

Alterazioni della funzionalità piastrinica in pazienti affetti da Malattia di Gaucher

Silvia Linari, Sandro Cinotti, Enrica Paladino, Giovanni Longo, Massimo Morfini.

Centro Emofilia, Divisione di Ematologia, Azienda Ospedaliera Careggi, Firenze.

INTRODUZIONE

La malattia di Gaucher tipo I (deficit di b-glucocerebrosidasi) è il più frequente disturbo ereditario da accumulo lisosomiale ed è caratterizzata da un progressivo accumulo di b-glucocerebroside nelle cellule del sistema reticoloendoteliale, con infiltrazione a livello del midollo osseo, epatosplenomegalia, lesioni scheletriche (1). Il sintomo più frequente, presente in circa la metà dei pazienti (2), è rappresentato dalle manifestazioni emorragiche, che sono comunemente attribuite alla piastrinopenia, dovuta sia alle dimensioni aumentate della milza (sindrome da ipersplenismo), sia all'infiltrazione del midollo osseo da parte delle cellule di Gaucher, che ostacolano la produzione delle piastrine stesse da parte dei loro progenitori (megacariociti). Il riscontro frequente di emorragie severe, anche in pazienti con conta piastrinica nella norma, ha indotto a ricercare altri fattori di rischio emorragico presenti nella malattia di Gaucher. Numerosi studi hanno così dimostrato una riduzione dei livelli di alcuni fattori della coagulazione (3,4) e recenti dati hanno rivelato un'alterazione dell'aggregazione piastrinica nel 22% dei soggetti esaminati (5). Per cercare di caratterizzare meglio l'alterata funzionalità piastrinica, abbiamo iniziato a studiarne sistematicamente i diversi aspetti evidenziando un disordine complesso, che si riduce progressivamente con la terapia enzimatica sostitutiva.

MATERIALI E METODI

La ricerca è stata condotta su 4 pazienti (3 femmine ed 1 maschio), seguiti presso il Centro Emofilia di Firenze, affetti da malattia di Gaucher tipo I, di età media 30 anni. All'esordio tutti presentavano sintomatologia emorragica spontanea (petecchie, ecchimosi, epistassi) e splenomegalia, eccetto due in precedenza sottoposti a splenectomia. Le indagini di laboratorio sono state eseguite su campioni di sangue periferico prelevato dopo 6 e 36 mesi dall'inizio della terapia enzimatica sostitutiva (6) con imiglucerasi (Cerezyme, Genzyme) alla dose media di 52 U/Kg/ mese (range: 20-120 U/Kg/mese). Sono stati effettuati i seguenti esami ematologici routinari (7): tempo di sanguinamento secondo Ivy, conta piastrinica, aggregazione piastrinica secondo Born. Con tecnica citofluorimetrica (8) sono stati analizzati:

- Fenotipo della membrana piastrinica mediante valutazione dell'espressione della glicoproteina Ib (GpIb), recettore per il fattore von Willebrand e della glicoproteina IIbIIIa (GpIIbIIIa), recettore per il fibrinogeno;
- Stato di attivazione piastrinica mediante la valutazione della exocitosi degli α -granuli (espressione della P-selectina, GMP-140) e dei lisosomi (espressione della glicoproteina 53, Gp53) a riposo;
- Attivabilità piastrinica mediante l'analisi dell'espressione della GMP-140 e Gp53 dopo stimolo agonista ADP+Adrenalina;
- δ -granuli mediante la valutazione del contenuto in nucleotidi adeninici con l'impiego del fluocromo quinacrina;
- Piastrine reticolate mediante il fluocromo arancio di tiazolo.

RISULTATI

Le prove di aggregazione piastrinica eseguite dopo 6 mesi dall'inizio della terapia mostravano in 3 su 4 pazienti una ridotta risposta al collagene, ADP, epinefrina; dopo 36 mesi, invece, si è ottenuta una normalizzazione dei test.

Il tempo di sanguinamento (v.n.: 3-8 minuti), che era significativamente allungato (range: 9-15 minuti) a sei mesi di trattamento, si è normalizzato a 36 mesi.

La conta piastrinica (v.n.: 140-440x10⁹/L) effettuata a sei mesi mostrava trombocitopenia in 1 dei 2 pazienti non splenectomizzati (90x10⁹/L) ed il seguente range: 90-180x10⁹/L. Dopo 36 mesi di terapia si è ottenuta una significativa crescita del numero delle piastrine (range: 116-264 x10⁹/L), tranne in un soggetto che si era trattato con discontinuità per un lungo periodo di tempo.

Lo studio del fenotipo piastrinico eseguito dopo i primi 6 mesi di terapia ha mostrato una lieve riduzione dell'espressione della GpIb (canale medio di fluorescenza c.m.f.: 335/ v.n.:350-430) in 1 su 4 pazienti, associata ad una normale esposizione della GpIIbIIIa (v.n.: 460-590). Dopo 36 mesi, l'espressione di entrambe le glicoproteine è risultata aumentata e compresa nel range di normalità . La valutazione dello stato di attivazione piastrinica ha mostrato il seguente andamento:

Dopo 6 mesi di terapia:

GMP-140 basale ai limiti inferiori del range normale (v.n.: 0.03-0.23 Parametro D KS Stat.) in 4 su 4 campioni Gp53 basale ai limiti inferiori del range normale (v.n.: 0-0.26 Parametro D KS Stat.) in 1 su 4 campioni.

Dopo 36 mesi di terapia:

GMP-140 basale oltre il valore normale in 2 su 4 pazienti Gp53 basale significativamente aumentata in 4 su 4 pazienti.

La valutazione dell'attivabilità piastrinica, intesa come espressione della GMP-140 e della Gp53 dopo stimolo agonista con ADP+Adrenalina ha dato i seguenti risultati:

Dopo 6 mesi di terapia:

GMP-140 fortemente ridotta in 2 su 4 soggetti ed al limite inferiore della norma nei restanti (v.n.: 0.6-0.8 Parametro D KS Stat.).

Gp53 fortemente ridotta in 1 su 4 pazienti, normale nei restanti (v.n.: 0.26-0.82 Parametro D KS Stat.).

Dopo 36 mesi di terapia:

GMP-140 con valori normali in 4 su 4 campioni;

Gp53 con valori normali in 4 su 4 pazienti.

La valutazione del contenuto in nucleotidi adeninici (d-granuli) e delle piastrine reticolate, eseguita solo dopo 36 mesi di terapia, ha dimostrato in tutti i campioni una significativa riduzione del contenuto dei d-granuli ed una normale percentuale di piastrine reticolate.

CONCLUSIONI

I pazienti affetti da malattia di Gaucher hanno rivelato un'alterata funzionalità piastrinica espressa da una ridotta aggregabilità a ADP, Adrenalina e Collagene, da una diminuita exocitosi degli a-granuli e lisosomi dopo stimolo agonista (ADP+Adrenalina) e da un allungamento del tempo di emorragia, indipendentemente dai valori della conta piastrinica. Lo scarso livello di attivazione piastrinica evidenziato dall'analisi della GMP-140 e Gp53 e la pur non frequente riduzione della GpIb insieme ai difetti funzionali descritti, supportano l'idea che un difetto piastrinico quantitativo e qualitativo sia caratteristica peculiare della malattia. Il dato più significativo che emerge dalla nostra valutazione è il netto miglioramento dei parametri piastrinici esaminati, conseguente al trattamento enzimatico sostitutivo continuativo.

Ci proponiamo di seguire nel tempo l'andamento degli stessi indici di funzionalità piastrinica e di arruolare nuovi pazienti in questo studio. Sarebbe interessante poter effettuare una valutazione dei parametri descritti al momento stesso della diagnosi, prima di iniziare la terapia sostitutiva, come è

stato possibile fare solo in un caso dei 4 presentati. In conclusione, la piastrinopenia, associata a difetti funzionali piastrinici multipli ed alla riduzione di alcuni fattori della coagulazione, può spiegare le gravi manifestazioni emorragiche frequentemente osservate nella malattia di Gaucher. L'efficacia della terapia è stata supportata dalla significativa riduzione della frequenza ed entità delle manifestazioni emorragiche dei pazienti esaminati.