

PROGETTO

LA TERAPIA TRASFUSIONALE DEI PAZIENTI TALASSEMICI STUDIO METABOLICO E INFIAMMATORIO DI EMAZIE CONCENTRATE OTTENUTE DA DUE TIPOLOGIE DI LAVORAZIONE

Centro Proponente (Unità Operativa 1 - U.O.1): Medicina Trasfusionale e Laboratorio Analisi Chimico Cliniche ed Endocrinologiche (L.A.C.C.E.) AUSL-IRCCS Reggio Emilia

Centro Partecipante (Unità Operativa 2 - U.O.2): Medicina Trasfusionale AUSL Romagna - Officina Trasfusionale Pievesestina

1. Introduzione

Le sindromi talassemiche sono un gruppo di emoglobinopatie ereditarie che risultano da sintesi significativamente ridotta o assente di emoglobina normale determinate da mutazioni autosomiche recessive a carico dei geni delle catene proteiche dell'emoglobina. Il fenotipo clinico della talassemia varia dal quadro asintomatico e completamente silente del portatore sano a quello del malato grave con anemia severa. [1]

Dagli inizi degli anni '50 il quadro clinico, il decorso e la sopravvivenza dei malati sono cambiati, grazie all'utilizzo di terapie sempre più efficaci. In particolare, la terapia trasfusionale con concentrati di globuli rossi (PRBC), praticata con regolarità (i.e. ogni 15 giorni circa nei pazienti affetti da talassemia major), consente di mantenere costantemente un buon livello di emoglobina correggendo l'anemia in modo da garantire l'afflusso di una normale quantità di ossigeno a tessuti e organi, primo tra tutti il cuore, e permettere una riduzione della produzione di globuli rossi a livello midollare. [2] Per i pazienti con talassemia major e talassemia intermedia trasfusione dipendente, la trasfusione rappresenta una scelta terapeutica obbligata: il regime trasfusionale, ormai standardizzato, si ripete periodicamente per tutta la vita del paziente, a partire dalla prima infanzia, assicurando al paziente una crescita ed uno sviluppo regolari ed una buona qualità della vita. [3]

L'effetto collaterale più evidente della terapia trasfusionale è legato al ferro (Fe) liberato dai PRBC trasfusi e che in questi pazienti non viene utilizzato a causa dell'eritropoiesi inefficace. Il Fe liberato si



va a depositare nei tessuti dove provoca gravi lesioni le quali portano al quadro clinico legato alla trasfusione definito emocromatosi. [4] All'accumulo di ferro vanno aggiunte tutte le altre complicazioni classicamente legate alle trasfusioni. [5]

I dati del Centro Nazionale Sangue (CNS) riportano che, nonostante la β -talassemia sia definita una patologia rara, le trasfusioni destinate ai pazienti talassemici assorbono una quota superiore al 10% della produzione nazionale di globuli rossi. [6]

Il trattamento della β -talassemia major prevede la trasfusione di PRBC ogni 2-3 settimane, con lo scopo di mantenere un valore di Hb pre-trasfusionale di 9,5-10,5 gr/dL. [7-9]. In generale la quantità di PRBC da trasfondere non deve eccedere il 15-20 mL/kg. [10] L'utilizzo di PRBC leucodeplete è raccomandato al fine di minimizzare le reazioni febbrili, diminuire il rischio di trasmissione di citomegalovirus e di allo-immunizzazione.

Le raccomandazioni SIMTI del 2014 [3] per le strategie trasfusionali nei talassemici indicano che il concentrato eritrocitario da destinare a questi pazienti dovrebbe essere scelto tenendo conto delle seguenti caratteristiche:

- Il più alto contenuto di Hb possibile;
- Il più basso contenuto di leucociti;
- Il più basso contenuto di citochine;
- Il minimo intervallo temporale tra la donazione e la trasfusione, comunque non superiore a 14 giorni;
- La più bassa concentrazione di plasma per unità (< 0,5 g proteine totali/unità).

Questo poiché le caratteristiche dei diversi emocomponenti utilizzati possano incidere sulla frequenza delle trasfusioni, sugli eventi avversi a breve termine e, presumibilmente, anche su quelli a lungo termine.

1.1 Razionale dello studio

L'interesse verso i pazienti talassemici ha portato all'istituzione, presso il Centro Nazionale Sangue, del Registro Nazionale della Talassemia e delle altre Emoglobinopatie (DPCM 3 marzo 2017) [6]; il progetto si inserisce nell'ambito di questa crescente attenzione. È noto dalla letteratura, che le caratteristiche del prodotto destinato alla trasfusione risentono di diversi fattori:



- *tempo di conservazione* in quanto i cambiamenti biochimici, metabolici e strutturali a carico delle emazie conservate *ex vivo*, compaiono già nelle prime fasi del periodo di conservazione in frigo-emoteca e hanno un effetto negativo sulla qualità dell'emocomponente. [11-13] Tali lesioni correlano sia con una diminuzione della sopravvivenza *in vivo* degli eritrociti e del trasporto di O₂, che con l'accumulo di molecole potenzialmente tossiche [14-16] e ad azione pro-infiammatoria. [14]
- *Modalità di preparazione*. La modalità di rimozione dei leucociti, ad esempio, influisce sul grado di emolisi, sul volume dei globuli rossi, sulla conta leucocitaria e sul contenuto di fattori pro-infiammatori. [15-17]

Inoltre, nostri dati [12] sulla caratterizzazione metabolica dei PRBC, hanno messo in evidenza che durante il periodo di stoccaggio vi sono variazioni metaboliche associate ad un aumento dello stress ossidativo. Più di 40 metaboliti sono stati investigati e tra questi, la 5-oxoprolina è stata individuata come *biomarker* utile a stimare il livello di protezione dallo stress ossidativo degli eritrociti.

Tuttavia, tali evidenze sono relativamente recenti per cui non è attualmente noto se tali alterazioni possano determinare rischi in *setting* particolari di pazienti come quello dei talassemici. Ne consegue che indagare approfonditamente la qualità dell'emocomponente possa essere di primaria importanza. Ad oggi, le tipologie di prodotto di norma utilizzate per la terapia trasfusionale nei pazienti talassemici dell'AUSL-IRCCS Reggio Emilia e dell'Officina Trasfusionale AUSL Romagna, sono le seguenti (Figura 1):

- Tipo 1: concentrato eritrocitario ottenuto da filtrazione in linea pre-storage del sangue intero, successiva centrifugazione e rimozione del plasma;
- Tipo 2: concentrato eritrocitario ottenuto da scomposizione del sangue intero, con eliminazione del buffy-coat e plasma e successiva leucodeplezione degli eritrociti.

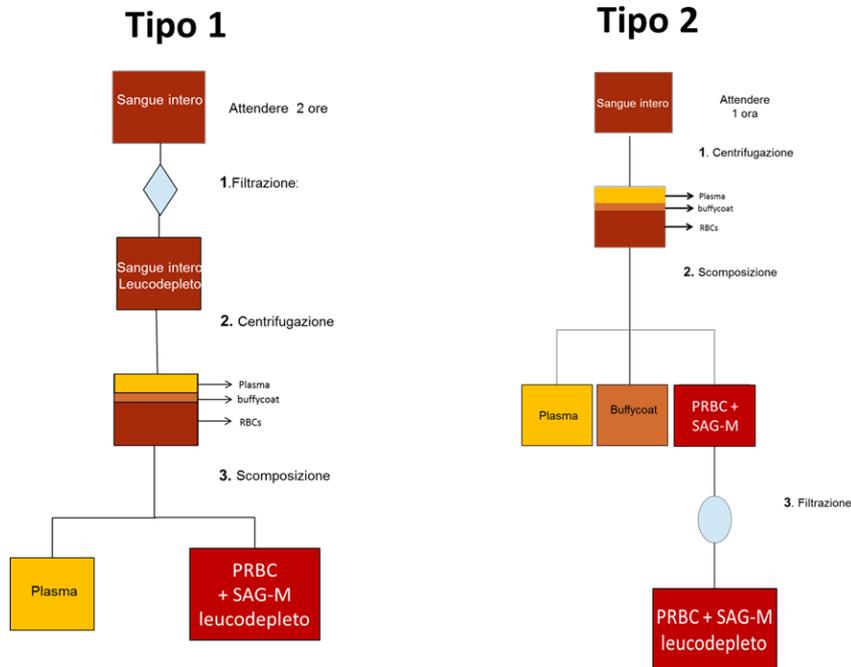


Figura 1. Schema delle procedure di preparazione delle emazie concentrate leucodeplete per pazienti talassemici.

Le due modalità di preparazione descritte in Figura 1 sono sostanzialmente diverse, pertanto non si può escludere che esse possano incidere anche sulle caratteristiche biochimiche dei due tipi di PRBC. Poiché è noto che gli eritrociti sono estremamente suscettibili al danno da radicali dell'ossigeno, lo stato infiammatorio e pro-ossidativo dei 2 diversi tipi di PRBC potrebbero risultare tra loro differenti.

2. Obiettivi

Obiettivo primario: individuare, tra i 2 tipi di PRBC, quello maggiormente appropriato per i pazienti talassemici.

Obiettivo secondario: identificazione di metaboliti con possibile ruolo eziopatogenetico nella insorgenza di eventi avversi post-trasfusionali.

3. Protocollo dello studio

3.1 Premessa al disegno sperimentale

È noto che la fonte di variabilità, in termini di qualità degli eritrociti, è rappresentata dal donatore. Infatti, il suo stato di salute, e alcuni fattori legati allo stile di vita non vengono normalmente considerati nella fase di selezione, ma possono impattare sulle proprietà fisico-biochimiche degli PRBC e sulla loro



conservazione. [17] Consci del fatto che la variabilità individuale potrebbe influenzare significativamente l'esito dello studio qui proposto, andremo a limitare tale fonte di *bias* nel modo di seguito descritto.

Le unità di sangue intero provenienti da due donatori ABO identici verranno dapprima unite a formare un pool e, successivamente, separate in due sacche (Figura 2) che saranno processate per ottenere le due diverse tipologie di PRBC, come precedentemente mostrato in Figura 1. I PRBC ottenuti alla fine del processo di lavorazione saranno utilizzati esclusivamente a scopo scientifico e, quindi, non trasfusi.

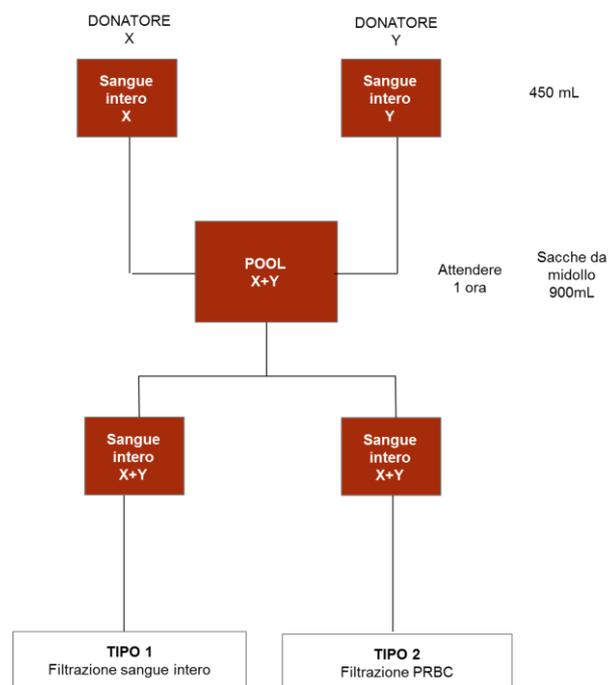


Figura 2. Schema di preparazione dei pool di sangue intero. Due unità di sangue intero provenienti da due donatori ABO identici, verranno dapprima unite in una sacca più grande (*pool*) e successivamente separate in due sacche che seguiranno le modalità di processamento precedentemente descritte (Tipo 1: filtrazione del sangue intero e scomposizione; Tipo 2: scomposizione e filtrazione dei PRBC) al fine di ottenere i due tipi di PRBC come mostrato in Figura 1).

3.2 Disegno sperimentale

Tipo di studio: osservazionale, multicentrico.

Durata dello studio: 1 anno

- Al fine di aumentare la disponibilità del numero delle unità di globuli rossi da utilizzare a scopo di ricerca, proponiamo uno studio multicentrico. Saranno coinvolti due diversi Servizi Trasfusionali operanti con la stessa metodologia produttiva:



- U.O.1: SOC di Medicina Trasfusionale dell'AUSL-IRCCS di Reggio Emilia;
- U.O.2: Officina Trasfusionale AUSL Romagna, Pievesestina, Cesena.

Lo studio proposto sfrutta diverse tecniche e metodologie analitiche, a disposizione presso il Laboratorio di Ricerca Metabolomica dell'U.O.1. Verranno integrate tecniche complementari e altamente informative ma che necessitano di specifiche competenze scientifiche quali: analisi citofluorimetriche, saggi ELISA e spettroscopia di risonanza magnetica nucleare protonica ($^1\text{H-NMR}$) e spettrometria di massa. L'analisi comparativa dei PRBC impiegherà parametri ematologici non inseriti nei controlli di qualità abituali di questi emocomponenti.

Verranno eseguite, per ogni donatore i test previsti per legge sia sulla sacca madre di sangue intero che sugli eritrociti concentrati leucodepleti.

Nel corso del progetto, i due Centri partecipanti recluteranno 20 donatori ciascuno (maschi tra i 35 e 50 anni di età) dai quali saranno raccolte in totale 40 unità di sangue intero; si ritiene che tale numero possa considerarsi, in questa fase, soddisfacente in virtù del carattere esplorativo della ricerca.

Le unità di sangue intero prima di essere processate verranno unite a formare un *pool* come mostrato in Figura 2 e poi suddivise per essere processate secondo le modalità mostrate in Figura 1.

3.3 Metodi

Per ciascuna unità di PRBC ottenute saranno effettuate le seguenti analisi a 2, 7 e 14 giorni di conservazione, Tabella 1:

- *Contenuto di Hb*: verrà effettuato un esame emocromocitometrico;
- *Parametri di qualità degli eritrociti*: verrà valutato il volume corpuscolare medio (MCV), la distribuzione (dimensione e volume) dei globuli rossi (RDW), il grado di emolisi [18], la fragilità eritrocitaria [19], e LDH (mediante test spettrofotometrico Advia 1800 Siemens tramite la conversione dell'acido piruvico in lattato e NADH in NAD^+).
- *Conta e vitalità dei leucociti residui*: sarà effettuata un'analisi citofluorimetrica. La conta dei leucociti residui sarà fatta utilizzando un anticorpo fluorescente anti-CD45 e biglie calibrate. La vitalità dei leucociti residui sarà invece valutata mediante il saggio della 7-actinomicina D (7-AAD);



- *Contenuto e metabolismo del Ferro*: livelli di ferro e ferritina, contenuto di transferrina, TIBC (capacità ferro-legante totale), UIBC (capacità ferro-legante non saturata), saturazione della transferrina.
- *Profilo metabolico*: L'analisi dei campioni viene effettuata, mediante spettroscopia di risonanza magnetica nucleare protonica ($^1\text{H-NMR}$) in un strumento JEOL 600MHz ECZ600R e spettrometria di massa (Spettrometro di massa LTQ ORBITRAP XL Thermo).
- *Profilo infiammatorio*: valutazione dei livelli di citochine correlate alla trasfusione mediante saggi ELISA (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-18);
- *Elettroliti e ammonio*: La quantificazione degli elettroliti sarà effettuata con ion selective electrodes (ISE), ammonio in un strumenti Advia 1800 Siemens.

Tabella 1: Saggi da eseguire per ogni tipo di emocomponente

Saggio	Sacca	Sangue Intero donatore	Sangue Intero X+Y	PRBC (2, 7 e 14 gg)
Contenuto di Hb		✓	✓	✓
Parametri di qualità degli eritrociti		✓	✓	✓
Conta e vitalità dei leucociti residui				✓
Contenuto e metabolismo del Ferro		✓	✓	✓
Profilo metabolico				✓
Profilo infiammatorio				✓
Elettroliti, ammonio		✓	✓	✓

Lo studio sarà condotto, per gli aspetti sperimentali dalla U.O.1 mentre per gli aspetti organizzativi saranno gestiti da entrambi le U.O..

3.4 Analisi dei dati



L'analisi dei dati verrà effettuata dalla U.O. proponente mediante utilizzo del software Graphpad Prism (GraphPad Software). La differenza tra i campioni esaminati verrà analizzata sulla base dei dati ottenuti in ciascun esperimento effettuato almeno 3 volte con un livello di significatività del 5%.

3.5 Percorso di approvazione dello studio

la U.O.1 presenterà lo studio presso il Comitato Etico (CE) di AVEN. Successivamente U.O.2. presenterà al CE della AUSL Romagna lo studio approvato dal CE di AVEN.

Si prevede una durata dello studio di circa 12 mesi dalla data di approvazione dello studio da parte di entrambi i CE.

4. Budget dello studio

Qui di seguito viene riportata la ripartizione del budget del progetto di ricerca.

Al Centro Nazionale Sangue viene richiesto esclusivamente il finanziamento di una Borsa di Studio per il periodo di 12 mesi, per l'importo complessivo di 24.000 €.

Nelle Tabelle sottostanti sono riportati i dettagli del co-finanziamento da parte dell'Azienda Unità Sanitaria Locale-IRCCS di Reggio Emilia e dell'Azienda Unità Sanitaria Locale della Romagna.



Titolo progetto:		Analisi di diverse tipologie concentrate destinate ai pazienti talassemici in Regione Emilia Romagna: uno studio multicentrico.	
Ente finanziatore:		Valutazione del profilo metabolico e infiammatorio	
UO Capofila:		CNS Centro Nazionale Sangue	
UO 2:		Azienda USL Reggio Emilia IRCCS - SOC Medicina Trasfusionale	
UO 2:		AUSL-Romagna - Pievesestina - Cesena - Officina Trasfusionale	
Personale AUSL-IRCCS Reggio Emilia	<i>Borsa di studio di 1 anno richiesta al Centro Nazionale Sangue</i>	€ 24.000,00	<i>Ricercatore di nuova acquisizione</i>
Capofila- Coordinatore: AUSL-IRCCS di Reggio Emilia - Co-Finanziamento			
Categorie	descrizione spese	Totale	
Acquisto di beni e servizi	<i>a. Materiale di Consumo (Kit citochine e reagenti per analisi NMR)</i>	€ 5.000,00	
	<i>b. Analisi Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) - Università degli studi di Parma</i>	€ 4.000,00	
	<i>c. Analisi biochimiche e dosaggio proteine presso Lab. Analisi AUSL-IRCCS</i>	€ 3.000,00	
Formazione/Missione	<i>Partecipazione a Congressi per diffusione risultati</i>	€ 2.000,00	
Totale co-finanziamento progetto AUSL-IRCCS Reggio Emilia		€ 14.000,00	
Unità Operativa 2: AUSL-Romagna - Co-Finanziamento			
Categorie	descrizione spese	Totale	
Acquisto di beni e servizi	<i>a. Materiali di Consumo (kit citochine e reagenti per analisi NMR)</i>	€ 14.000,00	
Totale co-finanziamento progetto AUSL Romagna		€ 14.000,00	



5. Bibliografia

- [1] Chonat S, Quinn CT. *Current Standards of Care and Long Term Outcomes for Thalassemia and Sickle Cell Disease*. Adv Exp Med Biol. 2017; 1013: 59-87. Review.
- [2] Silvestroni E, Bianco I. *Screening for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years*. Am J Hum genet .1975; 27: 198-203.
- [3] Bonomo P, Carta MP, Forni GL. *Raccomandazioni per le strategie trasfusionali nelle emoglobinopatie*. Collana Scientifica SITE, 2014; 3: 1-64.
- [4] Borgna-Pignatti C, Galanello R. *Thalassemias and related disorders: quantitative disorders of hemoglobin synthesis*. In Wintrobe's Clinical Hematology Vol. 42. 11th ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia; 2004, pp. 1319-65.
- [5] Borgna-Pignatti C, Cappellini MD, De Stefano P, Del Vecchio GC, Forni GL, Gamberini MR, Ghilardi R, Origa R, Piga A, Romeo MA, Zhao H, Cnaan A. *Survival and complications in thalassemia*. Ann N Y Acad Sci 2005; 1054: 40-7.
- [6] Registro Nazionale della Talassemia e delle altre Emoglobinopatie (DPCM 3 marzo 2017) – <http://www.centronazionalesangue.it/node/624>
- [7] Rund D, Rachmilewitz E. *β -Thalassemia*. N Engl J Med. 2005; 353(11):1135–46.
- [8] Rachmilewitz EA, Giardina PJ. *How I treat thalassemia*. Blood. 2011; 118(13):3479–88.
- [9] Piomelli S, Graziano J, Karpatkin M, et al. *Chelation Therapy, Transfusion Requirement, And Iron Balance In Young Thalassemic Patients*. Ann N Y Acad Sci. 1980; 344(1):409–17.
- [10] Voon HPJ, Vadolas J. *Controlling alpha-globin: a review of alpha-globin expression and its impact on beta-thalassemia*. Haematologica. 2008; 93(12):1868–76.
- [11] D'Alessandro A, Nemkov T, Reisz J, et al. *Omics markers of the red cell storage lesion and metabolic linkage*. Blood Transfus. 2017; 15:137-44.
- [12] Pertinhez TA, Casali E, Lindner L, et al. *Biochemical assessment of red blood cells during storage by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. Identification of a biomarker of their level of protection against oxidative stress*. Blood Transfus. 2014; 12: 548-56.
- [13] Casali E, Berni P, Spisni A, et al. *Hypoxanthine: a new paradigm to interpret the origin of transfusion toxicity*. Blood Transfus. 2016; 14: 555-6.
- [14] Sut C, Tariket S, Chou ML, et al. *Duration of red blood cell storage and inflammatory marker generation*. Blood Transfus. 2017; 15: 145-52.
- [15] Pertinhez TA, Casali E, et al. *A Comparative Study of the Effect of Leukoreduction and Pre-storage Leukodepletion on Red Blood Cells during Storage*. Front Mol Biosci. 2016; 3:13.
- [16] Orlov D, Karkouti K. *The pathophysiology and consequences of red blood cell storage*. Anesthesia 2015; 70: 29-37
- [17] Sparrow RL. *Red blood cell components: time to revisit the sources of variability*. Blood Transfus. 2017; 15: 116-25.
- [18] Han V, Serrano K, Devine DV. *A comparative study of common techniques used to measure haemolysis in stored red cell concentrates*. Vox Sang 2010; 98:116–23.



[19] Butterworth ST. *A micromethod for estimating osmotic fragility of erythrocytes*. J Clin Pathol. 1964; 17:96-7

6. GANTT

