



Università degli Studi di Pisa

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in Scienze Biologiche

Tesi di Laurea

“Valutazione dei Livelli di BDNF Ematico in uno Studio di
Follow-up su Pazienti con Depressione Maggiore”

Relatore:

Prof. Luca Giovannini

Candidata:

Alessia Scatena

Anno Accademico 2004-2005

ABSTRACT: “EMATIC BDNF VALUATION IN A FOLLOW UP STUDY IN PATIENTS WITH MAJOR DEPRESSION DISORDERS”

The brain-derived neurotrophic factor is the most largely diffused member of neurotrophins in the aging and adult mammal brain.

The BDNF is involved in the synaptic plasticity, in neuronal survival and differentiation both in the central nervous system and in the peripheral one.

BDNF can also be found in peripheral tissues and in blood but at present its role has not been determined.

A large portion of ematic BDNF is stored and released by platelets. The circulating levels of BDNF are influenced by hormones, stress, diet, physical activity, inflammation. The ematic level of BDNF can be used to predict neurodegenerative diseases since there's a correlation between central and ematic BDNF levels.

AIM OF STUDY. The aim of this research is to determine if ematic BDNF can be used as a clinical parameter of therapeutic efficacy in depressed patients treated with tricyclic antidepressant and SSRI (Serotonin Specific Inhibitor Reuptake). To avoid the under or over estimation of BDNF levels in depressed patients compared to healthy subjects, a preliminary observation of ematic BDNF levels has been made in order to determine a range of physiological values and eventually the presence of a circadian rhythm in serum and plasma.

MATERIALS AND METHODS. The experiment has been divided into three phases:

PHASE 1: BDNF platelet release evaluation: blood samples taken from 8 healthy volunteers have been placed in tubes containing Clot Activator. Serum was collected after 5 minutes, 30 minutes, 60 minutes, 120 minutes.

PHASE 2 evaluation of circadian rhythm BDNF levels in plasma and serum: volunteers have been divided into two groups: males (n=18) and females (n=16). At the time of the first drawing, 08:00 am, clinical exams have been made to volunteers to evaluate cortisol and ACTH levels. Testosterone level have been recorded in males and progesterone, estradiol, LH and FSH in women. Further drawings have been made at 11:00 am, 02:00 pm and 08:00 pm. Female volunteers have been submitted to two drawing cycles: the first one during the follicular phase, the second in the luteal phase in order to correlate BDNF values with the menstruation period and sexual and non sexual hormones.

Blood samples have been divided into three pools: total pool (serum), plasmatic pool, soluble pool (plasmatic BDNF not binded to plasmatic protein). To obtain the total plasmatic pool plasma has been acidified with HCl 1N for 15 minutes and then neutralised with NaOH 1N. To dose the soluble quantity plasma hasn't been acidified. BDNF dosage has been made with ELISA kit (Promega, USA).

PHASE 3 Follow up study of patients affected by MDD and treated with tricyclic antidepressants and SSRI: valuation of ematic BDNF level variation. For this six months duration experiment we recruited 13 patients: 8 of them treated with SSRI and the remaining 5 with a combination of SSRI and tricyclic antidepressants. To each subject blood drawings have been made on day 0 (drug free), day 7, day 30, day 60, day 90, day 180 to determine BDNF level variations in serum and plasma after the pharmacological

treatment. At the same time a valuation of the clinical ameloration of the subjects was made using valuation tables (HAM-A, HAM-D e MADRS).

RESULTS. The obtained data show a progressive release of BDNF, which reaches its maximum level with the complete platelet activation after 1 hour. In the second experimental phase both seric and soluble plasmatic pools of the two groups don't show any relevant circadian rhythm; on the other hand we assist to this phenomenon in the total plasmatic pool. To valuate BDNF level variations in each sample compared with values obtained from the first drawing (08:00 am), data were treated also as incremental variations. In the male group plasmatic BDNF concentration at 08:00 am is significantly greater if compared to values obtained at 08:00 pm (8.35 ± 1.08 ng/ml vs. 4.97 ± 0.67 ng/ml; $p < 0.05$); incremental valuation shows significant variation at 2:00 pm (0.58 ± 0.09 a.u.) and at 8:00 pm (0.59 ± 0.11 a.u.) to compared with levels at 8.00 am (1 ± 0 a.u.) ($p < 0.05$), but not if compared with variations at 11.00 am (0.87 ± 0.07 a.u.).

In the female group, both in luteal phase (estradiol 135 ± 58.12 pg/ml; progesterone 13.74 ± 5.47 ng/ml; cortisol 16.5 ± 5.25 mcg/dl; ACTH 15.65 ± 6.3 pg/ml) that in follicular phase (estradiolo 93.75 ± 50.37 pg/ml; progesterone 0.025 ± 0.1 ng/ml; cortisolo 16.5 ± 2.38 mcg/dl; ACTH 14.7 ± 5.45 pg/ml), plasmatic BDNF concentration is highest at 11.00 am (9.0 ± 6.8 ng/ml). Incremental valuation shows a significant increase at 11:00 am (1.74 ± 0.19 a.u.) compared to basal level at 8.00 am (1 ± 0 a.u.) ($p < 0.05$). Values at 2:00 pm (0.98 ± 0.17 a.u.) and at 8:00 pm (0.98 ± 0.17 a.u.) are significant decreased compared to 11.00 am ($p < 0.05$). In both groups we observed some differences from the described trend, mostly curves with afternoon raise. The valuation of clinical parameter could not explain the described trend and its exception.

Regarding the study on patients the data obtained with valuation tables HAM-A, HAM-D e MADRS point out a great improvement of patients affected by MDD due pharmacological treatment. Table HAM-A shows a relevant decrease starting from day 30 (13.9 ± 1.7) compared to day 0 (23.1 ± 1.7); table HAM-D shows a relevant decrease starting from day 30 (11.7 ± 1.9) compared to day 0 (22.4 ± 1.7) and to day 7 (18.8 ± 2.3); table MADRS shows a relevant decrease starting from day 30 (17.1 ± 2.7) compared to day 0 (29.4 ± 1.7) and to day 7 (26.6 ± 2.2). This clinical parameters correlate with data obtained from the valuation of BDNF ematic levels.

As a matter of fact we observe an increase of plasma BDNF levels in patients which, if expressed as incremental variation respect to day 0, becomes significant starting from day 90 (2.02 ± 0.45) compared to day 0 (1 ± 0), to day 7 (0.73 ± 0.13), to day 30 (1.01 ± 0.15) and to day 60 (1.19 ± 0.05). In the serum instead we don't observe significant variations.

CONCLUSIONS. Our study evidences a circadian trend for plasmatic BDNF with a maximum value in the morning. Both in the male and female group we can observe different patterns with the phase shift. A correlation could not be found between BDNF and cortisol, ACTH, testosterone, estradiol, progesterone, LH and FSH.

The data obtained in the follow up study show an increase of BDNF plasmatic levels together with the decrease of valuation tables; although, examining the data from the volunteer group, it's impossible to express without doubts how much this increase is due to the real pharmacological efficacy or to the change of the subject change of way of living and phisical activity.

RIASSUNTO

Il fattore neurotrofico cervello-derivato (BDNF) è, tra i membri della famiglia delle neurotrofine, quello che mostra l'espressione più diffusa nel cervello del mammifero adulto e in fase di sviluppo. Il BDNF è implicato nei meccanismi di plasticità sinaptica, della sopravvivenza e della differenziazione dei neuroni sia nel sistema nervoso centrale che in quello periferico. Rimane tuttavia da delineare il significato biologico del BDNF nei tessuti periferici, data la notevole quantità di questa neurotrofina contenuta nelle piastrine e il drastico aumento della concentrazione ematica successivo all'attivazione piastrinica. I livelli circolanti di BDNF variano a seconda delle diverse condizioni fisiologiche (ormoni, stress, abitudini alimentari, attività fisica, processi infiammatori), per cui i livelli ematici possono essere utilizzati come predittivi di patologie neurodegenerative in quanto rispecchiano analoghe variazioni a livello centrale.

SCOPO DEL LAVORO. Questo lavoro costituisce lo studio preliminare di un progetto orientato alla valutazione del BDNF ematico come parametro clinico di efficacia terapeutica su soggetti affetti da patologia depressiva e curati con Triciclici od SSRI (Serotonin Specific Inhibitor Reuptake) reclutati presso la Clinica Psichiatrica dell'ospedale S.Chiera di Pisa. Per evitare di sovra- o sotto-stimare tali variazioni rispetto ai valori espressi da soggetti sani, si è deciso di allestire un protocollo sperimentale per la valutazione del contenuto proteico di BDNF ematico in particolare per valutare la possibile presenza di fluttuazioni circadiane nel siero e nel plasma, parallelamente all'analisi di parametri clinici. Tale studio permetterà di stabilire le modalità di prelievo per la successiva fase sperimentale (clinica).

MATERIALI E METODI. Il lavoro sperimentale è stato suddiviso in due fasi:

Fase 1 Valutazione del rilascio del BDNF da piastrine attivate: i campioni di sangue provenienti da 8 volontari sani è stato raccolto in provette contenenti Clot Activator. Il sangue è stato sierato appena prelevato, dopo 30 min, dopo 1h e dopo 2h dal prelievo.

Fase 2 Valutazione delle variazioni circadiane dei livelli di BDNF nel plasma e siero:

Per quanto riguarda le possibili variazioni dovute al sesso i campioni sono stati divisi in due gruppi, uomini (n=18) e donne (n=16). Al momento del primo prelievo, ore 8.00, i volontari sono stati sottoposti ad esami clinici per la valutazione dei livelli di cortisolo e ACTH. Inoltre negli uomini abbiamo preso in considerazione anche i livelli di testosterone e nelle donne di progesterone, estradiolo, LH e FSH. In seguito sono stati effettuati ulteriori prelievi alle ore 11.00, 14.00, 20.00. Le volontarie sono state sottoposte a due cicli di prelievi: il primo prelievo nella fase follicolare, il secondo in quella luteale per correlare i valori del BDNF con la fase del ciclo mestruale e i livelli di ormoni sessuali e non.

I campioni ematici sono stati divisi in tre pools: pool totale, pool plasmatico, pool solubile (BDNF plasmatico non complessato alle proteine plasmatiche). Per la valutazione del pool plasmatico totale il plasma è stato acidificato con HCl 1N per 15 minuti quindi neutralizzato con NaOH 1N. Per valutare la quota solubile il plasma è stato dosato senza effettuare questo passaggio. Il BDNF è stato dosato con un apposito kit ELISA (Promega, USA).

Fase 3 Studio di follow-up in pazienti affetti da MDD trattati con triciclici ed SSRI:

valutazione della variazione dei livelli ematici di BDNF. In questo studio della durata di 6 mesi sono stati reclutati 13 pazienti, di cui 8 trattati con SSRI e 5 con una combinazione di SSRI e triciclici. Ad ogni paziente sono stati effettuati prelievi di

sangue al giorno 0 (drug free), al giorno 7, al giorno 30, al giorno 60, al giorno 90 e al giorno 180 per valutare la variazione dei livelli di BDNF nel siero e nel plasma a seguito del trattamento farmacologico. Contemporaneamente in clinica, agli stessi tempi detti sopra, veniva valutato il miglioramento clinico del paziente tramite apposite scale di valutazione eterologa (HAM-A, HAM-D e MADRS).

RISULTATI. I dati ottenuti nella prima fase mostrano come si assista ad un progressivo rilascio di BDNF che diventa massimale a completa attivazione piastrinica dopo 1h. Nella seconda fase sperimentale sia il pool sierico che il pool plasmatico solubile di entrambi i gruppi non presentano variazioni circadiane significative; diversamente si osserva nel pool plasmatico totale. Per valutare le variazioni dei livelli di BDNF di ciascun campione rispetto ai valori rilevati al primo prelievo (ore 8.00), i dati sono stati calcolati anche come variazioni incrementali. Nel gruppo uomini la concentrazione plasmatica di BDNF alle ore 8.00 è significativamente maggiore rispetto ai valori rilevati alle ore 20.00 (8.35 ± 1.08 ng/ml vs. 4.97 ± 0.67 ng/ml; $p < 0.05$); la valutazione incrementale evidenzia la significatività delle variazioni alle ore 14.00 ($0,58 \pm 0,09$ a.u.) oltre che delle ore 20.00 ($0,59 \pm 0,11$ a.u.) rispetto ai livelli delle ore 8.00 (1 ± 0 a.u.) ($p < 0.05$), ma non rispetto alle variazioni osservate per le ore 11.00 ($0,87 \pm 0,07$ a.u.). Nel gruppo donne nella fase luteale (estradiolo 135 ± 58.12 pg/ml; progesterone $13,74 \pm 5.47$ ng/ml; cortisolo $16,5 \pm 5.25$ mcg/dl; ACTH $15,65 \pm 6.3$ pg/ml) osserviamo un picco mattutino della concentrazione di BDNF intorno alle ore 11.00 (9.0 ± 6.8 ng/ml). Tale andamento della concentrazione plasmatica è individuabile solo come trend; i valori incrementali evidenziano l'esistenza di una curva con l'incremento delle ore 11.00 (1.6 ± 0.18 a.u.) significativo rispetto al valore basale delle ore 8.00 (1 ± 0

a.u.) ($p < 0.05$). I valori delle ore 14.00 (1.05 ± 0.12 a.u.) e 20.00 (0.89 ± 0.08 a.u.) risultano invece significativamente inferiori rispetto alle ore 11.00 ($p < 0.05$). Un andamento analogo si osserva per la fase follicolare (estradiolo 93.75 ± 50.37 pg/ml; progesterone 0.025 ± 0.1 ng/ml; cortisolo $16,5 \pm 2.38$ mcg/dl; ACTH 14.7 ± 5.45 pg/ml), anche se possiamo stabilire solo un trend. Per entrambi i gruppi sono stati osservati scostamenti dall'andamento descritto, in particolare curve con picco pomeridiano. La valutazione dei parametri clinici non ha permesso tuttavia di trovare una spiegazione né per l'andamento descritto né per le relative eccezioni.

Per quanto riguarda lo studio sui pazienti i risultati ottenuti con scale di valutazione HAM-A, HAM-D e MADRS evidenziano un netto miglioramento clinico dei pazienti affetti da MDD a seguito del trattamento farmacologico. In particolare per la scala HAM-A si ha una diminuzione significativa dei valori a partire dal g30 (13.9 ± 1.7) rispetto al g0 (23.1 ± 1.7), per la scala HAM-D si ha una diminuzione significativa a partire dal g30 (11.7 ± 1.9) sia rispetto al g0 (22.4 ± 1.7) sia rispetto al g7 (18.8 ± 2.3), per la scala MADRS si ha una diminuzione significativa a partire dal g30 (17.1 ± 2.7) sia rispetto al g0 (29.4 ± 1.7) sia rispetto al g7 (26.6 ± 2.2). Questi dati clinici correlano con quanto osservato dalla valutazione dei livelli ematici del BDNF.

Infatti parallelamente osserviamo un aumento dei livelli di BDNF nel plasma dei pazienti che, espresso come variazione incrementale rispetto al giorno 0, diventa significativo a partire dal g90 (2.02 ± 0.45) rispetto al g0 (1 ± 0), al g7 (0.73 ± 0.13), al g30 (1.01 ± 0.15) e al g60 (1.19 ± 0.05).

Mentre per i livelli sierici non si osservano variazioni significative.

CONCLUSIONI. Il nostro studio ha evidenziato che esiste un andamento circadiano per il BDNF nel plasma con un picco mattutino. Sia nel gruppo uomini che nel gruppo donne è possibile osservare patterns diversi con avanzamento di fase. Sia per l'andamento generale che per gli altri casi non è stato tuttavia possibile trovare ancora una correlazione con i fattori ormonali quali cortisolo, ACTH, testosterone, estradiolo, progesterone, LH e FSH.

I risultati ottenuti nello studio di follow-up su pazienti depressi evidenziano un aumento dei livelli plasmatici di BDNF parallelamente alla riduzione delle scale di valutazione; tuttavia, alla luce dei dati ottenuti sul gruppo dei volontari, non è possibile dire con certezza quanto tale aumento sia dovuto alla reale efficacia farmacologica e quanto non trovi invece spiegazione nel cambiamento di stile di vita dei pazienti e dell'attività motoria.

INDICE

INTRODUZIONE

<i>LA FAMIGLIA DELLE NEUROTROFINE</i>	<i>pg 1-2</i>
<i>IL BDNF</i>	<i>pg 2-9</i>
<i>FORMAZIONE PRE-PRO-NEUROTROFINE</i>	<i>pg 9-10</i>
<i>RECETTORI</i>	<i>pg 11-13</i>
<i>VIE DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE</i>	<i>pg 14-15</i>
<i>TRASPORTO RETROGRADO E ANTEROGRADO</i>	<i>pg 16-19</i>
<i>IL BDNF NELLE PATOLOGIE DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE</i>	<i>pg 20-23</i>
<i>AZIONE DEGLI ANTIDEPRESSIVI</i>	<i>pg 24-25</i>
<i>FATTORI CHE INFLUENZANO IL BDNF</i>	<i>pg 26-30</i>
<i>LO STRESS, GLI ORMONI DELL'ASSE IPOTALAMO-IPOFISI-CORTECCIA SURRENALE E LA DEPRESSIONE</i>	<i>pg 31-36</i>
<u><i>SCOPO DEL LAVORO</i></u>	<i>pg 37-38</i>

MATERIALI E METODI

pg 39-53

RISULTATI

pg 54-78

DISCUSSIONE

pg 79-83

CONCLUSIONI

pg 84

BIBLIOGRAFIA

pg 85-107

ABBREVIAZIONI

ACTH ormone adrenocorticotropo

AD Alzheimer disease

AMPA α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate

BDNF brain-derived neurotrophic factor

c-AMP adenosina monofosfato ciclica

CNS sistema nervoso centrale

CREB cAMP Responsive Element Binding protein

FSH ormone follicolo stimolante

HAM-A Hamilton Anxiety Rating Scale

HAM-D Hamilton Depression Rating Scale

LH ormone lutenizzante

LTP long term potentiation

MADRS Montgomery-Asberg Depression Rating Scale

MDD Major Depressive Disorder

NGF nerve growth factor

NMDA N-methyl-D-aspartate

NT neurotrofina

PD Parkinson disease

PNS sistema nervoso periferico

SSRI inibitore specifico del reuptake della serotonina

TRK chinasi tropomiosina connessa