

Articolo tradotto da Stefano Gentile , Socio di Debra Italia Onlus , dall'originale in lingua inglese pubblicato dalla " BMC Pediatrics " – BioMed Central in data 29 Ottobre 2016

METABOLISMO DELL'OMOCISTEINA NEI BAMBINI E NEGLI ADOLESCENTI AFFETTI DA

"EPIDERMOLISI BOLLOSA "

00000000

RICERCATORI : Rachele De Giuseppe – Università di Pavia
Greta Venturelli – Fondazione IRCSS Ospedale Maggiore Policlinico – Milano.
Sophie Guez, Simona Salera, Gabriella Chiarelli, Francesca Manzoni e Susanna Esposito – Unità di Cura Pediatrica Altamente Intensiva - Università di Milano.
Claudia De Vita e Fabrizia Bamonti - Dip. Scienze Biomediche, Chirurgiche e Dentali – Università di Milano.
Dario Consonni – Unità di Epidemiologia – Fondaz IRCSS (v. sopra)
Cinzia Dellanoce – CNR – Ospedale Niguarda Cà Granda – Milano
Rita Maiavacca – Microbiologia . Fondaz IRCSS (v. sopra).

Il testo italiano è rigorosamente fedele all'originale.

GLOSSARIO : in calce è stato inserito un Glossario per facilitare la comprensione di alcuni termini scientifici ai " non addetti a i lavori ".

ACRONIMI ED ABBREVIAZIONI : è altresì allegato un breve elenco delle abbreviazioni usate nel testo con il relativo significato.

FIGURE E TABELLE : non sono riportate . Si rimanda al testo originale in lingua inglese.

ROMA, 20 Febbraio 2017

1) - ANTEPRIMA –

“ SFONDO ”

La Epidermolisi Bollosa (EB) appartiene alle malattie rare di natura genetica ad espressione “ eterogenea “, caratterizzata dalla formazione di vesciche sulle pelle e nelle mucose, come conseguenza del benché minimo trauma meccanico (leggasi : urti e colpi anche di piccola entità).

Il coinvolgimento (laddove presente) della mucosa della bocca e della stenosi dell'esofago si ritengono essere responsabili di gravi carenze nutrizionali, ma pochi studi hanno finora affrontato questo aspetto.

Questo studio si prefigge di valutare lo stato della Omocisteina (v. Glossario) nei bambini e negli adolescenti affetti da EB valutando la Omocisteina totale nel plasma (tHcy) e le concentrazioni delle vitamine metabolicamente correlate : B 6, B 12 ed i “ folati “ (v. Glossario).

“ METODI “

Venti pazienti di età media 12 anni (età del campione compresa fra i 5 ed i 19 anni) sono stati sottoposti ad analisi della Omocisteina totale nel plasma, dei livelli di B 12 e della “ holotranscobalamina “ (frazione attiva della B 12) nel siero, dei livelli degli “ eritrociti folati “ (SF e rispettivamente Ery – F) nel siero, della vitamina B 6 nel plasma, ed i livelli della proteina hsCRP altamente sensibile e C – reattiva. La gravità clinica della malattia è stata valutata anche con il criterio BEBS che assegna un punteggio totale alla gravità stessa della malattia secondo la valutazione dei diversi “ siti “ del corpo nei quali la EB si manifesta.

E' stato infine scelto e coinvolto un campione ben assortito per sesso e per età.

“ RISULTATI “

I pazienti hanno manifestato livelli totali di Omocisteina più alti ($p = 0,04$) e livelli di B 6 più bassi ($p = 0,03$) del campione di soggetti sani. Invece le concentrazioni di B 12, della Holo TC, dell'SF e della Ery – F sono risultate confrontabili fra i pazienti ed i soggetti sani.

Analisi multiple di regressione lineare hanno mostrato che i livelli della Omocisteina totale (tHcy) non sono dipendenti dai livelli delle vitamine con le quali c'è una correlazione metabolica.

Ed in più, i livelli della proteina hsCRP nel siero si sono manifestati più alti nei pazienti affetti da EB che nei soggetti sani ($p = 0,003$) e correlati “ negativamente “ con le concentrazioni di B 6 ($r = - 0,6$; $p = 0,009$). I punteggi ottenuti con il metodo BEBS si sono rapportati negativamente con Holo TC ($p = 0,022$) e con i livelli della B 6 ($p = 0,005$), mentre si sono rapportati positivamente con l'età ($p = 0,031$) e con i livelli della proteina hsCRP (p inferiore a 0,001).

“ CONCLUSIONI “

La misurazione / valutazione della Omocisteina totale e dei livelli delle vitamine con le quali c'è una correlazione metabolica evidenzia una influenza importante del “quadro “ nutrizionale che può rivelarsi fondamentale per le cure dei malati nel lungo termine. Monitorare i livelli della B 6 in pazienti affetti da EB può diventare particolarmente importante allo scopo di prevenire complicazioni dovute ad insufficienza di B 6 e per contro di evitare un eccesso di B 6 che invece contribuisce a mantenere uno stato “ infiammatorio “.

2) – SINTESI –

La EPIDERMOLISI BOLLOSA appartiene ad una famiglia di malattie della pelle ereditarie (da geni “ dominanti “ o da geni “ recessivi “).

Essa è caratterizzata dalla formazione di vesciche sulla pelle e/o sulle mucose come conseguenza di traumi anche di lieve entità (leggasi : urti e/o colpi).

Le bolle si rompono facilmente e le ulcerazioni sono a rischio di infezione.

La EB è distinta con quattro manifestazioni prevalenti a seconda della gravità, e più precisamente in funzione della separazione della epidermide dalla “ lamina basale “ sottostante, e sono : la EB Simplex (EBS), la EB Giunzionale (JEB), la EB Distrofica (DEB) e la “ Sindrome “ di Kindler (KS).

A causa del possibile coinvolgimento della mucosa orale e di stenosi dell’esofago, i pazienti affetti da EB ed in particolare da JEB o da DEB sono a rischio di gravi carenze nutrizionali, come ad esempio carenze di vitamine del gruppo B (la B 6 , la B 9, la B 12 e/o i “ folati “ – v. Glossario)

Ciò può essere dovuto a problemi del cavo orale, dell’esofago e dell’apparato orofaringeo (per la presenza di vesciche nella bocca, di ulcerazioni, una anormale motilità esofagea, stenosi dell’esofago, disfagia, fastidi ai denti, ecc ecc) ovvero problemi di digestione e / o di assorbimento; escoriazioni anali, stenosi rettale con conseguente stipsi cronica; perdite di sangue e proteine attraverso vescicole cutanee aperte; “ ipermetabolismo “ che si traduce in una perdita eccessiva di calore e turnover di proteine in particolare nel contesto delle infezioni citate.

Queste complicazioni influiscono maggiormente sui neonati, i bambini e gli adolescenti affetti da EB proprio per le più spiccate esigenze nutrizionali necessarie per la crescita e lo sviluppo.

Una “ Iperomocisteinemia “ (HHcy) cioè un eccesso di omocisteina nel circolo sanguigno (i livelli normali di omocisteina nel plasma sono di 5 – 12 micro moli per litro – N.d.T.) può essere conseguenza della carenza di una o più vitamine del gruppo B ed è stata associata a diverse malattie, come ad esempio le malattie cardiovascolari, il morbo di Alzheimer ed altre patologie demenziali, le neuropatie periferiche, l’insufficienza renale e l’ipotiroidismo. Inoltre recenti studi hanno dimostrato il coinvolgimento della omocisteina (Hcy) sia nel potenziamento della attività infiammatoria e delle risposte “ anomale “ del sistema immunitario, facendo pensare ad un ruolo della Hcy non solo nello sviluppo delle malattie cardiovascolari, ma anche nella patogenesi delle malattie “ autoimmuni “.

Dal momento che il metabolismo della omocisteina è catalizzato da enzimi che richiedono la collaborazione di vitamine del gruppo B come “ cofattori “, livelli elevati di Hcy totale possono indicare uno stato di denutrizione proprio a causa della mancanza di vitamine correlate; in particolare la vitamina B 12 , la olotranscobalamina (holoTC, la forma biologicamente attiva di B 12) e / o i folati, fattori che collaborano al processo di “ ri – metilazione “, e la vitamina B 6 per il processo di “ transsolforazione “. (l’omocisteina è un aminoacido solforato presente negli alimenti proteici – latticini- carne – legumi – uova – N.d.T.).

Fino ad oggi pochi studi hanno preso in considerazione le carenze nutrizionali in pazienti affetti da Epidermolisi Bollosa. Per quanto a nostra conoscenza il presente studio è il primo volto a valutare l’omocisteina nell’organismo studiando i livelli delle vitamine e della omocisteina totale nei pazienti EB.

3) – METODI –

3.1) PAZIENTI COINVOLTI

Sono stati selezionati venti pazienti tra bambini ed adolescenti, dei quali 12 maschi ed otto femmine, di età compresa fra i cinque mesi ed i diciannove anni ed esaminati presso il reparto pediatrico di terapia altamente intensiva della Fondazione IRCSS Cà Granda, nell'Ospedale Maggiore Policlinico di Milano.

Le tipologie di EB sono state classificate in base a dati genetici, ai risultati di mappature da immunofluorescenza e da dati clinici.

Le analisi delle tipologie di EB hanno permesso di identificare 6 casi di EBS (semplice) pari al 30 % del campione, 1 caso di JEB (Junction) pari al 5 % , 11 casi di DEB (distrofica) pari al 55% e 2 casi di KS (Kindler) pari al 10 %.

Tra i pazienti affetti da Epidermolisi Distrofica 3 casi sono stati classificati come DDEB (“ dominante “) pari al 27,3 % , e 8 casi come RDEB (“ recessiva “) pari al 71, 7 % del totale.

Per tutti i pazienti , la gravità della malattia è stata valutata anche attraverso il punteggio che si ottiene applicando il metodo BEBS . Il punteggio finale si ottiene tenendo conto della superficie totale di pelle danneggiata dell'eventuale coinvolgimento delle unghie della bocca, degli occhi, della laringe e dell'esofago . Ed ancora della presenza di cicatrici sulle mani, di cancro della pelle, di ferite croniche , di alopecia ed anche di scompensi nutrizionali. Alla estensione della pelle sono stati assegnati 50 punti e 5 punti ciascuno alle altre 10 “ manifestazioni “ per un totale massimo di 100 punti. Il metodo è stato applicato dal pediatra che ha seguito regolarmente i pazienti ed ha effettuato i prelievi di sangue.

I dati raccolti dai pazienti di EB sono stati confrontati con analoghi dati rilevati su un campione di persone sane (12 maschi ed 8 femmine di età compresa fra 1 anno e 19 anni).

I protocolli dello studio effettuato sono stati approvati dal Comitato Etico della Fondazione IRCSS Cà Grande dell'Ospedale Maggiore Policlinico di Milano (con il n° di registrazione 2014 – 359), in conformità con le norme di buona pratica clinica per la sperimentazione di medicinali sugli esseri umani.

Per tutti i pazienti entro i 18 anni è stato richiesto un consenso scritto , su informativa, da parte di un genitore o di un tutore legale , mentre ai pazienti di età superiore agli 8 anni è stato richiesto anche un loro consenso scritto. Inoltre sia ai genitori che ai pazienti di età superiore agli 8 anni è stato richiesto un consenso scritto alla pubblicazione dei dati raccolti. Infine anche il Comitato Etico ha approvato la pubblicazione dei dati e dello studio.

3.2) SITUAZIONE NUTRIZIONALE

I bambini con Epidermolisi Grave tendono ad essere al di sotto della statura “ standard “ e sotto peso per la loro età. La valutazione dello stato nutrizionale è stata condotta con metodi “ antropometrici “. Per i pazienti e per i soggetti sani i controlli di altezza e peso sono stati condotti in condizioni standard dalla stessa infermiera e sempre con le stesse attrezzature . E' stato anche calcolato l' “ Indice di Massa Corporea “ (BMI) . Il peso, l'altezza ed il BMI sono stati valutati utilizzando le curve di crescita del Cacciari.

3.3) ANALISI BIOCHIMICHE

Sono stati misurati i livelli nel plasma di : tHcy, B 6, i “ siero – folati “ (s – F), la B 12 , la holo TC, e gli eritrociti (ery – F), allo scopo di valutare il metabolismo della Omocisteina. E' stata anche valutata nel siero la proteina reattiva C ad alta sensibilità.

Due campioni di sangue per ogni paziente sono stati prelevati al mattino dopo una notte a digiuno e raccolti in provette schermate alla luce, uno senza alcun additivo (per la B 12, HoloTC e hsCRP) e l'altro con aggiunta di acido “ etilenediaminetetracetico “ (EDTA - per prevenire la coagulazione), per saggiare la concentrazione di ery – F , tHcy, e la B 6.

I campioni con EDTA sono stati immediatamente messi su ghiaccio e dopo aver raccolto aliquote di sangue intero per l'emocromo e la determinazione della ery – F , son stati centrifugati per 30 minuti allo scopo di ottenere campioni di plasma per la determinazione della omocisteina totale e della B 6.

I campioni di siero e di plasma sono stati congelati e conservati a – 80 ° fino al momento delle analisi.

Le concentrazioni totali di omocisteina nel plasma e di B 12 nel siero sono state determinate con un test immunoenzimatico usando i relativi kit disponibili in commercio su analizzatore AIA 600 AH(Tosoh Bioscience, Tokyo, Giappone) mentre l'Holo TC, s – F, e la ery – F con un test immunoenzimatico utilizzando i relativi kit disponibili in commercio su un analizzatore i2000SR (della Abbott Diagnostic, Abbott Park, IL, USA).

Le concentrazioni di B 6 nel plasma sono state misurate con il metodo HPLC usando il relativo kit commerciale (della Chromsystems Instruments & Chemicals, Monaco, Germania).

I livelli di HsCRP sono stati determinati con un test immunoenzimatico ricorrendo al kit commerciale su analizzatore modulare (Roche , Svizzera).

A causa dei continui cambiamenti fisiologici che si manifestano durante l'infanzia, non sono risultati facilmente disponibili valori di riferimento pediatrici appropriatamente suddivisi.

Per questo motivo, i livelli di omocisteina totale e le vitamine con essa correlate metabolicamente nei pazienti affetti da EB son stati confrontati con quelli di un campione di soggetti sani egualmente assortita sia per età che per sesso.

Inoltre nel presente studio sia la “ iperomocisteinemia “ che la carenza di B 12 sono state determinate rispettando gli intervalli di riferimento ed i valori “ limite “ stabiliti da Bailey nel programma CALIPER (Canadian Laboratory Initiative for Pediatric Reference Interval (v. Tab 3) mentre i livelli della B 6, di s – F, e di ery – F sono stati confrontati con i dati ottenuti da una analisi metabolica che ha dettagliato i dati dello “ stato vitaminico “ di gruppi diversi della popolazione spagnola. (v. Tab 3). In particolare dato per buono che la B6, s –F , ed ery – F fossero distribuiti omogeneamente, sono stati assunti come intervallo di riferimento i livelli medi delle vitamine rilevati nella popolazione spagnola, accettando due deviazioni standard su entrambi i lati della media.

I livelli di HoloTC sono stati classificati utilizzando il relativo valore “ limite “ per una popolazione adulta, dato che nessuno studio è stato ancora condotto su bambini ed adolescenti.

3.4) ANALISI STATISTICHE

I risultati, riportati come valore medio all'interno dell'intervallo 25 % - 75 % , sono stati ottenuti utilizzando il test Mann – Whitney , per rilevare ogni differenza fra i soggetti sani ed i pazienti affetti da EB . Inoltre a causa del basso numero di malati di JEB e di KS, è stato possibile confrontare i livelli delle vitamine metabolicamente correlate con la omocisteina e del hsCRP solo sui gruppi di pazienti EBS e DEB.

L'analisi della regressione multipla è stata usata per trovare gli “ indicatori “ dei valori della omocisteina. Il coefficiente di Pearson è stato utilizzato per testare le correlazioni fra le variabili continue. Le analisi statistiche sono state perfezionate usando Stata 13 (Stata Corp.2013, Stata : release 13 Statistical Software, College Station, TX : Stata Corp. LP).

4) – RISULTATI –

La tabella 1 riporta le caratteristiche demografiche e le rilevazioni sulla crescita / sviluppo dei pazienti e dei soggetti sani.

Per quanto riguarda il peso, 7 pazienti su 20 e 2 soggetti sani su 20 sono risultati sotto il terzo percentile ($p = 0,13$). In particolare fra questi pazienti 12 sono affetti da DEB e di questi 4 da RDEB , 6 sono affetti da EBS e 2 da DT (“ giunzionale “ detta anche JEB N.d.T.)

Per quanto riguarda l'altezza solo 2 individui sono risultati, sia nei soggetti sani che nei pazienti, al disotto del terzo percentile. Otto pazienti e quattro soggetti sani hanno presentato un "Indice di Massa Corporea" inferiore al terzo percentile ($p = 0,30$). Fra i pazienti in questione 4 sono affetti da RDEB, 3 da EBS ed 1 da JEB.

In aggiunta, 1 paziente con DDEB (e punteggio BEBS pari a 2) ha manifestato un peso corporeo fra il 90 ed il 97 percentile ed un paziente con EBS (e punteggio BEBS pari a 1) ha riportato una massa corporea maggiore del 95 percentile.

I soggetti sani hanno fatto rilevare sia il peso che la "massa corporea" al di sotto del 90 percentile.

Tra i pazienti affetti da Epidermolisi Bollosa Distrofica, 5 hanno presentato stenosi dell'esofago. Un solo paziente (affetto da JEB) è risultato celiaco. Tutti gli altri pazienti non hanno presentato evidenze cliniche o sintomi di cattivo metabolismo.

La tabella 2 riporta i punteggi del metodo BEBS rilevati sui pazienti, punteggi che vanno da 2 a 67.

Anche se non abbiamo riportato l'apporto calorico e l'assunzione giornaliera di nutrienti dei pazienti in studio, è risultato che un paziente KS e tre pazienti DEB stavano assumendo integratori liquidi piuttosto calorici arricchiti di vitamine e minerali, in particolare le vitamine B 6 e B 12 e l'acido folico. E ancora un paziente EBS, tre pazienti DEB ed un paziente JEB avevano implementato solo la vitamina B 12. In tutti i casi le dosi di vitamine assunte come integratori erano inferiori all'apporto vitaminico raccomandato dall'Istituto IOR.

Sia i pazienti che i soggetti sani sono risultati avere normali funzioni renali (dati non riportati).

Nel 45 % dei pazienti affetti da EB si è rilevata la presenza di "anemia microcitica", mentre i parametri ematologici nei soggetti sani sono risultati compresi negli intervalli di riferimento (dati non riportati).

Nella tabella 3 sono riportati i parametri biochimici dei pazienti e dei soggetti sani. I risultati sono riportati come valore mediano; intervallo interquartile.

I livelli plasmatici della omocisteina totale sono risultati significativamente più elevati nei pazienti EB rispetto ai soggetti sani (nei primi: 9,9 ; 7,5 – 10,5 micromoli / Litro. Nei secondi 6,5 ; 5,8 – 8,4 micromoli / Litro – $p = 0,04$) (v. Fig 1 – a).

Il 55 % dei pazienti ha rivelato livelli di omocisteina totale al di sopra del valore di soglia (10,4 ; 10,1 – 10,9 micromoli / Litro, in accordo con l'intervallo di riferimento del programma CALIPER).

In particolare i pazienti affetti da DEB hanno mostrato concentrazioni di omocisteina totale significativamente più elevati rispetto ai soggetti sani (10,0 ; 8,3 – 10,6 micromoli / Litro contro 6,5 ; 5,8 – 8,4 micromoli / Litro – $p = 0,03$) mentre nei pazienti affetti da Epidermolisi Bollosa Semplice i livelli di omocisteina totale non differivano in maniera apprezzabile dai livelli dei soggetti sani (9,4 ; 6,5 – 10,4 micromoli / Litro contro 6,5 ; 5,8 – 8,4 micromoli / Litro – $p = 0,25$).

La valutazione delle vitamine correlate metabolicamente con la omocisteina ha evidenziato livelli alterati della B 6 nel plasma per il 70 % dei pazienti EB e curiosamente i livelli di B 6 rilevati sono comunque risultati significativamente più bassi nei pazienti che nei soggetti sani (6,9 ; 4,2 – 12,3 mg / L contro 11,3 ; 9,2 – 14,3 mg / L – $p = 0,03$) (Fig 1 – b).

Ed in più i livelli di B 6 erano più bassi sia in pazienti con peso minore del terzo percentile rispetto ai rimanenti (3,6 ; 1,8 – 6,3 mg / L contro 9,1 ; 6,9 – 18,3 mg / L – $p = 0,03$), sia nei pazienti con indice di massa corporea (BMI) minore del terzo percentile rispetto agli altri pazienti (4,6 ; 2,3 – 6,2 mg / L contro 9,6 ; 7,5 – 20,0 mg / L – $p = 0,01$).

I livelli sierici dei folati sono risultati alterati nel 50 % dei soggetti con patologie EB manifestandosi significativamente più bassi sia in pazienti con peso minore del terzo percentile rispetto ai rimanenti (8,6 ; 6,1 – 10,4 nanomoli / Litro contro 13,8 ; 10,4 – 22,4 nanomoli / Litro – $p = 0,05$) sia in pazienti con massa corporea minore del terzo percentile rispetto agli altri (7,6 ; 5,8 – 9,9 nanomoli / Litro contro 15,9 ; 11,0 – 23,3 nanomoli / Litro – $p = 0,01$).

Tuttavia le concentrazioni medie di folati nel siero tra pazienti e soggetti sani non sono risultate minimamente differenti ($p = 0,64$).

La “ olotranscobalamina “ (holoTC) e la B 12 nel siero sono risultate normali nella maggior parte dei pazienti e dei soggetti sani in concordanza con gli studi di Bailey e di Bamonti .

Come pure non si sono rilevate differenze per la B 12, la holoTC e la ery – F fra i malati ed i soggetti sani.

Tuttavia è interessante notare che le concentrazioni della holoTC erano più basse sia nei pazienti il cui peso fosse sotto il terzo percentile rispetto ai rimanenti ($83,0 ; 71,6 - 99,7$ picomoli / Litro contro $126,0 ; 93,9 - 128,0$ picomoli / Litro – $p = 0,09$) sia nei pazienti con BMI minore del terzo percentile rispetto agli altri pazienti ($90,5 ; 74,6 - 99,2$ picomoli / Litro contro $128,0 ; 92,8 - 128,0$ picomoli/ litro – $p = 0,08$).

Nonostante i livelli alterati di B 6 e dei folati sierici, l’analisi multipla di regressione lineare ha mostrato che i livelli della omocisteina totale sono indipendenti dai livelli delle vitamine con essa correlate metabolicamente.

I livelli sierici della hsCRP sono significativamente più elevati nei pazienti affetti da EB che nei soggetti sani ($p = 0,003$), risultati alterati nel 50 % dei malati (v Fig 1 – c) e crescenti con il crescere della gravità della Epidermolisi Bollosa.

Infatti i livelli medi della hsCRP sono significativamente più alti nei pazienti con EB “ Distrofica “ rispetto ai sani ($3,0 ; 0,2 - 2,5$ mg / dL contro $0,04 ; 0,03 - 0,1$ mg / dL – $p = 0,000$) e nei pazienti DEB se confrontati con pazienti EBS ($3,0 ; 0,2 - 5,4$ mg / dL contro $0,2 ; 0,03 - 1,0$ mg / dL – $p = 0,04$).

Una correlazione negativa è stata trovata fra i livelli della B 6 ed i livelli della hsCRP ($r = - 0,6 ; p = 0,009$ (v. Fig 1 – d).

E per concludere i punteggi ottenuti con il metodo BEBS sono rapportati negativamente con i livelli della holo TC ($r = - 0,5 ; p = 0,022$) e con i livelli della B 6 ($r = - 0,6 ; p = 0,005$) mentre sono rapportati positivamente con l’età ($r = 0,5 ; p = 0,031$) e con i livelli di hsCRP ($r = 0,8 ; p$ minore di $0,001$).

5) – DISCUSSIONE

Lo “ stato “ di “ Iperomocisteinemia “ che è un indicatore della carenza di folati, e delle vitamine B 6 e B 12 è stato associato con l’aumento della attività infiammatoria e con meccanismi di “ innesco “ di processi “ autoimmuni “ (cioè di risposte ANOMALE del sistema immunitario N.d.T.).

I pazienti affetti da EB possono soffrire di malnutrizione acuta e cronica . Infatti laddove si presentano stenosi dell’esofago ed ulcerazioni della mucosa orale può aversi anche difficoltà di “ ingestione “ e la malnutrizione proteico – calorica può essere peggiorata dalle perdite attraverso le vesciche cutanee e da sindrome infiammatoria cronica conseguente ad infezioni croniche della pelle.

Pertanto la gestione nutrizionale è un aspetto essenziale della cura a lungo termine dei pazienti con EB, perché l’assunzione di proteine, di vitamine e degli oligoelementi è essenziale per la crescita ma anche per la guarigione delle ferite e per il rafforzamento della resistenza contro le infezioni batteriche.

Al giorno d’oggi pochi studi hanno affrontato il “quadro“ ed il ruolo delle vitamine nella Epidermolisi Bollosa.

Un precedente studio condotto da Ingen , Housz ed Oro ha tracciato un “ quadro “ delle vitamine e dei metalli in 14 pazienti affetti da Epidermolisi Bollosa Distrofica Recessiva . Gli autori hanno rilevato carenze di ferro, vitamine D, C, B 6, PP, zinco e selenio, in percentuali variabili dal 36 al 70 % dei pazienti stessi.

Mentre le vitamine A , B 1 , B 2 , B 12 , una proteina legante del retinolo e la carnitina sono risultate “ corrette “ ,cioè all’interno dei relativi intervalli di riferimento.

E quindi per la prima volta, ma sulla base delle considerazioni riportate, in questo studio abbiamo valutato il comportamento della Omocisteina, analizzando i livelli della omocisteina totale e delle vitamine con essa metabolicamente correlate, in 20 bambini ed adolescenti confrontando le rilevazioni con analoghe condotte su un campione di soggetti sani egualmente assortiti per età e sesso.

I nostri risultati hanno mostrato livelli di omocisteina totale al di sopra del valore di “ soglia “ in oltre il 50 % dei pazienti analizzati.

In particolare i livelli di omocisteina totale non sono risultati differenti fra pazienti con EBS e soggetti sani, ma più alti fra pazienti con DEB e soggetti sani .

Analizzando le vitamine correlate con la Omocisteina i nostri risultati riguardo alla vitamina B 6 sono concordanti con gli studi precedenti.

Infatti i livelli della B 6 nel plasma sono al di sotto del limite inferiore dell'intervallo di riferimento nella maggior parte dei pazienti analizzati e comunque più bassi nei pazienti che nei soggetti sani.

Per quanto riguarda la carenza di questa vitamina , i livelli di B 6 in pazienti con peso al di sotto del terzo percentile sono differenti rispetto ai livelli in pazienti con peso al di sopra del decimo percentile.

Una spiegazione plausibile di questa carenza può essere attribuita alla difficoltà di nutrizione dei pazienti EB.

ATTENZIONE : per i termini scientifici che compaiono nel paragrafo seguente si rimanda al Glossario allegato – N.d.T.

Shen ed altri ricercatori hanno stabilito che il “ piridossalfosfato “ (PLP) , che è la forma attiva della vitamina B 6, è stato in passato erroneamente associato con altri indicatori di stati infiammatori, come la proteina C – reattiva (CRP), il fibrinogeno ed il conteggio dei globuli e cellule del sangue.

In aggiunta una relazione contraria fra CRP ed il PLP è stata trovata fra i partecipanti ai gruppi di studio del Framingham Heart Study e dei gruppi per la supervisione della nutrizione e della salute nazionali (NHANES).

Le evidenze attuali suggeriscono che la associazione contraria fra il PLP nel plasma e uno stato infiammatorio possa risultare da questo co – enzima usato dagli enzimi dipendenti dal PLP per il percorso metabolico della chinurenina nella degradazione del triptofano, per il metabolismo degli sfingolipidi immunomodulatori, quali la ceramina e la sfingosina- fosfatata, e per la serina idrossimetilasi per la proliferazione delle cellule immunitarie.

In sintonia con le precedenti rilevazioni, nel presente studio è stata rilevata una relazione “ inversa “ fra i livelli di vitamina B 6 e la hsCRP (“ Proteina C – reattiva ad alta sensibilità “ che è un indicatore di infiammazione sistemica ! N.d.T.) nei pazienti affetti da EB .

Ed infatti i pazienti EB analizzati hanno manifestato livelli di hsCRP più alti di quelli rilevati nei soggetti sani e, cosa molto interessante, sono più alti nella EB Distrofica che nella EB Semplice.

Non si sono rilevate differenze tra i pazienti con EBS ed i soggetti sani. Ciò è probabilmente dovuto alla estensione delle parti interessate da vesciche e da ulcerazioni, sottolineando una possibile correlazione fra la gravità della malattia e l'intensità dello stato infiammatorio.

Perciò ipotizziamo che la carenza di vitamina B 6 sia conseguenza non solo di uno stato “ denutrizionale “, ma anche della situazione di infiammazione cronica tipica di questi pazienti.

La concentrazione degli “ eritrociti “ (ery – F) è un indicatore affidabile sia dello status dei folati che della alimentazione in generale, ed i siero – folati “ della alimentazione più recente ; una valutazione più chiara del quadro dei folati totali si ottiene usualmente valutando entrambi i parametri, come è stato fatto sia nel presente che in studi precedenti.

Nel presente studio il 50 % dei pazienti ha denunciato valori alterati di siero – folati a causa di insufficiente apporto nutrizionale ; ed infatti nei pazienti con peso corporeo sotto al terzo percentile i livelli di s – F sono risultati più bassi che negli altri pazienti.

Tuttavia i livelli di siero – folati non differiscono fra i malati ed i soggetti sani, evidenziandosi solo una leggera insufficienza nei pazienti EB .

Ciò è stato anche confermato valutando i livelli di ery – F , che si sono attestati all'interno degli intervalli di riferimento nella maggior parte sia dei pazienti che dei soggetti sani, e che sono risultati analoghi ai valori ottenuti da Ortega (...)

La determinazione della Cobalamina (vitamina B 12 ...v. Glossario), misurando anche la concentrazione della Holotranscobalamina, rappresenta un approccio per diagnosticare anche una sottile carenza della cobalamina stessa.

La Holotranscobalamina, un indicatore del quadro vitaminico B 12, che è in sostanza il complesso cobalamina – transcobalamina, rappresenta la parte biologicamente attiva della vitamina B 12 ed è circa un quarto del totale vitaminico B 12 presente nel siero; essa viene “ riconosciuta “ dai ricettori delle membrane delle cellule sparsi ovunque e può rappresentare una entità ad alto valore diagnostico come indicatore di “ immagazzinamento “.

E' stato dimostrato che la Holotranscobalamina è un indicatore più significativo del quadro vitaminico della B 12, se confrontato con la valutazione della quantità totale di cobalamina nel siero e può essere anche il più immediato e più sensibile rilevatore di carenza della vitamina stessa.

In sintonia con gli studi condotti da Ingen, Housz , Oro ed altri, i livelli di B 12 si sono attestati all'interno degli intervalli di riferimento nella maggior parte sia dei pazienti che dei soggetti sani.

Ciò è probabilmente dovuto al ricircolo enteroepatico (passaggio dal fegato all'intestino e viceversa N.d.T.) con il rallentamento di una precoce comparsa della carenza di cobalamina.

Anche se , come è stato appena affermato, i livelli di Holotranscobalamina nei due gruppi in analisi non sono risultati differenti, una alterazione è comunque stata evidente nel 10 % dei pazienti e dei soggetti sani.

In più i pazienti EB “ sotto – nutriti “ (con peso corporeo inferiore al terzo percentile) hanno manifestato concentrazioni ridotte di HoloTC , ma livelli vitaminici di B 12 compresi negli intervalli di riferimento se confrontati con i valori dei pazienti ben nutriti.

Da qui l'importanza della determinazione della HoloTC , come indicatore precoce ed immediato della carenza di B 12, allo scopo di monitorare il quadro clinico della cobalamina.

Tuttavia nel presente studio è stato assunto come riferimento il valore di soglia di una popolazione adulta (pari a 40 picomoli/ L ed oltre) e questo può rappresentare una limitazione e suggerire che siano necessari studi ulteriori che conducano a valutare i livelli di HoloTC in un campione più vasto in età pediatrica così da determinare un valore di soglia appropriato a questa fascia di età.

Ed ancora, considerando il metabolismo della Omocisteina, nonostante la presenza della B 6 e la carenza dei siero folati (s – F) in alcuni pazienti, le analisi multiple di regressione lineare hanno dimostrato che i livelli di Omocisteina totale non dipendono dalle vitamine con essa correlate metabolicamente. Ciò può essere dovuto al limitato numero di pazienti esaminati per cui si ritengono necessari ulteriori approfondimenti ampliando il campione dei pazienti EB da studiare.

Un fatto ben conosciuto è invece che perfino fra pazienti affetti dallo stesso “ tipo “ di EB, i sintomi clinici possono differire sensibilmente riguardo la gravità della malattia.

Il quadro nutrizionale di questi pazienti non è sempre in sintonia con la loro diagnosi genetica ma è piuttosto correlato con i sintomi clinici e può essere condizionato da altri fattori socio – economici.

Ed è per questo che nel presente studio abbiamo classificato la gravità della malattia per ogni singolo paziente utilizzando il metodo BEBS, che può aiutare a caratterizzare i pazienti con gravità del male severa o inaspettamente e contribuisce a determinare le correlazioni fra la manifestazione esteriore e la origine genetica.

Come già riportato in precedenza da altri ricercatori, il punteggio che si ottiene con il metodo BEBS ha una relazione evidente con l'età, suggerendo che il cambiamento del punteggio rispecchia le osservazioni cliniche, ed in particolare la progressione della malattia con l'età. Ed in aggiunta, il punteggio BEBS conferma la carenza della B 6 attribuibile a “ sotto – nutrizione “ e ad uno stato infiammatorio grave, nonché l'utilità della HoloTC come indicatore precoce della carenza di vitamina B 12.

I risultati del nostro studio sono in accordo con la considerazione sopra riportata, in particolare per quanto riguarda l'” Indice di Massa Corporea “ (BMI) ed i livelli della B 6 . Infatti nel nostro campione un malato di DDEB , nonostante la diagnosi genetica, ha mostrato buoni sintomi clinici (con un punteggio BEBS di 2), un BMI maggiore del 95% ercentile e livelli di B 6 nella norma .Tre pazienti con EBS invece hanno totalizzato 8, 17 e 25 punti nella valutazione BEBS, un BMI al di sotto del terzo percentile e livelli di vitamina B 6 sotto il limite inferiore dell'intervallo di riferimento.

6) – CONCLUSIONI –

I pazienti affetti da EB corrono il rischio di deficienze nutrizionali. Per quanto ci risulta, questo è il primo studio che esamina le possibili carenze nutrizionali (del gruppo vitaminico B) di pazienti in giovane età, analizzando il quadro clinico della Omocisteina.

La maggior parte dei pazienti sofferenti di EB hanno mostrato livelli di Omocisteina totale al di sopra del valore di soglia probabilmente a causa dei bassi livelli di vitamina B 6 e di siero – folati.

Infatti i livelli di s – F sono risultati bassi in circa la metà dei pazienti analizzati, ed ancor di più in quelli sotto – nutriti. E tuttavia confrontando i livelli di s – F fra i malati di EB ed i soggetti sani, abbiamo riscontrato una carenza “ leggera” solo nei primi.

La carenza di vitamina B 6 laddove consistente è da attribuire non solo alla de – nutrizione ma anche ad uno stato infiammatorio severo evidenziato da un aumento dei livelli della hsCRP (Proteina C – reattiva ad alta sensibilità).

Inoltre i livelli di Omocisteina totale non è possibile correlarli in maniera significativa con la carenza di vitamine con essa metabolicamente collegate (in particolare i siero – folati e la B 6) a causa del numero limitato di casi studiati.

Infine abbiamo anche sottolineato l'importanza della misurazione della HoloTC (Olotranscobalamina) come indicatore precoce della carenza di Cobalamina.

Per concludere, monitorare i livelli di Omocisteina totale e delle vitamine con essa coinvolte nel metabolismo ci permette di tracciare il quadro nutrizionale dei pazienti affetti da EB il che può rappresentare un aspetto essenziale per delineare le cure nel lungo periodo. Così come monitorare i livelli della vitamina B 6 riveste particolare importanza allo scopo di evitare sia una serie di complicazioni associabili a carenza di B 6, che gli stati infiammatori dovuti invece ad un eccesso della B 6 stessa.

7– RINGRAZIAMENTI –

Gli autori sono molto grati a Maria Coduri per la consulenza linguistica ed alla Onlus “ Amici del Bambino Malato “.

8 – FINANZIAMENTI –

Questo studio è stato sostenuto da una sovvenzione da parte del Ministero della Salute (Ricerca Corrente di Grant 2015 – 850/01) e dalla Onlus Amici del Bambino Malato (ABM).

9 – DISPONIBILITA' DI DATI E MATERIALE –

Tutti i dati ed i materiali utilizzati sono inclusi nel manoscritto in lingua inglese.

10 – CONTRIBUTI DEGLI AUTORI –

RDG ha progettato sia lo studio che le sperimentazioni, ha condotto gli esperimenti, analizzato ed interpretato i dati ottenuti ed ha stilato la prima stesura del manoscritto.

GV ha condotto gli esperimenti, analizzato ed interpretato i dati ottenuti

SG ed SS hanno “arruolato” i pazienti ed interpretato i risultati ottenuti

GC e FM hanno partecipato e contribuito al reclutamento dei pazienti

CDV, CD e RM hanno condotto le sperimentazioni

DC ha sviluppato le analisi statistiche

FB e SE hanno interpretato i dati e revisionato criticamente il testo

Tutti i ricercatori sono stati coinvolti nella stesura dei testi ed hanno dato approvazione definitiva alla versione sottoposta loro e pubblicata.

11 – CONFLITTO DI INTERESSI –

Tutti gli autori hanno dichiarato di non essere in “conflitto di interessi”.

12 – CONSENSO ALLA PUBBLICAZIONE –

I genitori dei giovani pazienti ed i pazienti al di sopra degli 8 anni hanno dato consenso scritto alla pubblicazione dei risultati.

13 – APPROVAZIONE DEI CODICI ETICI – CONSENSO A PARTECIPARE –

I protocolli del presente studio sono stati approvati dal Comitato Etico della Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico, in Milano. (N° di registraz. 2014 – 359) e svolti in conformità con le norme di buona pratica clinica per le sperimentazioni di medicinali su esseri umani.

Il consenso scritto su informativa di un genitore o di un tutore legale sono stati richiesti per individui al di sotto dei 18 anni, mentre per i soggetti al di sopra degli 8 anni è stato richiesto il loro assenso sottoscritto.

ROMA, 28 FEBBRAIO 2017

-- GLOSSARIO --

CHINURENINA Metabolita del Triptofano (v. più avanti) .

- **COBALAMINA** ovvero vitamina B 12, è sostanza di colore rosso altamente solubile in acqua .

- Ha : - n° 63 atomi di Carbonio
- n° 88 atomi di Idrogeno
- n° 1 atomo di Cobalto (!)
- n° 14 atomi di Azoto
- n° 14 atomi di Ossigeno
- n° 1 atomo di Fosforo
-

CRP Proteina C - reattiva . Proteina del sangue prodotta dal fegato.
E' " sintetizzata " durante uno stato infiammatorio.
La sua misurazione, insieme alla VES , può indicare o meno uno stato .
infiammatorio, come l'artrite reumatoide ed il lupus.
Livelli giusti intorno ai 6 mg / L

EDTA Acido etilendiaminotetracetico . E' un acido carbossilico. Trova larghissimo impiego ad es. nell'esame " emocromocitometrico " .

Ery – F Eritrociti – globuli rossi – emazie – sono cellule del sangue

HoloTC Holotranscobalamina . E' la fase attiva della vitamina B 12 . Circa il 25 % della cobalamina in circolo si trasforma in transcobalamina ed è a questo punto disponibile per le cellule e per l'organismo.

hs CRP " Proteina C – reattiva ad alta sensibilità " . E' un marcatore di infiammazione " sistemica " .

OMOCISTEINA Amminoacido solforato che si forma in seguito alla trasformazione.
enzimatica della Metionina (amminoacido presente nei latticini, carni.
legumi, uova , ecc ecc). I livelli normali nel plasma sono 5 - : 12.
micromoli per litro. La concentrazione di Omocisteina nel plasma è.
Dovuta alla interazione di fattori genetici, fisiologici o " acquisiti " .
Come una dieta povera di vegetali, farmaci, malattie ereditarie, ecc

- **PIRIDOSSALFOSFATO** Forma attiva della vitamina B 6 . Ha :

- n° 8 atomi di Carbonio
- n° 10 atomi di Idrogeno
- n° 1 atomo di Azoto
- n° 6 atomi di Ossigeno
- n° 1 atomo di Fosforo

Il piridossalfosfato è attivo in molte reazioni enzimatiche per il metabolismo di lipidi, amminoacidi e glucosio.

SERINA IDROSSIMETILASI Enzima che appartiene alla classe delle TRANSFERASI.

S – F Siero – folati . Il termine " folato " si riferisce alle vitamine del gruppo B presenti negli alimenti (i folati sono indicati come vitamina B 9).

SFINGOLIPIDI

Lipidi di natura NON conosciuta (da cui il radicale “ sfinge “).
Al gruppo appartengono sia il Ceramide che la Sfingosina fosfatata.

TRIPTOFANO

Amminoacido presente nelle proteine di origine animale.
Il fabbisogno giornaliero per l'organismo è di 250 mg.
La CHINURENINA è un metabolita del Triptofano.
L'enzima che produce la Chinurenina permette alle cellule “natural killer
di rivitalizzarsi.

- **ABBREVIAZIONI** -

BEBS

Birmingham Epidermolisi Bollosa Score (punteggio)

DDEB

Epidermolisi Bollosa Distrofica Dominante

RDEB

“ “ “ Recessiva

JEB

“ “ Giunzionale

EBS

“ “ Semplice

KS

Sindrome di Kindler