlika, P=0,150

Tablica 23. Razlike u kontroli bolesti ovisno o genotipu koji dijete ima

| | | Refraktorna epilepsija | | | |
|--------------------------|-------|------------------------|-------|-------------|-------|
| | | Kontrolirana | | Refraktorna | |
| | | N | % | N | % |
| Polimorfizmi APOE | e2/e2 | 0 | 0,0% | 1 | 3,7% |
| | e2/e3 | 9 | 10,7% | 7 | 25,9% |
| | e3/e3 | 54 | 64,3% | 13 | 48,1% |
| | e2/e4 | 2 | 2,4% | 0 | 0,0% |
| | e3/e4 | 18 | 21,4% | 6 | 22,2% |

| | | | | |
|-------|---|------|---|------|
| e4/e4 | 1 | 1,2% | 0 | 0,0% |
|-------|---|------|---|------|

| | Vrijednost | P |
|---------------------------------------|------------|-------|
| Fisher-Freeman-Haltonov egzaktni test | 7,39 | 0,150 |
| N | 111 | |



Slika 11. Razlike u kontroli bolesti ovisno o genotipu koji dijete ima

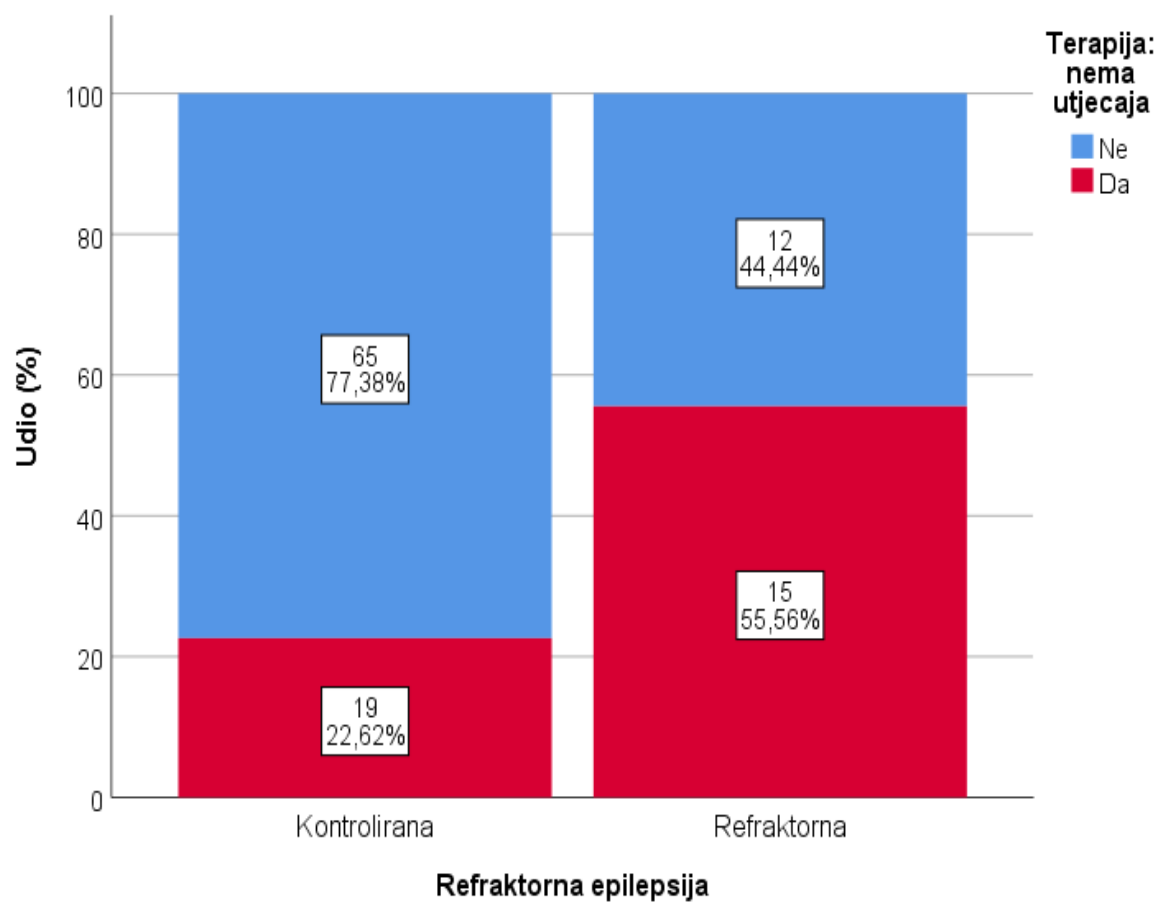
3.2.6. RAZLIKA U KONTROLI BOLESTI OVISNO O PRIMIJENJENOJ TERAPIJI

Tablica 24. Razlika u kontroli bolesti ovisno o primijenjenoj terapiji kod djeteta

| | | Refraktorna epilepsija | | | |
|-------------------------|----|------------------------|-------|-------------|-------|
| | | Kontrolirana | | Refraktorna | |
| | | N | % | N | % |
| Terapija: inhibitori | Ne | 33 | 39,3% | 8 | 29,6% |
| | Da | 51 | 60,7% | 19 | 70,4% |
| Terapija: induktori | Ne | 65 | 77,4% | 20 | 74,1% |
| | Da | 19 | 22,6% | 7 | 25,9% |
| Terapija: nema utjecaja | Ne | 65 | 77,4% | 12 | 44,4% |
| | Da | 19 | 22,6% | 15 | 55,6% |

| | | Refraktorna epilepsija | |
|-------------------------|---------------------|------------------------|--|
| Terapija: inhibitori | X ² test | 0,818 | |
| | df | 1 | |
| | P | 0,366 | |
| Terapija: induktori | X ² test | 0,125 | |
| | df | 1 | |
| | P | 0,724 | |
| Terapija: nema utjecaja | X ² test | 10,432 | |
| | df | 1 | |
| | P | 0,001 | |

Tablice 24, zajedno sa slikom 12, odgovara na posljednje pitanje sekundarnog cilja (*Postoji li razlika u kontroli bolesti ovisno o primijenjenoj terapiji kod djeteta*). Jedina značajna razlika zabilježena je kod djece koja imaju refraktornu epilepsiju i kod koje je značajno veći postotak terapije koja nema utjecaja (P=0,001, slika 1)



Slika 12. Razlika u kontroli bolesti ovisno o primijenjenoj terapiji kod djeteta

4. RASPRAVA

Epilepsija je kronični poremećaj funkcije mozga, različite etiologije, karakterizirana recidivirajućim napadajima uzrokovanim prekomjernim električnim izbijanjem moždanih stanica s različitim kliničkim slikama i laboratorijskim nalazima (140). Epilepsija je usko povezana s dječjom dobi, a dokaz tome su brojni radovi koji pokazuju da oko 60% ljudi koji imaju epilepsiju su djeca do 16. godine života (2, 3) i jedna je od najčešćih neuroloških poremećaja kod djece. Osoba koja ima epilepsiju ima napadaje, ali uzrok, vrsta, trenutak javljanja, trajanje i odgovor na terapiju takvih napada mogu biti vrlo različiti, osobito u dječjoj populaciji. Utjecaj epilepsije na život puno je složeniji od samog medicinskog stanja. Stručnjaci kažu da je liječenje epilepsije više nego samo liječenje napadaja jer kod epilepsije postoje psihološki i kognitivni učinci koji se trebaju rješavati zajedno s utjecajem na cijelu obitelj. Javljanjem u dječjoj dobi epilepsija ima utjecaj i na dijete i obitelj, ali i na školu, okolinu i naravno liječnike uključene u tretman. Većina djece s epilepsijom može postići dobru kontrolu napadaja uz liječenje, a neki mogu biti i bez napadaja.

Mogućnosti liječenja epilepsije znatno su se proširile posljednjih godina, uključujući mnoge nove lijekove (51), specijalizirane dijete (ketogena dijeta), uporaba kanabidiola (45) te širok spektar kirurških zahvata (141) i novih tehnika kao što je neinvazivna stimulacija mozga (142).

Pronalaženje najefikasnijeg pristupa u liječenju epilepsije katkad dovodi do neuspjeha, a i pogreške. Genetska varijabilnost dovodi do različitih odgovora na antiepileptičku terapiju bilo da se radi o pozitivnom ili negativnom učinku. Srećom, postoje mnogi učinkoviti lijekovi protiv epilepsije i u današnje vrijeme nastoje se stvoriti novi lijekovi sa što manje neželjenih reakcija, što boljim djelovanjem, što većom spektrom djelovanja i što jednostavnijom i raznovrsnijom primjenom.

Obzirom na genetsku različitost svakog pojedinca i dalje je potreba za dugogodišnjim, katkad i doživotnim, liječenjem i trajnim liječničkim nadzorom velika te predstavlja medicinski i ekonomski problem.

Neadekvatno liječenje i ponekad neefikasna dijagnoza posljedica su nedostatka pouzdanih metoda bilo za otkrivanje epilepsije i njenog tijeka, bilo za razjašnjenje epileptogeneze ili za

razvoj i napredovanje epilepsije. Razvoj elektrofiziologije, neuroimaginga, molekularne biologije i genetike obećava otkrivanje klinički korisnih biomarkera koji bi mogli pomoći u praćenju epilepsije. Uvelike će olakšati diferencijalnu dijagnozu, ukloniti trenutni pristup pogreškama u farmakoterapiji, olakšati prethodnu procjenu i poboljšati isplativost otkrića lijekova i kliničkih ispitivanja sredstava za prevenciju i liječenje epilepsije (143).

Jedan takav potencijalni biomarker je i apolipoprotein E. APOE igra važnu ulogu u transportu i metabolizmu lipida i pokazao se kao faktor rizika za razvoj demencije i drugih neurodegenerativnih bolesti jer osim jetre, koji je glavni organ za sintezu lipoproteina u plazmi, APOE se također sintetizira u astrocitima i mikrogliji mozga. Kao što je u uvodu spomenuto, gen APOE lokaliziran je na kromosomu 19q 13.2 te se kod ljudi pojavljuje u tri izoforme e2, e3, e4, stoga razlikujemo homozigotne (APOE e2/e2, e3/e3, e4/e4) i heterozigotne genotipove (APOE e3/e2, e4/e3, e4/e2). APOE e3 alel je najčešći oblik (70% -80%), nakon čega slijedi APOE e4 (10%-15%) i APOE e2 (5%-10%) (71). U mozgu sudjeluje u distribuciji kolesterola tijekom popravka, rasta i mijelinacije membrane živčanih stanica tijekom razvoja i starenja. Stoga igra važnu ulogu ne samo kod ozljeda mozga, bilo ishemičnog ili traumatskog, već i tijekom epileptičkih napadaja (144, 145).

Dosada su objavljene studije opisale odnos između izooblika APOE i koncentracije u plazmi s pojavom neurodegenerativnih bolesti, osobito Alzheimerove bolesti. Analiza APOE alela u bolesnika s Alzheimerovom bolešću pokazala je značajnu povezanost između APOE alela tipa 4 i Alzheimerove bolesti (146-148). Također je zabilježena značajna povezanost između APOE polimorfizma i ozljeda glave te bolesnici s APOE e4 imaju veću vjerojatnost štetnog ishoda 6 mjeseci nakon ozljede glave, za razliku od bolesnika s drugim izoformama APOE (149-151).

Polučivši dobre rezultate odnosa APOE i bolesti mozga, mnogi istraživači došli su na ideju o proučavanju povezanosti polimorfizma APOE i epilepsije. Dosadašnja istraživanja o ulozi APOE i njegovom polimorfizmu u osoba s epilepsijom pružila su neujednačene rezultate. Dok su neka istraživanja pokazala pozitivne rezultate vezano za epilepsije temporalnog reznja i dokazali da postoji povezanost apolipoproteina E s ranim početkom epilepsije temporalnog reznja te veći rizik za pojavu kasnih posttraumatskih napada (114, 115) dok druga istraživanja nisu pronašla povezanost između APOE i epilepsije (111, 113).

Sva su istraživanja uglavnom provedena na populaciji starijoj od 18 godina.

Epilepsija kod djece obično uključuje genetske/nasljedne, nepoznate, metaboličke i strukturne promjene mozga, dok su stečena stanja, kao što su trauma glave, infekcija i cerebralni moždani udar rijetko uzrok epilepsije u dječjoj dobi. Obzirom na sudjelovanje apolipoproteina u funkciji mozga i plastičnosti mozga u dječjoj dobi, ispitali smo genotip apolipoproteina u bolesnika s epilepsijom u dječjoj dobi kako bismo otkrili koja je njegova uloga kod djece s epilepsijom s ciljem ranijeg dijagnosticiranja i boljeg terapijskog učinka (149, 152-154).

Proučavajući studije koje su pokazale signifikantnu povezanost kod pacijenata koji boluju od epilepsije s APOE e4 alelima (115, 116) u smislu da nosioci e4 alela nemaju adekvatni odgovor na antikonvulzivnu terapiju osobito koji imaju kompleksne parcijalne napadaje te da prisutnost alela e4 kolerira s ranim početkom bolesti (115), ovom studijom, koja je učinjena na pedijatrijskoj populaciji, nastojali smo prikazati razlike u raspodjeli pojedinih polimorfizama APOE gena ovisno o vrsti epilepsije.

U ovom istraživanju su djeca s epilepsijom podijeljena u tri skupine s obzirom na vrstu napadaja (žarišne, generalizirane i neklasificirane) i to na temelju dostupnih anamnestičkih podataka, postojanja pozitivne obiteljske anamneze na epilepsiju, dostupne semiologije napadaja, te zabilježenih interiktalnih promjena na EEG nalazu.

Analizom podataka nije bilo značajnih razlika u raspodjeli pojedinih polimorfizama APOE s obzirom na žarišnu, generaliziranu i neklasificiranu vrstu epilepsije ($P=0,529$). U svakoj vrsti epilepsije bili su najzastupljeniji aleli e3/e3 (od 50,0% do 62,9%) dok su aleli e2/e2 i e4/e4 (2,4%) bili najmanje zastupljeni. Naši podaci o zastupljenosti i polimorfizmu APOE nisu značajno drukčiji od podataka u studijama koje su proučavale polimorfizam APOE kod pacijenata s epilepsijom iako je u njihovim studijama zastupljenost e4 veća nego e2, a to možemo objasniti s nedovoljnim brojem pacijenata: e4 (15.5%), e3 (74.8%) i e2 (9.8%) (111).

Diaz-Arrastia i sur. (114) pokazali su da prijašnja trauma može biti povezana s prisutnošću alela e4. To su potvrdili drugi animalni modeli i istraživanja koji su demonstrirali da postoji loš ishod kod pacijenata nakon traumatske ozljede na mozgu, krvarenja ili infarkta, a koji su nosioci APOE e4 alela (155-157) što je već spomenuto u uvodnom dijelu. To dovodi do oštećenja rasta, smanjenja sinaptogeneze i reduciranja sinaptičke plastičnosti nakon oštećenja moždanog tkiva

(105-107). Oštećenje tkiva, poremećena sinaptogeneza i poremećena plastičnost dovode do poremećene organizacije tkiva, što rezultira žarišnim napadajima i razvojem žarišne simptomatske epilepsije. Došlo se do zaključka da APOE ε4 igra važnu ulogu kod pacijenata sa simptomatskom epilepsijom kojoj je prethodila trauma (114).

Gore navedeni rezultati, potaknuti dodatnom dijagnostičkom obradom (MR mozga, neuropsihologija, genetika, PET, SPECT, fMRI...), omogućili su podjelu epilepsije ovisno o etiologiji bolesti: idiopatske (nasljedne, koje nemaju neuroradiološki vidljive neuroanatomске ili patološke abnormalnosti, a sama genetska osnova nije jasno definirana), simptomatske (sekundarna epilepsija, organska, stečena ili s dokazanom lezijom mozga, povezane s anatomskim i patološkim promjenama) i kriptogene/sindromi (gdje se sumnja na simptomatsku epilepsiju, ali se nije dokazala lezija mozga ili je u sklopu drugih bolesti) (24).

Uvrstivši raspodjelu po etiologiji tri glavne skupine dobili smo podvrste epilepsije kod djece te učinili analizu razlika u raspodjeli pojedinih polimorfizama gena APOE ovisno o podvrsti epilepsije koristeći Fisher-Freeman-Haltonov egzaktni test. Kao i kod raspodjele pojedinih polimorfizama APOE s obzirom na žarišnu, generaliziranu i neklasificiranu vrstu epilepsije, analizirajući ovu skupinu nisu pronađene razlike u raspodjeli pojedinih polimorfizama gena APOE ovisno o podvrsti epilepsije niti su nađene razlike u raspodjeli polimorfizama APOE ako se gleda isključivo etiološka podjela na idiopatske i simptomatske epilepsije. Zaključno, rezultati ove studije nisu pokazali povećani rizik razvoja epilepsije kod nosioca niti APOE ε4 niti bilo kojeg drugog alela, bilo da se radi o simptomatskim ili idiopatskim epilepsijama.

Proučavajući literaturu nalaze se studije koje su nastojale dokazati povezanost između APOE i febrilnih konvulzija, tj. dokazati da polimorfizam APOE ima utjecaj na pojavu febrilnih konvulzija u ranom djetinjstvu, na prognozu febrilnih konvulzija, a time i na kasniji razvoj epilepsije (158, 159). Studije nisu polučile uspjehom, a rezultati ove studije mogu biti jedna vrsta potvrde da u dječjoj dobi ne postoji povezanost između APOE genotipa i nastanka bolesti, odnosno da je razvoj epilepsije složen proces gdje i genetski faktori i čimbenici okoliša i neuroplastičnost moduliraju alele te samo kod nekih pojedinaca dolazi do razvoja epilepsije, a kod nekih ne.

Isti ishod su imale i druge studije koje su istraživale ulogu epilepsije kao komorbiditeta kod djece s cerebralnom paralizom i povezanost s APOE. Lien i suradnici (160) proučavajući cerebralnu paralizu kod djece u Norveškoj željeli su istražiti povezanost APOE e4 i težine kliničke slike (loša fina motorna funkcija, prisutnost epilepsije, poteškoće hranjenja) kod oboljelih. Kao i većina drugih studija koja je učinjena kod pacijenata s epilepsijom nije nađena povezanost između APOE e4 i epilepsije iako smatraju da povezanost između opsega oštećenja mozga i epilepsije može biti biološki vjerojatna jer živčane stanice nosioca APOE e3/e3 genotipa imaju bolji i brži odgovor na oštećenje moždanog tkiva za razliku nosioca APOE e4/e4. To upućuje na to da APOE e3, ali ne APOE e4, aleli omogućuju neuronima bolji odgovor bez obzira na vrstu ozljede (161).

Raspodjela ispitanika po spolu bila je zadovoljavajuća za statističku obradu (dječaka 50,3% u kontrolnoj i 45,9% u ispitivanoj skupini te djevojčica 49,7% u kontrolnoj i 54,1% u ispitivanoj skupini). Prema dobi najviše je bilo ispitanika u dobi od 10 do 14 godina života što se podudara s literaturom o pojavnosti epilepsije u Hrvatskoj, ali i u svijetu (3, 4).

Rezultati genotipizacije pokazali su da alel e3 i e3/e3 genotip je najzastupljenija izoforma bilo da se radi o kontrolnoj grupi ili grupi ispitanika s epilepsijom. Naš rezultat podudara se s ranije učinjenim studijama i s prethodnim rezultatima rađenim na zdravoj populaciji kod adultnih ispitanika te nam govori da i kod djece koja boluju od epilepsije u odnosu na kontrolnu skupinu ne postoji razlika u vrsti genotipa. U objavljenim radovima također je pokazano da je genotip e3/e3 najzastupljeniji u obje skupine dok je e2/e2 rijetko prisutan (162).

U ovoj je studiji genotip e3/e3 je bio najzastupljeniji u obje grupe bez statistički značajne razlike u raspodjeli alela između oboljelih od epilepsije i kontrolne skupine, te se rezultati ove studije uklapaju u rezultate studija učinjenih na europskoj populaciji, odnosno na bijeloj rasi. Grupa ispitanika s epilepsijom imala je zastupljenost (60,4%), a kontrolna grupa (65%). Drugi po zastupljenosti je genotip e3/e4 dok genotip e2/e2 bio je najmanje zastupljen osobito u kontrolnoj grupi gdje je iznosio (0,4%). U ovom istraživanju nije bilo statistički značajne razlike te se može tvrditi da se polimorfizam APOE gena podjednako raspoređuje u djece oboljele od epilepsije kao i u općoj populaciji.

Kako je APOE glikoprotein važan za metabolizam lipida proučavan je profil lipida kod ispitanika. Već je ranije spomenuto kako u normalnim fiziološkim uvjetima vrlo bitnu ulogu u funkcioniranju središnjeg živčanog sustava imaju masne kiseline i kolesterol kao bitne komponente stanične membrane, kao prekursori steroidnih hormona, vitamina D i žučnih kiselina. Dobro je znano da kolesterol igra veliku ulogu u sinaptogenezi i važan je za mijelinizaciju i rast membrana i tijekom razvoja, ali i u odrasloj dobi. Za taj proces važna je dobra regulacija i postojanost krvno-moždane barijere. Većina kolesterola u mozgu se nakuplja tijekom perinatalnog razvoja i adolescencije kada se odvija i mijelinizacija. Prestankom procesa mijelinizacije smanjuje se koncentracija kolesterola u mozgu i razina kolesterola ovisi o vanjskom izvoru. APOE u parenhimu mozga pomaže u regulaciji plazmatskih lipida i metabolizmu kolesterola i važan je mehanizam za oporavak nakon oštećenja stanica središnjeg živčanog sustava i to redistribucijom lipida u regeneraciji dijelova stanica tijekom remijelinizacije. Kada kolesterol dosegne maksimalnu potrebnu razinu 24-hidroksilaza katalizira kolesterol u 24S-hidroksikolesterol (24OHC), koji se može odstraniti u prisutnosti HDL-a i tako štiti neurone od toksičnog učinka (154, 163, 164). Visoki kolesterol i oštećen njegov metabolizam dovode do disbalansa, što povećava rizik za razvoj mnogih stanja i bolesti koji djeluju na mozak (Alzheimerove bolest, ostalih neurodegenerativnih bolesti, cerebrovaskularnih bolesti), a one pak mogu biti uzrok za pojavu simptomatske epilepsije. *In vitro* studije pokazale su da preopterećenje kolesterola u plazmi membrana u osnovnoj kulturi neurona dovodi do povećanja amiloida β , što je patološka oznaka za pojavu Alzheimerove bolesti, ali i svih ostalih bolesti mozga, uključujući i epilepsiju (165, 166). Prema tome važno je uvijek imati na umu kako neadekvatna regulacija kolesterola može dovesti do promjena u distribuciji, transportu i kretanju i biti temelj za razvoj epileptičkih napada i u konačnici epilepsije.

U našoj studiji zanimljivo je da kontrolna skupina u odnosu na ispitivanu skupinu ima značajno češće povišeni ukupni kolesterol (57,3% naprema 35,1%) te povišeni LDL (40,6% naprema 21,6%), za razliku od nekih ranijih studija koje su pokazale da su ukupne razine LDL-a i kolesterola bile znatno više kod ispitanika s epilepsijom (110, 167). U dosadašnjim studijama pokazano je da povišene razine serumskog kolesterola mijenjaju razinu kolesterola u frontalnom korteksu miševa koji se hrane namirnicama bogatim kolesterolom, iako ukupno razine kolesterola u mozgu ostaju stabilne (168). Takva neravnoteža kolesterola mogla bi

Monika Kukuruzović, Disertacija

promijeniti svojstva sinaptičke membrane živčanog sustava (169) i stvoriti preduvjete za nastanak epileptogeneze.

Jedno moguće objašnjenje ove studije jesu različite prehrambene navike (na primjer: u našoj zemlji se konzumira i kontinentalna i mediteranska kuhinja) i uvriježeno je da osobe koje imaju postavljenu dijagnozu kronične bolesti, osobito ako se radi o pedijatrijskoj populaciji, posežu za uvođenjem zdravih prehrambenih navika te stimuliraju povećanje fizičke aktivnosti. Drugo moguće objašnjenje je činjenica da neki antiepileptici kao jednu od nuspojava uzrokuju smanjene apetita (topiramid, zonisamid), dok drugi (etosuksimid, okskarbamazepin, valproična kiselina) mogu uzrokovati prolazne mučnine i povraćanje, što, ovisno o osobi, može biti i dugotrajnije pa bolesnici prestanu uzimati redovite obroke, te u konačnici dovodi do pada na tjelesnoj težini (47).

Dodatno su nalazi lipidograma prikazani i kao kontinuirane vrijednosti te je i tu dobivena značajna razlika (veće vrijednosti u kontrolnoj skupini) u ukupnom kolesterolu ($P < 0,001$) i LDL-u ($P < 0,001$). Trigliceridi i HDL nisu pokazali statistički značajne razlike u kontrolnoj i ispitivanoj skupini.

Dosadašnje velike epidemiološke studije pokazale su kako od oko 50 milijuna ljudi u svijetu, koji boluju od epilepsije, 60% oboljelih su djeca u dobi do 16. godine života (4, 170).

Početak bolesti u našoj studiji poklapa se sa svjetskim epidemiološkim podacima (170). Možemo istaknuti kako je kod nas vrh pojavnosti bolesti u dobi 10-14 godina, dok je najmanji u dobi ispod 5. godine života.

Epilepsija je usko povezana s dječjom dobi, a dokazano je da se i veliki broj procesa vezanih za sazrijevanje mozga odvijaju u dječjoj dobi (127, 128). Mozak je tada u razvoju, osjetljiv, podložan raznim oštećenjima, što može dovesti do lošeg ishoda bolesti. Neke studije pokazale su da dob početka epilepsije i etiologija te trajanje i učestalost napadaja dovode do lošeg ishoda (171). Jedan od najvažnijih čimbenika ranog početka bolesti (najčešće proučavana epilepsija temporalnog režnja) je pozitivna osobna anamneza na febrilne konvulzije (172). Neki autori smatraju da se febrilne konvulzije pojavljuju prvenstveno u predisponiranim (genetski čimbenici, malformacije mozga, oštećenje mozga) pojedincima koji će kasnije razviti mezijalnu temporolobarnu epilepsiju s hipokampalnom sklerozom (173). Drugi vjeruju da se febrilne

konvulzije mogu pojaviti i kod pojedinaca bez promjena na mozgu, ali su oni ipak predisponirani za nastanak epilepsije (174). Pokazalo se da produljeni prigodni cerebralni napadaji dovode do abnormalne mrežne reorganizacije koja će dovesti u predisponiranim pojedincima do razvoja epileptogene zone, uzrokujući hipokampalnu ozljedu s edemom (175).

Uzimajući u obzir anamnestičke podatke kako febrilne konvulzije utječu na rani početak epilepsije, autori su nastojali pronaći povezanost između početka epilepsije i polimorfizmom APOE (115, 176).

Rezultati dosadašnjih istraživanja su oprečni. Skupina autora iz Porta pokazala je utjecaj APOE i febrilnih konvulzija na početak nastanka mezijalne temporalne lobarne epilepsije s hipokampalnom sklerozom (MTLE – HS) (177). Oni su zaključili da apolipoprotein ne sudjeluje u etiopatogenetkom procesu nastanka MTLE - HS, ali prisutnost APOE e4 alela može ubrzati razvoj bolesti u predisponiranim pojedincima, tj. pacijentima koji su ranije imali febrilne konvulzije, a početak bolesti može utjecati na prognozu MTLE-HS (177).

Sporiš i suradnici (178) nedavno su proveli studiju na našoj populaciji kod pacijenata s nelezijским temporalnim lobarnim epilepsijama. Pokazali su kako se polimorfizam APOE genotipa može upotrebljavati kao marker za početak bolesti kod bolesnika s nelezijским temporalnim lobarnim epilepsijama. Također su u radu istakli da pacijenti nosioci APOE e2/e3 genotipa imaju znatno kasniji početak bolesti u usporedbi s pacijentima s genotipom APOE e3/e4, dok se kod pacijenta nosioca APOE e3/e4 bolest javlja četiri godine ranije, a kod APOE e2/e3 šest godina ranije. U njihovoj studiji nosioci APOE e3/e3 genotipa imali su u prosjeku četiri godine kasniji početak bolesti u odnosu na nosioce APOE e3/e4 (177).

Nasuprot tome, druge studije nisu pronašle povezanost između dobi početka epilepsije i polimorfizma APOE, bilo da su proučavali epilepsije s žarišnim napadajima ili (179) temporalne lobarne epilepsije (111). Iste rezultate izvijestili su i Yeni i suradnici koji su proučavali grupu od 20 pacijenata koji boluju od mezijalne temporalne epilepsije s hipokampalnom sklerozom (113).

Nalaz ovog istraživanja u skladu je s istraživanjima koja nisu pronašla povezanost između dobi početka epilepsije i polimorfizma APOE. U ovoj studiji rađenoj na pedijatrijskoj populaciji nismo pronašli statistički značajnih razlika u dobi početka bolesti ovisno o genotipu. Za

istaknuti je da dvoje pacijenata, koji su nosioci APOE e2/e2 i APOE e4/e4, imaju nešto raniji početak bolesti s obzirom na broj oboljelih. Međutim, taj nalaz nije moguće interpretirati s obzirom da se u ostalim grupama ne pojavljuju nosioci s tim genotipovima, odnosno radi se samo o dva pacijenta. Genotip APOE e3/e3 je bio najzastupljeniji i pojavljivao se s jednakim udjelom kod pacijenata u svim dobnim skupinama.

Epilepsija je česta kronična bolest dječje dobi koja zahtijeva dugotrajnu primjenu antikonvulzivne terapije, a sama terapija može dovoditi do raznih metaboličkih promjena. Terapija može imati različit utjecaj na jetreni enzimski sustav, a jedan od učinaka je promjena u metabolizmu lipida (180). Postoje različite kontradiktorne studije koje povezuju utjecaj antiepileptika s promijenjenim metabolizmom serumskih lipida, a posljedično tome i pojavu ateroskleroze. Međutim, većina tih studija koja pokazuje efekt antiepileptika na serumske lipide rađena je na odrasloj populaciji ili miješanoj pedijatrijskoj i odrasloj (181, 182).

Dobro je znano, a i dokazano od epidemioloških i kliničkih studija, da povećana koncentracija kolesterola, tj. LDL kolesterola u plazmi dovodi do porasta aterosklerotičnih kardiovaskularnih bolesti (183). Kliničke manifestacije ateroskleroze javljaju se u odrasloj dobi, ali patološke promjene počinju još u djetinjstvu (184).

S obzirom da su kardiovaskularne bolesti vodeći uzrok smrti u kasnijoj životnoj dobi, potrebno je odrediti profil lipida svim oboljelima i utvrditi postoji li razlika u početnom lipidnom statusu s obzirom na vrstu epilepsije koji su razvili. U ovoj studiji pacijentima koji boluju od epilepsije određen je lipidni status nakon 14h gladovanja. U ispitivanje je bilo uključeno 41 dijete s dijagnozom generalizirane epilepsije, 62 djece s žarišnom epilepsijom i 8 djece s neklasificiranom epilepsijom (tj. kombinacija žarišne i generalizirane epilepsije ili se radilo o nepoznatoj vrsti epilepsije).

Lipidogram je uspoređivan u odnosu i na indeks tjelesne mase koja je bila bez značajnih razlika između grupa, tj. pacijenti bez obzira na vrstu epilepsije imali su sličan indeks tjelesne mase.

U našem uzorku najviša vrijednost kolesterola i LDL kolesterola zabilježena je u kod djece s neklasificiranom epilepsijom (87,5%), ali nije bilo statistički značajnih razlika u odnosu na druge dvije vrste epilepsije. Isti rezultati dobiveni su proučavajući HDL i trigliceride.

Rezultati ove studije pokazuju da se profil serumskih lipida (ukupnog kolesterola, lipoproteina male gustoće, lipoproteina visoke gustoće i triglicerida) ne razlikuje s obzirom na vrstu epilepsije kod djece te se ti rezultati poklapaju sa studijom Tomouma i suradnika koji također nisu pronašli razliku u razini serumskih lipida s obzirom na vrstu epilepsije (185).

U konačnici naša studija se poklapa sa svim drugim studijama koje su proučavale utjecaj antiepileptika na lipidni status. Dokazano je da antiepileptici (karbamazepin, fenitoin), koji se metaboliziraju u jetri preko P450 mikrosomalnog sustava, dovode do porasta serumskih lipida dok noviji antiepileptici (levetiracetam, lamotrigin), koji ne koriste taj enzimski sustav, ne odvođe do promjene u lipidnom statusu (181, 186).

Antiepileptici djeluju različito na lipidni status kod oboljelih od epilepsije. To znači da bez obzira na tip epilepsije i u usporedbi s kontrolnom grupom nije nađeno statistički značajnih razlika vezanih za lipidni status pacijenata. Ako razmišljamo o prevenciji ateroskleroze kod osoba oboljelih od epilepsije, moramo prvenstveno razmišljati o odabiru antiepileptičke terapije koja ne dovodi do metaboličkih promjena. Katkada to predstavlja izazov jer dobro je znano, a i dokazano u raznim studijama (187), da se kod djece sa žarišnom epilepsijom kao antiepileptik prvog izbora primjenjuje valproat i karbamazepin, a oba antiepileptika, osobito karbamazepin, mogu dovesti do promjena u lipidnom statusu (185).

Ukoliko epilepsija ipak zahtijeva baš tu vrstu terapije, potrebno je razmišljati o potrebi konzumiranja dijetetskih namirnica kako bi izbjegli nepotrebno povećanje kolesterola i LDL kolesterola lošim prehranbenim navikama, te na taj način izbjeći pojavu aterosklerotskih oštećenja i bolesti te u konačnici prevenirati nepotrebno dodatno liječenje i smrtne ishode pacijenata.

Kako dosadašnjim rezultatima nismo uspjeli povezati razlike u lipidnom statusu s obzirom na vrstu epilepsije kod djece, željeli smo vidjeti ima li te koliki je utjecaj različitosti polimorfizma APOE u odnosu na ukupni kolesterol i LDL kolesterol, polazeći od ranije dokazanih studija u kojima se pokazuje utjecaj APOE na metabolizam lipida u mozgu (154, 163, 164).

Mozak sadrži ~ 25% ukupnog kolesterola u tijelu. Iako se većina kolesterola sintetizira u samom mozgu, ipak male količine kolesterola prelaze kroz krvno-moždanu barijeru iz cirkulacije. Suprotan proces prelaska viška kolesterola kroz krvno-moždanu barijeru do

cirkulacije nije moguć pa se pretvara u metabolit 24S-hidroksikolesterol, za koji se smatra da difuzijom pređe barijeru i u cirkulaciji se razgradi i izluči. APOE je glavni nosač kolesterola u središnjem živčanom sustavu (188). Njegov polimorfizam utječe na metabolizam ukupnog kolesterola, a to može rezultirati neadekvatnim kapacitetom opskrbe živčanih stanica kolesterolom i fosfolipidima, te dovesti do oštećenja i razvoja Alzheimerove bolesti (189). Dok postoje uvjerljivi dokazi koji sugeriraju da je APOE polimorfizam uključen u razvoj Alzheimerove bolesti, cerebralne amiloidne angiopatije kao i traumatske ozljeda mozga, uloga APOE nije sasvim jasna kod drugih oblika demencije ili drugih neuroloških bolesti (189).

Nosioci APOE e4 alela imaju višu razinu ukupnog kolesterola, LDL kolesterola i triglicerida zahvaljujući učinkovitijoj apsorpciji crijeva i prema tome imaju veći rizik od hipertenzije i kardiovaskularnih bolesti demencija tipa Alzheimerove bolesti (73, 75). APOE e3 alel koji je divlji tip povezan je s nižim razinama kolesterola i manjim rizikom od razvoja bolesti. APOE e2 alel je povezan također s nižim razinama kolesterola u plazmi i LDL kolesterola, ali višim razinama triglicerida u usporedbi s e3 alelom (67, 69). Takav općeniti stav treba uzeti s rezervom jer učinak APOE polimorfizma na razinu lipida u plazmi umjeren je i individualan. Studije su pokazale da povezanost između APOE polimorfizma i razina lipida, tj. učinak polimorfizma na lipidni status ovisi i o drugim čimbenicima, kao što su: spol, prehrana, konzumacija alkohola, hiperglikemija, primjena estrogenske terapije i eventualno prekomjerna tjelesna težina (190).

Ova studija u prvotnim nalazima lipidograma, u ispitivanoj skupini, promatranima kao kategorijske varijable s obzirom na polimorfizme APOE, nije pokazala statistički značajne razlike. Nisu potvrđeni dosadašnji rezultati u kojima su nosioci alela e2 povezani s nižim razinama ukupnog i LDL kolesterola, višim vrijednostima triglicerida (67, 68). S druge strane Palanisamy i suradnici (191) u svom radu, proučavajući utjecaj APOE e4 na kogniciju kod pacijenata s epilepsijom, uspoređivali su lipidni status i njegovu povezanost s polimorfizmom APOE. Njihova studija, kao i naša, nije pronašla povezanost profila lipida i polimorfizma APOE. Dodatnom analizom naših rezultata, lipidograma, kao kontinuirane varijable, dobivena je značajna razlika u razini LDL-a koji je bio najviši kod polimorfizma e2/e4 ($P=0,020$). To može ukazivati i potvrditi sva ona istraživanja koja zagovaraju sinergistični učinak polimorfizma APOE s jedne strane i čimbenika okoliša s druge strane na lipidni status, bilo da

Monika Kukuruzović, Disertacija

se radi o zdravim pojedincima ili u našem slučaju kod pacijenata koji imaju postavljenu dijagnozu epilepsije (190).

Prognoza dječje epilepsije ima važne epidemiološke i kliničke posljedice. Uspješnost liječenja epilepsije je točno prepoznavanje vrste napada tj. postavljanje ispravne dijagnoze epilepsije ili epilepsijskog sindroma. Postoji opći konsenzus da odrasle osobe i djeca s novodijagnosticiranom epilepsijom imaju 65-75% šanse da uđu u dugotrajnu remisiju (192). Oko 10-15% tijekom vremena postane rezistentno na terapiju, a 10-25% postignu kratkotrajnu remisiju kombinacijom više antiepileptika. Postavljanje točne dijagnoze prema tipu epilepsije i otkrivanje bolesnika kod kojih postoji visok rizik farmakorezistencije je od velike važnosti jer će slaba kontrola napadaja usporiti normalni neurološki razvoj u djeteta oboljelog od epilepsije, a to može imati loš utjecaj na školovanje i buduće zapošljavanje, kao i na cjelokupni obiteljski život.

Dosadašnja istraživanja pokazala su da pojava epileptički napadaja u ranoj dobi, velika frekvencija napada prije i tijekom početne terapije, pozitivna obiteljska anamneza, anamneza o febrilnim konvuzijama, malformacijama mozga ili traumatskim oštećenjima mozga povećavaju vjerojatnost slabe kontrole napadaja i u konačnici loš ishod (192).

S obzirom da je kvaliteta života izuzetno važna, postavljeno je kod svakog pojedinca postavili smo si pitanje postoji li kakav biomarker koji bi mogao predvidjeti samu kontrolu bolesti? Novija istraživanja nisu polučila dobrim rezultatima, a svima je u konačnici ideja da je otkrivanje biomakera u epilepsiji prioritetno radi bolje kontrole i liječenja bolesti, ali i optimalizacije troškova (193).

Aboud i suradnici (161) su u svom radu, vodeći se brojnim studijama koje su polučile rezultatima kod bolesnika s Alzheimerovom bolesti, željeli prikazati ima li APOE utjecaj na ishod kod bolesnika s epilepsijom. Njihovo istraživanje pokazalo je da upacijenata, koji su nosioci APOE e3/3, postoji snažan neuronsko-glijalni odgovor na neuronalni stres tijekom epileptičkog napadaja koji se očituje boljom ekspresijom proteina akutne faze neurona i povećanom elastičnošću stanica s jedne strane, te manjim oštećenjem unutar stanice i manjom osjetljivošću stanice na neprimjerene cikluse i smrt. S druge strane, nosioci APOE e4/e4 u njihovoj studiji bili su u nepovoljnom položaju u usporedbi s drugim genotipima jer su imali

najmanji akutni odgovor i najveću osjetljivost na stres. Zaključno su njihovi rezultati uputili na to da APOE genotip može biti važan u odlukama o vremenu kirurške intervencije za farmakorezistentnu epilepsiju, kao i na odluke o izloženosti pojedinaca aktivnostima s visokim rizikom za traumatsko oštećenje mozga.

U ovoj studiji, a uklapajući se u prosjek europske populacije, statistički značajno najveći broj ispitanika imao je (161) genotip APOE e3/e3, bilo da su bili dobro kontrolirani ili nisu imali adekvatan odgovor na terapiju. Nažalost, nismo imali adekvatan broj nosioca APOE e4/e4. U studiju je bio uključen samo jedan pacijent nosilac APOE e4/e4 i to u grupi ispitanika koja je bila dobro kontrolirana. U grupi s refraktornom epilepsijom nije bilo pacijenata.

Kako bi liječenje bilo adekvatno, potrebno je pravilno odabrati antiepileptik tako da se postigne zadovoljavajući krajnji cilj, što je u interesu pacijenta, ali i neuropedijatra. Kod samog liječenja težnja je svih primjena jednog lijeka u zadovoljavajućoj terapijskoj dozi kad god je to moguće. Primjenom monoterapije smanjuje se broj nepotrebnih odlazaka liječniku i hospitalizacija, što dovodi do bolje suradljivosti pri primjeni terapije, a isto tako smanjuju se nepotrebni troškovi liječenja.

Liječenje započinje primjenom jednog od antiepileptika prve linije za dijagnosticirani oblik bolesti koji po svojim farmakološkim svojstvima najviše odgovara specifičnim karakteristikama svakog pojedinog bolesnika (dob, spol, komorbiditeti, komedikacija, profesija, životne navike i stil, intelektualni kapacitet i slično). Monoterapija je zlatni standard u liječenju epilepsija, ali nažalost često je potrebno koristiti više antiepileptika u različitim kombinacijama kako bi se postigla zadovoljavajuća kontrola bolesti, osobito kod prisustva više oblika epileptičkih napadaja. Unatoč svim pokušajima liječenja epilepsije, otprilike 25% djece bit će refrakturno na medikamentoznu terapiju (48). Liječenje djece predstavlja dodatne probleme, osobito zbog utjecaja lijekova na razvoju mozga, učenje i ponašanje, kada se lijek upotrebljava dugotrajno. Također moramo paziti i na nuspojave lijekova, poput hepatotoksičnosti, neurološke toksičnosti, teratogenosti, preosjetljivosti, metaboličkih i endokrinoloških promjena (53), bilo da se radi o neadekvatnoj dozi ili pak kao posljedica interakcije s drugim lijekovima, stoga je odabir „pravog“ lijeka veliki izazov.

Kao što je već spomenuto, interakcije s lijekovima rezultat su djelovanja sustava citokrom P450 (CYP), bilo da uzrokuje indukciju ili inhibiciju enzima. Rezultat može dovesti do interakcija koje uzrokuju teške nuspojave i štetne učinke s jedne strane ili ne dovode do adekvatnog terapijskog odgovora. Svi učinci ovise o aktivnosti i djelovanju CYP sustava enzima tako da i doze pojedinih antiepileptika mogu uzrokovati nuspojave na primjenu antiepileptika u vrlo maloj koncentraciji. To znači da u tom slučaju osoba ima slab metabolizam lijekova ili inhibira CYP 450 enzimski sustav. S druge strane povećanjem sinteze enzima neki induktori dovode do značajnih kliničkih interakcija (56). Kako bi regulirali i smanjili potencijalne štetne učinke, potrebno je, osim odabira odgovarajućeg lijeka, započeti isti postepeno, prema danim shemama ovisno o terapiji, uspostaviti stabilizirajuću dozu (minimalnu koncentraciju) koja dovodi do razrješenja tegoba, u konkretnom slučaju napadaja, potrebno je pratiti pojavu nuspojava te eventualno predvidjeti farmakokinetiku svakog lijeka. Uvelike nam može pomoći genotipizacija CYP enzimskog sustava u odabiru adekvatnog lijeka kako bi se uspostavila prava kontrola bolesti (194).

Unatoč primjeni prethodnih smjernica i uputa, odabir adekvatne terapije katkada je vrlo težak te se neki napadaji jednostavno ne mogu dovesti pod kontrolu. Prema definiciji Internacionalne lige protiv epilepsije (ILAE), farmakorezistentna epilepsija ili epilepsija otporna na lijekove javlja se kada osoba nije postala (i ostala) bez napadaja s odgovarajućim primjenom dvaju adekvatno izabranih antiepileptika za tu vrstu napadaja, u odgovarajućoj dozi koju pacijent tolerira i pokušao ga je primijeniti kao monoterapiju ili u kombinaciji s drugim antiepileptikom (48). Kwan and Brodie (195) pokazali su u svom radu da 37% pacijenata razvije farmakorezistentnu epilepsiju te su pokazali kakao je malo podataka na temelju dokaza koji nas upućuje kako liječiti farmakorezistentnu epilepsiju. Efektivnost (kontrola napadaja i izostanak nuspojava) antiepileptičkog lijeka je važnija od efikasnosti (kontrola napadaja) jer nuspojave su jedan od razloga zašto mijenjamo terapiju. Farmakorezistentne epilepsije u dječjoj dobi predstavljaju poseban izazov jer učestali napadaji rezultiraju kognitivnim, psihijatrijskim i drugim komorbiditetima te u konačnici iznenadnom neočekivanom smrću povezanom s epilepsijom (SUDEP), što je vodeći uzrok smrti u bolesnika s farmakorezistentnom epilepsijom.

Monika Kukuruzović, Disertacija

Prema istraživanju Berga i sur. (196) 55% djece s generaliziranim napadima razvit će farmakorezistentnu epilepsiju, dok kod djece, koja imaju postavljenu dijagnozu žarišne epilepsije, veliki broj napadaja može dovesti do pojave farmakorezistencije. Stoga danas za prognozu tijeka bolesti koristimo mnoštvo čimbenika, kao što su: vrsta epilepsije, postojanje epileptičkog sindroma, etiologija bolesti, učestalost napadaja, utjecaj čimbenika okoline i genetičkih čimbenika koji utječu na antikonvulzivnu farmakodinamiku (197).

Djeca s različitom vrstom epilepsije, učestalošću napadaja te različitim etiološkim čimbenicima uključena su u ovu studiju. S obzirom na kontrolu podijeljeni su na one koje su dobro kontrolirani, tj. oni koju su bez napada i one koji su refraktorni, tj. farmakorezistentni i imaju recidivirajuće napadaje unatoč terapiji. Antiepileptičku terapiju podijelili smo u tri grupe, odnosno prema utjecaju na CYP enzimski sustav (induktore, inhibitore i bez utjecaja na enzimski sustav). U obje skupine najčešće primjenjivani antiepileptici su iz grupe lijekova koja inhibiraju CYP enzimski sustav (valproat, topiramid, okskarbamazepin).

Naši podatci o najčešće korištenim lijekovima podudaraju se sa svjetskim istraživanjima u kojima su pacijenti, neovisno radi li se o idiopatskoj i simptomatskoj epilepsiji, kao lijek prvog izbora koristili inhibitore CYP enzimskog sustava (valproat i karbamazepin) (187). Kod nas nije nađena razlika u kontroli bolesti ovisno o primijenjenoj terapiji kod djece koja su primala lijekove bilo inhibitore bilo induktore CYP enzimskog sustava, međutim, kod djece koja imaju refraktornu epilepsiju značajno je veći postotak terapije koja nema utjecaja na CYP enzimski sustav (levetiracetam, etosuksimid).

Prema našim podacima možemo zaključiti da bez obzira radi li se o induktorima ili inhibitorima CYP enzimskog sustava, na samu kontrolu bolesti djeluje više čimbenika i ishod liječenja je individualan.

Nažalost, idealne antiepileptičke terapije, koja bi bila dobre oralne bioraspodjelivosti uz poluživot od 12 do 24 sata nema. Takva terapija bi omogućila primjenu lijeka jednom ili dva puta dnevno. Njegovo vezanje na proteine plazme bilo bi minimalno, a to bi dovelo do smanjenog metabolizma lijeka, što bi smanjilo mogućnost za potencijalne interakcije među lijekovima i razvoj nuspojava. Napretkom i razvojem znanosti i tehnologije nadamo se pozitivnom ishodu.

Monika Kukuruzović, Disertacija

Unatoč tome, svi oni koji su uključeni u skrb pacijenata koji boluju od epilepsije trebaju, uz spoznaju o adekvatnom liječenju, razumjeti prirodu bolesti, a cilj svakog liječenja je usmjerena na prestanak i/ili smanjenje frekvencije epileptičkih napadaja i u konačnici poboljšanje kvalitete života.

5. ZAKLJUČCI

Udio genotipa APOE u ispitanika s epilepsijom u skladu je s podacima europskih i svjetskih istraživanja, što znači da je najzastupljeniji divlji tip alela e3/e3.

S obzirom na žarišnu, generaliziranu i neklasificiranu vrstu epilepsije nije nađeno razlika u raspodjeli genotipova kao niti razlika vezanih za pojedinu podvrstu epilepsije, bilo da se radi o simptomatskim ili idiopatskim epilepsijama. Zaključak je da nije potrebno učiniti genotipizaciju kako bi predvidjeli vrstu epilepsije.

Nije nađeno razlika između kontrolne i ispitivane grupe vezano za polimorfizam APOE dok je nađen veći udio kolesterola u kontrolnoj grupi moguće kao posljedica neuravnotežene prehrane s jedne strane, tj. smanjenog apetita kod oboljelih od epilepsije zbog utjecaja pojedinih antiepileptika. Nadovezujući se na taj podatak kod djece oboljelih od epilepsije ovisno o vrsti epilepsije ili genotipu APOE nije pronađena razlika u ukupnom ili LDL kolesterolu.

Iako bi se očekivala bolja kontrola bolesti u ispitanika s divljim tipom, no nije nađeno statistički značajnih razlika u kontroli bolesti obzirom na genotip kao niti razlika između grupa ispitanika koji dobivaju induktore i inhibitore. Zabilježen je veći udio refraktornih epilepsija kod ispitanika koji uzimaju antiepileptike čiji se metabolizam ne odvija preko CYP enzimskog sustava.

Prema dobivenim rezultatima nema jasne kliničke opravdanosti i koristi genotipizacije APOE kod pacijenata s epilepsijom niti kod postavljanja dijagnoze i klasificiranja bolesti, a niti kod praćenja i kontrole same bolesti niti nam služi kao rani znak prepoznavanja i detektiranja pacijenata s mogućom budućom refraktornom epilepsijom. Drugi čimbenici, kao što su dob početka napadaja, učestalost napadaja, utjecaj na neuromotorni razvoj i kasnije način života su važniji za predviđanje tijeka bolesti.

6. LITERATURA

1. Fisher RS. et al. Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. *Epilepsia*. 2017; 58(4):531–542.
2. Camfield P. Incidence, prevalence and aetiology of seizures and epilepsy in children. *Epileptic Disorders*. 2015; 17(2):117-23.
3. Chin JH. The global burden for epilepsy. A proposal. *Neurology* 2013; 80:754-755.
4. Bielen I, Cvitanović-Šojat L, Bergan-Marković B, Kosiček M, Planjar-Prvan M, Vukšić L, Miketek G, Matek P. Prevalence of epilepsy in Croatia: a population-based survey. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2007; 116(6):361-367.
5. Magiorkinis E, Sidiropoulou K, Diamantis A. Hallmarks in the history of epilepsy: epilepsy in antiquity. *Epilepsy and Behavior*. 2010; 17(1):103–108.
6. Stol M. *Epilepsy in Babylonia*, Brill Publishers, Amsterdam. 1993; p 3-20.
7. Longrigg J. Epilepsy in ancient Greek medicine--the vital step. *Seizure*. 2000; 9(1):12-21.
8. <http://www.epilepsy.com/epilepsy/history>
9. Hippocrates. *The Sacred Disease*, 2, Loeb Classical Library and Harvard University Press, London, UK. Translated by W. H. S. Jones. 1965; 2.
10. Temkin, Owsei. *The Falling Sickness: A History of Epilepsy from the Greeks to the Beginnings of Modern Neurology*. 1971.
11. Kluger G, Kudernatsch V. St. Valentine—patron saint of epilepsy: Illustrating the semiology of seizures over the course of six centuries. *Epilepsy & Behavior*. 2009; 14(1):219–225.
12. Magiorkinis E et al. Highlights in the history of epilepsy: the last 200 years. *Epilepsy research and treatment*. 2014; 582039.
13. Pierce JM. Disease once sacred. A history of the medical understanding of epilepsy. *Brain*. 2002; 125(2):441-442.
14. Friedlander W. The rise and fall of bromide therapy in epilepsy. *Arch Neurol*. 2000; 57:1782-1785.
15. Reynolds EH. Todd, Hughlings Jackson, and the electrical basis of epilepsy. *The Lancet*. 2001; 358:575-577.

16. Penry JK, Porter RJ, Dreifuss RE. Simultaneous recording of absence seizures with video tape and electroencephalography. A study of 374 seizures in 48 patients. *Brain*. 1975; 98(3).
17. Gastaut H. Classification of the epilepsies. Proposal for an international classification. *Epilepsia*. 1969; 10:14–21.
18. Millet D. Hans Berger: From psychic energy to EEG. *Perspectives in biology and medicine*. 2001; 44(4):522-542.
19. Locock C. Analysis of fifty-two cases of epilepsy observed by the author. *The Lancet*. 1857; 70:527–529.
20. Prous J. A century of progress in drug therapy. *Drug news perspect*. 1999; 12(10):581.
21. Taylor DC. One hundred years of epilepsy surgery: Sir Victor Horsley's contribution. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1986; 49(5):485-488.
22. Gastaut H. Clinical and electroencephalographical classification of epileptic seizures. *Epilepsia*. 1970; 11:102-113.
23. Commission on classification and terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia*. 1981; 22:489-501.
24. Commission on classification and terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia*. 1989; 30:389-399.
25. Berg AT et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*. 2010; 51(4):676–685.
26. Scheffer IE et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017; 58(4):512–521.
27. Shorvon SD. The etiologic classification of epilepsy. *Epilepsia*. 2011; 52(6):1052–1057.
28. Matsumoto H, Ajmone Marsan C. Cellular mechanisms in experimental epileptic seizures. *Science*. 1964; 144:193–6.
29. Holmes GL, Ben-Ari Y. Seizing hold of seizures. *Nature Med*. 2003; 9:994–6.
30. Chang BS, Lowenstein DH. Epilepsy. *N Engl J Med*. 2003; 349:1257–66.

31. Berg AT, Millichap JJ. The 2010 revised classification of seizures and epilepsy. *Continuum (Minneapolis, Minn)*. 2013; 19:571–597.
32. Katherine H. Noe. Seizures: Diagnosis and Management in the Outpatient Setting. *Semin Neurol*. 2011; 31(1):54-64.
33. Barišić N. Cerebralni napadaji i epilepsije u Barišić N i sur. *Pedijatrijska neurologija, Medicinska naklada*. 2009; p 204-294.
34. Dworetzky BA, Reinsberger C. The role of the interictal EEG in selecting candidates for resective epilepsy surgery. *Epilepsy Behav*. 2011; 20(2):167-171.
35. Kalamangalam GP, Morris HH 3rd, Mani J, Lachhwani DK, Visweswaran S, Bingaman WM. Noninvasive correlates of subdural grid electrographic outcome. *J Clin Neurophysiol*. 2009; 26(5):333-341.
36. Halasz P. Prolonged EEG-monitoring. *Ideggyogy Sz*. 2011; 64(9-10):314-316.
37. Taheri MR, Krauthamer A, Otjen J, Khanna PC, Ishak GE. Neuroimaging of migrational disorders in pediatric epilepsy. *Curr Probl Diagn Radiol*. 2012; 41(1):11-9.
38. Takanashi J. MRI and CT in the diagnosis of epilepsy. *Japanese journal of clinical medicine*. 2014; 72(5):819–26.
39. La Fougère C. et al. PET and SPECT in epilepsy: A critical review. *Epilepsy & Behavior*. 2009; 15(1):50–55.
40. Baxendale S. Neuropsychology-testing the brain. In: Duncan, JS and Sisodiya, SM and Smalls, JE, (eds.) *Epilepsy 2001: from science to patient - Lecture notes: 8th Epilepsy Teaching Weekend, September 28-30, 2001. St Anne's College, Oxford 2001*; p 219–224.
41. <https://www.epilepsy.com/learn/treating-seizures-and-epilepsy/surgery/pre-surgery-tests/wada-test>
42. Fuhr U. Induction of drug metabolising enzymes: pharmacokinetic and toxicological consequences in humans. *Clin Pharmacokinet*. 2000; 38:493-504.
43. Kukuruzovic M, Cvitanovic-Šojat Lj, Malenica M, Kužnik K. Pretrage kod postavljanja dijagnoze epilepsije. *Paediatr Croat*. 2012; 56(1):170-175.
44. Elger CE, Schmidt D. Modern management of epilepsy, a practical approach. *Epilepsy Behav*. 2008; 12:501–39.

45. Perucca E. Cannabinoids in the Treatment of Epilepsy: Hard Evidence at Last?. *J Epilepsy Res.* 2017; 7(2):61–76.
46. Glauser T, Ben-Menachem E, Bourgeois B, Cnaan A, Chadwick D, Guerreiro C, Kalviainen R, Mattson R, Perucca E, Tomson T. ILAE treatment guidelines: evidence-based analysis of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes. *Epilepsia.* 2006; 47(7):1094-120.
47. Kwan P, Brodie MJ. Combination therapy in epilepsy: when and what to use. *Drugs.* 2006; 66(14):1817-29.
48. Kwan P, Schachter SC, Brodie MJ. Drug-resistant epilepsy. *N Engl J Med.* 2011; 365(10):919-26.
49. Livingston S. Antiepileptic drugs. *Am J Nurs.* 1963;63:103-7.
50. El-Dib M, Soul JS. The use of phenobarbital and other anti-seizure drugs in newborns. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2017; 22(5):321-327.
51. Bialer M, Johannessen SI, Kupferberg HJ, Levy RH, Perucca E, Tomson T. Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the Eighth Eilat Conference (EILAT VIII). *Epilepsy Res.* 2007; 73(1):1-52.
52. Lynch BA, Lamberg N, Nocka K, et al. The synaptic vesicle V2A is the binding site for levetiracetam. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101(26):9861-6.
53. Kwan P, Sills GJ, Brodie MJ. The mechanisms of action of commonly used antiepileptic drugs. *Pharmacol Ther* 2001; 90:21-34.
54. Gayatri NA., Livingston JH. Aggravation of epilepsy by anti-epileptic drugs. *Dev med child neurol.* 2006; 48(5):394-398.
55. Yuan R, Parmelee T, Balian JD, Upoor RS, Ajayi F, Burnett A et al. In vitro interaction studies: experience of the food and drug administration. *Clin Pharmacol Ther.* 1999; 66:9-15.
56. Levy RH. Cytochrome P450 isozymes and antiepileptic drug interactions. *Epilepsia.* 1995; 136:8-13.
57. Dossing M, Pilsgaard H, Rasmussen B, Poulsen HE. Time course of phenobarbital and cimetidine mediated changes in hepatic drug metabolism. *Eur J Clin Pharmacol.* 1983; 25:215-22.

58. Wilkins PB, Wrighton SA, Schuetz EG, Molona DT, Guzelian PS. Identification of glucocorticoid inducible cytochrome P450 in the intestinal mucosa of rats and man. *J Clin Inves.* 1987; 80:1029-36.
59. Benedetti MS. Enzyme induction and inhibition by new antiepileptic drugs: a review of human studies. *Fundam Clin Pharmacol.* 2000; 14(4):301-19.
60. Gustafson A, Alaupovic P & Furman R H. Studies of the composition and structure of serum lipoproteins. Separation and characterization of phospholipid-protein residues obtained by partial delipidization of very low density lipoproteins of human serum. *Biochemistry.* 1966; 5:632-40.
61. Law SW, Lackner KJ, Fojo SS, Hospattankar A, Monge JC, Brewer HB Jr. The molecular biology of human apo A-I, apo A-II, apo C-II, apo B. In Argel A & Frolich J: Lipoprotein deficiency syndromes. *Adv Exp Med Biol.* 1986; 201:151-62.
62. Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Cooper CJ, Yasin M, Eaton GM, Lauer MA, Sheldon WS, Grines CL, Halpern S, Crowe T, Blankenship JC, Kerensky R. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2003; 290 (17):2292–300.
63. Benn M, Nordestgaard BG, Jensen JS, Grande P, Sillesen H, Tybjaerg-Hansen A. Polymorphism in APOB associated with increased low-density lipoprotein levels in both genders in the general population. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(10):5797-803.
64. Pullinger CR et al. Two apolipoprotein B gene defects in a kindred with hypobetalipoproteinemia, one of which results in a truncated variant, apoB-61, in VLDL and LDL. *Journal of lipid research.* 1992; 33(5):699–710.
65. Chen SH, Yang CY, Chen PF, Setzer D, Tanimura M, Li WH, Gotto AM Jr, Chan L. "The complete cDNA and amino acid sequence of human apolipoprotein B-100". *Journal of Biological Chemistry.* 1986; 261(28):12918–12921.
66. Lee J, Hegele RA. Abetalipoproteinemia and homozygous hypobetalipoproteinemia: a framework for diagnosis and management. *J Inherit Metab Dis.* 2014; 37(3):333-9.
67. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J. Lipid Res.* 1984; 25(12):1277–94.

68. Drayna DT, McLean JW, Wion KL, Trent JM, Drabkin HA, Lawn RM. Human apolipoprotein D gene: gene sequence, chromosome localization, and homology to the alpha 2u-globulin superfamily. *DNA*. 1987;6(3):199-204.
69. Mahley RW, Rall SC, Jr. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2000;1:507–537.
70. Phillips MC. Apolipoprotein E isoforms and lipoprotein metabolism. *IUBMB Life*. 2014; 66(9):616–23.
71. Singh PP, Singh M, Mastana SS. APOE distribution in world populations with new data from India and the UK. *Annals of Human Biology*. 2006; 33(3):279–308.
72. Huang Y, Mahley RW. Apolipoprotein E: Structure and Function in Lipid Metabolism, Neurobiology, and Alzheimer's Diseases. *Neurobiol Dis*. 2014; 72PA:3–12.
73. Mahley RW. Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*. 1988; 240:622–630.
74. Herz J, Bock HH. Lipoprotein receptors in the nervous system. *Annu Rev Biochem*. 2002; 71:405–434.
75. Bu G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci*. 2009; 10:333–344.
76. Mahley RW, Rall SC Jr. Type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia): The role of apolipoprotein E in normal and abnormal lipoprotein metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill. 2001; p2835–2862.
77. Huang X, Chen PC, Poole C. APOE-[epsilon]2 allele associated with higher prevalence of sporadic Parkinson disease. *Neurology*. 2004; 62(12):2198-202.
78. McKay GJ et al. Evidence of association of APOE with age-related macular degeneration: a pooled analysis of 15 studies. *Human mutation*. 2011;32(12):1407–16.
79. Chen J, Li Q, Wang J. Topology of human apolipoprotein E3 uniquely regulates its diverse biological functions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108:14813–14818.
80. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 1993; 261(5123):921-3.

81. Farlow MR, He Y, Tekin S, Xu J, Lane R, Charles HC. Impact of APOE in mild cognitive impairment. *Neurology*. 2004; 63(10):1898–901.
82. Chapman J, Vinokurov S, Achiron A, Karussis DM, Mitosek-Szewczyk K, Birnbaum M, Michaelson DM, Korczyn AD. APOE genotype is a major predictor of long-term progression of disability in MS. *Neurology*. 2001; 56(3):312–6.
83. Friedman G, Fromm P, Sazbon L, Grinblatt I, Shochina M, Tsenter J, Babaey S, Yehuda B, Groswasser Z. Apolipoprotein E-epsilon4 genotype predicts a poor outcome in survivors of traumatic brain injury. *Neurology*. 1999; 52(2):244–8.
84. McCarron MO, DeLong D, Alberts MJ. APOE genotype as a risk factor for ischemic cerebrovascular disease: a meta-analysis. *Neurology*. 1999;53(6):1308–1.
85. Kadotani H, Kadotani T, Young T, Peppard PE, Finn L, Colrain IM, Murphy GM, Mignot E. Association between apolipoprotein E epsilon4 and sleep-disordered breathing in adults. *JAMA*. 2001;285(22):2888–90.
86. Huebbe P, Nebel A, Siegert S, Moehring J, Boesch-Saadatmandi C, Most E, Pallauf J, Egert S, Müller MJ, Schreiber S, Nöthlings U, Rimbach G. APOE ε4 is associated with higher vitamin D levels in targeted replacement mice and humans. *FASEB Journal*. 2011;25(9):3262–70.
87. Mondadori CR, de Quervain DJ, Buchmann A, Mustovic H, Wollmer MA, Schmidt CF, Boesiger P, Hock C, Nitsch RM, Papassotiropoulos A, Henke K. Better memory and neural efficiency in young apolipoprotein E epsilon4 carriers. *Cerebral Cortex*. 2007; 17(8):1934–47.
88. Hauser PS, Ryan RO. Impact of apolipoprotein E on Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*. 2013; 10(8):809–17.
89. Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM. Effects of age, sex and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA*. 1997; 278(16):1349–56.
90. Wisniewski T, Frangione B. Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. *Neuroscience Letters*. 1992; 135(2):235–8.

91. Roberts GW, Gentleman SM, Lynch A, Graham DI. Beta A4 amyloid protein deposition in brain after head trauma. *Lancet*. 1991; 338(8780):1422-3.
92. McKee AC, Cantu RC, Nowinski CJ, Hedley-Whyte ET, Gavett BE, Budson AE, et al. Chronic traumatic encephalopathy in athletes: progressive tauopathy after repetitive head injury. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2009; 68:709–35.
93. Jordan BD, Relkin NR, Ravdin LD, Jacobs AR, Bennett A, Gandy S. Apolipoprotein E epsilon4 associated with chronic traumatic brain injury in boxing. *JAMA*. 1997; 278(2):136-40.
94. Martinez-Gonzalez NA, Sudlow CL. Effects of apolipoprotein E genotype on outcome after ischaemic stroke, intracerebral haemorrhage and subarachnoid haemorrhage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006; 77:1329–35.
95. McCarron MO, Muir KW, Nicoll JA, Stewart J, Currie Y, Brown K, et al. Prospective study of apolipoprotein E genotype and functional outcome following ischemic stroke. *Arch Neurol*. 2000; 57:1480–4.
96. Høgh P, Oturai A, Schreiber K, Blinkenberg M, Jørgensen OS, Ryder L, Paulson OB, Sørensen PS, Knudsen GM. Apolipoprotein E and multiple sclerosis: impact of the epsilon-4 allele on susceptibility, clinical type and progression rate. *Mult Scler*. 2000; 6(4):226-30.
97. Pinholt M, Frederiksen JL, Christiansen M. The association between apolipoprotein E and multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2006; 13:573–80.
98. Ghaffar O, Reis M, Pennell N, O'Connor P, Feinstein A. APOE epsilon 4 and the cognitive genetics of multiple sclerosis. *Neurology*. 2010; 74:1611-8.
99. Burwick RM, Ramsay PP, Haines JL, Hauser SL, Oksenberg JR, Pericak-Vance MA, et al. APOE epsilon variation in multiple sclerosis susceptibility and disease severity: some answers. *Neurology*. 2006; 66:1373–83.
100. Poirier J. Cholesterol transport and synthesis are compromised in the brain in sporadic Alzheimer's disease: from risk factors to therapeutic targets. In: Gauthier S, Cummings JL, eds. *Alzheimer's Disease and Related Disorders Annual*. Martin Dunitz Ltd. 2002; p1–21.
101. <http://neuron.MeFsT.Hr/doCs/KaTedre/neurologija/MediCina/epilepsije.pdf>.

102. Masliah E, Mallory M, Veinbergs I, Miller A and Samuel W. Alterations in apolipoprotein E expression during aging and neurodegeneration. *Prog Neurobiol.* 1996; 50:493–503.
103. Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburgand I, Rydel RE Beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci.* 1992;12:376–389.
104. Mahley RW, Nathan BP and Pitas RE. Apolipoprotein E. Structure, function, and possible roles in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1996; 777:139–145.
105. Holtzman DM, Fagan AM, Mackey B, Tenkova T, Sartorius L, Paul SM, Bales K, Ashe KH, Irizarry MC, Hyman BT. Apolipoprotein e facilitates neuritic and cerebrovascular plaque formation in an Alzheimer's disease model. *Ann. Neurol.* 2000; 47:739-747.
106. Lomnitski L, Chapman S, Hochman A, Kohen R, Shohami E, Chen Y, Trembovler V, Michaelson DM. Antioxidant mechanisms in apolipoprotein e deficient mice prior to and following closed head injury. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999; 1453:359-368.
107. Levi O, Jongen-Relo AL, Feldon J, Roses AD, Michaelson DM. Apoe4 impairs hippocampal plasticity isoformspecifically and blocks the environmental stimulation of synaptogenesis and memory. *Neurobiol. Dis.* 2003; 13:273-282.
108. Bickeboller H, Campion D, Brice A, Amouyel P, Hannequin D, Didierjean O, Penet C, Martin C, Perez-Tur J, Michon A et al. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: genotype-specific risks by age and sex. *Am J Hum Genet.* 1997; 60:439–446.
109. Orwa A, Mrak RE, Boop Frederick A, Sue W Griffin T. Epilepsy: neuroinflammation, neurodegeneration, and APOE genotype. *Acta Neuropathol Commun.* 2013; 3:1-41.
110. Kumar A, Tripathi M, Pandey RM, Ramakrishnan L, Srinivas M, Luthra K. Apolipoprotein E in Temporal Lobe Epilepsy: A Case-Control Study. *Dis Markers.* 2006; 22(5-6):335–342.
111. Blumcke I, Brockhaus A, Scheiwe C, Rollbrocker B, Wolf HK, Elger CE, Wiestler OD. The apolipoprotein e epsilon 4 allele is not associated with early onset temporal lobe epilepsy. *Neuroreport.* 1997; 8:1235-1237.
112. Gambardella A, Aguglia U, Cittadella R, Romeo N, Sibilgia G, LePiane E, Messina D, Manna I, Oliveri RL, Zappia M, Quattrone A. Apolipoprotein E polymorphisms and the risk of nonlesional temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 1999; 40:1804-7.

113. Yeni SN, Ozkara C, Buyru N, Baykara O, Hanoglu L, Karaagac N, Ozyurt E, Uzan M. Association between APOE polymorphisms and mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *European journal of neurology: the official journal of the European Federation of Neurological Societies*. 2005; 12:103-7.
114. Diaz-Arrastia R, Gong Y, Fair S, Scott KD, Garcia MC, Carlile MC, Agostini MA, Van Ness PC. Increased risk of late posttraumatic seizures associated with inheritance of apoe epsilon4 allele. *Arch. Neurol.* 2003; 60(6):818-22.
115. Briellmann RS, Torn-Broers Y, Busuttill BE, Major BJ, Kalnins RM, Olsen M, Jackson GD, Frauman AG, Berkovic SF. Apoe epsilon4 genotype is associated with an earlier onset of chronic temporal lobe epilepsy. *Neurology*. 2000; 55:435-437.
116. Sporis D, Sertic J, Henigsberg N, Mahovic D, Bogdanovic N, Babic T. Association of refractory complex partial seizures with a polymorphism of apoe genotype. *J. Cell Mol. Med.* 2005; 9:698-703.
117. Chapin JS, Busch RM, Janigro D, Dougherty M, Tilelli CQ, Lineweaver TT, Naugle RI, Diaz-Arrastia R, Najm IM. Apoe epsilon4 is associated with postictal confusion in patients with medically refractory temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 2008; 81:220-224.
118. Li Z, Ding C, Gong X, Wang X, Cui T. Apolipoprotein E ε4 Allele was Associated with Nonlesional Mesial Temporal Lobe Epilepsy in Han Chinese Population. *Medicine*. 2016; 95(9):2894.
119. Gambardella A, Aguglia U, Chifari R, Labate A, Manna I, Serra P, Romeo N, Sibilgia G, Lepiane E, Russa A.L, Ventura P, Cittadella R, Sasanelli F, Colosimo E, Leggio U, Zappia M, Quattrone A. Apoe epsilon4 allele and disease duration affect verbal learning in mild temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 2005; 46:110-117.
120. Kadis D, Iida K, Kerr E, Logan W, McAndrews M, Ochi A, et al. Intrahemispheric reorganization of language in children with medically intractable epilepsy of the left hemisphere. *J Int Neuropsychol Soc.* 2007; 13:505–16.
121. Taupin P. Adult neurogenesis and neuroplasticity. *Rest Neurol Neurosci.* 2006; 24:9–15.
122. Rakic P. Guidance of neurons migration to the fetal monkey neocortex. *Brain Res.* 1971; 33:471–6.

123. Nadarajah B, Parnavelas JG. Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci.* 2002; 3:423–32.
124. Uylings H. Development of the human cortex and the concept of ‘critical’ or ‘sensitive’ periods. In: Gullberg M, Inderfrey P, editors. *Series in cognitive neuroscience and language learning and processing.* Oxford: Blackwell Publishing. 2006; p59–90.
125. Stiles J, Jernigan T. The basics of brain development. *Neuropsychol Rev.* 2010; 20:327–48.
126. Luciana M. Cognitive development in children born preterm: implications for theories of brain plasticity following early injury. *Dev Psychopathol.* 2003; 15:1017–47.
127. Koenderink M, Uylings H, Mrzljak L. Postnatal maturation of the layer III pyramidal neurons in the human prefrontal cortex: a quantitative Golgianalysis. *Brain Res.* 1994; 653:173–82.
128. Koenderink M, Uylings H. Postnatal maturation of later V pyramidal neurons in the human prefrontal cortex. A quantitative Golgi analysis. *Brain Res.* 1995; 678:233–43.
129. Mrzljak L, Uylings H, Kostovic I, Van Eden C. Prenatal development of neurons in the human prefrontal cortex. I. A qualitative golgi study. *J Comp Neurol.* 1988; 271:355–86.
130. Zecevic N, Rakic P. Synaptogenesis in monkey somatosensory cortex. *Cerebral Cortex.* 1991; 1:510–23.
131. Bertenthal B, Campos J. New directions in the study of early experience. *Child Dev.* 1987; 58:560–7.
132. Rakic P, Bourgeois J, Eckenhoff M, Zecevic N, Goldman-Rakic P. Concurrent overproduction of synapses in diverse regions of the primate cerebral cortex. *Science.* 1986; 232:232–5.
133. Thatcher R. Human frontal lobe development. In: Krasnegor N, Lyon G, Goldman-Rakic P, editors. *Development of the prefrontal cortex.* Baltimore: Paul H Brookes. 1997; p85–113.
134. Paus T, Zijdenbos A, Worsley K, Collins DL, Blumenthal J, Giedd JN, Rapoport JL, Evans AC. Structural maturation of neural pathways in children and adolescents: in vivo study. *Science.* 1999; 283:1908–1911.

135. Kolb B, Gibb RJ. Brain plasticity and behaviour in the developing brain. *Can Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2011; 20(4):265-76.
136. Staudt M. Reorganization after pre- and perinatal brain lesions. *J Anat*. 2010; 217:469–74.
137. Sharma A, Nash AA, Dorman M. Cortical development, plasticity and re-organization in children with cochlear implants. *J Commun Disord*. 2009; 42:272–9.
138. Kennard M. Cortical reorganization of motor function. Studies on series of monkeys of various ages from infancy to maturity. *Arch Neurol Psychiatr*. 1942; 48:227–240.
139. Chen R, Cohen L, Hallett M. Nervous system reorganization following injury. *Neuroscience*. 2002; 111:761–73.
140. Weber YG, Lerche H. Genetic mechanisms in idiopathic epilepsies. *Dev Med Child Neurol*. 2008; 50(9):648–54.
141. Jette N, Reid AY, Wiebe S. Surgical management of epilepsy. *CMAJ: Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. Canadian Medical Association. 2014; 186(13):997–1004.
142. Laxpati NG, Kasoff WS, Gross RE. Deep brain stimulation for the treatment of epilepsy: circuits, targets, and trials. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. Springer. 2014; 11(3):508–26.
143. Engel J et al. Epilepsy biomarkers. *Epilepsia*. 2013; 54(4):61–9.
144. Dekroon RM, Armati PJ. Synthesis and processing of apolipoprotein E in human brain cultures. *Glia*. 2001; 33: 298–305.
145. Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Foss D, Mahley RW. Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*. 1987; 917:148–161.
146. Gallardo G, Schluter OM, Sudhof TC. A molecular pathway of neurodegeneration linking alpha-synuclein to ApoE and A beta peptides. *Nat Neurosci*. 2008; 11:301–308.
147. Martins CA, Oulhaj A, De Jager CA, Williams JH. APOE alleles predict the rate of cognitive decline in Alzheimer disease: a nonlinear model. *Neurology*. 2005; 65:1888–1893.
148. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased

- frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:1977–1981.
149. Blackman JA, Worley G, Strittmatter WJ. Apolipoprotein E and brain injury: implications for children. *Developmental medicine and child neurology*. 2005; 47(1):64–70.
150. Emmerich T, Abdullah L, Crynen G, Dretsch M, Evans J, Ait-Ghezala G, Reed J, Montague H, Chaytow H, Mathura V, Martin J, Pelot R, Ferguson S, Bishop A, Phillips J, Mullan M, Crawford F. Plasma Lipidomic Profiling in a Military Population of Mild Traumatic Brain Injury and Post-Traumatic Stress Disorder with Apolipoprotein E ϵ 4-Dependent Effect. *J Neurotrauma*. 2016; p1–18.
151. Teasdale GM, Nicoll JA, Murray G, Fiddes M. Association of apolipoprotein E polymorphism with outcome after head injury. *Lancet*. 1997; 350:1069–1071.
152. Aboud O, Mark RE, Boop FE, Griffin WST. Epilepsy: neuroinflammation, neurodegeneration and APOE genotype. *Acta Neuropathol Commun*. 2013; 1:41.
153. Kurowski B, Martin Lisa J, Wade Shari L. Genetics and outcomes after traumatic brain injury (TBI): What do we know about pediatric TBI?. *Pediatr Rehabil Med*. 2012; 5(3):217–231.
154. Matsuda A, Nagao K, Matsuo M, Kioka N, Ueda K. 24(S)-hydroxycholesterol is actively eliminated from neuronal cells by ABCA1. *J Neurochem*. 2013; 126(1):93-101.
155. Gallek MJ, Conley YP, Sherwood PR, Horowitz MB, Kassam A, Alexander SA. Apoe genotype and functional outcome following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Biol. Res. Nurs*. 2009; 10:205-212.
156. Han SD, Suzuki H, Drake AI, Jak AJ, Houston WS, Bondi MW. Clinical, cognitive, and genetic predictors of change in job status following traumatic brain injury in a military population. *J. Head Trauma Rehabil*. 2009; 24:57-64.
157. Mo MC, Muir KW, Weir CJ, Dyker AG, Bone I, Nicoll JA, Lees KR. The apolipoprotein e epsilon4 allele and outcome in cerebrovascular disease. *Stroke* 1998; 29:1882—1887.
158. Giray O, Ulgenalp A, Bora E, Uran N, Yilmaz E, Unalp A et al. Role of apolipoprotein E in febrile convulsion. *Pediatr Neurol*. 2008; 39:241–244.

159. Lavenex P, Lavenex PB, Cachat F, Gehri M, Juvet T. No association between ApoE polymorphism and febrile seizures. *Neurol Sci.* 2016; 37(1):31-6.
160. Lien E, Andersen GL, Bao Y, Gordish-Dressman H, Skranes JS, Vik T, Blackman JA. Apolipoprotein E polymorphisms and severity of cerebral palsy: a cross-sectional study in 255 children in Norway. *Dev Med Child Neurol.* 2013; 55(4):372-7.
161. Aboud O, Mrak RE, Boop F, Griffin ST. Apolipoprotein epsilon3 alleles are associated with indicators of neuronal resilience. *BMC Med.* 2012; 10:35.
162. Chhabra S et al. Study of polipoprotein E polymorphism in normal healthy controls from northern India, *Dis Markers.* 2000; 16:159-161.
163. Fagan AM, Holtzman DM, Munson G, Mathur T, Schneider D, Chang LK et al. Unique lipoproteins secreted by primary astrocytes from wild type, apoE (-/-), and human apoE transgenic mice. *J Biol Chem.* 1999; 274:30001–30007.
164. Gong JS et al. Apolipoprotein E (ApoE) isoform-dependent lipid release from astrocytes prepared from human ApoE3 and ApoE4 knock-in mice. *J Biol Chem.* 2002; 277:29919–29926.
165. Cedazo-Minguez A. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *J Cell Mol Med.* 2007; 11:1227–1238.
166. Horsburgh K, McCarron MO, White F, Nicoll JA. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease, acute brain injury and cerebrovascular disease: evidence of common mechanisms and utility of animal models. *Neurobiol Aging.* 2000; 21:245-255.
167. Kottke BA, Moll PP, Michels V, Vand Weidman WH. Levels of lipids, lipoproteins, and apolipoproteins in a defined population *Mayo Clin Proc.* 1991; 66:1198–1208.
168. Howland DS et al. Modulation of secreted beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide in brain by cholesterol, *J Biol Chem.* 1998; 273:16576–16582.
169. Koudinov AR, Koudinova NV. Essential role for cholesterol in synaptic plasticity and neuronal degeneration, *Faseb J.* 2001; 15:1858–1860.
170. Sridharan R. Epidemiology of epilepsy. *Current science.* 2002; 6(82): 664-670.
171. Holmes G. Effects of early seizures on later behavior and epileptogenicity. *Ment ret and dev disab.* 2004; 10(2):101-105.

172. Falconer MA, Serafetinides EA, Corseillis JAN. Etiology and pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Arch Neurol.* 1964; 10:233-248.
173. Vestergaard M, Pedersen CB, Sidenius P, Olsen J, Christensen J. The long-term risk of epilepsy after febrile seizures in susceptible subgroups. *American journal of epidemiology.* 2007; 165:911-8.
174. Janszky J, Janszky I, Ebner A. Age at onset in mesial temporal lobe epilepsy with a history of febrile seizures. *Neurology.* 2004; 63:1296-8.
175. Scott RC, King MD, Gadian DG, Neville BG, Connelly A. Hippocampal abnormalities after prolonged febrile convulsion: a longitudinal MRI study. *Brain: a journal of neurology.* 2003; 126:2551-7.
176. Kauffman MA, Consalvo D, Moron DG, Lereis VP, Kochen S. ApoE epsilon4 genotype and the age at onset of temporal lobe epilepsy: a case-control study and meta-analysis. *Epilepsy Res.* 2010; 90:234-9.
177. Leal B, Chaves J, Carvalho C, Bettencourt A, Freitas J, Lopes J, Ramalheira J, Costa PP, Mendonça D, Silva AM, Silva BM. Age of onset of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: the effect of apolipoprotein E and febrile seizures. *Int J Neurosci.* 2017; 127(9):800-804.
178. Sporiš D, Bašić S, Sertić J, Mahović Lakušić D and Babić T. Is apolipoprotein E ϵ 2 associated with delayed onset of non-lesional temporal lobe epilepsy? *Acta Clin Croat.* 2017; 56:10-14.
179. Kilpatrick ES, Jagger CE, Spooner RJ, Brodie MJ. Apolipoprotein E and epilepsy. *Ann Clin Biochem.* 1996; 33:146-7.
180. Matsuda I, Higashi A, Inotsume N. Physiologic and metabolic aspects of anticonvulsants. *Pediatr Clin North Am.* 1989; 36(5):1099-111.
181. Calandre EP, Rodriguez-Lopez C, Blazquez A, Cano D. Serum lipids, lipoprotein and apolipoproteins A and B in epileptic patients treated with valproic acid, carbamazepine or phenobarbital. *Acta Neurol Scand.* 1991; 83:250-253.
182. Sudhop T, Bauer J, Elger CE, Von Bergmann K. Increased high-density lipoprotein cholesterol in patients with epilepsy treated with carbamazepine: a gender-related study. *Epilepsia.* 1999; 40:480-484.

183. De Backer G, Ambrosioni E, Borch-Johnsen K, et al. European guidelines on cardiovascular disease and prevention in clinical practice. *Atherosclerosis*. 2003; 171:145-155.
184. Hackman AM, Bricker JT. Preventive cardiology, hypertension, and dyslipidemia. In : *The Science and Practice of Pediatric Cardiology*. Garason A, Bricker JT, Fisher DJ, Neish SR (eds.). Baltimore Williams & Wilkins. 1998; p2243-2260.
185. Tomoum HY, Awadallah MM, Fouad DA and Ali AH. Lipid Profile, Apolipoproteins A and B in Children With Epilepsy *Journal of Child Neurology*. 2008; 23(11):1275-1281.
186. Manimekalahi K, Visakan B, Salwe KJ, Murugesan S. Evaluation of Effect of Antiepileptic Drugs on Serum Lipid Profile among Young Adults with Epilepsy in a Tertiary Care Hospital in Pondicherry. *J Clin Diagn Res*. 2014;(8):HC05-09.
187. Dudley RW, Penney SJ, Buckley DJ. First-drug treatment failures in children newly diagnosed with epilepsy. *Pediatr Neurol*. 2009; 40(2):71-77.
188. Dietschy JM, Turley SD. Cholesterol metabolism in the brain, *Curr. Opin. Lipidol*. 2001; (2)105-112.
189. Verghese PB, Castellano JM, Holtzman DM. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders, *Lancet Neurol*. 2011; 10:241-252.
190. Frikke-Schmidt R. Context-dependent and invariant associations between APOE genotype and levels of lipoproteins and risk of ischemic heart disease: a review. *Scand. J. Clin. Lab. Investig*. 2000; 233:3-25.
191. Palanisamy A, Rajendran NN, Narmadha MP, Ganesvaran RA. Association of apolipoprotein E ϵ 4 allele with cognitive impairment in patients with epilepsy and interaction with phenytoin monotherapy. *Epilepsy Behav*. 2013; 26(2):165-9.
192. Camfield C, Camfield P, Gordon K, Smith B, Dooley J. Outcome of childhood epilepsy: a population-based study with a simple predictive scoring system for those treated with medication. *J Pediatr*. 1993; 122:861–8.
193. Pitkänen A, Ekolle Ndode-Ekane X, Lapinlampi N, Puhakka N. Epilepsy biomarkers - Toward etiology and pathology specificity. *Neurobiol Dis*. 2018; S0969-9961(18):30145-1.

194. Desta Z, Zhao X, Shin J, Flockhart D. Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. *Clin Pharmacokinet.* 2002; 41(12):913-58.
195. Kwan P, Brodie MJ. Early identification of refractory epilepsy. *New England Journal of Medicine.* 2000; 342(5):314-318.
196. Berg AT, Shinnar S, Levy SR, Testa FM, Smith-Rapaport S, Beckerman B, Ebrahimi N. Two-year remission and subsequent relapse in children with newly diagnosed epilepsy. *Epilepsia.* 2001; 42(12):1553-1562.
197. French JA. Refractory epilepsy: clinical overview. *Epilepsia.* 2007; 48(Suppl.1):3-7.

7. PRILOZI

7.1. Popis tablica

Tablica 1. Rutinska laboratorijska obrada

Tablica 2. Dodatna laboratorijska obrada

Tablica 3. Antiepileptici, tip neželjenih reakcija

Tablica 4. Antiepileptici, mehanizam djelovanja, enzimi djelovanja

Tablica 5. Podjela apolipoproteina

Tablica 6. APOE frekvencija gena i genotipa u ljudskoj populaciji

Tablica 7. Podjela ispitanika prema podvrsti epilepsije

Tablica 8. Lijekovi koje su bolesnici uzimali s različitim djelovanjem na CYP metabolizam

Tablica 9. Podjela ispitanika prema vrsti terapije

Tablica 10. Rezultati

Tablica 11. Metode mjerenja lipida

Tablica 12. Razlike u raspodjeli pojedinih polimorfizama gena APOE ovisno o vrsti epilepsije: Fisher-Freeman-Haltonov egzaktni test

Tablica 13. Razlike u raspodjeli pojedinih polimorfizama gena APOE ovisno o podvrsti epilepsije: Fisher-Freeman-Haltonov egzaktni test

Tablica 14. Razlike u raspodjeli pojedinih polimorfizama gena APOE ovisno radi li se o simptomatskoj ili idiopatskoj podvrsti epilepsije: Fisher-Freeman-Haltonov egzaktni test

Tablica 15. Izračun Hardy-Weinbergove ravnoteže polimorfizma gena APOE u ispitivanoj skupini djece s epilepsijom (N = 111)

Tablica 16. Razlike u zastupljenosti djevojčica i dječaka, dobnih skupina, nalazima lipidograma te polimorfizama gena APOE između ispitivane i kontrolne skupine

Tablica 17. Razlike u dobi, indeksu tjelesne mase te nalazima lipidograma (promatranima kao kontinuirane varijable) između ispitivane i kontrolne skupine: Mann-Whitney U test

Tablica 18. Razlike u dobnim skupinama ispitanika obzirom na polimorfizme APOE

Tablica 19. Razlike u nalazima lipidograma promatranima kao kategorijske varijable s obzirom na vrstu epilepsije u ispitivanoj skupini: Fisher-Freeman-Haltonov egzaktni test

Tablica 20. Razlike u nalazima lipidograma promatranima kao kontinuirane varijable obzirom na vrstu epilepsije u ispitivanoj skupini: Kruskal-Wallisov test

Tablica 21. Razlike u nalazima lipidograma promatranima kao kategorijske varijable s obzirom na polimorfizme APOE u ispitivanoj skupini: Fisher-Freeman-Haltonov egzaktni test

Tablica 22. Razlike u nalazima lipidograma promatranima kao kontinuirane varijable s obzirom na polimorfizme APOE u ispitivanoj skupini: Kruskal-Wallisov test

Tablica 23. Razlike u kontroli bolesti ovisno o genotipu koji dijete ima

Tablica 24. Razlika u kontroli bolesti ovisno o primijenjenoj terapiji kod djeteta

7.2. Popis slika

Slika 1. Apolipoprotein E

Slika 2. Kromosom 19q13.2

Slika 3. APOE (E2,E3,E4) Light Cycler

Slika 4. Razlike u raspodjeli pojedinih polimorfizama gena APOE ovisno o vrsti epilepsije

Slika 5. Razlike u raspodjeli pojedinih polimorfizama gena APOE ovisno o podvrsti epilepsije

Slika 6. Razlike u raspodjeli simptomatskih i idiopatskih podvrsta epilepsije ovisno o polimorfizmu gena APOE u ispitivanoj skupini

Slika 7. Raspodjela APOE polimorfizma u ispitivanoj skupini

Slika 8. Razlike u razini ukupnog kolesterola između ispitivane i kontrolne skupine: Mann-Whitney U test, $P < 0,001$

Slika 9. Razlike u razini LDL između ispitivane i kontrolne skupine: Mann-Whitney U test, $P < 0,001$

Slika 10. Razlike u dobnim skupinama ispitanika obzirom na polimorfizme APOE

Slika 11. Razlike u kontroli bolesti ovisno o genotipu koji dijete ima

Slika 12. Razlika u kontroli bolesti ovisno o primijenjenoj terapiji kod djeteta

8. ŽIVOTOPIS

Rođena 1980. godine u Požegi. Završila je Osnovnu školu u Pleternici i Opću gimnaziju u Požegi. U lipnju 2005. godine diplomirala na Medicinskom fakultetu u Zagrebu. Nakon odrađenog staža i položenog državnog ispita, godinu dana radila na zamjeni u Ambulanti opće medicine kao liječnik Opće medicine.

Od 2007. godine zaposlena je u Kliničkom bolničkom centru „Sestre milosrdnice” kao liječnik na specijalizaciji iz pedijatrije gdje je tijekom dvije godine radila kao profesorica u Srednjoj medicinskoj školi iz nastavnog područja pedijatrije. Od 2012. godine je specijalist pedijatar. U listopadu 2012.g. uručena joj je nagrada za mlade znanstvenike "Radovan Marković" Hrvatskog pedijatrijskog društva, na X. Kongresu održanom u Puli za rad „Pretrage kod postavljanja dijagnoze epilepsije”. 2013g. položila je Europski tečaj naprednog održavanja života djece i novorođenčadi. Te iste godine završila je tečaj iz Ultrazvuka mozga. Od 2017.g. je subspecijalist pedijatrijske neurologije. Provodila višemjesečnu edukaciju u inozemstvu; Velika Britanija, Nizozemska, Austrija. Većinom je njezino obrazovanje u tim centrima koncentrirano na kirurško liječenje epilepsije djece. Sudjelovala je i u brojnim seminarima i vježbama studenata Stomatološkog fakulteta. Trenutačno je zaposlena kao odjelni liječnik odjela za dječju neurologiju s epileptologijom, Klinike za pedijatriju, u KBC Sestre milosrdnice. Na Medicinskom fakultetu, u sklopu predmeta Temelji liječničkog umjeća, održava nastavu od 2014. godine te od ove akadmske godine je izvršiteljica kolegija Zaštita zdravlja i njega predškolskog djeteta na Učiteljskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu odsjek Čakovec.

Popis objavljenih radova

Kukuruzović M, Basic Kes V, Malenica M. Association between Apolipoprotein E polymorphisms and Epilepsy in Children. Acta Med Croatica. 2019 (accepted for publication No. ACC 2019-053)

Starčević M, Mataija M, Sović D, Dodig J, Matijević R, **Kukuruzović M**. Važnost antenatalne imunoprofilakse u prevenciji hemolitičke bolesti fetusa i novorođenčeta. Acta Med Croatica. 2011 Mar;65(1):49-54.

Batista M, Mestrović A, Vekić AM, Malenica M, **Kukuruzović M**, Begovac I. Coping skills in children with epilepsy - Evaluation of cognitive behavioral therapy intervention. Acta Clin Croat. 2015 Dec;54(4):467-74.

Cvitanović Šojat Lj, **Kukuruzović M**, Gjergja Juraški R, Lerotić I, Bilonić-Ćović I, Malenica M, Šojat T, Vugrinec M. Ponovni napadaji i epilepsija nakon prvog neprovođenog epileptičkog napadaja: retrospektivna analiza hospitaliziranih bolesnika. Paediatr Croat 2009;53:135-138.

Kukuruzović M, Gjergja Juraški R, Malenica M, Divčić B, Crnković M, Kužnik K, Cvitanović-Šojat Lj. Neurološki poremećaji kao uzrok akutne hospitalizacije u adolescentskoj dobi. Paediatr Croat 2010;54(Supl 1):87-89.

Cvitanović-Šojat Lj, **Kukuruzović M**, Gjergja Juraški R, Malenica M, Kužnik K, Šojat T, Vugrinec M. Neurological complications associated with Influenza A/B and Parainfluenza III in children. Medicinski razgledi 2011;50(Supl3):20-21.

Kukuruzović M, Cvitanović-Šojat Lj, Malenica M, Kužnik K. Pretrage kod postavljanja dijagnoze epilepsije. Paediatr Croat 2012;56(Supl 1):170-175.

Kukuruzović M, Cvitanović Šojat Lj, Gjergja Juraški R, Malenica M, Kužnik K, Mihатов Štefanović I, Vugrinec M. Neurološki simptomi u djece povezani s infekcijom virusima influence. Paediatr Croat 2012;56(2):125-127.

Kukuruzović M, Malenica M, Kužnik K, Cvitanović-Šojat Lj. Multipla skleroza – klinička prezentacija pacijenata na neuropedijatrijskom odjelu KBC Sestre milosrdnice. Paediatr Croat; 2013;57(Supl 1):54-56.

Monika Kukuruzović, Disertacija

Cvitanović-Šojat Lj, Malenica M, **Kukuruzović M**, Zigman T, Kužnik K. Epileptička encefalopatija refraktorna na liječenje i heredodegenerativna bolest nepoznate etiologije. Paediatr Croat; 2013;57(2):146.

Katavić M, **Kukuruzovic M**, Malenica M, Seneca S, Cvitanović Šojat Lj. Distinctive phenotype in a girl with Rett syndrome and a novel 25 bp deletion mutation in exon c.881_905del25, nm_004992.3) of the MECP2 gene. Paediatrica Croatica; 2014;58(4):283-5.

Malenica M, **Kukuruzovic M**, Bitanga S, Krakar G, Valent B, Cvitanović Šojat Lj. Identical mutation associated with distinct clinical phenotypes of Friedreich's ataxia: Case report. Paediatrica Croatica; 2014;58(4):291-4.

Cvitanović Šojat Lj, Malenica M, **Kukuruzović M**, Žigman T, Bielen A. Niemann-Pick disease type C: mutations of NPC1 gene and the course of disease. Paediatrica Croatica; 2014;58(4):255-61.