

La catena leggera del neurofilamento come biomarcatore nella sclerosi multipla

Lorenzo Gaetani

Clinica Neurologica, Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Perugia, Perugia

Introduzione

La ricerca sui biomarcatori liquorali ed ematici nelle malattie neurologiche ha compiuto di recente notevoli passi in avanti grazie allo sviluppo di metodiche immunoenzimatiche ultrasensibili in grado di misurare analiti anche a basse concentrazioni ⁽¹⁾. Nell'ambito della Sclerosi Multipla (SM), una grande attenzione è

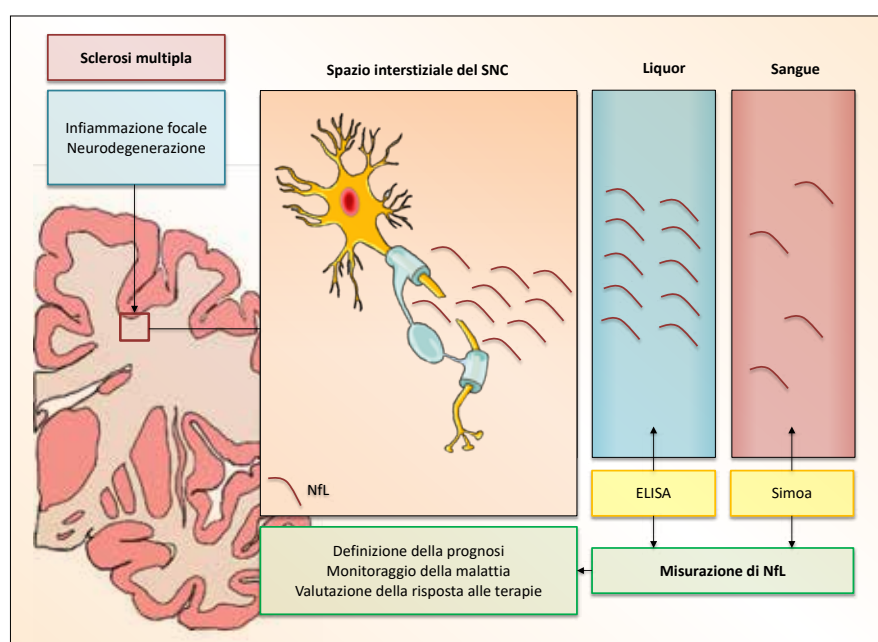
oggi rivolta verso la catena leggera del neurofilamento (*Neurofilament Light chain*, NfL), una proteina dosabile sia nel liquor che nel sangue, le cui variazioni sono espressione del danno assonale. Ad oggi, NfL ha dimostrato di avere potenziali applicazioni nella valutazione prognostica della SM, così come nel monitoraggio e nella definizione della risposta

ai trattamenti *disease-modifying* della stessa (Fig. 1).

Che cosa è NfL e che funzioni svolge?

NfL è una delle subunità proteiche più leggere del neurofilamento, una proteina con funzioni strutturali prevalentemente localizzata negli assoni ⁽²⁾. All'interno degli assoni, i

Figura 1. Nel corso della sclerosi multipla (SM), l'infiammazione focale e la neurodegenerazione partecipano a determinare un danno assonale prevalentemente a carico degli assoni di grande calibro dotati di rivestimento mielinico. Il danno assonale, a sua volta, porta al rilascio della catena leggera del neurofilamento (NfL) nello spazio interstiziale del sistema nervoso centrale (SNC). Da qui, NfL raggiunge il liquor e il sangue. In quest'ultimo comparto, le concentrazioni di NfL sono inferiori rispetto al liquor. La misurazione della concentrazione di NfL nel liquor e nel sangue, possibile mediante enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) nel siero e nel plasma, può avere implicazioni soprattutto nella definizione della prognosi della SM, così come nel monitoraggio della malattia e nella valutazione della risposta ai trattamenti *disease-modifying* a disposizione o in studio.



neurofilamenti sono disposti in serie, in maniera compatta, rendendone possibile la crescita radiale. Ne consegue che gli assoni più grandi, rivestiti di mielina, contengono un quantitativo maggiore di neurofilamenti e, di conseguenza, di NfL⁽²⁾. In seguito ad un danno assonale, di qualsiasi natura, NfL viene rilasciato nello spazio interstiziale da dove raggiunge il liquor ed il compartimento ematico, in maniera più marcata se il danno riguarda gli assoni di maggior calibro, ovvero quelli mielinizzati (Fig. 1). L'entità del rilascio di NfL sembra essere proporzionale al danno assonale, dato che patologie associate ad un diffuso danno neuronale (come le encefalopatie prioniche o la demenza associata a HIV) sono caratterizzate da un massivo incremento delle concentrazioni di NfL, sia nel liquor che nel sangue^(3,4). Anche in assenza di patologie neurologiche, vi è un fisiologico rilascio di NfL nello spazio interstiziale del sistema nervoso centrale, verosimilmente espressione dei processi di invecchiamento dello stesso, dal momento che le concentrazioni sia liquorali che sieriche di NfL, in soggetti non affetti da malattie neurologiche, sono fortemente età-dipendenti^(5,6).

Come può essere misurato NfL?

NfL può essere misurato nel liquor attraverso un *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), il cui processo di sviluppo risale al 1996⁽⁷⁾, disponibile in commercio. Più di recente, è stato perfezionato un nuovo ELISA che ha permesso di confermare i risultati ottenuti negli anni precedenti⁽⁸⁾. Nel sangue, dove le concentrazioni di NfL sono circa 40 volte inferiori rispetto al liquor, la misurazione di questa proteina è stata resa possibile in maniera affidabile

dalla metodica *Single Molecule Array* (Simoa), sviluppata nel 2010⁽¹⁾.

NfL può avere un valore diagnostico per la SM?

Nelle persone con SM e con sindrome clinicamente isolata (CIS), i valori di NfL nel liquor e nel sangue sono significativamente maggiori rispetto a quelli misurabili in soggetti di controllo di età corrispondente^(6,9). Tuttavia, la maggioranza degli studi è stata condotta su coorti selezionate di pazienti, valutate retrospettivamente. Questo limite, insieme alla aspecificità delle variazioni di NfL e alla scarsità di evidenze relative all'accuratezza di NfL nel distinguere tra la SM e le principali condizioni che entrano in diagnosi differenziale, rende poco verosimile che NfL possa avere un valore diagnostico per la SM⁽¹⁰⁾. Ciò nonostante, la misurazione di NfL nel liquor o nel siero potrebbe entrare a far parte, in futuro, del *work-up* diagnostico della SM, seppure con valenza prognostica più che diagnostica in senso stretto, come discusso più avanti.

Qual è il potenziale prognostico di NfL nella SM?

In qualità di marcatore di danno assonale, il rationale per il valore prognostico di NfL nella SM è forte e diverse evidenze sembrano confermarlo. Infatti, elevati valori di NfL nel liquor al momento della diagnosi sono stati associati ad un più alto rischio di conversione da SM recidivante a SM secondariamente progressiva a distanza di 14 anni dall'esordio della malattia⁽¹¹⁾, e ad un maggior grado di disabilità a distanza di 13 anni⁽¹²⁾. Inoltre, i valori sia liquorali che sierici di NfL all'esordio di malattia correlano strettamente con le variazioni negative dei volumi

cerebrale e midollare a distanza di 5 anni dalla misurazione di NfL^(13,14). Se l'associazione tra NfL ed alcuni *outcomes* clinici (es. disabilità) e strumentali (es. atrofia cerebrale e midollare) espressione del danno assonale è intuitiva, più controversa è la capacità di NfL di definire, fin dall'esordio, la successiva attività infiammatoria di malattia. Non a caso, ad esempio, le evidenze nelle CIS a supporto del valore di NfL nel predire la conversione a SM sono contrastanti^(15,16). Tuttavia, di recente, grazie alla capacità di effettuare misurazioni ripetute su campioni di siero, è emerso che le variazioni longitudinali di NfL possono avere un potenziale prognostico anche in termini di attività infiammatoria di malattia. Ad esempio, un aumento delle concentrazioni di NfL di 10 volte in un arco di tempo di 2 anni si associa ad un aumento pari a 5 volte del numero di nuove lesioni captanti gadolinio nell'arco dello stesso periodo⁽¹⁷⁾.

NfL potrebbe essere utilizzato per monitorare l'attività di malattia?

La misurazione delle concentrazioni sieriche di NfL sembra avere un'accuratezza non eccellente nell'identificare pazienti con attività di malattia (definita come una ricaduta nei 3 mesi precedenti o lesioni captanti gadolinio nelle 6 settimane precedenti il prelievo), mostrando in particolare una bassa sensibilità (45%), a fronte di una buona specificità (80%)⁽¹⁸⁾. Per tale motivo, NfL non può essere pensato come un sostituto delle misure convenzionali di attività di malattia, ma potrebbe aggiungersi ad esse, come suggerito da alcuni Autori, ad integrare la definizione della *No Evidence of Disease Activity* (NEDA)⁽¹⁹⁾.

NfL può essere utilizzato per valutare la risposta ad un trattamento *disease-modifying*?

Nella misura in cui NfL quantifica il danno assonale secondario alle lesioni focali o ai processi immunopatologici che si realizzano nella sostanza bianca apparentemente normale, è ragionevole attendersi che le terapie *disease-modifying* possano influenzare il rilascio di NfL nello spazio interstiziale. Vari studi hanno mostrato una riduzione dei valori di NfL, sia nel liquor che nel siero, come conseguenza dell'utilizzo di diversi farmaci disponibili per il trattamento della SM⁽¹⁰⁾. Queste evidenze rappresentano un'ulteriore dimostrazione dei vantaggi del trattamento immunosoppressivo della SM, anche in termini di

protezione dal danno assonale. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per comprendere come usare NfL per valutare la risposta alle terapie nella pratica clinica o negli studi clinici. Ad esempio, è noto che NfL nel liquor aumenta in funzione del danno assonale verificatosi fino a tre mesi prima⁽²⁰⁾. È ragionevole ipotizzare un andamento analogo anche nel siero, visto che esiste una buona correlazione tra le dinamiche di NfL nel liquor e nel sangue⁽⁶⁾. Per questo motivo, la misurazione di NfL nel siero ogni 3 mesi potrebbe essere sufficiente per monitorare il danno assonale in corso di terapie *disease-modifying*. A conferma di ciò, tuttavia, è necessario ottenere dati longitudinali su ampie popolazioni, che analizzino le traiettorie individuali di NfL.

Conclusioni

NfL è uno dei biomarcatori più promettenti nella SM. In un possibile scenario futuro, NfL potrebbe essere misurato nel liquor al momento della diagnosi per ottenere una valida stima prognostica a lungo termine. Al contrario, durante il decorso della malattia, NfL potrebbe essere misurato in maniera longitudinale su campioni di siero per monitorare la patologia, valutare la risposta alle terapie e, eventualmente, prendere decisioni terapeutiche.

Prima che ciò sia possibile, tuttavia, è necessario implementare le tecniche analitiche, sviluppando sistemi di riferimento e metodi standardizzati, così come definire valori normativi per classi di età ■

Bibliografia

- Rissin DM, Kan CW, Campbell TG, et al. Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nat Biotechnol.* 2010;28(6):595-9.
- Yuan A, Kumar A, Peterhoff C, Duff K, Nixon RA. Neurofilaments and neurofilament proteins in health and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;9(4). pii: a018309.
- Kovacs GG, Andreasson U, Liman V, et al. Plasma and cerebrospinal fluid tau and neurofilament concentrations in rapidly progressive neurological syndromes: a neuropathology-based cohort. *Eur J Neurol.* 2017;24 (11): 1326-e77.
- Abdulle S, Mellgren A, Brew BJ et al. CSF neurofilament protein (NFL) - a marker of active HIV-related neurodegeneration. *J Neurol.* 2007; 254(8):1026-32.
- Yilmaz A, Blennow K, Hagberg L, et al. Neurofilament light chain protein as a marker of neuronal injury: review of its use in HIV-1 infection and reference values for HIV-negative controls. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017;17(8): 761-70.
- Disanto G, Barro C, Benkert P, et al; Swiss Multiple Sclerosis Cohort Study Group. Serum Neurofilament light: A biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2017;81(6):857-70.
- Rosengren LE, Karlsson JE, Karlsson JO, et al. Patients with amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative diseases have increased levels of neurofilament protein in CSF. *J Neurochem.* 1996;67(5):2013-8.
- Gaetani L, Höglund K, Parnetti L, et al. A new enzyme-linked immunosorbent assay for neurofilament light in cerebrospinal fluid: analytical validation and clinical evaluation. *Alzheimers Res Ther.* 2018;10(1):8.
- Kuhle J, Plattner K, Bestwick JP, et al. A comparative study of CSF neurofilament light and heavy chain protein in MS. *Mult Scler.* 2013;19(12):1597-603.
- Gaetani L, Blennow K, Calabresi P, et al. Neurofilament light chain as a biomarker in neurological disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2019;90(8):870-81.
- Salzer J, Svenningsson A, Sundström P. Neurofilament light as a prognostic marker in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2010;16(3):287-92.
- Modvig S, Degn M, Roed H, et al. Cerebrospinal fluid levels of chitinase 3-like 1 and neurofilament light chain predict multiple sclerosis development and disability after optic neuritis. *Mult Scler.* 2015;21(14):1761-70.
- Arrambide G, Espejo C, Eixarch H, et al. Neurofilament light chain level is a weak risk factor for the development of MS. *Neurology.* 2016;87(11):1076-84.
- Barro C, Benkert P, Disanto G, et al. Serum neurofilament as a predictor of disease worsening and brain and spinal cord atrophy in multiple sclerosis. *Brain.* 2018;141(8):2382-91.
- Teunissen CE, Iacobaeus E, Khademi M, et al. Combination of CSF N-acetylaspartate and neurofilaments in multiple sclerosis. *Neurology.* 2009;72(15):1322-9.
- Disanto G, Adiutori R, Dobson R, et al; International Clinically Isolated Syndrome Study Group. Serum neurofilament light chain levels are increased in patients with a clinically isolated syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2016;87(2):126-9.
- Kuhle J, Nourbakhsh B, Grant D, et al. Serum neurofilament is associated with progression of brain atrophy and disability in early MS. *Neurology* 2017;88(9):826-31.
- Novakova L, Zetterberg H, Sundström P, et al. Monitoring disease activity in multiple sclerosis using serum neurofilament light protein. *Neurology.* 2017;89(22):2230-7.
- Bonnan M, Marasescu R, Demasles S, et al. No evidence of disease activity (NEDA) in MS should include CSF biology - Towards a 'Disease-Free Status Score'. *Mult Scler Relat Disord.* 2017;11:51-5.
- Lycke JN, Karlsson JE, Andersen O, Rosengren LE. Neurofilament protein in cerebrospinal fluid: a potential marker of activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1998;64(3):402-4.