

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN ANATOMIA PATOLOGICA

**RILIEVO DI FATTORI XENOBIOTICI, CON PARTICOLARE
RIFERIMENTO A NICOTINA E COTININA, IN CAMPIONI
ISTOLOGICI APPARTENENTI A FETI E NEONATI DECEDUTI
PER CAUSE NATURALI.**

RELATORE: CHIAR.MO PROF. LUIGI MATTURRI

CORRELATRICE: PROF.SSA ANNA LAVEZZI

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA DI:

DOMENICO DI CANDIA

MATR. N. R07416

ANNO ACCADEMICO 2010 - 2011

PREMESSE ALLO STUDIO SPERIMENTALE.

Neuropatologia della morte inaspettata perinatale (fetale-SIUD e neonatale) e della sindrome della morte improvvisa del lattante (SIDS).

La mortalità infantile costituisce un fondamentale problema socio-sanitario che rappresenta l'indice più accurato di valutazione della qualità della salute nei paesi più sviluppati. Essa comprende sia la mortalità perinatale (ossia la mortalità fetale dopo la 25^a settimana di gestazione – secondo la legge 31 – e quella neonatale entro la 1^a settimana di vita) sia i decessi entro il 1° anno di vita, inclusa la SIDS.

La valutazione del tasso di mortalità fetale, che rappresenta la patologia di gran lunga prevalente nei paesi più industrializzati, costituisce l'indicatore fondamentale dell'efficacia dell'assistenza materno-infantile. Tuttavia, nella gran parte delle indagini epidemiologiche, essa viene ristretta ai decessi dei nati vivi entro il 1° anno di vita (con esclusione quindi della mortalità fetale), con ovvie implicazioni riduttive delle dimensioni reali del problema.

La SIDS o “morte in culla” colpisce un infante apparentemente sano ogni 750-1000 nati e si pone come la più frequente causa di decesso naturale nel primo anno di vita.

La morte del feto a termine e quella neonatale nella 1^a settimana di vita, nel 60-80% dei casi, risultano inspiegabili anche dopo l'esame autoptico di routine. La morte fetale, secondo l'OMS, ha l'incidenza di un caso ogni 100-200 gravidanze fisiologiche. La sua frequenza è pertanto circa 6 volte

superiore a quella della morte in culla, che non si è sensibilmente ridotta negli ultimi 25 anni nonostante i progressi dell'assistenza materno-infantile, a causa principalmente della scarsa attività di ricerca, specie in campo anatomo-patologico.

I risultati di approfondite ricerche, eseguite nell'Istituto di Anatomia Patologica e nel Centro "Lino Rossi" dell'Università degli Studi di Milano nel corso di oltre 30 anni, sulla più ampia casistica internazionale (oltre 150 casi di SIDS, 50 controlli e 80 morti fetali tardive inaspettate e neonatali) hanno contribuito ad individuare la natura e le localizzazioni delle alterazioni strutturali e/o funzionali, comuni ad entrambi i processi morbosi, frequentemente responsabili dello scatenamento di riflessi nervosi mortali in assenza di sintomi neurologici premonitori.

Le alterazioni più rilevanti, riscontrate in tutti i casi di morte perinatale inaspettata e di SIDS esaminati, sono contrassegnate dall'insufficiente sviluppo e/o maturazione di differenti componenti del tronco cerebrale e del cervelletto che modulano le attività vitali (respiratoria, cardiaca, del risveglio e delle prime vie digestive).

Per quanto riguarda lo studio anatomo-patologico del tronco cerebrale, le più importanti strutture che devono essere analizzate, in quanto essenziali per il controllo delle funzioni vitali, sono suddivisibili in tre regioni, come indicato nella Tab. 1:

1- Gruppo ventrale del midollo allungato – Comprende il *nucleo ambiguo*, suddivisibile in un subnucleo compatto più rostrale e in un

subnucleo diffuso più caudale, il *complesso pre-Bötzing*, ventrale rispetto la porzione diffusa del nucleo ambiguo, il *nucleo centrale del rafe oscuro*, il *nucleo olivare inferiore* e il *nucleo arcuato*.

2- Gruppo dorsale del midollo allungato – I principali nuclei di questo gruppo sono il *nucleo del tratto solitario*, costituito da più subnuclei, tra cui il subnucleo ventro-laterale, che rappresenta un importante centro inspiratorio, il *nucleo dorsale del vago* e il *nucleo ipoglosso*.

3- Gruppo pontino-mesencefalico – La porzione più rostrale include il *nucleo rosso*, situato nei due terzi inferiori del mesencefalo, il *complesso parabrachiale/Kölliker-Fuse*, costituito dai nuclei parabrachiale laterale, parabrachiale mediale e di Kölliker-Fuse, localizzato principalmente nella regione dorso-laterale della porzione superiore del ponte ed esteso anche al terzo inferiore del mesencefalo, e il *locus coeruleus*, attiguo al nucleo parabrachiale mediale. Nella parte caudale del ponte si osserva il *nucleo parafacciale*, costituito da un numero limitato di neuroni disposti a ridosso e ventralmente al nucleo facciale e il *nucleo retrotrapezoide*, adiacente al nucleo parafacciale.

Molti nuclei di questi gruppi sono connessi tra di loro, sia dal punto di vista anatomico che funzionale, costituendo con i loro assoni e dendriti una rete complessa estesa in tutto il tronco cerebrale, denominata “*formazione reticolare*”.

Del cervelletto devono essere esaminati in particolare gli strati della corteccia (che nel feto sono 4: granulare esterno, molecolare, delle cellule

di Purkinje e granulare interno) e i nuclei profondi (dentato, globoso, del fastigio e emboliforme).

L'esame di tutte queste strutture, sia nelle SIDS che nelle morti inaspettate perinatali, ha messo in evidenza vari tipi di alterazioni, sia strutturali che funzionali. Le principali anomalie possono essere così riassunte:

1- Nella porzione ventrale del midollo allungato frequente è l'ipoplasia del nucleo arcuato (con aspetti variabili: bilaterale, monolaterale, parziale), associata spesso a mancata espressione del gene EN2, e l'ipoplasia della formazione reticolare, particolarmente delle fibre dendritiche del complesso pre-Bötzinger.

2- Nella porzione dorsale del midollo allungato un riscontro frequente è l'ipoplasia con mancata sintesi di somatostatina del nucleo ipoglosso.

3- Per quanto riguarda le alterazioni del gruppo pontino-mesencefalico è da segnalare la mancata sintesi di catecolamine nel locus coeruleus, l'ipoplasia dei nuclei parabrachiali associata ad agenesia del nucleo di Kölliker-Fuse, ipoplasia del nucleo parafacciale, soprattutto nelle morti improvvise fetali.

Nel cervelletto si osservano di frequente immaturità della corteccia, senza evidente stratificazione nelle morti fetali e con ispessimento dello strato granulare esterno nelle SIDS, e marcata gliosi del nucleo dentato.

Queste alterazioni, spesso associate tra loro in uno stesso caso, sono risultate correlate al fumo di sigaretta materno durante la gravidanza.

Poiché il sistema nervoso nel feto, in determinati periodi dello sviluppo, può essere particolarmente vulnerabile a vari tipi di insulto, le alterazioni osservate potrebbero essere il risultato di importanti interazioni tra la suscettibilità genetica individuale e l'esposizione a fattori ambientali, particolarmente al fumo di sigaretta. Se la madre fuma durante la gravidanza, il monossido di carbonio, uno dei prodotti gassosi derivati dalla combustione della nicotina, può facilmente oltrepassare per diffusione passiva la barriera placentare e legarsi all'emoglobina. La carbossiemoglobina che ne deriva, inibisce il rilascio di ossigeno determinando un alterato sviluppo fisiologico di organi e tessuti fetali, specialmente di quelli molto sensibili a danni ipossici, come il tronco cerebrale e il cervelletto. Inoltre, la nicotina è una delle poche sostanze liposolubili in grado di superare la barriera ematoencefalica e agire direttamente sull'espressione di geni che controllano lo sviluppo del sistema nervoso autonomo.

In base a questi dati, la morte inaspettata del feto, del neonato e la SIDS si configurano come un processo multifattoriale per lo più riconducibile ad analogia patologia neurologica prenatale.

Tabella 1. Gruppi di neuroni del tronco cerebrale coinvolti nel controllo della funzioni vitali (respirazione, attività cardio-vascolare, risveglio, prime vie digestive).

| MODULATORI DELLE FUNZIONI VITALI | | |
|----------------------------------|------------------------------|----------------------------------------|
| Gruppo midollare ventrale | Gruppo midollare dorsale | Gruppo pontino-mesencefalico |
| Complesso pre-Bötzinger * | Nucleo del tratto solitario* | Complesso parabrachial/Kölliker-Fuse * |
| Nucleo ambiguo* | Nucleo dorsale del vago* | locus coeruleus* |
| Nucleo rafe oscuro centrale | Nucleo ipoglosso | nucleo parafacciale* |
| Nucleo arcuato | | nucleo rosso* |
| Nucleo olivare inferiore | | |

* appartenenti alla formazione reticolare

CONSIDERAZIONI EZIOPATOGENETICHE.

Da circa 30 anni, epoca a cui risale negli Stati Uniti l'introduzione e la successiva unanime accettazione della dizione di SIDS, come diagnosi di morte, tale sindrome è stata oggetto di molteplici ed eterogenee ipotesi eziopatogenetiche.

Per quanto la maggioranza di esse sia stata scalzata da teorie ogni volta più recenti ed accreditate e detenga pertanto ora un valore puramente storico, permane invariata e diffusa tra gli Autori di merito l'idea che in tale sindrome giochi un ruolo essenziale la concomitanza di fattori neurologici e cardiaci di tipo aritmogeno tali da condizionare una compromissione, non ancora perfettamente identificata, dell'attività respiratoria.

L'attenzione rivolta a tale ambito anatomofunzionale non rappresenta peraltro un evento del tutto nuovo, allorché il frequente riscontro nei cadaveri deceduti per SIDS di quadri morfologici, macro e microscopici, deponenti per una morte sopravvenuta con meccanismo ipossico-asfittico, ha condotto in passato, alla formulazione dell'"*ipotesi timica*" e di quella delle "*apnee notturne*"; teorie che rispettivamente attribuivano il decesso, la prima ad un meccanismo di compressione tracheale da parte del timo iperplastico (in occasione dell'iperestensione cervicale associata alla posizione prona) e la seconda ad un'aumentata suscettibilità dei lattanti deceduti ad andare incontro ad episodi di prolungata apnea notturna.

E' evidente come il progresso medico-scientifico, sotto forma di metodiche e tecniche di indagine sempre più avanzate e scientificamente attendibili, abbia contribuito a determinare il superamento di tali ipotesi, allorché non confermate da studi successivi; ed abbia al medesimo tempo comportato la graduale affermazione di ulteriori teorie che, pur non riuscendo ancora a definire nel dettaglio il complesso meccanismo fisiopatologico sotteso alla SIDS, hanno certamente meglio inquadrato

alcuni degli aspetti epidemiologici, clinici ed anatomopatologici di tale sindrome.

Peraltro oggi, la maggioranza degli Autori ravvisa la necessità di interpretare la morte improvvisa del lattante, fin tanto che non si dimostri un'univoca eziologia, come una sindrome di probabile origine multifattoriale, nella quale si configura, quale momento essenziale al suo determinismo, una non meglio precisata compromissione della risposta ventilatoria a particolari perturbazioni dell'omeostasi.

Tale ipotesi, la cui genesi è certamente da relazionarsi al recente riscontro nei lattanti deceduti per SIDS di alterazioni biochimiche ed istologiche fortemente indiziarie di una disfunzione respiratoria, non potrebbe altrimenti essere vagliata ed avvalorata, se non mediante la revisione, in letteratura, degli studi anatomopatologici e fisiopatologici realizzati sul sistema nervoso centrale e sul mantice diaframmatico, che sono i principali distretti anatomico-funzionali deputati al controllo neurovegetativo e meccanico della ventilazione.

Sistema nervoso centrale.

La convinzione che il sistema nervoso centrale sia implicato nel determinismo della morte improvvisa del lattante, è essenzialmente riconducibile al frequente riscontro, nell'ambito di indagini atte a far luce sulla patogenesi della sindrome, di dati anamnestici, clinici e necroscopici indiziarie di una compromissione di alcuni distretti cerebrali coinvolti nella regolazione delle funzioni vegetative. Pertanto, la crescente attenzione che

la scienza medica ha rivolto, nell'eseguire indagini diagnostiche, agli aspetti morfologici e fisiopatologici dell'encefalo è esitata nella formulazione di una teoria, da anni e tuttora oggetto di studi autoptici e sperimentali, che attribuisce la morte improvvisa nel lattante ad una, non ancora perfettamente compresa, disfunzione, su base malformativa o maturativa, del controllo neurovegetativo della funzionalità cardiorespiratoria.

Una siffatta ipotesi eziopatogenetica, per quanto sostenuta dalla grande parte degli Autori che si sono interessati della materia, non rappresenta comunque l'unico inquadramento fisiopatologico avanzato in letteratura; a rinforzare infatti il crescente interesse medicolegale ed anatomopatologico per la morfologia macro e microscopica dell'encefalo, è sopravvenuta, nell'ultimo decennio, un'ulteriore teoria che, in attesa di una conferma o di una smentita, propone come evento responsabile delle morti improvvise del lattante, un interessamento dei centri bulbari ad opera di una ischemia del tronco cerebrale, conseguente ad un fenomeno di compressione delle arterie vertebrali.

A prescindere da tale difformità di orientamento, gli innumerevoli studi necroscopici realizzati in tema di SIDS hanno evidenziato una molteplicità ed eterogeneità di reperti macroscopici, istologici, citologici e biochimici, la cui interpretazione, se da un lato spesso non contribuisce, a causa della loro aspecificità, a fornire elementi di conferma alle ipotesi più accreditate cui si è accennato, dall'altro sovente rimane orfana di un chiaro inquadramento eziopatogenetico. A riguardo, è peraltro doveroso

sottolineare come l'enorme variabilità e discrepanza dei reperti encefalici evidenziati nei vari studi autoptici, sia in parte attribuibile alla mancanza di standardizzazione delle metodiche d'indagine e come dunque, ai fini di minimizzare "bias" metodologici, si prospetti opportuno uniformare i protocolli di investigazione medicolegale ed anatomopatologica della SIDS.

Prima di procedere ad un approfondimento delle ipotesi eziopatogenetiche proposte dagli Autori di merito, è doveroso richiamare, alla luce di una revisione della letteratura medica degli ultimi 15 anni, quelle che sono state le più discusse e significative alterazioni istologiche e biochimiche riscontrate nelle indagini sul sistema nervoso centrale.

Riscontri istologici.

Ritardo di mielinizzazione del sistema nervoso centrale.

Il parametro di mielinizzazione, impiegato al fine di apprezzare il grado di maturazione del sistema nervoso, rappresenta il marker più sensibile ed accessibile alle comuni metodiche di indagine istologica. Gli Autori hanno pertanto ipotizzato come l'immatùrità cerebrale riscontrata in alcuni studi istologici, possa essere il segnale di un globale interessamento encefalico, nel quale non mancherebbe una compromissione delle aree adibite al controllo neurovegetativo cardiorespiratorio.

Sotto la medesima ottica è stato ricondotto il riscontro di una diminuzione del numero delle piccole fibre mieliniche del nervo vago, cui teoricamente potrebbe conseguire una ridotta od assente risposta agli stimoli esogeni irritanti.

Leucomalacia periventricolare e subcorticale.

Riportata in letteratura sin dal 1970, venne attribuita a suo tempo ad un fenomeno di tipo ipossico-ischemico. Allo stato rappresenta ancora un riscontro di dubbio significato fisiopatologico, potendo essere l'esito di fattori non necessariamente ipossici.

Ritardo di maturazione a livello cerebellare, ventricolare (ependimale) e bulbare (persistenza di spine dendritiche nelle cellule delle regioni ventrolaterali).

Non è chiaro se il riscontro isolato in studi differenti di ognuno di questi reperti sia attribuibile alla scelta del ricercatore di focalizzare la propria attenzione su specifiche strutture cerebrali, tralasciando le restanti, oppure all'effettiva esclusiva localizzazione riportata. Fermo restando questa incertezza, alcuni Autori hanno ipotizzato che il ritardo maturativo cerebellare, sulla base della sua ben documentata evoluzione dalla vita fetale all'infanzia, possa essere il segnale di un generico ed esteso ritardo maturativo encefalico, nel quale andrebbe ad inquadrarsi il già accennato ritardo di mielinizzazione.

Riscontro di vacuoli, pseudocisti, noduli micro e macrogliali postinfiammatori periventricolari.

Reperti di non univoca interpretazione, forse esito dell'azione pre o postnatale precoce di una non meglio identificata noxa lesiva.

Fenomeni di apoptosi dell'ippocampo e dei nuclei dorsali del tronco cerebrale.

In letteratura, tale evidenza è stata relazionata ad un ipotetico insulto lesivo acuto, verificatosi poche ore prima del decesso, e da cui il lattante avrebbe apparentemente e momentaneamente recuperato.

Fenomeni di gliosi reattiva del tronco cerebrale.

Tra tutte le alterazioni istologiche evidenziate, la gliosi reattiva del tronco è senza dubbio uno dei reperti più frequentemente evidenziati e più suscettibile di una interpretazione fisiopatologica. In particolare, la riscontrata localizzazione di siffatta reazione cellulare nelle aree di controllo delle funzioni vagali (nucleo del fascio solitario, nucleo dorsale del vago e nucleo ambiguo) ed nel nucleo olivare inferiore porta ad ipotizzare un presumibile coinvolgimento del centro respiratorio bulbare ed apre così la via a molteplici orientamenti interpretativi.

Da un lato, la mancata conferma di questo dato da parte di alcuni studi, ha condotto alcuni Autori ad escludere un rapporto diretto tra tale reperto ed il meccanismo fisiopatologico responsabile della sindrome ed a rappresentarlo come un epifenomeno della morte, su probabile base ipossica.

Altri Autori invece, alla luce del riscontro di gliosi bulbare nei lattanti deceduti per scompenso cardiaco, ove è ben documentata la condizione di deficit periferico di perfusione-ossigenazione, interpretano la presenza di un incrementato numero di astrociti, come una manifestazione direttamente connessa al meccanismo patogenetico della sindrome. Sotto quest'ottica pertanto, tale reperto, inteso come esito di isolati o ripetuti eventi ipossici-ischemici precipitanti il decesso, potendosi conciliare con entrambe le ipotesi eziopatogenetiche accennate nella parte introduttiva dell'elaborato, viene presentato ora a sostegno della teoria neurovegetativa ora di quella della compressione delle arterie vertebrali.

A tale contrasto di idee, fenomeno che peraltro connota tutti gli studi e le ipotesi avanzate sulla SIDS, va aggiunta la segnalazione di un Autore che, nel vagliare il significato della gliosi reattiva e nel riscontrarne una scarsa differenza quantitativa tra i casi ed i controlli dello studio da lui effettuato, pone l'accento sulla necessità di uniformare la metodologia di indagine, allorché è evidente come non uniformi sezioni istologiche implicino inevitabilmente (soprattutto in relazione alla complessità strutturale dei nuclei bulbari) risultati contrastanti e carenti di certezza scientifica.

Ipoplasia isolata del nucleo arcuato.

Reperto che, per quanto ancora poco approfondito in letteratura, si ritiene significativo, ai fini di comprendere gli intimi meccanismi fisiopatologici della sindrome, per il ruolo detenuto da tale regione bulbare nel facilitare la chemiosensibilità all'aumento di anidride carbonica e di ioni idrogeno.

Ipoplasia del glomo carotideo.

Alcuni Autori, sulla base dell'accertato ruolo del glomo carotideo nel determinare una risposta ventilatoria all'ipossia, hanno attribuito a tale riscontro un notevole significato fisiopatologico, allorché l'integrità di tale struttura, in occasione degli episodi di apnea notturna, cui il lattante sembra essere particolarmente predisposto, si profila essenziale ai fini di provocare un'adeguata iperventilazione postanossica.

La mancata conferma di tale dato morfologico da parte di alcuni studi successivi, ha posto in dubbio tale orientamento patogenetico, sottolineando come, in assenza di alterazioni evidenti a carico del glomo carotideo, l'inibizione della risposta ventilatoria possa imputarsi alla dopamina, i cui valori sembrerebbero aumentare nei lattanti deceduti per SIDS.

Alterazioni biochimiche.

Elevate concentrazioni parenchimali di acido lattico e di idrogenioni.

Tali rilievi biochimici, in quanto fortemente indicativi di uno stato di acidosi premortale, sono stati interpretati da alcuni Autori come il segnale di una cronica condizione ipossico-asfittica intravitale.

Diminuita attività muscarinica colinergica nel nucleo arcuato (capacità di legame dei recettori muscarinici).

L'ipotesi di un coinvolgimento del nucleo arcuato nella genesi della SIDS, suffragato com'è dal riscontro di alterazioni istologiche e biochimiche, è da attribuirsi al ruolo cui tale regione sembra essere deputata. Infatti, studi neurofisiologici sperimentali, recenti studi di risonanza magnetica, realizzati in adulti esposti ad ipercapnia, con localizzazione elettiva in questo nucleo della risposta alla CO₂ e la presentazione di un "case report" di un lattante deceduto per una sindrome da ipoventilazione centrale in assenza di nucleo arcuato, hanno condotto numerosi ricercatori ad avanzare l'ipotesi, sempre più plausibile, di un'implicazione dell'acetilcolina presente nel nucleo arcuato nel determinismo delle risposte ventilatorie alla CO₂ ed agli ioni H⁺.

Pertanto il riscontro di un deficit di attività colinergica in questa sede (faccia ventrale del midollo allungato) può essere significativo di una difficoltà endogena a far fronte ad emergenze ipercapniche od asfittiche

che si presentano in occasione di eventi costituenti una minaccia per la vita.

Diminuzione dell'immunoreattività per l'enzima antitirosina idrossilasi a livello dei nuclei vagali e della area reticolare superficiale ventrolaterale.

L'elettiva localizzazione a livello di specifiche aree bulbari di un deficit del sistema adrenergico e noradrenergico, evidenziato mediante alcuni studi di immunostochimica del tronco cerebrale, viene riportato in letteratura come un segnale di una alterazione del controllo neurovegetativo della funzionalità cardiorespiratoria. In particolare, sulla base di un presunto ruolo dei neuroni adrenergici nel ridurre l'attività respiratoria spontanea, è stato proposto come tale deficit catecolaminergico possa costituire un meccanismo compensatorio di una condizione respiratoria già di per sé deficitaria, quale viene a verificarsi nella sindrome della morte improvvisa del lattante.

E' interessante altresì notare come uno di questi studi immunostochimici, nel focalizzare la propria attenzione alle regioni del midollo allungato, abbia messo in rilievo, a fianco di tale anomalia neurotrasmettitoriale, un concomitante quadro istologico di gliosi reattiva, interpretabile, sia come evento antecedente e determinante lo squilibrio catecolaminergico riscontrato, sia come una manifestazione secondaria ad episodi ipossico-ischemici, imputabili all'alterato controllo cardiorespiratorio, a sua volta attribuito alla compromessa attività adrenergica e noradrenergica. Allo

stato comunque, rimane ancora da accertare se l'associazione di tali reperti sia un evento casuale o detenga uno specifico significato fisiopatologico.

Teoria neurovegetativa ad origine torcoencefalica.

Da quanto sopra esposto, si deduce la crescente difficoltà degli Autori di merito nell'estrapolare considerazioni scientificamente valide circa gli intimi meccanismi fisiopatologici responsabili delle morti da SIDS. Ciò nonostante, in siffatto scoraggiante panorama, non si è mancato di formulare ipotesi eziopatogenetiche che interpretassero ed accordassero gli innumerevoli riscontri necroscopici, cui si è accennato.

Pertanto, sulla base delle modalità con cui le morti, rapide ed inattese, si verificano, della storia anamnestica e clinica dei pazienti, sulla base dell'assenza di reperti macro-microscopici, in grado di giustificare il decesso e dei risultati ottenuti da studi anatomopatologici e forensi, da tempo si sospetta come l'evento finale della SIDS debba essere ricercato in una non meglio precisata anomalia, malformativa o maturativa, del tronco cerebrale, o più specificatamente delle vie adibite al controllo neurovegetativo cardiorespiratorio.

Reperti istologici, quali quelli di ritardo di mielinizzazione, di maturazione neuronale, di ipoplasia del nucleo arcuato e di leucomalacia e gliosi reattiva, su base presumibilmente ipossico-ischemica, affiancati da alcune alterazioni biochimiche sopra citate, rappresentano, nel localizzarsi elettivamente a livello del bulbo, elementi fortemente indiziari di una

sottostante compromissione anatomo-funzionale, le cui conseguenze, mediante un complesso e misconosciuto meccanismo fisiopatologico, sono ravvisabili nella repentinità ed imprevedibilità dei decessi che connotano la SIDS .

A lato di siffatti risultati, che essenzialmente emergono da indagini incentrate sul sistema nervoso centrale, non manca peraltro, nei lattanti morti per SIDS od a elevato rischio epidemiologico, l'osservazione di plurimi profili patologici a carico di alcune specifiche funzioni vegetative (respirazione spontanea, chemiosensibilità, termoregolazione e funzione cardiovascolare), il cui controllo autonomo origina a livello del tronco cerebrale. Le prolungate apnee notturne, il deficit nella risposta di "risveglio" (passaggio da sonno rem a sonno non-rem) all'ipossia notturna, la ridotta risposta ventilatoria all'ipossia e all'ipercapnia, l'alterata termoregolazione, di cui è ben noto il ruolo di fattore di rischio, le osservate bradicardie paradosse postipotensive o postipossiche, rappresentano particolari "patterns" che, tipicamente associati alla SIDS, ben si conciliano con la teoria di una disfunzione anatomo-funzionale a carico delle aree adibite al controllo neurovegetativo periferico.

Inoltre, un ulteriore dato a sostegno di tale orientamento eziopatogenetico, è fornito dal riscontro di alterazioni istopatologiche e biochimiche deponenti per prolungati e ripetuti episodi intravitali di tipo asfittico, ove verrebbero a giustificarsi i reperti di aumentato spessore della muscolare liscia delle arteriole polmonari, di incrementata ematopoiesi extramidollare, con conseguente incremento dei tassi di emoglobina fetale,

e di incremento dei livelli postmortali di cortisolo, di ipoxantine nell'umore vitreo e di acidi nel tessuto cerebrale.

Gli innumerevoli dati, epidemiologici, anamnestici, clinici e necroscopici che la letteratura fornisce in tema di SIDS, sono stati pertanto interpretati e convogliati in un'unica teoria eziopatogenetica, nella quale gli Autori sostenitori non hanno tralasciato di contemplare e motivare alcuni dei più noti ed accertati fattori di rischio per tale sindrome.

In relazione alla posizione prona, senza dubbio uno dei fattori più ampiamente approfonditi e discussi, fenomeni ad essa imputabili, quali quelli di reinspirazione dei gas esalati, con conseguente ipercapnia, e quelli di ostruzione delle vie aeree superiori, mediante retroposizione della mandibola ed occlusione della faringe o mediante diretta compressione del naso, rappresentano emergenze cui il lattante non riuscirebbe a far fronte, a causa della compromissione neurovegetativa delle risposte ventilatorie e cardiocircolatorie alle perturbazioni esterne.

Anche il basso peso alla nascita e la prematurità, che sono condizioni cliniche associate alla sindrome, facilmente si spiegano alla luce di tale ipotesi fisiopatologica, allorché, in un generalizzato quadro di iposviluppo fetale, ben si colloca un presumibile ritardo di maturazione delle vie nervose centrali, cui il deficit del sistema nervoso autonomo è stato in parte relazionato.

Nondimeno, l'associazione temporale della SIDS, la cui massima incidenza coincide con il 2°-4° mese di vita, con i drammatici

cambiamenti fisiologici cui il lattante va incontro, viene spiegata alla luce della enorme rilevanza che le funzioni neurovegetative acquisiscono durante un periodo della vita, quale è quello infantile, così vulnerabile a qualsivoglia “interferenza” esogena.

In base a quanto esposto, le morti improvvise del lattante sarebbero imputabili non ad un unico evento terminale, potendosi esse verificare mediante un’aritmia cardiaca primitiva, un’aritmia cardiaca secondaria ad apnea centrale, ostruttiva o mista, od ancora a causa di un’incapacità “patologica” di adattamento del lattante a perturbazioni compromettenti il normale equilibrio omeostatico.

A prescindere “dall’ accertata compatibilità” dei dati epidemiologici, istologici e biochimici con una plausibile compromissione del controllo bulbare delle funzioni neurovegetative, è necessario sottolineare come tale proposta eziopatogenetica rimanga pur sempre una semplice ipotesi ancora da avvalorare.

Teoria della compressione delle arterie vertebrali.

Le prime evidenze fisiopatologiche relative il ruolo detenuto dai movimenti del capo, nel provocare un’ostruzione delle arterie vertebrali, risalgono agli anni '60, quando H.A. Maslowski per primo e E.S.

Crawford successivamente, in occasione dell'esecuzione delle prime angiografie vertebrali in adulti affetti da insufficienza vascolare cerebrale, dimostrarono come, una rotazione della testa dal lato dell'arteria iniettata di mezzo di contrasto, comportasse una drastica diminuzione della radiopacità intravasale.

Da allora, ulteriori e numerosi studi hanno confermato tale dato, identificando, nell'ambito della sindrome da insufficienza vascolare cerebrale dell'adulto, un gruppo di pazienti in cui l'insufficienza è da imputarsi al territorio delle arterie vertebrali e nei quali i sintomi, quali la vertigine, la diplopia, la debolezza agli arti inferiori e le brevi perdite di coscienza, si presentano o si accentuano, in occasione di particolari posizioni o movimenti della testa sul rachide cervicale.

Negli ultimi quindici anni lo stesso Maslowski, Pamphlett ed Altri, sulla base di tali riscontri nell'adulto e di successivi lavori da loro compiuti sul lattante (studi postmortem di morfometria vascolare, di arteriografia vertebrale e di microscopia cerebrale e studi in vivo di sonografia transcranica), hanno formulato per la Sids una nuova ipotesi eziopatogenetica, attribuendo tale sindrome ad una insufficienza, su base compressiva, di una od entrambe le arterie vertebrali, cui farebbe seguito un'ischemia del tronco cerebrale.

Per quanto tale teoria si discosti completamente dalle ipotesi fino ad oggi avanzate e non sia ancora stata a sufficienza approfondita, si è ritenuto

opportuno accennarla, alla luce dei numerosi consensi che tale tesi ha raccolto negli ambienti scientifici.

Non bisogna infatti dimenticare come la Sids, a prescindere dall'attuale necessità di formularne diagnosi, mediante protocolli anatomopatologici e medico legali, rimanga pur sempre, fino al riconoscimento di un meccanismo patogenetico che ha condotto al decesso, una "non diagnosi di morte". Fermo restando l'odierna esigenza di convogliare tali decessi al di sotto di un'unica classe nosologica, rimane ancora da verificare un loro comune denominatore eziologico; non si può pertanto escludere che alcune delle morti che oggi vengono catalogate come Sids, siano attribuibili in un futuro, come conseguenza di indagini standardizzate e più accurate, al meccanismo eziopatogenetico su cui si incentra la teoria, che ci si appresta ad esporre.

Tale ipotesi si basa sul riscontro nei lattanti di una particolare conformazione anatomica del rachide cervicale e delle regioni limitrofe che, in attesa di una successiva stabilizzazione evolutiva, renderebbe la pervietà delle arterie vertebrali particolarmente suscettibile ai movimenti ed alle posizioni della testa.

La rotazione e l'estensione della testa sono di norma e nell'adulto movimenti realizzati non tanto dalla scatola cranica, che sull'atlante compie essenzialmente un limitato moto di ciondolamento, quanto dal rachide cervicale, cui invece sono consentite ampie escursioni su tutti gli assi del piano.

Nel lattante, invece, a causa di una fisiologica immaturità del sistema osteoarticolare, sembrerebbe esserci una maggiore mobilità sia della scatola cranica che del rachide cervicale, ulteriormente accentuata nei prematuri e nei neonati con basso peso alla nascita ed essenzialmente riconducibile ad una peculiare conformazione anatomica delle strutture ossee ed articolari della regione cervicale.

Nell'adulto, infatti, le arterie vertebrali, dal foro trasverso di C1 al forame occipitale, decorrendo, attraverso l'atlante e l'osso occipitale, in senso latero-mediale, lungo la superficie superiore di tale vertebra, sono di norma protette da possibili compressioni esterne, nel loro tratto laterale, ad opera delle masse laterali di C1, rispetto alle quali sono collocate posteriormente, ed in quello mediale, per mezzo di una doccia ossea preposta al loro decorso.

Nel lattante, invece, tali meccanismi protettivi, in virtù di una conformazione anatomo-funzionale ancora in via di sviluppo, vengono sovente ad essere inefficienti.

A fianco della mancata formazione della suddetta doccia ossea, cui consegue inevitabilmente un libero decorso delle arterie vertebrali sulla faccia superiore dell'atlante, spesso si riscontra una concomitante condizione ipoevolutiva a carico delle masse laterali di C1 che, risultando costituite, anziché di tessuto osseo, da tessuto connettivo fibroso, ricoperto da un sottile strato di cartilagine, esercitano una debole protezione meccanica nei confronti di tali segmenti vascolari.

A ciò si affianca una notevole lassità legamentosa a livello dell'articolazione atlanto-occipitale che, nel facilitare un'ampia escursione nei movimenti di rotazione ed estensione del capo, renderebbe il neonato, rispetto ad un adulto, più suscettibile ad ostacolo emodinamico vertebrale.

Ostacolo che, durante l'estensione del rachide cervicale, viene ad identificarsi da un lato, nella compressione esercitata dalle strutture molli interposte tra l'occipite e l'atlante, tra la quali gioca un ruolo essenziale, a causa di un ispessimento tipico dell'epoca infantile, la membrana posteriore atlanto-occipitale e dall'altro, nella cosiddetta "instabilità atlanto-occipitale", caratterizzata da una diminuzione d'ampiezza dell'arco posteriore dell'atlante e dal conseguente suo frequente impegno nel forame occipitale.

Mentre l'estensione del rachide cervicale comporta una compressione delle arterie vertebrali in regione atlanto-occipitale, i movimenti di rotazione della testa sembrerebbero agire a livello del passaggio vertebrale tra C1 e C2, dove tali segmenti vascolari, fuoriusciti dal forame trasversario dell'epistrofeo, ripiegandosi lateralmente per entrare in quello dell'atlante, vengono a trovarsi per un breve tratto più esposti, in quanto non protetti dalle strutture ossee vertebrali, ad un'azione di ingombro dei tessuti muscolari e nervosi limitrofi.

I lavori sperimentali compiuti a riguardo hanno inoltre evidenziato come tale fenomeno sia particolarmente evidente e più accentuato nei movimenti associati di estensione e rotazione.

Gli Autori pertanto

E' sufficiente una piccola diminuzione del diametro allorché il flusso è proporzionale alla 4° potenza. Tale suscettibilità anatomica all'ingombro vascolare, pur potendo esitare in una totale ostruzione di flusso di una od entrambe le arterie vertebrali, non rappresenta comunque un meccanismo sufficiente a determinare ischemia del territorio vertebrobasilare tronco cerebrale, allorché la circolazione collaterale mediata dalla vertebrale controlaterale, nelle occlusioni monolaterali, o dalle carotidi interne, in caso di occlusione bilaterale, costituisce un meccanismo anatomico preposto a salvaguardare la vascolarizzazione dei distretti cerebrali.

Concomitante situazione di una arteria vertebrale, quella rimasta pervia, ridotta di calibro in maniera congenita, ipoplasica o se nelle compressioni bilaterali c'è inadeguatezza delle comunicanti posteriori? Dalle carotidi, o se si chiude la vertebrale più ampia

Sintomi: bradicardia centrale e apnea

La posizione prona è stata oggi accettata quale uno dei maggiori fattori di rischio per la Sids. Posizione prona: sde estende, compressione bilaterale ed ischemia se le comunicanti posteriori sono ipoplasiche, se ruota, occlusione controlaterale e se la vertebrale dal lato a cui ha ruotato è ipoplasica, insieme alla comunicanti, idem.

Il materasso soffice è ulteriore fattore di rischio perché implica una maggiore rotazione per liberare naso e bocca.

L'età di massima incidenza, tra i 2 e i 4 mesi, è spiegata poiché la conduttanza, che è proporzionale alla 4° potenza del diametro dei vasi, è relativamente bassa nei primi 4 mesi di vita e pertanto la capacità del sistema di Willis di compensare è limitata poiché il tronco cerebrale cresce più rapidamente dei vasi e poi perché l'instabilità atlanto-occipitale tende a decrescere dopo i primi 6 mesi di vita.

La sids che colpisce bimbi tra 1 e 6 mesi, dopo la conformazione anatomica cambia e prima i bimbi non hanno la forza né la coordinazione per ruotare od estendere la testa di un grado sufficiente a causare una compressione delle arterie vertebrali.

L'ipertermia rappresenta un ulteriore fattore di rischio associato alla sids e può essere anche esso giustificato alla luce di tale teoria eziopatogenetica, allorché, potendo incrementare anche di 4 o 5 volte il normale il flusso degli arti superiori, che è in competizione con la circolazione vertebrobasilare originante dalle arterie succlavia e pertanto il sequestro di sangue dagli arti superiori alla vascolarizzazione della fossa cranica posteriore necessita una vasodilatazione delle arterie vertebrali non sempre attuabile. Infatti il fumo della madre in gravidanza e quello passivo poi sono anch'essi fattori di rischio spiegabili forse per il meccanismo di impedimento alla vasodilatazione arteriosa che sembrerebbe esercitare in giovane adulti. Se si assume il medesimo fenomeno nei bimbi, la mancata vasodilatazione impedirebbe un compenso al meccanismo di furto operato dalla succlavia.

Per quanto tali associazioni siano al momento speculative a sudorazione profusa

Gli esami istologici eseguiti su lattanti morti per sids non hanno evidenziato segni di infarto del tronco cerebrale. Del resto il bimbo dovrebbe sopravvivere almeno 4 ore per rendere visibili i tipici segni cellulari dell'ischemia. Pertanto se non c'è storia clinica di precedenti attacchi di apnea e se l'arresto cardiocircolatorio subentra abbastanza rapidamente all'apnea difficilmente si riscontreranno segni di ischemia al tronco cerebrale. Alcuni studi hanno riscontrato gliosi, che è stata interpretata come il risultato di ripetuti episodi di ostruzione delle vie aeree. In particolare, uno di essi ha evidenziato gliosi in assenza di markers ipossici a livello cerebrale o extracerebrale, potendosi interpretare come un fatto ipossico espressamente localizzato al tronco cerebrale. Pertanto è ipotizzabile come ripetuti episodi di compressione parziale delle arterie vertebrali possano esitare in ischemie del tronco insufficienti a portare a morte il lattante ma sufficientemente severe da comportare gliosi reattiva. Per arrivare ad una occlusione totale cui seguirebbe la morte in assenza di segni di infarto.

La domanda è perché solo alcuni bimbi andrebbero incontro a sids.

Perché il diametro delle arterie vertebrali in molti bimbi differisce (nel 40% una è la metà dell'altra) e pertanto l'occlusione di quella ectasica comporterebbe una riduzione del flusso. Inoltre in estensione la compressione di entrambe metterebbe in gioco le comunicanti posteriori

per salvare il tronco cerebrale da ischemia, ma esse sono in grado di supplire solo il 13 % del flusso della basilare poiché nell'infante sono molto piccole.

In ultimo la combinazione di più fattori di rischio farebbe precipitare la situazione.

Pertanto, in attesa di ulteriori chiarificazioni ed indagini e fermo restando la necessità di standardizzazione delle metodiche diagnostiche, ci si limita in questa sede a segnalare, a fianco degli aspetti macroscopici, cui ogni medico legale dovrebbe, in sede necroscopica, prestare la dovuta attenzione per escludere altre eziologie, le modalità di prelievo ed alcune indagini microscopiche ed immunoistochimiche, mirate alla verifica delle ipotesi fisiopatologiche presentate.

DIAGNOSI DIFFERENZIALE

Da valutare ai fini di escludere macroscopicamente altre cause di morte del lattante.

| REGIONI ANATOMICHE | CARATTERISTICHE DA VALUTARE | DIAGNOSI DIFFERENZIALE |
|---------------------------|------------------------------------|-------------------------------|
|---------------------------|------------------------------------|-------------------------------|

| | | |
|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Fontanella bregmatica Fontanella lambdoidea | Dimensione in centimetri | Masse cerebrali (es. tumori) Ipertensione endocranica |
| Leptomeningi | Normotrasparenza Presenza di essudato Aspetti quali-quantitativi del liquor | Emorragia subaracnoidea Meningite |
| Seni durali | Pervietà | Trombosi |
| Poligono di Willis | Decorso | Malformazioni |

LIQUIDO CEFALORACHIDIANO (Puntura preautoptica in cisterna).

| | |
|---------------------------|------------------------------------|
| Esami | Ricerca di: |
| Esame chimico-fisico | Aumento dei parametri infiammatori |
| Esame colturale | Meningococco |
| Polimerase chain reaction | Virioni |

PRELIEVI.

Encefalo in toto

Arterie carotidi (a cavallo della biforcazione)

Arterie vertebrali

INDAGINI MICROSCOPICHE MIRATE AL RISCONTRO DI
QUADRI ISTOLOGICI ASSOCIATI ALLA SIDS.

| REGIONI ANATOMICHE | QUADRI ISTOLOGICI DA RICERCARE |
|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Cervelletto Ependima ventricolare Tronco cerebrale > Bulbo | Grado di mielinizzazione Grado di maturazione Aree di leucomalacia Segni di apoptosi Glios reattiva |
| Nucleo arcuato | Ipoplasia |
| Glomo carotideo | Ipoplasia |
| Arterie vertebrali | Ipoplasia od ectasia Segni di compressione esterna Inginocchiamenti Fibrosi perivasale Lesioni dell'intima |
| Tronco cerebrale | Segni di ischemia |

Indagini immunoistochimiche mirate alla verifica delle ipotesi eziopatogenetiche proposte in letteratura.

| | |
|----------------|---------------------------------------------------|
| Nucleo arcuato | Valutazione dell'attività muscarinica colinergica |
| Nuclei vagali | Valutazione dell'attività catecolaminergica. |

Individuazione dei fattori xeno biotici.

In collaborazione con differenti strutture ospedaliere operanti sul territorio Nazionale, è stato avviato uno studio clinico su reperti provenienti dalla sala anatomica, appartenenti a feti e neonati deceduti inaspettatamente senza riscontro di cause determinanti la morte.

Lo scopo del lavoro è stato la ricerca di fattori xenobiotici di interesse tossicologico, ovvero, sostanze di natura chimica, estranee all'organismo umano, alle quali esso è esposto attraverso qualsiasi via (sistemica, orale, inalatoria, cutanea) la cui attività possa essere in qualche modo responsabile dell'arresto cardiocircolatorio del soggetto.

In particolare è stata posta particolare attenzione alla ricerca della nicotina e del suo principale metabolita, la cotinina. Recenti studi evidenziano infatti una possibile correlazione tra la presenza delle due sostanze e l'aumento della probabilità di decesso in culla o durante il periodo di gestazione.

L'esposizione prenatale alla nicotina, aumenterebbe il rischio di morte improvvisa dei lattanti (Sids) durante il primo anno di vita. Uno studio condotto da alcuni ricercatori presso il Dipartimento di medicina neonatale del Karolinska Institute (Svezia), ha esaminato 36 neonati, di cui 19 provenienti da famiglie di non fumatori e 17 con madri fumatrici. E' stata registrata la pressione sanguigna dei neonati durante il riposo, ad intervalli ciclici; alla prima e alla terza settimana, al 3 mese ed infine ad un anno dall'inizio dell'osservazione. I risultati hanno rilevato anomalie nella pressione sanguigna e nella frequenza cardiaca dei bambini con madri fumatrici. Quando questi soggetti venivano sollevati da una posizione supina registravano ulteriori aumenti di pressione sanguigna e frequenza cardiaca.

Tuttavia, a un anno di età queste anomalie tendono a diminuire. L'importanza di questo studio è che viene dimostrato per la prima volta come l'esposizione prenatale alla nicotina possa condurre a modifiche durature del meccanismo di controllo della pressione sanguigna del bambino, aumentando il rischio di Sids.

(Gary Cohen; Heather Jeffery; Hugo Lagercrantz; and Miriam Katz-Salamon. Long-Term Reprogramming of Cardiovascular Function in Infants of Active Smokers. Hypertension. Published Online on January 25, 2010.)

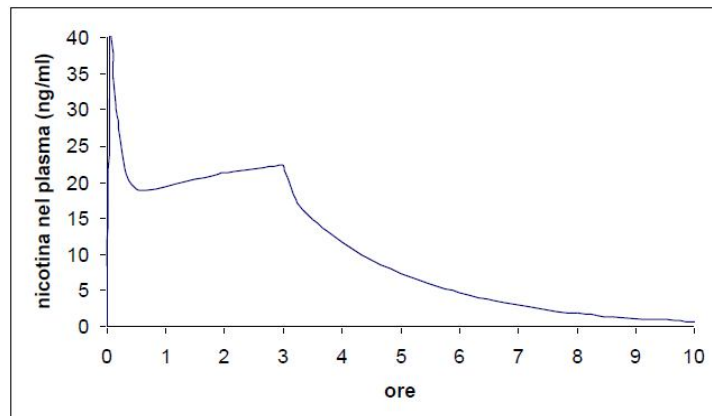
Assorbimento e distribuzione della Nicotina.

La farmacocinetica della nicotina è stata studiata nell'uomo in diverse condizioni sperimentali al fine di determinare possibili relazioni tra i livelli della sostanza e gli effetti osservati (farmacocinetica-farmacodinamica) e l'influenza della via di somministrazione sui livelli plasmatici confrontando le velocità dell'assorbimento di nicotina da diverse formulazioni. In altri studi lo scopo è stato quello di studiare il metabolismo della sostanza e la sua variabilità nella popolazione. Tutte queste informazioni servono a caratterizzare la farmacocinetica della nicotina che, unitamente alla farmacodinamica, costituisce uno strumento indispensabile per valutare correttamente non solo gli effetti e le potenzialità di questa sostanza, ma anche il suo ruolo in fenomeni quali la tolleranza, assuefazione e dipendenza dal fumo di sigaretta.

Isolata nel 1838, la Nicotina è chimicamente una base forte (amina terziaria), con un pKa di 8,5. Si tratta di un alcaloide, il cui assorbimento avviene senza difficoltà a livello della cute, delle mucose orali, dell'apparato respiratorio e della mucosa intestinale. Presenta uno scarso assorbimento gastrico, in quanto l'acidità dello stomaco costituisce un fattore limitante di particolare efficacia.

Dopo somministrazione e.v. nell'uomo, si può osservare una prima fase iniziale di caduta rapida dei livelli plasmatici dovuta alla distribuzione della nicotina in diversi tessuti, seguita da una fase di scomparsa più lenta caratterizzata da una emivita di circa 2-3 ore.

Nel seguente grafico è riportato il profilo plasmatico medio della nicotina dopo infusione endovenosa continua per 3 ore. In questa simulazione si possono interpolare con buona approssimazione i livelli medi di nicotina. È possibile notare che a 3 ore le concentrazioni di nicotina tendono a stabilizzarsi, mentre dopo la fine dell'infusione le concentrazioni calano fino a raggiungere valori che a 10 ore possono essere considerati trascurabili.

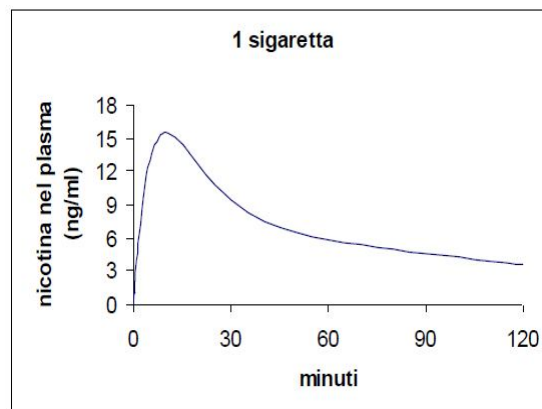


Distribuzione.

Nel sangue, ad un pH di 7.4, circa il 69 % della nicotina è ionizzato e meno del 5 % è legato alle proteine plasmatiche. Come si è visto in precedenza il volume di distribuzione stimato dopo somministrazione e.v. è ampio e questo significa che la nicotina si distribuisce bene in molti tessuti. Ovviamente non è facile avere accurate informazioni sulla distribuzione nell'uomo tuttavia, le concentrazioni tissutali di nicotina

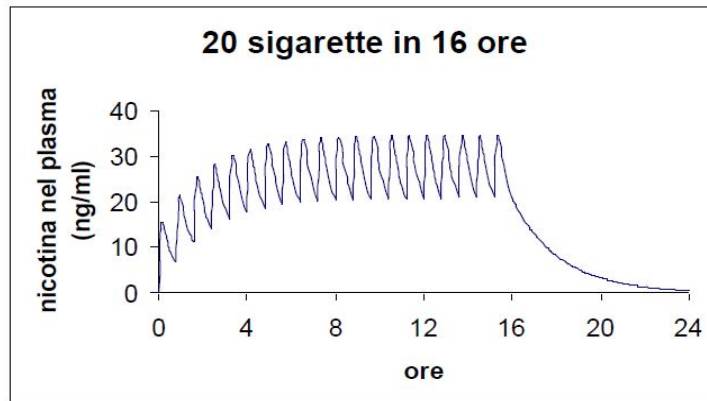
sono state misurate nel coniglio hanno evidenziato che la milza, il fegato, il polmone e il cervello hanno un'alta affinità per la sostanza, mentre l'affinità per il tessuto adiposo risulta molto bassa. In altri studi sull'animale è stato dimostrato che il passaggio della nicotina dal sangue al cervello è molto rapido e che la distribuzione avviene già durante il primo passaggio del sangue attraverso questo organo.

Il grafico riportato di seguito evidenzia l'andamento della concentrazione di nicotina plasmatica dopo una somministrazione di 30 g di sostanza.



Avendo un'emivita di circa 2 ore, il consumo di più sigarette ad intervalli regolari non più lunghi di 6-8 ore provoca un accumulo significativo di nicotina nel plasma con livelli persistenti anche durante la notte. Utilizzando i parametri e il modello della simulazione precedente, sono stati predetti allora i livelli plasmatici di nicotina dopo il fumo di più

sigarette nell'arco della giornata (20 sigarette in 16 ore ad intervalli esattamente uguali) e i risultati sono rappresentati di seguito.



Meccanismo di eliminazione.

La nicotina è in parte eliminata per via renale ed in parte è metabolizzata nel fegato e, in misura minore, nel polmone e nel cervello. I fumatori hanno in media una clearance totale minore dei non fumatori e comunque la variabilità di questo parametro nella popolazione è molto ampia. Il principale metabolita della nicotina è la cotinina (70-80%), mentre una quota inferiore viene trasformata in nicotina N9-oxide (4 %). La cotinina è a sua volta in parte metabolizzata, e in parte escreta nelle urine. Sia la nicotina che la cotinina subiscono anche una glucuronazione.

Parametri cinetici della cotinina nell'uomo:

| Parametro | Valore |
|-----------------------|-----------|
| Emivita | 18 ore |
| Clearance totale | 72 ml/min |
| Clearance renale | 12 ml/min |
| Clearance extrarenale | 60 ml/min |

La cotinina è stato il marker maggiormente utilizzato per misurare l'esposizione alla nicotina dei fumatori e dei non fumatori (fumo passivo), e questo sia perché la semivita del metabolita è molto più lunga della semivita del precursore, sia perché, essendo la nicotina e la cotinina metabolizzate probabilmente dallo stesso citocromo, esiste un'alta correlazione tra la clearance della cotinina e la clearance della nicotina che, a sua volta, è il parametro che meglio di altri è predittivo dei livelli plasmatici della nicotina.

La clearance renale della nicotina varia tra il 2 e il 35 percento della clearance totale. E' Interessante notare che il pH delle urine influenza l'eliminazione renale a causa della ionizzazione della nicotina. Infatti la nicotina, che è una base debole, è non ionizzata a pH 7 e quindi parte della quota filtrata può essere facilmente riassorbita a livello del tubulo, mentre l'opposto accade a pH acido. La conseguenza è che si ha un aumento della clearance renale della nicotina quando le urine tendono ad essere acide. Si è osservato che in soggetti fumatori questo aumento può raggiungere

valori percentuali molto elevati, infatti in uno studio controllato si è avuto in aumento della clearance renale del 208 % acidificando le urine fino a pH 4.5 rispetto ai controlli che avevano un pH medio pari a 5.6. Essendo solo parzialmente eliminata per via renale, l'effetto sulla clearance totale è risultato meno marcato (41%). Al contrario, portando il pH delle urine a 6.7 si è osservato un calo della clearance renale (78%). Nello stesso studio si è osservato che i soggetti fumatori tendevano ad aumentare il consumo di sigarette in modo da compensare, almeno in parte, l'aumentata eliminazione di nicotina.

SEZIONE ANALITICA

I campioni oggetto dello studio si compongono principalmente di alcuni milligrammi di tessuto prelevato il sede autoptica da differenti distretti del cadavere. In particolare, si tratta di frammenti di polmone, fegato, rene, encefalo, cute e talvolta, ove presenti di capelli, appartenenti a soggetti deceduti sia in sede intrauterina, sia fino a pochi mesi dopo la nascita.

L'importanza di tali reperti e della loro natura è data dal fatto che rappresentano i normali siti di deposito e di catabolismo della maggior parte delle sostanze assorbite dall'organismo.

Non sono state oggetto dello studio matrici quali sangue, urina e bile, non reperibili probabilmente per difficoltà di prelievo in individui di tali dimensioni e stadio di maturazione.

Sono stati analizzati 151 campioni appartenenti a 35 soggetti di entrambi i sessi.

Data l'esiguità del materiale disponibile (alcuni prelievi non superavano i 500 milligrammi in peso), è stato opportuno suddividere in tre aliquote ciascun reperto per procedere a tre differenti linee di indagine.

La prima aliquota è stata dedicata alla analisi generica ad ampio spettro operata in GC/MS. Tale tecnica consente l'individuazione nel campione di oltre 750'000 sostanze non volatili di interesse tossicologico.

Sul medesimo reperto è inoltre stata possibile la ricerca dei composti volatili mediante tecnica gas-cromatografica a spazio di testa.

La seconda linea di screening ha previsto il dosaggio di 61 metalli attraverso la tecnica ICP-MS a cella di collisione. Attraverso questa indagine è stato possibile verificare le concentrazioni sia degli elementi “costitutivi”, sia l'eventuale presenza di elementi di interesse tossicologico.

La terza indagine analitica è stata dedicata alla ricerca in tracce di nicotina e cotinina con metodica mirata in UPLC-MS-MS triplo quadrupolo.

Tale tecnica consente l'individuazione di concentrazioni inferiori al picogrammo di analita per grammo di campione.

MATERIALI E METODI.

Screening GC-MS

Preparazione del campione.

Una porzione di tessuto, omogeneizzata con 9,5 ml di acqua è stata lasciata a macerare per 48 ore. Successivamente il materiale è stato centrifugato a 3.500 rpm per 10 minuti.

È stata quindi separata la porzione di surnatante ed addizionata di 4 ml di tampone pH 6,88.

La miscela è stata quindi agitata su vortex e caricata su colonna Certify, previamente condizionata con 2 ml di metanolo, seguiti da 2 ml di tampone a pH 6,88.

La colonna è stata quindi lavata con 2 ml di tampone a pH 6,88, 1.5 ml di acido acetico 0,01 M e portata a secchezza.

Si è quindi operata una prima eluizione con 4 ml di una miscela di cloroformio/acetone 1:1 da cui si è ottenuto l'eluato acido/neutro ed una seconda eluizione con 2ml di etilacetato al 2% di NH₃ seguiti da 2 ml diclorometano/isopropanolo 8:2 al 2 % di NH₃ da cui si è ottenuto l'estratto basico.

Gli estratti sono stati portati a secchezza e separatamente ricostituiti con 100 µl di metanolo e sottoposti ad analisi GC-MS.

Condizioni strumentali.

L'esame degli estratti ottenuti è stato eseguito con la tecnica gascromatografica a spettrometria di massa.

E' stato allo scopo utilizzato un gas-cromatografo 5890 Agilent Technologies, corredato di "Mass Selective Detector" serie 5975 e munito di una colonna Chromopack CP-SIL 8 CB della lunghezza di 15 m, del diametro interno di 0,25 mm e con un film di rivestimento di 0,25 mcm.

L'esame degli estratti è stato eseguito utilizzando una rampa a temperatura programmata per 2 minuti a 100°, da 100° a 160° con un incremento di 40°/minuto e da 160° a 290° con un incremento di 8°/ minuto e una isoterma finale di 1'.

La temperatura dell'iniettore di 270° C e quella dell'interfaccia di 250° C. Splittless : 45''.

M.S.D. Scansione da 40 a 550 m/z.

Ricerca di tossici organici volatili.

La presenza di composti volatili può essere evidenziata, direttamente su materiale biologico sfruttando la loro volatilità.

Questa tecnica, detta spazio di testa (head space), consiste nell'effettuare un'analisi gas-cromatografica su un'aliquota della frazione gassosa che si sviluppa da un campione di materiale biologico opportunamente preparato in vial a chiusura ermetica e riscaldato a 60°C per quindici minuti.

E' stato utilizzato un gas-cromatografo Agilent 6850 munito di campionatore automatico Gerstel MPS-2 per il prelievo del campione

gassoso ed un rivelatore ad GC-MS Agilent 5973. La colonna utilizzata è stata una HP-BAlc capillare della lunghezza di 7,5 metri, del diametro interno di 0,32 mm e con rivestimento interno dello spessore di 0,20 µm.

L'analisi è stata condotta alle seguenti condizioni operative:

| | |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Carrier: | idrogeno a 2 mL/min |
| Temperatura forno: | isoterma a 120°C per 1'; da 120°C a 165°C con un incremento di 25°C/min ed isoterma finale per 2 minuti |
| Iniettore: | Split, 20:1 mantenuto a 250°C |
| Rivelatore: | FID, mantenuto a 300°C |
| Flussi idrogeno ed aria | 30 e 300 mL/min |
| Make-up | azoto a 30 mL/min |

Analisi metalli in tracce.

Preparazione del campione.

Ciascun campione viene digerito mediante aggiunta di 5 ml di HNO₃, 0.5 ml di H₂O₂ e posto in microonde con la seguente programmata standard (EPA 3050B):

| Step | Time | Temperature | Microwave power |
|------|-----------|-------------|------------------|
| 1 | 10 minuti | 200°C | Up to 1000 Watt* |
| 2 | 20 minuti | 200°C | Up to 1000 Watt* |

Al termine del processo di digestione in microonde i campioni vengono portati al volume di 50ml con H₂O bidistillata. In questo modo si ottiene

una primaria diluizione del campione, di tale soluzione ne verrà prelevata un'aliquota di 1ml, posta in una provetta graduata da 10ml e portata ad un volume di 4 ml con H₂O bidistillata ottenendo una diluizione finale di 1:200 e una concentrazione di acido non superiore al 2%.

Preparazione dei bianchi e calibratori.

Unitamente ai campioni vengono allestiti due bianchi digerendo con la metodica sopra riportata 0,5ml di H₂O bidistillata. Tali soluzioni saranno utilizzate come background.

Per il "correct by current data" viene allestita una soluzione costituita di 4 elementi (Y, Ce, Tl, Co) in concentrazione di 10 ppb/ml.

Condizioni strumentali ICP-MS

Per le analisi viene utilizzata un strumentazione ICP-MS Agilent Technologies 7500ce dotata di cella di collisione e autocampionatore Cetac ASX-510 Autosempler. I gas utilizzati, quali argon ed elio sono stati forniti dalla ditta SIAD S.p.A con specifiche di purezza del 99,999%. Ogni materiale utilizzato per il trattamento del campione, provette, matracci e puntali per pistole, ad esclusione delle capsule per la digestione in microonde, è costituito da polietilene monouso.

L'acido nitrico utilizzato per la digestione viene purificato mediante distillazione con Subpur Subboiling Distillation System della Milestone Microwave Laboratory System, il perossido utilizzato è prodotto dalla J.T. Baker con certificazione di purezza Ultrarex II Ultrapure .

L'acqua utilizzata per le diluizioni e per le soluzioni di lavaggio durante le sessioni analitiche è stata prodotta mediante distillazione con Millipore Elix 3.

Per la mineralizzazione in microonde è stato utilizzato un sistema Ethos Touch Control Milestone Microwave Laboratory System.

Condizioni operative.

| | |
|----------------|------------|
| RF Power | 1500 W |
| RF Matching | 1.7 V |
| Smpl Depth | 7.5 mm |
| Carrier Gas | 0.75 L/min |
| Makeup Gas | 0.4 L/min |
| He Gas | 4 L/min |
| Nebulizer Pump | 0.1 rps |
| S/C Temp | 2 degC |
| AMU Gain | 128 |
| AMU Offset | 124 |
| Axis Gain | 1.0002 |
| Axis Offset | -0.09 |
| QP Focus | -8 V |
| Cell Exit | -36 V |
| Octp Bias | -16 V |
| Qp Bias | -13 V |

Ricerca mirata nicotina e cotinina in tracce.

Preparazione del campione.

Una aliquota di campione è stato omogeneizzato con 9 ml di acqua e lasciato a macerare per 48 ore, dopo di che il materiale è stato centrifugato a 3.500 giri per 10 minuti.

È stato prelevato il surnatante a cui sono stati addizionati di 4 ml di tampone pH 6,88.

La miscela è stata quindi agitata su vortex e centrifugata ed il campione è stato caricato su colonnina Certify, previamente condizionata con 2 ml di metanolo, seguiti da 2 ml di tampone a pH 6,88.

La colonnina è stata quindi lavata con 2 ml di tampone a pH 6,88 e 1.5 ml di acido acetico 0,01 M e portata a secchezza.

Si è quindi operata una prima diluizione con 4 ml di cloroformio/acetone 1:1 da cui si ottiene l'eluato acido/neutro ed una seconda diluizione con 2ml di etilacetato al 2% di NH₃ seguiti da 2 ml diclorometano/isopropanolo 8:2 al 2 % di NH₃ da cui si ottiene l' estratto basico.

Gli estratti sono stati portati a secchezza e sono stati quindi separatamente ricostituiti con 100 µl di metanolo e sottoposti ad analisi HPLC-MS.

Condizioni strumentali.

HPLC/MS-MS Triple Quad Applied Biosystems API 3200 to the following conditions:

Column: Thermo Hypersil Gold 50mm x 2.1mm particle size 1.9µm

scan type SRM

scan time (sec) 0.01

scan width (m/z) 0.02

peak width Q1 (FWHM) 0.4

polarity positive

analysis time 5 min.

Pump Dionex Ultimate 3000 system separation module with a column heater/cooler.

Gradiente.

A: H₂O 0.1% HCOOH

B: CH₃CN

Flow 1ml/min

| T°C min | solvent A | solvent B |
|---------|-----------|-----------|
| 0 | 99% | 1% |
| 0.5 | 99% | 1% |
| 3 | 0% | 100% |
| 3.5 | 0% | 100% |
| 4 | 0% | 100% |
| 4.1 | 99% | 1% |
| 5 | 99% | 1% |

CONCLUSIONI E DISCUSSIONE DEI RISULTATI.

Sono stati oggetto dello studio 151 campioni appartenenti a 35 soggetti. Tali campioni si compongono di reperti biologici provenienti dalla sala anatomica (porzioni di rene, fegato, polmone, encefalo e cute) e, in alcuni casi, di esigui quantitativi di capelli appartenenti a soggetti deceduti in età neonatale

Sui reperti sono state eseguite analisi di routine per la ricerca di sostanze di interesse tossicologico, uno screening per il dosaggio di 61 metalli e sono state condotte analisi mirate al rilievo e dosaggio della nicotina e cotinina mediante tecnica UPLC/MS-MS.

Le indagini svolte hanno dato esito negativo, non è stata rilevata la presenza di composti di natura esogena tali da presupporre uno stato di intossicazione acuta o cronica. In alcuni campioni, appartenenti a soggetti deceduti prima della nascita, è stata rilevata la presenza di caffeina. Tale positività, riconducibile ad un assorbimento passivo da parte del feto, non è in alcun modo riconducibile alle cause del decesso. Le basse concentrazioni della molecola ed il suo meccanismo d'azione non lasciano supporre alcuna implicazione con le cause del prematuro decesso.

Inoltre, in alcuni soggetti deceduti in età neonatale è stata determinata la presenza di fenobarbital, farmaco appartenente alla classe dei barbiturici ad azione anticonvulsivante il cui utilizzo d'elezione riguarda il trattamento dell'epilessia e diazepam, ansiolitico anticonvulsivante.

A tale proposito sono state verificate le informazioni di ricovero ove risulta la somministrazione dei farmaci nel periodo antecedente il decesso per scopi terapeutici.

Risulta pertanto verosimile la non correlazione di entrambe le molecole con le cause determinanti il decesso.

Analogamente, analisi effettuate sui campioni di tessuto e sulla porzione in spazio di testa non hanno determinato la presenza di sostanze volatili di interesse tossicologico.

L'indagine di rilievo e dosaggio di 61 metalli non ha evidenziato la presenza di elementi essenziali in concentrazioni esterne ai ranges fisiologici. Non è stata rilevata inoltre la presenza di metalli pesanti tali da determinare intossicazioni correlabili dalla prognosi del soggetto.

Le indagini di rilievo e dosaggio della nicotina e del suo metabolita principale, la cotinina hanno evidenziato, in alcuni campioni, la presenza di quantità indosabili di nicotina (inferiori a 0,001ng/g). Non è stata rilevata la presenza di cotinina.

Un'interpretazione plausibile dei risultati ottenuti è una possibile contaminazione dei campioni, le quantità di nicotina evidenziate potrebbero derivare dell'esposizione dei campioni in ambiente non particolarmente areato ove vi è la presenza di fumo di sigaretta o la semplice manipolazione da parte di un individuo fumatore.

È opportuno premettere che il rilievo di tali sostanze, in particolare a concentrazioni inferiori al nanogrammo, risulta particolarmente difficoltoso in quanto trattasi di molecole le cui caratteristiche chimico-fisiche non permettono un'eccellente cromatografia ed una efficace ionizzazione nonostante l'utilizzo delle strumentazioni più sofisticate, permettendo un LOD (*limit of detection*) non inferiore a 0,001ng. Inoltre non essendo stata rilevata la presenza del metabolita della nicotina, la cotinina, indice di un reale assorbimento ante mortem, tali rilievi non hanno alcun riscontro tossicologico e non possono essere considerati rappresentativi ai fini dello studio.

Ne consegue pertanto che le indagini svolte su 151 reperti, appartenenti a 35 soggetti, non hanno evidenziato la presenza di alcuna sostanza xenobiotica tale da rappresentare un fattore di concausa del decesso.

Bibliografia.

Anna Maria Lavezzi, Giulia Ottaviani, and Luigi Maturri, *Adverse effects of prenatal tobacco smoke exposure on biological parameters of the developing brainstem*. *Neurobiology of Disease* 20 (2005) 601 – 607

C. C. Cloak PhD*, T. Ernst PhD, L. Fujii MD, B. Hedemark BA, and L. Chang MD. *Lower diffusion in white matter of children with prenatal methamphetamine exposure*. *Neurology*. 2009 Jun 16;72(24):2068-75. Epub 2009 Apr 15.

Coleman-Phox K, Odouli R, Li DK. *Use of a Fan During Sleep and the Risk of Sudden Infant Death Syndrome*. *Archives of Pediatric and Adolescent Medicine*. October 2008; 162(10):963-8.

Colson ER, Rybin D, Smith LA, Colton T, Lister G, Corwin MJ. *Trend and Factors Associated With Infant Sleeping Position*. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*. December 2009; 163(12):1122-8.

Diamond J. *Infant Mortality – PRB (Population Reference Bureau) 2003 –Cartlidge PHT, Stewart JH. Effect of changing the stillbirth definition on evaluation of perinatal mortality rate*. *Lancet* 199, 346: 486-488.

D Mecchia, A.M Lavezzi, M Mauri, and L Maturri *Feto-Placental Atherosclerotic Lesions in Intrauterine Fetal Demise: Role of Parental Cigarette Smoking*. *Open Cardiovasc Med J*. 2009; 3: 51–56.

Elizabeth R. Sowell et al. *Differentiating Prenatal Exposure to Methamphetamine and Alcohol versus Alcohol and Not Methamphetamine using Tensor-Based Brain Morphometry and Discriminant Analysis*. *The Journal of Neuroscience*, March 17, 2010, 30(11):3876-3885

Filiano, J.J., and Kinney, H.C. “*A Perspective on Neuropathologic Findings in Infants of the Sudden Infant Death Syndrome: The Triple Risk Model*.” *Biology of the Neonate* 1994; 65(3–4):194–7.

Gary Cohen; Heather Jeffery; Hugo Lagercrantz; and Miriam Katz-Salamon. *Long-Term Reprogramming of Cardiovascular Function in Infants of Active Smokers*. Hypertension. Published Online on January 25, 2010.

Glinianaia FV, Rankin J, Bell R, Pless-Mulloi T, Howel D. *Does Particulate Air Pollution Contribute to Infant Death? A Systematic Review*. Environmental Health Perspectives, 2004; 112; 1365-1371.

Hauck, F.R., Moore, C.M., Herman, S.M., Donovan, M., Kalelkar, M., Christoffel, K.K., Hoffman, H.J., and Rowley, D. "The Contribution of Prone Sleeping Position to the Racial Disparity in Sudden Infant Death Syndrome: The Chicago Infant Mortality Study." Pediatrics 2002 Oct; 110(4):772–80.

Heinrich J, Slama R. Fine Particles, A Major Threat to Children. International Journal of Hygiene and Environmental Health. 2007; 210: 617-622.

Ineko K, Patricia F, Groswasser J, Scaillet S, et al. *Incomplete Arousal Processes in Infants Who Were Victims of Sudden Death*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. December 2003; 168:1298-1303.

Lequang Thuan, L. Mlgueres, Roche, G. Roussel, G. Mahuzler, J. Chretlen, G. Eklndjlan. *Elimination of Caffeine Interference in HPLC Determination of Urinary Nicotine and Cotinine*. 1456 CLINICAL CHEMISTRY, Vol. 35, No. 7, 1989

Lavezzi AM, Ottaviani G, Ballabio G, Rossi L, Maturri L. *Preliminary study on the cytoarchitecture of the human parabrachial/Kölliker-Fuse complex, with reference to sudden infant death syndrome and sudden intrauterine unexplained death*. Pediatr Devel Pathol 2004; 7: 171-179.

Lavezzi A.M., Ottaviani G., Maturri L. *Role of somatostatin and apoptosis in breathing control in sudden perinatal and infant unexplained death*. Clin Neuropathol 2004; 23: 304-310.

Lavezzi A.M., Ottaviani G., Rossi L., Maturri L. *Hypoplasia of the parabrachial/Kölliker-Fuse complex in perinatal death*. Biol Neonate 2004; 86: 92-97.

Lavezzi A.M., Ottaviani G., Mingrone R., Maturri L. *Effects of smoking on human locus coeruleus development analyzed in perinatal and sudden unexplained death.* Dev Brain Res 2005; 154: 71-80

Lavezzi AM, Ottaviani G, Mauri M, Maturri L. *Alterations of biological features of the cerebellum in sudden perinatal and infant death.* Curr Mol Med. 2006; 6: 429-435.

Lee C-T, Chen J, Hayashi T, Tsai S-Y, Sanchez JF, et al. 2008 *A Mechanism for the Inhibition of Neural Progenitor Cell Proliferation by Cocaine.* PLoS Med 5(6): e117.

Li, D.K., Petitti, D.B., Willinger, M., McMahon, R., Odouli, R., Vu, H., and Hoffman, H.J. “*Infant Sleeping Position and the Risk of Sudden Infant Death Syndrome in California, 1997–2000.*” American Journal of Epidemiology 2003 March 1; 157(5):446–55.

Mathews, T.J., Menacker, F., and MacDorman, M.F. “*Infant Mortality Statistics from the 2002 Period Linked Birth/Infant Death Data Set.*” National Vital Statistics Reports November 24, 2004; 53(10).

Maturri L, Minoli I, Lavezzi AM, Cappellini A, Ramos S, Rossi L. *Hypoplasia of medullary arcuate nucleus in unexpected late fetal death (stillborn infants): a pathologic study.* Pediatrics 2002; 109: E43.

Maturri L, Lavezzi AM, Cappellini A, Ottaviani G., Minoli I., Rubino B., Rossi L. *Association between pulmonary hypoplasia and hypoplasia of arcuate nucleus in stillbirth.* J Perinatol 2003; 23: 328-332.

Maturri L, Ottaviani G, Lavezzi AM. *Unexpected sudden death related to medullary brain lesions.* Acta Neuropathol (Berl) 2005; 109: 554-555.

Maturri L, Lavezzi AM, Rossi L. *Proposal to modify the definition of SIDS, with regard to the post-mortem exam.* In: *Proceedings of the 7th International Conference on SIDS*, Florence, August 31-September 4, 2002: p. 103.

Maturri L, Ottaviani G, Alfonsi G, Crippa M, Rossi L, Lavezzi AM. *Study of the brainstem, particularly the arcuate nucleus, in*

sudden infant death syndrome (SIDS) and sudden intrauterine unexplained death (SIUD). Am J Forensic Med Pathol 2004; 25: 44-48.

Moon, R.Y., Patel, K.M., and Shaefer, S.J.M. "Sudden Infant Death Syndrome (SIDS) in Child Care Settings." Pediatrics 2000; 106 (2) 295–300.

O'Leary C.M., Nassar N., Zubrick S.R., Kurinczuk J.J., Stanley F., Bower C. *Evidence of a complex association between dose, pattern and timing of prenatal alcohol exposure and child behaviour problems*. Addiction 2010, 105(1): 74-86.

Rina D. Eiden, Shannon McAuliffe, Lorig Kachadourian, Claire Coles, Craig Colder and Pamela Schuetze. *Neurotoxicology and Teratology*, Volume 31, Issue 1, January-February 2009, Pages 60-68.

Ottaviani G., Maturri L., Mingrone R., Lavezzi A.M. *Hypoplasia and neuronal immaturity of the hypoglossal nucleus in sudden infant death*. J Clin Pathol 2006, 59: 497-500.

Ritz B, Wilhelm M, Zhao Y. *Air Pollution and Infant Death in Southern California*. 1989-2000. Pediatrics. 2006; 118:483-502.

Shah T, Sullivan K, Carter J. Sudden Infant Death Syndrome and Reported Maternal Smoking during Pregnancy. *American Journal of Public Health*. October 2006; 96:1757-9.

Woodruff TJ, Parker JD, Schoendorf KC. *Fine Particulate Matter (PM_{2.5}) Air Pollution and Selected Causes of Postneonatal Infant Mortality in California*. Environmental Health Perspectives. 2006; 114: 785-790.

Tong S, Colditz P. *Air Pollution and Sudden Infant Death Syndrome: A Literature Review*. Pediatric and Perinatal Epidemiology. 2004; 18: 327-335.