

İdiyopatik West ve Lennox-Gastaut Sendromlarında, Glial Biyobelirteçlerin Serum Düzeyleri ile Klinik Şiddet ve Elektroensefalografi Özellikleri Arasındaki İlişki

The Association Between Serum Levels of Glial Biomarkers, Clinical Severity and Electroencephalography Features in Idiopathic West and Lennox-Gastaut Syndromes

Minara CHERKEZZADE¹ , Selen SOYLU² , Erdem TÜZÜN² , Vuşlat YILMAZ² , Mine SEZGİN³ , Zuhai YAPICI¹ , Cem İsmail KÜÇÜKALİ² , Pinar TOPALOĞLU¹ 

¹İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı, Çocuk Nörolojisi Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Sinir Bilimleri Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ÖZ

Amaç: Nöbet endüksiyonunda artan glial aktivitenin katkısı giderek daha fazla tanınmasına rağmen, epileptik ensefalopatinin (EE) fizyopatolojisinde glia kaynaklı nöroenflamasyonun rolü çok az araştırılmıştır.

Yöntem: EE'de glial aktivitenin katkısını tanımlamak için, idiyopatik West sendromu (WS, n=18), idiyopatik Lennox-Gastaut sendromu (LGS, n=13) ve sağlıklı kontrollerin (n=31) serumlarında, ELISA ile, glial fibriller asidik protein (GFAP), high mobility group box 1 (HMGB1), kitinaz-3 benzeri protein 1 (CHI3L1), çözünür CD163 (sCD163) ve miyeloid hücreler 2 üzerinde eksprese edilen tetikleyici reseptör (TREM2) dâhil olmak üzere daha önce açıklanan biyobelirteç değerine sahip glia türevi medyatörlerin seviyelerini ölçtük.

Bulgular: Epileptik ensefalopatili hastalar sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede yüksek CHI3L1 seviyeleri gösterdi. HMGB1, CHI3L1, sCD163 ve TREM2 seviyeleri LGS hastalarında WS hastalarına ve/veya sağlıklı kontrollere göre daha yüksekti. Araştırılan medyatörlerden biri veya daha fazlası tedaviye yanıt verme, hastalığın ciddiyeti ve elektroensefalografide (EEG'de) patolojik özelliklerin varlığı ile ilişkilendirildi.

Tartışma: Bulgularımız, astrosit ve mikroglia aracılı nöroenflamasyonun LGS ve WS patogenezinde rol oynayabileceğine dair hasta bazlı ilk kanıtları sunmaktadır. Ayrıca glial medyatörler idiyopatik EE'li hastalarda prognostik biyobelirteçler olarak hizmet edebilir.

Anahtar Sözcükler: Epileptik ensefalopati, glia, kitinaz-3 benzeri protein 1, Lennox-Gastaut sendromu, nöroenflamasyon; West sendromu

ABSTRACT

Introduction: Although the contribution of enhanced glial activity in seizure induction is increasingly recognized, the role of glia-induced neuroinflammation in the physiopathology of epileptic encephalopathy (EE) has been scarcely investigated.

Methods: To delineate the contribution of glial activity in EE, we measured levels of glia-derived mediators with previously described biomarker value, including glial fibrillary acidic protein (GFAP), high mobility group box 1 (HMGB1), chitinase-3-like protein 1 (CHI3L1), soluble CD163 (sCD163) and triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) by ELISA in sera of patients with idiopathic West syndrome (WS, n=18), idiopathic Lennox-Gastaut syndrome (LGS, n=13) and healthy controls (n=31).

Results: Patients with EE showed significantly higher CHI3L1 levels

compared to healthy controls. Levels of HMGB1, CHI3L1, sCD163 and TREM2 were higher in LGS patients than WS patients and/or healthy controls. One or more of the investigated mediators were associated with treatment responsiveness, disease severity and presence of pathological features on electroencephalography (EEG).

Conclusions: To our knowledge, our findings provide the initial patient-based evidence that astrocyte- and microglia-mediated neuroinflammation might be involved in the pathogenesis of LGS and WS. Moreover, glial mediators may serve as prognostic biomarkers in patients with idiopathic EE.

Keywords: Chitinase-3-like protein 1, epileptic encephalopathy, glia, Lennox-Gastaut syndrome, neuroinflammation, West syndrome

Cite this article as: Cherkezzade M, Soylu S, Tüzün E, Yılmaz V, Sezgin M, Yapıcı Z ve ark. İdiyopatik West ve Lennox-Gastaut Sendromlarında, Glial Biyobelirteçlerin Serum Düzeyleri ile Klinik Şiddet ve Elektroensefalografi Özellikleri Arasındaki İlişki. Arch Neuropsychiatry 2024; 61:128–134.

GİRİŞ

Epilepsi, tekrarlayan nöbetlerle karakterize kronik bir merkezi sinir sistemi (MSS) bozukluğudur. Epilepside, iyon kanalı fonksiyon bozukluğu ve artan nöronal uyarılabilirliğin önemli bir rolü olduğuna inanılmaktadır. Bununla birlikte, epilepsinin kesin patojenik mekanizmaları bilinmemektedir ve

artan nöronal uyarılabilirliği azaltmayı amaçlayan anti-epileptik ilaçlar, epilepsi hastalarının büyük bir kısmında nöbetleri önlemede başarısız olmaktadır (1). Glial hücrelerin, özellikle de astrositler ve mikrogliaların, epilepsinin patofizyolojisinde artan nöronal uyarılabilirliğe katkı sağladığı

Öne Çıkan Noktalar

- Epileptik ensefalopatili hastalar sağlıklı kontrollere göre daha yüksek CHI3L1 seviyeleri gösterdi.
- HMGB1, CHI3L1, sCD163 ve TREM2 düzeyleri LGS hastalarında daha yüksekti.
- Bulgularımız, astrositik ve mikrogial nöroenflamasyonun EE'deki ilk kanıtlarıdır.
- Glial medyatörler, idiyopatik EE'li hastalarda prognostik biyobelirteçler olabilir.

giderek daha fazla kabul edilmektedir (2). Aynı zamanda, tekrarlayan nöbetlerin glial aktivasyonu tetiklediği ve glia kaynaklı proenflamatuvar araçların salınmasına yol açarak kısır bir pozitif geri besleme döngüsü oluşturduğu ve epileptik nöbetlerin devamı için uygun bir mikro ortam oluşturduğu da gösterilmektedir (3).

Epilepside rol oynayan başlıca nöroenflamatuvar glial yollardan bazıları; toll benzeri reseptörler ve yüksek mobilite grup kutusu 1 (HMGB1) arasındaki etkileşim yoluyla aktive edilen B hücrelerinin nükleer faktör kappa-hafif zincir artırıcısı (NF- κ B) ve mitojenle aktive protein kinaz (MAPK) sinyal yolları, enflamatuvar yollar, tümör nekroz faktörü- α (TNF- α)-TNF reseptör 1 sinyal yolu ve çeşitli kemokin sinyal yollarıdır (3). Glial hücreler tarafından salınan proenflamatuvar medyatörler glial fonksiyonlara müdahale ederek glutamat alımını ve nöronların ateşlenmesiyle salınan fazla potasyumun tamponlanması azaltır, nörotransmitterlerin sinaptik salınımını ve nörotransmitter reseptörlerinin ekspresyonunu değiştirir ve kan-beyin bariyerini bozarak, periferik kandan beyin parankimine ek enflamatuvar medyatörlerin erişimine izin verir (4).

Epileptik ensefalopati (EE), sürekli epileptik nöbetlerin, ilerleyici serebral fonksiyon bozukluğuna, motor-mental geriliğe ve davranışsal anormalliklere yol açtığı, nispeten immünoterapiye yanıt veren bir grup bozukluğu içerir. West sendromu (WS) ve Lennox-Gastaut sendromu (LGS), klinik pratikte en sık karşılaşılan EE sendromları arasındadır (5). Glia kaynaklı medyatörlerin, nöbet endüksiyonu, nöroenflamasyon ve nöronal fonksiyon bozukluğunda yukarıda belirtilen katkılarına dayanarak, glial hücrelerin EE sendromlarının patofizyolojisine katıldığını varsayabiliriz. Bununla birlikte, EE'de glial hücrelerin katılımı hakkında çok az şey bilinmektedir ve bu konudaki bilgilerimizin çoğu, idiyopatik WS ve LGS hastalarının MSS'sinde artmış glial aktivasyonu gösteren immünohistokimya çalışmaları ile sınırlıdır (6,7).

Bu çalışmada, EE patofizyolojisinde glial hücrelerin ve glia kaynaklı nöroenflamasyonun katılımına ilişkin kanıt sağlamak ve EE'deki glial biyobelirteçlerin prognostik değerini değerlendirmek için, idiyopatik WS ve LGS'li hastalarda daha önce bildirilen biyobelirteç değerine sahip glia türeği medyatörlerden oluşan bir panelin serum seviyelerini taramayı amaçladık. Bu amaçla; biz çalışmamızda, nöroenflamasyon sırasında astrositler ve/veya mikrogia tarafından artan ekspresyonları (8-12) ve nöroenflamasyonla karakterize edilen çeşitli MSS bozukluklarında daha önce gösterilmiş biyobelirteç değerleri nedeniyle (13-18) glial fibriller asidik protein (GFAP), HMGB1, kitinaz-3 benzeri protein 1 (CHI3L1, YKL-40 olarak da bilinir), çözünür CD163 (sCD163) ve miyeloid hücrelerde eksprese edilen tetikleyici reseptör 2 (TREM2)'yi seçtik.

YÖNTEM

Katılımcılar

Çalışmaya ardışık 18 idiyopatik WS hastası, ilgili kriterlere göre (19,20) tipik klinik ve EEG bulgularıyla tanı konulan 13 ardışık idiyopatik LGS

hastası ve yaş/cinsiyet uyumlu 31 sağlıklı kontrol dâhil edildi (Tablo 1). Sağlıklı kontroller, sağlıklı çocuk kontrol muayenesine gelen çocuklardan oluşturuldu. Kayıt sırasında tüm hastalara periferik kan örnekleme, EEG incelemesi ve kranyal manyetik rezonans (MR) görüntüleme (1,5 Tesla tarayıcı ile) yapıldı. Bazı hastalarda güncel EEG ve MR incelemeleri kullanılırken, bazı hastaların daha eski kayıtları kullanıldı. Ensefalopatinin semptomatik nedenleri (örn. beyin iskemisi/hemorajisi, tümör, malformasyonlar, migrasyon defektleri, kortikal displazi ve travmatik beyin hasarı) ve eşlik eden enfeksiyöz, otoimmün veya enflamatuvar bozuklukları olan hastalar hariç tutuldu. Epileptik ensefalopatinin ek metabolik nedenlerini dışlamak için, tüm hastalar için ayrıntılı bir rutin araştırma şeması kullanıldı ve ayırıcı tanı için biyotidinaz eksikliği, piridoksin eksikliği, mitokondriyal bozukluklar, glikosilasyon defektleri, fenilketonüri ve diğer aminoasidüri, peroksizomal ve lizozomal bozukluklar araştırıldı. Nörokütanöz sendromları (örn. tüberoz skleroz) olan hastalar da çalışma dışı bırakıldı. Genetik tarama, dâhil edilen EE hastalarında yaygın olarak bulunan genetik mutasyonları göstermede başarısız oldu. Sadece hafif periventriküler lökomalazisi olan hastalar dışlanmadı. Hastaların hiçbirinde kayda değer bir perinatal, geçmiş tıbbi veya aile tıbbi öyküsü yoktu. Hastaların tamamı anti-epileptik tedavi (1-3 ilaç arasında değişen) altındaydı ve 26 hasta hastalık seyri boyunca immünoterapi (adrenokortikotropin hormonu veya steroid) almıştı. Kayıtlı hastaların hiçbirisi kan örneklemesinden sonraki son üç ay içinde immünoterapi almamıştı. Tedaviye olumlu yanıt, başlangıçtaki aylık nöbet sıklığıyla karşılaştırıldığında nöbet sıklığında >%50 azalma olarak kabul edildi. Nöbet durumu, Uluslararası Epilepsiyle Mücadele Derneği sınıflandırmasına göre şu şekilde değerlendirildi: 1- Auralar da dâhil olmak üzere nöbetlerin tamamen ortadan kalkması (en az bir yıl boyunca) / veya 2- Başlangıçtaki nöbet günlerine göre %50'den fazla azalma (en az bir yıl boyunca, auralar içerebilir veya içermeyebilir)(21). Kayıt sırasındaki prognoz, Kaba Motor Fonksiyon, El Becerisi ve İletişim Fonksiyonu Sınıflandırma Sistemlerine (22) göre belirlendi ve Düzey I-V arası bir ölçekte gösterildi. Elektroensefalografi incelemesi sırasında arka plan aktivitesi, sivri dalga deşarjları ve bürst-süpresyon (burst-suppression) paterni kaydedildi.

Çalışma, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmış (tarih ve sayı: 18/12/2020-257365) ve tüm hastalardan veya vekillerinden yazılı bilgilendirilmiş onam alınmıştır. Çalışma Helsinki deklarasyonu kurallarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

ELISA

Tüm katılımcıların periferik kan örnekleri sabah 08.00-10.00 arasında alındı, serumları izole edilerek kullanıma kadar -80°C'de saklandı. GFAP, HMGB1, sCD163 (Elabscience, Houston, TX, ABD), CHI3L1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, ABD) ve TREM2'nin (Cusabio, Houston, TX, ABD) serum seviyeleri üreticinin yönergelerine göre ELISA ile ölçüldü.

İstatistiksel Analizler

Nitel değişkenler ki-kare testi kullanılarak karşılaştırıldı. Sürekli verilerin dağılımı özellikleri incelendikten sonra iki grup arasında yapılan karşılaştırmalarda Man-Whitney U testi kullanıldı. İki'den fazla grubun karşılaştırıldığı analizlerde parametrik olmayan Kruskal-Wallis testi kullanıldı ve post-hoc Dunn's testi yapıldı. Korelasyon analizleri için Spearman testi uygulandı. $p < 0,05$ değeri istatistiksel anlamlılık için sınır kabul edildi.

BULGULAR

Klinik ve Demografik Veri

Epileptik ensefalopatili hastalar (8,4±5,8 yaş) ve sağlıklı kontroller (9,1±4,7 yaş) arasında yaş ($p=0,290$) ve cinsiyet (EE grubunda 14 kadın, 17 erkek ve sağlıklı kontrollerde 11 kadın, 20 erkek; $p=0,437$) açısından anlamlı fark yoktu. Cinsiyet dağılımı da LGS (sekiz kadın, beş erkek) ve WS hastaları (altı kadın, 12 erkek) arasında benzerdi ($p=0,119$). Ancak LGS hastaları

Tablo 1. Epileptik ensefalopatili çocukların ve sağlıklı kontrollerin demografik ve klinik özellikleri

	LGS (n=13)	WS (n=18)	SK (n=31)	p değeri
Cinsiyet				
Kadın	8	6	11	0,212
Erkek	5	12	20	
Yaş (yıl)	13,0±4,6	5,1±3,9	9,1±4,7	0,580
Hastalık süresi (yıl)	11,8±4,4	4,8±4,0		<0,001
Hastalığın başlangıç yaşı (ay)	4,9±2,9	4,1±2,3		0,481
Son aya ait nöbet sıklığı				
Hiçbiri	2	8		0,237
≤1/hafta	3	1		
>1/hafta <1/gün	1	2		
≥1/gün	7	7		
EE'nin klinik şiddeti*				
Seviye I-III (hafif-orta)	10	11		0,353
Seviye IV-V (şiddetli)	3	7		
Tedaviye yanıt**				
Nöbet sıklığında >%50 azalma	4	10		0,263
Nöbet sıklığında ≤%50 azalma	6	6		
EEG'de arka plan etkinliği				
Normal	0	3		0,121
Yavaş dalgalar	13	15		
Börs-supresyon (burst-suppression) EEG paterni				
Mevcut olmayan	5	5		0,723
Mevcut	8	13		
Ani dalga deşarjları				
Hiçbiri	2	15		0,001
2-2,5 Hz	10	2		
2,5-3 Hz	1	0		
>3 Hz	0	1		
MRG				
Normal	9	13		0,856
Periventriküler lökomalazi	4	5		

Sürekli değişkenler ortalama ± standart sapma olarak gösterildi. Anamlı p değerleri kalın harflerle gösterildi.

*Klinik şiddet Kaba Motor Fonksiyon, El Becerisi ve İletişim Fonksiyonu Sınıflandırma Sistemlerine göre belirlendi.

**5 hastaya ebeveyn onayı olmaması veya yan etkiler nedeniyle immünoterapi uygulanmadı. Bu nedenle bu hastalar tedaviye yanıt analizine dâhil edilmedi.

EE: epileptik ensefalopati; EEG: elektroensefalografi; LGS: Lennox-Gastaut sendromu; MRG: manyetik rezonans görüntüleme; SK: sağlıklı kontroller; WS: West sendromu.

İstatistiksel analizlerde gerektiği şekilde Mann-Whitney U, ki-kare ve Kruskal-Wallis testleri kullanıldı.

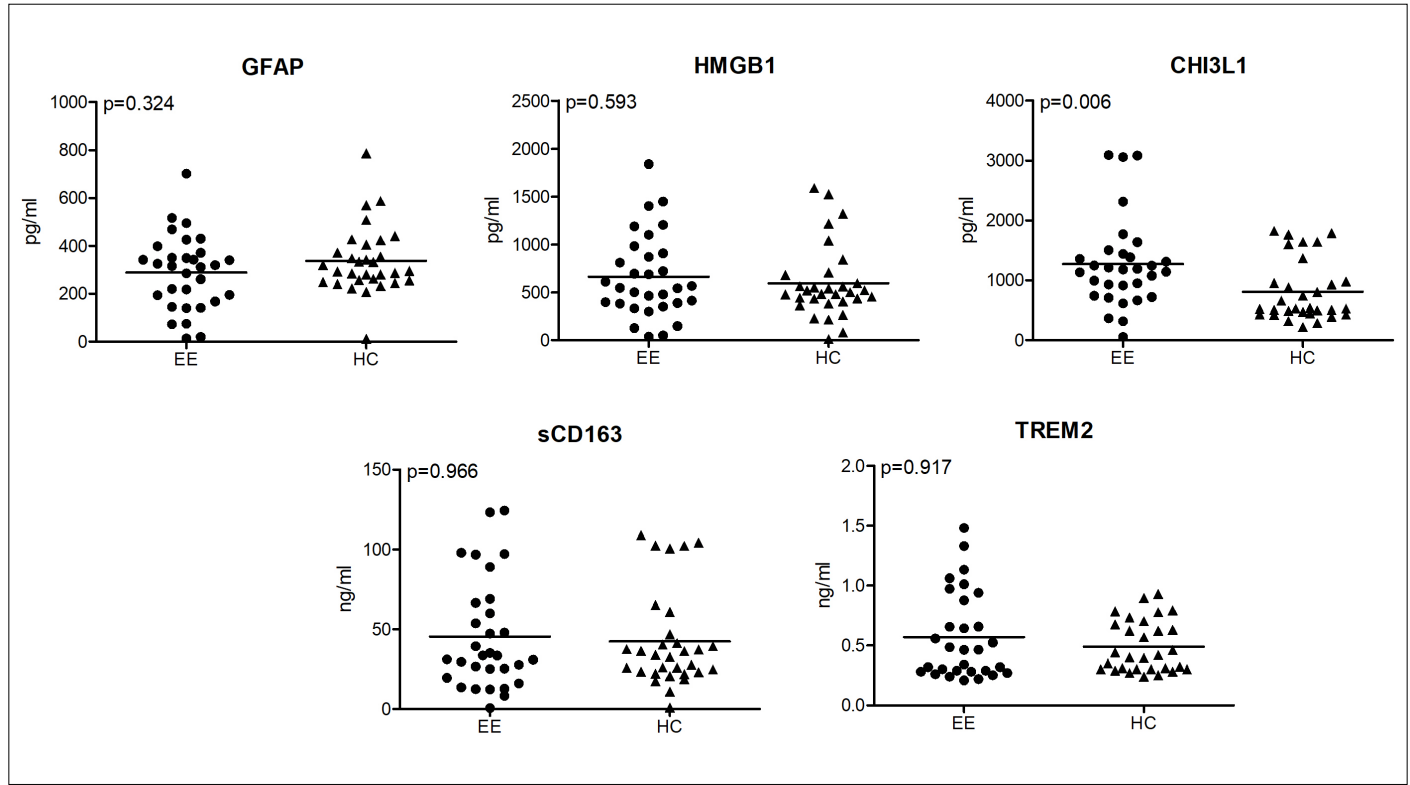
(13,0±4,6 yaş) WS hastalarından (5,1±4,0 yaş) anlamlı derecede daha yaşlıydı (p<0,001) ve hastalık süreleri anlamlı derecede daha yüksekti (p<0,001). Lennox-Gastaut sendromu ve WS hastaları arasında hastalığın başlangıç yaşı, nöbet sıklığı, klinik şiddeti ve kan alımı sırasında tedaviye yanıt açısından anlamlı fark yoktu (Tablo 1). Tüm LGS hastalarında yavaş dalgalar görülürken, WS'li üç hastada kan örnekleme sırasında yapılan EEG'de normal arka plan aktivitesi vardı. Börs-supresyon (burst-suppression) EEG paterni olan hasta oranları WS ve LGS hastaları arasında benzer iken, LGS hastalarında WS hastalarına göre anlamlı olarak daha fazla sayıda spike-dalga deşarjı görüldü. On üç LGS hastasının sadece 4'ünde ve 18 WS hastasının beşinde MR görüntüleme hafif periventriküler lökomalazi görüldü (Tablo 1).

Epilptik Ensefalopati Alt Gruplarında Glia Kaynaklı Biyobelirteçlerin Düzeyleri

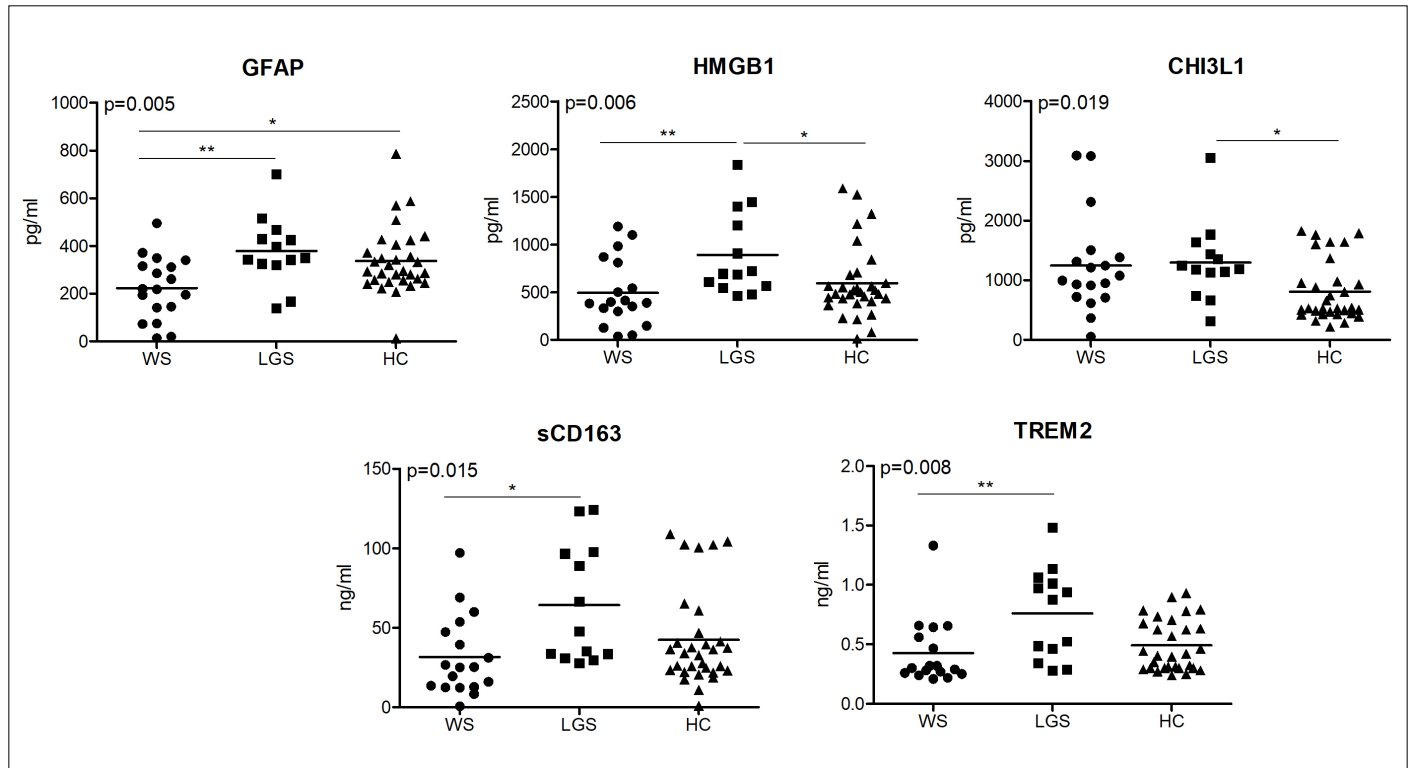
EE'li hastalar (WS ve LGS hastalarının kombine kohortu), glial biyobelirteçlerin serum düzeyleri açısından sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında, EE hastalarında yalnızca CHI3L1 düzeylerinin anlamlı düzeyde arttığı, GFAP, HMGB1, sCD163 ve TREM2 düzeylerinin ise çalışma grupları arasında karşılaştırılabilir düzeyde olduğu görüldü (Şekil 1). Epilptik ensefalopati alt

grupları ayrı ayrı değerlendirildiğinde, WS hastaları LGS ve sağlıklı kontrol gruplarına göre anlamlı derecede düşük GFAP düzeyleri gösterdiler. Öte yandan, LGS hastaları sağlıklı kontrollere göre önemli ölçüde daha yüksek CHI3L1 seviyeleri, WS hastalarına göre anlamlı derecede daha yüksek sCD163 ve TREM2 düzeyleri, WS hastalarına ve sağlıklı kontrollere göre ise daha yüksek HMGB1 düzeyleri sergilediler (Şekil 2).

Glial biyobelirteçlerin serum seviyeleri ile EE'nin klinik/laboratuvar özellikleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için spesifik EE alt grupları arasında GFAP, HMGB1, CHI3L1, sCD163 ve TREM2 seviyelerini karşılaştırdık. Kan örnekleme sırasında nöbet geçirmeyen EE hastaları, istatistiksel anlamlılığa ulaşmadan daha düşük serum GFAP, HMGB1 ve TREM2 seviyeleri gösterdi (Tablo 2). Benzer şekilde tedaviye yanıt veren hastalarda (nöbet sıklığında >%50 azalma) GFAP ve TREM2 düzeyleri anlamlı derecede düşüktü (Tablo 3). Klinik şiddeti artan (Seviye IV-V) EE hastalarının serum HMGB1, CHI3L1 ve sCD163 seviyeleri, nispeten daha hafif hastalık şiddetine sahip hastalara (Seviye I-III) göre anlamlı derecede daha yüksekti (Tablo 4). Ayrıca Spearman testi, serum CHI3L1 düzeyleri ile Düzey I ve V ölçeğinde EE'nin klinik şiddetini değerlendiren Kaba Motor İşlev, El Becerisi ve İletişim İşlevi Sınıflandırma Sistemleri düzeyleri



Şekil 1. Epileptik ensefalopatili (EE) hastalar ile sağlıklı kontroller (SK) arasında glia kaynaklı biyobelirteçlerin serum seviyelerinin karşılaştırılması. Glial fibriller asidik protein, GFAP; yüksek hareket kabiliyetine sahip grup kutusu 1, HMGB1; kitinaz-3 benzeri protein 1, CHI3L1; çözünür CD163, sCD163; Miyeloid hücreler 2'de eksprese edilen tetikleyici reseptör, TREM2. Yatay çizgiler ortalama değerleri gösterir. Her panelin sol üst çeyreğinde belirtilen p değerleri Mann-Whitney U testi ile elde edildi.



Şekil 2. West Sendromu (WS), Lennox-Gastaut sendromu (LGS) ve sağlıklı kontroller (SK) olan hastalar arasında glia türevi biyobelirteçlerin serum seviyelerinin karşılaştırılması. Glial fibriller asidik protein, GFAP; yüksek hareket kabiliyetine sahip grup kutusu 1, HMGB1; kitinaz-3 benzeri protein 1, CHI3L1; çözünür CD163, sCD163; Miyeloid hücreler 2'de eksprese edilen tetikleyici reseptör, TREM2. Yatay çizgiler ortalama değerleri gösterir. Her panelin sol üst çeyreğinde gösterilen p değerleri Kruskal-Wallis testi ile elde edildi. Dunn's post-hoc analizine göre *, $p < 0,05$ ve **, $p < 0,01$.

Tablo 2. Kan örnekleme sırasında nöbet geçiren ve nöbet geçirmeyen EE hastalarında glial biyobelirteçlerin karşılaştırılması

Nöbet aktivitesi	Mevcut değil (n=10)	Mevcut (n=21)	p değeri
GFAP (pg/ml)	225,0±143,1	319,3±154,8	0,056
HMGB1 (pg/ml)	530,1±393,7	723,1±446,2	0,118
CHI3L1 (pg/ml)	1151,6±750,9	1355,6± 836,3	0,252
sCD163 (ng/ml)	43,2±35,0	46,4±34,8	0,407
TREM2 (ng/ml)	0,5±0,3	0,7±0,5	0,095

İstatistiksel analizde Mann-Whitney U testi kullanıldı. Anlamlı p değerleri kalın harflerle gösterildi.

CHI3L1: Kitinaz-3 benzeri protein 1; EE: epileptik ensefalopati; GFAP: glial fibriler asidik protein; HMGB1: yüksek hareket kabiliyetine sahip grup kutusu 1; sCD163: çözünür CD163; TREM2: miyeloid hücreler 2'de eksprese edilen tetikleyici reseptör.

Tablo 3. Tedaviye yanıt veren ve dirençli EE hastalarında glial biyobelirteçlerin karşılaştırılması

	Dirençli (n=12)	Duyarlı (n=14)	p değeri
GFAP (pg/ml)	344,2±125,7	234,2±124,2	0,018
HMGB1 (pg/ml)	825,5±496,6	608,8±395,6	0,119
CHI3L1 (pg/ml)	1300,8±892,4	1247,5±673,8	0,434
sCD163 (ng/ml)	55,3±38,2	41,3±35,4	0,173
TREM2 (ng/ml)	0,8±0,6	0,4±0,2	0,010

İstatistiksel analizde Mann-Whitney U testi kullanıldı. Anlamlı p değerleri kalın harflerle gösterildi.

CHI3L1: Kitinaz-3 benzeri protein 1; EE: epileptik ensefalopati; GFAP: glial fibriler asidik protein; HMGB1: yüksek hareket kabiliyetine sahip grup kutusu 1; sCD163: çözünür CD163; TREM2: miyeloid hücreler 2'de eksprese edilen tetikleyici reseptör.

Tablo 4. Kaba Motor Fonksiyon, El Becerisi ve İletişim Fonksiyonu Sınıflandırma Sistemleri tarafından belirlenen, hafif ve şiddetli klinik şiddeti olan EE hastaları arasındaki glial biyobelirteçlerin karşılaştırılması

	Seviye I-III (n=21)	Seviye IV-V (n=10)	p değeri
GFAP (pg/ml)	306,3±127,9	252,4±204,7	0,229
HMGB1 (pg/ml)	496,8±309,8	738,9±467,3	0,049
CHI3L1 (pg/ml)	1069,0±449,5	1753,4±1160,9	0,048
sCD163 (ng/ml)	31,0±18,0	52,2±38,3	0,023
TREM2 (ng/ml)	0,7±0,5	0,5±0,4	0,106

İstatistiksel analizde Mann-Whitney U testi kullanıldı. Anlamlı p değerleri kalın harflerle gösterildi.

CHI3L1: Kitinaz-3 benzeri protein 1; EE: epileptik ensefalopati; GFAP: glial fibriler asidik protein; HMGB1: yüksek hareket kabiliyetine sahip grup kutusu 1; sCD163: çözünür CD163; TREM2: miyeloid hücreler 2'de eksprese edilen tetikleyici reseptör.

Tablo 5. Kan örnekleme sırasında bürst-süpresyon (burst-suppression) EEG paterni olan ve olmayan EE hastaları arasında glial biyobelirteçlerin karşılaştırılması

	Mevcut değil (n=10)	Mevcut (n=21)	p değeri
GFAP (pg/ml)	291,0±227,6	287,9±113,5	0,485
HMGB1 (pg/ml)	448,6±258,0	761,9±467,1	0,012
CHI3L1 (pg/ml)	1211,9±812,3	1326,9±815,9	0,359
sCD163 (ng/ml)	32,9±23,9	51,3±37,9	0,044
TREM2 (ng/ml)	0,6±0,4	0,6±0,5	0,411

İstatistiksel analizde Mann-Whitney U testi kullanıldı. Anlamlı p değerleri kalın harflerle gösterildi.

CHI3L1: Kitinaz-3 benzeri protein 1; EE: epileptik ensefalopati; GFAP: glial fibriler asidik protein; HMGB1: yüksek hareket kabiliyetine sahip grup kutusu 1; sCD163: çözünür CD163; TREM2: miyeloid hücreler 2'de eksprese edilen tetikleyici reseptör.

Tablo 6. Kan örnekleme sırasında EEG'de sivri dalga deşarjı olan ve olmayan EE hastaları arasındaki glial biyobelirteçlerin karşılaştırılması

	Mevcut değil (n=17)	Mevcut (n=14)	p değeri
GFAP (pg/ml)	258,8±121,2	325,4±187,1	0,132
HMGB1 (pg/ml)	542,5±340,0	804,5±500,2	0,045
CHI3L1 (pg/ml)	988,5±500,0	1655,7±957,7	0,015
sCD163 (ng/ml)	34,2±24,9	59,0±39,9	0,028
TREM2 (ng/ml)	0,5±0,3	0,8±0,6	0,030

İstatistiksel analizde Mann-Whitney U testi kullanıldı. Anlamli p değerleri kalın harflerle gösterildi.

CHI3L1: Kitinaz-3 benzeri protein 1; EE: epileptik ensefalopati; GFAP: glial fibriler asidik protein; HMGB1: yüksek hareket kabiliyetine sahip grup kutusu 1; sCD163: çözünür CD163; TREM2: miyeloid hücreler 2'de eksprese edilen tetikleyici reseptör.

arasında anlamlı bir pozitif korelasyon ($p=0,006$, $R=0,481$) gösterdi. GFAP, HMGB1, sCD163 ve TREM2 ile klinik şiddet arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı. Elektroensefalografi bulgularına göre belirlenen EE alt grupları arasında glial biyobelirteç düzeyleri karşılaştırıldığında, bört-süpresyon (burst-suppression) paterni olan EE hastalarının HMGB1 ve sCD163 düzeylerinin, olmayanlara göre anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü (Tablo 5). Benzer şekilde, sivri dalga deşarjlarının varlığı, artan serum HMGB1, CHI3L1, sCD163 ve TREM2 seviyeleri ile ilişkilendirildi (Tablo 6). Periventriküler lökomalazisi olan ve olmayan EE hastaları arasında glial biyobelirteçlerin serum seviyeleri açısından anlamlı bir fark yoktu (veriler gösterilmemiştir). Ayrıca glial biyobelirteç düzeylerinin yaş, hastalık süresi ve hastalığın başlangıç yaşı değişkenleri ile anlamlı düzeyde ilişkili olmadığı görüldü ($p=0,154-0,733$; $R=0,064-0,262$).

TARTIŞMA

Bu çalışmada, kombine WS ve LGS kohortunda yüksek serum CHI3L1 düzeyleri ve LGS hastalarında WS hastalarına ve/veya sağlıklı kontrollere göre daha yüksek serum HMGB1, sCD163 ve TREM2 düzeyleri bulduk. Bildiğimiz kadarıyla bu bulgular, özellikle LGS hastalarında ilk kez artan glial aktivite ve nöroenflamasyona dair kanıt sağlar.

Glial hücrelerin varsayılan önemi ve katkısı çoğunlukla EE'nin hayvan modelleri kullanılarak doğrulanmıştır. Epileptik ensefalopati ile ilişkili genlerin mutasyona uğramış varyantlarının (örn. tuzla indüklenbilir kinaz 1, SCN8A ve KCNMA1) deney hayvanlarına dâhil edilmesi, nöral uyarılabilirliğin, epileptik nöbetlerin ve astrosit ve/veya mikroglia aktivitesi belirteçlerinin kortikal ekspresyonunun artmasına neden olur (23-25). Bu nedenle, hastadan elde edilen bulgularımız EE'deki glial aktivitenin önemini daha da desteklemektedir.

Karakteristik bir astrositik ürün olan GFAP düzeylerinde artış olmaması, astrositlerin EE'deki rolü hakkında çekincelere yol açabilir. Bununla birlikte, bu görüşe karşı çıkılarak, hem aktive edilmiş astrositler hem de mikroglia (16) tarafından üretilen CHIC3L1, LGS hastalarında önemli ölçüde artmış ve EE'nin çeşitli klinik özellikleriyle korele olmuştur. Glial fibriler asidik protein düzeylerinin yaşla birlikte arttığı bilinmektedir (26) ve bu, diğer iki çalışma grubundan daha genç olan WS hastalarında azalan GFAP düzeylerini açıklayabilir. Her ne kadar GFAP düzeyleri ile hastaların yaşı arasında korelasyon bulunmasa da bu durum katılımcı sayısının azlığı ve çalışmamızın istatistiksel gücünün azalması ile açıklanabilir. Son olarak, serum GFAP seviyeleri, EE hastalarının MSS'inde meydana gelen patolojik değişiklikleri doğru şekilde yansıtmıyor olabilir ve bu nedenle beyin omurilik sıvısı GFAP seviyelerinin ölçümü gelecekteki araştırmalar için garanti edilebilir.

Bununla birlikte kan alımı sırasında aktif nöbet geçiren ve antiepileptik ilaçlara direnç gösteren hastalarda GFAP düzeylerinin artma eğilimi gösterdiği görüldü. Bu, hayvanlarda nöbetlerin tetiklenmesine paralel olarak artan sayıda GFAP pozitif astrosit gösteren genetik EE modeli çalışmalarını ile uyumludur (23-25). Ayrıca bu düşüncüyü destekler şekilde,

astrosit inhibitörü ONO-2506 ile tedavi edilen deney hayvanları, beyinde GFAP ekspresyonunun azalmasına paralel olarak nöbet sıklığında azalma ve diken-dalga deşarjı sergiler (27).

HMGB1, CHI3L1 ve sCD163 düzeyleri, nöbetlerin yoğunluğundan ziyade artan klinik şiddet skorlarıyla ilişkiliydi. Varsayılan bir açıklama, EE'nin ciddiyetini değerlendirmek için kullanılan klinik ölçeğin motor-zihinsel gelişimi dikkate almasıdır. Bu nedenle, bu üç glial aracının glia kaynaklı nöronal yıkım ve ilişkili nörolojik hasarla ilişkili olma olasılığı daha yüksektir. Bu iddiayı destekler nitelikte, rekombinant HMGB1'in sıçanlara ventriküler uygulanması, kortikal nöron ölümüne, nöronal göç ve organizasyonun bozulmasına ve serebral glutamat içeriğinin artmasına neden olmuştur (28).

HMGB1, CHI3L1 ve sCD163 arasındaki bört-süpresyon (burst-suppression) ve diken dalga deşarjlarının elektrofizyolojik bulgularıyla olan ilişki, EE'de patolojik EEG bulgularının oluşumunda mikroglia ve astrositlerin rol oynadığına dair kanıt sağlar. Özellikle, uyarılmış mikroglia'dan oluşan şartlandırılmış ortamın intraventriküler uygulaması, glial IL-1 β ve TNF-a üretiminin artmasına, kortikal glutamat içeriğinin artmasına, nöbetlerin ve diken-dalga deşarjlarının indüklenmesine neden olur (29). Epileptik hastalarda diken dalga deşarjlarının oluşumunda astrositler gibi diğer kortikal glial hücrelerin rolünü gösteren ek raporlar mevcuttur (30-32).

CHI3L1, çeşitli doku tipleri tarafından bol miktarda eksprese edilen 40 kD'lik bir glikoproteindir. Kesin biyolojik fonksiyonu hâlâ çok iyi bilinmemekle birlikte, enflamasyonun biyolojik belirteci olma potansiyeli giderek daha fazla tanınmaktadır. Nörolojide, CHI3L1'in özellikle amiotrofik lateral skleroz, felç ve multipl sklerozda büyük bir biyobelirteç değeri taşıdığı bulunmuştur (16). İlaça dirençli epilepside de CHI3L1'in potansiyel biyolojik belirteç değeri öne sürülmüştür (33). Ancak EE dâhil çoğu epileptik bozuklukta önemi büyük oranda bilinmemektedir. Çalışmamızda CHI3L1 hem LGS hem de WS hastalarında arttı ve motor/mental bozukluğun şiddeti ve elektrofizyolojik özelliklerle koreleydi. Bu nedenle, CHI3L1'in EE'ye dâhil olduğu kesin mekanizmaların daha fazla araştırılması gerekmektedir.

Her ne kadar sonuçlarımız EE fizyopatolojisinde glial hücrelerin rol oynadığına dair daha fazla destek sağlasa da, HMGB1'in nöronlar tarafından da üretildiği ve çoğunlukla nöron-glia karışımının bir belirteci olduğu da unutulmamalıdır (34,35). Benzer şekilde sCD163 ve CHI3L1 de sadece mikroglialar tarafından değil aynı zamanda monositler ve miyeloid hücre tipleri tarafından da üretilmektedir (16,36). Periferik kan monositlerinin EE patogenezi katkısı daha önce öne sürülmüştü (37). Dolayısıyla yüksek sCD163 ve CHI3L1 düzeyleri, diğer miyeloid hücre tiplerinin aktivasyonu ve EE'nin klinik özelliklerine katkısı ile de ilişkili olabilir.

Çalışmamızın bir kısıtlılığı olarak, özellikle LGS grubunda vaka sayısının düşük olması istatistiksel gücü azaltmış ve biyobelirteç düzeyleri ile klinik/demografik özellikler arasındaki bazı anlamlı ilişkileri gizlemiş olabilir. Bu

nedenle çalışmamız bir ön araştırma çalışması olarak değerlendirilmeli ve daha fazla sayıda EE hastasının katılımıyla yapılacak ileri çalışmalar tarafından takip edilmelidir. Ayrıca serum GFAP düzeylerinin standart sapmasının yüksek olması, bunun pratikte bir belirteç olarak kullanılmasını zorlaştırabilir. Bu nedenle alternatif glial belirteçlerin araştırılmasını öneriyoruz.

Kısaca, sonuçlarımız özellikle LGS hastalarında glial hücrelerin katkısına ilişkin bir "kavram kanıtı" temeli sağlıyor ve böylece önceki hayvan modeli tabanlı mekanik çalışmaların ve hasta bazlı immünohistokimya raporlarının bulgularını doğruluyor. Ayrıca CHI3L1, bir glial aracı ve EE'nin klinik şiddeti, motor/zeka geriliği ve elektrofizyolojik bulguları ile ilişkili potansiyel bir biyobelirteç olarak ön plana çıkmıştır. Bulgularımız ayrıca EE'nin gelecekteki terapötik müdahaleleri için potansiyel bir hedef olarak glial hücrelerin seçilmesine daha fazla destek vermektedir.

Etik Komite Onayı: Çalışma, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmış (tarih ve sayı: 18/12/2020-257365).

Hasta Onamı: Tüm hastalardan veya vekillerinden yazılı bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış Bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir- PT; Tasarım- ET, PT; Denetleme- PT, ET, ZY; Kaynaklar- (-); Malzemeler- (-); Veri Toplanması ve/veya İşlemesi- MC, SS, PT, ÇİK; Analiz ve/veya Yorum- PT, ET, MS, ÇİK, VY; Literatür Taraması- MC, SS; Yazıyı Yazan- MC, PT, ET; Eleştirel İnceleme- PT, ET, VY, ZY, ÇİK.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu-BAP-TTU-2021-37165 tarafından desteklenmektedir.

KAYNAKLAR

- Lasoñ W, Chlebicka M, Rejdak K. Research advances in basic mechanisms of seizures and antiepileptic drug action. *Pharmacol Rep.* 2013;65(4):787-801. [Crossref]
- Chen P, Chen F, Zhou B. Understanding the role of glia-neuron communication in the pathophysiology of epilepsy: a review. *J Integr Neurosci.* 2022;21(4):102. [Crossref]
- Sanz P, Garcia-Gimeno MA. Reactive glia inflammatory signaling pathways and epilepsy. *Int J Mol Sci.* 2020;21(11):4096. [Crossref]
- Patel DC, Tewari BP, Chaunsali L, Sontheimer H. Neuron-glia interactions in the pathophysiology of epilepsy. *Nat Rev Neurosci.* 2019;20(5):282-297. [Crossref]
- Jain P, Sharma S, Tripathi M. Diagnosis and management of epileptic encephalopathies in children. *Epilepsy Res Treat.* 2013;2013:1-9. [Crossref]
- Hayashi M. Neuropathology of the limbic system and brainstem in West syndrome. *Brain Dev.* 2001;23(7):516-522. [Crossref]
- Kawashima T, Adachi T, Tokunaga Y, Furuta A, Suzuki SO, Doh-ura K, et al. Immunohistochemical analysis in a case of idiopathic Lennox-Gastaut syndrome. *Clin Neuropathol.* 1999;18(6):286-292.
- Sánchez-Ruiz de Gordo J, Erro ME, Vicuña-Urriza J, Zelaya MV, Tellechea P, Acha B, et al. Microglia-related gene triggering receptor expressed in myeloid cells 2(TREM2) is upregulated in the substantia nigra of progressive supranuclear palsy. *Mov Disord.* 2020;35(5):885-890. [Crossref]
- Zhao L, Zhang X, Zhang C. Methimazole inhibits the expression of GFAP and the migration of astrocyte in scratched wound model in vitro. *Mediators Inflamm.* 2020;2020:4027470. [Crossref]
- Vu L, An J, Kovalik T, Gendron T, Petrucelli L, Bowser R. Cross-sectional and longitudinal measures of chitinase proteins in amyotrophic lateral sclerosis and expression of CHI3L1 in activated astrocytes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2020;91(4):350-358. [Crossref]
- Lisi L, Ciotti GMP, Braun D, Kalinin S, Currò D, dello Russo C, et al. Expression of iNOS, CD163 and ARG-1 taken as M1 and M2 markers of microglial polarization in human glioblastoma and the surrounding normal parenchyma. *Neurosci Lett.* 2017;645:106-112. [Crossref]
- Haraguchi T, Takasaki K, Naito T, Hayakawa K, Katsurabayashi S, Mishima K, et al. Cerebroprotective action of telmisartan by inhibition of macrophages/microglia expressing HMGB1 via a peroxisome proliferator-activated receptor γ -dependent mechanism. *Neurosci Lett.* 2009;464(3):151-155. [Crossref]
- Katsipis G, Tzekaki EE, Tsolaki M, Pantazaki AA. Salivary GFAP as a potential biomarker for diagnosis of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease and its correlation with neuroinflammation and apoptosis. *J Neuroimmunol.* 2021;361:577744. [Crossref]
- Costa J, Gromicho M, Pronto-Laborinho A, Almeida C, Gomes RA, Guerreiro ACL, et al. Cerebrospinal fluid chitinases as biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *Diagnostics (Basel).* 2021;11(7):1210. [Crossref]
- Park S-H, Lee E-H, Kim H-J, Jo S, Lee S, Seo SW, et al. The relationship of soluble TREM2 to other biomarkers of sporadic Alzheimer's disease. *Sci Rep.* 2021;11(1):13050. [Crossref]
- Pintea R, Montalban X, Comabella M. Chitinases and chitinase-like proteins as biomarkers in neurologic disorders. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2021;8(1):e921. [Crossref]
- Paudel YN, Shaikh MF, Chakraborti A, Kumari Y, Aledo-Serrano Á, Aleksovska K, et al. HMGB1: a common biomarker and potential target for TBI, neuroinflammation, epilepsy, and cognitive dysfunction. *Front Neurosci.* 2018;12:628. [Crossref]
- Bhattacharya A, Ashouri R, Fangman M, Mazur A, Garett T, Doré S. Soluble receptors affecting stroke outcomes: potential biomarkers and therapeutic tools. *Int J Mol Sci.* 2021;22(3):1108. [Crossref]
- Bourgeois BFD, Douglass LM, Sankar R. Lennox-Gastaut syndrome: a consensus approach to differential diagnosis. *Epilepsia.* 2014;55 Suppl 4:4-9. [Crossref]
- Mytinger JR. Definitions and diagnostic criteria for infantile spasms and west syndrome - historical perspectives and practical considerations. *Semin Pediatr Neurol.* 2021;38:100893. [Crossref]
- Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, et al. ILAE classification of the epilepsies: position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia.* 2017;58(4):512-521. [Crossref]
- Hidecker MJC, Paneth N, Rosenbaum PL, Kent RD, Lillie J, Eulenberg JB, et al. Developing and validating the communication function classification system for individuals with cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol.* 2011;53(8):704-710. [Crossref]
- Thompson JA, Miralles RM, Wengert ER, Wagley PK, Yu W, Wenker IC, et al. Astrocyte reactivity in a mouse model of SCN8A epileptic encephalopathy. *Epilepsia Open.* 2022;7(2):280-292. [Crossref]
- Pang B, Mori T, Badawi M, Zhou M, Guo Q, Suzuki-Kouyama E, et al. An epilepsy-associated mutation of salt-inducible kinase 1 increases the susceptibility to epileptic seizures and interferes with adrenocorticotropic hormone therapy for infantile spasms in mice. *Int J Mol Sci.* 2022;23(14):7927. [Crossref]
- Yao Y, Qu D, Jing X, Jia Y, Zhong Q, Zhuo L, et al. Molecular mechanisms of epileptic encephalopathy caused by KCNMA1 loss-of-function mutations. *Front Pharmacol.* 2022;12:775328. [Crossref]
- Vågberg M, Norgren N, Dring A, Lindqvist T, Birgander R, Zetterberg H, et al. Levels and age dependency of neurofilament light and glial fibrillary acidic protein in healthy individuals and their relation to the brain parenchymal fraction. *PLoS One.* 2015;10(8):e0135886. [Crossref]
- Onat F. Astrocytes and absence epilepsy. *Br J Pharmacol.* 2013;168(5):1086-1087. [Crossref]
- Yang X, Zhang X, Ma Y, Wang Z, Huang K, Liu G, et al. Abnormal rat cortical development induced by ventricular injection of rHMGB1 mimics the pathophysiology of human cortical dysplasia. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:634405. [Crossref]
- Zhao H, Zhu C, Huang D. Microglial activation: an important process in the onset of epilepsy. *Am J Transl Res.* 2018;10(9):2877-2889.
- Zhang H, Shen Z, Zhao Q, Yan L, Du L, Deng Z. Dynamic transitions of epilepsy waveforms induced by astrocyte dysfunction and electrical stimulation. *Neural Plast.* 2020;2020:8867509. [Crossref]
- Ozgur M, Özyurt MG, Arkan S, Cavdar S. The effects of optogenetic activation of astrocytes on spike-and-wave discharges in genetic absence epileptic rats. *Ann Neurosci.* 2022;29(1):53-61. [Crossref]
- Amzica F. Participation of cortical glial cells to the genesis of spike-wave seizures. *Adv Neurol.* 2006;97:173-182.
- Zhang H, Tan J-Z, Luo J, Wang W. Chitinase-3-like protein 1 may be a potential biomarker in patients with drug-resistant epilepsy. *Neurochem Int.* 2019;124:62-67. [Crossref]
- Voong CK, Goodrich JA, Kugel JF. Interactions of HMGB proteins with the genome and the impact on disease. *Biomolecules.* 2021;11(10):1451. [Crossref]
- Yang H, Andersson U, Brines M. Neurons are a primary driver of inflammation via release of HMGB1. *Cells.* 2021;10(10):2791. [Crossref]
- Pranzatelli MR, Tate ED, McGee NR. Microglial/macrophage markers CHI3L1, sCD14, and sCD163 in CSF and serum of pediatric inflammatory and non-inflammatory neurological disorders: a case-control study and reference ranges. *J Neurol Sci.* 2017;381:285-290. [Crossref]
- Takamatsu T, Yamanaka G, Ohno K, Hayashi K, Watanabe Y, Takeshita M, et al. Involvement of peripheral monocytes with IL-1 β in the pathogenesis of west syndrome. *J Clin Med.* 2022;11(2):447. [Crossref]