

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI SPETTROMETRIA DI MASSA

PROGETTO

Analisi proteomica del liquido cerebrospinale (csf) di pazienti con idrocefalo normoteso (nph).

RESPONSABILE SCIENTIFICO: Dr. **Giuseppe Pieraccini**

COLLABORATORI: A. Caldini, A. Terreni, B. Salvadori, A. Scollato,
N. Di Lorenzo, G. Mastrobuoni, S. Francese, A. Ognibene, L. Bini, G. Messeri.

L'Idrocefalo Normoteso (NPH, Normal Pressure Hydrocephalus) è una condizione neurologica che interessa pazienti anziani (oltre i 55 anni di età) ed è caratterizzata da un accumulo di liquido cerebrospinale (CSF, CerebroSpinal Fluid) negli spazi ventricolari: questo comporta l'insorgenza di un tipico quadro sintomatico. Il trattamento di scelta per i pazienti con NPH è l'inserimento chirurgico di un sistema valvolare che permetta il drenaggio del liquido (VPS, Ventricular-Peritoneal Shunting). Lo NPH è una delle poche forme trattabili di demenza, ma è difficoltosa l'individuazione dei pazienti che possono beneficiare di questo intervento (solo il 75% dei pazienti migliora dopo VPS). Lo scopo di questo studio, condotto in collaborazione tra le strutture sopra indicate, è quello di identificare mediante 2D elettroforesi e spettrometria di massa le differenze nei profili proteici del CSF dei pazienti su cui l'intervento chirurgico può dare esiti positivi da coloro che non avrebbero benefici. Sono così stati raccolti campioni di CSF da 19 pazienti con il tipico quadro sintomatico del NPH durante l'intervento chirurgico. L'evoluzione del quadro sintomatico è stata valutata a tre mesi di distanza dall'intervento mentre le proteine presenti nel CSF sono state separate su gel bidimensionale, rivelate con colorazione al Sypro Ruby e le immagini così generate analizzate su software Melanie (versione 4.0, Amersham). Gli spot espressi in modo diverso nei gel dei pazienti migliorati rispetto ai non migliorati sono stati prelevati, sottoposti a digestione in-gel con tripsina e sottoposti ad analisi MALDI-TOF (MALDI-TOF/TOF Ultraflex, Bruker Daltonics) per identificare le proteine in essi contenute.

Dopo tre mesi 15 pazienti avevano mostrato un quadro clinico decisamente migliorato, mentre i restanti 4 risultavano invariati. La mappa delle proteine

contenute nei loro CSF mostrava un totale di 190 spot comuni a migliorati e non, di cui 15 risultavano diversamente espressi, cioè caratterizzati da una differenza di volume dello spot di almeno 1,5 volte. Tra questi 4 presentavano una differenza significativa al test di Mann Whitney tra i due gruppi di pazienti. La spettrometria di massa ha permesso di caratterizzare le proteine presenti negli spot di interesse.

I dati così ottenuti sembrano indicare che la sovraespressione della Alfa2 Heremans Schmid Glicoproteina e della Alfa1 Beta Glicoproteina e la sottoespressione della Proteina Acida Glial Fibrillare e della Apolipoproteina AIV è associata ad un miglioramento del quadro sintomatico dopo l'intervento. Queste proteine andranno perciò valutate per il possibile ruolo di indicatori nella scelta dei pazienti con NPH da sottoporre ad intervento chirurgico per il VPS.



C. I. S. M.

ANALISI PROTEOMICA DEL LIQUIDO CEREBROSPINALE (CSF) DI PAZIENTI CON IDROCEFALO NORMOTESO (NPH)

*Caldini A, Terreni A, Salvadori B, Ognibene A, Messeri G
Settore Proteine - Laboratorio Generale, AOUC*

*Scollato A, Di Lorenzo N
Dipartimento di Neurochirurgia, AOUC*

*Francese S, Mastrobuoni G, Pieraccini G, Moneti G
Centro Interdipartimentale di Spettrometria di Massa
Università degli Studi di Firenze*

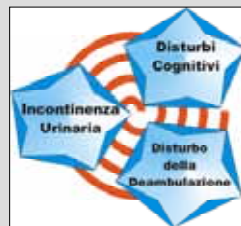


Aspetti clinici dell'Idrocefalo Normoteso



C. I. S. M.

Un alterato flusso liquorale causato da un difetto di riassorbimento o da cause ostruttive provoca dilatazione delle strutture ventricolari cerebrali per accumulo liquorale.



La prevalenza della demenza nei paesi industrializzati è circa il 5% nei soggetti di età superiore ai 65 anni.

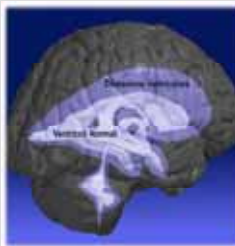
La prevalenza del NPH nell'ambito delle demenze varia dal 2 al 10%.



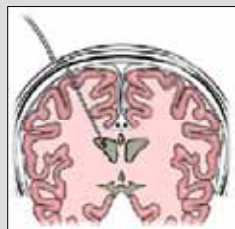
Trattamento dell'Idrocefalo Normoteso



C. I. S. M.



Trattamento chirurgico: drenaggio del liquor dal cranio tramite un sistema valvolare, con un catetere ventricolare introdotto in un ventricolo laterale ed un catetere distale posto in una cavità sierosa (VPS).



L'uso delle derivazioni liquorali rende l'NPH una delle patologie neurologiche più **trattabili** quando è praticata un'accurata selezione clinica dei pazienti.

Le variazioni di Pressione IntraCranica, misurate in continuo, permettono di individuare i pazienti che con maggior probabilità possono beneficiare del VPS.



Scopo del lavoro



C. I. S. M.

Solo il 75 % dei pazienti migliorano dopo VPS (Black P, J Neurosurg, 1980);
nel 13 - 40 % dei casi sono state riportate complicanze dovute all'intervento (Laarson A et al., Acta Neurol Scand, 1991):



↪ analizzare il CSF di pazienti con NPH mediante elettroforesi bidimensionale e correlare il pattern proteico con le diverse risposte post-VPS.

↪ identificazione di fattori prognostici per una miglior definizione dei pazienti da sottoporre a VPS.



RISULTATI



C. I. S. M.

↪ Dopo 3 mesi dall'intervento di DVP è stato valutato il grado di miglioramento dei pazienti sulla base dei principali sintomi dell'NPH: disturbi della deambulazione, incontinenza urinaria e disturbi cognitivi.



↪ 15 pazienti migliorati

↪ 4 pazienti invariati

↪ 71% di risposta al DVP

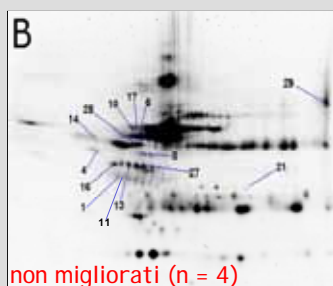
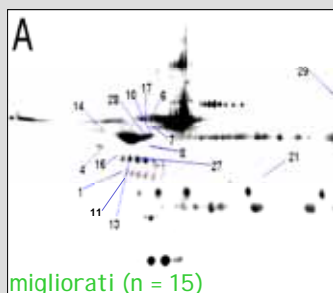
↓ L'outcome clinico dei pazienti è stato quindi correlato con i risultati ottenuti con l'analisi proteomica.



2D-GEL ANALISI



C. I. S. M.



differenze quantitative tra migliorati e non migliorati

Spot n°	Vol. in improved pt.		Vol. in not improved pt.		Vol. ratio
	Mean	SD	Mean	SD	
1	0,1592	0,1400	0,3429	0,3545	2.1535
*4	0,2694	0,1316	0,1286	0,0625	2.0958
6	0,6482	0,2722	0,3821	0,3325	1.6966
7	0,2054	0,1144	0,3768	0,3252	1.8340
8	0,1777	0,0634	0,3515	0,4376	1.9785
10	0,2856	0,0961	0,4494	0,4841	1.5737
11	0,2265	0,1368	0,4096	0,1929	1.8083
*13	0,2623	0,0920	0,5528	0,1885	2.1078
14	0,1621	0,0697	0,1000	0,0767	1.6215
16	0,1767	0,1000	0,3147	0,1245	1.7811
*17	0,3023	0,1107	0,1896	0,0322	1.5946
21	0,0234	0,0075	0,0355	0,0146	1.5199
*27	0,3477	0,1389	0,5888	0,1391	1.6932
*28	0,4931	0,2057	0,2687	0,1478	1.8347
29	0,0660	0,0253	0,1041	0,1013	1.5776



Risultati



C. I. S. M.

Spot n°	Proteina	M.W. (kDa)	migliorato <i>versus</i> non migliorato
1	clusterin (complement lysis inhibitor, SP-40,40, sulfated glycoprotein 2, testosterone-repressed prostate message 2, apolipoprotein J)	52.2	↓
4	Alpha 2-Heremans Schmid glycoprotein (fetuin A)	33.4	↑
6	Serum albumin	71.0	↑
8	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1	46.4	↓
10	Antithrombin III	52.9	↓
11	-Apolipoprotein E precursor -apolipoprotein J precursor	36.1 48.8	↓
13	Glial fibrillary acidic protein	49.8	↓
14	Chain A, Alpha1 Antichymotrypsin (Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 3, precursor)	47.0	↑
16	Chain F, Human Complement Component C3c	40.7	↓
17	Alpha 1 beta glycoprotein	51.9	↑
27	apolipoprotein A-IV	45.3	↓
28	No. I.d		↑