



Ruolo dell'ossido nitrico esalato nei pazienti con discinesia ciliare

Luca Artusio, Ilaria Brambilla, Patrizia Bulzomì, Letizia Lupo, Elisabetta De Sando,
Giulia Masa, Silvia Caimmi, Gian Luigi Marseglia

Clinica Pediatrica, Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia

Abstract

Ruolo dell'ossido nitrico esalato nei pazienti con discinesia ciliare

La Discinesia Ciliare Primitiva (DCP) è una rara patologia ereditaria caratterizzata da alterazione strutturale e compromissione funzionale delle ciglia. Questo comporta frequenti infezioni delle alte e basse vie respiratorie, *situs viscerum inversus* e problemi di sterilità maschile. Per procedere da un sospetto diagnostico ad una diagnosi certa è necessario affiancare ad un quadro clinico suggestivo la rilevazione di specifiche mutazioni nei geni responsabili della struttura ciliare o l'osservazione di modificazioni strutturali o funzionali delle ciglia nel tessuto prelevato dal paziente. La misurazione dell'ossido nitrico è di grande utilità nel discriminare i soggetti probabilmente affetti da DCP da quelli che non lo sono, permettendo di riservare le indagini più invasive e costose ad individui più probabilmente malati. L'ossido nitrico nei casi di DCP ha valori sempre al di sotto della norma. La sua misurazione è abbastanza agevole, non invasiva ed economica, tutte caratteristiche che lo pongono in primo piano come test di *screening* nei soggetti fenotipicamente candidati alla diagnosi di DCP.

The role of exhaled nitric oxide in patients with primary ciliary dyskinesia

Primary Ciliary Dyskinesia (PCD) is a rare hereditary disorder characterized by structural alteration and functional compromising of cilia. This results in frequent infections of the lower and upper airways, *situs viscerum inversus* and male sterility. In order to proceed from a suspect diagnosis to a certain diagnosis it is necessary to identify the specific mutations of genes responsible for the structure of cilia and/or to observe the structural and functional modifications of the cilia from the patient tissue sample, along with the general suggestive clinical picture. The measuring of Nitric Oxide is very useful in discerning which patients are probably affected by PCD from those who are not, reserving of course the more invasive and expensive research methods for those who are more likely to be affected. Nitric Oxide in cases of PCD will always be present in concentrations below the norm. It is a fast, reliable and easy to perform measure. In addition, it is non-invasive and low cost, all of which are characteristics that make it a feasible first choice as a screening test in subjects which are phenotypic candidates for PCD diagnosis.

Introduzione

La discinesia ciliare primitiva (DCP) è una patologia ereditaria caratterizzata da alterazioni ultrastrutturali delle ciglia, in genere a trasmissione autosomica recessiva e con un'incidenza di 1:15000-40000. Le ciglia sono estroflessioni cellulari caratterizzate da una struttura molecolare complessa definita assonema. Nella sezione trasversale di un normale ciglio si possono osservare 9 doppiette di microtubuli periferici collegate ad una coppia centrale per mezzo di ponti radiali. Le 9 doppiette sono inoltre collegate tra loro da ponti di nexina. Da ogni doppietta periferica sporgono due bracci di dineina, uno interno e uno esterno. Questi, dotati di attività ATPasica, sono necessari per la motilità ciliare (figura 1). Nella DCP le alterazioni possono essere presenti a diversi livelli dell'ultrastruttura (difetti a carico dei bracci di dineina, difetto dei raggi, difetto dei microtubuli centrali, disorganizzazione dell'assonema), in alcuni casi le ciglia sono addirittura assenti e in rari altri le ciglia hanno apparente normale ultrastruttura e le alterazioni sono quindi di tipo funzionale.

Le modificazioni sopra elencate alterano la funzionalità delle ciglia con ripercussioni sui tessuti normalmente ciliati. A livello dell'apparato respiratorio le ciglia sono responsabili della *clearance* mucociliare: con il loro battito sincronizzato allontanano il muco con le sostanze e i microrganismi in esso intrappolati. Le ciglia svolgono anche un ruolo nella rotazione dei visceri durante l'embriogenesi e l'assonema costituisce il flagello dello spermatozoo rendendosi indispensabile per la sua motilità. È evidente come un'alterazione ciliare comprometta tutte queste funzioni. Un deficit della *clearance* mucociliare determinerà una condizione infettivo-infiammatoria cronica delle vie respiratorie superiori ed inferiori che si manifesterà clinicamente con distress respiratorio neonatale, congestione nasale cronica, tosse produttiva cronica, infezioni ricorrenti delle basse vie respiratorie, bronchiectasie, otite media cronica e sinusite cronica. La malrotazione viscerale si manifesterà con *situs viscerum inversus* totale o eterotassie di diverso grado. Le alterazioni o la mancanza di motilità della coda dello spermatozoo renderà il paziente sterile.

Nel 50% dei pazienti con DCP è presente la triade 1) bronchiectasie, 2) sinusite cronica 3) *situs viscerum inversus*, che definisce la sindrome di Kartagener, nella quale spesso poi si associano anomalie dei seni paranasali (polipi nasali ed agenesia dei seni frontali), rinite ed otite.

Caso Clinico

F.Y., 7 anni

Il bambino è nato da terza gravidanza normodecorsa da genitori di origine marocchina. A 15 giorni dalla nascita ha presentato distress respiratorio per cui è stato trasferito in terapia subintensiva dove è stata fatta diagnosi di bronchiolite ed è stata documentata la presenza di *situs viscerum inversus*. È quindi seguita una storia di infezioni ricorrenti a carico delle alte e basse vie respiratorie e del parenchima polmonare (per 3 episodi è stato necessario il ricovero). Il *situs viscerum inversus* e l'elevata morbilità respiratoria hanno portato all'esecuzione di ulteriori accertamenti. Per gli esami più complessi si è fatto riferimento alla Clinica Pediatrica di Pisa.

Presentiamo di seguito gli esami risultati significativi. Alla TC dei seni paranasali si è rilevata agenesia dei seni frontali e ispessimento della mucosa dei seni mascellari. La TC torace ha dimostrato fibrosi a carico del lobo medio (che in caso di *situs viscerum inversus* è a sinistra) e assenza di bronchiectasie. Con il *brushing* dei turbinati nasali sono stati prelevati frammenti di mucosa nasale per studi sulle ciglia. Con l'analisi *in vitro* dell'attività ciliare è stata riscontrata una frequenza di battito ciliare nei *range* di normalità, ma nel 14.6% delle ciglia erano conglobate, nel 2.4% raccorciate e nell'87.8% immobili. Con l'esame morfometrico ultrastrutturale sono state analizzate 152 ciglia con i seguenti reperti: 1 assonema disorganizzato, 12 *swollen cilia*, 2 ciglia con coppie periferiche aggiuntive, 56 con

assenza bracci di dineina interna e esterna, 79 con accorciamento bracci di dineina interna e esterna, 2 con dislocazione della coppia periferica, 0 assonemi a normale ultrastruttura. La misura dell'ossido nitrico ha rilevato un valore di 3 ppb. E' attualmente in corso la tipizzazione HLA del piccolo paziente e dei genitori per uno studio in cui si dimostri eventuale associazione della malattia con determinati alleli HLA.

Discussione

In questo caso tutte le rilevazioni erano compatibili con il sospetto e suggestive per una diagnosi di DCP.

Gli esami utili per la diagnosi di DCP sono:

1. La misurazione dell'ossido nitrico espirato.
2. Analisi genetica (ricerca delle mutazioni conosciute).
3. Misurazione della *clearance* muco-ciliare a livello nasale (test alla saccarina, inalazione di particelle radiomarcate) e a livello polmonare.
4. Indagini effettuate su materiale prelevato con biopsia bronchiale o con brushing dei turbinati nasali, quali video microscopia digitale ad alta velocità e analisi ultrastrutturale.

È evidente come la misurazione dell'ossido nitrico (NO) possa essere un buon test orientativo prima dell'esecuzione di indagini più invasive e/o costose.

L'NO è una molecola che in condizioni fisiologiche e patologiche svolge nell'organismo umano numerose funzioni. Viene sintetizzato dall'ossido-nitrico-sintetasi (NOS) attivata usando l'arginina come substrato. Esistono diverse isoforme di questo enzima: due forme costitutive, sempre presenti a livello dell'endotelio (eNOS o NOS-III) e dei neuroni (nNOS o NOS-I), ed una forma inducibile (iNOS o NOS-II), espressa, in risposta a stimoli patologici, nei macrofagi, nelle cellule di Kupffer, nei neutrofili, nei fibroblasti, nella muscolatura liscia vasale e nelle cellule endoteliali. L'isoforma inducibile genera NO in quantità 1000 volte maggiori rispetto agli enzimi costitutivi, non è fisiologicamente espressa, ma viene indotta da alcune CK ad attività infiammatoria (IL-1, INF γ , TNF), dal LPS e da sostanze ossidanti. Questa induzione viene inibita dai glucocorticoidi e da alcune citochine (tra cui il TGF- β). L'NO ha nel sistema respiratorio diverse azioni: modula il battito ciliare, causa rilasciamento del muscolo liscio, ha effetti citotossici e citostatici (importanti nella difesa primaria aspecifica contro batteri, miceti, protozoi, parassiti e cellule tumorali), agisce sulla secrezione di muco e sull'essudazione di plasma ed è infine coinvolto nella neurotrasmissione, nell'infiammazione e nell'immunità cellulo-mediata. L'NO può essere misurato a livello bronchiale dove i valori normali devono cadere in un intervallo tra i 7 e i 20 ppb. Il *single breath online method* è il *gold standard* per la misurazione del NO in bambini collaboranti. Consta di una fase di inalazione di aria fino quasi al raggiungimento della CPT, seguita da un'espirazione a flusso costante di 50 ml/sec per almeno 4 secondi. E' indicata l'esecuzione a digiuno poiché l'NO espirato aumenta in seguito ad ingestione di alimenti contenenti nitrati (bietole, spinaci). Se nella stessa sessione devono essere effettuate sia la spirometria che il test del NO, deve essere eseguita prima la valutazione del NO e poi la spirometria. I valori misurati risulteranno aumentati in caso di flogosi delle vie respiratorie (asma bronchiale non allergico, rinite), molto aumentati nell'asma bronchiale allergico (purché il paziente non sia in terapia con steroidi o antileucotrienici) e ridotti in soggetti affetti da fibrosi cistica e DCP. L'NO può anche essere misurato a livello delle alte vie respiratorie dove raggiunge concentrazioni molto maggiori (soprattutto nei seni paranasali) rispetto alle basse vie. La tecnica di misurazione non è cruenta ed è di facile applicazione sopra i 6 anni di età. Per l'esecuzione viene richiesto al paziente di compiere un'inspirazione massimale con conseguente chiusura del palato molle (perché l'aria proveniente dai seni paranasali non sia contaminata con l'NO proveniente dalle basse vie aeree), quindi di eseguire una manovra di pausa respiratoria prolungata. A questo punto si procede alla misurazione della concentrazione del NO con un catetere nasale (avente

una conformazione tale da chiudere la narice ed evitare la contaminazione da parte dell'aria esterna). I normovalori sono compresi tra 300 ppb e 900 ppb. Si rileveranno pertanto valori di NO aumentati nella rinite allergica (supera 1500 ppb), ridotti nella sinusite infettiva (per ostruzione degli osti dei seni) con ritorno a normovalori dopo un'adeguata terapia antibiotica, NO ridotto nella FC e fortemente ridotto, talora indosabile, nella PCD.

Sia la fibrosi cistica che la DCP sono quindi caratterizzate da ridotti valori di NO che non tendono alla normalizzazione in seguito ad adeguata terapia.. Nella fibrosi cistica la riduzione della concentrazione di NO è dovuta a riduzione della produzione e ad ostacolo alla liberazione dalle pareti delle vie aeree costituito dall'abbondante muco denso che le riveste. Nella DCP è stata scartata l'ipotesi inizialmente avanzata di vicinanza dei loci della struttura ciliare con quelli della NOS. Infatti le alterazioni strutturali possono essere dovute a mutazioni genetiche identificate su cromosomi diversi, mentre i valori di ossido nitrico sono costantemente bassi. Si pensa quindi che la correlazione fra il difetto della ciliogenesi e il difetto della sintesi di ossido nitrico sia funzionale piuttosto che genetica.

È fondamentale ricordare che qualsiasi valutazione sulle ciglia deve essere effettuata da 4 a 6 settimane dopo la risoluzione di un episodio infettivo. Le infezioni respiratorie si rendono infatti responsabili di un difetto acquisito qualitativo e/o quantitativo della motilità ciliare ovvero di discinesia ciliare secondaria.

Conclusioni

E' sicuramente necessaria una prudente distinzione tra diagnosi definitiva e diagnosi probabile o possibile di DCP. Per la diagnosi definitiva devono infatti essere presenti caratteristiche fenotipiche associate a diagnosi genetica e/o riscontro ultrastrutturale di alterazioni specifiche di DCP.

E' risultato da altri studi che in un individuo con caratteristiche fenotipiche di DCP e livelli molto bassi di NO la diagnosi di DCP è altamente probabile (specialmente quando siano già stati eseguiti test per la FC e siano risultati negativi). La valutazione del NO sembra di conseguenza la meno cruenta, la più pratica e la più rapida tecnica per lo *screening* delle DCP attualmente disponibile. All'esecuzione della quale, in caso di rilievo di valori bassi di NO, dovrà seguire la ricerca genetica di mutazioni note o l'esecuzione di studi morfo-strutturali o funzionali sulle ciglia per fare diagnosi di certezza.

Tabelle e figure

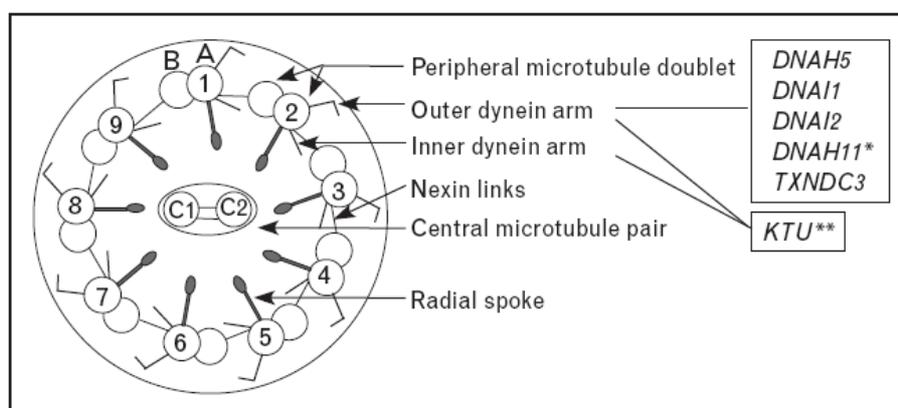


Figura 1. Struttura del microtubulo.

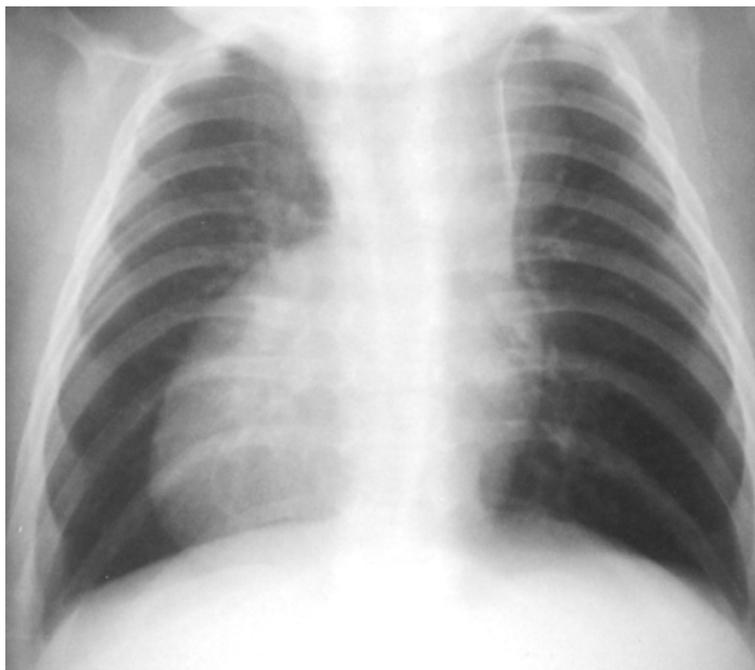


Figura 2. Immagine della radiografia del paziente.

Bibliografia

1. Leigh MW, Zariwala MA, Knowles MR. Primary ciliary dyskinesia: improving the diagnostic approach. *Curr Opin Pediatr* 2009; epub ahead of print.
2. Paraskakis E, Zihlif N, Bush A. Nitric oxide production in PCD: possible evidence for differential nitric oxide synthase function. *Pediatr Pulmonol* 2007; 42(10): 876-880.
3. Carraro S, Gottardi G, Bonetto G et al. Exhaled nitric oxide in children with asthma and sinusitis. *Pediatr Allergy Immunol* 2007; 18: 28-30.
4. Shoemark A, Wilson R. Bronchial and peripheral airway nitric oxide in primary ciliary dyskinesia and bronchiectasis. *Respir Med* 2009; 103(5): 700-706.
5. Zenga A, Argirò S, Dahdah L et al. L'impatto respiratorio e sistemico della discinesia ciliare primitiva. *Doctor Peditria* 2007.