



BANDO FONDAZIONE LICE 2022 PROGETTO di RICERCA

Responsabile del Progetto: Giada Giovannini

Data di nascita: 19/04/1985

Affiliazione: Unità Operativa di Neurologia, Ospedale Civile Baggiovara, AOU di Modena, Italia

Ente ospitante il Responsabile del Progetto: Centro Epilessia, Unità Operativa di Neurologia, Ospedale Civile Baggiovara, AOU di Modena, Italia

Centri partecipanti

- Centro Epilessia, Unità Operativa di Neurologia, Ospedale Civile Baggiovara, Modena, Italia

Titolo del progetto: Biomarcatori sierici e liquorali di prognosi a lungo termine in pazienti adulti con Stato Epilettico

Sinossi

Lo Stato Epilettico (SE) è una frequente emergenza neurologica caratterizzata da un'elevata mortalità e morbidità. Come evidenziato nella definizione di Stato Epilettico (1), l'attività epilettica sostenuta o le crisi epilettiche ripetute sono in grado di innescare modificazioni biomolecolari e cellulari che possono portare a danno o morte neuronale, gliosi e rimodellamento dendritico ed assonale che sono in ultimo alla base dello sviluppo di conseguenze cognitivo-comportamentali irreversibili e dell'epilettogenesi.

Gli scores attualmente in uso nella pratica clinica (EMSE, STESS, END-IT) permettono di definire la sopravvivenza a breve termine dopo un episodio di SE ma non sono in grado di definire il rischio di sviluppo ed il grado di danno cerebrale permanente (2,3) ed il rischio di sviluppare epilessia o declino cognitivo-comportamentale dopo un primo episodio di SE (4-10).

Negli ultimi anni la letteratura si è arricchita di studi riguardanti biomarcatori sierici e liquorali di neuroinfiammazione e di danno glioneuronale nei pazienti con epilessia e con Stato Epilettico (8,11-13) ma nonostante la crescente attenzione scientifica ad oggi nessun biomarcatore sierico o liquorale è stato validato per uso clinico nel determinare la prognosi nei pazienti con Stato Epilettico. Il presente studio si pone l'obiettivo principale di valutare il profilo sierico e liquorale e le variazioni longitudinali di alcuni specifici biomarcatori di neuroinfiammazione e di danno neuronale nei pazienti con un primo episodio di SE, valutandone nello specifico il potere predittivo nei confronti dello sviluppo di sequele neuro-cognitive e di sviluppo di epilessia.

Lo studio arruolerà in modo prospettico nell'arco di 12 mesi, i pazienti adulti non epilettici con diagnosi elettro-clinica certa di un primo episodio di SE osservati presso l'Ospedale Civile di Baggiovara (OCB), Modena. Ci poniamo quindi l'obiettivo di arruolare 60 pazienti non epilettici con un primo episodio di SE.

Ogni paziente arruolato verrà sottoposto ad un prelievo di siero entro 24 ore dalla diagnosi di Stato Epilettico e quando indicato per pratica clinica, anche ad un prelievo liquorale. Verranno misurati i seguenti biomarcatori: Metalloproteinasi della matrice 9 (MMP9) e Superossidodismutasi (SOD) quali marcatori di infiammazione ed Ubiquitina Carbossi-terminale Idrolasi L1 (UCH-L1) quale marcatore di danno neuronale.

Sugli stessi prelievi saranno misurati anche biomarcatori già in studio nei pazienti con SE presso il nostro centro: total TAU (tTAU) TAU fosforilata (pTAU), β -amiloide ($A\beta$), enolasi neurono-specifica (NSE), neurofilamenti leggeri (NfL), proteina S100-B (S100B) e pannello citochinico. I prelievi sierici per il dosaggio degli stessi biomarcatori verranno ripetuti anche a 6 mesi.

Verranno raccolti inoltre i dati clinici, elettroencefalografici e terapeutici di ogni paziente arruolato. Inoltre, verrà acquisita una RMN encefalo entro le prime 48 ore dalla diagnosi di Stato Epilettico e tutti i pazienti arruolati effettueranno un monitoraggio EEG a lungo termine nelle prime 24-48 ore dalla diagnosi di SE come previsto dal protocollo diagnostico-terapeutico locale.

Per tutti i pazienti arruolati è previsto un follow-up a 6 mesi comprensivo di: valutazione clinica, acquisizione di RMN encefalo e dosaggio dei biomarcatori.

Per i pazienti arruolati entro il 10° mese sarà effettuato, entro il termine dello studio, un follow-up a 12 mesi che comprenderà: valutazione clinica e acquisizione di RMN encefalo.

Ogni paziente arruolato sarà inoltre sottoposto ad una valutazione neuropsicologica tra il 6° e il 12° mese.

Parole chiave: Stato Epilettico, biomarcatori, prognosi, neuroinfiammazione, danno neuro-gliale

Razionale

Lo Stato Epilettico (SE) è una frequente emergenza neurologica caratterizzata da un'elevata mortalità e morbidità. Come evidenziato nella definizione di Stato Epilettico (1), l'attività epilettica sostenuta o le crisi epilettiche ripetute sono in grado di innescare modificazioni biomolecolari e cellulari che possono portare a danno o morte neuronale, gliosi e rimodellamento dendritico e assonale che determinano la comparsa di conseguenze cognitivo-comportamentali irreversibili e dell'epilettogenesi. Tuttavia, gli scores clinici esistenti (4,6,7) non permettono di definire con precisione il rischio individuale di sviluppare conseguenze irreversibili dopo un episodio di SE.

Negli ultimi anni la letteratura si è arricchita di studi sia su modello animale sia sull'uomo riguardanti potenziali biomarcatori sierici e liquorali di neuroinfiammazione e danno glioneuronale (8,10,13). Nonostante la crescente attenzione scientifica, ad oggi nessun biomarcatore è validato per poter essere utilizzato nella pratica clinica a scopo diagnostico o prognostico.

La definizione di biomarcatori sierici e liquorali di neuroinfiammazione e di danno glioneuronale durante un primo episodio di SE ha importanti implicazioni diagnostico-terapeutiche oltre che gestionali.

Dal punto di vista terapeutico, la definizione delle modificazioni acute di biomarcatori infiammatori permette di individuare i pazienti che potrebbero beneficiare, già a partire dalla fase acuta, di trattamenti neuroprotettivi, potenzialmente "disease-modifying" da affiancare al consolidato trattamento con farmaci anti-crisi.

Dal punto di vista gestionale, la valutazione del potere predittivo dei biomarcatori di neuroinfiammazione e di danno glioneuronale nei confronti di sequele funzionali (cognitivo-comportamentali e lo sviluppo di epilessia) nei pazienti che sopravvivono ad un primo episodio di SE permette di definire e predire con maggiore precisione il carico gestionale del paziente per i caregivers e per il sistema sanitario permettendo così di mettere in atto le strategie assistenziali più idonee alla gestione e alla cura del singolo paziente.

Tra i biomarcatori maggiormente studiati nell'epilessia si ritrovano i Neurofilamenti e la S100B.

I Neurofilamenti sono una classe di filamenti intermedi la cui principale funzione è quella di mantenere la struttura citoscheletrica e le interconnessioni con gli altri filamenti permettendo così la crescita e la stabilità della struttura degli assoni dei neuroni dove sono espressi in maniera esclusiva e qui svolgono anche un importante ruolo nei processi di plasticità sinaptica (14,15). Nei processi patologici che provocano un danno neuronale acuto o cronico ripetuto, i Neurofilamenti vengono quindi rilasciati nello spazio extracellulare ed i loro livelli possono essere misurati nel liquor e anche nel siero rappresentando perciò un biomarcatore di degenerazione neuronale in differenti patologie neurologiche. Tra i Neurofilamenti, i Neurofilamenti Leggeri (NFL) sono una sottocategoria caratterizzata da un minor grado di fosforilazione e quindi da un peso molecolare inferiore. Sono pertanto maggiormente diffusibili e più adatti a poter essere misurati nel siero. Diversi studi sia su animale (16,17) sia nell'uomo (12,18,19) hanno dimostrato un transitorio incremento dei livelli sierici e liquorali di NFL sia dopo singole crisi sia nei pazienti con SE. In particolare, un recente lavoro del nostro gruppo ha documentato come nei pazienti con SE i livelli sierici di NFL sono maggiori rispetto a quelli osservati dopo singole crisi e rispetto ai controlli sani. Inoltre i NFL presentano un significativo incremento soprattutto negli SE di più lunga durata, negli SE refrattari alla terapia, e nei pazienti che vanno incontro a peggioramento clinico o al decesso entro 30 giorni dallo SE (12).

La S100B è una proteina legante il calcio principalmente espressa negli astrociti e che partecipa a diversi processi di proliferazione e differenziazione cellulare. Durante i processi di danno neurale viene rilasciata nel liquor e nel siero per cui è riconosciuta in molte malattie neurologiche come un sensibile marker di danno astrocitario. Inoltre, l'incremento dei livelli extra-cellulari di S100B è riconosciuto come un fattore che prende parte attiva nei processi infiammatori e neurodegenerativi (20,21). Diversi studi hanno dimostrato un innalzamento dei livelli sierici di S100B nei pazienti con epilessia rispetto ai controlli sani e una correlazione con il grado di severità dell'epilessia (10,21-24). Inoltre, i livelli sierici di S100B sono risultati significativamente aumentati nei pazienti con SE rispetto ai controlli ed ai pazienti con epilessia (25) e nei pazienti con SE è stata dimostrata una stretta correlazione positiva tra i livelli sierici di S100B e il grado di danno parenchimale rilevato in acuto dalla RMN (26).

Neurofilamenti leggeri e S100B sono biomarcatori di danno neurogliale già in studio presso il nostro centro nei pazienti con epilessia e SE. A fianco a questi, lo studio prenderà in considerazione ed esplorerà i seguenti biomarcatori:

-*Metalloproteinasi della matrice 9 (MMP9)*: è considerato un marcatore di neuroinfiammazione ed epilettogenesi. E' un componente di una larga famiglia di enzimi proteolitici che prendono parte ai meccanismi di degradazione/rimodellamento della matrice extracellulare. Svolge un ruolo chiave nel favorire i processi di neuroinfiammazione attraverso l'induzione di cambiamenti di permeabilità della barriera emato-encefalica e migrazione leucocitaria che si osservano in corso di crisi epilettiche sostenute. Favorisce inoltre i processi di rimodellamento patologico dei network neuronali, di rimodellamento strutturale a livello delle sinapsi e di morte cellulare che contribuiscono all'epilettogenesi (27-30).

-*Superossidodismutasi (SOD)*: è un enzima che prende parte ai meccanismi antiossidanti. Nelle crisi epilettiche ripetute e nello Stato Epilettico si è osservato un incremento dei processi neuroinfiammatori e della produzione di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto. Nei pazienti con SE i livelli plasmatici di SOD appaiono ridotti rispetto a quelli osservati nei controlli sani (31,32).

-*Ubiquitina Carbossi-terminale Idrolasi L1 (UCH-L1)*: è considerato un marcatore di danno neuronale. E' un enzima citoplasmatico altamente specifico nei neuroni ed i cui livelli liquorali e sierici incrementano rapidamente in corso di processi che portano a distruzione neuronale ed incremento di permeabilità della barriera emato-encefalica. Entro 48 ore da crisi singole, sono stati riportati livelli liquorali di UCH-L1 significativamente più elevati rispetto ai controlli; inoltre nei pazienti con crisi ripetute i livelli sierici di UCH-L1 sono apparsi significativamente più elevati rispetto ai pazienti con crisi singole (33).

Obiettivi

Lo studio valuterà in particolare il profilo in acuto e la variazione nel tempo dei summenzionati biomarcatori sierici e liquorali di neuroinfiammazione e di danno neuronale nei pazienti adulti con diagnosi definita di un primo episodio di SE. Gli obiettivi principali dello studio sono:

- Valutazione del profilo e delle modificazioni longitudinali dei biomarcatori in studio e loro correlazione con i dati clinici e paraclinici: epidemiologici (età, genere, comorbidità), clinici (eziologia, manifestazione clinica, durata), terapeutici (risposta al trattamento, uso di terapie di terza linea, uso di terapie immunomodulanti/immunosoppressive) e strumentali (caratteristiche EEG e di alterazioni acute peri-ictali allo studio di neuroimaging in acuto).
- Correlazione del profilo e delle modificazioni longitudinali dei biomarcatori in studio con le sequele neurologiche a breve

e lungo termine: il rischio di decesso, lo sviluppo di danni parenchimali cerebrali (atrofia e gliosi), lo sviluppo di epilessia, il rischio di ricorrenza di SE, il declino cognitivo-comportamentale.

- Correlazione del profilo e delle modificazioni longitudinali dei biomarcatori in studio con altri biomarcatori sierici e liquorali di neuroinfiammazione e di danno glioneuronale che vengono già studiati presso il nostro centro nei pazienti con SE (tTAU/pTAU/A β), NSE, NfL e S100B e pannello citochinico) ed analisi delle loro modifiche nel tempo.

Piano Sperimentale

Lo studio si configura come studio prospettico interventistico senza farmaco.

Lo studio arruolerà in modo prospettico nell'arco di 12 mesi, i pazienti adulti (≥ 18 anni), non epilettici, con diagnosi elettro-clinica certa di un primo episodio di SE presso l'Ospedale Civile di Baggiovara, Modena.

Ogni anno presso il nostro centro 80-100 pazienti ricevono una diagnosi definitiva di SE e di questi 50-60 avvengono in pazienti senza una precedente diagnosi di epilessia. Ci poniamo quindi l'obiettivo di arruolare 60 pazienti con un primo episodio di SE.

I gruppi di controllo saranno rappresentati da:

- 30 controlli sani. Il gruppo sarà composto da una coorte di soggetti sani (senza storia nota di patologie neurodegenerative) i cui prelievi ematici e liquorali siano stati donati e conservati presso la Neurobiobanca dell'OCB di Modena.
- 30 pazienti con epilessia e crisi isolate. Questo gruppo sarà costituito da una coorte di pazienti adulti con diagnosi di epilessia che per motivi clinici (necessità di intraprendere modificazioni terapeutiche o un iter diagnostico pre-chirurgico) vengono ricoverati presso l'Unità di Monitoraggio per le Epilessie del reparto di Neurologia dell'Ospedale Civile di Baggiovara. Verranno arruolati soltanto i pazienti che presenteranno una crisi isolata in corso di monitoraggio EEG e verranno pertanto esclusi i pazienti con crisi ripetute. Il prelievo sierico per il dosaggio dei biomarcatori verrà eseguito entro 2 ore dalla crisi. Qualora per necessità cliniche, il paziente dovrà essere sottoposto a prelievo liquorale le misurazioni dei biomarcatori saranno effettuate anche su tale matrice. Di questi pazienti verranno raccolti i seguenti dati epidemiologici, clinici e terapeutici: età, genere, età di esordio delle crisi, tipo di crisi, tipo di epilessia, caratteristiche EEG, frequenza crisi nei precedenti 3 mesi, numero di farmaci anti-crisi effettuati in passato, numero di farmaci anti-crisi in atto al momento del ricovero, tipo di crisi pre-prelievo.

La diagnosi di SE verrà formulata in accordo con la definizione ILAE che considera 5 minuti come limite temporale per la definizione dello SE tonico-clonico; 10 minuti per lo SE focale con alterazione della consapevolezza e 10-15 minuti per lo SE di assenza (1). Nei casi di SE non convulsivi (NCSE) la diagnosi avverrà mediante l'analisi e la classificazione del tracciato elettroencefalografico in accordo con i criteri di Salisburgo per la diagnosi elettroencefalografica dei NCSE (34).

Ogni paziente entrerà nel percorso diagnostico-terapeutico previsto dall'apposito protocollo locale (PDTA aziendale per la diagnosi ed il trattamento dello SE basato sulle attuali raccomandazioni internazionali e nazionali – LICE)(35) in uso presso l'OCB di Modena e tale percorso non sarà modificato dalla conduzione del presente studio. I dati clinici, elettroencefalografici e terapeutici di ogni paziente arruolato verranno raccolti.

Ogni paziente verrà sottoposto ad un prelievo di siero entro 24 ore dalla diagnosi di Stato Epilettico e quando indicato per pratica clinica, anche ad un prelievo liquorale. Verranno misurati i seguenti biomarcatori: Metalloproteinasi della matrice 9 (MMP9), Superossidodismutasi (SOD) ed Ubiquitina Carbossi-terminale Idrolasi L1 (UCH-L1), oltre a biomarcatori già in studio nei pazienti con SE presso il nostro centro (tTAU/pTAU/A β), NSE, NfL e S100B e pannello citochinico). Gli stessi biomarcatori verranno analizzati nei gruppi di controllo.

Inoltre, verrà acquisita una RMN encefalo entro le prime 48 ore dalla diagnosi di Stato Epilettico e tutti i pazienti arruolati effettueranno un monitoraggio EEG a lungo termine nelle prime 24-48 ore dalla diagnosi di SE come previsto dal protocollo diagnostico-terapeutico locale.

Per tutti i pazienti arruolati è previsto un follow-up a 6 mesi comprensivo di: valutazione clinica, acquisizione di RMN encefalo e dosaggio dei biomarcatori.

Per i pazienti arruolati entro il 10° mese sarà effettuato, entro il termine dello studio, un follow-up a 12 mesi che comprenderà: valutazione clinica e acquisizione di RMN encefalo.

Ogni paziente arruolato sarà sottoposto ad una valutazione neuropsicologica tra il 6° e il 12° mese.

Facilities personale coinvolto

La nostra UO presenta una consolidata esperienza nella gestione e nel trattamento dei pazienti adulti con SE. Ogni anno circa 80-100 pazienti con diagnosi definitiva di SE accedono presso l'Ospedale Civile di Baggiovara che rappresenta l'hub provinciale per i pazienti con emergenze neurologiche. Il neurologo è presente in ospedale 24/24 ore, 7 giorni/settimana ed il pronto soccorso è operativo in maniera continuativa. Per garantire l'omogeneità diagnostico-terapeutica dei pazienti adulti con SE, dal 2017 è in uso presso il nostro ospedale un PDTA aziendale per la gestione ed il trattamento dello SE. In virtù di questo, vi è una stretta e consolidata collaborazione con il pronto soccorso, il reparto di neuroranimazione ed il servizio di neuroradiologia.

Oltre al Centro Epilessia dell'UO di Neurologia, le altre unità operative dell'Ospedale Civile di Baggiovara coinvolte in questo progetto saranno: l'Unità Operativa di Anestesia e Neuroranimazione, l'Unità Operativa di Medicina di Urgenza e Pronto Soccorso, l'Unità operativa di Neuroradiologia, la Neurobiobanca di Modena e il Laboratorio di Neuroimmunologia, Università di Modena e Reggio Emilia.

Presso la nostra UO lo staff di neurofisiopatologia dedicato copre un servizio ore 8-20 per 6 giorni/settimana potendo acquisire sia EEG standard sia effettuare monitoraggio EEG in continuo (4 letti dedicati al monitoraggio VEEG presenti nel reparto di neurologia e 24 letti con possibilità di monitoraggio EEG continuo presso il reparto di Neuroranimazione). Tutti gli EEG acquisiti vengono analizzati da neurofisiologi con comprovata esperienza in elettroencefalografia ed in particolare nella refertazione

elettroencefalografica nel paziente critico (centro riconosciuto SINC).

È presente un servizio di neuroradiologia 24/24 ore, 7 giorni/settimana che permette l'acquisizione di RMN su macchinario 3T. Il nostro centro ha inoltre una lunga e comprovata esperienza clinica e di ricerca sul neuroimaging strutturale nello SE e nelle epilessie e sul neuroimaging funzionale e sul post-processing nello studio delle epilessie.

La nostra UO ha un laboratorio di neuroimmunologia dedicato che include una "neuro-biobanca" presente dal 2018 e presenta una solida esperienza di ricerca nell'ambito dei biomarcatori di laboratorio trasversale a differenti ambiti neurologici.

Infine, è presente un servizio di neuropsicologia clinica con una lunga esperienza specifica nella valutazione cognitiva dei pazienti con epilessia e partecipante attivamente al Gruppo di Studio LICE Neurologia Cognitiva e Neuropsicologia dell'Epilessia dell'età adulta.

Metodi

-Raccolta dati:

Attraverso un'apposita eCRF verranno raccolti per ciascun paziente arruolato i seguenti dati: età, genere, ora e data di esordio dello SE, comorbidità e terapie concomitanti, livello di disabilità pre-SE (utilizzando la modified Rankin Scale, mRs), livello di coscienza alla prima valutazione medica (utilizzando la Glasgow Coma Scale, GCS), eziologia dello SE, semeiologia dello SE, ora e data del primo EEG, ora/data e risultati dei prelievi sierici e liquorali per il dosaggio dei biomarcatori in studio, tipo/durata e dosaggio dei farmaci anti-crisi utilizzati, tipo/durata e dosaggio dei farmaci anestetici utilizzati, tipo/durata e dosaggio di ogni altra terapia utilizzata, data e risultati degli studi neuroradiologici effettuati, tipo di risposta terapeutica (responsività/refrattarietà/super-refrattarietà), tempo di ospedalizzazione, tempo in terapia intensiva, necessità di ventilazione meccanica, presenza e tipo di complicanze intraospedaliere, destinazione alla dimissione, mortalità intraospedaliere, a 30 giorni a 6 mesi ed a 12 mesi, outcome funzionale (mRs,) alla dimissione, a 30 giorni e (mRS, ADL, IADL) a 6 mesi ed a 12 mesi, sviluppo di epilessia a 6 mesi e 12 mesi, valutazione neuropsicologica tra i 6 e i 12 mesi.

-Definizione di risposta al trattamento:

La risposta al trattamento verrà considerata secondo le seguenti definizioni: SE responsivo al trattamento nel caso si risolva dopo la terapia di prima linea con la sola benzodiazepina o con la benzodiazepina seguita da terapia di seconda linea con un farmaco anti-crisi secondo protocollo locale in uso adeguato per tipo e dosaggio, somministrato per via endovenosa; SE refrattario nel caso non venga risolto dalla terapia di prima linea seguita dalla somministrazione di un farmaco di seconda linea; SE super-refrattario se continua o ricorre nonostante l'utilizzo di terapia anestesiológica per > 24 ore (36,37).

- Monitoraggio EEG:

Ogni paziente riceverà, secondo pratica clinica, un monitoraggio EEG acquisito secondo il sistema internazionale 10-20, a lungo termine nelle prime 24-48 ore dalla diagnosi di SE. Ogni tracciato verrà analizzato da neurofisiologi esperti e nei casi di NCSE il tracciato verrà classificato in accordo con i Salzburg Consensus Criteria (SCC) per la diagnosi elettroencefalografica di NCSE (34).

-Determinazione dei biomarcatori:

I prelievi di siero verranno acquisiti entro 24 ore dalla diagnosi SE ed a 6 mesi.

I prelievi sierici e quando acquisito per pratica clinica, anche il prelievo liquorale, verranno analizzati attraverso test immunoenzimatico (ELISA kit) per la determinazione dei biomarcatori in studio.

-Studio RM:

Ogni paziente arruolato sarà sottoposto ad una prima RMN encefalo, eseguita per pratica clinica in base al protocollo diagnostico-terapeutico locale entro le prime 48 ore dalla diagnosi di SE. Le RMN encefalo di follow-up verranno acquisite in occasione delle visite di follow-up a 6 e 12 mesi. RMN encefalo di follow-up nei pazienti con SE vengono già acquisite come previsto da altro studio in atto presso il nostro centro (878/2021/SPER/AOUMO SIRER ID 3094 – PMA-SE Peri-ictal MRI Abnormalities in patients with Status Epilepticus). Tutte le RMN verranno acquisite sullo stesso macchinario (3T) adottando il protocollo di studio in essere presso la nostra UO per lo studio dei pazienti con epilessia secondo le raccomandazioni fornite della commissione neuroimmagini della ILAE (protocollo HARNESS-MRI: Harmonized Neuroimaging of Epilepsy Structural Sequences)(38). Tale protocollo prevede le seguenti sequenze: sequenza 3D T1-pesata ad alta risoluzione (che permette la valutazione anatomica e morfologica); 3D- fluid-attenuated inversion recovery ad alta risoluzione (che permette la valutazione delle alterazioni di segnale in particolare relative alla gliosi e all'incremento dello spazio extra-cellulare; sequenza 2D coronale T2 pesata ad alta risoluzione per lo studio in dettaglio della struttura ippocampale (immagini acquisite perpendicolarmente all'asse lungo dell'ippocampo); Arterial Spin Labelling (ASL) che permette la visualizzazione delle alterazioni perfusionali.

Quando indicato per pratica clinica, lo studio sarà completato con l'acquisizione di una sequenza pesata in T1 con gadolinio per la definizione della presa di contrasto ed una sequenza SWI (susceptibility-weighted imaging) e T2* per la definizione delle emorragie, dei depositi di ferro e delle calcificazioni.

-Analisi statistica:

Verranno condotte analisi descrittive appropriate per le variabili continue e categoriche. Le variabili continue normalmente distribuite saranno analizzate con test parametrici; in caso di variabili continue non normalmente distribuite, verranno utilizzati test non parametrici. Le variabili categoriche verranno analizzate utilizzando il test del Chi quadro o il test di Fisher quando appropriato. Verranno condotte analisi di correlazione per studiare le relazioni esistenti tra i biomarcatori sierici/liquorali e le caratteristiche cliniche dello SE. Analisi di regressione logistica verranno attuate per valutare il valore predittivo dei biomarcatori sierici e liquorali nei confronti delle misure di outcome a breve e lungo termine. Saranno utilizzate curve Receiver operating characteristic (ROC) attraverso il calcolo dell'indice Youden per valutare, per ciascun biomarcatore sierico/liquorale, il valore con la migliore sensibilità e specificità nel predire gli outcomes considerati. L'area al di sotto della curva ROC (AUC) permetterà di valutare l'abilità discriminatoria di ciascun modello.

Risultati attesi e rilevanza clinica

Sulla base dei dati preliminari e dei dati emergenti dalla letteratura esistente, ci attendiamo di osservare un incremento dei livelli sierici di Metalloproteinasi della matrice 9 ed Ubiquitina Carbossi-terminale Idrolasi L1 ed una riduzione dei livelli di Superossidodismutasi nei pazienti durante la fase acuta dello SE rispetto ai controlli sani e rispetto ai pazienti con epilessia. Ci attendiamo inoltre un maggior grado di modificazione dei biomarcatori analizzati nei casi di SE refrattario e super-refrattario rispetto ai pazienti con SE responsivo.

Ci attendiamo di osservare un maggiore aumento di Ubiquitina Carbossi-terminale Idrolasi L1 e Metalloproteinasi della matrice 9 e una maggiore riduzione di Superossidodismutasi durante lo SE nei pz che sviluppano modificazioni neuroradiologiche croniche in senso di gliosi ed atrofia e di sequele cliniche cognitivo-comportamentali rispetto ai pazienti che non le sviluppano.

Inoltre, ci attendiamo di osservare un incremento maggiore in fase acuta ed un persistente incremento in fase cronica di Metalloproteinasi della matrice 9 nei pazienti che sviluppano un'epilessia ed in particolar modo in coloro che sviluppano un'epilessia farmaco-resistente ed in coloro che presentano recidive di Stato Epilettico rispetto ai pazienti per cui lo Stato Epilettico rimane un evento isolato.

Ci aspettiamo infine che il profilo di modifica dei biomarcatori di neuroinfiammazione e di neurodegenerazione analizzati confermi e si accordi alle modificazioni di altri biomarcatori di neurodegenerazione e infiammatori studiati negli stessi pazienti.

Questo progetto permetterà di caratterizzare in modo indiretto, in vivo, nell'uomo, i cambiamenti indotti a livello cerebrale dall'attività epilettica sostenuta. Questo porterà ad un incremento delle conoscenze circa i processi coinvolti nel danno cerebrale e quelli di adattamento post-SE.

Inoltre, la valutazione di biomarcatori di danno neuronale e di infiammazione fin dalle prime fasi dello SE potrebbe supportare lo sviluppo di diversi algoritmi di trattamento dello SE, rispetto alla pratica clinica attuale, considerando in alcuni pazienti terapie immunomodulanti /anti-infiammatorie fin dalle prime fasi sulla base del profilo 'paziente-specifico' di alterazione dei diversi marcatori biologici.

Inoltre lo studio permetterà di incrementare le informazioni epidemiologiche sulle conseguenze a breve e a lungo termine dello SE. Infine, riteniamo che l'inserimento dei valori dei biomarcatori sierici negli scores predittivi esistenti possa migliorarne il potere predittivo nei confronti delle sequele a lungo-termine.

Bibliografia.

1. Trinka E, Cock H, Hesdorffer D, Rossetti AO, Scheffer IE, Shinnar S, et al. A definition and classification of status epilepticus - Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia*. 2015 Oct;56(10):1515–23.
2. Giovannini G, Kuchukhidze G, McCoy MR, Meletti S, Trinka E. Neuroimaging alterations related to status epilepticus in an adult population: Definition of MRI findings and clinical-EEG correlation. *Epilepsia*. 2018 Oct;59 Suppl 2:120–7.
3. Meletti S, Monti G, Mirandola L, Vaudano AE, Giovannini G. Neuroimaging of status epilepticus. *Epilepsia*. 2018 Oct;59 Suppl 2:113–9.
4. Gao Q, Ou-Yang T peng, Sun X long, Yang F, Wu C, Kang T, et al. Prediction of functional outcome in patients with convulsive status epilepticus: the END-IT score. *Crit Care*. 2016 Dec;20(1):46.
5. Giovannini G, Monti G, Tondelli M, Marudi A, Valzania F, Leitinger M, et al. Mortality, morbidity and refractoriness prediction in status epilepticus: Comparison of STESS and EMSE scores. *Seizure*. 2017 Mar;46:31–7.
6. Leitinger M, Höller Y, Kalss G, Rohracher A, Novak HF, Höfler J, et al. Epidemiology-Based Mortality Score in Status Epilepticus (EMSE). *Neurocrit Care*. 2015 Apr;22(2):273–82.
7. Rossetti AO, Logroscino G, Milligan TA, Michaelides C, Ruffieux C, Bromfield EB. Status Epilepticus Severity Score (STESS): A tool to orient early treatment strategy. *J Neurol*. 2008 Oct;255(10):1561–6.
8. Hanin A, Lambrecq V, Denis JA, Imbert-Bismut F, Rucheton B, Lamari F, et al. Cerebrospinal fluid and blood biomarkers of status epilepticus. *Epilepsia*. 2020 Jan;61(1):6–18.
9. Lukasiuk K, Becker AJ. Molecular Biomarkers of Epileptogenesis. *Neurotherapeutics*. 2014 Apr;11(2):319–23.
10. Simani L, Sadeghi M, Ryan F, Deghani M, Niknazar S. Elevated Blood-Based Brain Biomarker Levels in Patients with Epileptic Seizures: A Systematic Review and Meta-analysis. *ACS Chem Neurosci*. 2020 Dec 16;11(24):4048–59.
11. Monti G, Tondelli M, Giovannini G, Bedin R, Nichelli PF, Trenti T, et al. Cerebrospinal fluid tau proteins in status epilepticus. *Epilepsy Behav*. 2015 Aug;49:150–4.
12. Giovannini G, Bedin R, Ferraro D, Vaudano AE, Mandrioli J, Meletti S. Serum neurofilament light as biomarker of seizure-related neuronal injury in status epilepticus. *Epilepsia*. 2022 Jan;63(1):e23–9.
13. Alkhachroum A, Der-Nigoghossian CA, Rubinos C, Claassen J. Markers in Status Epilepticus Prognosis. *Journal of Clinical Neurophysiology*. 2020 Sep;37(5):422–8.
14. Yuan A, Rao MV, Veeranna, Nixon RA. Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease. Cold Spring Harb

Perspect Biol. 2017 Apr;9(4):a018309.

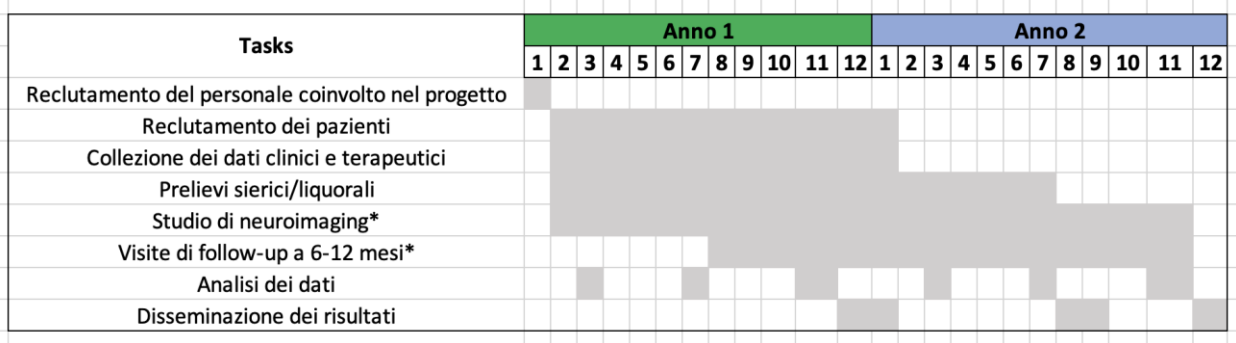
15. Yuan A, Veeranna, Sershen H, Basavarajappa BS, Smiley JF, Hashim A, et al. Neurofilament light interaction with GluN1 modulates neurotransmission and schizophrenia-associated behaviors. *Transl Psychiatry*. 2018 Dec;8(1):167.
16. Sherry AK, Turner DA. Non-phosphorylated neurofilament protein immunoreactivity in adult and developing rat hippocampus: specificity and application in grafting studies. :14.
17. Yang Q, Wang S, Karlsson JE, Hamberger A, Haglid KG. Phosphorylated and non-phosphorylated neurofilament proteins: distribution in the rat hippocampus and early changes after kainic acid induced seizures. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 1995 Oct;9(3):217–28.
18. Lybeck A, Friberg H, Nielsen N, Rundgren M, Ullén S, Zetterberg H, et al. Postanoxic electrographic status epilepticus and serum biomarkers of brain injury. *Resuscitation*. 2021 Jan;158:253–7.
19. Nass RD, Akgün K, Elger C, Reichmann H, Wagner M, Surges R, et al. Serum biomarkers of cerebral cellular stress after self-limiting tonic clonic seizures: An exploratory study. *Seizure*. 2021 Feb;85:1–5.
20. Michetti F, D'Ambrosi N, Toesca A, Puglisi MA, Serrano A, Marchese E, et al. The S100B story: from biomarker to active factor in neural injury. *J Neurochem*. 2019 Jan;148(2):168–87.
21. Langeh U, Singh S. Targeting S100B Protein as a Surrogate Biomarker and its Role in Various Neurological Disorders. *CN*. 2020 Dec 31;19(2):265–77.
22. Calik M, Abuhandan M, Sonmezler A, Kandemir H, Oz I, Taskin A, et al. Elevated serum S-100B levels in children with temporal lobe epilepsy. *Seizure*. 2013 Mar;22(2):99–102.
23. Liang KG, Mu RZ, Liu Y, Jiang D, Jia TT, Huang YJ. Increased Serum S100B Levels in Patients With Epilepsy: A Systematic Review and Meta-Analysis Study. *Front Neurosci*. 2019 May 16;13:456.
24. Meguid NA, Samir H, Bjørklund G, Anwar M, Hashish A, Koura F, et al. Altered S100 Calcium-Binding Protein B and Matrix Metalloproteinase 9 as Biomarkers of Mesial Temporal Lobe Epilepsy with Hippocampus Sclerosis. *J Mol Neurosci*. 2018 Dec;66(4):482–91.
25. Hanin A, Denis JA, Frazzini V, Cousyn L, Imbert-Bismut F, Rucheton B, et al. Neuron Specific Enolase, S100-beta protein and progranulin as diagnostic biomarkers of status epilepticus. *J Neurol [Internet]*. 2022 Feb 21 [cited 2022 Apr 29]; Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s00415-022-11004-2>
26. Gunawan PI, Saharso D, Sari DP. Correlation of serum S100B levels with brain magnetic resonance imaging abnormalities in children with status epilepticus. *Korean J Pediatr*. 2019 Jul 15;62(7):281–5.
27. Rempe RG, Hartz AM, Bauer B. Matrix metalloproteinases in the brain and blood–brain barrier: Versatile breakers and makers. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016 Sep;36(9):1481–507.
28. Dubey D, McRae PA, Rankin-Gee EK, Baranov E, Wandrey L, Rogers S, et al. Increased metalloproteinase activity in the hippocampus following status epilepticus. *Epilepsy Research*. 2017 May;132:50–8.
29. Bronisz E, Kurkowska-Jastrzębska I. Matrix Metalloproteinase 9 in Epilepsy: The Role of Neuroinflammation in Seizure Development. *Mediators of Inflammation*. 2016;2016:1–14.
30. Mizoguchi H, Yamada K. Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Targets in Epileptogenesis and Seizures. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 2013 Aug 28;11(2):45–52.
31. Kalita J, Misra UK, Singh LS, Tiwari A. Oxidative stress in status epilepticus: A clinical-radiological correlation. *Brain Research*. 2019 Feb;1704:85–93.
32. Cho I, Kim WJ, Kim HW, Heo K, Lee BI, Cho YJ. Increased Superoxide Dismutase 2 by Allopregnanolone Ameliorates ROS-Mediated Neuronal Death in Mice with Pilocarpine-Induced Status Epilepticus. *Neurochem Res*. 2018 Jul;43(7):1464–75.
33. Mondello S, Palmio J, Streeter J, Hayes RL, Peltola J, Jeromin A. Ubiquitin Carboxy-Terminal Hydrolase L1 (UCH-L1) is increased in cerebrospinal fluid and plasma of patients after epileptic seizure. *BMC Neurol*. 2012 Dec;12(1):85.
34. Leitinger M, Beniczky S, Rohrer A, Gardella E, Kals G, Qerama E, et al. Salzburg Consensus Criteria for Non-Convulsive Status Epilepticus--approach to clinical application. *Epilepsy Behav*. 2015 Aug;49:158–63.
35. Minicucci F, Ferlisi M, Brigo F, Mecarelli O, Meletti S, Aguglia U, et al. Management of status epilepticus in adults. Position paper of the Italian League against Epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2020 Jan;102:106675.

36. Ferlisi M, Shorvon S. The outcome of therapies in refractory and super-refractory convulsive status epilepticus and recommendations for therapy. Brain. 2012 Aug;135(Pt 8):2314–28.

37. Lowenstein DH, Bleck T, Macdonald RL. It's Time to Revise the Definition of Status Epilepticus. Epilepsia. 1999 Jan;40(1):120–2.

38. Bernasconi A, Cendes F, Theodore WH, Gill RS, Koepp MJ, Hogan RE, et al. Recommendations for the use of structural magnetic resonance imaging in the care of patients with epilepsy: A consensus report from the International League Against Epilepsy Neuroimaging Task Force. Epilepsia. 2019 Jun;60(6):1054–68.

Piano Temporale del Progetto (schema di Gantt)



*i 12 mesi di follow-up nei termini previsti per lo studio saranno raggiunti dai pazienti che saranno arruolati entro il 10° mese.

Sintetico schema grafico del progetto

Piano economico

	costo totale del progetto	quota richiesta a Fondazione LICE	quota cofinanziata	Ente cofinanziatore
Personale di ricerca	98.000	25.000	73.000	AOU Modena
Attrezzature	n.a.	n.a.	n.a.	
Materiali di consumo	9.000	9.000	0	
Servizi informatici	n.a.	n.a.	n.a.	
Partecipazioni a congressi e collaborazioni (max 10%)	2000	2000	0	
Costi di pubblicazione	2000	2000	0	
Overheads (max 10%)	2000	2000	0	

Dettaglio delle spese previste

Personale di ricerca:

- 2 neurologi (2 mesi/anno per 2 anni): 40.000 € (quota co-finanziata AOU Modena)
- 1 dottorando (3 mesi/anno per 2 anni): 18.000 € (quota co-finanziata AOU Modena)
- 1 biologo (3 mesi/anno per 2 anni): 15.000 € (quota co-finanziata AOU Modena)
- 1 ricercatore (neurologo) dedicato (10 mesi): 25.000 € (quota richiesta a Fondazione LICE)

Materiali di consumo:

- Kit di dosaggio dei biomarcatori: 240 campioni da analizzare per i 3 biomarcatori in studio: 9000 € (quota richiesta a Fondazione LICE).

Partecipazioni a congressi e collaborazioni:

- Costi per la partecipazione (spese di registrazione) e l'organizzazione di congressi e conferenze per la disseminazione dei risultati: 2000 € (quota richiesta a Fondazione LICE).

Costi di pubblicazione:

- Costi per la pubblicazione in riviste peer-reviewed degli studi riportanti i risultati dello studio: 2000 € (quota richiesta a Fondazione LICE).

Overheads:

- Costi fissi generali ed amministrativi: 2000 € (quota richiesta a Fondazione LICE).

