

Dal : INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES

Traduzione dall'inglese di : Stefano Gentile – Socio di DEBRA Italia

Autori : Susanna Esposito .- Sophie Guez. – Annalisa Orenti . – Gianluca Tadini . – Giulietta Scovera. – Alessia Scala . – Elia Biganzoli . – Emilio Berti . – Nicola Principi.

(per i “ profili “ professionali degli autori vedasi articolo originale in inglese)

AUTOIMMUNITA' E SQUILIBRIO DELLE CITOCHINE NELLA EPIDERMOLISI BOLLOSA EREDITARIA

Articolo pubblicato in data 24 settembre 2016

Il Traduttore ha ritenuto utile anteporre un “ glossario “ (in ordine alfabetico) con le definizioni dei termini meno conosciuti, con il ricorso a Dizionari scientifici, riviste scientifiche, Treccani e Wikipedia.

Può accadere che alcune definizioni non siano “ perfette “. Ed allora ce ne scusiamo vivamente. Le tabelle riassuntive NON vengono riprodotte e quindi ad esse si può ricorrere nell'originale in lingua inglese

Roma, dicembre 2016

GLOSSARIO

(in ordine alfabetico)

A) AUTOIMMUNITA'

Risposta ANOMALA del sistema immunitario tendente ad attaccare le cellule sane dell'organismo . Tipiche malattie derivanti da tale comportamento anomalo sono ad es. la celiachia, il diabete, l'artrite reumatoide, alcuni eritemi, ecc ecc .(v. anche lettera " L ")

B) BEBS (Birmingham Epidermolysis Bullosa Severity Score)

Metodo che si prefigge lo scopo di raggiungere un " punteggio " finale relativo alla gravità della malattia, tramite punteggi parziali riguardanti la severità nelle diverse zone del corpo dove la EB è presente.

E quindi le unghie delle mani , le unghie dei piedi, la estensione complessiva, le lesioni alla bocca (diversi livelli), agli occhi (diversi livelli) alla faringe (idem) alla laringe (idem) all'esofago (idem) escoriazioni sulle braccia, alopecia ecc ecc fino alle disfunzioni nutrizionali.

C) CITOCHINE

Son proteine di origine naturale alla produzione delle quali sono preposte cellule specifiche. Le citochine sono agenti " immunomodulatori " nel senso che possono modulare o ALTERARE le risposte del sistema immunitario . In sostanza sono importanti regolatori della risposta immunitaria . E perciò sono disponibili citochine " pro " infiammazione e citochine " anti " infiammazione ! **L'imbalance** è lo squilibrio (o lo sbilanciamento) fra i due gruppi.

D) COLLAGENE

E' la principale proteina del tessuto connettivo del mondo animale. Nell'uomo rappresenta circa il 6 % del peso corporeo. Ai fini del presente studio il più importante è il **collagene di tipo XVII (noto come COL 17 A 1)** - è " trans membrana " , attore importante in alcune forme di Epidermolisi Bollosa " giunzionale " –

E) DESMOGLEINE

(DSG 1 – DSG 3 ecc) Sono " glico proteine " presenti nei Desmosomi (v. più avanti). Se attaccate da anticorpi " anomali " ,(Ig A , Ig C) vengono distrutti i legami intercellulari e si manifesta la " lisi " delle cellule dello strato epidermico interessato.

F) DESMOSOMI

In termini semplici si tratta di strutture che fungono da punti di collegamento e coesione di cellule epidermiche adiacenti.

G) EPIDERMIDE

e' formata da **cinque** strati . Dall'esterno verso l'interno : Corneo, Lucido, Granuloso, Spinoso, Basale.

H) FENOTIPO

L'insieme della morfologia, dello sviluppo e del comportamento di un individuo (e quindi anche delle interazioni fra geni ad ambiente esterno.

I) GENI

Corrispondono a porzioni di genoma localizzate in precise posizioni all'interno della sequenza del DNA e **contengono le informazioni necessarie per la produzione di una proteina**. Sono "unità" ereditarie. Ogni gene "controlla" uno o più caratteri, come il colore degli occhi o dei capelli, la velocità di coagulazione del sangue ecc ecc .

GENI "DOMINANTI" e GENI "RECESSIVI"

Un gene è "dominante" quando concorrendo a determinare una caratteristica dell'individuo la propria azione prevale su quella di un altro gene preposto alla stessa funzione.

Quest'ultimo soccombendo viene chiamato "recessivo". Ad esempio il fatto che il colore degli occhi esca scuro è affidato ad un gene ; quello degli occhi chiari ad un altro gene . Se l'individuo risulterà avere gli occhi scuri, il primo gene è quello "dominante" e l'altro il gene "recessivo".

J) GENOTIPO

E' il "corredo" genetico di un individuo

K) IFN – gamma

Citochina facente parte della famiglia degli "interferoni" (prodotta dai linfociti B e T)

L) INTERLEUCINE

Proteine secrete da cellule del sistema immunitario ed in alcuni casi anche da cellule dell'endotelio e dall'epitelio. Per le funzioni che svolgono possono essere classificate come "citochine". A seconda dei compiti e delle funzioni che svolgono (e quindi anche nella zona dell'organismo nella quale agiscono) se ne contano 35.

Esempio curioso : la interleuchina 31 è la "citochina" centrale per l'induzione ed il mantenimento del prurito !.

M) MALATTIE AUTOIMMUNI

Si sviluppano quando il sistema immunitario non riconosce più alcune cellule sane (o comunque le colloca fra quelle da "combattere") e pertanto le attacca. E' quindi una risposta **anomala** del sistema immunitario.

Una malattia "autoimmune" può manifestarsi in diverse parti dell'organismo. Sono ad esempio malattie autoimmuni l'artrite reumatoide, la vitiligine, la psoriasi, il diabete di tipo 1, ecc ecc.

N) OMEOSTASI

E' un processo di protezione dell'organismo dalle interazioni con l'ambiente esterno.

Esempio : la temperatura del corpo (attorno ai 37 gradi)che nonostante le variazioni ambientali viene mantenuta costante (ovviamente entro certi limiti delle escursioni termiche esterne). Oppure il PH del sangue.

O) PEMFIGO

Dermatosi bollosa di natura "autoimmune" provocata dalla attività di auto – anticorpi anomali specifici (IgA oppure IgG) che attaccano i Desmosomi (v. lettera F)

P) TH

Linfociti "helper" – Regolatori delle risposte immunitarie . In particolare la famiglia dei TH 17 comprende : IL 17 A / B / C / D / E / F ed anche il 25

1 – INTRODUZIONE

1.1 La Epidermolisi Bollosa Ereditaria abbraccia un gruppo eterogeneo di patologie rare, trasmesse per via genetica, che comprende differenti malattie della pelle o differenti manifestazioni di “ vescicole “ della pelle , con un fondamento “ monogenico “ oppure trasmesse per ereditarietà di un gene difettoso “ dominante “ o di uno “ recessivo “.

1.2 Inizialmente le varie manifestazioni di Epidermolisi erano classificate a seconda della intensità con la quale le vesciche si manifestavano ed erano distinte in :

Epidermolisi Bollosa Semplice (EBS) con fragilità della pelle e comparsa di vescicole confinate a livello della “ epidermide “. (v. Glossario)

Epidermolisi Bollosa di Giunzione (IEB) con formazione di vesciche fra i diversi strati della pelle in zona “ membrana “.

Epidermolisi Bollosa Distrofica (DEB) con formazione delle vesciche nello strato superiore del “ derma “.

Epidermolisi Bollosa Distrofica Recessiva (RDEB) (non si dispone di dettaglio clinico, ma è da ricondurre alla definizione di “ geni “ - v. Glossario .NdT)

Epidermolisi Bollosa con Sindrome di Kindler che comprende tutte le manifestazioni caratterizzate oltre che da specifiche caratteristiche cliniche (v. sensibilità anomala alla luce), dallo sviluppo simultaneo di vesciche in diversi strati della pelle – in area “ membrana “.

1.3 Tuttavia sono state individuate clinicamente differenti sottospecie, raggruppate in diversi gruppi a seconda delle loro caratteristiche genetiche e del modo di manifestarsi. Per queste ragioni negli ultimi anni è stato introdotto un nuovo criterio di classificazione detto “ a buccia di cipolla”. Questo nuovo approccio tiene conto in sequenza dei vari tipi di EB , sempre tenendo anche conto della vecchia classificazione, nonché delle caratteristiche con le quali la malattia si manifesta, il “ livello “ di ereditarietà, le proteine esaminate e la loro presenza nella pelle, i geni coinvolti, i tipi di “ mutazioni “ presenti e laddove possibile le mutazioni specifiche e la loro localizzazione .

1.4 La scala di Gravità della Epidermolisi Bollosa di Birmingham (**BEBS**) è stata riconosciuta come valida per la classificazione della gravità della malattia.(v. Glossario).

Essa tiene conto ed assegna un punteggio alla estensione della pelle danneggiata, al coinvolgimento delle unghie, della bocca , degli occhi, della laringe e dell’esofago, nonché alle ferite alle mani, alle lesioni cancerogene della pelle, alle piaghe croniche con persistenza di almeno sei mesi, all’alopecia e alle disfunzioni nutrizionali.

L’estensione della EB è valutata al max 50 punti e le altre dieci voci sono valutate ciascuna max 5 punti, per raggiungere un punteggio finale massimo di 100 punti.

1.5 La Epidermolisi Bollosa è provocata da mutazioni di geni (v. Glossario) deputati a codificare alcune proteine specifiche strutturali della pelle. Ad esempio le mutazioni dei geni KRT 5 e KRT 14 che “ tutelano “ i filamenti cheratinosi di tipo 1 e di tipo 2, possono essere responsabili dell’insorgere della EB di tipo “ Semplice “, laddove invece le mutazioni del gene COLT 7 A 1 (v. Glossario) deputato al collagene di tipo VII (COL 7) sono causa di DEB.

1.6 Tuttavia non sono del tutto individuate le correlazioni fra “ genotipo “ e fenotipo “ (v. Glossario) tanto che individui con le stesse mutazioni genetiche, hanno di frequente manifestato caratteristiche cliniche molto differenti. Queste osservazioni ci consentono di ritenere valida la possibilità che nella genesi delle EB, oltre alle alterazioni provocate da mutazioni genetiche, altri fattori significativi entrino in gioco. Diversi segnali sembrano rafforzare questa ipotesi.

1.7 Innanzitutto alcuni casi di EB sono aggravati da malattie “ autoimmuni “ (v. Glossario) extracutanee. Inoltre in diversi pazienti affetti da EB si possono riscontrare livelli di anticorpi antiepidermici in misura proporzionale alla gravità della malattia in questione. Infine è acclarato nella EB un significativo squilibrio delle citochine (v. Glossario) che lascia pensare ad una “ patologia “ infiammatoria sistemica, “ strutturale “.

1.8 Tutte queste valutazioni portano a ritenere che la Epidermolisi Bollosa sia essa stessa una patologia “ strutturale ” nella quale diversi fattori contribuiscono al manifestarsi , svilupparsi ed eventualmente aggravarsi delle differenti forme di EB. La validazione di queste ipotesi potrebbe avere importanti conseguenze per la diagnosi ed il trattamento delle EB.

1.9 Le concentrazioni di anticorpi antiepidermici e delle citochine pro – infiammazioni possono giocare un ruolo nella gravità della malattia e rappresentare uno strumento utile a stabilire una prognosi sulle Epidermolisi Bollose. Ed in più i farmaci utili a regolare i disturbi da autoimmunità e gli scompensi infiammatori possono rivelarsi dei trattamenti opzionali per la cura di malattie complesse, talvolta anche molto acute, per le quali non è attualmente disponibile alcuna terapia di successo

1.10 Il presente studio è stato concepito per determinare nel siero le concentrazioni di citochine e di anticorpi antiepidermici in un gruppo di pazienti affetti da differenti tipologie di EB, allo scopo di studiare le correlazioni fra il “ fenotipo “ di EB ed il livello di gravità della malattia in questione.

2. RISULTATI

2.1 Lo studio ha coinvolto un insieme di 42 pazienti affetti da EB (dei quali 24 maschi di età media 15,4 anni – min 1 anno, max 29 anni) e 38 soggetti sani (dei quali 20 maschi di età compresa fra un anno e mezzo e 29 anni).

N° 13 pazienti con EBS

N° 22 pazienti con DEB

N° 3 pazienti con DDEB (Epidermolisi Bollosa Distrofica Dominante)

N° 5 pazienti con JEB

N° 2 pazienti con Sindrome di Kindler

Tabella 1

2.2 La tabella 1 riporta i livelli nel siero di anticorpi antiepidermici e delle citochine di tutti i soggetti sottoposti ad analisi (per un totale di 80). Gli anticorpi antiepidermici sono risultati presenti in misura molto maggiore nei pazienti affetti da EB che nei soggetti sani. (si vedano le voci Desmogleine 1, Desmogleine 3, BP 180, BP 230, e COL 7). Lo stesso andamento si è manifestato per molte citochine (IL 1 beta, IL 2, IL 6, IL 10 , che sono interleuchine - v. Glossario) , TNF beta ed IFN gamma.

2.3 Il livello delle interleuchine IL 8 ed IL 12 nel siero è risultato più alto nei malati di EB che nei soggetti sani anche se la differenza NON appare statisticamente rilevante. L'interleuchina IL 4 ed il TNF alfa sono stati rilevati presenti nei due gruppi NELLA STESSA MISURA.

Tabella 2

2.4 La tabella 2 riporta il confronto delle concentrazioni nel siero degli anticorpi e delle citochine rilevate nei pazienti RDEB rispetto a tutte le altre forme di EB nonché il confronto fra queste ultime ed il campione sano. Le tipologie di EB non classificate come RDEB sono state considerate nel loro insieme perché ad una valutazione preliminare non hanno peso le differenze fra le varie tipologie .

2.5 I dati riportati indicano che l'aumento delle concentrazioni di anticorpi antiepidermici è più spinto nei pazienti affetti da RDEB rispetto a tutti gli altri. Così come nei pazienti delle “ altre “ EB le concentrazioni delle grandezze analizzate rimangono più alte rispetto al campione sano. Le differenze fra i pazienti affetti da RDEB rispetto agli altri tipi di EB sono significativamente rilevanti per tutti gli anticorpi misurati ad eccezione dell'anticorpo DSG 1 (v. Glossario) dopo la correzione con il protocollo Benjamini – Hochberg. Tuttavia riguardo all'anticorpo DSG 1 le concentrazioni medie nel siero di pazienti affetti da RDEB sono circa il doppio rispetto ai pazienti delle altre forme di EB.(!)

2.6 Per contro le concentrazioni medie delle citochine analizzate e misurate non sono molto differenti fra i pazienti affetti da RDEB e le altre forme di EB pur rimanendo più alte nei primi. E comunque le concentrazioni di IL – 1 beta, IL – 2 , IL – 6 , e di TNF beta sono risultate sensibilmente più elevate nel gruppo di pazienti con “ altre “ EB rispetto al gruppo di soggetti sani.

Tabella 3

2.7 La tabella 3 riporta i risultati delle grandezze analizzate in pazienti con EB “ localizzata “ e pazienti con EB “ generalizzata “ rispetto al gruppo di soggetti sani. Gli anticorpi – antiepidermici sono molto più presenti nei casi di Epidermolisi Bollosa “ generalizzata “ rispetto a quella “ localizzata “ ed ancora una volta i pazienti con EB localizzata hanno concentrazioni di anticorpi – antiepidermici superiori ai soggetti sani, con differenze particolarmente significative solo per il Collagene COL 7.

2.8 Per quanto concerne le concentrazioni di citochine nel siero, anche se le interleuchine IL 1 beta, IL 2, IL 6, ed IL 8 ed il TNF alfa erano presenti in misura maggiore nei pazienti con EB “ generalizzata “ rispetto alla EB “ localizzata “, le differenze fra i due gruppi non sono significative. E comunque il gruppo di soggetti sani ha fatto rilevare valori sensibilmente più bassi di IL 1 beta, IL 2, IL 6, e TNF beta ed IFN gamma rispetto ai pazienti con EB “ localizzata”.

Tabella 4

2.9 La tabella 4 riporta le comparazioni fra le grandezze analizzate in pazienti affetti da EB con valori alti e valori bassi del punteggio BEBS. Gli anticorpi antiepidermici sono significativamente più alti nei pazienti con un punteggio alto di BEBS che in quelli con punteggio basso di BEBS. Stesso risultato fra questi ultimi ed il campione di soggetti sani, con forti differenze per i DSG 3, BP 180, BP 230, ed il COL 7.

2.10 In più anche se le IL 1 beta, IL 2, IL 6, TNF alfa ed IFN gamma sono risultate in generale più alte nei pazienti con alto punteggio BEBS che in quelli con punteggio basso; si ritengono significative solo le differenze di IL 6 , dopo la correzione con il protocollo Benjamini – Hochberg. E per concludere ancora una volta i pazienti affetti da EB con basso punteggio BEBS hanno fatto rilevare concentrazioni di IL 1 beta, IL 2, IL 6, IL 10, IL 12, TNF beta ed IFN gamma più alte rispetto ai soggetti sani.

Tabella 5

2.11 La tabella 5 sintetizza le correlazioni fra gli anticorpi antiepidermici, i livelli di citochine nel siero ed i punteggi di BEBS nei pazienti affetti da EB. I punteggi di BEBS sono direttamente correlati con gli anticorpi BP 180, BP 230 ed il collagene COL 7, nonché con le interleuchine IL 6. Queste ultime appaiono significativamente collegate anche con DSG 1, DSG 3, BP 180, BP 230 e COL 7. (vedasi Tabella 6)

3. DISCUSSIONE

3.1 La presente ricerca dimostra che fenomeni infiammatori ed “ autoimmuni “ si manifestano frequentemente nelle Epidermolisi Bollose così da giocare un ruolo nella “ evidenza “ clinica della malattia.

3.2 Diversi anticorpi antiepidermici sono risultati più alti nei pazienti EB rispetto al campione sano ed i livelli crescenti strettamente legati alla gravità della malattia ed al fenomeno infiammatorio (prevalentemente denunciato dall’aumento delle interleuchine IL 6).

3.3 I pazienti con RDEB (e cioè la Epidermolisi con le manifestazioni cliniche più “ importanti “), il gruppo con EB “ generalizzata “ e quelli con alti punteggi di BEBS hanno mostrato l’incremento più elevato nelle concentrazioni di anticorpi antiepidermici e di citochine.

3.4 I nostri risultati amplificano quanto riportato dal TAMPOIA il quale analizzando nel siero le concentrazioni degli anticorpi BP 180, BP 230, e COL 7 , ha trovato che i livelli erano sensibilmente più elevati in pazienti affetti da RDEB rispetto a pazienti affetti da Epidermolisi Bollosa Semplice e le concentrazioni strettamente collegate al livello di gravità della malattia.

3.5 Nel nostro studio, oltre agli anticorpi anti – BP 180, BP 230 e COL 7 sono stati presi in considerazione anche gli anticorpi anti – DSG 1 e DSG 3 .Queste proteine appartengono alla “ superfamiglia “ delle molecole tipo “ cadherin “ (cioè “ Calcium -.dependent adhesion “ / adesione influenzata da Calcio bivalente), che influenzano l’adesione cellula – cellula e sono fra i componenti fondamentali delle giunzioni fra cellule, contribuendo a resistere alle azioni di sfregamento e sono rilevate in alte concentrazioni in cellule sottoposte a stress meccanici (tipici ad es. dell’urto).

3.6 Il ruolo “ patogenico “ di questi anticorpi è stato rilevato con sperimentazioni prima su animali e poi sull’uomo. **Gli anticorpi anti – collagene COL 7 iniettati nelle cavie hanno causato la formazione di vescicole .**

3.7 La circolazione di “ autoanticorpi “ attivi contro l’adesione fra derma ed epidermide è determinante per l’insorgere di patologie come la Epidermolisi Bollosa Acquisita, una malattia “ autoindotta “ clinicamente assimilabile alla EB. Incrementi delle concentrazioni di BP 130 e BP 180 sono tipicamente rilevabili nel siero di pazienti affetti da PEMFIGO BOLLOSO (v. Glossario). Ed infine gli anticorpi che attaccano le desmogleine DSG 1 e DSG 3 sono stati rilevati nel PEMFIGO SEMPLICE ed in quello ESFOLIANTE.

3.8 Ciononostante non si può escludere che i livelli più elevati di anticorpi antiepidermici possano essere la conseguenza di un deterioramento delle condizioni della pelle. In analogia con quanto è stato dimostrato in diverse malattie autoimmuni contratte sulla pelle vi sono indicazioni

che nella Epidermolisi Bollosa l'insorgere di reazioni autoimmunitarie possa essere causa di ulteriori danni alla pelle stessa !

3.9 Si potrebbe supporre che per la Epidermolisi Bollosa i danni alla pelle ed alle mucose siano determinati da fattori genetici, ma possano anche essere aggravati dall'insorgere di una "attività" immunitaria che in qualche caso può avere un ruolo prevalente nell'aumentare la gravità delle manifestazioni cliniche.

3.10 In ricerche condotte su animali, si è riscontrato che il collagene COL 7 è presente nei tessuti gastro – intestinali e può essere danneggiato da anticorpi anti – COL 7. Per di più in pazienti affetti da EB si possono sviluppare diverse malattie " autoimmuni " (v. Glossario). Sono state ampiamente illustrate complicazioni renali e gastrointestinali comprese la celiachia, l'amiloidosi, la glomeronefrite e la nefropatia IgA. Ed infine, nella Epidermolisi Bollosa Acquisita su circa il 30 % dei pazienti si sono rilevate patologie infiammatorie intestinali.

3.11 Diverse ipotesi sono state formulate per tentare di spiegare come mai nella EB Ereditaria una reazione autoimmune possa aggravare la patologia di partenza. Ma gli " inneschi " precisi del crollo della auto – tolleranza e dei conseguenti accadimenti che portano a reazioni autoimmuni patogeniche rimangono tuttora non individuati.

3.12 Considerando che i bambini affetti dalle forme più acute di EB " fenotipiche " presentano di solito un numero più elevato di infezioni sulla pelle, si potrebbe supporre che una eterogeneità di microorganismi alterati possa condurre ad un peggioramento delle infiammazioni sulla pelle e delle difese immunitarie.

3.13 Alcuni risultati raccolti nel presente ed in altri studi concernenti lo squilibrio delle citochine in pazienti affetti da EB suggeriscono che il manifestarsi di una reazione infiammatoria cronica possa spiegare almeno in parte l'insorgere del comportamento anomalo del sistema immunitario con il conseguente deterioramento ed estensione delle lesioni tipiche della EB.

3.14 Le citochine giocano un ruolo centrale nell'insorgenza delle malattie derivanti dal comportamento deviato del sistema immunitario. E l'aumento nel siero dei livelli di alcune citochine è associato con l'insorgere ed il progredire di malattie sistemiche " autoimmuni ". In particolare le citochine pro – infiammazione contribuiscono all'insorgenza ed alla propagazione delle infiammazioni, sebbene il contributo di ciascuna citochina sia influenzato sensibilmente dalla sua concentrazione, dallo " stadio " della malattia nel momento in cui la citochina in esame viene liberata e della sua interazione con le altre citochine , in particolare con quelle che esercitano effetti anti – infiammatori.

3.15 La citochina IFN gamma è considerata un indicatore tipico delle infiammazioni provocate da un comportamento anomalo del sistema immunitario e la sua somministrazione in alcune cavie ha determinato l'insorgere di malattie " autoimmuni ". In sperimentazioni su animali, il rilascio persistente di interleuchine della famiglia IL 1 è stato associato con il manifestarsi di gravi malattie del sistema cardio – vascolare e del metabolismo, incluse mutazioni aberranti dello spessore delle pareti dei vasi sanguigni, con stenosi dell'aorta, ingrossamento del cuore, danni agli arti, alla circolazione nella coda (!), perdita di tessuti grassi, e sistematico deposito di amiloidi in diversi organi del corpo, con conseguenti disfunzioni del fegato e dei reni.

3.16 Aumenti delle interleuchine del gruppo IL 7 possono avere conseguenze importanti perché queste citochine favoriscono la differenziazione dei TH 17 (v. Glossario). Studi recenti condotti su

animali ed in pazienti affetti da sclerosi multipla ed artrite reumatoide hanno mostrato che le interleuchine IL 17 liberate dalla cellule TH 17 giocano un ruolo nell'indurre malattie "autoimmuni", prevalentemente influenzando la risposta immunitaria innata.

3.17 Ed in più è stato manifestato in uno studio che i linfociti "helper" TH 17 partecipano alle manifestazioni patologiche della pelle ed alla fibrosi polmonare favorendo la produzione di fibroblasti (cellule tipiche del tessuto connettivo) e la produzione di citochine, in un campione murino di sclerosi sistemica, trattato con antibiotico biomicina. In questo studio la maggior parte delle citochine con attività infiammatoria (come IL 1 beta, IL 2 , IL 6, TNF beta, ed IFN gamma) erano sensibilmente più alte in pazienti affetti da EB che in individui sani, ed i livelli più alti nei pazienti affetti da RDEB rispetto alle altre forme di Epidermolisi.

3.18 Inoltre i livelli nel siero delle interleuchine IL 6 erano strettamente correlati con la estensione e la gravità delle forme di EB nonché con la concentrazione di anticorpi – antiepidermici. L'aumento delle citochine pro – infiammazione sembra confermare che la Epidermolisi Bollosa sia una patologia " di sistema ", spiegando così il coinvolgimento di manifestazioni extracutanee rilevate di frequente nelle EB.

3.19 L'intensità delle reazioni infiammatorie sembra essere determinante nel condizionare l'attività " autoimmune " e di conseguenza determinante per la gravità della malattia. E sono stati rilevati nel siero e nel liquido presente nelle vesciche sia di pazienti che di animali con EB acquisita, livelli crescenti di diverse citochine (incluse IL 1 ed IL 6) non molto diverse da quelle rilevate con il presente studio.

Per di più nella maggior parte dei casi, l'attività della malattia è commisurata ai livelli di citochine, confermandosi il contributo di queste proteine al manifestarsi di lesioni sulla pelle.

3.20 In linea con i risultati dello studio condotto da Annichiarico ma in contrasto con i risultati pubblicati diversi anni or sono da Chopra , nel presente studio si è dimostrato un incremento nel siero della concentrazione di IL 2 per patologie di EB **a prescindere dalla gravità della malattia stessa.**

3.21 La individuazione della interleuchina IL 2 è essenziale per lo sviluppo, l'attività e l'omeostasi (v. Glossario) delle cellule " T – regolatrici ", tanto che nelle malattie della pelle si sono riscontrati livelli più alti di questa citochina (esempio tipico nella psoriasi).Ma c'è di più : la riduzione di IL 2 combinata con la riduzione di altre citochine " pro – infiammazioni " si è rilevata associabile a significativi miglioramenti di malattie della pelle.

3.22 Benchè sarebbero necessari ulteriori elementi riguardanti il vero ruolo della IL 2 nelle EB per spiegare i risultati discordanti, l'incremento di IL 2 potrebbe comunque rappresentare un ulteriore indicatore dello " squilibrio " delle citochine presenti nei vari casi di EB che potrebbe portare a reazioni "autoimmuni " ed a coinvolgimenti sistemici dell'organismo.

4. MATERIALI E METODI

4.1 ANALISI DEL CAMPIONE, SELEZIONE E " COINVOLGIMENTO "

4.1.1 Lo studio è stato condotto fra il 1° Aprile 2015 ed il 30 Settembre 2015 ed ha interessato tutti i pazienti affetti da EB regolarmente seguiti dal " Centro per la Epidermolisi Bollosa " presso la Fondazione IRCSS Cà Grande dell'Ospedale Maggiore Policlinico - Università degli Studi di Milano.

4.1.2 Fenotipi (v. Glossario) clinici, analisi al microscopio elettronico su campioni ottenuti da biopsie della pelle, nonché analisi delle mutazioni genetiche hanno consentito le diagnosi in accordo con i criteri del Terzo Meeting Internazionale sulle Diagnosi e le Classificazioni delle Epidermolisi Bollose.

4.1.3 Subito dopo l'arruolamento si è proceduto alla registrazione completa delle caratteristiche demografiche e della " storia clinica " di tutti i pazienti utilizzando dei questionari cartacei standardizzati. **La gravità della EB è stata indicata utilizzando la scala dei punteggi BEBS (Birmingham EB Severity Score).**

NOTA : (vedasi anche Glossario) .Si tratta della rilevazione di coinvolgimenti delle unghie, della bocca, della laringe, dell'esofago con livelli diversi di " intensità " nonché la presenza di cicatrici croniche, alopecie cicatrizzanti, melanomi, anche questi con graduatorie crescenti, per terminare con disturbi della nutrizione per i quali, ad esempio, il livello **5** è classificato " cachettico ".

4.1.4 E' stato creato anche un gruppo di " controllo ", formato da soggetti sani con analogo assortimento per età e per genere, esenti da malattie croniche latenti e mai interessati da qualunque disturbo della pelle.

4.1.5 Ai pazienti coinvolti ed ai soggetti sani è stato prelevato un campione di sangue di 5 ml allo scopo di misurare le citochine nel siero e gli anticorpi – antiepidermici. Il protocollo è stato approvato dalla Commissione Etica della Fondazione IRCSS ed è stato richiesto ed ottenuto il consenso scritto dei soggetti coinvolti, sottoscritto da entrambi i genitori o da un giudice tutelare per i minori di 18 anni.

4.2 MISURAZIONI DELLE CITOCINE

4.2.1 Le concentrazioni di IL 1 beta, IL 2, IL 4, IL 6, IL 8, IL 10 ed IL 12 nel siero, i " fattori di necrosi tumorale " THF alfa e TNF beta, e l'interferone IFN gamma, sono stati misurati con saggi di " immunoassorbimento enzimatico " (ELISA) (con kit della RAY BIOTECH americana) seguendo le istruzioni della Casa Produttrice.

4.2.2 I sieri sono stati sottoposti ad un periodo di incubazione di 150 minuti a temperatura ambiente. Dopo un lavaggio per rimuovere le proteine non aggregate , è stato aggiunto un substrato di Tetrametilbenzidina incubando il tutto per 10 minuti a temperatura ambiente.

4.2.3 La soluzione acida è stata aggiunta ad ogni campione (vetrino ? NdT) per portare a termine la reazione enzimatica e stabilizzare lo sviluppo del colore.

4.2.4 Il valore di ogni campione è stato determinato confrontando la densità ottica del campione con quella del calibratore ed è stato espresso in pg/ml. L'assorbenza è stata misurata con un lettore ELISA a 450 nm (di fabbricazione BIO – RAD – USA).

4.3 RILEVAZIONI DEGLI ANTICORPI – ANTIEPIDERMICI

4.3.1 Gli anticorpi aggressivi nei confronti della Desmogleina 1, della Desmogleina 3 e del Pemfigo Bolloso 180 (BP 180) del BP 230 e del Collagene COL 7 vengono rilevati con un metodo ELISA (v. paragrafo 4.2.1) commercializzato dalla giapponese MBL International . Sono stati rispettati i protocolli prescritti dalla Casa Produttrice.

4.3.2 In breve sono stati diluiti sia l'agente calibratore che il siero del paziente e quello del soggetto sano, aggiunti ad ogni " pozzetto " di una piastra a micro pozzetti, coperti con antigeni sterilizzati ed incubati per 60 minuti a temperatura ambiente.

4.3.3 Dopo un lavaggio con soluzione tampone contenente PBS tween 20, 100 microlitri di soluzione contenente per ossidasi estratta da radice di rafano ed anticorpi – anti-umani IgG di capra sono stati aggiunti in ogni pozzetto ed incubati per 60 minuti a temperatura ambiente.

4.3.4 Dopo un lavaggio intenso, è stato aggiunto un substrato di tetrametilbenzidina ed incubato per 30 minuti a temperatura ambiente. La soluzione acida è stata a questo punto aggiunta in ogni pozzetto per portare a termine la reazione enzimatica e stabilizzare lo sviluppo della colorazione.

4.3.5 Il valore di ogni campione è stato determinato confrontando la densità ottica del campione in esame con la densità ottica del calibratore. Valore espresso in U/ml. La assorbenza è stata misurata con un lettore ELISA a 490 nm.

4.4 ANALISI STATISTICHE

4.4.1 I livelli degli anticorpi – anti-epidermici misurati nel siero e le citochine studiate sono stati espressi sia per i pazienti che per i soggetti sani in termini di valore medio e di " intervallo " di valori poiché la loro distribuzione è risultata asimmetrica e si sono rilevati anche valori " anomali ".

4.4.2 Per stabilire se le differenze rilevate nei livelli del siero dei pazienti e di quello dei soggetti sani fossero statisticamente accettabili, si è condotto un test di WILCOXON sulla somma dei ranghi, perché questo test consente di effettuare comparazioni fra i valori mediani di due distribuzioni (di due " diagrammi ").

4.4.3 A causa della presenza di soggetti con gli stessi livelli nel siero è stata scelta una versione severa del test sopra citato alla quale è stato applicato un fattore di correzione. Ed in più i p –values sono stati per test multipli con il ricorso al metodo del " tasso di false rilevazioni " (procedura Benjamini – Hochberg).

4.4.4 Gli stessi criteri di analisi (e cioè la determinazione di valori mediani e di intervalli di valori applicando il test di WILCOXON sulla somma dei ranghi ed estendendo i controlli ai test multipli) sono stati adottati per comparare la RDEB (Epidermolisi Bollosa Distrofica Recessiva, una delle più gravi) e le altre forme di EB, comparare la EB localizzata con quelle " estese " (in sintonia con la classificazione di FINE) e comparare le EB leggere con quelle gravi (in sintonia con i criteri di punteggio della BEBS - v. Glossario – per i quali criteri, pazienti con punteggio finale al di sopra di 23,5 sono classificati affetti da EB grave).

4.4.5 Le correlazioni fra i punteggi BEBS, gli anticorpi – anti-epidermici e le citochine nonché le correlazioni fra i livelli di interleuchine IL 6 nel siero e le concentrazioni di anticorpi – anti-epidermici sono state valutate con il coefficiente di SPEARMAN. Tutte le analisi statistiche sono state condotte con l'ausilio di un software " R – Software 3.2.2 (Austria).

5 – CONCLUSIONI

5.1 I dati ottenuti dal presente studio dimostrano che le reazioni di tipo " autoimmunitario " ed infiammatorio sono manifestazioni frequenti nelle Epidermolisi Bollose, il che aggiunge nuove informazioni sulla patogenesi delle EB stesse. Ma c'è di più : Questo studio sembra suggerire nuovi approcci terapeutici per una malattia per la quale non sono ancora disponibili cure efficaci.

5.2 Il ricorso a farmaci o medicinali che contrastino l'intervento del sistema immunitario e che quindi siano attivi contro le citochine " favorevoli " alle infiammazioni (che risultano, queste ultime, essere la più importante causa di stati infiammatori e di processi di " attacco " al sistema immunitario), può portare a ridurre le manifestazioni cliniche o i sintomi della EB E migliorare sensibilmente la qualità della vita dei pazienti coinvolti.

5.3 Pertanto si sente proprio il bisogno urgente di studi mirati, nonché di analisi approfondite di potenziali **effetti collaterali indesiderati** (incluso l'eventuale sviluppo di infezioni) che se emergenti sono da collegare strettamente all'uso di farmaci " immunosoppressori " . Tutto ciò con l'obiettivo di affrontare una malattia come la Epidermolisi Bollosa , ancora oggi assolutamente difficile da debellare !

NOTA DEL TRADUTTORE : Si rimanda al testo originale in lingua inglese per l'elenco completo degli autori, tutta la bibliografia di riferimento nonché l' " abstract " di apertura.

ROMA, DICEMBRE 2016