

UTILIZAREA BIOMARKERIOR MOLECULARI ȘI CELULARI ÎN EPILEPSIE (Reviul literaturii)

^{1,2}Cornelia CALCÎI - conf. univ., dr. șt. med.,

^{1,2}Svetlana HADJIU - prof. univ., dr. hab. șt. med.,

^{1,4}Ludmila FEGHIU - doctorand, medic neuropediatru,

¹Nadejda LUPUȘOR - doctorand, medic neuropediatru,

⁵Maria MOLDOVANU - medic imagist

^{1,3}Mariana SPRINCEAN - conf. univ., dr. șt. psihologice,

¹Nineli REVENCO - dr. hab. șt. med., prof. univ., șef departament pediatrie

¹Departamentul Pediatrie, IP USMF „Nicolae Testemițanu”,

²Laboratorul Neuropediatric, IMSP Institutul Mamei și Copilului

³Catedra Biologie Moleculară și Genetică Umană, IP USMF „Nicolae Testemițanu”,

⁴Centrul Național de Epileptologie

⁵Centrul de Diagnostic German

tel. mob.: +373-696-143-33, e-mail: cornelia.calcii@usmf.md

Rezumat

Biomarkerii periferici au numeroase utilizări în tratamentul, prognosticarea și farmacovigilența epilepsiei. Până în prezent, niciun biomarker periferic nu a demonstrat o eficacitate dovedită, deși sunt cercetate mai multe opțiuni. În acest articol dorim să analizăm principalele domenii în care biomarkerii periferici își pot prezenta utilitatea, inclusiv participarea în procesele de inflamație, disfuncția barierei hemato-encefalice, modificări ale metabolismului, hormonilor și factorilor de creștere.

Cuvinte-cheie: biomarkeri, epilepsie

Summary. Use of molecular and cellular biomarkerior in epilepsy

Peripheral biomarkers have numerous uses in the treatment, prognosis and pharmacovigilance of epilepsy. Unfortunately, no peripheral biomarker has demonstrated proven efficacy, although several options are being investigated. In this article we want to analyze the main areas in which peripheral biomarkers can present their usefulness, including participation in the processes of inflammation, dysfunction of the blood-brain barrier, changes in metabolism, hormones and growth factors.

Key-words: biomarkers, epilepsy

Резюме. Использование молекулярных и клеточных биомаркеров при эпилепсии

Периферические биомаркеры имеют много потенциальных применений для лечения, прогнозирования и фармакологического исследования при эпилепсии. Согласно исследованиям, ни один периферический биомаркер не продемонстрировал доказанной эффективности, хотя в настоящее время исследуется несколько кандидатов. В этой статье мы обсудим основные области применения, включая воспаление, дисфункцию гематоэнцефалического барьера, окислительно-восстановительные изменения, метаболизм, гормоны и факторы роста.

Ключевые слова: биомаркеры, эпилепсия.

Introducere

Epilepsia afectează aproximativ 50 de milioane de persoane din întreaga lume. O treime dintre acestea prezintă o farmacorezistență către remediile antiepileptice [3, 7, 26]. În prezent nu sunt stabiliți biomarkerii esențiali pentru prognozarea farmacorezistenței. Ca *biomarkeri* sunt definite „modificările celulare, biochimice sau moleculare, care pot fi măsurate în medii biologice, cum ar fi țesuturile umane, celule sau fluide” [16, 17]. Mai recent, un grup de lucru al *National Institutes of Health (NIH)* din SUA a extins această definiție la „o caracteristică care poate fi măsurată obiectiv și care este un indicator al proceselor biologice normale și patologice sau al răspunsului

farmacologic la intervenția terapeutică aplicată” [18]. În cazul epilepsiei, spectrul biomarkerilor variază de la markeri neuroimagistici și electrofiziologici până la markeri moleculari și celulari, determinați în fluidele și țesuturile periferice.

În acest articol va fi analizată o revistă a literaturii ce ține de biomarkerii solubili, determinați în sânge și lichidul cefalorahidian (LCR). Aceștia pot avea multiple potențiale utilizări precum capacitatea de a prezice dezvoltarea epilepsiei în urma unei injurii cerebrale și/sau după o primă convulsie, progresia maladiei și severitatea acesteia și posibilitatea dezvoltării farmacoresistenței către drogurile antiepileptice (DAE) [16]. Astfel au fost analizate 34 surse

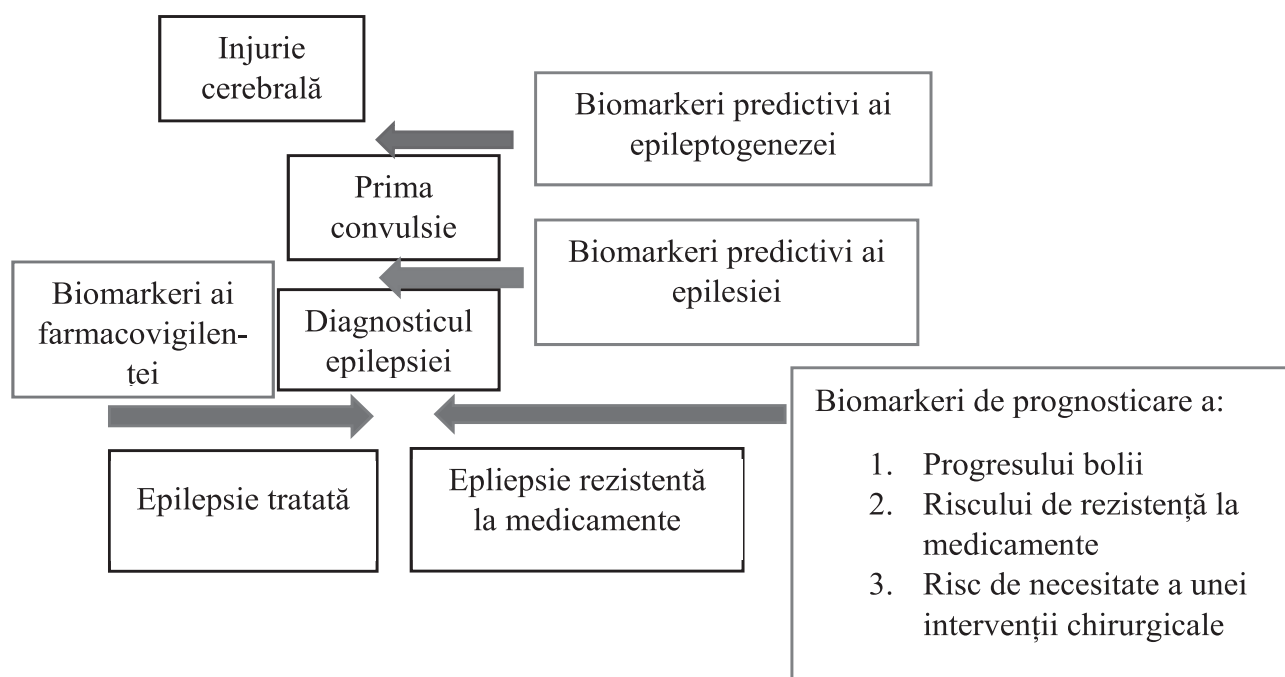


Figura 1. Posibilitățile de acoperire a biomarkerilor: predicția, prognosticarea și farmacovigilența [8].

bibliografice în care au fost expuse datele ce țin de importanța biomarkerilor în epilepsie.

Este cunoscut că, biomarkerii epileptogenezei sunt costisitori și dificil de cercetat. Chiar și după afecțiuni cerebrale severe, în prezența unui potențial risc epileptogen, cum ar fi traumatismul cranian sever, proporția persoanelor care dezvoltă epilepsie nu este mare. Mai mult decât atât, acest proces poate dura zeci de ani. O situație ideală ar fi identificarea biomarkerilor specifici întregului proces epileptogen, în imediata apropiere a leziunii neuronale, cu posibilitatea de predicție a riscului de dezvoltare a acceselor, a epilepsiei și a rezistenței la tratament [20, 24].

Biomarkerii moleculari și celulari ar trebui în mod ideal să fie prezenți într-un compartiment accesibil, cum ar fi sângele, țesuturile, LCR, sputa sau urina (figura 1).

Inflamația. Studiile experimentale recente au relevat faptul că inflamația poate precipita convulsiile și susține activitatea convulsivă [1, 5, 6]. În plus, aceasta poate influența descărcarea epileptică prin modificări ale homeostazei glutamatului și a ionilor implicați în procesul epileptogen. În consecință, markerii biologici ai inflamației reprezintă o cale de identificare a pacienților la care inflamația joacă un rol cheie în epileptogeneză și/sau menținerea excitabilității neuronale [1, 5]. Mai mult, medicamentele imunomodulatoare, inclusiv steroizii și imunoglobulinele intravenoase, s-au dovedit a avea efecte strategice terapeutice de succes la unii copii cu encefalopatii epileptice, care deseori sunt rezistente la medicamentele convenționale antilepileptice (AED).

Inflamația țesuturilor poate fi implicată nu numai în generarea convulsiilor, ci și în dezvoltarea fenotipului de rezistență medicamentoasă. În mod surprinzător, chiar și copiii cu convulsii focale, convulsii care nu sunt considerate în mod tradițional ca fiind de natură inflamatorie, au un răspuns pozitiv la steroizi. Țintirea procesului inflamator poate prezenta o strategie terapeutică nouă în tratamentul epilepsiei, iar biomarkerii circulanți capabili să demonstreze răspunsul la tratament au o valoare crescută [6, 13].

În mai multe studii, s-a demonstrat că persoanele cu epilepsie focală farmacorezistentă prezintă un dezechilibru în raportul antagoniștilor receptorilor interleukinei-1 β / interleukinei-1 (IL-1 β / IL-1Ra). IL-1 β este recunoscut drept un mediator al inflamației creierului. La rozătoare, blocarea farmacologică a biosintezei IL-1 β reduce semnificativ riscul de dezvoltare a convulsiilor. Acest „profil de citokine pro-inflamatorii” în sângele periferic, constituit din niveluri crescute ale IL-6, cu un raport scăzut al IL-1 β / IL-1Ra, poate fi întâlnit în rândul pacienților la care inflamația persistentă și nesoluționată, duce la dezvoltarea unei neuromodulări asociate cu modificări ale excitabilității neuronale. La fel, concentrația mai ridicată a IL-1 β în ser și în LCR a fost asociată cu un risc crescut de dezvoltare a epilepsiei după leziunile cerebrale [21, 22].

Grupul cu mobilitate ridicată box-1 (*High-mobility group box-1*, HMGB1) este unul dintre cei mai cunoscuți mediatori ai neuroinflamării evocate de leziunile epileptogene, fapt dovedit în modelele clinice de epilepsie [2]. Acesta este eliberat activ de celulele

imune în timpul infecției sau inflamației aseptice induse de leziuni. Moartea celulară duce la eliberarea pasivă a HMGB1. Modelele experimentale de epilepsie sugerează că forma disulfurică acetilată a HMGB1 este responsabilă de apariția inflamației în epilepsie. Un studiu pilot la pacienții cu epilepsie focală rezistentă, sugerează că izoformele HMGB1 pot fi considerați biomarkeri candidați în stratificarea epilepsiei [23]. Cu toate acestea, HMGB1 nu este specific numai pentru epilepsie și, de fapt, ar fi un biomarker sensibil și specific pentru mai multe afecțiuni, inclusiv patologii autoimune și malignități.

Inhibiția farmacologică a HMGB1 a avut succes în numeroase modele experimentale de boală [25]. Intervențiile utilizate au inclus inhibiția directă folosind anticorpi policlonali și monoclonali, inhibitori competitivi ai HMGB1 A-Box, metode de sechestrare și degradare a HMGB1. Deoarece HMGB1 nu are specificitate cerebrală, nu este clar dacă modificările periferice sau cele din sistemului nervos central (SNC) sunt responsabile de convulsii sau de efectele terapeutice descrise anterior.

Bariera hematoencefalică

Disfuncția barierei hematoencefalice în urma convulsiilor prelungite pe modele animale a fost recunoscută încă din anii 1950. Edemul vasogen, cauzat de modificările neurovasculare, a fost descris pentru prima dată de Klatzo și colegii săi. În unele cazuri, disfuncția barierei hematoencefalice poate cauza convulsii, în timp ce disfuncția creată artificial prin alte mijloace, duce la o epileptogeneză întârziată [4, 8]. Dereglarea funcției barierei hematoencefalice din cauza unei crize hipertensive în eclampsie și în cadrul encefalopatiei hipertensive, poate implica modificarea concentrațiilor serice ale magneziului. Vătămarea barierei hematoencefalice în studiile experimentale a provocat apariția întârziată a convulsiilor [10, 11]. Dereglarea funcției barierei hematoencefalice este frecvent întâlnită în diferite afecțiuni neurologice, cum ar fi encefalita, meningita, accidentele vasculare cerebrale, boala Alzheimer și alte afecțiuni ale SNC. Nu există nici-un dubiu că disfuncția cerebrovasculară condiționează sau susține convulsiile. Rolul afectării cerebrovasculare în diverse tulburări ale SNC, inclusiv epilepsia, a fost în trecut acceptat din punct de vedere clinic, însă, doar recent, a fost testat ca mecanism important, ce stă la baza epileptogenezei. Restabilirea integrității cerebrovasculare este importantă și a fost, de asemenea, propusă ca fiind o abordare complementară prin administrarea DAE tradiționale [14, 15]. În cazul epilepsiei umane, datele studiilor sunt foarte sugestive, pentru a concluziona că în regiunile focale din care își au originea convulsiile se

determină o pierdere a permeabilității selective a barierei hematoencefalice.

În plus, datele din mai multe studii susțin ideea că bariera hematoencefalică la pacienții cu epilepsie prezintă o varietate de modificări moleculare care sunt într-un fel sau altul implicate în boala epileptică [4, 8, 10]. Având în vedere importanța barierei hematoencefalice pentru tulburările convulsive și epilepsie, nu este surprinzător faptul că biomarkerii din acest domeniu fiziopatologic sunt extrem de examinați, totodată, necesită cercetări ulterioare. În general, există trei abordări pentru determinarea integrității barierei hematoencefalice în epilepsie. Acestea nu diferă de aspectele utilizate anterior pentru măsurarea integrității cerebrovasculare în alte maladii neurologice [19]. Din punct de vedere istoric, raportul dintre albumina serică și albumina din LCR a fost prima abordare utilizată. Se cunoaște că, bariera vasculară protejează creierul de substanțele nocive din sânge, furnizând în același timp nutrienții necesari creierului pentru funcționarea corectă și reglementarea strictă a traficului de celule și molecule din sânge în creier. De asemenea, bariera vasculară separă macromolecule impermeabile ($> \sim 500$ Da) în sânge și creier. Astfel, atunci când bariera hematoencefalică este intactă, albumina, fiind de 10 ori mai concentrată în sânge, va avea un raport constant față de concentrația în LCR [10]. Un principiu similar, dar aplicat în alt mod, ar fi imagistica prin rezonanță magnetică nucleară (RMN) cu aplicarea substanței de contrast. În acest caz „raportul” dintre parenchimul cerebral și sânge este măsurat topografic, iar distribuția substanței injectate în sânge este vizualizată în creier. Absența extravazării indică o barieră hematoencefalică intactă. Astfel, creierul produce proteine specifice care sunt izolate în SNC în condițiile barierei hematoencefalice intacte. În timpul deschiderii barierei hematoencefalice, proteinele, care în mod normal sunt prezente în concentrații mari în SNC, sunt libere să difuzeze în sânge după gradientul lor de concentrație. Proteina, fiind un marker periferic ideal cu semnificație clinică, ar trebui să fie: (1) o proteină (sau moleculă) prezentă în concentrații mici sau nedetectabile în serul subiecților sănătoși; (2) prezentă în creier și LCR, fiind într-o concentrație mai mare în parenchimul cerebral decât în plasmă; (3) disponibilă pentru extravazare în cazul afectării barierei hematoencefalice; și, (4) în continuare eliberată de celulele creierului ca răspuns la leziunile creierului (de exemplu, în timpul gliozei reactive). Mai multe proteine, inclusiv S100B, enolaza specifică neuronală (NSE) și proteina fibrilară glială (GFAP) au fost evaluate pentru funcțiile sale, iar proteina S100B include toate caracteristicile menționate mai sus. Tehnicile de imagistică disponibile pentru cercetarea clinică

nu au o rezoluție înaltă necesară pentru a „vizualiza” această structură, deși agenții de contrast care au fost utilizați măsoară integritatea barierei hematocerebrale. Evaluarea funcțională a statutului barierei hematoencefalice prin calcularea coeficientul de albumină (QA) din ser și LCR și RMN cu contrast sunt pe scară largă acceptate ca fiind standardele de aur pentru determinarea integrității barierei hematoencefalice. O lucrare recentă a arătat că nivelul seric al proteinei S100B corelează cu QA, permițând astfel măsurarea proteinei din LCR în mod indirect și fără efectuarea puncției lombare [11, 14].

Este relevant faptul că, proteina S100B serică este cel mai studiat marker, care poate fi implicat în mecanismele epileptogenezei întârziate după leziunile cerebrale traumatiche. Injuriile cerebrale, în general, sunt asociate cu o pierdere rapidă a integrității barierei hemato-encefalice urmată de dezvoltarea afecțiunilor cerebrale. Astfel, proteina S100B a apărut ca un biomarker periferic indicator al permeabilității barierei hematoencefalice. Creșterea nivelurilor serice ale S100B reflectă prezența unei bariere deteriorate și poate prezice consecințele pe termen lung după o patologie cerebrală. Evenimentele intracraniene sunt asociate cu un risc crescut de crize convulsive, astfel, este posibil că, proteina S100B se va dovedi, de asemenea, a avea o utilitate în detectarea persoanelor cu risc crescut pentru convulsii. Două meta-analize independente pentru S100B în afecțiunile traumatiche cerebrale au concluzionat că nivelurile normale de S100B prezic cu precizie rezultatele unui examen neuroimagic normal și că eșantionarea S100B în decurs de 3 ore de la vătămare ar trebui luată în considerare atunci când nu există deficit neurologic focal sau leziuni extracerebrale semnificative [9, 12]. Prin urmare, există o oportunitate de a efectua un test cu un nivel predictiv ridicat, astfel încât multe scanări inutile să poată fi evitate și separate, un test cu o valoare predictivă pentru a diagnostica complicațiile după traumatismele cerebrale.

Concluzii

Epilepsia este reprezentată de o arie de cercetări a biomarkerilor specifici, ce au o mare importanță clinică, fiind necesari în prognozarea maladiei, riscul de dezvoltare a sechelelor neurologice și a farmacorezistenței către remediile antiepileptice. Astfel identificarea acestora ar putea avea un impact semnificativ asupra cursului clinic al bolii. Trebuie recunoscut faptul că mulți dintre biomarkerii discutați în această revizuire sunt implicați și în alte patologii, inclusiv boli non-neurologice. Vor fi necesare cercetări prospective pentru identificarea individuală sau a grupurilor de biomarkeri specifici care ar diferenția epilepsiile de

alte boli. Noile strategii terapeutice ar trebui să implice integrarea informațiilor clinice, inclusiv electroencefalografia și examenele neuroimaging, cu noii biomarkerii moleculari și celulari.

Identificarea biomarkerilor inflamației aberante ar putea stratifica pacienții, pentru determinarea persoanelor, la care inflamația contribuie la menținerea stării epileptice. Accentuarea rolului pe care îl joacă inflamația în epilepsie poate stimula strategii de stopare a progresiei fenotipului rezistent la medicamente.

Markerii integrității barierei hemato-encefalice sunt instrumente utile pentru determinarea sechelelor într-o varietate de boli neurologice sau evenimente acute (accidente vasculare cerebrale, traumatisme). În prezent se studiază rolul acestor markeri în prognosticul și diagnosticul tulburărilor convulsive, necătând la faptul că din alt punct de vedere, acești markeri deja au demonstrat că bariera hematoencefalică este lezată în momentul acceselor convulsive și că perturbarea integrității acestei bariere este epileptogenă. Mai mult decât atât, atunci când bariera hematoencefalică este deteriorată, permițând albuminei să intre în spațiul interstițial, acest fapt poate afecta eficacitatea unor medicamente și, prin urmare, markerii integrității barierei pot fi utili în luarea deciziilor terapeutice.

Instrumentele mai bune pentru a prezice debutul epilepsiei ar putea duce la dezvoltarea noilor strategii terapeutice pentru prevenirea dezvoltării epilepsiei, potențial sub formă de intervenție imunomodulatorie. În plus, predicția timpurie a rezistenței la medicamente ar însemna că pacienții ar putea fi evaluați pentru chirurgia epilepsiei la un stadiu precoce, evitându-se astfel administrarea mai multor DAE, cu efecte secundare asociate, care sunt în mod inevitabil sortite eșecului.

Bibliografie

1. Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Ann. Rev. Immunol.* 2011; 29:139–162.
2. Balosso S, Liu J, Bianchi ME et al. Disulfide-containing high mobility group box-1 promotes N-Methyl-D-aspartate receptor function and excitotoxicity by activating toll-like receptor 4-dependent signaling in hippocampal neurons. *Antioxid. Redox Signal.* 2014; 21(12):1726–40.
3. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ 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; 51:676–685.
4. Blyth BJ, Farhavar A, Gee C, et al. Validation of serum markers for blood-brain barrier disruption in traumatic brain injury. *JNeurotrauma* 2009; 26:1497–1507.
5. Diamond ML, Ritter AC, Failla MD, et al. IL-1beta associations with posttraumatic epilepsy development:

- a genetics and biomarker cohort study. *Epilepsia*. 2014; 55:1109–1119.
6. de Vries HE, Kooij G, Frenkel D et al. Inflammatory events at blood-brain barrier in neuroinflammatory and neurodegenerative disorders: implications for clinical disease. *Epilepsia*. 2012; 53 (Suppl.6):45–52.
 7. Engel J Jr; International League Against Epilepsy. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2001; 42:796–803.
 8. Gorter JA, van Vliet EA, Aronica E. Status epilepticus, blood-brain barrier disruption, inflammation, and epileptogenesis. *Epilepsy Behav* 2015; 49:13–16.
 9. Heidari K, Vafaei A, Rastekenari AM et al. S100B protein as a screening tool for computed tomography findings after mild traumatic brain injury Systematic review and meta-analysis. *Brain Inj* 2015; 11:1–12.
 10. Hoffmann A, Bredno J, Wendland MF et al. Validation of in vivo magnetic resonance imaging blood-brain barrier permeability measurements by comparison with gold standard histology. *Stroke* 2011; 42:2054–2060.
 11. Janigro D. Are you in or out? Leukocyte, ion and neurotransmitter permeability across the epileptic blood-brain barrier. *Epilepsia* 2012; 53 (Suppl.1):26–34.
 12. Kapural M, Krizanac-Bengez L, Barnett G et al. Serum S-100 beta possible marker of blood-brain barrier disruption. *Brain Res* 2002; 940:102–104.
 13. Lehtimäki KA, Liimatainen S, Peltola J et al. The serum level of interleukin-6 in patients with intellectual disability and refractory epilepsy. *Epilepsy Res* 2011; 95:184–187.
 14. Marchi N, Granata T, Ghosh C et al. Blood-brain barrier dysfunction and epilepsy: pathophysiologic role and therapeutic approaches. *Epilepsia* 2012; 53:1877–1886.
 15. Marchi N, Angelov L, Masaryk T et al. Seizure-promoting effect of blood-brain barrier disruption. *Epilepsia* 2007; 48:732–742.
 16. Marchi N, Cavaglia M, Fazio V et al. Peripheral markers of blood brain barrier damage. *Clin Chim Acta* 2004; 342:1–12.
 17. Mao LY, Ding J, Peng WF et al. Interictal interleukin-17A levels are elevated and correlate with seizure severity of epilepsy patients. *Epilepsia* 2013; 54:e142–e145.
 18. Maroso M, Balosso S, Ravizza T et al. Toll-like receptor 4 and high mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. *Nat Med* 2010; 16:413–419.
 19. Masel BE, DeWitt DS. Traumatic brain injury: a disease process, not an event. *J Neurotrauma* 2010; 27:1529–1540.
 20. Masel BE, DeWitt DS. Traumatic brain injury: a disease process, not an event. *J Neurotrauma* 2010; 27:1529–1540.
 21. Maroso M, Balosso S, Ravizza T et al. Interleukin-1 β biosynthesis inhibition reduces acute seizures and drug resistant chronic epileptic activity in mice. *Neurotherapeutics* 2011; 8: 304–315.
 22. Maroso M, Balosso S, Ravizza T et al. Interleukin-1 β biosynthesis inhibition reduces acute seizures and drug resistant chronic epileptic activity in mice. *Neurotherapeutics* 2011; 8: 304–315.
 23. Musumeci D, Roviello GN, Montesarchio D. An overview on HMGB1 inhibitors as potential therapeutic agents in HMGB1-related pathologies. *Pharmacol Ther* 2014; 141: 347–357.
 24. Oby E, Janigro D. The blood-brain barrier and epilepsy. *Epilepsia* 2006; 47:1761–1774.
 25. Pilzweiger C, Holdenrieder S. Circulating HMGB1 and RAGE as clinical biomarkers in malignant and autoimmune diseases. *Diagnostics (Basel)* 2015; 5:219–253.
 26. Pitkanen A. Drug-mediated neuroprotection and antiepileptogenesis: animal data. *Neurology* 2002; 59: S27–S33.
 29. Tanuma N, Miyata R, Nakajima K et al. Changes in cerebrospinal fluid biomarkers in human herpesvirus-6-associated acute encephalopathy/febrile seizures. *Mediators Inflamm* 2014; 2014:564091.
 30. Uden L, Calcagnile O, Uden J, et al. Validation of the Scandinavian guidelines for initial management of minimal, mild and moderate traumatic brain injury in adults. *BMC Med* 2015; 13: 292.
 31. Vezzani A, French J, Bartfai T, et al. The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol* 2011; 7:31–40.
 32. Wathen C, Janigro D. IL-1 β associations with posttraumatic epilepsy development: a genetics and biomarker cohort study. *Epilepsia* 2014; 55:1313.
 33. Yang H, Lundback P, Ottosson L, et al. Redox modification of cysteine residues regulates the cytokine activity of high mobility group box-1 (HMGB1). *Mol Med* 2012; 18: 250–259.
 34. Zurolo E, Iyer A, Maroso M, et al. Activation of Toll-like receptor, RAGE and HMGB1 signalling in malformations of cortical development. *Brain* 2011; 134:1015–1032.