

Parametri biochimici per il monitoraggio dell'eritropoiesi

G. Lippi

*Dipartimento di Scienze Morfologico-Biomediche, Università degli Studi,
Ospedale Policlinico, Verona*

Introduzione

Il sangue è un liquido viscoso composto da una frazione cellulare (globuli rossi, globuli bianchi e piastrine) dispersa in un fluido, denominato plasma. Poiché la massima parte della componente cellulare del sangue è rappresentata da globuli rossi, è evidente che le proprietà fisiche del sangue sono largamente sostenute dalla "serie rossa". La funzione prevalente dei globuli rossi è il trasporto dell'emoglobina, la quale, a sua volta, è il principale carrier dell'ossigeno dai polmoni ai tessuti periferici. In assenza d'ossigeno, molecola impiegata per produrre substrati energetici (ATP, fosfocreatina) mediante metabolismo aerobico e sfruttando reazioni enzimatiche sequenziali appartenenti a glicolisi, ciclo di Krebs e fosforilazione ossidativa, i tessuti organici sono costretti ad un metabolismo alternativo, globalmente meno efficace, denominato metabolismo anaerobico e culminante nella trasformazione di piruvato in acido lattico. La maggior parte dell'acido lattico generato in carenza relativa d'ossigeno è efficacemente metabolizzata ed eliminata; ciononostante, una quota prossima al 20% evade i normali processi di clearance e s'accumula nel plasma e nei tessuti di produzione, causando la caratteristica sensazione di dolore, fatica e spossatezza.

L'emoglobina entro i globuli rossi consente il trasporto di quantità d'ossigeno da 30 a 100 volte superiori rispetto alla controparte fisiologicamente disciolta nel plasma. Il 97% dell'ossigeno presente nel sangue è legato all'emoglobina; solo il rimanente 3% è disciolto nella fase acquosa del plasma. Gli eritrociti hanno la capacità di concentrare molecole d'emoglobina fino ad un massimo di circa 34 g per 0.1 litri di emazie, concentrazione quasi mai superata, poiché essa rappresenta il limite concreto al meccanismo di formazione. Sommariamente, il volume percentuale di sangue costituito da cellule (emazie in preponderanza) è denominato ematocrito. Normalmente il valore di ematocrito è abbastanza stabile; tuttavia esso può subire variazioni considerevoli per effetto di molteplici fattori fisiologici o patologici. Tanto maggiore è il valore dell'ematocri-

to, tanto più importante è l'attrito fra strati adiacenti di sangue; questa forma d'attrito è la principale responsabile della viscosità ematica.

La massa eritrocitaria totale è rigorosamente regolata, al fine di garantire un numero d'emazie adeguato a fornire sufficiente apporto d'ossigeno, senza rappresentare ostacolo alla circolazione. L'eritropoietina (Epo) è il principale ormone effetore sul midollo emopoietico e sulla serie rossa. L'epo, prodotto principalmente del rene (in adulti con ipossia severa epatociti e macrofagi del tessuto osseo possono contribuire al pool circolante), esplica la sua azione interagendo con specifici recettori cellulari. L'epo è una glicoproteina acida composta da 165 aminoacidi, con peso molecolare di 34 kDa e contenuto carboidratico prossimo al 40%. La concentrazione plasmatica di epo è finemente regolata dal bilancio tra domanda ed apporto d'ossigeno; l'ipossia ne stimola sintesi e secrezione dal rene. L'incremento della concentrazione ematica di epo determina l'aumento della massa eritrocitaria che, a sua volta, ne inibisce sintesi e rilascio mediante un complesso ciclo regolatorio. L'azione dell'epo è altamente selettiva nei confronti dei progenitori eritroidi e si esplica mediante l'interazione con recettori cellulari specifici. La causa più comune di difettosa sintesi di epo è l'insufficienza renale cronica. Iperproduzione di epo si osserva frequentemente in corso d'ipossia tissutale, in gravidanza, in presenza di alcune patologie dell'emoglobina e, più raramente, nell'insufficienza respiratoria. Nei soggetti normali esiste una relazione inversa tra la concentrazione plasmatica di epo, ematocrito ed emoglobina. Nei pazienti in terapia con epo si osserva un rilascio di reticolociti, i precursori dei globuli rossi, già 24 ore dall'inizio della terapia; l'incremento culmina dopo 4-6 giorni e, senza ulteriori somministrazioni, la normalizzazione dei conteggi avviene dopo 8-10 giorni. L'aumento del rilascio di reticolociti può essere d'entità tale da raddoppiare la quota circolante. Altri importanti meccanismi regolatori il metabolismo eritrocitario sono la disponibilità di ferro, vitamina B12 e acido folico. Il ferro è essenziale per la sintesi del gruppo eme, sito attivo legante l'ossigeno nella molecola di

emoglobina, mentre folati e vitamina B12 sono essenziali per sintesi e progressione maturativa dei precursori eritroidi.

Il monitoraggio dell'eritropoiesi

Il monitoraggio della funzione eritropoietica rappresenta un aspetto cardine in medicina Generale e di Laboratorio. Le patologie riconducibili ad alterazioni della serie rossa si suddividono sostanzialmente in anemie o policitemie. Le prime, contraddistinte da diminuzione della concentrazione emoglobinica del sangue, possono essere classificate sulla base di criteri diversi: morfologia (anemie normocitiche, macrocitiche, microcitiche), concentrazione emoglobinica (anemie normocromiche, ipercromiche ipocromiche), concentrazione emoglobinica media corpuscolare (anemie ipocromiche microcitiche, normocromiche normocitiche, ipercromiche macrocitiche), patogenesi (anemie da deficit di produzione, da eccessivo consumo), anatomo-funzionale (anemie normogenerative, iporigenerative, iperrigenerative), biochimica (anemie iposideremiche, ipersideremiche). Per semplicità, l'anemia può essere comunque classificata sulla base di 1) diminuita produzione di globuli rossi, 2) aumentata distruzione o 3) perdita. Le policitemie, contraddistinte da una concentrazione in eccesso d'emoglobina, possono essere arbitrariamente suddivise in base alla causa. La diagnosi differenziale delle policitemie è importante. Innanzi tutto, devono essere escluse forme di policitemia apparente (senza aumento della massa eritrocitaria), e secondarie. L'indagine clinica consente solitamente di individuare forme apparenti e di correggerle (sono solitamente sostenute da obesità, ingente perdita di liquidi, fumo, alcool, ipertensione, feocromocitoma). Le forme secondarie devono essere differenziate identificando la presenza di condizioni cliniche associate. Esse si suddividono generalmente in 1) eritrocitosi congenite o familiari primitive, sostenute da alterazioni strutturali nella sequenza del recettore dell'eritropoietina, 2) policitemie secondarie a ridotta ossigenazione, per emoglobinopatie congenite o acquisite, malattie polmonari ipossiemiche, cardiopatie cianogene, permanenza ad alta quota, 3) policitemie secondarie ad abnorme secrezione di eritropoietina, solitamente associate a malattie neoplastiche quali carcinomi renali e polmonari, emangioblastomi cerebellare, leiomiomi uterini o secondarie ad insufficienza renale e 4) policitemie idiopatiche, genere che racchiude tutte le forme in cui sono assenti i caratteristici criteri per la diagnosi di policitemia vera o secondaria.

Alla luce del fatto che la determinazione di ematocrito ed emoglobina rappresentano stima approssimativa ed incompleta per il monitoraggio dell'eritropoiesi, è stato recentemente proposto d'integrare tali misurazioni con altri parametri, ritenuti più indicativi. Tra essi, i più significativi e promettenti

appaiono: volume corpuscolare medio (MCV), concentrazione media di emoglobina corpuscolare (MCHC), contenuto corpuscolare medio di emoglobina (MCH), Zn-protoporfirina eritrocitaria, sideremia, ferritinemia, transferrinemia, TIBC, epo, recettore solubile della transferrina (sTrf), percentuale di emazie aumentate di volume, conteggio reticolocitario e relativi indici. Tra i vari parametri proposti, l'integrazione delle misurazioni di ematocrito eritrocitario, reticolocitario (Chr), epo serica, rsTrf e percentuale dei globuli rossi di volume aumentato rappresentano gli indici più affidabili. L'aggiunta del calcolo del rapporto tra concentrazione del recettore solubile della transferrina e ferritina o della determinazione dell'mRNA della globina beta consentirebbe di accrescere ulteriormente la sensibilità diagnostica.

La *ferritina* è una glicoproteina formata da 24 subunità che circoscrivono un sito che può ospitare fino a 4000 atomi di ferro. Le ferritine mammarie constano di una miscela di isoferritine, derivate dall'unione di due subunità (H ed L) in diverso rapporto. In genere le isoferritine in cui prevalgono subunità L hanno elevato contenuto di ferro e predominano nei tessuti deputati a conservazione e deposito a lungo termine (fegato, milza); le isoferritine ricche in subunità H hanno un contenuto di metallo meno rilevante e prevalgono nei tessuti in cui si manifestano repentini scambi di ferro (tessuto eritroide). Le caratteristiche delle due subunità giustificano la diversa funzionalità. Il ruolo complementare delle due catene, rapida ossidazione del ferro da parte della H ed efficace ritenzione da parte della L, rendono pertanto ragione della eterogenea presenza di eteropolimeri nelle ferritine estratte da tessuti. Nei soggetti normali la concentrazione di ferritina serica varia da 10 a 300 mg/L e riflette modificazioni dell'equilibrio del ferro corporeo dovute principalmente a sesso, età e dieta. In condizioni caratterizzate da carenze di ferro, la concentrazione plasmatica della ferritinemia può scendere sotto i 10 mg/L. Bassi livelli di ferritina riflettono generalmente una deplezione di riserve, senza tuttavia inquadrare la causa.

Il *recettore solubile della transferrina* (sTfr) è una glicoproteina integrale di membrana di circa 190 kDa che consta di due identiche subunità, ciascuna delle quali è in grado di legare all'estremità carbossi-terminale una molecola di transferrina carica di ferro. La proteolisi genera una forma solubile. Nel plasma sTfr è presente in forma di complesso con la transferrina e la sua concentrazione appare strettamente legata a quella del recettore di membrana. L'*uptake* cellulare di ferro è finemente regolato dall'espressione di Tfr; quando le riserve di ferro sono esaurite o in via d'esaurimento (in genere per concentrazioni di ferritina <12 mg/L) l'espressione di Tfr aumenta, indicando e rivelando una sorta di "fame organica" di ferro. Infatti, poiché dall'80 al 95% delle molecole di Tfr è espresso su cellule eritropoietiche, la concentrazione di Tfr (e quindi anche

quella della forma solubile) riflette la necessità di ferro da parte di tali cellule. In presenza di carenza marziale, la concentrazione di sTfr nel siero aumenta ancor prima che diminuisca significativamente quella dell'emoglobina. Pertanto, mentre la concentrazione di sTfr appare valido indice dello stato marziale funzionale, la ferritina ne riflette più accuratamente le riserve organiche. Una valutazione accurata dello stato del ferro si può ottenere determinando il rapporto tra sTfr e ferritina. Poiché a differenza della ferritina la concentrazione di sTfr non appare influenzata da flogosi, epatopatie o neoplasie maligne, è possibile distinguere fra anemie da patologie croniche ed anemie da carenza marziale. Valori elevati di sTfr si riscontrano inoltre in corso di policitemia, anemia emolitica, talassemia, sferocitosi, anemia falciforme, anemia megaloblastica, sindrome mielodisplastica e deficit di vitamina B12. Alte concentrazioni di sTfr compaiono durante la gravidanza, in concomitante presenza di deficit di ferro funzionale. Il dosaggio della concentrazione di sTfr e la valutazione del rapporto sTfr/ferritina consentono infine un accurato monitoraggio della terapia con epo ricombinante (rHuEpo), trovando valida applicazione in medicina sportiva per lo screening del doping ematico. Nel novembre del 2001 la Commissione Medica del Comitato Olimpico Internazionale (CIO), ha emanato linee guida comprendenti i criteri definitivi per l'identificazione d'assunzione impropria di forme ricombinanti o artificiali di epo. In sintesi, l'algoritmo diagnostico prescelto, definisce che (1) i metodi di scelta per l'identificazione di epo devono essere considerati il test diretto su urine ed il test indiretto su sangue e che (2) i due test devono essere accoppiati (incrociati) e presentare entrambi il medesimo esito (entrambi positivi o negativi). Il protocollo su sangue è basato sull'integrazione d'alterazioni molto suggestive d'alcuni parametri ematologici. I parametri compresi nel protocollo, noto anche come "Protocollo Australiano", comprendono ematocrito eritrocitario (Ht) e reticolocitario, percentuale dei globuli rossi macrocitici (%Macro), epo plasmatica ed sTfr. I due algoritmi diagnostici sviluppati sull'integrazione dei risultati del dosaggio dei suddetti parametri, definiti "ON-model score" (identificazione d'uso corrente di rHuEpo) e "OFF-model score (identificazione d'uso

di rHuEpo nelle settimane precedenti il prelievo), hanno rivelato specificità e sensibilità molto prossime al 100%, consentendo un limite di riconoscimento presuntivamente estensibile fino a 4 settimane dall'ultima assunzione impropria di rHuEpo.

Bibliografia

- Wick M, Pinggera W, Lehmann P, eds. Iron metabolism, diagnosis and therapy of anemias. 4a ed. Vienna/New York: Springer Verlag, 1999.
- Lippi G. Medicina di laboratorio e doping. *Biochim Clin* 1999;23:131-41.
- Lippi G, Franchini M. The new frontiers of blood doping. *Recenti Progr Med* 2002; 93:1-8.
- Lippi G, Guidi G. Laboratory screening for erythropoietin abuse in sport: an emerging challenge. *Clin Chem Lab Med* 2000;38: 13-9.
- Parisotto R, Wu M, Ashenden MJ, et al. Detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes utilizing markers of altered erythropoiesis. *Haematologica* 2001;86:128-37.
- Ferguson BJ, Skikne BS, Simpson KM, et al. Serum transferrin receptor distinguishes the anemia of chronic diseases from iron deficiency anemia. *J Lab Clin Med* 1992; 19:385-90.
- Punnonen K, Irjala K, Rajamäki A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 1997;89:1052-7.
- Lippi G, Guidi G. Aggiornamenti in tema di medicina di laboratorio e doping. La nuova Campagna del CO-NI "Io non rischio la salute!". *Biochim Clin* 2000; 24:87-95.
- Lippi G, Franchini M, Guidi G. Hematocrit measurement and antidoping policies. *Clin Lab Haematol* 2002;24:65-6.
- Magnani M, Corsi D, Bianchi M, et al. Identification of blood erythroid markers useful in revealing erythropoietin abuse in athletes. *Blood Cells Mol Dis* 2001;27: 559-71.
- Lippi G. Linee guida per l'identificazione del doping con eritropoietina umana ricombinante. *Biochim Clin* 2001;25:425-9.
- Lippi G. Emocitometria e medicina sportiva. Il laboratorio di ematologia. Abano Terme (PD), 10-11 Aprile 2002.
- Lippi G. Il profilo ematologico nell'atleta: esiste una normalità? Attività sportiva, uso di farmaci e doping. Le reali necessità dell'atleta ed i limiti posti dalla nuova legge sul doping. Verona, 15 Giugno 2002.