



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di SCIENZE CHIRURGICHE E GASTROENTEROLOGICHE
“PG CEVESE”

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: BIOLOGIA E MEDICINA
DELLA RIGENERAZIONE

INDIRIZZO: Scienze Epatologiche e Gastroenterologiche

CICLO: XXI

**PREDIZIONE DEL SOVRACCARICO MARZIALE MEDIANTE UNA NUOVA
TECNICA DI SPETTROMETRIA DI MASSA PER IL DOSAGGIO
DELL’EPCIDINA PLASMATICA**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Pierpaolo Parnigotto

Supervisore: Ch.mo Prof. Annarosa Floreani

Dottorando: Dott. Erik Rosa Rizzotto

DATA CONSEGNA TESI

27 gennaio 2009

INDICE

Abstract	5
Introduzione	9
Il metabolismo del ferro	9
Rilevanza clinica della proteine del metabolismo del ferro	12
Transferrina	12
Ferritina e recettore solubile della transferrina	13
Il sovraccarico di ferro nell'organismo: l'emocromatosi ereditaria	15
L'epcidina	16
Disregolazione dell'epcidina	21
Il dosaggio dell'epcidina	23
Obiettivo della tesi	26
Materiali e Metodi	27
Il campione	27
Analisi SELDI-MS	28
Analisi statistica	31
Risultati	33
Discussione	42
Conclusioni	45
Bibliografia	I

ABSTRACT

INGLESE

PREDICTION OF IRON OVERLOAD WITH A NEW MASS SPECTROMETRY METHOD FOR DETECTION OF HEPCIDIN IN PLASMA

Background. Hepcidin (Hep) has emerged as the primary regulator of iron homeostasis. Previous studies on assessing urinary levels of Hep are of limited availability. We have developed a new method for quantifying Hep in plasma by SELDI-TOF mass spectrometry, using the 25-AA peptide as reference standard.

Aims: 1) to assess the performance of this new method in different conditions of iron metabolism disorders; 2) to assess the diagnostic validity of non invasive serum markers in identifying iron overload.

Methods: the following groups of subjects were enrolled into the study: 1. type I hemochromatosis (HE)(n=10), NAFLD (n=17), chronic hepatitis C (n=10), healthy controls – previously enrolled in a general population epidemiological study - with normal ultrasound, normal LFTs, alcohol assumption <20 g ethanol/day, and negative for C282 mutations (n=155). The following parameters were assayed in each case: plasma Hep, C282Y and H63D mutations of the HFE gene by (Taqman chemistry); serum iron, ferritin (SF), transferrin saturation (TfSat), transaminases, GGT, glucose, insulin, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides.

Results: Plasma Hep levels were significantly higher in HCV+ (26.3 ± 7.2 nmol/L) pts compared to controls (12.3 ± 1.0)(one-way ANOVA: $F=3.2$, $p<0.05$), and were positively correlated with SF ($r=0.451$, $p<0.001$). H63D heterozygous subjects revealed

a pattern of iron overload (significantly higher serum iron, SF, TfSat, and lower Hep/SF ratio) compared to H63D wild type subjects. By analysing data with the Biomarker Pattern 5.0.2. Software, in order to identify the most significant discriminant markers between HE and controls, we obtained a four-terminal node algorithm which included as main splitters Hep/SF ratio, glucose and iron. These variables allowed a correct diagnosis of HE with a 100% sensitivity, 98.6% specificity and AUROC=0.993.

Conclusions: The new plasma Hep mass spectrometry method yields accurate measurements which reflect pathologic and genetic influences; simple non invasive markers (Hep/SF ratio, glucose and iron) can predict the presence of HE.

**PREDIZIONE DEL SOVRACCARICO MARZIALE MEDIANTE UNA NUOVA
TECNICA DI SPETTROMETRIA DI MASSA PER IL DOSAGGIO
DELL'EPCIDINA PLASMATICA**

Introduzione. L'Epcidina (Hep) si ritiene essere il principale regolatore dell'omeostasi del ferro. Precedenti studi sul dosaggio urinario dell'Hep sono limitati. Abbiamo sviluppato un nuovo metodo per quantificare Hep nel plasma attraverso la spettrometria di massa SELDI-TOF, utilizzando come standard di riferimento il peptide di 25-AA.

Obiettivi. 1) valutare la performance di questa nuova metodica in diverse condizioni di alterazione del metabolismo del ferro; 2) valutare la validità diagnostica di un marker sierico non invasivo per identificare il sovraccarico di ferro.

Metodi. I seguenti gruppi di soggetti sono stati arruolati nello studio: 1. Emocromatosi di tipo I (HE) (n=10), NAFLD (n=17), epatite C cronica (n=10), controlli sani – precedentemente reclutati in uno studio epidemiologico sulla popolazione generale – con ecografia epatica non patologica, funzionalità epatica normale, introito alcolico <20 g etanolo/die, e negativi per la mutazione C282 (n=155). I seguenti parametri sono stati saggiati in ciascun caso: Hep plasmatica, mutazioni C282Y e H63D del gene HFE attraverso sonde Taqman; ferro sierico, ferritina (SF), saturazione della transferrina (TfSat), transaminasi, GGT, glucosio, insulina, colesterolo totale, colesterolo HDL, colesterolo LDL, trigliceridi.

Risultati. I livelli plasmatici di Hep sono risultati significativamente più elevati nei soggetti HCV+ (26.3 ± 7.2 nmol/L) rispetto ai controlli sani (12.3 ± 1.0) (one-way ANOVA: $F=3.2$, $p<0.05$), e sono risultati positivamente correlati con SF ($r=0.451$, $p<0.001$). I soggetti eterozigoti per H63D hanno dimostrato un pattern di sovraccarico

di ferro (livelli significativamente più elevati di ferro sierico, SF, TfSat, e un più basso rapporto Hep/SF) rispetto ai soggetti H63D-wild type. Dall'analisi dei dati con il Software Biomarker Pattern 5.0.2., per identificare il marker discriminante più significativo tra HE e i controlli, abbiamo ottenuto un algoritmo a 4 nodi che include come splitter principali il rapporto Hep/SF, il glucosio ed il ferro. Queste variabili sono sufficienti per diagnosticare correttamente HE con il 100% sensibilità, il 98.6% di specificità e AUROC=0.993.

Conclusioni. La nuova applicazione della spettrometria di massa per dosare i livelli di Hep plasmatici fornisce misure accurate che rilevano basi patologiche e genetiche; semplici marker non invasivi (Hep/SF, glucosio e ferro) possono predire la presenza di HE.

INTRODUZIONE

Il metabolismo del ferro

Il ferro è un elemento essenziale per moltissimi processi metabolici, ma si caratterizza anche per presentare effetti potenzialmente nocivi per il metabolismo ossidativo^{1 2}. Per questo rappresenta un paradosso per le cellule viventi.

L'organismo pertanto è impegnato da un lato a mantenere la concentrazione di ferro libero ai livelli più bassi possibili, e dall'altro a garantire la quota di ferro necessaria alla sintesi delle emoproteine e delle altre molecole contenenti ferro³, combinando la quota di ferro proveniente dagli alimenti, con il ferro distribuito nei tessuti e con quello eliminato quotidianamente (Figura 1). Questo equilibrio è mantenuto grazie alla presenza di meccanismi estremamente sofisticati che regolano l'omeostasi del ferro a diversi livelli⁴.

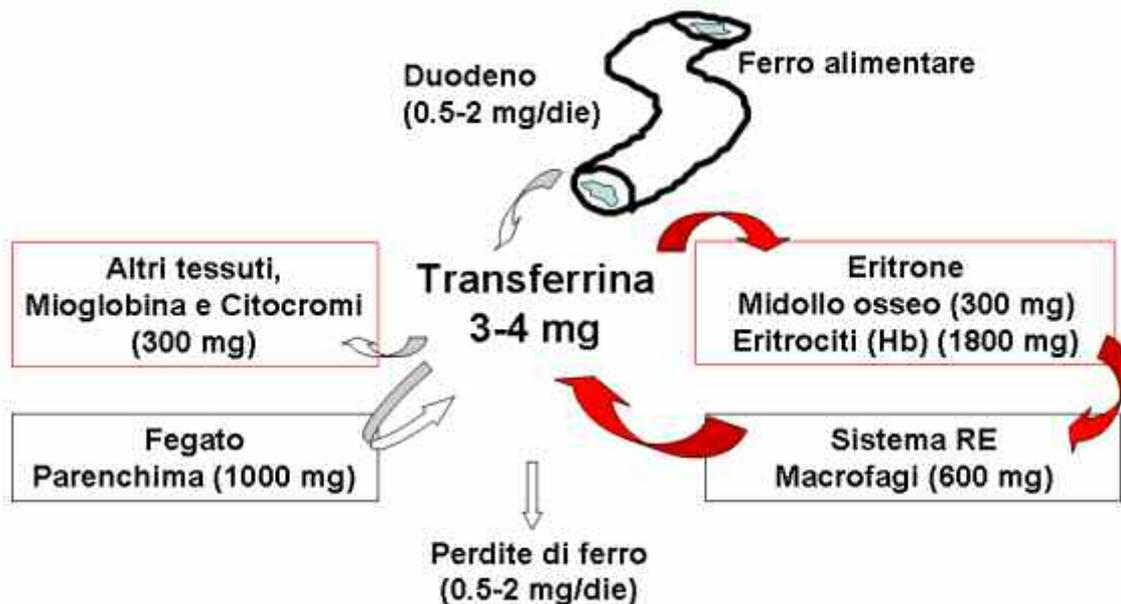


Figura 1. Distribuzione del ferro nell'uomo adulto

Vi sono tre sono proteine fondamentali che agiscono per rendere il ferro rapidamente disponibile per il metabolismo cellulare: la transferrina (Tf), il recettore della transferrina (TfR) e la ferritina^{4 5}.

Il ferro assorbito o rilasciato dai macrofagi, viene trasportato alle sedi di utilizzo dalla transferrina. La sintesi della transferrina⁶ è essenzialmente epatica ed è modulata dallo stato del ferro, dagli ormoni steroidei e dalle citochine infiammatorie. La proteina possiede due siti di legame per lo ione Fe³⁺. Per liberare il ferro all'interno delle cellule la transferrina diferrica si lega ad uno specifico recettore. Il recettore della transferrina è costituito da due subunità identiche legate da un ponte disolfuro. La porzione extracellulare contiene i siti di legame per la transferrina: la transferrina si lega al recettore, il complesso va incontro ad endocitosi emigra all'interno del citoplasma cellulare dove l'acidità all'interno dell'endosoma provoca il distacco del ferro dalla transferrina⁷. Il complesso apotransferrina/recettore attraverso una estensione tubulare dell'endosoma ritorna sulla superficie cellulare, dove il pH neutro favorisce il distacco della apotransferrina che ritorna quindi libera in circolo; il ferro complessato con un ligando, viene trasportato ai siti di utilizzo cellulare o di deposito.

Il recettore si può trovare su tutte le cellule, tranne i globuli rossi maturi, ma è abbondante soprattutto nelle cellule in attiva proliferazione, dove il ferro è un cofattore necessario per la sintesi del DNA. La porzione extracellulare del recettore della transferrina può andare incontro a proteolisi ed essere liberata in circolo in forma solubile, prendendo così il nome di recettore solubile della transferrina (sTfR). Il quantitativo di recettore rilasciato in circolo è proporzionale al recettore presente sulla membrana cellulare ed è influenzato direttamente dal contenuto di ferro presente all'interno della cellula: una carenza di ferro porta ad un aumento del recettore cellulare

e quindi di quello solubile, mentre l'effetto opposto si ha in caso di sovraccarico di ferro.

Questo avviene grazie ad un complicato sistema di regolazione genica che coinvolge alcune proteine citoplasmatiche "iron response protein" (IRP)^{8 9} in grado di legarsi ad alcune specifiche sequenze (ORE) presenti nell'mRNA del recettore: queste proteine, tramite modificazioni conformazionali legate alla concentrazione di ferro, possono regolare la stabilità dell'mRNA¹⁰. Quindi se il ferro immagazzinato nelle cellule è sufficiente per mantenere un adeguato metabolismo, l'importazione del complesso Fe/Trf sarà ridotta dall'aumento della degradazione dell'mRNA per il recettore della transferrina e viceversa. Le proteine IRP sono anche al centro della regolazione del gene che codifica per la ferritina. La ferritina ha la funzione di sequestrare e immagazzinare il ferro. E' una molecola sferica formata da 24 catene polipeptidiche che racchiudono una cavità entro la quale si possono depositare fino a 4000 atomi di ferro. La sintesi delle subunità della ferritina è controllata a livello trascrizionale dalle proteine IRP che si legano ad elementi ferrosensibili (IRE)⁹ situati nell'mRNA della ferritina: quando il ferro intracellulare è scarso la traduzione dell'mRNA è soppressa, quando i livelli del ferro aumentano IRP1 diventa inattiva e IRP2 viene degradata, consentendo così una efficace trascrizione delle due subunità della ferritina. Le proteine IRP sono quindi coinvolte sia nella regolazione della sintesi della ferritina, che del recettore solubile della transferrina, ma anche della proteina DMT1 coinvolta nell'assorbimento del ferro, e quindi il sistema IRP/IRE permette un controllo coordinato tra loro delle principali proteine coinvolte nel mantenimento dell'omeostasi del ferro. Tali proteine sono influenzate non solo dal ferro, ma anche da nitrossido, ormoni tiroidei, progesterone e citochine infiammatorie¹¹.

Rilevanza clinica delle proteine del metabolismo del ferro

Transferrina

La sensibilità della sintesi epatica della transferrina alla concentrazione di ferro, ci permette di capire come la Tf sia inversamente proporzionale al quantitativo di ferro dell'organismo. Di conseguenza una modificazione dei depositi di ferro porterà anche ad una modificazione del grado di saturazione della transferrina: nel deficit di ferro avremo un incremento della concentrazione di Tf e quindi una diminuzione significativa della saturazione della transferrina e viceversa. Per questi motivi la determinazione della concentrazione della transferrina e della saturazione della transferrina (Tsat) hanno sempre fatto parte degli algoritmi diagnostici dell'anemia sideropenica. Tuttavia la sintesi della transferrina è ridotta in corso di flogosi, durante la terapia estroprogestinica, in gravidanza, ed è correlata allo stato nutrizionale. Inoltre il dosaggio della saturazione della transferrina, molto usato a scopi clinici, è nella maggior parte dei laboratori, calcolato sulla base di sideremia e concentrazione della transferrina, e risente inevitabilmente della variabilità biologica e analitica legate al dosaggio della sideremia. Quindi la saturazione della transferrina può modificarsi notevolmente in un breve arco di tempo (dal 15 al 70%). Per questi motivi il ruolo diagnostico della transferrina e della saturazione della transferrina rimane limitato alla diagnosi di anemia sideropenica non complicata.

In questi ultimi anni sono stati così sperimentati altri marcatori (soprattutto i globuli rossi ipocromici) per cercare di riconoscere con maggiore specificità i pazienti che realmente possano beneficiare di terapia marziale, anche alla luce delle sempre maggiori conoscenze circa gli effetti dannosi di un sovraccarico di ferro¹².

Un campo invece dove il ruolo della saturazione della transferrina è ancora ben definito e riconosciuto è nello screening del sovraccarico di ferro. Un punto cardine dei meccanismi di mantenimento dell'omeostasi del ferro riguarda l'assorbimento di ferro nella dieta. In caso di emocromatosi ereditaria (HH) l'assorbimento intestinale è aumentato.

Ferritina e recettore solubile della transferrina

La ferritina sierica, nonostante sia quantitativamente irrilevante rispetto alla ferritina intracellulare (meno dell'1%), è clinicamente importante. Rappresenta l'indice più accurato per la valutazione dei depositi corporei di ferro, dal momento che la concentrazione di ferritina nel siero è strettamente correlata alla quantità di ferritina intracellulare che a sua volta è prodotta in funzione del ferro intracellulare. La ferritina è quindi un indice indispensabile per la valutazione degli stati di deplezione ferrica. Tuttavia l'utilità della ferritina è limitata in due condizioni: in tutti i casi in cui i depositi di ferro sono depleti in maniera fisiologica (bambini, donne in gravidanza) e negli stati infiammatori, dal momento che la ferritina è una proteina della fase acuta. In questi casi è stato proposto il dosaggio del recettore solubile della transferrina (sTfR). Infatti flebotomie ripetute su volontari sani determinano prima la caduta dei livelli di ferritina e poi, quando i depositi di ferro sono esauriti, si osserva l'incremento della concentrazione del recettore solubile della transferrina. Quindi per una valutazione più completa del metabolismo ferrico vengono proposti sia la determinazione della ferritina come marker dei depositi di ferro sia il dosaggio del recettore solubile come indice del fabbisogno tissutale di ferro¹³.

Nel corso degli anni '90 numerosi studi hanno valutato il valore clinico del recettore della transferrina in diverse situazioni: nella diagnosi di anemia sideropenica nei bambini e nelle donne in gravidanza, nel follow up degli emodializzati e soprattutto

nelle anemie da malattie croniche. Tale anemia è caratterizzata da un ridotto rilascio di ferro dalle cellule del sistema reticoloendoteliale e da un ridotto assorbimento intestinale di ferro. Le alterazioni del metabolismo del ferro sono indotte dalle citochine e secondo recenti osservazioni anche da un nuovo peptide: l'epcidina.

La diagnosi differenziale tra IDA (iron deficiency anemia) e ACD (anemia chronic disease) può essere fatta agevolmente, ma le cose si complicano quando l'ACD si accompagna con un deficit di ferro. Nel corso degli anni sono stati proposti vari tentativi di correggere il valore della ferritina sulla base di indici di flogosi come VES o PCR, ma questi tentativi non hanno avuto molto seguito. Il recettore solubile della transferrina viene quindi dosato in numerose condizioni di infiammazione e infezione con risultati però spesso tra loro discordanti, soprattutto tra i pazienti con artrite reumatoide. Questo può secondo alcuni autori essere spiegato ricordando che il recettore solubile della transferrina è sì un marker di deficit tissutale di ferro, ma anche di eritropoiesi. Quindi l'interpretazione clinica del recettore solubile della transferrina in un paziente in cui ci siano contemporaneamente anche modificazioni dell'attività eritropoietica è più complicata, come nel caso dell'anemia da malattie croniche in cui accanto all'alterato metabolismo del ferro c'è anche una inibizione dell'eritropoiesi dovuta a citochine e ad altri fattori.

In ultima analisi la relazione tra stato del ferro e livelli di sTfR nei pazienti con infiammazioni dipenderà dalla gravità dello stato infiammatorio coesistente e soprattutto dal grado di inibizione dell'eritropoiesi. Per questi motivi le ricerche attuali stanno prendendo in considerazione l'utilizzo di nuovi marker correlati alla produzione di globuli rossi ipocromici (HYPO) e alla misura della emoglobinizzazione dei reticolo citi (CHr). Questi parametri sembrano in grado di rispecchiare la quantità di ferro

circolante incorporata nel compartimento eritrocitario, e riflettono recenti cambiamenti nell'eritropoiesi.

Gli Autori propongono di inquadrare con la combinazione di CHr, HYPO e sTfRF index i vari stadi dei difetti funzionale di ferro. Al momento questi nuovi parametri sono disponibili solo su un unico strumento e questo limita la possibilità di studiare più diffusamente il significato clinico di questi marcatori che sembrano comunque essere promettenti non solo nella diagnosi della deficienza marziale nei pazienti con ACD ma anche in altre situazioni difficilmente valutabili con i marker ematologici fino ad ora discussi, come nella diagnosi di anemia sideropenica nei bambini, nelle donne in gravidanza e nell' identificazione dell'abuso di eritropoietina nel doping. Allo stesso modo la mancanza di standardizzazione del dosaggio del recettore solubile della transferrina, l'utilizzo di unità di misura diverse, la mancanza di range di riferimento universali, abbinato in molti studi alla scelta di differenti criteri diagnostici per la diagnosi di anemia sideropenica, spesso rende difficile il confronto tra studi diversi e può almeno in parte spiegare i risultati spesso contrastanti. Quindi il ruolo del recettore solubile della transferrina nella pratica clinica, in particolare nel monitoraggio dell'eritropoiesi in particolari situazioni (post-trapianto di Midollo Osseo, post-chemioterapia, monitoraggio trattamento anemia emolitica) e nella diagnosi di deficienza marziale nelle anemie da malattie croniche, nei bambini e nelle donne in gravidanza, rimane a tutt'oggi ancora da definire.

Il sovraccarico di ferro nell'organismo: l'emocromatosi ereditaria

L'emocromatosi è una malattia ereditaria che conduce al progressivo sviluppo di un sovraccarico di ferro a livello di diversi organi e tessuti.^{14 15}

A causa dell'effetto tossico del ferro la struttura e la funzione degli organi interessati può essere danneggiata e questo accade nello stadio conclamato di malattia.¹⁶

La maggior parte dei casi di emocromatosi genetica è ascrivibile ad un unico gene chiamato HFE e alle sue due mutazioni più comuni (C282Y e H63D).^{17 18} Pertanto questa forma è detta emocromatosi classica o emocromatosi HFE o emocromatosi tipo 1 (Data Base OMIM).^{19 20} Tuttavia negli ultimi anni sono stati descritti altri tipi di emocromatosi genetica più rari e dovuti a difetti di altri geni coinvolti nella regolazione del metabolismo del ferro²¹:

- l'emocromatosi giovanile o tipo 2 che è una forma severa ad insorgenza precoce dovuta ad alterazioni dei geni dell'emogiuvelina (2a) o dell'epcidina (2b);
- l'emocromatosi tipo 3 che si manifesta in età adulta e dipende da mutazioni nel gene del recettore della transferrina 2²²;
- l'emocromatosi tipo 4 che a differenza delle precedenti si presenta spesso con saturazione della transferrina normale, ed è dovuta a difetti della ferroportina.²³

In particolare approfondiremo in questa tesi il ruolo dell'epcidina, una proteina scoperta nel 2001.

Il gene che codifica per questa proteina è denominato HAMP e si trova sul cromosoma 19. Sono state identificate solo due mutazioni del gene HAMP che, analogamente alle mutazioni del gene HFE, possono portare allo sviluppo dell'emocromatosi tipo 2b se presenti su entrambi i cromosomi ereditati dai genitori (malattia genetica recessiva).

L'epcidina

L'epcidina è un ormone peptidico che agevola il controllo della distribuzione del ferro: bassi livelli di epcidina portano ad un sovraccarico di ferro intracellulare, mentre la sovrapproduzione di epcidina causa anemia²⁴

L'epcidina regola l'esportazione del ferro cellulare legandosi alla ferroportina sulle superfici delle cellule e riducendo la capacità della cellula di esportare il ferro. Questo, per contro, porta ad una riduzione dei livelli di ferro extracellulare.^{25 26} Dati preliminari indicano che anche i DMT1 e Dcytb duodenali sono regolati negativamente dall'epcidina, sebbene resti da chiarire la presenza di una interazione diretta o indiretta tra epcidina e questi trasportatori.^{27 28}

hHEP	DTHFPICIFCCGCHRSKCGMCCKT
pHEP	DTHFPICIFCCGCCRKAICGMCCCKT
rHEP	DTNFPICLFCCKCCKNSSCGLCCIT
mHEP	DTNFPICIFCCCKCCNNSQCGICCKT
dHEP	DTHFPICIFCCGCKTPKCGLCCCKT

Figura 2. Sequenze dell'epcidina nei vertebrati: umana (hHEP), suina (pHEP), murina (mHEP), e canina (dHEP). Le cisteine conservate, che formano 4 ponti disolfuro, sono evidenziate in grigio.

L'epcidina viene secreta dal fegato in risposta a varie condizioni fisiologiche, tra cui: infiammazioni, elevato ferro corporeo, ipossia e anemia. In risposta a queste condizioni, alcuni segnali non ancora chiaramente definiti vengono trasmessi a meccanismi di recettori, come il recettore 2 della transferrina, il recettore IL-6, HFE e emogiuvulina, che agiscono sugli epatociti per indurre la sintesi e la liberazione dell'epcidina. Tra questi diversi segnali e meccanismi dei recettori è possibile che esistano interazioni delle quali non sono ancora note le modalità di elaborazione per modulare l'epcidina. Tuttavia, è noto che il malfunzionamento del recettore 2 della transferrina, del recettore IL-6, dell'HFE e dell'emogiuvulina in diversi tipi di emocromatosi riduce l'espressione di epcidina.²⁹

Dato che l'infiammazione e il recettore di IL-6 stimolano intensamente la produzione dell'epcidina umana e che l'escrezione di epcidina aumenta considerevolmente durante l'infiammazione, l'epcidina indotta da IL-6 potrebbe essere il mediatore responsabile della limitazione di ferro e dell'inadeguata eritropoiesi nell'anemia da infiammazione. È possibile quindi che lo sviluppo di analoghi dell'epcidina presenti future applicazioni terapeutiche.³⁰

L'epcidina è una proteina di piccole dimensioni (Figura 3) che funziona come ormone, portando un messaggio in tessuti e organi diversi da quello dove viene prodotto. Viene codificata dal gene HAMP (Figura 4) ed è un regolatore chiave dell'equilibrio del ferro nell'organismo (ferro-omeostasi): è prodotta dal fegato e blocca l'assorbimento intestinale del ferro e il rilascio di ferro dai macrofagi (le cellule che servono per riciclare il ferro contenuto nei globuli rossi dopo che questi muoiono), le due principali vie attraverso cui il ferro entra nel circolo.³¹

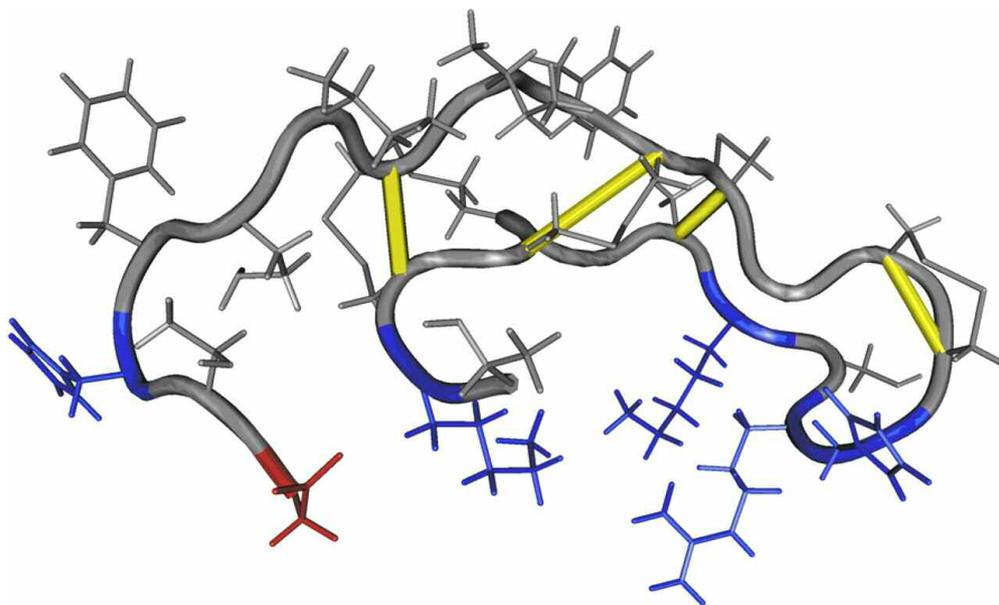


Figura 3. Struttura dell'epcidina

Nell'individuo sano, l'epcidina viene prodotta in quantità definite in funzione dello stato del ferro nel sangue, dei depositi nell'organismo e dell'attività eritropoietica (la produzione dei globuli rossi nel midollo che richiede ferro): se il ferro circolante o depositato si riduce o se l'attività eritropoietica aumenta viene inibita la produzione di epcidina e quindi "si apre la strada" all'ingresso del ferro nel sangue; al contrario, se il deposito di ferro dell'organismo tende ad aumentare e non è richiesto ferro da parte del midollo la produzione di epcidina blocca l'ingresso di ferro nel sangue.³²

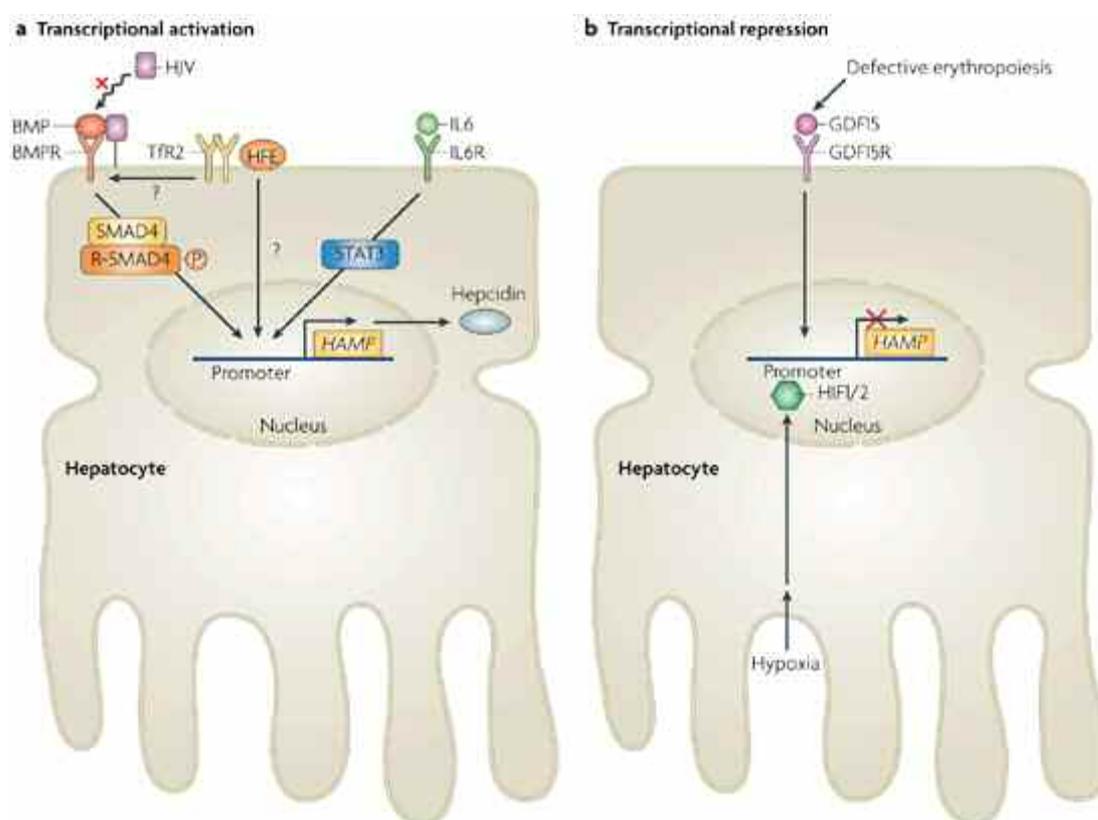


Figura 4. Regolazione dell'espressione del gene HAMP, che codifica per la molecola dell'epcidina³³

L'epcidina svolge la sua azione modulatrice legandosi ad un'altra proteina chiamata ferroportina che regola l'uscita di ferro dalla cellula della mucosa intestinale e dalle cellule "di deposito" (in particolare il macrofago) al sangue. Quando l'epcidina è

presente, si lega alla ferroportina, ne limita la funzione e blocca quindi l'uscita di ferro nel sangue. Quando l'epcidina è assente accade l'inverso (Figure 5 e 6).

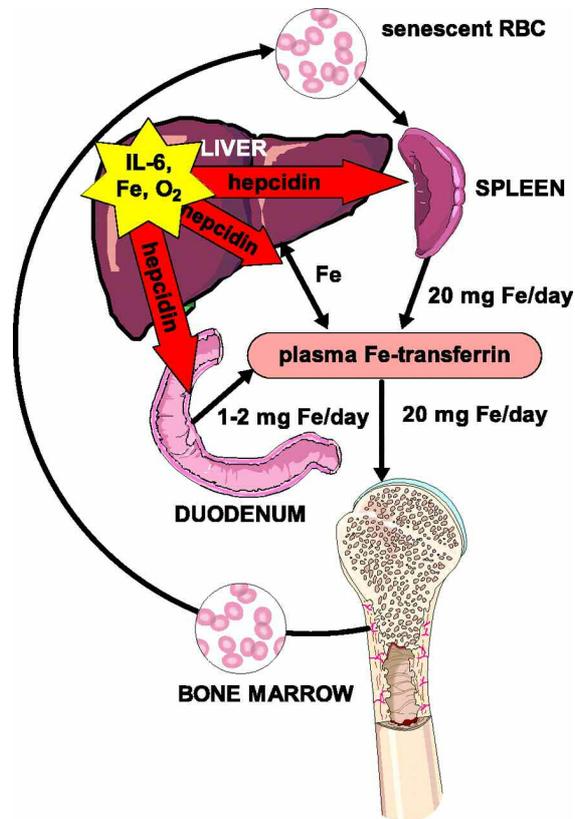


Figura 5. Ruolo dell'epcidina nella regolazione del ferro

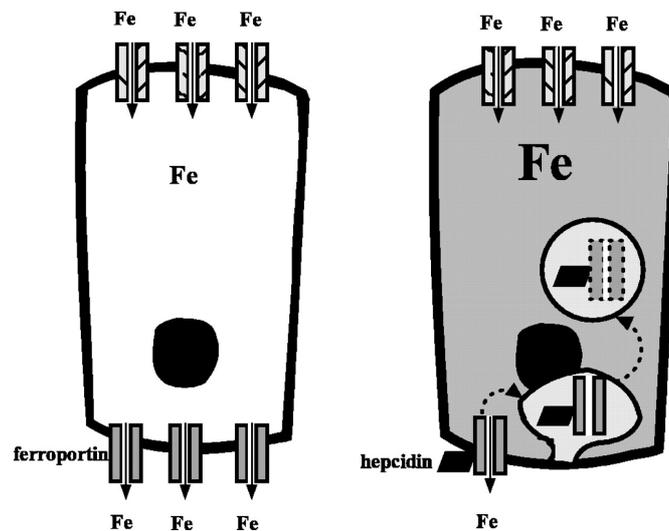


Figura 6. Regolazione dell'espressione della ferroportina sulla membrane basolaterale degli enterociti ad opera dell'epcidina

Disregolazione dell'epcidina

Vi sono due condizioni patologiche in cui la produzione di epcidina è speculare: l'emocromatosi e l'anemia delle malattie croniche.

Nell'emocromatosi genetica (tutti i tipi tranne quello dovuto ai difetti della ferroportina), la produzione di epcidina è bassa (rispetto alla quantità di ferro depositato) e, poiché l'assorbimento di ferro intestinale e il rilascio di ferro dal macrofago aumentano, si sviluppa un progressivo accumulo di ferro.

Al contrario, nell'anemia delle malattie croniche, seppure non siano aumentati né i depositi né il ferro circolante, la produzione di epcidina è alta e di conseguenza il ferro rimane bloccato nei macrofagi, l'assorbimento intestinale è inibito, il ferro non è disponibile per il midollo e si sviluppa un'anemia caratterizzata da saturazione della transferrina bassa (indicativo del poco ferro circolante) e ferritina alta (espressione del ferro bloccato nei depositi) (Figura 7).

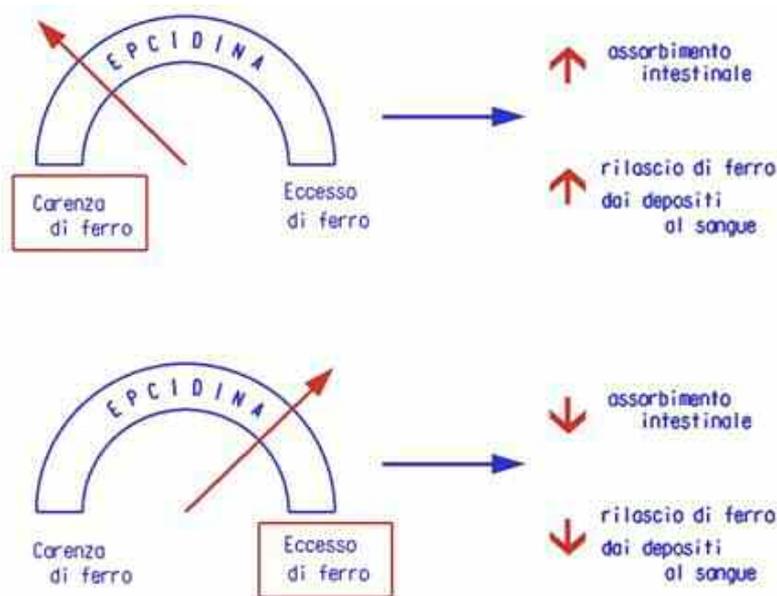


Figura 7. Epcidina ed alterazione del metabolismo del ferro

Per quanto riguarda l'emocromatosi è necessario sottolineare che non tutti i soggetti che presentano un assetto genetico a rischio sviluppano la malattia. Ad esempio, solo il 25-50% degli omozigoti C282Y (ovvero coloro che hanno ereditato la mutazione da entrambi i genitori) hanno valori di ferritina e di saturazione della transferrina così alti da fare diagnosi di malattia, gli altri presentano tutt'al più valori solo lievemente elevati. Pertanto si può dire che anche l'emocromatosi come altre malattie necessita per esprimersi sia di una predisposizione genetica (ad esempio i genotipi HFE a rischio) ma anche di fattori aggiuntivi.

Da tempo sono noti i fattori acquisiti, malattie associate che possono determinare un aumento o una riduzione del sovraccarico di ferro attraverso numerosi meccanismi. Oggi la ricerca si sta concentrando sull'analisi di fattori genetici in grado di modulare l'espressione della malattia: l'epcidina potrebbe essere uno di questi. Si ipotizza che i pazienti con emocromatosi Classica ed espressione di malattia più severa (cioè indici del ferro più alti e maggiore sovraccarico di ferro) producano meno epcidina degli altri (Figura 8). Purtroppo il dosaggio dell'epcidina nel sangue e nelle urine è molto complesso a causa delle piccole dimensioni della proteina attiva (25 aminoacidi).

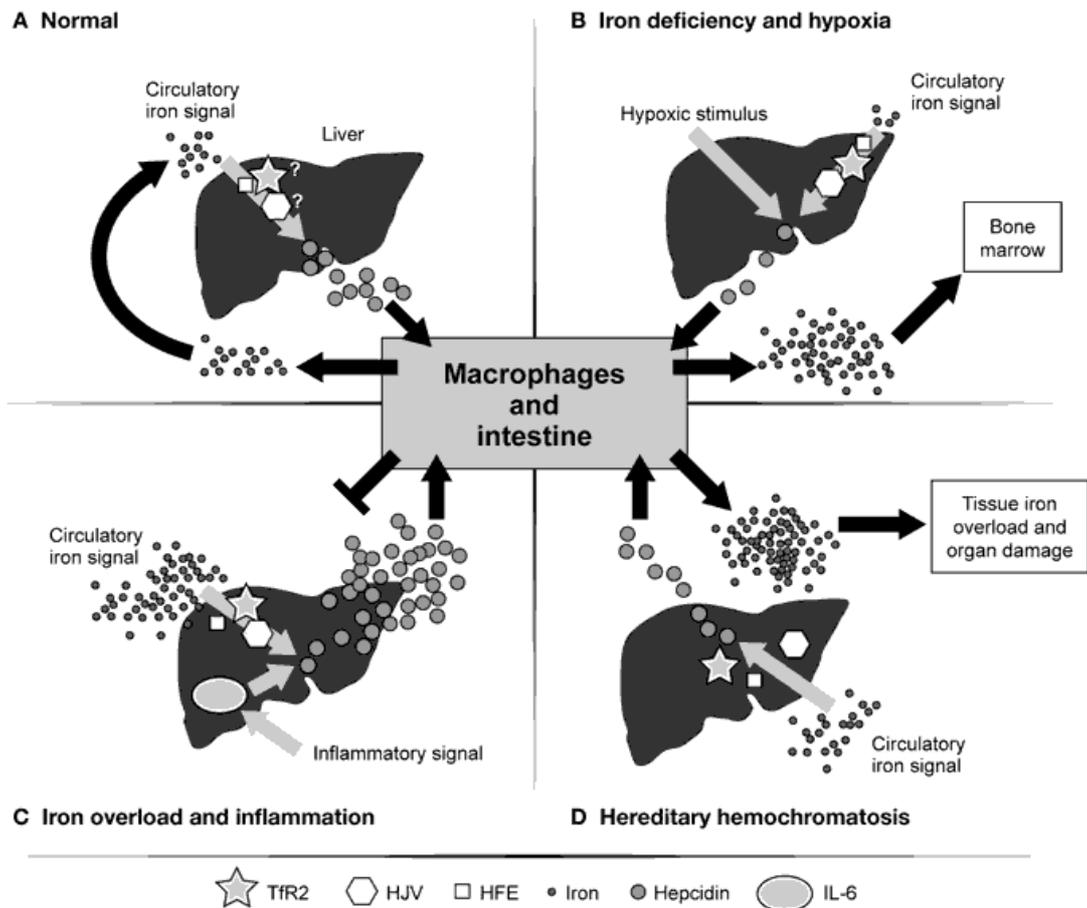


Figura 8. Epcidina: regolatore del ferro³⁴

Il dosaggio dell'epcidina

Fino ad oggi esistono poche indagini strumentali che vadano a dosare nell'uomo l'epcidina. In studi sperimentali ed in colture cellulari l'espressione del RNA dell'epcidina è preferito rispetto al dosaggio diretto, ma ovviamente tale metodo è usato sporadicamente nell'uomo, vista l'invasività del campionamento. Metodi immunoistochimici basati sull'uso di anticorpi specifici anti-epcidina, come la colorazione tissutale immunoistochimica, il SDS-PAGE e il Western Blot sono problematici soprattutto per la limitata disponibilità di anticorpi adatti. Ciò è da

attribuirsi alle piccole dimensioni dell'epcidina, alla compattezza e complessità di struttura della molecola, e alla sua sequenza fortemente conservata tra le specie.

Metodi immunistochimici per il dosaggio dell'epcidina

A nostra conoscenza solamente un metodo dotblot basato sugli anticorpi è stato usato con successo per il dosaggio semiquantitativo dell'epcidina nelle urine. Con l'utilizzo della cromatografia a scambio cationico, i peptidi vengono estratti dall'urina, risospesi ed immobilizzati su di una membrana vinilica. L'epcidina viene quantificata mediante Chemiluminescenza utilizzando anticorpi di coniglio contro epcidina umana. La quantità di epcidina di ogni campione viene normalizzato con le concentrazioni di creatinina urinaria. Data la mancanza di un controllo per le perdite di epcidina nella fase pre-analitica dell'analisi, come nell'estrazione delle proteine e loro sospensione, questo metodo è da ritenersi semiquantitativo. La disponibilità limitata di anticorpi non commerciali fa sì che l'ottimizzazione di metodi strumentali basati sugli anticorpi con buona specificità sia difficile da raggiungere. Per contro, un metodo ELISA per il dosaggio dell'epcidina potrà migliorare di molto l'accessibilità a tale analisi, ma non è capace di discriminare tra le differenti isoforme della proteina. Inoltre la misurazione del suo precursore, la proepcidina, è stata proposta mediante l'utilizzo di un kit ELISA che utilizza anticorpi diretti contro la regione propeptidica dell'epcidina. Tuttavia, l'utilizzo diagnostico di questa metodica è controverso, per la mancanza di chiare correlazioni con l'epcidina ed altri parametri del metabolismo del ferro. Concentrazioni significative sono state riportate nella malattia della ferroportina o in combinazione con malattie renali in stadio avanzato.³⁵

Dosaggio dell'epcidina mediante SELDI-TOF-MS

Di recente è stato descritto anche un metodo di spettrometria di massa (SELDI-TOF MS: surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) che riconosce le tre isoforme esistenti di epcidina. Tale procedura si dimostra veloce, ma molto difficile da automatizzare.^{36 37}

Prima di tutto, la valutazione delle misurazioni mediante spettrometria di massa su siero e urine umani ha rivelato una sostanziale influenza dei fattori preanalitici, specialmente sull'epcidina urinaria, ed un'ampia variazione circadiana dei livelli di epcidina.³⁸

OBIETTIVO DELLA TESI

Il progetto di ricerca, oggetto della presente tesi di dottorato, si propone pertanto di contribuire alla definizione del ruolo dell'epcidina nel metabolismo del ferro e comprenderne il significato diagnostico e prognostico nella patologia da sovraccarico marziale.

In particolare lo studio si propone di:

- valutare l'affidabilità e l'accuratezza del dosaggio plasmatico dell'epcidina utilizzando una metodica semi-quantitativa come la spettrometria di massa
- ed inoltre, attraverso tale dosaggio, analizzarne la validità diagnostica per identificare il sovraccarico marziale nell'uomo.

MATERIALI E METODI

Il campione

Sono stati arruolati nello studio 37 soggetti adulti (M/F=19/18) di età compresa tra i 29 ed i 77 anni afferiti agli ambulatori dedicati allo studio ed alla cura delle epatopatie. Tale campione è stato confrontato con un gruppo di 150 soggetti sani (M/F=56/94; di età compresa tra 10 e 88 anni).

La popolazione in esame è distribuita come segue:

- 10 pazienti affetti da emocromatosi genetica classica (Omozigoti C282Y)
- 17 pazienti con diagnosi di NAFLD
- 10 pazienti affetti da epatopatia cronica HCV-correlata
- 150 controlli sani arruolati nel precedente studio Arsita³⁹, con ecografia normale, indici di citolisi epatica nella norma, introito alcolico inferiore a 20 g/die

Per ciascun soggetto è stato possibile registrare i livelli dei seguenti parametri ematochimici: mutazioni HFE C282Y e H63D (sonde Taqman); ferro, ferritina, saturazione della transferrina, transaminasi, GGT, glucosio, insulina, colesterolo totale, colesterolo HDL, colesterolo LDL, trigliceridi. Infine per ogni soggetto è stato raccolto un campione di plasma citrato e su di esso è stata dosata l'epcidina mediante con metodica SELDI-TOF.

Come indice di sovraccarico di ferro è stato inoltre utilizzato il rapporto epcidina/ferritina (new Hep) come descritto da Piperno et al.⁴⁰

Analisi SELDI-MS

La superficie cromatografia scelta per lo studio è la CM10 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Si tratta di una superficie cationica consente di catturare molecole positive.

I campioni sono stati pertanto preparati in maniera tale da avere una soluzione con $\text{pH} < 5$ per cui l'epcidina ha una netta carica positiva.

Il protocollo seguito per ogni spot cromatografico è il seguente:

Soluzioni

1. NaAcetato 0.1 M pH 4
2. Soluzione satura CHCA in 50% ACN, 0.5 % TFA

Attivazione della matrice

1. Aggiungere 200 uL di NaAc e vortexare per 5'
2. Svuotare e ripetere.

Preparazione del campione

1. Centrifugare i campioni a 4 °C per 5' a 15.000 xg.
 - A) urina: 30 uL + ACTH (concentrazione finale 28.41 nM).

Curva di calibrazione con epcidina sintetica in urina (30 uL) priva di epcidina endogena (concentrazione finale: 74.70, 149.40 e 398.30 nM).

- B) plasma citrato: 80 uL + ACTH (concentrazione finale 9.47 nM).

Curva di calibrazione con epcidina sintetica in plasma (80 uL) privo di epcidina endogena (concentrazione finale: 3.319, 6.639, 19.917, 59.75 e 119.5 nM)

Incubazione

1. Applicare a ciascun spot 180 uL di NaAc per le urine e 130 uL per il plasma insieme al campione.
2. Incubare a 4 °C per 12-16 ore.

Lavaggio

1. Svuotare il contenuto.
2. Aggiungere 200 uL di NaAC e ripetere 2 volte.
3. Eliminare il liquido che bagna lo spot e lavare con acqua distillata.
4. Asciugare per 15' e aggiungere 1.5 uL di CHCA.
5. Lasciar asciugare per 5'.

Lettura (parametri strumentali)

Intervallo masse: 0-10000 Da

Focus: 2800 Da

Deflector: 1500 Da

Setting Urina: intensità 190 e sensibilità 8

Plasma setting A: intensità 195 e sensibilità 9

Plasma setting B: intensità 200 e sensibilità 10

Gli spettri di massa sono stati generati con lo strumento Proteinchip reader (PBSIIc) (Laboratori Bio-Rad). Gli spettri di massa dei campioni di plasma e urine sono stati ottenuti leggendo tutta la superficie dello spot e facendo la media di 300 letture. Per il plasma sono stati utilizzati 2 diversi setting strumentali (A e B).

Diluizioni scalari di epcidina standard (Bachem GmbH, Weil am Rhein, Germany – 2789.40 Da), sono state aggiunte a campioni di plasma o urine prive di epcidina endogena per ottenere le curve standard. I setting A e B sono stati utilizzati per quantificare l'epcidina nell'intervallo di concentrazione 0-120 nM.

Normalizzazione degli spettri

Gli spettri di massa ottenuti possono essere confrontati tra loro solo dopo opportune modifiche che servono a ridurre la componente di variabilità aspecifica. Per tale scopo è

stato utilizzato il software ProteinChip v. 3.2.1 (Bio-Rad) che opera le seguenti correzioni:

- sottrazione della linea di base
- calcolo del rumore di fondo
- normalizzazione

Determinazione del rumore di fondo e della linea di base

Il ProteinChip software calcola la linea di base che, come conseguenza del rumore di fondo strumentale, non è mai una retta parallela all'asse m/z. La linea di base viene quindi sottratta allo spettro. Il rumore di fondo viene invece calcolato come media più 3 deviazioni standard (SD) dei segnali elettrici aspecifici al detector. Ogni segnale che supera la soglia stabilità viene interpretato come un picco dovuto ad un peptide. L'intensità di questo picco, misurato come distanza tra l'estremità e la linea di base è in relazione alla quantità del peptide nel campione analizzato. La massa viene determinata per confronto con lo spettro di calibrazione.

Normalizzazione

La normalizzazione consente di standardizzare l'intensità dei picchi in modo da compensare differenze nella preparazione del campione o in fase di lettura. Questi fenomeni causano variazioni tra gli spettri che non dipendono da reali differenze tra i singoli componenti proteici.

Per correggere le differenze nella qualità degli spot sia gli standard che i campioni sono stati addizionati con 9.47 nM (per il plasma) e 28.41 nM (per le urine) di un frammento N-terminale di ACTH (N-ACTH, 2933.48 Da) (Synacten, Novartis Pharma, Stein, Switzerland).

I picchi di epcidina sono stati quindi normalizzati con l'altezza media dei picchi di ACTH. Il valore dell'epcidina normalizzata quindi veniva considerato reale solo quando

il fattore di normalizzazione risultava compreso tra 0.5 e 2.0, altrimenti i campioni venivano rianalizzati. L'intensità media del rumore di fondo + 3DS è stata utilizzata per ricavare la minima dose rilevabile (limite di sensibilità), che è 1.0 nM per il plasma e 0.6 nM per le urine.

Analisi statistica

Per l'analisi statistica sono stati utilizzati i seguenti software:

- SPSS v. 9.0 (SPSS Company, Chicago, IL, USA)
- Biomarker Patterns™ (Bio-Rad)

Il software consente di costruire un modello decisionale che mostra come i dati possono essere classificati e predetti. La classificazione è il risultato di un processo di apprendimento (learning) in cui vengono ricercate le variabili (predictors o splitters) capaci di meglio differenziare i gruppi posti a confronto. Le variabili possono essere le features di esperimenti SELDI e/o altri parametri numerici o categorici. Attraverso semplici risposte di tipo “si/no”, a domande concernenti l'insieme dei dati (analisi multivariata), il software ricerca le relazioni tra le variabili e costruisce il miglior “albero decisionale”. Tramite quest'ultimo viene eseguito un processo di “testing” in cui ai pazienti si cerca di riattribuire il proprio gruppo di appartenenza. Il fine ultimo è quello di classificare, il più correttamente possibile, un nuovo soggetto che giunga all'osservazione. Per le variabili quantitative viene definito il miglior cut-off.

Il software procede “a cascata”, utilizzando le variabili discriminanti, secondo un ordine di priorità, in modo da:

1. suddividere ogni nodo in un albero;
2. decidere quando l'albero è completo;

3. assegnare ai nodi le percentuali di ripartizione.

In ogni nodo di separazione è possibile leggere quale variabile è stata utilizzata, il cut-off che meglio discrimina i gruppi analizzati e in che percentuale vengono ripartiti i pazienti. Dai nodi terminali è possibile ricavare sensibilità (=veri positivi/veri positivi + falsi negativi) e la specificità (=veri negativi/veri negativi + falsi positivi) dell' algoritmo elaborato. Il software consente infine di tracciare la curva ROC (receiver operating characteristic) e di calcolarne l'area sottesa che rappresenta l'accuratezza diagnostica per l'algoritmo ricavato.

RISULTATI

Come si può osservare nella tabella 1 i livelli di epcidina risultano significativamente più elevati nei pazienti con epatopatia cronica HCV (26.3 ± 7.2 , media \pm SE) rispetto ai controlli (12.3 ± 1.0) (one-way Anova: $F=3.2$, $p<0.05$). Il ferro e la % di saturazione della transferrina risultavano significativamente più elevati sia nelle emocromatosi di tipo I che nei pazienti affetti da epatopatia cronica HCV rispetto ai controlli ($F=7.9$, $p<0.001$ and $F=23.7$, $p<0.001$), mentre i livelli di ferritina e transferrina risultavano associati solo alle emocromatosi tipo I ($F=7.0$, $p<0.001$ and $F=7.8$, $p<0.001$). Il glucosio, il C-peptide e l'insulina risultavano significativamente più elevate nelle emocromatosi tipo I e le NAFLD rispetto ai controlli ($F=21.1$, $p<0.001$, $F=18.1$, $p<0.001$ and $F=21.9$, $p<0.001$). Mentre l'epcidina risultava significativamente correlare con il livelli di ferritina ($r=0.451$, $p<0.001$), l'indice epcidina/ferritina risultava diminuito solo nei soggetti con emocromatosi tipo I ($F=2.18$, $p=0.07$), senza però raggiungere la significatività statistica.

Tabella 1. Analisi descrittiva della popolazione

	HH (n=10)	NAFLD (n=17)	HCV (n=10)	Control (n=150)	GI Control (n=7)	one-way ANOVA
Ferro	$32.2 \pm 3.2^*$	18.1 ± 1.3	$28.0 \pm 3.6^*$	20.4 ± 0.6	17.7 ± 3.4	$F=7.9$, $p<0.001$
Ferritina	$491 \pm 185^*$	223 ± 48	334 ± 112	130 ± 17	79 ± 25	$F=7.0$, $p<0.001$
Transferrina	$1.95 \pm 0.1^*$	2.88 ± 0.1	2.53 ± 0.1	2.82 ± 0.04	2.61 ± 0.2	$F=7.8$, $p<0.001$
sat TS	$69.96 \pm 9.6^*$	24.48 ± 2.1	$42.72 \pm 5.2^*$	28.46 ± 1.0	29.05 ± 6.4	$F=23.7$, $p<0.001$
Epcidina	11.2 ± 3.3	17.7 ± 3.6	$26.3 \pm 7.2^*$	12.3 ± 1.0	13.0 ± 4.1	$F=3.2$, $p<0.05$
New hep	$0.031 \pm 5.6-$ 0.3	$0.11 \pm 4.9-02$	$0.14 \pm 4.8-0.2$	0.14 ± 0.1	$.16 \pm 6.7-$ 02	$F=2.2$, $p:ns$
MCV	87 ± 4	88 ± 1	91 ± 3	87 ± 1	$81 \pm 5^*$	$F=3.1$, $p<0.05$

ALT	39.3±7.4	33.1±4.1	63.6±29.7*	26.0±2.3	22.0±9.8	F=3.3, p<0.05
GGt	74.3±51.4	29.7±3.0	61.9±28.6	25.4±3.2	23.6±9.1	F=2.9, p<0.05
Glucosio	7.2±1.1*	5.9±0.3*	4.8±0.2	4.4±0.06	5.0±0.2	F=21.1, p<0.001
C-peptide	3.9±0.9*	2.9±0.3*	1.9±0.3	1.5±0.05	1.8±0.5	F=18.1, p<0.001
Insulina	23.6±8.8*	11.9±1.0*	9.9±2.1	5.7±0.2	6.2±1.9	F=21.9, p<0.001
Colesterolo	228±16	221±8	178±10	208±3	206±12	F=2.5, p<0.05
HDL	52±7	50±3	50±5	58±1	51±5	F=2.5, p<0.05
Trigliceridi	146±28	150±17*	113±14	107±5	122±29	F=2.9, p<0.05

I pazienti nel gruppo dei controlli che presentavano eterozigoti per H63D o C282Y sono stati confrontati con quelli senza le mutazioni su tutti i parametri in studio. I soggetti mutati per C282Y non risultavano associati a livelli più bassi di colesterolo (t=3.3, p<0.01), LDL (t=2.6, p<0.05) ed HbA1c (t=4.7, p<0.001), mentre i pazienti con mutazione H63D presentavano livelli significativamente più elevati di ferro (t=2.7, p<0.05), emoglobina (t=3.9, p<0.01), ematocrito (t=3.1, p<0.01), % di saturazione della transferrina (t=3.5, p<0.01) e più bassi livelli di transferrina (t=3.6, p<0.01) e newHep (t=2.5, p<0.05).

Tabella 2. Tutti i casi escluse le emocromatosi tipo I. Ruolo delle mutazione C282Y e H63D. Solo i parametri significativi

	C282Y WW (n=158)	C282Y M (n=17)	Student's t test
Colesterolo	211±3	181±9	t=3.3, p<0.01
LDL	133±3	109±8	t=2.6, p<0.05
HbA1c	5.4±0.06	5.0±0.06	t=4.7, p<0.001
Fe	21±0.6	16±1.6	t=2.6, p<0.05
% sat TS	29.4±1.0	23.9±2.4	t=2.1, p<0.05

	H63D WW (n=165)	H63D M (n=17)	Student's t test
Hb	14±0.1	15±0.3	t=3.9, p<0.01
Hct	41.9±0.3	44.8±0.9	t=3.1, p<0.01
Fe	20±0.6	25±1.9	t=2.7, p<0.05
Transf	2.8±0.04	2.5±0.06	t=3.6, p<0.01
% sat TS	27.9±1	39.3±3	t=3.5, p<0.01
Hep/ferr	0.14±0.01	0.09±0.02	t=2.5, p<0.05

Come mostrato in figura 1 la newHep risulta diminuita nei mutati rispetto ai controlli.

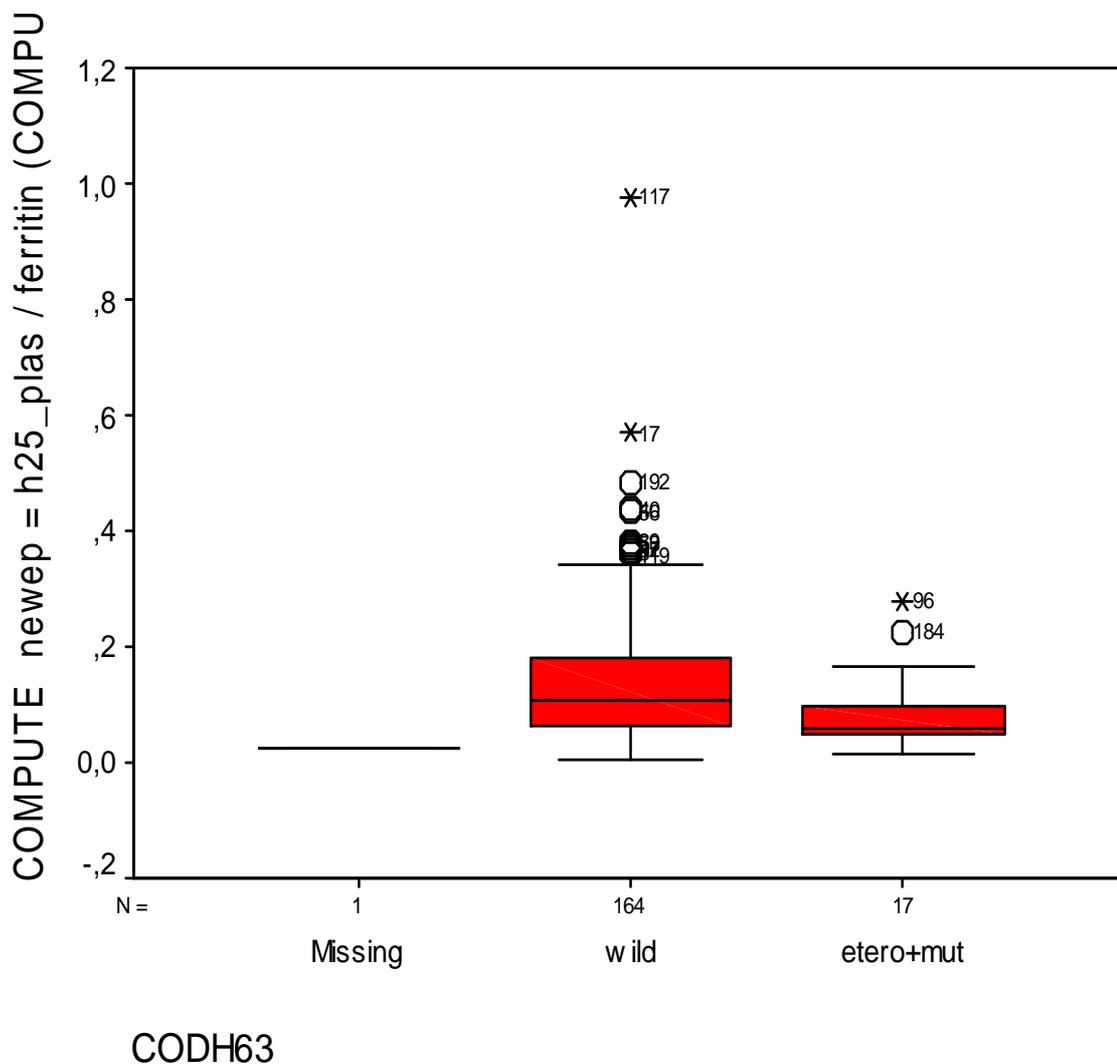


Figura 9

E' stata pertanto eseguita una regressione logistica multinomiale (tabella 3) in cui venivano analizzate le malattie epatiche separatamente e confrontate con i seguenti parametri: glucosio, insulina, colesterolo, trigliceridi, ALT, % saturazione transferrina, rapporto epcidina/ferritina.

Come indicato in tabella gli unici parametri significativi sono l'insulina ed il glucosio per le NAFLD, e insulina, ALT, % sat transferrina e Ep/ferr per l'epatopatia HCV correlata.

Tabella 3. Regressione logistica multinomiale

	HH N=8	NAFLD N=17	HCV N=9	Rif. N=139
	Exp B (95% CI)	Exp B (95% CI)	Exp B (95% CI)	
Glucosio	1.8E+14 (0-out of range)	3.8 (1.9-7.5)**	1.45 (0.4-5.7)	-
Insulina	2.9 (7.4E-78-1.1+78)	1.95 (1.43-2.66)**	1.7 (1.2-2.3)*	-
Colesterolo	2.6 (2.0E-57-3.4E+57)	1.02 (1.00-1.05)	0.97 (0.93-1.00)	-
Trigliceridi	0.7 (2.6E-31-1.7E+30)	1.00 (0.98-1.01)	1.01 (0.99-1.04)	-
ALT	0.46 (1.9-140-1.1+139)	1.00 (0.97-1.04)	1.02 (1.00-1.04)*	-
% sat TS	3.0 (7.5-136-1.2+136)	1.04 (0.96-1.12)	1.16 (1.07-1.27)*	-
Ep/ferr	0	3.35 (3.6E-03-3116)	1844 (4-837085)*	-

Per identificare gli indici che meglio correlino con la diagnosi di emocromatosi tipo I e NAFLD confrontandoli con i controlli è stato utilizzato il Software Biomarker pattern.

Come viene mostrato nella figura 10, prendendo in considerazione i 10 soggetti con emocromatosi tipo I e i 150 controlli, si osserva la formazione un algoritmo a 3 nodi terminali che mostra come maggiori splitter il rapporto epcidina/ferritina (cut off 0.066)

e glucosio (cut off 4.786 mmol/l). Tali indici permettevano di classificare come emocromatosi il 100% delle emocromatosi e 92,7% dei controlli (con un'area sotto la curva ROC=0.963, figura 11).

Se invece il gruppo dei controlli veniva ripulito dai soggetti con allele H63D mutato si veniva a formare con il gruppo di 10 emocromatosi tipo I, un gruppo di 137 controlli. A questo punto come mostrato in figura 12 l'algoritmo che si veniva a creare era a 4 nodi terminali ed ai due indici precedentemente descritti si andava ad aggiungere anche il ferro (cut off 15.4 μ mol/l). Seguendo questo algoritmo si sarebbe raggiunto una capacità diagnostica delle emocromatosi del 100%, contro il 98.6% dei controlli (con un'area sotto la curva ROC=0.993, figura 13).

Come mostrato in figura 14 sono state pertanto analizzate le 17 NAFLD contro i 150 controlli con la formazione di un algoritmo a 3 nodi terminali, comprendente come più accurati splitter diagnostici l'insulina (cut off 9.05) e il glucosio (cut off 5.411). Tale algoritmo permette di diagnosticare il 94% dei casi e l'89% dei controlli (area sotto la curva ROC 0.951, figura 15).

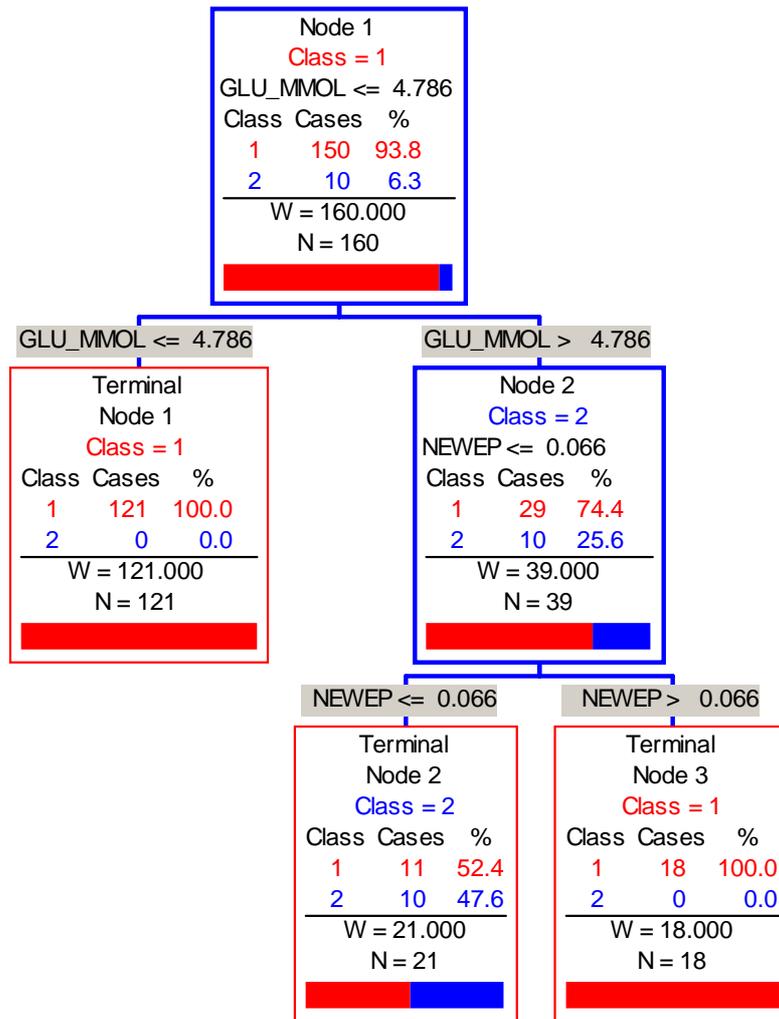


Figura 10. Algoritmo a 3 nodi terminali, emocromatosi vs controlli

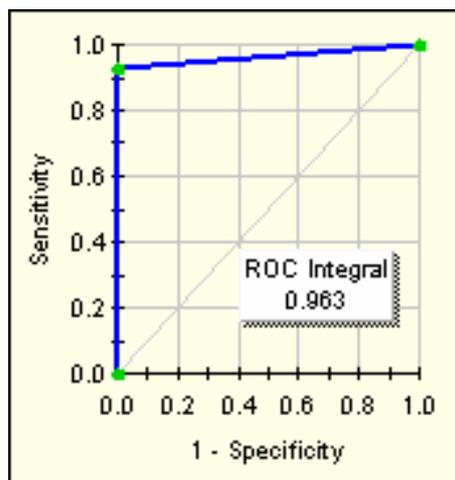


Figura 11. Curva ROC emocromatosi vs controlli

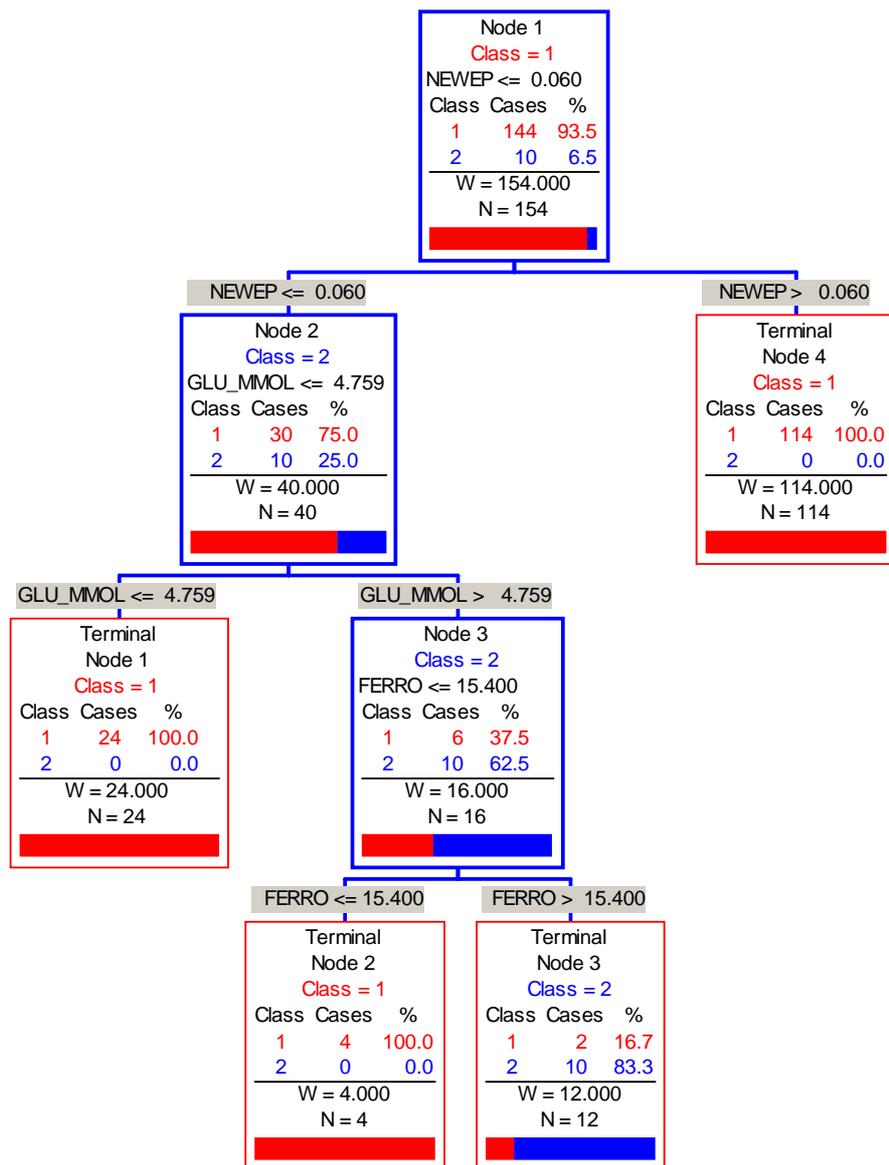


Figura 12. Algoritmo a 4 nodi terminali, emocromatosi vs controlli – H63D

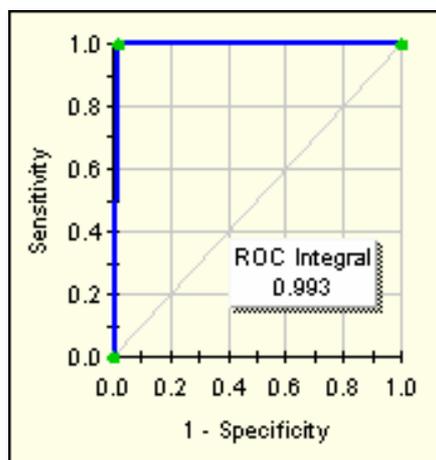


Figura 13. Curva ROC emocromatosi vs controlli – H63D

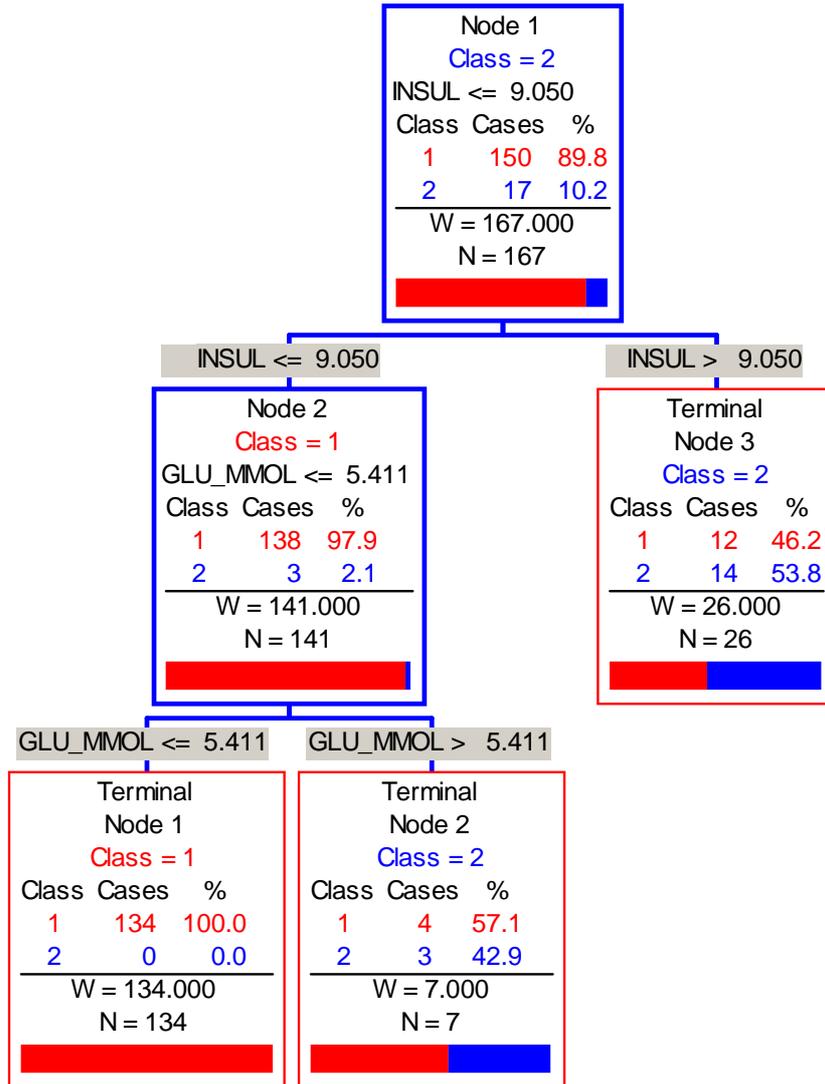


Figura 14. Algoritmo a 3 nodi terminali, NAFLD vs controlli

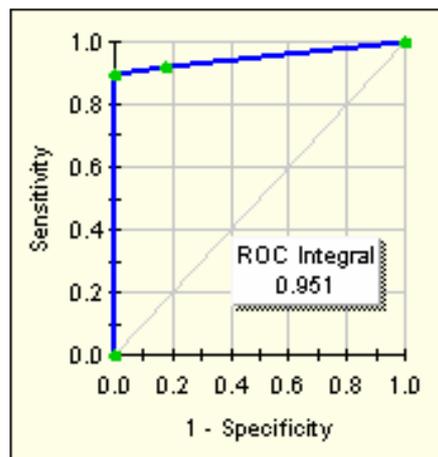


Figura 15. Curva ROC NAFLD vs controlli

La tabella 4 riporta i livelli urinari e plasmatici di epcidina. Entrambi i livelli di plasma e urine risultano correlati con la ferritina sierica ($r=0.392$, $p<0.001$ and $r=0.892$, $p<0.001$), mentre vi è una correlazione tra epcidina plasmatica e TIBC ($r=0.262$, $p<0.01$). La figura 16 mostra i grafico spettrofotometrico della ricerca sul plasma e urine dell'epcidina.

Tabella 4. Livelli di epcidina in soggetti sani. I livelli plasmatici sono espresso in nM, quelli urinari in nmol/mmol creatinine.

	CASI		MEDIA		MEDIANA		DS		5 Percentile		95 Percentile	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Plasma	57	98	17.57	9.26	14.39	5.28	14.28	9.47	1.00	1.00	46.88	32.74
Urine	3	12	37.49	6.38	31.24	3.81	31.99	7.68	9.09	0.08	72.14	23.93

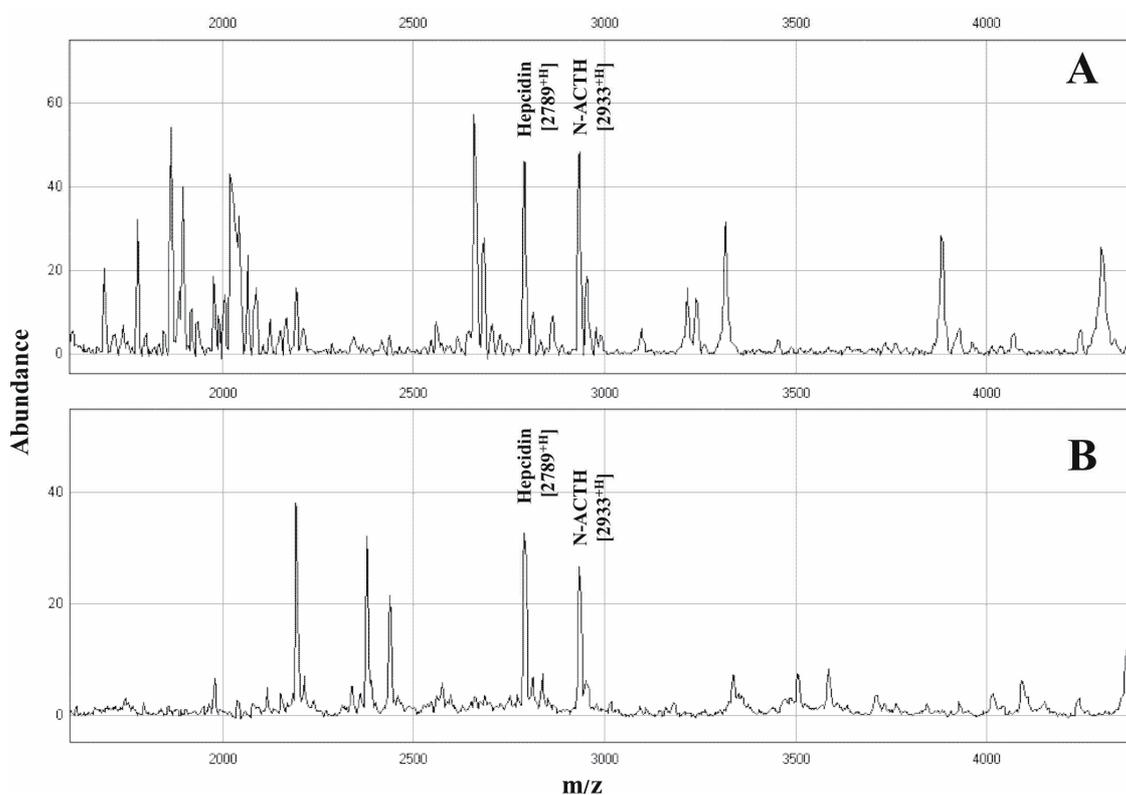


Figura 16. Spettro di massa di plasma (A) e urine (B)

DISCUSSIONE

Fino ad oggi l'epcidina era stata dosata con estrema difficoltà con metodiche immunologiche (dot-blot o ELISA)^{41 42 43 44}. Invece nel nostro studio il dosaggio è stato eseguito con spettrometria di massa SELDI su plasma citrato e urina. Tale metodica si è dimostrata corretta per il dosaggio dell'epcidina in linea anche con i dosaggi eseguiti sulle urine, rilevando così con buona approssimazione il livello di tale ormone nel sangue.

Dai risultati è emerso che nella popolazione HCV positiva i livelli di epcidina erano significativamente più elevati rispetto ai controlli HCV negativi. Tale risultato è per il momento in disaccordo con i lavori pubblicati in letteratura. Digitando su PubMed le parole epcidina e HCV solo 10 articoli sono disponibili al momento in tutta la letteratura. Tra questi i più interessanti sono lo studio di Nishina et al.⁴⁵ dove il dosaggio dell'epcidina veniva eseguito su topi transgenici e Miura et al.⁴⁶ su cellule epatiche in vitro. Entrambi dimostravano una significativa riduzione dei livelli di epcidina. Sembra infatti che i radicali dell'ossigeno vadano ad inibire la produzione di epcidina, spiegando quindi il motivo per cui nelle epatopatie croniche HCV si verifichi un sovraccarico di ferro a livello epatico. L'unico studio in vivo è stato eseguito da Fujita et al.⁴⁷ dove il dosaggio dell'epcidina veniva eseguito sul siero di pazienti HCV positivi prima e dopo trattamento con PEG-IFN. Anche qui venivano dimostrati livelli più bassi di epcidina rispetto ai controlli, con conseguente aumento dopo trattamento con IFN. Essendo l'epcidina un tempo conosciuta come peptide antimicrobico per cui i suoi livelli aumentavano negli stati di infiammazione al fine di far diminuire l'assorbimento di ferro, sarebbe pertanto più normale trovarla aumentata, piuttosto che

diminuita nell'infiammazione da HCV. Probabilmente l'aumentare ed il diminuire dell'epcidina, legato allo stress ossidativo, è legato anche alla viremia che nel virus C, come nel B, ha un andamento ondulatorio.

Da lungo tempo si sta cercando un metodo o un indice che possa essere impiegato come screening dell'Emocromatosi genetica tipo I (quella che comprende il 90% delle emocromatosi), visto che tale malattia è molto frequente nella popolazione. Tuttavia eseguire a tappeto sulla popolazione le mutazioni maggiori HFE è improponibile perché molto costoso come dimostrato da Gagnè et al.⁴⁸. L'indice più sensibile e specifico per la diagnosi di malattia fin'ora si è rivelato la % di saturazione della transferrina. In uno studio condotto dal nostro gruppo nel 2002 dimostravamo che tra gli indici di sovraccarico di ferro, quello più sensibile e specifico era proprio la % sat TS (AUROC=0.743). Tuttavia un recente studio americano di Adams et al.⁴⁹ dimostrava che utilizzando la % di saturazione della transferrina come metodo di screening su una corte di 100.000 soggetti sani in cui erano state fatte anche le mutazioni HFE, avrebbe perso il 33% dei pazienti affetti da emocromatosi tipo I. Con il metodo da noi proposto, utilizzando 3 semplici esami ematochimici (ferro, ferritina e glucosio) più l'epcidina si ottiene un'accuratezza diagnostica praticamente del 100% per lo screening dei soggetti affetti da emocromatosi genetica tipo I.

In questo studio inoltre viene rilevato nei soggetti eterozigoti per C282Y una diminuzione del colesterolo totale ed LDL come peraltro già confermato in letteratura da Pankw et al.⁵⁰ nello studio ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities). Questo suggerisce che tale mutazione vada ad influenzare in qualche modo il metabolismo lipidico.

Ancora una volta viene confermato in uno studio che effettivamente la mutazione H63D, la più frequente delle due, effettivamente possiede un ruolo nel determinare un

sovraccarico di ferro anche se probabilmente si avvalga di alcuni cofattori come di recente è stato confermato da Machado et al.⁵¹

CONCLUSIONI

In conclusione, abbiamo sviluppato un metodo mediante SELDI-TOF-MS per quantificare l'epcidina sia nel plasma che nelle urine, validandolo in un'ampia coorte di soggetti. Questo metodo potrà essere usato in studi future per chiarire meglio l'utilità clinica del dosaggio dell'epcidina.

L'epcidina ha sicuramente un ruolo di prim'ordine sulla regolazione del metabolismo del ferro, tuttavia esistono numerosi cofattori ancora sconosciuti che la stimolano o inibiscono a generare un sovraccarico di ferro nelle malattie epatiche quali HCV e NAFLD.

Questo studio inoltre conferma il ruolo della mut C282Y nel metabolismo lipidico e quello del H63D sul sovraccarico di ferro.

Infine semplici markers non invasivi come Epcidina/ferritina, ferro e glucosio possono predire la presenza di emocromatosi ereditaria tipo I nella popolazione generale.

BIBLIOGRAFIA

-
- 1 Syed BA, Sargent PJ, Farnaud S, Evans RW. An overview of molecular aspects of iron metabolism. *Hemoglobin*. 2006;30(1):69-80.
 - 2 Donovan A, Roy CN, Andrews NC. The ins and outs of iron homeostasis. *Physiology (Bethesda)*. 2006;21:115-23.
 - 3 Ganz T. Iron homeostasis: fitting the puzzle pieces together. *Cell Metab*. 2008;7(4):288-90.
 - 4 Edison ES, Bajel A, Chandy M. Iron homeostasis: new players, newer insights. *Eur J Haematol*. 2008;81(6):411-24.
 - 5 Rouault TA. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat Chem Biol*. 2006;2(8):406-14.
 - 6 de Jong G, van Dijk JP, van Eijk HG. The biology of transferrin. *Clin Chim Acta*. 1990 Sep;190(1-2):1-46.
 - 7 Omar S, Feki M, Kaabachi N. [Iron metabolism, overview and recent insights. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2006;64(6):523-34.
 - 8 Pantopoulos K. Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Mar;1012:1-13.
 - 9 Muckenthaler MU, Galy B, Hentze MW. Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annu Rev Nutr*. 2008;28:197-213.
 - 10 Cairo G, Recalcati S. Iron-regulatory proteins: molecular biology and pathophysiological implications. *Expert Rev Mol Med*. 2007;9(33):1-13.
 - 11 Loréal O, Pigeon C, Zanninelli G, Turlin B, Lescoat G, Deugnier Y, Brissot P. Current data on iron metabolism. *Ann Endocrinol (Paris)*. 1999;60(3):197-203.
 - 12 MacKenzie EL, Iwasaki K, Tsuji Y. Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(6):997-1030.
 - 13 Dunn LL, Rahmanto YS, Richardson DR. Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends Cell Biol*. 2007;17(2):93-100.
 - 14 Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y, Kato J. Iron overload and cofactors with special reference to alcohol, hepatitis C virus infection and steatosis/insulin resistance. *World J Gastroenterol*. 2007;13(35):4699-706.
 - 15 Brissot P, Troadec MB, Bardou-Jacquet E, Le Lan C, Jouanolle AM, Deugnier Y, Loréal O. Current approach to hemochromatosis. *Blood Rev*. 2008;22(4):195-210.
 - 16 Jacobs EM, Verbeek AL, Kreeftenberg HG, van Deursen CT, Marx JJ, Stalenhoef AF, Swinkels DW, de Vries RA. Changing aspects of HFE-related

-
- hereditary haemochromatosis and endeavours to early diagnosis. *Neth J Med*. 2007;65(11):419-24.
- 17 Beutler E. Hemochromatosis: genetics and pathophysiology. *Annu Rev Med*. 2006;57:331-47.
- 18 Pietrangelo A. Hemochromatosis: an endocrine liver disease. *Hepatology*. 2007;46(4):1291-301.
- 19 Alexander J, Kowdley KV. Hereditary hemochromatosis: genetics, pathogenesis, and clinical management. *Ann Hepatol*. 2005;4(4):240-7.
- 20 Swinkels DW, Janssen MC, Bergmans J, Marx JJ. Hereditary hemochromatosis: genetic complexity and new diagnostic approaches. *Clin Chem*. 2006;52(6):950-68.
- 21 Pietrangelo A. Molecular insights into the pathogenesis of hereditary haemochromatosis. *Gut*. 2006;55(4):564-8.
- 22 Pelucchi S, Mariani R, Trombini P, Coletti S, Pozzi M, Paolini V, Barisani D, Piperno A. Expression of hepcidin and other iron-related genes in type 3 hemochromatosis due to a novel mutation in transferrin receptor-2. *Haematologica*. 2009; [Epub ahead of print].
- 23 Taddei T, Mistry P, Schilsky ML. Inherited metabolic disease of the liver. *Curr Opin Gastroenterol*. 2008;24(3):278-86.
- 24 Kemna EH, Tjalsma H, Willems HL, Swinkels DW. Hepcidin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologica*. 2008;93(1):90-7.
- 25 Ganz T. Hepcidin--a peptide hormone at the interface of innate immunity and iron metabolism. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;306:183-98.
- 26 Nemeth E, Ganz T. Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annu Rev Nutr*. 2006;26:323-42.
- 27 Hugman A. Hepcidin: an important new regulator of iron homeostasis. *Clin Lab Haematol*. 2006;28(2):75-83.
- 28 Ganz T, Nemeth E. Iron imports. IV. Hepcidin and regulation of body iron metabolism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290(2):G199-203.
- 29 Ganz T. Hepcidin and its role in regulating systemic iron metabolism. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006:29-35, 507.
- 30 Oates PS. The role of hepcidin and ferroportin in iron absorption. *Histol Histopathol*. 2007;22(7):791-804.
- 31 Atanasiu V, Manolescu B, Stoian I. Hepcidin--central regulator of iron metabolism. *Eur J Haematol*. 2007;78(1):1-10.
- 32 Oates PS, Ahmed U. Molecular regulation of hepatic expression of iron regulatory hormone hepcidin. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22(9):1378-87.
- 33 De Domenico I, McVey Ward D, Kaplan J. Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008;9:72-81.

- 34 Pietrangelo A, Trautwein C. Mechanisms of Disease: the role of hepcidin in iron homeostasis—implications for hemochromatosis and other disorders. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*. 2004; 1: 39-45.
- 35 Ganz T, Olbina G, Girelli D, Nemeth E, Westerman M Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood*. 2008;112(10):4292-7.
- 36 Kemna E, Tjalsma H, Laarakkers C, Nemeth E, Willems H, Swinkels D. Novel urine hepcidin assay by mass spectrometry. *Blood*. 2005;106(9):3268-70.
- 37 Kemna EH, Tjalsma H, Podust VN, Swinkels DW. Mass spectrometry-based hepcidin measurements in serum and urine: analytical aspects and clinical implications. *Clin Chem*. 2007;53(4):620-8.
- 38 Murphy AT, Witcher DR, Luan P, Wroblewski VJ. Quantitation of hepcidin from human and mouse serum using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Blood*. 2007;110(3):1048-54.
- 39 Floreani A, Rosa Rizzotto E, Basso D, Navaglia F, Zaninotto M, Petridis I, DI Andrea O, Testa R, Marra M, Baldo V, Chiamonte M. An open population screening study for HFE gene major mutations proves the low prevalence of C282Y mutation in Central Italy. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;26(4):577-86.
- 40 Piperno A, Girelli D, Nemeth E, Trombini P, Bozzini C, Poggiali E, Phung Y, Ganz T, Camaschella C Blunted hepcidin response to oral iron challenge in HFE-related hemochromatosis. *Blood*. 2007;110(12):4096-100.
- 41 Kemna EH, Tjalsma H, Willems HL, Swinkels DW. Hepcidin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologica* 2008;93:90-7.
- 42 Bozzini C, Campostrini N, Trombini P, Nemeth E, Castagna A, Tenuti I, et al. Measurement of urinary hepcidin levels by SELDI-TOF-MS in HFE-hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis* 2008;40:347-52
- 43 Kemna EH, Tjalsma H, Podust VN, Swinkels DW. Mass spectrometry-based hepcidin measurements in serum and urine: analytical aspects and clinical implications. *Clin Chem*. 2007;53:620-8
- 44 Kobold U, Dülffer T, Dangl M, Escherich A, Kubbies M, Röddiger R, Wright JA. Quantification of hepcidin-25 in human serum by isotope dilution micro-HPLC-tandem mass spectrometry [Letter]. *Clin Chem* 2008;54:1584-6
- 45 Nishina S, Hino K, Korenaga M, Vecchi C, Pietrangelo A, Mizukami Y, Furutani T, Sakai A, Okuda M, Hidaka I, Okita K, Sakaida I. Hepatitis C virus-induced reactive oxygen species raise hepatic iron level in mice by reducing hepcidin transcription *Gastroenterology*. 2008;134(1):226-38.
- 46 Miura K, Taura K, Kodama Y, Schnabl B, Brenner DA. Hepatitis C virus-induced oxidative stress suppresses hepcidin expression through increased histone deacetylase activity. *Hepatology*. 2008;48(5):1420-9.
- 47 Fujita N, Sugimoto R, Motonishi S, Tomosugi N, Tanaka H, Takeo M, Iwasa M, Kobayashi Y, Hayashi H, Kaito M, Takei Y. Patients with chronic hepatitis C achieving a sustained virological response to peginterferon and ribavirin therapy recover from impaired hepcidin secretion. *J Hepatol*. 2008;49(5):702-10.

-
- ⁴⁸ Gagné G, Reinharz D, Laflamme N, Adams PC, Rousseau F. Hereditary hemochromatosis screening: effect of mutation penetrance and prevalence on cost-effectiveness of testing algorithms. *Clin Genet.* 2007;71(1):46-58.
- ⁴⁹ Adams PC, Reboussin DM, Press RD, Barton JC, Acton RT, Moses GC, Leiendecker-Foster C, McLaren GD, Dawkins FW, Gordeuk VR, Lovato L, Eckfeldt JH Biological variability of transferrin saturation and unsaturated iron-binding capacity. *Am J Med.* 2007;120(11):999.e1-7.
- ⁵⁰ Pankow JS, Boerwinkle E, Adams PC, Guallar E, Leiendecker-Foster C, Rogowski J, Eckfeldt HFE C282Y homozygotes have reduced low-density lipoprotein cholesterol: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Transl Res.* 2008 Jul;152(1):3-10.
- ⁵¹ Machado MV, Ravasco P, Martins A, Almeida MR, Camilo ME, Cortez-Pinto H. Iron homeostasis and H63D mutations in alcoholics with and without liver disease. Machado MV, Ravasco P, Martins A, Almeida MR, Camilo ME, Cortez-Pinto H. *World J Gastroenterol.* 2009;15(1):106-11.