



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CARDIOVASCOLARI

Ciclo XXIV

**METABOLOMICA: UN NUOVO APPROCCIO PER LO STUDIO
DELLA PREDITTIVITA' DI FARMACORESISTENZA E DI
COMPLICANZE CARDIOVASCOLARI IN EPILESSIA**

Settore scientifico disciplinare di afferenza

Area 06: MED 26

Presentata da:

Dott.ssa ANTONELLA MURONI

Coordinatore Dottorato

Prof. FRANCESCO MARROSU

Relatore

Prof. FRANCESCO MARROSU

Esame finale anno accademico 2010 - 2011

*“Genomics and proteomics tell you what might happen,
but metabolomics tells you what actually did happen”*

Bill Lasley

Sommario

INTRODUZIONE	5
FARMACORESISTENZA	7
Generalità	7
Fisiopatologia	13
SUDEP	19
LA METABOLOMICA: DALL'ANALISI DEL PROFILO METABOLICO ALLA PREDITTIVITA' DI FARMACORESISTENZA.....	30
IL NOSTRO STUDIO.....	34
Materiali e Metodi	34
Risultati.....	39
DISCUSSIONE	43
CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE.....	47
BIBLIOGRAFIA.....	50

INTRODUZIONE

Nel quotidiano lavoro di approccio a pazienti affetti da epilessia il Neurologo, sia al momento della diagnosi che nel corso delle visite successive, è chiamato a rispondere a numerose domande del paziente, le più significative sono: riusciranno i farmaci a controllare le crisi? Sarò sempre dipendente dai farmaci? In che misura cambierà la mia vita?

Debbo dire che nella stragrande maggioranza dei casi noi rispondiamo a queste domande basandoci su probabilità, chiaramente basate su quanto ci dicono i dati di letteratura su quella specifica sindrome epilettica. Di sicuro, e questo è un trend comune in tutto il mondo, quasi nessun Epilettologo parlerebbe al paziente, almeno in prima visita, della SUDEP (*sudden unexpected death in epilepsy*, ovvero *morte improvvisa ed inaspettata in epilessia*), sebbene questa sia un problema reale (venti volte superiore nell'epilettico rispetto alla popolazione generale) anche in pazienti che apparentemente non presentano alcuna patologia cardiaca. I motivi di questo sono differenti: in primo luogo è necessario che il paziente metabolizzi, per così dire, la diagnosi, e costruisca un rapporto di fiducia con il proprio specialista, dal momento che la convivenza con la malattia e i farmaci durerà in molti casi tutta la vita. In secondo luogo non abbiamo

molte possibilità di sapere a priori quale sarà l'evoluzione della malattia di quel paziente, con particolare riferimento all'eventuale sviluppo di farmacoresistenza. E' vero che molte sindromi epilettiche, abbondantemente studiate sul profilo clinico e genetico, hanno una evoluzione annunciata (es. epilessia rolandica nel bambino), ma è altrettanto certo che, specialmente nel caso dell'esordio in età adulta in assenza di alterazioni morfologiche documentabili ad una risonanza magnetica, sia tremendamente difficile assegnare una prognosi. L'avvento della genomica ha consentito negli ultimi decenni di individuare forme di epilessia associate ad anomalie cromosomiche, spesso in comorbidità con alterazioni del ritmo cardiaco. Oggi l'ultima nata della discipline "omiche", la metabolomica, potrebbe essere in grado, attraverso l'analisi di biofluidi ottenuti in modo assolutamente non invasivo (sangue ed urine) di aprire una nuova strada alla comprensione dei meccanismi di farmacoresistenza identificando in una fase precoce della malattia gli individui che potrebbero svilupparla; gli stessi individui che, come ampiamente dimostrato in modo convergente da tutti i dati di letteratura, appaiono come maggiormente a rischio di complicanze cardiovascolari e morte improvvisa.

FARMACORESISTENZA

Generalità (da Mutani, 2006)

Il problema della farmacoresistenza riguarda numerose patologie neurologiche e, in epilessia, circa il 30% dei pazienti.

L'incidenza dell'epilessia farmacoresistente è stimata, in Italia, in circa 3300 nuovi casi/anno (6/100000), mentre la prevalenza si attesta 3/1000, ovvero 150000 casi. Naturalmente questa segue la curva di distribuzione bimodale dell'epilessia, ossia ha un picco nell'età infantile-adolescenziale e negli anziani.

La persistenza di crisi nonostante l'impiego di farmaci di vecchia e nuova generazione, che in Italia sono in totale una ventina, comporta numerosi problemi per i pazienti, quali quello appunto di assumere politerapie, spesso in conflitto con altri farmaci assunti per patologie concomitanti, il declino cognitivo, lo stigma sociale, la dipendenza da terzi, oltre che un aumentato rischio di mortalità, come si vedrà in seguito.

Ovviamente perché si possa parlare di farmacoresistenza devono essere escluse tutte quelle condizioni che possono mimarla (falsa farmacoresistenza) e cioè:

- Presenza di crisi psicogene non epilettiche, tenendo conto che non solo sono causa di errori diagnostici neppure tanto rari in assoluto, ma che possono manifestarsi anche in pazienti realmente epilettici, nel 10% circa dei casi;
- Errori diagnostici di sindrome con conseguente terapia inappropriata, ad esempio l'etosuccimide nelle forme parziali;
- Errori terapeutici di dosaggio;
- Non corretta compliance da parte del paziente.

Al di là di queste doverose considerazioni, il concetto di farmacoresistenza non trova pieno consenso negli autori, che nel corso degli anni hanno ideato diverse definizioni che tengono conto di parametri sempre diversi, quali la frequenza delle crisi, la gravità, gli anni di epilessia alle spalle ed il numero dei farmaci necessari per poter dichiarare la forma farmacoresistente.

La definizione più provocatoria è senza dubbio quella di Hauser (1992), secondo cui “tutte le epilessie sono farmacoresistenti” dal momento che i farmaci hanno un'azione sintomatica, palliativa, ma non agiscono sui meccanismi causali innescanti la crisi. Per Berg et al. (1996) è farmacoresistente un paziente che presenta “una o più crisi/mese per almeno due anni dopo almeno tre farmaci”; per Huttenlocher e Hapke

(1990) bisogna arrivare a “una o più crisi/mese per almeno cinque anni dopo terapia alla massima dose tollerata”. Camfield (1996) definisce farmacoresistenti i pazienti che “nei primi cinque anni di malattia hanno una o più crisi ogni due mesi, mentre dopo i cinque anni di storia almeno una crisi/anno, nonostante l’assunzione di tre farmaci di prima scelta”. Cascino (1990) ha proposto come indice di farmacoresistenza “la persistenza di crisi negli anni nonostante l’assunzione di uno o più farmaci appropriati alla massima dose tollerabile”. Infine secondo Schachter (1993) è farmacoresistente “colui che non riesce a condurre uno stile di vita adeguato alle proprie capacità a causa della persistenza delle crisi oppure degli effetti collaterali dei farmaci o dei problemi psicosociali”, introducendo per la prima volta il concetto di qualità di vita quale indice di efficacia di un trattamento. Questo concetto è attualmente largamente condiviso per cui una modesta persistenza di crisi è preferibile alla libertà dalle stesse quando la sofferenza indotta dagli effetti collaterali di politerapie è maggiore di quella derivante dalle crisi stesse (Perucca, 2004). E’ stata inoltre proposta da Perucca stesso una scala per la definizione di farmacoresistenza che si basa sul numero dei farmaci usati, in base alla quale la probabilità di libertà da crisi è del 30% dopo il fallimento del primo

antiepilettico, riducendosi del 10-15% e del 5% se, rispettivamente, falliscono due o tre farmaci in successione o combinazione.

Circa il 10% dei pazienti, infine, presenta crisi dopo anni di remissione.

Secondo Goodridge e Shorvon (1983) tale fenomeno rientra in uno dei tre pattern della farmacoresistenza (Schmidt e Loscher, 2005): il primo è quello della farmaco resistenza *ab initio*, il secondo è quello tardivo ed il terzo è quello intermittente, contrassegnato da fasi di scarso controllo cui succedono fasi di remissione.

Oltre alla risposta al primo trattamento, i principali fattori predittivi di farmacoresistenza sono: l'età precoce di insorgenza dell'epilessia, la prolungata durata dell'epilessia attiva prima dell'inizio del trattamento, l'elevata frequenza delle crisi e la presenza di danno cerebrale (epilessie sintomatiche): alto rischio di farmacoresistenza è legato alla presenza di displasia corticale, di sclerosi ippocampale associata o meno a patologie extra-ippocampali, di tumori cerebrali (gangliogliomi, tumori disembrionoplastici), di facomatosi (Sturge-Weber, sclerosi tuberosa). In particolare per quanto riguarda l'epilessia del lobo temporale, che presenta spesso un pattern di farmacoresistenza di tipo terzo, Kalviainen (2002) ha documentato in risonanza magnetica una riduzione di volume dell'ippocampo ipsilaterale al focus epilettogeno in tutti i pazienti, ed una

sclerosi mesiale in un elevato numero di questi. Tali alterazioni correlavano con la frequenza elevata, un'insorgenza precoce delle crisi e la presenza di crisi febbrili. In alcuni pazienti erano presenti lesioni gliotiche dell'amigdala. L'autore, osservando i pazienti nel tempo, notò che le alterazioni morfologiche delle strutture mesiali non sempre erano presenti all'esordio, ma diventavano di comune riscontro nei pazienti con storie di lungo corso e/o crisi intrattabili, arrivando alla conclusione che la sclerosi mesiale era contemporaneamente "causa e conseguenza" dell'epilessia temporale. Ovviamente il riscontro di alterazioni di tali strutture, spesso parecchio sottili, è dipendente dall'adeguatezza dell'esame RMN (risonanza magnetica nucleare), dalla sensibilità dell'apparecchio e dall'esperienza del radiologo.

Come si è già accennato la corretta diagnosi sindromica deve essere uno dei punti fermi affinché il concetto di farmacoresistenza sia correttamente usato. Secondo Sander (1993) in termini prognostici le epilessie possono essere suddivise in quattro categorie:

1. Prognosi eccellente

Interessano il 20% dei pazienti, hanno remissione spontanea e non necessitano obbligatoriamente di farmaci antiepilettici (AEDs, *antiepileptic drugs*). Sono alcune epilessie generalizzate (convulsioni neonatali familiari e

non, epilessia mioclonica benigna dell'infanzia) e parziali (epilessia rolandica ed occipitale tipo Panayiotopoulos).

2. Prognosi buona

Interessano il 30% dei pazienti, necessitano di trattamento con AEDs con controllo delle crisi; possibile la remissione spontanea; di norma persistenza della remissione dopo sospensione della terapia. Sono alcune epilessie generalizzate (epilessia tipo assenza dell'infanzia, sindrome di West idiopatica) e parziali (alcune epilessie criptogenetiche legate ad una localizzazione).

3. Prognosi incerta

Interessano il 20% dei pazienti. Necessitano di trattamento continuativo con AEDs e buon controllo delle crisi. Rara la remissione spontanea. Sono alcune epilessie generalizzate (epilessia mioclonica giovanile, epilessia con crisi di grande male al risveglio) e parziali (epilessia occipitale di tipo Gastaut, la maggior parte delle epilessie legate ad una localizzazione).

4. Prognosi severa

Interessano il 30% dei pazienti. Necessitano di trattamento con AEDs con scarso o nullo controllo delle crisi (farmacoresistenza). Sono epilessie generalizzate (Sindrome di West, di Lennox-Gastaut e di Dravet, epilessie miocloniche progressive, epilessia con crisi mioclono-astatiche) e parziali,

quali epilessie parziali sintomatiche di danno o malformazione cerebrale (da Mutani, 2010).

A proposito di queste ultime, secondo Kwan e Brodie (2002) la sclerosi mesiale ippocampale e le displasie corticali sono le lesioni con la prognosi peggiore per le ricadute. L'EEG è considerato un utile parametro prognostico, dato che la presenza di parossismi e/o attività lenta, soprattutto nelle epilessie idiopatiche, si correla con una prognosi sfavorevole (Van Donselaar et al, 1992), mentre un ritmo normale o normalizzato dopo terapia costituisce un fattore prognostico favorevole (Shinnar et al, 1994). I dati su questo punto sono tuttavia discordanti (Hopkins et al, 1988).

Fisiopatologia (da De Curtis, 2005)

La maggiore parte degli studi suggerisce che la farmacoresistenza sia un fenomeno secondario al processo patologico di epilettogenesi (Pitkanen e Sutula, 2002). Gli effetti dei farmaci in epilessia possono essere mediati da una serie di differenti processi, e la resistenza può avvenire a diversi livelli: a livello intestinale (il gabapentin ad esempio possiede un meccanismo di trasporto attivo saturabile) o epatico, attraverso un alterato metabolismo;

cineticamente a livello della barriera emato-encefalica, o direttamente a livello del sito bersaglio.

Le forme di epilessia refrattarie alla terapia più frequenti e più studiate, come già accennato, sono le epilessie parziali del lobo temporale e le epilessie associate ad alterazioni della maturazione corticale. Il tessuto asportato a seguito di exeresi è stato sottoposto negli anni a tecniche di indagine sempre più raffinate, anche immunoistochimiche, onde definire le caratteristiche neuropatologiche e di eccitabilità della regione epilettogena e per esaminare i meccanismi di farmacoresistenza (Elger, 2002; Avoli e Williamson, 1996).

Nell'epilessia del lobo temporale associata a sclerosi ippocampale (Engel, 1996), e nei relativi modelli animali sperimentali (Loscher, 2002) indotti da stimolazione ripetitiva (modello del *kindling*) o dall'induzione di uno stato di male convulsivo (modello della pilocarpina e del kainato), si documentano caratteristiche alterazioni strutturali della regione paraippocampale, rappresentate da:

1. riduzione del parenchima neuronale a carico della corteccia entorinale e della regione CA1/CA3 dell'ippocampo;
2. dispersione neuronale del giro dentato;
3. alterazione e riorganizzazione sinaptica del giro dentato;

4. gliosi diffusa dell'ippocampo (Falconer et al, 1964; Blumcke et al, 2002)

L'insieme di alterazioni e riorganizzazioni circuitali ed anomalie di vascolarizzazione hanno come via finale comune un generale incremento dell'ipereccitabilità che comporta la comparsa di crisi difficilmente controllate dai farmaci, i quali, pur magari correttamente assorbiti, vanno ad agire su bersagli strutturalmente alterati. Ciò è quanto verosimilmente accade nelle displasie corticali (Palmini et al, 2004), come dimostrato da studi effettuati su campioni di tessuto umano ed in modelli sperimentali animali (Copp e Harding, 1999, Russo et al, 2003). L'asportazione chirurgica totale di un tessuto così gravemente sovrvertito può comportare in via definitiva la guarigione del paziente, ma nella pratica clinica è evidente che ciò è possibile solo laddove l'anomalia sia strettamente limitata ad una regione anatomica (come appunto l'ippocampo, ad esempio).

Ovviamente, come suggerisce la clinica, la stessa sindrome epilettica può in alcuni pazienti rispondere ad un farmaco mentre in altri essere drammaticamente resistente. Inoltre il paziente comunemente indicato dal neurologo come farmacoresistente lo è a tutti i farmaci, indipendentemente dal loro meccanismo d'azione, dunque tale fenomeno non può essere ricondotto ad un unico meccanismo causale biologico.

Nei recenti tempi, in cui gran spazio è lasciato alla genomica, di grande interesse è stato il riscontro di un aumento dell'espressione di alcune proteine di membrana responsabili dell'eliminazione dei farmaci (Kwan e Brodie, 2005; Abbott et al, 2002; Loscher, 2002), come la P-glicoproteina (PGP) e la *Multidrug resistance associated protein* (MRP) dai geni *multidrug-resistance* (MDR o ABCB1) (Petraccia et al, 2003). Queste proteine sono espresse sulla superficie luminale dell'endotelio cerebrale e sono deputate all'estruzione dei farmaci dal parenchima cerebrale verso il capillare sanguigno in seguito al loro ingresso nell'interstizio cerebrale per diffusione (Potschka et Loescher, 2001, Sisodiyia et al, 2002). Chiaramente una loro aumentata espressione in un sito qualsiasi determina l'aumentata estrusione di farmaco nel sangue vanificandone l'effetto terapeutico: tali proteine sono state chiamate in causa per spiegare la resistenza di alcuni tumori ai chemioterapici, ma sono state isolate anche nel parenchima cerebrale. La P-glicoproteina e le proteine MDR sono responsabili del trasporto dal parenchima cerebrale al sangue della maggior parte dei farmaci antiepilettici classici (difenilidantoina, carbamazepina, valproato) e di nuova generazione (lamotrigina, topiramato, felbamato) (Elger, 2003). Diversi studi hanno dimostrato un aumento di espressione delle proteine MDR (MDR1 e MDR7) nelle cellule endoteliali di tessuto cerebrale

epilettogeno ottenuto da pazienti con epilessia farmacoresistente come epilessia del lobo temporale, displasie corticali (Sisodiya et al, 2002; Aronica et al, 2003, Aronica et al, 2004; Tishler et al, 1995) e tumori benigni disembrigenetici (Aronica et al, 2003) e da modelli sperimentali di epilessia temporale (Loscher, 2002). È stato inoltre dimostrato che l'induzione di una singola crisi epilettica è in grado di determinare un aumento transitorio di espressione delle proteine MDR (Rizzi et al, 2002) in animali trattati acutamente con sostanze epilettogene, mentre il trattamento cronico con farmaci antiepilettici è in grado di aumentare l'espressione endoteliale di proteine MDR. Infine, il trattamento con farmaci inibitori della funzione delle proteine MDR è in grado di ridurre la concentrazione intracerebrale dei farmaci antiepilettici in animali trattati cronicamente (Funao et al, 2003; Potschka et al, 2004; Summers et al, 2004). Tuttavia non tutti gli antiepilettici sono substrato delle MDR, vi sono dunque altre condizioni genetiche determinanti come effetto finale inefficacia terapeutica. Ad esempio potremmo citare i canali ionici del sodio voltaggio dipendenti, responsabili della generazione del potenziale d'azione nel neurone, che svolgono un ruolo centrale nella generazione dell'attività epilettica parossistica. Il polimorfismo dei geni codificanti per le varie subunità del canale del sodio potrebbe spiegare la presenza di farmacoresistenza *ab*

initio, come accade in pazienti affetti da epilessia mioclonica severa dell'infanzia o in pazienti con epilessia generalizzata e crisi febbrili plus (GEFS +), in cui sono state riscontrate mutazioni *de novo* del gene per la subunità alfa 1 dei canali del sodio (SCN1A), cui si legano antiepilettici come la carbamazepina e la fenitoina. Un'ampia serie di ricerche, sia nell'uomo che in modelli sperimentali, ha evidenziato che il ripetersi delle crisi si accompagna a modifiche strutturali del canale del sodio che lo rendono progressivamente insensibile all'azione dei suddetti due farmaci, con comparsa di farmacoresistenza tardiva.

I recettori GABA-A costituiscono un importante bersaglio dell'azione di molti AEDs. E' possibile che il ripetersi di crisi determini progressive modificazioni plastiche del recettore GABA-A con conseguente potenziamento della sensibilità allo zinco e riduzione della sensibilità ad alcuni AEDs GABAergici. Tale meccanismo potrebbe contribuire alla comparsa di farmacoresistenza tardiva. E' stata inoltre dimostrata la presenza di un polimorfismo del gene per il recettore 1 del GABA (G1465A) in un gruppo di pazienti con epilessia del lobo temporale non lesionale (Gambardella et al, 2003).

Una menzione particolare meritano le patologie disimmuni: si veda l'encefalite di Rasmussen, caratterizzata da crisi focali farmacoresistenti e

progressivo danno strutturale a carico di un emisfero, imputabili ad un processo disimmune, in cui i principali responsabili sarebbero autoanticorpi anti GluR3; gli anticorpi contro la glutammico-decarbossilasi (GAD-A), che converte l'acido glutammico in GABA, sono ugualmente stati riscontrati in pazienti con epilessia e altre sindromi neurologiche (atassia cerebellare, sindrome dell'uomo rigido), pur restando al momento controverso il loro ruolo nella genesi di farmacoresistenza (Kwan et al, 2000).

SUDEP (da Shorvon e Tomson, 2011)

Come già accennato sopra, il principale problema legato alla farmacoresistenza in epilessia è rappresentato da un aumento di mortalità. In tale sede non andremo a discutere delle problematiche legate alle morti per suicidio o per patologie concomitanti legate magari ai farmaci o alla sindrome stessa, ma di una condizione che, più che causa di morte, è essa stessa un evento clinico: la morte improvvisa in epilessia o SUDEP.

L'acronimo sta ad indicare “una morte improvvisa, inaspettata, con o senza testimonianza, non dovuta a traumi o annegamento, con o senza evidenza di una crisi che l'ha preceduta, escludendo lo stato di male epilettico ed ogni altra causa anatomica o tossicologica all'autopsia” (Nashef, 1997).

Comunemente se l'autopsia è stata eseguita si parla di "SUDEP definita", in caso contrario di "probabile". Si tratta di una definizione ampia che incorpora diverse cause. Effettivamente sarebbe auspicabile separare i casi in cui è stata documentata una crisi immediatamente prima della morte da quelli in cui non si ha tale riscontro, dal momento che la fisiopatologia è sicuramente non del tutto simile. Ma non è superfluo ricordare che, nella pratica clinica, le informazioni riguardo l'esatta modalità dell'evento sono spesso piuttosto scarse, pertanto sarà auspicabile parlare di "SUDEP possibile".

Per quanto riguarda l'epidemiologia, dati ricavati sulla popolazione statunitense rivelano che la morte improvvisa è venti volte più frequente negli epilettici rispetto alla popolazione generale (Ficker et al. 1998). L'incidenza varia da 0.9-2.3/1000 persone/anno nella popolazione epilettica generale, sale a 1.1-5.9 nei pazienti farmacoresistenti, per portarsi a 6.3-9.3 nei pazienti candidati alla chirurgia e/o che continuano a presentare crisi dopo l'intervento (Walczak et al, 2001; Timmings 1993; Annegers et al, 2000; Dasheiff RM, 1991; Hennessy et al, 1999). Nella popolazione di epilettici seguiti c/o i centri di riferimento la SUDEP è la principale causa di morte, provocando dal 10 al 50% dei decessi (Lip e Brodie, 1992, Kloster et Engelskjøn, 1999).

I fattori di rischio della SUDEP sono stati analizzati in studi caso-controllo con pazienti epilettici viventi come controlli, o con epilettici deceduti per altre cause. Gli studi maggiormente informativi sono i primi, tuttavia i pochi casi di SUDEP documentati in ogni studio hanno impedito un'analisi accurata di tutti i fattori di rischio, ad eccezione dei pochi principali. Per ovviare a tali limitazioni il gruppo di Epidemiologia dell'ILAE (lega internazionale contro l'epilessia) ha raccolto i dati da quattro dei principali studi caso-controllo (Nilsson et al, 1999, Walczak et al, 2001; Langan et al, 2005; Hitiris et al, 2007) e ne ha illustrato i risultati (Hesdorffer et al, 2011). L'analisi combinata di questi studi, che comprendeva 289 casi di SUDEP e 958 controlli viventi, ha identificato come principale fattore di rischio la presenza di crisi tonico-cloniche generalizzate (GTCS). Infatti, rispetto ai pazienti che non presentano questo tipo di crisi, il rischio relativo era di 2.94 in chi ne manifestava 1-2/anno, 8.28 in chi ne manifestava 3-12/anno, 14.51 in chi ne presentava più di 50/anno. Inoltre tale metanalisi ha documentato che il rischio era maggiore nei maschi rispetto alle femmine (1.4), in pazienti con esordio della patologia prima dei 16 anni (1.7) in chi aveva una storia di malattia più lunga di 15 anni (2) ed infine in chi era costretto ad assumere politerapie: tale aspetto va spesso di

pari passo con il maggior numero di GTCS e conseguentemente con la farmacoresistenza.

Per quanto riguarda i meccanismi fisiopatologici della SUDEP molto è stato ipotizzato ed il primo meccanismo chiamato in causa è quello dell'ipoventilazione, quindi una causa primaria respiratoria. E' senz'altro da citare uno studio (Johnston et al, 1995) in cui 5 di 13 pecore morirono entro cinque minuti dall'esordio delle crisi. Nelle pecore decedute venne riscontrata un'aumentata pressione in atrio sinistro ed in arteria polmonare, oltre che ad un edema polmonare di entità moderata. Negli animali morti inoltre era stata registrata una depressione respiratoria, a differenza di quelli sopravvissuti. Gli autori conclusero indicando l'ipoventilazione quale fattore scatenate la morte. Un altro studio (Johnston et al, 1997) diede un ruolo chiave alle apnee centrali ed ostruttive, in assenza di aritmie cardiache. Il primo studio clinico in cui tali esperimenti inclusero una registrazione elettroencefalografica risale al 1996 (Nashef et al). Vennero registrate 47 crisi in 17 pazienti, e l'apnea (prevalentemente di tipo centrale) fu documentata in 20 crisi, incluse tutte quelle tonico-cloniche. La pO_2 scese a meno del 85% in 10 soggetti, in cui si registrò anche un incremento della frequenza cardiaca di circa 40 battiti/minuto,

mentre in quattro pazienti, sempre nel contesto delle già citate modificazioni respiratorie, una bradicardia auto-risolventesi.

Le apnee centrali con o senza componente ostruttiva iniziarono dunque ad assumere un ruolo chiave nella fisiopatologia della morte improvvisa, anche in considerazione del fatto che questa capita spesso durante il sonno. La supervisione del soggetto, spesso bambino, non è un fattore da trascurare, in quanto la stimolazione durante il sonno (ad es. con uno scossone) può interrompere l'apnea e ripristinare il normale ritmo cardiorespiratorio (Nashef et al, 1998).

Tuttavia, non essendo le modificazioni respiratorie sufficienti a spiegare la maggior parte dei casi di SUDEP, sempre maggior risalto hanno assunto i disturbi del ritmo cardiaco che vengono registrati nelle crisi. In effetti negli studi citati prima non erano stati posti in essere dispositivi sofisticati di monitoraggio in tal senso.

L'asistolia è documentata nello 0.27-0.40% delle crisi registrate in centri di riferimento. Rocamora et al (2003) riportarono, in uno studio includente 1244 pazienti, undici crisi in cinque soggetti (0.40%) associate ad una asistolia di durata compresa tra 4 e 60 secondi, ed ad una crisi parziale secondariamente generalizzata. Due dei cinque pazienti erano affetti da patologia cardiaca preesistente. In un secondo studio svolto su 6825

pazienti (Schuele et al, 2007) l'asistolia durante la crisi venne documentata in 16 crisi di 10 soggetti (0.27%).

Ciò che inoltre emerge da questi studi è che la quasi totalità dei pazienti in cui era stata registrata l'asistolia aveva recentemente ridotto la posologia dei farmaci, e che le crisi in questione erano parziali complesse con origine dai lobi temporale o frontale. Nelle crisi frontali il disturbo del ritmo era tosto precipitato in un arresto respiratorio, nelle crisi temporali la secondaria generalizzazione consisteva in una crisi atonica tipo "drop attack", il che ha suggerito agli autori di far molta attenzione alle crisi con caduta repentina o agli episodi di drop attack (quindi non interpretati come crisi) perché questi possono nascondere un disturbo del ritmo cardiaco potenzialmente fatale. E' stato riportato infatti il caso di un paziente con crisi atoniche la cui frequenza si è drasticamente ridotta dopo impianto di un pacemaker (Rossetti et al, 2005). Infine, una bradiaritmia è stata documentata in registrazioni profonde nella corteccia orbito-frontale, insulare, temporale anteriore (Oppheimer, 1992).

Dunque quanto emergerebbe da questi studi è che le aritmie cardiache siano piuttosto rare, ma la loro prevalenza in realtà potrebbe essere assai superiore, dal momento che esse potrebbero capitare solo in una minoranza di crisi in ciascun paziente. Minoranza che potrebbe comunque essere

fatale. La registrazione elettrocardiografica per mesi, come nel caso di pazienti con impianto di loop-recorder, potrebbe rivelare numeri ben più significativi. Nello studio di Rugg-Gunn (2004) vennero registrate 377 crisi in 19 pazienti, su un totale di 220000 ore registrate per soggetto. Ben quattro pazienti presentarono asistolia o comunque periodi di bradicardia prolungati, il che ha successivamente comportato l'impianto di un pacemaker. Tre di essi, infine, avevano presentato periodi di asistolia che ne avrebbero potuto determinare la morte. Solo poche crisi in realtà erano associate ad aritmie.

Al di là di questi riscontri, è palese che non tutti gli individui farmacoresistenti muoiono per SUDEP. Quindi ci sono fattori predisponenti, che sono stati studiati in vari trials, e che hanno condotto alla conclusione che il soggetto suscettibile è, come già accennato, un paziente con lunga storia di epilessia, insorta durante l'infanzia o l'adolescenza, che presenta crisi tonico-cloniche, ovvero si tratta spesso di epilessie inquadrare in sindromi più complesse. E' stato osservato che in soggetti pluri-farmacoresistenti è più probabile riscontrare vacuolizzazioni sub endocardiche, suggestive di ischemia cronica, e anomalie del sistema di conduzione (Natelson et al, 1998; Opekin et al, 2000), il che chiaramente è un fattore di rischio per SUDEP.

Grande interesse è stato rivolto alle sindromi da QT lungo. Le crisi di per sé stesse possono prolungare l'intervallo QT specialmente se la scarica abnorme coinvolge la regione dell'insula (Oppheneimer, 2006). Le sindromi genetiche sono associate a morte improvvisa a causa del rischio di torsioni di punta. Si tratta di canalopatie, alcune delle quali associate ad epilessia. E' stata descritta una famiglia con epilessia e mutazione del gene SCN1A, in cui due individui morirono per SUDEP (Hindocha et al, 2008). Esistono otto geni che causano QT lungo (tra cui SCN5A, KCNQ1, KCNH2, KCNE1 e KCNE2). Mutazioni di SCN5A e KCNH2 sono state riscontrate in sei casi di SUDEP (Tu et al, 2011); in topi knock-out KCNQ sembra rappresentare un gene di suscettibilità a questa condizione (Glasscock et al, 2010). La sindrome di Takotsubo è stata ugualmente associata ad epilessia e ad almeno un caso di decesso "near SUDEP" (Dupuis et al, 2011).

Infine un ulteriore fattore che deve mettere il medico in allarme è la durata del periodo di elettrodecremento registrato subito dopo una crisi che, secondo uno studio di Lhatoo (2010), sembra correlare positivamente con l'incidenza di SUDEP.

A fronte di queste considerazioni ci sarebbe da dire: quali strategie possono essere adottate per ridurre al minimo il rischio? E che tipo di informazione dare in merito al paziente?

Possiamo limitarci a ricordare alcune regole di *good-clinical-practice*.

- Controllare la frequenza delle crisi non solo con i farmaci, che devono essere assunti regolarmente, ma anche con delle sane abitudini (evitare le bevande alcoliche e la deprivazione di sonno)
- Quando si sostituisce un farmaco il paziente deve essere informato che la fase di titolazione è a rischio; sempre meglio introdurre un nuovo farmaco prima di levare del tutto quello precedente
- I pazienti che presentano crisi durante il sonno dovrebbero essere sorvegliati da terzi
- Attenzione ai farmaci che possono avere effetti sul ritmo cardiaco, in particolare quelli che agiscono sui canali al sodio come lamotrigina e carbamazepina; la prima è stata chiamata in causa in casi di SUDEP (Hesdorffer et al, 2011)
- Attenzione ai segnali di allarme: crisi tonico-cloniche prolungate associate a bradiaritmia, cianosi, apnea; crisi atoniche; il paziente deve essere attentamente sorvegliato dopo una crisi fino al completo recupero dello *statu quo ante*
- Tener presente, nella scelta di una terapia, i rapporti rischi/benefici e renderne edotto il paziente ed il caregiver.

Nei pazienti farmaco-resistenti la chirurgia dell'epilessia o, nei casi inoperabili, la stimolazione del nervo vago dovrebbero essere presi in considerazione. La prima ha lo scopo di asportare la lesione epilettogena e di rendere il paziente potenzialmente libero da crisi. Il rischio di SUDEP in questa classe di pazienti decresce in misura proporzionale alla riduzione delle crisi. Per quanto riguarda la stimolazione vagale ci sono da osservare due facce della medaglia: la prima riguarda la potenziale tendenza alla bradicardia indotta dallo stimolatore: in realtà alterazioni del ritmo cardiaco sono state riscontrate solo in sala operatoria al momento dell'impianto, e non dopo. Chiaramente grande cautela deve essere prestata ai pazienti con condizioni patologiche preesistenti. Ma è stato anche osservato (Cadeddu et al, 2010) che la stimolazione vagale sarebbe in grado di indurre modificazioni dell'*heart rate variability* (HRV) attraverso un sofisticato meccanismo di riequilibri del sistema orto-parasimpatico, che sarebbe intrinsecamente compromesso in epilettici non-responders. Questo in realtà, se suffragato da studi più ampi, potrebbe portare alla stimolazione vagale un ruolo addirittura "protettivo" dalla SUDEP.

Nei pazienti in cui sono state documentate (o anche semplicemente riferite dal caregiver) crisi particolarmente prolungate associate ad apnea

e cianosi è senz'altro opportuna una valutazione cardiologica approfondita ed eventualmente un impianto di loop-recorder: qualora venissero confermate bradiaritmie o asistolie inter- e postcritiche i soggetti in questione saranno candidati all'impianto di un pacemaker.

Per quanto sarebbe corretto informare ogni paziente epilettico, al momento della diagnosi, dell'aumentato rischio di morte improvvisa legato intrinsecamente alla patologia, è da notare che, quasi in ogni parte del mondo, questo non viene fatto, per diversi motivi. In primo luogo perché l'incidenza reale non è ben definita a causa di fattori confondenti e della mancanza di testimonianze e spesso di esame autoptico, come già detto; in secondo luogo per non creare ansie/preoccupazioni che potrebbero incidere negativamente sulla qualità di vita del paziente più della malattia stessa; ed infine perché, a parte le sindromi epilettiche geneticamente identificate o comunque più note, è spesso difficile prevedere, al momento della diagnosi, se e quando si svilupperà una farmacoresistenza.

LA METABOLOMICA: DALL'ANALISI DEL PROFILO METABOLICO ALLA PREDITTIVITA' DI FARMACORESISTENZA

Tutte le metodiche caratterizzate dal suffisso “omica” si riferiscono ad una visione olistica del panorama delle macromolecole biologiche. La genomica rappresenta lo studio delle sequenze codificanti e non del DNA, mentre la proteomica è lo studio delle proteine che caratterizzano l'organismo nelle sue attività fisiologiche e fisiopatologiche. La metabolomica, termine apparso per la prima volta in un lavoro del 1999, è lo *studio specifico e complesso delle uniche impronte chimiche lasciate da caratteristici processi cellulari*: nello specifico, lo studio dei loro profili metabolici a molecole piccole. Il metaboloma rappresenta l'insieme di tutti i metaboliti di un organismo biologico, che sono i prodotti finali della sua espressione genica. E così, mentre i dati dell'espressione genica dell'mRNA e delle analisi proteomiche non spiegano esaurientemente ciò che potrebbe succedere in una cellula, il profilo metabolico può fornire un'istantanea della fisiologia di quella cellula. Anche la parola metabonomica è di uso corrente, in particolare nel contesto di valutazione della tossicità farmacologica. Ci sono alcune discussioni sulle differenze tra 'metabolomica' e 'metabonomica'; in

generale viene usato più comunemente il termine 'metabolomica'. La differenza tra i due termini non è collegata alla scelta di una piattaforma analitica: sebbene la metabonomica sia più associata alla spettroscopia dell'NMR (Nuclear Magnetic Resonance) e la metabolomica con le tecniche a base spettrometrica, è semplicemente per via degli usi tra gruppi diversi che questi termini sono diventati di uso comune. Mentre non c'è ancora nessun accordo, è sempre più in crescita il consenso che sostiene che le differenze risiedano nel fatto che 'metabolomica' metta maggiore enfasi sul profilo metabolico complessivo, mentre 'metabonomica' viene usato per descrivere modifiche metaboliche causate da una perturbazione biologica. (in pratica c'è ancora un ampio grado di sovrapposizione nell'utilizzo dei termini e spesso sono usati come sinonimi). La metabolomica è stata ideata nel 1970 da Arthur Robinson. Analizzando i modelli cromatografici "confusi" di urina di soggetti a cui era stata somministrata la Vitamina B6, Robinson si rese conto che centinaia o migliaia di costituenti chimici nell'urina contenevano informazioni molto utili. Sebbene non fosse chiamata metabolomica, il primo elaborato su questo tema era intitolato "Quantitative Analysis of Urine Vapor and Breath by Gas-Liquid Partition Chromatography", di Robinson e Pauling nel 1971 e pubblicato

nella rivista *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Da allora Robinson ha fatto pubblicare numerosi altri elaborati sui modelli quantitativi sugli umori corporei. Robinson e i suoi colleghi hanno identificato diverse malattie e condizioni parafisiologiche basate su questi dati. Si aspettava che l'analisi dei fluidi corporei potesse essere ottimizzata per farne uno strumento di misurazione a basso costo, importante dal punto di vista medico e ricco di informazioni per misurare modifiche guidate dal metabolismo nello stato funzionale, anche quando i costituenti chimici sono tutti nell'“intervallo normale”.

L'idea centrale concepita da Robinson era che i dati ricchi di informazioni che riflettono lo stato funzionale di un sistema biologico complesso risiede nel modello quantitativo e qualitativo dei metaboliti nei fluidi corporei. Venti anni dopo altri iniziarono a capire il valore di questo approccio e l'interesse in materia venne sollevato. La stessa metabolomica venne conosciuta negli anni '90 (il primo elaborato che usa la parola metaboloma è del gruppo di Oliver (1998)). Molti dei metodi bioanalitici usati per la metabolomica sono stati adattati (o in alcuni casi semplicemente adottati) dalle tecniche biochimiche esistenti. Due caratteristiche che accomunano la ricerca metabolomica sono: 1) i metaboliti sono descritti senza pregiudizi nei confronti di uno specifico

metabolita o gruppo di metaboliti e 2) le relazioni tra i metaboliti sono caratterizzate al momento principalmente da metodi a variante multipla.

Dunque la metabolomica è una tecnica esplorativa volta a determinare i profili metabolici dinamici indotti dai processi biologici nei sistemi viventi, in modo tale da descrivere i meccanismi di regolazione funzionale del sistema in oggetto sia in relazione a fattori genetici che ambientali. I risultati che otterremo rappresentano ciò che “sta accadendo” in quel momento nel nostro sistema, mentre genomica e proteomica ci dicono semplicemente “cosa potrebbe accadere”. Dal momento che i processi biologici non sono “isolati”, ma influenzati da numerose variabili, l’analisi del profilo metabolico consente di investigare su meccanismi esterni (si pensi ad una variabile come la dieta) che interagiscono con il sistema in esame producendo modificazioni della sua attività. Per tale motivo la metabolomica è stata definita da Nicholson (1999) “la valutazione quantitativa della risposta metabolica dei sistemi viventi in seguito a stimoli fisiopatologici o a modificazioni acquisite del genoma”. Una delle sfide della biologia sistemica è di integrare la proteomica, la trascrittomica e le informazioni metabolomiche per avere una visione d’insieme più completa degli organismi viventi.

La considerazione alla base dell'approccio metabolomico, sulla quale anche il nostro studio è basato, è che ogni malattia o alterazione fisiopatologica dell'organismo possiede un proprio pattern metabolico che consente di identificarla anche quando è ai primissimi stadi. Tale pattern è rappresentato dai metaboliti prodotti dal sistema "malato", che sono differenti da quelli del "fisiologico".

IL NOSTRO STUDIO

Materiali e Metodi

L'obiettivo del nostro studio è quello di identificare un pattern metabolico discriminativo tra epilettici responders e non, e di iniziare ad investigare su quelli che sono i pathways principali di differenziazione. Trattandosi di un lavoro preliminare, sarebbe stato troppo lungo reclutare solo pazienti di nuova diagnosi, metterli in terapia e seguirli nel tempo, dal momento che spesso occorrono anni prima che la farmacoresistenza eventualmente si sviluppi.

Abbiamo quindi preso in esame pazienti con una diagnosi clinica definita in quanto l'insorgenza della malattia risaliva a parecchi anni prima, e dei quali potevamo dire con certezza a che gruppo appartenevano.

pz	s	età	esordio	clinica	terapia
FS					
1	M	38	N	GEN	VPA
2	F	52	I	PSG	CBZ
3	F	62	50	PSG*	OXCS
4	M	67	4	PSG	CBZ+VPA
5	M	59	17	PSG	CBZ
6	M	58	20	PSG*	CBZ+LEV
7	F	26	23	PSG	CBZ
8	F	21	16	PSG	TPM
9	M	18	3	PSG*	CBZ
FR					
1	F	63	2	PSG	LEV
2	F	54	9	PSG	LEV+OXC+ZNS
3	F	38	9	PSG	LTG
4	F	18	I	EMG	LTG
5	M	40	10	PSG	CBZ+TPM
6	M	54	I	PSG	OXC+PB
7	F	57	I	PSG	PB+OXC
8	M	62	46	PSG*	LEV

9	F	39	12	PSG	LEV+OXC+PB
10	M	48	6	PSG	OXC+ZNS+TPM+PB

Tab. 1: Legenda. PB: fenobarbital; LTG: lamotrigina; LEV: levetiracetam; CBZ: carbamazepina; OXC: oxcarbazepina; TPM: topiramato; VPA: ac. valproico; ZNS: zonisamide; GEN: epilessia generalizzata; PSG: epilessia parziale secondariamente generalizzata; EMG: epilessia mioclonica giovanile; FS: farmacosensibili; FR: farmacoresistenti. I: età infantile n.a.s.; N: età neonatale.

Il gruppo dei pazienti responders è costituito da individui per lo più in monoterapia (in un paio di casi con due farmaci), affetti da epilessia parziale secondariamente generalizzata (tranne uno). In tre casi l'epilessia è secondaria, rispettivamente a: 1) ictus cerebrale per il paziente n. 3, che oltre all'oxcarbazepina assume anche acido acetilsalicilico 100 mg/die; 2) tumore benigno ora asportato (pz n.6) e 3) displasia corticale (pz n. 9).

Nel secondo gruppo è da rilevare che alcuni pazienti assumono un solo farmaco: chiaramente non si tratta dell'unica terapia assunta, si tratta di persone che, pur avendo provato farmaci di vecchia e nuova generazione in svariate combinazioni, le hanno interrotte perché inefficaci o per troppi effetti collaterali, quindi mantengono una monoterapia a scapito però di un controllo delle crisi piuttosto scarso. Anche in questo gruppo abbiamo una epilessia secondaria a tumore maligno con exeresi incompleta (pz n. 8).

I pazienti che, come detto, afferivano al Nostro Centro per la Diagnosi e Cura dell'Epilessia dell'Adulto da molti mesi o anni, sono stati invitati, dopo consenso informato, ad eseguire prelievi di campioni di sangue ed urine in tempi da noi preventivamente stabiliti. Ogni soggetto doveva esser a digiuno da almeno 6 ore e aver seguito, nelle 48 ore precedenti, una dieta che fosse per tutti il più possibile simile. Ciò onde limitare, per quanto possibile, la variabilità metabolica indotta dall'assunzione di alimenti diversi, specialmente sulle urine.

L'analisi è stata eseguita su campioni di sangue ed urine di un piccolo gruppo di soggetti sani come controllo.

Ad ogni paziente è stato prelevato un campione di sangue, in provetta EDTA, ed uno di urine. Il campione di sangue è stato, quanto prima, centrifugato per la separazione del plasma. Il plasma è quindi stato aliquotato in campioni di 500 μ l e conservato a -80°C fino al momento dell'analisi. Il campione di urine veniva, quanto prima, centrifugato per la separazione del sedimento e quindi conservato a -80°C per le successive analisi.

Prima dell'analisi all'NMR i campioni di plasma sono stati ulteriormente centrifugati a 12000 per 5 minuti a -4°C , prelevato 150 μ l di surnatante,

a cui sono stati aggiunti 50 μ l di TSP (3-(Trimetilsilil)-propionic acid-D4, sale di sodio) 0,5 mM e 400 μ l di Tampone Fosfato.

L'analisi NMR è stata eseguita mediante uno spettrometro Varian Inova 400 MHz equipaggiato con un probe inverso FGP a tripla risonanza. Gli spettri sono stati acquisiti con un intervallo di punti di 64 KB, con FID da 128 scansioni su una larghezza spettrale di 8 KHz usando la sequenza tnnoesy di Varian. Il segnale dell'acqua è stato soppresso mediante un impulso di saturazione nel ritardo di rilassamento di 5 secondi con pw=8.

I dati grezzi sono stati esportati ed elaborati mediante Mnova con cui si è costruita la matrice di analisi basata sulla riduzione dei valori di chemical shift mediante una matrice di bins di eguale ampiezza (0,004 ppm) su cui si sono calcolate le aree integrali normalizzate all'intera area dello spettro. La matrice 27x245 è stata integrata con le colonne delle variabili descrittive (sesso, età, ...) da usare come covariate e confounders del modello.

La matrice di dati è stata così importata in SIMCA+12 per la costruzione di modelli discriminanti e classificatori. Si segnala che ad oggi sono stati prelevati 142 campioni (urine e plasma) per 21 soggetti a tempi

successivi distanziati di un mese. L'analisi è stata eseguita su 74/142 campioni per 19/21 soggetti con $^1\text{H-NMR}$.

Risultati

Le differenze metaboliche tra le due classi dei responder e non responder sono evidenziate da questo “contribution plot”.

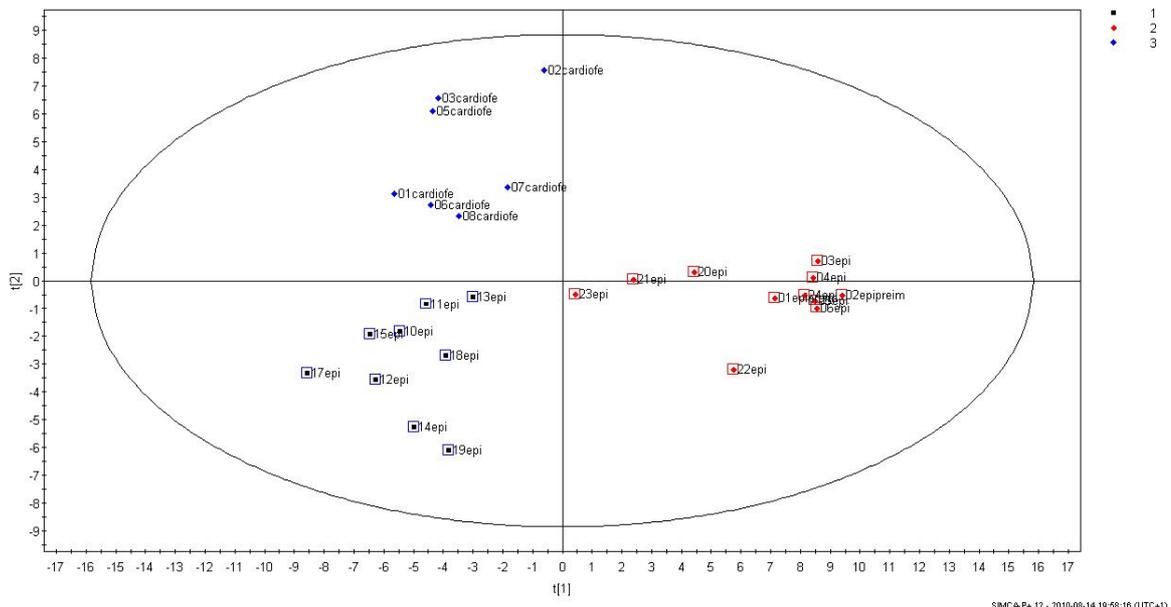


Fig.1: Analisi $^1\text{H-NMR}$ di pz epilettici farmaco-responder e farmacoresistenti, paragonati ad un gruppo di sani (in alto).

Le regioni di chemical shift in cui si trovano i contributi sopra soglia di sicurezza individuano una impronta metabolica costituita da:

	Name
HMDB00294	Urea
HMDB00254	Succinic acid
HMDB01522	Methylguanidine
HMDB01431	Pyridoxamine
HMDB00469	5-Hydroxymethyluracil
HMDB01906	2-Aminoisobutyric acid
HMDB00164	Methylamine
HMDB02303	Dimethylsulfide
HMDB00925	Trimethylamine N-oxide
HMDB00292	Xanthine

Tab. 2

Partendo dai metaboliti rilevati si trovano le interazioni tra alcuni pathways fondamentali quali quello del metabolismo del glutammato:

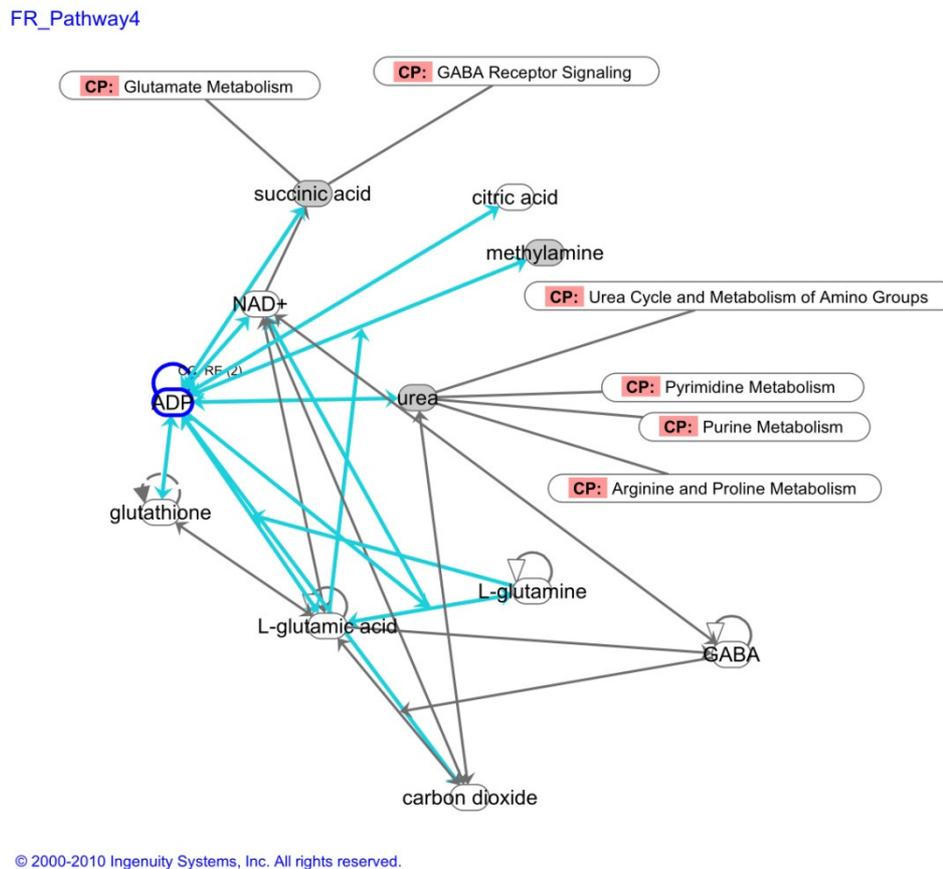


Fig.2: Vie principali del metabolismo del glutammato

E nel metabolismo del glutammato si evidenziano i collegamenti con:

butanoato, cisteina, fenilalanina, tirosina, triptofano, istidina, acidi dicarbossilici e metabolismo dei corpi chetonici.

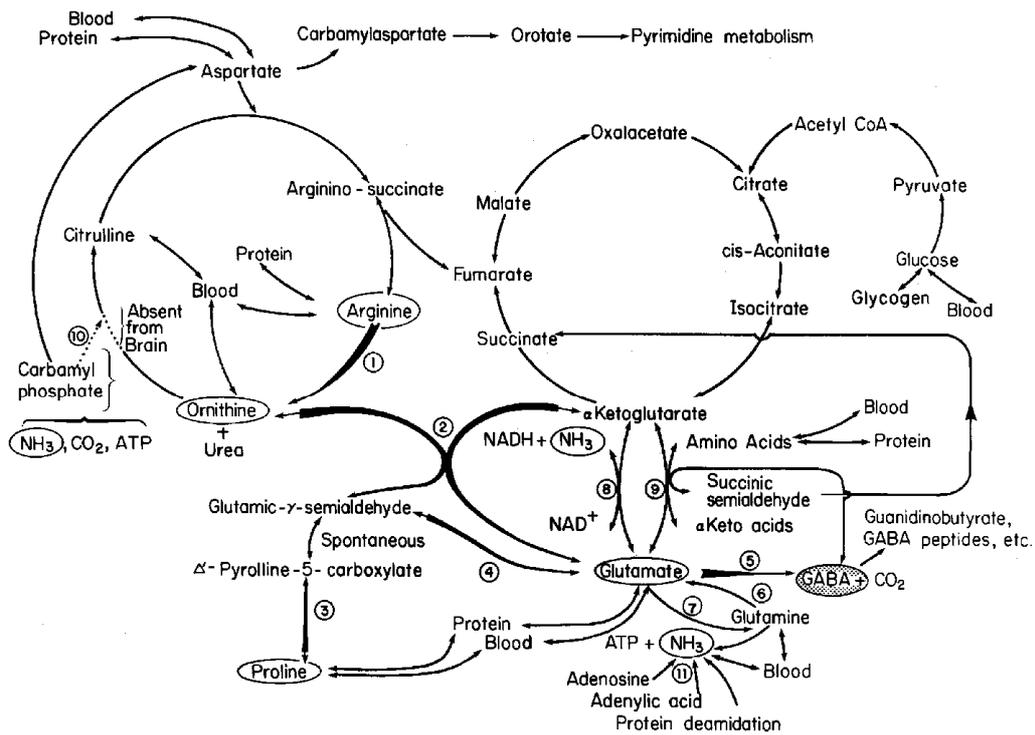


Fig.3 : Via del metabolismo del GABA

DISCUSSIONE

Quello che a colpo d'occhio emerge immediatamente è che i due gruppi da noi preventivamente classificati come responders e non-responders segregano in due aree distinte del diagramma, dimostrando che effettivamente esiste un pattern metabolico di cui è stata appunto identificata l'impronta che li caratterizza.

Il risultato è ancora più significativo se si considera l'alta variabilità individuale inter- e soprattutto intra-gruppo, come età sesso, sindrome epilettica e soprattutto farmaci assunti nel corso della vita. In particolare il gruppo dei farmacoresistenti, dopo anni di trattamento con i farmaci più disparati, non poteva certo far presagire una impronta metabolica comune!

Non possiamo non azzardare l'ipotesi che questa differenziazione sarebbe stata possibile già nelle prime fasi della loro malattia, quando i due gruppi erano senz'altro più omogenei se non altro come terapia. E a conferma di questa ipotesi anche i primi dati sperimentali sui campioni di urine hanno documentato una tendenza alla segregazione del gruppo degli epilettici da quello dei soggetti sani, come da figura:

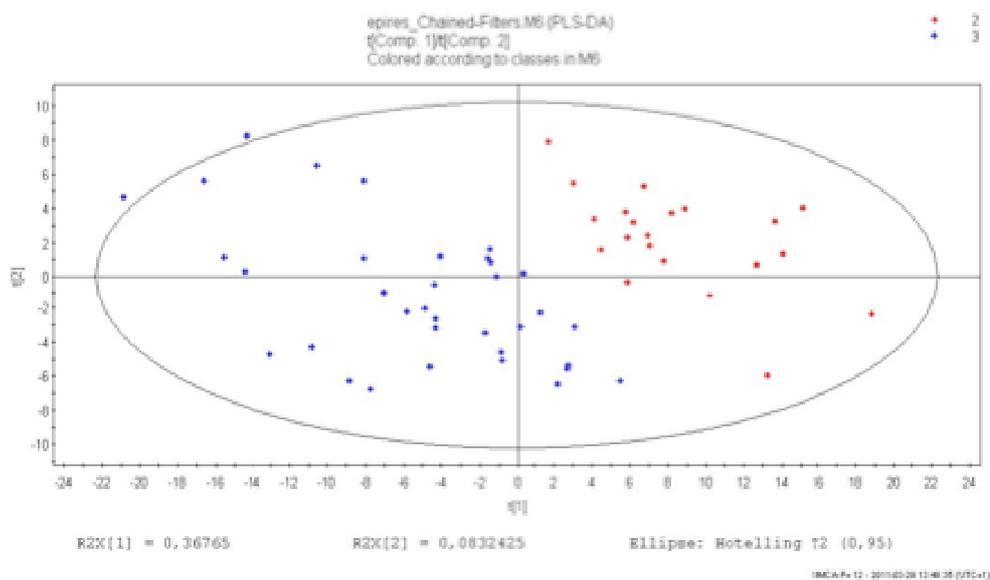


Fig.4: Analisi $^1\text{H-NMR}$ di campioni di urine di soggetti sani ed epilettici

Anche in questo caso quindi si è documentata una impronta metabolica differenziativa costituita da acido fumarico, urea, glicina, acido formico, dimetilsulfide, D-glucuronolattone, Di-metil-allil-pirofosfato, 4-metil-catecolo.

La successiva considerazione riguarda il peso di tale impronta metabolica differenziativa specialmente in relazione ad eventi avversi cardiovascolari (aritmie e “predisposizione” al rischio di morte improvvisa).

Abbiamo già detto che le epilessie del lobo temporale sono state utilizzate come modello di farmacoresistenza. Ebbene, l’amigdala e le strutture temporali mesiali proiettano su ipotalamo, nucleo parabrachiale mediale, locus coeruleus, nucleo del tratto solitario e nuclei ventromediali del ponte.

Pertanto è chiaro che le crisi che originano dal lobo temporale possono causare anche una destabilizzazione del sistema nervoso autonomo. In animali da esperimento è stato da tempo identificato il lock-step-phenomenon (LSP), caratterizzato dalla sincronizzazione delle scariche corticali interictali con le scariche delle fibre postgangliari orto- e parasimpatiche legate all'attività cardiaca, con conseguenti modificazioni di frequenza, ritmo, gittata e pressione arteriosa (Lathers et al, 1987). Il fenomeno è stato collegato alla SUDEP attraverso diversi meccanismi: in primis l'eccessiva stimolazione simpatica di un cuore probabilmente già danneggiato dalle ripetute scariche di catecolamine durante le crisi; in secondo, l'irregolarità delle scariche succitate, che porterebbe a repentine modificazioni della pressione e della gittata cardiaca; in terzo luogo, il crollo della pressione arteriosa stessa al termine della crisi, che può teoricamente condurre ad una aritmia mortale.

Il GABA-shunt (fig 3), cioè la via metabolica che porta alla formazione del GABA, neurotrasmettitore inibitorio, dal glutammato, neurotrasmettitore eccitatorio, è in questo profondamente coinvolto.

Vale la pena citare alcuni studi di ricerca di base (gruppo di Longhurst) che documentano il suo ruolo, e non solo, nella modulazione di effetti cardiovascolari indotti sperimentalmente.

La stimolazione dei recettori cardiopolmonari con fenilbiguanide (PBG) induce un riflesso cardiovascolare inibitorio, con riduzione della pressione arteriosa e della frequenza cardiaca mediata dai neuroni del sistema parasimpatico del nucleo ambiguo. Il blocco dei recettori GABA-A e degli oppioidi mediante gabazina e naloxone contrasta tale attività vagale riducendo l'insorgenza di bradicardia del 53 e del 73%, rispettivamente. Quindi da ciò se ne deduce che il riflesso vagale è mediato dalla modulazione di recettori GABAergici e degli oppioidi nel nucleo ambiguo (Tjen-A-Looi et al, 2001).

Analogamente studi dello stesso gruppo di lavoro avevano in precedenza documentato un coinvolgimento del circuito nucleo arcuato-sostanza grigia periacqueduttale-nuclei rostrali-ventrolaterali del midollo allungato nella modulazione del riflesso simpatico-inibitorio (causante un crollo della pressione arteriosa) indotto dall'elettrostimolazione di gatti anestetizzati. L'effetto sarebbe appunto mediato da GABA, oltre che da nocicettina ed oppioidi (Tien-A-Looi et al, 2007).

Del resto il ruolo del GABA shunt, o meglio di una sua disregolazione, nell'ippocampo di modelli sperimentali di epilessia farmaco-resistente è stato altresì dimostrato (TaeCheon Kang et al, 2003), consentendoci di spiegare la possibilità di una impronta metabolica differenziale degli amminoacidi

relativi nei pazienti farmacoresistenti rispetto ai responders, anche laddove non esista una alterazione morfologica delle strutture mesiali documentata alla risonanza magnetica.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Il limite principale dello studio è costituito dalla esigua numerosità del campione, che chiaramente non consente di affermare che tali risultati siano applicabili a gruppi ben più ampi di pazienti epilettici. A causa di ciò non è ancora stato possibile suddividere i pazienti in sottogruppi con caratteristiche più omogenee (ad esempio per localizzazione del focus epilettogeno laddove non sia possibile una esatta definizione della sindrome), il che potrebbe portare ad una miglior definizione del pattern metabolico discriminativo. Un punto a favore resta tuttavia il fatto che, a fronte di tanta variabilità intra-gruppo, si sia comunque riusciti a trovare un pattern metabolico differenziativo, per quanto costituito da svariate molecole, che consenta, dopo anni di trattamento, di identificare un paziente farmacoresistente.

Ulteriori studi, peraltro già in corso, consistono nel prelevare campioni di sangue ed urine di pazienti in prima diagnosi e di seguirli nel tempo, onde

valutare se già in tale primissima fase vi siano delle alterazioni metaboliche differenziali analoghe a quelle dei nostri due attuali gruppi.

Chiaramente il fatto di poter prevedere in anticipo quale sarà il destino di una epilessia ha un duplice risvolto: da un lato infatti, ben lungi dall'esercitare allarmismi sul paziente in oggetto, potrebbe condurre allo svolgimento di accurate indagini di secondo livello onde valutare il rischio di aritmie: ad es. tali pazienti potrebbero essere candidati all'impianto di un loop-recorder che permetta di monitorizzare frequenza e ritmo cardiaci anche nei periodi intercritici. La registrazione di alterazioni del genere li candiderebbe all'impianto di un pace-maker. E' evidente che l'impianto di un loop-recorder non possa al momento essere eseguito "a tappeto" su tutta la popolazione dei pazienti epilettici, ma solo in caso di disturbi del ritmo noti o comunque in caso di familiarità che faccia sospettare una sottesa alterazione genetica.

In secondo luogo, e forse è questo il risvolto più importante, la definizione di pattern metabolici discriminativi in pazienti epilettici potrebbe, se confermata da numeri più consistenti, permettere di aggiungere un importante tassello alle conoscenze dei meccanismi di farmacoresistenza. Dal momento che l'analisi metabolomica, come detto, è specchio e marker di un processo "corrente e dinamico" che avviene nell'organismo

esattamente nel tempo in cui viene svolta, nulla osta di pensare che interventi successivi possano portare alla correzione di quello “squilibrio” metabolico riportandolo nel binario del fisiologico e modificando la prognosi clinica del paziente.

BIBLIOGRAFIA

1. Abbott NJ, Khan EU, Rollinson CM, Reichel A, Janigro D, Dombrowski SM, Dobbie MS, Begley DJ. Drug resistance in epilepsy: the role of the blood-brain barrier. *Novartis Found Symp* 2002, 243:38–47.
2. Adjei P. Autonomic disfunction in epilepsy. PhD Thesis, University College London, 2010.
3. Annegers JF, Coan SP, Hauser WA, Leestma J. Epilepsy, vagal nerve stimulation by the NCP system, all-cause mortality, and sudden, unexpected, unexplained death. *Epilepsia*. 2000;41:549-53.
4. Aronica E, Gorter JA, Jansen GH, Van Veelen CW, Van Rijen PC, Leenstra S, Ramkema M, Scheffer GL, Scheper RJ, Troost D. Expression and cellular distribution of multidrug transporter proteins in two major causes of medically intractable epilepsy: focal cortical dysplasia and glioneuronal tumors. *Neuroscience* 2003, 118:417–429.
5. Aronica E, Gorter JA, Ramkema M, Redeker S, Ozbas-Gerceker F, Van Vliet EA, Scheffer GL, Scheper RJ, Van Der Valk P, Baayen JC, Troost D. Expression and cellular distribution of multidrug resistance-related proteins in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2004, 45:441–451.
6. Aronica E, Gorter JA, Van Vliet EA, Spliet WG, Van Veelen CW, Van Rijen PC, Leenstra S, Ramkema MD, Scheffer GL, Scheper RJ, Sisodiya SM, Troost D. Overexpression of the human major vault protein in gangliogliomas. *Epilepsia* 2003,44:1166–1175.
7. Avoli M, Williamson A. Functional and pharmacological properties of human neocortical neurons maintained in vitro. *Progr Neurobiol* 1996,48:519–554.
8. Berg AT, Levy SR, Novotny EJ, Shinnar S. Predictors of intractable epilepsy in childhood: a case-control study. *Epilepsia*. 1996;37:24-30.

9. Blumcke I, Thom M, Wiestler OD. Ammon's horn sclerosis: a maldevelopmental disorder associated with temporal lobe epilepsy. *Brain Pathol* 2002, 12:199–211.
10. Cadeddu C, Deidda M, Mercuro G, Tuveri A, Muroni A, Nocco S, Puligheddu M, Maleci A, Marrosu F. Cardiovascular modulation during vagus nerve stimulation therapy in patients with refractory epilepsy. *Epilepsy Res.* 2010;92:145-52.
11. Camfield PR, Camfield CS. Antiepileptic drug therapy: when is epilepsy truly intractable? *Epilepsia.* 1996;37 Suppl 1:S60-5.
12. Cascino GD. Intractable partial epilepsy: evaluation and treatment. *Mayo Clin Proc.* 1990;65:1578-86.
13. Copp AJ, Harding BN. Neuronal migration disorders in humans and in mouse models an overview. *Epilepsy Res* 1999,36:133–141.
14. Dasheiff RM. Sudden unexpected death in epilepsy: a series from an epilepsy surgery program and speculation on the relationship to sudden cardiac death. *J Clin Neurophysiol.* 199;8:216-22.
15. De Curtis M. Meccanismi di farmacoresistenza. *Neurol Sci* 2005, 26:S1–S4
16. Dupuis M, van Rijckevorsel K, Evrard F, Dubuisson N, Dupuis F, Van Robays P. Takotsubo syndrome (TKS): a possible mechanism of sudden unexplained death in epilepsy (SUDEP). *Seizure.* 2012;21:51-4.
17. Elger CE. Pharmacoresistance: modern concept and basic data derived from human brain tissue. *Epilepsia* 2003, 44:9–15.
18. Engel J JR. Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 1996, 26:141–150.
19. Falconer MA, Serafetidines EA, Corselis JAN. Etiology and pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Arch Neurol* 1964,10:232–248.
20. Ficker DM, So EL, Shen WK, Annegers JF, O'Brien PC, Cascino GD, Belau PG. Population-based study of the incidence of sudden unexplained death in epilepsy. *Neurology.* 1998;51:1270-4.

21. Funao T, Oda Y, Tanaka K, Asada A. The P-glycoprotein inhibitor quinidine decreases the threshold for bupivacaine-induced, but not lidocaine-induced, convulsions in rats. *Can J Anaesth* 2003, 50:805–811.
22. Gambardella A, Manna I, Labate A, Chifari R, La Russa A, Serra P, Cittadella R, Bonavita S, Andreoli V, LePiane E, Sasanelli F, Di Costanzo A, Zappia M, Tedeschi G, Aguglia U, Quattrone A. GABA(B) receptor 1 polymorphism (G1465A) is associated with temporal lobe epilepsy. *Neurology*. 2003;60:560-3.
23. Glasscock E, Yoo JW, Chen TT, Klassen TL, Noebels JL. Kv1.1 potassium channel deficiency reveals brain-driven cardiac dysfunction as a candidate mechanism for sudden unexplained death in epilepsy. *J Neurosci*. 2010;30:5167-75.
24. Goldman AM, Glasscock E, Yoo J, Chen TT, Klassen TL, Noebels JL. Arrhythmia in heart and brain: KCNQ1 mutations link epilepsy and sudden unexplained death. *Sci Transl Med*. 2009;1:2ra6.
25. Goodridge DM, Shorvon SD. Epileptic seizures in a population of 6000. II: Treatment and prognosis. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1983;287:645-7.
26. Hauser WA. The natural history of drug resistant epilepsy: epidemiologic considerations. *Epilepsy Res Suppl*. 1992;5:25-8.
27. Hennessy MJ, Langan Y, Elwes RD, Binnie CD, Polkey CE, Nashef L. A study of mortality after temporal lobe epilepsy surgery. *Neurology*. 1999;53:1276-83.
28. Hesdorffer DC, Tomson T, Benn E, Sander JW, Nilsson L, Langan Y, Walczak TS, Beghi E, Brodie MJ, Hauser A; ILAE Commission on Epidemiology; Subcommission on Mortality. Combined analysis of risk factors for SUDEP. *Epilepsia*. 2011;52:1150-9.
29. Hindocha N, Nashef L, Elmslie F, Birch R, Zuberi S, Al-Chalabi A, Crotti L, Schwartz PJ, Makoff A. Two cases of sudden unexpected death in epilepsy in a GEFS+ family with an CN1A mutation. *Epilepsia*. 2008;49:360-5.

30. Hitiris N, Suratman S, Kelly K, Stephen LJ, Sills GJ, Brodie MJ. Sudden unexpected death in epilepsy: a search for risk factors. *Epilepsy Behav.* 2007;10:138-41.
31. Hopkins A, Garman A, Clarke C. The first seizure in adult life. Value of clinical features, electroencephalography, and computerised tomographic scanning in prediction of seizure recurrence. *Lancet.* 1988;1:721-6.
32. Huttenlocher PR, Hapke RJ. A follow-up study of intractable seizures in childhood. *Ann Neurol.* 1990;28:699-705.
33. Johnston SC, Horn JK, Valente J, Simon RP. The role of hypoventilation in a sheep model of epileptic sudden death. *Ann Neurol.* 1995;37:531-7.
34. Johnston SC, Siedenberg R, Min JK, Jerome EH, Laxer KD. Central apnea and acute cardiac ischemia in a sheep model of epileptic sudden death. *Ann Neurol.* 1997;42:588-94.
35. Kälviäinen R, Salmenperä T. Do recurrent seizures cause neuronal damage? A series of studies with MRI volumetry in adults with partial epilepsy. *Prog Brain Res.* 2002;135:279-95.
36. Kang TC, Park SK, Hwang IK, An SJ, Choi SY, Kwon OS, Baek NI, Lee HY, Won MH. The altered expression of GABA shunt enzymes in the gerbil hippocampus before and after seizure generation. *Neurochem Int.* 2003;42:239-49.
37. Kloster R, Engelskjøn T. Sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP): a clinical perspective and a search for risk factors. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1999;67:439-44.
38. Kwan P, Brodie M. Potential role of drug transporters in the pathogenesis of medically intractable epilepsy. *Epilepsia* 2005; 46:224–235.
39. Kwan P, Brodie MJ. Potential role of drug transporters in the pathogenesis of medically intractable epilepsy. *Epilepsia* 2005, 46:224–235.

40. Kwan P, Sills GJ, Kelly K, Butler E, Brodie MJ. Glutamic acid decarboxylase autoantibodies in controlled and uncontrolled epilepsy: a pilot study. *Epilepsy Res.* 2000;42:191-5.
41. Langan Y, Nashef L, Sander JW. Case-control study of SUDEP. *Neurology.* 2005;64:1131-3.
42. Lathers CM, Schraeder PL, Weiner FL. Synchronization of cardiac autonomic neural discharge with epileptogenic activity: the lockstep phenomenon. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1987;67:247-59.
43. Lhatoo SD, Faulkner HJ, Dembny K, Trippick K, Johnson C, Bird JM. An electroclinical case-control study of sudden unexpected death in epilepsy. *Ann Neurol.* 2010;68:787-96.
44. Lip GY, Brodie MJ. Sudden death in epilepsy: an avoidable outcome? *J R Soc Med.* 1992;85:609-11.
45. Loscher W. Current status and future directions in the pharmacotherapy of epilepsy. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23:113–118.
46. Loscher W. Animal models of drug-resistant epilepsy. *Novartis Found Symp* 2002, 243:149–159.
47. Loscher W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease modifying drugs. *Epilepsy Research* 2002, 50:105–123.
48. Mutani R. L'epilessia farmacoresistente: inquadramento e problematiche correlate. *Neurol Sci* 2006; 27.
49. Nashef L, Garner S, Sander JW, Fish DR, Shorvon SD. Circumstances of death in sudden death in epilepsy: interviews of bereaved relatives. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1998;64:349-52.
50. Nashef L, Walker F, Allen P, Sander JW, Shorvon SD, Fish DR. Apnoea and bradycardia during epileptic seizures: relation to sudden death in epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1996;60:297-300.

51. Nashef L. Sudden unexpected death in epilepsy: terminology and definitions. *Epilepsia*. 1997 Nov;38:S6-8.
52. Opeskin K, Thomas A, Berkovic SF. Does cardiac conduction pathology contribute to sudden unexpected death in epilepsy? *Epilepsy Res*. 2000;40:17-24.
53. Oppenheimer S. Cerebrogenic cardiac arrhythmias: cortical lateralization and clinical significance. *Clin Auton Res*. 2006;16:6-11.
54. Oppenheimer SM, Gelb A, Girvin JP, Hachinski VC. Cardiovascular effects of human insular cortex stimulation. *Neurology*. 1992;42:1727-32.
55. Palmieri A, Najm I, Avanzini G, Babb T, Guerrini R, Foldvary-Schaefer N, Jackson G, Luders HO, Prayson R, Spreafico R, Vinters HV. Terminology and classification of the cortical dysplasias. *Neurology* 2004, 62:S2-S8.
56. Persson H, Kumlien E, Ericson M, Tomson T. Circadian variation in heart-rate variability in localization-related epilepsy. *Epilepsia*. 2007;48:917-22. Epub 2007 Feb 27.
57. Perucca E (2004) General principles of medical treatment. In: Shorvon SD, Dodson WE, Fish D, Perucca E (eds) *The treatment of epilepsy*. Blackwell, Oxford, pp 139-160.
58. Petraccia L, Onori P, Sferra R, Lucchetta MC, Liberati G, Grassi M, Gaudio E. MDR (multidrug resistance) in hepatocarcinoma clinical-therapeutic implications. *Clin Ter* 2003, 154:325-335.
59. Pitkanen A, Sutula TP. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporallobe epilepsy. *Lancet Neurol* 2002 1:173-181.
60. Potschka H, Baltés S, Löscher W. Inhibition of multidrug transporters by verapamil or probenecid does not alter blood-brain barrier penetration of levetiracetam in rats. *Epilepsy Res* 2004, 58:85-91.

61. Potschka H, Loescher W. Multidrug resistance-associated protein is involved in the regulation of extracellular levels of phenytoin in the brain. *Neuroreport* 2001, 12:2387-2.
62. Rizzi M, Caccia S, Guiso G, Richichi C, Gorter JA, Aronica E, Aliprandi M, Bagnati R, Fanelli R, D'incalci M, Samanin R, Vezzani A. Limbic seizures induce P-glycoprotein in rodent brain: functional implications for pharmacoresistance. *J Neurosci* 2002, 22:5833-5839.
63. Rocamora R, Kurthen M, Lickfett L, Von Oertzen J, Elger CE. Cardiac asystole in epilepsy: clinical and neurophysiologic features. *Epilepsia*. 2003;44:179-85.
64. Rossetti AO, Dworetzky BA, Madsen JR, Golub O, Beckman JA, Bromfield EB. Ictal asystole with convulsive syncope mimicking secondary generalisation: a depth electrode study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005;76:885-7.
65. Rugg-Gunn FJ, Simister RJ, Squirrell M, Holdright DR, Duncan JS. Cardiac arrhythmias in focal epilepsy: a prospective long-term study. *Lancet*. 2004;364:2212-9.
66. Russo GL, Tassi L, Cossu M, Cardinale F, Mai R, Castana L, Colombo N, Bramerio M. Focal cortical resection in malformations of cortical development. *Epileptic Disord* 2003, 5[Suppl 2]:S115-S123.
67. Sander JW (1993) Some aspects of prognosis in the epilepsies: a review. *Epilepsia* 34:1007-1016.
68. Schachter SC. Advances in the assessment of refractory epilepsy. *Epilepsia*. 1993;34 Suppl 5:S24-30.
69. Schmidt D, Löscher W. Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms. *Epilepsia*. 2005;46:858-77.
70. Schuele SU, Bermeo AC, Alexopoulos AV, Locatelli ER, Burgess RC, Dinner DS, Foldvary-Schaefer N. Video-electrographic and clinical features in patients with ictal asystole. *Neurology*. 2007;69:434-41.

71. Shinnar S, Kang H, Berg AT, Goldensohn ES, Hauser WA, Moshé SL. EEG abnormalities in children with a first unprovoked seizure. *Epilepsia*. 1994 May-Jun;35(3):471-6.
72. Shorvon S, Tomson T. Sudden unexpected death in epilepsy. *Lancet*. 2011;2028-38.
73. Sisodiya SM, Lint WR, Harding BN, Squier MV, Thom M (2002) Drug resistance in epilepsy: human epilepsy. *Novartis Found Symp* 2002, 243:167–174.
74. Summers MA, Moore JL, Mcauley JW. Use of verapamil as a potential P-glycoprotein inhibitor in a patient with refractory epilepsy. *Ann Pharmacother* 2004, 38:1631–1634.
75. Terrence CF, Rao GR, Perper JA. Neurogenic pulmonary edema in unexpected, unexplained death of epileptic patients. *Ann Neurol*. 1981 May;9(5):458-64
- Natelson BH, Suarez RV, Terrence CF, Turizo R. Patients with epilepsy who die suddenly have cardiac disease. *Arch Neurol*. 1998;55:857-60
76. Timmings PL. Sudden unexpected death in epilepsy: a local audit. *Seizure*. 1993;2:287-90.
77. Tishler DM, Weinberg KI, Hinton DR, Barbaro N, Annett GM, Raffel C. MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy. *Epilepsia* 1995, 36:1–6.
78. Tjen-A-Looi SC, Li P, Li M, Longhurst JC. Modulation of Cardiopulmonary Depressor Reflex in Nucleus Ambiguus by Electroacupuncture: Roles of Opioids and Gamma Aminobutyric Acid. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011 Dec 28.
79. Tjen-A-Looi SC, Li P, Longhurst JC. Role of medullary GABA, opioids, and nociceptin in prolonged inhibition of cardiovascular sympathoexcitatory reflexes during electroacupuncture in cats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293:H3627-35.

80. Tomson T, Ericson M, Ihrman C, Lindblad LE. Heart rate variability in patients with epilepsy. *Epilepsy Res.* 1998;30:77-83.
81. Tu E, Bagnall RD, Duflou J, Semsarian C. Post-mortem review and genetic analysis of sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP) cases. *Brain Pathol.* 2011;21:201-8.
82. van Donselaar CA, Schimsheimer RJ, Geerts AT, Declerck AC. Value of the electroencephalogram in adult patients with untreated idiopathic first seizures. *Arch Neurol.* 1992;49:231-7.
83. Walczak TS, Leppik IE, D'Amelio M, Rarick J, So E, Ahman P, Ruggles K, Cascino GD, Annegers JF, Hauser WA. Incidence and risk factors in sudden unexpected death in epilepsy: a prospective cohort study. *Neurology.* 2001;56:519-25.

Un ringraziamento di cuore vada al Dott. Luigi Barberini, al Prof. Luigi Atzori ed alle dottoresse Milena Lussu e Federica Murgia, che hanno preparato ed analizzato i campioni.

Ringrazio il Prof. Giuseppe Mercurio, per avermi dato l'opportunità di svolgere questa importante e per me nuova esperienza.

Ringrazio infine il Prof Francesco Marrosu che, ancora una volta, ha messo il suo tempo e le sue competenze a disposizione della nostra equipe di lavoro, in un progetto così nuovo e stimolante.