



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI

-SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE BIOMEDICHE-

Direttore: Prof. Andrea Piana

Indirizzo: Epidemiologia molecolare dei tumori

**Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale
Sezione di Patologia Sperimentale e Oncologia
(Responsabile: Prof.ssa Rosa Maria Pascale)**

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale

Tutor / Relatore:

Chiar.mo Prof. Francesco Meloni

Tesi di Dottorato:

Dott. Andrea Melis

Anno Accademico 2013-2014

Alla mia famiglia

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

INDICE

SEZIONE COMPILATIVA

1. LA POLIPOSIS RINOSINUSALE

1.1 Epidemiologia.....	pg. 4
1.2 Anatomia patologica.....	pg. 10
1.3 Teorie sull' eziopatogenesi	pg. 16
1.4 Cenni di clinica e terapia.....	pg. 25

SEZIONE SPERIMENTALE

2. SCOPO DELLA RICERCA

2.1 Stress ossidativo e infiammazione.....	pg. 35
2.2 Possibile ruolo dei metalli nello sviluppo e decorso clinico della poliposi nasale: review della letteratura.....	pg. 38
2.3 Obiettivi della ricerca	pg. 44

3. MATERIALI E METODI

3.1 Selezione dei pazienti	pg. 45
3.2. Staging clinico.....	pg. 47
3.3. Tecniche di prelievo biptico intraoperatorio.....	pg. 48
3.4. Microscopia elettronica a trasmissione (TEM) e a scansione (SEM).....	pg. 49
3.5. Spettrometria di massa ad alta risoluzione (HR-ICP-MS).....	pg. 52
3.6. Analisi attività SOD	pg. 53

4. RISULTATI.....

pg. 54

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....

pg. 66

6. BIBLIOGRAFIA.....

pg. 69

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

1. LA POLIPOSIS RINOSINUSALE

1.1. Epidemiologia

I polipi nasali sono neoformazioni benigne che derivano da un edema della mucosa che riveste la parete alta delle fosse nasali. Da questa area, denominata etmoide anteriore, originano i polipi che tendono ad espandersi e quindi ad ostruire le cellule etmoidali, i seni paranasali (mascellare, frontale, ed in qualche caso sfenoidale) e le fosse nasali. La prima manifestazione dei polipi è un ispessimento diffuso o circoscritto associato ad un rigonfiamento della mucosa. Se i fattori eziologici continuano ad agire, il passaggio successivo è la formazione di un'area mucosa alterata, a base ampia, più o meno definita, dalla quale si sviluppano i polipi, i quali solitamente interessano entrambe le fosse nasali, e sono classificati all'interno delle rinosinusiti croniche.

La poliposi nasale (PN) era una patologia conosciuta già dall'epoca degli antichi Egizi ed i polipi nasali fino al XX secolo venivano rimossi con un'ansa metallica secondo il metodo descritto da Ippocrate ⁽¹⁾. Il problema di fondo di questa comune affezione è la mancanza di una eziopatogenesi certa, nonostante le numerose ipotesi presenti in letteratura. Questa incertezza condiziona sia la difficoltà a classificare i differenti tipi di poliposi, sia l'efficacia del trattamento, non ancora risolutivo.

Sempre più evidenze suggeriscono che la PN sia una manifestazione clinica di multipli meccanismi immunologici coesistenti, e dato che questi meccanismi possono determinare sia condizioni cliniche che subcliniche, è difficile avere dei dati epidemiologici certi ⁽²⁾.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

Fenotipicamente la rinosinusite cronica (CRS) può essere classificata in CRS senza PN e CRS con PN. La CRS senza PN riflette un' infiammazione TH1-mediata⁽³⁾. La CRS con PN idiopatica comprende la maggior parte dei casi di PN e si manifesta come una poliposi massiva dominata da un'infiammazione TH2-mediata eosinofila.

In rari casi un difetto genetico, immunologico o metabolico è associato alla crescita di una poliposi diffusa (sdr di Kartagener, sdr di Churg Strauss). Inoltre la CRS con PN deve essere differenziata dai polipi antrocoanali, che rappresentano il 5% dei casi di poliposi. I polipi antrocoanali sono generalmente monolaterali e originano dal seno mascellare; questi si presentano ad una età inferiore rispetto alla CRS con PN e mostrano livelli minori di eosinofilia.

La prevalenza della PN nella popolazione è stata stimata intorno all' 1-4 %, tuttavia l'evidenza di questo dato è insufficiente⁽⁴⁾.

La diagnosi è rara nei giovani sotto i 20 anni (se non in specifiche patologie genetiche citate sopra) mentre, nella terza decade di vita, i polipi iniziano a svilupparsi in un numero considerevole di soggetti, fino a raggiungere un picco all' età di 59 anni. Nella quinta decade i polipi si presentano con frequenza doppia rispetto alla popolazione adulta in generale.

Varie comorbidità come la rinite allergica, lo stato atopico e l' asma bronchiale sono state proposte come fattori nella genesi della PN. Queste associazioni sono tuttavia ancora oggetto di studi e risultati contraddittori vengono attualmente registrati.

Spesso si è pensato alla PN come il risultato di una risposta allergica (atopia) agli agenti inalanti, ma sebbene questa relazione sembri intuitiva, i dati della letteratura ci

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

dicono che questa associazione è debole. La prevalenza di PN nei pazienti affetti da rinite allergica infatti è stimata tra l' 1,5 e l' 1,7 % ⁽⁵⁾.

Diversi studi di coorte hanno invece rivelato una forte associazione tra asma e PN. In uno studio su oltre 2.000 pazienti, Settiane ha riportato che la PN è risultata presente maggiormente nei pazienti non allergici rispetto agli allergici (13 vs. 5%, $p < 0.01$) ⁽⁶⁾.

L' asma bronchiale rappresenta una condizione predisponente alla PN rispetto ad una associazione casuale. La sequenzialità dei tempi di insorgenza delle due patologie respiratorie ne dà conferma: infatti l'asma compare prima della PN in oltre 2/3 dei pazienti con poliposi e solo in 1/5 dei casi insorge successivamente ⁽⁷⁾.

La fisiopatologia della CRS con PN e quella dell' asma riflettono una risposta infiammatoria cronica molto simile almeno in un sottogruppo di pazienti; infatti i pazienti affetti da PN presentano un' abbondante infiltrato di eosinofili così come i soggetti asmatici, che mostrano anche mastcellule e linfociti T CD4+ ⁽⁸⁾. Bachert et al. hanno teorizzato che la relazione tra CRS grave e asma può essere dovuta alla produzione di citochine infiammatorie nelle vie aeree che induce una up-regulation di eosinofili, mastcellule e basofili a livello del midollo osseo. Queste cellule infiammatorie migrano nella mucosa delle vie aeree determinando una risposta infiammatoria che conduce alla formazione dei polipi nasali ⁽⁹⁾.

La diagnosi di PN nei bambini è estremamente rara. L' incidenza stimata nei pazienti con meno di 16 anni è compresa tra 0,1 e 0,216 % ⁽⁵⁾.

In uno studio su 1.051 pazienti pediatrici allergici, solo uno ha mostrato PN ⁽⁵⁾.

Così come per l' età, la letteratura è molto discordante in relazione all' impatto del genere sullo sviluppo della PN. In una review Settiane su 211 pazienti ha mostrato

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

una distribuzione di maschi e femmine di 50,2 vs 49,8 % ⁽⁵⁾. I dati pubblicati dal Ministero della Salute danese ha evidenziato un'incidenza maggiore nei maschi oltre i 20 anni di età rispetto alle donne della stessa età. Il rapporto maschi/femmine dei pazienti nel range di età 40-50 è stato di 2,9; tra gli 80-89 anni di 6,0. L'incidenza tra i due sessi è stata la stessa nel range di età tra 40 e 69 anni ⁽⁴⁾.

I fattori genetici sono stati proposti come possibile eziologia della PN. Diversi studi hanno mostrato che oltre il 14% dei pazienti con PN hanno una storia di familiarità⁽¹⁰⁾.

Tentativi di delineare un meccanismo ereditario utilizzando gemelli monozigoti hanno fornito risultati non univoci ⁽¹¹⁾.

Ulteriori tentativi sono stati fatti per evidenziare la familiarità della poliposi. In una coorte di 174 pazienti, il 25 % aveva parenti di primo grado con PN. 44 pazienti mostravano la triade di Samter (ASA intolleranza, asma e PN) ed il 36 % di questi avevano parenti di primo grado con PN. Inoltre del 32 % dei pazienti che mostravano sia PN che asma, 1/3 aveva parenti di primo grado con PN. Quindi, sebbene una predisposizione genetica sia un fattore importante, non si conosce un meccanismo di trasmissione ereditario chiaro ⁽¹²⁾.

Esistono comunque diverse malattie ereditarie in cui la PN è caratteristica. La fibrosi cistica è un disordine autosomico recessivo causato da mutazioni nel gene regolatore della conduttanza transmembrana. Circa il 20 % dei pazienti con fibrosi cistica sviluppa una PN ⁽⁵⁾.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

La sindrome di Kartagener (Primary ciliary dyskinesia) è caratterizzata da bronchiectasie, PN e situs inversus. Difetti nella dineina ciliare sono responsabili dell'immobilità ciliare ⁽¹³⁾.

La sindrome di Young è un altro disturbo caratterizzato da patologie polmonari ricorrenti, azoospermia e PN. Una vasculite sistemica, la sindrome di Churg Strauss presenta sintomi a carico delle vie aeree superiori uniti a asma, eosinofilia, neuropatie, infiltrato polmonare e anormalità dei seni paranasali.

La PN è frequentemente associata all' intolleranza all' aspirina o ai FANS. In questo sottogruppo di pazienti questi farmaci inducono una risposta asmatica acuta in 30-90 minuti. La triade di sintomi (ASA intolleranza, asma, PN) è la triade di Samter o di Widal ⁽¹⁴⁾.

E' stato dimostrato che le cellule epiteliali dei polipi nasali dei pazienti con ASA intolleranza hanno anormalità nella genesi aspirina-indotta degli eicosanoidi (prodotti derivati dal metabolismo dell' acido arachidonico incluse prostaglandine, trombossano e leucotrieni).

I polipi dei pazienti con triade di Samter rappresentano un fenotipo di infiammazione severa, che è più recalcitrante sia alla terapia medica che a quella chirurgica.

La rinossinusite micotica allergica è una eziologia che sta alla base di un sottogruppo di pazienti con rinossinusite cronica e fortemente associata a PN. Generalmente viene diagnosticata quando si presentano una reazione di ipersensibilità tipo I a miceti, PN, immagini TC con mucosa ispessita con calcificazioni, eosinofili nel muco nasale con cristalli di Charcot-Leyden ⁽¹⁵⁾.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinossinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

Approssimativamente il 5-10 % dei pazienti con CRS con PN è affetto da una rinite micotica allergica. L'età media di insorgenza è tra i 22 e 28 anni, e pare che vi sia un meccanismo di rinforzo dell'inflammazione eosinofila proprio sostenuto dai miceti.

Nonostante il meccanismo di formazione dei polipi nasali resti un argomento di ricerca, l'*etnia* e la *variabilità geografica* sono potenziali fattori in grado di modificare la fisiopatologia. Nella popolazione Caucasica i polipi nasali hanno una marcata componente eosinofila, probabilmente dovuta alla upregulation dell'interleuchina 5 (IL-5) ⁽¹⁶⁾.

Questo incremento di eosinofili non è comune a tutte le etnie, infatti i polipi nasali nei paesi Asiatici mostrano un pattern di neutrofili, anche se la manifestazione clinica resta del tutto simile alla razza caucasica.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

1.2. Anatomia Patologica

L' istologia normale della mucosa rinosinusale è caratterizzata da componenti strutturali che includono epitelio, membrana basale e sottomucosa, e da componenti non strutturali costituiti da cellule infiammatorie.

ELEMENTI STRUTTURALI NORMALI

Epitelio e membrana basale: i 2 cm anteriori delle fosse nasali sono ricoperti da cute, composta da epidermide con epitelio squamoso stratificato cheratinizzato, un derma di fibrocollagene e ghiandole annesse. Il resto della fossa nasale è ricoperto da mucosa di tipo respiratorio. L' epitelio respiratorio è costituito da 4 tipi principali di cellule: ciliate cilindriche, caliciformi, cellule non ciliate con microvilli e cellule basali. Il rapporto tra cellule cilindriche e caliciformi è di 5:1 ⁽¹⁷⁾. L' epitelio respiratorio normale spesso mostra aree isolate di metaplasia squamosa soprattutto a livello dei turbinati inferiori ⁽¹⁸⁾. Le cellule sono legate da giunzioni strette e sovrastano una membrana basale composta da fibre collagene (tipo I, III, IV, V, VI e VII), eparan solfato, proteoglicani e laminina. La membrana basale è delicata, tuttavia a livello dei turbinati inferiori può verificarsi un ispessimento.

Rispetto alla fossa nasale i seni paranasali hanno un epitelio più sottile e meno specializzato. Queste differenze tra seni e fossa derivano dalla diversa origine embriologica.

Il turbinato superiore, la parte superiore del setto, il tetto della cavità nasale e la porzione supero-mediale del turbinato medio sono ricoperti da epitelio olfattorio. E' un epitelio colonnare ciliato pseudostratificato che consiste di cellule basali, cellule con microvilli, cellule olfattorie ciliate bipolari e cellule di sostegno. Con l' età e le

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

infezioni ricorrenti l' epitelio olfattorio può essere rimpiazzato da epitelio di tipo respiratorio.

Sottomucosa: al di sotto della membrana basale la sottomucosa sovrastante la cartilagine e l'osso contiene tessuto connettivo fibrovascolare lasso, cellule stromali e numerose ghiandole sieromucose e ghiandole salivari minori, vasi sanguigni, nervi e cellule linfatiche.

Le ghiandole sieromucose hanno una produzione per il 10 % sierosa e 90 % mucosa e secernono mucina, immunoglobuline ed enzimi.

I vasi sono capillari subepiteliali, microvasi perighiandolari e numerose anastomosi arteriose e venose ⁽¹⁹⁾.

ELEMENTI NON STRUTTURALI NORMALI

Il compartimento linfatico della mucosa rinosinusale comprende singoli linfociti sparsi tra le cellule epiteliali e la lamina propria, ed il tessuto linfatico associato alla mucosa nasale (NALT) ⁽²⁰⁾. La popolazione di linfociti è composta da cellule T, B, plasmacellule, natural killer, mentre le cellule mieloidi includono monociti, macrofagi, cellule dendritiche, mastcellule e granulociti (neutrofili e eosinofili).

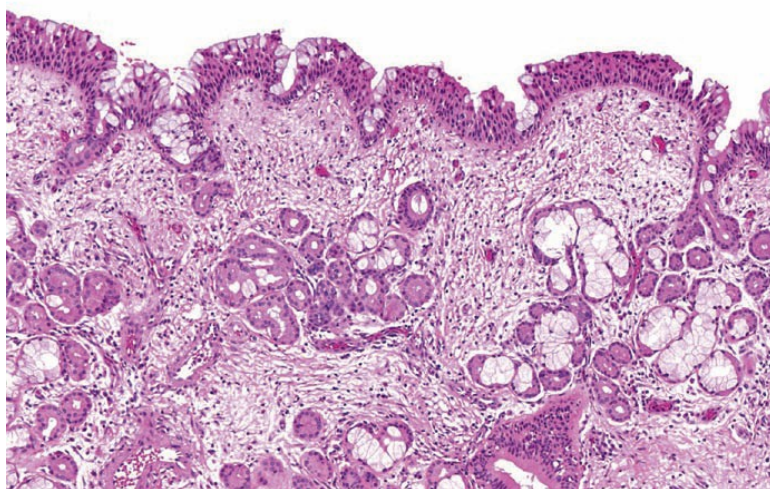


Fig. 1. Mucosa normale rinosinusale (H&E, 100x) ricoperta da epitelio di tipo respiratorio su una delicata membrana basale. La sottomucosa è costituita da connettivo con ghiandole sieromucose e linfociti sparsi (NALT)

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

ALTERAZIONI NELLA RINOSINUSITE CRONICA CON POLIPOS NASALE

Approssimativamente circa il 20% dei pazienti con CRS presenta polipi nasali. Le condizioni cliniche spesso associate alla poliposi nasale includono asma, triade di Samter, CRS con eosinofilia, fibrosi cistica, sindrome di Churg Strauss, sindrome di Kartagener e sindrome di Young. Da un punto di vista istologico i polipi sono stati classificati in molti gruppi sulla base della eziologia presunta, infiltrato infiammatorio predominante e caratteristiche dello stroma. Queste classificazioni tuttavia sono puramente descrittive e non specificano il disordine o la patologia che è sottostante allo sviluppo della poliposi.

Anatomia macroscopica dei polipi nasali.

Macroscopicamente la maggior parte dei polipi ha un aspetto edematoso, liscio e traslucido con una consistenza morbida rispetto alla mucosa non polipoide.

Le biopsie eseguite su pazienti con poliposi presente da diverso tempo possono invece mostrare aspetto duro e compatto.

I polipi nasali solitamente sono mobili e attaccati tramite un peduncolo alla mucosa sottostante. Più comunemente crescono dal meato medio e dal recesso sfeno-etmoidale e sono bilaterali, anche se non sono così rare le forme monolaterali. Le loro dimensioni possono essere estremamente variabili e, nei casi severi, possono occupare completamente le fosse nasali.

Nelle poliposi di vecchia data l'osso sinusale può essere rimodellato e causare un allargamento del dorso del naso. La mucosa del turbinato medio, del turbinato inferiore, il processo uncinato ed il setto possono presentare polipi con ampia base di impianto.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

Spesso è possibile che la coda del turbinato inferiore presenti una degenerazione polipoide, contrariamente alla testa dello stesso turbinato inferiore, che raramente è polipoide probabilmente a causa della presenza di metaplasia squamosa ⁽²¹⁾.

Una parte di CRS con PN presentano un muco denso, tenace, detto mucina eosinofila. Questa mucina è presente nei pazienti con sinusite allergica micotica e poliposi recalcitrante come nella fibrosi cistica, nell' ASA intolleranza e nella Kartagener.

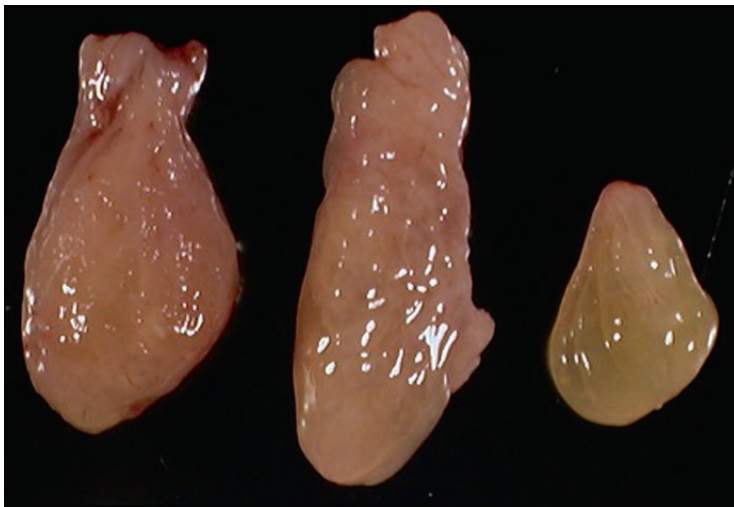


Fig. 2. Aspetto macroscopico dei polipi nasali dopo asportazione in blocco.

Anatomia microscopica dei polipi nasali.

Le principali caratteristiche dei polipi nasali e della mucosa dei pazienti affetti da rinosinusite cronica rispetto alla mucosa normale sono:

- 1) Cambiamenti strutturali di epitelio, sottomucosa e talvolta dell' osso sottostante;
- 2) La natura ed il grado dell' infiltrato cellulare infiammatorio.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

I polipi nasali sono stati storicamente classificati in base al loro aspetto istologico e alle cellule infiammatorie predominanti nel loro contesto ⁽²²⁾. Esistono 3 tipi principali e, come detto prima, non è stata descritta una patogenesi differente per ciascuno di questi sottotipi.

a) Polipo “allergico”: edematoso, eosinofilo

E' il tipo più comune (85-90%), rivestito da epitelio respiratorio con alterazioni della mucosa che includono: ulcerazione, tessuto di granulazione, iperplasia delle cellule caliciformi e metaplasia squamosa. La membrana basale è ispessita ed è presente edema della sottomucosa, che risulta infiltrata da eosinofili, plasmacellule e linfociti. Questi polipi sono associati a rinosinusite cronica, rinosinusite allergica micotica, ASA intolleranza, fibrosi cistica e sindrome di Churg Strauss.

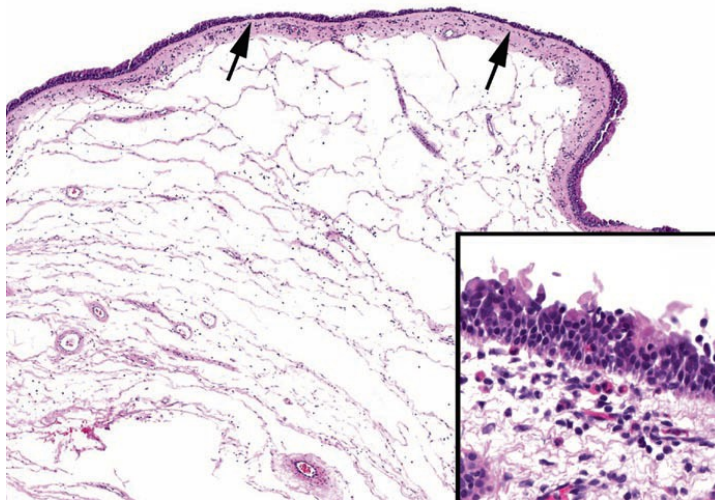


Fig. 3. Polipo edematoso eosinofilo(H&E, 20×). Mostra ispessimento della membrana basale e edema della sottomucosa. Nel riquadro (H&E, 400x) è evidente l' infiltrato infiammatorio di eosinofili e plasmacellule.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

b) Polipo “infiammatorio cronico” o “fibro-infiammatorio”: è meno comune (<10%). Si pensa possano derivare da polipi edematosi che, in seguito a traumatismo cronico, sviluppano cambiamenti infiammatori dello stroma con proliferazione di miofibroblasti che può mimare una neoplasia dei tessuti molli. Presentano una fibrosi della sottomucosa e infiltrato infiammatorio con predominanza linfoide con centri germinali. L’epitelio di rivestimento probabilmente presenta metaplasia squamosa come marker di cronicità.

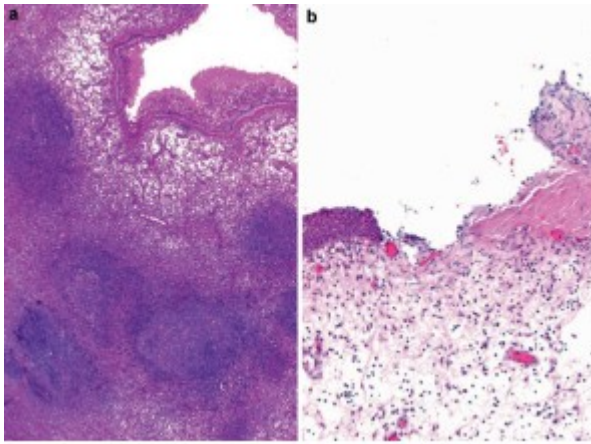


Fig. 4. Polipo “infiammatorio cronico” (a) (H&E, 20×). Iperplasia linfoide con centri germinali. (b) (H&E,100×). Ulcerazione mucosa (destra) e metaplasia squamosa (sinistra).

c) Polipo “iperplastico”: presentano iperplasia delle ghiandole sieromucinosi. E’ raro, ed il limite con neoplasie epiteliali come l’ hamartoma è molto sottile.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

1.3. Teorie sull'eziopatogenesi

Molte teorie patogenetiche sullo sviluppo della poliposi nasale sono state pubblicate durante gli ultimi 150 anni; queste teorie sono basate su edema, incremento delle ghiandole tubulo-alveolari, la presenza di cisti nelle ghiandole mucose e sulle ghiandole mucose dei polipi nasali.

Teoria dell' Adenoma e del Fibroma.

Billroth ⁽²³⁾ trovò un aumento di ghiandole tubulari nei polipi nasali: interpretò ciò come neoformazioni della mucosa nasale. I PN furono quindi interpretati come adenomi originanti dalla mucosa nasale, che comprimevano verso l'esterno l'epitelio e le ghiandole nasali originali. Hopmann non trovò alcuna ghiandola nel contesto dei PN e interpretò questi ultimi come fibromi soffici che protrudevano dalla mucosa nasale. Entrambe queste teorie furono confutate nello scorso secolo.

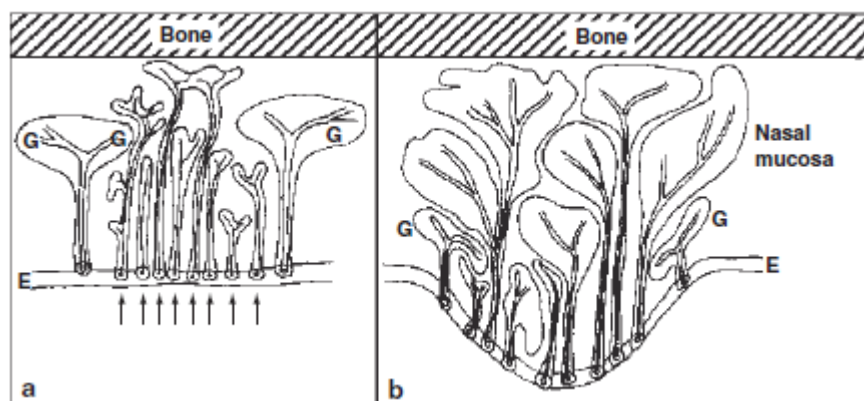


Fig. 5. Teoria dell' adenoma.

Teoria dell' etmoidite necrotizzante.

Questa teoria si incentrava sull' ipotesi che un' etmoidite potesse condurre ad una periostite ed osteite dell' osso etmoidale e causare necrosi. L' osso necrotico veniva quindi ricoperto da tessuto mixomatoso che si proiettava verso la mucosa nasale che

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

veniva pressata caudalmente a formare un polipo. Hayek ⁽²⁴⁾ si oppose a questa teoria, dimostrando che nell' etmoide dei pazienti con poliposi non fu mai trovata necrosi.

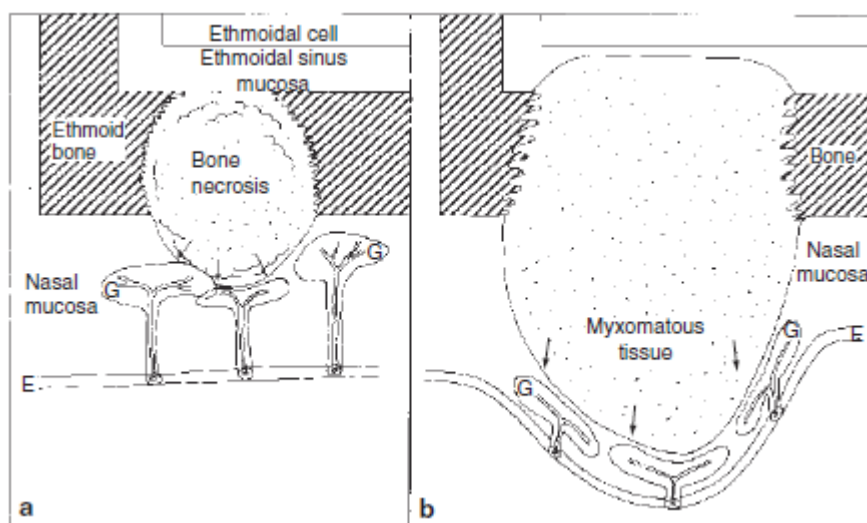


Fig. 6. Teoria dell' etmoidite necrotizzante.

Teoria cistica-ghiandolare

Questa teoria è basata sulla presenza di ghiandole cistiche e cisti ripiene di muco nei PN ⁽²⁵⁾. E' la più vecchia tra le teorie che considerano le ghiandole mucose. Ipotizza che l' edema della mucosa nasale causi un ostruzione dei dotti delle ghiandole basali, portando alla formazione di cisti della mucosa nasale. Le cisti si espanderebbero spingendo la mucosa verso il basso e formando i polipi. Comunque Taylor e altri studiosi hanno dimostrato che la dilatazione cistica delle ghiandole è successiva alla formazione del polipo ⁽²⁶⁾.

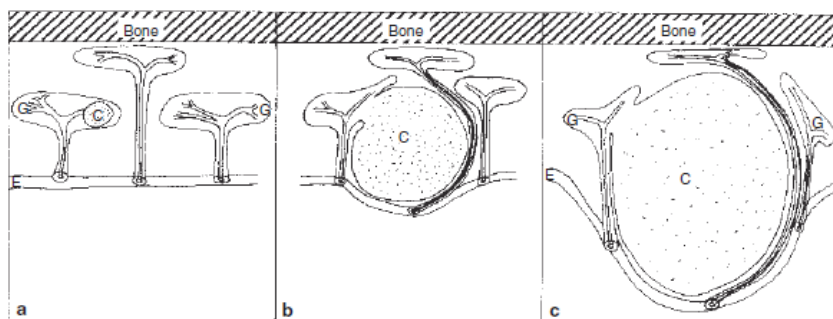


Fig. 7. Teoria cistica-ghiandolare

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

Teoria dell' essudato della mucosa

Hayek credeva che la formazione dei PN iniziasse da un essudato localizzato profondamente nella mucosa nasale, che veniva quindi estroflessa ⁽²⁴⁾. Si sarebbe quindi formato un fascio vascolare la cui congestione avrebbe portato all' aumento di volume del polipo. In accordo con questa teoria, anche gli strati di ghiandole tubulo-alveolari e sieromucose dovrebbero essere ritrovate nella parte distale del polipo, tuttavia nei PN non vengono ritrovate così tante ghiandole e comunque queste vengono ritrovate solo in polipi formati già da tempo.

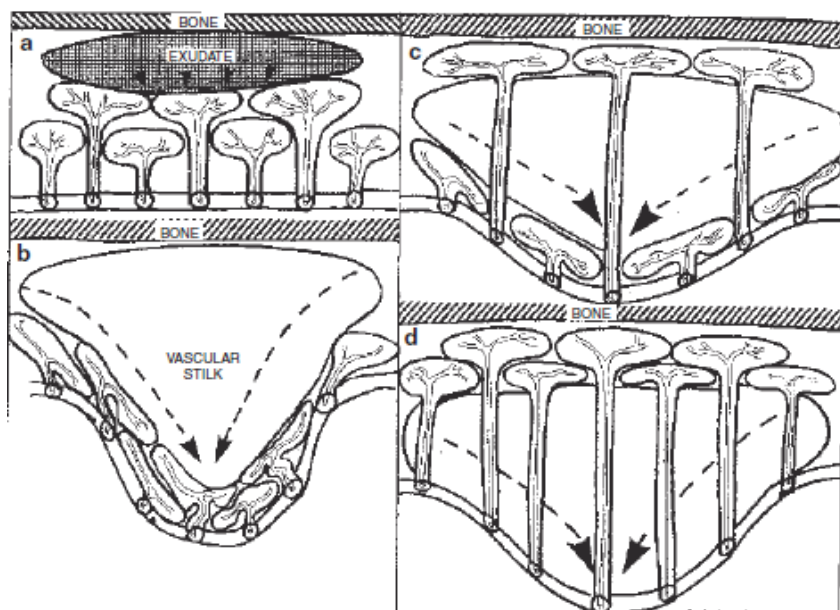


Fig. 8. Teoria dell' essudato.

Teoria della dilatazione cistica dei dotti escretori delle ghiandole nasali e ostruzione dei vasi.

Nell' infiammazione cronica della mucosa nasale, I dotti escretori delle ghiandole tubulo-alveolari sono ostruiti, distesi e dilatati in strutture cistiche. I capillari e le vene (che sono intorno ai dotti escretori) sono pressati e ostruiti con conseguente trasudazione e edema. Tuttavia la dilatazione cistica delle ghiandole si verifica solo

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

una volta che il polipo è già formato, per cui questa spiegazione può essere utilizzata solo per la patogenesi della fibrosi cistica.

Teoria del blocco.

Questa teoria di Jenkins ⁽²⁷⁾ è basata sulla premessa che la formazione del polipo è sempre preceduta dallo stesso grado di infiammazione cronica, sia infettiva che allergica. Il polipo stesso è un accumulo di fluido extracellulare contenuto in un determinato tessuto. Il blocco è generalmente causato da un infiltrazione di round cells che bloccano gli spazi intercellulari e determinano edema locale.

Se l' ostruzione persiste si possono formare dei polipi. Questa è una delle numerose teorie della formazione dei polipi basata sull' edema, tuttavia non spiega perché e come i polipi possono crescere in una zona anziché in un' altra.

Teoria della periflebite e perilinfangite.

Questa teoria di Eggston e Wolff ⁽²⁸⁾ è basata sulle infezioni ricorrenti che porterebbero al blocco del trasporto del fluido intercellulare nella mucosa e all' edema della lamina propria. Se l' edema dovesse coinvolgere aree più ampie il risultato sarebbe il prolasso della mucosa e la formazione del polipo. Questa teoria è basata sulla dimostrazione di modificazioni vascolari croniche nella mucosa nasale, ma questi cambiamenti sono diffuse, e la teoria non spiega come i polipi originino da una zona particolare.

Teoria dell' iperplasia ghiandolare.

Krajina ⁽²⁹⁾ trovò in casi di infezione cronica o di allergia un infiltrato ed un' iperplasia delle ghiandole nasali localizzati. Queste ghiandole aumenterebbero di volume facendo protrudere la mucosa. D' altra parte i cambiamenti dei vasi sanguigni e

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

l'edema nella regione del meato medio porterebbero al prollasso della mucosa in forma di polipo. Tuttavia nei polipi non si trovano ghiandole tubulo-alveolari e l'iperplasia ghiandolare nella poliposi è veramente scarsa.

Teoria del danno epiteliale.

Tos et al. ⁽³⁰⁾ hanno studiato la forma, la distribuzione, la densità e il profilo istologico delle ghiandole esaminando i polipi interamente, senza essere sezionati. Hanno quindi proposto che nella prima fase della formazione dei polipi si verificherebbe un danno epiteliale o una necrosi dovuta all' infiammazione ed alla pressione della lamina propria edematosa ed infiltrata.

La lamina propria protruderebbe nel difetto epiteliale e l'epitelio adiacente tenderebbe a ricoprire il difetto. Se il difetto non viene ricoperto in tempo utile la lamina propria continuerebbe a protrudere ed il polipo, con il suo asse vascolare, si verrebbe a formare. Dopo l' epitelizzazione del polipo, si formerebbero le nuove, lunghe, ghiandole tubulari.

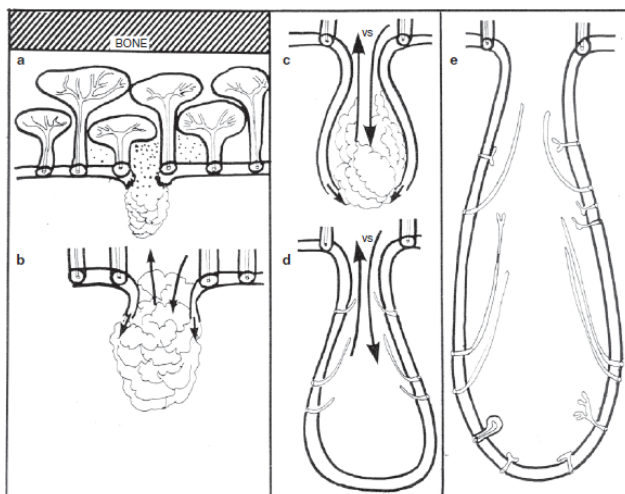


Fig. 9. Teoria del danno epiteliale.

Questo studio ha dimostrato come le ghiandole dei polipi siano strutture neoformate e che i polipi non siano prollassi della mucosa nasale originaria.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

L' esame istopatologico eseguito da Tos ha mostrato nei piccoli polipi neoformati un epitelio basso cubico o cilindrico con cellule ciliate ma senza o con poche cellule caliciformi, rispetto ai PN di grandi dimensioni, in cui l' epitelio è pseudostratificato con cellule caliciformi.

Le ghiandole dei polipi sono tubulari e originano intorno all' asse del polipo dalla sua porzione media. Quando la prima ghiandola compare, il polipo ha già raggiunto una certa dimensione.

Infiemmazione eosinofila

Alla ricerca di una causa prima, numerosi aspetti della PN sono stati documentati. Molteplici molecole sono state identificate nell' ambito dei mediatori infiammatori, delle citochine, dei fattori di crescita, delle molecole di adesione. Un ruolo centrale è stato attribuito alle citochine di derivazione Th2: GM-CSF, IL-3, IL-4 e, soprattutto, IL-5, rispetto a quelle di derivazione Th1 ⁽³¹⁾.

Una serie di evidenze ha posto al centro della poliposi nasale l' interleuchina 5 (IL-5), come confermato da diverse linee di evidenza: un costante aumento rispetto ai controlli sani o affetti da CRS senza PN; un aumento che non dipende dall' atopia concomitante; la produzione autocrina da parte degli eosinofili. Ma la dimostrazione incontrovertibile è stata fornita dall' utilizzo di anticorpi monoclonali anti-IL-5: nel tessuto polipoide infiltrato da eosinofili gli anticorpi determinano riduzione dell' eosinofilia tissutale e portano gli eosinofili all' apoptosi.

In sintesi, l' IL-5 è il maggiore fattore di sopravvivenza degli eosinofili: il ritardo nella morte di queste cellule sarebbe il meccanismo fondamentale.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

L' IL-5 è quindi una citochina chiave nella maturazione, attivazione e inibizione dell' apoptosi degli eosinofili. Peraltro, questi granulociti possono contribuire loro stessi alla produzione di IL-5 attraverso secrezione autocrina.

Regolazione della matrice extracellulare

Numerosi studi hanno analizzato l' attività fibroblastica dei polipi ed hanno scoperto, nel tessuto omogeneizzato, una carenza di TGF-beta1 (Fattore Trasformante di Crescita beta1) ⁽³²⁾. Questa è una potente citochina fibrogenica che agisce come chemiotattico per i fibroblasti e stimola la formazione della matrice extracellulare. Nel tessuto poliposico questa citochina si trova legata alla matrice, dove viene mantenuta in una forma latente. Il TGF-beta1 è una citochina con attività anti-IL-5: inibisce la sintesi di IL-5 e ne abroga gli effetti anti- apoptosici sugli eosinofili.

L' incremento di IL-5 e la diminuzione di TGF-beta spiega quindi l' accumulo di eosinofili dove la matrice connettivale viene meno, ossia le principali caratteristiche istopatologiche della poliposi nasale.

Accanto a ciò è stato osservato che nel tessuto dei polipi è presente uno sbilanciamento delle metallo-proteinasi (MMP), che sono una famiglia di endopeptidasi in grado di degradare la matrice extracellulare. Nella poliposi si osserva un aumento di alcune MMP, in particolare della MMP 7 e 9, che possono spiegare il rimodellamento tessutale della poliposi nelle aree pseudocistiche ⁽²⁾.

La teoria micotica.

La poliposi nasale associata a colture paranasali positive di *Aspergillus* è stata proposta da oltre 40 anni e la scoperta di altre specie fungine ha portato al termine di "rinosinusite fungina allergica"⁽³³⁾. Successivamente è stato proposto un ruolo

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

patogenetico dei miceti nella CRS. Nella *micosi eosinofila* la patogenesi proposta è di tipo immunologico e rappresentata dalla iperreattività eosinofila indotta, in soggetti predisposti, dalla presenza di ife fungine con un meccanismo immunologico (non IgE mediato) non ancora completamente precisato nonostante gli sforzi di numerosi ed importanti gruppi di studio.

In questi pazienti non c'è un'infezione micotica (micosi invasive) né proliferazione micotica extramucosa (fungus ball), ma i seni paranasali sono occupati da secrezioni ad alta viscosità, contenenti un tappeto di eosinofili, cristalli di Charcot Leyden e da scarse ife disperse nel contenuto fluido sinusale (mucina eosinofila). I miceti sono in grado di attivare una risposta esagerata degli eosinofili che sostengono poi la patologia.

Un numero minore di questi pazienti mostrano una condizione atopica associata e sono dette “micosi allergiche”: presentano un quadro clinico sovrapponibile alle micosi eosinofile, ma con associata ipersensibilità ai funghi con aumento di IgE totali, specifiche e prick test positivo.

La teoria del Superantigene (enterotossina *S. Aureus*)

Una delle teorie più interessanti è quella della colonizzazione batterica, in grado di influenzare la gravità della poliposi. Questa prospettiva è nata in seguito a studi che avevano dimostrato l' aumento di concentrazione tissutale di IgE e di plasmacellule IgE positive, suggerendo una produzione locale di tali anticorpi. Infatti la sintesi localizzata di IgE è una caratteristica della PN, con aumento di oltre dieci volte delle plasmacellule IgE secernenti rispetto alle mucose nasali di controllo. Nelle IgE

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

prevalgono anticorpi contro le enterotossine dello *Staphylococcus Aureus*, reperibili nel 30-50% dei pazienti con PN e nel 60-80% di quelli con PN associati ad asma.

Da un punto di vista patogenetico, gli stafilococchi si localizzano a livello epiteliale e rilasciano le enterotossine nel tessuto sottostante, dove esse agiscono come superantigene ed inducono la formazione locale delle IgE policlonali.

La teoria del superantigene è avvalorata da queste considerazioni:

- Le enterotossine di *S. Aureus*, in particolare la TSST-1 (la tossina 1 della sindrome da shock tossico) e la proteina stafilococcica A (SPA) potenziano la risposta immunitaria. Esse sono in grado di creare legami crociati tra linfociti T e B e di rinforzare la produzione di IgE da parte delle plasmacellule.
- Il superantigene è tale perché non ha bisogno di cellule dendritiche per essere presentato ai linfociti.
- Le enterotossine stafilococciche stimolano le cellule T attraverso un recettore aspecifico inducendo la produzione di IL-4 e IL-5, attivando gli eosinofili e prolungando la loro sopravvivenza.
- Le IgE anti-enterotossine sono correlate alla gravità dell' infiammazione eosinofila.

Se consideriamo che lo *S.Aureus* è uno dei micro-organismi più comuni nella cavità nasali (oltre il 25% dei soggetti ne è portatore nel vestibolo nasale e fino al 70% dei ceppi è produttore di enterotossine), l'eradicazione di questo micro-organismo al naso potrebbe costituire un metodo efficace di gestione della poliposi nasale ^(2,34,35).

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

1.4. Cenni di clinica e terapia.

La poliposi nasale è un processo flogistico cronico a carico della mucosa di cavità nasali e seni paranasali, di frequente riscontro nella pratica otorinolaringoiatrica. La poliposi nasale oltre a rappresentare una problematica clinica, costituisce un importante problema sociale sia per la sua alta incidenza di riscontro (2-5 % della popolazione mondiale), sia per le ripercussioni economiche che può indurre.

La spesa sanitaria è infatti influenzata da tale patologia sia per la riduzione della qualità di vita che comporta, che per la conseguente alterazione della performance lavorativa, e per l'impiego di farmaci talora a terapia combinata.

Le formazioni polipoidi possono essere singole, ma più spesso si riscontrano multiple e bilaterali, e in base all'estensione della malattia si possono distinguere differenti forme di malattia: isolate, diffuse e massive.

La poliposi nasale in quanto patologia cronica, presenta una sintomatologia persistente, e la gravità clinica è correlabile con l'ampiezza delle masse polipoidi, determinando quadri clinici molto variabili da paziente a paziente.

I sintomi della rinosinusite e della PN possono essere sovrapponibili ed esprimersi con intensità variabile: ostruzione nasale, rinorrea, post nasal drip, parestesie facciali e cefalea sovraorbitaria sono i sintomi propri di entrambe le patologie ^(1,2).

Il principale sintomo lamentato dai pazienti con PN è l' **ostruzione nasale**. La PN semplice può causare una chiusura nasale persistente (e non periodica come nella rinosinusite). La gravità dell' ostruzione dipende dall' ampiezza della dimensione del polipo che, talvolta, può dare una sensazione di valvola, consentendo il flusso aereo in una sola direzione. L' ostruzione può addirittura influenzare il timbro della voce.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

La presenza di tessuto polipoide, nel suo percorso di estensione locale determina l'ostruzione dell'ostio di drenaggio dei seni paranasali, meccanismo che ha come conseguenza un ristagno delle secrezioni, creando quindi un ambiente suscettibile all'instaurarsi di sovrainfezioni batteriche; i segni e sintomi che conseguono a questo quadro patologico sono quelli della flogosi rinosinusale, spesso a carattere recidivante, con intensa cefalea orbitaria, frontale o al vertice ^(2,1).

La PN, nelle forme più gravi, può addirittura allargare le cavità nasali e sinusali fino all'ipertelorismo nei casi più estremi.

Altro sintomo spesso riferito è la **rinorrea**, in genere "acquosa", che si può eventualmente associare anche a scolo retrofaringeo, spesso muco-purulento ⁽²⁾.

I disturbi dell'olfatto (**iposmia/anosmia**) sono più frequenti nella PN che nella RSC. Oltre $\frac{3}{4}$ dei pazienti che giungono all'intervento chirurgico lamenta iposmia o anosmia. Questo sintomo è legato alla difficoltà che l'aria inspirata incontra per raggiungere la mucosa olfattiva; tale sintomo riveste un ruolo molto importante nel contesto della patologia nasale, poiché compromette pesantemente la qualità di vita del paziente, anche se in alcuni casi viene riferito come poco rilevante per via dell'adattamento ad una condizione che si è instaurata gradualmente ⁽¹⁾.

In periodi successivi possono anche comparire sintomi legati al coinvolgimento delle strutture anatomiche adiacenti, come irritazione faringea, laringea e tracheale, disfonia, tosse.

Talvolta si può riscontrare anche un coinvolgimento delle vie aeree inferiori, con presenza di broncospasmo, fino all'instaurazione di una vera e propria condizione di asma bronchiale.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

La diagnosi di poliposi nasale si fonda su punti ben precisi:

- **Anamnesi:** si indaga sulle caratteristiche della sintomatologia, sulla stagionalità, sulla eventuale familiarità per poliposi nasale, sulle patologie locali e sistemiche e sulla terapia farmacologica effettuata dal paziente;
- **Rinoscopia Anteriore:** metodica attraverso la quale è possibile osservare i polipi soprattutto nelle forme massive, poiché è indagabile con questo esame solo la porzione anteriore della fossa nasale. Macroscopicamente alla visione rinoscopica, si presentano come vegetazioni lisce, traslucide e di colore biancastro, di consistenza molle in fasi iniziali e meno nelle fasi avanzate.
- **Endoscopia nasale:** rimane l' esame elettivo dell' indagine clinica. Il paziente dovrebbe essere valutato possibilmente in condizioni basali e dopo aver inalato uno spray decongestionante addizionato con un anestetico locale. L'esplorazione dovrebbe riguardare tutte le strutture della cavità nasale, compresi gli accessi ai seni nonché le caratteristiche della mucosa e la presenza di masse.

I° tempo: il primo tempo dell' endoscopia diagnostica viene eseguito mediante l' introduzione dell' endoscopio in un piano parallelo al pavimento nasale: prevede la valutazione della pervietà dell' area valvolare, la valutazione della porzione anteriore della fossa nasale, l' ispezione dello sbocco del dotto naso-lacrimale a livello del meato inferiore, l' ispezione del meato inferiore e del turbinato inferiore nella sua totalità fino alla coana e del rinofaringe ⁽³⁶⁾.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

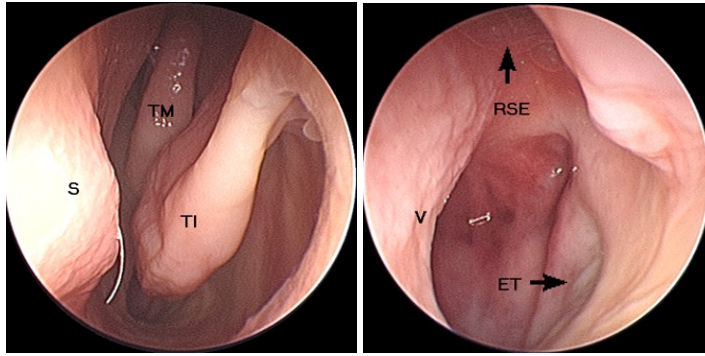


Fig. 10. Primo tempo endoscopico: nella prima figura S (setto nasale), TI (turbinato inferiore) e TM (turbinato medio). Nella seconda ET (Tuba di Eustachio).

II° tempo: dopo aver represso l' endoscopio fino alla valvola nasale, si cambia inclinazione rivolgendola a 45° verso l' alto per studiare l' area dell' agger nasi, la fessura olfattoria, la testa del turbinato medio, il recesso sfeno-etmoidale e l'orifizio del seno sfenoidale ⁽³⁶⁾.

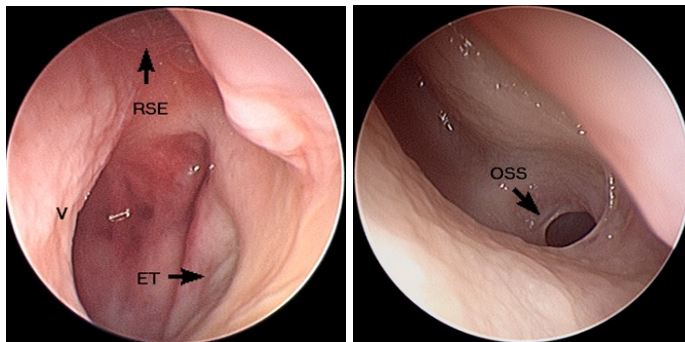


Fig. 11. Secondo tempo endoscopico: nella prima figura RSE (recesso sfeno-etmoidale); nella seconda OSS (orifizio seno sfenoidale).

III° tempo: per eseguire questo tempo si utilizza un elevatore di Cottle in modo da medializzare delicatamente il turbinato medio e studiare quindi il meato medio (bulla etmoidale, ostio naturale del seno mascellare e recesso frontale) ⁽³⁶⁾.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

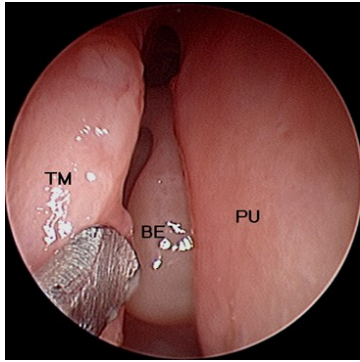


Fig. 12. Terzo tempo endoscopico: TM (turbinato medio), BE (bulla etmoidale) e PU (processo uncinato).

L' endoscopia nasale consente di effettuare una osservazione diretta delle masse patologiche endonasali e la loro caratterizzazione macroscopica, anche se non consente di visualizzare la reale base di impianto dei polipi, nè di valutare l'effettiva estensione della malattia.

Sulla base del rilievo endoscopico esistono diversi criteri di classificazione della poliposi; uno dei più utilizzati è quello di Lund-Mackay (1993) ⁽³⁷⁾.

- **Tecniche di imaging:** la tomografia assiale computerizzata (TC) rappresenta l' indagine di scelta per confermare l' estensione della patologia nasale completando i reperti endoscopici. L' indagine deve essere eseguite con scansioni nelle tre proiezioni dello spazio: assiali, coronali e sagittali.



Fig. 13. Scansioni TC coronale, assiale e sagittale.

Il tessuto polipoide appare della stessa densità delle parti molli.

La classificazione radiologica più utilizzata è quella di Lund-Mackay ⁽³⁷⁾.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

- **Citologia nasale:** è un esame rapido e semplice che consente di analizzare uno striscio di mucosa nasale al microscopio per valutare l' infiltrato infiammatorio. Spesso questo è correlato ad un aumentata percentuale di recidive, soprattutto se sono presenti granulociti eosinofili e mastcellule ⁽³⁸⁾.

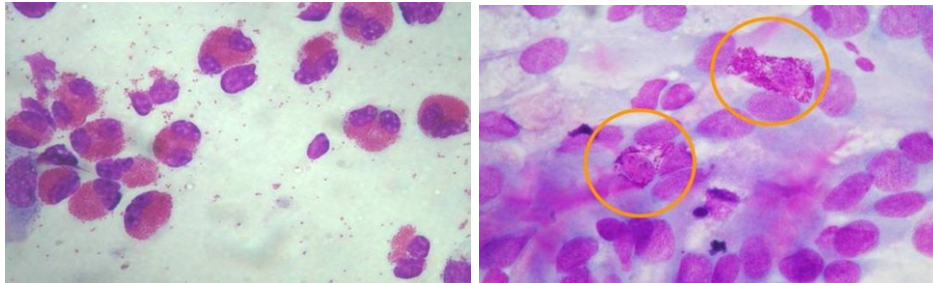


Fig. 14. Citologia nasale (MG – G): nella prima figura predominanza di eosinofili; nella seconda mast-cellule in degranulazione.

Da un punto di vista clinico, la classificazione della poliposi più diffusa è stata introdotta da Stammberger ⁽²⁾ nel 1997 e suddivide i polipi in cinque gruppi in base alle caratteristiche cliniche, istologiche e alla diversa risposta alle terapie:

- **Gruppo I:** comprende il polipo antrocoanale che origina nel seno mascellare, talora con una componente cistica, fuoriesce dall'ostio accessorio del seno mascellare, vegeta nella fossa nasale e può infine raggiungere la coana e impegnare il rinofaringe. Questo polipo è solitamente monolaterale e viene identificato per lo più in età pediatrica;

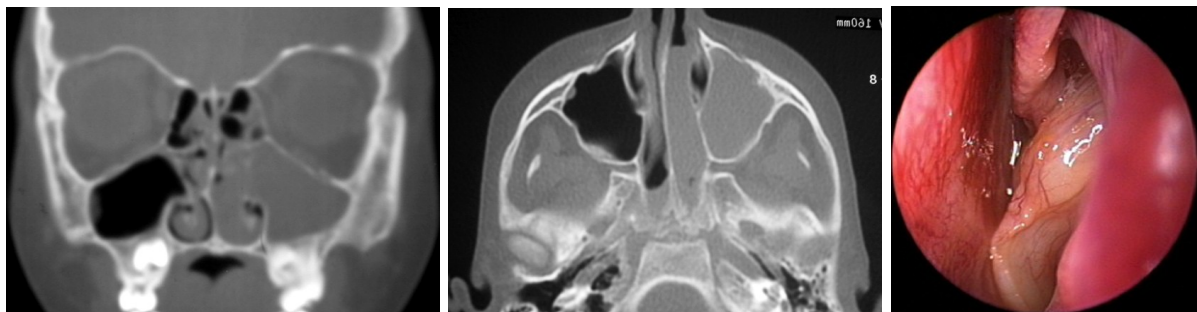


Fig. 15. Polipo antrocoanale. TC coronale e assiale e rilievo endoscopico (polipo meato medio).

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

- **Gruppo II:** comprende grandi polipi isolati che originano dalle aree di contatto dell'etmoide anteriore o dal recesso sfeno-etmoidale (meato superiore-supremo o seno sfenoidale) e giungono fino al pavimento nasale e fino alla coana;

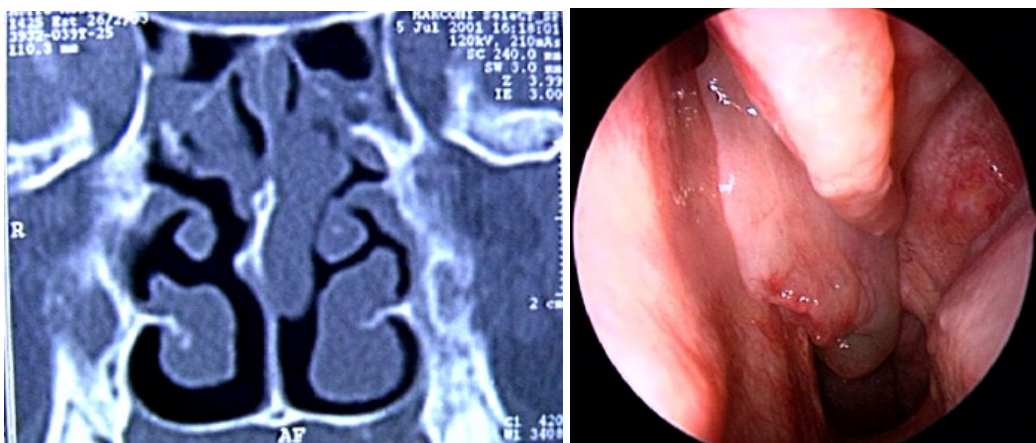


Fig. 16. Poliposi isolata. TC coronale e rilievo endoscopico (polipo meato medio).

- **Gruppo III:** è composto da pazienti con poliposi associata a rinosinusite cronica non dominata dalla presenza degli eosinofili. La poliposi è solitamente bilaterale e spesso è presente una sovrainfezione batterica;



Fig. 17. Poliposi associata a RSC. TC coronale, assiale e rilievo endoscopico (polipo meato medio).

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

- **Gruppo IV:** comprende pazienti con poliposi associata a rinosinusite cronica con marcata eosinofilia.

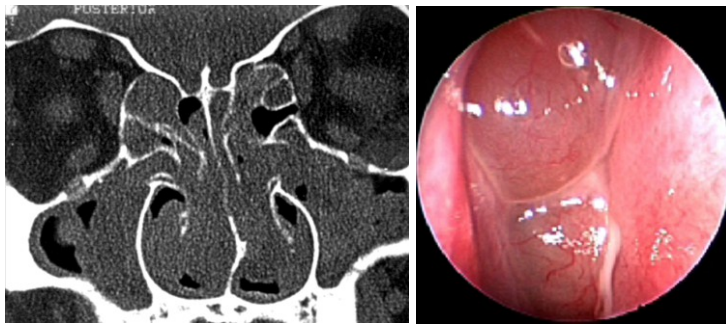


Fig. 18. PN + RSC ed eosinofilia. TC coronale e rilievo endoscopico.

- **Gruppo V:** comprende le poliposi associate a malattie sistemiche (fibrosi cistica, discinesia ciliare primaria).



Fig. 19. Poliposi massiva associata a Fibrosi Cistica. TC coronale, assiale e rilievo endoscopico.

Storia naturale e complicanze della poliposi nasale.

Il decorso a lungo termine della poliposi nasale è largamente sconosciuto, anche perché la storia naturale della patologia è solitamente modificata dagli interventi terapeutici, di natura medica o chirurgica ⁽²⁾.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

Nonostante le procedure chirurgiche, anche le più radicali, la PN ha un' alta frequenza di recidiva in almeno 1/3 dei pazienti. Nei casi più gravi (poliposi massiva) la recidività è del 60 % ⁽³⁹⁾.

Le manifestazioni della PN dipendono dall' ampiezza del polipo. Le piccole formazioni possono non indurre sintomi e sono identificabili, durante le indagini di routine spesso come reperto collaterale.

I polipi del meato medio sono invece sintomatici, possono bloccare il complesso ostio-meatale (COM) e causare segni e sintomi cronici o ricorrenti.

Una PN massiva o un singolo grande polipo (per esempio antro-coanale) associati ad ostruzione delle fosse nasali e del rinofaringe possono determinare disturbi del sonno (OSAS) e respirazione orale cronica. Possono inoltre causare disfunzione tubarica ed infezioni dell' orecchio medio.

Va ricordato infine che almeno un terzo dei pazienti poliposici manifesta un interessamento delle vie aeree inferiori, solitamente in forma di asma.

Terapia della Poliposi Nasale.

La patogenesi della poliposi nasale non è ancora completamente precisata e per questo il suo trattamento non è spesso risolutivo ma si limita a controllare i sintomi (trattamento sintomatico). La scelta terapeutica prevede l' associazione di un trattamento medico (steroideo, antistaminico, antileucotrieno) e una terapia chirurgica endoscopica endonasale (ESS). Il trattamento medico con steroidi sistemici e topici presenta un grado di raccomandazione secondo l'evidence based medicine.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

Il trattamento medico e quello chirurgico presentano un' azione sinergica e possono essere ripetuti nel tempo per garantire il controllo della patologia, data l' elevata tendenza alla recidiva.

La scelta del tipo di intervento chirurgico da effettuare varia in base al tipo di poliposi. In queste forme la terapia chirurgica è di tipo sintomatico ed è propedeutica al trattamento medico ⁽²⁾.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

2. SCOPO DELLA RICERCA.

2.1. Stress ossidativo e infiammazione

La prima definizione di Stress Ossidativo risale: “A disturbance in the pro-oxidant – antioxidant balance in favour of the former, leading to potential damage” (Una modificazione dell’equilibrio tra fattori pro- e anti- ossidanti in favore dei primi che può determinare un potenziale danno) ⁽⁴⁰⁾.

I principali attori dello stress ossidativo sono radicali liberi e specie chimiche altamente reattive che hanno un alto potere ossidante. Tali molecole hanno la caratteristica comune di essere particolarmente instabili poiché possiedono uno o più elettroni spaiati in uno degli orbitali molecolari. Questa forte instabilità li porta a reagire con altre molecole per cercare un equilibrio appropriandosi di un elettrone delle molecole con cui vengono in contatto. A seconda della composizione chimica i radicali ossidanti vengono distinti in due grandi categorie: le specie radicali dell’ossigeno (ROS) e le specie radicali dell’azoto (RNS).

Le modificazioni chimiche operate dai ROS possono riguardare tutte le macromolecole che costituiscono le cellule provocando danni strutturali e funzionali.

Le modificazioni che avvengono possono riguardare i lipidi, le proteine e il DNA.

L’ossidazione di molecole di natura lipidica (perossidazione lipidica) modifica la struttura tridimensionale dei lipidi che costituiscono le membrane cellulari modificandone la fluidità e la permeabilità, compromettendone l’integrità di funzionamento.

L’ossidazione delle proteine può agire su due livelli, da una parte può determinare un cambiamento della struttura tridimensionale della molecola impedendone il corretto

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

funzionamento, dall'altra può modificare il sito catalitico di un enzima impedendo il legame con il substrato. A seconda del tipo di proteina coinvolta può esserci un mal funzionamento delle reazioni metaboliche cellulari (enzima), delle vie di trasduzione del segnale (recettore) o dei gradienti di membrana di diverse sostanze (trasportatori). Il danno al DNA consiste in modificazioni chimiche dei nucleotidi che spesso danno origine a rotture del filamento di acido nucleico o a errori nella replicazione con l'introduzione di mutazioni.

Meccanismi antiossidanti

Considerando tutta la serie di eventi scatenata dalle specie ossidanti, risulta chiaro che le cellule sono notevolmente influenzate dalla presenza delle specie reattive, per questo motivo hanno sviluppato alcuni sistemi di detossificazione per difendersi dai danni provocati dall'interazione dei ROS con le macromolecole cellulari (sistemi anti-ossidanti).

I sistemi anti-ossidanti sono costituiti da enzimi e molecole "tamponi" che bloccano la capacità delle specie altamente reattive di arrecare danni cellulari.

Tra gli enzimi più conosciuti come sistemi anti-ossidanti ricordiamo:

- Catalasi che degrada H_2O_2 formando H_2O ed ossigeno ($H_2O_2 \rightleftharpoons O_2 + 2 H_2O$)
- Superossido Dismutasi che trasforma la specie più reattiva, O_2^- in H_2O_2 ($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$)
- Glutatione perossidasi (GPx) che catalizza la reazione di degradazione di H_2O_2 per formare H_2O , ossidando il glutatione ridotto (GSH) alla sua forma disolfito (GSSG); la GPx inoltre catalizza la reazione di riduzione dei lipidi perossidi ai loro rispettivi alcoli.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

Nel normale funzionamento cellulare, la produzione di sostanze pro-ossidanti è equilibrata dai sistemi antiossidanti che limitano al minimo i danni ossidativi e consentono alla cellula di svolgere le normali funzioni a cui è deputata. Come descritto da Sies ⁽⁴⁰⁾, lo sbilanciamento di questo equilibrio verso il sistema ossidante comporta l'accumulo di danni ossidativi che inducono un malfunzionamento della cellula. Questo sbilanciamento può essere dovuto ad un aumento della concentrazione di ROS oppure ad una minore capacità di neutralizzare i sistemi ossidanti. Nel primo caso, l'aumento della produzione di ROS può essere dovuta ad un'aumentata concentrazione di O₂⁻, all'aumento della attivazione dei fagociti o all'esposizione diretta a tossine esogene (es. fumo di sigaretta). Nel secondo caso invece, la minore attività anti-ossidante può essere dovuta ad una riduzione dell'intake di antiossidanti (introduzione di antiossidanti con la dieta), aumento dell'escrezione di glutathione (GSH) o mutazioni geniche di enzimi antiossidanti che ne determinano un malfunzionamento.

I dati sperimentali pubblicati in questi anni circa il ruolo dello stress ossidativo nel campo della salute umana suggeriscono che produzione, trasformazione e metabolismo dei radicali siano processi finemente regolati nei tessuti e che un malfunzionamento di questi processi possa portare all'instaurarsi di un danno tissutale di tipo infiammatorio. La cronicizzazione del fenomeno infiammatorio è a sua volta una delle maggiori cause dell'invecchiamento cellulare, dello sviluppo di alcuni tumori, dell'instaurarsi di malattie neurodegenerative e cardiovascolari.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

2.2. Possibile ruolo dei metalli nello sviluppo e decorso clinico della poliposi nasale: review della letteratura.

Sempre più evidenze e dati sperimentali pubblicati in questi anni circa il ruolo dello stress ossidativo dimostrano che un'alterazione nel metabolismo dei radicali liberi nei tessuti possa portare all'instaurarsi di un danno tissutale di tipo infiammatorio.

E' inoltre noto che alcuni enzimi antiossidanti necessitano di alcuni metalli per la loro massima efficacia e che una diminuzione di alcuni di questi microelementi, che avrebbero un'azione anti-ossidante e immunoregolatoria anche presi singolarmente, come lo zinco o il selenio, potrebbe condurre allo sviluppo di patologie a carattere cronico.

Un sottogruppo di metalli particolarmente importante in biologia e in medicina è costituito dai cosiddetti “metalli in traccia” (o elementi in traccia), gli elementi chimici presenti nei fluidi biologici degli organismi viventi in concentrazioni inferiori a 1 µg per grammo di peso ⁽⁴¹⁾. In base agli effetti fisiopatologici i metalli in traccia possono essere suddivisi in due gruppi: nel primo gruppo gli elementi essenziali per la vita in quanto implicati in importanti processi metabolici, mentre nel secondo gruppo sono contenuti elementi tossici per gli organismi viventi anche a basse concentrazioni. Nel caso degli esseri umani sono noti quindici elementi in traccia essenziali: *arsenico, cobalto, cromo (III), rame, fluoro, ferro, iodio, manganese, molibdeno, nichel, selenio, silicio, stagno, vanadio e zinco* ⁽⁴²⁾, mentre il secondo gruppo contiene elementi quali *cadmio, mercurio, alluminio, cromo (VI) e piombo*.

La definizione di essenzialità è ricondotta a quattro funzioni principali: stabilizzatrice, di struttura, ormonale e di cofattore enzimatico.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

Come tutti gli elementi anche quelli in traccia svolgono la loro azione a condizione che siano presenti a determinati livelli di concentrazione. I livelli bassi provocano stati di carenza; quelli più alti stati di tossicità.

Di seguito descriveremo le caratteristiche dei principali elementi essenziali esaminati nel nostro studio.

Ferro (Fe): è l'elemento chimico di numero atomico 26. Il suo ruolo biologico si esplica in un notevole numero di reazioni biochimiche nelle cellule viventi. Tra le più importanti si possono citare le reazioni di ossido-riduzione e di trasporto dell'ossigeno legato all'emoglobina, mediate da numerosi enzimi (per ossidasi, catalasi, citocromo-ossidasi). Gli animali inglobano il ferro nel complesso eme un componente essenziale delle proteine coinvolte nelle reazioni redox, come la respirazione. Eccessi di ferro aumentano quindi le reazioni redox provocando così un aumento dei radicali liberi. Per evitare ciò, il ferro nel nostro organismo è legato a proteine, che regolano il suo stato di ossidazione ⁽⁴²⁾.

Zinco (Zn): è l'elemento chimico di numero atomico 30. E' un importante agente immunoregolatore, cofattore di crescita e citoprotettore con i suoi ruoli antiossidante, antiapoptotico e antinfiammatorio ⁽⁴³⁾. Queste proprietà sono particolarmente importanti per mantenere l'omeostasi dei tessuti epiteliali che sono la prima linea di difesa. L'epitelio respiratorio è vulnerabile a diversi ossidanti (prodotti della respirazione aerobia e esterni come il fumo di sigaretta). Per combattere questi ossidanti l'epitelio respiratorio e le sue secrezioni contengono antiossidanti come catalasi, vitamine C ed E, glutazione e due isoforme di superossido dismutasi ⁽⁴⁴⁾.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

Alcuni studi hanno evidenziato un effetto protettivo dello Zn nei confronti dell'azione tossica di alcuni metalli pesanti ⁽⁴⁵⁾.

Rame (Cu): è l'elemento chimico di numero atomico 29. E' componente di tantissimi enzimi (es. SOD), e composti proteici (ceruloplasmina) che hanno un ruolo di catalizzatori nella riduzione dell'ossigeno molecolare nell'acqua. Mentre un eccesso di Cu catalizza la formazione di radicali liberi, la superossido dismutasi (inibita da bassi valori di Cu) ha una capacità anti-ossidante ^(42, 46).

Selenio (Se): è l'elemento chimico di numero atomico 34. Il selenio è un oligonutriente presente in natura che rappresenta un nutriente essenziale, implicato in numerose funzioni biologiche. Fonti naturali di selenio sono pesce, carne, frattaglie, latte e derivati, lievito di birra, cereali, noci, funghi, frutta e vegetali. Viene usato per eliminare i radicali liberi in sinergia con la vitamina E e in molti enzimi antiossidanti (glutazione perossidasi). E' ben nota l'azione di prevenzione esercitata nei confronti degli effetti tossici di Cadmio (Cd) e Mercurio (Hg) ⁽⁴²⁾.

Cromo (Cr): è l'elemento chimico di numero atomico 24. Era noto fino a pochi decenni fa solo per le sue proprietà tossiche. Il cromo (III) è da considerarsi, in tracce, essenziale alle forme di vita umana e animale, mentre i composti del cromo (VI) sono riconosciuti tossici e cancerogeni: possono causare effetti avversi alla pelle, alle cavità nasali e ai seni paranasali e, in misura minore, al rene.

E' biologicamente attivo nel nostro organismo solo il Cr trivalente. Venne identificato come elemento attivo un complesso organico del cromo che venne chiamato 'Fattore di tolleranza al glucosio' (Glucose Tolerance Factor, GTF) ⁽⁴⁷⁾.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

Manganese (Mn): è l'elemento chimico di numero atomico 25. Molte classi di enzimi contengono uno o più atomi di manganese come cofattori: le ossidoriduttasi, le transferasi, le idrolasi, le liasi, le isomerasi, le ligasi, le lectine e le integrine. I polipeptidi più famosi che contengono manganese sono l'arginasi, la superossido dismutasi e la tossina della difterite ⁽⁴²⁾.

Nichel (Ni): è l'elemento chimico di numero atomico 28. Il nichel è un minerale in traccia essenziale nel corpo umano. Ricerche eseguite su esseri umani e animali mostrano che il nichel ha una funzione nel metabolismo degli ormoni, dei lipidi e della membrana e nell'integrità della membrana cellulare. E' un attivatore di alcuni enzimi (nel fegato arginasi, tripsina e carbossilasi) e partecipa al metabolismo del glucosio. Se ne trovano quantità importanti nel DNA e nell' RNA e può agire come stabilizzatore di questi acidi nucleici. Il nichel è tossico per gli esseri umani se assunto a livelli troppo elevati (è anche componente del fumo di sigaretta) ⁽⁴²⁾.

Cadmio (Cd): è l'elemento chimico di numero atomico 48. Il cadmio non riveste alcun ruolo biologico nel corpo umano. Sia esso sia i suoi composti sono tossici perfino a basse concentrazioni e tendono ad accumularsi negli organismi e negli ecosistemi. I danni possono essere acuti (sistema respiratorio e gastroenterico) o cronici (il principale bersaglio è il rene) ⁽⁴⁸⁾.

Piombo (Pb): è l'elemento chimico di numero atomico 82. I suoi composti sono tossici per inalazione e ingestione (l'avvelenamento è detto saturnismo). Il piombo è un metallo velenoso, che può danneggiare il sistema nervoso (specialmente nei bambini) e causare malattie del cervello e del sangue. L'esposizione al piombo o ai

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

suoi sali, soprattutto a quelli solubili, o all'ossido PbO₂, può causare nefropatie, caratterizzate dalla sclerotizzazione dei tessuti renali, e dolori addominali colici ⁽⁴⁸⁾.

Alluminio (Al): è l'elemento chimico di numero atomico 13. Nessun sistema vivente utilizza l'alluminio per i processi biochimici, ragione che sarebbe sufficiente per ritenerlo tossico se in senso restrittivo si definisce tale tutto ciò che entra e non dà luogo a reazioni nell'organismo. L'alluminio è tossico per il SNC (altamente tossico anche a basso dosaggio, in caso di esposizione cronica se non eliminato), come i metalli pesanti nel caso in cui l'organismo non sia in grado di espellerlo, ad esempio in caso di gravi malattie renali. È meno velenoso ma molto più persistente (e alla fine tossico in maniera paragonabile) dei più noti mercurio, cadmio, piombo. Ha la tendenza ad accumularsi nel cervello e nelle ossa. Alcune ricerche cliniche sembrano dimostrare la correlazione tra assunzione cronica di alluminio e lo sviluppo di gravi malattie neurodegenerative, quali Alzheimer, Parkinson, SLA, sclerosi multipla, demenza ⁽⁴⁸⁾.

Da una ricerca eseguita su Pubmed risulta che in letteratura sono presenti solo tre lavori che abbiano tentato di mostrare una correlazione tra presenza di metalli in traccia e lo sviluppo o il decorso della poliposi rinosinusale. Nei primi due lavori son stati misurati soprattutto i cosiddetti metalli «buoni» con azione anti-ossidante, mentre nel terzo lavoro i metalli pesanti su una popolazione con esposizione professionale e voluttuaria.

Il lavoro di Rostkowska B. et al del 2004 ⁽⁴⁹⁾ ha determinato la concentrazione di Cu, Zn, Se e Pb in campioni di polipi prelevati da 41 pazienti rispetto a 10 campioni di mucosa sana evidenziando una riduzione di concentrazione nei polipi nasali

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

ipotizzando che questo risultato potesse derivare da alterazioni dell' ultrastruttura del polipo rispetto alla mucosa sana.

Nel 2013 Okur et al ⁽⁵⁰⁾ hanno misurato i livelli di Zn e Se e di due enzimi anti-ossidanti metallo-dipendenti (SOD e GSH-Px) dei polipi nasali di 37 pazienti confrontandoli con i valori rilevati su 27 controlli sani. Anche in questo caso le concentrazioni dei metalli sono risultate inferiori nei polipi rispetto ai controlli, così come l' attività della SOD.

Khelifi et al ⁽⁵¹⁾ nel loro lavoro del 2014 hanno invece misurato le concentrazioni di quattro metalli pesanti (Cd, Ni, Cr, As) in 55 polipi nasali e su 55 campioni di mucosa normale di pazienti esposti per cause professionali, geografiche o voluttuarie. In questo caso i risultati hanno mostrato un aumentata concentrazione di metalli nei polipi nasali rispetto alla mucosa sana.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

2.3. Obiettivi della ricerca.

In virtù dei dati pubblicati in letteratura ci siamo chiesti se potesse esistere un rapporto tra concentrazione dei metalli e sviluppo della poliposi rinosinusale e se testando più metalli differenti avremmo ottenuto le stesse differenze di concentrazione. Inoltre ci siamo proposti di verificare se le concentrazioni dei metalli potessero variare in base allo stadio clinico e se potessero esistere delle differenze ultrastrutturali tra polipi di diverso stadio clinico che permettessero di giustificare una differente concentrazione dei metalli stessi.

Per conseguire i nostri obiettivi abbiamo selezionato 29 pazienti sani e 58 pazienti affetti da poliposi nasale. Questi ultimi sono stati quindi stadiati clinicamente. Abbiamo prelevato successivamente 58 campioni di polipi e 29 controlli sani. Su ciascun campione prelevato abbiamo eseguito un'analisi morfostrutturale e misurato la concentrazione di dieci metalli (Al, Pb, Ni, Fe, Zn, Se, Cu, Mn, Cr, Cd).

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Selezione dei pazienti.

Sono stati selezionati 58 pazienti (41 maschi e 17 femmine) con età media di 52 anni affetti da poliposi rinosinusale diagnosticata attraverso esame endoscopico e TC senza m.d.c. in proiezione assiale, coronale e sagittale. Tutti i pazienti erano in lista operatoria per intervento chirurgico di pansinusectomia per via endoscopica (FESS).

I controlli sani sono stati prelevati da 29 pazienti (20 maschi e 9 femmine) con età media di 53 anni in lista operatoria per correzione funzionale del setto nasale. Tutti i pazienti del gruppo di controllo non sono risultati affetti da rinopatie croniche sia allergiche che non allergiche.

Ciascun paziente è stato sottoposto ad una accurata indagine anamnestica, personale e familiare per evidenziare oltre ai dati anagrafici (età, sesso) la presenza di possibili fattori in grado di influenzare la patologia (ASA intolleranza, asma bronchiale, atopia) o l'esposizione ai metalli (fumo di sigaretta, esposizione professionale).

Dal grafico in Fig. 20 si può evincere che l'atopia è stata riscontrata solo nel 3% dei pazienti, a conferma che esiste una scarsa correlazione tra allergia e PN.

In circa 1/5 dei pazienti invece è stata evidenziata una correlazione tra poliposi rinosinusale ed asma bronchiale non allergico e intolleranza all'acido acetilsalicilico.

Il 19 % dei pazienti aveva un'esposizione professionale ai metalli pesanti: le professioni sono state rappresentate da operai edili impegnati in compiti di carpenteria, fabbri e saldatori.

Il 15 % dei pazienti è risultato fumatore in media di 15 sigarette al dì.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

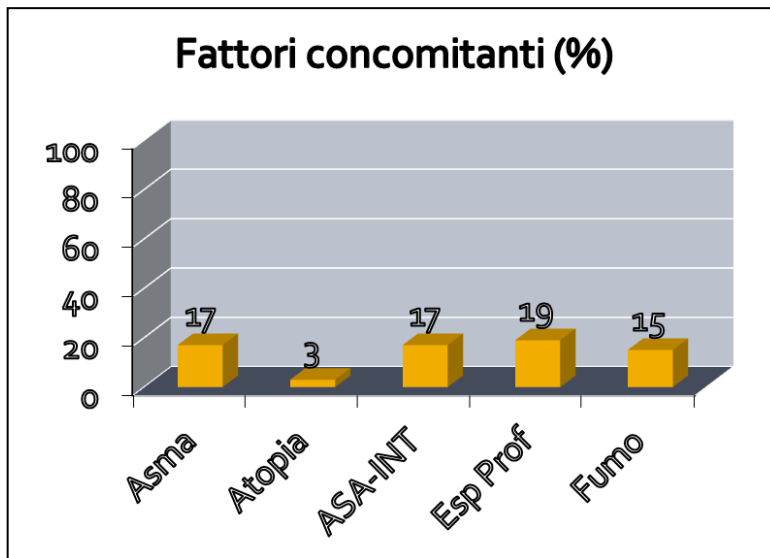


Fig. 20. Fattori concomitanti nel gruppo di pazienti affetti da poliposi rinosinusale.

Tutti i 59 pazienti affetti da poliposi sono stati sottoposti a prelievo citologico attraverso scraping con Rhinoprobe della mucosa del 1/3 medio del turbinato inferiore per esame microscopico ottico dopo colorazione con May Grunwald – Giemsa che ha evidenziato nel 63,79 % dei casi una neutrofilia mentre nel restante 36,21 % una eosinofilia.

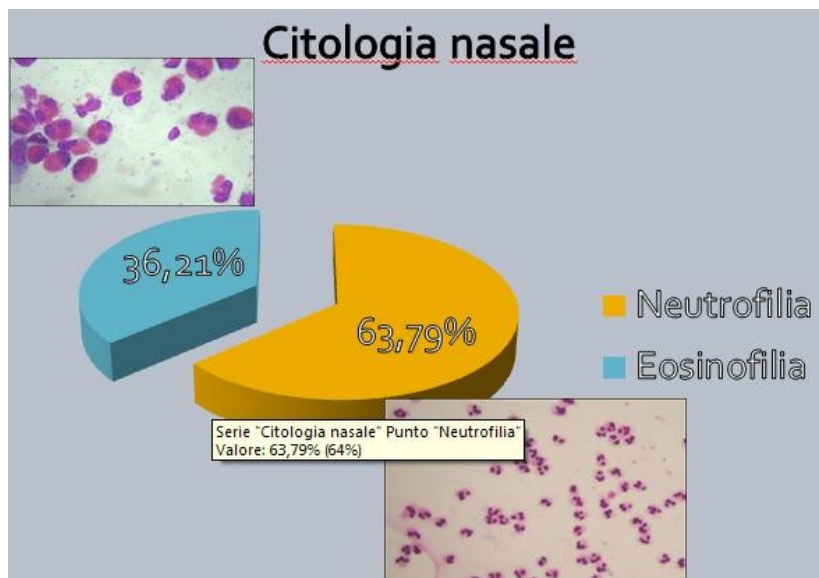


Fig. 21. Risultati della citologia nasale nel gruppo di pazienti affetti da poliposi rinosinusale.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

3.2. Stadiazione clinica.

I pazienti del gruppo “poliposi” sono stati stadiati clinicamente secondo la classificazione proposta da Stammberger ⁽²⁾.

Solo due pazienti sono risultati affetti da polipo antrocoanale e quindi inseriti nello stadio I. Quattro pazienti hanno mostrato una poliposi isolata e quindi uno stadio II. La maggior parte dei pazienti 37/58(63,79 %) è stata classificata allo stadio III (poliposi massiva associata a rinosinusite cronica) mentre il 25,8 % (15/58) è stato incluso nello stadio IV (poliposi massiva associata ad eosinofilia). Nessun paziente è stato classificato allo stadio V. I dati relativi allo staging clinico sono riassunti nella Fig. 22.

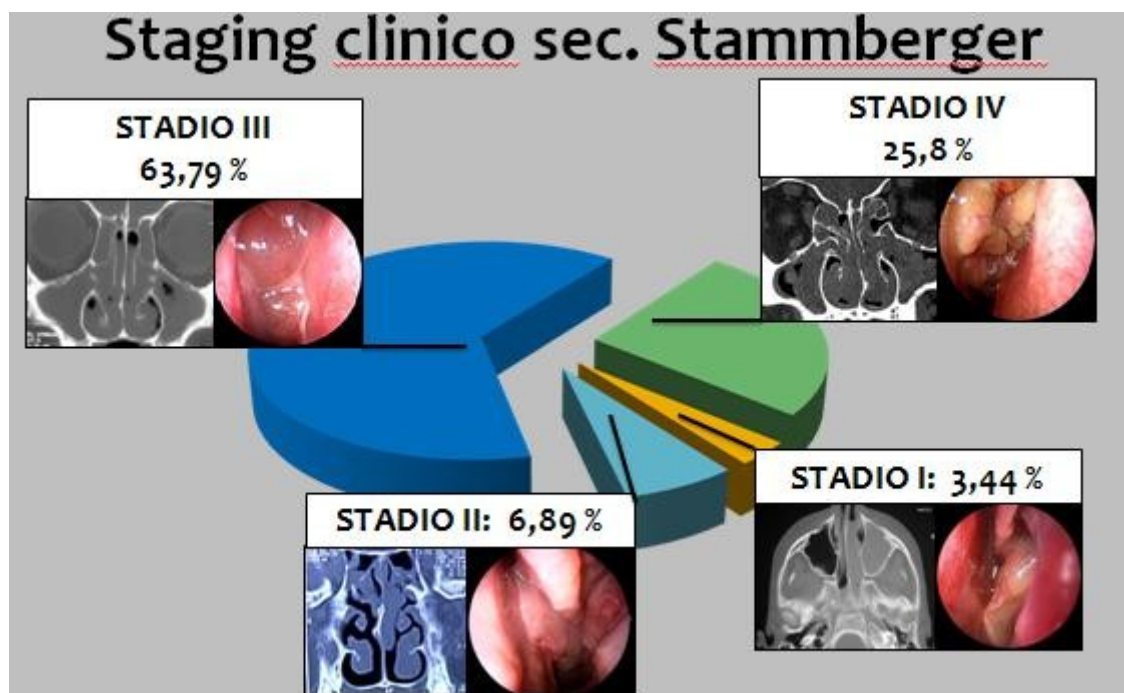


Fig. 22. Stadiazione clinica secondo Stammberger del gruppo di pazienti affetto a poliposi rinosinusale.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

3.3. Tecniche di prelievo bioptico intra-operatorio.

I campioni di polipo (Fig. 24) sul quale è stato effettuato lo studio, sono stati prelevati durante intervento chirurgico di chirurgia endoscopica rinosinusale mediante l'utilizzo di strumenti taglienti (pinza di Blakesley-Weil, Karl Storz, Germany; Fig. 23).

I campioni di mucosa sana sono stati invece prelevati mediante incisione eseguita sul turbinato medio dei pazienti sottoposti a correzione funzionale del setto.

Ciascun pezzo anatomico prelevato è stato inviato in laboratorio fresco e conservato per le successive analisi a seconda del tipo di analisi da effettuare.

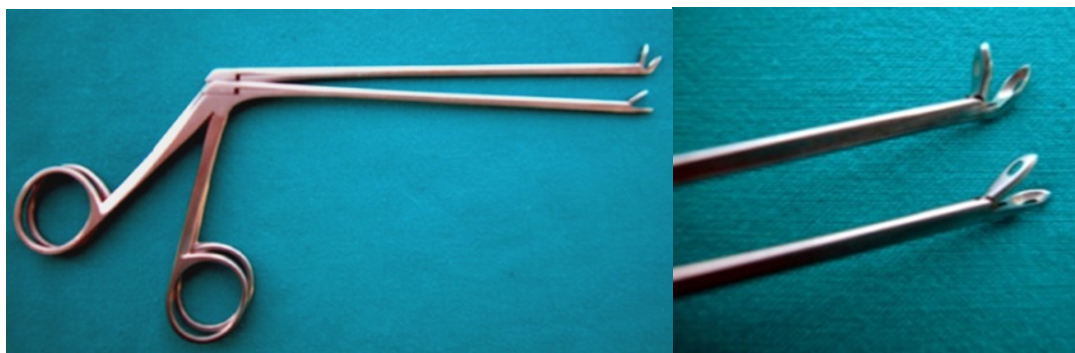


Fig. 23. Pinze taglienti secondo Blakesley – Weil (Karl Storz, Germany): retta e curva con dettaglio.

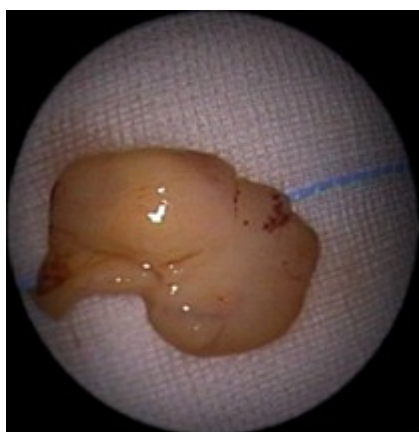


Fig. 24. Campione di polipo fresco.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

3.4. Microscopia elettronica a trasmissione (TEM) e a scansione (SEM).

L'analisi morfostrutturale dei polipi è stata effettuata in Microscopia Elettronica a Trasmissione (TEM) e a Scansione (SEM).

TEM.

I campioni di biopsie di polipi appena prelevati sono stati chimicamente fissati con 2% glutaraldeide in cacodylate buffer per 2 ore. Sono stati effettuati cinque lavaggi di 5 minuti ciascuno, nello stesso buffer. A questo punto i campioni cellulari sono stati post fissati in 1% di tetrossido di Osmio (OsO₄) per 1 h a 4°C; quindi si è passati alla disidratazione del campione in acetone al 60%, 5 cambi per 5 minuti ciascuno, e in acetone assoluto, 5 cambi per 5 minuti ciascuno.

I campioni sono quindi stati inclusi in resine/acetone con un primo passaggio, con rapporto 1:1 per 20 minuti a 60°C, quindi un secondo passaggio, con rapporto 3:1 per 20 minuti a 60°C. I primi due passaggi sono stati fatti in fornetto a 60°C in boccette con tappo chiuso, per evitare l'evaporazione dell'acetone. Un terzo passaggio in resina assoluta, per 20 minuti a 60°C, con boccetta tappo aperto. Infine inclusione overnight a 60°C.

I blocks" (1mm x 1mm) sono stati sezionati in sottili sezioni. Le sezioni preparate con LKB-8800 ultratome, sono state esaminate e fotografate con un Zeiss 902 electron microscope a 80 kV (Fig. 25).

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.



Fig. 25. Zeiss 902 Electron Microscope.

SEM.

I campioni di polipi sono stati fissati in glutaraldeide al 2,5% per 2 ore, quindi lavati in phosphate buffer saline (PBS) (5 lavaggi da 5 minuti). I pezzi sono stati poi congelati in azoto liquido per immersione per alcuni minuti, dopodichè è stata eseguita una criofrattura cellulare. I campioni ottenuti sono stati esaminati e fotografati al microscopio elettronico a scansione in modalità low vacuum ESEM (environmental scanning electron microscope; Fig. 26).

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.



Fig. 26. Low Vacuum ESEM.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinuziale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

3.5. Spettrometria di massa ad alta risoluzione (HR-ICP-MS)

Sono stati analizzati con la metodica dell' ICP-MS un totale di 58 biopsie di polipi nasali e 29 mucose nasali utilizzate come controlli di riferimento.

I metalli che sono stati analizzati sono: Zn, Cd, Al, Pb, Se, Cu, Cr, Mn, Ni, Fe.

I campioni conservati a -80°C, di peso variabile tra i 100 mg e i 200 mg, sono stati scongelati e pesati. Quindi è stata fatta una mineralizzazione previa asciugatura in stufa a 105°C per 2h.

I campioni sono stati digeriti in acido nitrico (HNO₃) (Ultrapure grade, Carlo Erba, Milan, Italy), è stato utilizzato un campione cellulare di mucosa nasale sana come bianco standard per la lettura. Sono inoltre state prese delle precauzioni per evitare contaminazioni di metalli nella plastiche utilizzata. Provette sono state previamente lavate in HNO₃ al 10% per 24h, sono poi stati fatti risciacqui ripetuti con acqua deionizzata (EASY Pure system, PBI International, Milan, Italy).

Tutte le fasi preparatorie sono state eseguite in un laboratorio di classe 100 per minimizzare il rischio di contaminazione da metalli. Dopo la diluizione dei campioni con acqua deionizzata (PBI International), la concentrazione dei diversi metalli studiati è stata quantificata con l'uso di uno spettrometro di massa (SF-ICP-MS, ThermoFischer Brema, Germania; Fig. 27).

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.



Fig. 27. SF-ICP-MS, ThermoFischer Brema, Germania.

3.6. Analisi attività SOD.

Per la ricerca dell'attività della SOD è stato utilizzato l' Assay Kit della Biovision, secondo protocollo della ditta.

Analisi attività SOD totale.

Prima del trattamento il tessuto è stato lavato con 150mM di KCl per rimuovere i globuli rossi. Il tessuto è stato omogenato in ghiaccio secco 0.1M Tris/HCl, pH 7.4 contenente 0.25M saccarosio, 5mM β -ME, 0.1mg/ml PMSF.

Il tessuto omogenato è stato centrifugato a 500 x g per 5 minuti a 4°C e sono state scartati i detriti cellulari. Il surnatante ottenuto contiene l'attività enzimatica sia mitocondriale che citosolica.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

RISULTATI.

Risultati Spettrometria di Massa ad alta risoluzione (HR – ICP – MS).

I risultati della misurazione della concentrazione dei dieci metalli (Cadmio, Alluminio, Piombo, Nichel, Cromo, Zinco, Selenio, Rame, Manganese, e Ferro) sono riassunti nelle tabelle seguenti (Fig. 28).

	Al (ng/g)	Cr (ng/g)	Mn (ng/g)	Fe (ng/g)	Ni (ng/g)	Cu (ng/g)	Zn (ng/g)	Se (ng/g)	Cd (ng/g)	Pb (ng/g)
PNS	2346	102	180	43839	148	1091	18551	159	66	222
CTR	4975	364	466	113394	379	2037	38482	233	173	450

Fig. 28. Risultati spettrometria di massa della concentrazione dei metalli tra il gruppo di pazienti affetto da poliposi rinosinusale (PNS) ed i controlli sani (CTR): medie aritmetiche.

La distribuzione dei valori di concentrazione dei metalli nei due gruppi è risultata fortemente asimmetrica positiva. Una trasformazione logaritmica dei dati originali è stata in grado di rendere simmetrica la distribuzione dei valori. Pertanto sono state calcolate come misure di posizione le medie geometriche (Fig. 29).

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

	Al (ng/g)	Cr (ng/g)	Mn (ng/g)	Fe (ng/g)	Ni (ng/g)	Cu (ng/g)	Zn (ng/g)	Se (ng/g)	Cd (ng/g)	Pb (ng/g)
PNS	1762	59	141	35289	96	1018	13913	151	50	47
CTR	3777	180	379	94708	342	1863	34641	214	142	232

Fig. 29. Risultati spettrometria di massa della concentrazione dei metalli tra il gruppo di pazienti affetto da poliposi rinosinusale (PNS) ed i controlli sani (CTR): medie geometriche.

Per la differenza tra i due gruppi è stato effettuato il test t di Student.

Nei polipi nasali le medie delle concentrazioni di tutti i metalli esaminati sono risultate significativamente inferiori rispetto ai controlli sani.

La media aritmetica dell' Alluminio (Al) è risultata 2346 ± 2128 ng/g nei polipi e 4975 ± 4495 ng/g nei controlli sani. La media geometrica rispettivamente 1762 e 3777 ng/g nei polipi e nei controlli sani ($p < 0.001$).

La media aritmetica del Cromo (Cr) è risultata 102 ± 111 ng/g nei polipi e 364 ± 464 ng/g nei controlli sani. La media geometrica rispettivamente 59 e 181 ng/g nei polipi e nei controlli sani ($p < 0.001$).

La media aritmetica del Manganese (Mn) è risultata 180 ± 143 ng/g nei polipi e 466 ± 334 ng/g nei controlli sani. La media geometrica rispettivamente 141 e 379 ng/g nei polipi e nei controlli sani ($p < 0.001$).

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

La media aritmetica del Ferro (Fe) è risultata 43839 ± 27154 ng/g nei polipi e 113394 ± 70116 ng/g nei controlli sani. La media geometrica rispettivamente 35289 e 94708 ng/g nei polipi e nei controlli sani ($p < 0.001$).

La media aritmetica del Nichel (Ni) è risultata 148 ± 139 ng/g nei polipi e 379 ± 175 ng/g nei controlli sani. La media geometrica rispettivamente 96 e 342 ng/g nei polipi e nei controlli sani ($p < 0.001$).

La media aritmetica del Rame (Cu) è risultata 1091 ± 416 ng/g nei polipi e 2037 ± 867 ng/g nei controlli sani. La media geometrica rispettivamente 1018 e 1863 ng/g nei polipi e nei controlli sani ($p < 0.001$).

La media aritmetica del Zinco (Zn) è risultata 18551 ± 15276 ng/g nei polipi e 38482 ± 17874 ng/g nei controlli sani. La media geometrica rispettivamente 13913 e 34641 ng/g nei polipi e nei controlli sani ($p < 0.001$).

La media aritmetica del Selenio (Se) è risultata 159 ± 48 ng/g nei polipi e 233 ± 110 ng/g nei controlli sani. La media geometrica rispettivamente 151 e 213 ng/g nei polipi e nei controlli sani ($p < 0.001$).

La media aritmetica del Cadmio (Cd) è risultata 66 ± 59 ng/g nei polipi e 173 ± 104 ng/g nei controlli sani. La media geometrica rispettivamente 50 e 142 ng/g nei polipi e nei controlli sani ($p < 0.001$).

La media aritmetica del Piombo (Pb) è risultata 222 ± 807 ng/g nei polipi e 450 ± 629 ng/g nei controlli sani. La media geometrica rispettivamente 47 e 231 ng/g nei polipi e nei controlli sani ($p < 0.001$).

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

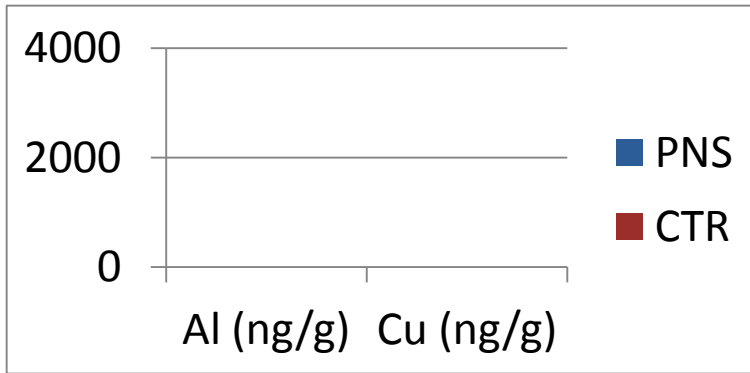


Fig. 30. Risultati spettrometria di massa della concentrazione dei metalli tra il gruppo di pazienti affetto da poliposi rinosinusale (PNS) ed i controlli sani (CTR): risultati Alluminio e Rame.

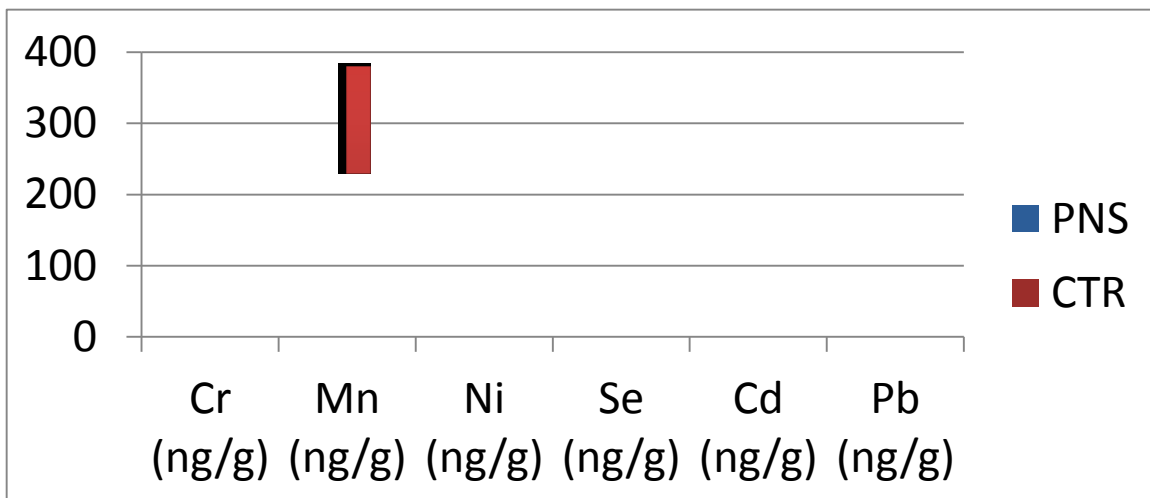


Fig. 31. Risultati spettrometria di massa della concentrazione dei metalli tra il gruppo di pazienti affetto da poliposi rinosinusale ed i controlli sani: risultati Cromo, Manganese, Nichel, Selenio, Cadmio, Piombo.

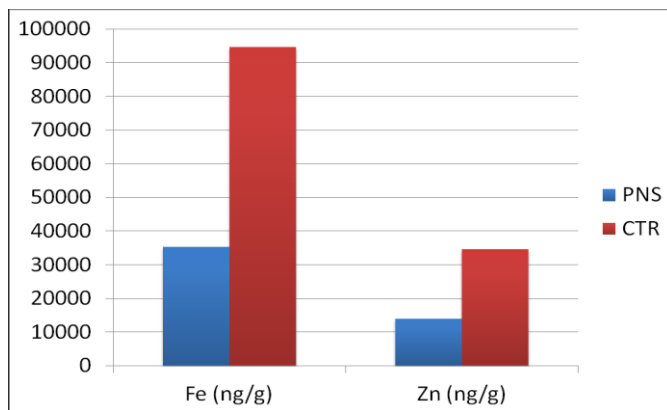


Fig. 32. Risultati spettrometria di massa della concentrazione dei metalli tra il gruppo di pazienti affetto da poliposi rinosinusale (PNS) ed i controlli sani (CTR): risultati Ferro e Zinco.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

Sia per quanto riguarda i metalli essenziali (Zn, Se, Cu, Mn, Fe, Cr, Ni) che per quanto riguarda i metalli francamente tossici (Al, Pb, Cd) è stata evidenziata una riduzione di concentrazione nei polipi senza riscontrare differenze.

Per quanto riguarda le differenze tra diversi stadi clinici è stato evidenziato che gli stadi clinici I e II hanno mostrato una concentrazione di metalli superiore rispetto agli stadi III e IV, senza tuttavia significatività statistica a causa dell' esiguità dei pazienti appartenenti ai primi due stadi (6/58). Questi dati sono riassunti nella figura 30.

PNS STADIO	Al (ng/g)	Cr (ng/g)	Mn (ng/g)	Fe (ng/g)	Ni (ng/g)	Cu (ng/g)	Zn (ng/g)	Se (ng/g)	Cd (ng/g)	Pb (ng/g)
I - II	4471	252	257	48989	283	1107	25266	137	93	1103
III - IV	2101	84	171	43244	132	1089	17776	132	62	120

Fig. 33. Risultati spettrometria di massa della concentrazione dei metalli tra il gruppo di pazienti affetto da poliposi rinosinusale stadi I e II ed il gruppo affetto da poliposi rinosinusale stadi III e IV.

Risultati analisi attività SOD totale.

I risultati della determinazione dell' attività SOD totale sono stati poco attendibili in quanto i campioni reclutati possedevano una dimensione non sufficiente per una corretta analisi con il kit a nostra disposizione ed un livello di residuo ematico troppo elevato per una determinazione realistica dell' attività SOD, per cui i dati non sono stati riportati in questo lavoro.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

I risultati della microscopia elettronica hanno evidenziato come la presenza di una matrice extracellulare disomogenea, rarefatta, ricca di vacuoli mucolipidici, e di cellule ricche di organuli citoplasmatici presenti sia nel controllo sano (Figg. 34-35) che nella poliposi isolata (Figg. 36-37) diventi più omogenea, con assenza dei vacuoli mucolipidici nella poliposi massiva (Fig. 38-39-40), quasi a indicare una minore attività funzionale e di filtro del connettivo, che risulta ispessito.

Inoltre nella poliposi massiva è stato riscontrato un infiltrato linfocitario abbondante nell' interstizio e cellule epiteliali di grandi dimensioni con un grande nucleo in posizione centrale e citoplasma ridotto con numerosi vacuoli, indice di un aumentata attività replicativa.

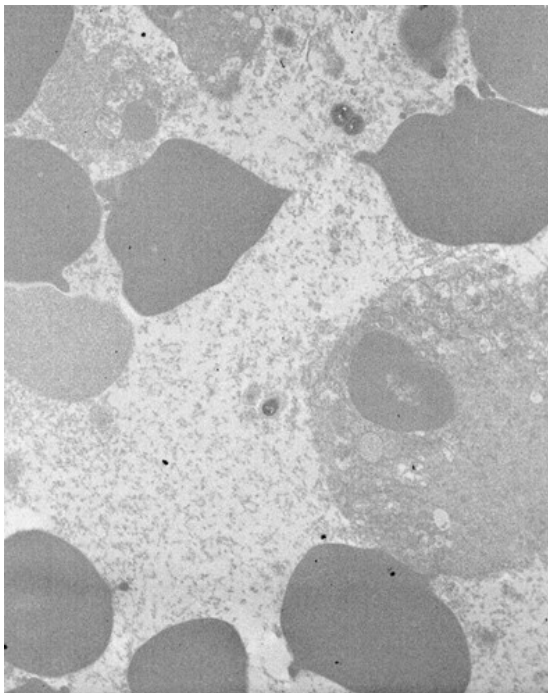


Fig. 34. Controllo sano (3000x), TEM.

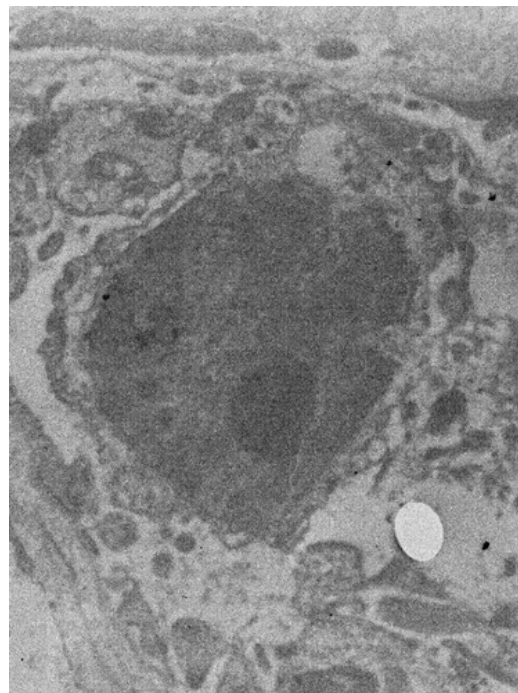


Fig. 35. Controllo sano (7000x), TEM.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

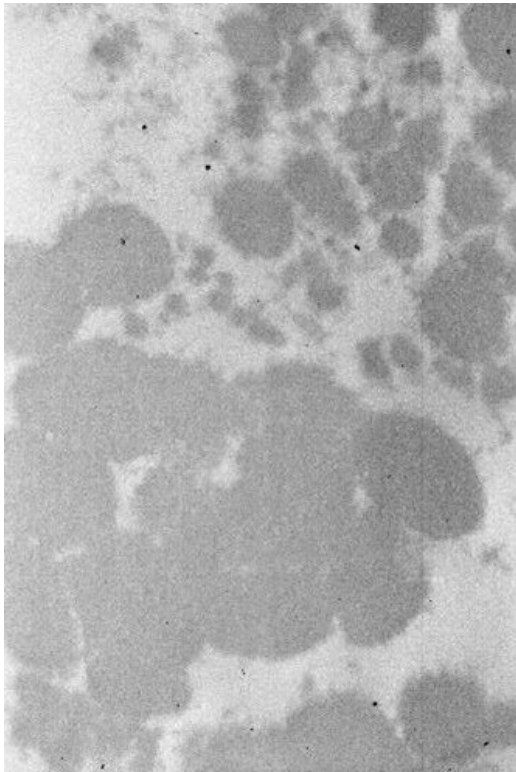


Fig. 36. Poliposi stadio II (3000x), TEM.

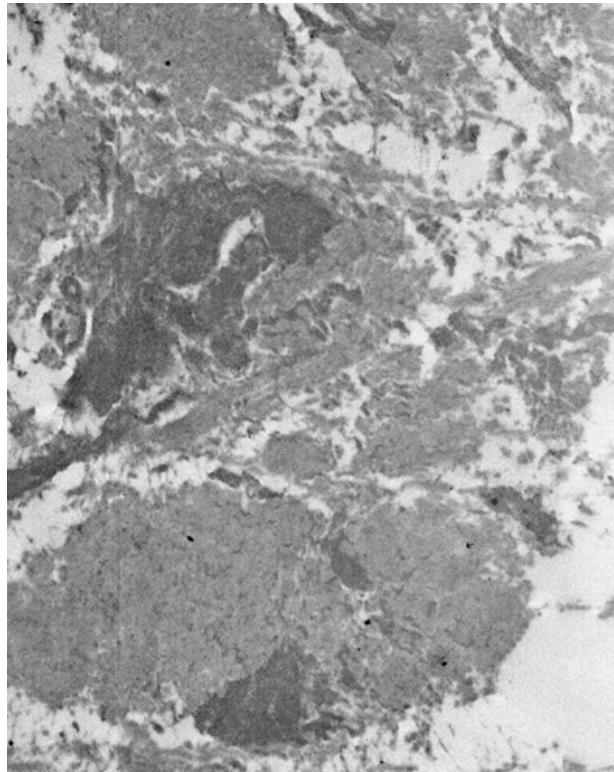
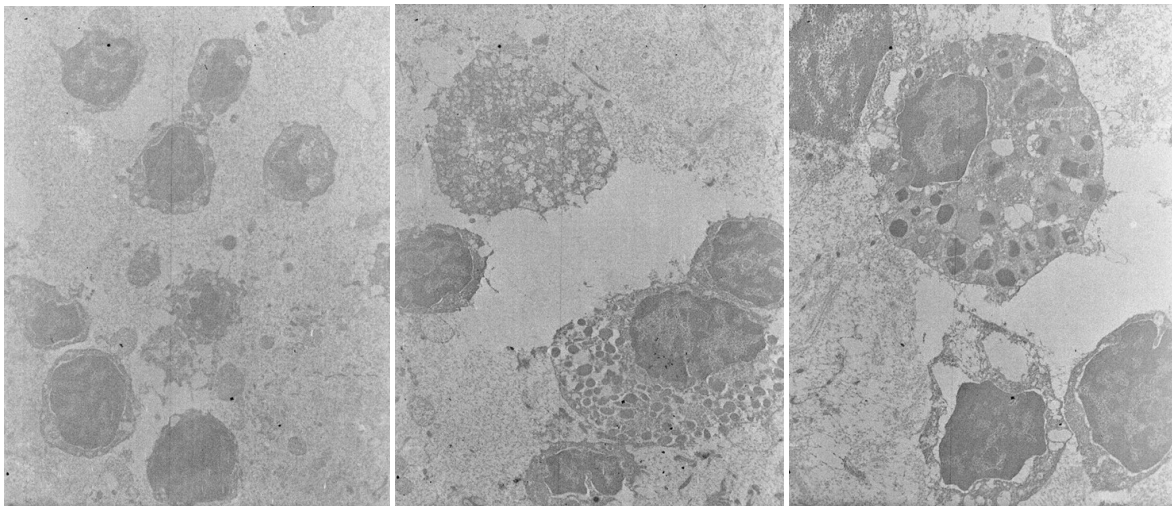


Fig. 37. Poliposi stadio II (7000x), TEM.



Figg. 38-39-40. TEM: Poliposi stadio III (3000x); poliposi stadio III (7000x); poliposi stadio III (7000x).

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

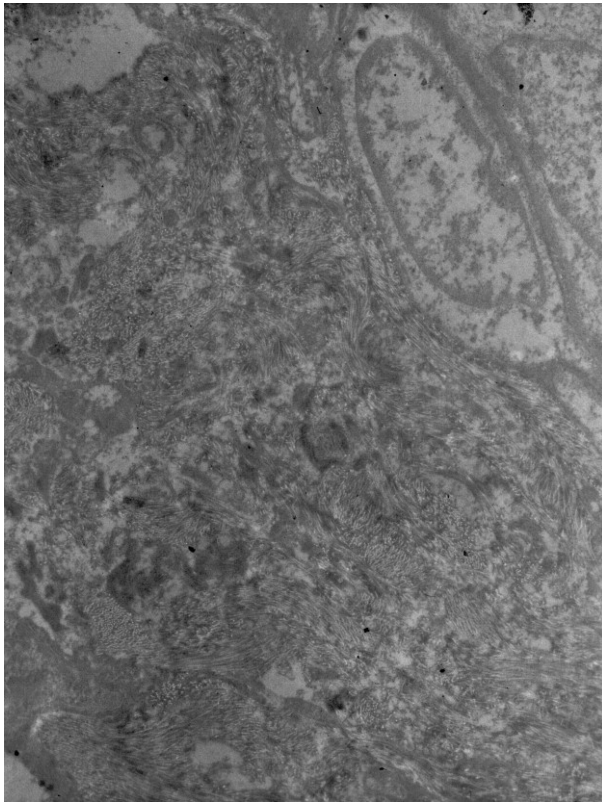


Fig. 41. Poliposi stadio III (3000x), TEM: presenza di fibre collagene ad andamento intrecciato e fibroblasto.

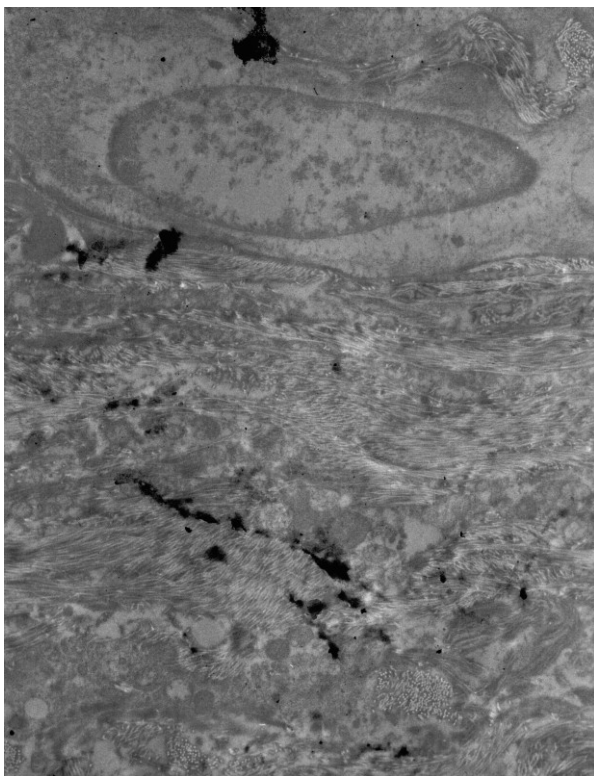


Fig. 42. Poliposi stadio III (3000x), TEM: fibre collagene e fibroblasto allungato lungo le fibre.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

Anche la microscopia elettronica a scansione (SEM) ha mostrato delle differenze ultrastrutturali tra controllo sano e polipi nasali.

I campioni di mucosa nasale sana al taglio trasversale hanno evidenziato numerosi vasi diffusi su tutta la sezione ed un aspetto disomogeneo della matrice extracellulare, con fasci di fibre collagene ad andamento reticolare ed intrecciato (Figg. 43 – 44 - 45).

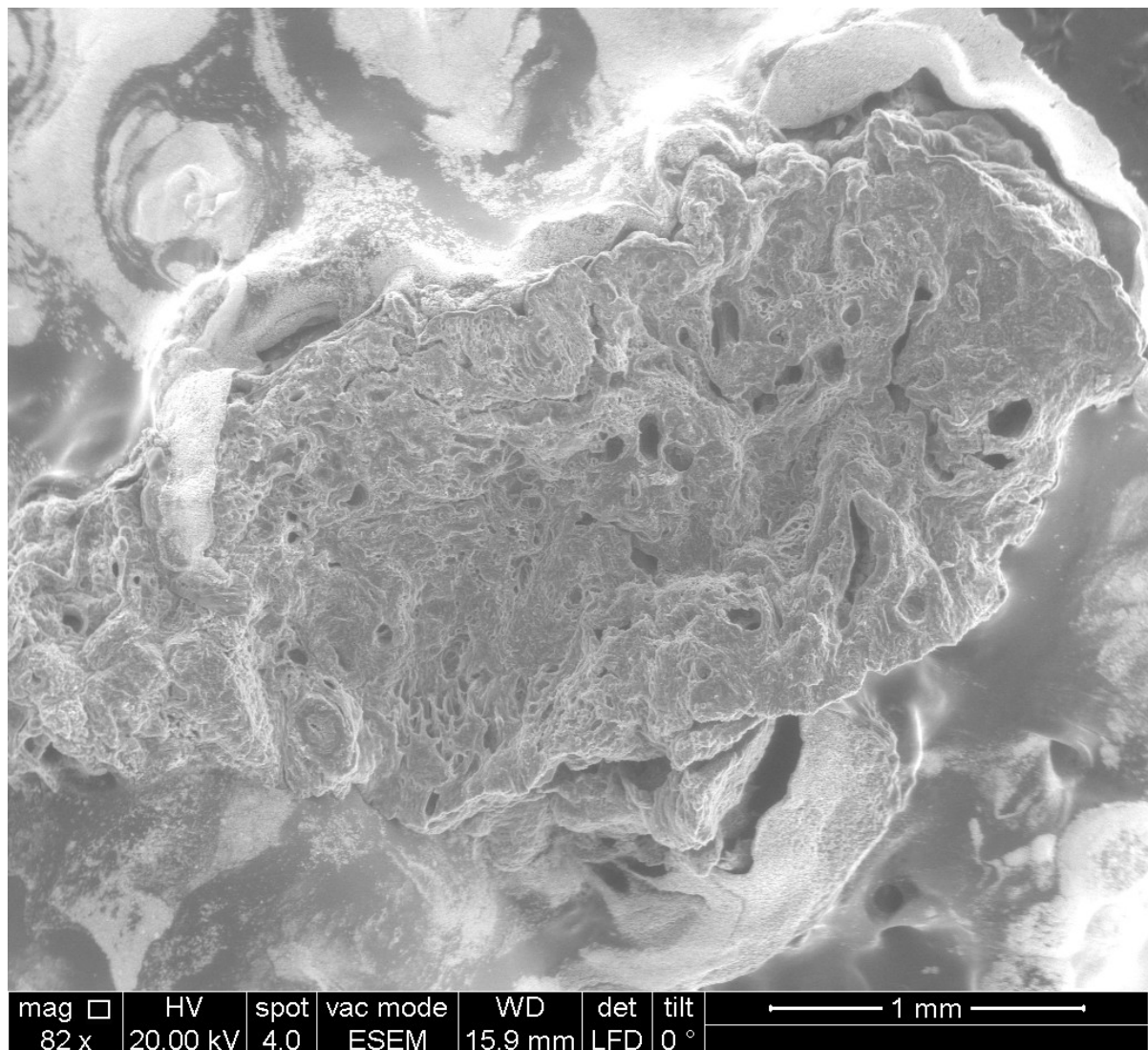


Fig. 43. SEM: sezione di campione di mucosa nasale sana (82x).

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

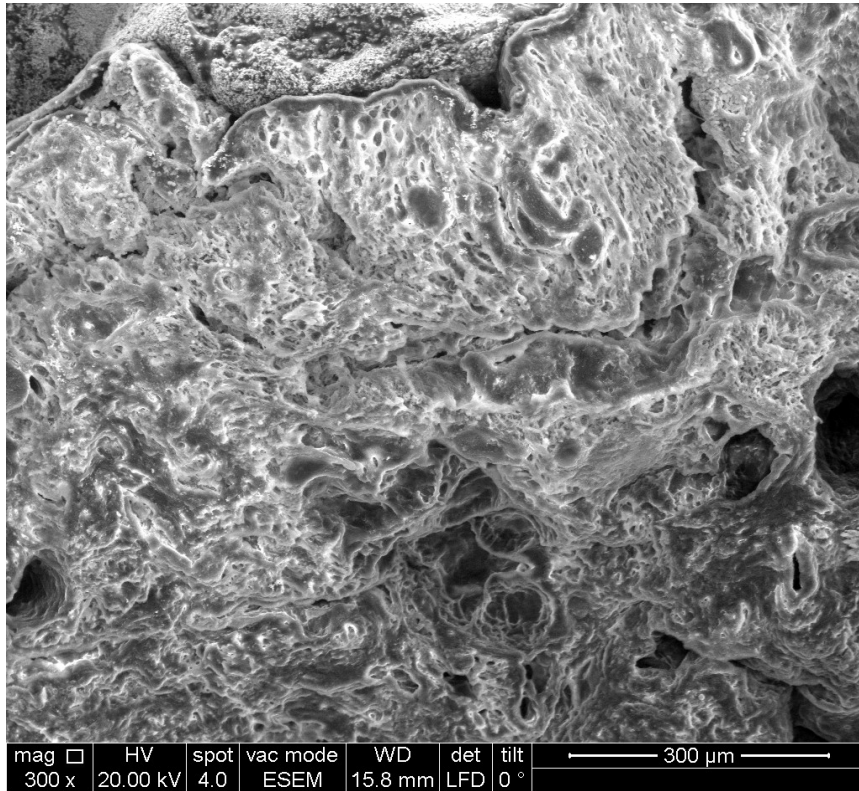


Fig. 44. SEM: sezione di campione di mucosa nasale sana (300x).

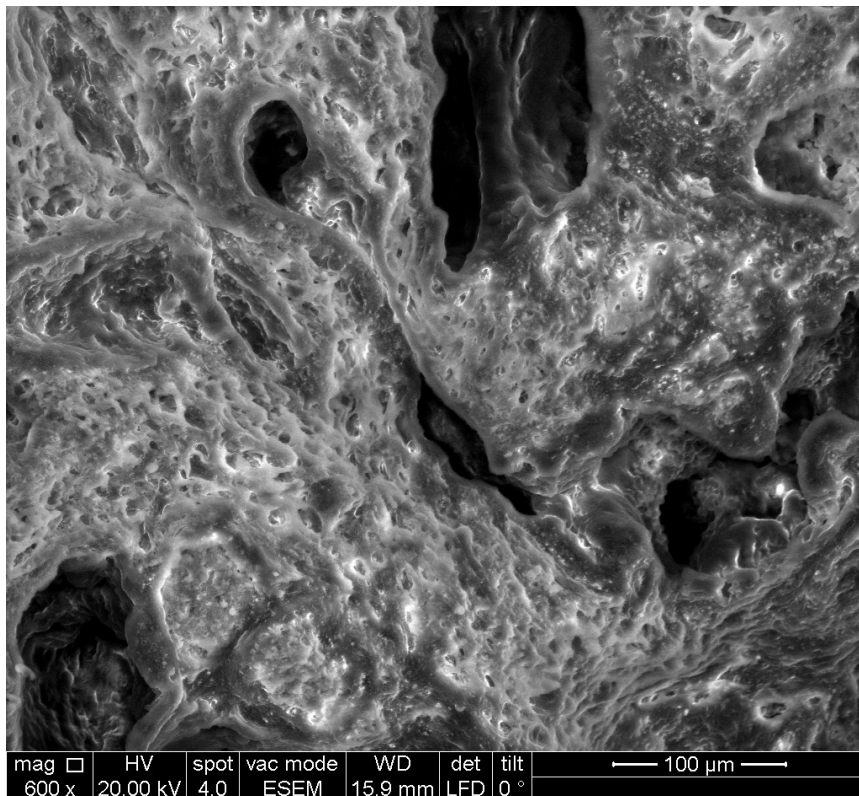


Fig. 45. SEM: sezione di campione di mucosa nasale sana (600x).

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

I polipi nasali invece hanno mostrato nella sezione di taglio un aspetto compatto ed ispessito di fibre collagene, presenza di vasi in taglio longitudinale (asse vascolare) e micro-organismi in superficie con uno strato traslucido di muco. A ingrandimenti crescenti risultano evidenti fibre ad andamento compatto longitudinale (Figg. 46 – 47 – 48).

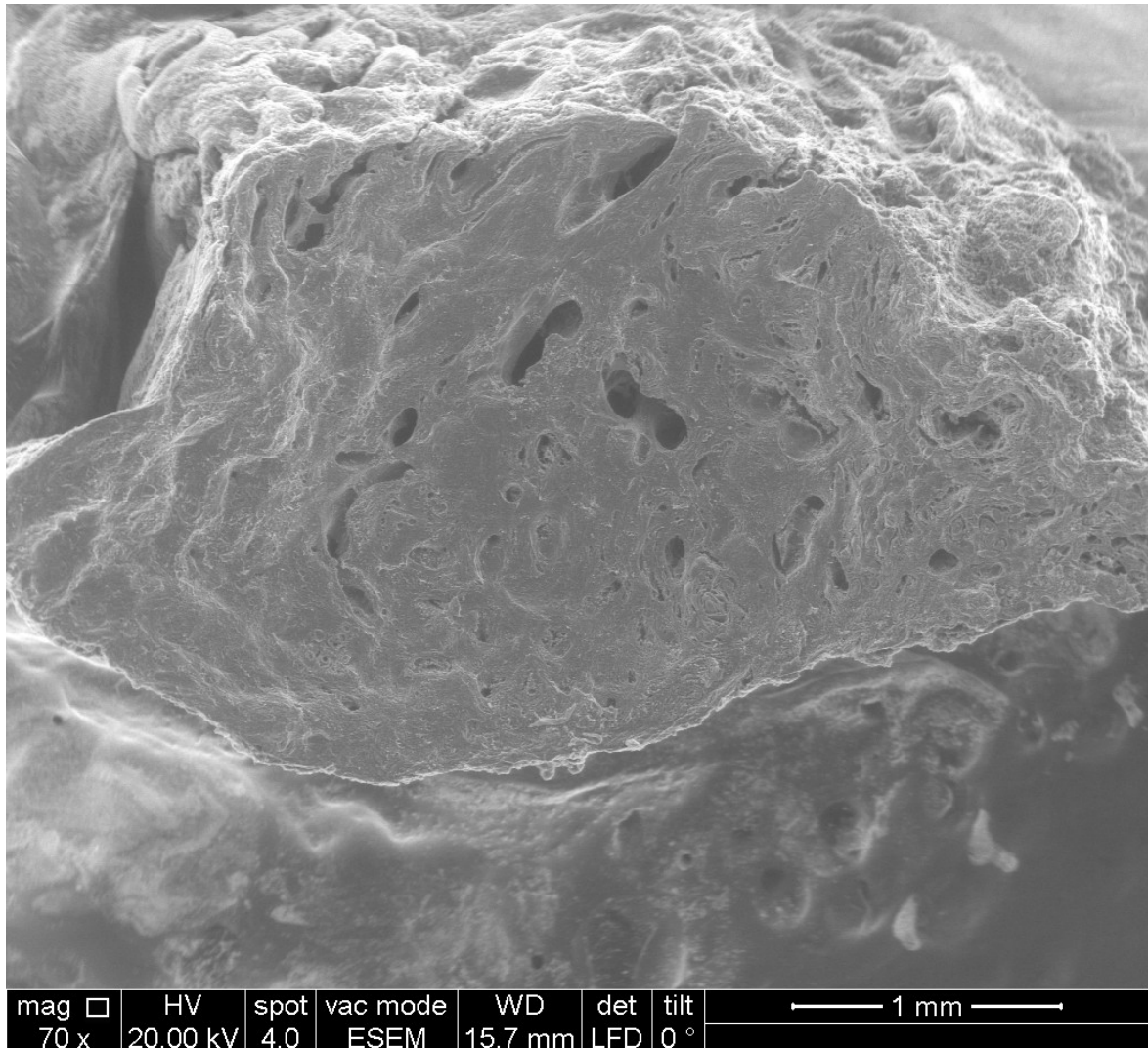


Fig. 46. SEM: sezione di polipo nasale stadio IV (70x).

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

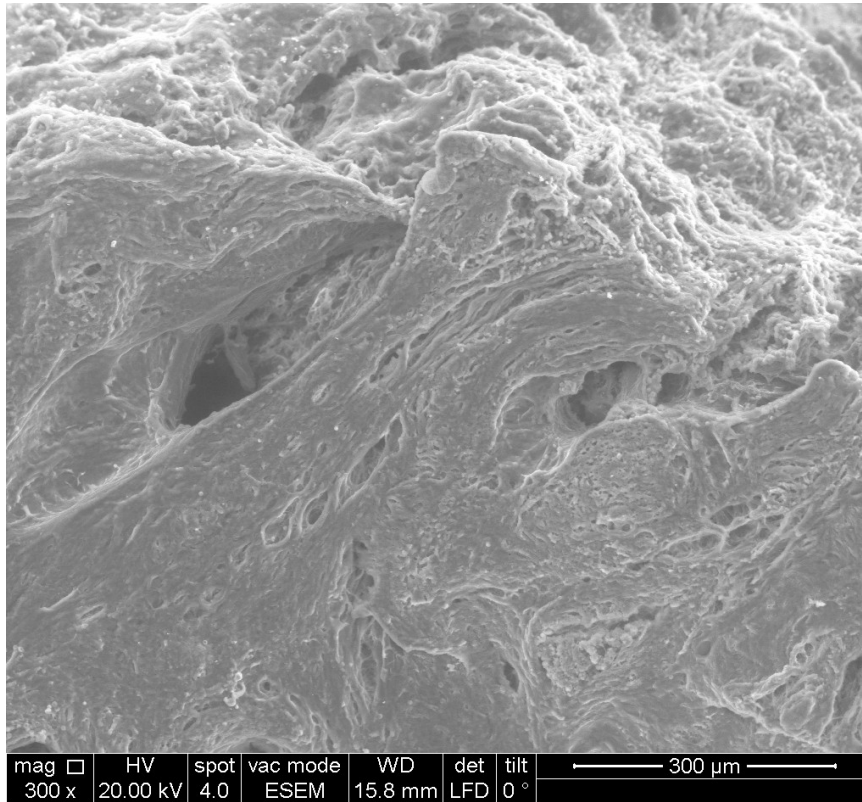


Fig. 47. SEM: sezione di polipo nasale stadio IV (300x). Sulla superficie del polipo sono evidenti diversi micro-organismi a formare un biofilm.

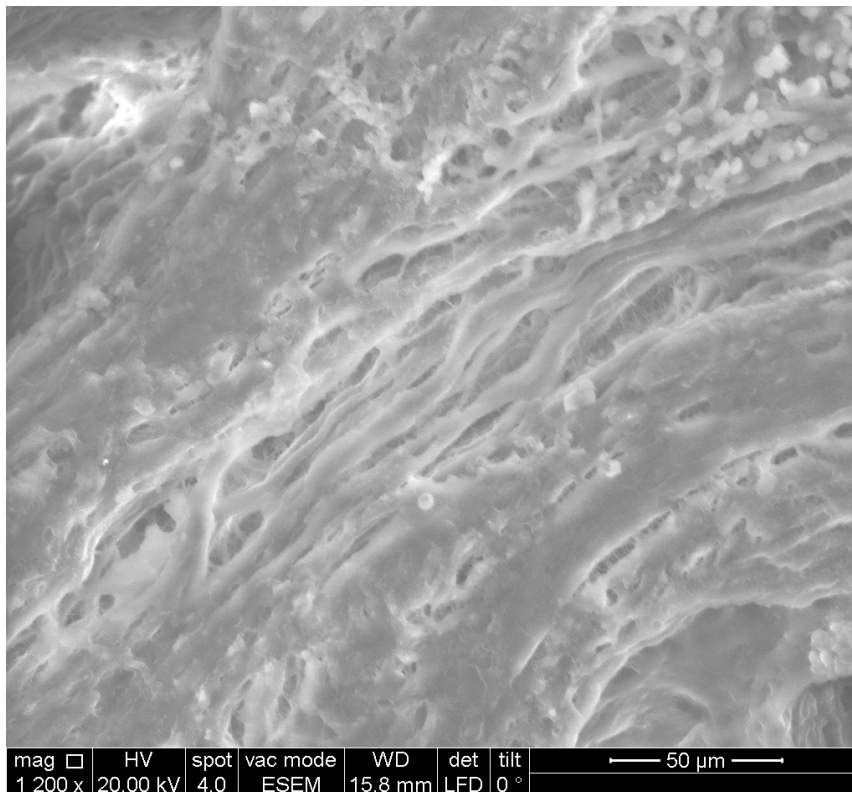


Fig. 48. SEM: sezione di polipo stadio IV (1200x). Fibre collagene ad andamento compatto longitudinale.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Alcuni metalli in traccia come Zinco, Selenio, Rame, Manganese e Ferro hanno un ruolo molto importante come anti-ossidanti, come cofattori di enzimi anti-ossidanti (SOD, GSH-Px, catalasi) e come agenti immuno-regolatori. In particolare è documentato in letteratura che la loro presenza favorisce l'eliminazione dai tessuti dei radicali liberi.

Una riduzione di questi elementi in traccia dunque può favorire il danno legato ai radicali liberi e facilitare i fenomeni di infiammazione, infezione e di degenerazione neoplastica in diversi tipi di tessuti ^(41, 42, 43, 44, 45, 46, 47).

Altri metalli, come Cd, Ni, Pb, Cr e Al non sono essenziali per il nostro organismo ed alcuni di essi sono addirittura tossici se presenti in concentrazioni elevate ⁽⁴⁸⁾.

Nella nostra ricerca i risultati alla spettrometria di massa ad assorbimento atomico (HR-ICP-MS) hanno evidenziato una concentrazione della totalità dei 10 metalli esaminati nei polipi nasali inferiore rispetto ai controlli sani, confermando i dati di Rostkowska et al. ⁽⁴⁹⁾ per Zn, Se, Pb e Cu e di Okur et al. ⁽⁵⁰⁾ per Zn e Se.

D'altro canto anche la concentrazione dei metalli pesanti (Cd, Ni, Pb, Cr, Al) è risultata inferiore nei polipi nasali, in contrasto con il lavoro di Khelifi et al. ⁽⁵¹⁾ che tuttavia aveva analizzato una popolazione esposta ai metalli pesanti sia per motivi geografici che per motivi professionali che per abitudini voluttuarie.

I risultati ottenuti, elaborati statisticamente, hanno mostrato una significatività statistica su tutti i dieci metalli presi in esame.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

L'analisi della differenza di concentrazione dei dieci metalli tra il gruppo di "poliposi non diffuse" (stadi I e II di Stammberger) ed il gruppo delle "poliposi massive" ha permesso inoltre di determinare che il primo gruppo ha una maggiore capacità di approvvigionamento di metalli rispetto al secondo, nonostante i nostri dati non siano statisticamente significativi a causa dell'esiguità del gruppo delle "poliposi non diffuse" (6/58 pazienti).

I dati ottenuti dalla microscopia elettronica hanno mostrato delle sostanziali differenze ultrastrutturali tra polipi e controlli sani, ma anche tra "poliposi non diffuse" e "poliposi massive".

La presenza di micro-organismi di verosimile origine batterica presenti sulla superficie delle poliposi massive e documentati dalle nostre immagini al SEM sono confermate anche da diversi lavori in letteratura, che descrivono la presenza di veri e propri biofilm sulla superficie dei polipi nasali che potrebbero contribuire ad alimentare l'infiammazione cronica del polipo stesso ^(52, 57).

L'ispessimento della matrice extracellulare, la fibrosi dello stroma del polipo a livello subepiteliale ed il suo aspetto più omogeneo rispetto al controllo sano, documentato sia alla microscopia elettronica a trasmissione che a scansione, sono dati anch'essi riportati in letteratura ^(54, 55).

Anche il dato relativo alla presenza di uno stroma meno ispessito del polipo antrocoanale che abbiamo evidenziato al TEM conferma studi precedenti ⁽⁵⁶⁾.

Dunque si può affermare, sulla base della nostra esperienza, che nella poliposi rinosinusale vi è una minore concentrazione di metalli in traccia, sia essenziali che non, rispetto al tessuto sano, e che questa tendenza a reperire minori quantità di

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

metalli è ancora più accentuata nelle “poliposi massive” (stadi III e IV di Stammberger). Questo dato si traduce in una potenziale riduzione dell’ attività anti-ossidante a livello dei polipi nasali a causa della riduzione di cofattori fondamentali per gli enzimi SOD, GSH-Px e catalasi ma anche dell’ effetto diretto immunoregolatore ed anti-ossidante esercitato proprio da alcuni degli elementi testati in questo studio (Zn, Se, Mn, Fe e Cu su tutti).

Infine le differenze ultrastrutturali tra controlli sani e polipi nasali, ma anche tra “poliposi non diffuse” e “poliposi massive” da noi descritte alla microscopia elettronica TEM e SEM potrebbero spiegare che anche la struttura meno vascolarizzata, fibrotica e ricca di infiltrato infiammatorio del polipo nasale possa contribuire ad un minore approvvigionamento dei metalli esponendo il tessuto ad un maggiore stress ossidativo e quindi ad un processo infiammatorio cronico che potrebbe condurre alla progressione clinica e ad un auto-mantenimento e sviluppo della poliposi rinosinusale.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

6. BIBLIOGRAFIA

1. **Lund VJ.** *Diagnosis and treatment of nasal polyps.* BMJ 311 (7017): 1411-1414, 1995.
2. **European Academy of Allergology and Clinical Immunology.** *European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps.* Rhinology 18: 1-87, 2005.
3. **Van Zele T, Claeys S, Gevaert P et al.** *Differentiation of chronic sinus diseases by measurement of inflammatory mediators.* Allergy 61(11):1280–1289, 2006.
4. **Larsen K, Tos M.** *The estimated incidence of symptomatic nasal polyps.* Acta Otolaryngol 122(2):179–182, 2002.
5. **Settipane GA.** *Epidemiology of nasal polyps.* Allergy Asthma Proc 17:231–236, 1996.
6. **Settipane GA, Chafee FH.** *Nasal polyps in asthma and rhinitis: a review of 6, 037 patients.* J Allergy Clin Immunol 59:17–21, 1977.
7. **Larsen K.** *The clinical relationship of nasal polyps to asthma.* Allergy Asthma Proc 17 (5): 243-249, 1996.
8. **Jankowski R, Bouchoua F, Coffinet L et al.** *Clinical factors influencing the eosinophil infiltration of nasal polyps.* Rhinology 40:173–178, 2002.
9. **Bachert C, Patou J, Van Cauwenberge P.** *The role of sinus disease in asthma.* Curr Opin Allergy Clin Immunol 6:29–36, 2006.
10. **Greisner WA, Settipane GA.** *Hereditary factor for nasal polyps.* J Allergy Clin Immunol 95:1(part 2)205, 1995.
11. **Settipane GA.** *Benefit/risk ratio of aspirin.* N Engl Soc Allergy Proc 2:96–102, 1981.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

12. **Cohen NA, Widelitz JS, Chiu AG et al.** *Familial aggregation of sinonasal polyps correlates with severity of disease.* Otolaryngol Head Neck Surg 134:601–604, 2006.
13. **Sturgess JM, Thompson MW, Czegledy-Nagy E et al.** *Genetic aspects of immotile cilia syndrome.* Am J Med Genet 25(1):149–160, 1986.
14. **Samter M, Beers MF.** *Intolerance to aspirin: clinical studies and consideration of its pathogenesis.* Ann Intern Med 68:975–983, 1968.
15. **Bent J, Kuhn F.** *Diagnosis of allergic fungal sinusitis.* Otolaryngol Head Neck Surg 111:580–588, 1994.
16. **Bachert C, Wagenmann M, Hauser U et al.** *IL-5 synthesis is upregulated in human nasal polyp tissue.* J Allergy Clin Immunol 99:837–842, 1997.
17. **Tos M, Morgensen C.** *Mucus production in chronic maxillary sinusitis. A quantitative histopathological study.* Acta Otolaryngol 97:151–159, 1984.
18. **Augusto AG, Bussolotti Filho I et al.** *Structural and ultrastructural study of the anterior portion of the nasal septum and inferior nasal concha.* Ear Nose Throat J 80(5):325–327, 333–338, 2001.
19. **Berger G, Finkelstein Y et al.** *Old and new aspects of middle turbinate histopathology.* Otolaryngol Head Neck Surg 140(1):48–54, 2009.
20. **Debertin AS, Tschernig T et al.** *Nasal-associated lymphoid tissue (NALT): frequency and localization in young children.* Clin Exp Immunol 134(3):503–507, 2003.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

21. **Larsen PL et al.** *Nasal polyps and their relation to polyps in the paranasal sinuses: a macro-, endo-, and microscopic study of autopsy materials.* Am J Rhinol 12 (1): 45-51, 1998.
22. **Hellquist HB.** *Nasal polyps update.* Histopathology. Allergy asthma Proc 17 (5): 237-242, 1996.
23. **Billroth T.** *Über den Bau der Schleimpolypen.* Georg Reimer, Berlin, pp 1–90
24. **Hayek M.** *Über die pathologischen Veränderungen der Siebbeinknochen im Gefolge der entzündlichen Schleimhauthypertrophie und der Nasenpolypen.* Arch Laryngol Rhinol 4:277–301
25. **Frerichs F.** *Über den Bau der Schleimpolypen.* Georg Reimer, Berlin, pp 1–90
26. **Taylor M.** *Histochemical studies on nasal polypi.* J Laryngol Otol 77:326–341, 1963.
27. **Jenkins J.** *Blockade theory of polyp formation.* Laryngoscope 42:703–704, 1932.
28. **Eggston AA, Wolff D.** *Histopathology of the ear, nose and throat.* Williams and Wilkins, Baltimore, pp 613–676, 1947.
29. **Krajina Z.** *A contribution to the etiopathogenesis of the nasal polyps.* Pract Otorhinolaryngol 25:241–246, 1963
30. **Tos M, Mogensen C.** *Pathogenesis of nasal polyps.* Rhinology 15:87–95, 1977.
31. **Ferguson BJ.** *Eosinophilic mucin rhinosinusitis: a distinct clinicopathological entity.* Laryngoscope 110:799–813, 2000.
32. **Coste et al.** *Expression of the transforming growth factor beta isoforms in inflammatory cells of nasal polyps.* Arch Otolaryngol Head Neck Surg 124 (12): 1361-1366, 1998.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

33. **Bateman ND et al.** *Nasal polyps: still more questions than answers.* J Laryngol Otol 117 (1): 1-9, 2003.
34. **Bachert C et al.** *Staphylococcus Aureus enterotoxins: a key in airway disease?* Allergy 57 (6): 480-487, 2002.
35. **Zhang N et al.** *An update on the impact of Staphylococcus aureus enterotoxins in chronic sinusitis with nasal polyposis.* Rhinology 43 (3): 162-168, 2005.
36. **Castelnuovo P et al.** *La dissezione anatomica endoscopica del distretto rinosinusale.* Endo-Press Tuttlingen. 2007
37. **Lund VJ, Kennedy DW.** *Quantification for staging sinusitis. The Staging and Therapy Group.* Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl 167:17–21; 1995.
38. **Gelardi M et al.** *Cytology in the diagnosis of rhinosinusitis.* Pediatric Allergy and Immunology (18): 50–52, 2007.
39. **Wynn R et al.** *Recurrence rates after endoscopic sinus surgery for massive sinus polyposis.* Laryngoscope 114 (5): 811-813, 2004.
40. **Sies H et al.** *Oxidative stress: damage to intact cells and organs.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 17;311(1152):617-31. 1985.
41. **Templeton DM.** *The importance of trace element speciation in biomedical science.* Anal Bioanal Chem. 375(8):1062-6. 2003.
42. **Ingrao G, Santaroni G, Tomassi G.** *Elementi in traccia: ruolo biologico e aspetti nutrizionali per l'uomo.* Ann Ist Super Sanita. 31(2):275-81, 1995.
43. **Zalewski et al.** *Zinc metabolism in airway epithelium and airway inflammation: basic mechanisms and clinical targets. A review.* Pharmacology & Therapeutics 105:127–149. 2005.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

44. **Wright, D. et al.** *Interactions of oxygen radicals with airway epithelium.* Environ Health Perspect, 102(Suppl. 10), 85– 90. 1994.
45. **Abdulla M. et al.** *Antagonistic effect of zinc in heavy metal poisoning.* Proceedings of management and control of heavy metals in the environment. CEP consultants, Edinburgh, UK.
46. **Floyd RA et al.** *The role of metal ions in oxidative process and aging.* Toxicol Health 9 (1,2). Special issue. 1993.
47. **Schwarz K and Mertz W.** *Chromium III and the glucose tolerance factor.* Archives of Biochemistry and Biophysics 85:292-295. 1959.
48. **Harrison,** *Principi di Medicina Interna (il manuale - 16^a edizione),* New York - Milano, McGraw-Hill, 2006.
49. **Rostkowska B. et al.** *Trace elements in nasal polyps.* Biol trace Elem Res 106:117-121. 2005.
50. **Okur E. et al.** *Trace elements in nasal polyps.* Eur Arch Otorhinolaryngol 270 (8): 2245-2248. 2013.
51. **Khelifi R. et al.** *Heavy metals in normal mucosa and nasal polyp tissues from Tunisian patients.* Environ Sci Pollut Res. E-pub. 2014.
52. **Zernotti ME. et al.** *Evidence of Bacterial Biofilms in Nasal Polyposis.* J Investig Allergol Clin Immunol; Vol. 20(5): 380-385. 2010.
53. **Coste A. et al.** *Inflammatory cells as well as epithelial cells in nasal polyps express vascular endothelial growth factor.* Eur Respir J; 15: 367 – 372. 2000.
54. **Kazuhiko Takeuchi and Yuichi Majima.** *Remodeling in Chronic Sinusitis and Nasal Polyps.* Allergology International;54:39-43. 2005.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.

55. **Mouwafak M. Al-Rawi et al.** *Changes in Nasal Epithelium in Patients With Severe Chronic Sinusitis: A Clinicopathologic and Electron Microscopic Study.* Laryngoscope 108: December 1998.
56. **Cengiz Özcan et al.** *Antrochoanal polyp: a transmission electron and light microscopic study.* Eur Arch Otorhinolaryngol 262 : 55–60. 2005.
57. **Thiago Freire Pinto Bezerra et al.** *Biofilm in Chronic Sinusitis with Nasal Polyps: Pilot study.* Braz J Otorhinolaryngol;75(6):788-93. 2009.

Dott. Andrea Melis.

Influenza della presenza di metalli e antiossidanti sullo sviluppo e decorso clinico della poliposi rinosinusale.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli Studi di Sassari.