

Analisi metabolomica degli effetti dell'infezione cronica HCV: valutazione comparata dei pazienti prima e dopo eradicazione virale tramite farmaci ad azione antivirale diretta.

PI: dott.ssa Laura Gragnani

co-PI: dott. Leonardo Tenori

INTRODUZIONE

Il virus dell'epatite C (HCV) rappresenta, a livello mondiale, un problema di primaria importanza in termini di salute pubblica, con più di 200 milioni di soggetti infetti, di cui circa due milioni in Italia ^{1,2}.

Come è noto, l'HCV ha la caratteristica di persistere nell'ospite, dando luogo ad una infezione cronica, spesso asintomatica per anni, ma che provoca un danno epatico cronico progressivo che può portare alla cirrosi, una condizione che a sua volta può evolvere verso un carcinoma epatocellulare. Ad oggi, l'infezione cronica da HCV è però considerata una malattia sistemica, dato che il virus è capace di determinare l'insorgenza di numerose manifestazioni extraepatiche, in particolare di disordini di natura linfoproliferativa, il cui prototipo è la crioglobulinemia mista, una malattia considerata benigna da un punto di vista clinico, ma che spesso può essere invalidante per il paziente e che inoltre può evolvere verso un linfoma non Hodgkin's ³⁻⁵.

Pur non essendo disponibile, ad oggi, un vaccino efficace contro il virus, a causa della sua elevata variabilità genetica, la terapia antivirale può portare alla completa eradicazione del virus. Nei quindici anni passati, la terapia "standard of care" è stata rappresentata dalla associazione di due molecole, l'interferone- α peghilato (peg-IFN) e la ribavirina (RBV). Tale combinazione risultava efficace nel determinare una completa eradicazione virale (sustained virological response-SVR, definita come viremia negativa alla settimana 24 del follow up post-terapia) in circa il 45% dei soggetti trattati ^{6,7}.

La durata e l'outcome della terapia dipendevano da particolari fattori virali (in particolare il genotipo) e dell'ospite (genotipo IL28b, il grado di danno epatico, un precedente fallimento al trattamento eradicante e la presenza di manifestazioni extraepatiche come una crioglobulinemia mista sintomatica), ma il trattamento provocava spesso l'insorgenza di numerosi eventi avversi che determinavano un alto tasso di interruzioni proprio perché difficile da tollerare ^{6,7}. L'introduzione nel 2014 di nuove molecole ad azione antivirale diretta (DAA), utilizzabili in regimi IFN-free, ha rappresentato una vera e propria rivoluzione nella gestione clinico-terapeutica di questa infezione ⁸. Questi farmaci, sviluppati grazie all'aumento delle conoscenze del ciclo replicativo di HCV, rese possibili dal modello di replicazione in vitro basato sul replicone ⁹, hanno come bersaglio

alcune proteine non strutturali del virus (NS5A NS5B e NS3/4); i DAA vengono utilizzati in combinazioni IFN-free e garantiscono tassi di SVR molto elevati (intorno al 95%), con durata di trattamento molto breve (da tre a sei mesi, due mesi in caso di danno epatico lieve) ed eventi avversi solitamente limitati in numero ed entità ⁶⁻⁸. Anche il periodo necessario per stabilire l'efficacia virologica della terapia è stato abbreviato e il paziente viene definito sustained virological responder se l'HCV-RNA sierico è negativo 12 settimane dopo la fine del trattamento (SVR12) ¹⁰.

Negli ultimi quindici anni un importante contributo alla scoperta di nuovi biomarcatori di diagnosi e prognosi e alla comprensione di meccanismi patogenetici è stato dato dalle cosiddette tecniche "-omiche". Questo termine si riferisce a piattaforme tecnologiche innovative come la genomica, la proteomica, la metabolomica, che permettono di rilevare e identificare milioni di molecole diverse, presenti ed espresse nel nostro organismo, in condizioni fisiologiche e patologiche. La metabolomica è la più recente delle tecniche "-omiche" ed è sempre di più considerata un valido strumento per screening high-throughput di valutazione del rischio di sviluppare una malattia e per la messa a punto di nuove procedure diagnostiche e prognostiche (progressione di malattia e outcome della terapia) non invasive ¹¹.

La metabolomica è lo studio del cosiddetto metaboloma, ossia l'insieme di piccole molecole (metaboliti) presenti nei fluidi corporei, cellule o tessuti. Il metaboloma fornisce un ritratto dinamico dello stato metabolico di un individuo e la natura chimica e l'abbondanza relativa dei metaboliti rilevabili può essere considerata come l'impronta che ne caratterizza lo stato fisiopatologico. Inoltre, la metabolomica è in grado di identificare specifici profili associati a cambiamenti metabolici causati dalla suscettibilità a diverse malattie, spostando così il peso della previsione del rischio dai test genetici ad una analisi biochimica globale: la genomica ci informa su quello che potrebbe accadere, la metabolomica ci dice che cosa sta realmente accadendo. La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (¹H-NMR) è uno dei principali strumenti di analisi utilizzati in metabolomica e permette l'identificazione simultanea e la quantificazione di centinaia di piccole molecole che determinano un profilo metabolomico malattia-specifico.

Ad oggi sono pochi i dati disponibili relativi all'infezione cronica da HCV ottenuti mediante un approccio di metabolomica; infatti, la maggior parte delle analisi di metabolomica condotte su soggetti con danno epatico cronico considerano eziologie diverse da quella virale o prendono in considerazione un particolare stadio di danno epatico senza stratificare per eziologia ¹²⁻¹⁵. I dati più interessanti riguardanti l'infezione da HCV sono riportati da Saito e colleghi ¹⁴ che hanno comparato i profili metabolici di 10 pazienti con infezione cronica da HCV che avevano fallito un trattamento con Peg-IFN e RBV, con quelli di 10 soggetti che, dopo la stessa terapia avevano ottenuto una risposta

virologica sostenuta. Nonostante fosse condotto su una popolazione limitata e in assenza di opportuni controlli, i risultati di questo studio suggeriscono l'interesse di valutare, su una popolazione più ampia e meglio caratterizzata, il modello di infezione da HCV con un approccio di metabolomica; in particolare, le nuove terapie antivirali dirette, avendo come bersaglio diretto il ciclo replicativo del virus, forniscono un modello di studio ideale, perché prive di possibili effetti confondenti dati da molecole biologicamente attive come l'interferone, che avendo un'azione a livello sistemico potevano alterare il quadro metabolico del paziente.

SCOPO E RISULTATI ATTESI

Con questo progetto di ricerca proponiamo, per la prima volta, uno studio prospettico, a triplo controllo, utilizzando l'approccio della metabolomica, sui sieri di pazienti con infezione cronica HCV prima e dopo eradicazione virale ottenuta con i farmaci antivirali diretti oggi disponibili.

Tramite l'NMR infatti è possibile identificare particolari metaboliti presenti in quantità diverse nei sieri analizzati definendo così una sorta di "firma metabolica", sia del gruppo considerato che del singolo campione. Oltre all'inclusione di gruppi di controllo (due patologici e uno di soggetti sani), grazie alla disponibilità di campioni pre- e post- terapia, ciascun paziente sarà controllo di se stesso e ciò consentirà di rilevare eventuali cambiamenti dovuti alla eliminazione del virus; inoltre, il campionamento frequente nel follow-up dopo l'SVR12 consentirà di valutare la progressione di tali cambiamenti. I metaboliti identificati saranno quindi oggetto di successive analisi che cercheranno di chiarirne la rilevanza biologica e il legame con la presenza di HCV.

Inoltre, essendo questo studio controllato, ogni paziente servirà da controllo di se stesso, incrementando così la quantità di informazioni che sarà possibile ottenere

I risultati di questo progetto potrebbero essere utili a capire se e come HCV interferisca con particolari vie metaboliche, e se queste alterazioni possano spiegare alcuni aspetti della patogenesi della malattia da HCV (sia per quanto riguarda il danno a carico del fegato che per manifestazioni extraepatiche). I risultati potranno anche avere un impatto sul miglioramento della gestione clinica dei pazienti HCV, identificando particolari biomarcatori sierici di diagnosi (i.e. diagnosi precoce di manifestazioni extraepatiche non ancora sintomatiche), di prognosi e di outcome terapeutico.

Infine, questo progetto, se realizzato, potrebbe rappresentare un primo modello da estendere allo studio di altre infezioni, sia virali che batteriche. Infatti, l'approccio della metabolomica, a fronte della complessità iniziale nella fase di ricerca sperimentale e di analisi dei dati ottenuti che permettono di attribuire a determinati metaboliti un significato fisio-patologico, risulta essere una tecnica dalle enormi potenzialità per

l'analisi di routine, data la velocità di esecuzione e la completa assenza di invasività nella raccolta del campione.

DISEGNO DELLO STUDIO

Verrà effettuata un'analisi metabolomica su campioni di siero raccolti da pazienti con infezione HCV sia prima del trattamento antivirale con DAA (baseline) che dopo la fine del trattamento, precisamente a 12, 24 e 48 settimane dalla fine della terapia (SVR12, SVR24 e SVR48).

Inoltre, verranno analizzati adeguati gruppi di controllo, in modo da poter verificare se un particolare profilo metabolico sia associato alla presenza di infezione HCV, più in generale all'infezione da virus epatitici (HCV e/o HBV) o ad una condizione generale di danno epatico, più o meno avanzato.

I campioni di siero saranno ottenuti da:

- Gruppo di studio 1: almeno 70 soggetti con infezione cronica HCV (baseline, SVR12, SVR24 e SVR48)
- Gruppo di studio 2: almeno 6 pazienti con relapse virologico (baseline, 12 settimane post-relapse)
- Gruppo di controllo patologico (1): almeno 40 soggetti con infezione cronica HBV;
- Gruppo di controllo patologico (2): almeno 40 soggetti con danno epatico legato al consumo di alcol;
- Gruppo di controllo sano: almeno 50 soggetti sani

Lo studio verrà condotto in accordo con la Dichiarazione di Helsinki e sarà approvato dal Comitato Etico locale. Ai soggetti coinvolti sarà fornito un modulo di consenso informato scritto che dovrà essere riconsegnato firmato e datato.

Fattibilità e attendibilità dello studio: Tutti i pazienti HCV-positivi saranno analizzati al baseline e ai tre time-point post-terapia precedentemente descritti. Inoltre, il numero dei soggetto HCV che entreranno nello studio potrebbero aumentare considerevolmente dato che l'agenzia italiana per lo studio del farmaco (AIFA) sta allargando i criteri di prescrivibilità dei DAA a categorie di pazienti fino ad adesso considerati non eleggibili al trattamento.

Per quanto riguarda l'adeguatezza del campione, secondo la definizione di Cohen di "power calculation" ¹⁶, utilizzando un t-test come modello e monitorando nel tempo almeno 70 individui con un disegno sperimentale accoppiato (che permette di

massimizzare la variabilità intra-individuale) è possibile individuare piccole variazioni (Cohen's $d \approx 0.2$) con un livello di significatività di 0.05 e una accuratezza statistica dell'80%.

Pertanto, secondo quanto appena descritto, la dimensione del campione presente è adeguata agli obiettivi dello studio.

Raccolta dei campioni: Il reclutamento dei pazienti HCV e HBV positivi e quello dei donatori sani verrà effettuato presso l'ambulatorio del centro MaSVE, diretto dalla prof.ssa Anna Linda Zignego. I pazienti con epatopatia dipendente da abuso alcolico verranno invece arruolati dal dott. Valentino Patussi del centro Alcológico Regionale Toscano. Tutti i dati clinici dei pazienti verranno raccolti da tali centri, conservati in forma anonima e identificati con un codice alfanumerico. In occasione del prelievo ematico per gli esami di routine, verrà quindi effettuato un prelievo di sangue periferico in provetta non rivestita di anticoagulante (che potrebbe interferire con l'analisi NMR), da cui il siero del paziente verrà quindi separato e conservato, prima dell'analisi, a -20°C .

Analisi NMR: I sieri dei pazienti verranno analizzati presso il laboratorio del Consorzio Interuniversitario Risonanze Magnetiche di Metallo Proteine (CERM), dell'Università degli Studi di Firenze, sotto la responsabilità scientifica del co-PI del progetto, dott. Leonardo Tenori. Lo scopo è quello di acquisire gli spettri $^1\text{H-NMR}$ ¹⁷ utilizzando uno spettrometro Bruker che lavora a 600 MHz (Bruker BioSpin). Per ciascun campione verranno acquisiti spettri monodimensionali usando sia una sequenza a impulso standard (noesygppr1d.comp; Bruker BioSpin) sia una sequenza spin-echo Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) (cpmgpr1d.comp; Bruker BioSpin). Inoltre, esperimenti bidimensionali (COSY, TOCSY, $^{13}\text{C-HSQC}$) verranno effettuati col fine di completare l'assegnazione di metaboliti non identificabili diversamente.

Analisi statistica: Gli spettri prodotti, verranno analizzati utilizzando R, un software open source, per l'analisi statistica dei dati. Verranno quindi utilizzate tecniche di statistica multivariata (principal component analysis, partial least square, canonical correlation analysis) e univariata (t-test, Wicoxon test, correlation analysis) per l'analisi dei dati. In particolare, in questo studio, ci proponiamo di utilizzare un approccio Multilevel-PLS ¹⁸, col fine di massimizzare la variabilità intra-individuale e ridurre quella tra diversi individui, in modo da seguire anche la variazione del singolo paziente nei diversi tempi di campionamento.

REFERENCES

1. Bellentani S. et al. *Microbes Infect* 2000;2:1757-63.
2. Craxi A. et al. *Mol Aspects Med* 2008;29:85-95.
3. Zignego AL. et al. *J Hepatol* 1992;15:382-6.
4. Zignego AL. et al. *Arch Virol* 1997;142:545-55.
5. Ferri C. et al. *Eur J Clin Invest* 1993;23:851-5.
6. Pawlotsky JM. et al. *J Hepatol.* 2015 Apr;62(1 Suppl):S87-99.
7. Sarrazin C. et al. *J Hepatol.* 2012;56 Suppl 1:S88-100.
8. Welzel TM. et al. *J Hepatol.* 2014 Nov;61(1 Suppl):S98-S107.
9. Lindenbach B.D. et al. *Science.* 2005 ;309(5734):623-6.
10. Werner CR. et al. *World J Gastroenterol.* 2016 Sep 21;22(35):8050-9.
11. Bezabeh T. *et al.* *Magn Reson Insights* 2014;7:1-14.
12. Embade N. et al. *PLoS One.* 2016 May 9;11(5):e0155094
13. Tian S. et al. *BMC Bioinformatics.* 2014 Apr 4;15:97
14. Saito T. et al. *Metabolism* 2013;62:1577-86.
15. Semmo N. et al. *J Viral Hepat.* 2015 Jul;22(7):617-24.
16. Cohen J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences* (second ed.). Lawrence Erlbaum Associates.1988
17. Tenori L. et al. *Mol Oncol* 2015;9:128-39.
18. Westerhuis JA. et al. *Metabolomics* 2010;6:119-28.