

# ENOLAZA SPECIFICĂ NEURONALĂ CA MARKER DE INJURIE CEREBRALĂ ȘI PARTICULARITĂȚILE ADMINISTRĂRII TRATAMENTULUI NEUROPROTECTIV ÎN EPILEPSIILE COPIILOR DE VÂRSTĂ MICĂ

## NEURON-SPECIFIC ENOLASE AS MARKER OF BRAIN LESIONS AND FEATURES OF NEUROPROTECTIVE TREATMENT OF EPILEPSY IN TODDLERS

**Cornelia Călcâi**

### REZUMAT:

În cadrul multor afecțiuni acute și cronice neurologice, inclusiv epilepsia, care evoluează cu neurodistrucție focală sau difuză are loc eliberarea de proteine, enzime, fermenți neurospecifiți din celulele afectate ale creierului în spațiul interstițial și ulterior, în lichidele biologice ale organismului. Una din direcțiile actuale de imunodiagnosticare este studierea concentrației serice de proteine neurospecifice, pentru rezolvarea problemelor de diagnostic, monitorizare și prognozare a evoluției procesului patologic. Unul dintre acești markeri este enolaza specifică neuronală (NES). Aceasta din urmă este eliberată atunci când țesutul nervos este traumatizat. Se utilizează pentru diagnosticul stărilor caracterizate prin ischemie și hipoxie cerebrală, precum și studiere a patogeniei afecțiunilor neurologice, care decurg cu afectarea barierei hematoencefalice. În ultimii ani a fost depistată creșterea concentrației de NSE în țesutul nervos și în lichidele biologice ale bolnavilor de epilepsie, precum și pe modele animale, la care s-au dezvoltat convulsii.(7,8).

**Cuvinte cheie:** enolaza specifică neuronală, marker, epilepsie, țesutul nervos, injurie

### ABSTRACT:

In many acute and chronic neurological disorders, including epilepsy, associated with focal or diffuse destruction of the nervous tissue there is a release of proteins, enzymes and neuron-specific markers from affected cells into interstitial space, and later in biological fluids. One of the modern directions of immunodiagnosics is the study of serum concentrations of the neuron-specific proteins that help to solve problems with diagnosis, monitoring and prognosis of disease evolution.

One of these markers is the neuron-specific enolase. This protein is released when there is a traumatic lesion of nervous tissue, and is used to diagnose conditions accompanied by cerebral ischemia and hypoxia, as well as to study the pathogenesis of neurological diseases occurring with the injury of the blood-brain barrier. In recent years, there has been revealed a growing concentration of NSE in nervous tissue and biological fluids of patients with epilepsy, as well as in animal models that have developed seizures.

Within the framework of many acute and chronic neurologic disorders, inclusively epilepsy, which follow with focal or diffuse neurodestruction there are freed by proteins, enzymes, neurospecific ferments from the affected cells of the brain in the interstitial space and, subsequently, in the biological liquids of the body. One of the contemporary views in immunodiagnosics is the analysis of serous concentration of proteins neurospecific, for working out problems of diagnosis, monitoring as well as anticipation of the pathologic process. One of these signs is the specific neuronal enolase. It is exuded when the nervous tissue is damaged. It is used in the diagnoses of states characterized through ischaemia and cerebral hypoxia, as well as the study of pathogenesis in the neurologic disorders, which develop affecting the haematoencephalic barrier. Lately there has been observed an increase of NSE concentration in the nervous tissue and in the biological liquids of the sick suffering with epilepsy, as well on animal samples, in which convulsions were present.(7,8).

**Key words:** specific neuronal enolase, marker, epilepsy nervous tissue, injury

## SCOPUL STUDIULUI

Evidențierea corelației dintre epilepsia copilului (tipul accesului convulsiv, frecvența acestuia, vârsta de debut a epilepsiei, prezența retardului neuropsihic) și nivelul seric al enolazei specifice neuronale, precum și particularitățile administrării tratamentului antiepileptic în combinație cu cel neuroprotector în epilepsiile nou-născuților și sugariilor.

## MATERIAL ȘI METODE

Studiul a fost efectuat la baza clinică ICȘ DOSM și C (Institutul de Cercetări Științifice în Domeniul Ocrotirii Mamei și Copilului) din Orașul Chișinău, în secțiile de neuropsihiatrie a nou-născuților și psihoneurologie și epileptologie pe parcursul anilor 2007-2009. Pentru realizarea obiectivelor propuse, în studiu au fost incluși 108 copii (**lotul I**), cu vârstele cuprinse între 2 săptămâni -24 luni (vârsta medie  $9,2 \pm 1,2$  luni), dintre aceștea 61 (56,0%) - băieți și 47 (44,0%) fete. Grupul de referință a fost constituit din 108 copii fără istoric de accese convulsive, practic sănătoși (**lotul II**) de aceeași vârstă, dintre care 49 băieți (45,0%) și 59 (55,0%) fete.

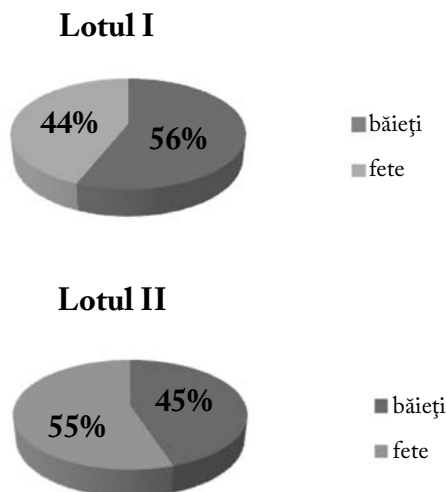


Fig1. Structura după sex a persoanelor incluse în studiu

Selectarea pacienților pentru lotul de cercetare s-a efectuat după următoarele **criterii de includere**: (1) convulsii epileptice de orice tip sau etiologie, (2) schimbări specifice la EEG (dar nu obligatoriu), (3) vârsta (2 săptămâni-24 luni). Copiii care au manifestat convulsii acute, dar care la momentul examinării pe EEG încă nu se formase focarul epileptic deasemenea

au fost înrolați în studiu. Pentru evaluarea pacienților a fost alcătuit un chestionar special, în care au fost incluse datele necesare pentru colectarea notificărilor demografice, de cercetare clinică și paraclinică: numele prenumele, datele anamnezei perinatale, prezența de convulsii de diferite etiologii, vârsta de debut a convulsiilor, tipul convulsiilor, frecvența și durata lor, factorul declanșator posibil, lungimea perioadei intercritice, prezența de convulsii la rude, devieri în statusul neurologic la momentul examinării, preparate antiepileptice utilizate, schimbări în valorile marcherilor biologici studiați, eficacitatea tratamentului combinat administrat. Tipul epilepsiei a fost stabilit pe baza **Clasificării internaționale a epilepsiilor, sindroamelor epileptice și a afecțiunilor paroxismale înrudite (2000)** (Liga Internațională de Combatere a Epilepsiei): (1) *epilepsie idiopatică*, (2) *epilepsie simtomatică*, (3) *epilepsie criptogenă*.

Accesele convulsive au fost clasificate în conformitate **Clasificarea internațională a crizelor epileptice (1981)** (Liga Internațională de Combatere a Epilepsiei): (a) *parțiale* (simple, complexe), (b) *generalizate* (absențe, tonice, clonice, tonico-clonice, mioclonice, atonice). Pentru nou-născuții incluși în studiul nostru (11 cazuri), cu vârstele cuprinse între 2 și 4 săptămâni, stabilirea diagnosticului de epilepsie s-a bazat pe datele anamnestice (convulsii în maternitate, relatate de neonatologi sau serviciul de reanimare neonatologică), din observațiile proprii ale mamei și ale medicului neuropediatru, precum și din datele examinării prin EEG (criteriu neobligatoriu).

Tabelul 1. Caracteristica generală a lotului de cercetare (n=108) și a lotului de referință (n=108)

Caracteristica generală	Pacienții (n=108)	Grupa de control (n=108)	P
Vârsta medie (luni)	9,2±1,2	10,0±0,9	>0,05
Sex			
fată	47 (44,0±7,24%)	59 (55,0±6,48%)	>0,05
băiat	61 (56,0±6,36%)	49 (45,0±7,11%)	>0,05
Accese parțiale	53(49,1±4,81%)	-	<0,001
Accese generalizate	43(39,8±4,71%)	-	<0,001
Accese polimorfe	12(11,1±3,02%)	-	<0,01

Din datele expuse în tabelul de mai sus se vede că loturile de copii sunt omogene după vârstă și sexul pacienților ( $p > 0,05$ ).

Pentru evaluarea nivelului seric al enolazei specifice neuronale de la copiii din lotul de studiu și cel de control a fost recoltat 3 ml de sânge venos, care a fost centrifugat și congelat la temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ne-am străduit ca diferența de timp dintre ultima convulsie și venepuncție să fie cât mai mică, sau chiar să urmeze direct ultimul acces. Ulterior serul a fost transportat la sediul firmei „DAC-Spectro Med”, unde au fost efectuate examinările respective. Ulterior, după administrarea tratamentului, peste 3 luni, la copiii incluși în lotul I de studiu a mai fost prelevat sânge, pentru examinarea markerilor biologici sus numiți și evaluarea modificării concentrațiilor serice ale acestora după administrarea tratamentului neuroprotectiv. Pentru determinarea enolazei specifice neuronale s-a utilizat testul NSE ELISA (EIA-4610). Metoda se prezintă ca o metodă imunoenzimatică calorimetrică în determinarea cantitativă a concentrației enolazei specifice în ser (2-fosfo-D-glicerat hidrolaza), care este o izoenzimă ce face parte din familia enolazelor. Testul se bazează pe conjugarea enolazei neuronale specifice cu doi anticorpi monoclonali, unul imobilizat fiind pe microplășete, altul fiind conjugat cu peroxidaza ce se utilizează pentru această procedură. Intensitatea colorării a fost direct proporțională cu concentrația enolazei. Valorile normale ale acesteia sunt 0-12 ng/ml, iar cele patologice sunt cele mai mari de 12 ng/ml.

Ulterior pacienții din lotul I au fost divizați prin metodă aleatorie în trei subloturi a câte 36 de pacienți. Copiii din sublotul I au primit tratament antiepileptic combinat cu Caraxon, cei din sublotul II li s-a asociat wla tratamentul de bază Cortexin, iar pacienții din sublotul III au primit numai tratament antiepileptic. Tratamentul de bază a constat în administrarea preparatelor antiepileptice, care au fost diferențiate în funcție de tipul crizei. Cel mai des pentru convulsiile generalizate s-a utilizat acidul valproic (Orfiril, Depakine), iar în accesele parțiale s-a utilizat carbamazepina (Timonil, Finlepsin). Cel mai des s-au utilizat siropurile, care sunt mai ușor de administrat la copii. Preparatul Ceraxon dispune de o formă de administrare sub formă de sirop. El a fost administrat în doză de 1 ml (100 mg) de 2-3 ori în 24 de ore în funcție de vârsta copilului timp de 3 luni.

Preparatul medicamentos Cortexin a fost administrat în doză de 0,5 mg la kg, i/m, timp de 10 zile.

Ulterior am repetat această cură de tratament peste 2 luni. Astfel, copiii din lotul I de studiu au primit două cure de tratament cu Cortexin a câte 10 zile fiecare. Ulterior peste 3 luni de la inițierea tratamentului combinat acestea au fost evaluați repetat fie în condiții de ambulator, fie în staționar.

Copiii din sublotul III au primit doar remediile antiepileptice corespunzătoare tipului de crize.

Aceștia la fel au fost evaluați după trei luni de tratament.

## REZULTATELE OBȚINUTE

Analizând nivelul concentrației serice a NSE în cele 3 grupe de epilepsii în care au fost divizați copiii, s-au obținut următoarele date (Tabelul 2.)

Tabelul 2. Prevalența NSE în grupul copiilor cu accese generalizate, focale și cu accese polimorfe

Titlul NSE	Epilepsia focală (n=53), abs, frecv P±ES	Epilepsia generalizată (n=43), abs, frecv P±ES	Epilepsia cu accese polimorfe (n=12 abs, frecv P±ES)
Total (%)	12 (22.6±5.74%) 14,582-24,956	15 (34.8±7.26%) 15,897-28,634	8 (66.7±13.60%) 14,675-24,834
Valori crescute ușor (12-20 ng/ml)	7 (13.2±4.65%) (14,582-19,946)	5 (11.6±4.88%) (15,897-19,634)	2 (16.7±10.77%) (14,675-19,784)
Valori moderate (20-30 ng/ml)	5 (9.4±4.02%) (22,846-24,956)	10 (23.3±6.45%) (20,987-28,634)	6 (50.014.43±%) (21,957-24,834)

Tabelul 3. Corelația dintre valorile NSE și frecvența acceselor convulsive

Frecvența acceselor	Abs. P±ES%	Proporția titrului NSEleuat, (%)	Valorile NSE (min-max)	Coef. de corelație rxy
De câteva ori pe zi	30 (27.8±4.31)	15 (50.0)	14,582-27,987	+0.43**
De câteva ori pe săptămână	41 (37.9±4.67)	13 (32.0)	12,459-28,634	+0.49**
Câte 1-2 ori pe lună	16 (9.26±2.79)	4 (25.0)	15,897-24,834	+0.29***
O dată (2 sau mai multe)	21 (19.4±3.81)	3 (15.0)	19,987-22,849	+0.31***

\*\*corelație medie \*\*\*corelație slabă

Corelația între frecvența acceselor convulsive și prezența crescută a enolazei specifice neuronale este prezentată în tabelul de mai sus (Tabelul 3.). Putem remarca faptul că frecvența titrului majorat al enolazei specifice neuronale este în corcondanță directă cu frecvența acceselor convulsive. Pentru accesele cu frecvență înaltă (de câteva ori pe zi) nivelul enolazei specifice neuronale a fost majorat în 50% din numărul total de cazuri. De asemenea, cu cât frecvența este mai mică, cu atât și numărul de cazuri depistate este mai mic.

Corelația dintre vârsta de debut a convulsiilor și titrul de NSE crescut este expusă în tabelul de mai jos. (Tab.4)

Tabelul 4. Corelația dintre vârsta de debut a acceselor epileptice și titrul de NSE

Vârsta de debut a convulsiilor	$p \pm ES$	NSE crescut (%)	NSE min-max	Corelație r <sub>xy</sub>
<1 lună	38 (35,2±4,59)	11(29)	14,675-24,967	+0,44**
1-3 luni	13 (12±3,13)	4(31)	15,897-24,956	+0,18***
3-6 luni	23 (21,3±3,94)	8(35)	19,543-27,987	+0,28***
6-12 luni	29 (26,9±4,27)	11(38)	12,459-22,849	+0,34**
>12 luni	4 (3,7±1,82)	1(25)	19,784	+0,12***

\*\*corelație medie \*\*\*corelație slabă

Un aspect important la care ne referim este relația dintre prezența retardului asociat epilepsiei și nivelul de NSE. În tabelul de mai jos este expusă această corelație. (Tab.5)

Tabelul 5. Corelația dintre retardul asociat epilepsiei și nivelul NSE din ser

Retard	Abs. P ± ES%	Cota NSE (%)	Valorile min-max	Coef. de corelație r <sub>xy</sub>
Neuropsihic și motor	86 (79,6±3.88%)	28 (32,56)		+0.88*
Neuropsihic	46 (53,4±4.80%)	18 (39,13)	14,582-28,634	+0.70*
Motor	40 (46,5±4.79%)	10 (25.0)	12,459-27,987	+0.52**

\*corelație puternică \*\*corelație medie

*Aprecierea tratamentului după criteriul evaluării concentrației enolazei specifice neuronale.*

Tabelul 6. Nivelurile concentrației serice a enolazei specifice neuronale în grupurile de studiu înainte și după tratament

	I grup (n=36)	II grup (n=36)	III grup(n=36)
	AE+Ceraxon	AE+Cortexin	AE
Nivel sporit al concentrației serice de enolază specific neuronală (total)	14 copii 14,675-24,967	10 copii 12,459-27,987	11 copii 14,582-28,634

\*nivel majorat al enolazei specifice neuronale după tratament

Astfel, valoarea medie a concentrației serice a enolazei în primul grup de studiu până la tratament a constituit 20,818·0,920, iar după tratament 10,108·1,322 (t=6,652, p<0,001). Se evidențiază o diferență statistică comparativă dintre variațiile concentrației enolazei până la tratamentul cu Ceraxon și după acesta, astfel acest preparat prezintă un factor de neuroprotecție în cazul convulsiilor destul de semnificativ. În cel de-al II-lea grup de studiu deasemenea avem o diferență destul de semnificativă între variațiile concentrației până și după tratament. Astfel, valoarea medie a enolazei până la administrarea Cortexinului a constituit 21,183·1,407, iar după 9,952·0,955 (t=6,606, p<0,001). De aici putem vedea indirect efectul pozitiv al Cortexinei ca agent neuroprotector.

Deasemenea am analizat omogenitatea acestor grupe de studiu, evaluând și comparând valorile medii ale enolazei între I și III grupă, II și III grupă, I și II grupă până la tratament. Pentru grupele I și III t=0,344, p>0,05, pentru II și III grupă t=0,081, p>0,05, iar pentru cea de-a I și II grupă t=0,217, p>0,05. Deci diferență statistică între concentrațiile enolazei între aceste trei grupe până la tratament nu se evidențiază.

După administrarea tratamentului am obținut o diferență statistică între I și III grupă de studiu (t=2,283, p<0,05), între II și III grupă (t=3,802, p<0,05), iar între I și II grupă (t=0,096, p>0,05) nu a fost remarcată o semnificație statistică, ceea ce ne face să credem că ambele preparate sunt benefice și au practic aceleași proprietăți neuroprotective în cadrul copiilor din grupul de studiu.

## CONCLUZII

1. Frecvența titrului crescut al enolazei specifice neuronale este în concordanță directă cu frecvența acceselor convulsive. Pentru accesele cu frecvență înaltă (de câteva ori pe zi) nivelul enolazei specifice neuronale a fost majorat în 50% din numărul total de cazuri.

2. Există o corelație puternică între prezența retardului neuropsihic și motor și nivelul ridicat al enolazei specifice neuronale.

3. Deasemenea este remarcată o corelație medie

\*

\*

\*

## AIM OF THE STUDY

Emphasis in the correlation between child's epilepsy (type of convulsive attack, its frequency, the onset of epilepsy, the presence of neuropsychic delay) and the serum level of specific neuronal enolase considering as well particularities in antiepileptic treatment in combination with the neuroprotector in cases of epilepsy at newborns and babies.

## MATERIAL AND METHODS

The following study has been performed on the clinical bases ICSPIDOSM and C from Chisinau city, in the departments of neuropsychiatry of newborns and psychoneurology and epileptology during the years 2007-2009. For accomplishing the proposed objectives, in the study were involved 108 children (group I), aged between 2 weeks -24 months (average age  $9,2 \pm 1,2$  months), among these 61 (56,0%) - boys and 47 (44,0%) girls. The reference group was made from 108 children without an anamnesis of convulsive attacks, practically healthy (group II) of the same age, among which 49 boys (45,0%) and 59 (55,0%) girls.

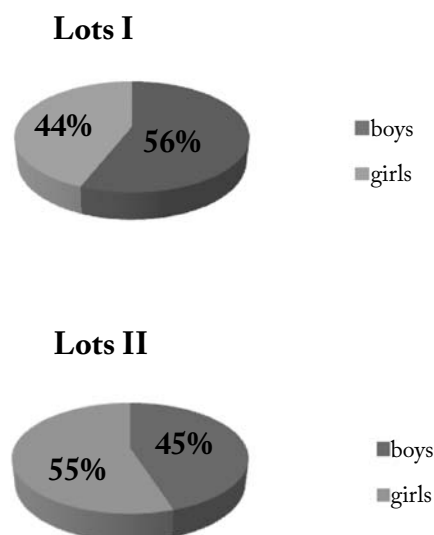
Patient's selection for the research group was performed according to the following criteria: (1) epileptic convulsions of any type or aetiological, (2) specific changes at EEG (not obligatory), (3) age (2 weeks -24 months). Children who have manifested acute convulsions, but which at the moment of examination on EEG the epileptic foci was not established yet which was also enrolled into the study. For the patients' evaluation there was made a special questionnaire, in which there were included necessary

între grupul de copii cu vârsta mai mică de 1 lună și nivelul enolazei. Acest lucru este posibil legat cu evenimentele hipoxice -ischemice care au loc imediat după naștere la unii copii.

4. Este remarcată o diferență statistică comparativă dintre variațiile concentrației enolazei până și după tratamentul cu Ceraxon și Cortexin, astfel putem concluziona că aceste preparate prezintă un factor de neuroprotecție în cadrul convulsiilor epileptice la copii.

data in order to collect demographic notes, of paraclinic and clinic research: name, surname,

Fig1. Structure according to peoples' sex included in the study



perinatal anamnesis data, the presence of convulsions being of various genesis, the onset of convulsions, type of convulsions, their length and frequency, the possible triggering factor, the intercritical length period, the presence of convulsions among relatives, deviations in the neurologic status at the moment of examination, antiepileptic used preparations, changes in the studied biologic note values, efficacy in the combined administered treatment. The type of epilepsy has been settled on the bases of Epileptic international classification, epileptic syndromes and as well connected paroxysmal disorders (2000) (International League in Epilepsy Control): (1) idiopathic

epilepsy, (2) symptomatic epilepsy, (3) criptogenous epilepsy. Convulsive attacks were classified according to Epileptic international classification (1981) (International Lique in Epilepsy Control): (a) partial (simple, complex), (b) generalised (absences, tonic, clone, tonico-clonic, myoclonic, atonic).

For the newborn babies included in our study (11 cases), aged between 2 and 4 weeks, the settled epilepsy diagnosis was based on the anamnesis data (convulsions in maternity department, relatated by the neonatologists or the service of neonatologic reanimation), out of the mother's own observations as well as the neuropediatrition's, and from the data of examination through EEG (unobligatory criteria).

Table 1. General characteristic of research (n=108) and reference type (n=108)

General characteristics	Patients (n=108)	Group of control (n=108)	P
Average age (months)	9,2±1,2	10,0±0,9	>0,05
Sex			
girl	47 (44,0±7,24%)	59 (55,0±6,48%)	>0,05
boy	61 (56,0±6,36%)	49 (45,0±7,11%)	>0,05
Partial attacks	53(49,1±4,81%)	-	<0,001
Generalized attacks	43(39,8±4,71%)	-	<0,001
Polymorphic attacks	12(11,1±3,02%)	-	<0,01

From the data exposed in the above table is seen that the groups of children are homogenous according to age and sex of the patients (p>0,05).

For the evaluation of the serous level of specific neuronal enolase, at children from the studied and control group there were gathered 3 ml of venous blood, which was centrifuged and frozen at the temperature of -20°C. We did our best considering the difference in time between the last convulsion and venopunction to be as small as possible, or even following the last attack. Afterwards the serum has been transported to the head office „DAC-Spectro Med”, where the necessary investigations were performed. Later, after the administered treatment, in 3 months, at children included in group I of study were taken some more blood samples, in order to

examine the above mentioned biological signs and the evaluation of their serous concentration modification after the administration of the neuroprotective treatment. To determine the specific neuronal enolase there was used the test NSE ELISA (EIA-4610). The following method represents a kind of a calorimetric immunoenzymatic method to determine the quantitative concentration of the specific enolase in the serum (2-phospho-D-glicerate hydrolaze), which is an izoenzyme which takes part from the enolase family. The following test is based on the combination of specific neuron enolase with two monoclonal antibodies, one being immobilized on microboards, the other being combined with the peroxydase which is used for this procedure. Colouring intensity was directly proportional with the enolase concentration. Its normal values are 0-12 ng-ml, and the pathologic ones are bigger than 12 ng-ml.

Consequently patients from group I were divided through a random method in three subgroups of 36 patients. Children from subgroup I have received antiepileptic treatment combined with Caraxon, those from the subgroup II were added to the basic treatment Cortexin, but the patients from the subgroup III have only received antiepileptic treatment. The basic treatment was in the administration of epileptic preparations, which were differentiated depending on the type of attacks. Most often for generalised convulsions was used valproic acid (Orfiril, Depakine), but in partial attacks was used carbamazepine (Timonyl, Fynlepsin). Most often were used syrop forms, which are easier to administrate to children. Ceraxon preparation is used under the form of syrop. It was administered in the dosage of 1 ml (100 mg) 2-3 times in 24 hours depending on the age of the child during 3 months.

The medication Cortexin was administered in the dose of 0,5 mg per kg, i/m, during 10 days. This type of treatment was repeated in 2 months. That is children from group I of study have received two treatment courses with Cortexin per 10 days each. Afterwards in 3 months from the initiation of the combined treatment these have been evaluated repeatedly whether at home or being hospitalized.

Children from subgroup III have only received antiepileptic remedies corresponding to the type of attack. These have also been evaluated in three months of treatment.

**OBTAINED RESULTS**

Analysing the serous level of concentration of NSE in those 3 groups of epilepsies where the children were divided, we have received the following data (Table 2)

Table 2. Prevalence NSE in childrens' group with generalised attacks, foci as well with polymorph attacks

Titre NSE	Foci epilepsy (n=53), abs, frecv P±ES	Generalised epilepsy (n=43), abs, frecv P±ES	Epilepsy with polymorph attacks (n=12 abs, frecv P±ES)
<b>Total (%)</b>	12 (22.6±5.74%) 14,582-24,956	15 (34.8±7.26%) 15,897-28,634	8 (66.7±13.60%) 14,675-24,834
<b>Indices easily raised (12-20 ng/ml)</b>	7(13.2±4.65%) (14,582-19,946)	5(11.6±4,88%) (15,897-19,634)	2(16.7±10.77%) (14,675-19,784)
<b>Moderate indices (20-30 ng/ml)</b>	5(9.4±4.02%) (22,846-24,956)	10 (23.3±6.45%) (20,987-28,634)	6 (50.014.43±%) (21,957-24,834)

Correlation between the frequency of attacks and the presence of elevated enolase specifically neuronal is exposed bellow (Table 3).

Table 3. Correlation between indices NSE and the frequency of convulsive attacks

Frequency attacks	Abs. P ±ES%	Proportion titre NSEelevated, (%)	Indices NSE (min-max)	Coeff. of correlation rxy
<b>Several times a day</b>	30 (27.8±4.31)	15 (50.0)	14,582-27,987	+0.43**
<b>Several times a week</b>	41 (37.9±4.67)	13(32.0)	12,459-28,634	+0.49**
<b>1-2 times per month</b>	16 (9.26±2.79)	4(25.0)	15,897-24,834	+0.29***
<b>Once (2 or more attacks in the same day)</b>	21 (19.4±3.81)	3(15.0)	19,987-22,849	+0.31***

\*\*medium correlation \*\*\*weak correlation

We may observe the fact that the frequency of the increased titre of the specific neuronal enolase is in harmony with the frequency of convulsive attacks. For the attacks of high frequency (several times a day)

the level of specific neuronal enolase was increased in 50% out of the whole number of cases. It is noticed, as well, that as far the frequency is smaller, the number of cases is much smaller.

Correlation between the onset of the convulsions and the titre of raised NSE is represented in table below.(Tab.4)

Table 4. Correlation between the onset of the convulsions and the titre of raised NSE

Onset of convulsions	p±ES	NSE increased (%)	NSE min-max	Correlation rxy
<b>&lt;1 month</b>	38 (35,2±4,59)	11(29)	14,675-24,967	+0,44**
<b>1-3 month</b>	13 (12±3,13)	4(31)	15,897-24,956	+0,18***
<b>3-6 month</b>	23 (21,3±3,94)	8(35)	19,543-27,987	+0,28***
<b>6-12 months</b>	29 (26,9±4,27)	11(38)	12,459-22,849	+0,34**
<b>&gt;12 months</b>	4 (3,7±1,82)	1(25)	19,784	+0,12***

\*\*medium correlation \*\*\*weak correlation

An important issue we wished to talk about was the relation between the presence of the delay associated to epilepsy and the level of NSE. In the table below is exposed this correlation.(Tab.5)

Table 5. Correlation between the presence of the delay associated to epilepsy and the level of NSE from the serum.

Delay	Abs. P ±ES%	Rate NSE (%)	Levels min-max	Coeff. of
<b>Neuropsychic and motor</b>	86 (79,6±3.88%)	28 (32,56)		+0.88*
<b>Neuropsychic</b>	46 (53,4±4.80%)	18 (39,13)	14,582-28,634	+0.70*
<b>Motor</b>	40(46,5±4.79%)	10 (25.0)	12,459-27,987	+0.52**

\*\*strong correlation \*\* medium correlation

Appreciation of the treatment according to the criteria of evaluation considering the specific neuronal enolase concentration.

Table 6. The levels in serous concentration of specific neuronal enolase in the group study before and after the treatment

	I group (n=36) AE+Ceraxon	II group (n=36) AE+Cortexin	III group (n=36) AE
Increased level of serous concentration in specific neuronal enolase (total)	14 children 14,675-24,967	10 children 12,459-27,987	11 children 14,582-28,634

\*increased level of specific neuronal enolase after the treatment

Thus the medium level of serous concentration of enolase in the first group of study till the treatment constituted  $20,818 \pm 0,920$ , and after the treatment  $10,108 \pm 1,322$  ( $t=6,652, p<0,001$ ). So, it is obviously observed a comparative differentiation in statistics between variations in enolase concentration till the treatment with Ceraxon and after it, so, we may conclude that this preparation presents a factor of neuroprotection in the case of convulsions quite significantly. In the IIInd group of study we also have a quite significant differentiation between variation in concentration till and after the treatment. Like so the medium level of enolase till the administration of Cortexyn constituted  $21,183 \pm 1,407$ , and after  $9,952 \pm 0,955$  ( $t=6,606, p<0,001$ ). From here we can conclude indirectly the positive effect of Cortexin as a neuroprotector agent.

We have also analysed the homogeneity of these groups of study, evaluating and comparing the medium levels of enolase between Ist and III group, IIInd and IIIrd group, Ist and IIInd group till the treatment. For groups I and III  $t=0,344, p>0,05$ , for IIInd and IIIrd group  $t=0,081, p>0,05$ , and for the Ist and IIInd group  $t=0,217, p>0,05$ . So, the statistic difference between

enolase concentration among these three groups till the treatment is not certified.

After the administration of the treatment we have obtained a statistic difference between Ist and IIIrd group of study ( $t=2,283, p<0,05$ ), between IIInd and IIIrd group ( $t=3,802, p<0,05$ ), and between Ist and IIInd group ( $t=0,096, p>0,05$ ) was not remarked a statistic meaning, which makes us think that both preparations are quite benefic and possess practically the same neuroprotective properties in the framework of children from the group of study.

## CONCLUSIONS

1. Frequency of the increased titre of specific neuronal enolase is in direct proportion with the frequency of convulsive attacks. For the attacks with high frequency (several times a day) the level of specific neuronal enolase has been increased in 50% out of the total number of cases.

2. There exists a strong correlation between the presence of neuropsychic and motor delay and the increased level of specific neuronal enolase.

3. It was also remarked a medium correlation between the group of children aged less than 1 month and the level of enolase. This thing could be possibly linked with the hipoxy -ischaemic events which take place immediately after birth at certain children.

4. It is observed a comparative statistic difference between the variation of enolase concentration till and after the treatment with Ceraxon and Cortexin, thus, we may conclude that these preparations represent a neuroprotective factor in the case of epileptic convulsions in children.

## BIBLIOGRAFIE / BIBLIOGRAPHY

1. Ben-Ari Y. 1985; Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid. Mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 14:375-403.
2. Holmes G. 1991; Do seizures cause brain damage? *Epilepsia* 32(suppl5):S 14-28.
3. Marksteiner J, Prommegger R, Sperk G. 1990; Effect of anticonvulsant treatment on kainic acid-induced increases in peptide levels. *Eur J Pharmacol* 181:241-6.
4. DeGiorgio CM, Tomiyasu U, Gott PS, Treiman D. 1992; Hippocampal pyramidal cell loss in human status epilepticus. *Epilepsia* 33:23-7.
5. Cavazos JE, Das I, Sutula TP. 1994; Neuronal loss induced in limbic pathways by kindling: evidence for induction of hippocampal sclerosis by repeated brief seizures. *J Neurosci* 14:3106-21.
6. Puleo PR, Meyer D, Wathen C, et al. 1994; Use of a rapid assay of subforms of creatine kinase MB to diagnose or rule out acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 331:5614.



7. Marangos P, Schmechel D, Parma A, Clark R, Goodwin F. Measurement of neuron specific enolase (NSE) and nonneuronal (NNE) isoenzymes of enolase in rat, monkey and human nervous system. *J Neurochem* 1979;33:319-29.
8. Shimizu A, Suzuki F, Kato K. 1983; Characterization of alpha, beta and gamma human enolase isoenzymes and preparation of hybrid enolases from homodimeric forms. *Biochem Biophys Acta* 748:278.
9. Zomzely-Neurath CE. 1982; Nervous system specific proteins: 14- 3-2 protein, antigen alpha and neuron specific enolase. *Scand J Zmmunol* 15(suppl9): 140.
10. Lafon-Cazal M, Bougault I, Steinberg R, Pin J, Bockaert J. 1992; Measurement of gamma enolase release, immune method for selective quantification of neurotoxicity independently from glial lysis. *Brain Res* 593:63-8.
11. Royds JA, Timperley WR, Taylor CB. 1988; Levels of enolase and other enzymes in the cerebrospinal fluid as indices of pathologic change. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 19:
12. DeGiorgio CM, Correale JD, Gott PS, et al. 1995; Serum neuron specific enolase (s-NSE) in human status epilepticus. *Neurology* 45: 1134-7.
13. Royds JA, Aelwyn G, Davies-Jones B, Lewtas NA, Timperley WR, Taylor CB. 1983; Enolase isoenzymes in the cerebrospinal fluid of patients with diseases of the nervous system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 46: 1031-6.

