

LAVORO ORIGINALE

Trattamento della forma diffusa di sclerosi sistemica con trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche: esperienza su due casi

The treatment of diffuse cutaneous systemic sclerosis with autologous hemopoietic stem cells transplantation (HSCT): our experience on 2 cases

I. Miniati¹, R. Saccardi², F. Pagliai², S. Guiducci¹, A. Bosi², S. Guidi², S. Urbani²,
A. Tyndall³, M. Matucci Cerinic¹

¹Medicina Interna I e Reumatologia, Università di Firenze;

²Unità Trapianti Midollo Osseo, Osp. Careggi, Firenze;

³Dipartimento di Reumatologia, Università di Basilea, Svizzera

SUMMARY

Objectives: Autologous hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is a treatment option which may be considered for severe diffuse cutaneous systemic sclerosis (dcSSc) patients not responding to cyclophosphamide (CY). We present two cases of dcSSc not responding to CY >10 g who were successfully treated with HSCT.

Patients and methods: Two dcSSc patients were unresponsive to monthly i.v. pulse of CYC (0.75 g m²). Both patients had significant reduction of DLCO and mild-moderate pulmonary hypertension and HSCT was considered due to the rapid progression of the disease. Following informed consent and ethics committee approval, HSCT was performed. Mobilisation was performed with CY 4g/m² and recombinant human granulocyte colony stimulating factor (rHu G-CSF) followed by a successful apheresis (CD34+ cells, >7X10⁶). Conditioning regimens were: CY 100mg/kg body weight plus thiotepa 10 mg/kg in the first patient and CY 200 mg/kg in the second. Both graft products were CD34 selected. No arrhythmias occurred during the procedure and no other severe side effects were observed during hospitalisation.

Results: Follow up: Patients underwent a monthly follow up with physical examination, pulmonary function tests and echocardiography every 3 months. Chest CT has been performed 6 months post transplantation. The following was observed: skin score (from 40 to 10 for the first patient and from 38 to 12 for the second one), LVEF and pulmonary function remained stable, PAP decreased from 45 mmHg to 35 mmHg and from 40 to 32 mmHg. No late complications or cardiac toxicity was observed.

Conclusion: These two dcSSc cases demonstrate that HSCT may be successfully performed without serious side effects in cases in whom despite a cumulative CY dose was ineffective. This suggests an "immunological threshold" effect which may be exploited in other severe, therapy refractory autoimmune cases.

Reumatismo, 2005; 57(4):277-282

La sclerosi sistemica (SSc) è una patologia infiammatoria cronica del mesenchima (connettive), ad eziologia ignota, caratterizzata da alterazioni funzionali e organiche del microcircolo e da anomalie della funzione immunitaria, che compor-

tano l'attivazione fibroblastica permanente e l'accumulo di tessuto fibroso nella cute e numerosi organi interni ed apparati che può esitare in una grave disabilità funzionale e determinare un'insufficienza dei parenchimi che può condurre a morte il paziente entro pochi anni dalla sua insorgenza (1). Nelle forme più gravi di malattia, con andamento rapidamente progressivo, la mortalità entro 5 anni dall'esordio, secondaria all'interessamento d'organo, è stimata intorno al 40-50% (2, 3). L'incompleta conoscenza dei meccanismi patogenetici di in-

Indirizzo per la corrispondenza:

Dr.ssa Irene Miniati
Medicina interna I e Reumatologia
Università di Firenze
Viale Pieraccini, 18 - 50139 Firenze
E-mail: i.miniati@tin.it

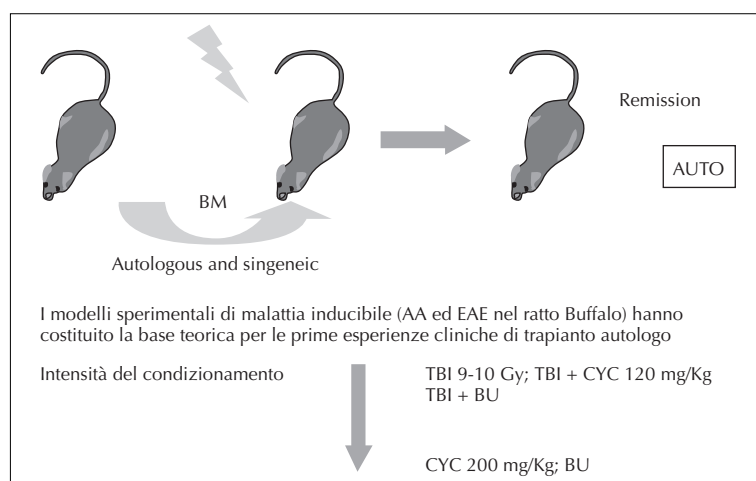


Figura 1 - Modelli sperimentali di trapianto autologo nelle malattie autoimmuni.

nescio e di mantenimento delle alterazioni tissutali preclude la via a possibili terapie eziologiche. Al momento non sono presenti terapie in grado di bloccare l'evoluzione della malattia e di far regredire la fibrosi. Il trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche come potenziale terapia per le malattie autoimmuni è stato suggerito sulla base di studi su modelli sperimentali di malattia inducibile (Fig. 1) nella quale si otteneva una remissione di malattia dopo il trattamento (4). Inoltre è stato osservato che, pazienti affetti da malattie autoimmuni che venivano sottoposti a trapianto di midollo sia eterologo sia, più recentemente, autologo per neoplasie ematologiche o tumori solidi, andavano incontro ad una remissione della malattia autoimmune (5-7). Esiste un gruppo di patologie refrattarie e con tendenza alla recidiva per le quali è stato coniato da alcuni autori il termine di "malattie autoimmuni maligne" per le quali c'è un'indicazione alla terapia immunoablattiva con l'intento di distruggere totalmente o parzialmente il sistema autoimmune aberrante (8). La ricostituzione immunologica a partire da poche cellule staminali emopoietiche autologhe consente la ricapitolazione dell'ontogenesi immunitaria con l'acquisizione di self-tolerance: se i geni che comportano l'induzione della malattia sono scarsamente rappresentati, lo stato di tolleranza non verrà facilmente infranto (9). Il trapianto autologo ha dimostrato avere una mortalità inferiore rispetto al trapianto allogenico, rischio considerato peraltro accettabile per le forme di malattie autoimmuni gravi, nel contesto dei potenziali benefici di una remissione di malattia a lungo termine ed una prevenzione del danno tissutale progressivo. Descriviamo due casi di sclerosi sistemica diffusa rapidamente progressiva, che non

avevano risposto a terapia immunosoppressiva con ciclofosfamide e sono stati sottoposti con successo a trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche.

CASI CLINICI

Due pazienti, un maschio di 64 anni (caso 1) e una femmina di 50 (caso 2), sono stati seguiti dall'esordio di malattia presso il nostro dipartimento. Il fenomeno di Raynaud era insorto nel primo paziente nel 1998 e nel secondo nel 2000; da allora entrambi avevano sviluppato in pochi mesi una forma cutanea diffusa di SSc con coinvolgimento polmonare. Entrambi, in seguito al riscontro di vetro smerigliato alla Tc torace ad alta risoluzione (HRCT) e di alveolite linfocitaria al lavaggio broncoalveolare (BAL), erano stati sottoposti ad infusione endovenosa mensile con 750 mg di ciclofosfamide per 6 mesi seguito da somministrazione di farmaco per os al dosaggio di 50 mg/die. Non si era osservato in entrambi alcun miglioramento del coinvolgimento cutaneo; il danno polmonare risultava invece peggiorato in entrambi con segni di fibrosi alle basi polmonari evidenziati alla HRCT del torace. La rapida progressione della malattia nonostante la terapia in atto suggeriva un trattamento mediante trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche, che è stato effettuato, previo consenso informato ed approvazione del comitato etico.

Valutazione basale dei pazienti

Alla visita di screening i pazienti mostravano un esteso interessamento cutaneo valutato mediante modified Rodnan Skin Score (mRSS) rispettiva-

mente di 40/51 e 38/51. In entrambi era presente melanoderma su volto, tronco ed arti. La mobilità articolare era marcatamente ridotta a livello di tutti i distretti interessati. L'indice di disabilità, valutato mediante il questionario HAQ, era rispettivamente di 1,6 ed 1,3: l'estensione dell'interessamento cutaneo aveva determinato in entrambi i pazienti un'importante disabilità nello svolgimento delle comuni attività quotidiane. La videocapillaroscopia mostrava uno scleroderma pattern di tipo "late". La dispnea che i pazienti lamentavano erano stata classificata come classe III NYHA. All'esame obiettivo del torace erano presenti crepitii basali bilateralmente. Le prove di funzionalità respiratoria mostravano una sindrome restrittiva con riduzione del DLCO significativa (40% nel caso 1 e 38% nel caso 2). Alla HRCT del torace era presente fibrosi ad entrambe le basi. Entrambi i pazienti presentavano ipertensione polmonare lieve-moderata, valutata mediante ecocolordoppler cardiaco: il gradiente Vd-Ad era nel caso 1 di 45 mmHg e nel caso 2 di 40 mmHg. La frazione di eiezione ventricolare sinistra risultava nella norma in entrambi. L'ECG dinamico secondo Holter mostrava la presenza di sporadica extrasistolia sopraventricolare e ventricolare monomorfa ma non si evidenziavano episodi di tachicardia ventricolare. La funzione renale risultava nella norma nei due pazienti con valori di clearance della creatinina di 163 ml/min nel caso 1 e di 93 ml/min nel caso 2. Non erano presenti anomalie nel sedimento urinario né proteinuria. In entrambi i pazienti il quadro laboratoristico era caratterizzato dalla positività degli anticorpi anti-nucleo ad alto titolo ed Scl-70 e da una moderata elevazione degli indici di flogosi. La biopsia osteomidollare effettuata prima del trapianto mostrava una lieve ipoplasia midollare nel caso 1 mentre risultava nella norma nel caso 2.

Mobilizzazione

Prima di eseguire la mobilizzazione è stato posizionato un catetere venoso centrale tipo Groshong nella vena succlavia. La mobilizzazione è stata effettuata mediante l'utilizzo di ciclofosfamide 2 g/m² somministrata per via endovenosa in un'ora per 2 giorni consecutivi. Al fine di prevenire la cistite emorragica è stata effettuata iperidratazione, alcalinizzazione delle urine e somministrato MESNA. A partire da 5 giorni successivi dal termine delle infusioni di ciclofosfamide è stato somministrato filgrastim (G-CSF) per via sottocutanea alla dose di 5 mcg/kg/die per 5 giorni consecutivi. L'emocromo veniva controllato giornalmente.

Staminaferesi

È stata effettuata il giorno successivo dal termine della somministrazione di Filgrastim mediante accesso venoso a due vie utilizzando un separatore cellulare a flusso continuo. È stato ottenuto un quantitativo di cellule CD34+ sufficiente mediante due aferesi: 5.85x10⁶ nel caso 1 e 3.93x10⁶ nel caso 2. Le cellule sono state quindi raccolte e criopreservate.

Condizionamento

È iniziato dopo 6 settimane a partire dalla staminaferesi, previa esecuzione dell'ecocardiogramma che confermava una frazione di eiezione nella norma in entrambi i pazienti in assenza di alterazioni della cinetica segmentaria. Nel caso 1 è stato utilizzato un regime di condizionamento con CYC 50 mg/kg/die per via endovenosa per 2 giorni consecutivi seguita da Thiotepa 5 mg/kg/die i die giorni successivi. Nel caso 2 è stata utilizzata CYC al dosaggio di 25 mg/kg/die per 4 giorni consecutivi per via endovenosa. La scelta di due diversi regimi di condizionamento è stata legata alla prevenzione di un possibile effetto cardiотossico legato alla CYC ad alte dosi. Tuttavia l'analisi del data base dell'EBMT autoimmunity working party non avrebbe evidenziato casi di decesso per complicanze cardiache legate al trattamento con ciclofosfamide (10). È stata somministrata ATG in entrambi i pazienti nei giorni -3, -2 e -1 alla dose di 2.5 mg/kg/die per via endovenosa. Durante il periodo di condizionamento non si sono verificati eventi avversi.

Reinfusione

Al giorno 0 le cellule CD 34+ sono state scongelate e reinfuse nel numero di 5,85x10⁶/Kg nel caso 1 e 3.93x10⁶/Kg nel caso 2, sotto monitoraggio cardiaco. Non si sono verificati eventi aritmici durante la reinfusione. L'ecocolordoppler cardiaco eseguito dopo il trapianto autologo ha mostrato una frazione di eiezione stabile, in assenza di segni di disfunzione diastolica ed anomalie della cinetica di parete. L'attecchimento del midollo è avvenuto in undicesima giornata con il raggiungimento di un numero di polimorfonucleati >500/fl e di piastrine >20.000/mm³. Uno dei due pazienti ha manifestato febbre >38° in quinta giornata di durata di 3 giorni, senza evidenza clinica di processi infettivi. Entrambi i pazienti sono stati dimessi in quattordicesima giornata con emocromo nei limiti della norma. Al momento della dimissione era già evidente un miglioramento del quadro cutaneo.

Follow-up

È stata effettuata una profilassi antivirale ed antimicotica per 3 mesi ed antibiotica per 6 mesi. Nel primo paziente non si sono mai verificati eventi infettivi.

Il secondo invece in cinquantesima giornata dal trapianto autologo è stato di nuovo ricoverato per la comparsa di febbre $>38^{\circ}$. L'Rx torace non mostrava segni di addensamenti parenchimali con caratteri di attività, l'urinocoltura su 3 campioni era risultata nella norma. La PCR per CMV su siero e sangue ha dato esito positivo e pertanto è stata somministrata terapia con Ganciclovir per 6 giorni. Dopo due giorni di terapia antivirale la febbre si è risolta.

Non si è osservata nessun altro evento infettivo durante il follow up. I pazienti si sono sottoposti mensilmente al controllo dell'emocromo e degli esami ematochimici di routine. Ogni 3 mesi sono state effettuate le prove di funzionalità respiratoria, l'ecocolordoppler cardiaco con valutazione della pressione polmonare e la valutazione della funzione renale completa mediante clearance della creatinina. Ogni 6 mesi sono stati effettuati la TC torace ad alta risoluzione e l'ECG holter.

RISULTATI

Dopo 2 anni di follow up entrambi i pazienti hanno mostrato un netto miglioramento del quadro cutaneo. Lo skin score si è ridotto da 40 a 10 nel caso 1 e da 38 a 11 nel caso 2. La funzione polmonare è rimasta stabile, con lieve miglioramento del DLCO in entrambi i pazienti. La pressione polmonare, valutata mediante ecocolordoppler cardiaco, si è ridotta in entrambi i pazienti: il gradiente Vd-Ad ha raggiunto i 32 mmHg nel caso 1 e 35 mmHg nel caso 2.

La frazione di eiezione è sempre rimasta stabile. Nessuno dei due pazienti lamentava più dispnea nello svolgimento delle comuni attività quotidiane. Non si sono verificati eventi infettivi degni di nota durante il follow up. I due pazienti non assumono più farmaci immunosoppressori. È stata mantenuta solo terapia con vasodilatatori: PGE1 per somministrazione endovenosa settimanale nel caso 1 e calcio antagonisti diidropiridinici per os nel caso 2.

Tuttavia entrambi riferiscono una notevole riduzione della frequenza di insorgenza, dell'intensità e della durata del fenomeno di Raynaud. I risultati sono riportati nella tabella I.

DISCUSSIONE

I due pazienti descritti erano affetti da una forma grave e rapidamente progressiva di sclerosi sistemica variante cutanea diffusa. Il coinvolgimento d'organo, in particolar modo del polmone, in una fase precoce di malattia, aveva in un primo momento suggerito un trattamento immunosoppressivo con ciclofosfamide, che si è tuttavia rivelato inefficace in entrambi i casi, dal momento che la malattia era progredita sia sul versante cutaneo sia degli organi interni. Attualmente esiste un'indicazione al trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche nelle forme di malattia precoci, diffuse e rapidamente progressive, in cui tuttavia la funzionalità degli organi interni è ancora abbastanza preservata da tollerare un trattamento aggressivo con chemioterapia ad alte dosi. Nei pazienti che vengono sottoposti a tale procedura, è importante effettuare uno stretto monitoraggio della funzione di tutti gli organi, in modo particolare la funzione cardiaca e renale. La ciclofosfamide, farmaco che viene più comunemente usato nella fase di mobilitazione e condizionamento nei pazienti con SSc, si caratterizza per un effetto cardiотossico acuto e dose-dipendente. In letteratura sono stati riportati eventi avversi gravi e talvolta fatali legati all'utilizzo di ciclofosfamide in corso di autotrapianto di cellule staminali (11); sono stati osservati scompenso cardiaco congestizio, versamento pericardico, aritmie ventricolari (12-14). Il cuore è un organo bersaglio della SSc, il cui coinvolgimento si manifesta comunemente con fibrosi "a macchia di leopardo" sul tessuto miocardio e di conduzione determinando l'insorgenza di aritmie, spesso del tutto asintomatiche, che possono portare a morte improvvisa il paziente (15). Per tale motivo è importante effettuare un attento monitoraggio della funzione cardiaca mediante ecocolordoppler ed una valutazione del rischio aritmico prima di sottoporre pazienti con SSc ad una terapia immunoablattiva con ciclofosfamide. I due pazienti sono stati valutati dal punto di vista cardiaco secondo le linee guida proposte dal "consensus meeting" EBMT/EULAR di novembre 2002 (10). All'ecocolordoppler cardiaco entrambi presentavano buona cinetica cardiaca e frazione di eiezione prima della procedura, reperti che sono stati confermati durante la procedura di condizionamento, dopo la reinfusione di cellule CD 34+ e durante tutto il periodo di follow up. L'ECG dinamico secondo Holter mostrava in entrambi la presenza di rara extrasistolia sopraventricolare e ventricolare monomor-

Tabella I

Parametri	Paziente 1			Paziente 2		
	basale	1 anno	2 anni	basale	1 anno	2 anni
Modified Rodnan skin score	40	15	10	38	15	12
DLCO	38%	42%	44%	36%	42%	42%
Gradiente Vd-Ad (mmHg)	45	38	32	40	32	30
Frazione di eiezione	59%	58%	60%	57%	55%	58%
Indice di disabilità (SHAQ)	1,6	0,8	0,5	1,3	0,8	0,6
Clearance creatinina (ml/min)	163	102	93	140	113	97

fa. La procedura di condizionamento e di reinfusione di cellule CD 34+ è stata effettuata sotto monitoraggio cardiaco, durante il quale non si sono verificati eventi aritmici. È stata effettuato anche un controllo della funzione renale mediante la clearance della creatinina, al fine di valutare il rischio di una crisi renale acuta, aggravata anche dalla iperidratazione che si effettua durante il trapianto. Nei due pazienti sono stati inoltre somministrati ACE inibitori a basse dosi. Durante la procedura di trapianto nei due pazienti non è mai verificato un aumento dei livelli di creatinina sierica e la clearance della creatinina si è mantenuta nella norma durante tutto il follow up. I risultati ottenuti sull'andamento della malattia dei due pazienti dopo l'autotrapianto di cellule CD 34+, sono stati soddisfacenti dal punto di vista dell'impegno cutaneo. La

riduzione dello skin score osservata fin dalle prime fasi immediatamente successive alla procedura, ha permesso ai due pazienti un buon recupero funzionale nello svolgimento delle comuni attività quotidiane, dato peraltro confermato dalla netta riduzione dell'indice di disabilità valutato mediante il questionario HAQ (vedi tabella I). Inoltre la riduzione della pressione polmonare ha migliorato la dispnea e la tolleranza allo sforzo, contribuendo quindi anche essa ad un miglioramento della qualità di vita. La funzione polmonare, che prima del trapianto era peggiorata rapidamente nonostante la terapia immunosoppressiva, è rimasta stabile in questi due anni. I nostri dati pertanto indicano che il trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche può essere considerato come terapia di successo e privo di rischio nelle forme gravi di SSc.

RIASSUNTO

Il trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche è una strategia terapeutica che è stata utilizzata negli ultimi anni per il trattamento delle forme diffuse di sclerosi sistemica (dSSc) con andamento rapidamente progressivo. Vengono descritti due casi di pazienti con dSSc con impegno polmonare ed ipertensione polmonare lieve-moderata, che non avevano risposto alla terapia immunosoppressiva con ciclofosfamide e che sono stati trattati con successo mediante trapianto autologo di cellule staminali, ottenendo una stabilizzazione della funzione polmonare un netto miglioramento del quadro cutaneo e della qualità di vita. La procedura non è stata complicata da eventi avversi seri.

Parole chiave - Sclerosi sistemica, trapianto autologo, malattie autoimmuni.

Key words - *Systemic Sclerosis, autologous stem cells transplantation, autoimmune diseases.*

BIBLIOGRAFIA

1. Seibold JR: Scleroderma. Textbook of Rheumatology, eds. WN Kelly, E.D. Harris, S. Rudy, and C.B. Sledge 1215-44. WB, 1989.
2. Altman RD, Medsger TA Jr, Bloch DA, Michel BA. Predictors of survival in systemic sclerosis, *Arthritis Rheum* 1991; 34: 403-13.
3. Bryan C, Knight C, Black CM, Silman AJ. Prediction of five-year survival following presentation with scleroderma. Development of a simple model using three disease factors at first visit. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 26.
4. van Bekkum DW. Autologous Stem Cell Transplantation for Treatment of Autoimmune Diseases. *Stem Cells* 1999; 17: 172-8.
5. Jacobs P, Vincent MD, Martell RW. Prolonged remission of severe refractory rheumatoid arthritis following

- allogeneic bone marrow transplantation for drug-induced aplastic anaemia. *Bone Marrow Transplant* 1986; 1: 237-9.
6. Yin JA, Jowitt SN. Resolution of immune-mediated diseases following allogeneic bone marrow transplantation for leukaemia. *Bone Marrow Transplant* 1992; 9: 31-3.
 7. Roubenoff R, Jones RJ, Karp JE, Stevens MB. Remission of rheumatoid arthritis with the successful treatment of acute myelogenous leukemia with cytosine arabinoside, daunorubicin, and m-AMSA. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 1187-90.
 8. Fassas A, Passweg JR, Anagnostopoulos A, Kazis A, Kozak T, Havrdova E, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis. A retrospective multicenter study. *J Neurol* 2002; 249: 1088-97.
 9. Van Bekkum. Stem cell transplantation in experimental models of autoimmune disease. *J Clin Immunol* 2000; 20: 10-6.
 10. Saccardi R, Tyndall A, Coghlan G, Denton C, Edan G, Emdin M, et al. Consensus statement concerning cardiotoxicity occurring during haematopoietic stem cell transplantation in the treatment of autoimmune diseases, with special reference to systemic sclerosis and multiple sclerosis. *Bone Marrow Transplant* 2004; 34: 877-81.
 11. Appelbaum F, Strauchen JA, Graw Jr RG, Savage DD, Kent KM, Ferrans VJ, et al. Acute lethal carditis caused by high-dose combination chemotherapy. A unique clinical and pathological entity. *Lancet* 1976; 1: 58-62.
 12. Goldberg MA, Antin JH, Guinan EC, Rappaport JM. Cyclophosphamide cardiotoxicity: an analysis of dosing as a risk factor. *Blood* 1986; 68: 1114-8.
 13. Gottdiener JS, Appelbaum FR, Ferrans VJ, Deisseroth A, Ziegler J. Cardiotoxicity associated with high-dose cyclophosphamide therapy. *Arch Intern Med* 1981; 141: 758-63.
 14. Ayash LJ, Wright JE, Tretyakov O, Gonin R, Elias A, Wheeler C, et al. Cyclophosphamide pharmacokinetics: correlation with cardiac toxicity and tumor response. *J Clin Oncol* 1992; 10: 995-1000.
 15. Coghlan JG, Mukerjee D. The heart and pulmonary vasculature in scleroderma: clinical features and pathobiology. *Curr Opin Rheumatol* 2001; 13: 495-9.
 16. Lin AT, Clements PJ, Furst DE. Update on disease-modifying antirheumatic drugs in the treatment of systemic sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2003; 29: 409-26.