

## L'Associazione sostiene un nuovo progetto di ricerca: grasso e ferro epatico un'unione difficile.

Nei mesi scorsi è stato avviato un nuovo progetto di ricerca sostenuto dall'Associazione per lo Studio dell'Emocromatosi e delle Malattie da Sovraccarico di Ferro che vedrà coinvolti il Prof. Alberto Piperno come supervisore, il dr. Carlo Nicoli come responsabile del progetto, la dr.ssa Daniela Miriam Prata Pizzala come ecografista, il dr. Giorgio Bovo e il dr. Nicola Zucchini come anatomopatologi, il dr. Filiberto Di Gennaro come radiologo, la dr.ssa Irene Redaelli e la dr.ssa Nicoletta Paruccini come fisici sanitari.

Il numero di persone coinvolte esprime quanto sia articolato il progetto, di seguito descriverò in modo chiaro e succinto i presupposti e gli scopi della ricerca.

Diverse cause e meccanismi conducono al sovraccarico di ferro e la diagnosi precoce è fondamentale per evitare complicazioni, inoltre la valutazione accurata della quantità di sovraccarico di ferro è necessaria per guidare la diagnosi, la terapia e per definire la prognosi.

La **ferritina sierica** è l'indice più semplice di sovraccarico di ferro ma è in gran parte influenzato da molteplici fattori come la presenza di danno delle cellule del fegato, l'infiammazione sistemica, un eccessivo funzionamento della tiroide, l'assunzione di alcol e alterazioni della sindrome metabolica, portando spesso alla sovrastima della vera quantità del carico di ferro. Per questo motivo una diagnosi precisa di iperferritinemia richiede una strategia che comprenda storia personale familiare e medica, analisi del sangue ed, infine, la misurazione del contenuto epatico di ferro e test genetici.

L'iperferritinemia è frequentemente osservata nelle malattie epatiche di qualsiasi natura ma la misura in cui la ferritina riflette realmente le riserve di ferro in queste condizioni è variabile; tra queste la condizione di "Dysmetabolic iron overload syndrome" (DIOS) è caratterizzata da sovraccarico di ferro da lieve a moderato associato ad alterazioni della sindrome metabolica e da steatosi epatica. Il sovraccarico di ferro e la steatosi/steatoepatite potrebbero condurre/contribuire allo sviluppo e progressione di un danno epatico severo e irreversibile. Sia la frazione di grasso intraepatico che la concentrazione di ferro epatico sono parametri importanti da valutare per aiutare la diagnosi, per monitorare la progressione e per valutare gli effetti degli interventi terapeutici.

Come cercare di individuare e quantificare il grasso ed il ferro intraepatico così da poter seguire e curare nel modo migliore il paziente? Attualmente le armi a nostra disposizione sono diverse.

La **biopsia epatica** è attualmente l'esame più affidabile e preciso sia per valutare la concentrazione di ferro epatico (LIC) che per la quantificazione del contenuto del grasso intraepatico; tuttavia la variabilità del campionamento e l'invasività limitano l'uso della biopsia epatica. Inoltre la classificazione semiquantitativa classica della steatosi presenta dei limiti. Una

nuova tecnica per calcolare l'area di steatosi (AOS) mediante l'analisi di un'immagine digitale ha il potenziale per diventare un indice più preciso, ma è laborioso e richiede un software specifico e personale specializzato.

L'**ecografia** è la prima metodica applicabile a tutti i pazienti in quanto non invasiva, indolore, ben tollerata, priva di controindicazioni e complicanze di alcun tipo, inoltre è a basso costo e facilmente riproducibile.

Limite di questa tecnica è l'estrema variabilità operatore-dipendente il cui impatto è stato limitato dall'utilizzo condiviso da tutti gli operatori di scale numeriche.

L'ecografia è infatti una metodica ormai consolidata nel definire la presenza o meno di steatosi epatica, tuttavia non vi è ancora una scala universalmente utilizzata per definirne il grado ecografico, sebbene ne siano state proposte diverse da svariati autori. La valutazione della steatosi epatica presso il nostro centro avviene mediante l'utilizzo di una scala a sei punti, definita sulla base del confronto tra ecogenicità del parenchima epatico e della corticale renale, dell'entità dell'attenuazione del fascio ultrasonoro in profondità e della presenza o meno di aree di disomogenea distribuzione del grasso.

La tecnica ecografica offre inoltre la possibilità di valutare la presenza o meno di disomogeneità del parenchima epatico e dunque di effettuare una prima stima della presenza di un'eventuale evoluzione fibrotica dell'epatopatia e della sua entità, oltre alla possibilità di identificare contestualmente eventuali complicanze legate all'evoluzione stessa della malattia (HCC, ipertensione portale). La valutazione della fibrosi epatica presso il nostro centro avviene anch'essa mediante una scala a quattro punti, definita in base alla presenza e al tipo di disomogeneità del parenchima epatico (fine, grossolana, nodulare).

La **risonanza magnetica (MRI)** fornisce mezzi non invasivi per quantificare con precisione sia il ferro sia il grasso epatico. La risonanza è inoltre un metodo ampiamente accettato per misurare il contenuto di ferro epatico e cardiaco nei pazienti affetti da talassemia. Le comuni tecniche di MRI sono efficaci per determinare la quantità di steatosi ma la perdita di intensità di segnale secondaria alla presenza di ferro è un potenziale problema nella determinazione del grasso limitandone l'uso in alcune patologie come la DIOS.

Una **nuova tecnica di risonanza magnetica con sequenze di "single breath-hold" multiecho MRI** ha il potenziale per permettere la quantificazione simultanea del grasso e del ferro in un tempo molto breve (circa 20 secondi) e senza apnea del paziente. Questa metodica potrebbe essere quindi utile per quantificare accuratamente sia il grasso che il ferro nel fegato di pazienti con aumentata ferritina sierica, superando i limiti di precisione e durata della rappresentazione tradizionalmente utilizzata per la quantificazione del grasso o del ferro.

Dalle premesse fatte nasce lo scopo del nostro studio che coinvolgerà 130 pazienti circa e avrà la durata di un anno. Il progetto si articola nei seguenti punti:

- indagare la validità della tecnica ecografica come metodica di primo approccio per valutare la presenza di accumulo di grasso nel fegato e stimarne l'entità, confrontando i dati ecografici con quelli ottenuti dalla valutazione standard di steatosi nella biopsia epatica semiquantitativa;
- valutare l'eventuale presenza di aspetti ecografici tipici del solo sovraccarico di ferro, confrontando i dati ottenuti con i livelli del ferro epatico misurati mediante la risonanza magnetica e/o biopsia epatica;

- confrontare infine, in un campione più piccolo, i risultati ottenuti dalla studio ecografico sia con i dati ricavati dall'analisi "single breath-hold" multiecho MRI per il ferro e per il grasso, sia con il loro rispettivo LIC e AOS, misurato su campioni bioptici del fegato.

Ringraziando l'Associazione per la fiducia ed il sostegno riservato ci auguriamo che il lavoro porti a dei risultati interessanti ed utili nella pratica clinica permettendo una migliore definizione di una delle categorie più frequenti di pazienti da noi seguiti affetti da sovraccarico di ferro e sindrome metabolica.

**Dr. Carlo Nicoli - Dr.ssa Daniela Miriam Prata Pizzala**

## Primi risultati del Progetto Iperferritinemie "Senza Ferro"

Nel N° 58 del Notiziario di Maggio 2012 era stato descritto il Progetto dal titolo «Iperferritinemie "Senza Ferro"».

La ferritina è una proteina presente in tutte le cellule di tutti tessuti. La sua funzione principale è quella di fungere da deposito di ferro e proteggere in questo modo i tessuti dal potenziale effetto tossico del ferro libero (Figura 1).

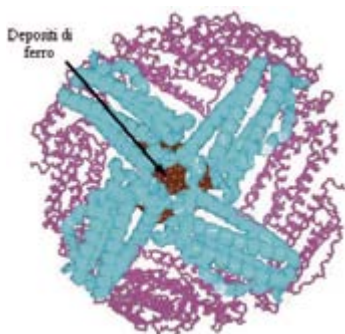


Figura 1.

Una piccola quota di ferritina viene anche rilasciata nel sangue, in modo proporzionale alla quantità di ferritina intra-cellulare.

Per questo motivo il dosaggio della ferritina sierica è molto utilizzato in diagnostica per valutare il sovraccarico di ferro tissutale. Tuttavia elevati livelli di ferritina sierica sono frequenti anche in molte situazioni in cui l'incremento è indipendente dallo stato del ferro (processi infiammatori acuti e cronici, neoplasie, abuso di alcool o necrosi epatocellulare). Esistono anche cause genetiche di iperferritinemia, come mutazioni nelle regioni IRE nel 5'UTR del gene della L-ferritina, responsabili

per la sindrome ereditaria di iperferritinemia cataratta (HHCS) o mutazioni nel gene stesso della L-ferritina, che causano una forma di iperferritinemia definita benigna.

Esistono però alcuni pazienti con iperferritinemia a eziologia sconosciuta che sempre più spesso si presentano all'ambulatorio.

In particolare in questo progetto abbiamo arruolato 14 pazienti, di cui 5 coppie di fratelli o sorelle. Questi pazienti non presentano sovraccarico tissutale di ferro, mutazioni note nei geni del metabolismo del ferro o altre cause note di iperferritinemia. Presentano però ferritina sierica sempre superiore a 1000 µg/L, ma con gli altri indici dello stato del ferro normali e nessun altro sintomo clinico. Lo scopo del nostro progetto è quindi quello di cercare di definire quali siano i meccanismi di incremento della ferritina sierica e le sue cause molecolari in questi soggetti con iperferritinemia inspiegata. Per validare lo studio, abbiamo arruolato anche 6 controlli sani con ferritina sierica e indici dello stato del ferro normali.

Prendendo spunto da un articolo pubblicato da un gruppo di ricercatori francesi, la nostra prima ipotesi formulata è stata che i pazienti producessero più ferritina intracellulare dei controlli. Poiché non è possibile accedere alle cellule epatiche o ai macrofagi, sedi principali del deposito di ferro, abbiamo pensato di utilizzare le cellule del sangue: gli eritrociti e i linfo-monociti. Studi precedenti avevano infatti evidenziato l'esistenza di una relazione tra la ferritina

contenuta nelle cellule del sangue e la ferritina a livello epatocellulare, in pazienti con diverse condizioni patologiche e diverso stato del ferro.

Ai pazienti e ai controlli è stato eseguito un semplice prelievo di sangue in ambulatorio. Poi, in laboratorio, partendo dal sangue intero abbiamo separato i globuli rossi ed i linfo-monociti (globuli bianchi) dal plasma (parte liquida del sangue) con il metodo della separazione per gradiente tramite Ficoll™ (Figura 2).

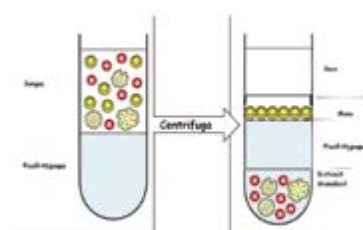


Figura 2.

Il Ficoll™ è un copolimero sintetico ramificato di alto peso molecolare molto idrosolubile sintetizzato a partire da saccarosio e epicloridrina. Il raggio delle singole molecole di Ficoll raggiunge i 2-7 nm; le soluzioni ottenute sciogliendo questo polimero in acqua sono caratterizzate da una densità massima, da un'alta viscosità e bassa pressione osmotica, tutte caratteristiche utilizzate per preparare gradienti di densità per la separazione cellulare.

I campioni così preparati, sia gli eritrociti sia i linfo-monociti, sono stati poi analizzati da un gruppo del San Raffaele con cui collaboriamo (Dr.ssa Sonia Levi e Dr. Paolo Santambrogio) per misurare la quantità di ferritina L ed H in rapporto al contenuto proteico totale.

Dai risultati ottenuti abbiamo osservato che tra i pazienti (PZ) e i controlli (CTRL), sia nei globuli bianchi sia nei rossi, non c'è alcuna differenza nei livelli cellulari di ferritina L e H, a fronte invece di livelli di ferritina sierica circa 20 volte maggiori nei pazienti (Come riportato nei grafici in Figura 3).

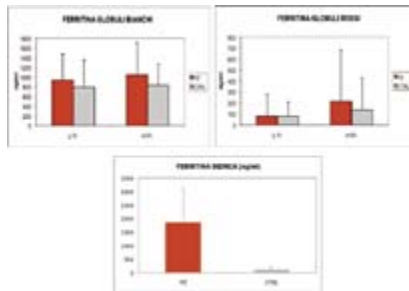


Figura 3.

Con questo primo esperimento abbiamo quindi dimostrato che i pazienti producono livelli di ferritina intracellulare paragonabili ai controlli normali. Abbiamo dovuto perciò formulare altre due ipotesi. La prima prevede che i pazienti producano sì la stessa quantità di ferritina dei controlli, ma che ne secerano di più nel sangue. Poiché parte della ferritina viene glicosilata prima di essere rilasciata in circolo, cioè vengono aggiunte molecole di zucchero alla proteina, abbiamo eseguito esperimenti sul siero per verificare se la proteina venisse glicosilata diversamente tra pazienti e controlli sani. Per eseguire questi esperimenti abbiamo incubato il siero dei soggetti con la concanavalina A,

una matrice che lega in modo specifico gli zuccheri aggiunti alla proteina (Figura 4). La concanavalina "cattura" tutta la ferritina glicosilata, lasciando nel siero solo la ferritina non-glicosilata.

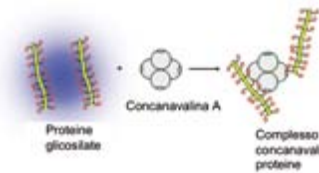


Figura 4.

Abbiamo quindi dosato i livelli di ferritina sierica pre- e post-trattamento con concanavalina e calcolato, per differenza, la quantità di ferritina glicosilata. Questi esperimenti hanno dimostrato che i pazienti presentano una percentuale di ferritina glicosilata più bassa rispetto a quella dei controlli (60% vs 85%, come dal grafico in Figura 5).



Figura 5.

Questi risultati suggeriscono quindi che nei pazienti potrebbe esserci un problema nella secrezione della ferritina nel sangue, ma dovranno essere confermati

con esperimenti futuri più approfonditi.

La seconda nuova ipotesi che abbiamo formulato, considerando la familiarità tra fratelli, è che esista un difetto genetico benigno recessivo che potrebbe causare questa forma di iperferritinemia.

Negli esperimenti futuri si valuterà quindi la possibilità di analizzare le coppie di fratelli affetti con uno studio delle varianti genetiche estese a tutto il genoma o alle regioni contenenti il gene della ferritina.

Tutti questi esperimenti sono stati finanziati dall'Associazione che ha approvato il Progetto e sono stati eseguiti presso il Laboratorio sito in Università durante il corso del dottorato di ricerca in Ematologia Sperimentale.

Dr.ssa Giulia Ravasi  
Dottoranda Senior



Associazione per lo Studio dell'Emocromatosi e delle malattie da sovraccarico di ferro

Registrazione Tribunale di Monza n. 1245 del 19.03.1997

Edito da Associazione per lo Studio dell'Emocromatosi e delle malattie da sovraccarico di ferro ONLUS

Direzione e Redazione Ospedale Nuovo S. Gerardo Monza via Piranesi 33 - tel. 039.2333220

Direttore responsabile Franco Rizzi

Coordinatore di redazione Romano Vasi

Segreteria Pier Carlo Donghi

Grafica Aldo Parma

Stampa Verga arti grafiche srl via don Venanzio Corti 7, Macherio

## Rimboccarci le maniche

In questi ultimi anni di crisi economica, di grandi incertezze si guarda al passato con nostalgia. Si ripensa a quanto abbiamo avuto e magari non adeguatamente apprezzato.

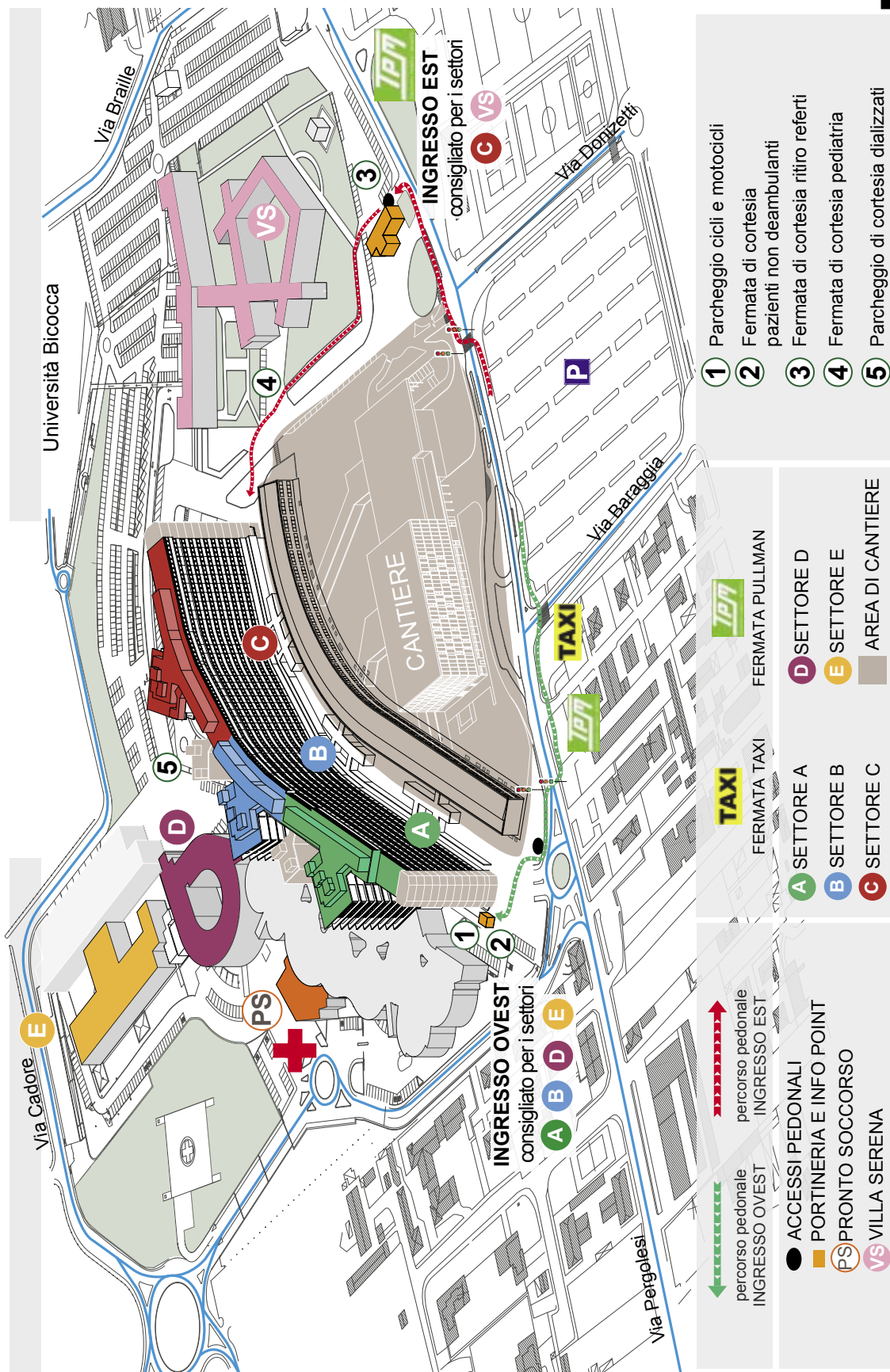
Anche l'Associazione vive momenti di attesa: siamo in attesa che finalmente nasca un centro con spazi e personale adeguato, siamo in attesa di poter supportare iniziative e investimenti per i quali tornare a organizzare attività di divulgazione e di raccolta fondi.

Vorremmo tornare, per esempio, ad avere banchetti natalizi e pasquali di grande successo, vorremmo tornare ad avere assemblee annuali di grande partecipazione, vorremmo anche dover stampare i bollettini perché terminati (perché no...), vorremmo che le persone che ci hanno seguito in momenti di grandi problematiche tornassero a farsi sentire.

Non tutto è terminato per colpa della crisi, abbiamo sicuramente fatto degli errori nel nostro percorso e allora proviamo a ricominciare: si dice che è nei momenti di difficoltà che nascono le grandi svolte. Di sicuro non si devono buttare le esperienze fatte e quello che di buono è stato creato. Non resta quindi che rimboccarci le maniche!

Donatella Donati

# COME ORIENTARSI DURANTE I LAVORI ALL'OSPEDALE SAN GERARDO DI MONZA



## ASSEMBLEA GENERALE DEL 15 GIUGNO 2013

### Approvazione Bilancio dell'esercizio al 31.12.2012

- i criteri di valutazione non sono stati modificati rispetto a quelli degli anni precedenti
- i valori di bilancio dell'esercizio in corso sono compatibili con quelli precedenti
- illustrati solo i conti con il saldo diverso da zero

**I RICAVI** - quote associative e 5xMille hanno riscontrato un calo del 10% e 20%, causa, evidentemente, della precarietà generale.

**I COSTI** sono stati contenuti al massimo. Voci predominanti sono: prestazioni di servizio, lavori di segreteria presso l'ambulatorio.

**CAPITALE NETTO** - l'esiguità dei costi nei vari esercizi e presente consente comunque la possibilità di rispettare le finalità dell'Associazione.

L'assemblea, preso atto delle esposizioni fatte, dopo esauriente discussione all'unanimità delibera di approvare il bilancio chiuso al 31 dicembre 2012.

