



ALLEGATO 2

Progetto di Ricerca

Determinazione dei livelli della catena leggera del neurofilamento (NFL) e della proteina acida fibrillare gliale (GFAP) in sieri di pazienti affetti da malattie infiammatorie demielinizzanti

Principal Investigator

Dr. Renato Mantegazza

Direttore UOC Neurologia IV – Neuroimmunologia e Malattie Neuromuscolari

Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

Background

Le malattie demielinizzanti a carattere infiammatorio (IDD), come la sclerosi multipla (SM) e i disturbi dello spettro della neuromielite ottica (NMOSD) (1,2) sono caratterizzate da ripetuti attacchi infiammatori immunomediati a cui sono associati processi neurodegenerativi; questi fenomeni diventano clinicamente rilevanti in fasi avanzate della malattia. Nella MS il bersaglio principale è rappresentato dalla guaina mielinica e dagli oligodendrociti, mentre gli astrociti sono principalmente aggrediti nella NMOSD. Linfociti T e B autoreattivi possono giocare un ruolo attivo nei processi patogenetici in quanto producono mediatori solubili e sono coinvolti nella regolazione e secrezione di citochine e chemochine; a supporto di questo ulteriore meccanismo di danno, nella SM sono stati riscontrati aggregati linfocitari ectopici in specifiche aree meninge.

Gli approcci terapeutici sono piuttosto efficaci nel modulare la reattività immunitaria nel SNC ma non sono in grado di contrastare i meccanismi di neurodegenerazione; nonostante la ricerca intensiva, non sono stati identificati chiari biomarcatori utili per prevedere il decorso della malattia o la risposta al trattamento, in particolare per gli aspetti sopra indicati di neurodegenerazione. La proteina della catena leggera del neurofilamento (NFL) è stata recentemente descritta come biomarcatore di danno neuronale intra-assonale, insieme alla proteina acida fibrillare gliale (GFAP), quest'ultima come biomarcatore di attivazione/lesione astrocitaria (3,4). NFL e GFAP sono infatti proteine presenti nella struttura citoscheletrica e, a seguito di lesioni neuroassonali o gliali, vengono ritrovate nello spazio extracellulare.

Sono state inoltre descritte interazioni tra le pathways immuno-correlate e biomarcatori di danno neuronale e attivazione degli astrociti; approfondite analisi molecolari e proteiche di questi processi interconnessi potranno fornire nuove informazioni sulla patogenesi e sulla prognosi per queste malattie.

Scopo dello studio

Il progetto prevede l'analisi dei livelli sierici di NFL e GFAP, in parallelo ad un pannello di citochine e chemochine immuno-correlate, in pazienti con IDD. In un gruppo ristretto di campioni IDD (n=20) sono stati misurati elevati livelli di NFL rispetto ad un gruppo di campioni controllo (n=9) (p=0,04, t-test due code). Intendiamo quindi proseguire questa analisi, applicando protocolli in microfluidica, implementando la casistica e, per gli stessi soggetti già analizzati, valutando anche tempi successivi (T = 6 mesi e T = 12 mesi).

Piano dello studio

Attività	Tempi previsti
Determinazione NFL e GFAP in microfluidica	5 mesi
Analisi citochine e chemochine mediante piattaforma multiparametrica	5 mesi
Analisi statistica di correlazione dei risultati; report finale.	2 mesi
Costo del progetto	€ 10.000,00

Metodi

Dimensione del campione, dati clinici, campioni biologici

Questo studio è di tipo preclinico e prevede l'analisi mediante protocolli in microfluidica e multiparametrici di campioni di siero, conservati nella banca biologica dell'Unità Operativa Neurologia IV, e sono stati prelevati da pazienti e controlli dopo la firma del consenso informato per l'utilizzo dei campioni stessi per scopi scientifici. Le determinazioni di NFL, GFAP e di citochine e chemochine saranno eseguite su campioni codificati al fine di garantire l'anonimato dei dati. Saranno analizzati almeno 50 campioni di pazienti con IDD e un pari numero di campioni da individui sani, abbinati per età e sesso, come popolazione di controllo. Saranno inclusi anche pazienti con IDD e in follow-up clinico, per una valutazione a T=6 e T=12 mesi. I pazienti affetti da SM o da NMOSD soddisfacevano rispettivamente i criteri di McDonald revisione 2017 (5) e i criteri di Wingerchuk del 2015 (6). I risultati saranno stratificati per sesso, età di insorgenza della malattia, durata della malattia al prelievo.

Analisi dei biomarcatori

I livelli di NFL e GFAP saranno misurati utilizzando una piattaforma di microfluidica ad alta sensibilità. Le citochine e le chemochine pro e antinfiammatorie saranno quantificate mediante kit multiparametrici (piattaforma Luminex). Verrà inoltre valutato un pannello di fattori solubili immuno-correlati che includerà IFN- γ , IL-2, TNF- α (subset Th1 - attività immunitaria cellulo-mediata); IL-4, IL-5, IL-10 (subset Th2 - attivazione e mantenimento della risposta immunitaria umorale); IL-17, IL-21 e IL-22 (subset Th17 - associate a processi autoimmuni). Nuove molecole o mediatori immunoinfiammatori solubili saranno eventualmente aggiunte alle analisi programmate.

Analisi statistica

La distribuzione normale (gaussiana) dei dati sarà valutata mediante test di Kolmogorov-Smirnov. Dati sperimentali con distribuzione non parametrica saranno analizzati con test di Mann-Whitney-Wilcoxon, mentre i dati normali saranno analizzati con test ANOVA o con t-test. L'elaborazione dei dati e analisi statistica verrà eseguita con il software Prism v5.0 (GraphPad). Il livello di significatività p sarà fissato a $<0,05$.

Diffusione dei risultati

I risultati dello studio saranno considerati per una pubblicazione scientifica.

I dati e le conclusioni della ricerca saranno divulgati a clinici e scienziati coinvolti nella ricerca sulle IDD e ad associazioni di pazienti, medici di medicina generale, per un generale beneficio della società civile e dei singoli soggetti.

Referenze

1. Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA. Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* (2018) **378**:169–180. doi:10.1056/NEJMra1401483
2. Kawachi I, Lassmann H. Neurodegeneration in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (2017) **88**:137–145. doi:10.1136/jnnp-2016-313300
3. Watanabe M, Nakamura Y, Michalak Z, Isobe N, Barro C, Leppert D, Matsushita T, Hayashi F, Yamasaki R, Kuhle J, et al. Serum GFAP and neurofilament light as biomarkers of disease activity and disability in NMOSD. *Neurology* (2019) **93**:E1299–E1311. doi:10.1212/WNL.00000000000008160
4. Kuhle J, Kropshofer H, Haering DA, Kundu U, Meinert R, Barro C, Dahlke F, Tomic D, Leppert D, Kappos L. Blood neurofilament light chain as a biomarker of MS disease activity and treatment response. *Neurology* (2019) **92**:E1007–E1015. doi:10.1212/WNL.00000000000007032
5. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, Correale J, Fazekas F, Filippi M, Freedman MS, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol* (2018) **17**:162–173. doi:10.1016/S1474-4422(17)30470-2
6. Wingerchuk DM, Banwell B, Bennett JL, Cabre P, Carroll W, Chitnis T, De Seze J, Fujihara K, Greenberg B, Jacob A, et al. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology* (2015) **85**:177–189. doi:10.1212/WNL.0000000000001729