



Dosaggio dell'epcidina nel siero di pazienti con malattia infiammatoria intestinale

Michela Masotti, Filippo Costanzo, Marco Guerci, Gaetano Bergamaschi

Clinica Medica I, Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia

Dosaggio dell'epcidina nel siero di pazienti con malattia infiammatoria intestinale

L'anemia è tra le più frequenti manifestazioni extraintestinali nei pazienti affetti da malattia infiammatoria intestinale. La diagnosi differenziale tra anemia da carenza di ferro e da infiammazione cronica in questi pazienti assume un'importanza fondamentale nella scelta terapeutica; può risultare altresì particolarmente difficoltosa, poichè spesso entrambi i meccanismi patogenetici contribuiscono all'anemizzazione nel medesimo paziente. In questo lavoro abbiamo dosato l'epcidina nel siero di pazienti affetti da malattie infiammatorie intestinali ed in un gruppo di soggetti di controllo, sani o con anemie non infiammatorie né secondarie ad insufficienza renale. Abbiamo quindi analizzato i fattori che influenzano i livelli sierici di epcidina nelle malattie infiammatorie intestinali e la possibilità di utilizzare l'epcidina per discriminare i casi di anemia da infiammazione cronica dai casi di anemia da carenza di ferro associata ad anemia da infiammazione cronica. Tramite la concentrazione dell'epcidina è stato possibile discriminare la maggior parte dei nostri pazienti con anemia da carenza di ferro dai pazienti con anemia da infiammazione cronica, per cui possiamo assumere che il dosaggio dell'epcidina può essere utile per una corretta diagnosi differenziale della patogenesi dell'anemia nelle malattie infiammatorie intestinali e, potenzialmente, in altre malattie infiammatorie croniche.

Hepcidin dosage in serum of patients with inflammatory bowel disease

Anemia is one of the most common extraintestinal manifestations in patients with inflammatory bowel disease. Differential diagnosis between iron deficiency anemia and anemia of chronic disease is fundamental for an appropriate therapeutic choice, but it could also result arduous because both the pathogenetic mechanisms often contribute to anemia in this patients. In this work we have dosed hepcidin in the serum of patients with inflammatory bowel disease and of a group of control (healthy subjects or patients with anemia not related with chronic disease nor renal insufficiency). We have also examined factors influencing hepcidin seric level, and evaluated hepcidin dosage as a diagnostic tool in differential diagnosis between anemia of chronic disease and iron deficiency anemia. Hepcidin concentration could discriminate most of our patients with iron deficiency anemia from those with anemia of chronic disease, so we can assume that hepcidin dosage could be useful to understand the prevalent mechanism of anemia in patients with inflammatory bowel disease and, potentially, in other chronic inflammatory diseases.

Introduzione

Le Malattie Infiammatorie Intestinali sono un gruppo di patologie ad eziologia multifattoriale che comprende il Morbo di Crohn, la Colite Ulcerosa e le Coliti Indeterminate. L'anemia è tra le più frequenti manifestazioni extraintestinali delle malattie infiammatorie intestinali. La diagnosi differenziale tra anemia da carenza di ferro e da infiammazione cronica in questi pazienti assume un'importanza fondamentale nella scelta terapeutica; tuttavia può risultare particolarmente difficile, poichè spesso entrambi i meccanismi patogenetici contribuiscono all'anemizzazione nel medesimo paziente. È attualmente oggetto di studio il ruolo del dosaggio dell'epcidina sierica per la diagnosi differenziale tra i due tipi di anemia. L'epcidina è un peptide di sintesi epatica, agente regolatore comune su cui confluiscono i vari sistemi di controllo dell'omeostasi del ferro dell'organismo; essendo un regolatore negativo dell'assorbimento del ferro, la concentrazione di epcidina tende a ridursi nella carenza di ferro, mentre aumenta negli stati infiammatori.

L'anemia nelle malattie infiammatorie intestinali

Le malattie infiammatorie intestinali (Inflammatory Bowel Disease, IBD) sono un gruppo di patologie ad eziologia multifattoriale che comprende il Morbo di Crohn (MC), la Colite Ulcerosa (CU) e le Coliti Indeterminate, sottogruppo che comprende quel 10% di pazienti le cui caratteristiche cliniche ed anatomopatologiche non permettono di escludere né la diagnosi di MC né quella di CU.

L'anemia è tra le più frequenti manifestazioni extraintestinali delle malattie infiammatorie intestinali, e viene riscontrata con una prevalenza variabile tra il 6% ed il 74% dei casi a seconda delle diverse casistiche riportate in letteratura [1]. In base alla definizione della WHO, un paziente viene considerato anemico in presenza di un valore di emoglobina inferiore a 12 g/dl nelle donne e a 13 g/dl negli uomini [2].

L'eziologia dell'anemia nelle IBD è multifattoriale, essendo i principali meccanismi coinvolti la carenza di ferro e la flogosi cronica, anche se le carenze di acido folico e vitamina B12 e l'impiego di farmaci potenzialmente mielotossici hanno un ruolo in una percentuale significativa di pazienti. Nei processi infiammatori cronici viene stimolata la produzione di citochine che, attraverso meccanismi diversi (blocco degli scambi di ferro fra i diversi compartimenti dell'organismo, inibizione delle capacità di crescita e differenziazione dei progenitori e dei precursori eritroidi), inibiscono l'eritropoiesi. Alla carenza di ferro contribuiscono diversi meccanismi, quali le perdite ematiche intestinali nelle sedi di malattia, il sanguinamento gastrico associato all'uso di farmaci gastrolesivi ed il malassorbimento di ferro favorito dalla flogosi stessa.

Principali problematiche nella diagnosi differenziale dell'anemia nelle IBD

La diagnosi di anemia da carenza di ferro (IDA) si basa sulla presenza di emoglobina, MCV, MHC, sideremia e ferritina ridotti, e recettore solubile della transferrina e TIBC aumentati, mentre la diagnosi di anemia da malattia cronica (ACD) sulla presenza di emoglobina, sideremia e TIBC ridotte, MCV normale nelle fasi iniziali quando si ha solo inibizione dell'eritropoietina, e ridotto quando si associa la deplezione di ferro [3-4]. La diagnosi differenziale tra anemia da carenza di ferro (IDA) e da infiammazione cronica (ACD) nei pazienti affetti da malattia infiammatoria intestinale può risultare particolarmente difficoltosa, poichè spesso entrambi i meccanismi patogenetici contribuiscono all'anemia nel medesimo paziente. Gli usuali criteri discriminanti come la ferritina o la saturazione della transferrina risultano poco attendibili, essendo influenzati da ambedue le componenti patogenetiche e non corrispondendo all'effettivo stato dei depositi di ferro dell'organismo[3].

La determinazione del meccanismo fisiopatologico responsabile dell'anemizzazione di un paziente riveste un'importanza fondamentale nella scelta terapeutica: infatti, se nell'anemia da carenza di ferro la supplementazione marziale è imprescindibile, nell'anemia da infiammazione cronica sarebbe da evitare, dato che non si ha un'effettiva deplezione dei depositi di ferro.

È attualmente oggetto di studio il ruolo del dosaggio dell'epcidina sierica per la diagnosi differenziale tra i due tipi di anemia [5]: l'espressione di epcidina viene infatti inibita quando diminuisce la disponibilità di ferro, e viene al contrario indotta in caso di infiammazione cronica [6-7].

Epcidina ed omeostasi del ferro

L'epcidina è una proteina di fase acuta costituita da 25 aminoacidi, scoperta in modo indipendente da tre laboratori nei primi anni del 2000 [8-9]. L'epcidina si lega alla ferroportina espressa sulla membrana cellulare enterocitaria e macrofagica, attivando un meccanismo di fosforilazione che ne determina l'internalizzazione, l'ubiquitinazione e quindi la degradazione nell'endosoma [10]. Rimuovendo la ferroportina dalle membrane cellulari degli enterociti e dai macrofagi contententi il ferro derivato dalla fagocitosi dei globuli rossi senescenti, l'epcidina impedisce l'immissione in circolo del ferro [11].

La carenza di ferro determina attivazione della matriptasi 2, che scinde il legame dell'emojuvelina dalla membrana cellulare. L'emojuvelina solubile in alte concentrazioni inibisce la via del BMP, con conseguente riduzione dei livelli di epcidina. La ferroportina enterocitaria e macrofagica non viene quindi degradata e maggiori quantitativi di ferro vengono assorbiti e recuperati.

La citochina IL6, prodotta nel corso di vari processi infiammatori cronici, si lega ad un recettore di membrana espresso a livello delle cellule bersaglio e, in cooperazione con la Janus chinasi JAK, attiva STAT3, che a livello nucleare determina aumento della trascrizione del gene dell'epcidina [12-13]. Aumentati livelli di epcidina determinano degradazione della ferroportina enterocitaria e della ferroportina espressa dalle cellule di deposito, con conseguente ridotto assorbimento e sequestro di ferro endocellulare.

Scopo del lavoro

In questo lavoro abbiamo dosato i livelli di epcidina nel siero di pazienti affetti da malattia infiammatoria intestinale ed in un gruppo di soggetti di controllo allo scopo di determinare i fattori che influenzano i livelli sierici di epcidina nelle malattie infiammatorie intestinali e valutare la possibilità di utilizzare l'epcidina per discriminare i casi di anemia da flogosi dai casi di anemia dovuta a carenza di ferro associata a flogosi.

Materiali e metodi

Abbiamo studiato 54 pazienti con IBD, di cui 22 affetti da MC e 32 con RCU. Lo studio ha inoltre valutato, come controlli, 12 soggetti sani e 13 pazienti anemici affetti da anemia da carenza di ferro o da deficit di vitamina B12 o di acido folico, in assenza di flogosi o insufficienza renale. La presenza di anemia è stata definita da un livello di Hb < 13.0 g/dL nei maschi e < 12.0 g/dL nella popolazione femminile [2]. I pazienti non erano arruolabili nello studio se affetti da altre patologie in grado di determinare anemia o di interferire con l'eritropoiesi (neoplasie, precedenti trattamenti chemioterapici o radio-terapici, connettivopatie, infezioni, insufficienza renale). Oltre all'esame emocromocitometrico per individuare la presenza di anemia, i pazienti affetti da IBD ed il gruppo di pazienti anemici non affetti da IBD sono stati sottoposti a determinazione degli indici infiammatori, VES e proteina C reattiva

(PCR) e a dosaggio di vitamina B12 e acido folico (in caso di anemia macrocitica). In tutti i pazienti e nei controlli stato del ferro ed eritropoiesi sono stati valutati mediante determinazione di sideremia, transferrina, TfSat, ferritina sierica, recettore solubile della transferrina (sTfRc) ed eritropoietina (EPO).

Risultati

Tra i 54 pazienti con IBD, 27 avevano malattia in fase attiva e 26 erano anemici (2 pazienti con anemia moderata, tutti gli altri con anemia lieve). Tra i pazienti anemici con IBD, 9 avevano IDA, 7 ACD, 4 carenza di ferro associata a flogosi; 6 pazienti avevano anemia a diversa eziologia (2 da carenze vitaminiche, 4 a patogenesi non determinata). Tra i pazienti anemici non affetti da IBD, l'anemia era determinata da carenza di ferro (8 casi), deficit di acido folico o vitamina B12 (3 casi) o da recente sanguinamento gastrointestinale (2 casi).

Non abbiamo riscontrato differenze significative nei livelli di epcidina sierica tra controlli (volontari sani e pazienti anemici non affetti da IBD) e pazienti affetti da IBD.

Nelle IBD l'epcidina era più elevata nei pazienti con malattia attiva rispetto ai pazienti con malattia in fase di quiescenza (6.68 ± 9.81 nM e 2.77 ± 3.17 nM rispettivamente, $P=0.0295$), mentre non abbiamo riscontrato differenze significative tra pazienti anemici e non anemici; tuttavia, considerando i soli pazienti anemici, i livelli di epcidina tendono ad aumentare significativamente passando dal gruppo di pazienti con IDA, al gruppo con IDA + ACD, al gruppo con ACD pura (1.55 ± 3.00 nM, 3.59 ± 5.64 nM e 14.77 ± 13.90 nM rispettivamente, $P=0.0229$; Figura 1).

Utilizzando un cut-off della concentrazione di epcidina sierica pari a 2.0 nM, l'85% dei pazienti con carenza di ferro presenta una concentrazione inferiore al cut-off, mentre l'86% dei pazienti con ACD senza carenza di ferro ha una concentrazione superiore (Tabella 1). Anche i pazienti con IBD non anemici, ma con carenza di ferro, avevano epcidina più bassa rispetto ai pazienti con IBD non anemici e senza carenza di ferro (0.85 ± 0.54 nM e 4.42 ± 5.41 nM, $P=0.0490$).

Nei pazienti con IBD l'epcidina sierica correla significativamente con la proteina C reattiva ($r=0.3337$, $P=0.0095$), ma non con la velocità di sedimentazione eritrocitaria. Sia nei controlli che nei pazienti con IBD abbiamo trovato correlazioni significative tra epcidina e ferritina sierica ($r=0.660$, $P<0.0001$), transferrina ($r=-0.471$, $P=0.0002$) e recettore solubile della transferrina ($r=-0.439$, $P=0.0005$). Non c'erano invece correlazioni significative tra epcidina ed eritropoietina sierica o TfSat. All'analisi multivariata ferritina sierica, sTfRc e PCR mantenevano la correlazione con l'epcidina nei pazienti affetti da IBD, mentre tra i controlli solo la ferritina sierica risultava ancora correlata con l'epcidina.

Discussione

I risultati ottenuti confermano ed estendono dati già riportati in letteratura sul comportamento dell'epcidina in generale e nelle IBD in particolare. Viene confermata la correlazione dell'epcidina con la PCR [14] e con la ferritina serica [15], espressione della dipendenza della produzione di epcidina dallo stato infiammatorio dell'organismo e della correlazione tra livelli di epcidina e ferro presente nei depositi. L'assenza di correlazione tra la concentrazione di epcidina e l'eritropoietina, e la contemporanea presenza di una correlazione inversa significativa con il sTfRc sembrano indicare che la regolazione della produzione dell'epcidina e degli scambi di ferro nell'organismo dipendono più dal fabbisogno di ferro per l'eritropoiesi, espresso dai livelli del sTfRc, che dal grado di stimolazione dell'eritropoiesi stessa da parte dell'eritropoietina.

Sia tra i pazienti con IBD che tra i controlli l'epcidina correla inversamente con la transferrina; questo risultato concorda con quanto già evidenziato dall'analisi di un'ampia casistica (oltre 2900 volontari) nella quale è stato dimostrato che la total iron binding capacity, espressione diretta della concentrazione di transferrina nel siero, costituisce insieme alla ferritina sierica un parametro biochimico predittivo, nella popolazione generale, della concentrazione di epcidina nel siero [16]. I nostri risultati differiscono, invece, da quelli riportati da Arnold et al (2009) [17], che nelle IBD hanno riscontrato livelli di epcidina inferiori rispetto ai soggetti normali, anche in assenza di carenza di ferro, e non hanno trovato alcuna correlazione tra epcidina e sTfRc. Oustamanolakis et al [15], al contrario, hanno trovato valori di epcidina mediamente più elevati nei pazienti con IBD rispetto ai controlli sani. L'eterogeneità dei risultati descritti è probabilmente dovuta a 2 fattori principali, in particolare al fatto che il dosaggio dell'epcidina non sia ancora pienamente standardizzato e all'eterogeneità delle popolazioni di pazienti studiate, anche nell'ambito di una stessa patologia.

Conclusioni

Nella maggior parte dei nostri pazienti con carenza di ferro la concentrazione dell'epcidina è in grado di discriminare questi pazienti dai pazienti con ACD, per cui dal punto di vista diagnostico il dosaggio dell'epcidina può essere utile per una corretta diagnosi differenziale della patogenesi dell'anemia nelle IBD e, potenzialmente, in altre malattie infiammatorie croniche. Sulla base dei nostri dati, nei pazienti con anemia da carenza di ferro associata a flogosi l'effetto della carenza di ferro sembra prevalere rispetto a quello dell'infiammazione e la concentrazione di epcidina nel siero è bassa. Tuttavia, il numero di pazienti appartenenti a questo gruppo è piccolo (4), per cui non è al momento possibile trarre conclusioni definitive sull'argomento.

Tabelle e figure

Tabella 1. Concentrazione dell'epcidina nel siero dei diversi gruppi di soggetti studiati.

<i>Soggetti studiati (N*)</i>	<i>Epcidina sierica (nM)</i>
<i>IBD non anemici (28)</i>	3.49±4.90
<i>IBD anemici (26)</i>	
IDA (9)	1.55±3.00
IDA + ACD (4)	3.59±5.64
ACD (7)	14.77±13.90
Altre anemie (6)	3.09±3.26
<i>Controlli non anemici (12)</i>	3.80±3.03
<i>Controlli anemici (13)</i>	2.52±3.82
IDA (8)	1.18±1.99
Non IDA (5)	5.66±4.87

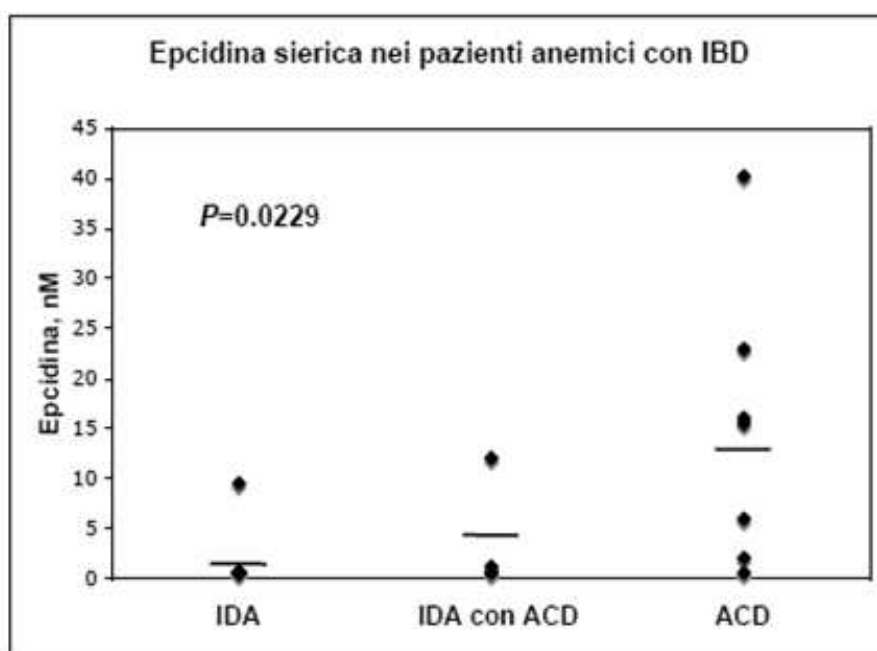


Figura 1. Livelli di epcidina in IDA, IDA con ACD e ACD pura.

Bibliografia

1. Gasche C, Kulnigg S. Intravenous iron in Inflammatory bowel disease. *Seminars in Hematology* 2006;43:S18-S22.
2. Blanc B, Finch C, Hallberg L et al. Nutritional anaemias. Report of a WHO Scientific Group. *WHO Tech Rep Ser* 1968;405:1-40.
3. Stein J, Hartmann F, Dignass AU. Diagnosis and management of iron deficiency anemia in patients with IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7:599-610.
4. Punnonen K, Irjala K, Rajamaki A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 1997;89:1052-1057.
5. Coyne DW. Heparin: clinical utility as a diagnostic tool and therapeutic target. *Kidney Int* 2011;80:240-244.
6. Theurl I, Aigner E, Theurl M et al. Regulation of iron homeostasis in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: diagnostic and therapeutic implications. *Blood* 2009;113:5277-5286.
7. Munoz M, Villar I, Garcia-Erce JA et al. An update on iron physiology. *World J Gastroenterol* 2009;15:4617-4626.
8. Park CH, Valore EV, Waring AJ et al. Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001;276:7806-7810.
9. Krause A, Neitz SE, Magert HJ et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits anti-microbial activity. *FEBS Lett* 2000;480:147-150.
10. Laftah AH, Bala R, Simpson RJ. Effect of heparin on intestinal iron absorption in mice. *Blood* 2004;103(10):3940-3944.
11. Mena NP, Esparza A, Tapia V et al. Heparin inhibits apical iron uptake in intestinal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294:G192-198.
12. Ganz T, Nemeth E. Iron sequestration and anemia of inflammation. *Semin Hematol* 2009;46:387-393.
13. De Domenico I, Lo E, Ward DM et al. Heparin-induced internalization of ferroportin requires binding and cooperative interaction with Jak2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:3800-3805.
14. Semrin G, Douglas S, Fishman MD et al. Impaired intestinal iron absorption in Crohn's disease correlates with disease activity and markers of inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:1101-1106.
15. Oustamanolakis P, Koutroubakis IE, Messaritakis I et al. Serum heparin and proheparin concentrations in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011;23:262-268.
16. Galesloot TE, Vermeulen SH, Geurts-Moespot AJ et al. Serum heparin: reference ranges and biochemical correlates in the general population. *Blood* 2011;117:e218-e225.
17. Arnold J Sangwaiya A, Bhatkal B et al. Heparin and inflammatory bowel disease: dual role in host defense and iron homeostasis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009;21:425-429.