

## Valutazione del recettore solubile della transferrina in pazienti oncologici sottoposti a radioterapia e a chemioterapia

Stefania Volonté<sup>1</sup>, Mari Cabiddu<sup>2</sup>, Alberto Bossi<sup>3</sup>, Angelo Giovanni Lanceni<sup>4</sup>, Lorenzo Stangoni<sup>1</sup>, Lucio Scopsi<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Servizio di Medicina di Laboratorio, Casa di Cura S. Pio X, 20159 Milano

<sup>2</sup>Unità Operativa di Oncologia Medica, Azienda Ospedaliera Treviglio-Caravaggio, 24047 Treviglio (BG) e (al momento dello studio) Unità Operativa di Oncologia Medica, Casa di Cura S. Pio X, 20159 Milano

<sup>3</sup>Radiotherapie, Universitaire Ziekenhuizen, 3000 Leuven, Belgio e (al momento dello studio) Servizio di Radioterapia, Casa di Cura S. Pio X, 20159 Milano

<sup>4</sup>Reparto di Radioterapia Oncologica, Azienda Ospedaliera S. Gerardo, 20052 Monza (MI)

<sup>5</sup>Servizio di Oncogenetica, Casa di Cura S. Pio X, 20159 Milano

### ABSTRACT

#### Evaluation of soluble transferrin receptor in cancer patients undergoing radiotherapy or chemotherapy

Soluble transferrin receptor (sTfR) is a useful marker of iron deficiency, because of the absence of significant variations in the acute phase. We planned to evaluate its usefulness in cancer patients undergoing radiotherapy or chemotherapy. In this context, sTfR remained stable despite significant variations of the ferritin and transferrin levels. This observation, along with the stability of iron levels and the absence of significant correlation between sTfR and, respectively, ferritin and transferrin, lend support to the view that the observed variations are not an expression of iron deficiency but represent the typical protein reaction of the acute phase. Therefore, in these patients sTfR measurement proves useful in the differential diagnosis between anemia and inflammatory reactions secondary to the applied therapies.

### RIASSUNTO

Il recettore solubile della transferrina (sTfR) è un utile indice di carenza marziale poiché non subisce variazioni significative nella fase acuta. Si è voluto qui indagarne l'utilità in pazienti oncologici sottoposti a radioterapia e a chemioterapia. A fronte di significative variazioni di ferritina e transferrina, i livelli di sTfR rimanevano stabili. Ciò, unitamente al fatto che anche la sideremia rimaneva stabile e all'assenza di correlazioni significative tra sTfR e, rispettivamente, transferrina e ferritina, avvalorava l'ipotesi che le variazioni osservate non sottendano una carenza marziale ma rappresentino la tipica reazione proteica della fase acuta. Si dimostra pertanto che in questi pazienti il dosaggio dell'sTfR è utile per la diagnosi differenziale di anemia rispetto a fenomeni infiammatori conseguenti alle terapie applicate.

### INTRODUZIONE

Il recettore della transferrina è una proteina di membrana presente sulla superficie cellulare. La sua funzione è quella di legare la transferrina circolante e di captare il ferro richiesto per la crescita e il metabolismo cellulare. La concentrazione di questo recettore, regolata dalla sintesi di mRNA, a sua volta dipende dalla concentrazione intracellulare di ferro, aumenta nelle anemie ferroprive (1). Il recettore solubile della transferrina (sTfR) rappresenta il frammento del recettore tessutale che viene rilasciato in circolo per proteolisi e la sua concentrazione correla direttamente con la quantità di recettori espressi sulla superficie cellulare (2). L'sTfR, è un utile indice di carenza marziale in pazienti oncologici poiché, a differenza di transferrina e ferritina, non subisce variazioni significative nella fase acuta (2).

In questo lavoro abbiamo voluto verificare l'impatto della radioterapia e della chemioterapia sul metabolismo

del ferro in pazienti oncologici la cui patologia non coinvolgesse direttamente gli organi emopoietici. Abbiamo inoltre voluto verificare se la concentrazione serica dell'sTfR fosse, in questi pazienti, utile quale parametro discriminante per la corretta valutazione dell'equilibrio marziale. A questo scopo abbiamo determinato, oltre alla concentrazione di sTfR, anche i valori di ferro, transferrina, ferritina, reticolociti, emoglobina ed eritrociti.

### MATERIALI E METODI

Sono stati presi in considerazione 10 pazienti sottoposti a chemioterapia (9 femmine e un maschio), di età compresa tra 42 e 69 anni (media 53,2), e 22 pazienti sottoposti a radioterapia (11 femmine e 11 maschi), di età compresa tra 43 e 77 anni (media 60,9). Il trattamento radioterapico aveva finalità sia adiuvante (11 femmine con adenocarcinoma mammario sottoposte a quadrantectomia) sia radicale (11 maschi con adenocarcinoma prosta-

tico). Il trattamento chemioterapico (sette adenocarcinomi mammari e tre adenocarcinomi coloretali) era di tipo adiuvante in sette casi e di prima linea in tre. Sono stati esclusi pazienti con patologie che avrebbero potuto elevare in modo fittizio il valore di sTfR e ferritina, quali anemia ferropriva conclamata,  $\beta$ -talassemia e anemia emolitica autoimmune. Nessuno dei pazienti arruolati era in terapia con farmaci stimolanti l'eritropoiesi, antianemici o in qualche modo interagenti con il metabolismo del ferro, né è incorso in episodi emorragici. Lo studio è stato approvato dalla Commissione Consultiva per la Sperimentazione Clinica di Nuove Metodiche Diagnostiche e Terapeutiche della Casa di Cura San Pio X di Milano e a ciascuno dei pazienti arruolati è stato chiesto di sottoscrivere un modulo di consenso informato.

Le determinazioni venivano eseguite immediatamente prima dell'inizio della terapia (1° prelievo), a metà della terapia (2° prelievo) e 15 giorni dopo il termine della terapia (3° prelievo). Il campione di sangue veniva prelevato ai pazienti a digiuno, trasferito immediatamente al laboratorio, centrifugato e separato dal coagulo entro due ore dal prelievo. Dopo l'esecuzione degli esami di laboratorio prescritti per il monitoraggio delle cure, un'aliquota di siero veniva utilizzata per la determinazione di sTfR, ferro, ferritina e transferrina. Se non immediatamente utilizzati, i campioni di siero venivano stivati a  $-80^{\circ}\text{C}$  sino al momento dell'analisi.

Per emocromo e reticolociti, il sangue intero veniva raccolto in provette sotto vuoto contenenti  $\text{K}_3\text{EDTA}$  e analizzato entro 30 minuti dal prelievo. L'sTfR è stato misurato con un metodo turbidimetrico (IDeA sTfR-IT, Orion Diagnostica, Espoo, Finlandia). Per transferrina e ferro è stato utilizzato il *kit* immunoturbidimetrico TRANSFERRINA DASIT (Dasit S.p.A, Cornaredo, Milano). Per la ferritina è stato utilizzato il *kit* in chemiluminescenza IMMULITE® (Medical Systems S.p.A., Genova). Tutte le analisi su siero, ad eccezione della ferritina, sono state eseguite in modo automatico utilizzando l'autoanalizzatore Konelab 30i (Kone Corporation, Espoo, Finlandia; distribuito in Italia da DASIT S.p.A, Cornaredo, Milano). Emocromo e reticolociti sono stati determinati utilizzando il contaglobuli Sysmex 9500-Ret (Sysmex Toa Medical Electronics Co., Ltd., Kobe, Giappone; distribuito in Italia da DASIT S.p.A, Cornaredo, Milano). La calibrazione dei parametri analizzati, a eccezione dell'emocromo e dei reticolociti, veniva eseguita a ogni corsa analitica e il controllo di qualità era eseguito giornalmente a uno o due livelli diversificati (normale e patologico). I reticolociti sono stati determinati con la tecnica in fluorescenza e suddivisi in cellule a bassa (LFR), media (MFR) e alta intensità di fluorescenza (HFR). L'intensità della fluorescenza è inversamente correlata al tempo di immissione in circolo dei reticolociti. Il substrato fluorescente utilizzato per la conta, l'auramina O, reagisce con l'RNA ancora presente nei reticolociti: più tardiva è l'immissione in circolo del reticolocita, maggiore è il suo contenuto in RNA (3).

Lo stato di anemia è stato definito come la rilevazione di un ematocrito uguale o inferiore al 38% per le donne e

uguale o inferiore al 40% per gli uomini.

Per l'elaborazione statistica dei dati sono stati eseguiti *test* di correlazione logaritmica e polinomiale e *test* di significatività (test T di Student) utilizzando le funzioni disponibili dal foglio di lavoro del *software* Excel (Microsoft Co., CA, USA).

## RISULTATI

### Pazienti sottoposti a radioterapia

I dati sui pazienti sottoposti a radioterapia (tabella 1) mostrano una generale tendenza a un decremento, seppure non significativo, dei valori di eritrociti, ematocrito ed emoglobina, che rimangono però nei limiti della norma. La tabella 2 riporta i valori ottenuti dalla valutazione dei para-

**Tabella 1**

Valori di eritrociti, emoglobina ed ematocrito nei pazienti sottoposti a radioterapia

	Eritrociti totali $10^6/\mu\text{L}$	Emoglobina g/dL	Ematocrito %
Valori di riferimento	4-5,5	12-18	32-50
1° Prelievo			
Media	4.46	13.65	41.04
DS	0.37	1.01	3.43
2° Prelievo			
Media	4.23	13.66	41.36
DS	1.13	0.92	3.39
P	0.413	0.916	0.537
3° Prelievo			
Media	4.25	12.62	38,35
DS	1.10	2.41	9,41
P	0.437	0.275	0.277

**Tabella 2**

Parametri reticolocitari nei pazienti sottoposti a radioterapia. LFR= low fluorescence reticulocytes, MFR= medium fluorescence reticulocytes, HFR= high fluorescence reticulocytes.

	Reticolociti totali	LFR %	MFR %	HFR %
Valori di riferimento	5-20	78-92	6-18	0-4
1° Prelievo				
Media	11.26	89.83	10.19	1.89
DS	3.68	5.46	4.46	1.67
2° Prelievo				
Media	11.00	80.34	12.10	2.39
DS	3.60	18.39	5.11	1.61
P	0.915	0.234	0.112	0.323
3° Prelievo				
Media	16.68	81.76	12.94	3.20
DS	4.36	7.18	5.16	2.97
P	0.0001	0.039	0.039	0.004

metri reticolocitari: si nota un significativo incremento della concentrazione reticolocitaria globale al terzo prelievo, parallelamente a un incremento significativo dei reticolociti "giovani" e a un calo significativo nelle percentuali dei reticolociti più datati (LFR). In nessun caso vengono comunque superati i limiti dell'intervallo di riferimento.

La tabella 3 riporta i valori relativi a ferro, ferritina, transferrina e sTfR: si nota come la concentrazione di quest'ultimo rimanga sostanzialmente stabile nel corso della terapia, e sempre entro i limiti normali. Sebbene la sideremia presenti un decremento al terzo prelievo, ciò non è dovuto a un deficit di emoglobina (tabella 1) e non vi è correlazione inversa tra ferro e sTfR. I valori di transferrina aumentano invece in modo significativo durante l'intero periodo di osservazione, mentre quelli di ferritina aumentano in modo significativo a metà ciclo per calare in modo altrettanto significativo nel post-trattamento.

### Pazienti sottoposti a chemioterapia

Come per la radioterapia, ematocrito, emoglobina ed eritrociti totali non mostrano variazioni significative (tabella 4). A metà del ciclo di terapia i reticolociti aumentano significativamente, sia quando considerati in toto che nelle classi a media e alta fluorescenza (tabella 5). Parallelamente, si rileva una diminuzione significativa dei reticolociti più vecchi (classe LFR).

Ferritina e transferrina presentano un aumento significativo da metà ciclo terapeutico, mentre le variazioni di ferro e sTfR non risultano significative (tabella 6).

### Tutti i pazienti

Nelle figure 1 e 2 sono visualizzate le correlazioni tra sTfR, e, rispettivamente, transferrina e ferritina per l'intero gruppo dei pazienti. Dai valori di  $R^2$  e dall'equazione di regressione si evince l'assenza di correlazione significati-

va tra sTfR e transferrina e ferritina. A conferma di questo, dai valori di sTfR e di ferritina sono stati calcolati i valori di "sTfR index" (4). Tale indice (rapporto tra sTfR e logaritmo della ferritina) sarebbe un utile discriminatore tra anemia ferropriva e variazioni del valore della ferritina indotte da altre cause. I dati disponibili in letteratura non sono concordi nello stabilire un unico valore-soglia che distingua tra normale e patologico; nel presente lavoro si è fatto riferimento all'intervallo di normalità 0,63-1,8 riportato dagli stessi Autori (5). Nella nostra casistica, i valori di sTfR index sono risultati compresi nell'intervallo 0,5 - 1,2 nel gruppo di pazienti trattati con radioterapia e nell'intervallo 0,5 - 1,2 nel gruppo dei pazienti trattati con chemioterapia: in nessun caso quindi si è raggiunto il valore soglia discriminante per carenza di ferro.

**Tabella 4**

Valori di eritrociti, emoglobina ed ematocrito nei pazienti sottoposti a chemioterapia.

	Eritrociti totali $10^6/\mu\text{L}$	Emoglobina g/dL	Ematocrito %
Valori di riferimento	4-5,5	12-18	32-50
1° Prelievo			
Media	4.31	13.03	39.80
DS	0.33	0.97	2.26
2° Prelievo			
Media	4.10	12,80	39.13
DS	0.34	0.94	2.50
P	0.071	0.247	0.368
3° Prelievo			
Media	4.31	13.25	40.22
DS	0.43	1.15	2.50
P	0.966	0.295	0,458

**Tabella 5**

Parametri reticolocitari nei pazienti sottoposti a chemioterapia. LFR= low fluorescence reticulocytes, MFR=medium fluorescence reticulocytes, HFR= high fluorescence reticulocytes.

	Reticolociti totali	LFR %	MFR %	HFR %
Valori di riferimento	5-20	78-92	6-18	0-4
1° Prelievo				
Media	15.15	85.83	12.81	1.14
DS	5.66	3.73	3.24	0.78
2° Prelievo				
Media	20.52	71.14	17.47	6.32
DS	8.35	22.97	3.50	4.93
P	0.007	0.069	0.0005	0.013
3° Prelievo				
Media	18.13	79,44	16.27	4.44
DS	6.71	7.75	6.00	2.62
P	0.010	0.010	0.046	0.004

**Tabella 3**

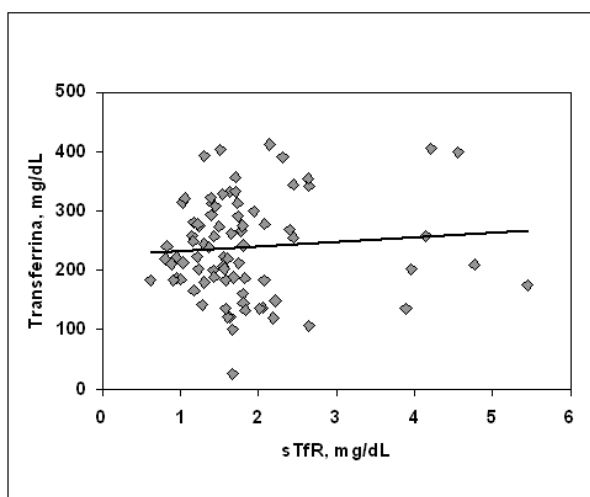
Parametri correlati al metabolismo del ferro nei pazienti sottoposti a radioterapia.

	Ferro $\mu\text{g/dL}$	Ferritina ng/mL	Transferrina $\mu\text{g/dL}$	sTfR mg/dL
Valori di riferimento	30-170	30-300	200-360	0.9-2.3
1° Prelievo				
Media	97.83	150.13	181.16	1.62
DS	19.23	12.05	14.33	0.49
2° Prelievo				
Media	119.53	188.29	230.94	1.61
DS	10.32	12.46	19.94	0.45
P	0.232	0.021	0.014	0.915
3° Prelievo				
Media	85.27	134.81	306.31	1.85
DS	11.48	21.50	29.24	0.55
P	0.057	0.035	0.0004	0.336

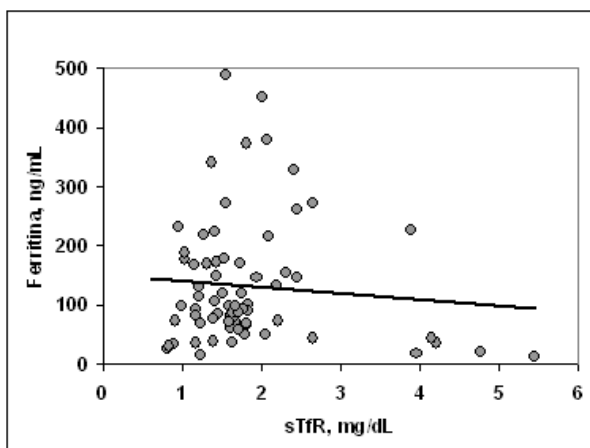
**Tabella 6**

Parametri correlati al metabolismo del ferro nei pazienti sottoposti a chemioterapia.

	Ferro μg/dL	Ferritina ng/mL	Transferrina μg/dL	sTfR mg/dL
Valori di riferimento	30-170	30-300	200-360	0.9-2.3
1° Prelievo				
Media	69.00	62.80	208.00	2.11
DS	24.21	29.66	35.66	1.45
2° Prelievo				
Media	79.40	99.72	259.40	2.40
DS	36.66	62.66	103.82	1.34
P	0.453	0.057	0.191	0.276
3° Prelievo				
Media	74.20	96.79	297.00	2.16
DS	23.63	65.09	80.72	1.19
P	0.379	0.124	0.0195	0.820

**Figura 1**

Correlazione tra transferrina e TfR nell'intero gruppo di pazienti.

**Figura 2**

Correlazione tra ferritina e sTfR nell'intero gruppo di pazienti. Equazione della retta di regressione:  $y = 152 - 10,8x$ ; correlazione:  $R^2 = 0.009$

## DISCUSSIONE

Il nostro lavoro dimostra che in pazienti neoplastici sottoposti a chemioterapia e a radioterapia la determinazione dell'sTfR è utile per discriminare tra uno stato di anemia ferropriva e alterazioni di altra origine dei parametri correlati al metabolismo del ferro di altra origine. I nostri risultati, pertanto, concordano con quanto rilevato in precedenza in individui normali (6).

Le variazioni significative di ferritina e transferrina osservate in corso di chemioterapia e a seguito di radioterapia denotano l'insorgenza di uno stato infiammatorio non accompagnato da anemia ferropriva. L'assenza di una correlazione diretta tra sTfR, transferrina e ferritina avvalorava l'ipotesi che le variazioni di questi due ultimi analiti non siano indicativi di una carenza marziale ma rappresentino la tipica reazione proteica della fase acuta.

Alcuni Autori hanno dimostrato come il valore di sTfR possa essere predittivo di uno stato anemico insorgente, ma non sia sufficientemente specifico di questa condizione e a questo scopo hanno suggerito l'utilizzo di differenti valori-soglia dell'sTfR index in relazione alla patologia sottostante (7). Nel nostro lavoro tutti i campioni esaminati cadono comunque all'interno dell'intervallo di riferimento tipico dello stato normosideremico (5).

Alcuni pazienti sottoposti a radioterapia e chemioterapia hanno presentato una variazione della concentrazione dei reticolociti circolanti, rivelatrice dell'influenza aspecifica del trattamento sulla funzionalità midollare e sull'eritropoiesi: si è voluto verificare se tale condizione comportasse anche una transitoria anemia ferropriva o, viceversa, un accumulo di ferro e se vi fossero variazioni significative dei parametri correlati al metabolismo marziale. L'incremento globale dei reticolociti a metà del ciclo di chemioterapia è indice di un impatto immediato dei farmaci somministrati sul midollo osseo. Nei pazienti trattati con radioterapia, il significativo incremento a due settimane dal termine del trattamento è invece segno di un'impennata tardiva dell'attività eritropoietica.

Studi precedenti avevano rilevato che, in pazienti oncologici, l'emivita dei reticolociti e degli eritrociti circolanti è significativamente diminuita (8). Anche se non è chiaro attraverso quale meccanismo questo si verifici, è stata ipotizzata un' inadeguata risposta del midollo osseo all'effetto stimolante dell'eritropoietina (9), particolarmente evidente nei pazienti pediatrici (10). L'incremento dei reticolociti "giovani" e il calo di quelli più datati osservati nel nostro studio avallerebbe ulteriormente l'ipotesi che, in pazienti oncologici trattati, l'emivita eritrocitaria sia diminuita. Il fatto che la sideremia rimanga sostanzialmente stabile nel corso della terapia, e sempre nei limiti della norma, evidenzia viepiù come non sussistano le condizioni di una anemia ferropriva.

L'sTfR e la sideremia sarebbero infine correlate alla gravità di alcuni linfomi maligni (11). Nel nostro studio non si è inteso, né potuto, verificare l'oscillazione del valore di sTfR rispetto alla gravità della patologia, ma ci si è limitati a rilevarne la costanza nel corso di terapie radianti o con farmaci antitumorali, a fronte di una marcata variabilità di

altri parametri nel breve periodo.

Per concludere, nei pazienti oncologici sottoposti a radioterapia e chemioterapia, la determinazione dell'sTfR si rivela un utile biomarcatore per una diagnosi differenziale di anemia rispetto a un fenomeno infiammatorio conseguente alle terapie applicate.

### RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia la Ditta DASIT SpA per avere fornito i kit per la determinazione di: recettore solubile della transferrina, ferro e transferrina. Un ringraziamento particolare va alla Dott.ssa Antonella Bertoncetto e alla Sig.ra Celeste Lorenzi per il supporto tecnico.

### BIBLIOGRAFIA

1. Baynes RD. Assessment of iron status. *Clin Biochem* 1996;29:209-215.
2. Thorstensen K. The transferrin receptor: its diagnostic value and its potential therapeutic target. *Scand J Lab Clin Invest* 1993;53(Suppl 215):113-120.
3. Houwen B. Reticulocyte maturation. *Blood Cells* 1992;18:167-186.
4. Punnonen K., Irljala K, Rajamaki A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 1997;89:1052-1057.
5. Suominen P, Punnonen K, Rajamaki A, Irljala K. Serum transferrin receptor and transferrin receptor-ferritin index identify healthy subjects with subclinical iron deficits. *Blood* 1998;92:2934-2939.
6. Skikne BS, Flowers CH, Cook JD. Serum transferrin receptor: a quantitative measure of iron deficiency. *Blood* 1990;75:1870-1876.
7. 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;48:1118-1121.
8. Means RT, Kranzt SB. Progress in understanding the etio-pathogenesis of the anemia of chronic disease. *Blood* 1992;80:1639-1647.
9. Dowlati A, R'ZiK S, Fillet G, Beguin Y. Anemia in lung cancer is due to impaired erythroid marrow response to erythropoietin stimulation as well as inadequacy of erythropoietin production. *Br J Haematol* 1997;97:297-299.
10. Kim M, Lee J, Wu C, Cho S, Lee K. Defective erythropoiesis in bone marrow is a mechanism of anemia in children with cancer. *J Korean Med Sci* 2002;17:337-340.
11. Bierner J, Amlie LM, Rusten LS, Jakobsen E. Serum levels of soluble transferrin receptor correlate with severity of disease but not with iron stores in patient with malignant lymphoma. *Tumour Biol* 2002;23:146-153.