RELAZIONE FINALE

Abstract

Le sinucleinopatie, in primo luogo la malattia di Parkinson e la demenza a corpi di Lewy, sono precedute da una lunga fase prodromica in cui i processi neurodegenerativi sono già in atto ma clinicamente silenti. Il disturbo comportamentale del sonno REM (iRBD) è uno dei più affidabili marcatori di questa fase: la maggior parte dei pazienti che ne è affetta svilupperà negli anni una sinucleinopatia conclamata. Restano tuttavia carenti biomarcatori accessibili in grado di stratificare il rischio di conversione.
Il progetto ha investigato il metaboloma e il microbiota fecali come finestra sull'asse intestino-cervello in fase prodromica. Sono stati confrontati 21 pazienti con iRBD e 15 controlli sani, caratterizzando in parallelo i profili metabolici e la composizione del microbiota intestinale e integrando successivamente i due livelli in un unico modello.
Già in questa fase precoce emerge un insieme coerente di alterazioni: uno spostamento della fermentazione microbica verso il metabolismo proteolitico, l'attenuazione di segnali metabolici protettivi per il sistema nervoso, la comparsa di cataboliti potenzialmente neurotossici e una riorganizzazione del microbiota con perdita di generi benefici. L'integrazione multi-omica ha isolato una firma coordinata intestino-ospite in grado di discriminare i pazienti dai controlli con circa l'85% di accuratezza. Nel complesso, i risultati indicano il metaboloma fecale come un sensore sensibile delle prime interazioni intestino-cervello nelle sinucleinopatie e forniscono candidati biomarcatori da validare in studi longitudinali.

Materiali e metodi

Partecipanti. Sono stati arruolati 21 pazienti con iRBD, con diagnosi confermata mediante polisonnografia, e 15 controlli sani della stessa area geografica e di età comparabile. I pazienti sono seguiti nel tempo con valutazioni cliniche periodiche presso l'Istituto.
Campioni. I campioni fecali sono stati autoraccolti dai partecipanti, congelati e conservati a bassissima temperatura fino all'analisi, così da preservarne l'integrità metabolica e microbica.
Analisi. Ciascun campione è stato caratterizzato su più piattaforme complementari, per ottenere una copertura ampia del profilo biochimico e microbico:
• Acidi grassi a catena corta e ramificata (SCFA/BCFA), quantificati in modo mirato come lettura funzionale dell'attività fermentativa del microbiota.
• Volatiloma, ossia la frazione volatile del metaboloma, profilata senza selezione preventiva mediante spettrometria di massa ad alta risoluzione.
• Metaboloma non volatile, analizzato in modalità untargeted mediante cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa tandem ad alta risoluzione.
• Microbiota intestinale, caratterizzato mediante sequenziamento del gene 16S rRNA.
Integrazione e analisi statistica. I diversi blocchi di dati sono stati combinati mediante integrazione multi-omica (DIABLO), che individua le variabili co-varianti tra le piattaforme e la firma congiunta più discriminante tra i gruppi. Le analisi hanno previsto la correzione per test multipli e la verifica dell'eventuale effetto confondente di età e sesso, che è stato controllato.

Risultati

Coorte: I pazienti con iRBD presentavano una durata media di malattia di circa 8,6 anni, con età e caratteristiche generali comparabili ai controlli. Nel periodo di osservazione (in media quasi 5 anni) 3 pazienti hanno effettuato la conversione a una sinucleinopatia conclamata (1 malattia di Parkinson, 2 demenza a corpi di Lewy), a conferma del rischio associato alla condizione.
Metabolismo fermentativo. Gli acidi grassi a catena corta lineari risultavano invariati, mentre quelli a catena ramificata (isobutirrico, isovalerico, 2-metilbutirrico) erano significativamente aumentati nei pazienti. Il dato indica uno spostamento della fermentazione microbica verso il metabolismo proteolitico, con la componente saccarolitica ancora conservata.
Volatiloma: Tre composti discriminavano nettamente i gruppi: p-cresolo e 2-ottanone aumentati nei pazienti, indolo ridotto. Le tre molecole, confermate contro standard di riferimento, mostravano singolarmente una buona capacità discriminante (AUC compresa tra 0,8 e 0,9).

Metaboloma non volatile. L'analisi ha ampliato il quadro con una riduzione uniforme degli acidi biliari, un'attenuazione del metabolismo del triptofano (coerente con il calo dell'indolo, incluso il catabolita indolo-3-acetico) e un aumento delle acilcarnitine.
Microbiota: Nei pazienti erano ridotti Blautia e Faecalibacterium, generi saccarolitici e produttori di butirrato con il maggior peso discriminante verso i controlli, e arricchiti taxa dell'ordine Oscillospirales associati a nicchie di metabolismo amminoacidico. La composizione complessiva del microbiota differiva significativamente tra i gruppi.
Integrazione multi-omica. Il modello DIABLO ha risolto una firma coordinata intestino-ospite che separava i pazienti dai controlli con un'accuratezza in cross-validazione dell'84,8% (sensibilità 84,2%, specificità 85,7%). Le componenti principali dei tre blocchi risultavano fortemente concordanti, indicando alterazioni che co-variano lungo un asse comune piuttosto che indipendenti.

Discussione

I dati delineano, già in fase prodromica, un rimodellamento coerente del metabolismo intestinale e del microbiota. Il filo conduttore è uno spostamento della fermentazione microbica verso il catabolismo proteico, accompagnato dall'attenuazione di segnali protettivi e dalla comparsa di cataboliti di potenziale rilievo neurobiologico.
La conservazione degli SCFA lineari a fronte dell'aumento dei BCFA suggerisce che l'iRBD rappresenti uno stadio di squilibrio più precoce rispetto alla malattia di Parkinson conclamata, in cui è tipica la riduzione delle vie butirrogeniche. Tra i cataboliti aumentati, il p-cresolo è di particolare interesse: composto di origine microbica con documentati effetti neurotossici, potrebbe agire come fattore permissivo sui circuiti catecolaminergici del tronco encefalico, già vulnerabili in questa fase. Si tratta di un'ipotesi meccanicistica, non di una relazione dimostrata dal presente disegno.
L'attenuazione dell'asse triptofano-indolo indica un indebolimento di segnali normalmente protettivi, mentre la riorganizzazione del microbiota, con la perdita di generi benefici e l'arricchimento di taxa a vocazione proteolitica, è direzionalmente coerente con il quadro metabolico. L'integrazione multi-omica rafforza questa lettura, mostrando che le variazioni microbiche e metaboliche procedono in modo concorde lungo un asse condiviso.
Conclusioni. Il progetto ha consolidato una metodologia multi-omica integrata e replicabile e ha dimostrato che il metaboloma fecale offre una finestra sensibile e non invasiva sulle prime interazioni dell'asse intestino-cervello nelle sinucleinopatie, individuando molecole e taxa candidati come biomarcatori precoci. I risultati costituiscono una base solida per il proseguimento della linea di ricerca e per l'accesso a finanziamenti competitivi finalizzati alla loro validazione.

Ringraziamenti e valorizzazione del contributo

Il progetto è stato reso possibile dal sostegno della Fondazione del Monte di Bologna e Ravenna, che ha finanziato le attività di ricerca nell'ambito del progetto "Microbioma e metaboloma intestinale per la ricerca di biomarcatori del Gut-Brain axis nel disturbo comportamentale del sonno REM". Si ringraziano inoltre i pazienti e i controlli che hanno preso parte allo studio e il personale clinico e di laboratorio dell'IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna che ne ha permesso la realizzazione.
Si dichiara espressamente che tutti gli output scientifici derivanti dal progetto, ossia pubblicazioni su riviste scientifiche, comunicazioni e poster a congressi, dataset e altri prodotti della ricerca, riportano e riporteranno esplicito riconoscimento del contributo della Fondazione del Monte di Bologna e Ravenna. A titolo di esempio, il manoscritto principale del progetto include già la Fondazione nella sezione dedicata ai finanziamenti (funding), con l'indicazione del titolo del progetto sopra riportato.