

ALTERAZIONI METABOLICHE IN ERITROCITI DI CANI ANEMICI

S. Paltrinieri, F. Agnes, S. Comazzi

Istituto di Patologia Generale Veterinaria - Milano

Introduzione

In letteratura sono riportate rare segnalazioni sull'attività metabolica di eritrociti di cane in corso di anemia, per lo più riferite a forme rigenerative (Smith e Agar, 1975; Lubas *et al.*, 1979; Romanello, 1980): in casi di anemia emolitica, oltre alla concentrazione di 2,3 DPG, aumenta l'attività degli enzimi piruvato kinasi (PK), indicatore del metabolismo in generale, e glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PDH), che permette una maggiore produzione di NADPH, indispensabile per i sistemi anti-ossidativi eritrocitari; (Paltrinieri *et al.*, 1996). Ancor più rare e incomplete sono le segnalazioni relative a forme non rigenerative (King *et al.*, 1992). Per tali motivi si è voluto verificare il comportamento metabolico di globuli rossi di cani anemici, analizzando comparativamente anemie di diversa origine ed includendo nel protocollo sperimentale la valutazione della resistenza globulare e dell'indice di produzione reticolocitaria (RPI), sia per meglio inquadrare la fisiopatologia dei singoli casi di anemia, sia per una loro valutazione comparativa.

Materiali e metodi

Sono stati esaminati campioni di sangue prelevati da 22 cani di età sesso e razza differenti, affetti da anemia. Il sangue, posto in provette contenenti sodio eparina e trasportato in borsa termica, è stato analizzato entro 2 ore dal prelievo. Quali valori di riferimento sono stati utilizzati 10 cani di età, sesso e razza differenti privi di alterazioni ematologiche riferibili a stati anemici, esaminati durante lavori precedenti (Paltrinieri *et al.*, 1996, Paltrinieri *et al.*, 1998).

Ematologia: sono stati valutati il conteggio degli eritrociti e dei leucociti mediante analizzatore automatico (Coulter Counter ZF), la concentrazione dell'emoglobina con metodo di Drabkin (Haemoglobinometer), il microematocrito (Haemofuge A), gli indici eritrocitari di Wintrobe (MCV, MCH, MHCH) come indicato da Jain (1986) e la formula leucocitaria su striscio colorato con May Grünwald Giemsa. È stata infine

valutata la percentuale di reticolociti dopo colorazione con blu brillante di cresile (Pasquinelli, 1984) ed è stato calcolato l'Indice di Produzione Reticolocitaria (RPI) come proposto da Jain (1993).

2,3DPG - per il dosaggio del 2,3DPG è stato utilizzato un kit disponibile in commercio (Sigma) con valutazione spettrofotometrica a 340 nm contro acqua in spettrofotometro Beckman (mod. 25).

PK e G6PDH - L'attività degli enzimi PK e G6PDH è stata valutata utilizzando kit disponibili in commercio (Boehringer Mannheim) con determinazione spettrofotometrica contro acqua a 340 nm.

Fragilità osmotica – E' stata seguita la metodica di Dacie e Lewis, descritta da Pasquinelli (1984), allestendo diluizioni scalari (da 0,9% a 0,1%) di NaCl, aggiungendo ad ogni provetta 50 µl di sangue e misurando spettrofotometricamente (540 nm contro acqua), dopo centrifugazione, la concentrazione di emoglobina nel surnatante. Dai valori ottenuti in ogni campione sono state elaborate statisticamente (curva sigmoideale dose-risposta) le curve di emolisi cumulativa e derivativa. Lo stesso metodo statistico ha permesso di ricavare i valori di emolisi minima (meno del 5% di emolisi) media (più del 50% di emolisi) e massima (più del 90% di emolisi).

Analisi statistica – Per l'analisi statistica è stato utilizzato il software SPSS 6.1.2.

Risultati

L'eritrogramma degli animali anemici evidenzia valori inferiori rispetto ai controlli per quanto riguarda il numero di eritrociti ($P < 0,001$), la concentrazione emoglobinica ($P < 0,001$), ed il valore ematocrito ($P < 0,001$), una maggiore percentuale di reticolociti ($P < 0,01$) ed un più alto RPI ($P < 0,05$): quest'ultimo parametro, però, presentava un valore medio inferiore ad 1, valore che viene ritenuto utile in medicina veterinaria per distinguere le anemie in rigenerative e non rigenerative (Jain, 1993). Si è quindi ricorsi ad una valutazione analitica di tale parametro, suddividendo poi gli animali anemici in due gruppi in funzione della risposta midollare. (Tab. 1)

Al gruppo delle anemie non rigenerative appartengono essenzialmente forme croniche, con l'eccezione dei quattro casi di piroplasmosi, mentre tra le anemie rigenerative rientrano quasi esclusivamente forme acute, ed in particolare casi di

anemia emolitica, caratterizzati da un ben preciso corredo sintomatologico (febbre, emoglobinuria, anemia ed ittero) e da reperti di intensa risposta midollare.

<i>Anemie rigenerative</i>			<i>Anemie non rigenerative</i>		
N°	Patologia	RPI	N°	Patologia	RPI
1	Anemia emolitica	1,18	7	Leucemia mieloide acuta (AML5)	0,07
2	Anemia emolitica	3,08	9	Piroplasmosi	0,76
3	Anemia emolitica	2,03	12	Piroplasmosi	0,05
4	Cardiopatìa	1,04	13	Emorragia cronica (emangiosarcoma)	0,19
5	Anemia Emolitica Autoimmune	1,28	14	Anemia ipoplastica	0,22
6	Sindrome della vena cava	1,35	16	Large Granular Leukemia	0,04
8	Flogosi purulenta cronica	1,42	17	Emorragia cronica (emangiosarcoma)	0,26
10	Anemia emolitica	2,53	19	Anemia ipoplastica	0,16
11	Anemia Emolitica Autoimmune	2,01	20	Piroplasmosi	0,12
15	Piroplasmosi	1,85	21	Piroplasmosi	0,28
18	Emorragia acuta (trauma)	1,64	22	Ehrlichiosi	0,08

Tabella 1: Suddivisione dei casi di anemia in base all'indice di produzione reticolocitaria

La rilettura dei dati ottenuti in funzione della suddivisione in tre gruppi (Controlli, Anemie Non Rigenerative e Anemie Rigenerative) ha delineato differenze più nette nell'eritrogramma (tab. 2). Permangono differenze significative ($P < 0,001$) per quanto riguarda numero di eritrociti totali, concentrazione di emoglobina e valore ematocrito, con valori inferiori nei due gruppi di animali anemici rispetto a quelli di controllo: gli animali con anemia rigenerativa, inoltre, manifestano valori molto più elevati di quelli degli altri due gruppi per quanto riguarda numero di eritroblasti ($P < 0,05$), percentuale di reticolociti ($P < 0,001$), ed MCV ($P < 0,05$): Invece l'MCHC risulta significativamente ridotto ($P < 0,001$). Le anemie non rigenerative quindi appaiono come normocromiche normocitiche, e quelle rigenerative come ipocromiche macrocitiche, in accordo con quanto riportato in letteratura (Jain, 1986; Jain, 1993).

	Eritrociti x 10 ⁶ /μl	Eritroblasti x 10 ⁶ /μl	Reticolociti (%)	RPI	Hb (g/dl)	Ht (%)	MCV (fl)	MCHC (%)	MCH (pg)
C	7,49 ± 0,87	0,05 ± 0,12	0,91 ± 0,53	0,24 ± 0,14	18,9 ± 1,7	51,5 ± 4,2	69,2 ± 5,3	36,8 ± 1,6	25,4 ± 1,5
AN	3,24 ± 0,77	0,16 ± 0,33	1,17 ± 1,25	0,20 ± 0,20	8 ± 1,9	22,6 ± 5,9	69,9 ± 11	35,7 ± 2,6	24,8 ± 2,5
AR	2,87 ± 0,91	4,81 ± 7,46	10,06 ± 3,77	1,76 ± 0,62	7,6 ± 1,9	24,1 ± 5,8	93,1 ± 37,5	31,8 ± 3,8	29,5 ± 12,3
	***	*	***	***	***	***	*	***	n.s.
	C vs AN, AR	AR vs AN, C	AR vs AN, C	AR vs AN, C	C vs AN, AR	C vs AN, AR	AR vs AN, C	AR vs AN, C	-

Tabella 2: Valori relativi all'eritrogramma rilevati negli animali di controllo (C), ed in quelli con anemia non rigenerativa (AN) e rigenerativa (AR)

Per quanto riguarda il metabolismo eritrocitario (Tab. 3), nelle forme rigenerative l'attività della PK è più alta rispetto ai controlli ($P < 0,001$), ed alle forme non rigenerative ($P < 0,01$), che, pur presentando un valore medio più alto di quello dei controlli, non ne differiscono in maniera significativa, anche a causa dell'alta variabilità individuale. Per quanto riguarda l'attività della G6PDH non sono state rilevate differenze tra i due gruppi di animali anemici, che presentano entrambi valori medi più elevati rispetto a quello dei controlli ($P < 0,01$). Lo stesso dicasi a proposito della concentrazione di 2,3DPG, con una maggiore significatività statistica ($P < 0,001$). A questo proposito va rilevata l'importanza della presenza di elementi eritroidi immaturi nel determinare le variazioni sopradescritte: infatti è stato possibile rilevare correlazioni positive dell'attività della PK con il numero di eritroblasti ($P < 0,01$, $r = 0,52$) e di reticolociti ($P < 0,05$, $r = 0,52$) e negativa con il numero di eritrociti ($P < 0,001$, $r = -0,69$); l'attività della G6PDH, invece non è risultata positivamente correlata con gli elementi immaturi, mentre è stato possibile evidenziare una correlazione negativa con gli eritrociti totali ($P < 0,001$, $r = -0,67$).

	PK (U/g Hb)	G6PDH (U/g Hb)	2,3 DPG ($\mu\text{mol/g Hb}$)	Resistenza globulare minima (% Na Cl)	Resistenza globulare media (% Na Cl)	Resistenza globulare massima (% Na Cl)
C	2,15 $\pm 1,33$	2,34 $\pm 1,01$	15,00 $\pm 1,19$	0,560 $\pm 0,175$	0,451 $\pm 0,102$	0,374 $\pm 0,099$
AN	12,53 $\pm 8,61$	9,16 $\pm 3,90$	19,67 $\pm 4,04$	0,704 $\pm 0,044$	0,420 $\pm 0,075$	0,218 $\pm 0,044$
AR	21,43 $\pm 15,06$	9,30 $\pm 6,26$	21,43 $\pm 4,37$	0,728 $\pm 0,078$	0,438 $\pm 0,101$	0,228 $\pm 0,071$
	***	**	***	***	n.s.	***
	AR vs C	C vs AN, AR	C vs AN, AR	AR vs C	-	C vs AN, AR
	**			**		
	AR vs AN			AN vs C		

Tabella 3: Valori relativi all'attività di PK e G6PDH, alla concentrazione di 2,3 DPG ed alla fragilità osmotica rilevati negli animali di controllo (C), ed in quelli con anemia non rigenerativa (AN) e rigenerativa (AR)

La concentrazione di 2,3DPG, infine, è risultata correlata negativamente con il numero di eritrociti ($P < 0,001$, $r = -0,66$), mentre è emersa solo una modica correlazione con il numero di eritroblasti ($P < 0,05$, $r = 0,4$), a conferma del fatto che, indipendentemente dall'attività rigenerativa, in condizioni di anemia aumenta la

necessità di ossigeno dell'organismo. L'analisi della fragilità osmotica ha evidenziato una minore resistenza globulare minima e una maggiore resistenza globulare massima nei soggetti anemici rispetto ai controlli ad indicare da un lato una maggiore fragilità eritrocitaria, dall'altro la presenza di una sottopopolazione di eritrociti più resistente, presumibilmente costituita da elementi giovani e/o immaturi, che, come è noto, sono più resistenti alla lisi osmotica (Jain, 1993): ciò ha anche permesso di rilevare alterazioni della caratteristica forma sigmoide delle curve cumulative e due o più picchi di emolisi nelle curve derivate dei fragiligrammi.

Conclusioni

L'analisi dei risultati ottenuti indica, ai fini di un migliore inquadramento dello stato anemico, l'importanza di effettuare, oltre al routinario esame emocromocitometrico, la valutazione di parametri aggiuntivi. A tale proposito i parametri che meritano di essere presi maggiormente in considerazione sono la percentuale e il numero dei reticolociti, che consente di ricavare l'RPI, indice indispensabile per ottenere una corretta suddivisione in forme rigenerative e non rigenerative. La valutazione del metabolismo eritrocitario attraverso la determinazione di attività enzimatiche quali la PK, G6PDH, ha permesso di evidenziare come in tutti gli stati anemici, indipendentemente dalla causa di anemia, gli eritrociti si trovino in condizioni di aumentare il proprio metabolismo; tale incremento è più marcato nelle forme rigenerative in funzione della presenza di elementi giovani e/o immaturi. Non è invece rilevabile alcuna differenza tra anemie rigenerative e non rigenerative nella concentrazione di 2,3DPG in relazione alla sua specifica funzione. Infine lo studio della fragilità osmotica e delle curve derivativa e cumulativa del fragiligramma ha reso possibile l'evidenziazione di quadri tipici delle forme rigenerative.

In conclusione, nonostante i risultati ottenuti siano di per sé utili a definire gli aspetti di fisiopatologia eritrocitaria in corso di anemia, si ritiene comunque indispensabile uno studio dinamico da condurre attraverso una serie di prelievi in varie fasi di insorgenza, decorso e remissione dello stato anemico. Un'indicazione in tal senso viene fornita in modo paradigmatico dai casi osservati di piroplasmosi, dei quali uno ha fornito un quadro di anemia rigenerativa, quattro invece sono classificabili come anemia non rigenerative probabilmente in relazione ad una diagnosi più precoce.

Bibliografia

- 1) Jain NC: Scham's Veterinary Hematology . 4th Edition, Lea & Febiger, Philadelphia, 1986
- 2) Jain NC: Essential of Veterinary Haematology. Lea & Febiger, Philadelphia, 1993
- 3) King LC, Giger V, Diserens D, Nagode LA: Anemia of chronic renal failure in dogs. J. Int. Med., **6**:264-270, 1992
- 4) Lubas GJ, Della Croce G, Buonaccorsi A, Delgadillo AJ: Il comportamento di alcuni enzimi e metaboliti eritrocitari in diversi processi morbosi del cane. Clin.Vet. **102**:148-153, 1979
- 5) Paltrinieri S, Agnes F, Sartorelli P: Erythrocyte metabolism in healthy dogs and preliminary results in cardiopathic and anaemic dogs. Atti 14° E.S.V.P. Congress, **14**:50, 1996
- 6) Paltrinieri S, Sartorelli P, De Vecchi B, Agnes F: Erythrocyte metabolism in healthy, cardiopathic and anemic dogs. J.Comp.Pathol., **118**:in corso di stampa, 1998.
- 7) Pasquinelli F: Tecniche ematologiche in diagnostica e tecniche di laboratorio. volume 2, sezione 8, ematologia 835; Rosini editrice s.r.l. Firenze, 1984.
- 8) Romanello G: Comportamento della piruvato-chinasi e della glucosio-6-fosfato deidrogenasi nell'eritrocita di cane. Tesi di Laurea in Medicina Veterinaria, Milano, 1980.
- 9) Smith NS, Agar JE: The effect of phlebotomy on canine erythrocyte metabolism. Res. Vet. Sci., **12**, 231-238, 1975.