



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE
SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN:
SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E SPERIMENTALI
INDIRIZZO IN:
SCIENZE GERIATRICHE ED EMATOLOGICHE
XXIV° CICLO

**INTERAZIONE TRA TPO E SUO RECETTORE cMPL IN DIVERSI
DISORDINI PIASTRINICI**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Coordinatore di indirizzo: Ch.mo Prof. Fabrizio Fabris

Supervisore: Ch.mo Prof. Fabrizio Fabris

Dottorando: Dr.ssa Fabiana Tezza

INDICE

| | |
|--|---------|
| RIASSUNTO | pag. 5 |
| ABSTRACT | pag. 7 |
| INTRODUZIONE | |
| 1.1 LA MEGACARIOPOIESI | pag. 9 |
| 1.1.1 Struttura e funzione della TPO | pag. 10 |
| 1.1.2 Struttura e funzione di cMPL | pag. 14 |
| 1.2 DISORDINI DELLA TROMBOPOIESI | pag. 17 |
| 1.2.1 Trombocitopenia immune primaria (ITP) | pag. 18 |
| 1.2.2 Piastrinopenie costituzionali (FAM) | pag. 25 |
| 1.2.3 Sindromi mielodisplastiche (MDS) | pag. 28 |
| 1.2.4 Altre piastrinopenie da ipoplasia midollare | pag. 31 |
| 1.2.5 Trombocitemia essenziale (ET) | pag. 32 |
| SCOPO DELLO STUDIO | pag. 37 |
| MATERIALI E METODI | pag. 39 |
| RISULTATI | |
| 4.1 Studio del cMPL in citofluorimetria | pag. 49 |
| 4.2 Livelli di TPO nei diversi gruppi di studio | pag. 51 |
| 4.3 Western Blot (WB) di cMPL nei soggetti normali | pag. 53 |
| 4.4 Espressione di cMPL nei diversi gruppi di studio | pag. 54 |

| | |
|---|---------|
| 4.5 Correlazione tra TPO e cMPL nei diversi soggetti dello studio | pag. 56 |
| 4.6 Studio longitudinale in ITP splenectomizzate o trattate con agonista del TPO-R | pag. 60 |
| DISCUSSIONE | pag. 65 |
| BIBLIOGRAFIA | pag. 73 |

RIASSUNTO

INTRODUZIONE: la trombopoiesi è un processo multifattoriale dipendente da vari fattori tra cui microambiente midollare, cellule di superficie e fattori di crescita ematopoietici.

Il principale fattore che regola la produzione piastrinica è la trombopoietina (TPO), una proteina di 332 aminoacidi, con peso molecolare pari a 95 kDa, contenente due domini: quello amino-terminale con omologia strutturale con l'eritropoietina e quello carbossi-terminale coinvolto nel mantenimento della stabilità della TPO.

La TPO è sintetizzata prevalentemente a livello epatico e presenta livelli inversamente correlati al numero di piastrine e alla massa megacariocitaria anche se vi sono delle eccezioni quali i casi di massiva distruzione piastrinica o di trombocitosi reattiva.

La TPO aumenta dimensioni e numero dei megacariociti, favorisce l'espressione dei marcatori di superficie per le piastrine (CD41 e CD61) e stimola poliploidia dei megacariociti.

Il recettore per la TPO è il cMPL, costituito da un dominio extracellulare e da uno intracellulare, espresso soprattutto a livello di cellule CD34, megacariociti e piastrine.

Esistono diverse isoforme del cMPL, K, P e Tr, di cui quella fondamentale per la trasduzione del segnale è la P.

Il legame della TPO al suo recettore determina l'omodimerizzazione del recettore con conseguente fosforilazione di JAK2 e attivazione della via di trasduzione del segnale.

Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare i livelli di TPO e l'espressione di cMPL in diversi disordini piastrinici, in soggetti splenectomizzati e in quelli in terapia con agonista del TPO-R.

MATERIALI e METODI: le patologie da noi considerate sono state piastrinopenia immune primaria, piastrinopenia costituzionale, forme di ipoplasia midollare e sindromi mielodisplastiche; come gruppo di controllo sono stati considerati soggetti sani e soggetti con trombocitemia essenziale.

La TPO è stata dosata con metodica ELISA, il cMPL è stato valutato sia in citofluorimetria sia con Western Blot.

La valutazione statistica è stata effettuata con il software GraphPad Prism.

RISULTATI: lo studio del cMPL in citofluorimetria non è stato possibile per l'impossibilità a confrontare i risultati ottenuti data l'ampia variabilità *interassay*.

I soggetti con ipoplasia midollare presentano i più alti livelli di TPO dell'intera casistica; nei soggetti con ITP si hanno livelli di TPO superiori ai soggetti sani, alle ET e alle forme familiari e inferiori ai soggetti con ipoplasia midollare.

I soggetti con ITP hanno un'espressione di cMPL superiore ai controlli e alle ET, ma del tutto sovrapponibile alle ipoplasie midollari.

Nei soggetti splenectomizzati i livelli di TPO e l'espressione del cMPL si è ridotta mentre non vi sono state modifiche nei soggetti trattati con agonista del TPO-R.

DISCUSSIONE: analogamente a quanto descritto in letteratura anche nei nostri soggetti con ITP, la TPO è solo modestamente aumentata. I soggetti con ipoplasia midollare, così come quelli con mielodisplasia hanno un'aumentata espressione di cMPL e un aumento dei livelli di TPO. La correlazione tra TPO e cMPL nelle ITP è risultata lineare mentre nelle MDS vi è una correlazione inversa a sottolineare un possibile ruolo modulatore da parte delle diverse isoforme del recettore.

I dati relativi ai soggetti trattati, chirurgicamente o no, sono sovrapponibili a quelli descritti in letteratura ma sono relativi a un gruppo estremamente piccolo di pazienti.

ABSTRACT

INTRODUCTION: megakaryopoiesis is regulated by a complex network of cytokines and chemokines controlling all different stages of the process.

Thrombopoietin (TPO), produced constitutively by the liver, is the main regulator of platelet count and critically influences megakaryocyte proliferation and differentiation through a complex signal transduction TPO levels inversely correlated to platelet count and MK bone marrow mass.

cMPL is TPO receptor and it is made up of an intra- and an extracellular domain. Three isoforms, P, K and Tr, were identified and subsequent findings suggested P-isoform being the dominant form.

Upon ligand-induced MPL homodimerization, the major signaling events for proliferation are mediated through the JAK-STAT pathway.

We want to evaluate TPO levels and cMPL expression in different platelet disease, in splenectomized subjects and in patients treated with TPO-mimetic.

MATERIALS and METHODS: we assessed patients affected by primary immune thrombocytopenia, familial thrombocytopenia, hypoplasia forms and myelodysplastic syndromes. We compared these groups with not affected as well as thrombocytopenia patients.

The method for measurement for TPO was an ELISA; cMPL was evaluated through cytofluorimetry and Western Blot.

RESULTS: cytofluorimetry was not applied to cMPL because of high interassay variability.

The highest TPO levels were found in patients affected by bone marrow hypoplasia; ITP shows TPO levels higher than not affected, essential thrombocytopenia and familial thrombocytopenia patients.

ITP patients display a higher cMPL than controls and ET, but comparable levels to that of bone marrow hypoplasia.

In splenectomized ITP patients TPO and cMPL decreased after splenectomy whereas in TPO-mimetic treated ones they stayed stable.

DISCUSSION: according to literature, our ITP patients show a little increase in TPO. Bone marrow hypoplastic as well as myelodysplastic patients display higher cMPL and TPO levels.

In ITP there seems to be a linear correlation between TPO and cMPL, whereas in MDS the correlation seems to be indirect.

It could be suggested a modulatory role for different receptor isoforms.

No clear conclusion can stem from these data due to the reduced dimension of splenectomized and TPO-mimetic treated groups of patients.

INTRODUZIONE

1.1 La megacariopoiesi

La megacariopoiesi è un complesso processo di proliferazione, differenziazione e maturazione di un precursore emopoietico rivolto alla produzione di piastrine, componenti cellulari anucleati del sangue, svolgenti un ruolo fondamentale nel processo emostatico. Infatti la produzione di un adeguato numero di piastrine è fondamentale per la riparazione dei continui micro-danni vascolari nonché per la formazione del trombo qualora si presentino danni vascolari di maggiori dimensioni.

La conta piastrinica normale di una persona sana è compresa tra 150 e $350 \times 10^9/l$ elementi anche se, in uno stesso soggetto, vi sono delle variazioni fisiologiche; il mantenimento di tale *range* di normalità richiede una produzione piastrinica giornaliera pari a $\sim 1 \times 10^{11}$ elementi poiché la vita media piastrinica è pari a 10 giorni circa e vi è una compartimentazione splenica di circa $1/3$ [35].

La trombopoiesi è un processo dipende da vari fattori: microambiente midollare, costituito sia dalle cellule che dalle proteine della matrice extracellulare, molecole di superficie e fattori di crescita ematopoietici.

Il principale fattore che regola la produzione piastrinica è la trombopoietina (TPO). Il termine trombopoietina, introdotto per la prima volta nel 1958, fa riferimento alla sostanza responsabile dell'aumento della produzione piastrinica in risposta a condizioni di trombocitopenia, per analogia con l'eritropoietina (EPO) che, invece, stimola la produzione eritrocitaria [37]. La trombopoietina, attraverso il suo recettore cMPL, influenza in maniera critica la proliferazione e la differenziazione dei megacariociti attraverso un complesso *network* di segnali cellulari.

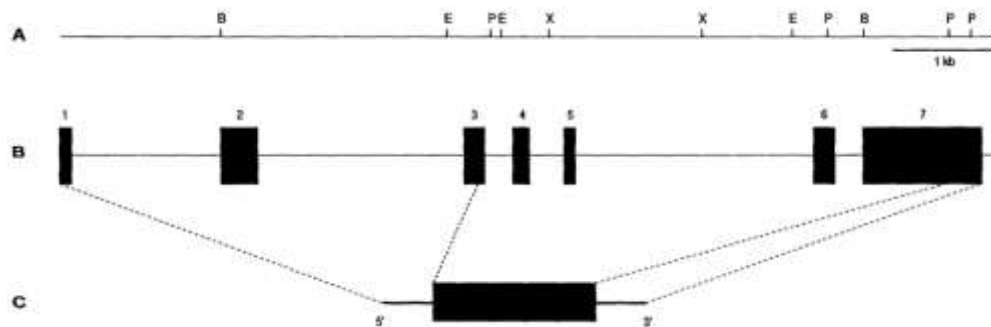
L'interazione tra TPO e cMPL non è deputata solo alla differenziazione megacariocitaria ma svolge anche un ruolo fondamentale di regolazione dei livelli di TPO stessa

attraverso un meccanismo che permette il controllo costante della quantità di TPO libera circolante, come descritto successivamente in maniera più dettagliata.

In aggiunta alla TPO, altri fattori influenzano la trombopoiesi, tra i quali IL3, IL6, G-CSF ed EPO. Questi fattori non rappresentano tuttavia fattori di regolazione basale della trombopoiesi. Al contrario, la chemochina SDF-1 o CXCL12, attraverso il suo recettore CXCR4, sembra possa esercitare un controllo diretto sulla trombopoiesi in maniera TPO-indipendente. Nei paragrafi successivi verrà descritta in maggiore dettaglio la biologia e l'interazione di TPO e cMPL.

1.1.1 Struttura e funzione della TPO

Il gene per la TPO è localizzato nel cromosoma 3q27 ed è costituito da 7 esoni e 6 introni, la cui struttura è rappresentata nella seguente figura [7].



Il precursore proteico è costituito da 353 aminoacidi da cui, dopo eliminazione peptidica a livello amino-terminale, viene prodotta la proteina matura che è costituita da 332 aminoacidi, con un peso molecolare di 95 kDa, contenente 2 domini: il dominio amino-terminale, la cui struttura presenta per più del 20% omologia con l'EPO è costituito da 153 aminoacidi, comprende 4 residui di cisteina, ed è deputato al legame col recettore denominato cMPL.

Il secondo dominio, quello carbossi-terminale, è costituito da 179 aminoacidi (resi-

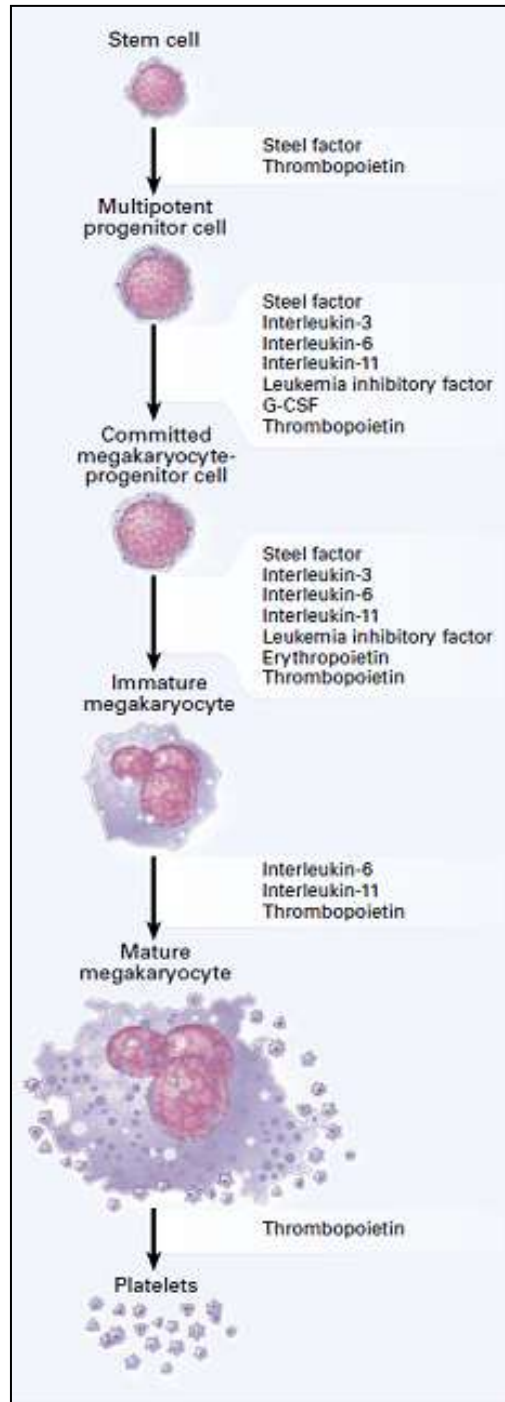
dui 154-332), è altamente glicosilato ed è importante nel mantenimento della stabilità e dell'emivita in circolo della TPO.

La TPO viene sintetizzata principalmente nel fegato [31], ma può essere prodotta anche dai reni e, in minor misura, da testicoli, cervello e dalle cellule stromali del midollo osseo [36]. Il ruolo fondamentale del fegato nella produzione di TPO è dimostrato dalla presenza di grave piastrinopenia in pazienti con insufficienza epatica avanzata, piastrinopenia rapidamente reversibile dopo trapianto di fegato [46].

Tuttavia è stato dimostrato come la TPO sia utile ma non fondamentale per la formazione di piastrine: infatti, topi knock-out per la TPO o per il suo recettore cMPL, presentano una riduzione marcata ma non completa di piastrine, con quota residua normale per morfologia e funzionalità [48].

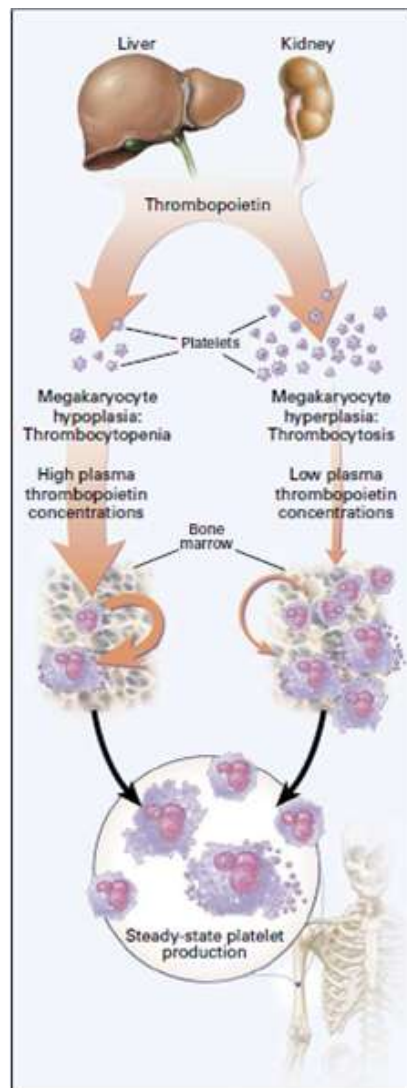
Convincenti evidenze dimostrano come i livelli plasmatici di trombopoietina siano inversamente correlati al numero di piastrine e alla massa megacariocitaria. Un esempio al riguardo è rappresentato dai livelli elevati di TPO in soggetti con piastrinopenia da terapia mielosoppressiva presentano [63; 16]. Esistono, tuttavia, delle eccezioni a questo principio rappresentate, innanzitutto, dai casi di distruzione piastrinica in cui i livelli ormonali non sono elevati come ci si aspetterebbe in base alla conta piastrinica [39; 28] e, in secondo luogo, dalle forme di trombocitosi reattiva in cui, invece, i livelli di TPO sono più alti del previsto [6].

Come precedentemente anticipato, la TPO, in sinergia con altre citochine tra cui IL3, IL6, G-CSF ed EPO, svolge diverse funzioni durante lo sviluppo dei megacariociti: aumenta le dimensioni e il numero dei megacariociti, favorisce l'espressione di marcatori piastrinici specifici quali il CD41 e il CD61 nonché stimola la poliploidia dei megacariociti [13; 69]. Nella fase finale di questo processo, come evidenziato nella seguente figura [34], la TPO stimola autonomamente il megacariocita maturo alla produzione di piastrine.



La regolazione dei livelli plasmatici di TPO prodotta dal fegato e, in minor misura dal rene, avviene attraverso la rimozione della TPO stessa dal plasma mediante legame a specifici recettori espressi dalle piastrine [17; 42].

Nella seguente figura [34], viene proposto uno schema di regolazione dei livelli di TPO: nelle condizioni di piastrinopenia, poca TPO viene rimossa con conseguente incremento dei suoi livelli plasmatici che andranno a stimolare il midollo per ristabilire i “normali” livelli di piastrine; nelle condizioni opposte di trombocitosi, invece, la TPO viene rimossa dalle piastrine con conseguenti bassi livelli plasmatici, ridotto stimolo a livello megacariocitario e ripristino di “normali” livelli piastrinici.



1.1.2 Struttura e funzione di cMPL

Il recettore per la TPO viene chiamato cMPL ovvero “*cellular homolog of myeloproliferative leukemia*” e appartiene alla famiglia dei recettori per le citochine di tipo I con la quale condivide la presenza di due moduli CRMs, ovvero “*cytokine receptor homology modules*”.

È una proteina transmembrana con un dominio extracellulare N-terminale e un dominio intracellulare C-terminale. La sua espressione è limitata ai tessuti coinvolti nei processi emopoietici, ad esempio midollo osseo e fegato embrionale, ed è particolarmente espresso dalle cellule CD34+, dai megacariociti e dalle piastrine dove sono presenti solamente 25-100 recettori/piastrina [4].

Il gene per il cMPL è costituito da 12 esoni ed è mappato a livello del cromosoma 1p34.

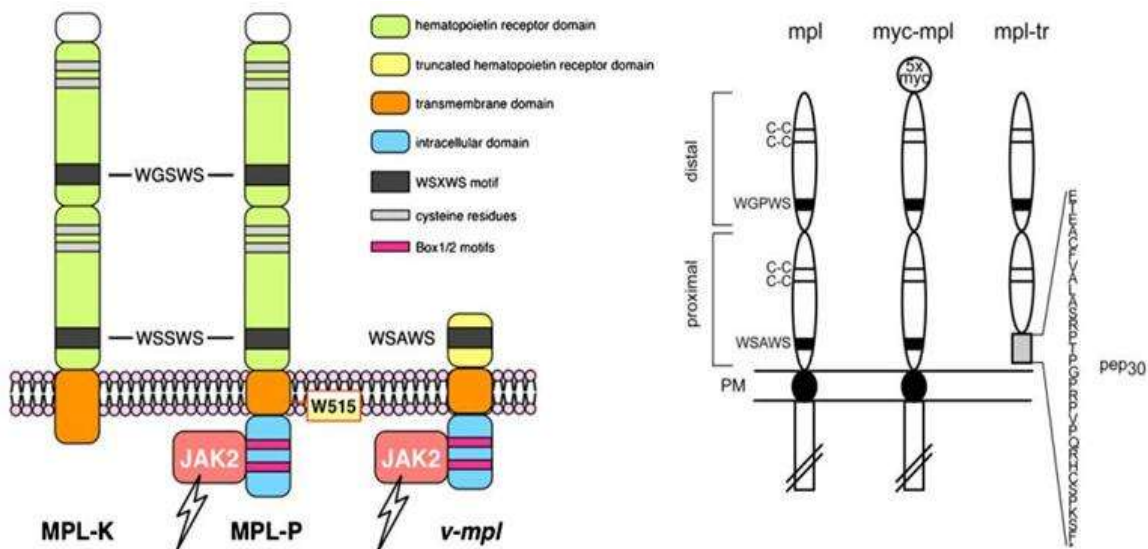
Sono state, inizialmente, identificate 2 isoforme - P e K - che, per meccanismi di *splicing* alternativo, hanno una struttura differente a livello del 3' con conseguenti diversità del dominio citoplasmatico. Studi successivi hanno dimostrato da un lato che le due isoforme sono co-esprese e, dall'altro, che l'isoforma principale è la P [24] che presenta un peso molecolare di 71 kDa nella forma non glicosilata, di 82 kDa in quella glicosilata.

Il cMPL-P è caratterizzato dalla presenza del dominio intracellulare, che ha una grande omologia strutturale con il v-mpl, suggerendo un ruolo fondamentale dell'isoforma P nella trasduzione del segnale [73].

Accanto a queste due isoforme, negli anni 2000, se ne è aggiunta una terza, definita Tr, con un peso molecolare di 56 kDa [9], caratterizzata dalla presenza di un dominio extracellulare intatto, ma priva dei domini transmembrana e intracellulare a causa di stop precoce, proprio a ridosso del dominio transmembrana. È stato ipotizzato che questa isoforma sia importante per la regolazione dell'espressione della isoform-

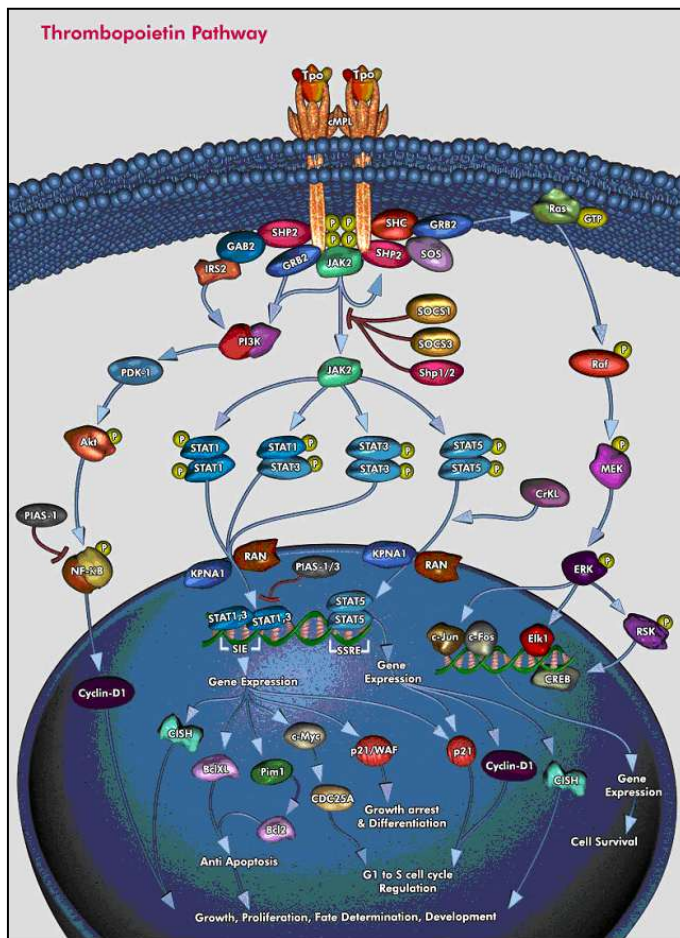
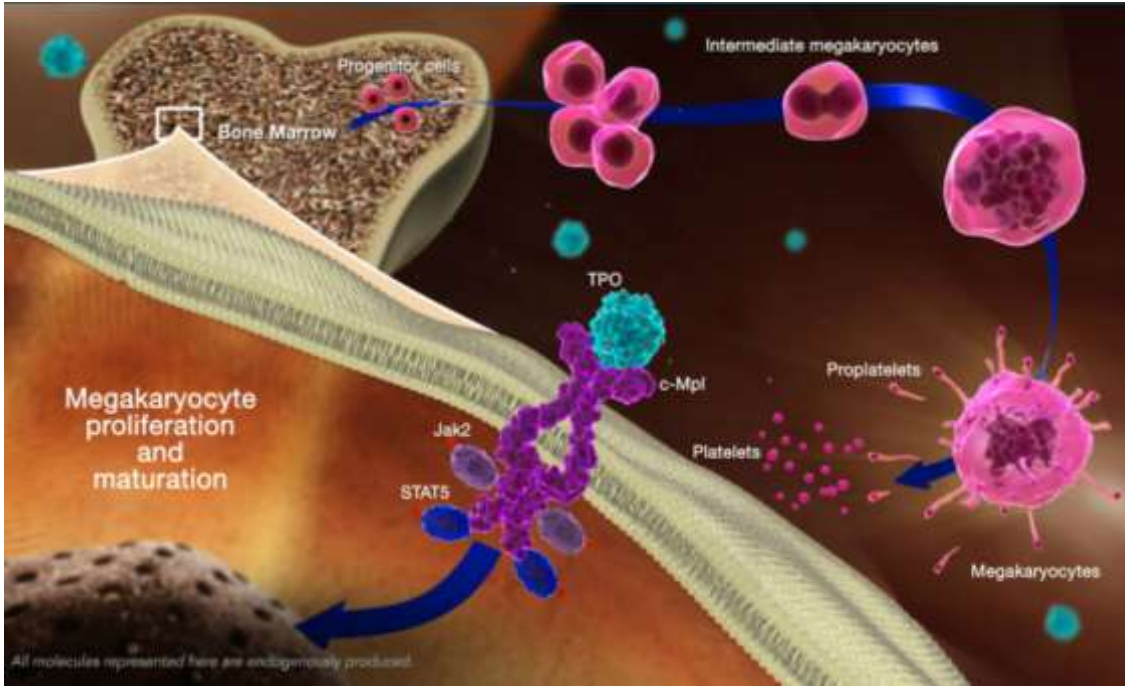
ma P e si pensa che il cMPL-Tr, rimanendo libero nell'ambiente intracellulare, possa dimerizzare con le singole catene della forma P, determinandone internalizzazione e distruzione all'interno dei lisosomi [71].

Qui di seguito vengono riportate le diverse isoforme del recettore cMPL (K, P e Tr).



Il legame della TPO al suo recettore provoca l'omodimerizzazione e conseguente attivazione del recettore con fosforilazione di JAK2 (*Janus-family Tyrosine Kinase-2*). A questo punto JAK2 è attivata e determina, a sua volta, la fosforilazione di un gran numero di substrati tra cui il cMPL stesso, STAT1 (*Signal Transducers and Activators of Transcription*), STAT3, STAT5 e varie proteine cosiddette "adattatrici" comprendenti SHC (*SH2 containing protein*), Raf1, MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)/ERK (*Extracellular Signal Regulated Kinase*) e PI3K (*Phosphatidylinositol-3 Kinase*). Dopo la fosforilazione, STAT1 e STAT3 omodimerizzano e traslocano a livello nucleare dove si legano al SIE (*Sis Inducible Element*).

Viene qui di seguito riportata una rappresentazione relativa alla via di trasduzione del segnale.



1.2 Disordini della piastrinopoiesi

I disordini della piastrinopoiesi possono essere distinti in acquisiti e congeniti e possono essere riassunti come schematizzato nella tabella 1.

Tabella 1. Classificazione delle piastrinopenie

| Piastrinopenie da alterata o diminuita piastrinopoiesi | | Piastrinopenia da aumentata distruzione | Piastrinopenie da alterata distribuzione |
|--|---|--|--|
| Acquisite | Leucemie, mielofibrosi SMD, PNH Anemia aplastica Sdr amegacariocitica idiopatica Mieloftisi Agenti chimici o fisici Infezioni (HBV, HIV) Deficit di Vit. B12 e/o folati Farmaci: chemioterapici | Non Immunologica TMA: TTP, HUS, CID, HELLP, CAPS PNH Sepsi, vasculiti Protesi vascolari, CEC Dialisi Ipersplenismo Emangiomi cavernosi Malattie Cardiogene cianotizzanti | Emodiluizione, anestesia ipotermica |
| | Congenite | Immunologica <i>Pseudopiastrinopenia</i> da EDTA ITP Primaria "idiopatica" ITP Secondaria a: Malattie autoimmuni: LES, tiroidite, APS Infezioni virali: HIV, HCV, CMV, VZV Infezioni batteriche: HP, Plasmodio M. Vaccini: Rosolia Linfomi: LLC, HD, CVID Farmaci: Eparina (HIT), Anti GpIIb-IIIa Alloanticorpi (HLA, HPA) porpora neonatale NAIT, Post trasfusionale | |
| AD | Mediterranea May-Haggling Alport e varianti Paris-Trousseau Quebec, vW lib | | |
| AR | Bernard Soulier Trombocitopenia Amegacariocitica TAR Chediak-Higashi Hermansky-Pudlak Anemia di Fanconi | | |
| X-linked | Wiskott-Aldrich | | |

SMD Sindromi Mielodisplastiche **PNH** Emoglobinuria parossistica notturna **AD** Autosomica dominante
AR Autosomica recessiva **TAR** Trombocitopenia con assenza del radio **TMA** Microangiopatie trombotiche
TTP Porpora trombotica trombocitopenica **HUS** Sindrome uremico emolitica **CID** Coagulazione intravasale diffusa **HELLP** Hemolysis, elevated liver enzyme, low platelets syndrome (**C**)**APS** Sindrome da anticorpi anti fosfolipidi (catastrofica) **CEC** circolazione extracorporea **EDTA** Acido etilendiamminotetraacetico **ITP** Trombocitopenia immune **LES** Lupus eritematoso sistemico **LLC** Leucemia linfatica acuta **HD** Linfoma di Hodgkin **HIT** Trombocitopenia indotta da eparina

Per questo studio sono stati considerati diversi disordini piastrinici secondo i criteri classificativi presentati nella tabella, ed in particolare la casistica è stata selezionata dai seguenti gruppi:

- a. piastrinopenie da aumentata distruzione (trombocitopenia immune primaria)
- b. piastrinopenie acquisite da alterata o ridotta piastrinopoiesi (sindromi mielodisplastiche, piastrinopenia post-chemioterapia o da mieloftisi)
- c. piastrinopenie congenite da alterata o ridotta piastrinopoiesi.

Nei paragrafi successivi verranno descritte le caratteristiche delle patologie piastriniche considerate in questo studio.

1.2.1 Trombocitopenia immune primaria (ITP)

La trombocitopenia immune primaria (ITP) è un disordine acquisito immuno-mediato caratterizzato da una piastrinopenia isolata, dove per piastrinopenia si intende una conta piastrinica periferica inferiore a $100 \times 10^9/l$, in assenza di cause o patologie che si possano associare alla piastrinopenia [59], con tendenza a presentare diatesi emorragica.

I meccanismi patogenetici alla base della ITP sono rappresentati da un lato da una ridotta produzione piastrinica e dall'altro da una loro aumentata distruzione, entrambi su base autoimmune [8]. L'immunità umorale gioca un ruolo preponderante nella fisiopatogenesi della ITP, ed è responsabile della presenza di anticorpi diretti verso antigeni piastrinici. In alcuni pazienti gli anticorpi riconoscono antigeni che derivano da una singola glicoproteina, mentre in altri casi vengono riconosciute glicoproteine multiple [23]. La presenza di questi autoanticorpi è considerata un marcatore di ITP, tuttavia solamente in circa il 60% dei soggetti sono identificabili [65]. Varie ipotesi sono state formulate al riguardo, tra le quali la scarsa sensibilità dei test, la presenza di antigeni non ancora conosciuti o ad altri meccanismi in grado di

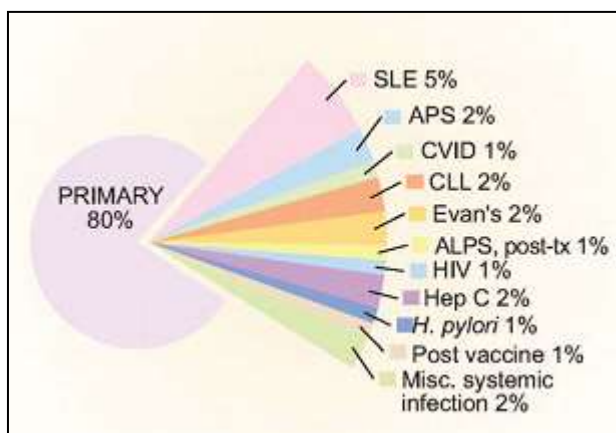
provocare piastrinopenia ed in particolare quelli cellulo-mediati.

Oltre che sulla presenza di autoanticorpi, la diagnosi di ITP primaria è una diagnosi di esclusione sia delle forme non autoimmuni che delle forme secondarie [tabelle 2 e 3].

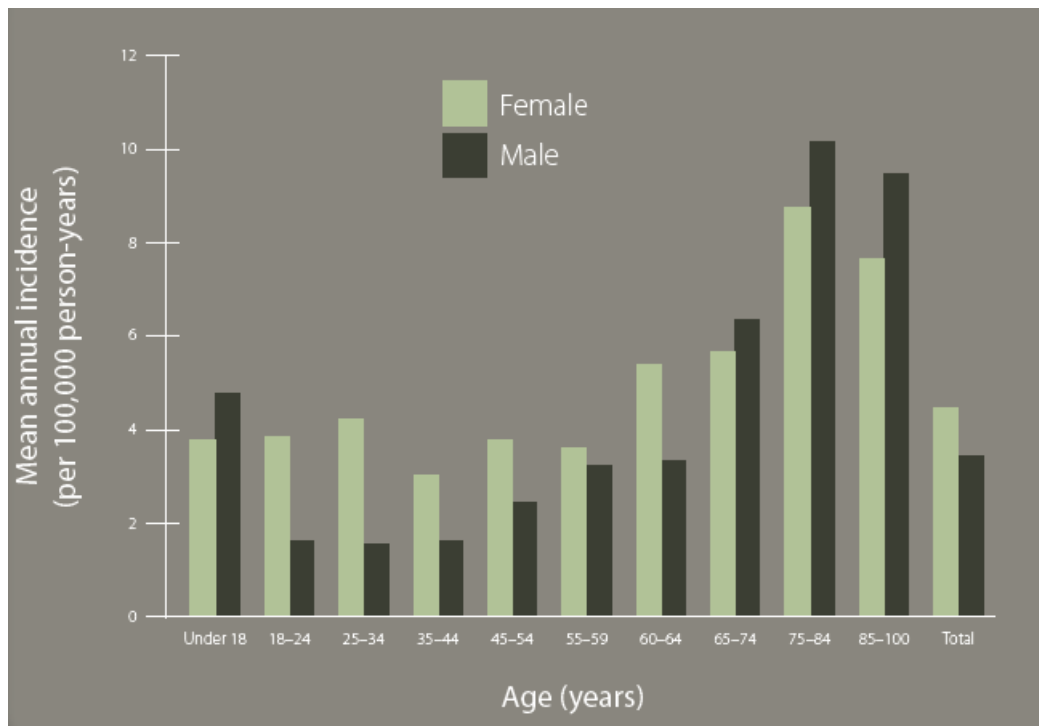
Tabella 2. Principali cause di piastrinopenia non auto-immune [12]

| |
|---|
| Pseudopiastrinopenia |
| Disordini con ridotta produzione piastrinica |
| <ul style="list-style-type: none"> • Infezioni virali • Terapia mielosoppressiva • Piastrinopenie congenite • Deficit di vitamina B₁₂ e/o folati • Patologie midollari (mielodisplasia, mielofibrosi, leucemia) |
| Disordini con ridotta sopravvivenza piastrinica |
| <ul style="list-style-type: none"> • Farmaci (chinino) • Piastrinopenia allo immune (post trasfusionale) • Coagulazione intravascolare disseminata • Porpora trombotica trombocitopenica/sindrome uremico-emolitica • Bypass cardiopolmonare |
| Piastrinopenia diluizionale |
| Ipersplenismo |
| <ul style="list-style-type: none"> • Ipertensione portale • Infiltrazione splenica |
| Sindromi mielodisplastiche |

Tabella 3. Cause di ITP secondaria, tratto da Cines [9].



L'incidenza varia da 1.6 a 3.9/100.000 abitanti/anno con una prevalenza variabile tra 9.5 e 23.6 per 100.000 persone; il rapporto maschi/femmine è spostato verso il sesso femminile nelle forme ad esordio giovanile mentre nelle forme ad esordio in età adulta il rapporto è circa uguale come evidenziato nella seguente figura [62; 1].



Il decorso clinico della ITP può avere dopo la fase acuta di esordio, evoluzione variabile da forme persistenti a forme croniche. Nel 2009 [59], oltre alla ridefinizione dell'acronimo ITP, si è provveduto a standardizzare anche le diverse fasi della malattia definendo:

- a. nuova diagnosi: entro 3 mesi dalla diagnosi stessa
- b. persistente: da 3 mesi a 1 anno
- c. cronica: dopo 1 anno dalla diagnosi.

La relazione tra TPO e conta piastrinica è stata studiata anche nelle ITP. Al contrario di quanto ipotizzato sulla base dei meccanismi di regolazione tra TPO e conta pia-

strinica, si è dimostrato che nei soggetti con ITP i livelli di TPO non sono elevati come ci si sarebbe aspettati in base alla severità della piastrinopenia [15; 39; 41; 26].

L'ITP, generalmente, viene scoperta incidentalmente se la conta piastrinica è $\geq 50 \times 10^9/l$ mentre nei soggetti con conta piastrinica inferiore vi può essere una sintomatologia emorragica più o meno grave a seconda della conta stessa. Più spesso, i soggetti con conta compresa tra 50 e $30 \times 10^9/l$ elementi possono presentare tendenza a ecchimosi/ematomi per traumi minori mentre l'insorgenza di sintomatologia emorragica spontanea (ecchimosi, petecchie, etc.) si osserva per conte piastriniche comprese tra 30 e $10 \times 10^9/l$; al di sotto di $10 \times 10^9/l$ i pazienti possono presentare gravi sanguinamenti spontanei degli organi interni.

L'indicazione a terapia della ITP dipende da vari fattori: presenza e gravità del sanguinamento, rapidità dell'incremento desiderato della conta piastrinica e possibili effetti collaterali. Lo scopo del trattamento sarà quello di ottenere una conta piastrinica in grado di prevenire sanguinamenti maggiori, non necessariamente di normalizzare la conta piastrinica.

Il trattamento di prima linea della ITP si basa, innanzitutto, sull'uso di corticosteroidi per pochi giorni (desametasone 40mg/die per 4 giorni) oppure per periodi più lunghi (ad esempio prednisone 1 mg/kg per 21 giorni, a scalare) .La terapia steroidea può essere associata alla somministrazione parenterale di immunoglobuline (IVIg) [49]. Nell'ambito di questa ultima opzione di prima linea, vi sono evidenze di efficacia in pazienti Rh+, di immunoglobuline anti-D (50-75 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ev) in singola somministrazione. In Italia, tuttavia, questo emoderivato è stato ritirato dal commercio perché associato ad elevata incidenza di anemia emolitica nel paziente anziano.

La principale terapia di seconda linea è, in pazienti eligibili per condizione generale, la splenectomia, la quale è tuttavia associata ad un tasso di refrattarietà/recidiva del 10-20%.

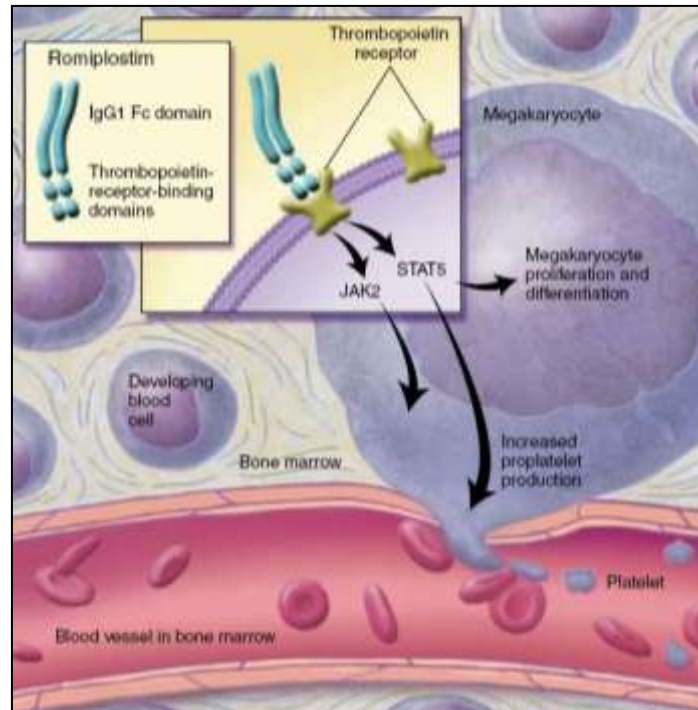
Ulteriori trattamenti di seconda linea successivi o alternativi alla splenectomia sono rappresentati da:

- a) immunosoppressori: rituximab, un anticorpo monoclonale chimerico, registrato per i linfomi non Hodgkin CD20 positivi, leucemia linfatica cronica e artrite reumatoide. Agisce determinando la citolisi, mediata dal complemento, di linfociti B esprimenti l'antigene con conseguente pressoché totale e persistente deplezione dei linfociti B stessi e blocco della produzione di autoanticorpi antiplastrine [78]. Attualmente il rituximab è un trattamento off-label nel trattamento della ITP [49].

Vi sono alternative all'impiego del rituximab, rappresentate da altri farmaci immunosoppressori tra cui azatioprina, vincristina, ciclofosfamide, ciclosporina A, micofenolato mofetile, IFN- γ 2B.

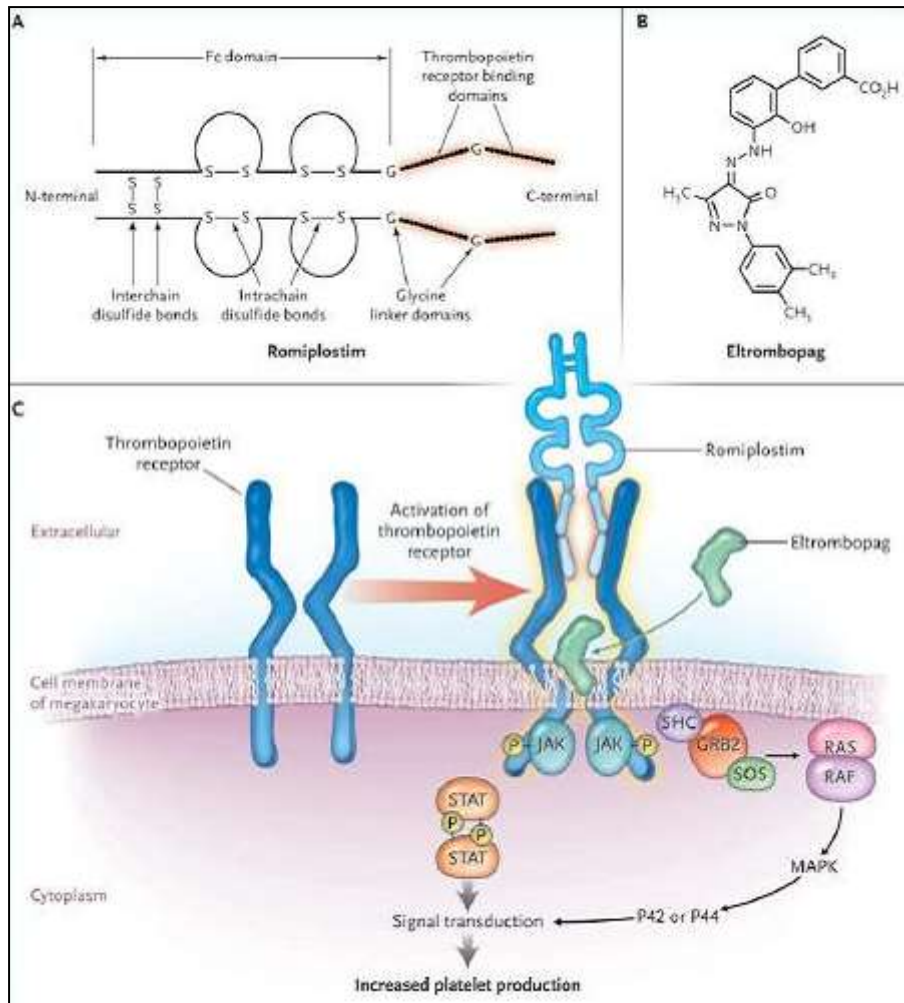
- b) agonisti del recettore della trombopoietina (TPO-R): romiplostin ed Eltrombopag.

Il romiplostin è una proteina di fusione Fc-peptide costituita da due componenti; la prima comprende un dominio Fc e la seconda un dominio peptidico che è deputato al legame con il recettore della TPO, legame che determina l'attivazione della via di trasduzione del segnale normalmente attivata dalla TPO endogena [60], come presentato nella seguente figura.



L'Eltrombopag presenta delle differenze rispetto al romiplostim, innanzitutto perché è una piccola molecola non peptidica, in secondo luogo perché il sito di legame è situato nel dominio transmembrana del recettore, in corrispondenza dell'istidina 499 e della treonina 496. L'effetto complessivo è, comunque, analogo a quello della TPO endogena.

Nella seguente figura sono rappresentate le diverse strutture di romiplostim ed Eltrombopag e i diversi siti di legame a livello del TPO-R [29].



Sono in fase di studio clinico altri tre farmaci: AKR-501, un TPO mimetico non peptidico che agisce in modo non competitivo, simile a Eltrombopag; ASI670542, piccola molecola che mima l'azione della TPO; fostamatinib, inibitore della tirosin-chinasi splenica con verosimile conseguente riduzione della distruzione piastrinica [60].

Il gruppo di lavoro che ha ristabilito la definizione di ITP ha anche reso omogenei i criteri per definire la risposta alla terapia [59]:

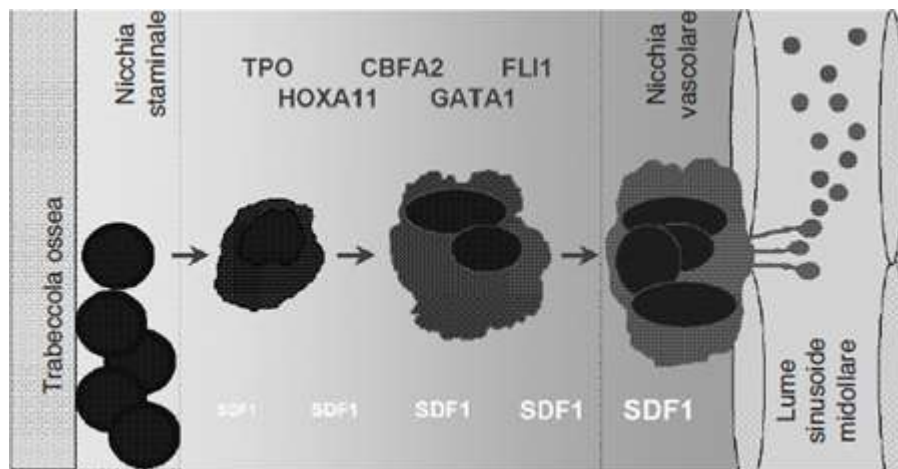
- completa (CR): conta piastrinica $\geq 100 \times 10^9/L$ elementi
- risposta (R): conta piastrinica compresa tra 30 e $100 \times 10^9/L$ elementi op-

- pure se vi è un incremento pari al doppio della conta piastrinica basale
- c. non risposta (NR): conta piastrinica $\leq 30 \times 10^9/L$ elementi o incremento inferiore al doppio del basale.

1.2.2 Piastrinopenie costituzionali (FAM)

Le piastrinopenie costituzionali, altrimenti dette ereditarie/familiari, sono delle rare forme di piastrinopenia con manifestazioni cliniche variabili da forme gravi e sintomatiche fin dalla nascita a forme più lievi di riscontro casuale.

Alla base di tali forme si possono avere o difetti del recettore per la TPO oppure difetti dei fattori di trascrizione coinvolti nella produzione delle proteine necessarie alla maturazione dei megacariociti quali HOXA11, CBFA2, GATA1, FLI1 [2]. Ciò viene schematizzato nella seguente figura dove SDF1 è il gradiente di *stem cell factor* che guida la cellula dalla nicchia staminale all'endotelio sinusoidale.



Le piastrinopenie ereditarie si possono suddividere in:

- a. Piastrinopenie da difetto di differenziazione dei megacariociti tra cui si annoverano:
- Piastrinopenia amegacariocitaria congenita (CAMT): autosomica recessiva, derivante da mutazioni del gene c-MPL. Il difetto del recettore im-

pedisce la differenziazione delle cellule staminali in megacariociti con conseguente piastrinopenia. Successivamente vi è un coinvolgimento anche delle linee granuloblastica ed eritroide con conseguente aplasia trilineare che porta a morte del paziente in età giovanile. È stato ipotizzato [2] che le mutazioni *non-sense* o *frame shift* siano alla base delle forme ad evoluzione precoce (CAMT1), quelle *missense* delle forme ad evoluzione più tardiva (CAMT2). In questi soggetti i livelli di TPO sono molto elevati e le piastrine hanno morfologia normale.

- Trombocitopenia amegacariocitaria congenita con sinostosi radio-ulnare (CTRUS): molto rara, autosomica dominante, derivante da delezioni nel gene HOXA11. Forma sindromica in cui accanto alla piastrinopenia si possono avere sinostosi radio-ulnare, clinodattilia, sindattilia, displasia dell'anca e/o sordità neurosensoriale [70].
- Trombocitopenia con assenza del radio (TAR): autosomica recessiva. Oltre alla piastrinopenia si ha aplasia bilaterale del radio associata ad altre malformazioni scheletriche e non.
- Disordine piastrinico familiare con predisposizione alla leucemia mieloide acuta (FDP/AML): autosomico dominante. Soggetti con piastrinopenia moderata e tendenza a sviluppare una leucemia mieloide acuta non linfatica e sindromi mielodisplastiche.

b. Piastrinopenie da difetto di maturazione dei megacariociti comprendenti:

- Piastrinopenie da mutazioni di GATA1: piastrinopenia X-linked associata a diseritropoiesi con componente emolitica.
- Trombocitopenia tipo Paris-Trousseau e sindrome di Jacobsen (TCPT e JBS): autosomiche dominanti dovute a delezioni terminali 11q23. Nella sindrome di Jacobsen si hanno ritardo psicomotorio, malformazioni car-

diache e del volto; nelle piastrinopenie di tipo Paris-Trousseau non ci sono difetti associati.

c. Piastrinopenie da difetto della formazione piastrinica:

- **Sindrome di Bernard Soulier (BSS):** autosomica recessiva. È caratterizzata dalla presenza di piastrine giganti e pertanto definita macrotrombocitopenia cui si associano alterazione della risposta alla ristocetina e di adesione piastrinica. È legata a un difetto quantitativo e/o qualitativo del complesso glicoproteico $Ib\alpha$ - $Ib\beta$ -IX-V causato da mutazioni nel gene per la $GPIb\alpha$, $GPIb\beta$ e $GPIX$ che, per lo più, determinano alterazioni quantitative del complesso $GPIb$ -IX-V. Nelle forme varianti, la più frequente delle quali è quella definita Bolzano, le mutazioni bloccano la funzione del recettore piuttosto che la sua espressione.
- **Malattia MYH9-correlata:** comprendente l'anomalia di May-Hegglin, la sindrome di Sebastian, la sindrome di Fechtner e quella di Epstein. Derivano tutte da mutazioni del gene MYH9 per la catena pesante della miosina non muscolare IIA (NMMHC-IIA). Fin dalla nascita si ha la presenza di una piastrinopenia più o meno marcata con numerose piastrine giganti. È possibile identificare sugli strisci di sangue periferico la presenza, nel citoplasma dei neutrofili, di inclusi di colore azzurro pallido, costituiti da aggregati di NMMHC-IIA, definiti inclusi Döhle-like. I soggetti affetti presenteranno piastrinopenia associata a cataratta e/o difetto uditivo di tipo neurosensoriale nonché nefropatia.

d. Piastrinopenie da ridotta sopravvivenza piastrinica in cui sono comprese:

- **Sindrome di Wiskott-Aldrich e trombocitopenia X-linked (WAS e XLT):** nella WAS accanto alla piastrinopenia si hanno eczema, infezioni ricorrenti e maggior frequenza di malattie autoimmuni e neoplastiche mentre

nella XLT si ha una piastrinopenia meno grave senza difetti associati. Derivano da mutazioni del gene per la proteina WAS (Xp 11.22-p11.23).

- Malattia di von Willebrand tipo 2B (vWD2B): caratterizzata da diatesi emorragica conseguente al difetto del vWF con aumentata risposta alla ristocetina.

e. Piastrinopenie a genesi sconosciuta in cui è compresa la cosiddetta sindrome delle piastrine grigie (GPS) caratterizzata da un grave deficit di α granuli cosicché le piastrine sembrano “pallide”.

La terapia in queste forme, volta ad arrestare le emorragie maggiori o a preparare i pazienti qualora debbano affrontare interventi chirurgici, si basa sull'uso di concentrati piastrinici, preferibilmente da donatori HLA-compatibili per il rischio di alloimmunizzazione e successiva refrattarietà. Nei casi in cui tale terapia si dimostra inefficace, si possono utilizzare concentrati di fattore VII ricombinante attivato. Le emorragie minori traggono beneficio da emostasi locale. La splenectomia è riservata solo ai pazienti con WAS o XLT [2].

1.2.3 Sindromi mielodisplastiche (MDS)

Le sindromi mielodisplastiche sono definite come un gruppo eterogeneo di disordini clonali del midollo osseo caratterizzati da emopoiesi inefficace, displastica, e da un variabile rischio di trasformazione leucemica.

Presentano un'incidenza variabile tra 3 e 12 casi/100.000abitanti/anno e un aumento di incidenza età-correlato con valori particolarmente elevati oltre i 70 anni [55; 44; 74; 45].

Le alterazioni molecolari e funzionali a livello midollare capaci di generare cellule mielodisplastiche sono poco conosciute. È, tuttavia, noto che la trasformazione di una cellula staminale normale in una displastica richiede il susseguirsi di lesioni ge-

netiche ed epigenetiche, quali alterazioni dei trasduttori del segnale, dei regolatori del ciclo cellulare o dei fattori di trascrizione [57].

Dal punto di vista genetico, le MDS presentano perdite cromosomiche coinvolgenti geni critici per una corretta mielopoiesi, tuttavia non vi sono mutazioni in grado di identificare in modo sicuro i vari sottotipi di MDS o l'evoluzione leucemica. Le alterazioni cromosomiche più comuni sono a carico dei cromosomi 5, 7, 8, 13 e 20 con la delezione interstiziale del cromosoma 5 che è caratteristica della cosiddetta "sindrome del 5q-".

La classificazione delle MDS attualmente in uso è quella del WHO, qui di seguito riassunta [22].

| Categoria WHO | Sangue periferico | Midollo osseo |
|---|--|---|
| Anemia refrattaria (AR) | Anemia Blasti rari o assenti | Displasia eritroide isolata Blasti < 5% Sideroblasti ad anello < 15% |
| Anemia refrattaria con sideroblasti ad anello (RARS) | Anemia Assenza di blasti | Displasia eritroide isolata Blasti < 5% Sideroblasti ad anello ≥ 15% |
| Citopenia refrattaria con displasia multilineare | Citopenia (bilineare oppure pancitopenia) Blasti assenti o rari Non corpi di Auer Monociti < 1 x 10 ⁹ /L | Displasia in ≥ 10% delle cellule in 2 o più linee mieloidi Blasti < 5% Assenza di corpi di Auer Sideroblasti ad anello < 15% |
| Citopenia refrattaria con displasia multilineare e sideroblasti ad anello | Citopenia (bilineare oppure pancitopenia) Blasti assenti o rari Non corpi di Auer Monociti < 1 x 10 ⁹ /L | Displasia in ≥ 10% delle cellule in 2 o più linee mieloidi Sideroblasti ad anello ≥ 15% Blasti < 5% Assenza di corpi di Auer |
| Anemia refrattaria con eccesso di blasti -1 (RAEB-1) | Citopenie Blasti < 5% Non corpi di Auer Monociti < 1 x 10 ⁹ /L | Displasia mono- o multilineare Blasti 5-9% Assenza di corpi di Auer |
| Anemia refrattaria con eccesso di blasti -2 (RAEB-2) | Citopenie Blasti 5-19% Corpi di Auer ± Monociti < 1 x 10 ⁹ /L | Displasia mono- o multilineare Blasti 10-19% Corpi di Auer ± |
| Sindrome mielodisplastica inclassificabile | Citopenie Blasti assenti o rari Non corpi di Auer | Displasia monolineare dei granulociti o dei megacariociti Blasti < 5% Assenza di corpi di Auer |
| Sindrome mielodisplastica associata a isolata del (5q) | Anemia Blasti < 5% Piastrine N o ↑ | Megacariociti normali o aumentati con nuclei ipolobati Blasti < 5% Assenza di corpi di Auer Anomalia citogenetica isolata del (5q) |

La presenza di piastrinopenia svolge un ruolo preponderante nel determinare le complicanze emorragiche delle MDS, tuttavia pochi sono gli studi relativi all'incidenza di piastrinopenia alla diagnosi. Nella casistica utilizzata per mettere a punto l'International Prognostic Scoring System (IPSS) la piastrinopenia era presente nel 37% dei soggetti [19], mentre in una più recente revisione di più di 2000 casi di MDS, la piastrinopenia alla diagnosi era presente nel 67% dei soggetti [33].

La presenza di una piastrinopenia isolata è poco frequente e si aggira attorno al 7% dei casi.

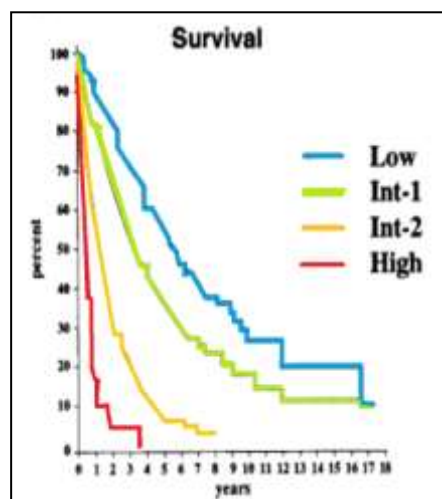
Dal punto di vista morfologico, nel sangue periferico dei soggetti con MDS le piastrine presentano un diametro superiore alla norma e, spesso, sono ipogranulate. A livello midollare, invece, si ha la presenza di micromegacariociti, di megacariociti binucleati o megacariociti poliploidi, multinucleari.

Per quanto riguarda la prognosi delle MDS è ormai largamente usato il già citato International Prognostic Scoring System (IPSS) che prende in considerazione dati clinici, morfologici e citogenetici e porta alla creazione di diverse classi di rischio. Il limite di questo score è essenzialmente dato dal raggruppare in classi omogenee soggetti con patologie diverse per quanto concerne presentazione e caratteristiche biologiche.

Viene qui di seguito riportato l'IPSS.

| Variabili prognostiche | Punteggio | | | |
|---|----------------------------------|----------------|---|-------|
| | 0 | 0.5 | 1.0 | 1.5 |
| % blasti midollari | < 5 | 5-10 | | 11-20 |
| Cariotipo | Normale, -Y, del (5q), del (20q) | Altre anomalie | Anomalie complesse ≥ 3 o del cr. 7 | |
| Citopenie* | 0-1 | 2-3 | | |
| *neutrofili $< 1.5 \times 10^9/L$, emoglobina $< 10g/dl$, piastrine $< 100 \times 10^9/L$; Basso rischio: 0; Intermedio 1: 0.5-1.0; Intermedio 2; 1.5-2.0; Alto ≥ 2.5 | | | | |

Applicando l'IPSS si ottiene una sopravvivenza mediana per i pazienti a basso rischio di 5.7 anni, per gli INT-1 di 3.5 anni, per la classe INT-2 di 1.2 anni e, infine, per la categoria ad alto rischio di 0.4 anni come evidenziato nella seguente figura modificata da Greenberg [19].



1.2.4 Altre piastrinopenie da ipoplasia midollare

La produzione di piastrine da parte del midollo osseo può ridursi a causa di danni midollari diretti. Nella maggior parte di questi disordini in grado di determinare soppressione o danno midollare, le altre serie emopoietiche, quella eritrocitaria e quella granulocitaria, sono egualmente colpite. Alcuni esempi sono rappresentati dalle seguenti patologie:

- Danno secondario ad infezione virale (es. rosolia, morbillo, varicella, parvovirus, epatite C, infezione da EBV);
- Alcuni agenti infettivi sono in grado di danneggiare direttamente il megacariocita, come il virus dell'HIV;
- Danno post-chemioterapia o radioterapia;
- Patologie congenite o acquisite responsabili di aplasia midollare come l'anemia di Fanconi, l'aplasia pura della serie megacariocitaria, la trombocitopenia con assenza di radio;

- Danno diretto da alcool;
- Carenza di vitamina B12 e acido.

Nel nostro studio abbiamo considerato, come gruppo di controllo, un gruppo di pazienti con conta piastrinica normale, ma anche un gruppo di pazienti con piastrinosi, in questo caso affetti da trombocitemia essenziale, una malattia mieloproliferativa cronica. Di seguito vengono fornite notizie generali su questa condizione.

1.2.5 Trombocitemia essenziale (ET)

La trombocitemia essenziale è un disordine clonale acquisito della cellula staminale caratterizzato da espansione della linea megacariocitaria/piastrinica con conseguente stabile incremento delle piastrine e diatesi trombo-emorragica.

La ET appartiene al gruppo delle neoplasie mieloproliferative (MPN) assieme a policitemia vera (PV) e mielofibrosi primitiva (PMF).

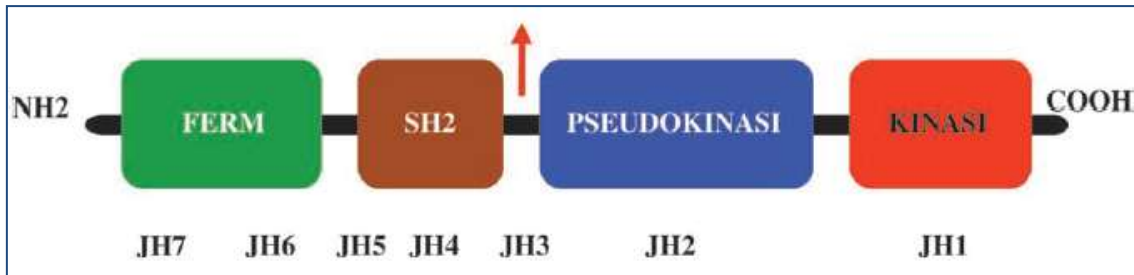
Ha un'incidenza variabile tra 0,59 e 2,53/100.000 abitanti/anno, con un'età mediana alla diagnosi di 65-70 anni e un rapporto femmine:maschi di 2:1 [32].

La diagnosi si basa sui criteri stabiliti dal WHO nel 2001, aggiornati nel 2008 [67] per introdurre la presenza della mutazione JAK2V617F, ovvero una mutazione somatica nel dominio pseudo-chinasico del gene JAK2.

Il gene JAK2 è uno dei quattro geni (JAK1, JAK2, JAK3, TYK2) che codificano per proteine citoplasmatiche ad attività tirosina kinasica ed appartiene alla famiglia delle Janus tirosine kinasi. JAK1 è mappato in 1p31.3, JAK2 in 9p24, JAK3 in 19p13.1 e TYK2 in 19p13.2. Ognuno di questi geni è formato da 20-25 esoni e codifica per proteine di 1100 aminoacidi del peso molecolare di 120kDa a struttura tridimensionale.

Tra le proteine Jak, Jak2 sembra essere quella più importante per la proliferazione e

differenziazione mieloide essendo attivata in risposta a varie citochine: EPO, GM-CSF, TPO, IL-3, IL-5, IL-12 e IFN- γ . La proteina JAK2 è costituita da sette regioni JH come dimostrato nella seguente figura.



La regione JH1, situata in prossimità dell'estremità carbossi-terminale della proteina, è dotata di attività kinasica e contiene residui di tirosina che vengono fosforilati quando la proteina è attivata. La regione JH2 presenta un'importante omologia con la regione JH1 ma non possiede attività kinasica (regione pseudo-kinasica).

Poiché solamente il 50% dei pazienti con ET presenta la mutazione V617FJAK2, altri geni implicati nella regolazione della megacariopoiesi sono stati studiati. Tra questi il gene MPL il quale, attraverso la proteina recettoriale codificata, svolge un ruolo fondamentale nell'attivazione del segnale a valle della tirosin chinasi JAK-2. Una mutazione del gene MPL è in grado pertanto di attivare il *signalling* responsabile della trasformazione di cellule emopoietiche in maniera indipendente dalla normale stimolazione mediata da citochine [51; 54].

Alcune di queste mutazioni di MPL erano già state descritte nella trombocitosi ereditaria (mutazione della regione transmembrana, S505N) e nella trombocitopenia amegacariocitica congenita (mutazione LOF).

Nel 2006 fu per la prima volta descritta la mutazione W515L del gene MPL, che consiste nella sostituzione della guanina in posizione 1544 con una timina. Nella proteina questa mutazione produce la sostituzione del triptofano con una leucina.

Successivamente venne identificata la mutazione MPLW515K a carico dello stesso codone e quindi altre quattro mutazioni a carico di altrettanti codoni (S505N, A506T, A519T) [53; 51; 61].

I livelli di TPO nei pazienti con TE sono uguali o lievemente superiori ai controlli [24] mentre viene riportato un livello di cMPL decisamente ridotto rispetto al normale come espressione di displasia di membrana nei pazienti con policitemia [47].

I criteri del WHO 2008 sono qui di seguito riportati.

| |
|---|
| 1. Conta piastrinica $\geq 450 \times 10^9/L$ |
| 2. Proliferazione megacariocitaria con presenza di elementi maturi. Proliferazione mieloide ed eritroide assente o lieve |
| 3. Esclusione di PV, PMF, MDS, leucemia mieloide cronica o altre forme mieloidi |
| 4. Presenza della mutazione V617F del gene JAK2 o di altri <i>markers</i> clonali; esclusione di trombocitosi reattiva |

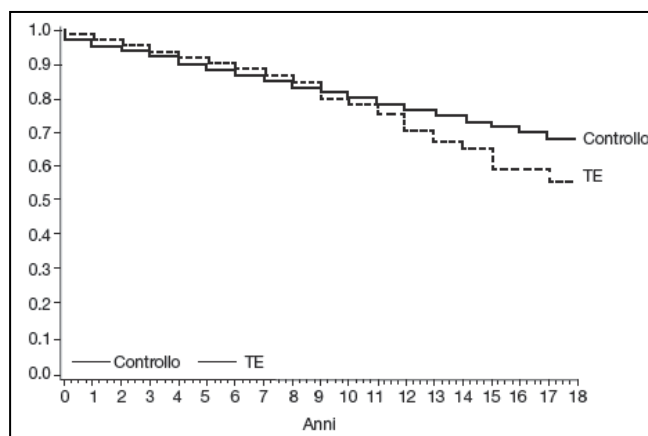
Le complicanze trombo-emorragiche sono la principale causa di mortalità nella ET, tuttavia la loro esatta incidenza non è nota e viene definita variabilmente tra 11 e 45% [14].

Le manifestazioni emorragiche coinvolgono quasi esclusivamente cute e mucose (ecchimosi, epistassi, gengivorragie) e si stima siano pari a 0.33% paziente/anno [11]. Gli episodi emorragici di maggior rilievo (cerebrali, gastroenterici) sono poco comuni e hanno la tendenza a manifestarsi in seguito a trauma, accidentale o chirurgico, oppure all'uso di antiaggreganti piastrinici [38; 59].

La sopravvivenza dei pazienti con ET è stata riportata nel tempo con valori significativamente crescenti e sempre più vicini a quelli della popolazione generale di controllo.

In più di 2000 pazienti segnalati nel 1997 la sopravvivenza era sovrapponibile a quel-

la della popolazione italiana di controllo fino al 10° anno (circa 80%) ma poi declinava sensibilmente raggiungendo il 55% al 18° anno e la mediana intorno al 20° anno, come rappresentato nella seguente figura [21].



Le linee guida sulla terapia nella ET [3] stratificando i pazienti in base a età e rischio trombotico, suggeriscono che al di sopra dei 60 aa, sia necessario iniziare un trattamento citoriduttivo.

Per la riduzione della conta piastrinica si possono usare vari farmaci:

- Idrossiurea (HU 15-20 mg/kg/die): agisce inibendo la sintesi del DNA e promuovendo la morte cellulare con un'attività che si manifesta a carico di tutte le linee emopoietiche. Ha una limitata tossicità e una comprovata efficacia nel ridurre gli eventi trombotici [11; 56].
- Pipobromano (0.7 – 1 mg/kg/die): simil-alchilante, considerato di prima scelta nei pazienti con più di 70 anni.
- Busulfano (BU 2 – 4mg/die): alchilante, indicato nel trattamento dei pazienti con età superiore a 70 anni in alternativa al piprobomano.
- Interferone a ricombinante (IFN 20MU/settimana): indicato nel trattamento di pazienti con età inferiore a 40 anni.
- Anagrelide (ANAG 2 – 2.5mg/die): è il farmaco di più recente introduzione.

Ai farmaci citoriduttivi viene associata l'aspirina, al dosaggio di 100 mg/die, per l'effetto antitrombotico, mutuando l'esperienza acquisita in ambito cardiovascolare ed è efficace nel controllo dei disturbi del microcircolo, soprattutto l'eritromelalgia [20].

SCOPO DELLO STUDIO

L'espressione di cMPL nei diversi disordini quantitativi delle piastrine riveste un potenziale interesse sia fisiopatologico che clinico insieme alla conoscenza dei livelli di TPO. Infatti cMPL è il principale trasduttore del segnale replicativo di TPO per la megacariopoiesi.

Il legame tra TPO e cMPL, oltre a regolare la differenziazione megacariocitaria, regola anche i livelli plasmatici di TPO circolante: è stato, infatti, dimostrato che la TPO è inversamente correlata sia alla conta piastrinica che alla massa megacariocitaria.

Il modello clinico che sottolinea l'importanza di questa interazione è rappresentato principalmente dalla CAMT e dalle malattie mieloproliferative tipo ET. Nei pazienti con ET sono stati descritti livelli di TPO normali o moderatamente elevati insieme a livelli di MPL nettamente ridotti [24]. Inoltre nel 5% dei pazienti con ET che non presentano mutazione di JAK2 la causa della trombocitemia è dovuta a mutazione del gene MPL con conseguente attivazione del *signalling* responsabile della proliferazione delle cellule emopoietiche.

Le mutazioni descritte sono la W515L, la MPLW515K nello stesso codone e altre quattro mutazioni a carico di altrettanti codoni (S505N, A506T, A519T). Alcune di queste mutazioni di MPL sono state descritte nella trombocitosi ereditaria (mutazione della regione transmembrana, S505N) e nella piastrinopenia congenita tipo CAMT (mutazione LOF).

La CAMT deriva da mutazioni del gene cMPL: il difetto del recettore impedisce la differenziazione delle cellule staminali in megacariociti con conseguente piastrinopenia. In questi soggetti con cMPL mutato, i livelli di TPO sono molto elevati ma le piastrine hanno morfologia normale.

I livelli TPO presentano un'ampia variabilità nei soggetti con mielodisplasia: se da

un lato alcuni autori hanno evidenziato livelli di TPO più elevati rispetto ai soggetti normali, altri non hanno confermato tale riscontro, soprattutto nei soggetti con anemia refrattaria. È stato, quindi, ipotizzato che, mentre nei soggetti con anemia refrattaria la produzione e il metabolismo della TPO rimangano normali, nei pazienti in trasformazione o meno, il clone leucemico determina un'iperespressione di cMPL.

Purtroppo non avevamo a disposizione soggetti con CAMT e quindi lo studio di espressione di MPL su piastrine e MK è stato eseguito in 104 soggetti con piastrinopenia acquisita (ITP, MK-Hypo), in soggetti con forme familiari non CAMT (BS, MYH9), in soggetti con ET senza mutazione MPL e in soggetti normali di controllo. Dal punto di vista fisiopatologico una diversa espressione di cMPL su piastrine e MK potrebbe sostenere infatti una diversa o mancata risposta ai TPO-R aprendo nuove prospettive sulla terapia individualizzata in particolare nei pazienti con ITP e in quelli con FAM che si sono dimostrati sensibili ai TPO-R. A questo riguardo abbiamo studiato longitudinalmente 2 soggetti con ITP sottoposti a splenectomia o a terapia con TPO-R.

Dal punto di vista metodologico abbiamo valutato i livelli di TPO, l'espressione del c-MPL sulle piastrine mediante citofluorimetria e Western Blot, l'espressione di c-MPL sui MK attraverso immunofluorescenza in videoconfocale di preparati di biopsia ossea.

MATERIALI E METODI

La nostra casistica comprende un totale di 104 soggetti, studiati presso la Medicina Interna CLOPD dal 2009 al 2011.

Tutti i soggetti avevano un'età superiore a 18 anni ed hanno fornito il proprio consenso informato per lo studio.

I pazienti sono stati suddivisi nei seguenti gruppi:

1. Trombocitopenia immune primaria (ITP): la diagnosi di ITP è stata eseguita in accordo con i criteri elaborati dall'International Working Group [59] ovvero mediante esclusione di pseudopiastrinopenia, forme da ridotta produzione midollare, da ridotta sopravvivenza piastrinica, piastrinopenia diluizionale o ipersplenismo nonché dopo esclusione di forme secondarie. Sempre in accordo con il precedente *panel* di esperti, i nostri pazienti erano considerati affetti da ITP cronica, ovvero con durata di malattia superiore ai 12 mesi.

Nella nostra casistica tra i soggetti con ITP si annoverano: 20 pazienti, 3 maschi e 17 femmine, con un'età media alla diagnosi di 40 ± 16 anni. La conta piastrinica media era di $35 \pm 23 \times 10^9/L$ elementi.

2. Piastrinopenia costituzionale, da noi alternativamente definite forme familiari (FAM): il sospetto di forma familiare viene posto in soggetti con storia familiare positiva per trombocitopenia oppure in propositi con piastrinopenia e altra sintomatologia riconducibile a forma sindromica o piastrinopenia non riconducibile ad altra causa compresa la ITP.

Le forme familiari presenti in questo studio sono rappresentate da sindrome di Bernard Soulier (BS) e macrotrombocitopenia da alterazione della miosina 9 (MYH9). Poiché queste due patologie sono caratterizzate dalla presenza di macrotrombociti è necessario eseguire una conta piastrinica manuale poiché al contatore automatico si avrebbe una conta piastrinica inferiore.

Abbiamo studiato in tutto 18 soggetti, 9 maschi e 9 femmine (14 BS con mutazioni monoalleliche GPIb alfa, 4 mutazioni di coda MYH9), con età media alla diagnosi di 38 ± 11 anni e conta piastrinica manuale media pari a $79 \pm 24 \times 10^9/L$ elementi.

3. Forme da ipoplasia midollare (Mk-Hyp): rientrano in questo gruppo soggetti con piastrinopenia secondaria a chemioterapia (9 soggetti), mieloftisi o emopatia quale leucemia acuta (5 soggetti), mieloma multiplo (4 soggetti) o mielodisplasia (6 soggetti). Affinché i soggetti potessero essere arruolati per lo studio era necessario che l'eventuale terapia trasfusionale piastrinica fosse stata effettuata da almeno 5 giorni.

Abbiamo, quindi, valutato 24 soggetti, 12 maschi e 12 femmine, con età media di 62 ± 15 anni e conta piastrinica di $46 \pm 26 \times 10^9/L$ elementi.

4. Forme mielodisplastiche (MDS): la diagnosi di mielodisplasia è stata ottenuta mediante valutazione di striscio di sangue periferico, striscio di sangue midollare colorato con ematossilina/eosina, valutazione di biopsia ossea eseguita da un anatomopatologo indipendente e studi di citogenetica. Per i criteri diagnostici si rimanda a quanto descritto nell'introduzione.

I soggetti con MDS sono stati estrapolati dai 24 precedentemente definiti Mk-Hyp al fine di ottenere un gruppo di pazienti omogeneo ed erano 6 pazienti, con un'età media pari a 60 ± 12 anni e conta di $56 \pm 32 \times 10^9/L$ piastrine.

Abbiamo poi identificato due gruppi di controllo:

- a. Controlli sani: 26 pazienti, 9 maschi e 17 femmine, con età media al momento dello studio di 42 ± 12 anni e conta piastrinica di $260 \pm 55 \times 10^9/L$ elementi
- b. Trombocitemia essenziale (ET): la diagnosi di ET è stata fatta seguendo i criteri stilati dal WHO nel 2008 [67].

In questo gruppo sono rientrati 16 pazienti, 9 maschi e 7 femmine, con età media alla diagnosi di 50 ± 8 anni e conta media di $920 \pm 318 \times 10^9/L$ piastrine. In nessuno dei 3 soggetti che non presentava la mutazione V617FJAK2 era presente mutazione c-MPL.

I dati fin qui espressi sono riassunti nella seguente tabella (tabella 4).

Tabella 4. Caratteristiche generali della casistica in studio

| | Numero Pazienti | M/F | Età (media \pm DS) | Conta piastrinica ($\times 10^9/L$) (media \pm DS) |
|-----------------------|------------------------|------------|--|---|
| ITP | 20 | 3/17 | 40 ± 16 | 35 ± 23 |
| FAM | 18 | 9/9 | 38 ± 11 | 79 ± 24 |
| Mk-Hyp | 24 | 12/12 | 62 ± 15 | 46 ± 26 |
| di cui MDS | 6 | 3/3 | 60 ± 12 | 56 ± 32 |
| Controlli sani | 26 | 9/17 | 42 ± 12 | 260 ± 55 |
| ET | 16 | 9/7 | 50 ± 8 | 920 ± 318 |

5. Studio longitudinale: nel corso dei due anni in cui si è svolto lo studio abbiamo valutato due pazienti con ITP sottoposte a splenectomia terapeutica e due pazienti in terapia con agonista recettoriale della TPO valutando i diversi parametri prima e dopo la procedura terapeutica.

- a. ITP splenectomizzate: abbiamo sottoposto a splenectomia laparoscopica due donne (F.S. e P.C., 38 e 35anni) con conta piastrinica alla diagnosi di 9 e $25 \times 10^9/L$ elementi. La splenectomia è stata eseguita in una paziente (F.S.) dopo 1 anno di malattia per resistenza allo steroide e necessità di terapia mensile con immunoglobuline. La seconda paziente (P.C.) è stata splenectomizzata dopo 2 anni dalla diagnosi di ITP. La splenectomia è stata proposta quando, al termine di una gravidanza, la paziente ha mostrato aggravamento della piastrinopenia ed importanti effetti collaterali da steroide. In entrambi i casi si è avuto

una risposta completa con risalita della conta piastrinica a $448 \pm 552 \times 10^9/L$ elementi. (sono due, meglio mettere i numeri senza media).

- b. ITP trattate con agonista recettoriale della TPO-R: l'uso di agonisti del TPO-R, in questi anni, è stato limitato dapprima a soggetti che aderissero a studi clinici controllati e, successivamente, a soggetti refrattari alla splenectomia.

In questo gruppo abbiamo inserito due donne, sottoposte a terapia con Eltrombopag, che sono state studiate all'avvio della terapia e, quindi, a intervalli regolari.

Il primo caso è stato quello di una giovane donna (S.C., 35aa), con diagnosi di ITP in età pediatrica, con conta piastrina stabilmente attorno a $20 \times 10^9/L$ elementi che ha aderito allo studio clinico (TRA105325).

Il farmaco è stato somministrato, secondo quanto previsto dal protocollo di studio, a dosaggio crescente da 25 a 100mg/die. I prelievi per lo studio sono stati eseguiti prima dell'avvio del trattamento, dopo 4 mesi e dopo 1 anno dalla terapia.

La conta piastrinica è progressivamente cresciuta, durante trattamento con Eltrombopag, fino al valore di $107 \times 10^9/L$ a un anno dall'avvio della terapia stessa.

La seconda paziente (B.P., 50aa) affetta da ITP cronica refrattaria (steroidi \pm IVIg, Rituximab, splenectomia) con conta piastrinica media di $15 \times 10^9/L$, sintomatica per ematomi ed ecchimosi.

Analogamente al precedente caso, il farmaco è stato somministrato a dosaggio crescente da 25 a 100mg/die, per un totale di 4 mesi, senza alcuna risposta da parte della conta piastrinica. I prelievi sono stati eseguiti prima della terapia e a 4 mesi dal suo inizio secondo quanto già eseguito per la precedente paziente.

Dopo 4 mesi di terapia non si è avuta risposta e si è deciso di sospendere la terapia con Eltrombopag.

Studio di cMPL e TPO

La valutazione del cMPL è stata eseguita mediante citofluorimetria, Western Blot e immunofluorescenza videoconfocale di cui si riporta qui di seguito dettagliata descrizione.

a. Citofluorimetria su PRP

La valutazione citofluorimetrica è stata eseguita in accordo con quanto precedentemente pubblicato [73] con le seguenti variazioni: a 25 μ l di PRP ottenuto per centrifugazione a 150G di sangue anticoagulato con sodio citrato, veniva aggiunto un uguale volume di una soluzione di paraformaldeide PFA 2% in PBS, pH 7,4. Il PRP veniva incubato per 15' a temperatura ambiente (RT). Le piastrine così fissate sono poi state stratificate su 500 μ l di saccarosio al 20% in PBS e lavate centrifugando 5' a 7000G. Il pellet piastrinico è stato risospeso in 25 μ l di Tyrodès buffer per l'incubazione con 10 μ l 25ng/ μ l di anticorpo anti-cMPL (policlonale di coniglio Upstate, Millipore, Temecula, CA, USA), per 40' RT. Sono poi stati aggiunti 10 μ l di Ab secondario anti-coniglio marcato con ficoeritrina (PE) 20ng/ μ l (Sigma Aldrich) per un'ulteriore incubazione di 40' RT al buio. L'eccesso di anticorpo è stato eliminato con un ultimo lavaggio in saccarosio identico al precedente e le piastrine sono state risospese in 500 μ l di Tyrodès buffer per la lettura citofluorimetrica con il fotomoltiplicatore settato a 600V.

Sono stati allestiti i seguenti controlli:

- il bianco a cui sono stati aggiunti 10 μ l di Tyrodès in sostituzione dei 10 μ l di l'anticorpo anticMPL, un anticorpo policlonale di coniglio (Upstate, Millipore, Temecula, CA, USA), e un pari volume di Tyrodès in sostituzione dei 10 μ l di Ab secondario
- il controllo non fissato che manca dello step della fissazione

- il controllo aspecifico preparato aggiungendo 10 μ l di Tyrodès in sostituzione dell'Ab anti cMPL.

b. Western Blot

Poiché il cMPL è una proteina poco espressa, il primo problema per la messa a punto della metodica è stato il calcolo del numero di piastrine sufficiente per poter rilevare la proteina con tale metodica. Questo problema è ancora più rilevante se si tiene conto dei pazienti oggetto dello studio: da un lato pazienti con piastrinopenia immunologica che possono presentare conte piastriniche molto ridotte ($< 50 \times 10^9/L$) con necessità quindi, di prelevare un maggiore volume di sangue; dall'altro pazienti con piastrinopenia familiare nei quali la presenza di macrotrombociti determina una sottostima della conta piastrinica al Coulter risultando un PRP in parte contaminato da leucociti, ricchi in proteine.

1. Preparazione del PRP

Il giorno dell'esperimento sono stati prelevati 21 ml di sangue fresco anticoagulato con ACD. I campioni dei soggetti normali di controllo sono stati centrifugati a 180g per 15 min a temperatura ambiente, mentre i campioni dei pazienti trombocitopenici sono stati centrifugati a 70g per 6 min per impedire l'eccessiva sedimentazione delle piastrine. La fase superiore è stata quindi trasferita in nuove provette per i successivi trattamenti.

2. Preparazione dei lisati piastrinici

Al PRP ottenuto dal sangue coagulato in ACD sono stati aggiunti 0.2 volumi di PBS/EDTA 2% per prevenire l'attivazione piastrinica. Per limitare la contaminazione da linfociti ed eritrociti i campioni, sia dei soggetti normali che di quelli piastrinopenici, sono stati centrifugati una seconda volta per 5 min rispettivamente a 180g e 70g.

Il surnatante è stato trasferito in nuove provette dove le piastrine sono state separate dal plasma mediante centrifugazione 20 min a 800g, e risospese in un appropriato volume di Tyrode Buffer.

Aliquote di 2×10^7 piastrine sono state lisate con un uguale volume di 2X Laemmli buffer [10% glycerol, 1% sodium dodecil solfato (SDS), 5% b-mercaptoetanol, 50 mmol/l Tris HCl pH 6.8, and 0.05% blu di bromofenolo] e bollite per 10'. Le aliquote non utilizzate sono state poste immediatamente a -80°C .

3. Western Blot

Il WB è stato eseguito in accordo con quanto precedentemente pubblicato [74] con le seguenti variazioni.

La corsa elettroforetica SDS page è stata effettuata su gel di poliacrilamide al 7.5% all'amperaggio costante di 25mA per 90 min a temperatura ambiente. Le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa (Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA) a 350mA RT per 2h30min, in un buffer contenente Tris (25 mmol/l), glicina (192mmol/l) e 20% metanolo. La membrana è stata saturata per 2h RT con una soluzione di 10 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl (pH7.6) e 1% Tween 20 (TBST) addizionato con latte in polvere al 3%. Dopo tre lavaggi con TBST, il blot è stato incubato overnight a 4°C l'anticorpo anti-cMPL, un anticorpo policlonale di coniglio (Upstate, Millipore, Temecula, CA, USA). Come antigene piastrinico di controllo abbiamo scelto una glicoproteina di membrana largamente espressa, la GP IIb/IIIa (CD41), riconosciuta dall'anticorpo SZ22 (Beckman-Coulter Immunotech, Marseille, F). Come riferimento, abbiamo utilizzato dei pesi molecolari commerciali (Precision Plus Protein Standard Kaleidoscope, Bio-Rad).

Dopo i necessari lavaggi in TBST, il segnale è stato rivelato con un anticorpo anti coniglio HRP (Sigma Aldrich), successiva rilevazione in chemiluminiscenza con reagenti ECL (GE Healthcare, UK) e successiva esposizione delle membrane a lastre

autoradiografiche.

L'espressione del cMPL e della GP IIb/IIIa di controllo è stata valutata con analisi densitometrica del Western Blot usando il programma shareware ImageJ.

c. Immunofluorescenza Videoconfocale

La valutazione dell'espressione di c-MPL sui MK è stata effettuata in 3 soggetti con ITP e in 3 soggetti sottoposti a biopsia ossea in corso di valutazione di MGUS.

Per tale metodica sono state utilizzate sezioni di biopsia osteomidollare paraffinata, precedentemente valutata dopo colorazione con ematossilina/eosina.

Dopo de-paraffinazione, eseguita con xilolo ed etanolo a scalare (100%-95%-90%-80%-70%), reidratazione delle fette, e smascheramento degli epitopi con Na Citrato 0.1M (pH 7,9) per 30' a 95°C. Sezioni di 8 µm di spessore sono state trattate con doppia marcatura per c-Mpl. Dopo saturazione con soluzione di 5% siero di asino/5%BSA/PBS la doppia marcatura è stata effettuata con anticorpo policlonale di coniglio anti-c-Mpl (Upstate Millipore, Temecula, CA, USA) diluito 1:100 a 4°C over night, il relativo secondario anti-rabbit biotinilato diluito 1:200 (60' RT) e amplificando il segnale con avidina coniugata con Texas Red (1:100, 60'RT).

Per l'identificazione dei megacariociti è stato utilizzato un anticorpo monoclonale anti CD41-clone SZ22 (Beckman-Coulter Immunotech, Marseille, F) diretto contro la subunità GPIIb del recettore per il fibrinogeno, accoppiato ad un secondario marcato con FITC. I preparati sono stati osservati al microscopio videoconfocale dopo montaggio con tampone anti-fade contenente DAPI per contrastare i nuclei. L'immagine è stata analizzata con microscopio a fluorescenza video-confocale ed acquisita con fotocamera digitale (Nikon, Firenze, Italia).

Per la quantificazione del CD41 e c-Mpl co-localizzazione, abbiamo ottenuto la XY matrice RGB e l'intensità del segnale esaminato pixel per pixel nei tre canali di colo-

re, corrispondenti a c-Mpl (rosso), CD41 (verde) e nuclei (blu). Segnali > 2SD dello sfondo sono stati considerati positivi. Abbiamo tracciato i segnali RGB in un diagramma di Venn per rappresentare graficamente il grado di co-localizzazione tra i colori.

È stata anche eseguita un'analisi semiquantitativa dell'intensità di fluorescenza da due operatori indipendenti che hanno valutato l'intensità della fluorescenza dei preparati attribuendo un punteggio variabile da 1 a 10.

d. Dosaggio della trombopoietina (TPO)

Per tale dosaggio abbiamo utilizzato un kit commerciale ELISA (TPO Quantikine, R&D System) seguendo le indicazioni del produttore.

Analisi statistica

I database e tutta l'analisi statistica sono stati eseguiti utilizzando il software GraphPad Prism (La Jolla, USA). I dati numerici che hanno descritto il campione sono presentati come media \pm deviazione standard o come media \pm errore standard. Il confronto tra medie è stato eseguito mediante t-test. La significatività statistica è stata assegnata per valori di $p < 0.005$.

RISULTATI

4.1 Studio del cMPL in citofluorimetria

Lo studio del cMPL, seguendo la metodica precedentemente descritta, è stato dapprima applicata a un gruppo di soggetti normali di controllo, per definire i limiti di normalità.

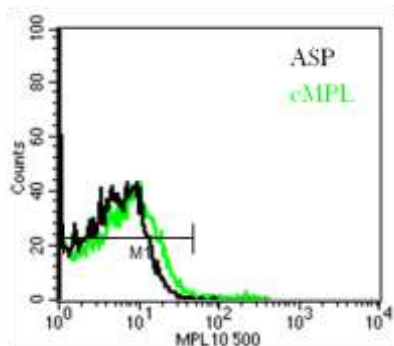
Le prove eseguite hanno evidenziato un'ampia variabilità inter ed intra dosaggio con valori di fluorescenza spesso inferiori o sovrapponibili al controllo aspecifico (Tabella 5; Figura 1).

Tabella 5: Valutazione quantitativa dell'intensità di fluorescenza (FL-MCH) in 16 soggetti di controllo

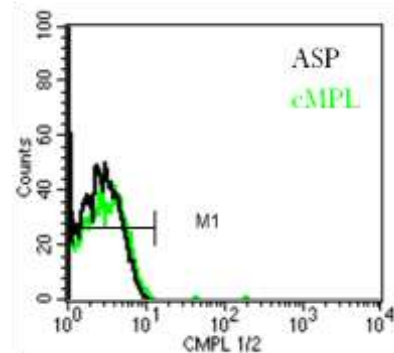
| Campione | FL-MCH CD 41 (FITC) | FL-MCH c-Mpl (PE) | FL-MCH c-Mpl/CD41 ratio |
|-----------------|------------------------------------|----------------------------------|--|
| A1 | 263,36 | 70,56 | 0,267 |
| A2 | 258,23 | 68,74 | 0,266 |
| A3 | 206,87 | 59,12 | 0,285 |
| A4 | 213,48 | 75,06 | 0,35 |
| A5 | 299,85 | 54,89 | 0,183 |
| B1 | 371,60 | 451,07 | 1,213 |
| B2 | 337,24 | 407,10 | 1,207 |
| B3 | 332,84 | 344,69 | 1,035 |
| C1 | 220,39 | 55,03 | 0,25 |
| C2 | 224,61 | 72,66 | 32,3 |
| D1 | 396,06 | 281,14 | 0,709 |
| D2 | 386,74 | 270,47 | 0,699 |
| D3 | 434,67 | 182,64 | 0,420 |
| D4 | 364,47 | 151,60 | 0,415 |
| D5 | 380,99 | 272,99 | 0,716 |
| D6 | 425,57 | 262,05 | 0,615 |

Figura 1: Istogramma di fluorescenza ottenuta con anti-cMPL (PE) in un soggetto sano (d) ed in 3 pazienti: a) ITP; b) piastrinopenia familiare; c) trombocitemia essenziale

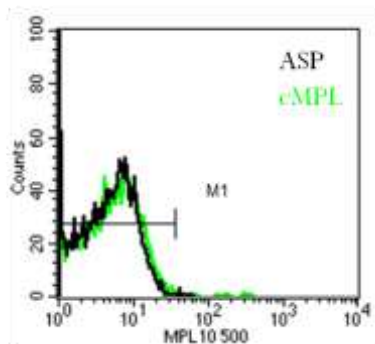
a) Citofluorimetria in ITP



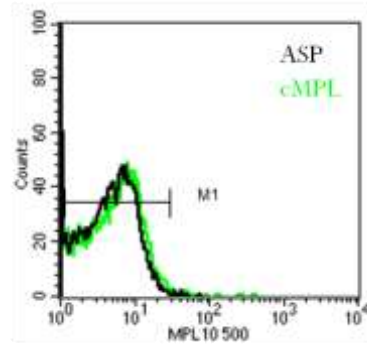
b) Citofluorimetria in FAM



c) Citofluorimetria in ET



d) Citofluorimetria in controllo sano



4.2 Livelli di TPO nei diversi gruppi di studio

Si riportano qui di seguito i valori di TPO (media \pm errore standard) dei diversi gruppi oggetto del nostro studio:

| | Numero pazienti | TPO (pg/ml) (media \pm ES) |
|-----------------------|-----------------|------------------------------|
| ITP | 20 | 135 \pm 21 |
| FAM | 18 | 69 \pm 14 |
| Mk-Hyp | 24 | 675 \pm 256 |
| MDS | 6 | 86 \pm 18 |
| Controlli sani | 26 | 67 \pm 14 |
| ET | 16 | 53 \pm 7 |

Dal confronto tra questi gruppi (Figure 2 e 3) è emerso che:

- a. i valori statisticamente più elevati di TPO si riscontrano nei soggetti con forma Mk-Hyp
- b. i soggetti con ITP presentavano livelli di TPO significativamente superiori ai controlli sani, alle ET e alle forme familiari
- c. nelle ITP i livelli di TPO sono risultati significativamente inferiori ai soggetti con forma Mk-Hyp
- d. non risulta differenza significativa dei livelli di trombopoietina tra i soggetti con ITP ed i 6 soggetti con mielodisplasia anche se in questi i livelli sono mediamente più bassi (Figura 3)
- e. non ci sono differenze tra le forme familiari e i controlli sani o ET.

Figura 2. Dosaggio di TPO nei diversi gruppi di studio

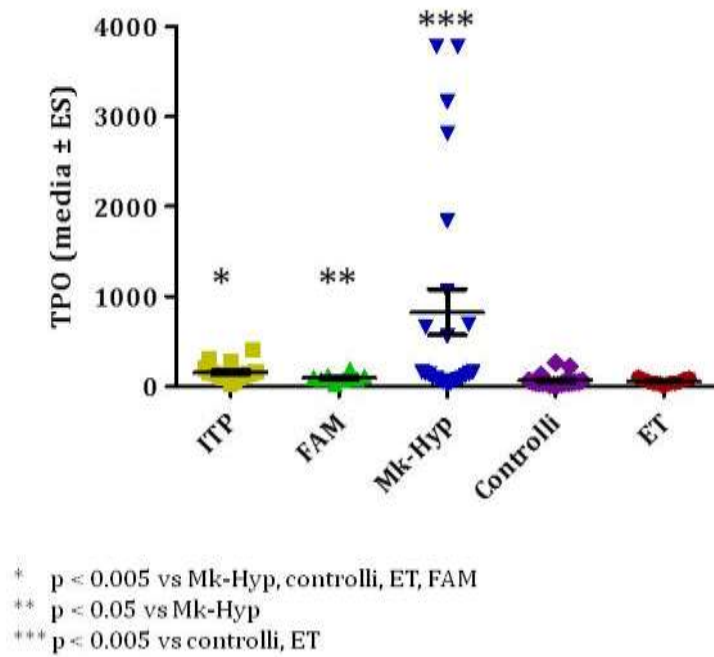
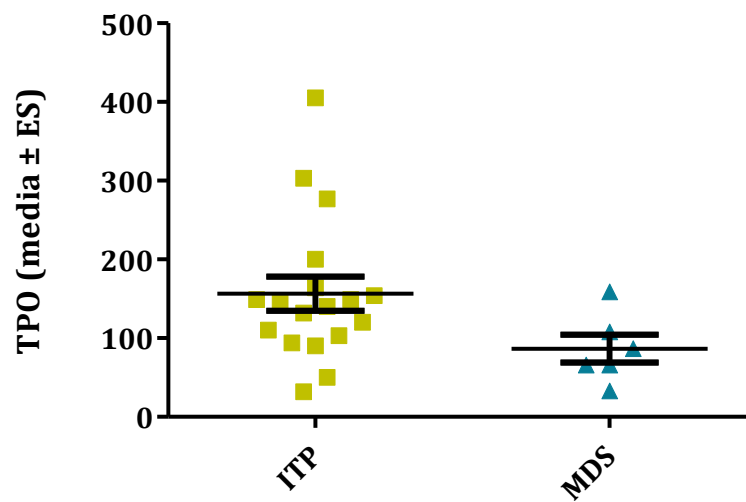


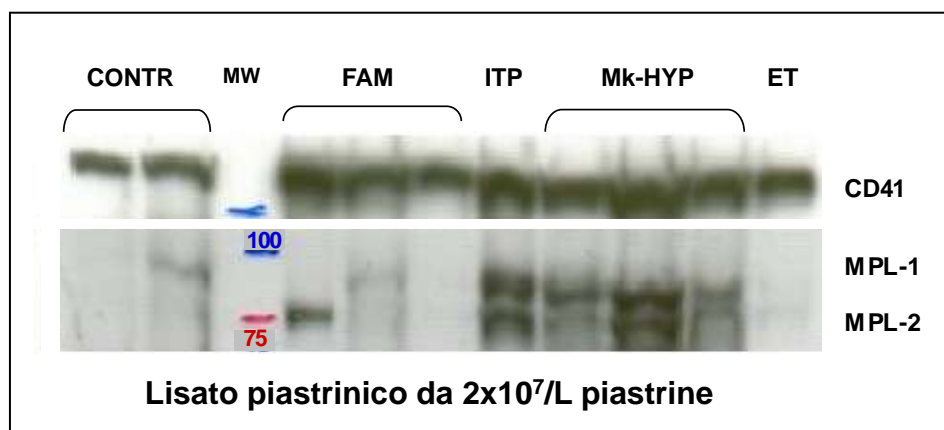
Figura 3. Dosaggio di TPO nei soggetti con ITP e MDS



4.3 Western Blot (WB) di cMPL nei soggetti normali

Mediante WB è stato possibile identificare due bande con un peso molecolare di 100 e 75 kDa, da noi rispettivamente definite cMPL 1 e cMPL 2, corrispondenti alle forme glicosilata e non glicosilata dell'isoforma P. Poiché vi sono evidenze che solo la forma glicosilata, corrispondente al cMPL1 sia quella attiva [9] nel nostro studio è stata considerato solamente il cMPL1, da qui in poi denominato semplicemente cMPL (Figura 4).

Figura 4. Analisi Western Blot dell'espressione di cMPL in alcuni soggetti di controllo, e nelle diverse forme di piastrinopenia studiate



4.4 Espressione di cMPL nei diversi gruppi di studio

L'espressione densitometrica del cMPL (media \pm errore standard), espressa come rapporto con il CD41, è risultata pari a:

| | Numero pazienti | cMPL/CD41 (media \pm ES) |
|-----------------------|----------------------------|--|
| ITP | 20 | 0.14 \pm 0.03 |
| FAM | 18 | 0.20 \pm 0.06 |
| Mk-Hyp | 24 | 0.15 \pm 0.04 |
| MDS | 6 | 0.16 \pm 0.04 |
| Controlli sani | 26 | 0.04 \pm 0.01 |
| ET | 16 | 0.03 \pm 0.01 |

La valutazione statistica di questi dati ha mostrato che:

- a. i pazienti con ITP, FAM ed MK-Hyp avevano un'espressione di cMPL significativamente superiore ai controlli (Figura 5)
- b. non si è trovata differenza nell'espressione di cMPL tra ITP e MDS pur essendoci in questo secondo gruppo un valore medio più basso rispetto alla ITP (Figura 6)
- c. i soggetti con ET non hanno mostrato una espressione di cMPL significativamente più bassa dei pazienti con piastrinopenia (Figura 5).

Figura 5. Espressione di cMPL nelle diverse patologie piastriniche studiate

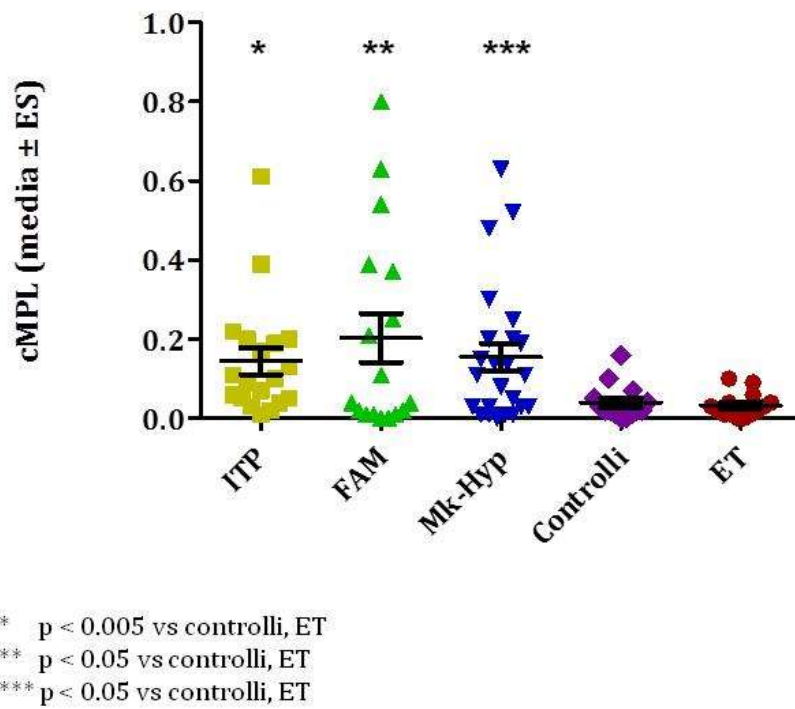
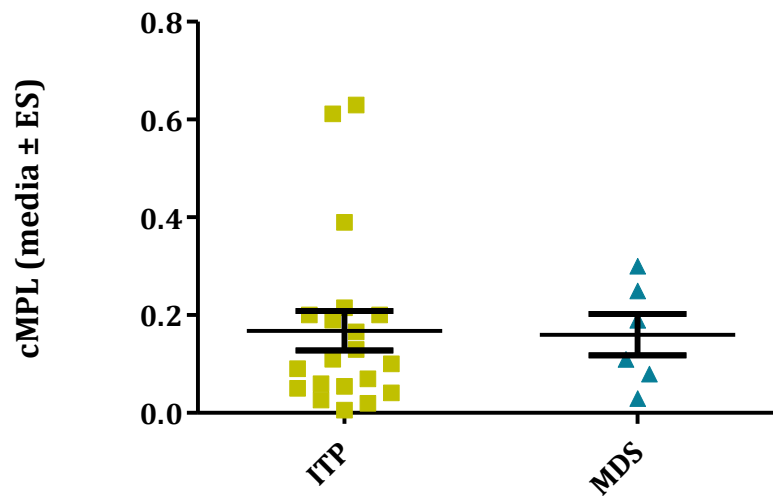


Figura 6. Espressione di cMPL nelle ITP e nelle MDS



4.5 Correlazione tra TPO e cMPL nei diversi soggetti dello studio

La correlazione tra livelli di TPO ed espressione di cMPL ha evidenziato, pur senza raggiungere la significatività:

1. correlazione inversa tra TPO e cMPL in ITP e soggetti sani
2. correlazione lineare nelle forme familiari, Mk-Hyp ed ET
3. correlazione lineare tra TPO e cMPL nelle mielodisplasie
4. nessuna correlazione in tutti i soggetti con piastrinopenia.

Nelle seguenti figure (7-13) sono rappresentate le precedenti correlazioni.

Figura 7. Correlazione tra TPO e cMPL nelle ITP

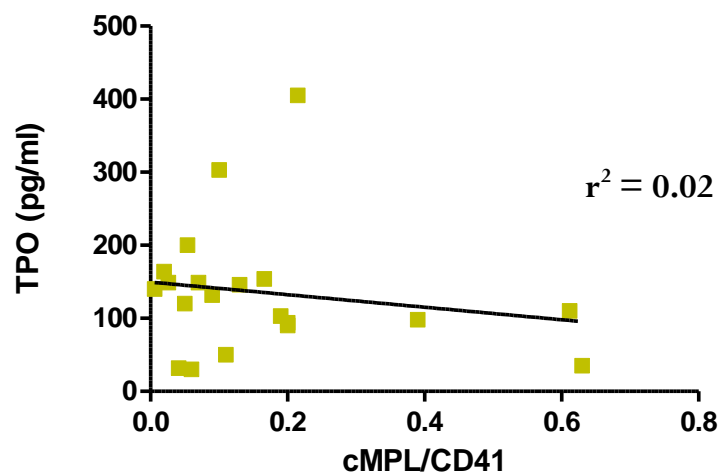


Figura 8. Correlazione tra TPO e cMPL nei controlli sani

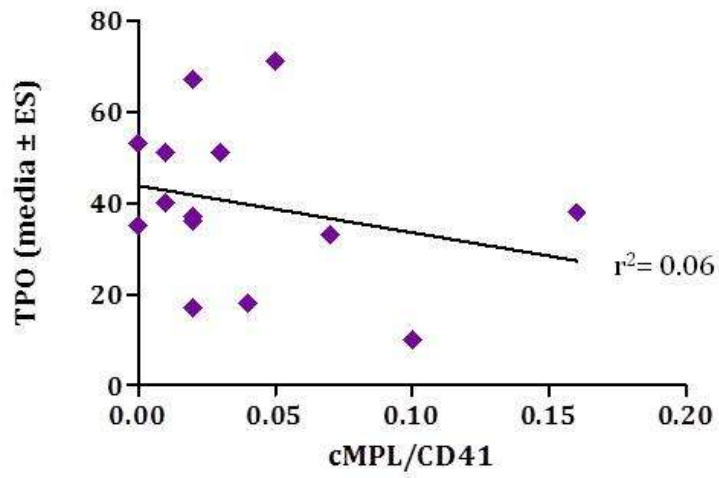


Figura 9. Correlazione tra TPO e cMPL nelle forme familiari

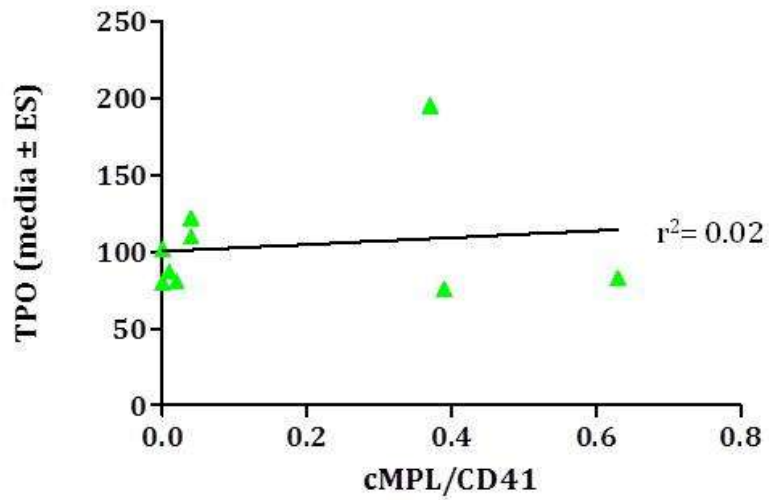


Figura 10. Correlazione tra TPO e cMPL nelle ipoplasie midollari

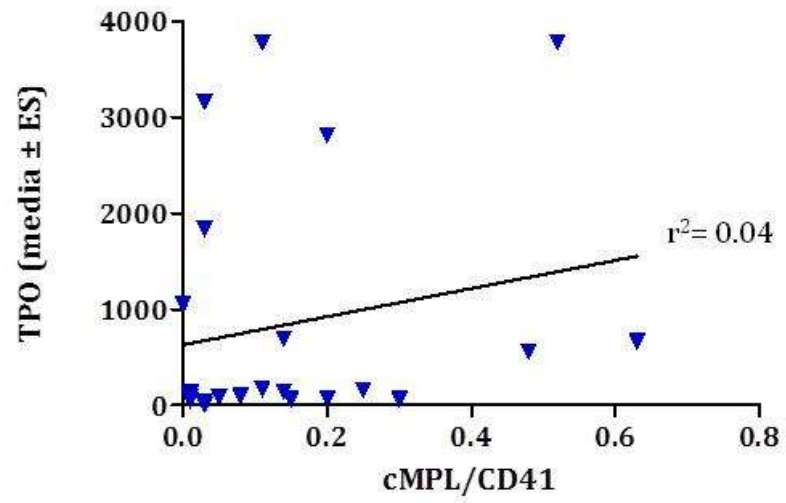


Figura 11. Correlazione tra TPO e cMPL nei pazienti con ET

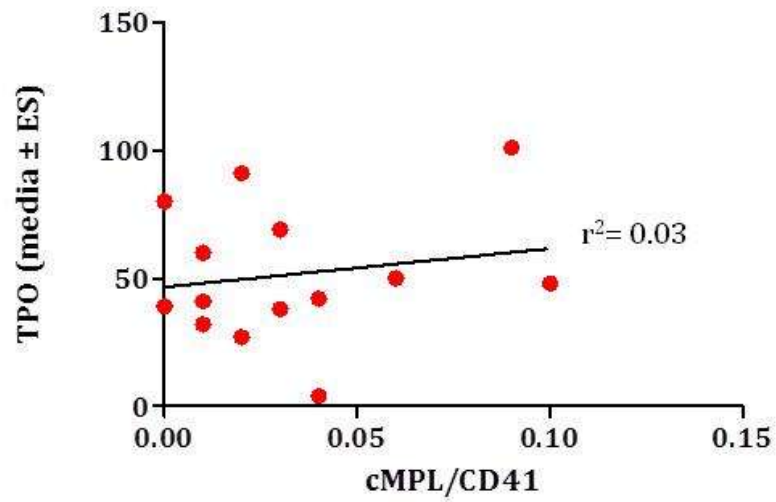


Figura 12. Correlazione tra TPO e cMPL nelle MDS

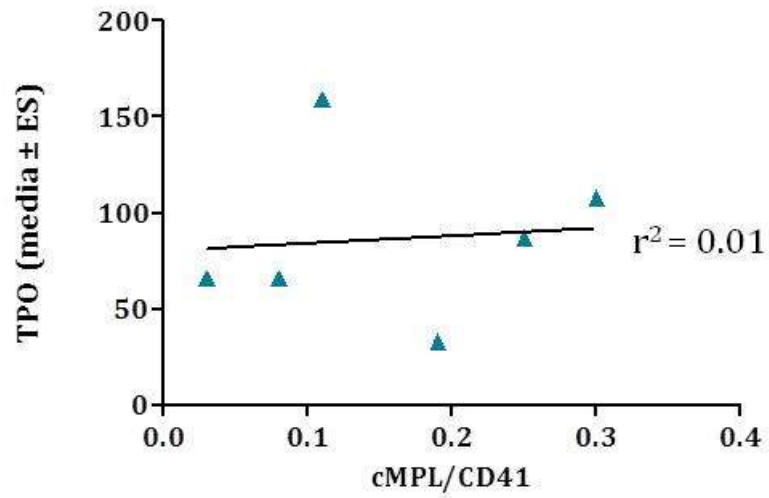
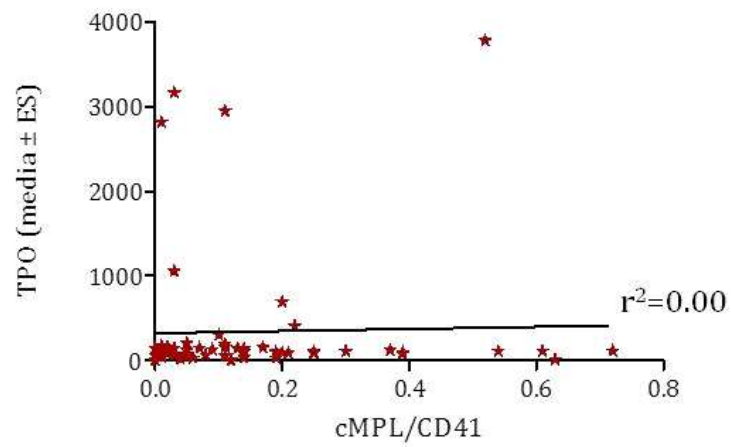


Figura 13. Correlazione tra TPO e cMPL in tutti i pazienti con piastrinopenia



4.6 Studio longitudinale in ITP splenectomizzate o trattate con agonista del TPO-R

a. Splenectomia

I livelli di TPO nelle due donne sottoposte a splenectomia sono risultati:

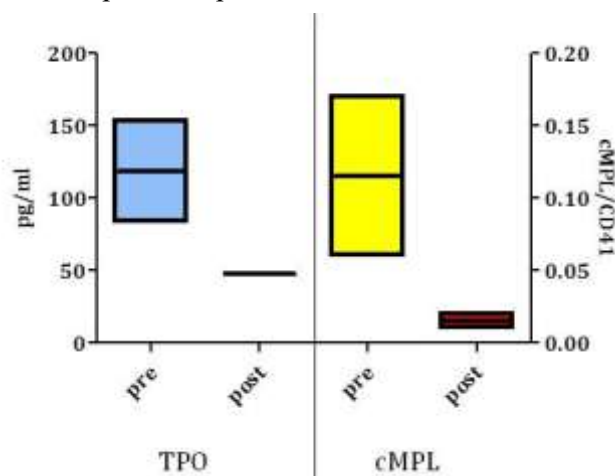
| | Numero pazienti | TPO (pg/ml) (media \pm ES) | Piastrine ($\times 10^9/L$) |
|-------------|-----------------|---------------------------------|----------------------------------|
| F.S. | Pre | 84 | 45 |
| P.C. | Pre | 154 | 52 |
| F.S. | Post | 48 | 76 |
| P.C. | Post | 47 | 859 |

L'espressione del cMPL è stata:

| | Numero pazienti | cMPL/CD41 (media \pm ES) | Piastrine ($\times 10^9/L$) |
|-------------|-----------------|-------------------------------|----------------------------------|
| F.S. | Pre | 0.06 | 45 |
| P.C. | Pre | 0.17 | 52 |
| F.S. | Post | 0.02 | 859 |
| P.C. | Post | 0.01 | 76 |

In entrambi i soggetti i livelli di TPO e l'espressione del cMPL, si sono ridotti e normalizzati dopo la splenectomia (Figura 14).

Figura 14. Livelli medi di TPO ed espressione media del cMPL nelle due pazienti con ITP sottoposte a splenectomia



b. Terapia con agonista del TPO-R (Eltrombopag)

Mentre la prima paziente (S.C.) ha continuato la terapia con Eltrombopag per un periodo superiore ad un anno, data la risposta positiva, nel secondo caso (B.P.) la terapia è stata interrotta dopo 4 mesi per inefficacia. I dati, quindi sono disponibili per entrambe le pazienti prima dell'avvio della terapia e al controllo a 4 mesi.

I livelli di TPO sono stati pari a:

| | Pazienti | TPO (pg/ml) (media ± ES) | Piastrine (x 10⁹/L) |
|--------------------|-----------------|-------------------------------------|--|
| Pre-terapia | S.C. | 32 | 62 |
| | B.P. | 16 | 14 |
| A 4 mesi | S.C. | 24 | 84 |
| | B.P. | 33 | 21 |
| A 1 anno | S.C. | 64 | 107 |

L'espressione del cMPL è stata:

| | Pazienti | cMPL/CD41 (media ± ES) | Piastrine (10⁹/l) |
|--------------------|-----------------|-----------------------------------|---|
| Pre-terapia | S.C. | 0.04 | 62 |
| | B.P. | 0.39 | 14 |
| A 4 mesi | S.C. | 0.06 | 84 |
| | B.P. | 0.50 | 21 |
| A 1 anno | S.C. | 0.12 | 107 |

I livelli di TPO e l'espressione del cMPL, non hanno mostrato significative variazioni durante il periodo di terapia con Eltrombopag.

c. Immunofluorescenza videoconfocale

La valutazione videoconfocale sui megacariociti ha mostrato un aumento dell'espressione di cMPL nei soggetti con ITP (3 soggetti) rispetto ai soggetti di controllo (3 soggetti con MGUS) (Figure 15 e 16).

Figura 15. Immunofluorescenza videoconfocale di un soggetto di controllo. Matrice RGB ed intensità del segnale nei tre canali di colore, corrispondenti a c-MPL (rosso), CD41 (verde) e nuclei (blu)

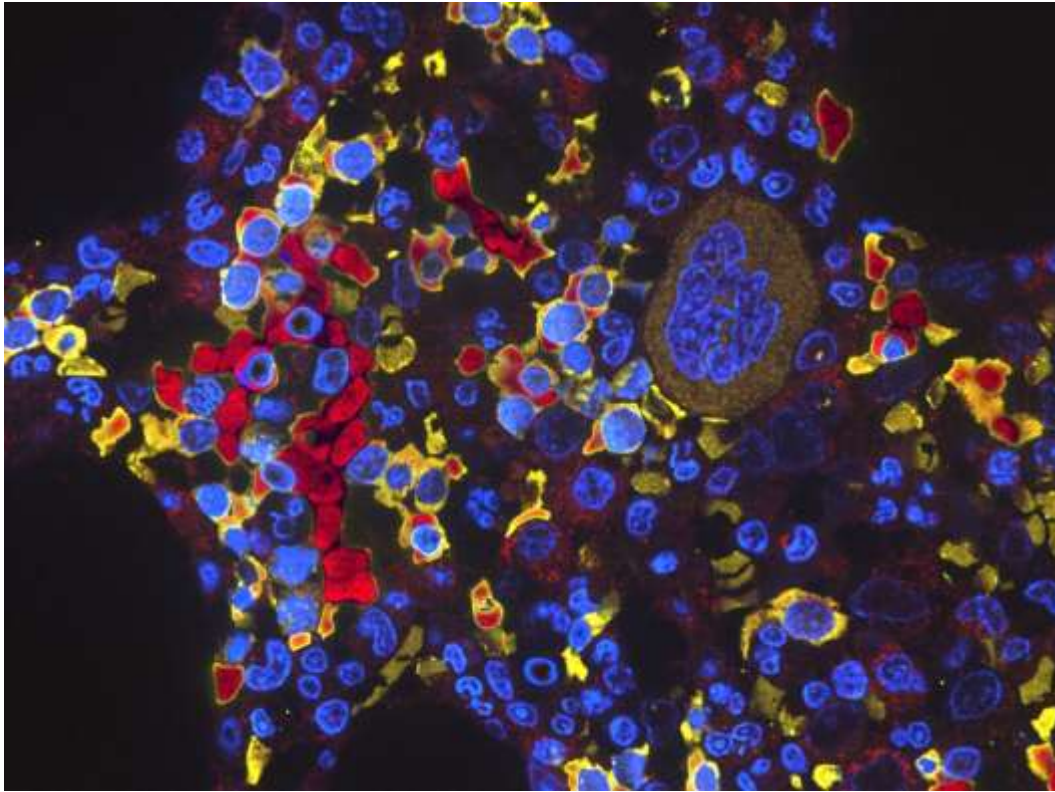
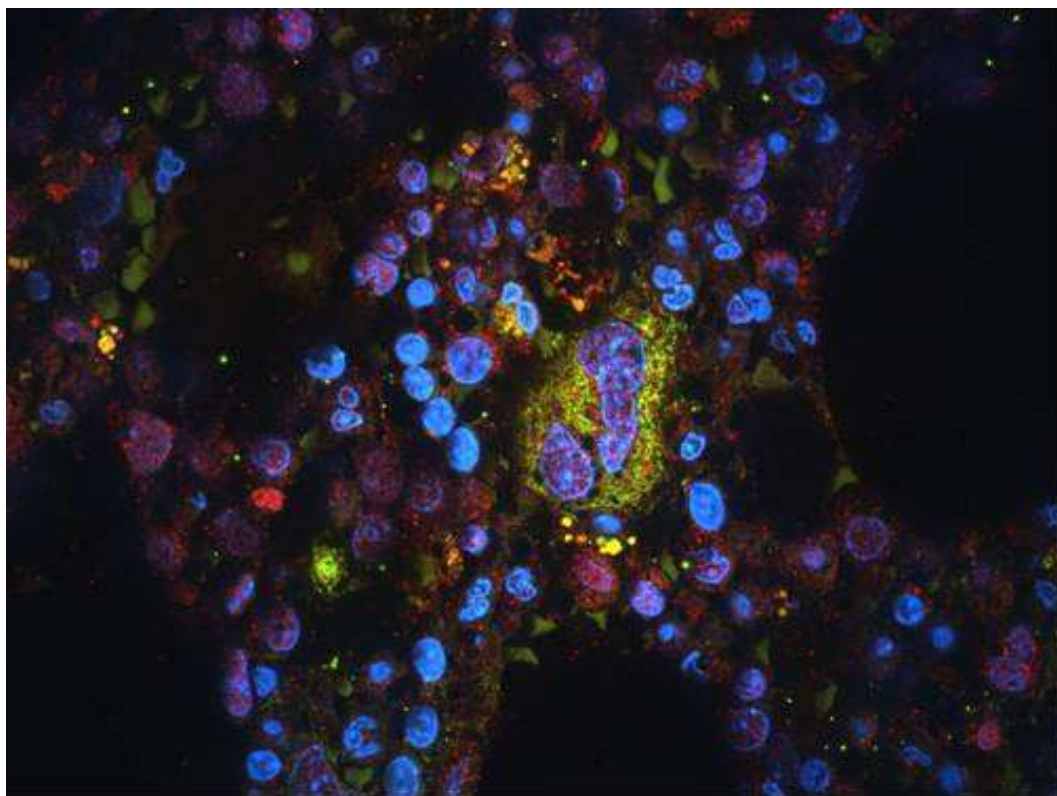


Figura 16. Immunofluorescenza videoconfocale di un soggetto con ITP. Matrice RGB ed intensità del segnale nei tre canali di colore, corrispondenti a c-MPL (rosso), CD41 (verde) e nuclei (blu)



DISCUSSIONE

La megacariopoiesi è regolata da un complesso *network* di citochine e chemochine coinvolte nei diversi stadi del processo.

La trombopoietina, attraverso il legame con il suo recettore, denominato cMPL, è il principale regolatore della produzione piastrinica e, mediante una complessa via di trasduzione del segnale, influenza la proliferazione e la differenziazione dei megacariociti [35].

Il legame tra TPO e cMPL, oltre a regolare la differenziazione megacariocitaria, regola anche i livelli plasmatici di TPO circolante: è stato, infatti, dimostrato che la TPO è inversamente correlata sia alla conta piastrinica che alla massa megacariocitaria [15].

L'espressione di c-MPL nei diversi disordini quantitativi delle piastrine riveste un potenziale interesse sia fisiopatologico che clinico. Infatti cMPL è il principale trasduttore del segnale replicativo di TPO per la megacariopoiesi. Il modello clinico che sottolinea l'importanza di questa interazione è rappresentato dalla CAMT e dalle malattie mieloproliferative tipo ET. Nei pazienti con ET sono stati descritti livelli di TPO normali o moderatamente elevati insieme a livelli di MPL nettamente ridotti (24). Inoltre nel 5% dei pazienti con ET che non presentano mutazione di JAK2 la causa della trombocitemia è dovuta a mutazione del gene MPL con conseguente attivazione del *signalling* responsabile della proliferazione delle cellule emopoietiche [51; 54].

Le mutazioni descritte sono la W515L, la MPLW515K nello stesso codone e altre quattro mutazioni a carico di altrettanti codoni (S505N, A506T, A519T) [53; 51; 61]. Alcune di queste mutazioni di MPL sono state descritte nella trombocitosi ereditaria (mutazione della regione transmembrana, S505N) e nella piastrinopenia congenita tipo CAMT (mutazione LOF).

La CAMT deriva da mutazioni del gene cMPL: il difetto del recettore impedisce la differenziazione delle cellule staminali in megacariociti con conseguente piastrinopenia. In questi soggetti con cMPL mutato, i livelli di TPO sono molto elevati ma le piastrine hanno morfologia normale.

Dal punto di vista fisiopatologico una diversa espressione di cMPL su piastrine e MK potrebbe sostenere una diversa o mancata risposta ai TPO-R aprendo nuove prospettive sulla terapia individualizzata in particolare nei pazienti con ITP e in quelli con FAM che si sono dimostrati sensibili ai TPO-R [52].

La metodica citofluorimetrica non si è dimostrata attendibile per la valutazione di MPL sulle piastrine e non abbiamo potuto applicarla dopo una prima fase sperimentale.

La sua espressione è limitata solamente a 25-100 recettori/piastrina [4] valore che si è dimostrato al di sotto della sensibilità del metodo citofluorimetrico tradizionale in molti campioni esaminati. Gli istogrammi di fluorescenza riportati da altri autori [30] confermano la nostra osservazione negativa.

L'ampia variabilità di fluorescenza rispetto al CD41 potrebbe tuttavia riflettere una situazione reale confermando l'inapplicabilità del metodo specifico ad una valutazione quantitativa di coorte.

L'MPL è stato identificato in 2 isoforme - P e K – che sono co-espresse nei MK.

Accanto a queste due isoforme, negli anni 2000, se ne è aggiunta una terza, definita Tr, con un peso molecolare di 56 kDa [9], che sembra essere importante per la regolazione dell'espressione della isoforma P [70].

Con la metodica di WB abbiamo potuto identificare solo l'isoforma principale P che presenta un peso molecolare di 71 kDa nella forma non glicosilata, di 82 kDa in quella glicosilata. Il nostro dato è coerente con quanto mostrato da altri autori [24].

L'espressione di MPL, valutata come rapporto con il CD41, è risultata mediamente

elevata in tutti i soggetti con piastrinopenia studiati indipendentemente dall'eziologia con valori 3-4 volte superiori ai controlli sani ed ai soggetti con ET.

Tuttavia, al di là del valore medio ottenuto, è presente una grande variabilità con valori di espressione normale o decisamente elevata. I nostri dati sono in accordo con quanto descritto in un eterogeneo gruppo di pazienti ematologici di cui i pazienti con ITP mostrano un'overespressione di cMPL ma livello dei megacariociti [77].

Il dato ottenuto sulle piastrine circolanti ha trovato conferma anche sui MK dei 3 soggetti con ITP studiati che mostrano una netta overespressione di MPL.

Nella nostra casistica si è confermata la presenza di livelli elevati di TPO nei pazienti che abbiamo inizialmente definito come affetti da ipoplasia midollare ed è emerso, anche, che i pazienti con forme ipoplasiche hanno livelli di TPO superiore ai soggetti con ITP, che al contrario presentano un quadro midollare nella norma [15; 39; 28].

La porpora trombocitopenica immune (ITP) ha un'incidenza variabile tra 0.4 e 12 casi/100.000 abitanti/anno nella popolazione pediatrica; l'incidenza si aggira attorno a 3 casi/100.000 abitanti/anno nei soggetti di età adulta [60]. Nei pazienti più giovani sembra interessare prevalentemente il sesso femminile mentre con l'avanzare dell'età l'incidenza di malattia tra maschi e femmine si avvicina progressivamente.

Nei soggetti con ITP, dove è presente una massiva distruzione piastrinica ma un numero di MK normale o aumentato, i livelli di TPO circolante non sono elevati come ci si aspetterebbe in base alla severità della piastrinopenia [41; 26].

Analogamente a quanto riportato in letteratura, anche nei nostri soggetti con ITP, in cui la conta piastrinica media era di $33 \pm 21 \times 10^9/L$ elementi, i livelli di TPO sono risultati moderatamente ma statisticamente superiori rispetto ai soggetti di

controllo.

I nostri dati, quindi, sembrano confermare un ruolo regolatorio esercitato dalla massa megacariocitaria sui livelli di TPO circolante.

Si può, pertanto, ipotizzare che questo meccanismo di regolazione abbia un ruolo anche in un gruppo di patologie eterogenee quali le sindromi mielodisplastiche, ovvero un gruppo eterogeneo di disordini clonali acquisiti del midollo osseo, caratterizzati da un'emopoiesi inefficace.

L'incidenza di questi gruppo di patologie è variabile tra 3 e 12 casi/100.000 abitanti/anno con un aumento età-correlato: l'incidenza, infatti, raggiunge valori particolarmente elevati al di sopra dei 70 anni diventando, pertanto, un problema di pertinenza geriatrica [55; 44; 73; 45].

Il registro piemontese sindromi mielodisplastiche ha riportato 61 soggetti con piastrinopenia isolata riferibile a sindrome mielodisplastica, pari a circa il 7% della casistica generale, sottolineando così come la piastrinopenia sia un problema clinicamente importante anche in questi gruppo di pazienti.

Secondo alcuni autori [27] la piastrinopenia è causata da deficit di sviluppo e maturazione megacariocitaria ma anche da incremento della morte per apoptosi di piastrine e megacariociti. Gli studi su biopsia midollare hanno evidenziato nella maggior parte dei soggetti una ipoplasia megacariocitaria ma, in alcuni casi, anche un netto incremento dei megacariociti.

Questo si riflette in un'ampia variabilità dei livelli TPO nei soggetti con mielodisplasia: se da un lato alcuni autori hanno evidenziato livelli di TPO più elevati rispetto ai soggetti normali [40; 25], altri [71; 66; 50] non hanno confermato tale riscontro, soprattutto nei soggetti con anemia refrattaria con eccesso di blasti e nelle forme con eccesso di blasti in trasformazione. È stato, quindi, ipotizzato che, mentre nei soggetti con anemia refrattaria la produzione e il metabolismo della TPO ri-

mangano normali, nei pazienti con eccesso di blasti, in trasformazione o meno, si ha una risposta inadeguata della TPO verosimilmente perché il clone leucemico determina un'iperespressione di cMPL [75].

I nostri dati relativi ai soggetti con ipoplasia midollare hanno evidenziato un quadro sovrapponibile a quanto precedentemente espresso con incremento sia della TPO che dell'espressione del cMPL. Analizzando, poi, il sottogruppo più omogeneo dei soggetti affetti da mielodisplasia si è avuta l'ulteriore conferma di questo andamento.

Mentre nelle ITP si è evidenziata, come atteso, una correlazione inversa tra TPO e cMPL, nessuna correlazione è stata riscontrata nelle MDS, elemento che potrebbe suggerire l'esistenza di una alterazione di legame tra TPO e cMPL, ipoteticamente riferibile all'esistenza di diverse isoforme di cMPL [9].

Nelle forme congenite rappresentate da pazienti con BS e MYH9, i livelli di TPO e l'espressione piastrinica di MPL appaiono comparabili a quanto riscontrato in ITP con overespressione di MPL. Questa osservazione conferma l'utilità di sperimentare la terapia con TPO-R anche in queste forme di piastrinopenia [52].

Kosugi [39] ha studiato due pazienti affetti da ITP, sottoposti a splenectomia con successo, evidenziando un transitorio incremento della TPO dopo la normalizzazione della conta piastrinica.

Nei due casi studiati nella nostra casistica, al contrario, la TPO come pure l'espressione di cMPL si sono ridotte dopo l'intervento chirurgico, il quale aveva comunque determinato una normalizzazione della conta piastrinica. Trova quindi conferma il ruolo delle piastrine e del loro cMPL nel regolare i livelli di TPO anche nella ITP.

L'idea di utilizzare la trombopoietina per stimolare la produzione delle piastrine nell'ITP risale alla seconda metà degli anni 1990. Gli studi sulle molecole di TPO di

prima generazione, con una struttura simile alla trombopoietina endogena, sono stati interrotti a causa dell'insorgenza di anticorpi anti-TPO con conseguente insorgenza di una grave piastrinopenia. Gli agenti trombopoietici di seconda generazione, invece, si legano e stimolano il recettore per la trombopoietina senza avere una analogia strutturale con la TPO stessa, per cui non hanno dato problemi di sviluppo di anticorpi contro la TPO. Per tale motivo questi nuovi farmaci sono meglio definiti come “agonisti del recettore della trombopoietina” o in maniera più breve “agonisti del TPO-R”. Di quest'ultimo gruppo sono attualmente disponibili il romiplostim e l'Eltrombopag: il romiplostim è un “peptibody” ovvero una proteina prodotta con la tecnologia del DNA ricombinante [43; 18], che viene somministrato per via sottocutanea settimanalmente. L'Eltrombopag è un agonista non peptidico del TPO-R, che viene somministrato giornalmente per via orale [64].

Bussel [5] ha trattato con Eltrombopag 118 pazienti affetti da ITP ed ha valutato i livelli di TPO prima e durante trattamento, evidenziando come il trattamento con agonista del TPO-R abbia lasciato inalterati i livelli di TPO. Con l'introduzione degli agonisti del TPO-R nel nostro paese, e l'indicazione al trattamento in soggetti con ITP già sottoposti a splenectomia, abbiamo potuto studiare due pazienti della nostra casistica trattati con TPO-R ed in particolare Eltrombopag. In questi due casi, in accordo con i dati di Bussel, non abbiamo osservato variazioni dei livelli di TPO prima e durante trattamento. Un dato assolutamente poco presente in letteratura è l'espressione di cMPL nei soggetti trattati con TPO-R. Nei due soggetti studiati, pur tenendo conto che solo in uno si è ottenuta la risposta clinica, l'espressione del cMPL piastrinico non ha subito variazioni. Ciò evidenzia che l'interazione di Eltrombopag con c-MPL non influenza né i livelli di TPO endogena né l'espressione del recettore. La valutazione tuttavia di una casistica più ampia potrà dare indicazioni sulla relazione tra espressione di cMPL e risposta terapeutica

agli TPO-R.

Nei soggetti affetti da TE sia il livello di espressione della TPO che quello di cMPL si discostano in maniera significativa da quanto evidenziato nei soggetti piastrinopenici: i livelli sono sovrapponibili a quanto trovato nei controlli normali. Questo dato, per quanto riguarda TPO, è in accordo con precedenti studi nei quali i livelli di TPO in pazienti con TE erano uguali o lievemente superiori ai controlli [24]. Tuttavia, negli stessi studi viene riportato una espressione di cMPL ridotta [76; 47], contrariamente ai nostri dati. Tuttavia la metodica usata è stata soprattutto la citofluorimetria che nelle nostre mani è risultata poco affidabile per una valutazione quantitativa. Dati più convincenti sono stati ottenuti sulla eterogenea espressione di cMPL in MK dei pazienti con ET [77; 47]; tale dato potrebbe trovare conferma nella prossima valutazione delle biopsie ossee dei nostri pazienti.

Alla luce della natura clonale della TE con mutazione V617F di JAK2 è improbabile che vi sia un ruolo fisiopatologico del cMPL al di là dell'iperattivazione a valle del recettore mediata da JAK2. Una eterogenea espressione riscontrata nei MK e la correlazione lineare tra TPO e cMPL osservata nella nostra casistica potrebbero esprimere difetti di stabilità e/o internalizzazione del recettore dopo legame con TPO [24].

In conclusione, quindi, in accordo con i dati della letteratura [25], anche la nostra casistica ha presentato una grande eterogeneità nei livelli di trombopoietina nei diversi tipi di piastrinopenia così come grande variabilità è stata riscontrata anche nell'espressione del cMPL, ancora una volta indipendentemente dal tipo di piastrinopenia.

La presenza di una correlazione lineare tra TPO e cMPL nelle forme mielodisplastiche ha destato sorpresa ma, come già accennato, è ipotizzabile che le diverse iso-

forme del recettore possano giocare un ruolo di modulazione reciproca determinando un'alterazione dell'espressione del recettore e della sua interazione con la trombopoietina.

BIBLIOGRAFIA

1. Abrahamson PE, Hall SA, Feudjo-Tepie M. *The incidence of idiopathic thrombocytopenic purpura among adults: a population-based study and literature review*. Eur J Haematol 2009; 83: 83-89
2. Balduini CL, Noris P. *Piastrinopenie costituzionali*. Hematology meeting reports 2007; 1: 84-94
3. Barbui T, Barosi G, Grossi A et al. *Practice guidelines for the therapy of essential thrombocythemia. A statement from the Italian Society of Hematology, the Italian Society of Experimental Hematology and the Italian Group of Bone Marrow Transplantation*. Haematologica 2004; 89: 215-232
4. Broudy VC, Lin NL, Sabath DF. *Human platelets display high-affinity receptors for thrombopoietin*. Blood 1997; 89: 1896-1904
5. Bussel JB, Cheng G, Saleh MN. *Eltrombopag for the treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura*. N Engl J Med 2007; 357: 2237-2247
6. Cerutti A, Custodi P, Duranti M. *Thrombopoietin levels in patients with primary and reactive thrombocytosis*. Br J Haematol 1997; 99: 281-284
7. Chang MS, McNinch J, Basu R. *Cloning and characterization of the human megakaryocyte growth and development factor (MGDF) gene*. J Biol Chem 1995; 270: 511-514
8. Cines DB, Bussel JB, Liebman HA. *The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity*. Blood 2009; 113: 6511-6521
9. Coers J, Ranft C, Skoda R. *A truncated isoform of c-Mpl with an essential C-terminal peptide targets the full-length receptor for degradation*. J Biol Chem 2004; 279: 36397-36404
10. Cortelazzo S, Viero P, Finazzi G. *Incidence and risk factors for thrombotic complica-*

- tions in a historical cohort of 100 patients with essential thrombocythemia. *J Clin Oncol* 1990; 8: 556-562
11. Cortelazzo S, Finazzi G, Ruggeri M. *Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and high risk of thrombosis*. *N Engl J Med* 1995; 332: 1132-1136
 12. Cuker A, Cines DB. *Immune thrombocytopenia*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010; 2010: 377-384
 13. De Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD. *Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand*. *Nature* 1994; 369: 533-538
 14. Elliott MA, Tefferi A. *Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia*. *Br J Haematol* 2005; 128: 275-290
 15. Emmons RV, Reid DM, Cohen RL. *Human thrombopoietin levels are high when thrombocytopenia is due to megakaryocyte deficiency and low when due to increased platelet destruction*. *Blood* 1996; 87: 4068-4071
 16. Engel C, Loeffler M, Franke H. *Endogenous thrombopoietin serum levels during multicycle chemotherapy*. *Br J Haematol* 1999; 105: 832-838
 17. Fielder PJ, Gurney AL, Stefanich E. *Regulation of thrombopoietin levels by c-mpl-mediated binding to platelets*. *Blood* 1996; 87: 2154-2161
 18. Frampton JE, Lyseng-Williamson KA. *Romiplostim*. *Drugs* 2009; 69: 307-317
 19. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM. *International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes*. *Blood* 1997; 89: 2079-2088
 20. Griesshammer M, Bangerter M, Van Vliet HH. *Aspirin in essential thrombocythemia: status quo e quo vadis*. *Semin Thromb Hemostas*. 1997; 23: 371-377
 21. Gugliotta L, Marchioli R, Baravelli S. *Trombocitemia essenziale: fattori di rischio*. *Progressi in Ematologia Clinica* 1998; 17: 179-183
 22. Harris NL, Jaffe ES, Diebold EL. *World Health Organization classification of neoplastic disease of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory*

- Committee meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. J Clin Oncol 1999; 17: 3835-3849*
23. He R, Reid DM, Jones CE. *Extracellular epitopes of platelet glycoprotein Ib alpha reactive with serum antibodies from patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. Blood 1995; 86: 3789-3796*
 24. Horikawa Y, Matsumura I, Hashimoto K. *Markedly reduced expression of platelet c-mpl receptor in essential thrombocythemia. Blood 1997; 90: 4031-4038*
 25. Hou M, Andersson PO, Stockelberg D. *Plasma thrombopoietin levels in thrombocytopenic states: implication for a regulatory role of bone marrow megakaryocytes. Br J Haematol 1998; 101: 420-424*
 26. Houwerzijl EJ, Louwes H, Esselink MT. *Increased glycojalicin index and normal thrombopoietin levels in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura with a decreased rate of platelet production. Haematologica 2005; 90: 710-711*
 27. Houwerzijl EJ, Blom NR, Van der Want JJ. *Increased peripheral platelet destruction and caspase-3-independent programmed cell death of bone marrow megakaryocytes in myelodysplastic patients. Blood 2005; 105: 3472-3479*
 28. Ichikawa N, Ishida F, Shimodaira S. *Regulation of serum thrombopoietin levels by platelets and megakaryocytes in patients with aplastic anaemia and idiopathic thrombocytopenic purpura. Thromb Haemost 1996; 76: 156-160*
 29. Imbach P, Crowther M. *Thrombopoietin-receptor agonists for primary immune thrombocytopenia. N Engl J Med. 2011; 365: 734-741*
 30. Izumi M, Takeshita A, Shinjo K. *Decreased amount of mpl and reduced expression of glycoprotein IIb/IIIa and glycoprotein Ib on platelets from patients with refractory anaemia: analysis by a non-isotopic quantitative ligand binding assay and immunofluorescence. Eur J Haematol 2001;66:245-252*
 31. Jelkmann W. *The role of the liver in the production of thrombopoietin compared with*

- erythropoietin*. Eur J Gastroenterol Hepatol 2001; 13: 791-801
32. Johansson P. *Epidemiology of the myeloproliferative disorders polycythemia vera and essential thrombocythemia*. Semin Thromb Hemost 2006; 32: 171-173
 33. Kantarjian H, Giles F, List A. *The incidence and impact of thrombocytopenia in myelodysplastic syndromes*. Cancer 2007; 109: 1705-1714
 34. Kaushansky K. *Thrombopoietin*. N Engl J Med 1998; 339: 746-754
 35. Kaushansky K. *The molecular mechanisms that control thrombopoiesis*. J Clin Invest 2005; 115: 3339-3347
 36. Kaushansky K. *Determinants of platelet number and regulation of thrombopoiesis*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2009:147-152
 37. Kelemen E, Cserhati I, Tanos B. *Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythaemic sera*. Acta Haematol 1958; 20: 350-355
 38. Kessler CM, Klein HG, Havlik RJ. *Uncontrolled thrombocytosis in chronic myeloproliferative disorders*. Br J Haem 1982; 50: 157-167
 39. Kosugi S, Kurata Y, Tomiyama Y. *Circulating thrombopoietin level in chronic immune thrombocytopenic purpura*. Br J Haematol 1996; 93: 704-706
 40. Kunishima S, Tahara T, Kato T. *Serum thrombopoietin and plasma glyocalicin concentrations as useful diagnostic markers in thrombocytopenic disorders*. Eur J Haematol 1996; 57: 68-71
 41. Kurata Y, Satoru H, Kiyoi T. *Diagnostic value of tests for reticulated platelets, plasma glyocalicin, and thrombopoietin levels for discriminating between hyperdestructive and hypoplastic thrombocytopenia*. Am J Clin Pathol 2001; 115: 656-664
 42. Kuter DJ, Rosenberg RD. *The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit*. Blood 1995; 85: 2720-2730
 43. Kuter DJ, Bussel JB, Lyons RM. *Efficacy of romiplostim in patients with chronic im-*

- immune thrombocytopenic purpura: a double-blind randomised controlled trial.* Lancet. 2008; 371: 395-403.
44. Ma X, Does M, Raza A. *Myelodysplastic syndromes. Incidence and survival in the United States.* Cancer 2007; 109: 1536-1542
45. Maynadié M, Verret C, Moskovichenko P. *Epidemiological characteristics of myelodysplastic syndrome in a well-defined French population.* Br J Cancer 1996; 74: 288-290
46. Martin TG 3rd, Somberg KA, Meng YG. *Thrombopoietin levels in patients with cirrhosis before and after orthotopic liver transplantation.* Ann Intern Med 1997; 127: 285-288.
47. Moliterno AR, Hankins WD, Spoivak JL. *Impaired expression of the Thrombopoietin receptor by platelets from patients with polycythemia vera.* N Engl J Med 1998; 338; 572-580
48. Murone M, Carpenter DA, de Sauvage FJ. *Hematopoietic deficiencies in c-mpl and TPO knockout mice.* Stem Cells 1998; 16: 1-6
49. Neunert C, Lim W, Crowther M. *The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia.* Blood 2011; 117: 4190-4207
50. Ogata K, Tamura H. *Thrombopoietin and myelodysplastic syndromes.* Int J Hematol. 2000;72: 173-177.
51. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T. *MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients.* Blood 2006; 108: 3472-3476
52. Pecci A, Gresele P, Klersy C. *Eltrombopag for the treatment of the inherited thrombocytopenia deriving from MYH9 mutations.* Blood 2010; 116:5832-5837
53. Pikman Y, Lee BH, Mercher T. *MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia.* PLoS Med 2006; 3: e270

54. Prow D, Vadhan-Raj S. *Thrombopoietin: biology and potential clinical applications*. Oncology (Williston Park) 1998; 12: 1597-1604, 1607-1608
55. Radlund A, Thiele T, Hansen S. *Incidence of myelodysplastic syndromes in a Swedish population*. Eur J Haematol 1995; 54: 153-156
56. Randi ML, Ruzzon E, Tezza F. *Toxicity and side-effects of hydroxyurea used for primary thrombocythemia*. Platelets 2005; 16: 181-184
57. Raskind WH, Turumali N, Jacobson R. *Evidence for a multistep pathogenesis of a myelodysplastic syndrome*. Blood 1984; 63: 1318-1323
58. Ravich RBM, Gunz FW, Reed CS. *The danger of surgery in uncontrolled haemorrhagic thrombocythemia*. Med J Aust 1970; 1: 704-708
59. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T. *Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group*. Blood 2009; 113: 2386-2393
60. Schipperus M, Fijnheer R. *New therapeutic options for immune thrombocytopenia*. Neth J Med 2011; 69: 480-485
61. Schnittger S, Haferlach C, Beelen DW. *Detection of three different MPL515 mutations in 10.1% of all JAK2V617F unmutated ET and 9.3% of all JAK2V617F unmutated OMF: a study of 387 patients*. Blood 2007; 110: 2546
62. Schoonen WM, Kucera G, Coalson J. *Epidemiology of immune thrombocytopenic purpura in the General Practice Research Database*. Br J Haematol 2009; 145: 235-244
63. Shinjo K, Takeshita A, Nakamura S. *Serum thrombopoietin levels in patients correlate inversely with platelet counts during chemotherapy-induced thrombocytopenia*. Leukemia 1998; 12: 295-300
64. Stasi R, Evangelista ML, Amadori S. *Novel thrombopoietic agents: a review of their use in idiopathic thrombocytopenic purpura*. Drugs 2008; 68: 901-912

65. Stasi R, Evangelista ML, Stipa E. *Idiopathic thrombocytopenic purpura: current concepts in pathophysiology and management*. *Thromb Haemost*. 2008; 99: 4-13
66. Tamura H, Ogata K, Luo S, Nakamura K. *Plasma thrombopoietin (TPO) levels and expression of TPO receptor on platelets in patients with myelodysplastic syndromes*. *Br J Haematol*. 1998;103: 778-784
67. Tefferi A, Thiele J, Orazi A. *Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel*. *Blood* 2007; 110: 1092-1097
68. Teofili L, Pierconti F, Di Febo A. *The expression pattern of c-mpl in megakaryocytes correlates with thrombotic risk in essential thrombocythemia*. *Blood* 2002; 100: 714-717
69. Teramura M, Kobayashi S, Hoshino S. *Interleukin-11 enhances human megakaryocytopoiesis in vitro*. *Blood* 1992; 79: 327-331
70. Thompson AA, Woodruff K, Feig SA. *Congenital thrombocytopenia and radioulnar synostosis: a new familial syndrome*. *Br J Haematol* 2001; 113: 866-870
71. Tiedt R, Coers J, Ziegler S. *Pronounced thrombocytosis in transgenic mice expressing reduced levels of Mpl in platelets and terminally differentiated megakaryocytes*. *Blood* 2009; 113: 1768-1777
72. Usuki K, Tahara T, Iki S. *Serum thrombopoietin level in various hematological diseases*. *Stem Cells* 1996; 14: 558-565
73. Vettore S, Scandellari R, Scapin M. *A case of Bernard-Soulier Syndrome due to a homozygous four bases deletion (TGAG) of GPIb α gene: lack of GPIb α but absence of bleeding*. *Platelets* 2008;19:388-391
74. Vettore S., Tezza F, Malara A. *A A386G biallelic GPIbalpha gene mutation with anomalous behaviour: a new mechanism suggested for Bernard Soulier syndrome patho-*

- genesis*. Haematologica 2011; 96: 1878-1882
75. Vigon I, Mornon JP, Cocault L. *Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogene: identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily*. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 5640-5644
76. Williamson PJ, Kruger AR, Reynolds PJ. *Incidence of myelodysplastic syndrome is increasing. Careful diagnosis is necessary for choice of the treatment*. Br J Haematol 1994; 87: 743-745
77. Yoon SY, Li CY, Tefferi A. *Megakaryocyte c-Mpl expression in chronic myeloproliferative disorders and the myelodysplastic syndrome: immunoperoxidase staining patterns and clinical correlates*. Eur J Haematol 2000; 65: 170-174
78. Zaja F, Baccarani M, Mazza P. *Dexamethasone plus rituximab yields higher sustained response rates than dexamethasone monotherapy in adults with primary immune thrombocytopenia*. Blood 2010; 115: 2755-2762
79. Zhang X, Yang Y, Shi H. *Expression of thrombopoietin related genes in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura*. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi 1998; 19: 587-589
80. Zwierzina H, Rollinger-Holzinger I, Nuessler V. *Endogenous serum thrombopoietin concentrations in patients with myelodysplastic syndromes*. Leukemia 1998; 12: 59-64