

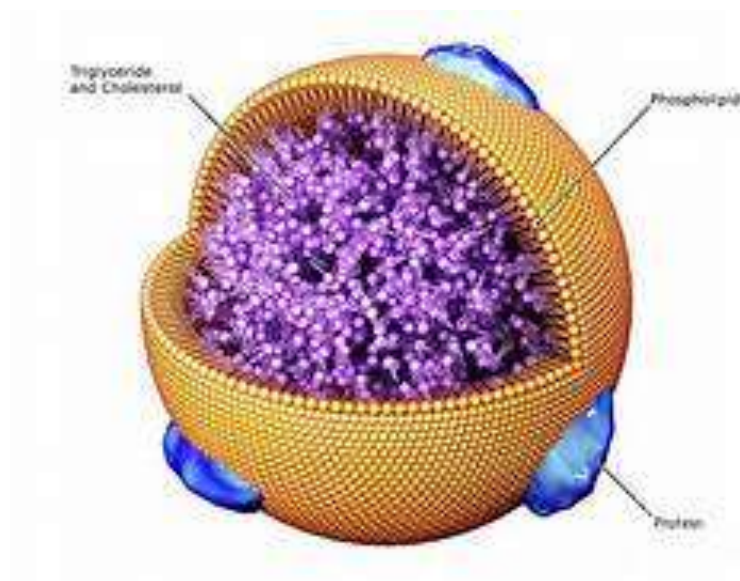
1. settembre

## Una pipeline per la fenotipizzazione molecolare profonda delle lipoproteine in piccoli volumi di liquido cerebrospinale umano

*Esisterà qualche altra strada oltre a quella della mente?*

Sylvia Plath

Il **plasma e il liquido cerebrospinale (CSF)** contengono complessi lipoproteici di dimensioni nanometriche chiamati **lipoproteine** che sono meglio riconosciute per il loro ruolo nel trasporto dei lipidi alle cellule e ai tessuti per mantenere l'omeostasi lipidica dell'intero corpo.



*Le lipoproteine plasmatiche sono ben studiate e caratterizzate, essendo tradizionalmente classificate sulla base della densità delle particelle in chilomicroni, lipoproteine a densità molto bassa (VLDL), lipoproteine a bassa densità (LDL) e ad alta densità (HDL). L'LDL è comunemente chiamato "colesterolo cattivo" e l'HDL "colesterolo buono" a causa della loro associazione opposta con le malattie cardiovascolari. Tuttavia, le lipoproteine sono composizionalmente più complesse del colesterolo semplice; contengono un nucleo lipidico neutro di esteri del colesterolo e trigliceridi circondati da un monostrato di fosfolipidi intervallato da colesterolo libero. Queste emulsioni lipidiche sono associate a proteine di impalcatura chiamate apolipoproteine che forniscono integrità strutturale alle particelle e agiscono come detergenti per il trasporto dei costituenti lipidici idrofobici attraverso l'ambiente acquoso. La principale proteina d'impalcatura per VLDL e LDL è l'apolipoproteina (APO) B e per HDL è APOA1.*

I recenti progressi nelle tecniche di separazione biofisica e l'avvento della spettrometria di massa ad alta sensibilità hanno rivelato una sostanziale eterogeneità compositiva all'interno di ciascuna sottoclasse di lipoproteine, in particolare per le **HDL**

Gli studi del *Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Cincinnati*, hanno dimostrato che l'**HDL** contiene più di **250 proteine diverse** e più di **200 lipidi diversi**.

Davidson WS et al. [The HDL Proteome Watch: Compilation of studies leads to new insights on HDL function](#). *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2022 Feb;1867(2):159072.

Queste proteine e lipidi si fondono in particelle discrete di diverse dimensioni (cioè, sottospecie HDL) che contengono complementi sia comuni che unici di proteine che agiscono in modo cooperativo in funzioni oltre il trasporto dei lipidi che vanno dall'inibizione delle **proteasi** all'attivazione della **cascata del complemento**

Vaisar T et al. [Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL](#). *J Clin Invest*. 2007 Mar;117(3):746-56.

Forse l'esempio più impressionante della specializzazione funzionale delle HDL è il **fattore litico del tripanosoma (TLF)**: un HDL che contiene APOA1, proteina correlata all'aptoglobina (HRP) e APOL1. TLF sfrutta l'HRP sulla superficie delle particelle per infiltrarsi nel parassita **Trypanosoma brucei brucei** attraverso un meccanismo di cavallo di Troia. Una volta ottenuto l'accesso, APOL1 subisce un cambiamento conformazionale indotto dal pH all'interno del lisosoma per formare un poro transmembrana con conseguente rigonfiamento osmotico e lisi del parassita (5). Il TLF è uno dei pochi complessi proteici HDL specifici che sono stati risolti con successo fino ad oggi (6), poiché le somiglianze nelle caratteristiche biofisiche tra le popolazioni di particelle le rendono difficili da risolvere con approcci di isolamento singoli.

Ciononostante, gli studi sulla fenotipizzazione delle HDL hanno recentemente identificato una speciazione unica e firme compositive correlate ai percorsi molecolari coinvolti nella

### **risposta immunitaria innata**

Rueda CM et al. [High density lipoproteins selectively promote the survival of human regulatory T cells](#). *J Lipid Res*. 2017 Aug;58(8):1514-1523.

### **nell'infiammazione**

Barter PJ, Rye KA. [High density lipoproteins and coronary heart disease](#). *Atherosclerosis*. 1996 Mar;121(1):1-12.

### **nel metabolismo del glucosio**

Fryirs MA et al. [Effects of high-density lipoproteins on pancreatic beta-cell insulin secretion](#). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 Aug;30(8):1642-8.

### **e nello stress ossidativo**

Navab M et al. [Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1](#). *J Lipid Res*. 2000 Sep;41(9):1481-94. PMID: 10974056.

Inoltre, diverse sottospecie di HDL seguono in modo differenziale, sia positivamente che negativamente, **la malattia coronarica**

Sacks FM et al. [Protein-Defined Subspecies of HDLs \(High-Density Lipoproteins\) and Differential Risk of Coronary Heart Disease in 4 Prospective Studies](#). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020 Nov;40(11):2714-2727.

rendendole allettanti bersagli terapeutici per **il trattamento dei disturbi metabolici**

Sacks FM et al. [Protein-Defined Subspecies of HDLs \(High-Density Lipoproteins\) and Differential Risk of Coronary Heart Disease in 4 Prospective Studies](#). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020 Nov;40(11):2714-2727.

Il cervello è uno degli organi più ricchi di lipidi nel corpo umano e il sistema nervoso centrale (SNC) genera una propria costellazione di lipoproteine che si ritiene aiutino a mantenere l'omeostasi lipidica del sistema nervoso centrale. Il metabolismo aberrante dei lipidi nel sistema nervoso centrale è stato ora collegato a molteplici disturbi neurodegenerativi tra cui il **morbo di Alzheimer (AD)**, il **morbo di Parkinson**, **la malattia di Huntington** e **la sclerosi laterale amiotrofica**.

Sfortunatamente, la nostra comprensione di queste particelle uniche nel sistema nervoso centrale è limitata, poiché esistono nel liquido cerebrospinale a 1/200 dei livelli di **lipoproteine** nel plasma rendendo notoriamente difficile un'analisi biochimica dettagliata. Alcuni studi suggeriscono che le

lipoproteine nel liquido cerebrospinale (CSF-Lps) sono simili alle HDL plasmatiche a causa di proprietà condivise come dimensione e forma

*Roheim PS et al. **Apolipoproteins in human cerebrospinal fluid**. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979 Sep;76(9):4646-9.*

Questa nozione è supportata da studi compositivi superficiali che mostrano che, come l'HDL, le Lps CSF sono principalmente arricchite in fosfolipidi e colesterolo. Inoltre, le Lps nel liquido cerebrospinale contengono più proteine associate alle HDL, tra cui **APOA1 e APOE**, sebbene a differenza delle HDL plasmatiche, **APOE** sia la proteina impalcatura primaria sulle Lps nel liquido cerebrospinale. Inoltre, nel liquido cerebrospinale sono presenti enzimi che modificano l'HDL, come la **lecitina-colesterolo aciltransferasi (LCAT)** e la proteina di trasferimento dei fosfolipidi (**PLTP**) e le proteine di membrana come la sottofamiglia A della cassetta legante l'adenosina trifosfato, membro 1 (**ABCA1**), essenziali per la biogenesi delle HDL, sono espresse in cellule specifiche del sistema nervoso centrale

*Langmann T et al. **Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages**. Biochem Biophys Res Commun. 1999 Apr 2;257(1):29-33.*

Date le forti somiglianze tra le **Lps del liquido cerebrospinale e le HDL plasmatiche**, ne consegue che le Lps del liquido cerebrospinale possono anche mostrare eterogeneità compositiva delle HDL e pleiotropia funzionale.

La rivelazione sulla complessità molecolare delle HDL è confermata da sofisticate tecniche di speciazione sviluppate per risolvere diverse popolazioni di HDL. Un approccio informativo è stato la cromatografia ad esclusione dimensionale ad alta risoluzione (SEC) che separa le particelle sulla base delle differenze nel loro diametro idrodinamico.

Rispetto alle tradizionali configurazioni SEC, l'integrazione di tre colonne Superdex 200 in tandem amplia notevolmente la finestra di eluizione di particelle e proteine nell'intervallo di dimensioni HDL

Questa tecnica ha rivelato profondi cambiamenti nei profili di speciazione delle HDL di individui con perturbazioni metaboliche documentate, tra cui

### **diabete di tipo 2**

*Gordon SM et al. **The effects of type 2 diabetes on lipoprotein composition and arterial stiffness in male youth**. Diabetes. 2013 Aug;62(8):2958-67.*

### **obesità**

*Davidson et al. **Obesity is associated with an altered HDL subspecies profile among adolescents with metabolic disease**. J Lipid Res. 2017 Sep;58(9):1916-1923.*

### **gravidanza**

*Melchior JT et al. **Pregnancy is accompanied by larger high density lipoprotein particles and compositionally distinct subspecies**. J Lipid Res. 2021;62:100107.*

Questi profili vengono generalmente ottenuti misurando l'abbondanza dei lipidi (cioè colesterolo totale o fosfolipidi) nelle singole frazioni utilizzando test enzimatici. Sebbene sufficienti per il plasma, l'applicazione di questi test al liquido cerebrospinale umano richiederebbe più di 50 ml di campione rendendo impraticabili studi analoghi sul liquido cerebrospinale-Lps tra individui e quindi popolazioni cliniche.

I ricercatori del **Biological Sciences Division, Pacific Northwest National Laboratory** e il **Department of Neurology, Oregon Health and Science University**,



oggi 1 settembre hanno pubblicato il report

*Merrill NJ et al*

**Human cerebrospinal fluid contains diverse lipoprotein subspecies enriched in proteins implicated in central nervous system health.**

*Sci Adv. 2023 Sep;9(35):eadi5571.*

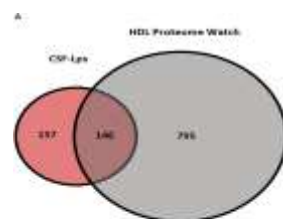
**Che ha utilizzato la sensibilità della fluorescenza per superare l'ostacolo dell'abbondanza di lipoproteine nel liquido cerebrospinale.**

E' stata sviluppata una tecnologia fluorescente sensibile per caratterizzare le sottospecie lipoproteiche in piccoli volumi di liquido cerebrospinale umano.

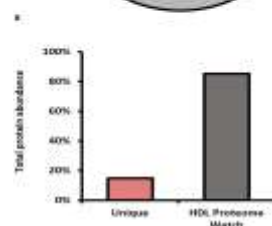
Sono state così identificate 10 popolazioni di Lps nel liquido cerebrospinale di dimensioni distinte, la maggior parte delle quali erano più grandi delle HDL plasmatiche.

L'analisi spettrometrica di massa ha identificato **303 proteine** nelle popolazioni, oltre la metà delle quali **non sono state riportate nell'HDL plasmatico**.

**Proteine associate a CSF-Lps rispetto al "HDL Proteome Watch"**



( A ) La sovrapposizione delle proteine identificate sul CSF-Lps umano con le proteine riportate sull'HDL Proteome Watch. L'elenco di controllo del proteoma HDL richiedeva solo un singolo rapporto di una proteina sull'HDL (941 proteine totali).

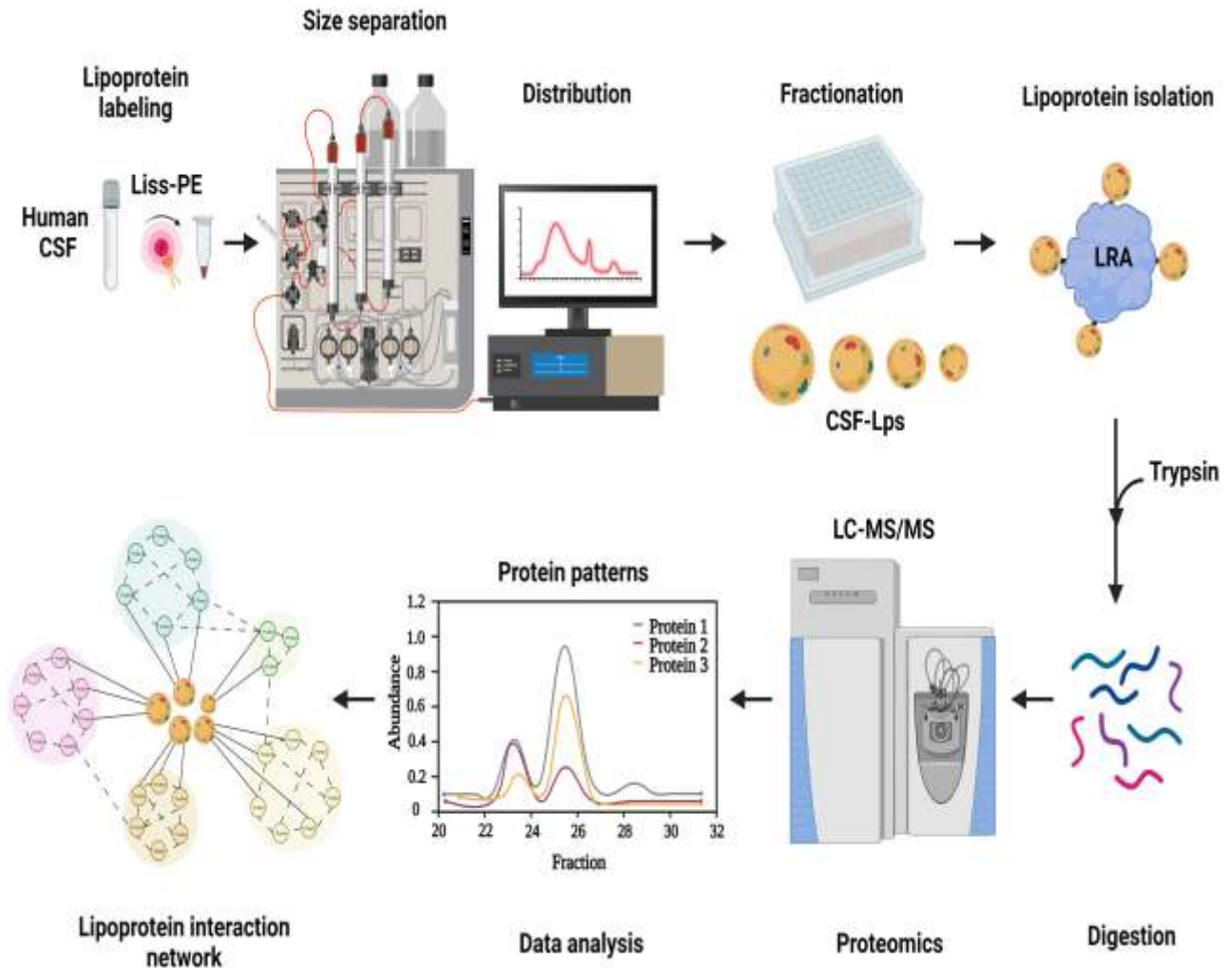


( B ) L'abbondanza relativa delle proteine esclusive di CSF-Lps e delle proteine che si sovrappongono all'HDL Proteome Watch. Abbiamo calcolato l'abbondanza sommando le intensità LFQ per le proteine all'interno di ciascun gruppo ed esprimendo i valori individuali come percentuale dell'intensità LFQ totale di tutte le proteine rilevate nelle frazioni.

L'analisi computazionale ha rivelato che le Lps CSF sono arricchite di proteine importanti per la guarigione delle ferite, l'infiammazione, la risposta immunitaria e sia la generazione che lo sviluppo dei neuroni. L'analisi di rete ha indicato che diverse sottopopolazioni di CSF-Lps contengono combinazioni uniche di queste proteine.

Lo studio dimostra che probabilmente esistono sottospecie CSF-Lp che contengono firme compositive correlate alla salute del sistema nervoso centrale.

La tecnologia utilizzata è riassunta nella figura:



### Flusso di lavoro per la caratterizzazione molecolare di CSF-Lps.

Le lipoproteine vengono marcate a scambio con un fosfolipide contenente rodamina e la distribuzione dimensionale viene determinata utilizzando un profilatore lipoproteico fluorescente. Le Lps CSF all'interno di ciascuna frazione vengono isolate utilizzando un agente di rimozione dei lipidi (LRA). Le proteine legate ai lipidi vengono digerite direttamente dalla resina, raccolte e analizzate utilizzando la spettrometria di massa dal basso verso l'alto (LC-MS/MS). L'analisi computazionale dell'abbondanza di proteine e dei modelli di comigrazione viene utilizzata per generare mappe della rete proteica e identificare potenziali sottospecie di CSF-Lp.

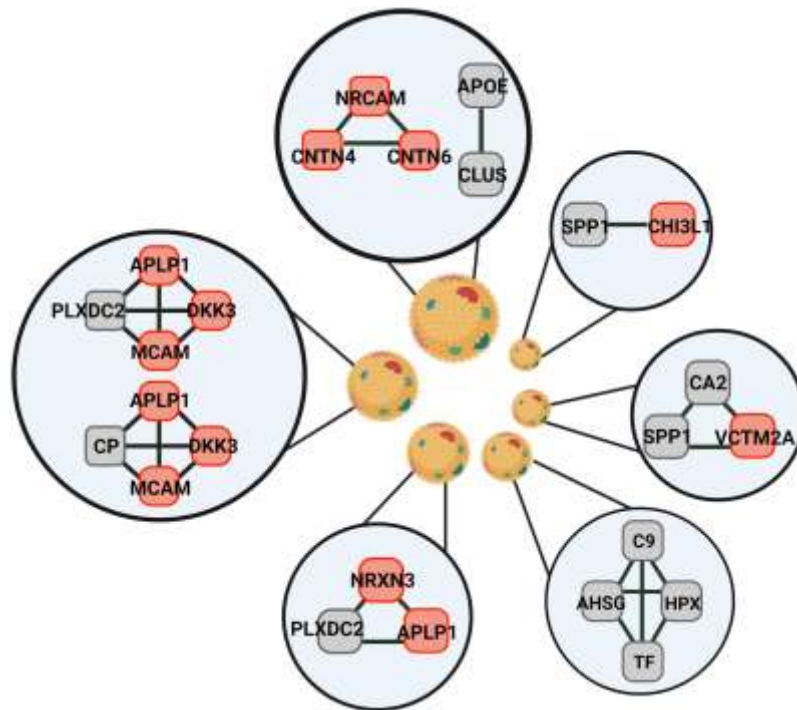


## In sintesi

Viene descritta una **pipeline** per la fenotipizzazione molecolare profonda delle lipoproteine in piccoli volumi di liquido cerebrospinale umano.

Il lavoro dimostra che il liquido cerebrospinale contiene una popolazione eterogenea di lipoproteine composizionalmente uniche che, come le HDL plasmatiche, sono arricchite in proteine *con funzioni che vanno oltre il semplice trasporto dei lipidi*.

## Rappresentazione di potenziali sottospecie CSF-Lp.



Il CSF-Lps è costituito da una costellazione di particelle di diverse dimensioni. Le particelle all'interno di classi di dimensioni diverse contengono hub di rete proteica unici costituiti sia da proteine precedentemente riportate sull'HDL plasmatico (grigio) sia da proteine uniche per le popolazioni che esistono all'interno del **sistema nervoso centrale (rosso)**.

Complessivamente i dati propongono un ruolo delle sottospecie CSF-Lp nella modulazione dei processi molecolari critici per l'elaborazione delle informazioni e la cognizione.

Dato che la quantificazione delle variazioni nelle dimensioni delle lipoproteine plasmatiche ha fornito approfondimenti sull'eziologia di molteplici disturbi metabolici.

Il lavoro futuro si concentrerà sulla profilazione molecolare del liquido cerebrospinale-Lps per identificare sottospecie funzionalmente rilevanti negli individui affetti da disturbi neurodegenerativi.

# Save the Date

## 26 settembre

# W A C I

## 2023

15 anni varie ed eventuali

26 SETTEMBRE 24 OTTOBRE 21 NOVEMBRE 19 DICEMBRE



Montespina Park Hotel



***Ideato e diretto da* Guglielmo Scala**

## “Remember: Allergology is Immunotherapy”

Ruolo della diagnostica molecolare (CRD) nell'Immunoterapia allergene specifica (AIT)

Guglielmo Scala

L'allergologia è una branca piuttosto curiosa della medicina interna. Nasce dall'immunologia, quella di laboratorio, quella vera, non moltissimi anni fa. Le malattie allergiche sono il “braccio clinico” dell'immunologia, o almeno quello più noto e studiato, e questo per la clamorosa prevalenza delle malattie allergiche, che, nel mondo caratterizzato dalla “western life-style” hanno fatto parlare di una vera e propria “epidemia allergica”.

In effetti, non è che la medicina interna sentisse proprio indispensabile, l'arrivo sulla scena clinica degli allergologi. Altri specialisti, cresciuti in discipline antiche e gloriose, coprono più che dignitosamente tutto il campo delle allergie. Pneumologi, otoiatri, dermatologi, oculisti, reumatologi, cardiologi hanno competenze specifiche che nessun allergologo può vantare, non ci sono confronti possibili. Gli esempi sono innumerevoli. Noi allergologi abbiamo molto da imparare dagli altri specialisti. Dagli pneumologi, ad esempio, impariamo la fisiopatologia respiratoria, così come non potremo mai eguagliare un otorino in una rinoscopia o un oculista nella sua diagnostica strumentale. E ancora, noi allergologi trattiamo le dermatiti e l'orticaria ma non saremo mai raffinati morfologi quanto lo sono i dermatologi. Parliamo di ipotensione e shock ma mai potremo competere con i cardiologi. Eccetera. E tuttavia siamo qui, e, partendo dai meccanismi della risposta immune, piano piano abbiamo acquisito competenze cliniche.

C'è in effetti qualcosa che ci caratterizza e, credo io, giustifica la nostra presenza del grande affresco della medicina interna. Proprio perché non apparteniamo ad una settorializzazione di “apparato”, ecco che il nostro approccio al paziente può essere, a noi piace crederlo, più “globale”. Il paziente allergico, quale che sia la sua malattia è sempre, per definizione, un paziente “atopico” cioè qualcuno che, su base genetica, ha un rapporto con l'ambiente diverso e talora minaccioso.

Non a caso si parla di “marcia allergica”, che pur non essendo una certezza assoluta, ci ricorda che nello stesso individuo, in fasi diverse della vita riscontriamo problemi clinici che di volta in volta coinvolgono apparati diversi. In questo breve articolo, ripreso da una mia conversazione tenuta all'ultimo congresso della SIAIP, mi piace sottolineare una specificità tipica della pratica allergologica. Il trattamento delle malattie allergiche respiratorie con l'immunoterapia specifica, oggi riassunta nell'acronimo AIT (Allergen Immuno-Therapy).

### *Perché l'AIT*

L'immunoterapia specifica ha diverse indicazioni, alcune consacrate dalle Linee Guida come l'allergia a veleno d'insetti, altre ancora in fase sperimentale, come quella per le allergie alimentari. Qui parliamo dell'AIT nelle allergie respiratorie, la rinite allergica e l'asma bronchiale allergico. Non è scopo di questo articolo approfondire la patogenesi di queste malattie. Basti ricordare che, in un soggetto allergico ad un aeroallergene (derivati acaridici, pollini, muffe, epiteli



animali), il contatto tra la mucosa respiratoria e la molecola responsabile (o meglio uno o più epitopi della molecola) induce una cascata di eventi che risultano in una infiammazione tessutale. *Un contatto episodico può determinare una flogosi acuta che tende a autoridursi (pur non sitando in una vera e propria restitutio ad integrum) mentre un contatto continuato darà origine ad una flogosi cronica e ad un sovertimento istologico irreversibile del tessuto bronchiale. La terapia classica prevede due passaggi chiave. Il primo, ovvio, è l'allontanamento dell'allergene. **L'approccio ecologico.** Qualora questo fosse possibile sarebbe senza dubbio la soluzione migliore.* Zero contatto, zero flogosi. Questa è, purtroppo solo utopia. Le allergie si producono esattamente nei confronti da molecole presenti nell'ambiente quindi una terapia "ecologica" basata sull'allontanamento dell'allergene è nei fatti quasi sempre irrealizzabile. Secondo passaggio, codificato da diverse linee guida internazionali, è **l'approccio farmacologico**. Le molecole che hanno un riconosciuto effetto sulla flogosi allergica, mediata essenzialmente da eosinofili e mastociti, sono gli steroidi.

Abbiamo formulazioni sempre più efficaci e con un sempre migliore indice terapeutico (cioè il rapporto efficacia/sicurezza) ma, diciamocela tutta: cortisonici si usavano quaranta anni fa, cortisonici si usano oggi. Migliori, certo, ma là stiamo. Ai cortisonici si aggiungono i broncodilatatori (catecolamine), a volte trovano spazio gli antistaminici. Altre molecole, quali gli antagonisti recettoriali dei leucotrieni, hanno fatto parlare di sé anni fa ma il loro campo di applicazione è modesto. Inoltre, i farmaci antiinfiammatori sono gravati da un serio problema clinico. Se lo stimolo infiammatorio è persistente (come infatti è sempre, e se no di che staremmo parlando?) l'efficacia degli antiinfiammatori dura solo finché essi sono somministrati. Alla sospensione del farmaco riparte la flogosi. In sintesi noi non abbiamo alcuno strumento per "guarire" un allergico, possiamo solo spegnere la flogosi quando c'è. Infatti, un asmatico ben trattato, che da lunghi periodi, anche anni, non abbia più presentato crisi asmatiche non si definisce "guarito". Si parla di "asmatico in fase di buon controllo".

Non è una mera distinzione semantica. Sottolinea il concetto che in qualsiasi momento si può presentare una situazione ambientale o personale per cui quell'asma, da anni sopita, si ripresenta. Talora le crisi di asma più gravi si verificano, infatti, proprio in pazienti in controllo da anni. Ma questo è un altro problema di cui, casomai, riparleremo. Ecco che siamo arrivati al punto. Abbiamo un solo strumento che, se ben utilizzato, è in grado di cambiare la storia naturale della malattia allergica respiratoria, che si tratti di rinite allergica o di asma bronchiale. Questo strumento è l'immunoterapia allergene-specifica. **L'approccio immunologico.** In sintesi, questa terapia consiste nel somministrare al paziente, attraverso vie diverse, esattamente l'allergene cui è allergico, l'allergene maggiormente rilevante nel determinare la malattia. Storicamente la somministrazione procedeva per inoculazione sottocutanea di estratti della fonte allergenica totale, come ad esempio l'estratto di acari dermatofagoidi o di pollini.

Nei decenni anche questa metodica è andata incontro a progressi molto significativi per due motivi principali. Da un lato l'affinamento della diagnostica, dall'altro lo sforzo dell'industria di produrre materiali sempre più purificati. Perché l'AIT sia la più efficace possibile è necessario che alcuni punti siano rispettati. La diagnosi deve essere la più precisa possibile e il prodotto il migliore possibile per quel paziente. Non è un argomento semplice.

## Diagnosi:

La base quotidiana della diagnostica allergologica di primo livello è il prick test cutaneo. Una piccola quota (circa 3 microlitri) di estratto viene a contatto col derma attraverso una piccola puntura (appunto un "prick"). Qualora nella cute del soggetto ci siano mastociti che esibiscono sulla membrana delle molecole di IgE che riconoscono quello specifico allergene il contatto evocerà la produzione di un pomfo, paragonabile ad una puntura di zanzara. Le stesse IgE specifiche, quelle che, se adese al mastocita, ci danno la positività al prick test, sono dosabili nel siero nella loro forma libera.

Negli anni il materiale utilizzabile per la diagnostica "in vitro" ha conosciuto un notevole impulso. Oggi siamo in grado di dosare non più soltanto un estratto di fonte allergenica ma, di quell'estratto, le singole molecole. Non tutte, beninteso, ma quelle allergologicamente più rilevanti. E più tempo passa più il pannello a disposizione della diagnostica si amplia con l'ingresso di nuove molecole. Questo ha consentito di perfezionare la diagnosi di allergia in maniera impensabile una ventina di anni fa. Prendiamo per esempio l'allergia ai pollini di graminacee. Oggi ha sempre meno senso parlare di "allergico alle graminacee". Il polline di graminacee più studiato è il Phleum Pratense (noto anche col nome di Codolina o Coda di topo).

Esso è un coacervo di molecole di cui alcune hanno un ruolo noto e preciso nella genesi della malattia allergica respiratoria (Phl p1 e Phl p5) altre hanno un ruolo in una possibile sensibilizzazione alimentare per somiglianza sterica con molecole della stessa famiglia presente in alcuni alimenti vegetali (Phl p7 e Phl p12) e altre ancora non hanno, ad oggi alcun ruolo noto in patologia umana. Ovviamente la stessa cosa vale per tutte le altre fonti allergeniche.

Ecco come cambia la diagnostica. La positività ad un prick test con estratto di graminacee mi dice che quel paziente avrà probabilmente sintomi all'inalazione del polline ma non mi dice qual è esattamente la molecola che, in quello specifico paziente, sta evocando il sintomo. La diagnostica molecolare (detta in inglese Component Resolved Diagnosis – CRD) invece supera questo gap e consente una diagnosi di precisione. A cosa mi serve, si potrebbe obiettare? Alla fine, se i sintomi son quelli, la terapia sempre quella sarà! Vero. Ma conoscere la diagnosi a livello molecolare mi consente di identificare per quel paziente il più efficace prodotto di immunoterapia.

### **Piccola parentesi per l'elogio del prick test.**

Ho detto che la base della diagnostica allergologica ancora oggi consiste nel buon vecchio prick test. Si tratta, è vero, di un test piuttosto rozzo, spesso fastidioso per il paziente (pomfi sparsi per le braccia, prurito intenso...). Gli estratti non hanno avuto la stessa evoluzione dei loro cugini della diagnostica "in vitro" e sono spesso ancora un oggetto sconosciuto. In altri termini sappiamo che un certo estratto proviene da una fonte allergenica e che, più o meno, conterrà tutte le molecole della fonte nativa.

Ma sappiamo poco di più. Certo, non sono gli stessi estratti di quarant'anni fa, sono più purificati, ma siamo lontani dalla perfezione. Tuttavia, l'essere un test "in vivo" ha numerosi vantaggi. Tanto per cominciare, salvo errori di distrazione dell'operatore, una positività non lascia dubbi, almeno sulla sensibilizzazione. Che poi una sensibilizzazione abbia un ruolo nella clinica è altro argomento e riguarda, comunque, anche la diagnostica in vitro. I sacerdoti del dosaggio sierico delle IgE specifiche guardano con sufficienza chi ancora esegue prick test, un test ritenuto medievale. Eppure, il riscontro della presenza in circolo di IgE non è, a mio parere, un succedaneo del prick test di pari valore.

Basta guardare al meccanismo immunopatogeno che ne è alla base. Perché il contatto cutaneo con un allergene evoca un pomfo certamente è indispensabile la presenza di IgE specifiche adese alla membrana dei mastociti cutanei, come già detto. Tuttavia questa presenza, pur indispensabile non è il solo parametro da considerare. L'immunologia classica ci insegna che esistono molti altri fattori in gioco. L'avidità del frammento Fab dell'anticorpo per l'epitopo della molecola, la densità recettoriale delle IgE sul mastocita, la realizzabilità del mastocita, cioè la sua capacità di rilasciare immediatamente l'istamina preformata, la conformazione del recettore mastocitario per il frammento Fc delle IgE. Insomma, può il semplice riscontro nel siero di IgE specifiche essere equivalente ad un così complesso meccanismo in cui, oltre alle IgE, tanti altri attori sono causa? Francamente ne dubito.

Purtroppo i tempi corrono velocemente verso la scomparsa del prick test. Probabilmente gli allergologi della prossima generazione non sapranno neanche di cosa si tratta. Le normative dell'EMA, riprese ovviamente dall'AIFA, stanno penalizzando la produzione di estratti per prick test a vantaggio dei prodotti per diagnostica in vitro. C'è del marcio in Danimarca (cioè negli Istituti Regolatori Europei)? Non lo so, non posso saperlo e francamente neanche mi interessa. Noto il fenomeno con disappunto, ecco tutto.

### **Torniamo al ruolo della CRD nell'AIT.**

Uno studio molto interessante del gruppo iPAN italiano ha dimostrato che alcune decine di pazienti allergici alle graminacee, tutti cioè positivi al prick test per estratto di graminacee, se esaminati a livello molecolare mostravano profili di sensibilizzazione assolutamente diversi e imprevedibili. Questo ha una evidente ricaduta in termini di probabile efficacia dell'immunoterapia. E' molto probabile che l'efficacia della immunoterapia stessa sia tanto maggiore quanto più la composizione molecolare dell'estratto utilizzato si sovrapponga al profilo di sensibilizzazione. Uno studio successivo, condotto su allergologi, ha mostrato come la prescrizione di immunoterapia cambi significativamente alla luce della CRD. La terapia deve essere precisa.

Al momento attuale la parola "precisa" ha ancora due possibili significati. Alcuni prodotti in commercio continuano a contenere l'estratto totale ma sono "titolati" per l'allergene maggiore. Nel caso dell'ALK Abellò l'estratto di solo Phleum è titolato a concentrazione nota, quindi, per il Phl p1. Nel caso della Stallergenes il prodotto è una miscela di 5 graminacee titolata sull'allergene maggiore di tutte e 5. In entrambi i casi i prodotti sono stati registrati e sono in vendita in farmacia con piano terapeutico. Una nuova frontiera è stata aperta dall'azienda spagnola Roxall che invece ha messo in commercio un prodotto purificato per l'allergia all'Alternaria, in cui invece della solita miscela è presente esclusivamente l'allergene maggiore puro, cioè l'Alt a1. E' ovvio che solo il tempo potrà dare conferma di quello che oggi sembra un traguardo sempre più vicino e cioè di riuscire a ritagliare per ogni singolo paziente un trattamento desensibilizzante che sia lo specchio fedele della sua allergia a livello molecolare.

**"Remember: Allergology is Immunotherapy"**

#### **Bibliografia**

Tripodi S et al, 2012, J Allergy Clin Immunol. Molecular profiles of IgE to Phleum pratense in children with grass pollen allergy: Implications for specific immunotherapy

**Tabar AI et al**, 2019 J Allergy Clin Immunol. Double-blind, randomized, placebo-controlled trial of *allergen-specific immunotherapy with the major allergen Alt a 1*.

**Stringari G et al**, 2014, J Allergy Clin Immunol. The effect of component-resolved diagnosis on specific immunotherapy prescription in children with hay fever

## La Macchina Genetica



**Una delle prime macchine per la sintesi del DNA prodotta negli anni '80.**