

**Κ.Λ. Μπουραντάς**  
**Αναπληρωτής Καθηγητής**  
**Παθολογίας - Αιματολογίας**  
**Πανεπιστημίου Ιωαννίνων**

## **Μοριακή βιολογία και φυσιολογική δράση της ερυθροποιητίνης**

Η ερυθροποιητίνη (Epo) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη (ορμόνη) που παράγεται από τα νεφρά κυρίως και ρυθμίζει την παραγωγή των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Καθαρή ερυθροποιητίνη λαμβάνεται από τα ούρα ασθενών με απλαστική αναιμία που έχουν υψηλές τιμές Epo. Σήμερα με ανασυνδυασμό του DNA παράγεται ανθρώπινη ανασυνδυασμένη ερυθροποιητίνη (rHuEpo) η οποία και χορηγείται θεραπευτικά περίπου σε κάθε είδους αναιμία. Στις μέρες μας παρόλη την ασφάλεια της χορήγησης του αίματος, πρέπει να αποφεύγουμε τις μεταγίσεις για τον φόβο μόλυνσεων από AIDS και ηπατίτιδα αλλά και την διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος. Η χορήγηση Epo μπορεί να βελτιώσει την αναιμία σε μεγάλο αριθμό ασθενών με αναιμία χρόνιας νόσου.

Η ανθρώπινη Epo έχει μοριακό βάρος 34.000 Daltons όπως προσδιορίστηκε ηλεκτροφορετικά και περιέχει 30% υδατάνθρακες από τους οποίους το 11% είναι σιαλικό οξύ.

Το γονίδιο της Epo βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7 έχει 5,4Kb DNA και περιέχει 4 ιντρόνια και 5 εξόνια με 193 αμινοξέα. Η rHuEpo έχει μ.β. 30.000 Da και περιέχει 39% υδατάνθρακες.

Η ενεργός ανθρώπινη Epo είναι γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη. Η μη γλυκοζυλιωμένη Epo που παράγεται από βακτηρίδια είναι μη ενεργός γιατί αποβάλλεται γρήγορα από το ήπαρ.

Στην εμβρυϊκή μορφή η αιμοποίηση που γίνεται στον σάκκο του Yolk είναι ανεξάρτητη της Epo. Αργότερα η Epo παράγεται από τα επιθηλιακά κύτταρα του ήπατος, ενώ η παραγωγή από τους νεφρούς γίνεται πιο αργά κατά την νεογνική περίοδο. Ο Jacobsen το 1957 υποστήριξε ότι η Epo παράγεται στους νεφρούς σαν απάντηση της νεφρικής υποξίας. Η υπόθεση αυτή ενισχύθηκε από την παρουσία mRNA στον υποξικό νεφρό του ποντικού (Schuster 1987), ενώ στην ίδια μελέτη φάνηκε ότι το mRNA παράγεται από την σωληναριακή και όχι την σπειραματική νεφρική λειτουργία. Το 1988 ο Koury και ο Lacombe έδειξαν ότι τα παραγωγικά κύτταρα ήταν διάμεσα κύτταρα μεταξύ των νεφρικών σωληναρίων σε στενή εγγύτητα με τα εγγύς σπειραμένα σωληνάκια, κυρίως στον νεφρικό φλοιό και ότι εμφάνιζαν χαρακτηριστικές περισωληναριακών τριχοειδικών ενδοθηλιακών κυττάρων, τα παραπάνω βρέθηκαν με *in situ hybridization*. Το 1990 (Maxwell) απομονώθηκε Epo από σωληναριακά κύτταρα με ανοσοϊστοχημικές τεχνικές. Μέχρι σήμερα ο ακριβής εντοπισμός της θέσης της παραγωγής της Epo σε φυσιολογικούς νεφρούς δεν κατέστη δυνατός με *in situ hybridization* λόγω χαμηλών επιπέδων έκφρασης του mRNA της Epo. Τα περισσότερα δε πειράματα έγιναν σε ποντικούς και έχει βρεθεί ότι η ανθρώπινη Epo έχει συγγένεια με την Epo του ποντικού και είναι δραστική σε αυτά.

Η πρόκληση αναιμίας πειραματικά προκαλεί παραγωγή Epo μέσα σε μια ώρα και η εμφάνιση mRNA της Epo στα νεφρά αυξάνει 500 - 1000 φορές πάνω από τις φυσιολογικές τιμές ενώ στο ήπαρ επέρχεται αύξηση σε ποσοστό 7%. Οι αλλαγές στο mRNA της Epo συνοδεύονται από αύξηση της Epo στον όρο που δείχνει την *de novo* σύνθεση της Epo παρά την

έκκριση αποθηκευμένης ορμόνης, η αύξηση του mRNA της Epo οφείλεται σε μεταγραφή.

Σε διάφορες σειρές ηπατικών κυττάρων έχει δείχθει ότι η Epo παράγεται σαν απάντηση της υποξίας ή σε διέγερση με CO, εξασφαλίζοντας ένα σύστημα μελέτης των κυτταρικών μηχανισμών που ελέγχουν την έκφραση του γονιδίου της Epo (Coldberg 1987). Ο Beru (1987) χορηγώντας Co i.v. προκάλεσε συσσώρευση mRNA σε νεφρούς και ήπαρ ποντικών. Αν και τα μακροφάγα αποδείχθηκε (1982) ότι εκφράζουν το mRNA της Epo, το γεγονός ότι τα κύτταρα του ήπατος προκαλούν αύξηση του mRNA στο ήπαρ, υποδεικνύει ότι το ηπατοκύτταρο είναι υπεύθυνο για την συσσώρευση mRNA στο ήπαρ. Ο Coldberg (1988) χρησιμοποιώντας κύτταρα του ανθρώπινου ηπατώματος (Hep 3B) έδειξε ότι μια πρωτεΐνη - αίμη υπεσέρχεται στον οξυγονο-ευαίσθητο μηχανισμό που ελέγχει την έκφραση της Epo και προκαλεί την μεταγραφή και την έκφραση του γονιδίου της Epo.

Αίμη - Πρωτεΐνη oxy-state deoxy-state και το αντίστροφο. CO.

Το σημείο μεταγραφής βρίσκεται στο 3' τέλος του γονιδίου της Epo και προκαλεί αμέσως υποξία αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της Epo. Το σημείο αυτό ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων της υπεροικογένειας των πυρηνικών ορμονών.

Φαίνεται ότι η υποξία δρα πάνω στην έκφραση και μεταγραφή του γονιδίου μέσω ενός ή περισσοτέρων διαβιβαστών.

Ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου η υποξία προκαλεί σύνθεση Epo παραμένει άγνωστος. Πιθανολογείται ελευθέρωση προσταγλανδίνης E, αύξηση νεφρικού κυκλικού AMP και ελάττωση ενδοκυττάρου ασβεστίου που προκαλούν αύξηση παραγωγής της Epo.

Η χαμηλή πίεση οξυγόνου στη φλοιώδη μοίρα των ουροφόρων σωληναρίων στέλνει σήμα στα περισωληναριακά κύτταρα μέσω της deoxygenation της αίμης - πρωτεΐνης. Μέσω ειδικών υποδοχέων των ερυθρών του μυελού των οστών η Epo διεγείρει την ερυθροποίηση. Η αύξηση των ερυθρών συνεχίζεται μέχρι να υποχωρήσει η υποξία (αρνητικό feedback). Οι πιθανές αιτίες υποξίας είναι:

1. Χαμηλή περιεκτικότητα οξυγόνου της ατμόσφαιρας. 2. Ελαττωμένη μεταφορά οξυγόνου λόγω μικρού αριθμού ερυθρών. 3. Ελαττωμένη ελευθέρωση οξυγόνου στους ιστούς και 4. αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου.

Γενικά η έκφραση Epo και η παραγωγή Epo γίνεται στους νεφρούς, στο ήπαρ, στα μακροφάγα και πιθανόν και σε άλλα όργανα.

Σε παθολογικές καταστάσεις έκτοπη παραγωγή Epo έχουμε συνήθως σε αιμαγγειοβλάστωμα εγκεφάλου, λειομείωμα μήτρας και καρκίνωμα του νεφρού, ενώ λιγότερο συνήθως είναι η παραγωγή Epo σε καρκίνο επινεφριδίων, ηπάτωμα και φαιοχρωμοκύττωμα. Οι φυσιολογικές τιμές της Epo είναι 4-26mU/ml. Υπάρχει σχέση μεταξύ Ht και Epo χωρίς να είναι απόλυτη. Η μέτρηση που γίνεται συνήθως είναι ανοσοενζυματική και όχι βιολογική έτσι σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια οι τιμές που βρίσκουμε είναι υψηλότερες σε σχέση με την αναιμία τους. Οι χαμηλές τιμές της Epo και οι φυσιολογικές σε ύπαρξη αναιμίας δείχνουν αδυναμία

απόκρισης στην Epo, ενώ οι υψηλές τιμές δεν είναι καθοριστικές για την βαρύτητα της αναιμίας και ακόμη για την απόκριση στη θεραπεία με Epo.

### Φυσιολογική δράση της Epo

#### Αιμοποίηση

Τα κύτταρα του αίματος (ερυθρά, λευκά, αιμοπετάλια) έχουν περιορισμένο χρόνο ζωής γι' αυτό καθημερινά παράγονται από το μυελό των οστών 200 εκατομμύρια ερυθρά και 100 εκατομμύρια λευκά αιμοσφαίρια.

Ολα προέρχονται από το μητρικό αρχέγονο πολυδύναμο κύτταρο (stem cell) που έχει την ικανότητα να αυτοπαράγεται αλλά και να διαφοροποιείται προς κύτταρα της κάθε σειράς. Η αιμοποίηση στηρίζεται στην διαφοροποίηση των κυττάρων, στην επίδραση του μικροπεριβάλλοντος και στους χημικούς παράγοντες.

Η ερυθρά σειρά από πολυδύναμο αρχικό κύτταρο γνωστό σαν (CFUs) colonyforming units που βρίσκεται στο μυελό των οστών, το παραπάνω μετατρέπεται σε BFU - E Burst - forming unit erythroid, στη συνέχεια σε CFU-E, που ωριμάζει σε ερυθροβλάστη (προερυθροβλάστη, ερυθροβλάστη και ώριμο ερυθρό) πάνω στα CFUs, BFU-E και CFU-E δρουν πολλοί αυξητικοί παράγοντες όπως: IL-3, GM-CSF, Epo, Θρομβοποιητίνη, SCF. Η Epo δρα στα BFU-E αλλά κυρίως στα CFU-E και στα κύτταρα που προέρχονται από αυτή τη σειρά (ερυθροβλάστες, μέχρι δικτυοερυθροκύτταρο, όχι στο ώριμο ερυθρό που δεν έχει πυρήνα ή υπολείματα πυρήνος).

Η κύρια δράση της Epo εξασκείται πάνω στην BFU-E σειρά και επιταχύνει τον χρόνο ωρίμανσης των ερυθρών, αλλά και χωρίς την ύπαρξη της Epo τα κύτταρα BFU-E αποθνήσκουν.

Η Epo δρα πάνω στα κύτταρα μέσω υποδοχέων της ερυθροποιητίνης, οι οποίοι είναι πολλοί περισσότεροι στην σειρά CFU-E από την σειρά BFU-E. Οι υποδοχείς αυτοί είναι ειδικοί για την ερυθροποιητίνη και είναι απαραίτητοι για την δράση της, και υπάρχουν υποδοχείς Epo υψηλής και χαμηλής συγγενείας.

Οι υποδοχείς Epo έχουν εξωκυττάριο και ενδοκυττάριο τμήμα και το γονίδιο τους βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19 και μ.β. = 55000Da. Η Epo ενώνεται με τους υποδοχείς εισέρχεται ταχέως στο κύτταρο και η ίδια αποδομείται χωρίς να είναι γνωστό αν το ίδιο συμβαίνει με τους υποδοχείς της Epo.

Λίγα είναι γνωστά σχετικά με τον μηχανισμό του συμπλέγματος Epo+υποδοχείς Epo. Η ένωση Epo - υποδοχέων ενεργοποιεί μία τυροσινική κινάση και αρχίζει πιθανόν η βιολογική δράση της Epo.

Πάντως το μόριο της κινάσης δεν υπάρχει στους υποδοχείς της Epo.

Η ένωση Epo+υποδοχείς Epo πιθανόν προκαλεί ταχεία φωσφορυλίωση και διφωσφορυλίωση σε ένα αριθμό διαφορετικών πρωτεϊνών μεταξύ αυτών της τυροσίνης και της σερίνης. Επίσης έχει σχέση με την Raf-1 πρωτεΐνη που χρειάζεται για την ωρίμανση των ερυθρών. Πιθανόν ενεργοποιεί το gas πρωτοογκογονίδιο. Αυξημένοι υποδοχείς ερυθροποιητίνης ανευρίσκονται στην ερυθρολευχαιμία γι' αυτό η χορήγηση Epo μπορεί να βελτιώσει τη νόσο.

Με την μέθοδο PCR έχουν βρεθεί σε φυσιο-

λογικά κύτταρα του μυελού των οστών τρεις τύποι των υποδοχέων της ερυθροποιητίνης που πιθανόν παίζουν ρόλο στην ωρίμανση αλλά και στον προγραμματισμένο θάνατο των ερυθρών.

Στο κύτταρο η Ερο προκαλεί αλλαγές στο ασβέστιο του κυττάρου, αδρανοποιεί την σύνθεση ολικού RNA, συμμετέχει στο μεταβολισμό της γλυκόζης και του σιδήρου, στη μεταγραφή των α και β αλυσίδων, στην έκφραση των υποδοχέων της τρανσφερίνης, στη σύνθεση της Hb και των πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης brands 3 και 4.1. Όλα τα παραπάνω καταλήγουν στην αύξηση της ερυθροποίησης, η οποία ευνοείται και από την αυξημένη παραγωγή και επιβίωση CFU-E. Η απουσία Ερο σε υπάρχουσα μάζα ερυθρών αυξάνει τον προγραμματισμένο θάνατο (apoptosis) των ερυθρών.

#### **Χορήγηση Ερυθροποιητίνης**

Η rHuEpo χορηγείται είτε υποδόρια είτε ενδοφλέβια. Προτιμάται η υποδόρια χορήγηση γιατί έχει παρατεταμένο χρόνο δράσης και καλύτερη ανταπόκριση.

#### **Παρενέργειες**

Οι συνήθεις παρενέργειες από την χρήση rHuEpo είναι υπέρταση, κνησμός, πυρετός, κεφαλαλγία, αλλεργική αντίδραση και θρομβωτικά επεισόδια.

#### **Βιβλιογραφία**

1. Ersely A. Humoral regulation of red cell produc-

tion. *Blood* 1953;8:349 - 57

2. Koury MJ, Bondurant MC. The mechanism of erythropoietin action. *Am J Kidney Dis* 1991;14 (4, suppl1):20-3.

3. Lacombe C, Da Silva J-L, Bruneval R et al. Erythropoietin: Sites of synthesis and regulation of secretion. *Am J Kidney Dis* 1991;14 (4 suppl1):14 - 9.

4. Kurtz A, Eckardt KU. Renal function and oxygen sensing. In: *Erythropoietin*. Baltimore / London: Hopkins Press, 1991;79 - 98.

5. Goldberg AM, Dunning SP, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 1988;242: 1412-5.

6. Garo J, Schuster S, Ramirez S. The regulation of erythropoietin gene expression. In: *Erythropoietin*. Baltimore / London: Hopkins Press, 1991;53-64.

7. Spivak JL. Recombinant human erythropoietin and the anemia of cancer. *Blood* 1994;84(4):9797-1004.

8. Jacobs K, Schoemaker C, Rudersdorf R et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 1985;313:806-10.

9. Spovak JL, Cotes PM. The pharmacokinetics and metabolism of erythropoietin. In: *Erythropoietin*. Baltimore / London: Hopkins Press, 1991;162-83.