

Definizione dello stato del ferro: ruolo del recettore solubile della transferrina

Claudia Merlotti*, Silvia Sarpau*, Anna Pagani*, Umberto Occhiuzzi#

*Università degli Studi di Milano, Scuola di Specializzazione in Biochimica Clinica

#Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Civile di Avezzano, ASL Avezzano-Sulmona, 67051 Avezzano (AQ)

ABSTRACT

Definition of iron status: role of soluble transferrin receptor

The subject of this review is the role of soluble transferrin receptor (sTfR) to define iron status. After a description of iron metabolism, the biochemistry and regulation of soluble transferrin receptor are dealt with. Subsequently we discuss the physio-pathology of the molecule, its biochemical clinical role and then the analytical methodology used for its measurement. Finally, we mention some data concerning the reference intervals and the biological variation of sTfR.

RIASSUNTO

Questo rassegna ha come argomento il ruolo del recettore solubile della transferrina (sTfR) nella definizione dello stato del ferro. Dopo una descrizione del metabolismo del ferro, si affrontano la biochimica e la regolazione del recettore solubile della transferrina. Successivamente si trattano la fisiopatologia di tale analita ed il suo ruolo biochimico clinico, per terminare con la metodologia analitica utilizzabile per la sua misura. Vengono infine menzionati alcuni dati relativi agli intervalli di riferimento ed alla variabilità biologica dell'sTfR.

INTRODUZIONE

Il ferro è un elemento essenziale per ogni forma di vita, poiché gioca un ruolo chiave in un ampio spettro di processi biologici (1). La regolazione del bilancio del ferro è critica, in quanto sia la sua mancanza sia il suo eccesso possono essere deleteri per le cellule dell'organismo. I parametri biochimici abitualmente utilizzati per la definizione dello stato del ferro comprendono sideremia, transferrina sierica, saturazione della transferrina, ferritina sierica ed indici ematologici quali emoglobina (Hb), ematocrito (Ht), MCV, MCHC, conta reticolocitaria (2). A tali parametri va incluso il recettore solubile della transferrina (sTfR), in grado di definire lo stato di ferro nell'organismo senza essere influenzato dallo stato infiammatorio, come invece accade per alcuni parametri sopra citati come la ferritina. Il recettore solubile della transferrina (sTfR), già oggetto di precedenti rassegne (1,3), verrà da noi trattato nei suoi aspetti di biochimica, fisiopatologia clinica e diagnostica di laboratorio.

METABOLISMO DEL FERRO

Il contenuto totale di ferro in un soggetto sano presenta

limiti relativamente stretti. La perdita di ferro dall'organismo (maschio adulto), pari a circa 1 mg/die, è precisamente equilibrata dal suo assorbimento intestinale. Tale perdita è dovuta a sfaldamento di cellule epiteliali del tratto gastroenterico, delle vie urinarie e della cute. Nelle donne altre vie di perdita sono rappresentate dal flusso mestruale, dalla gravidanza, dall'allattamento. Il contenuto di ferro nell'organismo è di circa 50-55 mg/Kg di peso corporeo nell'uomo e di circa 30-40 mg/Kg nella donna. Questo comporta, in quest'ultima, una più alta probabilità di sviluppare sideropenia rispetto all'uomo.

Il ferro dell'organismo è contenuto, per la maggior parte, nell'eme dell'emoglobina e, in quantità più ridotte, nella mioglobina, nei citocromi della catena respiratoria mitocondriale e sotto forma di deposito nei tessuti. Nel plasma se ne trova solo una piccola quantità legata alla transferrina. Il ferro incorporato nell'emoglobina è riutilizzato in continuazione mediante un ciclo interno (ciclo del ferro), il cui nodo centrale è costituito dalla transferrina. Tramite questa molecola, il ferro è trasportato dal plasma ai precursori eritrocitari midollari che sintetizzano l'emoglobina, e una volta giunti a maturazione passano in circolo come eritrociti. Al termine del loro ciclo vitale di 120 giorni, gli eritrociti sono fagocitati dai macrofagi presenti

Abbreviazioni: Hb, emoglobina; Ht, ematocrito; MCV, volume corpuscolare medio; MCHC, contenuto corpuscolare medio di emoglobina; sTfR, recettore solubile della transferrina; TfR, recettore della transferrina; IRES, elementi responsivi al ferro; IRP1, proteina regolatoria del ferro 1; IRP2, proteina regolatoria del ferro 2; NO, ossido nitrico; eALAS, 5-aminolevulinato sintetasi eritroide; IDE eritropoiesi ferro carente; IDA, anemia da carenza di ferro; ACD, anemia delle malattia croniche; TNF α fattore di necrosi tumorale α ; IL-1, interleuchina 1; INF γ , interferone γ ; rHuEPO, eritropoietina umana ricombinante; EPO, eritropoietina; VES, velocità di eritrosedimentazione; PCR, proteina C reattiva; TRC, complesso TfR-transferrina

soprattutto a livello splenico. Qui l'enzima eme-ossigenasi estrae dall'emoglobina dei globuli rossi il ferro, che viene in parte immagazzinato sotto forma di ferritina ed emosiderina e in parte legato alla transferrina con cui ritorna al plasma per completare il ciclo. Per far fronte alla richiesta variabile di ferro, i macrofagi conservano un pool di riserva di ferritina ed emosiderina. In condizioni normali, la quantità di ferro che entra nel macrofago è pari a quella che lo lascia e vi è ridotto scambio tra il ferro appena liberato dall'eme e il ferro presente nel pool di riserva. Il ferro degli eritrociti appena distrutti attraverso il macrofago compare nel plasma legato alla transferrina. Nel caso in cui la produzione di eritrociti sia maggiore della loro distruzione, il ferro che abbandona il macrofago supera quello che vi entra. Se invece la distruzione eritrocitaria supera la produzione, la quantità di ferro che entra nel macrofago è maggiore di quella che lo lascia così che il ferro è depositato nelle riserve. La mobilitazione del ferro dal pool di riserva è influenzata da varie condizioni patologiche quali infezioni, flogosi, neoplasie.

Nel maschio adulto normale una quota di circa 30 mg di ferro compie questo ciclo quotidianamente. Un'altra piccola quota, di 1-2 mg, abbandona quotidianamente il plasma e penetra nel fegato e in altri tessuti per la sintesi di emoproteine quali citocromi e mioglobina. L'apporto medio di ferro in una dieta mista è di circa 10-30 mg/die, ma solo il 5-10 % di questo, pari ad 1 mg, è assorbito quotidianamente così da equilibrare esattamente la quantità perduta. L'assorbimento di ferro aumenta se i suoi depositi nell'organismo sono ridotti o se l'eritropoiesi è accelerata, mentre diminuisce in condizioni di sovraccarico di ferro o di ipoplasia eritroide. L'assorbimento del ferro avviene principalmente a livello del digiuno e segue due vie ben distinte, una per il ferro contenuto nell'eme, e l'altra per i sali di ferro ferrosi e ferrici. Il ferro dell'eme deriva dall'emoglobina, dalla mioglobina e da tutte le altre emoproteine dei cibi di origine animale. L'esposizione all'acido cloridrico e alle proteasi del succo gastrico libera l'eme dalla sua apoproteina; l'eme liberato è captato rapidamente dalle cellule epiteliali gastroenteriche che ne rendono il ferro disponibile. L'assorbimento del ferro dell'eme è poco influenzato dagli altri componenti dietetici. La biodisponibilità del ferro dietetico non eme, invece, è molto variabile e dipende dallo stato ossidativo, dalla solubilità del ferro e dalla presenza nella dieta di sostanze chelanti. Al pH acido dello stomaco sono solubili sia i sali ferrosi sia ferrici; nel duodeno, dove aumenta il pH, il ferro ferrico è rapidamente trasformato in idrossidi ferrici insolubili. Alcuni composti, quali l'acido ascorbico, possono favorire l'assorbimento del ferro riducendo parte del ferro ferrico a ferroso, che rimane solubile anche a pH neutro. Componenti dietetiche quali il citrato possono aumentare la solubilità del ferro inorganico e quindi il suo assorbimento, mentre i fitati, le fibre detergenti neutre ed altre sostanze presenti nei cereali, nei grani e nella farina lo riducono legandolo sotto forma di complessi relativamente insolubili (4). La captazione di ferro dal lume intestinale è legata ad una proteina chiamata DMT 1 (trasportatore di metallo divalente 1), che agisce da trasportatore transmembrana.

to nella cellula intestinale, il ferro può essere incorporato nella ferritina, e rimanere nel citosol, oppure passare nel plasma come ferro ferrico legato alla transferrina (5). Il ferro immagazzinato come ferritina non raggiunge il plasma ma è perduto dall'organismo quando la cellula della mucosa intestinale va incontro a desquamazione, dopo la sua breve vita di 3-4 giorni.

È possibile identificare nell'organismo umano due diversi compartimenti del ferro, funzionale e di deposito. Il compartimento funzionale è coinvolto nel metabolismo cellulare. Il ferro di questo comparto è contenuto nell'emo-globina e nella mioglobina, deputate rispettivamente al trasporto e al deposito dell'ossigeno nei tessuti. Esso entra a far parte dei citocromi della catena respiratoria e dell'enzima ribonucleotide reductasi necessario per la produzione di DNA. Il compartimento di deposito è costituito dal ferro sequestrato nei tessuti sotto forma di ferritina ed emosiderina. Questo ferro dei depositi rappresenta quello assorbito in eccesso rispetto a quanto richiesto dal compartimento funzionale. I due compartimenti sono tra loro collegati da un sistema di trasporto rappresentato dalla glicoproteina carrier transferrina sintetizzata a livello epatico.

La transferrina, la cui concentrazione nel plasma di soggetti adulti normali è di circa 200-360 mg/dL, è una glicoproteina monomerica di circa 80 kDa costituita da una catena polipeptidica N glicosilata di 679 aminoacidi. La molecola della transferrina comprende due domini omologhi, N- e C- terminali, ognuno contenente un sito di legame per il ferro. Le catene glucidiche sono attaccate al dominio C terminale. La sua principale funzione è il trasporto del ferro tra i siti di assorbimento, deposito e utilizzazione.

Il trasporto del ferro, attraverso la membrana cellulare, avviene tramite un meccanismo di endocitosi mediata dal recettore per la transferrina (TfR), a seguito del legame transferrina-TfR. Questo si verifica in particolare modo nelle cellule che utilizzano ferro per la sintesi di emoglobina (eritroblasti). Il ferro entrato nella cellula può andare al mitocondrio, dove è incorporato per via enzimatica nella protoporfirina a formare l'eme, oppure essere depositato sotto forma di ferritina (4,6). La ferritina è una proteina sferica costituita da 24 subunità che circondano una cavità centrale che può immagazzinare fino a 4000 atomi di ferro per molecola. È stata dimostrata l'esistenza di numerose isoferritine con punti isoelettrici assai diversi. Esistono due differenti subunità di ferritina, H (subunità principale del cuore) e L (subunità principale del fegato), che possono essere presenti in quantità diverse all'interno di una data molecola di ferritina condizionandone l'eterogeneità. Piccole quantità di ferritina povere di ferro circolano nel plasma e sono in diretto rapporto con i depositi organici di ferro. I valori normali variano da 12 a 325 ng/mL con una media di circa 125 per gli uomini e 55 per le donne. Dalla ferritina deriva l'emosiderina, aggregato di ferro insolubile con un elevato rapporto ferro/proteina (7).

BIOCHIMICA E REGOLAZIONE DEL RECETTORE DELLA TRANSFERRINA (TFR)

Il TfR umano è una glicoproteina dimerica transmem-

brana, costituita da due identici monomeri di 95 kDa legati da una coppia di ponti disolfuro. Ogni monomero comprende 760 aminoacidi organizzati in un dominio citoplasmatico di 61 aminoacidi, un segmento transmembrana di 28 aminoacidi ed un dominio extracellulare di 671 aminoacidi. Il dominio citoplasmatico è richiesto per un appropriato movimento intracellulare e la sequenza peptidica tirosina-treonina-arginina-fenilalanina, in questa regione, è risultata essere il segnale per l'endocitosi attuata attraverso vescicole rivestite.

Alcuni aminoacidi rappresentano punti chiave: la serina in posizione 24 è un sito di fosforilazione; il dominio transmembrana, costituito principalmente da aminoacidi idrofobici, funziona come peptide segnale per la traslocazione attraverso il reticolo endoplasmico e come "ancora" di membrana per la proteina e la cisteina in posizione 52 è il principale sito di acilazione post traduzionale con acidi grassi. I siti di N-glicosilazione sono stati identificati a livello dei residui aminoacidici 251, 317 e 727 nel dominio extracellulare, mentre la treonina in posizione 104 è stata identificata come l'unico sito di O-glicosilazione. Questi glicani potrebbero giocare un ruolo nella traslocazione del recettore alla superficie cellulare e nel facilitare la sua interazione con la transferrina. Le cisteine in posizione 89 e 98 nel dominio extracellulare sono sede dei ponti disolfuro che legano insieme gli omodimeri del recettore. A livello delle arginine 100 e 121, il dominio extracellulare ha un sito serina proteasi sensibile e presenta una porzione C terminale di 85 kDa che può legare una molecola di transferrina carica di ferro. Ogni recettore dimerico può legare due transferrine, probabilmente una ad ogni subunità. Il gene per il recettore è localizzato sul cromosoma 3.

Tutte le cellule dell'organismo esprimono, ad un certo punto dello sviluppo, recettori della transferrina sulla loro superficie. L'espressione maggiore si ha nei tessuti che richiedono un importante e continuo rifornimento di ferro. Nell'uomo, il 75% del numero totale dei recettori per la transferrina sono stati ritrovati a livello dei precursori eritroidi nel midollo osseo. Gli altri due tessuti che esprimono un significativo numero di recettori per la transferrina sono il fegato e la placenta.

Il ferro entra negli eritroblasti tramite endocitosi mediata dal recettore per la transferrina. Dopo il legame transferrina-recettore i complessi sono concentrati in vescicole rivestite e internalizzati. Nella cellula il pH delle vescicole endocitiche è abbassato da una pompa protonica ATP dipendente a circa 5.5, essenziale per la dissociazione del ferro dalla transferrina. In aggiunta all'acidificazione, un cambiamento conformazionale della transferrina dopo il suo legame col TfR può modificarne l'affinità per il ferro. Infine il rilascio del ferro può essere facilitato da agenti chelanti a basso peso molecolare come ATP. Una volta rilasciato nella cellula, il ferro, possibilmente ridotto, è trasportato tramite un meccanismo carrier ancora sconosciuto e legato a composti a basso peso molecolare. Non si conosce il meccanismo con cui il ferro è indirizzato alla sua finale destinazione: deposito nella ferritina, incorporazione nell'emoglobina o in enzimi ferro dipendenti. L'ATP, come trasportatore del ferro, potrebbe giocare un ruolo importante nel suo trasporto intracellulare. L'apotransfer-

rina rimane legata al TfR nella vescicola endocitica a basso pH e il complesso viene riciclato alla superficie cellulare dove, a pH neutro, l'apotransferrina si dissocia dal TfR.

Dal recettore cellulare della transferrina (TfR) deriva la corrispondente forma solubile (sTfR), che si ritrova nel siero umano. sTfR reagisce con anticorpi specifici per la porzione carbossiterminale, ma non per quella aminoterminale. L'analisi della sequenza aminoacidica ha rivelato che sTfR è un frammento monomero del dominio extracellulare del TfR, derivante da taglio proteolitico tra arginina 100 e leucina 101, avente massa molecolare di 85 kDa.

Nel ciclo endocitico, una minore quantità di TfR endocitata è processata in modo differente. In questo percorso l'endosoma contenente i complessi TfR- ligando matura, divenendo un endosoma multivescicolare. Quest'ultimo contiene vescicole multiple, chiamate esosomi, che sono rilasciate per esocitosi. La proteolisi del TfR è mediata da una proteasi serinica associata alla membrana, localizzata prevalentemente sulla superficie dell'esosoma. La superficie cellulare potrebbe essere un sito alternativo per il taglio del TfR che avviene alla superficie dell'esosoma all'interno della cellula, presumibilmente a livello dell'endosoma multivescicolare. Successivamente, sTfR è rilasciato per esocitosi e circola sotto forma di complesso legato alla transferrina (1).

Nonostante non siano disponibili dati sul meccanismo d'eliminazione degli sTfR, si può ipotizzare che il loro catabolismo sia associato a quello della transferrina. Molti studi dimostrano l'esistenza di una relazione costante tra i livelli di TfR cellulari e la concentrazione di sTfR (8). Poiché TfR è prevalentemente espresso nei progenitori delle cellule eritroidi (eritroblasti), si è pensato che i livelli di sTfR possano riflettere il turnover di TfR a livello delle cellule eritroidi determinato da proliferazione cellulare e richiesta di ferro. Conseguentemente, cambiamenti nei livelli di sTfR sono stati osservati in varie condizioni cliniche associate con alterazioni nell'eritropoiesi e/o nello stato del ferro nell'organismo (1,3).

L'espressione del recettore della transferrina (TfR) controlla l'assorbimento del ferro da parte delle cellule che lo esprimono. Quando le riserve di ferro intracellulare sono esaurite (ferritina $\leq 12 \mu\text{g/L}$) la quantità di TfR espressa è maggiore. L'affinità del TfR per la transferrina dipende dallo stato di saturazione di quest'ultima. Poiché 80-95% delle molecole del recettore della transferrina sono localizzate sulle cellule eritropoietiche, la concentrazione di TfR e di conseguenza anche quella di sTfR riflette la richiesta di ferro di tali cellule.

Come per altri marcatori dello stato del ferro, in condizioni di carenza di ferro la concentrazione di sTfR nel siero aumenta ancora prima che la concentrazione d'emoglobina diminuisca significativamente. L'aumento di TfR a livello cellulare è regolato, in condizioni di carenza di ferro, da interazioni post trascrizionali tra strutture di mRNA tipo loop, chiamate elementi responsivi al ferro (IREs), e specifiche proteine citoplasmatiche, conosciute come proteine regolatorie del ferro (IRP1 e IRP2). IRP1 è una proteina bifunzionale che può agire sia come aconitasi citoplasma-

tica, sia come proteina legante IRE. La conversione di IRP1 nella forma legante IRE si verifica durante deprivazione cellulare di ferro, stress ossidativi e in presenza di ossido nitrico (NO). Questo è probabilmente legato alla rimozione di un cluster centrale Fe-S della proteina, che causerebbe una modificazione allosterica nella sua conformazione. In queste condizioni, IRP lega con alta affinità le IREs presenti a livello della regione 5' non tradotta degli mRNA per le catene H e L della ferritina e della 5 amino-levulinato sintasi eritroide (eALAS), causando repressione della loro traduzione. Al contrario, quando IRP si lega a IREs presenti a livello della regione 3' non tradotta del recettore della transferrina (TfR), aumenta la stabilità di questo mRNA, proteggendolo dalla digestione da parte di RNAasi e portando ad un'aumentata espressione di TfR a livello cellulare. Un accresciuto rifornimento intracellulare di ferro metabolicamente attivo ricostituisce l'attività aconitica di IRP1 e degrada IRP2, annullando la loro funzione di legare IREs. L'effetto inibente di IRPs sulla traduzione di ferritina ed eALAS e l'aumentata stabilità dell'mRNA di TfR sono invertiti, causando deposito e consumo di ferro e riducendo l'ingresso di ferro nella cellula. Trattamenti con eritropoietina umana ricombinante provocano un incremento dell'attività legante IREs inducendo un aumento dei livelli dell'mRNA del TfR. Questo determina un incremento della sua espressione a livello cellulare e conseguente aumentato ingresso di ferro a livello delle cellule eritroidi (9). Anche la somministrazione di acido ascorbico sembra modificare la concentrazione di sTfR e ferritina plasmatica. Infatti, a livello intracellulare, l'acido ascorbico favorisce la trascrizione ferro indotta della ferritina attraverso la conversione di IRP dalla forma legante RNA ad aconitasi. L'acido ascorbico, inoltre, ritarda la degradazione della ferritina bloccandone la digestio-

ne lisosomiale e favorendone la trasformazione in emoderina. Nell'uomo, la somministrazione orale di acido ascorbico incrementa l'assorbimento di ferro non eme dalla dieta, comportando un incremento della sideremia in soggetti con sovraccarico di ferro e deficienza di acido ascorbico. Pertanto la somministrazione di acido ascorbico, per i meccanismi sopra descritti, farà diminuire la concentrazione di sTfR ed aumentare quella di ferritina. (10).

FISIOPATOLOGIA CLINICA

Il recettore solubile della transferrina è in grado di identificare differenti patologie implicanti variazioni nello stato del ferro (Tabella 1).

Per quanto riguarda la carenza di ferro sono identificabili tre stadi. Nel primo stadio si verifica una riduzione del compartimento di deposito, evidenziato da una diminuzione di ferritina sierica associata a normali livelli di sTfR ed emoglobina. Nel secondo stadio, definito come eritropoiesi ferro carente (IDE), inizia a svilupparsi una carenza del compartimento funzionale, evidenziata da un aumento compensatorio dei livelli di TfR cellulare e del corrispondente recettore solubile nel siero. In questo stadio la ferritina è diminuita e l'emoglobina resta nella norma. Dalla progressiva deplezione del compartimento funzionale si giunge al terzo stadio, rappresentato da anemia sideropenica franca (IDA) evidenziata dalla caduta del livello di emoglobina del sangue. La concentrazione di sTfR può pertanto descrivere lo stato di ferro funzionale, mentre la ferritina riflette quello dei depositi del ferro (11).

Non essendo la concentrazione di sTfR influenzata da reazioni di fase acuta, da disordini funzionali acuti del

Tabella 1

Concentrazione sierica del recettore solubile della transferrina (sTfR) in varie patologie

Concentrazione di sTfR	Condizioni cliniche
Aumentata	Aumentata proliferazione eritroide: emolisi anemia emolitica autoimmune sferocitosi ereditaria β talassemia/emoglobina E malattia da emoglobina H anemia a cellule falciformi policitemia vera Diminuiti depositi tissutali di ferro: anemia sideropenica
Normale o aumentata	mielofibrosi sindrome mielodisplastica leucemia linfatica cronica
Normale	emocromatosi leucemia mieloide acuta e cronica neoplasia linfoidi tumori solidi
Diminuita	anemia da malattie croniche insufficienza renale cronica anemia aplastica periodo post trapianto di midollo osseo

fegato e da tumori maligni, è possibile utilizzarla per differenziare un'anemia da malattia cronica (ACD), da una dovuta a carenza di ferro (IDA) (12-15). Si definisce anemia da malattie croniche (ACD) quella che accompagna infezioni croniche, infiammazioni e neoplasie. Essa rappresenta la più comune forma di anemia in pazienti anziani ospedalizzati (16,17). L'ACD è caratterizzata da bassi livelli di sideremia e normali o aumentati livelli di ferro nei depositi, come dimostrano l'aumentato contenuto di ferro nel fegato e nei fagociti mononucleati e l'incremento dei valori di ferritina sierica. Da ciò risulta che la disponibilità di ferro per gli eritroblasti è diminuita, come dimostra il ridotto numero di sideroblasti nel midollo osseo. In accordo col meccanismo IRP-IRE prima descritto, questo deficit di ferro funzionale potrebbe determinare una up-regulation del numero di TfR sulla superficie degli eritroblasti (18). Nonostante questo, l'espressione di TfR a livello eritroide sembra essere normale o diminuita in pazienti con ACD (19,20). Questo potrebbe essere mediato da effetti inibitori delle citochine come TNF- α , IL-1 e IFN- γ , noti mediatori dell'infiammazione. Infatti, il trattamento di pazienti non anemici affetti da cancro con TNF- α e IFN- γ è accompagnato da un sostanziale decremento della concentrazione di sTfR (21).

Valori elevati di sTfR si trovano, oltre che nell'anemia da carenza di ferro, in condizioni in cui si verifica aumentata proliferazione eritroide come policitemia, anemia emolitica, talassemie (22), sferocitosi ereditaria, anemia a cellule falciformi. Livelli da normali ad accresciuti di sTfR sono stati riscontrati nella sindrome mielodisplastica e nella mielofibrosi (23, 24). In pazienti con tumori solidi e neoplasie maligne ematologiche i livelli di sTfR sono generalmente normali (25), nonostante le cellule maligne frequentemente esprimano un elevato numero di sTfR (26) e lo rilascino "in vitro". Elevati livelli di sTfR sono stati riscontrati in pazienti con leucemia linfatica cronica (25), mentre risultati discordanti sono stati osservati in pazienti con leucemia mieloide acuta (23,24). Diminuiti livelli di sTfR sono stati trovati in condizioni accompagnate da eritropoiesi ipoproliferativa, come nell'insufficienza renale cronica, nell'anemia aplastica e dopo trapianto di midollo osseo. In queste patologie, i livelli di sTfR possono ridursi al 50-60% del valore normale, il che implica che i tessuti non eritroidi contribuiscono significativamente a determinare i livelli di sTfR (23,27). La misura della concentrazione di sTfR può essere pertanto utile per monitorare l'eritropoiesi in varie situazioni cliniche (28). In pazienti sottoposti a trapianto di midollo osseo i livelli di sTfR sono diminuiti durante il periodo aplastico, tornando nella norma alla ripresa dell'eritropoiesi (23,29). È stato ipotizzato che, nei pazienti con cancro trattati con chemioterapia, i livelli di sTfR possano servire come marker precoce di proliferazione eritroide nel periodo di depressione midollare. In pazienti con anemia emolitica autoimmune, un aumento dei livelli di sTfR potrebbe indicare un'esacerbazione ed un incremento dell'emolisi, permettendo un più precoce intervento terapeutico. Nell'anemia che accompagna l'insufficienza renale cronica, i valori di sTfR prima del trattamento, e il loro precoce incremento dopo l'inizio della terapia con rHuEPO, sono utili

per predire la risposta al trattamento (30,31). Allo stesso modo, nei casi di anemia associata a neoplasie maligne, la risposta dell'emoglobina a rHuEPO potrebbe essere predetta da un iniziale incremento dei livelli di sTfR (32,33). Comunque, in pazienti in terapia con rHuEPO, sTfR perde la sua specificità nell'identificare condizioni di deficienza marziale, dal momento che un aumento dell'eritropoiesi incrementa da sé i livelli di sTfR (31).

La rHuEPO somministrata a scopo terapeutico o di doping sportivo svolge un'azione identica a quella dell'eritropoietina fisiologica. In laboratorio è difficile differenziare la EPO fisiologica (di produzione endogena) dalla rHuEPO esogena, se non ricorrendo alle differenti caratteristiche chimico-fisiche delle due molecole, dovute alla glicosilazione post-traduzionale cui la EPO endogena va incontro, evidenziabili con tecniche elettroforetiche (34). L'applicazione di tale principio allo studio della EPO urinaria, mediante isoelettrofocalizzazione/immunoblotting consente di accertare l'assunzione di rHuEPO con elevata confidenza (35). Sfortunatamente l'applicabilità di questo approccio è limitata ad un periodo di 3-6 giorni dall'assunzione del farmaco, a causa della rapida clearance della rHuEPO (35,36). Di conseguenza, fino a poco tempo fa l'unico parametro utilizzabile come indice di somministrazione di EPO era rappresentato dall'ematocrito. Esso però ha una grande variabilità, dovuta a fattori biologici, analitici e preanalitici, tale da non poterne fare un indice certo. In questo contesto l'sTfR rappresenta un parametro biochimico specifico in grado di evidenziare l'attivazione di un nuovo processo eritropoietico e rappresenta un marker per il controllo di questo tipo di doping (37-42).

La misura di sTfR può essere utile per identificare anche il sovraccarico marziale. Questo può essere legato sia ad un aumentato assorbimento di ferro, come nel caso d'inappropriate terapie marziali orali, emocromatosi ereditaria, eritropoiesi massiva inefficace, siderosi dei Bantu (43), sia a trasfusioni multiple di sangue in anemie refrattarie da eritropoiesi inefficace o ipoplastica (6). Tra questi fattori, l'emocromatosi ereditaria rappresenta la causa più frequente di sovraccarico di ferro. Si tratta di un disordine autosomico recessivo nel quale si verifica un aumentato assorbimento di ferro, fino a 10 mg/die negli omozigoti (44), non seguito da un corrispondente aumento delle perdite, con conseguente accumulo di livelli tossici di tale elemento in numerosi organi, danno tissutale e fibrosi. L'effetto tossico dell'accumulo di ferro è dovuto alla presenza di ioni liberi in grado di formare radicali dell'ossigeno. Le principali manifestazioni cliniche sono cirrosi e carcinoma epatico, infarto cardiaco, diabete ed impotenza (5,45-47).

Alla base di tale disordine vi è l'alterazione di un gene, chiamato HLA-H o HFE, che codifica per una proteina, anch'essa chiamata HFE, legante il recettore della transferrina. Tale gene è localizzato sul cromosoma 6. La più comune mutazione comporta la sostituzione di una cisteina con una tirosina in posizione 282 (C282Y) della catena proteica di HFE. Tale mutazione comporta l'incapacità di HFE di associarsi alla 2 microglobulina, considerata un fattore di stabilizzazione, in assenza della quale HFE è

degradata e non può più legarsi al recettore della transferrina. Normalmente HFE inibisce parzialmente il rilascio di ferro dalla transferrina all'endosoma, e da questo al citoplasma della cellula. La mutazione maggiore C282Y abolisce il sito di legame di HFE con la $\beta 2$ microglobulina, consentendo la degradazione di HFE. In sua assenza il trasporto del ferro nel citoplasma procede senza regolazione negativa.

Un problema ancora maggiore può riguardare l'epitelio intestinale. Si ipotizza che a questo livello HFE agisca negli enterociti indifferenziati delle cripte, precursori dell'orletto a spazzola, in modo tale da regolare la captazione del ferro plasmatico. Ciascuna cellula delle cripte avrebbe la funzione di sensore del carico di ferro dell'organismo, probabilmente allo scopo di programmare la successiva espressione di DMT1. Se la funzione di HFE è persa, il ruolo di sensori di queste cellule risulta compromessa. Quando misurano erroneamente bassi livelli di ferro, le cellule criptiche possono presentare un'aumentata espressione di DMT1, facilitando un aumentato assorbimento del ferro presente nel lume intestinale (5). In questi casi di sovraccarico di ferro, sTfR può presentarsi da normale a diminuito (48-52). Per esempio, nel lavoro di Looker AC e altri, si è visto come i valori medi di sTfR e di log sTfR/ferritina fossero rispettivamente del 10 e del 24 % più bassi nei soggetti con sovraccarico di ferro rispetto ai controlli ($P < 0,002$) (48). In altri studi, invece, la concentrazione di sTfR era nella norma, sia nel caso di emocromatosi ereditaria sia nel caso di sovraccarico di ferro legato alla siderosi dei Bantu (49). I risultati di questo studio sono però difficili da interpretare dato che i soggetti con emocromatosi erano in trattamento per ridurre il sovraccarico di ferro, quando sono state eseguite le misurazioni di sTfR (51). sTfR subisce modificazioni anche in corso di gravidanza, mostrando un significativo aumento nel secondo e terzo trimestre per tornare a livelli normali a 12 settimane dopo il parto. E' stato suggerito che questo innalzamento dei livelli di sTfR rifletta un'aumentata eritropoiesi (52).

RUOLO BIOCHIMICO CLINICO DELL'STfR

Le metodiche utilizzabili per la definizione dello stato del ferro possono essere distinte nei seguenti gruppi: aspirato midollare, morfologia e indici eritrocitari, misura delle proteine coinvolte nel metabolismo del ferro (53), determinazione della zinco protoporfirina eritrocitaria (54). Anche se la valutazione citochimica del ferro nell'aspirato midollare è considerata il gold standard per determinare lo stato del ferro (13), molti altri metodi meno invasivi e più pratici possono essere utilizzati. La sideremia, la percentuale di saturazione della transferrina e la capacità totale legante il ferro, comunque, mancano di sensibilità e una loro singola determinazione non basta per valutare lo stato del ferro. Misure indirette del compartimento funzionale del ferro, come MCV e la curva di distribuzione dei globuli rossi, hanno lo svantaggio di identificare tardivamente una deficienza di ferro. La ferritina sierica può essere utilizzata

come indicatore dei compartimenti di deposito del ferro perché è il marker che decresce più precocemente in seguito a carenza di ferro. Comunque, poiché la ferritina è una proteina di fase acuta del siero, la sua concentrazione può crescere sproporzionatamente rispetto ai depositi di ferro in corso di infiammazione, infezioni, neoplasia; particolare, questo, che ne limita l'utilità nella diagnosi differenziale tra anemia da carenza di ferro e anemia da malattie croniche (55,56).

La differenziazione tra questi due tipi di anemia, e in particolare la determinazione di una carenza di ferro coesistente in stato infiammatorio, è un comune problema diagnostico nella pratica clinica. L'anemia da malattie croniche può usualmente essere distinta da quella sideropenica attraverso l'esame del contenuto di ferro del midollo osseo. L'assenza di ferro nei depositi indirizza verso un'anemia sideropenica, mentre normalità o aumento degli stessi è compatibile con anemia da malattie croniche. Poiché l'analisi del midollo osseo è invasiva, sarebbe opportuno utilizzare parametri meno invasivi come la ferritina, utile nel valutare i depositi di ferro nell'organismo in assenza di proteine di fase acuta. Purtroppo in corso di infiammazione gli accresciuti livelli di ferritina possono mascherare una concomitante carenza di ferro. Nell'anemia da malattie croniche, i livelli di ferritina usualmente superano i 100 $\mu\text{g/L}$ quando i depositi di ferro sono adeguati, ma possono essere nella norma in presenza di una coesistente sideropenia. Al contrario della ferritina sierica, sTfR non rientra nelle proteine di fase acuta e non è correlato con parametri infiammatori come VES e PCR. Ne deriva che nella valutazione dell'anemia la combinazione di sTfR elevato e ferritina normale o elevata orienta verso un'alta probabilità di anemia sideropenica, mentre la combinazione di sTfR normale e ferritina aumentata indica la presenza di anemia da malattie croniche, con bassa probabilità di carenza di ferro (57).

La correlazione esistente tra sTfR ed attività eritropoietica del midollo osseo permette di utilizzarlo per sorvegliare la terapia con eritropoietina, poiché sTfR aumenta 4 settimane prima dell'emoglobina (55). Comunque, alcune condizioni associate con iperplasia eritroide possono comportare un aumento di sTfR in assenza di deficit di ferro (1).

Una più precisa valutazione dello stato del ferro, in presenza di livelli borderline di ferritina e/o di sTfR, può essere ottenuta utilizzando l'indice di sTfR, calcolato come: [concentrazione di sTfR]/[log concentrazione di ferritina], dove le concentrazioni nel siero sono espresse in mg/L per sTfR e in g/L per la ferritina. Questo indice può anche essere utile nel distinguere il deficit di ferro da condizioni di eritropoiesi iperplastica (11,15,57-59).

METODOLOGIA ANALITICA

Inizialmente, la determinazione di sTfR è stata effettuata con metodi immunoenzimatici (per esempio ELISA), che si avvalgono di una reazione antigene anticorpo. Per esempio, nel metodo Orion Diagnostica, standard e cam-

pioni reagiscono, in una prima fase, con anticorpi monoclonali antirecettori immobilizzati su micropiastra. In una seconda fase, il medesimo anticorpo, marcato con enzima fosfatasi alcalina reagisce con l'antigene legato e dopo un'incubazione e due lavaggi si determina la quantità di anticorpo marcato legato, misurando l'idrolisi del substrato p-nitrofenilfosfato come variazione di assorbanza a 405 nm. Tale misura è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene in esame (60).

Altri metodi immunoenzimatici possono utilizzare differenti enzimi, anche se il principio alla base della metodica rimane il medesimo. Anche per gli anticorpi anti sTfR utilizzati si riscontrano alcune differenze, legate al fatto che non si conosce con sicurezza l'epitopo contro cui è diretto l'anticorpo utilizzato nella reazione immunoenzimatica. Ne consegue che i metodi analitici immunoenzimatici delle varie case produttrici possono utilizzare anticorpi diretti contro parti diverse della molecola. Si ottengono così differenti intervalli di riferimento, a seconda del kit immunoenzimatico utilizzato. Questo è testimoniato dalla rassegna di Worwood, che riporta diversi lavori sul confronto fra sistemi immunoenzimatici di varie case produttrici (Ramco, R&D, Orion). Si evidenzia la differenza sia nelle unità di misura sia nei valori assoluti di concentrazione di sTfR ottenuti con ciascun metodo (3).

È stato dimostrato che l'intervallo di distribuzione del 95% dei valori di sTfR nella popolazione sana e in quella con carenza di ferro possono sovrapporsi, evidenziando la necessità di una standardizzazione internazionale che stabilisca limiti di riferimento utilizzabili da tutte le case produttrici (55).

Di recente sono diventati disponibili metodi automatici, basati sull'immunonefelometria o sull'immunoturbidimetria, nonché metodi immunochimici a marcatore chemiluminescente. Con questi metodi, la misura di sTfR potrebbe diventare parte integrante delle analisi di routine del laboratorio clinico, avvalendosi di strumenti multiparametrici. Vari lavori di letteratura testimoniano il vivo interesse intorno a questo argomento (61-71).

Il lavoro di Raya et al si propone di definire i limiti di riferimento di sTfR, prendendo in considerazione 885 soggetti sani di età compresa tra 3 e 91 anni, usando un metodo immunonefelometrico. Si è visto che la variabilità interindividuale andava dal 12,6% al 30,3% tra gruppi di età differente e la variabilità analitica era del 5%. Sono stati esaminati fattori biologici e altri fattori associati con la variazione della concentrazione di sTfR e si è visto che essi erano responsabili del 35% della variabilità di sTfR nel gruppo di uomini con età inferiore a 20 anni e del 18% nel gruppo di uomini con età superiore. Inoltre, giustificavano il 45% della variabilità nel gruppo di donne con età inferiore ai 20 anni e il 14% nel gruppo con età superiore. Negli uomini, i fattori statisticamente associati con la concentrazione di sTfR erano la ferritina, l'orosomucoide, l'emoglobina ed il tabacco in tutte le fasce di età e solo MCV negli uomini con età inferiore ai 20 anni. Nelle femmine, i principali fattori erano l'età, l'orosomucoide e l'emoglobina in tutte le fasce di età; MCV e tabacco nelle femmine con meno di 20 anni, ferritina ed attività fisica

nelle femmine di età superiore. Questi fattori sono stati usati per definire i criteri di esclusione e ripartizione per i valori di riferimento. Le mediane di riferimento erano 1,60 mg/L nella fascia di età compresa tra 3 e 10 anni in entrambi i sessi, 1,42 mg/L nei maschi tra gli 11 ed i 20 anni, 1,33 mg/L nelle femmine della stessa fascia di età. Nei soggetti con età superiore ai 20 anni, la mediana dei valori di riferimento era 1,16 mg/L, ad eccezione delle femmine con più di 60 anni per le quali era di 1,26 mg/L (61).

Il lavoro di Vernet M. e Doyen C. illustra i risultati della valutazione di un nuovo metodo applicato ad un analizzatore immunonefelometrico completamente automatico. La precisione intra e inter analitica è risultata molto buona (CVs < 4%). Nel gruppo di soggetti sani esaminati, non sono state trovate differenze significative tra uomini e donne. Fissando un cut-off di 1,76 mg/L per la diagnosi del deficit di ferro sia da solo sia combinato con anemia da malattia cronica, la sensibilità e la specificità erano pari rispettivamente a 82% e 96,8% (62).

Nel lavoro di Pepe et al è valutato un metodo immunoturbidimetrico per la determinazione dell'sTfR, applicato all'analizzatore automatico MEGA. Per eseguire la misura di sTfR in parallelo con quella degli altri parametri dello stato marziale utilizzando tale analizzatore, si è dovuto modificare il metodo basato sul reagente commerciale, passando dalla tecnica nefelometrica, utilizzando la nefelometria amplificata a particelle (lattice), a quella turbidimetrica. Dall'analisi di 86 campioni di siero comprendenti un ampio intervallo di valori patologici, sono state riscontrate buone caratteristiche analitiche per quanto concerne linearità, imprecisione, stabilità di calibrazione. Il confronto con un metodo ELISA ha mostrato una correlazione discretamente buona, anche se è stata osservata una significativa sottostima, non del tutto corretta dall'adozione di valori di riferimento metodo-specifici, soprattutto per quanto riguarda i valori bassi (60).

Nel lavoro di Hikawa A et al. si sottolinea invece che sarebbe più utile misurare il complesso TfR-transferrina (TRC) con un metodo immunonefelometrico amplificato a particelle, piuttosto che sTfR da solo poiché la maggior parte di sTfR circola nel siero stabilmente legata alla transferrina. I risultati ottenuti utilizzando questo sistema analitico sono strettamente correlati con quelli del convenzionale metodo di analisi immunoenzimatico ($r=0,967$). Si è visto che il valore medio di TRC, nei 179 soggetti adulti studiati, era pari a 1,62 mg/L e soggetti con anemia da carenza di ferro mostravano valori più elevati di TRC rispetto ai soggetti sani (66). È stata verificata anche la possibilità di misurare ferritina e recettore della transferrina plasmatici su macchie di plasma secco su carta da filtro. I risultati ottenuti sono comparabili con quelli ottenuti su plasma intero per quanto riguarda la definizione dello stato del ferro nell'organismo. L'uso di plasma secco può facilitare la raccolta, il deposito, il trasporto di campioni per studi epidemiologici di prevalenza dell'anemia (72).

Con le accresciute conoscenze sulla struttura biochimica di sTfR, il problema della standardizzazione dovrebbe essere discusso a livello internazionale, al fine di

stabilire limiti di riferimento che davvero consentano di utilizzare in maniera routinaria sTfR come indice dello stato del ferro dell'organismo (53).

BIBLIOGRAFIA

1. Feelders RA, Kuiper - Kramer EPA, van Eijk HG. Structure, function and clinical significance of transferrin receptors. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:1-10
2. Brugnana C. A hematologic "gold standard" for iron-deficient states?. *Clin Chem* 2002;4:981-2
3. Worwood M. Serum transferrin receptors assays and their application. *Ann Clin Biochem* 2002;39:221-30
4. Goldman L, Bennet JC, Drazen JM, Gill GN et al. *Cecil Textbook of medicine*. 21° edizione, Saunders Company, Philadelphia 2000:855-56
5. Press RD. Emocromatosi: un tratto genetico "semplice". *Minuti* 2000:5-17
6. Sherwood RA, Pippard MJ, Peters TJ. Iron homeostasis and the assessment of iron status. *Ann Clin Biochem* 1998;35:693-708
7. Harrison PM, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1275 1996:161-203
8. R'zik S, Beguin Y. Serum soluble transferrin receptor concentration is an accurate estimate of the mass of tissue receptors. *Experimental Hematology* 2001:677-85
9. Weiss G, Houston T, Kastner S, Johrer K et al. Regulation of cellular iron metabolism by erythropoietin: activation of iron-regulatory protein and upregulation of transferrin receptor expression in erythroid cells. *Blood* 1997;89:680-87
10. Khumalo H, Gomo ZAR, Gangaidzo IT, Moyo V et al. Effect of ascorbic acid administration on serum concentration of transferrin receptors. *Clin Chem* 1998;44:1573-75
11. Suominen P, Punnonen K, Rajamaki A, Irlja K. Serum transferrin receptor and transferrin receptor ferritin index identify healthy subjects with subclinical iron deficits. *Blood* 1998;92:2934-9
12. Mast AE, Blinder MA, Gronowski AM, Chumley C, Scott MG. Clinical utility of the soluble transferrin receptor and comparison with serum ferritin in several populations. *Clin Chem* 1998;44:45-51
13. Baynes RD. Assessment of iron status. *Clin Biochem* 1996;29:209-15
14. Ho CH. The diagnostic role of serum transferrin receptors in patients with various anemia. *Chinese Med Journ* 2002;65:55-60
15. Occhiuzzi U. Recettori solubili della transferrina: anemie da carenza di ferro e da malattia cronica. *Biochim Clin* 2002;26:5-8
16. Joosten E, Van Loon R, Billen J, Blanckaert N et al. Serum transferrin receptor in the evaluation of the iron status in elderly hospitalized patients with anemia. *Am J Hem* 2002;69:1-6
17. Bodieher F, Tatzeb F, Meisner W, Lapin A. Measurement of the soluble transferrin receptors could provide the basis for rational therapy of iron deficiency in multimorbid geriatric patients. *Eur J Geriatrics* 2001;3:135-9
18. Muta K, Nishimura J, Deguchi H, Umemura T, Ibayashi H. Erythroblast transferrin receptors and transferrin kinetics in iron deficiency and various anemias. *Am J Hematol* 1987;25:155-63
19. Feelders RA, Vreugdenhil G, van Dijk JP, Swaak AJG, van Eijk HG. Decreased affinity and number of transferrin receptors on erythroblasts in the anemia of rheumatoid arthritis. *Am J Hematol* 1993;43:200-4
20. Kuiper-Kramer PA, Huisman CMS, Molen-Sinke J Van Der, Abbes A, van Eijk HG. The expression of transferrin receptors on erythroblasts in anaemia of chronic disease, myelodysplastic syndromes and iron deficiency. *Acta Haematol* 1997;97:127-31
21. Feelders RA, Vreugdenhil G, Eggermont AMM, Kramer PA et al. Regulation of the acute phase response: effects of recombinant interferon gamma and recombinant tumor necrosis factor alpha on acute phase proteins levels and iron metabolism in cancer patients *Eur J Clin Invest* 1988;28:520-7
22. Klinec ST, Tuncer AM, Altay C. Transferrin receptor on peripheral blood lymphocytes in iron deficiency anaemia. *Brit J Haematol* 1999;104:494-8
23. Huebers HA, Beguin Y, Pootrakul P, Einspahr D, Finch CA. Intact transferrin receptors in human plasma and their relations to erythropoiesis. *Blood* 1990;75:102-7
24. Beguin Y, Clemons GH, Pootrakul P, Fillet G. Quantitative assessment of erythropoiesis and functional classification of anemia based on measurements of serum transferrin receptor and erythropoietin. *Blood* 1993;81:1067-76
25. Klemow D, Einspahr D, Brown TA, Flowers CH, Skikne BS. Serum transferrin receptor measurements in hematologic malignancies. *Am J Haematol* 1990;34:193-8
26. Neckers LM. Regulation of transferrin receptor expression and control of cell growth. *Pathobiology* 1991;59:11-8
27. Schrezenmeier H, Noe G, Raghavachar A, Rich IN, et al. Serum erythropoietin and serum transferrin receptor levels in aplastic anemia. *Br J Haematol* 1994;88:286-94
28. Fillet G, Beguin Y. Monitoring of erythropoiesis by the serum transferrin receptor and erythropoietin. *Acta Clin Belgica* 2001;56:146-54
29. Tetsa U, Rutella S, Martucci R, Scambia G, et al. Autologous stem cell transplantation: evaluation of erythropoietic reconstitution by highly fluorescent reticulocyte counts, erythropoietin soluble receptors, ferritin TIBC and iron dosage. *Br J Haematol* 1997;96:762-5
30. Deira J, Martin M, Sanchez S, Garrido J, et al. Evaluation of intestinal iron absorption by indirect methods in patients on hemodialysis receiving oral iron and recombinant human erythropoietin. *Am J Kid Dis* 2002;39:594-99
31. Ahluwalia N, Skikne BS, Savin V, Chonko. A Markers of masked iron deficiency and effectiveness of epo therapy in chronic renal failure. *Am J Kid Dis* 1997;30:532-41
32. Cazzola m, Ponchio L, Pedrotti C, Farina G, et al. Prediction of response to recombinant human erythropoietin (rHuEPO) in anemia of malignancy. *Haematologica* 1996;81:434-41
33. Beguin Y. Prediction of response to optimize outcome of treatment with erythropoietin. *Semin Oncol* 1998;25:27-34
34. Wide L, Bengtsson C, Berglund B, Ekblom B. Detection in blood and urine of recombinant erythropoietin administered to healthy men. *Med Sci Sports Exerc* 1995;27:1569-76
35. Lippi G. Linee guida per l'identificazione del doping con eritropoietina umana ricombinante. *Biochim Clin* 2001;25:490-93
36. Lippi G, Guidi G. Laboratory screening for erythropoietin abuse in sport: an emerging challenge. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:13-19
37. Adamson JW, Vapner DV. Recombinant erythropoietin to improve athletic performance. *N Engl J Med* 1991;324:698-9
38. Gareau R, Gagnon MG, Thellend C, Chenard C. Transferrin soluble receptor: a possible probe for detection of erythropoietin abuse by athletes. *Horm Metab Res* 1994;26:311-2
39. Souillard A, Audran M, Bressolle F, Gareau R. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin in athletes. Blood sampling and doping control.

- Br J Clin Pharmacol 1996;42:355-64
40. Bressolle F, Audran M, Gareau R, Baynes RD. Population pharmacodynamics for monitoring erythropoietin in athletes. *Clin Drug Invest* 1997;14:233-42
 41. Davey G, Nerurkar R. Doping in sport. *Lancet* 1998;352:1781-2
 42. Saris WHM, Senden JMG, Brouns F. What is a normal red-blood mass for professional cyclists?. *Lancet* 1998;352:1758
 43. Moyo VM, Mandishona E, Hasstedt SJ, Gangaidzo IT, Gomo ZAR. Evidence of genetic transmission in african iron overload. *Blood* 1998;91:1076-82
 44. Witte DL. Mild liver enzyme abnormalities: eliminating hemochromatosis as cause. *Clin Chem* 1997;43:1535-38
 45. Bulaj ZJ, Griffen LM, Jorde LB, Edwards CQ, Kushner JP. Clinical and biochemical abnormalities in people heterozygous for hemochromatosis. *New Eng J Med* 1996;335:1799-1805
 46. Fleming MD. Hepatic iron overload in the age of hereditary hemochromatosis mutation analysis. *Am J Clin Path* 1998;109:505-7
 47. Press MD, Flora K, Gross S, Rabkin JM, Corless CL. Direct HFE (HLA-H) mutation analysis vs quantitative iron assays for the diagnosis of hereditary hemochromatosis. 1998;109:577-84
 48. Looker AC, Loyesky M, Gordeuk VR. Increased serum transferrin saturation is associated with lower serum transferrin receptor concentration. *Clin Chem* 1999;45:2191-99
 49. Baynes RD, Cook JD, Bothwell T, Friedman BM, Meyer TE. Serum transferrin receptors in hereditary hemochromatosis and African siderosis. *Am J Hematol* 1994;45:288-92
 50. Thorstensen K, Romslo I. Measurement of serum transferrin receptor in screening for hemochromatosis. *Clin Chem* 1992;38:1510
 51. Ledue TB, Craig WY. Serum concentration of transferrin receptor in hereditary hemochromatosis. *Clin Chem* 1995;41:1053-4
 52. Choi JW, Im MW, Pai SH. Serum transferrin receptor concentrations during normal pregnancy. *Clin Chem* 2000;46:725-7
 53. Punnonen K. Transferrin receptor. *Clin Chem Lab Med* 2001;39, special supplement p S59
 54. Harthoorn-Lasthuizen EJ, van't Sant P, Lindemans J, Langenhuijsen MMAC. Serum transferrin receptor and erythrocyte zinc protoporphyrin in patients with anemia. *Clin Chem* 2000;46:719-722
 55. Van den Bosch G, Van den Bossche J, Wagner C, De Schouwer P, et al. Determination of iron metabolism related values in a healthy adult population. *Clin Chem* 2001;47:1465-67
 56. Skikne BS. Circulating transferrin receptor assay-coming of age. *Clin Chem* 1998;44:7-9
 57. Lee EJ, Oh EJ, Park YJ, Lee HK, Kim BK. Soluble transferrin receptor (sTfR), ferritin and sTfR-log ferritin index in anemic patients with nonhematologic malignancy and chronic inflammation. *Clin Chem* 2002;48:1119-21
 58. Suominen P, Mottonen T, Rajamaki A, Irljala K. Single values of serum transferrin receptor and transferrin receptor transferrin index can be used to detect true and functional iron deficiency in rheumatoid arthritis patients with anemia. *Arthritis and rheumatism* 2000;43:1016-20
 59. Punnonen K, Irljala K, Rajamaki A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 1997;89:1052-57
 60. Pepe F, Patrucco G, Cerrato D. Determinazione del recettore solubile della transferrina: valutazione di un metodo immunoturbidimetrico applicato all'analizzatore automatico mega. *Biochim Clin* 2001;25:379-81
 61. Raya G, Henny J, Steinmetz J, Herbeth B, Siest G. Soluble transferrin receptor (sTfR): biological variation and reference limits. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:1162-68
 62. Vernet M, Doyen C. Assessment of iron status with a new fully automated assay for transferrin receptor in human serum. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:437-42
 63. Cotton F, Thiry P, Boeynaems JM. Measurement of soluble transferrin receptor by immunoturbidimetry and immunonephelometry. *Clin Biochem* 2000;33:263-67
 64. Wians FH, Urban JE, Kroft SH, Keffer JH. Soluble transferrin receptor (sTfR) concentration quantified using two sTfR kits: analytical and clinical performance characteristics. *Clin Chim Acta* 2001;303:75-81
 65. Suominen P, Punnonen K, Rajamaki A, Irljala K. Evaluation of new immunoenzymometric assay for measuring soluble transferrin receptor to detect iron deficiency in anemic patients. *Clin Chem* 1997;43:1641-6
 66. Hikawa A, Nomata Y, Suzuki T, Ozasa H, Yamada O. Soluble transferrin receptor-transferrin complex in serum: measurement by latex agglutination nephelometric immunoassay. *Clin Chim Acta* 1996;254:159-72
 67. Kolbe-Busch S, Lotz J, Hafner J, Blanckaert NJC, et al. Multicenter evaluation of a fully mechanized soluble transferrin receptor assay on the Hitachi and Cobas Integra analyzer. The determination of reference ranges. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:529-36
 68. Punnonen K, Kaipainen -Seppanen O, Riittinen L, Tuomisto T, et al. Evaluation of iron status in anemic patients with rheumatoid arthritis using an automated immunoturbidimetric assay for transferrin receptor. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:1297-1300
 69. Allen J, Backstrom KR, Cooper JA, Cooper MC, et al. Measurement of soluble transferrin receptor in serum of healthy adults. *Clin Chem* 1998;44:35-9
 70. Suominen P, Punnonen K, Rajamaki A, Majuri R, et al. Automated immunoturbidimetric method for measuring serum transferrin receptor. *Clin Chem* 1999;45:1302-5
 71. Thomas C, Thomas L. Biochemical marker and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin Chem* 2002;48:1066-76
 72. Flowers CH, Cook JD. Dried plasma spot measurements of ferritin and transferrin receptor for assessing iron status. *Clin Chem* 1999;45:1826-32