

## STUDIO DELLA FUNZIONE PIASTRINICA NEI PAZIENTI CON SINDROME MIELODISPLASTICA

### **Introduzione**

La sindrome mielodisplastica (MDS) appartiene ad un gruppo eterogeneo di malattie neoplastiche clonali del midollo osseo caratterizzate da displasia trilineare con conseguente citopenia periferica e aumentata incidenza di progressione verso la leucemia acuta<sup>1</sup>

Le complicanze emorragiche possono avere gravi conseguenze nei pazienti con MDS e sono tra le principali cause di morte in questa popolazione. In uno studio del M.D. Anderson Cancer Center su 460 pazienti con MDS deceduti senza progressione a leucemia mieloide acuta, il sanguinamento è stata l'unica causa di morte in 48 di questi pazienti (10%), mentre ha contribuito alla morte in 90 pazienti (20%)<sup>2</sup>. Altri studi riportano che le complicanze emorragiche causano circa il 14-45% dei decessi di pazienti con sindromi mielodisplastiche.

La trombocitopenia, osservata nel 40-65% dei pazienti con MDS, contribuisce alla patogenesi delle complicanze emorragiche<sup>3</sup>, tuttavia, si osservano complicanze emorragiche anche in pazienti con MDS che hanno una conta piastrinica normale<sup>4</sup>. Infatti, la frequenza di emorragie fatali è equamente distribuita tra tutti i quattro gruppi di rischio identificati secondo l'International Prognostic Scoring System (IPSS)<sup>5</sup>, che viene definito sulla base di quattro parametri tra cui la conta piastrinica<sup>6</sup>.

E', quindi, ipotizzabile che anche le alterazioni della funzione piastrinica siano responsabili delle emorragie nei pazienti con MDS con conta piastrinica normale<sup>7,8</sup>. Numerose sono, infatti, le evidenze che documentano che non solo la trombocitopenia, ma anche diverse anomalie della funzionalità piastrinica contribuiscano alle complicanze emorragiche osservate nella maggior parte dei pazienti affetti da MDS studiati<sup>9,10</sup>. Tuttavia, ad oggi, non ci sono studi pubblicati che valutino contemporaneamente diversi parametri di funzionalità piastrinica, come l'aggregazione, la secrezione, il contenuto di granuli piastrinici, la produzione di trombossano (Tx) A2 e i livelli di AMP ciclico (cAMP) sia in condizioni basali e che dopo la stimolazione. È noto che un aumento di quest'ultimo parametro (cAMP), mai valutato prima in pazienti con MDS, può inibire drasticamente la funzionalità piastrinica.

### **Scopo dello studio**

Scopo di questo studio è stato quello di valutare globalmente, *in vitro*, la funzionalità piastrinica dei pazienti con MDS, appartenenti a diverse fasce di rischio IPSS che afferiscono all'ambulatorio di Medicina III dell'AO S. Paolo

### **Popolazione dello studio**

Sono stati arruolati, dopo aver firmato il modulo del consenso informato, 31 pazienti con diagnosi di MDS secondo i criteri WHO 2008, e 48 volontari sani confrontabili per età e sesso con i pazienti dello studio.

Sono stati esclusi dallo studio soggetti:

- con età inferiore ai 18 anni;
- che avevano assunto terapia anticoagulante o antiaggregante piastrinica (es. anti-infiammatori non-steroidi, ticlopidina, dipiridamolo, warfarin) entro 7 giorni prima del prelievo di sangue;
- che avevano abusato di alcool o droga.

### **Disegno dello studio**

Studio caso-controllo.

Per tutti i soggetti arruolati sono state raccolte le informazioni cliniche tra cui la diagnosi clinica, la storia emorragica o trombotica, la categoria di rischio IPSS, la storia familiare e la terapia farmacologica. Per ciascun soggetto è stato prelevato un campione di sangue venoso in EDTA come anticoagulante (3 mL) per la conta delle cellule del sangue; senza anticoagulante (3 mL) per la misura del TxB2 nel siero; in citrato di sodio 3,2% come anticoagulante (30 mL) per lo studio della funzione piastrinica, la misura dei livelli di cAMP intra-piastrinico e per la quantificazione delle glicoproteine di membrana piastriniche.

## Risultati

I soggetti con diagnosi di MDS presentano caratteristiche demografiche sovrapponibili a quelle dei controlli sani.

L'esame emocromocitometrico, effettuato mediante contaglobuli, rivela che i pazienti MDS presentano una riduzione statisticamente significativa di RGB (globuli rossi), Hgb (emoglobina) Hct (ematocrito) e piastrine rispetto ai controlli sani (Tabella 1).

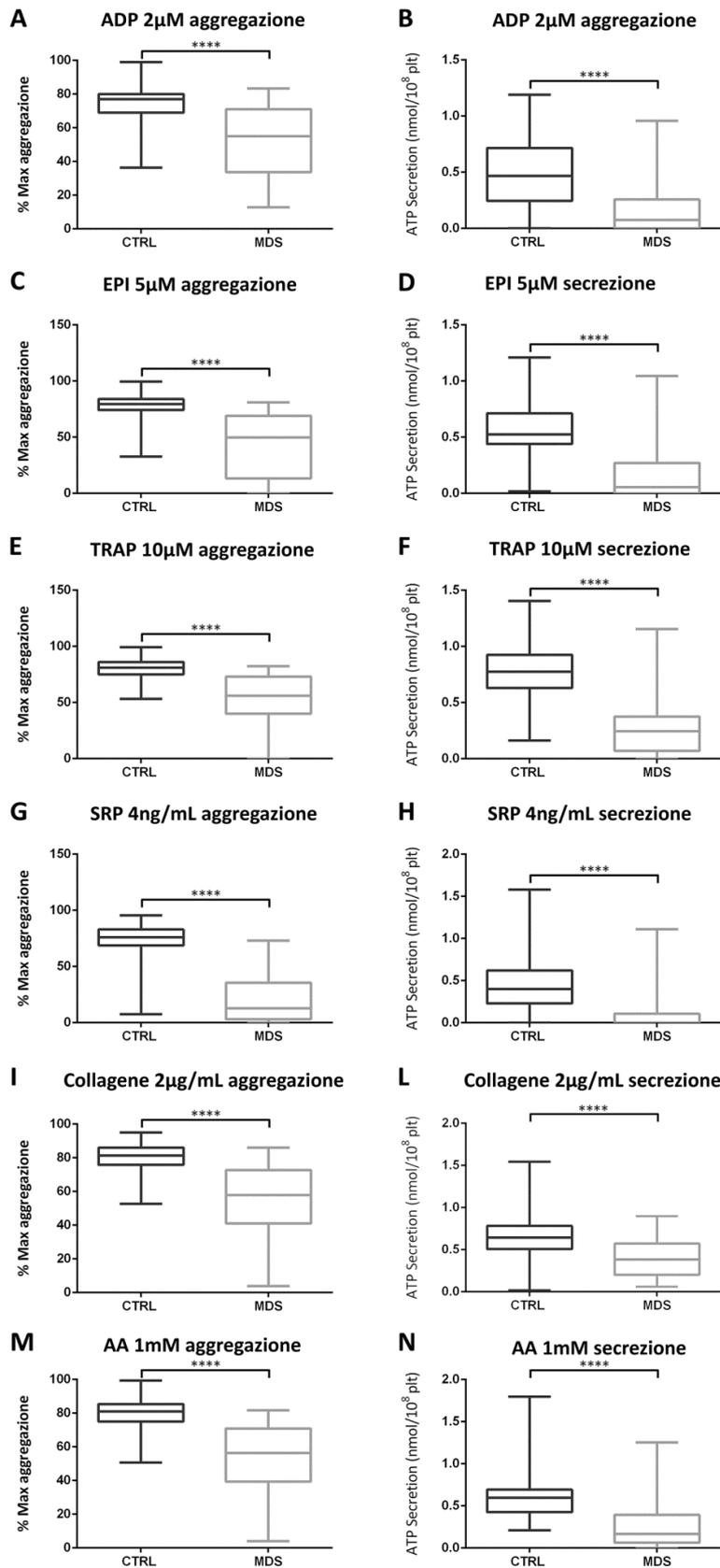
	<b>Controls</b> (Mean ± SD)	<b>MDS patients</b> (Mean ± SD)	<b>p</b>
<b>WBC</b> ( $10^3/\mu\text{L}$ )	7,1 ± 2,0	7,1 ± 6,3	0,9543
<b>RBC</b> ( $10^6/\mu\text{L}$ )	4,7 ± 0,5	3,9 ± 1,2	<0,0001
<b>Hgb</b> (g/dL)	13,7 ± 1,6	11,5 ± 3,3	0,001
<b>Hct</b> (%)	41,0 ± 4,5	36,2 ± 12,1	0,0161
<b>MCV</b> (fL)	87,2 ± 6,9	88,2 ± 20,8	0,7614
<b>MCH</b> (pg)	29,3 ± 3,0	30,5 ± 4,6	0,1733
<b>PLT</b> ( $10^3/\mu\text{L}$ )	233 ± 39	156 ± 112	<0,0001
<b>MPV</b> (fL)	8,6 ± 0,9	8,4 ± 0,8	0,3483

**Tabella 1:** emocromo di pazienti MDS e controlli sani. T- test, n=31 per MDS, n=48 per CTRL.

Sono state successivamente valutate l'aggregazione e la secrezione piastrinica in citrato-PRP (plasma ricco di piastrine) mediante lumi-aggregometria.

Sono stati testati i seguenti agonisti: ADP (adenosina difosfato), epinefrina, TRAP (peptide attivante il recettore della trombina), SRP (peptide specifico per la glicoproteina GPVI, uno dei recettori del collagene), collagene e AA (acido arachidonico).

I pazienti MDS, rispetto ai controlli sani, mostrano una riduzione statisticamente significativa dell'aggregazione e della secrezione in risposta a tutti gli agonisti testati (Figura 1). Inoltre non c'è correlazione tra numero di piastrine nel PRP e la percentuale di aggregazione, indicando quindi che i bassi valori osservati nei pazienti MDS non sono dovuti ad una riduzione del numero di piastrine, ma sembrano attribuibili ad un difetto piastrinico proprio dei pazienti MDS.



**Figura 1:** aggregazione e secrezione piastrinica indotta da (A e B) ADP 2 $\mu$ M (adenosina difosfato), (C e D) EPI 5 $\mu$ M (epinefrina), (E e F) TRAP 10  $\mu$ M (peptide attivante il recettore della trombina), (G e H) SRP

4ng/mL (ligando specifico di GPVI), (I e L) Collagene 2μM e (M e N) AA 1Mm (acido arachidonico) in pazienti MDS e controlli sani (CTRL). T- test, \*\*\*\*p<0.0001, n=31 per MDS, n=48 per CTRL.

Il contenuto dei granuli-δ è stato valutato misurando la quantità di ADP e ATP nelle piastrine. I pazienti con diagnosi di MDS presentano un contenuto di ATP nei granuli-δ significativamente maggiore rispetto ai controlli sani, mentre nessuna differenza è stata riscontrata per quanto riguarda il contenuto di ADP. Il rapporto ATP/ADP risulta essere significativamente maggiore nei pazienti MDS rispetto ai controlli sani (Tabella 2).

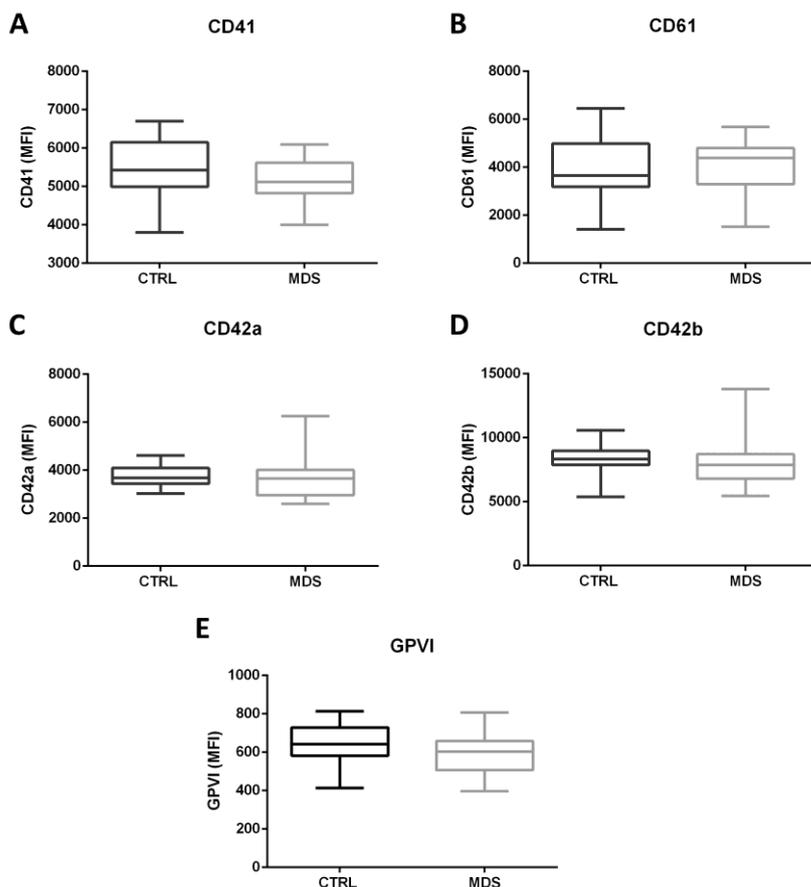
	<b>Controlli</b> (Media ± DS)	<b>MDS pazienti</b> (Media ± DS)	<b>p</b>
<b>ATP</b> (nmol/10 <sup>8</sup> piastrine)	7,98 ± 1,91	10,53 ± 5,50	0,0135
<b>ADP</b> (nmol/10 <sup>8</sup> platelets)	3,06 ± 0,90	2,87 ± 3,19	0,7353
<b>ATP/ADP</b>	2,68 ± 0,41	8,13 ± 11,45	0,0073

**Tabella 2:** contenuto dei granuli-δ in piastrine di pazienti MDS e di controlli sani. T- test, n=30 per MDS, n=44 per CTRL.

È stata valutata l'espressione delle seguenti glicoproteine (gp) di membrana delle piastrine mediante citofluorimetria:

- GPIIb, con anticorpo anti-CD41, GPIIIa, con anticorpo anti-CD61, che associate formano il complesso gpIIb/IIIa in grado di legare il fibrinogeno;
- GPIX, con anticorpo anti-CD42a, e GPIb, con anticorpo anti-CD42b, che con GPV formano il complesso gpIb/gpIX/gpV e sono in grado di legare il fattore di von Willebrand;
- GPVI, uno dei recettori dei collagene, importante nell'attivazione e aggregazione piastrinica con un anticorpo specifico anti-GPVI.

Nessuna differenza statisticamente significativa nell'espressione delle glicoproteine di membrana (GPIIb, GPIIIa, GPIX, GPIb e GPVI) è stata riscontrata tra pazienti MDS e controlli sani (Figura 2).



**Figura 2:** espressione delle glicoproteine di membrana (A) GPIIb, (B) GPIIIa, (C) GPIX, (D) GPIb e (E) GPVI in pazienti MDS e di controlli sani (CTRL). Dati espressi come MFI (intensità media di fluorescenza). T-test, n=24 per MDS, n=33 per CTRL.

Dati preliminari sui livelli di trombossano B<sub>2</sub> sierico, misurato tramite kit ELISA, non mostrano differenze tra i pazienti MDS e i controlli sani.

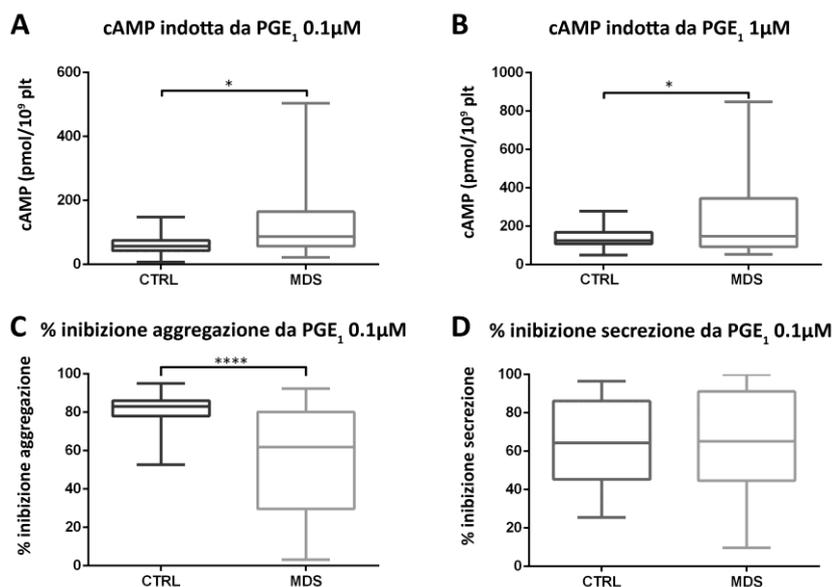
Infine sono stati valutati i livelli intra-piastrinici di cAMP, un inibitore della funzionalità piastrinica, in PRP in condizioni basali e dopo 2 minuti di incubazione *in vitro* con PGE<sub>1</sub> (prostaglandina E<sub>1</sub>) 0,1 μM e 1 μM sono stati misurati mediante saggio ELISA.

I valori di cAMP basali non mostrano differenze significative tra pazienti e controlli (dati non riportati). In seguito a stimolazione con la PGE<sub>1</sub> (0.1 uM e 1 uM) sia i controlli sani che i pazienti MDS mostrano un aumento della concentrazione di cAMP intra-piastrinico rispetto ai valori basali (dati non mostrati). Tuttavia la differenza tra i valori di cAMP basale e quelli dopo stimolo nei pazienti MDS è statisticamente maggiore rispetto ai controlli sani (Figura 3A e 3B).

È stata quindi valutata capacità della PGE<sub>1</sub> di inibire l'aggregazione e la secrezione piastrinica indotta da collagene in citrato-PRP mediante lumi-aggregometria. I dati sono stati calcolati come % di inibizione dell'aggregazione o della secrezione

piastrinica.

Parallelamente la PGE<sub>1</sub> 0.1 μM è in grado di inibire l'aggregazione piastrinica indotta da collagene maggiormente nei pazienti MDS rispetto ai controlli, mentre nessuna differenza è stata evidenziata tra pazienti e controlli sulla secrezione piastrinica (Figura 3C e 3D). Questi dati confermano che la PGE<sub>1</sub> induce una maggiore produzione di cAMP con una conseguente maggiore inibizione dell'aggregazione piastrinica rispetto ai controlli sani.



**Figura 3:** livelli intra-piastrinici di cAMP indotti da PGE<sub>1</sub> 0.1 μM (A) e PGE<sub>1</sub> 1 μM (B). Dati espressi come Δ(cAMP in condizioni basali–cAMP prodotto dopo stimolo con PGE<sub>1</sub>). % di inibizione dell'aggregazione (C) e della secrezione (D) piastrinica da parte della PGE<sub>1</sub> 0.1 μM in risposta al collagene. T- test, \*p<0.05, \*\*\*\*p<0.0001, n=28 per MDS, n=40 per CTRL.

## Conclusioni

I risultati di questo studio mostrano che nei pazienti MDS la funzionalità piastrinica è alterata patologicamente indipendentemente dalla conta piastrinica e a fronte di una normale espressione delle glicoproteine di membrana. La maggiore sensibilità alla PGE<sub>1</sub> riscontrata nei pazienti MDS supporta la nostra ipotesi sul coinvolgimento dell'cAMP intrapiastrinico, tuttavia saranno necessari altri studi per comprendere il meccanismo molecolare alla base.

## Referenze

<sup>1</sup> Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick H et al. The French–American–British (FAB). Co-operative group: proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. Brit J of Haemtol 1982; **51:189–199**.

<sup>2</sup> Kantarjian H1, Giles F, List A, Lyons R, Sekeres MA, Pierce S, Deuson R, Leveque J. The incidence

---

and impact of thrombocytopenia in myelodysplastic syndromes. *Cancer*. 2007 May 1; **109(9):1705-14**.

<sup>3</sup> Hofmann WK, Ottmann OG, Ganser A, Hoelzer D. Myelo-dysplastic syndrome: clinical features. *Semin Hematol* . 1996; **33:177–185**.

<sup>4</sup> Doll DC, List AF. Myelodysplastic syndromes. *West J Med*. 1989;151:161–167.

<sup>5</sup> Judith Neukirchen, Sabine Blum, Andrea Kuendgen, Corinna Strupp, Manuel Aivado, Rainer Haas, Carlo Aul, Norbert Gattermann, Ulrich Germing. Platelet counts and haemorrhagic diathesis in patients with myelodysplastic syndromes. *European Journal of Haematology* 2009; **83:477–482**.

<sup>6</sup> Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012; **120:2454–65**.

<sup>7</sup> Maldonado JE, Pierre RV. The platelets in preleukemia and myelomonocytic leukemia. Ultrastructural cytochemistry and cytogenetics. *Mayo Clin Proc*. 1975; **50:573–587**.

<sup>8</sup> Lintula R, Rasi V, Ikkala E, Borgstrom GH, Vuopio P. Plate-let function in preleukaemia. *Scand J Haematol*. 1981; **26:65–71**.

<sup>9</sup> Mittelman M, Zeidman A. Platelet function in the myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol*. 2000 Feb; **71(2):95-8**.

<sup>10</sup> Manoharan A1, Brighton T, Gemmell R, Lopez K, Moran S, Kyle P. Platelet dysfunction in myelodysplastic syndromes: a clinicopathological study. *Int J Hematol*. 2002 Oct; **76(3):272-8**.