



Il danno epatico è una nuova caratteristica della Malattia MYH9-correlata

Carlo Zaninetti¹, Alessandro Pecci¹, Ginevra Biino², Valeria Bozzi¹, Tiziana Fierro³,
Patrizia Noris¹, Umberto Magrini⁴, Paolo Gresele³, Carlo Luigi Balduini¹

¹Clinica Medica III, Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo,
Pavia, ²Istituto di Genetica Molecolare CNR, Università degli Studi di Pavia, Pavia,

³Dipartimento di Medicina Interna, Sezione di Medicina Interna e Cardiovascolare, Università di
Perugia, Perugia, e ⁴S.C. di Anatomia Patologica, Università degli Studi di Pavia,
Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia

Il danno epatico è una nuova caratteristica della Malattia MYH9-correlata

La Malattia MYH9-correlata (MYH9-RD) è un raro disordine sindromico, a trasmissione autosomica dominante, caratterizzato da piastrinopenia congenita associata al rischio di sviluppare nefropatia, sordità neurosensoriale e cataratta presenile. Nel corso dello studio del database di pazienti arruolati al Registro Italiano della MYH9-RD, abbiamo osservato che diversi soggetti presentavano una elevazione non spiegata dei markers di danno epatocellulare. Scopo del presente studio è stato quello di verificare l'ipotesi che il danno epatico sia una manifestazione non riconosciuta della MYH9-RD e di valutarne il significato clinico e prognostico. Le concentrazioni di AST, ALT e GGT osservate nei pazienti consecutivamente arruolati al Registro sono state confrontate con quelle determinate in tre casistiche di controllo: una composta dai soggetti partecipanti ad un ampio studio di popolazione condotto in un isolato geografico italiano e due casistiche di pazienti con piastrinopenia cronica derivante da cause diverse dalle mutazioni di MYH9. Trentotto dei 75 pazienti con MYH9-RD valutabili (50.7%) mostravano elevazione di ALT e/o AST, mentre la GGT era incrementata nel 27% dei casi (17/63). L'incremento medio era da 1.9 ± 0.7 a 2.7 ± 1.6 volte il limite superiore dell'intervallo di normalità. La prevalenza dell'alterazione di tali markers nei pazienti con MYH9-RD era significativamente superiore rispetto a quella osservata in ciascuna delle tre casistiche di controllo, con valori di odds ratio compresi tra 8.2 (95% CI 2.2-44.8) e 24.7 (14.8-40.8). Il follow-up clinico e ulteriori studi della funzione epatica non hanno mostrato alcun significativo danno strutturale d'organo né la tendenza all'evoluzione verso l'insufficienza epatica. Il danno epatico è quindi una caratteristica frequente, e sinora non riconosciuta, del quadro sindromico della MYH9-RD; allo stato attuale, tale alterazione non sembra possedere un significato prognostico sfavorevole.

Alteration of liver tests is a new feature of MYH9-related disease syndrome

MYH9-related disease (MYH9-RD) is a rare autosomal dominant syndromic disorder characterized by congenital thrombocytopenia associated with the risk of developing nephropathy, sensorineural deafness, and presenile cataract. During the analysis of the large database of patients enrolled to the Italian Registry for MYH9-RD, we observed that many subjects presented unexplained elevation of liver enzymes. The aim of the present study is to

test the hypothesis that hepatic damage is an unrecognized feature of the *MYH9*-RD and to define its clinical and prognostic significance. data concerning the concentration of AST, ALT, and GGT of consecutive patients enrolled in the Registry were collected and compared with those recorded in three control populations: the participants to a large epidemiological survey in an Italian geographic isolate, and two case series of subjects with chronic thrombocytopenia deriving from causes other than *MYH9* mutations. Thirty eight of 75 evaluable *MYH9*-RD patients (50.7%) showed elevation of ALT and/or AST, and 27.0% (17/63) presented increase of GGT. The increases ranged from 1.9 ± 0.7 to 2.7 ± 1.6 fold the upper normal limit. The prevalence of liver test alterations was significantly higher in *MYH9*-RD patients compared to each of the control populations, with odds ratios ranging from 8.2 (95% CIs 2.2-44.8) to 24.7 (14.8-40.8). Clinical follow-up and more detailed investigations did not show any significant structural damage of the liver or evolution towards liver insufficiency. We concluded that hepatocellular damage is a frequent and previously unrecognized feature of the *MYH9*-RD syndrome and that this defect does not appear to have a poor prognostic significance.

Introduzione

La Malattia *MYH9*-correlata (*MYH9*-related disease: *MYH9*-RD) è un disordine sindromico, a trasmissione autosomica dominante, causato da mutazioni nel gene che codifica per la catena pesante della miosina non-muscolare IIA (NMMHC-IIA). I soggetti affetti da *MYH9*-RD presentano sin dalla nascita anomalie ematologiche, rappresentate da piastrinopenia, macrocitosi piastrinica e caratteristici aggregati della proteina mutata nel citoplasma dei granulociti neutrofili. La maggior parte dei pazienti sviluppa in seguito, nel corso dell'infanzia o della vita adulta, ulteriori manifestazioni cliniche: sordità neurosensoriale, cataratta presenile, e/o nefropatia proteinurica che spesso evolve in insufficienza renale terminale [1-2]. Lo spettro di mutazioni causative della *MYH9*-RD comprende 44 differenti alterazioni eterozigoti di *MYH9* [1, 3-9] che possono coinvolgere il dominio N-terminale (Motor Domain: MD) o quello C-terminale (Tail Domain: TD) della NMMHC-IIA. Indagini recenti hanno identificato correlazioni significative fra genotipo e fenotipo clinico: i pazienti con mutazioni interessanti il MD, infatti, presentano piastrinopenia più severa e maggiore incidenza e gravità della nefropatia e del danno uditivo rispetto a quelli con mutazioni che coinvolgono il TD [2]. La miosina non-muscolare IIA è una miosina convenzionale citoplasmatica coinvolta in svariate funzioni connesse con la produzione di forza chemomeccanica intracellulare da parte del citoscheletro, quali la citocinesi, la motilità cellulare e il mantenimento della forma della cellula [10-11]. Studi condotti sull'ortologo murino *Myh9* ne hanno documentato l'espressione nella maggior parte degli organi e tessuti analizzati, con rare eccezioni, quali il muscolo scheletrico e il testicolo [12]. Nonostante la distribuzione pressoché ubiquitaria della NMMHC-IIA, le manifestazioni cliniche riconosciute della *MYH9*-RD sono limitate alle sopraccitate alterazioni ematologiche e della funzione renale, uditiva e visiva. La clinica Medica III della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia coordina dal 2007 un registro nazionale di questa malattia rara (Registro Italiano della Malattia *MYH9*-correlata, www.registromyh9.org). La raccolta di un casistica ampia di pazienti con *MYH9*-RD ha permesso di osservare che diversi soggetti presentavano alterazione dei markers bioumoriali di danno epatocellulare che rimaneva non spiegata anche dopo un accurato work-up diagnostico per la ricerca delle principali cause di epatopatia. Con il presente studio, abbiamo effettuato una valutazione sistematica della prevalenza delle alterazioni dei markers di danno epatico in un'ampia popolazione di pazienti con *MYH9*-RD caratterizzati per genotipo e fenotipo; tale prevalenza è stata confrontata con quella registrata nel corso di un ampio studio di popolazione condotto fra gli abitanti nella regione dell'Ogliastra, nella Sardegna centro-orientale [16] e con quella osservata in due casistiche di pazienti con differenti forme di piastrinopenia cronica afferiti al nostro Centro nello stesso periodo di tempo. Abbiamo infine valutato l'evoluzione delle alterazioni laboratoristiche osservate in termini di danno d'organo.

Scopo del lavoro

Il presente studio si propone di verificare l'ipotesi che il danno epatico sia una caratteristica sinora non riconosciuta del quadro fenotipico conseguente alle mutazioni di *MYH9* e, in tal caso, di fare luce sul suo significato clinico e prognostico in termini di danno d'organo.

Materiali e metodi

Pazienti

Sono stati arruolati allo studio tutti i pazienti consecutivi inclusi nel Registro dal settembre 2007 al settembre 2010 per i quali fossero disponibili i dati relativi agli indici bioumorali di danno epatico. La diagnosi di *MYH9*-RD è stata posta in tutti i casi mediante il test di screening in immunofluorescenza per la localizzazione leucocitaria della NMMHC-IIA e screening di mutazione di *MYH9* [1-2, 17]. Lo studio è stato approvato dal Comitato di Bioetica della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia. Tutti i pazienti arruolati hanno fornito consenso informato scritto alla partecipazione all'indagine. La prevalenza delle alterazioni degli indici di funzionalità epatica nei pazienti con *MYH9*-RD è stata confrontata con quella riscontrata nel corso di uno studio di popolazione effettuato tra il 2002 e il 2008 fra i residenti nella regione dell'Ogliastra, nella Sardegna centro-orientale, che ha permesso di raccogliere i dati clinici e bioumorali di 12517 abitanti [16, 18]. In questo modo, i pazienti con *MYH9*-RD sono stati confrontati con una casistica ampia di soggetti residenti in Italia, sia pur in un'area geografica ristretta, al fine di verificare che la prevalenza dei segni di danno epatico in questi soggetti differisca significativamente da quella della popolazione generale. Sono state utilizzate come ulteriori popolazioni di controllo due casistiche di pazienti consecutivi affetti da piastrinopenia cronica afferiti al nostro centro nello stesso periodo di tempo (2007-2010): una di pazienti con piastrinopenia autoimmune e una di soggetti affetti da piastrinopenie ereditarie derivanti da cause diverse dalle mutazioni di *MYH9* [19]. In questo modo, i pazienti con *MYH9*-RD sono stati confrontati con due casistiche omogenee per la condizione di piastrinopenia cronica, con lo scopo di escludere che tale situazione possa essere di per sé associata a danno epatico.

Metodi

Studio della funzione epatica nei pazienti con Malattia MYH9-correlata

Al momento della raccolta dei dati il Registro includeva 184 pazienti. Sono stati estratti dal database i parametri relativi ai livelli plasmatici dei seguenti indici bioumorali di danno epatico: alanina aminotransferasi (ALT), aspartato aminotransferasi (AST) e gamma-glutamiltanspeptidasi (GGT). L'alterazione di ciascun marker è stata definita dal rilievo di un livello plasmatico più alto rispetto al limite superiore del range di normalità del laboratorio dove è stato eseguita l'analisi. Al momento dell'analisi, in tutti i pazienti è stata raccolta l'anamnesi fisiologica, patologica e farmacologica ed è stato effettuato l'esame obiettivo. I pazienti con *MYH9*-RD che presentavano alterazione dei markers di danno epatico sono stati sottoposti ad approfondimento diagnostico consistente nello studio ecografico del fegato e nell'esecuzione sistematica di una serie di esami bioumorali per la ricerca di possibili cause alternative di danno epatico: ricerca markers sierologici per i virus HAV, HBV e HCV; dosaggio di bilirubina totale e diretta, albumina, colinesterasi, fosfatasi alcalina; ricerca anticorpi antinucleo, anti-muscolo liscio, anti-mitocondrio, anti-LKM e antimicrosomi; dosaggio cupremia, cupruria, ceruloplasmina, alfa-1-antitripsina; dosaggio ferritina sierica, ormoni tiroidei, anticorpi anti-endomisio e anti-transglutaminasi. Lo studio elastosonografico ad impulsi del fegato e lo studio istologico della

biopsia epatica sono stati eseguiti ciascuno in un singolo caso. Tutti i pazienti in cui, sulla base dell'anamnesi e degli esami bioumorali è stata riscontrata una condizione patologica potenzialmente determinante un danno epatico sono stati esclusi a priori dallo studio.

Analisi degli indici bioumorali di danno epatico nelle popolazioni di controllo

L'alterazione dei livelli plasmatici dei markers di danno epatico è stata definita nelle tre popolazioni di controllo utilizzando gli stessi criteri precedentemente descritti per la casistica dei pazienti con MYH9-RD. Per la popolazione degli abitanti dell'Ogliastra non era disponibile il dato di GGT.

Analisi statistica

Le variabili continue sono state espresse nella forma di media e deviazione standard, quelle discrete in forma di numeri interi e percentuali. La casistica dei pazienti con MYH9-RD è stata confrontata con ciascuna delle tre popolazioni di controllo attraverso l'uso del test Chi quadrato. Sono stati considerati come statisticamente significativi valori di p inferiori a 0.05. Per ciascuno dei confronti effettuati è stata calcolata l'odds ratio (OR) e il relativo intervallo di confidenza al 95% (95% CI). Il metodo della regressione logistica è stato utilizzato per prendere in considerazione l'eventuale effetto di età e genere come variabili di confondimento.

Risultati

Arruolamento

Al momento del presente studio risultavano arruolati al Registro 189 pazienti; i dati relativi agli indici bioumorali di funzionalità epatica erano disponibili in 89 casi. Quattordici pazienti sono stati esclusi a priori dallo studio a causa del riscontro di condizioni patologiche che possono determinare danno epatocellulare: positività sierologica per gli anticorpi anti-HCV o per HbsAg e/o presenza di epatopatia HCV-relata (7 pazienti), scompenso cardiaco congestizio (3), anamnesi positiva per esotossicosi alcolica (2), carcinoma vescicale con secondarismi epatici (1), morbo celiaco (1). Sono stati quindi analizzati 75 pazienti consecutivi con MYH9-RD appartenenti a 52 famiglie non consanguinee. La prevalenza delle alterazioni dei markers di danno epatico è stata confrontata con quella riscontrata in 77 pazienti consecutivi affetti da piastrinopenia autoimmune cronica e 32 soggetti consecutivi affetti da piastrinopenia ereditaria derivante da cause diverse dalle mutazioni di MYH9. Questi ultimi consistevano in 12 pazienti affetti da Sindrome di Bernard-Soulier monoallelica [19], 11 pazienti con piastrinopenia autosomica-dominante causata dalle mutazioni di ANKRD26 [20], 3 soggetti con piastrinopenia autosomica-dominante causata da mutazioni di ITGB3 [21] e 6 pazienti con macrotrombocitopenia ereditaria di origine non determinata [22-23]. Dei 12517 partecipanti allo studio epidemiologico Ogliastra erano disponibili i dati relativi agli indici bioumorali di funzionalità epatica di 7659 soggetti. Di questi, 402 sono stati esclusi a priori dallo studio in quanto presentavano in anamnesi una condizione patologica potenzialmente determinante danno epatocellulare. Sono stati quindi arruolati 7257 soggetti. Le principali caratteristiche demografiche delle casistiche analizzate sono riportate in tabella 1. Le differenti popolazioni sono risultate comparabili per età e genere, se si esclude il fatto che i pazienti con MYH9-RD presentavano età significativamente inferiore rispetto alla popolazione dello studio Ogliastra e ai pazienti con Piastrinopenia autoimmune ($p < 0.001$ per entrambi i confronti).

Alterazione degli indici bioumorali di danno epatico nei pazienti con Malattia MYH9-correlata

La prevalenza delle alterazioni dei markers di danno epatico nelle quattro casistiche analizzate è riportata in tabella 2. Trentotto dei 75 pazienti con MYH9-RD (50.7%) presentavano incremento di ALT o AST. L'enzima più frequentemente alterato era l'ALT, il cui valore è risultato elevato in 35 pazienti (46.7%); ventinove di questi (38.7% del totale) presentavano un contestuale incremento di AST. Tre pazienti, presentavano invece aumento della sola AST. Il livello della GGT è stato dosato in 63 pazienti ed è risultato incrementato in 17 casi (27%). In particolare, la GGT era aumentata in 16 dei 32 soggetti che presentavano incremento delle aminotransferasi, mentre in un solo caso è stata osservata elevazione isolata della GGT. L'incremento medio della ALT era di 1.9 volte il limite superiore del range di normalità dei laboratori in cui è stata effettuata l'analisi (deviazione standard, DS, 0.7); l'AST risultava incrementata mediamente 1.4 volte (DS 0.4), mentre l'aumento medio di GGT era pari a 2.7 volte (DS 0.4). I 39 pazienti che presentavano alterazione di uno o più markers di funzionalità epatica appartenevano a 31 famiglie differenti, erano per il 56% di sesso maschile e presentavano età media di 30.5 anni. I gruppi di pazienti con MYH9-RD con e senza elevazione dei markers di danno epatico non differivano significativamente per età, genere, conta piastrinica o presenza di manifestazioni cliniche extra-ematologiche della malattia (dati non mostrati). Infine, non è stata osservata alcuna correlazione fra la presenza di segni di danno epatico e la posizione della mutazione di MYH9, dal momento che la frequenza di tale riscontro era simile nei pazienti con mutazione coinvolgente il MD e in quelli con mutazione che alterava il TD.

Alterazione degli indici bioumorali di danno epatico nelle popolazioni di controllo

Popolazione dell'Ogliastra

I risultati del dosaggio dei markers di danno epatico nei soggetti partecipanti allo studio Ogliastra sono sintetizzati in tabella 2. Trecentonovantatré dei 7257 soggetti analizzati (5.4%) presentavano elevazione della concentrazione della ALT o AST. L'alterazione più frequente era l'incremento di ALT, documentato in 320 soggetti (4.4%); 139 di questi (1.9% del totale) presentavano contestuale elevazione di AST. Nei rimanenti 73 soggetti (1%) è stato registrato l'incremento della sola AST. L'incremento medio di tali indici era pari a 1.7 volte (DS 0.7) il limite superiore del range di normalità per ALT e 1.5 volte (DS 0.7) per AST.

Pazienti affetti da piastrinopenia autoimmune cronica

Cinque dei 77 pazienti analizzati (6.5%) presentavano incremento dei livelli di ALT, mentre in nessun caso è stata registrata elevazione di AST (Tabella 2). L'incremento isolato di GGT è stato riscontrato in 4 dei 71 pazienti in cui tale enzima è stato dosato (5.6%). L'incremento medio di tali indici era di 1.34 volte (DS 0.1) il limite superiore del range di normalità per ALT e di 1.49 volte (DS 0.2) per la GGT. Dei 20 pazienti nei quali la misurazione dei livelli enzimatici è stata ripetuta, in un solo caso (5%) è stata osservata elevazione in almeno una determinazione successiva, mentre nessuno ha presentato un'elevazione persistente in tutte le determinazioni effettuate.

Pazienti con piastrinopenie ereditarie diverse dalla Malattia MYH9-correlata

In tre dei 32 pazienti analizzati (9.4%) si è registrato un incremento di almeno una delle aminotransferasi (Tabella 2); il marker più frequentemente alterato si è rivelato essere la ALT, presente in concentrazione elevata in tre soggetti (9.4%), uno dei quali presentava una concomitante elevazione della AST. Nessun paziente ha mostrato livelli aumentati di GGT. L'entità dell'alterazione degli indici bioumorali espressa in termini di media \pm DS dell'aumento della concentrazione rispetto al limite superiore di normalità era 1.48 ± 0.12 volte per la ALT e 2.18 per la AST.

Comparazione fra pazienti con Malattia MYH9-correlata e popolazioni di controllo

La prevalenza dell'alterazione dei markers di danno epatico registrata nei pazienti con *MYH9*-RD è risultata significativamente superiore a quella osservata in ciascuna delle tre popolazioni di controllo. L'incremento delle aminotrasferasi era più frequente nei pazienti con mutazioni di *MYH9* quando AST e ALT venivano analizzate singolarmente, quando veniva presa in considerazione l'eventualità di elevazione di almeno uno dei due enzimi, o dell'incremento simultaneo di entrambi, con valori di p compresi fra 0.00001 e 0.0004 (Tabella 3). Risultati analoghi sono stati ottenuti quando è stata analizzata la prevalenza di alterazione di GGT (dati non mostrati). Il calcolo delle OR ha dimostrato che i pazienti con *MYH9*-RD presentavano, rispetto a ciascuna delle tre popolazioni di controllo, probabilità di incremento di ALT da 8.2 a 18.9 volte superiore, di incremento di AST da 21.4 a 24.7 volte superiore e di presentare incremento di almeno una fra ALT e AST da 8 a 14.8 volte superiore. Il rischio di avere un'alterazione simultanea di entrambe le aminotrasferasi era aumentato di 17.7 volte nel confronto con i pazienti affetti da altre forme di piastrinopenia ereditaria e 32.3 volte nel confronto con i partecipanti allo studio Ogliastra (Tabella 3). Quando, al fine di tenere conto del possibile effetto confondente delle variabili demografiche, i dati sono stati ponderati per età e genere, i valori di ORs sono risultati addirittura superiori, essendo compresi fra 8.5 e 41.6 (dati non mostrati). La curva di distribuzione dei livelli degli enzimi epatici studiati nelle diverse popolazioni ha evidenziato un andamento marcatamente differente nei pazienti con *MYH9*-RD rispetto ai soggetti di controllo: mentre in ciascuna delle casistiche di controllo è stata osservata, come atteso, una tipica curva gaussiana, il gruppo di pazienti con *MYH9*-RD presentava una curva appiattita, spostata verso destra e con una chiara tendenza alla distribuzione bimodale (Figura 1).

Indagini ulteriori nei pazienti con Malattia MYH9-correlata

I pazienti con *MYH9*-RD che presentavano alterazione non spiegata di ALT, AST e/o GGT sono stati sottoposti ad approfondimento diagnostico per la ricerca di possibili cause di danno epatico. Dei 39 pazienti con markers alterati, in 21 casi (53.8%) è stato effettuato lo studio ecografico del fegato: in 18 soggetti l'esame documentava un'ecostruttura epatica con caratteristiche di normalità, mentre in 3 pazienti era evidente una lieve steatosi epatica. In alcuni casi è stato descritto un modico incremento di volume del fegato. Uno solo dei 39 pazienti è stato sottoposto ad elastosonografia ad impulsi (Fibroscan), che ha fornito reperti di normalità. In 36 dei 39 pazienti (92.3%) con alterazione dei parametri bioumorali epatici sono stati effettuati i test sierologici per i virus epatotropi HBV e HCV, che hanno sempre dato esito negativo. Infine, in 21 soggetti è stato eseguito il sistematico screening bioumorale per la ricerca di possibili cause di danno epatico descritto nella sezione Metodi. In tutti i casi gli accertamenti eseguiti hanno fornito risultati nei limiti della norma. A causa della presenza di persistente e significativa alterazione dei markers di danno epatico, un paziente è stato sottoposto a biopsia epatica per via laparoscopica, previa trasfusione profilattica di concentrati piastrinici. L'esame istopatologico del tessuto epatico ha messo in evidenza un'architettura tissutale sostanzialmente conservata, con isolati gruppi di epatociti mostranti aspetti di steatosi micro- e macrovacuolare; negli spazi portali e attorno alle vene terminali è stata inoltre osservata la presenza di modica fibrosi; non sono stati riscontrati segni di infiammazione, necrosi, apoptosi, rigenerazione o colestasi. Sul prelievo di tessuto epatico è stata studiata, con metodo immunostochimico la localizzazione della distribuzione della NMMHC-IIA. La proteina presentava espressione citoplasmatica diffusa a livello degli epatociti, particolarmente concentrata a livello della membrana plasmatica, con rinforzo nella zona prospiciente i canalicoli biliari (Figura 2). Nei colangiociti, invece, la positività è apparsa elettivamente concentrata sul versante luminale della membrana plasmatica; risultavano inoltre intensamente positive le cellule di Kupffer e gli endoteli dei sinusoidi epatici. La distribuzione della NMMHC-IIA nel campione del paziente non era significativamente differente rispetto a quella osservata in un campione di parenchima epatico normale utilizzato come controllo (Figura 2).

Evoluzione dell'alterazione degli indici di danno epatico nei pazienti con Malattia MYH9-correlata

Dei 39 pazienti con MYH9-RD in cui è stata riscontrata un'alterazione non spiegata dei markers di danno epatico, 29 soggetti sono stati sottoposti a determinazioni ripetute nel tempo - da 1 a 9 determinazioni (media 3.1) in un intervallo compreso fra 2 e 150 mesi (media 43.6 mesi). I risultati del follow-up sono riportati in tabella 4. In sintesi, 20 pazienti (69%) hanno presentato un quadro di alterazione persistente degli enzimi epatici, con livelli aumentati in tutte le misurazioni effettuate (numero medio di misurazioni: 2.9) dopo un periodo di osservazione medio di 34 mesi. Quattro pazienti (14%) hanno mostrato un andamento fluttuante dei dosaggi enzimatici, con alcune misurazioni alterate e altre risultanti nei limiti della norma. Nei restanti 5 pazienti (17%) è stata osservata una remissione delle alterazioni degli enzimi dopo un tempo di osservazione medio di 19.2 mesi. In nessun caso è stata osservata una chiara tendenza alla progressione dell'elevazione dei markers di danno epatocellulare né un'alterazione clinicamente significativa della funzione epatica.

Discussione

Il presente studio ha dimostrato l'elevata prevalenza di alterazione di alcuni markers di danno epatocellulare, non spiegata da altre cause note di danno epatico, in un'ampia casistica di pazienti affetti da MYH9-RD: più della metà dei soggetti analizzati, infatti, presentava incremento di AST e/o ALT associato o meno ad elevazione di GGT. Tale frequenza è risultata significativamente superiore a quella osservata nel corso di un ampio studio di popolazione condotto fra i residenti di un'area della Sardegna centro orientale e in due casistiche di pazienti con piastrinopenia cronica derivante da cause diverse dalle mutazioni di MYH9. In particolare, la probabilità di presentare alterazione degli enzimi epatici, misurata attraverso il calcolo delle OR, è risultata da 8.2 a 24.7 volte superiore nei pazienti con MYH9-RD rispetto alle popolazioni di controllo; quando le OR sono state aggiustate per età e genere, tale probabilità è risultata ancora maggiore, da 8.5 a 41.6 volte superiore. Gli ulteriori approfondimenti diagnostici eseguiti sui pazienti con MYH9-RD e markers alterati non hanno dimostrato cause associate di danno epatico in nessuno dei casi studiati. Infine, l'osservazione di un sottogruppo di pazienti per un periodo compreso tra 2 e 150 mesi non ha dimostrato una tendenza all'evoluzione in senso peggiorativo, bensì di sostanziale stabilità, delle alterazioni epatiche. Questi dati indicano che il danno epatico è una conseguenza diretta delle mutazioni di MYH9 e rappresenta quindi una caratteristica clinica sinora mai riconosciuta del quadro della MYH9-RD. Le alterazioni epatiche appaiono addirittura più frequenti rispetto ad altre manifestazioni cliniche riconosciute della malattia, quali la nefropatia proteinurica e la cataratta presenile [2, 6]. Il fenotipo epatico appare caratterizzato da un'elevazione di AST e/o ALT, presente in pressoché tutti i pazienti, cui si associa solo in alcuni casi elevazione di GGT. Tale quadro biumorale depone per un danno primariamente o prevalentemente epatocellulare, piuttosto che per una alterazione di matrice colestatica.

La ricerca di correlazioni genotipo-fenotipo per le alterazioni epatiche, diversamente da quanto recentemente dimostrato per altre manifestazioni extra-ematologiche della malattia [2], ha dato esito negativo: la frequenza e la gravità di queste alterazioni erano infatti simili nei pazienti con mutazioni che coinvolgevano il MD o il TD della NMMHC-IIA. Le anomalie epatiche non sono risultate correlate, infine, ad altre caratteristiche dei pazienti analizzati, quali l'età, il genere, la conta piastrinica o la presenza di altre manifestazioni cliniche extra-ematologiche della MYH9-RD.

Le alterazioni epatiche riscontrate nella casistica apparivano sostanzialmente stabili nel tempo e non hanno mostrato in nessun caso andamento ingravescente ed evoluzione verso l'insufficienza epatica: ciò suggerisce quindi che il fenotipo epatico conseguente alle mutazioni di *MYH9* non abbia un significato prognostico negativo in termini di danno d'organo. Questo contrasta con l'interessamento renale in corso di *MYH9*-RD, il quale, una volta insorto, progredisce rapidamente verso la perdita della funzione d'organo fino all'insufficienza renale terminale [2, 6].

Le conclusioni del presente studio hanno ricadute immediate sulla pratica clinica. Il medico che identifichi segni bioumorali persistenti di danno epatocellulare in un paziente con *MYH9*-RD dovrà infatti considerare, nel processo di diagnosi differenziale, che queste alterazioni possono essere inquadrare nell'ambito del disordine genetico. Qualora, a conclusione di una corretta procedura diagnostico-differenziale, non si identifichino cause alternative di danno epatico, alla luce dei dati attuali, il medico potrà rassicurare il paziente sul significato prognostico benigno di tali alterazioni. È un dato di fatto, tuttavia, che questi pazienti presentino segni subclinici di sofferenza epatocellulare: appare quindi ragionevole adottare, nella gestione dei pazienti con *MYH9*-RD, una quanto più possibile stretta limitazione dei fattori che possono indurre un ulteriore danno epatico.

I dati della letteratura indicano che la miosina non-muscolare II A ha un ruolo essenziale nella secrezione biliare. La NMMHC-IIA è una componente strutturale della rete dei microfilamenti del citoscheletro che circondano il canalicolo biliare e diversi studi identificano questo enzima come il motore molecolare per la contrazione del canalicolo biliare e, quindi, per la progressione della bile a questo livello [24, 26]. Un altro ambito funzionale della miosina IIA è stato individuato nel trasporto vescicolare tra il comparto citoplasmatico e la membrana plasmatica dell'epatocita e nella regolazione dell'espressione sulla membrana del polo biliare di proteine trasportatrici responsabili dei processi di secrezione biliare - come, ad esempio, la proteina detta Bile salt export pump [28]. I difetti geneticamente determinati di tali trasportatori causano differenti forme di colestasi intraepatica familiare [27]. Studi più recenti hanno identificato ulteriori ruoli per la miosina IIA nelle cellule epatocitarie, spesso connessi con le funzioni fisiologiche di base di queste cellule: la riorganizzazione spaziale degli epatociti durante il processo di rigenerazione epatocellulare [30], la fisiologica poliploidizzazione somatica nella vita postnatale [29] e la progressione del ciclo cellulare in risposta agli stimoli che agiscono come fattori di crescita [31-32]. Naturalmente, i dati del presente studio non consentono di formulare delle ipotesi sul meccanismo patogenetico del danno epatocellulare indotto dalle mutazioni di *MYH9*. Tuttavia, è interessante rilevare come una perdita di funzione della miosina IIA, quale quella determinata dalle mutazioni di *MYH9*, determini primariamente un quadro fenotipico suggestivo di un danno epatocellulare (lisi epatocellulare) in luogo di un disordine ad impronta colestatica.

In conclusione, il presente studio dimostra che il danno epatico è una caratteristica clinica, sinora mai identificata, del quadro sindromico della *MYH9*-RD: allo stato attuale l'insorgenza di danno epatico non sembra possedere un significato prognostico negativo in termini di funzione d'organo.

Tabelle e figure

Tabella 1. Principali caratteristiche demografiche delle casistiche studiate.

	N°	Maschi	Intervallo di età	Età media (DS)
Malattia <i>MYH9</i> -correlata	75	42.6%	1-87 anni	31.3 (19.9) anni
Altre piastrinopenie ereditarie	32	37.5%	8-74 anni	34.8 (19.4) anni
Piastrinopenia autoimmune	77	46.7%	4-88 anni	48.8 (24.8) anni
Studio Ogliastra	7257	45.4%	3-105 anni	43.2 (19.4) anni

Tabella 2. Prevalenza delle alterazioni dei markers di danno epatico nelle casistiche analizzate. I dati sono presentati come n° di pazienti con concentrazione alterata/n° totale di pazienti valutabili (%) (Abbreviazioni: ND= dato non disponibile).

	ALT	AST	ALT o AST	ALT e AST	GGT	ALT o AST o GGT
Malattia <i>MYH9</i> -correlata	35/75 (46.7%)	32/75 (42.7%)	38/75 (50.7%)	29/75 (38.7%)	17/63 (27.0%)	39/69 (56.5%)
Altre piastrinopenie ereditarie	3/31 (9.7%)	1/30 (3.3%)	3/32 (9.4%)	1/29 (3.5%)	0/26 (0%)	3/26 (11.5%)
Piastrinopenia autoimmune	5/77 (6.5%)	0/77 (0%)	5/77 (6.5%)	0/77 (0%)	4/71 (5.6%)	9/71 (12.7%)
Studio Ogliastra	320/7257 (4.4%)	212/7257 (2.9%)	393/7257 (5.4%)	139/7257 (1.9%)	ND	ND

Tabella 3. Risultati del confronto fra la prevalenza di alterazione dei markers di danno epatico registrata nei pazienti con Malattia *MYH9*-correlata e quella osservata in ciascuna delle tre popolazioni di controllo. I dati sono espressi come odds ratios (OR) con i relativi intervalli di confidenza al 95% (indicato in parentesi) (Abbreviazioni: ND= dato non disponibile; *= il calcolo dell'OR non è stato possibile dal momento che nessuno dei 77 pazienti con Piastrinopenia autoimmune analizzati presentava elevazione di AST).

OR vs	Piastrinopenia autoimmune	p	Altre piastrinopenie ereditarie	p	Studio Ogliastra	p
Alterazioni enzimatiche						
<i>ALT</i>	12.6 (4.4-43.8)	0.00001	8.2 (2.2-44.8)	0.0003	18.9 (11.5-31.0)	0.00001
<i>AST</i>	ND*	ND	21.6 (3.2-908.3)	0.0001	24.7 (14.8-40.8)	0.00001
<i>ALT o AST</i>	14.8 (5.1-51.3)	0.00001	9.9 (2.7-54.2)	0.0001	8.0 (4.9-12.9)	0.00001
<i>AST e ALT</i>	ND*	ND	17.7 (2.6-746.1)	0.0004	32.3 (18.9-54.0)	0.00001

Tabella 4. Risultati del follow-up di 29 pazienti con Malattia *MYH9*-correlata che presentavano alterazione dei markers di danno epatico.

Enzima	N° di pazienti con alterazione alla prima determinazione	N° di pazienti con alterazioni dopo ripetute misurazioni	N° di misurazioni alterate/N° totale di misurazioni	Intervallo medio tra le misurazioni ripetute (range)
<i>AST</i>	26	23 (88.5%)	86/115 (74.8%)	36.1 (2-150) mesi
<i>ALT</i>	24	17 (70.8%)	58/111 (52.2%)	37.8 (2-150) mesi
<i>GGT</i>	12	10 (83.3%)	34/78 (43.6%)	36.9 (5-120) mesi

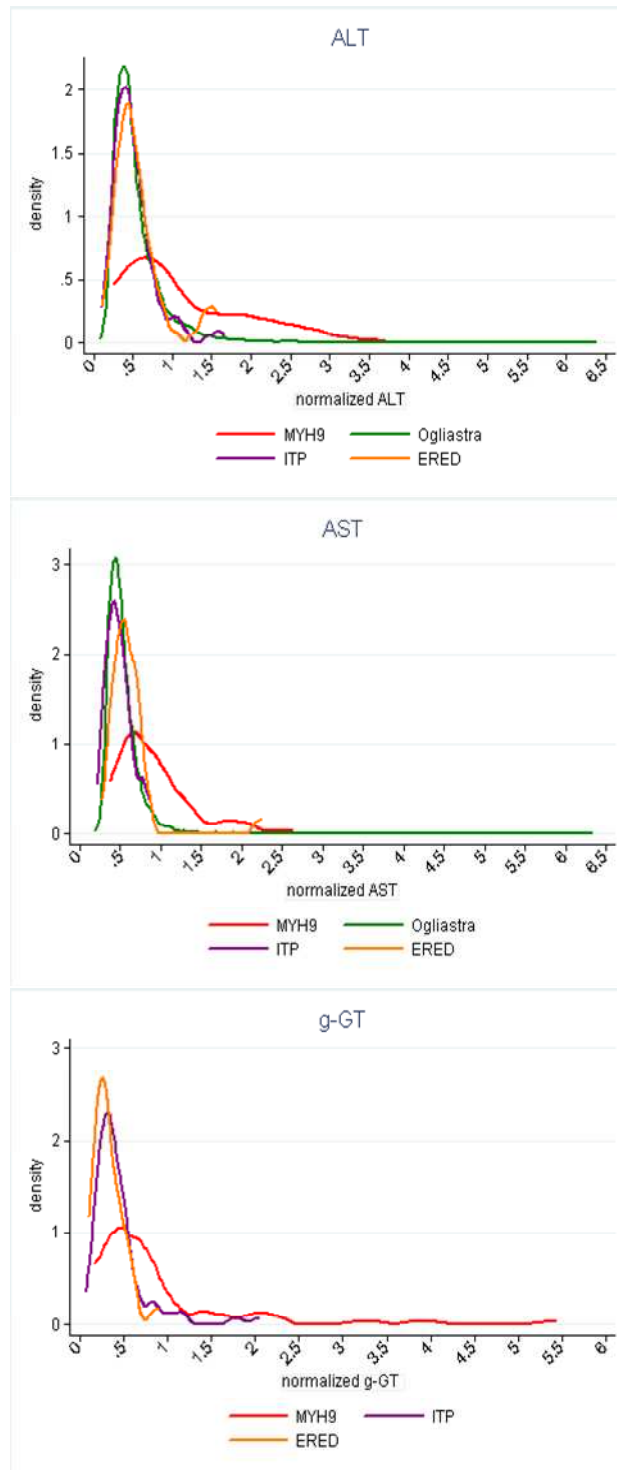


Figura 1. Curva di distribuzione dei livelli dei markers di danno epatico nelle diverse popolazioni dello studio. La figura indica la distribuzione dei livelli di ALT, AST e GGT nelle quattro casistiche analizzate (Abbreviazioni: MYH9= Malattia MYH9-correlata; ITP= Piastrinopenia autoimmune; Ogliastro= studio Ogliastro; ERED= piastrinopenie ereditarie diverse dalla Malattia MYH9-correlata). I livelli di ciascun enzima sono espressi come rapporto fra il valore riscontrato e il limite superiore del range di normalità del laboratorio in cui è stata eseguita l'analisi. Mentre in ciascuna delle popolazioni di controllo è stata osservata una curva di tipo gaussiano, il gruppo di pazienti con Malattia MYH9-correlata presentava una curva appiattita, spostata verso destra, con una tendenza alla distribuzione bimodale.

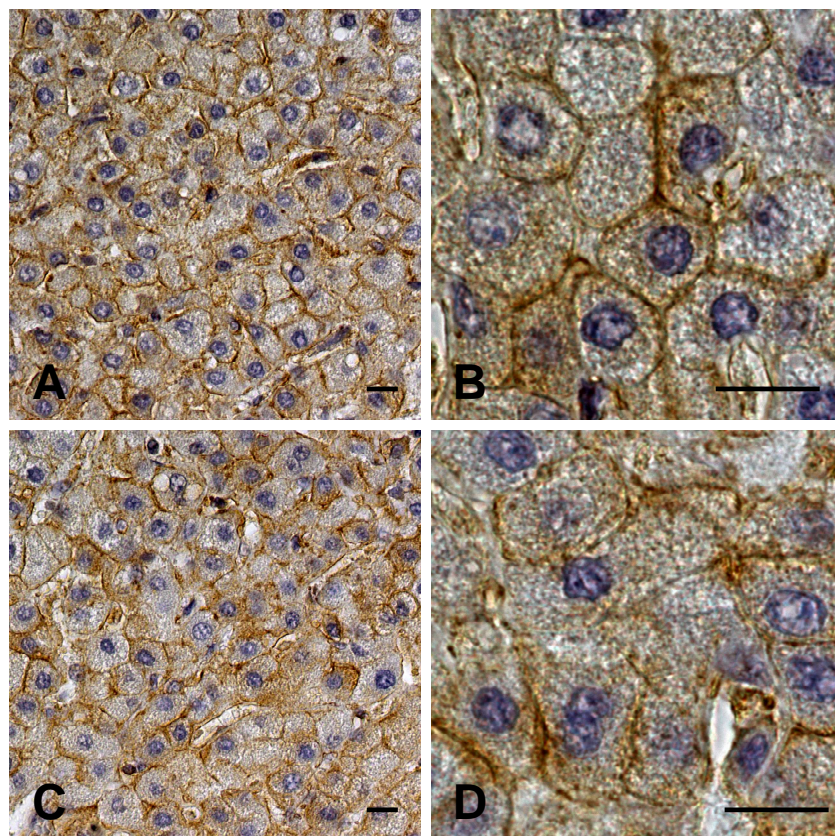


Figura 2. Localizzazione della NMMHC-IIA nel parenchima epatico di un paziente con Malattia MYH9-correlata. La biopsia epatica è stata effettuata in un paziente con Malattia MYH9-correlata causata da mutazione p.T1155A della NMMHC-IIA in seguito al riscontro di elevazione di AST, ALT e GGT persistente per un periodo di 6 anni. (A, B): la NMMHC-IIA (segnale marrone, immunistochemica con metodo avidina-biotina-perossidasi) presentava localizzazione citoplasmatica diffusa a livello degli epatociti, particolarmente concentrata a livello della membrana plasmatica, con rinforzo nella zona prospiciente i canalicoli biliari. Tale distribuzione non presentava differenze rispetto a quella osservata nel campione di parenchima epatico utilizzato come controllo (mostrata in C,D). I preparati sono stati controcolorati in ematossilina di Meyer. Le barre corrispondono a 10 micron.

Bibliografia

1. Seri M, Pecci A, Di Bari F et al. MYH9-related disease: May-Hegglin anomaly, Sebastian syndrome, Fechtner syndrome, and Epstein syndrome are not distinct entities but represent a variable expression of a single illness. *Medicine (Baltimore)* 2003;82:203-215.
2. Pecci A, Panza E, Pujol-Moix N et al. Position of nonmuscle myosin heavy chain IIA (NMMHC-IIA) mutations predicts the natural history of MYH9-related disease. *Hum Mutat* 2008;29:409-417.
3. Kelley MJ, Jawien W, Ortel TL et al. Mutation of MYH9, encoding non-muscle myosin heavy chain A, in May-Hegglin anomaly. *Nat Genet* 2000;26:106-108.
4. Seri M, Cusano R, Gangarossa S et al. Mutations in MYH9 result in the May-Hegglin anomaly, and Fechtner and Sebastian syndromes. The May-Hegglin/Fechtner Syndrome Consortium. *Nat Genet* 2000;26:103-105.
5. Heath KE, Campos-Barros A, Toren A et al. Nonmuscle myosin heavy chain IIA mutations define a spectrum of autosomal dominant macrothrombocytopenias: May-Hegglin Anomaly and Fechtner, Sebastian, Epstein and Alport-like syndromes. *Am J Hum Genet* 2001;69:1033-1045.
6. Balduini CL, Pecci A, Savoia A. Recent advances in the understanding and management of MYH9-related inherited thrombocytopenias. *Br J Haematol* 2011;154:161-174.

7. Kunishima S, Matsushita T, Kojima T et al. Immunofluorescence analysis of neutrophil nonmuscle myosin heavy chain-A in MYH9 disorders: association of subcellular localization with MYH9 mutations. *Lab Invest* 2003;83:115-122.
8. Burt RA, Joseph JE, Milliken S et al. Description of a novel mutation leading to MYH9-related disease. *Thromb Res* 2008;122:861-863.
9. Savoia A, De Rocco D, Panza E et al. Heavy chain myosin 9-related disease (MYH9-RD): neutrophil inclusions of myosin-9 as a pathognomonic sign of the disorder. *Thromb Haemost* 2010;103:826-832.
10. Sellers JR. Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta* 2000;1496:3-22.
11. Jacobelli J, Chmura SA, Buxton DB et al. A single class II myosin modulates T cell motility and stopping, but not synapse formation. *Nat Immunol* 2004;5:531-538.
12. D'Apolito M, Guarnieri V, Boncristiano M et al. Cloning of the murine non-muscle myosin heavy chain IIA gene ortholog of human MYH9 responsible for May-Hegglin, Sebastian, Fechtner, and Epstein syndromes. *Gene* 2002;286:215-222.
13. Gershoni-Baruch R, Baruch Y, Viener A et al. Fechtner syndrome: clinical and genetic aspects. *Am J Med Genet* 1988;31:357-367.
14. Rocca B, Laghi F, Zini G et al. Fechtner syndrome: report of a third family and literature review. *Br J Haematol* 1993;85:423-426.
15. Toren A, Amariglio N, Rozenfeld-Granot G et al. Genetic linkage of autosomal-dominant Alport syndrome with leukocyte inclusions and macrothrombocytopenia (Fechtner syndrome) to chromosome 22q11-13. *Am J Hum Genet* 1999;65:1711-1717.
16. Biino G, Balduini C, Casula L et al. Analysis of 12517 inhabitants of a Sardinian geographic isolate reveals that propensity to develop mild thrombocytopenia during ageing and to present mild, transient thrombocytosis in youth are new genetic traits. *Haematologica* 2011;96:96-101.
17. Pecci A, Noris P, Invernizzi R et al. Immunocytochemistry for the heavy chain of the nonmuscle myosin IIA as a diagnostic tool for MYH9-related disorders. *Br J Haematol* 2002;117:164-167.
18. Angius A, Melis PM, Morelli L et al. Archival, demographic and genetic studies define a Sardinian sub-isolate as a suitable model for mapping complex traits. *Hum Genet* 2001;109:198-209.
19. Savoia A, Balduini CL, Savino M et al. Autosomal dominant macrothrombocytopenia in Italy is most frequently a type of heterozygous Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 2001;97:1330-1335.
20. Noris P, Perrotta S, Seri M et al. Mutations in ANKRD26 are responsible for a frequent form of inherited thrombocytopenia: analysis of 78 patients from 21 families. *Blood* 2011;117:6673-6680.
21. Gresele P, Falcinelli E, Giannini S et al. Dominant inheritance of a novel integrin beta3 mutation associated with a hereditary macrothrombocytopenia and platelet dysfunction in two Italian families. *Haematologica* 2009;94:663-669.
22. Balduini CL; Cattaneo M, Fabris F et al. Inherited thrombocytopenias: a proposed diagnostic algorithm from the Italian Gruppo di Studio delle Piastrine. *Haematologica* 2003;88:582-592.
23. Noris P, Pecci A, Di Bari F et al. Application of a diagnostic algorithm for inherited thrombocytopenias to 46 consecutive patients. *Haematologica* 2004;89:1219-1225.
24. Tsukada N, Ackerley CA, Phillips MJ. The structure and organization of the bile canalicular cytoskeleton with special reference to actin and actin-binding proteins. *Hepatology* 1995;21:1106-1113.
25. Tsukada N, Azuma T, Phillips MJ. Isolation of the bile canalicular actin-myosin II motor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:6919-6923.
26. Watanabe S, Miyazaki A, Hirose M et al. Myosin in hepatocytes is essential for bile canalicular contraction. *Liver* 1991;11:185-189.
27. Subramanian VS, Marchant JS, Said HM. Molecular determinants dictating cell surface expression of the human sodium-dependent vitamin C transporter-2 in human liver cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;298:G267-G274.
28. Chan W, Calderon G, Swift AL et al. Myosin II regulatory light chain is required for trafficking of bile salt export protein to the apical membrane in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 2005;280:23741-23747.
29. Margall-Ducos G, Celton-Morizur S, Couton D et al. Liver tetraploidization is controlled by a new process of incomplete cytokinesis. *J Cell Sci* 2007;120:3633-3639.
30. Herrema H, Czajkowska D, Théard D et al. Rho kinase, myosin-II, and p42/44 MAPK control extracellular matrix-mediated apical bile canalicular lumen morphogenesis in HepG2 cells. *Mol Biol Cell* 2006;17:3291-3303.
31. Bhadriraju K, Hansen LK. Extracellular matrix-dependent myosin dynamics during G1-S phase cell cycle progression in hepatocytes. *Exp Cell Res* 2004;300:259-271.
32. Török N, Urrutia R, Nakamura T et al. Upregulation of molecular motor-encoding genes during hepatocyte growth factor- and epidermal growth factor-induced cell motility. *J Cell Physiol* 1996;167:422-433.