

# La granulocitoafèresi

**Luciano Cazzato, Claudia Citarella, Margherita Casanova, Angela Tullo, Maria Luigia Iaculli, Vincenza D'Onghia**

U.O.C. Medicina Trasfusionale, Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico di Bari, Bari

## GRANULOCYTAPHERESIS

**Abstract.** Inflammatory Bowel Diseases (IBD), whose main clinical syndromes are ulcerative colitis and Crohn's disease, are widespread conditions in Western countries. The etiology of IBD is multifactorial, involving both a genetic predisposition and an immunological dysregulation of the gut that activate the intestinal wall's inflammatory process. The pharmacological therapy available for IBD includes aminosalicylates, corticosteroids, immunosuppressants, cyclosporine, and biological agents; however, not all patients respond adequately to the therapy and most of these medications have a severe long-term toxicity. Since activated granulocytes and monocytes, together with proinflammatory cytokines and deregulated activity of the Regulatory T lymphocytes (Treg), seem to play a central role in the chronic enteric inflammation, granulocyte/monocyte adsorptive apheresis (GMA), an extracorporeal technique that removes activated leucocytes from the blood, may represent a safe and effective therapeutic tool. According to several multicentric studies on the therapeutic efficacy of GMA, this procedure is a safe and well-tolerated option for patients resistant to pharmacological therapy, or may be an adjunctive treatment to conventional therapeutic schemes, able to induce prolonged periods of clinical remission and a significant reduction of corticosteroids' intake. Further studies are required to better define the frequency of the treatment and the volume of blood to process, as well as the pharmacological therapy that is better associated with GMA and the possibility to treat other autoimmune diseases with this therapeutic tool.

**Key words:** Chronic inflammatory bowel diseases, Activated monocytes and granulocytes, Granulocyte/monocyte adsorptive apheresis, Corticosteroids

**Conflict of interest:** None.

**Financial support:** None.

Ricevuto: 31 Gennaio 2013; Accettato: 7 Marzo 2013

## La granulocitoafèresi

Nell'ultimo ventennio, le Malattie Infiammatorie Intestinali (IBD), le cui principali sindromi cliniche si identificano nel Morbo di Crohn e nella Rettocolite Ulcerosa, hanno mostrato una crescente incidenza, specialmente nei paesi industrializzati (1-3). L'eziologia di queste patologie non è del tutto chiarita ma sicuramente è di tipo multifattoriale, con una base genetica, alla cui comprensione stanno dando grande contributo lo studio di alcuni geni ritenuti cruciali nella patogenesi (4, 5) e una deregolazione dell'attività immunitaria a livello intestinale con alterazioni della flora microbica locale, che attiverebbero il processo infiammatorio della parete enterica. I leucociti e i monociti attivati infiltranti la parete intestinale, l'attività proinfiammatoria di citochine quali TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-2, IL-1A, IL-6 a livello locale e il calo del numero e dell'attività dei linfociti T reg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, dotati di un ruolo essenziale nella regolazione della funzione intestinale, appaiono cooperanti nell'innescare e nel mantenimento dell'infiammazione cronica che si traduce, a livello anatomopatologico, in lesioni carat-

teristiche coinvolgenti, nel Morbo di Crohn, l'intera parete intestinale con formazione di fistole e ascessi e, nella Rettocolite Ulcerosa, mucosa e sottomucosa della porzione distale del tubo digerente, con gravi turbe della funzione osmotica intestinale. Le manifestazioni cliniche conseguenti comprendono, quindi, diarrea profusa, melena, malassorbimento cronico, dolori addominali ricorrenti e una serie di manifestazioni sistemiche, tra cui episodi febbrili e artralgie, legati alla patogenesi autoimmune (6). Attualmente, i presidi terapeutici comprendono gli Aminosalicilati (mesalazina), con pochi effetti collaterali ma con un'efficacia clinica ancora discussa, i Corticosteroidi, terapia d'attacco delle forme moderate e severe, gravati di significativi effetti collaterali a lungo termine, gli Immunosoppressori (azatioprina, mercaptopurina), efficaci ma di uso limitato nella fase acuta, i Farmaci biologici (infliximab), molto efficaci (81% di risposta clinica) ma con seri effetti collaterali, e la Ciclosporina (7-11).

Al fine, dunque, di ridurre l'assunzione di farmaci gravati da una severa tossicità a lungo termine e di migliorare la qualità di vita dei pazienti, spesso giovani, tentando di mantenere

stabile la condizione di remissione clinica, è stato sperimentato un trattamento non farmacologico di supporto agli schemi terapeutici tradizionali, basato sull'afesi selettiva di granulociti e monociti/macrofagi attivati. Il razionale si basa sulla considerazione che le IBD sono malattie croniche, a carattere autoimmunitario, in cui citochine proinfiammatorie hanno un ruolo primario nello scatenare e nel perpetuare la malattia e l'osservazione che, in fase di malattia attiva, i neutrofili e i monociti circolanti, fonti principali di citochine proinfiammatorie, hanno valori al di sopra della media e si presentano in forma attivata, mentre, al contrario, i linfociti circolanti sono al di sotto dei valori medi.

Il dispositivo per granulocitoafesi ADACOLUMN, prodotto in Giappone alla fine degli anni '90 e introdotto in Europa nel 2001, consiste in un filtro costituito da circa 220 g di microsferi di acetato di cellulosa immerse in soluzione fisiologica, collegato a un circuito di linee ematiche che consente di processare, in regime di circolazione extracorporea (afesi veno-venosa), 1800 mL di sangue a un flusso di 60 mL/min nell'arco di 60 minuti.

Il circuito extracorporeo è collegato al paziente tramite due vene periferiche della fossa antecubitale e il processo coagulativo è impedito dalla somministrazione di eparina all'inizio della procedura (12, 13).

Il passaggio del sangue attraverso il filtro permette l'assorbimento selettivo dei granulociti/monociti attivati ai *carrier* della colonna, rendendo disponibili i siti di legame sulle Ig e sugli IC per i recettori Fc $\gamma$  presenti su neutrofili e monociti/macrofagi. Inoltre, è avviata l'attivazione del complemento, che genera frammenti tra cui C3a, C5a e le opsonine C3b/C3bi, a loro volta siti di legame per i recettori del complemento leucocitari CR1, CR2 e CR3, espressi comunemente da neutrofili e monociti/macrofagi. La procedura non ha mostrato effetti sugli elementi della serie eritrocitaria nel sangue periferico e risultano risparmiati i linfociti che non esprimono né i recettori del complemento (se si eccettuano dei piccoli *cluster* B, T e NK) né i recettori Fc $\gamma$  (a eccezione di alcuni ceppi B CD19+ e NK CD56+). Di conseguenza, la granulocitoafesi risulta essere l'unico presidio terapeutico che promuove la popolazione linfocitaria con un impatto marcato su condizioni di squilibrio immunologico. Inoltre, sono stati osservati una mobilitazione midollare di neutrofili immaturi CD10- privi di azione proinfiammatoria come conseguenza della deplezione periferica di neutrofili CD10+, vecchi e attivati, un marcato assorbimento selettivo dei monociti dal particolare fenotipo CD14+CD16+, a forte azione proinfiammatoria, e un notevole decremento dei livelli di citochine proinfiammatorie a fronte di un rilascio di sostanze ad azione protettiva nei confronti della risposta infiammatoria. Molto rilevante è, infine, l'osservazione di un aumento dei livelli circolanti del fenotipo CD4+CD25<sup>high+</sup>/FoxP3, nella cui attività sono implicati TGF $\beta$ e IL-1 e che rappresenta la cellula T regolatrice naturale (T<sub>reg</sub>) con un ruolo cruciale nella regolazione della funzione immunitaria intestinale ed esprime, nell'uomo, alti livelli del recettore per IL-2 (CD25) e del fattore di trascrizione FoxP3 (14, 15).

Studi sull'efficacia clinica della granulocitoafesi nelle IBD hanno dimostrato che, in generale, ha permesso una sospen-

sione o una significativa riduzione del dosaggio della terapia cortisonica nei pazienti trattati con questa categoria di farmaci e ha risparmiato l'introduzione in terapia ai pazienti che erano stati trattati con altri regimi terapeutici. I soggetti che rispondono meglio sembrano essere quelli con attività di malattia lieve/moderata, ai primi episodi clinici, mentre avrebbero meno benefici coloro che presentano lesioni mucose estese o profonde. Studi immunostochimici sul biopsie della mucosa colica hanno evidenziato una ridotta concentrazione di granulociti nella mucosa stessa, dove possono esacerbare le IBD (14). Il grado di integrità della mucosa al primo accesso rappresenterebbe, dunque, un elemento discriminante per il successo della terapia. I protocolli terapeutici più diffusi prevedono cicli di 5 sedute a cadenza settimanale. Un trattamento intensivo bisettimanale sarebbe più efficace nell'assicurare un buon tasso di remissione in tempi brevi, in particolare nel Morbo di Crohn (12). Il Registro Italiano di Afesi Terapeutica ha condotto uno studio osservazionale multicentrico coinvolgente 24 Unità di Gastroenterologia per un totale di 230 pazienti di ambo i sessi, età media 43.5 anni, affetti da Rettocolite Ulcerosa e Morbo di Crohn, di cui sono stati valutati l'*outcome* clinico e i parametri di laboratorio. I pazienti sono stati sottoposti a uno o più cicli di granulocitoafesi di cinque sedute l'uno e sono stati seguiti per una media di 8.7 mesi. A 12 mesi, nelle forme lievi, una remissione è stata ottenuta nel 90.9% dei pazienti con Rettocolite Ulcerosa e nel 72.2% di quelli con Morbo di Crohn. La percentuale cumulativa di risposta positiva (remissione + risposta clinica) nelle forme moderate a 12 mesi è stata, invece, rispettivamente dell'87.5% e del 69.2% e nessun parametro clinico o laboratoristico tra quelli analizzati (età, sesso, caratteristiche della malattia, fumo di sigaretta, anamnesi farmacologica, *CAI score*, valore dell'emoglobina, conta dei leucociti e VES) era associato in maniera indipendente con l'*outcome* clinico. La procedura risultava ben tollerata e non sono stati riportati significativi effetti collaterali (13).

Studi di metanalisi intrapresi su ampie popolazioni di pazienti hanno dimostrato che la risposta e il tasso di remissione erano significativamente migliori in coloro che associavano la granulocitoafesi alla terapia convenzionale rispetto al gruppo di controllo. Questo beneficio clinico si associava a pochi effetti collaterali rispetto alla terapia steroidea intensiva. Naturalmente l'esito è condizionato dalla gravità di partenza della patologia, con risposta e tasso di remissione varie volte più elevati in pazienti con patologia ad attività lieve-moderata. La remissione è più facile in pazienti *steroid-naive* che in pazienti trattati da lungo tempo o steroidei resistenti (12). In questo contesto, si inserisce anche la nostra esperienza condotta tra l'anno 2010 e 2012 su 24 pazienti affetti da IBD, per un totale di 245 procedure, in cui abbiamo osservato nel contesto del protocollo terapeutico una sospensione o, comunque, una riduzione dei cortisonici in tutti i pazienti e una remissione del 75% dopo il primo ciclo e del 92% dopo il secondo ciclo di trattamento.

Allo stato attuale, la granulocitoafesi si rivela un presidio terapeutico non farmacologico sicuro e ben tollerato, alternativo per i pazienti che non rispondono alle terapie convenzionali o che non le tollerano o aggiuntivo alle stesse per consentire al paziente di ridurre l'utilizzo di farmaci potenzialmente

tossici, con particolare riferimento ai cortisonici. Gli studi in corso sono finalizzati alla raccolta di dati che avvalorino quanto finora acquisito ma anche a una migliore definizione della terapia farmacologica da associare alla GMA, della frequenza di trattamento e dei volumi da trattare e dell'utilizzo in gruppi particolari di pazienti, come la popolazione pediatrica ed eventuali altre patologie autoimmuni quali l'artrite reumatoide, la malattia di Behcet e la psoriasi, in cui il coinvolgimento dei neutrofili sembra determinante nella patogenesi della flogosi articolare e delle caratteristiche lesioni cutanee, nell'infezione da HIV e HCV e nei pazienti neoplastici (14). L'acquisizione di sempre più significative evidenze scientifiche avvaloranti l'utilità, la sicurezza e l'utilizzo in diverse patologie su base autoimmune della granulocitoafesi potrebbe consentire anche una migliore definizione del rapporto costo/beneficio e un adeguamento, in particolare riferimento al nostro Paese, delle tariffe di prestazione ambulatoriale, con equa distribuzione su tutto il territorio nazionale.

### Riassunto

Rettocolite Ulcerosa e Morbo di Crohn, note come Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali, sono largamente diffuse nei paesi occidentali. L'eziologia è multifattoriale e comprende una predisposizione genetica e squilibri immunologici del tratto digerente che attivano il processo flogistico della parete intestinale. La terapia delle Malattie Infiammatorie Intestinali comprende aminosalicilati, cortisonici, immunosoppressori, ciclosporina e agenti biologici, farmaci gravati da una grave tossicità a lungo termine e da fenomeni di resistenza. Dal momento che granulociti e monociti attivati, insieme a citochine proinfiammatorie e alla deregolazione dell'attività dei linfociti T regolatori (T<sub>reg</sub>), hanno un ruolo cruciale nell'infiammazione cronica

intestinale, l'afesi selettiva dei monociti e dei granulociti, una tecnica che rimuove i leucociti attivati dal sangue in regime di circolazione extracorporea, potrebbe rappresentare un presidio terapeutico sicuro ed efficace. Vari studi multicentrici sull'efficacia terapeutica della granulocitoafesi hanno dimostrato che questa rappresenta un'opzione sicura per i pazienti resistenti alla terapia farmacologica oppure un trattamento ben tollerato in associazione con protocolli terapeutici tradizionali, capace di indurre periodi di remissione clinica prolungati e una significativa riduzione dell'assunzione di cortisonici. Ulteriori studi sono necessari per definire meglio la frequenza del trattamento, i volumi ematici da processare, la migliore terapia farmacologica da associare alla granulocitoafesi e la sua efficacia in altre patologie autoimmuni.

**Parole chiave:** Malattie infiammatorie croniche intestinali, Monociti e granulociti attivati, Granulocito/monocitoafesi selettiva, Cortisonici

**Dichiarazione di conflitto di interessi:** Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

**Contributi economici degli autori:** Gli Autori dichiarano di non aver ricevuto sponsorizzazioni economiche per la preparazione dell'articolo.

### Indirizzo degli Autori:

Dr. Luciano Cazzato  
Via Postiglione 44  
70126 Bari  
lucianocazzato@alice.it

### Bibliografia

- Hovde O, Moum AB. Epidemiology and clinical course of Crohn's disease: results from observational studies. *World J Gastroenterol* 2012; 18 (15): 1723-31.
- Qui X. Etiology of inflammatory bowel disease: a unified hypothesis. *World J Gastroenterol* 2012; 18 (15): 1708-22.
- Molodecky NA, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG. Challenges associated with identifying the environmental determinants of the inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 1792-9.
- Fan W, Maoqing W, Wangyang C, et al. Relationship between the polymorphism of TNFa-308 G>A and susceptibility to inflammatory bowel diseases and colorectal cancer: a meta-analysis. *Eur J Hum Genet* 2011; 19 (4): 432-7.
- Wang Z, Hu J, Fan R, Zhou J, Zhong J. Association between CD14 Gene C-260T polymorphism and Inflammatory Bowel Disease: a meta-analysis. *Plos One* 2012; 7 (9): e45144.
- Hanai H, Takeda Y, Eberhardson M, et al. The mode of actions of the Adacolumn therapeutic leucocytapheresis in patients with inflammatory bowel disease: a concise review. *Clin Exp Immunol* 2012; 163: 50-8.
- Vilela EG, Torres HO, Martins FP, Ferrari Mde L, Andrade MM, Cunha AS. Evaluation of inflammatory activity in Crohn's disease and ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2012; 18 (9): 872-81.
- Kozuch PL, Hanauer SB. Treatment of inflammatory bowel disease: a review of medical therapy. *World J Gastroenterol* 2008; 14 (3): 354-77.
- Keyashian K, Annunziata ML, Sakuraba A, Hanauer S. Management of inflammatory bowel disease: past, present and future. *Expert Rev Clin Immunol* 2012; 8 (4): 303-5.
- Iacucci M, de Silva S, Ghosh S. Mesalazine in inflammatory

- bowel disease: a trendy topic once again? *Can J Gastroenterol* 2010; 24 (2): 127-33.
11. Meier J, Sturm A. Current treatment of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2011; 17 (27): 3204-12.
  12. Habermalz B, Sauerland S. Clinical effectiveness of selective granulocyte, monocyte adsorptive apheresis with the Adacolumn device in ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2010; 55 (5): 1421-8.
  13. Passalacqua S, Ferraro PM, Bresci G, et al. The Italian Registry of Therapeutic Apheresis: granulocyte-monocyte apheresis in the treatment of inflammatory bowel disease. A multicentric study. *J Clin Apher* 2011; 26 (6): 332-7.
  14. Saniabadi AR, Hanai H, Fukunaga K, et al. Therapeutic leucocytapheresis for inflammatory bowel disease. *Transfus Apher Sci* 2007; 37 (2): 191-200.
  15. C Leitner G, Worel N, Vogelsang H. Selective Granulocyte and Monocyte Apheresis as a Non-Pharmacological Option for Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Transfus Med Hemother* 2012; 39: 246-52.
  16. Itagaki M, Saruta M, Iinuma T, Arihiro S, Kato T, Tajiri H. Infliximab-and immunosuppressant-resistant Crohn's disease successfully treated with adsorptive granulocyte apheresis combined with prednisolone. *Case Rep Gastroenterol* 2012; 6: 118-23.