

## DISTAL TRANSCRIPTIONAL ACTIVATORS OF THE MYELIN BASIC PROTEIN GENE IN OLIGODENDROCYTES AND SCHWANN CELLS

A. Pizzagalli (a), C. Taveggia (a), E. Fagiani (a), M.L. Feltri (a), A. Peterson (b), A. Messing (c),  
L. Wrabetz (a)

(a) DIBIT, IRCCS San Raffaele, Milano

(b) Dept. Molecular Oncology, McGill University, Canada

(c) Dept. Pathobiological Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin, Madison, USA

Remyelination occurs after demyelinating insults to the brain and spinal cord in Multiple Sclerosis, but with repeated injury, the capacity of oligodendrocytes (OL) to remyelinate is exhausted. Remyelination is more effective in peripheral nerve than in the brain and spinal cord and in part this may reflect differences in the capacity of OL and Schwann cells (SC) to transcribe myelin genes in response to injury. Myelin basic protein (MBP) is synthesized by both OL in the brain and spinal cord and SC in the peripheral nerves, providing an opportunity to identify such differences. MBP synthesis is required for myelinogenesis, and presumably for remyelination in the brain. MBP expression is regulated primarily at the level of transcription. However, the nuclear proteins which activate MBP transcription remain largely unidentified.

We have previously shown that OL and SC use a different set of DNA binding sites and proteins to activate transcription from the proximal MBP promoter. Recently, we and others have identified activators upstream of the MBP gene that function in OL and SC in transgenic mice. Peterson and colleagues have identified a 588 nucleotide enhancer that lies 9.6 kilobases upstream of the mouse MBP gene, and is necessary to activate *lacZ* reporter gene expression in SC, whereas we and others have shown that much smaller portions of the proximal MBP promoter are sufficient to activate *lacZ* expression in OL. However, our study also demonstrated that other upstream elements are required for quantitative MBP transcription in the brain, although these elements have not been located.

To identify important distal enhancers of the MBP gene that act in OL and SC, we performed transient transfection analysis on a set of progressive deletions of the 9.6 kilobase mouse MBP promoter fused to the luciferase reporter gene. We found that 9.6 kilobases of MBP 5' flanking sequence was sufficient to activate luciferase activity 200-fold in cultured OL, 27-fold in cultured SC, but not in most other cells. Deletion analysis revealed that approximately 50 to 70% of this activation depended on sequences between 9.6 and 9.0 kb upstream of the MBP gene for both OL and SC. However, the 588 nucleotide region behaved as an enhancer only in SC. Thus, when fused in either orientation to either the proximal MBP promoter, or the heterologous TK promoter, this region did not augment the basal transcription rate of these promoters in OL, whereas when fused in either orientation to the heterologous myelin P0 or TK promoter, this region did activate both of these promoters 3-4 fold in SC. These data correspond nicely with transgenic mice of Peterson et al. in which the 588 nucleotide fragment fused in either orientation to the heterologous heat shock protein 68 promoter activated *lacZ* reporter gene expression only in SC in nerve, but not in OL in the brain. We conclude that the 588 nucleotide sequence is an important transcriptional activator of MBP that is cell-specific to OL and SC, but behaves as an enhancer only in SC. In addition, our transfection analyses in cultured OL and SC are validated by the behaviour of this region in transgenic mice, but provide a more convenient and rapid model in which to perform mutagenesis analysis of activator function.

To confirm that this region could behave as an enhancer with a heterologous myelin promoter in transgenic mice, we first characterized the basal myelin P0 transgene, mP0TOT using *lacZ* as a reporter gene, and showed that its expression is appropriately directed to myelin-forming SC in developing peripheral nerve. At 5 days after birth (P5), expression was barely detected, whereas by P5 the 9.6 kilobase MBP promoter fragment from which the enhancer derives activates much higher levels of *lacZ* expression in transgenic mice. Thus, we have created lines of transgenic mice with the 588 nucleotide fragment fused upstream of mP0TOT. Offspring are being analyzed for *lacZ* expression in nerve during the first two weeks after birth as compared to lines of mP0TOT mice. These experiments will determine if the enhancer contains DNA elements that could coordinately enhance expression of different myelin genes.

Sequence analysis of the 588 nucleotide SC enhancer produced a large set of candidate binding sites associated with known transcription factors. Electrophoretic mobility shift assay showed that nuclear proteins from brain and SC bound sequences in this 588 nucleotide region, although the pattern of binding was cell-specific. Thus, we have mapped the complete 588 nucleotide enhancer with DNase I footprint analysis and restricted the candidate binding sites to two subsets: those that are footprinted only by SC, but not by brain or liver nuclear extracts; and those that are footprinted only by brain, but not by SC or liver nuclear extracts. The differential binding of sequences within the 588 nucleotide region by proteins from SC and OL is consistent with the differential function we found by transient transfection analysis. Computer analysis of these sequences has revealed several intriguing candidate transcription factors; one of these has already been hypothesized to play a role in activating myelination, and is pharmacologically accessible. These candidates are now being identified by EMSA supershift analysis using specific antibodies.

Thus, we have developed valid, useful models of the function of distal activators of the MBP gene, both *in vitro* and *in vivo*. Preliminary analysis in these systems demonstrates that the 588 nucleotide region is an activator of MBP transcription in both OL and SC, but an enhancer only in SC, and as an enhancer may function with heterologous promoters, including heterologous myelin gene promoters. Biochemical analysis confirms this functional difference between OL and SC, as the candidate sequences bound by transcription factors differ between the two cell types. Our characterization of these candidate transcription factors will provide pharmacological targets to improve remyelination as a complementary strategy to preventing further inflammatory damage after initial demyelination in Multiple Sclerosis.

**RIASSUNTI / ABSTRACTS**

**SOTTOPROGETTO / SUBPROJECT**

**STUDI CLINICI, EPIDEMIOLOGICI E ASSISTENZIALI / CLINICAL,  
EPIDEMIOLOGICAL AND ASSISTENCE STUDIES**

**VALUTAZIONE CON RISONANZA MAGNETICA DELL'ATTIVITÀ DELL'AZATIOPRINA SULLE LESIONI ENCEFALICHE DI SCLEROSI MULTIPLA RECIDIVANTE-REMITTENTE**

L. Massacesi (a), A. Parigi (a), A. Barillaro (a), G. Pellicanò (b), M. Cellerini (b), A. Konze(b), G. Siracusa (a), R. Taiuti(a), M.P. Sormani (c,d), M. Filippi (c), L. Amaducci (a)

(a) Dipartimento di Scienze Neurologiche e Psichiatriche Università degli studi, Firenze

(b) Dipartimento di Fisiopatologia Clinica ,Università degli studi, Firenze

(c) Istituto Nazionale Tumori, Genova,

(d) Dipartimento di Neurologia, Istituto Scientifico S.Raffaele, Milano

Al fine di valutare l'attività del farmaco Azatioprina (AZA) sulle lesioni cerebrali, 14 pazienti con una diagnosi di Sclerosi Multipla (SM) recidivante-remittente sono stati inclusi in uno studio con risonanza magnetica RM, nel quale è stato confrontato "in aperto" un periodo di trattamento e un periodo di controllo pre-trattamento di sei mesi. Ogni paziente incluso (10 femmine e 4 maschi, età media  $31 \pm 8$  anni, EDSS meda all'ingresso: 1.9) mostrava almeno tre lesioni captanti gadolinio (gad), nel periodo di osservazione pre-trattamento. La riduzione del numero totale di lesioni captanti gad è stata scelta come "end-point" primario dello studio. Le modificazioni del volume totale delle lesioni captanti gad, il numero ed il volume delle nuove lesioni captanti gad, il numero ed il volume delle nuove lesioni valutate il T2, sono state scelte come end-point secondari. Sono stati inoltre valutati il numero dei leucociti/linfociti, gli effetti collaterali, l'invalidità neurologica ed il numero di ricadute cliniche. Finora hanno concluso lo studio 12 pazienti, mentre altri due finiranno entro 3 mesi. Nessun paziente si è ritirato dallo studio durante il periodo di terapia. I pazienti inclusi hanno ricevuto una dose media di  $2,7 \pm 0,29$  mg/kg/die di AZA. Questo dosaggio ha ridotto il numero dei linfociti circolanti a un valore medio di  $1350 \pm 330$  (57% del valore basale medio). Durante il periodo di osservazione pre-terapie sono state osservate in totale due ricadute cliniche; una ricaduta è stata osservata durante il periodo di trattamento. Il punteggio medio di Expanded Disability Status scale è rimasto stabile durante lo studio. La riduzione osservata durante il trattamento rispetto al periodo pre-terapia nel numero totale di lesioni captanti gad è stata del 62% ( $p= 0,01$ , test dei ranghi di Wilcoxon per campioni appaiati). La riduzione osservata nel volume totale delle lesioni captanti gadolinio è stata del 64% ( $p= 0,01$ , test dei ranghi di Wilcoxon per campioni appaiati). Il numero ed il volume delle nuove lesioni captanti il gad si sono ridotti del 63% e del 61% rispettivamente ( $p= 0,01$ , test dei ranghi di Wilcoxon per campioni appaiati). L'aumento del carico lesionale totale misurato in T2 (fFLAIR) è stato ridotto dell'84% durante il periodo di terapia ( $p= 0,01$ , test dei ranghi di Wilcoxon per campioni appaiati). Al fine di valutare la cinetica del farmaco nell'indurre l'effetto terapeutico, i suddetti parametri sono stati valutati anche durante il periodo di induzione della terapia. Il numero di lesioni/paziente/mese osservato dopo due mesi di terapia era sovrapponibile al numero osservato nel periodo pre-terapia; dopo tre mesi di terapia lo stesso parametro tendeva ad avvicinarsi ai valori medi osservati durante la terapia. Nel loro insieme questi dati indicano che l'AZA è un farmaco attivo nel ridurre le lesioni infiammatorie attive e l'accumulo di lesioni cerebrali in pazienti con SM, quando somministrato ad un dosaggio sufficiente a ridurre il numero di linfociti circolanti. Tuttavia occorre sottolineare che l'effetto terapeutico ha bisogno di almeno 4 mesi di somministrazione per manifestarsi. Inoltre questo studio indica che il trattamento è maneggevole e ben tollerato, anche quando vengono somministrate dosi relativamente alte di farmaco. L'effetto dell'AZA sui parametri di RM prescelti è equivalente a quello osservato in analoghe condizioni sperimentali, usando il farmaco immunomodulante Interferone(IFN) beta, approvato in Europa e negli USA specificamente per la terapia della SM. Poiché precedenti studi clinici indicano che l'AZA ha un'attività equivalente a quella osservata con IFN beta anche su parametri clinici, e poiché studi caso-controllo hanno dimostrato che questo farmaco non induce un aumento del rischio di sviluppare neoplasie se usato per meno di 10 anni, l'AZA dovrebbe essere nuovamente incluso tra i farmaci di prim' scelta per la terapia della SM recidivante-remittente.

## MRI EVALUATION OF THE ACTIVITY OF AZATHIOPRINE TREATMENT ON ENCEPHALIC LESIONS DUE TO RELAPSING REMITTING MULTIPLE SCLEROSIS

L. Massacesi (a), A. Parigi (a), A. Barillaro (a), G. Pellicanò (b), M. Cellerini (b), A. Konze(b), G. Siracusa (a), R. Taiuti(a), M.P. Sormani (c,d), M. Filippi (c), L. Amaducci (a)

(a) Dipartimento di Scienze Neurologiche e Psichiatriche Università degli studi, Firenze

(b) Dipartimento di Fisiopatologia Clinica ,Università degli studi, Firenze

(c) Istituto Nazionale Tumori, Genova

(d) Dipartimento di Neurologia, Istituto Scientifico S.Raffaele, Milano

In order to evaluate the activity of the drug Azathioprine (AZA) on brain lesions, 14 patients with a diagnosis of relapsing-remitting multiple sclerosis (MS) were included in an open-labelled treatment (6 months) versus baseline (6 months) designed MRI study. Each patient included (10 female and 4 males, mean age of 31+8, mean EDSS at entry of 1.9) showed at least three enhancing lesions within six monthly MRI scans. A second set of six monthly MRI scans were then carried out after 4 month of treatment with AZA. The reduction of the total number of gadolinium enhancing lesion was chosen as primary end point of the study. Change of total enhancing lesion volumes, of new enhancing lesion number and volumes, number and volume of new and enlarging lesion identified with T2-weighted acquisitions and change of total lesion load identified with T2 weighed acquisitions, were chosen as secondary end points. Leucocyte/lymphocyte number, compliance of the therapy, clinical relapses, and EDSS were also evaluated. Thus far, 12 patients have concluded the study whereas 2 more patients will end the study within 3 months. No patient dropped out the study during the treatment period. The patients received an average dose of  $2.7 \pm 0.29$  mg/kg/day Azathioprine. This dosage reduced the mean blood lymphocyte counts to  $1350 \pm 330$  (57% of the mean baseline counts). Two clinical relapses were observed during the run-in period, 1 during treatment. The mean Expanded Disability Status Scale score remained stable during the study. The reduction observed during the treatment in the total number of the gadolinium enhancing lesions was equal to the 62% of the run-in period ( $p= 0.01$ ; Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test). The reduction observed in the volume of the total gadolinium enhancing lesions was equal to 64% ( $p= 0.01$ ; Wilcoxon mached pairs signed-ranks test). The reduction observed in the number and in the volume of the new gadolinium enhancing lesions was equal to the 63% and 61% respectively ( $p=$  ; Wilcoxon mached pairs signed-ranks test ). The reduction observed in the change of total load of the hyperintense lesions evaluated with T2 weighted (fFlair) sequences was 84% ( $p= 0.01$ ; Wilcoxon mached pairs signed-ranks test). In order to assess the kinetic of the treatment activity the total number of the gadolinium enhancing brain lesions were evaluated also during the months of treatment induction. The mean lesion number/patient /month observed after two months of therapy during the treatment induction was in the same range as in the pre-treatment period; after three month of treatment the same parameters was closer to the mean values observed during the treatment period. Taken together, these data indicate that AZA is active in MS patients in decreasing inflammatory activity and accumulation of brain lesions, when administered at a dosage that decreases blood lymphocyte counts. However the treatment effect needs at least 4 months for complete expression. In addition, this study indicates that the treatment is easy to administer and safe, even if a relatively high dose is used. The effect of AZA a on MRI outcome measures was comparable to those ones observed under the same experimental condition, by using different forms of immunomodulating drug IFNbeta, approved in Europe and USA specifically for the treatment of MS. Since previous data indicated that AZA exerted an activity on clinical outcome measures equivalent to that one observed using IFN beta, and since case-control studies indicated the absence of risk in developing neoplasms when AZA was used for less than ten years, this drug should again be included among the first choice drugs for the treatment of RR MS.

## RUOLO DELLE CITOCHINE NELLA REGOLAZIONE DELL'ATTIVITA' DI MALATTIA: STUDIO LONGITUDINALE SUGLI EFFETTI DEL BOLO CORTISONICO VALUTATI CON RISONANZA MAGNETICA E RT-PCR QUANTITATIVA

A. Bertolotto (a), M. Capobianco (a), S. Malucchi (a), E. Milano (a), L. Audano(a), A. Castello(a), M. Bergui (b), G.B. Bradac (b), R. Mutani (a)

(a) Divisione Universitaria di Neurologia H.S. Luigi, Orbassano

(b) Cattedra Neuroradiologia, H Molinette, Università degli studi di Torino

**Razionale:** Il bolo steroideo ad alto dosaggio riduce la severità degli attacchi clinici e riduce drasticamente il numero di lesioni captanti gadolinio (Gd) alla TRM. Tuttavia, questo effetto è limitato nel tempo, poiché in poche settimane molti pazienti presentano nuove lesioni attive alla TRM, spesso seguite da attacco clinico. La ragione di tale fenomeno è sconosciuta. Le citochine e le molecole di adesione potrebbero, tuttavia, avere un ruolo importante in quanto i cortisonici sembrano modificare la trascrizione, la sintesi e il rilascio di queste molecole.

**Obiettivo:** L'obiettivo è di indagare se le modificazioni indotte dal bolo cortisonico sull'attività di malattia sono mediate da citochine e molecole di adesione.

**Pazienti e metodi:** nell'ultimo anno si è completato lo studio che ha coinvolto 22 pazienti (8 maschi e 14 femmine) per un totale di 29 boli.

**Risultati:** a) messa a punto della metodica RT-PCR per la quantivizzazione del mRNA di citochine (TNFalfa e TGFbeta1) utilizzando la co-applificazione di un competitore interno sia per un housekeeping gene (GAPDH) sia per le citochine. b) dimostrazione che il bolo cortisonico riduce drasticamente, ma temporaneamente il numero di lesioni captanti Gadolinio; c) la valutazione del livello di mRNA dei linfomonociti ematici di TNFalfa e TGFbeta1 prima durante e dopo il bolo ha dimostrato che la concentrazione del mRNA del TNFalfa è diminuita in modo significato per 4 settimane dal bolo ( $P = 0.003$ ), ma dopo un mese il livello del TNFalfa ritorna simile a quello precedente il bolo ( $P = 0.07$ ). Non abbiamo osservato alcuna modifica del livello del mRNA del TGFbeta1. d) Il bolo steroideo determina una diminuzione statisticamente significativa ( $P=0,012$ ; Mann-Whitney U test) di sICAM rispetto ai valori iniziali, passando da un valore mediano di 348 a 277ng/ml (variazione -20%). Tale variazione si mantiene, anche se di minore entità, al termine del bolo ( $P=0,051$ ).

### **Conclusioni:**

- 1) Il bolo cortisonico riduce drasticamente, ma transitoriamente il numero di lesioni Gd+ alla RMN.
- 2) Il bolo cortisonico NON modifica il livello di mRNA del TGF beta1 nei linfomonociti ematici e della sua proteina nel siero.
- 3) Il bolo cortisonico riduce in modo significativo sia il livello di mRNA del TNF alfa sia quello sierico della proteina TNF alfa.
- 4) Il bolo cortisonico riduce in modo significativo e prolungato il livello di sICAM.

I nostri dati suggeriscono che l'efficacia clinica e RMN del bolo cortisonico siano correlabili con la contemporanea transitoria riduzione del livello di mRNA del TNF alfa e della proteina sierica del TNF alfa e con la diminuzione del livello della molecola di adesione sICAM nel siero.

## ROLE OF CYTOKINES IN DISEASE ACTIVITY: LONGITUDINAL MRI AND QUANTITATIVE RT-PCR STUDY OF THE EFFECTS OF HIGH DOSE CORTICOSTEROIDS

A. Bertolotto (a), M. Capobianco (a), S. Malucchi (a), E. Milano (a), L. Audano(a), A. Castello(a), M. Bergui (b), G.B. Bradac (b), R. Mutani (a)

(a) Divisione Universitaria di Neurologia H.S. Luigi, Orbassano

(b) Cattedra Neuroradiologia, H Molinette, Università degli studi di Torino

**Background:** High dosage steroids treatment improves the recovery of acute relapses of MS patients and it can quickly and drastically reduce the number of gadolinium-enhanced lesions. Nevertheless these actions are time-limited, since 50% patients present a relapse of disease activity first at the MRI, then at the clinical examination, in a few weeks. Although the mechanism of action of steroids during the clinical attacks are unknown, its action trough the cytokines and the adhesion molecules is a valuable candidate.

**Aim:** The aim of the research is to investigate if the modifications on disease activity in MS that follow high dosage streroids treatment are mediated by cytokines and adhesion molecules.

**Patients and methods:** In the last year the study has been completed and it involved 22 MS patients that underwent to 29 high dosage steroid treatments.

**Results:** a) we set up a RT-PCR method for quantitation of mRNA of cytokines (TNF $\alpha$  and TGF $\beta$ ) using co-amplification with internal competitors for both the housekeeping gene GAPDH and cytokines). b) we confirmed that corticosteroids reduced sharply the number of Gd enhanced lesions, but this effect is time-limited. c) quantification of mRNA of TNF $\alpha$  and TGF $\beta$  1 in peripheral blood mononuclear cells showed that the level of TNF $\alpha$  mRNA is decreased during the treatment ( $P = 0.003$  vs pre-treatment) but the reduction last only one month, in fact in the second month after the steroid treatment the level of TNF $\alpha$  mRNA is similar to pre-treatment ( $P = 0.07$ ). The level of TGF $\beta$  1 is not modified by the treatment. d) The serum level of sICAM is significantly reduced by high dose steroid treatment ( $P=0,012$ ; Mann-Whitney U test).

### **Conclusions:**

- 1) High dose corticosteroids reduces the number of Gd enhaced lesions;
- 2) The treatment reduced the levels of mRNA of TNF $\alpha$  in mononuclear cell, whereas the level of mRNA TGF $\beta$  1 is not influenced;
- 3) The serum level of sICAM1 is reduced by high dose corticosteoids.

Both MRI and immunological effects are time limited, suggesting that clinical and MRI efficacy of corticosteroids can be due to a reduction of the level of inflammatory cytokines.

**TERAPIA ADIUVANTE CON *BACILLE CALMETTE GUERIN* (BCG) NELLA SCLEROSI MULTIPLA**

C. Buttinelli (a), M. Salvetti (a), G. Ristori (a), M.G. Buzzi (b), U. Sabatini (b), C. Colonnese (b), F. Viselli (b), C. Pozzilli (a), S. Ruggeri (b), L. Bozzao (b)

(a) Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università degli studi di Roma "La Sapienza"

(b) IRCCS Neuromed Pozzilli (IS)

Il presente studio ha esaminato per la prima volta nella sclerosi multipla (SM) l'effetto del vaccino con Bacillo di Calmette-Guerin (BCG) come immunomodulatore. In accordo con linee guida per trial clinici nella SM recentemente pubblicate, è stato effettuato uno studio single crossover valutato con risonanza magnetica (RM) su 14 pazienti con malattia remittente. Dopo il trattamento l'attività di malattia alla RM era significativamente ridotta. Non è stato riportato alcun effetto collaterale importante. La terapia adiuvante con BCG è sicura e appare essere efficace nel ridurre l'attività di malattia nella SM remittente.

## ADJUVANT THERAPY WITH *BACILLE CALMETTE GUERIN* (BCG) VACCINE IN MULTIPLE SCLEROSIS

C. Buttinelli (a), M. Salvetti (a), G. Ristori (a), M.G. Buzzi (b), U. Sabatini (b), C. Colonnese (b), F. Viselli (b), C. Pozzilli (a), S. Ruggeri (b), L. Bozzao (b)

(a) Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università degli studi di Roma "La Sapienza"

(b) IRCCS Neuromed Pozzilli (IS)

This is the first study investigating the effect of *Bacille Calmette-Guerin* (BCG) vaccine as an immunomodulator in multiple sclerosis (MS). According to the guidelines for clinical trials in MS, a single crossover, magnetic resonance imaging (MRI)-monitored trial was performed in 14 patients with relapsing-remitting MS. After treatment, MRI activity was significantly reduced. No major adverse effects were reported. Adjuvant therapy with BW vaccine is safe and appears to be effective in reducing disease activity in MS.

## INTERVENTO PSICOEDUCATIVO PER LE PERSONE AFFETTE DA SCLEROSI MULTIPLA

M. Casacchia (a), A. Carolei (b), R. Totaro (b), R. Roncone (a), C. Mela (a), A. Cialfi (b), M.E. Rotunno (a), E. Muliere (a), E. Chiaravalle (a), M. Matteucci (a), M. Cenci (a)

(a) Clinica Psichiatrica, Università degli studi di L'Aquila

(b) Clinica Neurologica, Università degli studi di L'Aquila

Scopo del nostro studio pilota era quello di sviluppare e valutare un intervento psicoeducazionale su soggetti affetti da SM con disabilità (EDSS>3) e sui loro familiari, che spesso assumono il ruolo di operatori 24 ore su 24, sostenendo un notevole carico assistenziale.

Nello studio sono state incluse 20 persone colpite da SM, 13 femmine (età media  $42.7 \pm 12.4$  anni), 7 maschi (età media  $43.8 \pm 11.4$  anni), con i loro familiari (16 coniugi, 8 figli, 3 genitori, 1 sorella, 1 fratello, 1 suocera). Dieci persone presentavano un punteggio superiore o uguale 5.5 e 10 inferiore a 5.5. La durata di malattia andava da 1 anno e 8 mesi a 31 anni.

Le persone sono state valutate relativamente a sintomi di distress (questionario sullo Stato di Salute SF-36, versione italiana, 1996), agli stress specifici causati dalla SM (MS Stressor Scale, Buelow, 1991), ai rapporti sociali ed agli interessi (I. S. S., 1993), al grado di soddisfazione sulla loro qualità di vita (I. S. S., 1993), alla personalità (Eysenck Personality Inventory, 1976), alla loro modalità di fronteggiamento dei problemi che la malattia comporta (Jalowiec Coping Scale, 1987). I familiari sono stati valutati nei seguenti aspetti: sintomi di distress (Scala degli Eventi Stressanti, Buelow, 1991), conoscenze sulla malattia "sclerosi multipla", modalità di fronteggiamento dei problemi che la malattia comporta (Jalowiec Coping Scale, 1987), carico assistenziale oggettivo e soggettivo (questionario sui Problemi Familiari, 1991). Tutti i partecipanti allo studio sono stati intervistati da valutatori "indipendenti", che non hanno effettuato l'intervento psicoeducazionale.

Le persone e i loro familiari sono stati inseriti in maniera randomizzata in due gruppi: intervento familiare psicoeducazionale vs. gestione individuale di routine del caso. L'intervento psicoeducazionale familiare condotto è stato basato su metodiche centrate sull'informazione, sul miglioramento delle abilità di comunicazione e di risoluzione dei problemi, sul mantenimento e sulla promozione delle abilità sociali. L'intervento strutturato, effettuato ambulatorialmente, ha previsto una fase di trattamento attivo della durata di due mesi con incontri settimanali condotti da operatori specificamente addestrati.

All'ingresso nello studio i punteggi di disabilità dei soggetti affetti riportati alla scala EDSS non correlavano con il punteggio totale della Scala degli Eventi Stressanti. La percezione di stress correleva positivamente con l'utilizzo dello "Stile Fatalista". Nei casi con disabilità maggiore si è riscontrata una efficacia ridotta delle strategie di coping legate allo "Stile di Confronto Attivo" ed allo "Stile Ottimista".

I familiari utilizzavano diverse modalità di fronteggiamento dei problemi rispetto alle persone con SM. Riferivano un minor beneficio nell'utilizzo dello "Stile Evasivo" ed un maggior beneficio quando affrontavano i problemi correlati alla malattia secondo uno "Stile Emotivo".

A distanza di un anno dal termine dello studio condotto, si è osservato che i familiari di persone con SM inseriti nel gruppo sperimentale hanno adottato strategie di fronteggiamento più funzionali rispetto al gruppo di controllo (Stile di "Far affidamento su se stessi" e Stile "Ottimista") ai fini della gestione dello stress conseguente al carico assistenziale. Il gruppo sperimentale ha mostrato inoltre una migliore conoscenza di malattia ed una discreta riduzione del carico assistenziale nei familiari (Roncone e coll., ECTRIM 1999).

## PSYCHOEDUCATION INTERVENTION IN FAMILIES OF PATIENTS AFFECTED BY MULTIPLE SCLEROSIS

M. Casacchia (a), A. Carolei (b), R. Totaro (b), R. Roncone (a), C. Mela (a), A. Cialfi (b), M.E. Rotunno (a), E. Muliere (a), E. Chiaravalle (a), M. Matteucci (a), M. Cenci (a)

(a) *Clinica Psichiatrica, Università degli studi di L'Aquila*

(b) *Clinica Neurologica, Università degli studi di L'Aquila*

The aim of our pilot study was the development and assessment of a psychoeducational intervention for patients affected by Multiple Sclerosis (EDSS >3) and their relatives, that can be considered as 24-hour "informal" care givers, since they often experience a severe burden of care.

Twenty patients, 13 females (mean age 42.7 s.d. 12.4) and 7 males (mean age 43.8 s.d. 11.4) and their relatives (16 partners, 6 daughters, 2 sons, 1 father, 2 mothers, 1 sister, 1 brother, 1 mother-in-law) were included in our controlled psychoeducational intervention study. Ten patients scored higher than 5.5 on Expanded Disability Status Scale (EDSS) and 10 patients scored lower than 5.5. The duration of the illness ranged from 1 year and 8 months to 31 years.

The patients were assessed on distress symptoms (MOS 36-item Short Form Health Survey, SF-36, Italian version, 1996), MS Stressor Scale (Buelow, 1991), social relationships and interests (I.S.S., 1993), satisfaction about their quality of life (I.S.S., 1993), and their personality (Eysenck Personality Inventory, 1976) by independent raters, not conducting the experimental intervention. The relatives assessment included distress symptoms, knowledge about multiple sclerosis (Interview developed by the authors), subjective and objective burden of care (questionnaire for Family Problems, 1991). The patients and their relatives were assessed also with the Jalowiec Coping Scale, JCS (Jalowiec, 1987), a 60-item scale assessing 8 coping styles toward problems caused by the disease, that our group translated and validated into Italian.

The patients and their families were allocated at random into two groups: family psychoeducational intervention vs. individual routine care. The family psychoeducational intervention was based on information sharing, improvement of communication skills, problem solving and social skills. The active structured treatment includes weekly sessions over a 2-month period, conducted by trained professionals.

At the study entry, SM patients' disability ratings on EDSS did not correlate with the total score of the Stressor Scale. The perception of stress was positively correlated to the use of a "Fatalist Style". The more disabled cases reported reduced efficacy of strategies associated with the "Active Confronting" and "Optimist" coping styles.

Relatives used different patterns of coping than the patients. They reported less benefit from using the "Evasive Style" and a greater benefit when they used the "Emotive Style" when coping with problems of MS.

At 1-year follow-up relatives assigned to the experimental group showed a statistically significant improvement in coping strategies with a increased utilisation of the "Self-Reliant" and "Optimistic" coping styles compared to the control group. The experimental group showed a better knowledge about the disease and a good reduction of burden of care in relatives.

**STUDI CASO-CONTROLLO SUI FATTORI DI RISCHIO ESOGENI DELLA SCLEROSI MULTIPLA IN DUE POPOLAZIONI ITALIANE DIVERSE SUL PIANO ETNICO-GENETICO E SOCIO-AMBIENTALE**

I. Casetta (a), E. Granieri (a), S.B. Murgia (b), A. Ticca (b), M. Pugliatti (c), G. Rosati (c)

(a) Sezione di Clinica Neurologica, Università degli studi, Ferrara

(b) Divisione Neurologica, Nuoro

(c) Clinica Neurologica, Università degli studi, Sassari

La eziologia della Sclerosi Multipla (SM) è tuttora ignota. L'insieme degli acquisiti scientifici fino ad ora disponibili sembra accreditare l'ipotesi di un ruolo eziologico di fattori ambientali operanti su di un terreno di predisposizione genetica. Gli studi epidemiologici condotti in Italia anche dal nostro gruppo di ricerca hanno documentato una sostanziale stabilità dei tassi di incidenza nell'Italia continentale ed un trend temporale che vede un incremento significativo del rischio di malattia in Sardegna soprattutto negli ultimi anni, con tassi di incidenza più alti rispetto a quelli rilevati in altre regioni Italiane. Il diverso substrato di predisposizione genetica alla malattia può essere invocato quale spiegazione almeno parziale del diverso rischio di malattia in Sardegna. Tuttavia, l'incremento della frequenza della SM rilevato in Sardegna avvalora l'ipotesi che fattori esogeni possano influenzare il rischio di malattia ed il trend temporale dello stesso. Sulla scorta di queste considerazioni è stato e stato pianificato uno studio epidemiologico analitico con approccio di tipo caso-controllo nell'ottica di confrontare, da un lato le esposizioni ambientali dei casi sardi con una popolazione di controllo appaiata per età, sesso e residenza, dall'altro le possibili differenze tra casi sardi e dell'Italia continentale. Sono stati inclusi nello studio solo soggetti con SM definita con esordio di malattia successivo al 1984. Sono stati identificati 314 pazienti eligibili (116 residenti nella provincia di Ferrara e 198 residenti in quella di Nuoro). I dati sono stati raccolti utilizzando un questionario somministrato ai casi ed ai controlli tramite intervista diretta. Sono stati intervistati 115 pazienti ferraresi e 87 casi appartenenti alla provincia di Nuoro. Sono stati altresì sottoposti ad intervista 89 controlli sani residenti in provincia di Nuoro. Per ogni variabile sono stati calcolati l'Odds Ratio e relativi Limiti Fiduciali al 95%.

L'analisi dei fattori demografici e socio-economici non ha dimostrato differenze statisticamente significative tra casi ferraresi e casi sardi né tra casi e controlli residenti nella provincia di Nuoro.

Parimenti non abbiamo rilevato differenze statisticamente significative tra i tre gruppi in esame confrontando variabili correlate all'ambiente di residenza, livello scolare e situazione occupazionale dei genitori, ordine di genitura, frequentazione di comunità infantili, contatto con animali domestici o da allevamento, esposizione continuativa a tossici ambientali, abitudini di vita. Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative per quanto attiene la frequenza di malattie infettive contratte nel periodo infanto-adolescenziale, le vaccinazioni ed immunoprofilassi, una anamnesi positiva per patologie disimmunitarie o allergiche, dismetaboliche o traumi rilevanti. L'età di acquisizione delle comuni malattie esantematiche dell'infanzia non è risultata significativamente diversa nei tre gruppi a confronto.

## CASE-CONTROL STUDIES ON EXOGENOUS RISK FACTORS FOR MULTIPLE SCLEROSIS IN TWO ITALIAN POPULATIONS DIFFERENT FROM A GENETIC AND SOCIO-ENVIRONMENTAL POINT OF VIEW.

I. Casetta (a), E. Granieri (a), S.B. Murgia (b), A. Ticca (b), M. Pugliatti (c), G. Rosati (c)

(a) Sezione di Clinica Neurologica, Università degli studi, Ferrara

(b) Divisione Neurologica, Nuoro

(c) Clinica Neurologica, Università degli studi, Sassari

Epidemiological descriptive studies on Multiple Sclerosis (MS) in Italy demonstrated that the frequency of the disease in Sardinia is significantly higher than in other part of Continental Italy and Sicily. Two concurrent descriptive studies carried out by our own research group using the same methodology, provided further confirmation to the above statement and proved that MS incidence was substantially stable over time in Ferrara and significantly increasing in the Nuoro province. The different substrate of genetic predisposition of Sardinians as compared to other Caucasian populations could partly account for the higher incidence rates in this island. However, the increasing temporal trend suggests that exogenous environmental factors could influence the disease risk and its trend in this area. The aim of this study is to make a thorough examination of the environmental risk factors in a population which has a high risk of disease, comparing previous exposures of the cases to those of a group of healthy controls belonging to the same ethnic and geographic area and comparing the cases from Sardinia to the cases from the province of Ferrara. With this aim, we adopted an analytical retrospective case-control design with two separate branches: comparison between Sardinian cases and Sardinian controls; comparison between Ferrarese cases and Sardinian cases.

According to the study protocol, we planned to include only cases with definite MS with onset in the last years (since 1985). In this way, we identified 314 eligible patients (116 from the Ferrara province and 198 from the Nuoro province). Matching variables were sex, age  $\pm$  3 and residence. We interviewed 115 cases from the province of Ferrara, and 87 cases from the province of Nuoro, as well as 89 health controls living in the Nuoro province. Data were collected using a standardized questionnaire administered to cases and controls through a face to face interview. The questionnaire was modeled after that prepared by the International Working Group on Multiple Sclerosis Epidemiology. Relative risk was estimated for each variable through calculation of the odds ratio. The 95% confidence intervals were also calculated.

The analysis of demographic and socioeconomic characteristics showed no significant differences between Ferrarese and Sardinian cases as well as between Sardinian cases and Sardinian controls.

The comparisons of the above mentioned groups did not allow to detect any significant difference regarding the following variables: variables related to residence (urban versus rural or farming areas), educational and occupational status of parents, birth order position, multiple moves, attendance to nursery schools or holiday camps, exposure to pets or other animals, and continuous exposure to toxic agents. Nor were significant differences observed for lifestyle variables such as smoking and drinking in adolescence.

Vaccinations or other immunizations against smallpox, diphtheria, tetanus, poliomyelitis, tuberculosis, typhoid, B-hepatitis, rubella, cholera, and others showed no significant differences among the considered groups. Childhood infections, with particular reference to viral diseases, were investigated taking age of occurrence into account. No associations were found for infections and age of occurrence. Analysis of history of allergic conditions, past traumas, metabolic or endocrine disorders gave also statistically non significant results.

## **DEFINIZIONE DEL VALORE DI ALCUNI OUTCOMES PARACLINICI NEL MONITORAGGIO DELLA STORIA NATURALE E DEGLI INTERVENTI TERAPEUTICI NELLA SCLEROSI MULTIPLA**

G. Comi, V. Martinelli, M. Filippi, M. Rovaris, L. Leocani, M. Falautano, S. Medaglini, B. Colombo, P. Rossi, F. Martinelli

*Centro Studi Sclerosi Multipla, IRCCS Osp. San Raffaele, Università degli studi di Milano, Milano*

Obiettivo di questo progetto di ricerca è stata la valutazione del valore di alcuni parametri di Risonanza Magnetica (RM) e di alcuni parametri elettrofisiologici, nel monitorare l'evoluzione naturale della Sclerosi Multipla (SM) e gli effetti degli interventi terapeutici. Sono stati studiati i seguenti aspetti della Sclerosi Multipla: 1) Correlati clinici, neurofisiologici e RM del decadimento cognitivo nella SM, che è un reperto di frequente riscontro in questa malattia 2) Follow up clinico, neurofisiologico e di RM nei pazienti con Sclerosi Multipla con differenti tipi di progressione della malattia.

1) Durante il primo anno di studio, abbiamo valutato le correlazioni fra deficit cognitivo ai tests neuropsicologici e tecniche di RM convenzionale e non convenzionale (T2/proton density – PD pesate, T1 pesate e magnetization transfer imaging – MTI) in 30 pazienti SM. I pazienti con deficit cognitivo frontale o mnestico presentavano un maggiore carico lesionale totale (TLL) PD ( $p=0.04$  e  $p=0.01$ ). I pazienti con deficit frontali avevano un maggiore carico lesionale frontale (FLL) PD ( $p=0.01$  e TLL a MTI ( $p=0.03$ ) e una MT ratio (MTR) inferiore ( $p=0.04$ ). Questi risultati mostrano che le misure di carico lesionale PD e MTI sono associate al deficit cognitivo in questi pazienti. Durante il secondo anno di studio abbiamo valutato la coerenza EEG, un indice delle connessioni cortico-corticali, in un sottogruppo di questi pazienti. La coerenza era ridotta nei pazienti con deficit cognitivo ed era inversamente correlata al carico lesionale sottocorticale, indicando che le lesioni immediatamente sottostanti la corteccia cerebrale sono le più importanti nel determinare il decadimento cognitivo nella SM. Inoltre abbiamo valutato nuove tecniche neurofisiologiche e di RM (dual echo, T1 e MT1) nello studio delle funzioni esecutive in uno studio caso-controllo su 11 pazienti SM con e 11 senza demenza frontale. I pazienti frontali presentavano un maggiore carico lesionale totale, frontale e sottocorticale T1 e T2, e riduzione di MTR ( $p<0.001$ ). Questi risultati mostrano che la demenza frontale nei pazienti SM è associata alla gravità delle alterazioni RM. I risultati MTR suggeriscono che alterazioni invisibili alle tecniche convenzionali siano importanti nel determinare i deficit cognitivi. Gli stessi pazienti sono stati sottoposti a valutazione EEG durante un paradigma motorio self-paced e durante test di Stroop, utilizzato per valutare la funzionalità frontale. I tempi di reazione manuali allo Stroop test e le componenti EEG correlate allo stesso test e al paradigma motorio semplice erano rallentati nei pazienti frontali rispetto ai pazienti di controllo. Questi dati suggeriscono che i deficit cognitivi frontali nella SM sono associati ad alterata attività bioelettrica non solo in relazione all'esecuzione di un test cognitivo specifico, ma anche all'esecuzione di un movimento semplice, che può essere utilizzato come indicatore delle funzioni frontali.

2) Durante il primo anno di studio abbiamo trovato una significativa correlazione inversa fra variazioni dell'area trasversale del midollo cervicale (RM a livello spinale C5) e disabilità basale e dopo 1 anno in 29 pazienti SM, sia nella valutazione trasversale che longitudinale, indicante l'utilità di questo parametro RM quale indice paraclinico di monitoraggio della SM. Abbiamo inoltre iniziato uno studio longitudinale per valutare l'utilità dei potenziali evocati (PE) nel monitoraggio della malattia.

Durante il secondo anno abbiamo completato la valutazione dei pE in 92 pazienti (51M, 41F; età media  $38.97 \pm 9.8$  aa) (18 PPMS, 26 RRMS, 48 SPMS) con durata media di malattia di  $8.72 \pm 6.46$  aa e EDSS medio basale di  $4.55 \pm 1.6$ . Sono stati correlati i punteggi EDSS, Kurtzke's Functional Systems (FS) e un punteggio convenzionale dei PE. L'analisi trasversale ha evidenziato, per ogni sistema sensoriale e motorio, una correlazione significativa fra punteggio EP e il corrispondente FS, sia basale che al follow up ( $p < 0.02$ ). Inoltre, l'EDSS era significativamente correlato col punteggio EP globale sia alla valutazione basale ( $p = 0.0032$ ) che finale ( $p = 0.03$ ). Al follow up i punteggi FS erano significativamente aumentati per i sistemi somatosensoriale, piramidele e del tronco encefalico ( $p < 0.05$ ). Tutti i punteggi EP erano significativamente peggiorati al follow up ( $p < 0.05$ ). La correlazione fra il deterioramento del FS e il corrispondente potenziale evocato era significativa unicamente per il potenziale evocato somatosensoriale dell'arto inferiore ( $p = 0.011$ ). Questi risultati indicano che i potenziali evocati sono un buon correlato della disabilità nei pazienti SM. Le correlazioni longitudinali erano presenti solo per una modalità EP e le correlazioni trasversali erano migliori alla valutazione basale rispetto al follow up, suggerendo un effetto 'ceiling' delle anomalie EP, già notevoli alle valutazioni basali a causa della maggiore proporzione di pazienti con forma progressiva di malattia. Uno studio di follow up su un maggior numero di pazienti RR potrebbe consentire di definire l'utilità degli EP nel monitoraggio dell'evoluzione di questo tipo di decorso di malattia.

## ASSESSMENT OF THE VALUE OF SOME PARACLINICAL OUTCOMES IN MONITORING THE NATURAL HISTORY AND THE TREATMENT OF MULTIPLE SCLEROSIS

G. Comi, V. Martinelli, M. Filippi, M. Rovaris, L. Leocani, M. Falautano, S. Medaglini, B. Colombo, P. Rossi, F. Martinelli

*Centro Studi Sclerosi Multipla, IRCCS Osp. San Raffaele, Università degli studi di Milano, Milano*

The aims of this research project were the assessment of the value of some electrophysiological and magnetic resonance imaging parameters in monitoring the natural evolution of the disease and the effects of therapeutic interventions. The following aspects of Multiple Sclerosis (MS) were investigated: 1) Clinical, neurophysiological and magnetic resonance imaging (MRI) correlates of cognitive impairment in Multiple Sclerosis, which is a frequent finding in this disease. 2) Clinical, neurophysiological and magnetic resonance imaging follow-up of patients with Multiple Sclerosis, with different types of disease progression.

1) During the first year of study, we evaluated the correlations between cognitive impairment at psychometric tests and conventional and non-conventional brain MRI techniques (T2/proton density -PD-weighted, T1-weighted and magnetization transfer imaging - MTI) in 30 MS patients. Patients with frontal lobe deficits or memory impairment had a higher total lesion load (TLL) on PD scans ( $p=0.04$  and  $p=0.01$ , respectively). Patients with frontal lobe deficits had higher frontal lesion load (FLL) on PD scans ( $p=0.01$ ) and TLL on MTI ( $p=0.03$ ) scans and lower mean tissue and whole brain MT ratio (MTR) ( $p=0.04$ ). These findings show that lesion loads on PD-weighted MRI and MTI derived measures are associated with cognitive decline in MS patients. During the second year of the study, we evaluated EEG coherence, a parameter indicating cortico-cortical connections, in a subgroup of these patients. Coherence was lower in cognitively impaired patients. Coherence was inversely correlated with subcortical lesional load, indicating that lesions underlying cortex are the most important in determining cognitive impairment. Moreover, we evaluated new neurophysiological and brain MRI techniques (dual echo, T1 and MTI) in the assessment of executive functions in a case-control study on 11 MS patients with and in 11 without frontal lobe dementia. Frontal lobe demented patients had significantly higher T1 and T2 TLL, FLL and subcortical lesion load and lower MTR ( $p<0.001$ ). These results show that frontal lobe dementia in MS is associated with the severity of brain MRI abnormalities. MTR histogram findings suggest that changes undetectable by conventional imaging are also important in determining MS cognitive decline. The same patients underwent EEG evaluation during a self-paced motor task and during the Stroop test, a neuropsychological test utilised for the evaluation of frontal functions. Manual reaction time to the Stroop test was also measured. Reaction times, MRP and Stroop ERP components were significantly delayed in frontal compared to non frontal MS patients. These data suggest that frontal cognitive involvement in MS corresponds to abnormal bioelectrical activity not only in relation to performance of specific neuropsychological tests, but also during a self-paced movement paradigm, which can be used as an indicator of frontal lobe function.

2) During the first year of study, we found a significant inverse correlation between cross-sectional cervical cord area (axial MRI at C5 spinal level) and disability at entry and after 1 year for 29 MS patients, both in the transversal and longitudinal evaluation, indicating the usefulness of this MRI parameter as a paraclinical marker to monitor MS evolution. We also started a

longitudinal study evaluating the usefulness of multimodal EPs in monitoring the disease evolution.

During the second year we completed the longitudinal EP evaluation in 92 patients (51M, 41F; mean age 38.97+9.8 yrs) (18 PPMS, 26 RRMS, 48 SPMS) with a mean disease duration of 8.72+6.46 yrs at a mean baseline EDSS score of 4.55+1.6. EDSS, Kurtzke's Functional Systems (FS) and conventional scores of EPs were correlated. Cross-sectional analysis showed, for each sensory and motor pathway, a significant correlation between the EP score and the corresponding FS score, both at baseline and at follow-up evaluations ( $p<0.02$  or better). Moreover, EDSS was significantly correlated both at baseline ( $p=0.0032$ ) and at final evaluation ( $p=0.03$ ) with the global EPs score. At follow-up, a significant increase of the FS scores was observed for somatosensory, brainstem and pyramidal systems ( $p<0.05$  or better). All EPs scores were significantly worsened at follow-up compared to baseline ( $p<0.05$ ). There was a significant correlation between deterioration of functional system and the corresponding evoked potential only for lower limb SEPs ( $p=0.011$ ). These results indicate that evoked potentials are a good correlate of disability in MS patients. Longitudinal changes were significant only for one EP modality and transversal correlations were better at baseline evaluation than at follow-up, suggesting a ceiling effect of EPs abnormalities, which were already remarkable at baseline evaluation, due to the high proportion of progressive patients evaluated. A further follow up study on a higher number of RR patients would allow to define whether EPs are useful to monitor disease evolution in this type of MS course.

## ANALISI DEGLI INDICATORI PROGNOSTICI DELLA SCLEROSI MULTIPLA MEDIANTE UN APPROCCIO BAYESIANO

V. Cosi (a), R. Bergamaschi (a), A. Romani (a), C. Berzuini (b)

(a) Fondazione "Istituto Neurologico Casimiro Mondino", Pavia

(b) Dipartimento di Informatica e Sistemistica, Università degli studi di Pavia

Allo scopo di analizzare il decorso naturale della sclerosi multipla, abbiamo impiegato nuove tecniche statistiche, i modelli grafici Bayesiani a variabili latenti con i metodi "Markov chain Monte Carlo". Abbiamo costruito il nostro modello incorporando le informazioni che progressivamente venivano acquisite nello corso del follow-up di 186 pazienti (69 maschi, 117 femmine; età media all'esordio 28.9 anni; follow-up medio 7 anni) affetti da sclerosi multipla con forma remittente o secondariamente progressiva, osservati presso il nostro Centro per la Sclerosi Multipla entro 12 mesi dall'esordio di malattia.

Le principali caratteristiche del modello Bayesiano della malattia, per l'elaborazione del quale sono stati necessari lo sviluppo di uno specifico software e' l'elaborazione di complesse procedure statistiche, sono già state riportate in precedente abstract.

Nel corso dell'ultimo anno di studio ci siamo impegnati nell'applicazione del modello Bayesiano alla stima del rischio di progressione a livello di singolo paziente, allo scopo di valutare la capacità del modello di predire, in ogni momento del decorso di malattia, se il paziente avrebbe raggiunto o meno la fase progressiva in un dato intervallo di tempo. Abbiamo voluto valutare, in particolare, la capacità di predire l'evento precocemente in base al decorso dei primi 3 anni di malattia.

Per quanto riguarda i risultati generali, all'esordio di malattia la presenza di sintomi sfinterici è risultata il più importante indicatore prognostico sfavorevole. Seppur con minore impatto, sono risultati indicatori di progressione precoce anche altre variabili di esordio: l'età, il numero di sistemi funzionali neurologici interessati, l'interessamento motorio, la presenza di sequele. Nel corso dei primi tre anni di malattia, sono risultati indicatori prognostici sfavorevoli l'occorrenza di frequenti ricadute sfinteriche e/o motorie, esiti motori ( $SF \geq 2$ ) e l'accumulo di moderata disabilità ( $EDSS \geq 4$ ) al di fuori delle ricadute.

Abbiamo confrontato i risultati ottenuti mediante il nostro approccio statistico e quelli ottenuti con un approccio statistico "standard", basato su un modello di regressione con rischio proporzionale di Cox's. Un approccio di questo tipo (come pure approcci statistici simili o più semplici) non è in grado di analizzare congiuntamente le informazioni basali, le informazioni intermedie e l'end-point, in modo utile e corretto. Tale analisi, ignorando le variabili legate a manifestazioni intermedie ed essendo soggetta a molti dati censurati, conduce necessariamente a risultati scarsamente informativi, nei quali dominano quegli effetti semplicemente più rappresentati tra i pazienti. Al contrario, il nostro modello è in grado di incorporare informazioni intermedie aggiuntive, che sono utilizzabili come informazioni *surrogate* dell'end-point non raggiunto dai soggetti censurati. La nostra analisi ha evidenziato che l'impiego di tutti i dati raccolti nei primi tre anni di malattia è molto più informativo dal punto di vista prognostico, rispetto l'impiego dei soli dati basali. Tali risultati suggeriscono che vi è un reale vantaggio nell'incorporare informazione intermedia, e di conseguenza nell'impiegare anziché un approccio statistico "standard", un approccio come quello da noi proposto. Quest'ultimo è inoltre efficace nel generare predizioni sull'evoluzione di malattia a livello di singolo paziente. Infatti, associando uno specifico peso, interpretabile in termini di rischio relativo, a ciascun tipo di manifestazione di malattia, è possibile "costruire" per ogni paziente uno score rischio-specifico.

## A BAYESIAN APPROACH TO THE ANALYSIS OF PROGNOSTIC ESTIMATORS IN MULTIPLE SCLEROSIS

V. Cosi (a), R. Bergamaschi (a), A. Romani (a), C. Berzuini (b)

(a) Fondazione "Istituto Neurologico Casimiro Mondino", Pavia

(b) Dipartimento di Informatica e Sistemistica, Università degli studi di Pavia

In order to analyse the natural course of multiple sclerosis, we employed a new statistical technology, the Bayesian latent-variable graphical modelling with Markov chain Monte Carlo methods. We constructed the model incrementally, by incorporating increasing information throughout the follow-up of 186 MS patients (69 male, 117 female; mean age at onset 28.9 years; mean follow-up period 7 years) with a relapsing-remitting or a secondary progressive course, viewed at our Multiple Sclerosis Centre within 12 month of onset of the disease.

The main features of the Bayesian model of the disease, which had required the development of a specific software and a meaningful statistical elaboration, were reported in a previous abstract.

During the last year of the study, we concentrated on the employment of the Bayesian model to estimate the risk of progression at an individual patient's level, in order to evaluate the ability of the system to predict, at any time during the course of the disease, whether or not a given patient would have reached the progressive phase within a specified time interval. In particular, we evaluated the early predictive efficacy of the model.

As regards overall results, the presence of sphincter symptoms appeared to be the single most important predictor of unfavourable long-term evolution at disease onset. At a lesser extent, the risk of early progression was related to age, number of neurological functional systems involved, motor involvement and presence of sequelae at onset. During the first three years of follow-up, presence of frequent sphincter and/or motor relapses, motor impairment outside relapse ( $FS \geq 2$ ) and achievement of moderate disability ( $EDSS \geq 4$ ) outside relapses were unfavourable prognostic factors.

We compared the results obtained from our statistical approach with those obtained from a "standard" analysis, based on a Cox's proportional hazards regression model. Cox's standard framework (as well as many equivalent or simpler approaches) cannot do a joint analysis of baseline information, intermediate information and failure, in a useful and correct way. Such analysis, ignoring variables related to intermediate manifestations and subject to heavy censoring, necessarily yields poorly informative results, dominated by those effects which simply correspond to numerically large categories of patients. On the contrary, our model incorporates additional intermediate information which is viewed as a *surrogate* of the missing failure time information in censored subjects. The results of our analysis have indicated that the employment of the information available at three years after disease onset was remarkably more informative in respect to the employment of onset data only. This suggests that there is an advantage in incorporating intermediate information, and hence in using our proposed approach instead of a standard approach, not least for predicting disease evolution at an individual patient's level. In fact, it is possible to associate a specific weight, interpretable in terms of relative risk, to each different type of disease manifestation (so that information loss is kept to a minimum), providing the basis for constructing a patient-specific risk-score.

With its power to detect small prognostic effects, our proposed approach offers the advantages of validating short-term indicators of long-term disease evolution, of suggesting useful intermediate disease endpoints, of generating accurate patient predictions.

**STUDIO MULTICENTRICO DELL'EFFICACIA DEL METILPREDNISOLONE AD ALTE DOSI PER VIA SISTEMICA NEL PREVENIRE LA PROGRESSIONE VERSO LA SCLEROSI MULTIPLA DOPO UN PRIMO EPISODIO NEUROLOGICO SUGGESTIVO DI UNA PATOLOGIA DEMIELINIZZANTE. STUDIO CLINICO E DI RMN**

L. Durelli (a), B. Ferrero (a), E. Verdun (a), E. Gentile (a), A. Oggero (a), G.B. Bradac (a), M. Bergui (a), B. Bergamasco (a), B. Tavolato (b), G.L. Mancardi (c), E. Nobile-Orazio (d), L. Massacesi (e), E. Montanari (f), G. Giuliani (g)

(a) Clinica Neurologica dell'Università degli studi di Torino

(b) Clinica Neurologica dell'Università degli studi di Padova

(c) Clinica Neurologica dell'Università degli studi di Genova

(d) Clinica Neurologica dell'Università degli studi di Milano

(e) Clinica Neurologica dell'Università degli studi di Firenze

(f) Clinica Neurologica dell'Università degli studi di Fidenza

(g) Clinica Neurologica dell'Università degli studi di Ancona

Il metilprednisolone (MP) ad alte dosi per via endovenosa al primo attacco unilaterale di neurite ottica, riduce significativamente il rischio di sviluppare la Sclerosi Multipla (SM) entro i successivi due anni. E' stato, pertanto, proposto uno studio multicentrico controllato per valutare l'efficacia preventiva di un precoce trattamento ad alte dosi con MP sul successivo sviluppo di SM clinicamente definita dopo il primo episodio suggestivo di una patologia demielinizzante. Il protocollo e' stato approvato dal Ministero della Sanita' e sono stati coinvolti 54 centri del Nord Italia specializzati nella SM. Fra questi centri, 40 hanno accettato il protocollo, 25 hanno ottenuto l'approvazione del Comitato Etico locale, e sono stati inclusi i primi 33 pazienti nel corso dei primi anni dello studio. Il reclutamento dei pazienti e' risultato difficile per numerosi motivi: l'anamnesi dei pazienti apparentemente affetti da un primo episodio acuto di possibile natura demielinizzante risulta molto spesso positiva per altri episodi della stessa natura; precedente terapia corticosteroidea gia' iniziata presso un altro centro neurologico al momento del reclutamento; inizio della sintomatologia che risale ad oltre 30 giorni la data del reclutamento; il rifiuto del paziente di assumere placebo, considerata la grande diffusione della terapia corticosteroidea.

I centri partecipanti usano differenti apparecchiature di RMN, ciascuna con un diverso protocollo di elaborazione delle immagini. I software per l'analisi delle immagini di RMN utilizzato dal centro RMN di Torino e' in grado di leggere i files immagini prodotti dalla RMN di Torino e tutti i files immagini generati da macchine di RMN che abbiano implementato un formato aderente al Digital Imaging and Communication in Medicine (DICOM) standard. Dopo avere sviluppato alcuni software per la lettura dei dati dei centri dotati di software non DICOM compatibile, abbiamo deciso, nel corso del 1999, di ottenere i dati digitali direttamente tramite la rete del world wide web (Internet). Le RMN vengono dotate di un modem e di un computer con un software dedicato. Il computer viene collegato alla macchina di RMN tramite la scheda ethernet, ed utilizzando un software da noi predisposto, il radiologo puo' facilmente trasferire i dati digitali delle immagini dalla RMN al computer. Il centro coordinatore puo', quindi, collegarsi, via modem, con il computer locale ed effettuare a distanza il trasferimento dei files immagini dal centro periferico a quello coordinatore. Questa rete telematica tra centri italiani per l'SM e' una rete pilota, unica nel suo genere, che permette un'efficiente, rapida, e ripetibile trasmissione dei dati immagini tra centri neuroradiologici partecipanti a questo e ad altri studi multicentrici. La rapida evoluzione delle prospettive terapeutiche per la sclerosi multipla ha moltiplicato la necessita' di organizzare studi multicentrici, e questa rete telematica (che fa capo alla casella e-mail: smxsm@medfarm.unito.it) permetterà in futuro una gestione ottimale del problema di trasferimento delle immagini digitali.

**CAN EARLY SYSTEMIC HIGH DOSE METHYLPREDNISOLONE REDUCE THE RATE OF DEVELOPMENT OF MULTIPLE SCLEROSIS AFTER THE FIRST NEUROLOGIC EVENT SUGGESTIVE OF A CLINICAL DEMYELINATING EPISODE? A MULTICENTER CLINICAL-MRI STUDY**

L. Durelli (a), B. Ferrero (a), E. Verdun (a), E. Gentile (a), A. Oggero (a), G.B. Bradac (a), M. Bergui (a), B. Bergamasco (a), B. Tavolato (b), G.L. Mancardi (c), E. Nobile-Orazio (d), L. Massacesi (e), E. Montanari (f), G. Giuliani (g)

(a) Clinica Neurologica dell'Università degli studi di Torino

(b) Clinica Neurologica dell'Università degli studi di Padova

(c) Clinica Neurologica dell'Università degli studi di Genova

(d) Clinica Neurologica dell'Università degli studi di Milano

(e) Clinica Neurologica dell'Università degli studi di Firenze

(f) Clinica Neurologica dell'Università degli studi di Fidenza

(g) Clinica Neurologica dell'Università degli studi di Ancona

The Optic Neuritis (ON) Treatment Trial has shown that parenteral high-dose methylprednisolone (MP) delays the development of Multiple Sclerosis (MS) after the first ON attack. We therefore started a placebo-controlled multicenter trial to evaluate the preventive efficacy of an early high-dose MP treatment on the development of clinically definite MS after the first acute neurologic attack suggestive of a clinical demyelinating episode. A secondary endpoint is the computerized analysis of the correlation between total lesion load at Magnetic Resonance Imaging (MRI) and the subsequent development of MS.

The protocol has been approved by the Italian Ministry of Health and 54 MS centers, across all Italy, have been recruited, 40 accepted the protocol, 25 had the protocol accepted by the local ethical committee, and the first 33 patients were included in the study during the first years. Patient recruitment was difficult for many reasons. Patients apparently affected by the first acute neurologic attack of probable demyelinating nature, often resulted anamnestically to have suffered from other similar episodes. Patients referred to hospital for these episodes often already started corticosteroid treatment in another neurologic center. Neurologic symptoms often started more than 30 days before recruitment day. Patient refusal to be treated with placebo, due to the wide diffusion of corticosteroid treatment.

The participating centers use many different MRI machines, often with a different image processing protocol. The software for MRI analysis used by the MRI center of Torino can read the image files of Torino MRI machine and all the image files produced in formats accepted by the Digital Imaging and Communication in Medicine (DICOM) standard. After developing some suitable software for reading DICOM incompatible image data, we decided, during 1999, to get digital data directly through the world wide web network (Internet). MRI are connected to a personal computer(PC) with dedicated software, in turn connected with a modem. The PC is connected to the MRI machine through the ethernet card and, using the ad hoc developed software, the local radiologist can easily transfer image digital data from the MRI to the PC. The coordinating center can, then, connect through the modem and activate the file transfer protocol to get image files via Internet. This telematic network among Italian MS centers is a pilot network, unique in Italy. It allows a fast, efficient, and reproducible image data transfer among neuroradiologic centers involved in this and other multicenter studies. The fast evolution of new therapeutic approaches for MS patients has recently increased the need to organize multicenter studies. This telematic network (heading to the e-mail box: smxsm@medfarm.unito.it) will perfectly fit the need of such studies to manage the problem of digital image data trasfer.

## MISURAZIONI *IN VIVO* DEL DANNO ASSONALE IN PAZIENTI CON SCLEROSI MULTIPLA ED ALTRE PATOLOGIE DELLA SOSTANZA BIANCA CEREBRALE.

N. De Stefano, A. Federico

Unità di Malattie Neurometaboliche, Ist. di Scienze Neurologiche, Università degli studi di Siena

Recenti studi *in vivo* e *post-mortem* hanno posto l'accento sull'importanza del danno assonale nella sclerosi multipla (SM). La risonanza magnetica spettroscopica permette di misurare *in vivo* l'<sup>1</sup>N-acetilaspartato (NAA) cerebrale, garantendo quindi un non invasivo indice di integrità assonale. Nel nostro studio, abbiamo usato la risonanza magnetica spettroscopica per valutare se il danno assonale è presente ed è rilevante per la disabilità clinica sin dai primi stadi di malattia. I risultati del nostro studio (effettuato su 88 pazienti con SM, 55 con forma remittente, 33 con forma secondariamente progressiva) suggeriscono che il danno assonale comincia nella prima fase della malattia e contribuisce da subito alla disabilità. Infatti, diminuzioni del NAA erano evidenti anche prima che la disabilità fosse clinicamente evidente ed erano più rapidi a bassi livelli di disabilità. La correlazione tra NAA ed EDSS era significativamente maggiore ( $p<0.03$ ) in pazienti con lieve disabilità (EDSS <5,  $r=-0.54$ ,  $p<0.0001$ ) che in quelli con grave disabilità (EDSS ≥5,  $r=-0.1$ ,  $p<0.9$ ).

In uno studio precedente avevamo dimostrato una stretta correlazione tra il marker neuronale NAA e il danno neurologico di pazienti affetti da differenti malattie della sostanza bianca cerebrale. Allo stesso modo, decrementi del NAA sembrano avere rilevanza per la disabilità in uno studio effettuato su 13 pazienti con CADASIL (una arteriopatia cerebrale autosomica dominante con infarti subcorticali e leucoencefalopatia). Anche in questo studio abbiamo infatti potuto dimostrare una stretta correlazione tra il marker neuronale N-acetilaspartato ed il danno neurologico. Tale correlazione non è stata trovata tra le alterazioni cerebrali evidenziate alla risonanza magnetica per immagini e le condizioni cliniche dei pazienti.

I nostri risultati suggeriscono che il danno assonale può essere più importante della stessa demielinizzazione nella determinazione del danno funzionale in malattie della sostanza bianca. Misurazioni seriate del NAA cerebrale dovrebbero garantire un'affidabile ed accurata monitorizzazione della evoluzione della malattia.