

# miRNA jako potencjalne biomarkery padaczki u dzieci

## *miRNAs as potential biomarkers for childhood epilepsy*

Beata Rzepka-Migut<sup>1</sup>, Justyna Paprocka<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Klinika Neurologii Dziecięcej i Pediatrii, Kliniczny Szpital Wojewódzki Nr 2 im. Św. Jadwigi Królowej w Rzeszowie

<sup>2</sup>Katedra i Klinika Neurologii Dziecięcej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

### STRESZCZENIE

**Wstęp:** Padaczka jest jedną z najczęstszych i najbardziej wyniszczających chorób neurologicznych w grupie pacjentów pediatrycznych. Skłania to badaczy do poszukiwania molekularnego podłoża oraz prób wdrożenia leczenia celowanego. Jest to niezwykle trudne wyzwanie z uwagi na złożoność etiopatogenezy padaczki. Alternatywna opcja dociekań skupia się na poszukiwaniach biomarkerów. miRNA — to małe niekodujące RNA o długości 18–25 nukleotydów, które negatywnie regulują ekspresję genów na poziomie posttranskrypcyjnym działając przez hamowanie translacji białek lub degradację mRNA. Celem pracy była analiza dostępnego piśmiennictwa dotyczącego zmian profilu ekspresji wybranych miRNA u dzieci z padaczką.

**Materiały i metody:** Przegląd piśmiennictwa został przeprowadzony w oparciu o wytyczne PRISMA Statement (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses*). Poszukiwania objęły okres od 1 września 2010r. do 1 grudnia 2022r.

**Wyniki:** Ostatecznie do analizy włączono 17 publikacji. Widoczny jest rosnący trend zainteresowania tematem wykorzystania miRNA w padaczce, większość prac została opublikowana w ciągu ostatnich 5 lat. W badaniach metodą PCR przeanalizowano 26 różnych miRNA. Autorzy podsumowali artykuły oceniające wybrane miRNA jako potencjalne biomarkery diagnostyczne i prognostyczne w padaczce za pomocą krzywej ROC.

**Wnioski:** Liczba badań oceniających miRNA jako potencjalne biomarkery prognostyczne i diagnostyczne w padaczce szybko rośnie. Wyniki tych badań należy jednak zweryfikować w niezależnych kohortach również obejmujących dzieci z padaczką.

**Słowa kluczowe:** padaczka, microRNA, miRNA, biomarker

### ABSTRACT

**Introduction:** Epilepsy is one of the most common and devastating neurological diseases in pediatric patients. This has led researchers to search for the molecular basis of the disease and to try to find a targeted treatment, which is an extremely difficult challenge due to the complexity of the etiopathogenesis of epilepsy. An alternative research option is focused on the search for biomarkers. miRNAs are small non-coding RNAs, 18-25 nucleotides long, which negatively regulate gene expression at the post-transcriptional level by inhibiting protein translation or mRNA degradation. The aim of the study was to analyze the available literature focusing on the evaluation of changes in the expression profile of selected miRNAs in children with epilepsy.

**Materials and methods:** The literature review was conducted in accordance with PRISMA Statement (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses). The search covered the period from September 1, 2010 to December 1, 2022.

**Results:** 17 publications were included in the analysis. A growing trend of interest in the topic of miRNA use in epilepsy is evident, with most papers published in the last 5 years. Twenty-six different miRNAs were analyzed by PCR. The authors summarized articles assessing different miRNAs as potential diagnostic and prognostic biomarkers of epilepsy using a ROC curve.

**Conclusions:** The number of studies investigating miRNAs as potential prognostic and diagnostic biomarkers for epilepsy is growing rapidly. However, the results of these studies need to be verified in independent cohorts also including children with epilepsy.

**Keywords:** epilepsy, microRNA, miRNA, biomarker

Neurol Dziec. 2023; 33; 61: 20–29

#### Adres do korespondencji:

Beata Rzepka-Migut  
Klinika Neurologii Dziecięcej i Pediatrii, Kliniczny Szpital Wojewódzki Nr 2 im. Św. Jadwigi Królowej w Rzeszowie, ul. Lwowska 60, 35–301 Rzeszów  
e-mail: beatarzepka@gmail.com

Published: 23.02.2024

This article is available in open access under Creative Common Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) license, allowing to download articles and share them with others as long as they credit the authors and the publisher, but without permission to change them in any way or use them commercially.

## WSTĘP I CEL PRACY

Padaczka jest jedną z najczęstszych i najbardziej wyniszczających chorób neurologicznych w grupie pacjentów pediatrycznych [1]. Wysiłki badaczy skupione są na poszukiwaniu molekularnego podłoża padaczki oraz prób leczenia celowanego, jest to wyzwanie niezwykle trudne z uwagi na złożoność etiopatogenezy. Prowadzone są również badania naukowe poszukujące biomarkerów, czyli biologicznych wskaźników, które mogą być obiektywnie zmierzone, a zmiany w profilu ich ekspresji świadczą o fizjologii bądź chorobie organizmu. Ekspresja genów jest procesem wieloetapowym prowadzącym do odkodowania informacji genetycznej celem wytworzenia produktu, którym najczęściej jest białko. Ekspresja na każdym z etapów może podlegać regulacji, co przekłada się na ilość wytwarzanego w danym etapie produktu, w tym mRNA, miRNA czy białka. Regulacja ekspresji może być zaburzona między innymi poprzez mutacje w genach regulatorowych, zmiany struktury DNA czy nieprawidłowy poziom miRNA, które pełnią funkcję cząsteczek regulatorowych. Ilość produktów kolejnych etapów ekspresji genów może być poddana analizie z wykorzystaniem technik biologii molekularnej i analiz proteomicznych, jak np. qPCR, sekwencjonowanie NGS, mikromacierze ekspresyjne, Northern Blot — dla RNA oraz testy ELISA i Western Blot dla białek. Jedną z najczęściej wykonywanych analiz aktywności miRNA jest ta oparta na technice real-time qPCR (ilościowy PCR w czasie rzeczywistym), dzięki której możemy ocenić ilość danego miRNA i dokonać porównania poziomu ekspresji pomiędzy badanymi grupami [2]. Idealny biomarker powinien mieć wysoką czułość i swoistość, różnicować patologię już na wczesnym etapie, mieć długi czas półtrwania oraz powinien być oznaczany szybkimi i tanimi testami [3]. Odkrycie i zdefiniowanie roli i kierunku zmian wskaźnika w chorobie umożliwia przyporządkowanie mu odpowiedniej funkcji. Z punktu widzenia epileptologa niezwykle ważne są zastosowania:

- jako biomarkera diagnostycznego, który zobiektywizuje i przyspieszy postawienie diagnozy chroniąc pacjenta przed progresją choroby bądź też mylnie postawionym rozpoznaniem,
- jako biomarkera lekooporności, który na wczesnym etapie wskaże pacjentów zagrożonych rozwinięciem lekooporności i ukierunkuje działania lekarza w dalszym postępowaniu terapeutycznym.

Do roli biomarkerów z pewnością kandydują miRNA czyli małe, endogenne, niekodujące RNA, które negatywnie regulując ekspresję genów, regulują zmiany struktury i funkcji komórki, w tym strukturę dendrytów i aksonów, receptorów neuroprzekaźników, transporterów i kanałów jonowych [4, 5] poprzez wyciszenie i degradację docelowego mRNA [6]. Duży potencjał jako przyszłych biomarkerów wiąże się z ich właściwościami, takimi jak specyficzny wzorec tkankowy,

stosunkowo dużą stabilność oraz możliwość przeprowadzenia oznaczeń szeroko dostępną metodą PCR [7]. Ponadto ocena miRNA w próbce krwi jest metodą dostępną, mało inwazyjną, łatwą w przeprowadzeniu i szybką.

Droga miRNA z laboratorium do codziennej praktyki klinicznej z pewnością jest długa, jednak wyniki przeprowadzonych dotychczas badań są obiecujące. Celem pracy była analiza dostępnego piśmiennictwa dotyczącego zmian w profilu ekspresji wybranych miRNA u dzieci z padaczką.

## MATERIAŁY I METODY

Przegląd piśmiennictwa został przeprowadzony w oparciu o wytyczne PRISMA Statement (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses*) [8]. Autorzy przeszukali bazę danych Pubmed w celu zidentyfikowania publikacji dotyczących udziału miRNA w padaczce u dzieci. W procesie wyszukiwania użyto słów kluczowych: „miRNA”, „miRNAs”, „microRNA”, „microRNAs” oraz „epilepsy”. Poszukiwania objęły okres od 1 września 2010 roku do 1 grudnia 2022 roku.

Kryteria włączenia:

- prace oryginalne,
- padaczka jako kluczowy temat pracy,
- badania porównujące ekspresję miRNA metodą PCR.

Kryteria wyłączenia:

- recenzje, opisy przypadków, studia metodologiczne, artykuły redakcyjne, komentarze, listy, hipotezy,
- brak dostępnego streszczenia,
- publikacje w języku innym niż angielski,
- materiał pobrany wyłącznie od pacjentów z rozpoznaniem stwardnienia guzowatego (TSC), glejaka, urazowego uszkodzenia mózgu (TBI), niedokrwienia mózgu,
- objęcie badaniem pacjentów >18 r.ż.

Analiza została przeprowadzona w następujących krokach:

- analiza wybranych artykułów na podstawie tytułów i streszczeń,
- analiza artykułów pełnotekstowych,
- analiza zebranych danych.

Dane z prac spełniających kryteria włączenia zostały wprowadzone do arkusza kalkulacyjnego Excel, który zawierał następujące dane: tytuł manuskryptu, wielkość grupy, wiek, przyjmowane leki, analizowany materiał, liczbę punktów czasowych w których pobierano próbki, rodzaj miRNA. Wyniki przedstawiono w postaci tabel.

## WYNIKI

Ostatecznie do analizy włączono 17 publikacji (tab. I). W każdej pracy uwzględnionej w przeglądzie została przeprowadzona analiza profilu ekspresji miRNA na podstawie reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR).

Tabela I. Ocena ekspresji wybranych miRNA w populacji pediatrycznej z padaczką  
 Table I. Expression of selected miRNAs measured in a group of pediatric patients diagnosed with epilepsy

Bibliografia References	Uczestnicy Participants	Liczba No.	Wiek Age	Liczba LPD AED numbers	Faza Phase	Próbka Samples	miRNA miRNA
Liu Y, 2022 [9]	Padaczka	43	8,56 ± 2,14		1	Surowica	miR-155
	Zdrowy	43	8,45 ± 2,18				
Wang Y, 2022 [10]	Pacjenci lekooporni	13	5,49 ± 3,49	4	1		1318 miRNA
	Pacjenci lekowrażliwi	12	6,17 ± 3,94	1			
	Zdrowi	10	6,98 ± 4,39	0			
	Pacjenci lekooporni	31	6,63 ± 3,97	4	2	Osocze	miR-199a-3p, miR-125b-5p, miR-150-3p, miR-584-5p, miR-199a-5p miR-342a-5p
	Pacjenci lekowrażliwi	34	6,41 ± 3,69	1			
Zdrowi	27	6,60 ± 4,05	0				
Li C, 2021 [11]	TLE	88	9,72 ± 3,27		1	Surowica	miR-199a-3p
	Zdrowi	86	10,06 ± 3,07				
Wu Y, 2021 [12]	TLE	65	9,98 ± 2,58		1	Surowica	miR-29a
	Zdrowi	70	10,07 ± 2,62				
Niu X, 2021 [13]	TLE	59	9,32 ± 3,27		1	Surowica	miR-194-5p
	Zdrowi	63	10,00 ± 3,44				
Yu Y, 2021 [14]	TLE	98	9,64 ± 3,18		1	Surowica	miR-148a-3p
	Zdrowi	72	9,88 ± 3,04				
Fu M, 2020 [15]	Pacjenci lekooporni	16	7,24 ± 3,73		1	Surowica	miR-34c-5p
	Pacjenci lekowrażliwi	8	8,13 ± 3,21				
	Zdrowi	8	9,17 ± 4,20				
Li N, 2020 [16]	TLE	63	9,81 ± 2,79		1	Surowica	miR-15a-5p
	Zdrowi	67	10,13 ± 2,46				
Elnady, H.G. 2019 [17]	Padaczka	30	5–15		1	Osocze	miR-146a mir-106b
	Zdrowi	20	5–15				
Wang, L. 2020 [18]	Pacjenci lekooporni	26			1	Surowica	miR-139-5p
	NDE	35					
	Urazowe uszkodzenie mózgu lub malformacje naczyniowo-mózgowe	20					
Wu X, 2019 [19]	TLE	15	11,2 ± 2,6		1	Hipokamp	miR-135a-5p
	Zdrowi	15	10,6 ± 3,7				
Ren L, 2016 [20]	TLE	25			1	Tkanka nerwowa	miR-181a miR-132 miR-146a miR-34a miR-124
		11					
Li L, 2016 [21]	FCD typ II B	5	50–112 miesięcy		1	Tkanka nerwowa	2578 miRNA
					2		let-7f-1-3p miR-1281 miR-940 miR-1825 miR-6511b-5p miR-6862-5p



Tabela I. (cd.) Ocena ekspresji wybranych miRNA w populacji pediatrycznej z padaczką  
 Table I. (cont.) Expression of selected miRNAs measured in a group of pediatric patients diagnosed with epilepsy

Bibliografia References	Uczestnicy participants	Liczba No.	Wiek Age	Liczba LPD AED numbers	Faza Phase	Próbka samples	miRNA miRNA
Lee, J.Y, 2014 [22]	Dysplazja korowa	8	9		1	Tkanka nerwowa	miR-21, miR-130, miR-155, miR-193b miR-199
	Operacja z powodu zmiany ogniskowej umiejscowionej w strukturach głębokich mózgu	2	7–13				
	Dysplazja korowa	8	7		2		
	Operacja z powodu zmiany ogniskowej umiejscowionej w strukturach głębokich mózgu	3	6				
Ashhab, M.U, 2013 [23]	MTLE	8	8–13	3	1	Tkanka hipokampa	miR-155
	Pacjenci nie obciążeni chorobą neurologiczną	8	6–13	0			
Peng, J, 2013 [24]	MTLE	5	8–12	3	1	Tkanka hipokampa	miR-124 miR-134 miR-132 miR-21
	Pacjenci nie obciążeni chorobą neurologiczną	5	8–12	0			
Omran, A, 2012 [25]	MTLE	5	8–12	3	1	Tkanka hipokampa	miR-146a
	Pacjenci nie obciążeni chorobą neurologiczną	5	8–12	0			

FCD (focal cortical dysplasia) — ogniskowa dysplazja korowa; LPD — leki przeciwdrgawkowe; MTLE (mesial temporal lobe epilepsy) — padaczka z przyśrodkowej części płata skroniowego; NDE (newly diagnosed epilepsy) — nowo zdiagnozowana padaczka; TLE (temporal lobe epilepsy) — padaczka skroniowa

Widoczny jest rosnący trend zainteresowania tematem wykorzystania miRNA w padaczce, większość prac została opublikowana w ciągu ostatnich 5 lat. W badaniach metodą PCR przeanalizowano 26 różnych miRNA, oceniając ich zmieniony profil ekspresji. W nowszych pracach preferowane jest wykorzystywanie próbek krwi jako materiału biologicznego, podczas gdy starsze badania wykorzystywały tkankę nerwową mózgu pobraną śródoperacyjnie od pacjentów z padaczką lekooporną. Trzech niezależnych autorów wykazało wyższą ekspresję miR-155 zarówno w surowicy jak i preparatach tkanki nerwowej w grupie pacjentów z padaczką w porównaniu z grupą kontrolną [9, 22, 23]. Zmiany profilu ekspresji miR-146a oceniono w tkance nerwowej oraz w osoczu, a uzyskane wyniki wykazały zwiększoną ekspresję w grupie chorych na padaczkę w porównaniu do dzieci bez padaczki [17, 20, 25]. Dwukrotnie oceniono profil ekspresji miR-199a-3p, który był znacząco obniżony w surowicy dzieci z TLE w porównaniu z osobami zdrowymi w badaniu Li C. [11]. Wang L. oznaczał ekspresję miR-139-5p w surowicy trzech grup pacjentów, tj. dzieci ze świeżo rozpoznaną padaczką, u których nie stosowano dotychczas leczenia przeciwdrgawkowego, dzieci z padaczką lekooporną oraz dzieci zdrowych. Ekspresja miR-139-5p była niższa w grupie pacjentów z nowo rozpoznaną padaczką w porównaniu

z grupą kontrolną. Wyniki obniżonej ekspresji w grupie pacjentów lekoopornych były również istotne statystycznie w porównaniu z pacjentami nowo zdiagnozowanymi [18]. Również miR-29a, miR-194-5p oraz miR-34c-5p wykazały obniżoną ekspresję w surowicy dzieci z padaczką [12, 13, 15]. Li N. opisał znacząco obniżoną ekspresję miR-15a-5p w surowicy dzieci chorych w porównaniu ze zdrowymi kontrolami, co może wskazywać na potencjalne znaczenie w patogenezie padaczki płata skroniowego. Nie stwierdzono istotnych różnic między dziećmi z padaczką i stwardnieniem hipokampa w porównaniu z dziećmi bez tych nieprawidłowości. Ponadto nie zaobserwowano istotnych różnic między dziećmi z obustronnym TLE w porównaniu z jednostronnym TLE. Zmiana profilu ekspresji nie korelowała z wynikami zapisów badań EEG ani badań rezonansu magnetycznego (MR) [16]. Liu Y. stwierdził, że względna ekspresja korelowała ze stopniem nieprawidłowości w EEG oraz przebiegiem choroby [9]. Zwiększona ekspresja miR-148a-3p w surowicy korelowała z wywiadem obciążonym wystąpieniem drgawek gorączkowych i częstością napadów u dzieci z TLE [14]. Dwa badania obejmowały pacjentów z dysplazją korową Tkankę nerwową mózgu pobrano do dalszych badań podczas operacji neurochirurgicznej. Analizę profilu ekspresji miRNA przeprowadzono za pomocą mikromacierzy.

**Tabela II. miRNA jako potencjalny biomarker padaczki w oparciu o analizę krzywej ROC**  
**Table II. miRNA as a potential biomarker of epilepsy based on the analysis of ROC curve**

Piśmiennictwo References	miRNA miRNA	AUC AUC	Biomarker Biomarker
Liu Y, 2022 [9]	miR-155	0,813	Diagnostyczny
Wang Y, 2022 [10]	miR-584-5p, miR-342-5p, miR-150-3p, miR-125b-5p, miR-199a-3p, miR-199a-5p	0,888	Diagnostyczny
	miR-584-5p, miR-342-5p, miR-199a-3p	0,883	Diagnostyczny
	miR-584-5p, miR-342-5p, miR-150-3p, miR-125b-5p, miR-199a-3p, miR-199a-5p	0,823	Lekooporności
Niu X, 2021 [13]	miR-194-5p	0,896	Diagnostyczny
Yu Y, 2021 [14]	miR-148a-3p	0,928	Diagnostyczny
Li N, 2020 [16]	miR-15a-5p	0,908	Diagnostyczny
Elnady, H.G. 2019 [17]	miR-146a	0,763	Diagnostyczny
	miR-106b	0,885	Diagnostyczny

AUC (area under the curve) — pole pod krzywą

Następnie miRNA, które wykazywały zmienioną ekspresję w grupie pacjentów z padaczką, poddano dalszej weryfikacji za pomocą PCR. Wyniki obu metod były zgodne [21, 22].

Wang Y. ocenił 6 wybranych miRNA zarówno jako potencjalne biomarkery diagnostyczne pozwalające odróżnić pacjentów chorych od zdrowych jak i biomarkery prognostyczne, rozróżniające populację dzieci lekoopornych od lekowrażliwych [10]. Pozostałe miRNA ujęte w tabeli II zostały obiecująco ocenione jako potencjalne biomarkery diagnostyczne (tab. II).

## DYSKUSJA

Istnieje niezaspokojona potrzeba poszukiwania nowych narzędzi diagnostycznych i prognostycznych w grupie pacjentów cierpiących na padaczkę. Potrzeba ta wynika z faktu, iż padaczka jest chorobą niejednorodną, której wspólnym mianownikiem jest predyspozycja do występowania nawracających, nieprovokowanych napadów wynikających z hipersynchronicznych wyładowań neuronów. Różni się etiologią, obrazem klinicznym, odpowiedzią na zastosowane leczenie, rokowaniem [3]. Obiektywne narzędzia badawcze z pewnością przyczyniłyby się do poprawy diagnostyki różnicowej. Duża zmienność obrazu klinicznego jak i odpowiedzi na zastosowane leczenie stanowi trudność w prowadzeniu terapii. U 3 na 10 pacjentów nie obserwujemy sukcesu terapeutycznego pod postacią braku napadów pomimo stosowania dwóch dobrze tolerowanych i odpo-

wiednio dobranych leków przeciwdrgawkowych (LPD) w odpowiednich dawkach, co nazywamy lekoopornością [26]. Dysponujemy około 30 LPD jednak wskaźnik lekooporności jest wciąż porównywalny. Należy zwrócić uwagę, że proponowane leczenie możemy zakwalifikować jako „objawowe” a nie „przyczynowe”. Prowadząc farmakoterapię dostępnymi lekami dąży się do zminimalizowania częstości napadów przy jak najmniejszych skutkach ubocznych. Obserwujemy dużą zmienność wrażliwości na zastosowane leki nawet u pacjentów z tą samą diagnozą zespołu padaczkowego. Wdrażanie kolejnych opcji terapeutycznych wiąże się z niższym odsetkiem powodzenia [27].

miRNA — to małe niekodujące RNA o długości 18–25 nukleotydów które negatywnie regulują ekspresję genów na poziomie posttranskrypcyjnym działając przez hamowanie translacji białek lub degradację mRNA. miRNA zostały oznaczone po raz pierwszy w 1993 roku jednak za przełomowy należy uznać rok 2008 kiedy to Chen i wsp. po raz pierwszy systematycznie scharakteryzowali obecność miRNA w surowicy, w przedstawionej publikacji udowodnili, że miRNA są obecne we krwi ludzi i zwierząt oraz że badane poziomy w surowicy są stabilne, odtwarzalne i spójne między osobnikami tego samego gatunku [28]. W 2011 roku Hu wraz ze wsp. wykazali prawdopodobną korelację między zróżnicowaną ekspresją miRNA badaną w materiale tkanek hipokampa i krwi obwodowej w szczurzym modelu stanu padaczkowego [29]. Pierwsza praca w której wykorzysta-

no surowicę jako materiał biologiczny do oceny ekspresji miRNA u pacjentów z padaczką opublikowano dopiero w 2015 roku [30].

Początkowo do badań nad miRNA wykorzystywano tkanki mózgowia pobrane od pacjentów w trakcie operacji neurochirurgicznej z powodu lekoopornej padaczki, tak skonstruowane badanie utrudniało ocenę porównawczą ze zdrową grupą kontrolną. Do grupy kontrolnej włączano więc pacjentów którzy przebyli operację neurochirurgiczną z innych przyczyn, np. urazu lub krwawienia lub też tkanki mózgowia pobierane były w czasie autopsji. Interesujące w tym kontekście jest badanie przeprowadzone przez Roncon i wsp., w którym porównano ekspresję miRNA w tkance nerwowej mózgu pacjentów z padaczką pobranych śródoperacyjnie oraz w tkankach pobranych w trakcie sekcji zwłok od osób chorujących i nie chorujących na padaczkę. Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała, że próbki pobrane w trakcie sekcji zwłok były segregowane wspólnie, taki wynik nawet przy niewielkiej grupie badanej wskazuje, że pochodzenie próbki może mieć większe znaczenie niż choroba podstawowa [31]. Z kolei opierając się na innym badaniu z wykorzystaniem mysiego modelu padaczki, w którym badacze celowo opóźniali autopsję nie stwierdzono istotnych różnic w poziomach miRNA mierzonych natychmiast oraz po 4h i po 8h po śmierci [32]. Dodatkowym utrudnieniem z wykorzystaniem tkanki nerwowej mózgu jako materiału do badań ekspresji miRNA jest również brak dostępności materiału tkankowego na wczesnym etapie choroby.

miRNA znajdują się nie tylko wewnątrz komórek ale także w środowisku zewnątrzkomórkowym gdzie zostają uwolnione w sposób aktywny lub w wyniku śmierci komórki. Zwykle znajdują się w mikropęcherzykach, egzosomach, ciałach apoptotycznych lub są związane z lipoproteinami o dużej gęstości lub białkami Ago [33]. miRNA mogą być oznaczane we krwi [28, 34], moczu [35], płynie mózgowo-rdzeniowym [36], ślinie [34] a nawet łzach [35] ponieważ są stabilne w szerokim zakresie temperatury i pH a analiza może być przeprowadzona z opóźnieniem gdyż nie są wrażliwe na powtarzające się cykle zamrażania i rozmrażania [36, 37]. Niektóre miRNA powszechnie występują w większości dostępnych płynów ustrojowych, jednak część miRNA jest obecna tylko w konkretnych biopłynach [35]. Płyn mózgowo-rdzeniowy pomimo bezpośredniego kontaktu z tkanką nerwową nie jest popularnym materiałem do badań nad zmianami ekspresji miRNA w padaczce. Jednym z ograniczeń jego wykorzystania jest fakt inwazyjności metody jego pobrania, niemożność wykonywania seryjnych oznaczeń oraz niższe poziomy krążących miRNA na mikrolitr PMR w porównaniu z tą samą objętością osocza [38, 39]. W badaniu Webera i wsp. oznaczono miRNA w 12 płynach ustrojowych, najmniejsze ich stężenie stwierdzono w płynie mózgowo-

-rdzeniowy, moczu i płynie opłucnowym [35]. Wykorzystanie w analizie ekspresji miRNA próbek krwi zwiększyło dostępność materiału badawczego i pozwoliło na poszerzenie badań z udziałem dzieci oraz porównanie wyników pacjentów z padaczką ze zdrowymi kontrolami [40].

Pojedyncze miRNA celuje w około 200mRNA, tworząc ogromną sieć wzajemnych oddziaływań [41]. Utrata lub wzmocnienie funkcji konkretnych miRNA może zmodyfikować ekspresję setek białek a w konsekwencji wiele patofizjologicznych fenotypów jednocześnie, bez względu na etiologię padaczki [42, 43]. Obniżona ekspresja specyficznego miRNA zwiększa ekspresję powiązanego z nim białka, natomiast zwiększone poziomy miRNA będą działać hamująco na ekspresję tego białka [4]. Mechanizm działania polega na stosunkowo łagodnej redukcji poziomu komórkowego docelowego mRNA co skutkuje zmniejszeniem stężenia białka około 2–4-krotnie, możliwe jest również całkowite wyłączenie [44]. Zmiany ekspresji mogą więc doprowadzić do dysfunkcji na poziomie pojedynczej komórki, tkanki lub nawet całego mózgu [4].

Zidentyfikowano już około 2600 genów miRNA u ludzi [45], jednak wg danych szacunkowych tylko 15% jest specyficznych tkankowo, pozostały odsetek jest wykrywany niemal we wszystkich tkankach, ponadto 70% miRNA ulega ekspresji w tkankach mózgowia [46]. Biorąc pod uwagę ogromną ilość poznanych miRNA oraz różnorodność mRNA, można uznać, że miRNA regulują niemal wszystkie procesy metaboliczne komórki [44]. Stanowią więc potencjalny biomarker diagnostyczny, prognostyczny jak również cel terapeutyczny zwłaszcza w padaczkach o złożonej patofizjologii leżącej u ich podstawy [47].

Poszczególne typy komórek — neurony, oligodendrocyty, astrocyty czy mikroglej — posiadają własne charakterystyczne profile miRNA [48, 49]. Na każdy neuron przypada 1000–10000 kopii miRNA [50, 51]. Dostępne są liczne publikacje naukowe wskazujące na zmiany w ekspresji poszczególnych miRNA związane bezpośrednio z napadem padaczkowym, jak również epileptogenezą [4, 40, 52–54].

Autorzy wskazują na udział miRNA w procesach modyfikacji mikrostruktury neuronów, glejocy, śmierci neuronów, funkcji kanałów jonowych, stanach zapalnych i innych [55]. Procesy te ostatecznie mogą prowadzić do nadpobudliwości sieci neuronów i rozwoju padaczki. U podstaw molekularnego i komórkowego udziału w epileptogenezie leżą zmiany w ekspresji genów i regulacji ich ekspresji. W zmianach tych pośredniczą czynniki transkrypcyjne o szerokim spektrum działania [56, 57], mechanizmy epigenetyczne, takie jak metylacja DNA i modyfikacje histonów [58–61] oraz regulacja potranskrypcyjna z wykorzystaniem miRNA [62].

Poznanie funkcji pełnionych przez specyficzne miRNA oraz ich zaangażowania w proces epileptogenezy warunkuje dalsze badania dążące do normalizacji zaburzonej ekspre-

sji z wykorzystaniem molekularnych narzędzi podobnych do leków takich jak inhibitory antysensowne (antagoniści) oraz cząsteczki wzmacniające miRNA (mimetyki) [4].

Zwiększona ekspresja miR-146a w grupie pacjentów chorujących na padaczkę została wielokrotnie opisana oraz powiązana z aktywnym procesem zapalnym [30, 63–66]. Wzrost ekspresji miR-146a jest wynikiem wpływu silnych mediatorów prozapalnych, takich jak interleukina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) oraz czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) [67, 68]. Wykorzystanie syntetycznych mimetyków miR-146a w mysim modelu padaczkowym zmniejszyło częstość i nasilenie kolejnych napadów. Mechanizm przeciwdrgawkowy powiązano z supresją szlaku IL-1 $\beta$ -Toll-like receptor 4 [69]. Ekspresja miR-155 jest zwiększona w odpowiedzi na bodźce zapalne [70], hamowanie ekspresji miR-155 ma prawdopodobnie potencjał przeciwpadaczkowy poprzez ograniczanie zapalenia układu nerwowego i łagodzenie napadów [71, 72]. miR-132 kontroluje procesy związane z zapaleniem układu nerwowego oraz śmiercią komórek [73, 74]. Zwiększoną ekspresję miR-184 obserwowano w tkance hipokampa po epizodach napadowych. Eksperymentalne wyciszenie miR-184 znacząco nasilało śmierć neuronów wywołaną napadami padaczkowymi w dwóch zwierzęcych modelach stanu padaczkowego [75]. Wzrost ekspresji miR-181a obserwowano w przebiegu apoptozy neuronów po epizodach napadowych, rolę miR-181a powiązano z hamowaniem ekspresji białka kaspazy-3, natomiast wyciszenie miR-181a miało znaczenie neuroprotektynne i wiązało się ze wzrostem aktywacji białka kaspazy-3 [20].

Opisanie różnorodnych powiązań wybranych miRNA oraz mechanizmu ich działania w procesie epileptogenezy wykracza poza zakres tego przeglądu niemniej jednak uwzględnienie w niniejszym dokumencie kilku podstawowych faktów może zilustrować znaczenie miRNA dla funkcjonowania mózgu i padaczki.

Korzystając z coraz nowszych narzędzi bioinformatycznych, możliwe jest przewidywanie potencjalnych celów jak również szlaków molekularnych i komórkowych zaangażowanych w epileptogenezę. Dane analizujące możliwe cele miRNA zostały zgromadzone w ogólnodostępnych bazach takich jak TargetScan, EpiRNA, DIANA miRNA, miR-TarBase, microrna.org.

Aby móc w przyszłości wykorzystać miRNA jako biomarker padaczki potrzebujemy wiarygodnych wyników badań pozyskanych z dobrze zaplanowanych i przeprowadzonych z należytą starannością badań. Narzędziem umożliwiającym zobiektywizowanie pomiarów badań poprzez ocenę jakości modelu prognozującego a następnie możliwość ich porównania między niezależnymi badaczami jest krzywa ROC. Metoda ta ocenia poprawność klasyfikatora poprzez jednoczesny opis jego czułości i swoistości. AUC jest podstawowym wskaźnikiem oceniającym jakość klasyfikacji, jego

zakres wynosi 0–1, przy czym 1 odnosi się do klasyfikatora idealnego, 0,5 oznacza klasyfikator losowy a każdy mniejszy wynik klasyfikator nieprawidłowy [76]. Autorzy uznali badania z wykorzystaniem krzywej ROC jako metody weryfikującej znaczenie miRNA jako potencjalnych biomarkerów padaczki za najbardziej rzetelne i wartościowe.

Duża heterogenność projektów badawczych utrudnia porównanie wyników pomiędzy różnymi badaniami a tymi samymi typowanymi miRNA istotnymi dla padaczki. Aby zapewnić wiarygodną identyfikację nowych krążących biomarkerów miRNA do celów diagnozowania lub prognozowania choroby, badania powinny obejmować fazę badawczą i co najmniej jedną fazę walidacji [77]. Na etapie badawczym kandydaci na potencjalne biomarkery są identyfikowani z wykorzystaniem metod wysokoprzepustowych w niewielkiej grupie pacjentów. Najczęściej wykorzystywane metody to mikromacierze oraz metoda sekwencjonowania RNA [78]. Metoda mikromacierzy oparta jest na hybrydyzacji, umożliwia analizę tysięcy miRNA w jednym teście, jednak niższa cena badania wiąże się zazwyczaj z niższą specyficznością [79]. Metoda miRNA-seq jest metodą ilościowej oceny miRNA opartą na wykorzystaniu NGS lub masowo równoległego wysokoprzepustowego sekwencjonowania, atutem metody odróżniającą ją od poprzedniej jest możliwość wykrycia nowych jak i już znanych miRNA, wadą natomiast stosunkowo duża ilość potrzebnego materiału do analizy, wysoka cena oraz konieczność solidnego przygotowania biblioteki, aby uniknąć stronicznych danych [80]. Wyselekcjonowane w I etapie miRNA o obiecującym profilu ekspresji zostaną ocenione w fazie walidacyjnej. II faza badania przeprowadzana jest na większej grupie badanych. Metodą najczęściej wykorzystywaną jest qPCR [81]. Wciąż nie wypracowano konsensusu dotyczącego optymalnego projektu, analizy i interpretacji eksperymentu qPCR. Zastosowanie rozbieżnych metod analizy w rezultacie doprowadza do uzyskania sprzecznych wyników [82]. Powtarzalność wyników podobnych badań qPCR jest w znacznym stopniu uzależniona od oceny jakości RNA, wyboru startera do reakcji RT, rodzaju sondy fluorescencyjnej i metody analizy danych [83]. Dane te nie zawsze w sposób dostateczny opisane są w publikacji.

Jak zaprezentowano w tabeli I dwufazowy projekt badawczy zrealizowano jedynie w 3 przypadkach, 2 z nich wykorzystwały próbki tkanki nerwowej mózgu co uniemożliwia porównanie uzyskanych danych ze zdrowymi osobami, w pierwszym etapie wykorzystano metodę mikromacierzy. W 1 przypadku jako metodę badawczą wykorzystano miRNA-seq a do analizy posłużyły próbki osocza. W oparciu o analizę krzywej ROC 6 prac określiło potencjał wybranych miRNA jako biomarkerów padaczki (tab. II).

Kolejny istotny aspekt to potencjalny wpływ stosowanych leków przeciwdrgawkowych na zmiany ekspresji miRNA, aby uwiarygodnić otrzymane wyniki rozsądnym

wydaje się włączenie do badania grupy pacjentów nie przyjmujących leków i ocenę porównawczą z grupą pacjentów lekoopornych i lekowrażliwych.

Reasumując, zidentyfikowaliśmy jedynie 1 badanie w populacji dziecięcej spełniające powyższe kryteria. Badanie Wang Y. i wsp. opiera się na dwuetapowej analizie z wykorzystaniem miRNA-seq a następnie RT-PCR. Ponadto rzetelnie zweryfikowano listę i rodzaj przyjmowanych przez dzieci leków przeciwdrgawkowych [10].

## WNIOSKI

Rosnąca liczba publikacji dotyczących zmian ekspresji miRNA w padaczce dostarcza dowodów na potencjał wykorzystania ich jako przyszłych biomarkerów diagnostycznych i prognostycznych. Wyniki tych doniesień wymagają jednak weryfikacji w niezależnych kohortach, również pediatrycznych według wypracowanych i powtarzalnych standardów prowadzonych badań.

## PIŚMIMENNICTWO

- Nickels KC, Wong-Kissel LC, Moseley BD, et al. Temporal lobe epilepsy in children. *Epilepsy Res Treat.* 2012; 2012: 849540, doi: [10.1155/2012/849540](https://doi.org/10.1155/2012/849540), indexed in Pubmed: [22957247](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22957247/).
- Tyburcki J, Studzinska A, Daca P, et al. PCR w czasie rzeczywistym. Metody analizy danych Biotechnologia. 2008; 1: 86–96.
- Chen M, Zhao QY, Edson J, et al. Genome-wide microRNA profiling in brain and blood samples in a mouse model of epileptogenesis. *Epilepsy Res.* 2020; 166: 106400, doi: [10.1016/j.eplepsyres.2020.106400](https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2020.106400), indexed in Pubmed: [32590288](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32590288/).
- Brennan GP, Henshall DC. MicroRNAs as regulators of brain function and targets for treatment of epilepsy. *Nat Rev Neurol.* 2020; 16(9): 506–519, doi: [10.1038/s41582-020-0369-8](https://doi.org/10.1038/s41582-020-0369-8), indexed in Pubmed: [32546757](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32546757/).
- Baloun J, Bencurova P, Totkova T, et al. Epilepsy miRNA Profile Depends on the Age of Onset in Humans and Rats. *Front Neurosci.* 2020; 14: 924, doi: [10.3389/fnins.2020.00924](https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00924), indexed in Pubmed: [33041753](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33041753/).
- Kumar P. miRNA dysregulation in traumatic brain injury and epilepsy: a systematic review to identify putative biomarkers for post-traumatic epilepsy. *Metab Brain Dis.* 2023; 38(3): 749–765, doi: [10.1007/s11011-023-01172-z](https://doi.org/10.1007/s11011-023-01172-z), indexed in Pubmed: [36715879](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36715879/).
- Brindley E, Hill TDM, Henshall DC. MicroRNAs as biomarkers and treatment targets in status epilepticus. *Epilepsy Behav.* 2019; 101(Pt B): 106272, doi: [10.1016/j.yebeh.2019.04.025](https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.04.025), indexed in Pubmed: [31171435](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31171435/).
- Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health-care interventions: explanation and elaboration. *BMJ.* 2009; 339: b2700, doi: [10.1136/bmj.b2700](https://doi.org/10.1136/bmj.b2700), indexed in Pubmed: [19622552](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19622552/).
- Liu Ya, Yu G, Ding YY, et al. Expression of miR-155 in Serum Exosomes in Children with Epilepsy and Its Diagnostic Value. *Dis Markers.* 2022; 2022: 7979500, doi: [10.1155/2022/7979500](https://doi.org/10.1155/2022/7979500), indexed in Pubmed: [35928925](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35928925/).
- Wang Y, Wang Y, Chen Yi, et al. Circulating MicroRNAs From Plasma Small Extracellular Vesicles as Potential Diagnostic Biomarkers in Pediatric Epilepsy and Drug-Resistant Epilepsy. *Front Mol Neurosci.* 2022; 15: 823802, doi: [10.3389/fnmol.2022.823802](https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.823802), indexed in Pubmed: [35221916](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35221916/).
- Li C, Zheng X, Liu P, et al. Clinical value of lncRNA TUG1 in temporal lobe epilepsy and its role in the proliferation of hippocampus neuron via sponging miR-199a-3p. *Bioengineered.* 2021; 12(2): 10666–10673, doi: [10.1080/21655979.2021.2001904](https://doi.org/10.1080/21655979.2021.2001904), indexed in Pubmed: [34787069](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34787069/).
- Wu Y, Zhang Y, Zhu S, et al. MiRNA-29a serves as a promising diagnostic biomarker in children with temporal lobe epilepsy and regulates seizure-induced cell death and inflammation in hippocampal neurons. *Epileptic Disord.* 2021; 23(6): 823–832, doi: [10.1684/epd.2021.1331](https://doi.org/10.1684/epd.2021.1331), indexed in Pubmed: [34609285](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34609285/).
- Niu X, Zhu HL, Liu Q, et al. MiR-194-5p serves as a potential biomarker and regulates the proliferation and apoptosis of hippocampus neuron in children with temporal lobe epilepsy. *J Chin Med Assoc.* 2021; 84(5): 510–516, doi: [10.1097/JCMA.0000000000000518](https://doi.org/10.1097/JCMA.0000000000000518), indexed in Pubmed: [33742994](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33742994/).
- Yu Y, Du L, Zhang J. Febrile Seizure-Related miR-148a-3p Exerts Neuroprotection by Promoting the Proliferation of Hippocampal Neurons in Children with Temporal Lobe Epilepsy. *Dev Neurosci.* 2021; 43(5): 312–320, doi: [10.1159/000518352](https://doi.org/10.1159/000518352), indexed in Pubmed: [34348296](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34348296/).
- Fu M, Tao J, Wang D, et al. Downregulation of MicroRNA-34c-5p facilitated neuroinflammation in drug-resistant epilepsy. *Brain Res.* 2020; 1749: 147130, doi: [10.1016/j.brainres.2020.147130](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.147130), indexed in Pubmed: [32950487](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32950487/).
- Li Na, Pan J, Liu W, et al. MicroRNA-15a-5p serves as a potential biomarker and regulates the viability and apoptosis of hippocampus neuron in children with temporal lobe epilepsy. *Diagn Pathol.* 2020; 15(1): 46, doi: [10.1186/s13000-020-00944-w](https://doi.org/10.1186/s13000-020-00944-w), indexed in Pubmed: [32384924](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32384924/).
- Elnady HG, Abdelmoneam N, Eissa E, et al. MicroRNAs as Potential Biomarkers for Childhood Epilepsy. *Open Access Maced J Med Sci.* 2019; 7(23): 3965–3969, doi: [10.3889/oamjms.2019.634](https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.634), indexed in Pubmed: [32165937](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32165937/).
- Wang Li, Song L, Chen X, et al. microRNA-139-5p confers sensitivity to antiepileptic drugs in refractory epilepsy by inhibition of MRP1. *CNS Neurosci Ther.* 2020; 26(4): 465–474, doi: [10.1111/cns.13268](https://doi.org/10.1111/cns.13268), indexed in Pubmed: [31750616](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31750616/).
- Wu X, Wang Y, Sun Z, et al. Molecular expression and functional analysis of genes in children with temporal lobe epilepsy. *J Integr Neurosci.* 2019; 18(1): 71–77, doi: [10.31083/j.jin.2019.01.13](https://doi.org/10.31083/j.jin.2019.01.13), indexed in Pubmed: [31091851](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31091851/).
- Ren L, Zhu R, Li X. Silencing miR-181a produces neuroprotection against hippocampus neuron cell apoptosis post-status epilepticus in a rat model and in children with temporal lobe epilepsy. *Genet Mol Res.* 2016; 15(1), doi: [10.4238/gmr.15017798](https://doi.org/10.4238/gmr.15017798), indexed in Pubmed: [26910006](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26910006/).
- Li L, Liu CQ, Li TF, et al. Analysis of Altered Micro RNA Expression Profiles in Focal Cortical Dysplasia IIB. *J Child Neurol.* 2016; 31(5): 613–620, doi: [10.1177/0883073815609148](https://doi.org/10.1177/0883073815609148), indexed in Pubmed: [26442942](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26442942/).
- Lee JiY, Park AK, Lee ES, et al. miRNA expression analysis in cortical dysplasia: regulation of mTOR and LIS1 pathway. *Epilepsy Res.* 2014; 108(3): 433–441, doi: [10.1016/j.eplepsyres.2014.01.005](https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2014.01.005), indexed in Pubmed: [24560344](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24560344/).
- Ashhab MU, Omran A, Kong H, et al. Expressions of tumor necrosis factor alpha and microRNA-155 in immature rat model of status epilepticus and children with mesial temporal lobe epilepsy. *J Mol Neurosci.* 2013; 51(3): 950–958, doi: [10.1007/s12031-013-0013-9](https://doi.org/10.1007/s12031-013-0013-9), indexed in Pubmed: [23636891](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23636891/).
- Peng J, Omran A, Ashhab MU, et al. Expression patterns of miR-124, miR-134, miR-132, and miR-21 in an immature rat model and children with mesial temporal lobe epilepsy. *J Mol Neurosci.* 2013; 50(2): 291–297, doi: [10.1007/s12031-013-9953-3](https://doi.org/10.1007/s12031-013-9953-3), indexed in Pubmed: [23315173](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23315173/).
- Omran A, Peng J, Zhang C, et al. Interleukin-1β and microRNA-146a in an immature rat model and children with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 2012; 53(7): 1215–1224, doi: [10.1111/j.1528-1167.2012.03540.x](https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03540.x), indexed in Pubmed: [22708826](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22708826/).
- Kwan P, Brodie MJ. Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med.* 2000; 342(5): 314–319, doi: [10.1056/NEJM200002033420503](https://doi.org/10.1056/NEJM200002033420503), indexed in Pubmed: [10660394](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10660394/).
- Bauer S, Schütz V, Strzelczyk A, et al. Is there a role for microRNAs in epilepsy diagnostics? *Expert Rev Mol Diagn.* 2020; 20(7): 693–701, doi: [10.1080/14737159.2020.1745065](https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1745065), indexed in Pubmed: [32188279](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32188279/).
- Chen Xi, Ba Yi, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 2008; 18(10): 997–1006, doi: [10.1038/cr.2008.282](https://doi.org/10.1038/cr.2008.282), indexed in Pubmed: [18766170](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18766170/).
- Hu K, Zhang C, Long L, et al. Expression profile of microRNAs in rat hippocampus following lithium-pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurosci Lett.* 2011; 488(3): 252–257, doi: [10.1016/j.neulet.2010.11.040](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.11.040), indexed in Pubmed: [21094214](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21094214/).
- Wang J, Yu JT, Tan L, et al. Genome-wide circulating microRNA expression profiling indicates biomarkers for epilepsy. *Sci Rep.* 2015; 5: 9522, doi: [10.1038/srep09522](https://doi.org/10.1038/srep09522), indexed in Pubmed: [25825351](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25825351/).
- Roncon P, Zucchini S, Ferracin M, et al. Is autopsy tissue a valid control for epilepsy surgery tissue in microRNA studies? *Epilepsia Open.* 2016; 2(1): 90–95, doi: [10.1002/epi4.12023](https://doi.org/10.1002/epi4.12023), indexed in Pubmed: [29750217](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29750217/).
- McKiernan RC, Jimenez-Mateos EM, Bray I, et al. Reduced mature microRNA levels in association with dicer loss in human temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *PLoS One.* 2012; 7(5): e35921, doi: [10.1371/journal.pone.0035921](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035921), indexed in Pubmed: [22615744](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22615744/).



33. Sohel M. Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges. *Achievements in the Life Sciences*. 2016; 10(2): 175–186, doi: [10.1016/j.als.2016.11.007](https://doi.org/10.1016/j.als.2016.11.007).
34. Gallo A, Tandon M, Alevizos I, et al. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS One*. 2012; 7(3): e30679, doi: [10.1371/journal.pone.0030679](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030679), indexed in Pubmed: 22427800.
35. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. 2010; 56(11): 1733–1741, doi: [10.1373/clinchem.2010.147405](https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405), indexed in Pubmed: 20847327.
36. Cogswell JP, Ward J, Taylor IA, et al. Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. *J Alzheimers Dis*. 2008; 14(1): 27–41, doi: [10.3233/jad-2008-14103](https://doi.org/10.3233/jad-2008-14103), indexed in Pubmed: 18525125.
37. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(30): 10513–10518, doi: [10.1073/pnas.0804549105](https://doi.org/10.1073/pnas.0804549105), indexed in Pubmed: 18663219.
38. Raouf R, Jimenez-Mateos EM, Bauer S, et al. Cerebrospinal fluid microRNAs are potential biomarkers of temporal lobe epilepsy and status epilepticus. *Sci Rep*. 2017; 7(1): 3328, doi: [10.1038/s41598-017-02969-6](https://doi.org/10.1038/s41598-017-02969-6), indexed in Pubmed: 28607431.
39. Raouf R, Bauer S, El Naggar H, et al. Dual-center, dual-platform microRNA profiling identifies potential plasma biomarkers of adult temporal lobe epilepsy. *EBioMedicine*. 2018; 38: 127–141, doi: [10.1016/j.ebiom.2018.10.068](https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.10.068), indexed in Pubmed: 30396857.
40. Brennan G, Bauer S, Engel T, et al. Genome-wide microRNA profiling of plasma from three different animal models identifies biomarkers of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis*. 2020; 144: 105048, doi: [10.1016/j.nbd.2020.105048](https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105048), indexed in Pubmed: 32800995.
41. Ebert MS, Sharp PA. Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell*. 2012; 149(3): 515–524, doi: [10.1016/j.cell.2012.04.005](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.005), indexed in Pubmed: 22541426.
42. Schmiedel JM, Klemm SL, Zheng Y, et al. Gene expression. MicroRNA control of protein expression noise. *Science*. 2015; 348(6230): 128–132, doi: [10.1126/science.aaa1738](https://doi.org/10.1126/science.aaa1738), indexed in Pubmed: 25838385.
43. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell*. 2018; 173(1): 20–51, doi: [10.1016/j.cell.2018.03.006](https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006), indexed in Pubmed: 29570994.
44. Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, et al. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*. 2008; 455(7209): 58–63, doi: [10.1038/nature07228](https://doi.org/10.1038/nature07228), indexed in Pubmed: 18668040.
45. Vinchure OS, Kulshreshtha R. miR-490: A potential biomarker and therapeutic target in cancer and other diseases. *J Cell Physiol*. 2021; 236(5): 3178–3193, doi: [10.1002/jcp.30119](https://doi.org/10.1002/jcp.30119), indexed in Pubmed: 33094503.
46. Ludwig N, Leidinger P, Becker K, et al. Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44(8): 3865–3877, doi: [10.1093/nar/gkw116](https://doi.org/10.1093/nar/gkw116), indexed in Pubmed: 26921406.
47. Martinez B, Peplow PV. MicroRNAs as potential biomarkers in temporal lobe epilepsy and mesial temporal lobe epilepsy. *Neural Regen Res*. 2023; 18(4): 716–726, doi: [10.4103/1673-5374.354510](https://doi.org/10.4103/1673-5374.354510), indexed in Pubmed: 36204827.
48. McCall MN, Kim MS, Adil M, et al. Toward the human cellular microRNA-ome. *Genome Res*. 2017; 27(10): 1769–1781, doi: [10.1101/gr.222067.117](https://doi.org/10.1101/gr.222067.117), indexed in Pubmed: 28877962.
49. Nowakowski TJ, Rani N, Golkaram M, et al. Regulation of cell-type-specific transcriptomes by microRNA networks during human brain development. *Nat Neurosci*. 2018; 21(12): 1784–1792, doi: [10.1038/s41593-018-0265-3](https://doi.org/10.1038/s41593-018-0265-3), indexed in Pubmed: 30455455.
50. Kye MJ, Liu T, Levy SF, et al. Somatodendritic microRNAs identified by laser capture and multiplex RT-PCR. *RNA*. 2007; 13(8): 1224–1234, doi: [10.1261/rna.480407](https://doi.org/10.1261/rna.480407), indexed in Pubmed: 17592044.
51. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2005; 33(20): e179, doi: [10.1093/nar/gni178](https://doi.org/10.1093/nar/gni178), indexed in Pubmed: 16314309.
52. Srivastava A, Dixit AB, Banerjee J, et al. Role of inflammation and its miRNA based regulation in epilepsy: Implications for therapy. *Clin Chim Acta*. 2016; 452: 1–9, doi: [10.1016/j.cca.2015.10.023](https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.10.023), indexed in Pubmed: 26506013.
53. Bielefeld P, Mooney C, Henshall DC, et al. miRNA-Mediated Regulation of Adult Hippocampal Neurogenesis; Implications for Epilepsy. *Brain Plast*. 2017; 3(1): 43–59, doi: [10.3233/BPL-160036](https://doi.org/10.3233/BPL-160036), indexed in Pubmed: 29765859.
54. Ma Y. The Challenge of microRNA as a Biomarker of Epilepsy. *Curr Neuropharmacol*. 2018; 16(1): 37–42, doi: [10.2174/1570159X15666170703102410](https://doi.org/10.2174/1570159X15666170703102410), indexed in Pubmed: 28676013.
55. Cattani AA, Allene C, Seifert V, et al. Involvement of microRNAs in epileptogenesis. *Epilepsia*. 2016; 57(7): 1015–1026, doi: [10.1111/epi.13404](https://doi.org/10.1111/epi.13404), indexed in Pubmed: 27207608.
56. McClelland S, Flynn C, Dubé C, et al. Neuron-restrictive silencer factor-mediated hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channelopathy in experimental temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol*. 2011; 70(3): 454–464, doi: [10.1002/ana.22479](https://doi.org/10.1002/ana.22479), indexed in Pubmed: 21905079.
57. Hu Y, Lund IV, Gravielle MC, et al. Surface expression of GABAA receptors is transcriptionally controlled by the interplay of cAMP-response element-binding protein and its binding partner inducible cAMP early repressor. *J Biol Chem*. 2008; 283(14): 9328–9340, doi: [10.1074/jbc.M705110200](https://doi.org/10.1074/jbc.M705110200), indexed in Pubmed: 18180303.
58. Brennan GP, Dey D, Chen Y, et al. Dual and Opposing Roles of MicroRNA-124 in Epilepsy Are Mediated through Inflammatory and NRSF-Dependent Gene Networks. *Cell Rep*. 2016; 14(10): 2402–2412, doi: [10.1016/j.celrep.2016.02.042](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.042), indexed in Pubmed: 26947066.
59. McClelland S, Brennan GP, Dubé C, et al. The transcription factor NRSF contributes to epileptogenesis by selective repression of a subset of target genes. *Elife*. 2014; 3: e01267, doi: [10.7554/eLife.01267](https://doi.org/10.7554/eLife.01267), indexed in Pubmed: 25117540.
60. Hauser RM, Henshall DC, Lubin FD. The Epigenetics of Epilepsy and Its Progression. *Neuroscientist*. 2018; 24(2): 186–200, doi: [10.1177/1073858417705840](https://doi.org/10.1177/1073858417705840), indexed in Pubmed: 28468530.
61. Kobow K, Ziemann M, Kaipananickal H, et al. Genomic DNA methylation distinguishes subtypes of human focal cortical dysplasia. *Epilepsia*. 2019; 60(6): 1091–1103, doi: [10.1111/epi.14934](https://doi.org/10.1111/epi.14934), indexed in Pubmed: 31074842.
62. Henshall DC, Hamer HM, Pasterkamp RJ, et al. MicroRNAs in epilepsy: pathophysiology and clinical utility. *Lancet Neurol*. 2016; 15(13): 1368–1376, doi: [10.1016/S1474-4422\(16\)30246-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30246-0), indexed in Pubmed: 27839653.
63. Leontariti M, Avgeris M, Katsarou MS, et al. Circulating miR-146a and miR-134 in predicting drug-resistant epilepsy in patients with focal impaired awareness seizures. *Epilepsia*. 2020; 61(5): 959–970, doi: [10.1111/epi.16502](https://doi.org/10.1111/epi.16502), indexed in Pubmed: 32314378.
64. Aronica E, Fluiter K, Iyer A, et al. Expression pattern of miR-146a, an inflammation-associated microRNA, in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci*. 2010; 31(6): 1100–1107, doi: [10.1111/j.1460-9568.2010.07122.x](https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07122.x), indexed in Pubmed: 20214679.
65. Omran A, Peng J, Zhang C, et al. Interleukin-1 $\beta$  and microRNA-146a in an immature rat model and children with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 2012; 53(7): 1215–1224, doi: [10.1111/j.1528-1167.2012.03540.x](https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03540.x), indexed in Pubmed: 22708826.
66. An N, Zhao W, Liu Y, et al. Elevated serum miR-106b and miR-146a in patients with focal and generalized epilepsy. *Epilepsy Res*. 2016; 127: 311–316, doi: [10.1016/j.eplepsyres.2016.09.019](https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2016.09.019), indexed in Pubmed: 27694013.
67. Sheedy FJ, O'Neill LAJ. Adding fuel to fire: microRNAs as a new class of mediators of inflammation. *Ann Rheum Dis*. 2008; 67 Suppl 3: iii50–iii55, doi: [10.1136/ard.2008.100289](https://doi.org/10.1136/ard.2008.100289), indexed in Pubmed: 19022814.
68. Gaudet AD, Fonken LK, Watkins LR, et al. MicroRNAs: Roles in Regulating Neuroinflammation. *Neuroscientist*. 2018; 24(3): 221–245, doi: [10.1177/1073858417721150](https://doi.org/10.1177/1073858417721150), indexed in Pubmed: 28737113.
69. Iori V, Iyer A, Ravizza T, et al. Blockade of the IL-1R1/TLR4 pathway mediates disease-modification therapeutic effects in a model of acquired epilepsy. *Neurobiol Dis*. 2017; 99: 12–23, doi: [10.1016/j.nbd.2016.12.007](https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.12.007), indexed in Pubmed: 27939857.
70. Huang LG, Zou J, Lu QC. Silencing rno-miR-155-5p in rat temporal lobe epilepsy model reduces pathophysiological features and cell apoptosis by activating Sestrin-3. *Brain Res*. 2018; 1689: 109–122, doi: [10.1016/j.brainres.2017.11.019](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.11.019), indexed in Pubmed: 29191771.
71. Fu H, Cheng Y, Luo H, et al. Silencing MicroRNA-155 Attenuates Kainic Acid-Induced Seizure by Inhibiting Microglia Activation. *Neuroimmunomodulation*. 2019; 26(2): 67–76, doi: [10.1159/000496344](https://doi.org/10.1159/000496344), indexed in Pubmed: 30928987.
72. Dogini DB, Avansini SH, Vieira AS, et al. MicroRNA regulation and dysregulation in epilepsy. *Front Cell Neurosci*. 2013; 7: 172, doi: [10.3389/fncel.2013.00172](https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00172), indexed in Pubmed: 24109432.
73. Henshall DC. MicroRNAs in the pathophysiology and treatment of status epilepticus. *Front Mol Neurosci*. 2013; 6: 37, doi: [10.3389/fnmol.2013.00037](https://doi.org/10.3389/fnmol.2013.00037), indexed in Pubmed: 24282394.
74. McKiernan RC, Jimenez-Mateos EM, Sano T, et al. Expression profiling the microRNA response to epileptic preconditioning identifies miR-184 as a modulator of seizure-induced neuronal death. *Exp Neurol*. 2012; 237(2): 346–354, doi: [10.1016/j.expneurol.2012.06.029](https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.06.029), indexed in Pubmed: 22771761.

75. Geng H, Chen X. Development and validation of a nomogram for the early prediction of drug resistance in children with epilepsy. *Front Pediatr.* 2022; 10: 905177, doi: [10.3389/fped.2022.905177](https://doi.org/10.3389/fped.2022.905177), indexed in Pubmed: [36110106](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36110106/).
76. Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med.* 2014; 20(8): 460–469, doi: [10.1016/j.molmed.2014.06.005](https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.06.005), indexed in Pubmed: [25027972](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25027972/).
77. Zampetaki A, Mayr M. Analytical challenges and technical limitations in assessing circulating miRNAs. *Thromb Haemost.* 2012; 108(4): 592–598, doi: [10.1160/TH12-02-0097](https://doi.org/10.1160/TH12-02-0097), indexed in Pubmed: [22627831](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22627831/).
78. Sato F, Tsuchiya S, Terasawa K, et al. Intra-platform repeatability and inter-platform comparability of microRNA microarray technology. *PLoS One.* 2009; 4(5): e5540, doi: [10.1371/journal.pone.0005540](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005540), indexed in Pubmed: [19436744](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19436744/).
79. van Dijk EL, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Library preparation methods for next-generation sequencing: tone down the bias. *Exp Cell Res.* 2014; 322(1): 12–20, doi: [10.1016/j.yexcr.2014.01.008](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.01.008), indexed in Pubmed: [24440557](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24440557/).
80. Ruijter JM, Pfaffl MW, Zhao S, et al. Evaluation of qPCR curve analysis methods for reliable biomarker discovery: bias, resolution, precision, and implications. *Methods.* 2013; 59(1): 32–46, doi: [10.1016/j.ymeth.2012.08.011](https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.08.011), indexed in Pubmed: [22975077](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22975077/).
81. Bustin SA, Benes V, Garson J, et al. The need for transparency and good practices in the qPCR literature. *Nat Methods.* 2013; 10(11): 1063–1067, doi: [10.1038/nmeth.2697](https://doi.org/10.1038/nmeth.2697), indexed in Pubmed: [24173381](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24173381/).
82. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech.* 2004; 15(3): 155–166, indexed in Pubmed: [15331581](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15331581/).