



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale
Scienze della Nutrizione e dell'Alimentazione

**Effetti della dieta sullo stato infiammatorio in
soggetti affetti da sclerosi multipla.**

**Dietary effects on inflammatory status in subjects
affected by multiple sclerosis.**

Tesi di Laurea Magistrale di:
Giacomo Brocani

Relatrice:
Chiar.ma Prof.ssa Mara Fabri

Correlatrice:
Chiar.ma Prof.ssa Arianna Vignini

Correlatrice:
Dott.ssa Valentina Membrino

Sessione straordinaria febbraio 2025
Anno Accademico 2023/2024

INDICE

1 INTRODUZIONE	2
1.1 La sclerosi multipla	3
1.1.1 Epidemiologia	4
1.1.2 Eziologia	7
1.1.3 Classificazione	10
1.1.4 Ruolo dell'inflammazione	13
1.1.5 Terapie	19
1.1.6 Relazione tra dieta ed inflammazione	27
1.2 Dieta Mediterranea	36
2 SCOPO DELLA TESI	44
3 MATERIALI E METODI	46
3.1 Partecipanti	47
3.2 Questionario di aderenza alla Dieta Mediterranea	50
3.3 Analisi dei campioni ematici	54
3.4 Determinazione del Contenuto Totale di Polifenoli (TPC)	54
3.5 Determinazione della capacità antiossidante (ORAC)	56
3.6 Determinazione del Contenuto Totale di Flavonoidi (TFC)	58
3.7 Determinazione quantitativa delle citochine	59
3.8 Analisi statistica	61
4 RISULTATI SPERIMENTALI	62
4.1 Dati clinici dei partecipanti	63
4.2 Aderenza alla Dieta Mediterranea	63
4.3 Determinazione degli antiossidanti plasmatici	67
4.3.1 Contenuto Totale di Polifenoli (TPC)	68
4.3.2 Capacità antiossidante totale (ORAC)	68
4.3.3 Contenuto Totale di Flavonoidi (TFC)	69
4.4 Determinazione delle citochine	70
4.4.1 Interferone-gamma (IFN- γ)	70
4.4.2 Interleuchina-1beta (IL-1 β)	72
4.4.3 Interleuchina-6 (IL-6)	72
4.4.4 Interleuchina-17A (IL-17A)	72
5 DISCUSSIONE	74
6 CONCLUSIONE	83
7 BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	86
8 RINGRAZIAMENTI	91

1 INTRODUZIONE

1.1 La sclerosi multipla

La sclerosi multipla (SM) è una malattia autoimmune, cronica, che coinvolge la sostanza grigia e bianca del sistema nervoso centrale (SNC). Provoca lesioni demielinizzanti caratterizzate da infiammazione della guaina mielinica con infiltrazione leucocitaria (macrofagi, mastociti, linfociti), rottura della barriera emato-encefalica (BEE) ma anche deposizione di complemento ed immunoglobuline. L'infiammazione causata dall'ingresso di cellule periferiche coesiste con il danno agli elementi neuronali e sinaptici mentre gli elementi gliali reattivi sono impegnati nella rimozione dei detriti cellulari, nella riparazione della guaina mielinica e nel ripristino delle funzioni assonali. La SM è la più comune tra le malattie demielinizzanti acquisite e quindi è considerata la più caratteristica e prototipica (Papiri et al., 2023).

La SM può colpire qualsiasi parte del SNC ed i sintomi possono variare da persona a persona. Questi possono includere: problemi di vista, difficoltà a camminare o a mantenere l'equilibrio, disturbi del linguaggio o della memoria, intorpidimento o debolezza soprattutto nelle braccia e nelle gambe, rigidità muscolare, depressione, problemi con la funzione sessuale o la minzione, stanchezza cronica (World Health Organization, who.int).

1.1.1 Epidemiologia

La prevalenza globale della SM è stimata in 36 persone ogni 100.000, il che significa che ci sono 2,8 milioni di persone che vivono con la malattia in tutto il mondo, quindi 1 persona su 3.000. La SM è presente in tutte le regioni del mondo, ma è notevolmente più elevata nelle regioni europee e americane. Tuttavia, la prevalenza varia da una regione all'altra. In Europa si riscontrano i più alti livelli di persone con SM (Figura 1): San Marino (337 per 100.000), Germania (303 per 100.000) e Danimarca (282 per 100.000). San Marino e la Germania hanno la più alta prevalenza al mondo, seguiti dagli USA (288 per 100.000). Diversi paesi della stessa regione geografica con una prevalenza inferiore a 40 per 100.000 (Figura 1).

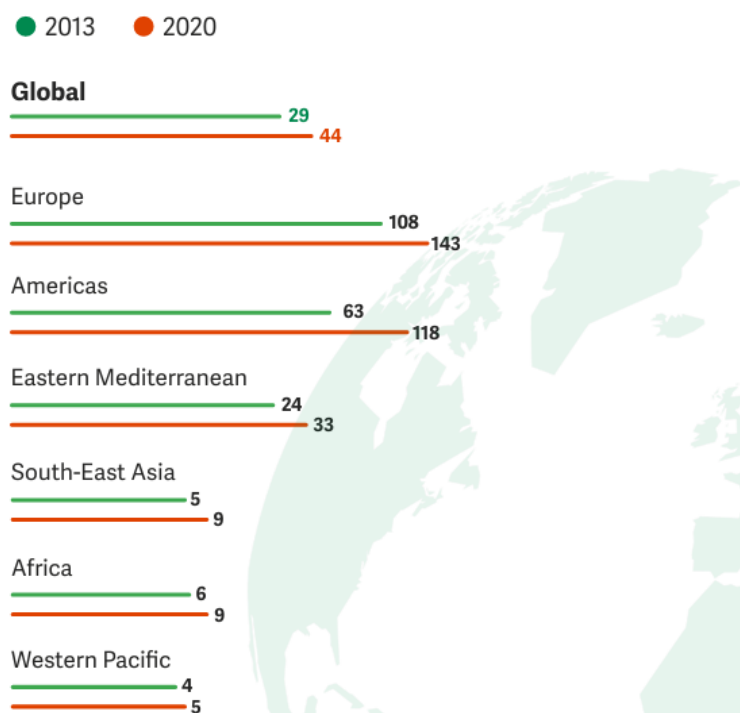


Figura 1. Numero di persone con SM (per 100.000), confronto di un sottoinsieme di paesi da cui sono stati forniti dati in entrambi i tempi (2013-2020) (Atlas of MSIF, 2020).

Diversi studi hanno dimostrato che la prevalenza della SM ha un legame con la latitudine, in quanto le persone che vivono in paesi più vicini all'equatore sembrano essere a minor rischio di SM, mentre quelle che vivono in paesi a latitudini più elevate (più vicine ai poli) sono a maggior rischio (Figura 2).

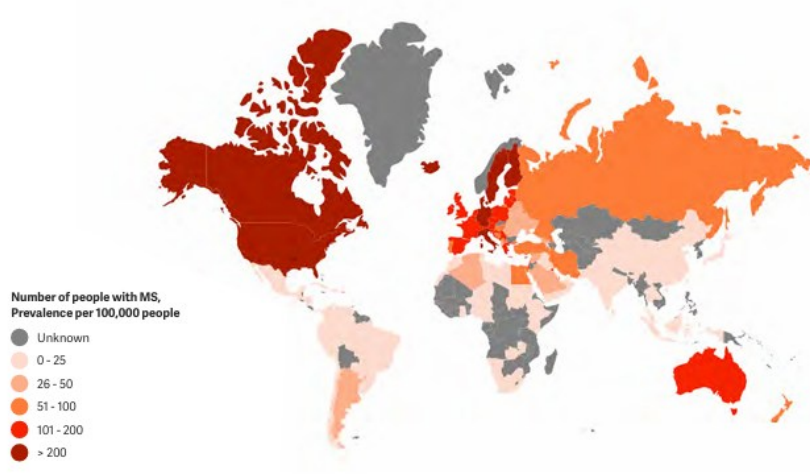


Figura 2. Numero di persone con SM, prevalenza su 100.000 persone (Atlas of MSIF, 2020).

Il genere femminile è colpito con una percentuale mediamente doppia (69%) rispetto al genere maschile (31%), ed all'interno delle regioni c'è una variazione del rapporto tra i sessi (Figura 3).

Western Pacific	78%
South-East Asia	76%
Americas	71%
Europe	69%
Africa	67%
Eastern Mediterranean	66%

Figura 3. Percentuale delle donne con SM-Nelle regioni WHO (Atlas of MSIF, 2020).

Nonostante la SM possa insorgere a qualsiasi età, l'età media di una diagnosi di SM in tutte le regioni del mondo è di 32 anni. Non esiste al momento una cura per la SM, il che significa che le persone convivono con la malattia per molti decenni. La SM è la causa neurologica più comune di disabilità per i giovani adulti.

La SM non colpisce solo gli adulti; almeno 30.000 bambini e adolescenti di età inferiore ai 18 anni vivono con la SM (1,5% del numero totale di persone con SM nei paesi che riportano dati di prevalenza pediatrica).

All'85% delle persone affette da SM in tutto il mondo viene inizialmente diagnosticata una SM recidivante-remittente e al 12% una SM progressiva. Al restante 3% viene assegnato un tipo di malattia sconosciuto alla diagnosi (Atlas of MSIF, 2020).

1.1.2 Eziologia

L'eziologia della malattia è sconosciuta e molto dibattuta. Attualmente, i meccanismi della malattia si esprimono attraverso una complessa interazione tra suscettibilità genetica, fattori ormonali, stimoli ambientali e asse neuro-immunitario, con conseguenze autoimmuni dirette al SNC. Per quanto riguarda i fattori ambientali che contribuiscono alla patogenesi della malattia, un rischio derivante da una bassa esposizione alla luce ultravioletta e da una bassa vitamina D nel sangue è stato suggerito dalla maggiore prevalenza nei paesi settentrionali e una ridotta incidenza nelle persone che migrano durante l'adolescenza dalle latitudini settentrionali alle aree a clima più caldo. Altri fattori ambientali che si ritiene conferiscano una maggiore suscettibilità allo sviluppo della malattia sono il fumo e l'obesità, ipoteticamente attraverso la loro influenza sull'infiammazione e sulle funzioni immunitarie. Tra gli altri fattori dello stile di vita, è stato recentemente proposto che la deprivazione di sonno in giovane età potrebbe aumentare il rischio di sviluppare la SM nella vita. A differenza di altre malattie autoimmuni, non è stato definito un singolo antigene in grado di avviare il processo patologico nell'uomo o di trasferirlo ad un organismo ricevente, sebbene una risposta anticorpale sostenuta contro gli antigeni sia ben stabilita. A questo proposito si ritiene che le bande oligoclonali, che sono un elemento cardine della

diagnosi della SM, nonostante siano rilevabili in altre malattie, derivino principalmente dalla produzione di autoanticorpi contro componenti intracellulari ubiquitari.

Diversi agenti patogeni sono stati proposti come fattori scatenanti per l'insorgenza della malattia, in particolare i virus della famiglia degli *Herpesviridae*, come il virus di Epstein-Barr e il virus dell'herpes umano 6. Tuttavia, l'evidenza di un'associazione causale finora è stata inconcludente. Altri virus che si ritiene abbiano una relazione con l'insorgenza della malattia sono i retrovirus endogeni umani (HERV), la cui attivazione come elementi trasponibili del genoma umano potrebbe influenzare la progressione della malattia. Diversi antigeni possono contribuire contemporaneamente all'insorgenza o all'esacerbazione della malattia. A questo proposito, l'infezione da batteri intracellulari come la *Chlamydia pneumoniae* è stata associata all'insorgenza della SM, mentre il contatto con superantigeni batterici, come le tossine da *Staphylococcus aureus*, è stato associato all'insorgenza e/o all'esacerbazione della malattia. Infezioni da altri batteri sono state collegate allo sviluppo della SM, anche se fino ad oggi questi patogeni non sono stati direttamente isolati dal liquido cerebrospinale dei pazienti.

L'infiammazione, una volta innescata, potrebbe progredire attraverso una fase asintomatica in cui le lesioni demielinizzanti appaiono in un

pattern multifasico e asincrono in siti non contigui configurando così il fenomeno di disseminazione nello spazio e nel tempo. L'esordio clinico prototipico è costituito da una disfunzione neurologica acuta, che si sviluppa nell'arco di ore o giorni, sostenuta dall'infiammazione di aree distinte del SNC, come i nervi ottici e le vie sensomotorie cerebrali, del tronco encefalico o della colonna vertebrale. La disfunzione derivante da episodi di malattia di solito si risolve in modo parziale o totale.

1.1.3 Classificazione

Secondo l'attuale definizione, un singolo episodio di malattia di SM, ma non sufficiente a soddisfare i criteri per la diffusione nello spazio e nel tempo, è definito sindrome clinicamente isolata (CIS). D'altra parte, una condizione in cui sono presenti lesioni caratteristiche di una malattia demielinizzante in assenza di manifestazioni cliniche è definita sindrome radiologicamente isolata (RIS). Nel corso del tempo, in base alle differenze nell'aspetto della lesione, nelle manifestazioni cliniche e nell'accumulo di disabilità, la malattia potrebbe assumere un decorso recidivante remittente (SMRR) o progressivo, che potrebbe essere ulteriormente distinto tra primariamente (SMPP) o secondariamente (SMSP) progressivo. Il primo è caratterizzato dalla ripetizione di brevi episodi di disfunzione neurologica sostenuti da infiammazione acuta del SNC e comparsa sincrona di lesioni demielinizzanti. Il decorso progressivo è caratterizzato da malfunzionamento neurologico, soprattutto dei sistemi motori, che decade lentamente nel tempo indipendentemente dalla comparsa di nuove placche demielinizzanti.

I decorsi progressivi possono essere ulteriormente distinti in secondari o primari a seconda che siano stati preceduti da una SMRR di lunga data o meno. L'insorgenza di recidive e la progressione sostenuta della malattia non si escludono a vicenda. Meno frequente è stato descritto un decorso benigno della malattia, caratterizzato dall'assenza di

recidive con conservazione del funzionamento neurologico per decenni, anche senza terapia immunomodulatoria.

Su base istologica, le lesioni tipiche della SM consistono in focolai confluenti di degradazione infiammatoria della mielina, centrati sugli spazi perivascolari vicini alle venule cerebrali e circondati da gliosi reattiva, che interessano sia la sostanza bianca che quella grigia dell'encefalo e del midollo spinale. Gli aspetti del danno parenchimale sono combinati con un grado variabile di infiltrazione di cellule trasportate dal sangue, come i linfociti CD4⁺, CD8⁺ e i monociti, che entrano attraverso le aree focali di interruzione della BEE. Le lesioni attive si distinguono per l'aumentata permeabilità della BEE e una significativa infiltrazione di linfociti B, CD4⁺, CD8⁺, mastociti, monociti dalla periferia, espressione di citochine e molecole di adesione, coesistenti con microglia attivate. D'altra parte, le lesioni inattive sono caratterizzate da una componente infiammatoria minore al loro interno, integrità relativamente conservata della BEE e presenza di fagociti radi e microglia al bordo della lesione. Sia le lesioni attive che quelle inattive mostrano una perdita assonale, mentre quelle inattive potrebbero espandersi lentamente nel tempo. Nonostante la maggiore integrità della BEE nelle lesioni croniche, gli studi di risonanza magnetica (MRI) nei pazienti con SM hanno rilevato un flusso glinfatico alterato, che sembra essere più prominente nella malattia

avanzata. Nella SMRR e nella SMPP/SMSP coesistono entrambi i tipi di lesioni, anche se in proporzioni diverse. Infatti, si ritiene che le lesioni inattive siano il tipo più comune di lesione in entrambe le forme, sebbene quelle attive siano più comuni nella SMRR, alla base di un impatto fisiopatologico diretto dell'infiammazione acuta. Le forme progressive della malattia, d'altra parte, mostrano lesioni inattive a lenta espansione, mentre mostrano aggregati di cellule infiammatorie simili a follicoli linfoidi terziari nei compartimenti leptomeningei combinati con atrofia globale del SNC. Anche le proporzioni relative di cellule B, plasmacellule e cellule T variano. Sia le lesioni attive che quelle inattive mostrano segni istologici di alterato trasporto assonale, come la degenerazione assonale anterograda e retrograda. Oltre all'infiammazione e alla degenerazione assonale, altre importanti caratteristiche della patologia della SM a livello cellulare sono le alterazioni della morfologia e del numero sinaptico, la deposizione di ferro e le alterazioni mitocondriali (Papiri et al., 2023).

1.1.4 Ruolo dell'inflammazione

Si ritiene che il processo di demielinizzazione nella SM inizi nel paranodo (adiacente ai nodi di Ranvier) e si estenda ai domini juxtaparanodali. Nelle regioni della lesione, le proteine di membrana altamente organizzate si disperdono in tutto l'assone scoperto, compresi i canali del sodio dei nodi di Ranvier. La ridistribuzione dei canali del sodio provoca il blocco della conduzione e il sovraccarico di calcio, con conseguente danno assonale. Questo processo richiede il reclutamento di cellule progenitrici degli oligodendrociti (OPC) e la loro maturazione nelle lesioni demielinizzate per avviare il processo di rimielinizzazione. Anche gli oligodendrociti maturi potrebbero aiutare nel processo. Tuttavia, tale rimielinizzazione non è sufficiente per un recupero completo nei pazienti con SM a causa dell'estensione delle lesioni, della perdita di OPC con l'età e del lungo periodo necessario per recuperare completamente la guaina mielinica quando la distruzione è più veloce, come accade durante questo processo patologico. Le OPC sono particolarmente vulnerabili allo stress ossidativo poiché hanno un tasso di metabolismo ossidativo più elevato rispetto agli oligodendrociti adulti. La disregolazione del differenziamento delle OPCs causa l'accumulo di ferro sia nei depositi extracellulari che nelle strutture intracellulari di diversi tipi di cellule neuronali. L'accumulo di ferro può provocare un effetto neurotossico diretto o indiretto, inducendo lo stress

ossidativo attraverso la reazione di Fenton ed esacerbando l'infiammazione.

L'infiammazione cronica immuno-mediata della SM inizia nella periferia con fallimento nell'auto-riconoscimento da parte delle cellule T. Gli antigeni che innescano la risposta immunitaria non sono noti, ma alcuni potenziali bersagli sono le proteine della mielina e le proteine da shock termico. Le cellule T sono in grado di riconoscere le particelle non autonome (o gli antigeni) dovute ai recettori delle cellule T di superficie (TCR). Possono differenziarsi in cellule T citotossiche che possono uccidere direttamente le cellule infette o in cellule T-helper in grado di attivare altre cellule come le cellule B e i macrofagi. Il TCR non può legarsi direttamente agli antigeni, poiché richiede cellule presentanti l'antigene (APC), che scompongono l'antigene in peptidi più piccoli.

Sulla superficie delle APC, le molecole MHC (complesso maggiore di istocompatibilità) presentano l'antigene alle cellule T. Poiché il legame del TCR alla molecola MHC che contiene l'antigene da presentare è instabile, le cellule T esprimono co-recettori per favorire la connessione. Di solito, le cellule T-helper esprimono il co-recettore $CD4^+$ e le cellule T citotossiche esprimono il co-recettore $CD8^+$. Inoltre, le cellule T naïve ($CD4^+$ o $CD8^+$ mature ma non ancora esposte all'antigene), dopo l'esposizione a determinate citochine possono

differenziarsi in un fenotipo di cellula T con produzione associata di citochine specifiche.

I fenotipi delle cellule T $CD4^{+}$ possono essere suddivisi in 4 sottosezioni: cellule Th1 e Th17 pro-infiammatorie, cellule Th2 anti-infiammatorie e cellule T regolatorie (Treg). Le suddette cellule immunitarie e la loro relazione sono riassunte nella Figura 4.

Per quanto riguarda l'eziologia autoimmune della SM, per molti anni si è creduto che fosse una malattia Th1 $CD4$ -mediata e che le cellule Th1 fossero i principali motori del processo autoimmune osservato nella SM.

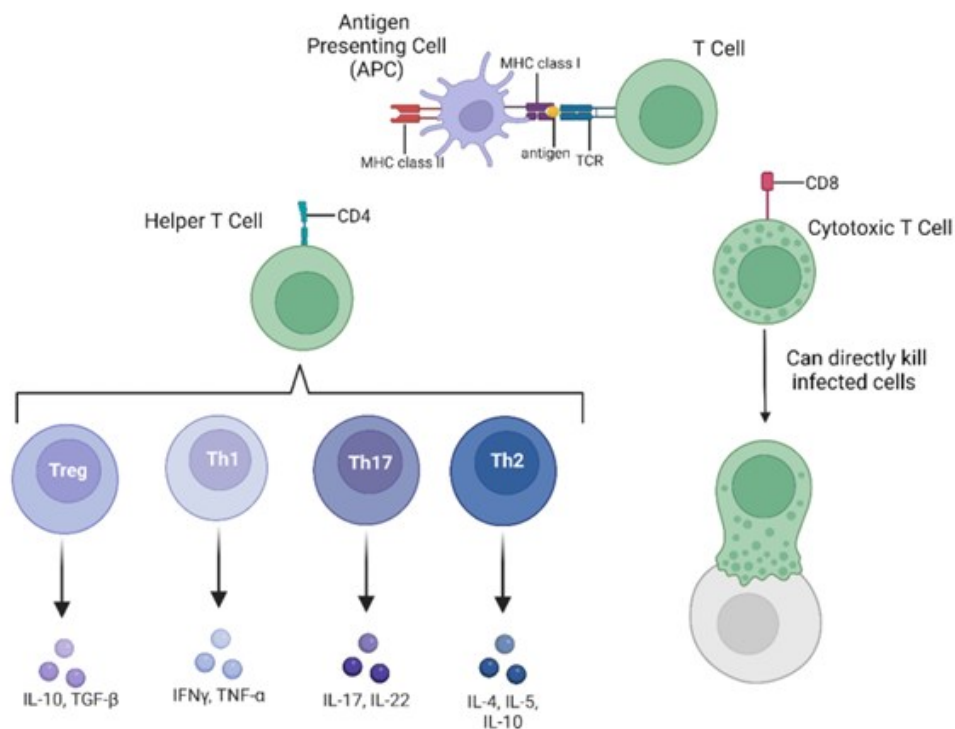


Figura 4. Rappresentazione schematica delle cellule immunitarie che mediano la sclerosi multipla (SM). I recettori delle cellule T (TCR) possono riconoscere gli antigeni ma non si legano direttamente, in quanto richiedono le cellule presentanti l'antigene (APC). Le APC esprimono il complesso di istocompatibilità (MHC), di cui quello di classe I presenta antigeni alle cellule T citotossiche, e quello di classe II presenta alle cellule T helper. Inoltre, per stabilire la connessione tra il TCR e l'MHC, le cellule T esprimono co-recettori. Di solito, le cellule T citotossiche esprimono il co-recettore CD8 e le cellule T helper esprimono il co-recettore CD4. Le cellule T citotossiche possono uccidere direttamente le cellule infette. La cellula T helper può presentarsi in diversi fenotipi a seconda del modello specifico di citochine secrete. Creato con Biorender.com (Dias-Carvalho et al., 2023).

La citochina IL-12 induce il fenotipo Th1 e, a sua volta, queste cellule secernono citochine pro-infiammatorie tra cui IFN γ , TNF- α e IL-2, riportate essere elevate in campioni sierici di pazienti con SM. Si credeva che l'equilibrio asimmetrico Th1/Th2 fosse alla base della progressione della SM. D'altra parte, le cellule Th2 producono citochine come IL-4, IL-10 o IL-5 legate a funzioni antinfiammatorie. I pazienti con SM con una maggiore attività delle cellule Th2 di solito hanno meno episodi recidivanti. Le citochine Th1 e Th2 possono inibirsi a

vicenda e, a seconda del rapporto, viene innescata la progressione o la remissione della malattia. Nei pazienti con SM, l'immunomodulazione farmaceutica per aumentare il Th2 provoca effetti benefici sul decorso della malattia. Al contrario, il ruolo centrale delle cellule Th1 nella SM è stato messo in discussione quando l'inibizione di IL-12 non è stata efficace nel ridurre le lesioni della SM negli studi clinici di fase II. IL-23 guida la differenziazione di Th17 che secerne diverse citochine pro-infiammatorie, tra cui IL-17 e IL-22. Considerando ciò, è stato osservato che nei pazienti con SM, i livelli di IL-17 nel liquido cerebrospinale e nelle cellule mononucleate del sangue periferico erano elevati rispetto ai controlli sani. Inoltre, l'analisi post-mortem del tessuto cerebrale di pazienti con SM ha rivelato un aumento dell'espressione e della produzione di IL-17 principalmente nei siti di lesione attivi. Oltre alle cellule T, anche gli astrociti e gli oligodendrociti producono questa citochina. Per quanto riguarda le cellule T, è stata riscontrata un'alta densità di cellule T CD4⁺ e T CD8⁺ nei siti di lesione attiva e che producono IL-17. D'altra parte, non sono state rilevate cellule Treg, suggerendo l'assenza di inibizione delle cellule T nel SNC. Le cellule Treg possono controllare la malattia e prevenirne la progressione poiché possono sopprimere l'attivazione delle cellule T inibendo la sua proliferazione e il rilascio di citochine.

È stato riscontrato che le cellule T CD8⁺ e IL-17 aumentano nel liquido cerebrospinale dei pazienti con SM in stadio iniziale, ma non nel sangue periferico, indicando che il microambiente infiammatorio del cervello potrebbe innescare l'espansione clonale di queste cellule e la produzione di IL-17. Questa nozione è supportata dalla presenza di IL-23, una citochina che induce il fenotipo IL-17-secrente in T CD8⁺ e che è prodotta da macrofagi e cellule dendritiche localizzate nelle lesioni della SM. In più, IL-6 e IL-1 β differenziano anche le cellule T naïve in cellule secernenti IL-17. Si può affermare che la progressione è guidata sia dai sottotipi Th1 che da quelli Th17 attraverso meccanismi diversi. Le cellule T auto-aggressive interagiscono con la BEE e la attraversano, infiltrandosi nel parenchima cerebrale. Una volta nel cervello, queste cellule interagiscono non solo con la mielina ma anche con altre cellule immunitarie residenti, aumentando ulteriormente il danno cerebrale. Inoltre, sembra che le cellule T CD4⁺ inizino il processo autoimmune e le cellule T CD8⁺ portino alla lesione da demielinizzazione (Dias-Carvalho et al., 2023).

1.1.5 Terapie

Si stima che l'85% delle persone affette dalla malattia sviluppino una SMRR all'esordio clinico. La proporzione di recidive è aumentata con l'età ed il peggioramento associato ad esse può essere contrastato con "terapie modificanti la malattia" (DMTs).

Negli ultimi decenni sono stati resi disponibili più di dieci farmaci modificanti la malattia da quando l'interferone, per primo, nel 1993 è stato introdotto come DMT per la SMRR.

Le DMTs mirano a ridurre la frequenza delle recidive cliniche, rallentare l'accumulo di disabilità neurologiche e prevenire lo sviluppo di SMSP nei pazienti con SM recidivante remittente, presumibilmente attraverso la prevenzione di attacchi infiammatori acuti sul SNC e la soppressione dell'infiammazione del SNC. Sempre più farmaci sono stati approvati dalla Food and Drug Administration (FDA, USA) e dall'Agenzia Europea per i Medicinali (EMA, Europa); questi includono farmaci orali (teriflunomide, dimetilfumarato, fingolimod, siponimod, ozanimod e cladribina) e farmaci ad iniezione sottocutanea o endovenosa di anticorpi monoclonali (natalizumab, alemtuzumab, rituximab e ocrelizumab) che sono utili per i pazienti che hanno una compliance non ottimale con farmaci orali giornalieri.

È importante sottolineare che le DMT per la SM possono essere classificate, in base all'efficacia, in più gruppi: a bassa efficacia,

moderata efficacia, da moderata ad alta efficacia e ad alta efficacia, come riportato nella Figura 5.

Table 2.

Characteristics of approved and commonly used disease modifying therapies for relapsing multiple sclerosis.

Efficacy	DMT	*Reduction of ARR	Key Pharmacological Mechanisms	Important Adverse Effects	Risk of Malignancy on Long-Term Use	Safety for Pregnancy
Low	IFNβ	51–55% (compared to placebo)	Reduce antigen presentation and T cell proliferation, shift Th1 to Th2 response, restore suppressor function	Damaged LFT, flu-like Rx, skin reaction, depression	Nil	Safe (pro-teratogenic)
Low	Glatiramer acetate	29% (compared to placebo)	Alter T cell differentiation to induce proliferation of anti-inflammatory lymphocytes	Skin injection site reactions; lymphopenia	Nil	Safe
Low	Teriflumide	54% (compared to placebo)	Inhibit proliferation of autoreactive B and T lymphocytes	Nausea, diarrhea, hair loss, damaged LFT, infection	Nil	Contraception in pregnancy, avoid accelerated elimination and organ screening USS if accidental pregnancy
Moderate	Dimefyll fumarate	51% (compared to placebo)	Affect Nrf2 pathway activity, reduce release of inflammatory cytokines and activate antioxidant pathways (neuroprotective effects)	Fatigue, gastrointestinal symptoms, lymphopenia, infection, low risk of PML (1 in 50,000), hypertension	Nil	Uncertain, inadequate data for conclusion
Moderate to high	S1P receptor modulators					
	Fingolimod	54% (compared to placebo)	S1P receptor modulators induce degradation of S1P receptors, trapping of lymphocytes in secondary lymphoid tissues	Headache, bradycardia, heart block, lymphopenia, infection especially herpes virus, PML (1 in 12,000), macular edema, liver function derangement	Increased risk of malignancy (skin basal and Merkel cell carcinoma, melanoma)	Unsafe, increased risk of CA with exposure in first trimester, washout period of 2 months before pregnancy recommended
	Siponimod	55% (compared to placebo)	similar to fingolimod	Headache, bradycardia, heart block, lymphopenia, hypertension, liver function derangement	Uncertain	Uncertain, risk of CA with exposure in first trimester unknown, likely similar to fingolimod, washout period of 10 days before pregnancy recommended
	Onasemnol	49% (compared to IFNβ1a)	similar to fingolimod	URT, UTI, liver function derangement, bradycardia, heart block, lymphopenia, hypertension, orthostatic hypotension, back pain	Uncertain	Uncertain
Moderate to high	Gadilixiv	58% (compared to placebo)	Nucleoside analogues, induce apoptosis of lymphocytes, followed by repopulation of lymphocytes	Lymphopenia, infection (see case of PML, reported)	Possible increased risk of malignancy	Uncertain, conception at least 6 months after last dose recommended
High	Natalizumab	69% (compared to placebo)	Bind to endothelial VCAM1 to prevent migration of lymphocytes to CNS	Infection reaction, anti-drug antibody, infection, PML	Nil	Uncertain, SA and CA likely not elevated for exposure in first trimester
High	Alectuzumab	51% (compared to IFNβ1a)	Depletion of lymphocytes, monocytes, NK cells followed by repopulation of lymphocytes	Infection reaction, infection especially herpes virus (not PML), secondary autoimmune stroke, arterial dissection, hemorrhage/epistaxis	Possible increased risk of malignancy including melanoma, thyroid cancer	Uncertain, conception at least 4 months after last dose
High	Anti-CD 20 monoclonal antibodies					
	Ocrelizumab	44% (compared to IFNβ1a)	Depletion of CD20+ B cells	Infection reaction, infection, lymphopenia, hypogammaglobulinemia	Possible increased risk of malignancy	Uncertain, low teratogenic risk, conception 2 months after last dose
	Rituximab	59% (compared to placebo)	Depletion of CD20+ B cells	Infection reaction, infection, lymphopenia, hypogammaglobulinemia	Nil	Uncertain, reduced B cell count in newborns, conception 3–6 months after last dose recommended
	Ofatumumab	59% (compared to teriflumide)	Depletion of CD20+ B cells	Infection, lymphopenia, hypogammaglobulinemia	Nil	Uncertain, conception 2 months after last dose recommended

* Reduction of annualized relapse rate according to the published clinical trials which vary in the comparators including placebo and other comparator DMT such as interferon-beta and teriflumide. CA = congenital anomalies; SA = spontaneous abortion.

Figura 5. Classificazione dei DMT in base all’ efficacia (Lee et al., 2024).

L'interferone beta (IFNβ), costituito da IFNβ1a (sommministrato per via sottocutanea tre volte alla settimana o per via intramuscolare) e IFNβ1b (per via sottocutanea a giorni alterni), sono le prime DMTs approvate per la SMRR. Questi farmaci richiedono iniezioni frequenti, ma grazie ad una formulazione PEGilata (coniugata con glicole polietilenico, PEG) la frequenza può essere ridotta ad una volta ogni 2 settimane. Gli effetti terapeutici sono correlati alla sotto regolazione dell'espressione di MHC di classe II su APC, all'induzione della produzione di IL-10 da parte delle cellule T che porta a uno spostamento della risposta delle

cellule Thelper (Th) all'antinfiammatorio Th2 e all'inibizione della migrazione delle cellule T attraverso il blocco delle metalloproteinasi e delle molecole di adesione. Nonostante gli effetti avversi comuni, tra cui lo squilibrio della funzionalità epatica, le reazioni al sito di infezione, i sintomi simil-influenzali, la mialgia e la depressione, gli $\text{INF}\beta$ sono ben tollerati e la loro sicurezza a lungo termine è confermata. Viene utilizzato principalmente nel trattamento della SMRR e SMSP.

L'acetato di glatiramer (GA) è un copolimero sintetico composto da quattro aminoacidi presenti nella proteina basica della mielina. Sebbene l'esatto meccanismo d'azione non sia completamente compreso, è noto che coinvolge sia l'immunità innata che quella adattativa, esercitando effetti immunomodificatori su cellule T, cellule B, monociti e varie vie citochiniche. Inizialmente, la FDA (Food and Drug Administration) ha approvato l'acetato di glatiramer per la SMRR nel 1996. Le indicazioni sono state successivamente estese per includere la CIS e la SMSP attiva negli adulti.

Il farmaco viene somministrato tramite iniezione sottocutanea tre volte alla settimana. Gli effetti avversi del glatiramer acetato includono reazioni al sito di iniezione e reazioni immediate post-iniezione come vampate, costrizione toracica, dispnea, palpitazioni, tachicardia, orticaria e ansia. Come l' $\text{IFN}\beta$, il glatiramer acetato non è considerato

immunosoppressivo e non è associato a un aumento del rischio di infezioni opportunistiche.

La teriflunomide (TF) è un inibitore orale della diidroorotasi deidrogenasi, un enzima mitocondriale necessario per la sintesi de novo della pirimidina, necessaria per l'espansione dei linfociti attivati dall'antigene. Attraverso l'inibizione della sintesi pirimidinica, porta a una riduzione dell'attività delle cellule T e B proliferanti, a una minore conta delle cellule Th1 e a un aumento del rapporto tra cellule T CD4⁺/CD8⁺ e della conta regolatoria delle cellule T. Questo farmaco viene utilizzato per il trattamento di SMRR attraverso somministrazione orale una volta al giorno. Gli effetti avversi comuni includono perdita di capelli, mal di testa, nausea, diarrea, rinofaringite, infezione del tratto urinario e livelli elevati di ALT, mentre gli effetti avversi rari ma potenzialmente gravi includono epatotossicità, infezioni opportunistiche (aspergillosi), soppressione del midollo osseo, pressione sanguigna elevata, neuropatia periferica e malattia polmonare interstiziale.

Il dimetilfumarato (DMF) è l'estere metilico dell'acido fumarico. Il suo esatto meccanismo d'azione nella SM non è completamente compreso, ma si ritiene che eserciti i suoi effetti attraverso una combinazione di meccanismi antinfiammatori e neuroprotettivi. Il DMF e il suo metabolita attivo, il monometilfumarato (MMF), attivano la via del

fattore nucleare 2 (Nrf2), che svolge un ruolo chiave nella risposta cellulare allo stress ossidativo. Ciò può portare a riduzioni dell'infiammazione e del danno ossidativo al sistema nervoso, entrambi fattori chiave nella patogenesi della SM. Il DMF è stato approvato dalla FDA per CIS, SMRR e SMSP attiva negli adulti. Gli effetti avversi del DMF includono vampate di calore e disturbi gastrointestinali.

Per quanto riguarda le terapie modificanti la malattia, da moderata ad alta efficacia, troviamo i modulatori del recettore della sfingosina-1-fosfato.

La sfingosina-1-fosfato (S1P) si lega ai recettori S1P sulla superficie dei linfociti e la successiva attività di segnalazione è importante per l'uscita dei linfociti dagli organi linfoidi secondari. I modulatori del recettore S1P, tra cui Fingolimod, Siponimod, Ponesimod e Ozanimod, si legano ai recettori S1P e portano all'internalizzazione e alla degradazione dei recettori S1P. Questi provocano l'intrappolamento dei linfociti nei tessuti linfoidi secondari e quindi la linfopenia periferica. Questi farmaci sono utilizzati principalmente per il trattamento della CIS, SMRR e SMSP anche se alcuni studi evidenziano effetti avversi comuni come il rischio più elevato di infezione.

La cladribina è un antimetabolita che inibisce la sintesi e la riparazione del DNA e promuove l'apoptosi cellulare senza avere un impatto importante sulle cellule del sistema immunitario innato. I suoi effetti

citotossici sui linfociti possono ridurre l'infiammazione e la recidiva nella SMRR o SMSP. La cladribina è un farmaco somministrato per via orale in due cicli all'anno. Gli effetti avversi comuni includono linfopenia, infezioni del tratto respiratorio superiore, mal di testa e nausea. La conta dei linfociti in genere diminuisce 2-3 settimane dopo la terapia con cladribina, raggiunge il suo nadir 2-3 mesi dopo l'inizio del trattamento e poi si riprende gradualmente nei mesi successivi.

Tra le terapie modificanti la malattia ad alta efficacia si ritrovano diverse soluzioni e diversi farmaci.

Natalizumab è un anticorpo monoclonale umanizzato IgG4 che ha come bersaglio l'antigene-4 molto tardivo (VLA4) espresso sulla superficie dei linfociti. VLA4 si lega alla molecola di adesione delle cellule vascolari 1 (VCAM1) espressa sulle cellule endoteliali ed è fondamentale per la migrazione dei linfociti dalla circolazione periferica al SNC. Il natalizumab è uno delle DMT più potenti per la SMRR ed è generalmente considerato un farmaco di seconda o addirittura terza linea a causa del rischio di PML (leucoencefalopatia multifocale progressiva), una complicanza potenzialmente pericolosa per la vita causata dall'infezione opportunistica degli oligodendrociti da parte del polyomavirus (virus di John Cunningham, JCV). Recentemente, è stato riportato che dosi prolungate di natalizumab, come un'infusione endovenosa di 300 mg ogni 6-8 settimane, sono

associate a un minor rischio di PML. Tuttavia, natalizumab può essere considerato una terapia di prima linea per i pazienti con SM altamente attiva che mirano a un rapido controllo della malattia, in particolare per il beneficio riportato di un miglioramento della disabilità (CDI) in una percentuale alta di pazienti.

Gli effetti avversi comuni di natalizumab includono reazioni all'infusione e/o infezioni del tratto respiratorio e del tratto urinario. Altri immunomodulatori devono essere interrotti almeno un mese prima dell'inizio del trattamento con natalizumab. È stato segnalato che un anticorpo anti-farmaco si sviluppa in circa il 6% dei pazienti e porta a una scarsa risposta al trattamento del farmaco.

Alemtuzumab è un anticorpo monoclonale che ha come bersaglio l'antigene CD52, una proteina che si trova sulla superficie dei linfociti maturi ma non sulle cellule staminali. Il suo meccanismo d'azione nella SM è legato all'esaurimento dei linfociti T e B circolanti, che si ritiene istighino l'infiammazione e le recidive nella SM. Alemtuzumab viene utilizzato per gli adulti con SMRR e viene somministrato per infusione endovenosa. Gli effetti avversi gravi includono reazioni all'infusione (occasionalmente gravi e potenzialmente fatali), infezioni e sviluppo di autoimmunità. Altre infezioni opportunistiche e potenzialmente fatali includono listeriosi, la toxoplasmosi, la nocardiosi, l'aspergillosi, la polmonite da pneumocystis, la candidosi, la riattivazione della

tubercolosi e la PML. A causa dei suoi problemi di sicurezza e del suo profilo di rischio, alemtuzumab è generalmente riservato a individui che non hanno risposto adeguatamente ad almeno altre due DMTs.

Nell'ultimo decennio, la visione tradizionale della SM come prevalentemente mediata dalle cellule T si è spostata verso l'idea che le recidive della SM coinvolgano interazioni tra diversi tipi di cellule immunitarie, comprese le cellule B. Terapie di deplezione delle cellule B come rituximab, ocrelizumab e ofatumumab sono utilizzate soprattutto nelle fasi iniziali della SM e nelle lesioni attive. In particolare, CD20 è una fosfoproteina transmembrana non glicosilata che viene espressa sulla superficie delle cellule. Gli anticorpi monoclonali diretti contro l'antigene CD20 riducono le cellule B CD20⁺ attraverso alcuni meccanismi: citotossicità cellulare anticorpo-dipendente, citotossicità complemento-dipendente e fagocitosi cellulare anticorpo-dipendente. La somministrazione di corpi monoclonali anti-CD20 porta a una rapida diminuzione delle cellule B CD20⁺, di solito entro pochi giorni.

L'uso di terapie modificanti la malattia di SM prevede l'avvio di una DMT a bassa efficacia (tipicamente IFN β , GA o TF) e il monitoraggio attento dei pazienti utilizzando valutazioni cliniche e risonanza magnetica per l'attività della malattia evidenziata da recidiva clinica, segni/disabilità neurologiche nuove o in peggioramento o lesioni

subcliniche nuove o in espansione. Se la malattia rimane attiva dopo un'adeguata durata della terapia (in genere 6 mesi o più), il trattamento verrà intensificato con un'altra DMT con maggiore efficacia. Il vantaggio di questa strategia è la sicurezza della DMT a bassa efficacia, evitando l'uso precoce di una DMT ad alta efficacia con un rischio di SAE (effetti avversi) come la PML e l'autoimmunità secondaria (Lee et al., 2024).

La gestione della SM richiede un approccio multidisciplinare e le prove indicano che uno stile di vita sano e una dieta equilibrata possono svolgere un ruolo significativo sia nella patogenesi che nella progressione della malattia (Abbasi et al., 2023).

1.1.6 Relazione tra dieta ed infiammazione

La dieta e l'infiammazione sono interconnesse e svolgono un ruolo cruciale nello sviluppo di malattie neurologiche come il morbo di Alzheimer, il morbo di Parkinson, la sclerosi multipla, la schizofrenia, la malattia bipolare e la depressione. I fattori dietetici sono stati identificati come modulatori chiave dell'infiammazione. Una dieta ricca di alimenti integrali, tra cui frutta, verdura, cereali integrali e fonti proteiche magre, è stata associata a livelli più bassi di marcatori infiammatori, come la proteina C-reattiva (CRP) e l'interleuchina-6 (IL-6). Al contrario, una dieta ricca di alimenti trasformati e ricchi di grassi,

carboidrati raffinati e carne rossa è associata a un aumento dell'infiammazione e a un rischio più elevato di malattie croniche, compresi i disturbi neurologici.

Una dieta che promuove l'infiammazione è una dieta che contiene alimenti che possono innescare nel corpo una risposta infiammatoria. Negli ultimi decenni, c'è stato un notevole cambiamento nelle abitudini alimentari dei paesi occidentalizzati, verso un aumento del consumo di diete di tipo occidentale (WDs), caratterizzate da un'elevata assunzione di pasti trasformati, cibi pronti, snack, bevande analcoliche zuccherate, alimenti ricchi di grassi e carboidrati. La maggior parte dei componenti di un alimento ultra-processato è costituita da conservanti, stabilizzanti, emulsionanti, agenti di carica, solventi, leganti, esaltatori sensoriali, dolcificanti, aromi e coloranti. Dal punto di vista nutrizionale, questi alimenti non dovrebbero essere consumati frequentemente e in grandi quantità. Alti livelli di grassi saturi (SFA) e acidi grassi trans (TFA) si trovano nei prodotti animali, come carne e latticini, e negli alimenti trasformati, come patatine, biscotti e cibi fritti. Questi grassi aumentano l'infiammazione promuovendo la produzione di citochine pro-infiammatorie, come IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Una dieta ricca di SFA e TFA è stata anche collegata a un aumento del rischio di Alzheimer. Gli studi hanno indicato una forte associazione tra l'aumento dell'assunzione di grassi totali, SFA e l'aumento del rischio di malattie

cardiovascolari e la diminuzione della funzione cognitiva. D'altra parte, gli adulti sani che hanno consumato una dieta povera di grassi ma ricca di acidi grassi omega-3 hanno sperimentato la protezione dal deterioramento cognitivo. Inoltre, il consumo di grassi polinsaturi (PUFA), in particolare di PUFA *n*-3, è stato collegato a un ridotto rischio di mortalità cardiovascolare grazie alle loro proprietà antinfiammatorie. Alcuni studi suggeriscono che le diete ricche di acidi grassi monoinsaturi (MUFA) possono anche avere effetti antinfiammatori. L'equilibrio tra acidi grassi *n*-6 e *n*-3 è di grande importanza. La quantità e il tipo di grasso consumato influiscono in modo significativo sul grado di infiammazione e sulla probabilità di sviluppare malattie non trasmissibili. Un altro componente di una dieta che promuove l'infiammazione è un'elevata assunzione di carboidrati raffinati, come pane bianco, pasta e bevande zuccherate. Questi alimenti causano un rapido aumento dei livelli di zucchero nel sangue, portando al rilascio di insulina. Livelli elevati e prolungati di insulina possono contribuire allo sviluppo della resistenza all'insulina nei tessuti, che è un fattore chiave nella patogenesi dell'infiammazione. Secondo gli studi, il consumo frequente di alimenti ad alto indice glicemico è positivamente correlato con livelli sierici più elevati di marcatori infiammatori come CRP, TNF- α , IL-1 β e IL-6. Mentre una grande assunzione di fibre nella dieta ha l'effetto opposto. Inoltre, una dieta che promuove

l'infiammazione è povera di frutta e verdura ricca di antiossidanti, che possono neutralizzare i radicali liberi e ridurre l'infiammazione.

L'impatto della dieta sull'infiammazione è stato riconosciuto e nel 2004 è stato sviluppato l'indice di infiammazione alimentare (DII). Il DII classifica le diete da altamente antinfiammatorie ad altamente infiammatorie ed è calcolato utilizzando 45 componenti alimentari e nutrienti. Il punteggio DII è derivato dal questionario sulla frequenza degli alimenti (FFQ) validati scientificamente. Valori alti di DII indicano una dieta infiammatoria, valori bassi indicano una dieta antinfiammatoria. La valutazione e il punteggio riguardano sei marcatori infiammatori specifici, tra cui CRP, IL-1, IL-4, IL-6, IL-10 e TNF- α (fattore di necrosi tumorale). Gli studi hanno dimostrato che una dieta antinfiammatoria può essere un approccio benefico nella gestione dell'obesità, dei disturbi cardiometabolici e autoimmuni (comprese le malattie infiammatorie intestinali e l'artrite reumatoide), del cancro, delle malattie neurodegenerative (morbo di Alzheimer) e della depressione. I modelli alimentari con benefici per la salute precedentemente documentati, come la Dieta Mediterranea (DM) e la dieta vegetariana, soddisfano la maggior parte dei presupposti della dieta antinfiammatoria. Queste diete sostengono l'assunzione di frutta e verdura in abbondanza, prodotti integrali, grassi sani e fonti di proteine vegetali o animali. L'influenza del consumo di cibo sulla funzione

neurologica umana è stata oggetto di interesse per i ricercatori per decenni. Un numero crescente di prove suggerisce che alcuni componenti della dieta hanno un impatto benefico sull'insorgenza e l'avanzamento di diversi disturbi neurologici. Di seguito, presentiamo le informazioni pubblicate sui componenti dietetici con elevata attività antinfiammatoria e antiossidante.

La ricerca indica che il consumo di una dieta ricca di frutta e verdura è associato a concentrazioni più basse di indicatori infiammatori. Il consumo di frutta e verdura, che sono ricche di sostanze bioattive, tra cui polifenoli e vitamine antiossidanti, minerali e fibre, è inversamente correlato all'infiammazione e allo stress ossidativo. Le ricerche disponibili mostrano che il consumo di frutta e verdura è correlato negativamente con le citochine pro-infiammatorie e le specie reattive dell'ossigeno, che sono correlate all'infiammazione e allo stress ossidativo. Per ridurre le citochine pro-infiammatorie e le specie reattive dell'ossigeno, si consiglia di consumare cinque porzioni di frutta e verdura al giorno. Inoltre, i prodotti vegetali possono avere effetti positivi sul sistema cardiovascolare limitando l'ossidazione del colesterolo LDL, rallentando così la formazione della placca aterosclerotica.

Le erbe e le spezie sono un ottimo complemento a una varietà di cucine grazie alle loro qualità di sapore e odore, nonché del loro impatto

positivo sulla salute. Gli effetti antiossidanti e antinfiammatori sono stati attribuiti a tre categorie principali di composti: terpeni, acidi fenolici e flavonoidi. Questi potrebbero migliorare l'attività di enzimi, fattori e proteine antinfiammatori e interrompere percorsi specifici nel processo infiammatorio. La curcumina e l'aglio sembrano offrire i più potenti effetti antinfiammatori riducendo nel sangue le concentrazioni di biomarcatori dell'infiammazione.

Il pesce azzurro è la fonte più abbondante e facilmente accessibile di acidi grassi *n*-3. Contiene abbondanti quantità di acidi grassi a catena lunga, in particolare EPA (Acido eicosapentaenoico) e DHA (Acido decosaesaenoico). È stato dimostrato che tali molecole possiedono un'azione antinfiammatoria, oltre a capacità antiaritmiche, antipertensive e antiaggreganti. Abbassano anche i livelli di trigliceridi nel sangue, riducendo la possibilità di eventi cardiovascolari. Un'altra fonte di acidi *n*-3 sono le alghe. Dalla dieta può essere ottenuto anche l'acido linolenico, un precursore dell'EPA che ha un effetto ipolipemizzante. Semi di lino, olio di lino e noci sono alcune delle sue fonti.

Gli alimenti di origine vegetale come la soia ed i legumi includono una varietà di sostanze nutritive. È stato scoperto che i prodotti a base vegetale sono benefici per la salute e nella prevenzione di varie malattie come il cancro, l'obesità, il diabete, osteoporosi e le problematiche

associate alla pressione sanguigna. L'assunzione di proteine vegetali ha portato ad un miglioramento dello stato infiammatorio in pazienti con malattie croniche associate all'infiammazione.

L'olio d'oliva è un esempio di grasso sano con vari benefici per la salute. Le olive e l'olio d'oliva sono ricchi di acidi grassi monoinsaturi che possono modificare le vie antinfiammatorie e l'espressione genica, portando a una riduzione dell'infiammazione. L'olio d'oliva ha un rapporto favorevole acido linoleico/acido alfa-linolenico; è ricco di grassi monoinsaturi e povero di grassi polinsaturi. Include anche fitosteroli, polifenoli, vitamina E e vitamina A. La sua composizione favorevole e gli alti livelli di acido oleico, polifenoli e vitamina E lo rendono resistente ai cambiamenti ossidativi. I fitosteroli lavorano insieme per ridurre al minimo l'assorbimento del colesterolo. Queste proprietà antiossidanti possono svolgere un ruolo cruciale nella prevenzione o nel miglioramento di varie malattie associate allo stress ossidativo, come l'aterosclerosi e altre malattie croniche degenerative. Prove crescenti indicano che il consumo regolare di olio extra vergine di oliva è associato a un ridotto rischio di malattie croniche degenerative come le malattie cardiovascolari, il diabete di tipo 2 e il cancro. I benefici per la salute sono dovuti non solo al contenuto di grassi monoinsaturi ma anche alla presenza di composti fenolici che hanno proprietà antiossidanti, antinfiammatorie e immunomodulanti.

Il consumo di noci e semi come spuntini o nei pasti è utile per gli effetti antinfiammatori della dieta, poiché contengono sostanze nutritive che aiutano a diminuire l'infiammazione, come fibre alimentari, fitonutrienti, vitamine, minerali e acidi grassi essenziali.

L'uso diffuso e tradizionale del tè, sia nero che verde, contribuisce in modo significativo alla capacità della dieta di ridurre l'infiammazione. È stato dimostrato che l'estratto di tè verde, ricco di composti fenolici, ha una capacità antiossidante e inibisce l'ossidazione del colesterolo LDL. Grazie alle sue caratteristiche antinfiammatorie e antiossidanti, il tè può servire come parziale sostituto dell'acqua per placare la sete, riducendo al contempo il progresso della malattia.

Con il crescente consumo di vino in tutto il mondo, sono stati condotti diversi studi per esaminare il ruolo del vino nelle malattie neurologiche. Un consumo di vino da leggero a moderato sembra ridurre il rischio di demenza e declino cognitivo in modo dipendente dall'età. La presenza di polifenoli (es. resveratrolo), in particolare nel vino rosso, e le loro proprietà antiossidanti contribuiscono a questi effetti benefici di un consumo moderato.

Il cacao è l'ingrediente principale del cioccolato ed è ricco di composti biologicamente attivi che possiedono proprietà antinfiammatorie e antiossidanti. I risultati di studi recenti mostrano l'impatto positivo dei flavonoli del cacao sulla funzione cognitiva e sulla neuroplasticità.

Il ruolo che possono avere gli alimenti nelle malattie infiammatorie è quindi molto importante.

Come è stato ampiamente descritto nella parte precedente, una dieta antinfiammatoria, composta da abbondante frutta e verdura, prodotti a basso contenuto di grassi e un gran numero di prodotti lattiero-caseari a basso contenuto di grassi con probiotici, può avere un impatto significativo sulla progressione della malattia e nei cambiamenti nel SNC. I risultati hanno mostrato che la conformità ad una dieta antinfiammatoria ha migliorato significativamente la Modified Fatigue Impact Scale (MFIS) e la qualità di vita della Sclerosi Multipla (MSQoL-54) nei pazienti con SM, insieme ad un aumento dei livelli della citochina antinfiammatoria interleuchina 4 (IL-4). Questo schema nutrizionale però, non influenza in modo significativo il livello di IL-17 e il livello di proteina C-reattiva ad alta sensibilità. È stato studiato l'impatto di una dieta chetogenica (KD) e della restrizione calorica (CR) sul livello sierico di catene leggere dei neurofilamenti (sNfL) nei pazienti con SM. Il sNfL è un promettente biomarcatore del danno assonale. Lo studio ha rivelato che dopo 6 mesi di trattamento il gruppo KD aveva livelli di sNfL significativamente più bassi rispetto al gruppo di controllo (Common diet, CD), indicando il potenziale effetto neuroprotettivo della KD nella SM. Un altro studio ha dimostrato che l'adozione della Dieta Mediterranea ha ridotto l'affaticamento misurato

utilizzando l'indice di stanchezza neurologica MS (NFI-MS) nelle donne con diagnosi di SM. Durante il periodo di 6 mesi, il gruppo di non intervento è aumentato in media di circa 2,2 punti, mentre il gruppo di intervento è diminuito di 4,6 punti di NFI-MS. Dopo il periodo di 6 mesi, il gruppo di non intervento è aumentato di circa 4,8 e il gruppo di intervento è diminuito di circa 7,4 punti. L'intervento dietetico ha anche ridotto la disabilità misurata dalla Expanded Disability Status Scale (EDSS). Pertanto si può ipotizzare che l'adozione della Dieta Mediterranea possa costituire un trattamento di supporto per la SM, migliorando la qualità della vita e il quadro infiammatorio della malattia (Kurowska et al., 2023).

1.2 Dieta Mediterranea

Nel 2010 l'UNESCO ha riconosciuto la DM come patrimonio culturale immateriale dell'Umanità; tenendo conto del suo contributo nel mantenimento della salute generale è stata dettagliata e rappresentata graficamente per far sì di avere una maggiore aderenza a questo modello alimentare sano.

La DM era il regime alimentare più seguito nel ventesimo secolo dalle popolazioni del bacino Mediterraneo; a causa della grande distribuzione e dell'industrializzazione la sua diffusione si sta lentamente riducendo.

La Dieta Mediterranea è ricca di alimenti vegetali (cereali, frutta,

verdura, legumi, frutta a guscio, semi e olive), con l'olio d'oliva come fonte principale di grassi aggiunti, insieme ad un'assunzione da elevata a moderata di pesce e frutti di mare, consumo moderato di uova, pollame e latticini (formaggio e yogurt), basso consumo di carne rossa e consumo moderato di alcol (principalmente vino durante i pasti). Sulla base di prove scientifiche sulla salubrità del modello alimentare DM e sul suo ruolo nella prevenzione di molte malattie croniche da parte di ampi studi epidemiologici, è stata strutturata una piramide alimentare per definire con precisione questo regime alimentare.

La piramide riflette il processo di cambiamento che la DM sta attraversando all'interno delle società mediterranee. Questa nuova rappresentazione grafica (Figura 6) è stata concepita come una piramide di struttura principale semplificata, da adattare alle realtà specifiche dei diversi paesi (ad esempio le dimensioni delle porzioni) e alle variazioni del modello alimentare in relazione ai vari contesti geografici, socio-economici e culturali della regione mediterranea.

Mediterranean diet pyramid: a lifestyle for today
guidelines for adult population

Serving size based on frugality
and local habits
Wine in moderation
and respecting social beliefs

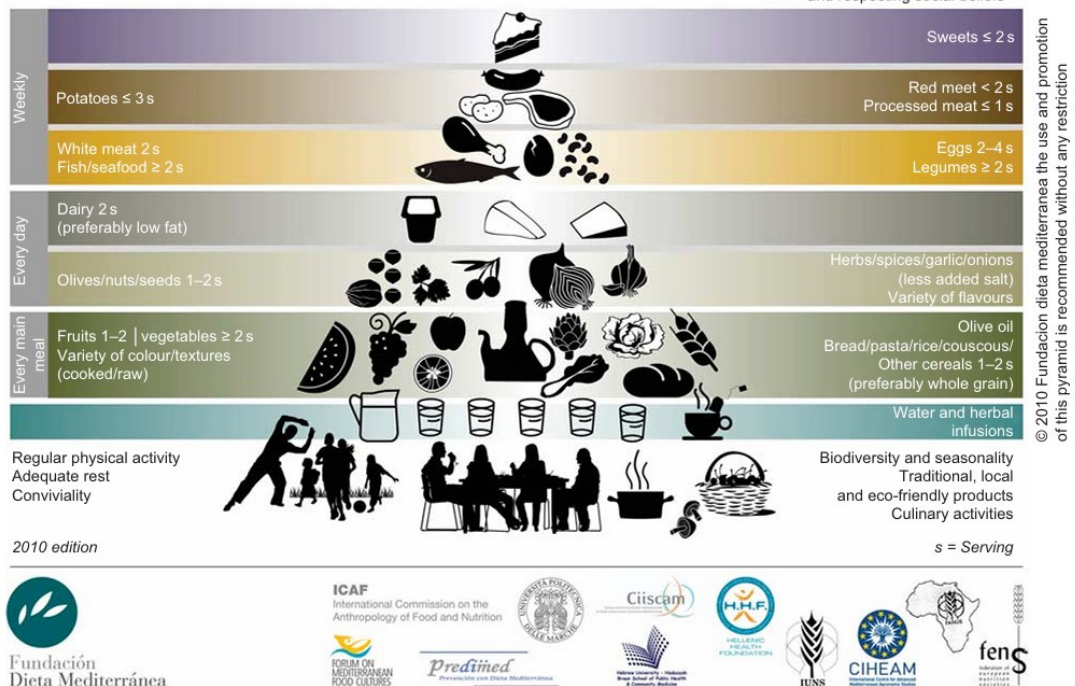


Figura 6. Piramide alimentare della Dieta mediterranea (DM) (Bach-Faig et al., 2011).

La piramide alimentare fornisce gli elementi chiave per la selezione degli alimenti, sia in termini quantitativi che qualitativi, indicando le proporzioni relative e la frequenza di consumo delle porzioni dei principali gruppi alimentari. Il modello comprende tutti i gruppi di alimenti, ed è solo una questione di varietà di alimenti e tecniche culinarie, insieme a frequenze e quantità adeguate nella dieta quotidiana. Un'ampia varietà di alimenti nella dieta riduce al minimo la possibilità di carenze di un particolare nutriente e micronutriente. Infatti, una maggiore aderenza alla DM è stata associata ad un migliore profilo nutrizionale.

La rappresentazione grafica ricalca gli alimenti che dovrebbero sostenere la dieta e fornire il più alto apporto energetico (livelli inferiori della piramide) e gli alimenti da consumare in quantità moderate (livelli superiori della piramide). Inoltre, elementi sociali e culturali caratteristici dello stile di vita mediterraneo sono incorporati nel grafico. Quindi, non si tratta solo di dare la priorità ad alcuni gruppi di alimenti rispetto ad altri, ma anche di prestare attenzione al modo di selezionarli, cucinarli e mangiarli. Così la piramide stabilisce linee guida dietetiche giornaliere, settimanali e occasionali al fine di seguire una dieta sana ed equilibrata.

- I pasti principali dovrebbero contenere tre elementi fondamentali:
 - Cereali: una o due porzioni per pasto sotto forma di pane, pasta, riso, couscous e altri. Preferibilmente integrale, poiché la lavorazione normalmente rimuove le fibre e alcuni preziosi nutrienti (Mg, Fe, vitamine, ecc.)
 - Verdure: due o più porzioni per pasto. Al fine di garantire l'assunzione giornaliera di vitamine e minerali, almeno una delle porzioni deve essere consumata a crudo (un pasto/giorno)
 - Frutta: una o due porzioni per pasto (anche come dessert scelto più frequentemente). Il concetto di "varietà di colori e consistenze" è sottolineato, nel caso di frutta e verdura, al fine di garantire un'ampia varietà di antiossidanti e composti protettivi.

- Dovrebbe essere garantita un'assunzione giornaliera di 1,5-2 l di acqua (equivalente a sei-otto bicchieri). Anche se le esigenze possono variare da persona a persona a causa dell'età, dell'attività fisica, delle circostanze personali e delle condizioni meteorologiche. L'acqua va consumata liberamente, in bottiglia o dal rubinetto, quando le circostanze igieniche lo permettono. Oltre all'acqua, infusi di erbe e tè senza zucchero e brodi a basso contenuto di sodio e grassi possono aiutare a completare il fabbisogno. Una corretta idratazione è fondamentale per mantenere l'equilibrio idrico corporeo.
- I latticini dovrebbero essere presenti in quantità moderate (due porzioni al giorno), con una preferenza per i latticini a basso contenuto di grassi, tradizionalmente sotto forma di yogurt, formaggio e altri prodotti lattiero-caseari fermentati. Sebbene la loro ricchezza di calcio sia importante per la salute delle ossa e del cuore, i prodotti lattiero-caseari possono essere una delle principali fonti di grassi saturi.
- L'olio d'oliva, in particolare quello extravergine, si trova al centro della piramide; dovrebbe essere la principale fonte di lipidi alimentari grazie all'alta qualità nutrizionale. La sua composizione unica gli conferisce un'elevata resistenza alle temperature elevate ed è pertanto consigliato sia per la cottura che per i condimenti. È stato riportato che il consumo di olio d'oliva è inversamente associato all'insorgenza di alcuni tumori, ed è noto per influenzare positivamente i lipidi nel sangue ed il sistema

cardiovascolare. Ciò può essere correlato al suo alto contenuto di acidi oleici monoinsaturi e all'abbondanza di composti antiossidanti, presenti principalmente nell'olio d'oliva vergine. Tradizionalmente, le verdure e altri alimenti vegetali vengono cucinati con olio d'oliva, amplificando così il loro valore nutrizionale.

- Spezie, erbe aromatiche, aglio e cipolle sono un buon modo per introdurre una varietà di sapori e appetibilità ai piatti e consentire una riduzione dell'uso di sale, poiché il sale è uno dei principali fattori che contribuiscono allo sviluppo dell'ipertensione tra gli individui predisposti. Le erbe e le spezie sono buone fonti di micronutrienti e composti antiossidanti e contribuiscono anche all'identità regionale dei piatti mediterranei.
- Nel rispetto delle convinzioni religiose e sociali, nella MD è presente un consumo moderato di vino e di altre bevande fermentate durante i pasti (un bicchiere al giorno per le donne e due bicchieri al giorno per gli uomini, come riferimento generico).
- Consumo di proteine di origine animale:
 - Pesce e crostacei (due o più porzioni settimanali), carne bianca (due porzioni settimanali) e uova (da due a quattro porzioni settimanali) sono buone fonti di proteine animali. Il pesce, la carne bianca (pollame, tacchino, coniglio, ecc.) e le uova forniscono proteine di alta qualità. Il pesce e i crostacei sono una buona fonte di proteine e

lipidi sani. Si consiglia un consumo vario (di pesce azzurro, pesce magro e crostacei). È stato riportato che il consumo di pesce (in particolare quelli ricchi di lipidi) e di crostacei riduce il rischio di malattie cardiovascolari (CVD) ed ha proprietà antinfiammatorie grazie al loro contenuto di PUFA n-3 a catena lunga. Anche la carne bianca è una buona fonte di proteine magre senza gli alti livelli di grassi saturi presenti in alcuni tagli di carne rossa.

- Il consumo di carne rossa (meno di due porzioni a settimana, preferibilmente tagli magri) e di carni lavorate (meno di una porzione) dovrebbe essere modesto sia in quantità che in frequenza, poiché l'assunzione di tali carni è stata costantemente associata ad alcune malattie croniche, tumori e CVD.
- La combinazione di legumi (più di due porzioni a settimana) e cereali è una sana fonte di proteine vegetali e lipidi che dovrebbe essere considerata come un'alternativa alla carne.
- Anche le patate sono incluse nel livello settimanale (tre o meno porzioni a settimana, preferibilmente fresche), poiché fanno parte di molte ricette tradizionali con carne e pesce. Dovrebbero essere consumate con moderazione in quanto hanno un alto indice glicemico.
- Nel vertice superiore della piramide ci sono gli alimenti ricchi di zuccheri e grassi non salutari (dolci). Lo zucchero, le caramelle, i succhi di frutta zuccherati e le bevande analcoliche devono essere consumati

in piccole quantità e messi da parte per le occasioni speciali. Questi alimenti sono ad alta densità energetica e possono contribuire all'aumento di peso. Gli zuccheri semplici, che sono abbondanti in dolci, pasticcini, succhi di frutta e bevande analcoliche, sono stati associati a un aumento dell'insorgenza di carie.

- Alla base della piramide, e di fondamentale importanza, si trova l'aspetto sociale e lo stile di vita salutare che deve comprendere adeguata attività fisica e distribuzione razionale delle porzioni alimentari. La pratica regolare di un'attività fisica moderata (almeno 30 minuti durante il giorno) funge da complemento di base alla dieta bilanciando l'apporto energetico, mantenendo un peso corporeo ottimale e fornendo molti altri benefici per la salute. Anche il riposo diurno e un adeguato sonno notturno fanno parte di uno stile di vita sano ed equilibrato. Evidenze scientifiche hanno dimostrato che un breve riposo dopo aver mangiato è un'abitudine mediterranea sana e tradizionale che aiuta a promuovere uno stile di vita equilibrato (Bach-Faig et al., 2011).

2 SCOPO DELLA TESI

Le ricerche scientifiche sono concordi nell'affermare che lo stile di vita, l'alimentazione e l'esercizio fisico sono tra i fattori più importanti per migliorare la qualità di vita dei pazienti con Sclerosi Multipla (SM). L'obiettivo di questa tesi è quello di verificare se un regime alimentare aderente alla Dieta Mediterranea (DM) possa produrre cambiamenti nello stato infiammatorio dei partecipanti affetti da SM. L'aderenza alla DM è stata verificata attraverso questionari autovalutativi; lo stato infiammatorio è stato controllato in tre tempi diversi: all'inizio dello studio (T0), dopo tre mesi (T1) e dopo sei mesi dal T1 (T2). Sono stati inoltre valutati nei tre periodi i dati clinici raccolti durante le visite neurologiche.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Partecipanti

Per questo studio sono stati reclutati 13 soggetti di controllo (7 donne e 6 uomini, età 25-36 anni, età media 29,69 anni) e 24 pazienti con Sclerosi Multipla Recidivante Remittente (SMRR, 16 donne e 8 uomini; 21-52 anni, età media 34,92 anni) del reparto “SOD, Clinica Neurologica” presso “Azienda Ospedaliero Universitaria delle Marche”. Tutti i pazienti seguono una Terapia (Disease-Modifying Therapies, DMT) con natalizumab (Tabella 1).

Tabella 1. Dati dei partecipanti allo studio.

SOGGETTI	ETA'	SESSO
Controlli		
C1	29	F
C2	36	M
C3	31	M
C4	30	F
C5	30	F
C6	29	F
C7	28	M
C8	26	F
C9	32	M
C10	25	F
C11	32	M
C12	26	F
C13	32	F
Pazienti		
P1	30	F
P2	34	F
P3	30	F
P4	52	F
P5	38	F
P6	36	F
P7	33	M
P8	38	M
P9	29	M
P10	21	M
P11	34	F
P12	49	M
P13	31	F
P14	31	F
P15	31	F
P16	36	F
P17	28	F
P18	21	M
P19	45	F
P20	50	F
P21	32	M
P22	40	F
P23	41	M
P24	28	F

Per ogni paziente reclutato è stato riportato il valore di “Expanded Disability Status Scale” (EDSS) nei tre tempi dello studio (Tabella 2).

Tabella 2. Valori di EDSS (Expanded Disability Status Scale) dei pazienti partecipanti allo studio.

SOGGETTI	EDSS (T0)	EDSS (T1)	EDSS (T2)
P1	1,5	1,5	1,5
P2	2	2	2
P3	1	1	1
P4	2	2	2
P5	1	1	1
P6	1	1	1
P7	1	1	1
P8	1,5	1,5	1,5
P9	1	1	1
P10	2	2	2
P11	2,5	2,5	2,5
P12	3,5	3,5	3,5
P13	2,5	2,5	2,5
P14	1,5	1,5	1,5
P15	2,5	2,5	2,5
P16	1	1	1
P17	1	1	1
P18	1	1	1
P19	1,5	1,5	1,5
P20	1,5	1,5	1,5
P21	1,5	1,5	1,5
P22	2	2	2
P23	1	1	1
P24	1	1	1

Tutti i pazienti reclutati avevano una scala di invalidità con valori compresi tra 1 e 3,5 (Tabella 2). Tali valori indicano una disabilità lieve e capacità di cammino autonomo con lievi deficit neurologici.

3.2 Questionario di aderenza alla Dieta Mediterranea

I soggetti di controllo ed i pazienti (che già seguivano la DMT) sono stati invitati a compilare il questionario di aderenza alla DM (Figura 7); nei pazienti la procedura è stata ripetuta in tre tempi diversi: all'inizio dello studio (T0), dopo tre mesi (T1), dopo sei mesi dal T1 (T2).

QUANTO SPESSO CONSUMA	FREQUENZA DI CONSUMO (PORZIONI/SETTIMANA O DIVERSAMENTE SCRITTO)						PUNTEGGIO TOTALE (a cura dell'operatore)
CEREALI Porzione: Pasta di semola = 80g Pasta all'uovo fresca = 100g Pasta all'uovo ripiena = 125g Biscotti, fette biscottate, cereali = 30g Pane = 50g	MAI	1-6	7-12	13-18	19-31	>32	
PATATE Porzione: Patate crude = 200g	MAI	1-4	5-8	9-12	13-18	>18	
FRUTTA Porzione: Frutta fresca = 150g Frutta secca = 30g	MAI	1-4	5-8	9-15	16-21	>22	
ORTAGGI/VERDURA Porzione: Insalata a foglia = 80g Verdure e ortaggi, crudi o cotti = 200g	MAI	1-6	7-12	13-18	19-31	>32	
LEGUMI Porzione: legumi secchi = 50g legumi freschi/cotti = 150g	MAI	<1	1-2	3-4	5-6	>6	
PESCE Porzione: Pesce fresco = 150g Pesce conservato (in scatola) = 50g	MAI	<1	1-2	3-4	5-6	>6	
CARNE ROSSA E DERIVATI Porzione: Carne rossa = 100g Carni conservate (insaccati) = 50g	≤1	2-3	4-5	6-7	8-10	≥11	
CARNE BIANCA Porzione: Pollo, tacchino, coniglio = 100g	≤3	4-5	6	7-8	9-10	≥11	
PRODOTTI LATTIERO-CASEARI Porzione: Latte e yogurt = 125g Formaggio fresco = 100g Formaggio stagionato = 50g	≤10	11-15	16-20	21-28	29-30	≥31	
UTILIZZO DELL'OLIO DI OLIVA (n° di volte/settimana) Porzione: Olio di oliva = 10ml	MAI	RARAMENTE	<1	1-3	4-5	GIORNALMENTE	
BEVANDE ALCOLICHE (vino/birra) (porzioni/giorno, mezzo bicchiere)	<3	3	4	5	6	>7 OPPURE 0	

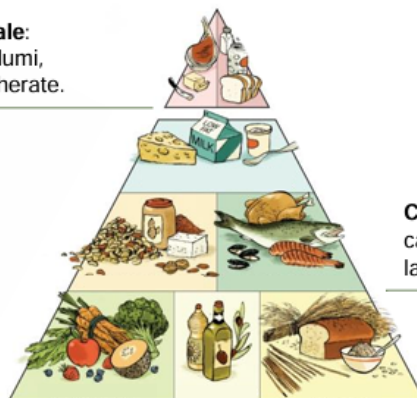
Figura 7. Questionari di aderenza alla Dieta Mediterranea somministrati ai soggetti di controllo ed ai pazienti nei tre periodi indicati. Non sono riportati i punteggi relativi al consumo delle varie categorie di alimenti (Panagiotakos et al., 2007).

È stato quindi consegnato ai pazienti un foglio con consigli nutrizionali riguardanti i fondamenti della DM (Figura 8).

CONSIGLI NUTRIZIONALI

Con che frequenza consumare gli alimenti :

Consumo occasionale:
carni rosse, burro, salumi,
dolci e bevande zuccherate.



Consumo settimanale:
carne bianca, uova, latte e
latticini.

Consumo quotidiano:
cereali integrali, verdura,
frutta, legumi e olio
extravergine d'oliva.

**Mantenere uno stile di
vita attivo.**



Bere tanta acqua.

Scegliere la varietà e la sostenibilità.

Cosa preferire:

- L'olio extravergine d'oliva al burro.



- La frutta e la verdura di stagione.



- Il pane e la pasta integrali.



Come iniziare bene la giornata:

Yogurt greco, macedonia di frutta fresca e
frutta secca.



Figura 8. Consigli alimentari sulla Dieta Mediterranea.

Per la valutazione dell'aderenza alla DM, è stato utilizzato il questionario con undici gruppi alimentari e valutato il punteggio "Med Diet Score".

Nella valutazione dei questionari, per ogni categoria di alimenti i punteggi vanno da 0 a 5 a seconda del consumo.

Per le categorie: cereali, patate, frutta, ortaggi/verdura, legumi, pesce ed utilizzo dell'olio di oliva, il punteggio più alto (5) si ottiene con una frequenza di consumo maggiore, il punteggio più basso (0) con una frequenza di consumo minore.

Per le categorie: carne rossa e derivati, carne bianca e prodotti lattiero-caseari il punteggio più alto (5) si ottiene con una frequenza di consumo minore, il punteggio più basso (0) con una frequenza di consumo maggiore.

La categoria che valuta il consumo di bevande alcoliche prevede un punteggio massimo (5) per chi ha una frequenza moderata di assunzione

ed un punteggio minimo (0) sia per chi ha un consumo eccessivo che per chi non consuma mai bevande alcoliche (Figura 9).

QUANTO SPESSO CONSUMA	FREQUENZA DI CONSUMO (PORZIONI/SETTIMANA O DIVERSAMENTE SCRITTO)						PUNTEGGIO TOTALE (a cura dell'operatore)
CEREALI Porzione: Pasta di semola = 80g Pasta all'uovo fresca = 100g Pasta all'uovo ripiena = 125g Biscotti, fette biscottate, cereali = 30g Pane = 50g	MAI 0	1-6 1	7-12 2	13-18 3	19-31 4	>32 5	
PATATE Porzione: Patate crude= 200g	MAI 0	1-4 1	5-8 2	9-12 3	13-18 4	>18 5	
FRUTTA Porzione: Frutta fresca= 150g Frutta secca = 30g	MAI 0	1-4 1	5-8 2	9-15 3	16-21 4	>22 5	
ORTAGGI/VERDURA Porzione: Insalata a foglia = 80g Verdure e ortaggi crudi o cotti = 200g	MAI 0	1-6 1	7-12 2	13-18 3	19-31 4	>32 5	
LEGUMI Porzione: legumi secchi = 50g legumi freschi/cotti = 150g	MAI 0	<1 1	1-2 2	3-4 3	5-6 4	>6 5	
PESCE Porzione: Pesce fresco = 150g Pesce conservato (in scatola) = 50g	MAI 0	<1 1	1-2 2	3-4 3	5-6 4	>6 5	
CARNE ROSSA E DERIVATI Porzione: Carne rossa = 100g Carni conservate (insaccati) = 50g	≤1 5	2-3 4	4-5 3	6-7 2	8-10 1	≥11 0	
CARNE BIANCA Porzione: Pollo, tacchino, coniglio = 100g	≤3 5	4-5 4	6 3	7-8 2	9-10 1	≥11 0	
PRODOTTI LATTIERO-CASEARI Porzione: Latte e yogurt=125g Formaggio fresco=100g Formaggio stagionato=50g	≤10 5	11-15 4	16-20 3	21-28 2	29-30 1	≥31 0	
UTILIZZO DELL'OLIO DI OLIVA (n° di volte/settimana) Porzione: Olio di oliva = 10ml	MAI 0	RARAMENTE 1	<1 2	1-3 3	4-5 4	GIORNALMENTE 5	
BEVANDE ALCOLICHE (vino/birra) (porzioni/giorno, mezzo bicchiere)	<3 5	3 4	4 3	5 2	6 1	>7 OPPURE 0 0	

Figura 9. Questionari di aderenza alla Dieta Mediterranea in cui sono riportati i punteggi relativi al consumo delle varie categorie di alimenti (Panagiotakos et al., 2007).

La somma dei valori risultanti dalle undici categorie di alimenti è compresa tra 0 e 55 con un valore soglia di 27: valori maggiori o uguali a 27 indicano aderenza alla DM, valori minori di 27 indicano non aderenza alla DM (Tryfonos et al., 2024).

3.3 Analisi dei campioni ematici

Il prelievo di sangue venoso periferico è stato effettuato al T0, al T1 ed al T2 nei pazienti ed una sola volta nei controlli. È stato prelevato il sangue dopo 12 ore di digiuno ed immediatamente unito all'anticoagulante EDTA. Il sangue è stato poi centrifugato a 1000 x g per 15 minuti; il sovranatante è stato prelevato e conservato a -80°C , fino al suo utilizzo.

Dal plasma sono stati determinati il Contenuto Totale di Polifenoli (Total Phenolic Content, TPC), la capacità ossidativa (Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC), il Contenuto Totale di Flavonoidi (Total Flavonoids Content, TFC), e la concentrazione delle citochine IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-17A.

3.4 Determinazione del Contenuto Totale di Polifenoli (TPC)

Per la determinazione del TPC è stato utilizzato il metodo Folin-Ciocalteu. La determinazione del TPC è un metodo basato sulla reazione di trasferimento di singoli elettroni.

Il test di Folin-Ciocalteu è stato ampiamente utilizzato in studi clinici e nutrizionali per misurare il contenuto polifenolico totale in alimenti di origine vegetale e in campioni biologici. Questo test si basa sulla riduzione del reagente di Folin-Ciocalteu con composti fenolici in un

ambiente alcalino. Il reagente di Folin-Ciocalteu contiene un complesso di acido fosfomolibdico/fosfotungstico (di colore giallo) che vengono ridotti per ottenere un cromoforo di colore blu con il massimo assorbimento a 765 nm. L'acido gallico è lo standard di riferimento comunemente utilizzato ed i risultati del test del TPC sono solitamente espressi come milligrammi equivalenti di acido gallico su Litri (mgGAE/L). Il test Folin-Ciocalteu per la misurazione del TPC presenta numerosi vantaggi, tra cui semplicità e riproducibilità. Tuttavia, presenta anche alcuni svantaggi; innanzitutto, il test è sensibile al pH, alla temperatura e al tempo di reazione, ed è per questo che è necessario selezionare accuratamente lo stato di reazione per risultati coerenti e affidabili. In secondo luogo, la sovrastima del TPC è una delle principali preoccupazioni per il test Folin-Ciocalteu, a causa del contributo degli agenti riducenti non fenolici presenti nel sistema durante la riduzione del reagente Folin-Ciocalteu (Munteanu et al., 2021).

I campioni sono stati dapprima trattati per eliminare possibili interferenti da agenti riducenti (ammine aromatiche, alcuni amminoacidi, acido citrico, acido ascorbico o alte concentrazioni di zuccheri). In una provetta Eppendorf da 1,5mL sono stati messi 400 µL di campione e centrifugati a 12000 x g per 5 minuti. Successivamente sono stati prelevati 200µL di campione centrifugato e sono stati messi

in un'altra provetta Eppendorf da 1,5mL, alla quale sono stati aggiunti 400µL di acido metafosforico (MPA 2 mol/L, preparato in precedenza) ed i campioni sono stati incubati a temperatura ambiente per 15 minuti. È stata fatta un'ultima centrifugazione dei campioni a 3000 x g per 3 minuti ed è stato prelevato il sovrnatante per il test Folin-Ciocalteu.

Sono state preparate delle provette Eppendorf contenenti 40µL di PBS (Phosphate Buffered Saline) per il bianco, 40µL di acido gallico alle diverse concentrazioni per la curva standard, e 40µL di ciascun campione, alle quali sono stati aggiunti 300µL di reattivo di Folin-Ciocalteu diluito 1:2. Dopo 5 minuti è stato aggiunto Na₂CO₃ (al 20%). Le provette sono state poi incubate in bagno termostatico a 37° C per 40 minuti. Dopo centrifugazione per 5 minuti a 13000 x g, da ogni provetta sono stati prelevati per due volte 150µL di sovrnatante per allestire in duplice copia una piastra a 96 pozzetti. Infine, è stata letta l'assorbanza in uno spettrofotometro a 765nm (Sinergy™ HTX, BioTek).

3.5 Determinazione della capacità antiossidante (ORAC)

Il test ORAC è un metodo basato sulla reazione di trasferimento di atomi di idrogeno (HAT) e misura la capacità di scissione della reazione a catena dei radicali da parte degli antiossidanti attraverso il monitoraggio dell'inibizione dell'ossidazione del radicale perossilico. I

radicali perossilici sono caratterizzati come radicali liberi che predominano nell'ossidazione dei lipidi nei sistemi biologici e negli alimenti, in condizioni fisiologiche. Di conseguenza, i valori ORAC sono considerati biologicamente rilevanti e un punto di riferimento per l'efficienza antiossidante. I generatori di radicali perossilici comunemente utilizzati in questo test sono rappresentati da azo-composti, tra cui il 2,2'-azobis (2-amidinopropano) diidrocloreuro idrofilo (AAPH). Secondo questo test, il radicale perossilico emesso da un generatore reagisce con un campione fluorescente che porta alla perdita di fluorescenza, registrata su un fluorimetro. Il metodo utilizza la tecnica della misura dell'area sotto la curva in presenza e in assenza dell'antiossidante. Come composto di riferimento viene utilizzato un antiossidante standard, il Trolox (analogo idrosolubile della vitamina E), e i valori ORAC degli antiossidanti valutati sono descritti come equivalenti di Trolox. Il test ORAC descrive la capacità degli antiossidanti di produrre l'atomo di idrogeno. Il composto azoico AAPH è il generatore di radicali perossilici utilizzato nei sistemi idrofili, utilizzando come sonda fluorescente la fluoresceina. Questo test misura la degradazione ossidativa della fluoresceina, dopo l'aggiunta di AAPH. Gli azo-iniziatori producono radicali liberi tramite riscaldamento, che danneggia la molecola fluorescente, portando alla perdita di fluorescenza. Man mano che la degenerazione ossidativa

continua, l'intensità fluorescente diminuisce; l'intensità viene registrata ogni cinque minuti per tre ore dopo l'aggiunta dell'azo-iniziatore. Gli antiossidanti proteggono la molecola fluorescente dalla degenerazione ossidativa (Munteanu et al., 2021). I campioni di plasma sono stati diluiti 1:100 e ne sono stati utilizzati 25µL. È stata preparata la piastra con doppia copia di bianco, di ciascuna delle concentrazioni del Trolox (5µL, 25µL, 50µL, 100µL, 200µL, 300µL) e di ciascun campione. Dopo l'aggiunta di Fluoresceina, la piastra è stata incubata a 37° per 10 minuti e, successivamente, sono stati aggiunti in ogni pozzetto 25µL di soluzione AAPH. Allo spettrofotometro (Sinergy™ HTX, BioTek) è stata eseguita una cinetica di tre ore con letture ogni 5 minuti (lunghezza d'onda di eccitazione: $\lambda_{ex}458$, lunghezza d'onda di emissione: $\lambda_{em}530nm$).

3.6 Determinazione del Contenuto Totale di Flavonoidi (TFC)

Il TFC fornisce informazioni sulla capacità antiossidante di un campione basandosi esclusivamente sulla sua composizione di flavonoidi (un sottogruppo di composti fenolici). Il TFC viene saggiato utilizzando il metodo colorimetrico del cloruro di alluminio ($AlCl_3$). Il contenuto di flavonoidi può essere misurato come assorbanza ad uno spettro di luce visibile a 415 nm. Per ricavare un valore quantitativo dalle letture di assorbanza del test TFC, l'estrapolazione viene eseguita

utilizzando una curva standard di catechina. Di conseguenza, i risultati TFC sono espressi come milligrammi equivalenti di catechina su litro (mgCAE/L) (Onyekachukwu Asomadu et al., 2024).

In una piastra da 96 pozzetti sono stati aggiunti (in tripla copia): 20µL di Acqua Milli-Q per il bianco, 20µL di catechina per lo standard e 20µL di campione (diluiti 1:2).

Sono stati poi aggiunti, ad ogni pozzetto, 6µL di nitrito di sodio (NaNO_2) al 5% e la piastra è stata incubata per 10 min a temperatura ambiente. Successivamente sono stati aggiunti 6µL di AlCl_3 al 10% con incubazione di 10 min. Infine, dopo l'aggiunta di 80µL di NaOH al 4%, è seguita un'ultima incubazione di 15 minuti. Preparati tutti i pozzetti in triplice copia, è stata letta l'assorbanza a 415nm in uno spettrofotometro (Sinergy™ HTX, BioTek) e sono stati confrontati i risultati con la curva standard.

3.7 Determinazione quantitativa delle citochine

Le citochine sono proteine di segnalazione intercellulare rilasciate da un'ampia varietà di cellule e tessuti. Svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione della crescita e della proliferazione cellulare, nonché nella modulazione della risposta dell'ospite ad infezioni, lesioni e infiammazioni.

Per la determinazione quantitativa simultanea di più concentrazioni di citochine umane nel plasma è stato utilizzato il kit “Luminex® Performance Assay Human High Sensitivity Cytokine Premixed Kit B”. Questo kit permette di selezionare le citochine di interesse per lo studio e di creare piastre personalizzate per l’analisi. Le citochine scelte per lo studio sono: IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-17A.

Gli anticorpi specifici per ogni analita sono incorporati in microparticelle diluite, che una volta trasferite in piastra con i campioni, legano gli analiti di interesse permettendo la loro misurazione quantitativa.

Per la lettura è stato utilizzato Bio-Plex® e sono stati eseguiti i passaggi del produttore per la preparazione e la calibrazione dello strumento.

È stato utilizzato uno standard RD6-65 (per campioni di plasma) a diverse concentrazioni, come indicato dal produttore. Successivamente sono state preparati cocktail con microparticelle e cocktail di biotina-anticorpi diluiti. Il campione è stato diluito con rapporto 1:2 (80 μ L di campione in 80 μ L di diluente). È stata quindi preparata la piastra a 96 pozzetti con 100 μ L di standard e 100 μ L di campioni. Successivamente sono stati aggiunti in ogni pozzetto 25 μ L di microparticelle diluite; la piastra è stata incubata per tutta la notte, a temperatura ambiente, in un agitatore a 800rpm. Dopo l’incubazione sono stati eseguiti tre lavaggi con 100 μ L di tampone. Completati i lavaggi sono stati aggiunti 50 μ L di

cocktail di biotina-anticorpi diluiti in ciascun pozzetto. Sono stati eseguiti altri tre lavaggi, aggiunti 50 μ L di streptavidina-ficoeritrina (streptavidin-PE) in ciascun pozzetto ed è seguita l'incubazione a temperatura ambiente per 30 minuti, in un agitatore a 800rpm. Sono stati eseguiti altri tre lavaggi ed aggiunti, infine, 100 μ L di tampone di lavaggio in ciascun pozzetto per risospendere le microparticelle. Dopo un'incubazione di 2 minuti a temperatura ambiente, in uno shaker a 800rpm, è stata eseguita la lettura con Bio-Plex® (Luminex® FCSTM14).

3.8 Analisi statistica

Per l'analisi statistica è stato utilizzato il pacchetto statistico GraphPad Prism (V8.0.2). Per le variabili continue sono stati utilizzati il test U di Mann-Whitney, Wilcoxon test e il test Kruskal-Wallis per TPC, TFC, ORAC, IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-17A e per il punteggio di aderenza alla DM.

4 RISULTATI SPERIMENTALI

4.1 Dati clinici dei partecipanti

Inizialmente sono stati reclutati 24 pazienti con SM recidivante remittente (SMRR) in terapia con natalizumab (Tysabri). Tuttavia, i dati analizzati alla fine dello studio provengono da 18 pazienti, in quanto il paziente P4 ha cambiato terapia, il paziente P7 ha cambiato centro di riferimento, i pazienti P13, P16 e P24 non hanno completato lo studio per altri motivi, non specificati. Inoltre, nelle analisi statistiche e nei risultati è stato successivamente escluso il campione di plasma prelevato dal paziente P21 perché era visibilmente presente emolisi. I 18 pazienti, 11 femmine e 7 maschi (rapporto 1,6:1) sono risultati avere una media di 34,8 anni.

4.2 Aderenza alla Dieta Mediterranea

È stato fatto compilare il questionario di aderenza alla DM a tutti i partecipanti allo studio.

La somma dei punteggi del questionario e l'aderenza alla DM ottenuti dai controlli sono riportati nella Tabella 3, quelli dei pazienti nella Tabella 4.

Tabella 3. Risultati dei questionari di aderenza alla Dieta Mediterranea dei soggetti di controllo.

CONTROLLI	PUNTEGGI	ADERENZA
C1	36	SI
C2	31	SI
C3	29	SI
C4	31	SI
C5	32	SI
C6	33	SI
C7	34	SI
C8	41	SI
C9	30	SI
C10	34	SI
C11	41	SI
C12	29	SI
C13	38	SI

Tabella 4. Risultati dei questionari di aderenza alla Dieta Mediterranea ai tempi T0 (inizio studio), T1 (tre mesi dal T0), T2 (sei mesi dal T1).

SOGGETTI	PUNTEGGIO T0	ADERENZA T0	PUNTEGGIO T1	ADERENZA T1	PUNTEGGIO T2	ADERENZA T2
P1	27	SI	34	SI	27	SI
P2	37	SI	38	SI	33	SI
P3	35	SI	39	SI	38	SI
P4	0	NO	0	NO	0	NO
P5	29	SI	27	SI	33	SI
P6	24	NO	30	SI	21	NO
P7	0	NO	0	NO	0	NO
P8	26	NO	27	SI	29	SI
P9	32	SI	33	SI	27	SI
P10	35	SI	34	SI	38	SI
P11	32	SI	33	SI	32	SI
P12	35	SI	31	SI	29	SI
P13	32	SI	29	SI	30	SI
P14	39	SI	38	SI	38	SI
P15	40	SI	40	SI	37	SI
P16	33	SI	34	SI	0	NO
P17	36	SI	41	SI	40	SI
P18	30	SI	31	SI	34	SI
P19	35	SI	35	SI	35	SI
P20	31	SI	36	SI	33	SI
P21	32	SI	35	SI	32	SI
P22	30	SI	38	SI	35	SI
P23	31	SI	40	SI	40	SI
P24	44	SI	44	SI	0	NO

Il valore soglia per definire se i soggetti partecipanti aderiscono alla DM è di 27: un punteggio minore di 27 indica non aderenza alla DM, un punteggio uguale o maggiore di 27 indica aderenza alla DM.

Dai risultati emerge che 16 pazienti su 18 (88,9%), al T0 erano aderenti alla Dieta Mediterranea, con un punteggio medio di 32 ± 4 punti. Al T1, dopo tre mesi dall'inizio dello studio, tutti i pazienti hanno mostrato aderenza alla DM con un punteggio medio di 35 ± 4 punti. Al T2, dopo nove mesi dall'inizio dello studio, 17 pazienti su 18 (94,4%) hanno mostrato aderenza alla DM con un punteggio medio di $33 \pm 5,1$ punti.

I risultati evidenziano che i soggetti di controllo sono tutti aderenti alla DM con un punteggio medio di 34 ± 4 punti (Figura 10).

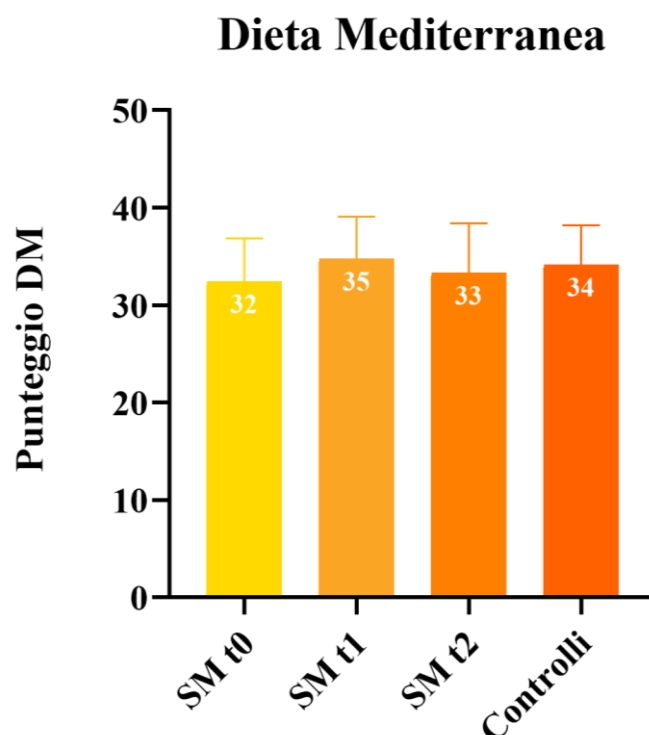


Figura 10. Analisi statistica dei punteggi di aderenza alla DM. In grafico sono riportati: i valori medi dei punteggi dei pazienti con SM al T0, al T1, al T2 ed i valori medi dei controlli. Le barre verticali sopra le colonne indicano le rispettive deviazioni standard.

Dal grafico riportato in Figura 10 emerge che il risultato dei punteggi dei questionari dei pazienti al T0 era più basso di 3 punti rispetto al T1, il punteggio al T1 era 2 punti più alto rispetto al T2 ed il punteggio in T0 era più basso di 1 punto rispetto al T2. Infine, i punteggi dei questionari dei controlli sono risultati più alti di 2 punti rispetto al T0, più bassi di 1 punto rispetto al T1 e più alti di 1 punto rispetto al T2. Nonostante ci siano queste differenze nei punteggi, nessuna variazione è risultata statisticamente significativa.

4.3 Determinazione degli antiossidanti plasmatici

Per ottenere le misurazioni ed i valori medi degli antiossidanti plasmatici sia dei controlli che dei pazienti, sono state utilizzate diverse metodiche. Nella Figura 11 sono riassunti i risultati ottenuti dal TPC (Figura 11a), ORAC (Figura 11b) e TFC (Figura 11c).

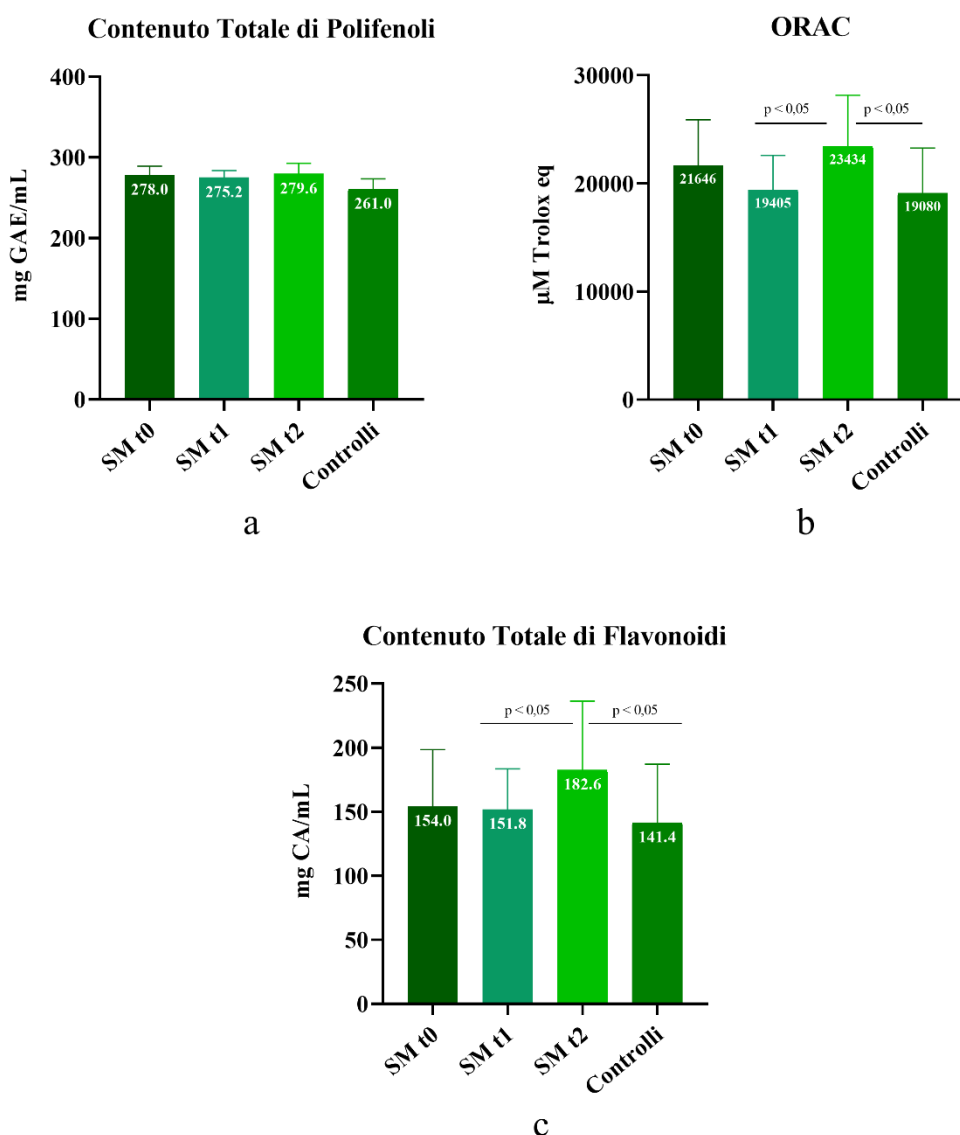


Figura 11. Analisi statistica dei valori medi di: Contenuto Totale di Polifenoli (a) misurato in milligrammi equivalenti di acido gallico su millilitri (mgGAE/mL); della capacità antiossidante misurata con il saggio ORAC (b) espressa in micromolare di Trolox equivalenti (μM Trolox eq); e del Contenuto Totale di Flavonoidi (c) espresso in milligrammi di catechina su mL (mgCA/mL). Nella figura sono riportati: i valori medi dei pazienti con SM al T0, al T1 ed al T2 ed i valori medi dei controlli. Le barre verticali sopra le colonne indicano le rispettive deviazioni standard. Le barre orizzontali indicano la significatività statistica ($p < 0,05$).

4.3.1 Contenuto Totale di Polifenoli (TPC)

La concentrazione media dei polifenoli (Figura 11a) è risultata di $278,0 \pm 11,0$ mgGAE/L nel T0, $275,2 \pm 8,4$ mgGAE/L nel T1, $279,6 \pm 13,0$ mgGAE/L al T2. Nei controlli la concentrazione media è di $261,0 \pm 12,4$ mgGAE/L. Si riscontra una diminuzione tra il T0 ed il T1, un aumento dei valori tra il T1 ed il T2 ed i valori dei controlli sono più bassi rispetto al T0 rispetto al T1 e rispetto al T2. Nonostante queste variazioni di valori medi, nessuna differenza tra i tre tempi e tra i controlli è risultata statisticamente significativa.

4.3.2 Capacità antiossidante totale (ORAC)

La capacità antiossidante media misurata (Figura 11b) è risultata pari a 21646 ± 4254 μ M Trolox Eq al T0, 19405 ± 3192 μ M Trolox Eq al T1, 23434 ± 4721 μ M Trolox Eq al T2. Per quanto riguarda i controlli la capacità antiossidante è risultata pari a 19080 ± 4184 μ M Trolox Eq.

C'è stato un aumento significativo dal T1 al T2 e tra il T2 ed i controlli ($p < 0,05$). Tra il T0 ed i controlli, tra il T1 ed i controlli e tra il T0 ed il T1 i valori diminuiscono ma questi non sono statisticamente significativi.

4.3.3 Contenuto Totale di Flavonoidi (TFC)

La concentrazione media dei flavonoidi plasmatici (Figura 11c) è risultata di $154,0 \pm 44,4$ mgCA/mL al T0, $151,8 \pm 31,6$ mgCA/mL al T1, $182,6 \pm 53,8$ mgCA/mL al T2. I valori risultanti dai controlli sono di $141,43 \pm 45,7$ mgCA/mL. Da questi valori è emerso che vi è una diminuzione di valori tra il T0 ed il T1 ed un innalzamento dei valori tra il T1 ed il T2. Inoltre, i controlli risultano avere valori più bassi rispetto a quelli dei pazienti, in tutti e tre i tempi analizzati. Nonostante questo, le differenze tra i valori riportati nei pazienti ai tempi T0 e T1 e tra quelli osservati nei pazienti al tempo T0 e nei controlli, non sono statisticamente significative. Le differenze tra i valori riportati nei pazienti ai tempi T1 e T2 e quelle tra i valori osservati nei pazienti al tempo T2 e nei controlli sono statisticamente significativi ($p < 0,05$).

4.4 Determinazione delle citochine

La quantità delle citochine plasmatiche è stata misurata con Bio-Plex® ed i risultati sono riportati nella Figura 12, per IFN- γ (Figura 12a), IL-1 β (Figura 12b), IL-6 (Figura 12c), IL-17A (Figura 12d).

4.4.1 Interferone-gamma (IFN- γ)

Dalla misurazione dei quantitativi medi di IFN- γ (Figura 12a) risulta che: al T0 i valori sono di $1,1 \pm 0,6$ pg/mL, al T1 di $0,9 \pm 0,4$ pg/mL, al T2 di $0,8 \pm 1,7$ pg/mL. Nei controlli il valore è di $0,6 \pm 0,4$ pg/mL e questo significa che è inferiore ai valori dei pazienti in tutti e tre i tempi dello studio. È stata riscontrata una diminuzione di valori tra il T0 ed il T1, tra il T1 ed il T2 e tra il T2 ed i controlli. Nonostante ci sia questa diminuzione sono risultate statisticamente significative ($p < 0,05$) solo le differenze tra il T0 ed i controlli e tra il T1 ed i controlli. Tra il T2 ed i controlli il valore è diminuito ma non con significatività statistica.

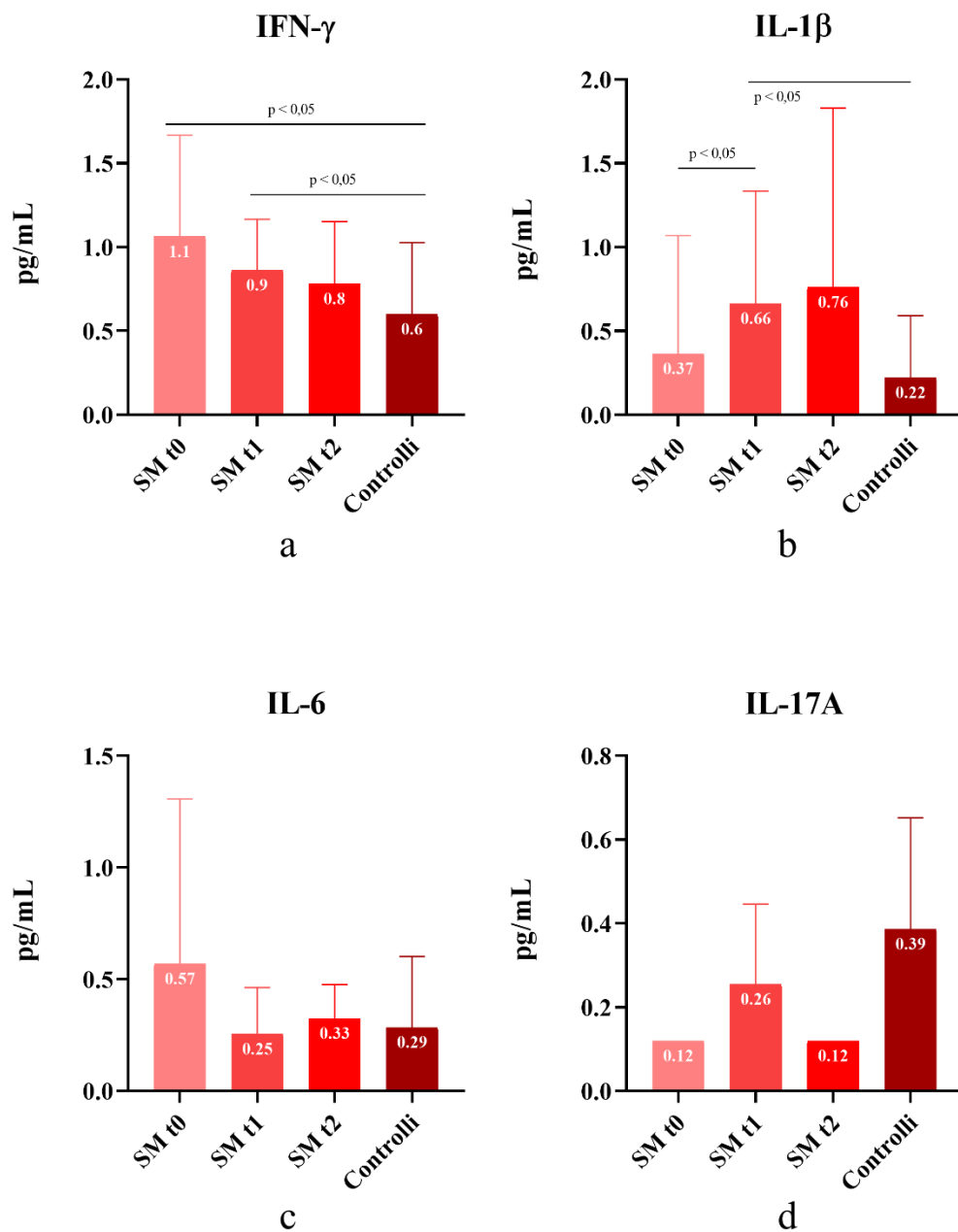


Figura 12. Analisi statistica dei valori medi di IFN- γ (a), di IL-1 β (b), di IL-6 (c) e di IL-17A (d) misurati in picogrammi su millilitri (pg/mL). Nella figura sono riportati: i valori medi dei pazienti con SM al T0, al T1 ed al T2 ed i valori medi dei controlli. Le barre verticali sopra le colonne indicano le rispettive deviazioni standard. Le barre orizzontali indicano la significatività statistica ($p < 0,05$).

4.4.2 Interleuchina-1beta (IL-1 β)

Per quanto riguarda la misurazione dell'IL-1 β (Figura 12b), è emerso che i valori medi sono: al T0 di $0,37 \pm 0,70$ pg/mL, al T1 di $0,66 \pm 0,67$ pg/mL, al T2 di $0,76 \pm 1,07$ pg/mL. I controlli esprimono valori medi di $0,22 \pm 0,37$ pg/mL. I valori medi dei pazienti sono risultati sempre maggiori rispetto ai controlli e sono aumentati tra il T0 ed il T1 e tra il T1 ed il T2. Le differenze statisticamente significative sono tra il T0 ed il T1 e tra il T1 ed i controlli.

4.4.3 Interleuchina-6 (IL-6)

I valori medi di IL-6 (Figura 12c) sono di $0,57 \pm 0,76$ pg/mL al T0, $0,25 \pm 0,21$ pg/mL al T1, $0,33 \pm 0,14$ pg/mL al T2 e di $0,29 \pm 0,32$ pg/mL nei controlli. Si nota una diminuzione dei valori tra il T0 ed il T1 ed un aumento dei valori tra il T1 ed il T2. I valori dei controlli sono più bassi rispetto al T0, e rispetto al T2 ma sono risultati più alti rispetto al T1. Nonostante le variazioni, nessuna differenza tra i gruppi risulta statisticamente significativa.

4.4.4 Interleuchina-17A (IL-17A)

I valori medi di IL-17A misurati (Figura 12d) sono stati di $0,12 \pm 0,00$ pg/mL al T0, di $0,26 \pm 0,19$ pg/mL al T1, di $0,12 \pm 0,00$ pg/mL al T2 e

di $0,39 \pm 0,27$ pg/mL nei controlli. Si nota un aumento di valori tra il T0 ed il T1 nei pazienti, una diminuzione tra il T1 ed il T2 e valori più alti nei controlli rispetto al T0, al T1 ed al T2. Nonostante le differenze tra il T0, il T1 ed il T2 e le differenze tra i controlli ed il T0, il T1 ed il T2, nessuna variazione è risultata statisticamente significativa.

5 DISCUSSIONE

Studi recenti indicano che la dieta può influenzare in modo significativo l'insorgenza e la progressione della SM. In relazione a questo, la DM è uno dei modelli alimentari più studiati e conosciuti al mondo ed è stata associata ad una vasta gamma di benefici per la salute. Per questo è stata valutata l'aderenza alla DM in pazienti con SM ed in un gruppo di soggetti sani di controllo. Dai nostri risultati è emerso che l'aderenza alla DM nei pazienti non presenta differenze statisticamente significative nei tre periodi considerati (T0, T1 e T2), e la media risultante sia nei pazienti che nei controlli è superiore al valore soglia di 27 punti. Tuttavia, è da notare l'andamento delle medie in quanto, tra il T0 ed il T2, l'aderenza media aumenta di 1 punto ed i controlli hanno ottenuto un punteggio medio inferiore ai pazienti solo se confrontato al T1. Inoltre, il paziente P8 ha mostrato un miglioramento nell'aderenza alla DM in quanto al T0 era risultato non aderente con un punteggio di 26 punti, al T1 è risultato aderente con un punteggio di 27 punti, mentre al T2 è risultato migliorato totalizzando 29 punti. Questi risultati ci indicano che i pazienti con SM che hanno partecipato allo studio, sono particolarmente attenti nelle scelte alimentari ed adottano uno stile di vita sano. Questo potrebbe essere associato sia all'attenzione dei pazienti verso la malattia che ai consigli sulla DM forniti ai pazienti all'inizio dello studio.

Alcuni degli effetti della DM descritti in letteratura sono stati osservati in diverse condizioni patologiche in cui è stato adottato questo regime alimentare, come la riduzione dello stress ossidativo e dell'infiammazione cronica, principalmente attribuibili a componenti antiossidanti bioattivi degli alimenti che fanno parte della DM (Dominguez, 2021). Una dieta ricca di verdura, frutta e legumi come la DM è correlata a un minor rischio di malattie croniche poiché fornisce composti antiossidanti, come la vitamina C, la vitamina E, i carotenoidi ed i composti fenolici. Secondo la letteratura, uno stile di vita con aderenza alla DM porta ad un miglioramento della capacità antiossidante misurata con il test ORAC (González et al., 2019). Lo stress ossidativo e l'infiammazione sono fattori ben consolidati nella patogenesi della SM e possono avere un impatto importante nel peggioramento cognitivo e nella qualità di vita dei pazienti (Daneshvar et al. 2024).

In questo lavoro di tesi, la capacità antiossidante del plasma è stata valutata attraverso il test ORAC nei tre tempi, per verificare l'andamento delle medie dei valori osservati nei pazienti, in associazione alla DM. Dalle misurazioni è emerso che l'andamento della capacità antiossidante ha subito una leggera diminuzione tra il T0 ed il T1 senza significatività statistica. Confrontando invece i valori dei pazienti tra il T1 ed il T2 (dopo sei mesi dal T1), si nota un aumento

della capacità antiossidante statisticamente significativo ($p < 0,05$). Anche tra il T2 ed i controlli vi è una differenza statisticamente significativa, con un valore medio maggiore nei pazienti. Considerando però che l'aderenza alla DM dei pazienti non è cambiata in modo significativo nei tre tempi, non possiamo identificare la DM come unico elemento utile a determinare un aumento della capacità antiossidante. Tuttavia, i pazienti sono rimasti aderenti alla DM per tutto il tempo dello studio e questo potrebbe far ipotizzare che è necessario un tempo prolungato per vedere gli effetti della DM. Inoltre, i pazienti seguono la DMT, che agisce sull'infiammazione; questo effetto potrebbe portare ad un miglioramento dei valori della capacità antiossidante, visto che infiammazione e stress ossidativo sono correlati.

Altri componenti della DM che apportano benefici ai pazienti con SM sono i flavonoidi poiché attenuano la gravità clinica della SM ed inibiscono l'attivazione microgliale. È stato inoltre dimostrato che alcuni flavonoidi sopprimono la produzione di mediatori infiammatori come l'ossido nitrico, il fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α), IL-6 e IL-1 β . Anche i polifenoli hanno dimostrato un effetto benefico riducendo la perdita di mielina e il danno assonale. Alcuni polifenoli hanno anche diminuito la produzione di mediatori infiammatori, come TNF- α , IL-6, IL10 e IL-17A (Yuan et al., 2023).

In relazione a questi risultati è stato approfondito l'andamento della concentrazione di polifenoli e di flavonoidi nel plasma di pazienti affetti da SM. I valori medi del contenuto di polifenoli erano simili in tutti i gruppi e il confronto tra i tre tempi dello studio ed il confronto con i controlli non è risultato statisticamente significativo.

Analizzando invece il contenuto totale di flavonoidi, si nota una diminuzione dei valori medi dal T0 al T1 ed un aumento dei valori da T1 a T2. Inoltre, vi è una differenza tra i valori medi del contenuto totale di flavonoidi tra il T2 ed i controlli.

I valori sono risultati statisticamente significativi tra il T1 ed il T2 e tra il T2 ed i controlli ma non statisticamente significativi tra T0 e T1.

Alla luce di questo, analizzando l'aderenza alla DM si nota che, pur essendo simili tra loro, i punteggi medi dei questionari variano nei tre tempi. In particolar modo, al tempo T0 i pazienti hanno ottenuto un punteggio medio di 32 punti, al T1 un punteggio medio di 35 punti, al T2 un punteggio medio di 33 punti. Se si confrontano tali punteggi con i risultati del contenuto totale di flavonoidi plasmatici, si osserva che il contenuto di flavonoidi ha un andamento non perfettamente sovrapponibile a quello dell'aderenza alla DM. Se si considera che tra il T0 ed il T1 le variazioni dei valori del contenuto totale di flavonoidi non sono statisticamente significative, mentre lo sono tra il T1 e il T2 ($p < 0,05$), si possono evidenziare alcuni aspetti. Il punteggio di aderenza

alla DM, anche se subisce un aumento tra il T0 ed il T1 ed una diminuzione tra il T1 ed il T2, non ha significatività statistica. In ogni caso, tra il T0 ed il T2, quindi dopo nove mesi dall'inizio dello studio, i pazienti hanno mostrato un miglioramento dell'aderenza alla DM di 1 punto. Questo suggerisce che, nel lungo periodo (nove mesi), i pazienti hanno adottato uno stile di vita più vicino alla DM ma questo non giustifica statisticamente l'aumento del contenuto dei flavonoidi. Tuttavia, nonostante una minore aderenza alla DM tra T1 e T2, i livelli di flavonoidi sono aumentati significativamente in questo stesso periodo. Questo potrebbe indicare che i flavonoidi non dipendono direttamente dal punteggio di aderenza alla DM, ma da altri fattori:

- un aumento nel consumo specifico di alimenti ricchi di flavonoidi (ad es. tè, frutta, verdura, cacao) indipendentemente dal punteggio globale di aderenza alla DM;
- un possibile effetto metabolico ritardato, cioè un accumulo progressivo di flavonoidi nel tempo, indipendentemente dalle variazioni della dieta a breve termine;
- una diversa biodisponibilità o metabolismo nei pazienti con SM, che porta a una maggiore ritenzione o assorbimento nel tempo.

I controlli sono stati valutati una sola volta, per cui non sono disponibili dati sull'andamento nel tempo dei livelli di flavonoidi in relazione al regime alimentare. La differenza dei valori tra il T2 ed i controlli a

favore dei pazienti potrebbe essere correlata all'assunzione, da parte dei pazienti, di specifici integratori o alimenti ricchi di flavonoidi.

In letteratura c'è un interesse a comprendere il ruolo che possono svolgere le proteine infiammatorie nella SM. IL-6 è stata associata al processo infiammatorio nella SM ed è risultata presente nel siero dei pazienti con SM. È stato scoperto che le proteine infiammatorie, come IFN- γ , IL-17A, IL-1 β , sono presenti nelle lesioni della SM. Non ci sono tuttavia proteine la cui presenza sia accertata, e le informazioni sul ruolo che esse possano svolgere nella patogenesi della SM sono ancora limitate (Kiropoulos et al., 2024).

In questo lavoro di tesi, tenendo in considerazione la letteratura attualmente disponibile, è stata misurata la quantità di citochine presenti nel plasma di pazienti con SM. Dai risultati sperimentali è emerso che la media dei valori IFN- γ è più bassa nei controlli, rispetto ai valori riscontrati nei pazienti al tempo T0, T1 e T2. Le medie dei pazienti nei tre tempi, se confrontate tra loro, sono diminuite sia dal T0 al T1 che dal T1 al T2. I valori statisticamente significativi ($p < 0,05$) sono risultati: la differenza tra il T0 ed i controlli e tra il T1 ed i controlli. Tra T2 e controlli il risultato era simile; questo potrebbe indicare un miglioramento nel tempo nel caso dei pazienti. Considerando l'aderenza alla DM dei gruppi, si può affermare che un lungo periodo (9 mesi) ha portato ad un miglioramento dei valori da T0 a T2 anche se

questi non mostrano una significatività statistica. Tale risultato non può essere associato direttamente ed esclusivamente alla DM in quanto i pazienti seguono la DMT che influisce sull'infiammazione, e potrebbe essere quindi coinvolta nel miglioramento del valore di IFN- γ .

La valutazione della quantità di IL-1 β ha mostrato un andamento crescente nei pazienti, dal T0 al T1 e dal T1 al T2. I controlli hanno riportato valori più bassi rispetto a quelli misurati in tutti e tre i tempi indagati nei pazienti. Visto che i valori statisticamente significativi sono solo quelli tra il T0 ed il T1 e tra il T1 ed i controlli si possono fare delle considerazioni. L'aderenza alla DM nei tre tempi non mostra variazioni statisticamente significative, per cui non si può affermare che l'aumento dei valori nei pazienti sia associato al modello alimentare in questione, in quanto potrebbe essere associato alla malattia. In aggiunta a questo, i valori dei controlli sono risultati più bassi rispetto ai pazienti, il che potrebbe confermare l'ipotesi della correlazione tra SM e aumento di IL-1 β , indipendentemente dall'aderenza alla DM.

I valori misurati di IL-6 non sono risultati statisticamente significativi, anche se la riduzione dal T0 al T2 è da sottolineare. Essendo IL-6 una citochina principalmente infiammatoria, la sua riduzione potrebbe essere dovuta alla DMT seguita dai pazienti. Considerando che i pazienti sono risultati aderenti alla DM in tutti e tre i tempi dello studio, non si può escludere l'effetto di tale modello alimentare, che nel lungo

termine potrebbe coadiuvare l'effetto del farmaco. Tuttavia, queste ipotesi hanno bisogno di studi ulteriori per essere chiarite e maggiormente indagate.

È stata misurata anche l'IL-17A, una citochina infiammatoria, che non ha riportato valori statisticamente significativi. I valori medi sono risultati molto bassi, sia nei controlli che nei pazienti e questo potrebbe indicare che l'aderenza alla DM sia un fattore positivo. Nei pazienti, inoltre, i valori sono risultati più bassi rispetto ai controlli, in tutti i tempi considerati; tale osservazione suggerisce che la DMT potrebbe influenzare i valori dell'IL-17A.

Un aspetto importante da sottolineare è che il paziente P8 è risultato non aderente alla DM all'inizio dello studio (T0), ed aderente sia al T1 che al T2. Parallelamente, i valori delle citochine infiammatorie INF- γ e IL-1 β sono diminuiti, mentre IL-17A è risultata sempre bassa. Questi valori non possono confermare che la DM possa avere un ruolo principale in pazienti con SM, ma vanno notati per ricerche future.

Infine, dai referti delle visite neurologiche, è riportato che l'andamento dell'EDSS non ha mostrato cambiamenti in nessuno dei pazienti nei nove mesi dello studio.

6 CONCLUSIONE

L'eterogeneità della SM e la sua eziologia multifattoriale rendono difficile chiarire come la malattia possa essere curata e la qualità di vita (QoL) dei pazienti migliorata. Nell'ultimo decennio, sono stati sviluppati farmaci che riducono l'infiammazione e la progressione della SM.

La letteratura è concorde nell'affermare che uno stile di vita sano, che comprenda l'attività fisica, apporti benefici nei pazienti con SM in termini di ricadute e progressione della malattia.

In questo studio è stato indagato come la DM possa influenzare l'infiammazione in pazienti con SM. L'aderenza alla DM è stata misurata tramite questionari auto-valutativi, per cui le risposte dei partecipanti potrebbero non essere totalmente attendibili. Inoltre, tra i valori plasmatici misurati, sono state considerate anche citochine infiammatorie possibilmente coinvolte nei meccanismi d'azione delle DMTs.

In ogni caso, una terapia integrata che comprenda sia DMTs che uno stile di vita sano, e la collaborazione multidisciplinare tra figure specialistiche resta di centrale importanza nel migliorare la QoL nei pazienti con SM e diminuire il rischio di ricadute.

Questo lavoro è un'indagine preliminare, in cui è stato notato che l'aderenza alla DM potrebbe essere utile nell'affiancare le DMTs e

potrebbe avere un ruolo positivo nel controllo di alcuni fattori d'infiammazione.

7 BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

Abbasi H., Shakouri F., Mosaddeghi-Heris R., Gholipour-Khalili E., Jahanshahlou F., Sanaie S., Naseri A., Talebi M. 2023, *Mediterranean-like diets in multiple sclerosis: A systematic review*. *Revue Neurologique* 180 (2024) 1021-1030, <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2023.07.017>

Atlas of MSIF, <https://www.msif.org/resource/atlas-of-ms-2020/> 2020,

Bach-Faig A., Berry M. E., Lairon D., Reguant J., Trichopoulou A., Dernini S., Xavier Medina F., Battino M., Belahsen R., Miranda G., Serra-Majem L. 2011, *Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates*. *Public Health Nutrition*, 14(12A), 2274-2284, doi:10.1017/S1368980011002515)

Daneshvar S., Frounchi N., Moradi F., Seifimansour S., Rahmani M., Talebi M., Golshaniniya P., Sanaie S., Naseri A. 2024, *Association of serum levels of inflammation and oxidative stress markers with cognitive outcomes in multiple sclerosis; a systematic review*. *Journal of Clinical Neuroscience*, 132 (2025) 110290, <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2024.110990>

Dias-Carvalho A., Isabel Sá S., Carvalho F., Fernandes E., Costa V.M. 2023, *Inflammation as common link to progressive neurological diseases*. *Archives of Toxicology*, 98:55-119, <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03628-8>.

Dominguez L.J., Di Bella G., Veronese N., Barbagallo M. 2021, *Impact of Mediterranean Diet on Chronic Non-Communicable*

Diseases and Longevity. Nutrient, 13(6), 2028,
<https://doi.org/10.3390/nu13062028>

González C.M., Martínez L., Ros G., Nieto G. 2019, *Evaluation of nutritional profile and total antioxidant capacity of the Mediterranean diet of southern Spain*. Food Science Nutrition, 7:3853-3862, DOI: 10.1002/fsn3.1211

Kiropoulos L.A., Rozenblat V., Baes N. 2024, *Inflammatory proteins related to depression in multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis*. Brain Behavior & Immunity-Health, 43 (2025) 100939, <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2024.100939>

Kurowska A., Ziemichód W., Herbet M., Piątkowska-Chmiel I. 2023, *The Role of Diet as a Modulator of the Inflammatory Process in the Neurological Diseases*. Nutrients 2023, 15, 1436, <https://doi.org/10.3390/nu15061436>

Lee C.Y., Chan K.H. 2024, *Personalized Use of Disease-Modifying Therapies in Multiple Sclerosis*. Pharmaceutics, 16, 120, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16010120>

Luminex® Performance Assay Human High Sensitivity Cytokine Premixed Kit B Catalog Number FCSTM14

Munteanu I.G., Apetrei C. 2021, *Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review*. Int. J. of Mol. Sci., 22, 3380, <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>

Onyekachukwu Asomadu R., Prince Chidike Ezeorba T., Christian Ezike T., Obiorah Uzoechina J. 2024, *Exploring the antioxidant potential of endophytic fungi: a review on methods for extraction and quantification of total antioxidant capacity (TAC)*. 3 Biotech (2024) 14:127, <https://doi.org/10.1007/s13205-024-03970-3>

Panagiotakos D., Pitsavos C., Arvaniti F., Stefanadis C. 2007, *Adherence to the Mediterranean food pattern predicts the prevalence of hypertension, hypercholesterolemia, diabetes and obesity, among healthy adults; the accuracy of the MedDietScore*. Preventive Medicine 44, 335-340, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ypmed.2006.12.009>

Papiri G., D'Andreamatteo G., Cacchiò G., Alia S., Silvestrini M., Paci C., Luzzi S., Vignini A. 2023, *Multiple Sclerosis: Inflammatory and Neuroglial Aspects*. Curr. Issues Mol. Biol., 45, 1443–1470, <https://doi.org/10.3390/cimb45020094>.

Tryfonos C., Chrysafi M., Papadopoulou S.K., Vadikolias K., Spanoudaki M., Mentzelou M., Fotiou D., Pavlidou E., Gkouvas G., Vorvolakos T., Michailidis A., Bisbinas A., Alexatou O., Giaginis C. 2024, *Association of Mediterranean diet adherence with disease progression, quality of life and physical activity, sociodemographic and anthropometric parameters, and serum biomarkers in community-dwelling older adults with multiple sclerosis:*

a cross-sectional study. Aging Clinical and Experimental Research (2024) 36:73, <https://doi.org/10.1007/s40520-024-02712-y>

World Health Organization, who.int.

Yuan J., Tao Y., Wang M., Huang F., Wu X. 2023, *Natural compounds as potential therapeutic candidates for multiple sclerosis: Emerging preclinical evidence*. Phytomedicine 123(2024) 155248, <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2023.155248>

8 RINGRAZIAMENTI

Giunto al termine di questo percorso, desidero ringraziare tutte le persone che mi hanno permesso di concretizzare il progetto di tesi. Inizio dalla mia relatrice, la Prof.ssa Mara Fabri, che ringrazio per avermi aiutato e per avermi dato l'opportunità di approfondire un tema a me molto caro. Ringrazio la correlatrice, Prof.ssa Arianna Vignini, che ha fatto da cardine per arrivare alla realizzazione di questo lavoro. Un grande ringraziamento va anche alla correlatrice Dott.ssa Valentina Membrino per avermi guidato, accompagnato ed insegnato tanto durante tutto il periodo di tesi. Desidero ringraziare anche la Dott.ssa Tiziana Di Crescenzo, il cui sostegno e collaborazione sono stati importanti nello sviluppo di questo progetto. Un ringraziamento speciale va a chi ha reso possibile la raccolta dati, a partire dal reparto "SOD, Clinica Neurologica" presso "Azienda Ospedaliero Universitaria delle Marche", in particolare alla Dott.ssa Ruja Taffi, alla Dott.ssa Ilaria De Santis ed a tutti gli infermieri e specializzandi. Ringrazio anche, per la disponibilità, l'aiuto e la collaborazione, la Dott.ssa Angelica Giuliani.

Ringrazio le persone a me più care a partire dalla mia compagna di vita Melissa, mia mamma Simona e mio fratello Giulio, che mi hanno supportato e spronato sempre ed hanno permesso che tutto ciò si realizzasse. Infine, un grazie ai miei colleghi di corso e a tutte le persone che hanno creduto e credono in me.