



Original Article

# Large-Scale Deletions of Mitochondrial DNA in Epilepsy Patients Treated with Carbamazepine

Nguyen Thi Tu Linh<sup>1</sup>, Vu Thu Huong<sup>1</sup>,  
Le Lan Phuong<sup>1</sup>, Nguyen Doan Thuy<sup>2,3</sup>, Nguyen Van Lieu<sup>2,3</sup>,  
Nguyen Thi Van Anh<sup>1</sup>, Trinh Hong Thai<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Thanh Xuan, Hanoi, Vietnam

<sup>2</sup>Hanoi Medical University, 1 Ton That Tung, Dong Da, Hanoi, Vietnam

<sup>3</sup>Tam Anh Hospital, 108 Hoang Nhu Tiep, Bo De, Long Bien, Hanoi, Vietnam

Received 19 October 2022

Revised 25 April 2023; Accepted 10 January 2024

**Abstract:** Mitochondrial dysfunction, caused by large-scale deletion mutations, can lead to impaired function of the mitochondrial respiratory chain, reduced ATP production, and severe effects on most energy-consuming organs, such as neurons, and can induce seizures in epilepsy. Carbamazepine (CBZ), the first-line drug used in the treatment of epilepsy, can be harmful to mitochondria, and its side effects may be related to mitochondrial dysfunction. In this study, mitochondrial DNA (mtDNA) large-scale deletions were identified in 65 CBZ-treated patients with epilepsy, including 32 patients with CBZ-induced hypersensitivity and 33 with CBZ tolerance. Using the PCR method, mtDNA large-scale deletions were identified in 21/65 epilepsy patients (32.31%), including 9/32 CBZ-hypersensitivity patients (28.13%) and 12/33 CBZ-tolerance patients (36.36%). However, this difference was not statistically significant. The “common deletion” of 4977 bp was the most prevalent deletion. Remarkably, the new deletion of 4876 bp in a CBZ-tolerance patient was reported for the first time. Quantitative PCR analysis showed that the level of mtDNA large-scale deletion was significantly lower in the hypersensitivity group than in the tolerance group ( $p < 0.05$ ). Besides, analysis of the association between the level of mtDNA large-scale deletion and mtDNA copy number with the clinical features of CBZ hypersensitivity patients showed no relationship with age and severity of skin lesions ( $p > 0.05$ ). However, there was a statistically significant association between the level of mtDNA large-scale deletions and sex ( $p < 0.01$ ). Further studies are needed to evaluate the role of mtDNA large-scale deletions in epilepsy and their association with antiepileptic drugs.

**Keywords:** Carbamazepine, epilepsy, mtDNA, mtDNA large-scale deletion.

\* Corresponding author.

E-mail address: [thaith@vnu.edu.vn](mailto:thaith@vnu.edu.vn)

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5487>

# Mất đoạn lớn của DNA ty thể ở bệnh nhân động kinh được điều trị bằng carbamazepine

Nguyễn Thị Tú Linh<sup>1</sup>, Vũ Thu Hương<sup>1</sup>,  
Lê Lan Phương<sup>1</sup>, Nguyễn Đoàn Thủy<sup>2,3</sup>, Nguyễn Văn Liệu<sup>2,3</sup>,  
Nguyễn Thị Vân Anh<sup>1</sup>, Trịnh Hồng Thái<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội,  
334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>Trường Đại học Y Hà Nội, 1 Tôn Thất Tùng, Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

<sup>3</sup>Bệnh viện Đa khoa Tâm Anh, 108 Hoàng Như Tiếp, Bồ Đề, Long Biên, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 19 tháng 10 năm 2022

Chỉnh sửa ngày 25 tháng 4 năm 2023; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 01 năm 2024

**Tóm tắt:** Rối loạn chức năng ty thể, gây ra bởi các đột biến mất đoạn lớn, có thể dẫn tới suy giảm chức năng của chuỗi hô hấp ty thể, giảm sản sinh ATP, ảnh hưởng mạnh đến bộ phận cần nhiều năng lượng như các tế bào thần kinh và gây ra các cơn co giật trong bệnh động kinh. Carbamazepine (CBZ) là thuốc hàng đầu được sử dụng trong điều trị động kinh, tuy nhiên tác dụng phụ của thuốc đã được báo cáo có liên quan đến rối loạn chức năng của ty thể. Trong nghiên cứu này, các mất đoạn lớn của DNA ty thể (mtDNA) được xác định ở 65 bệnh nhân động kinh được điều trị bằng carbamazepine trong đó có 32 bệnh nhân dị ứng và 33 bệnh nhân dung nạp với thuốc. Sử dụng phương pháp PCR đã xác định được 21/65 bệnh nhân động kinh có mất đoạn lớn (chiếm 32,31%), trong đó có 9/32 bệnh nhân (chiếm 28,13%) thuộc nhóm dị ứng với CBZ và 12/33 bệnh nhân (chiếm 36,36%) thuộc nhóm dung nạp. Tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Các mất đoạn lớn đều thuộc loại mất đoạn phổ biến 4977 bp, đặc biệt, mất đoạn mới 4876 bp được tìm thấy ở một bệnh nhân động kinh dung nạp với CBZ chưa được công bố trong các nghiên cứu trước đây. Phân tích PCR định lượng cho thấy mức độ mất đoạn lớn ở nhóm dị ứng thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm dung nạp ( $p < 0,05$ ). Phân tích mối liên quan giữa mức độ mất đoạn lớn và số bản sao mtDNA với các đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân dị ứng với CBZ cho thấy không có mối liên quan với độ tuổi và mức độ tổn thương da nặng hoặc nhẹ ( $p > 0,05$ ), tuy nhiên, có liên quan có ý nghĩa thống kê về mức độ mất đoạn lớn với giới tính ( $p < 0,01$ ). Các nghiên cứu tiếp theo cần được thực hiện để đánh giá vai trò của mất đoạn lớn mtDNA trong bệnh động kinh và mối liên quan tới các thuốc chống động kinh.

**Từ khóa:** Carbamazepine, bệnh động kinh, mtDNA, mất đoạn lớn mtDNA.

## 1. Mở đầu

Động kinh là một trong những bệnh thần kinh phổ biến nhất, ảnh hưởng đến gần 50 triệu người ở mọi lứa tuổi trên toàn thế giới. Ước tính tỉ lệ mắc động kinh là từ 50,4 đến 81,7 trên 100.000 người mỗi năm [1, 2]. Carbamazepine

(CBZ) là thuốc hàng đầu trong điều trị bệnh động kinh và có hiệu quả trong điều trị cơn động kinh cục bộ và cơn co cứng cơ giật. CBZ có tác dụng làm ổn định màng thần kinh bị quá kích thích, ức chế sự phóng điện của tế bào thần kinh lặp đi lặp lại và làm giảm sự lan truyền các xung động kích thích qua synap thông qua đóng mở kênh natri theo điện thế [3]. Mặc dù vậy, tác dụng phụ của CBZ được cho là gây độc cho ty thể, ức chế hoạt động của ATPase ở liều lượng thấp, giảm sản xuất ATP và hô hấp ty thể, giảm

\* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: thaith@vnu.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5487>

điện thế màng và có thể tác động đến quá trình phosphoryl hoá oxy hoá (OXPHOS) của ty thể,... [4, 5]. Do ATP rất cần thiết cho sự hưng phấn và tồn tại của các tế bào thần kinh nên rối loạn chức năng của ty thể lại có thể gây ra động kinh [6].

Ngày càng có nhiều bằng chứng cho thấy rối loạn chức năng ty thể là một trong những nguyên nhân gây độc tính của thuốc [7, 8]. Suy giảm chức năng ty thể có thể gây ra các đột biến của DNA ty thể (mtDNA), bao gồm các đột biến điểm, đột biến mất đoạn và/hoặc biến đổi số bản sao của ty thể... Khi các đột biến này vượt quá một ngưỡng nhất định thì sẽ tạo ra các tế bào thần kinh bị ức chế bởi hệ thống OXPHOS bị suy giảm, và do đó gây co giật [6].

Các mất đoạn lớn của mtDNA, phổ biến là mất đoạn có kích thước 4977 bp, là dạng mất đoạn thường gặp trong hệ gen ty thể. Mất đoạn 4977 bp ( $\Delta$ mtDNA<sup>4977</sup>) xảy ra giữa hai trình tự lặp 13 nucleotide ở vị trí 8470–8482 và 13447 - 13459 trên mtDNA và xóa bỏ một vùng lớn có kích thước 4977 bp chứa 5 gen mã hóa cho các phân tử tRNA (tRNA<sup>Gly</sup>, tRNA<sup>Arg</sup>, tRNA<sup>His</sup>, tRNA<sup>Ser</sup> và tRNA<sup>Leu</sup>) và 7 gen mã hóa cho các tiểu đơn vị của phức hệ phức hệ I (*ND3*, *ND4*, *ND4L* và một phần của *ND5*), phức hệ IV (*COX III*) và phức hệ V (*ATP6* và một phần của *ATP8*) [9]. Đột biến này tạo ra phân tử mtDNA nhỏ hơn bình thường nhưng vẫn có thể sao chép được và được tích lũy theo thời gian ở các mô sau nguyên phân với tỉ lệ khác nhau [10]. Các mất đoạn này thường ở dạng dị tế bào chất và mức độ mất đoạn được cho là khoảng trên 50% thì có ảnh hưởng đến chức năng của chuỗi hô hấp ty thể [11]. Mất đoạn lớn có thể gây ra rối loạn chức năng ty thể nghiêm trọng do các gen bị mất có vai trò quan trọng trong quá trình phosphoryl hóa oxy hóa và do đó, làm giảm khả năng hoạt động của toàn ty thể. Mặc dù vậy, chưa có nhiều nghiên cứu về vai trò của các mất đoạn lớn của mtDNA đối với các bệnh nhân động kinh.

Do đó, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành xác định các mất đoạn lớn và mức độ mất đoạn lớn của mtDNA cũng như sự thay đổi số bản sao mtDNA ở các bệnh nhân động kinh được điều trị bằng CBZ nhằm tìm hiểu mối liên

quan giữa mất đoạn này với khả năng đáp ứng thuốc và với một số đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân động kinh được điều trị bằng CBZ ở Việt Nam.

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu

Mẫu nghiên cứu gồm mẫu máu của 65 bệnh nhân động kinh được điều trị bằng CBZ, được chia thành 2 nhóm: 32 bệnh nhân dị ứng với CBZ và 33 bệnh nhân dung nạp với CBZ. Mẫu nghiên cứu do Bệnh viện Đa khoa Tâm Anh, Hà Nội cung cấp bao gồm 2 ml máu tĩnh mạch của mỗi bệnh nhân kèm theo một số đặc điểm lâm sàng như độ tuổi, giới tính, liều dùng thuốc CBZ (mg/ngày), thời gian dị ứng và tình trạng dị ứng hay dung nạp thuốc. Bệnh nhân được đưa vào nghiên cứu phải thỏa mãn đủ các tiêu chuẩn sau: i) Bệnh nhân được khám và chẩn đoán mắc bệnh động kinh; ii) Có chỉ định điều trị CBZ; iii) Bệnh nhân dùng thuốc CBZ dưới 3 tháng và có biểu hiện dị ứng (bệnh nhân nhóm dị ứng với CBZ) hoặc trên 3 tháng và không có biểu hiện dị ứng (bệnh nhân nhóm dung nạp); iv) Hiện tại không dùng các thuốc có nguy cơ dị ứng cao. Tiêu chuẩn loại trừ: i) Bệnh nhân có tình trạng dị ứng trên lâm sàng trước khi dùng thuốc hoặc tình trạng dị ứng xuất hiện trong vòng 24 giờ sau khi sử dụng thuốc; ii) Phụ nữ đang mang thai; iii) Bệnh nhân không đủ xét nghiệm cần thiết cho nghiên cứu; iv) Bệnh nhân từ chối tham gia nghiên cứu. Thông tin chi tiết về các đặc điểm bệnh học của đối tượng nghiên cứu đã được mô tả trong công bố của nhóm nghiên cứu trên cùng đối tượng bệnh nhân [12].

Bệnh nhân tham gia lấy mẫu đã được biết về mục đích nghiên cứu và đồng ý chấp thuận cho mẫu. Nghiên cứu được phê duyệt bởi Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu Y Sinh học của Trường Đại học Y Hà Nội, mã số 118/GCN-HDDDNCYSH-DHYHN ngày 8/7/2020. Mẫu máu được đựng trong ống chống đông và bảo quản ở từ -25 °C cho đến khi phân tích.

### 2.2. Phương pháp

Tách chiết và tinh sạch DNA tổng số từ máu toàn phần.

DNA tổng số được tách chiết từ mẫu máu sử dụng kit G-Spin™ Total DNA Extraction Kit (iNtRON, Hàn Quốc) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ DNA tổng số được định lượng bằng cách đo mật độ hấp thụ ánh sáng tử ngoại của acid nucleic ở bước sóng 260 nm ( $A_{260}$ ) sử dụng máy NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Mỹ) và điện di trên gel agarose 1%. Độ tinh sạch của DNA tách chiết được xác định bằng tỷ số  $A_{260}/A_{280}$  trong khoảng từ 1,8 - 2,0. DNA tổng số được bảo quản ở  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  cho đến khi sử dụng.

Xác định mất đoạn lớn của mtDNA bằng phương pháp PCR.

Các mất đoạn lớn mtDNA được xác định bằng phương pháp PCR lồng như đã được công bố trong các nghiên cứu trước đây của chúng tôi [13, 14]. Phản ứng PCR với các cặp mồi gồm 1,25  $\mu\text{l}$  10X PCR Buffer, 1,25  $\mu\text{l}$  dNTP, 0,125  $\mu\text{l}$  enzyme *i-StarTaq* DNA Polymerase (5 u/ $\mu\text{l}$ ) (iNtRON, Hàn Quốc), 0,25  $\mu\text{l}$  mỗi mồi (0,2  $\mu\text{M}$ ), DNA khuôn (2 ng/ $\mu\text{l}$ ) và bổ sung  $\text{H}_2\text{O}$  cho đạt thể tích phản ứng 12,5  $\mu\text{l}$ . Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose và chụp ảnh trên máy GelDoc (Bio-Rad, Mỹ).

Tinh sạch và giải trình tự DNA.

Sản phẩm PCR có mất đoạn lớn được tinh sạch bằng kit MEGAquick-spin™ Plus (iNtRON, Hàn Quốc) theo quy trình của nhà sản xuất. Mức độ tinh sạch của DNA được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% và giá trị  $A_{260}/A_{280}$  được xác định trên máy Nano Drop 2000c (Thermo Scientific, Mỹ). Sản phẩm sau khi tinh sạch đạt tiêu chuẩn được sử dụng để giải trình tự.

Xác định mức độ mất đoạn lớn và số bản sao mtDNA bằng PCR định lượng.

Phương pháp PCR định lượng (qPCR) xác định sự có mặt của gen *HBB* (đại diện cho DNA nhân), gen *ND1* nằm trong vùng ít xảy ra mất đoạn (đại diện cho mtDNA) và gen *ND4* nằm trong vùng hay xảy ra mất đoạn của mtDNA [15, 16]. Các cặp mồi đặc hiệu cho gen *HBB*, *ND1* và *ND4* được thiết kế dựa vào trình tự chuẩn của gen *HBB* (mã số NG\_000007.3) và ADN ty thể (mã số NC\_012920.1) trên

NCBI. Trình tự của các cặp mồi (5'→3') được sử dụng gồm: *HBB* (104 bp): mồi xuôi GGAGAAGTCTGCCGTTACTG và mồi ngược CCTTAAACCTGTCTTGTAACCT; *ND1* (115 bp): mồi xuôi AGTGGCTCCTTTSSCCTCTC và mồi ngược GGTGGTCTCTGCTAGTGTG; *ND4* (128 bp): mồi xuôi CCTATTTAGCTTCCCCAA và mồi ngược GTGATAGTGGTTCCTGATAAGT.

Thành phần phản ứng qPCR bao gồm: 5  $\mu\text{l}$  *iTaq*™ Universal SYBR® Green Super mix (BioRad, Mỹ); 0,2  $\mu\text{l}$  mỗi mồi (0,2  $\mu\text{M}$ ); 50 ng DNA tổng số và  $\text{H}_2\text{O}$  trong tổng thể tích 10  $\mu\text{l}$  phản ứng. Hỗn hợp phản ứng được trộn đều và PCR định lượng được thực hiện trên máy Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR (Thermo Scientific, Mỹ). Chu trình nhiệt gồm  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong 3 phút, 40 chu kỳ ( $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong 5 giây;  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong 30 giây). Cường độ tín hiệu huỳnh quang được ghi nhận trong một giây sau khi kết thúc một chu kỳ, các giá trị chu kỳ ngưỡng ( $C_t$ ) của mẫu nghiên cứu được ghi nhận sau khi kết thúc quá trình chạy PCR.

Dựa trên các giá trị  $C_t$  của mẫu nghiên cứu, số bản sao mtDNA được tính toán theo công thức  $2^{\Delta C_t}$ , trong đó  $\Delta C_t$  là hiệu số giữa  $C_t$  của gen *HBB* và  $C_t$  của gen *ND1* [17, 18].

Mức độ mất đoạn lớn mtDNA được tính toán theo công thức:  $D = (1 - R_{ND4/ND1}) \times 100\%$ , trong đó giá trị  $R_{ND4/ND1}$  được tính bằng  $2^{(C_t ND1 - C_t ND4)}$  [15, 19].

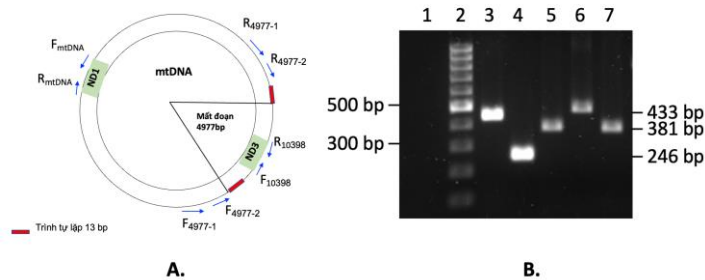
*Phân tích dữ liệu và xử lý thống kê:* các số liệu được xử lý và phân tích bằng phần mềm Excel và phần mềm GraphPad (phiên bản 9.0.2) theo các kiểm định thống kê thường dùng. Kiểm tra phân bố của dữ liệu bằng phép kiểm định Kolmogorov-Smirnov. Đối với các biến định lượng tuân theo phân phối chuẩn, so sánh thống kê được thực hiện bằng kiểm định T-test. Đối với các biến định lượng độc lập và không tuân theo phân phối chuẩn, kiểm định Mann-Whitney U test được sử dụng. Đối với các biến định tính, so sánh thống kê được thực hiện bằng kiểm định  $\chi^2$  hoặc kiểm định Fisher's Exact test trong trường hợp cỡ mẫu nhỏ. Giá trị  $p < 0,05$  được cho là khác biệt có ý nghĩa thống kê.

### 3. Kết quả

#### 3.1. Các mất đoạn lớn của mtDNA

Mất đoạn lớn trong hệ gen ty thể được xác định dựa trên phản ứng nhân bản đoạn gen *ND1* (cặp mồi  $F_{mtDNA}$  và  $R_{mtDNA}$ ) có kích thước 433 bp đại diện cho vùng không mất đoạn, đoạn gen *ND3* (cặp mồi  $F_{10398}$  và  $R_{10398}$ ) có kích thước 246 bp thuộc vùng có mất đoạn và đoạn DNA nằm ngoài các trình tự lặp 13 bp (ngoài vùng mất đoạn lớn) bằng phản ứng PCR lồng (Hình 1A). Trong đó, cặp mồi 4977-1 ( $F_{4977-1}$  và

$R_{4977-1}$ , nhân bản đoạn DNA có kích thước 496 bp) được thiết kế nằm phủ bên ngoài cặp mồi 4977-2 ( $F_{4977-2}$  và  $R_{4977-2}$ , nhân bản đoạn DNA có kích thước 381 bp) nhằm phát hiện các mất đoạn lớn mtDNA. Kết quả là nếu bản sao mtDNA có mất đoạn 4977 bp thì sau PCR vòng 2 chỉ thu được sản phẩm PCR có kích thước 381 bp. Nếu mtDNA có các mất đoạn lớn khác thì đoạn DNA được nhân lên có kích thước lớn hơn hoặc nhỏ hơn 381 bp. Ngược lại, nếu không có mất đoạn lớn của mtDNA trong mẫu nghiên cứu thì sẽ không thu được sản phẩm PCR lồng.

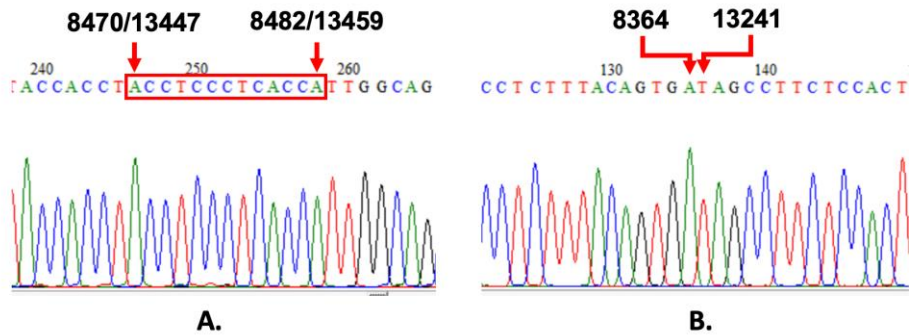


Hình 1. Vị trí các mồi dùng trong phản ứng PCR lồng phát hiện sự có mặt của mất đoạn lớn mtDNA (A) và ảnh điện di sản phẩm PCR xác định mất đoạn lớn của mtDNA trên gel agarose 1,7% (B). Giếng 1: đối chứng âm (H<sub>2</sub>O). Giếng 2: thang chuẩn DNA 100 bp. Giếng 3: sản phẩm PCR nhân gen *ND1* có kích thước ~ 433 bp. Giếng 4: sản phẩm PCR nhân gen *ND3* có kích thước ~ 246 bp. Giếng 5, 7: sản phẩm PCR với kích thước ~ 381 bp. Giếng 6: sản phẩm PCR với kích thước lớn hơn 381 bp.

Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định các mất đoạn lớn của ty thể (Hình 1B) cho thấy tất cả các mẫu đều thu được các băng DNA đặc hiệu, có kích thước 433 bp (đại diện cho gen *ND1*) và 246 bp (đại diện cho gen *ND3*). Điều này cho thấy đã nhân bản thành công mtDNA trong các mẫu nghiên cứu và xác định được các bản sao mtDNA không có mất đoạn lớn. Bên cạnh đó, kết quả cũng cho thấy đã nhân bản được các đoạn DNA có kích thước 381 bp, tương ứng với mất đoạn 4977 bp, và các đoạn DNA có kích thước khác 381 bp, tương ứng với các mất đoạn lớn khác xuất hiện trong các mẫu nghiên cứu. Phân tích cho thấy có 21/65 bệnh nhân động kinh có mất đoạn lớn mtDNA (chiếm 32,31%), trong đó có 9/32 bệnh nhân (chiếm 28,13%) thuộc nhóm dị ứng và 12/33 bệnh nhân (chiếm 36,36%) thuộc nhóm dung nạp. Tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ .

Trong nhóm dị ứng, mất đoạn lớn được tìm thấy với 1/8 trường hợp dị ứng nặng (SJS/TEN) và 8/24 trường hợp dị ứng nhẹ (ban đỏ toàn thân). Các mẫu có mất đoạn lớn đã được giải trình tự để xác định chính xác kích thước đoạn DNA bị mất. Phân tích kết quả giải trình tự bằng chương trình BLAST và Bioedit đã xác định được 20 mẫu có mất đoạn với kích thước 4977 bp nằm giữa 2 vùng trình tự của mtDNA, tại vị trí 8470-8482 và 13447-13459 tương ứng với hai đoạn trình tự lặp 13 bp (ACCTCCCTCACCA, vùng khung đỏ, Hình 2A).

Đáng chú ý là kết quả phân tích đã phát hiện thấy 01 mẫu có mất đoạn lớn với kích thước 4876 bp (nhỏ hơn so với dạng mất đoạn phổ biến 4977 bp) tại vị trí nucleotide từ 8365 đến 13240 của trình tự mtDNA. Đặc biệt, mất đoạn này không nằm giữa 2 trình tự lặp 13 nucleotide và là mất đoạn mới, chưa thấy được công bố trong các nghiên cứu trước đây (Hình 2B).



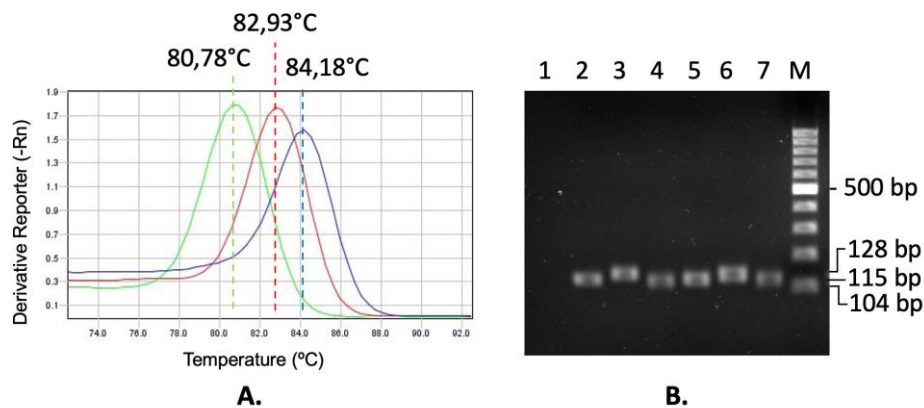
Hình 2. Kết quả phân tích trình tự các mẫu nghiên cứu bằng chương trình BLAST và phần mềm BioEdit. A: mắt đoạn 4977 bp nằm giữa 2 đoạn trình tự lặp 13 bp. B: mắt đoạn 4876 bp không chứa các đoạn trình tự lặp.

### 3.2. Mức độ mất đoạn lớn của mtDNA

Mức độ biến đổi cao hay thấp của các đột biến mtDNA là yếu tố quan trọng trong đánh giá vai trò của chúng liên quan đến chức năng của ty thể. Khi số bản sao đột biến vượt qua một ngưỡng nhất định thì sẽ biểu hiện ra lâm sàng. Trong nghiên cứu này, mức độ mất đoạn lớn của mtDNA được xác định bằng phương pháp qPCR dựa trên sự có mặt của gen *ND1* thuộc vùng ít xảy ra mất đoạn và gen *ND4* thuộc vùng thường xuyên xảy ra mất đoạn. Các mẫu nghiên cứu được đưa về nồng độ ~50 ng/μl và phản ứng qPCR được thực hiện với các nồng độ khác nhau: mẫu không pha loãng, mẫu pha loãng 10 lần và 100 lần từ nồng độ ban đầu. Kết

quả thu được nồng độ DNA tối ưu cho phản ứng qPCR là 5 ng/μl.

Phân tích đường cong đỉnh chảy và kết quả điện di sản phẩm qPCR giúp đánh giá tính đặc hiệu của phản ứng qPCR (không có sản phẩm phụ). Trong đó, đường biểu diễn nhiệt độ nóng chảy của đoạn gen *ND1*, *ND4* và *HBB* chỉ cho một đỉnh duy nhất là 80,78 °C; 82,93 °C và 84,18 °C tương ứng (Hình 3A). Bên cạnh đó, kết quả điện di các sản phẩm qPCR trên gel agarose 2% cũng cho thấy các băng thu được sáng rõ nét, đặc hiệu và đúng với kích thước tính toán. Điều này cho thấy phản ứng nhân bản thành công, không có sản phẩm phụ và các môi bắt cặp đặc hiệu với gen đích quan tâm (Hình 3B).



Hình 3. Đường biểu diễn nhiệt độ nóng chảy sản phẩm khuếch đại bằng qPCR của các gen *ND1*, *ND4* và *HBB* (theo thứ tự từ trái sang phải) (A) và kết quả điện di sản phẩm qPCR trên gel agarose 2% (B), trong đó: Giếng 1: đối chứng âm (nước); Giếng 2, 5: sản phẩm khuếch đại gen *HBB* có kích thước 104 bp; Giếng 3, 6: sản phẩm khuếch đại gen *ND4* có kích thước 128 bp; Giếng 4, 7: sản phẩm khuếch đại gen *ND1* có kích thước 115 bp. M: Thang chuẩn DNA 100 bp.

Mức độ mất đoạn lớn của mtDNA trong 65 mẫu nghiên cứu được tính toán dựa trên các giá trị  $C_t$  thu được và được xử lý, phân tích thống kê. Kiểm định phân bố dữ liệu bằng phép kiểm định Kolmogorov-Smirnov cho thấy dữ liệu không tuân theo phân phối chuẩn, do đó kiểm định phi tham số được sử dụng để đánh giá sự khác biệt và được biểu diễn bằng trung vị kèm theo khoảng tứ phân vị 25% - 75%. Kết quả cho thấy giá trị trung vị mức độ mất đoạn của nhóm dị ứng là 43,56%, thấp hơn đáng kể so với

nhóm dung nạp (49,13%) ( $p = 0,0157$ ) (Bảng 1). Bên cạnh đó, kết quả xác định số bản sao mtDNA (được tính toán dựa trên giá trị  $C_t$  của gen *HBB* và gen *ND1*) của nhóm dị ứng và dung nạp tương ứng bằng 77,24% và 63,12%, tuy nhiên, sự khác biệt giữa chúng không có ý nghĩa thống kê. Phân tích hệ số tương quan Spearman cho thấy không có mối tương quan giữa mức độ mất đoạn lớn và số bản sao DNA ty thể trên cả nhóm bệnh nhân dị ứng và dung nạp (Bảng 1).

Bảng 1. Mức độ mất đoạn lớn, số bản sao mtDNA và tương quan giữa chúng trong 2 nhóm nghiên cứu

Đặc điểm	Nhóm dị ứng ( $n = 32$ )	Nhóm dung nạp ( $n = 33$ )	$p^*$
Mức độ mất đoạn lớn <i>Me</i> (25% - 75%)	43,56 (0,000 - 51,29)	49,30 (31,89 - 68,10)	0,0157
Số bản sao <i>Me</i> (25% - 75%)	77,24 (42,64 - 104,3)	63,12 (23,05 - 117,2)	0,2885
Tương quan giữa mức độ mất đoạn lớn và số bản sao mtDNA			
$r_s$	-0,1488	-0,3190	
$p^{**}$	0,4165	0,0704	

Ghi chú: \*:  $p$  nhận được từ kiểm định Mann-Whitney U test,

\*\* $p$  nhận được từ phân tích tương quan giữa 2 biến,  $r_s$ : hệ số tương quan Spearman.

Phân tích mối liên quan với một số đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân động kinh có phản ứng dị ứng với CBZ cho thấy mức độ mất đoạn lớn và số bản sao mtDNA không liên quan với độ tuổi và mức độ dị ứng (tồn thương đa

nặng hoặc nhẹ) ( $p > 0,05$ ). Tuy nhiên, mức độ mất đoạn có liên quan với giới tính, cụ thể là mức độ mất đoạn lớn được thấy cao hơn ở nam giới so với nữ giới ( $p = 0,0067$ ) (Bảng 2).

Bảng 2. Mối liên quan giữa mức độ mất đoạn lớn và số bản sao mtDNA với các đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân động kinh dị ứng với CBZ

Đặc điểm	Số lượng mẫu ( $n, \%$ )	Mức độ mất đoạn ( <i>Me</i> , 25%-75%)	$p$	Số bản sao ( <i>Me</i> , 25%-75%)	$p$
Tuổi					
< 50	22 (68,75%)	40,26 (0,00 - 50,45)	0,0777	65,83 (38,76 - 105,20)	0,6527
≥ 50	10 (31,25%)	50,34 (33,39 - 55,98)		93,28 (45,69 - 106,9)	
Giới tính					
Nam	17 (53,13%)	48,24 (42,08 - 53,49)	0,0067	48,84 (32,56 - 104,0)	0,0806
Nữ	15 (46,88%)	0,000 (0,000 - 50,35)		99,73 (67,65 - 104,7)	

Mức độ tổn thương da					
<i>Ban đỏ toàn thân</i>	25 (78,13%)	43,36 (0,000 - 50,89)	0,4077	86,82 (44,65 - 111,2)	0,4958
<i>SJS/TEN</i>	7 (21,86%)	47,15 (0,000 - 59,67)		48,84 (37,27- 101,0)	

*Ghi chú:* các số liệu được biểu diễn bằng trung vị (Me) và khoảng tứ phân vị 25% - 75%.  
p nhận được từ kiểm định Mann-Whitney U test.

#### 4. Thảo luận

Động kinh là một bệnh liên quan đến rối loạn thần kinh đa dạng về căn nguyên và lâm sàng và được đặc trưng bởi các cơn co giật. Theo quan điểm truyền thống, co giật được cho là kết quả của sự mất cân bằng giữa các hoạt động thần kinh hưng phấn và ức chế và được cho là gây ra bởi các đột biến của 169 gen, tác động trực tiếp đến chức năng của ty thể [20, 21]. Điều này được cho là phù hợp khi xem xét vai trò quan trọng của ty thể trong quá trình phosphoryl hoá oxi hoá tạo ra ATP cần thiết cho quá trình kích hoạt điện thế hoạt động bình thường và truyền qua synap của tế bào thần kinh, tổng hợp chất dẫn truyền thần kinh, cân bằng nội môi canxi, sản xuất và điều hòa các loại oxy phản ứng... [20]. Do đó, khi chức năng của ty thể bị suy giảm thì năng lượng của tế bào thần kinh cũng suy giảm theo và có thể gây ra các cơn co giật.

Các nghiên cứu trước đây cho thấy tất cả các dạng động kinh đều được báo cáo trong các bệnh có liên quan đến rối loạn chức năng ty thể, gây ra bởi các đột biến trên hệ gen ty thể, như ở các hội chứng Leigh, MELAS, MERRF, LHON, hội chứng Kearns-Sayre,... [21]. Và ngược lại, các cơn động kinh cũng được cho là có tác động đến rối loạn chức năng của ty thể. Nghiên cứu của Khurana và cộng sự [22] trên các bệnh nhân động kinh cũng cho thấy hoạt động bất thường của phức hệ I hoặc phức hệ IV, hoặc cả 2 phức hệ này. Thậm chí, hoạt động của phức hệ I biến đổi mạnh ở trẻ em mắc chứng động kinh không kiểm soát [22]. Phát hiện này ủng hộ quan điểm chức năng ty thể bị ảnh hưởng tiêu cực bởi chứng động kinh và rối loạn chức năng chọn lọc của phức hệ I ty thể có thể là một dấu hiệu sinh hoá quan trọng của

chết tế bào thần kinh kích ứng bởi co giật trong vỏ não và có thể đóng một vai trò quan trọng trong cơ chế hình thành bệnh động kinh [21].

Mặc dù cơ chế gây bệnh liên quan đến động kinh và rối loạn chức năng ty thể vẫn chưa được hiểu biết đầy đủ và câu trả lời vẫn còn gây tranh cãi nhưng nhiều khả năng chúng có thể liên quan mật thiết với nhau, tạo thành một vòng tròn ảnh hưởng qua lại. Khi người bệnh ở trạng thái động kinh, lượng ion  $Ca^{2+}$  tăng vọt cùng với việc tăng sản xuất các gốc tự do chứa oxy (ROS) trong ty thể gây ra tình trạng hưng phấn của tế bào thần kinh, tăng nồng độ glutamate ngoại bào và dẫn đến rối loạn chức năng ty thể. Tăng nồng độ  $Ca^{2+}$  trong tế bào làm cho các con đường truyền tín hiệu bị kích thích quá mức, tăng tiêu thụ ATP và gây cạn kiệt năng lượng, làm cho tế bào thần kinh dễ bị tổn thương hơn với stress, dẫn đến suy giảm năng lượng và mất tế bào thần kinh trong bệnh động kinh [23-25]. Ngược lại, chuỗi hô hấp của ty thể, nơi quá trình phosphoryl hoá oxi hoá (OXPHOS) xảy ra, được coi là nguồn tạo ra các ROS quan trọng nhất. ROS có thể gây ra các đột biến mtDNA, bao gồm các đột biến điểm, đột biến mất đoạn và/hoặc biến đổi số bản sao của mtDNA. Khi các đột biến này vượt quá một ngưỡng nhất định thì sẽ tạo ra các tế bào thần kinh bị ức chế do hệ thống OXPHOS bị suy giảm và gây ra co giật [5].

Mất đoạn lớn mtDNA, phổ biến là mất đoạn 4977 bp, là dạng mất đoạn thường gặp trong hệ gen ty thể. Mất đoạn này có thể gây ra rối loạn chức năng ty thể nghiêm trọng do các gen bị mất có vai trò quan trọng trong quá trình phosphoryl hóa oxy hóa và do đó, làm giảm khả năng hoạt động của toàn ty thể. Sự tích tụ các đột biến được cho có liên quan đến giảm hoạt động trao đổi chất, tăng hình thành các gốc tự



do chứa oxy và dẫn đến quá trình lão hóa của các tế bào thần kinh, gây ra một số bệnh thoái hóa thần kinh như Alzheimer hay Parkinson [26]. Mức độ mất đoạn lớn do các tế bào thần kinh bị tổn thương cũng được báo cáo có liên quan đến độ tuổi của bệnh nhân. Nghiên cứu của Pagano và cs [27] cho thấy những người bị Parkinson tăng lên theo tuổi, tỷ lệ mắc lên đến 2,6% ở những người từ 85 đến 89 tuổi. Đặc biệt, mức độ mất đoạn lớn được thấy tăng rõ rệt sau 75 tuổi [26]. Nhiều nghiên cứu về động kinh cho thấy những người lớn tuổi dễ mắc bệnh động kinh hơn [1]. Nguyên nhân có thể do tuổi càng cao hoạt động của các tế bào thần kinh giảm sút và dễ bị tác động bởi các yếu tố như stress oxy hóa gây ra các đột biến mtDNA và đến một ngưỡng nhất định sẽ tác động đến thần kinh. Nghiên cứu của Volmering và cs [28] trên 74 mẫu mô hồi hải mã của bệnh nhân mắc chứng động kinh thùy thái dương (Mesial temporal lobe epilepsy - mTLE) kháng thuốc xác định thấy tỉ lệ mất đoạn lớn 4977 bp chiếm khoảng 2,6%. Đáng chú ý, ngoài mất đoạn 4977 bp, mất đoạn lớn 7436 bp cũng được xác định với tỉ lệ cao (8,3%) trên nhóm bệnh nhân mắc xơ cứng hồi hải mã. Phân tích mức độ mất đoạn 7436 bp cho thấy mất đoạn này chiếm tỉ lệ 92,3% ( $n = 48/52$ ) ở bệnh nhân xơ cứng hồi hải mã, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với 22,7% trên nhóm bệnh nhân mắc chứng động kinh thùy thái dương. Kết quả cũng cho thấy không có sự phụ thuộc giữa mức độ mất đoạn 7436 bp với độ tuổi mắc động kinh hoặc độ tuổi phẫu thuật của bệnh nhân. Trong nghiên cứu của chúng tôi, mất đoạn phổ biến 4977 bp được xác định thấy ở 32,31% (21/65) bệnh nhân động kinh. Đặc biệt, mất đoạn lớn 4876 bp xác định thấy trên nhóm bệnh nhân này chưa được báo cáo trong các nghiên cứu trước đây. Những phân tử bị mất đoạn vẫn có khả năng sao chép và tích lũy lâu dài trong mô theo thời gian, đến một ngưỡng nhất định thì có thể ảnh hưởng đến chức năng của tế bào [11]. Mặc dù chưa có ý nghĩa thống kê nhưng trong nghiên cứu này, số bản sao ty thể và mức độ mất đoạn lớn mtDNA cũng được thấy có xu hướng cao hơn ở nhóm bệnh nhân trên 50 tuổi so với nhóm dưới 50 tuổi. Nếu phân tích trên một cỡ mẫu lớn hơn thì

sẽ dự đoán được chính xác hơn sự khác biệt này trên nhóm bệnh nhân động kinh.

Trong nghiên cứu này, phân tích cho thấy mức độ mất đoạn mtDNA của nhóm dị ứng với CBZ (43,56%) thấp hơn so với nhóm dung nạp (49,13%). Điều này có thể giải thích do mối liên quan giữa bệnh động kinh và ty thể cũng bị tác động bởi các loại thuốc chống động kinh được sử dụng để điều trị bệnh. Theo một số nghiên cứu, một số thuốc chống động kinh có thể có hại đối với ty thể và tác dụng phụ của thuốc có thể liên quan đến rối loạn chức năng của ty thể [4]. Thuốc chống động kinh có thể tác động vào ty thể bằng cách ức chế ATPase ở liều lượng thấp; can thiệp vào các con đường, cấu trúc, chuỗi hô hấp hoặc quá trình sinh tổng hợp ty thể; các kênh hoặc thụ thể liên kết màng, điện thế màng và giảm sản xuất ATP. Đặc biệt, các thuốc chống động kinh cũng có thể gây ra các đột biến mất đoạn mtDNA hoặc có thể làm tăng hoặc giảm biểu hiện của các protein nhân khác nhau [4, 21]. Điều này có thể giải thích tại sao những người cao tuổi có hệ gen ty thể bị suy giảm chức năng có xu hướng nhạy cảm hơn với các tác dụng phụ của thuốc điều trị động kinh. Bên cạnh đó, mặc dù cho thấy không có mối liên quan với độ tuổi và mức độ dị ứng (tổn thương da nặng hoặc nhẹ) của bệnh nhân, tuy nhiên, mức độ mất đoạn mtDNA được cho là cao hơn đáng kể ở nam giới so với nữ giới ( $p = 0,0067$ ). Theo Vaught và cộng sự [29], một giả thuyết được đưa ra là do mtDNA chỉ được truyền từ mẹ sang con nên nam giới được coi là “ngõ cụt tiến hóa” khi nói đến việc truyền mtDNA cho thế hệ sau, và kết quả là chọn lọc tự nhiên chỉ có tác động trong việc hình thành những biến đổi tiến hóa trong bộ gen ty thể của nữ giới. Nếu một đột biến phát sinh ở hệ gen ty thể mã hóa cho một yếu tố quan trọng cho hoạt động chức năng của OXPHOS ở cả nam và nữ thì chọn lọc tự nhiên sẽ xảy ra ở hệ gen ty thể nữ giới để loại bỏ các đột biến mtDNA có hại này ra khỏi quần thể (tức là nữ giới mang đột biến có hại sẽ ít có khả năng truyền lại mtDNA của mình hơn), và do đó được coi là nguyên nhân có thể gây ra sự tích tụ các đột biến có hại trong bộ gen ty thể của nam giới nhiều hơn so với nữ giới [29].

Như vậy, sự hiểu biết về mối quan hệ qua lại giữa rối loạn chức năng ty thể và chứng động kinh là rất quan trọng trong lựa chọn phương pháp điều trị chống co giật thích hợp và có khả năng mở ra các phương pháp điều trị mới trong nhóm nhỏ các rối loạn động kinh do rối loạn chức năng ty thể. Hiện nay, theo hiểu biết của chúng tôi chưa có nghiên cứu cụ thể nào về mất đoạn lớn mtDNA liên quan đến khả năng kháng thuốc hay dung nạp thuốc ở bệnh nhân động kinh điều trị bằng CBZ. Trong tương lai cần tiến hành thêm các nghiên cứu về vai trò của mất đoạn lớn mtDNA trong động kinh và mối liên quan tới thuốc chống động kinh.

## 5. Kết luận

Nghiên cứu đã xác định được các mất đoạn lớn mtDNA ở 9/32 (28,13%) bệnh nhân dị ứng và 12/33 (36,36%) bệnh nhân dung nạp với CBZ. Ngoài mất đoạn phổ biến 4977 bp, một trường hợp có mất đoạn 4876 bp được tìm thấy trên bệnh nhân động kinh dung nạp với thuốc CBZ chưa được công bố trong các nghiên cứu trước đây. Bên cạnh đó, mức độ mất đoạn lớn ở nhóm dị ứng thấp hơn so với nhóm dung nạp. Ở nhóm bệnh nhân dị ứng với CBZ, mức độ mất đoạn lớn mtDNA được xác định có liên quan đến giới tính.

## Lời cảm ơn

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn các bệnh nhân đã tự nguyện cho mẫu nghiên cứu, cảm ơn các y bác sĩ của Bệnh viện Đa khoa Tâm Anh đã hỗ trợ lấy mẫu.

Nghiên cứu được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ Đề tài cấp Nhà nước mã số ĐTĐL.CN-63/19.

## Tài liệu tham khảo

- [1] WHO Epilepsy: A Public Health Initiative, Summary, Geneva: World Health Organization; 2019.
- [2] E. Beghi, G. Giussani, GBD 2016 Epilepsy Collaborators et al., Global, Regional, and National Burden of Epilepsy, 1990 - 2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016, *Lancet Neurol*, Vol. 18, No. 4, 2019, pp. 357-375.
- [3] J. Gierbolini, M. Giarratano, S. R. Benbadis, Carbamazepine-Related Antiepileptic Drugs for the Treatment of Epilepsy - A Comparative Review, *Expert Opin Pharmacother*, Vol. 17, No. 7, 2016, pp. 885-888.
- [4] J. Finsterer, S. Z. Mahjoub, Mitochondrial Toxicity of Antiepileptic Drugs and Their Tolerability in Mitochondrial Disorders, *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, Vol. 8, 2012, pp. 71-79.
- [5] I. Berger, I. Segal, D. Shmueli, A. Saada, The Effect of Antiepileptic Drugs on Mitochondrial Activity: A Pilot Study, *J. Child Neurol*, Vol. 25, No. 5, 2010, pp. 541-545.
- [6] J. Folbergrová, W. S. Kunz, Mitochondrial Dysfunction in Epilepsy, *Mitochondrion*, Vol. 12, No.1, 2012, pp. 35-40.
- [7] J. A. Dykens, Y. Will, The Significance of Mitochondrial Toxicity Testing in Drug Development, *Drug Discov Today*, Vol. 12, No. 17-18, 2007, pp. 777-785.
- [8] S. Nadanaciva, Y. Will, Current Concepts in Drug-Induced Mitochondrial Toxicity, *Curr Protoc Toxicol*, Chapter 2: Unit 2.15, 2009, <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx0215s40>.
- [9] M. A. Dani, S. U. Dani, S. P. Lima, A. Martinez, B. M. Rossi, F. Soares, M. A. Zago, A. J. Simpson, Less DeltamtDNA4977 than Normal in Various Types of Tumors Suggests that Cancer Cells Are Essentially Free of this Mutation, *Genet Mol Res*, Vol. 3, No. 3, 2004, pp. 395-409.
- [10] G. A. Cortopassi, D. Shibata, N. W. Soong, N. Arnheim, A Pattern of Accumulation of a Somatic Deletion of Mitochondrial DNA in Aging Human Tissues, *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 89, No. 16, 1992, pp. 7370-7374.
- [11] R. Rossignol, B. Faustin, C. Rocher, M. Malgat, J. P. Mazat, T. Letellier, Mitochondrial Threshold Effects, *J. Biochem*, Vol. 370, No. Pt3, 2003, pp. 751-672.
- [12] T. P. Bui, L. T. T. Nguyen, P. L. Le, N. T. T. Le, T. D. Nguyen, L. Van Nguyen, A. T. Van Nguyen, T. T. Trinh, Next-Generation Sequencing-Based HLA Typing Reveals the Association of HLA-B\*46:01:01 and HLA-DRB1\*09:01:02 Alleles with Carbamazepine-Induced Hypersensitivity Reactions in Vietnamese Patients with Epilepsy, *Hum Immunol*, Vol. 84, No. 3, 2023, pp. 186-195.
- [13] J. Dimberg, T. T. Hong, M. Skarstedt, S. Löfgren, N. Zar, A. Matussek, Novel and Differential Accumulation of Mitochondrial DNA Deletions in

- Swedish and Vietnamese Patients with Colorectal Cancer, *Anticancer Res*, Vol. 34, No. 1, 2014, pp. 147-152.
- [14] J. Dimberg, T. T. Hong, L. T. T. Nguyen, M. Skarstedt, S. Löfgren, A. Matussek, Common 4977 bp Deletion and Novel Alterations in Mitochondrial DNA in Vietnamese Patients with Breast Cancer, *Springerplus*, Vol. 4, 2015, pp. 58.
- [15] L. He, P. F. Chinnery, S. E. Durham, E. L. Blakely, T. M. Wardell, G. M. Borthwick, R. W. Taylor, D. M. Turnbull, Detection and Quantification of Mitochondrial DNA Deletions in Individual Cells by Real-Time PCR, *Nucleic Acids Res*, Vol. 30, No. 14, 2002, pp. e68.
- [16] L. Hu, X. Yao, Y. Shen, Altered Mitochondrial DNA Copy Number Contributes to Human Cancer Risk: Evidence from an Updated Meta-Analysis, *Sci Rep*, Vol. 6, 2016, pp. 35859.
- [17] A. X. Fan, R. Radpour, M. M. Haghghi, C. Kohler, P. Xia, S. Hahn, W. Holzgreve, X. Y. Zhong, Mitochondrial DNA Content in Paired Normal and Cancerous Breast Tissue Samples from Patients with Breast Cancer, *J. Cancer Res Clin Oncol*, Vol. 135, No. 8, 2009, pp. 983-989.
- [18] K. J. Krishnan, A. Bender, R. W. Taylor, D. M. Turnbull, A Multiplex Real-Time PCR Method to Detect and Quantify Mitochondrial DNA Deletions in Individual Cells, *Anal Biochem*, Vol. 370, No. 1, 2007, pp. 127-129.
- [19] R. K. Bai, L. J. Wong, Simultaneous Detection and Quantification of Mitochondrial DNA Deletion(s), Depletion, and Over-Replication in Patients with Mitochondrial Disease, *J. Mol Diagn*, Vol. 7, No. 5 2005, pp. 613-622.
- [20] G. Zsurka, W. S. Kunz, Mitochondrial Dysfunction and Seizures: The Neuronal Energy Crisis, *Lancet Neurol*, Vol. 14, No. 9, 2015, pp. 956-966.
- [21] D. S. Khurana, I. Valencia, M. J. Goldenthal, A. Legido, Mitochondrial Dysfunction in Epilepsy, *Seminars in Pediatric Neurology*, Vol. 20, No. 3, 2013, pp. 176-187.
- [22] D. Khurana, M. Goldenthal, I. Valencia, et al., Mitochondrial Respiratory Chain Dysfunction in Children with Epilepsy, *Epilepsia*, 2013.
- [23] S. Waldbaum, M. Patel, Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress: A Contributing Link to Acquired Epilepsy?, *J. Bioenerg Biomembr*, Vol. 42, 2010, pp. 449-455.
- [24] S. J. Chang, B. C. Yu, Mitochondrial Matters of The Brain: Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Status in Epilepsy, *J. Bioenerg Biomembr*, Vol. 42, 2010, pp. 457-459.
- [25] B. Martinc, I. Grabnar, T. Vovk, The Role of Reactive Species in Epileptogenesis and Influence of Antiepileptic Drug Therapy on Oxidative Stress, *Curr Neuropharmacol*, Vol. 10, 2012, pp. 328-343.
- [26] M. C. Debrinski, T. Horton, M. T. Lott, J. M. Shoffner, A. C. McKee, M. F. Beal, B. H. Graham, D. C. Wallace, Marked Changes in Mitochondrial DNA Deletion Levels in Alzheimer Brains, *Genomics*, Vol. 23, No. 2, 1994, pp. 471-476.
- [27] G. Pagano, N. Ferrara, D. J. Brooks, N. Pavese, Age at Onset and Parkinson Disease Phenotype, *Neurology*, Vol. 86, No. 15, 2016, pp. 1400-1407.
- [28] E. Volmering, P. Niehusmann, V. Peeva, A. Grote, G. Zsurka, J. Altmüller, P. Nürnberg, A. J. Becker, S. Schoch, C. E. Elger, W. S. Kunz, Neuropathological Signs of Inflammation Correlate with Mitochondrial DNA Deletions in Mesial Temporal Lobe Epilepsy, *Acta Neuropathol*, Vol. 132, No. 2, 2016, pp. 277-288.
- [29] R. C. Vaught, D. K. Dowling, Maternal Inheritance of Mitochondria: Implications for Male Fertility?, *Reproduction*, Vol. 155, No. 4, 2018, pp. R159-R168.