

## LAVORO ORIGINALE

# Fattori di crescita e terapia delle ulcere cutanee correlate alla sclerosi sistemica: uso del G-CSF in una casistica di 26 pazienti\*

## *The treatment of skin ulcers in systemic sclerosis: use of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) in 26 patients*

Dilia Giuggioli, Rocco Magistro, Michele Colaci, Umberto Franciosi, Andrea Caruso, Clodoveo Ferri

*Cattedra e UO di Reumatologia, Università di Modena e Reggio Emilia*

### SUMMARY

**Objectives:** *To verify the effectiveness of G-CSF in the treatment of non-healing skin lesions in SSc patients.*

**Methods:** *26 SSc patients (23 F and 3 M, age 54 ±13,6 yrs) with skin ulcers were enrolled in a pilot study. Prior to the treatment with G-CSF, all ulcers failed to heal with conventional therapies carried out for a period of 1-5 years. All patients were treated with 5µg/kg G-CSF subcutaneously for 5 days. Healing time, quality of wounds, VAS and HAQ-DI were used to evaluate the efficacy of the treatment.*

**Results:** *An improvement of skin ulcers was observed in 24/26 patients; in particular, 22/26 wounds completely healed, 2/26 showed a partial healing, in only 2 patients skin ulcers did not change during the 6-month follow-up.*

*The quality of life improves as showed by VAS (from 88±13 to 55±28; p<.0001) and HAQ (from 2.12 ±0.45 to 1.28±0.30; p<.0001). The eradication of pathogens from the infected ulcers was also observed in 12/12 patients; while no adverse side effects related to G-CSF were recorded.*

*Our study suggests that G-CSF may be usefully employed in scleroderma skin ulcers refractory to conventional treatments.*

Reumatismo, 2006; 58(1):26-30

### INTRODUZIONE

La sclerosi sistemica (SSc) è una malattia cronica autoimmune, caratterizzata da un'abnorme produzione di tessuto connettivo nella cute e negli organi interni (cuore, polmone, tratto gastrointestinale e rene) e da una diffusa microangiopatia (1). Quest'ultima è caratterizzata da iperplasia dell'intima, ipotrofia della media e fibrosi dell'avventizia delle arterie muscolari di piccolo calibro e comporta ischemia ed ipoperfusione cronica dei

tessuti (1). Il decorso della malattia, nella maggior parte dei casi, viene complicato dalla comparsa di ulcere cutanee presenti, più frequentemente, nelle dita delle mani e dei piedi. Le lesioni sono molto dolorose e difficilmente rimarginabili e condizionano pesantemente la qualità di vita dei pazienti. Nei casi più gravi possono evolvere verso una vera e propria gangrena, tale da porre indicazione per un intervento chirurgico demolitivo.

Il nostro gruppo da anni si è interessato del trattamento delle ulcere cutanee associate alle malattie reumatiche connettivistiche e vasculitiche, ponendosi come obiettivi sia quello di guarire le lesioni cutanee (medicazioni avanzate, trapianti di cute, uso di fattori di crescita) che quello di alleviare il dolore.

Recenti studi di biologia molecolare hanno mostrato come vari fattori di crescita cellulare siano essenziali nei meccanismi di guarigione di una lesione cutanea; ciò ha fornito il razionale per il lo-

\*Lavoro premiato al XLI Congresso SIR, Stresa 2004

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott.ssa Dilia Giuggioli

Cattedra di Reumatologia

Università degli Studi di Modena

Via del Pozzo 71

41100 Modena

E-mail: diliagiuggioli@Hotmail.com

ro utilizzo nella terapia delle ulcere cutanee (2, 3). La produzione di grandi quantità ad elevata purezza, mediante tecniche del DNA ricombinante, di molecole capaci di promuovere la cicatrizzazione e la guarigione della cute ulcerosa, ha aperto il campo a nuove opportunità terapeutiche sempre più efficaci (4, 5) e nel complesso meno costose (6).

### ***G-CSF: fattore stimolante le colonie granulocitarie***

I fattori di crescita sono delle glicoproteine che agiscono sia sulla differenziazione cellulare che sulla rigenerazione tissutale. Il fattore stimolante le colonie granulocitarie (G-CSF) è una citochina in grado di stimolare selettivamente la proliferazione e la maturazione dei precursori dei neutrofilo (7). Il Filgrastim- Neupogen® - (r-metHuG-CSF) è un G-CSF ricombinante costituito da 175 aminoacidi in grado di regolare il numero di cellule emopoietiche circolanti legandosi ad un recettore specifico presente sulla superficie delle cellule. Alcuni autori hanno dimostrato la capacità del G-CSF di promuovere la crescita e la migrazione in vitro degli endotelioцити (8).

Partendo dalle conoscenze acquisite sull'uso del G-CSF nel piede diabetico (9, 10) e sulle nostre precedenti osservazioni del suo utilizzo sulle ulcere cutanee vasculitiche infette (11), ci siamo proposti di verificare l'efficacia del Filgrastim nei processi riparativi delle ulcere correlate alla SSc e resistenti alle comuni terapie.

## **MATERIALI E METODI**

Sono stati reclutati 26 pazienti (23 F e 3 M, età 54 ±13,6 aa) affetti da SSc, classificati in base ai criteri ACR (12), che presentavano ulcere cutanee resistenti alle terapie tradizionali. Venivano definite come resistenti le ulcere persistenti da almeno 12 mesi, insensibili ai trattamenti sistemici con calcio antagonisti e prostanoidi, e alle medicazioni avanzate (idrocolloidi, alginati). La durata media delle ulcere cutanee prima dello studio era di 2 anni (range 1-5). Dei 26 pazienti 18 presentavano SSc variante cutanea limitata, 3 intermedia, 5 diffusa; la durata della malattia variava in un range da 5 a 15 anni, infine 18/26 pazienti presentavano ulcere multiple.

I criteri d'esclusione dallo studio erano: storia di neoplasie maligne, valori di creatinina superiori a 250 µmol/L, gravidanza in atto. Visto che la maggio-

**Tabella I** - Parametri di valutazione delle ulcere cutanee nei pazienti con SSc.

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| <b>Dimensioni</b>                 | 0 = 0 cm   |
|                                   | 1 = <1 cm  |
|                                   | 2 = 1,5-2  |
|                                   | 3 = >2 cm  |
| <b>Numero di sedi interessate</b> | 0 = 0  |
|                                   | 1 = 1  |
|                                   | 2 = 2-3  |
|                                   | 3 = > 4  |
| <b>Numero ulcere</b>              | 0 = 0  |
|                                   | 1 = 1  |
|                                   | 2 = 2-3  |
|                                   | 3 = >3   |
| <b>Presenza tessuto necrotico</b> | 0 = assenza  |
|                                   | 1 = necrosi marginale                              |
|                                   | 2 = necrosi del fondo                              |
|                                   | 3 = necrosi con esposizione dei piani sottocutanei |
| <b>Infezione</b>                  | 0 = assente  |
|                                   | 1 = presente senza essudato                        |
|                                   | 2 = presente con essudato lieve                    |
|                                   | 3 = presente con materiale purulento               |
| <b>Macerazione</b>                | 0 = assente  |
|                                   | 1 = lieve marginale                                |
|                                   | 2 = perilesionale                                  |
|                                   | 3 = marcata  |
| <b>Margini non proliferativi</b>  | 0 = assenza  |
|                                   | 1 = moderatamente sottominati                      |
|                                   | 2 = sottominati                                    |
|                                   | 3 = sottominati con fibrina                        |

ranza dei pazienti presentava ulcere all'arto inferiore (19/26) era considerato criterio di esclusione la concomitante presenza di insufficienza venosa.

Le lesioni cutanee sono state valutate al tempo zero, al 2° mese e al 6° mese mediante compilazione di un'apposita scheda che prendeva in esame i seguenti parametri: dimensione, sede, numero delle lesioni, presenza di tessuto necrotico, eventuale infezione o macerazione, proliferazione dei margini, assegnando uno score di gravità (0-3) ad ognuno di essi (Tab. I).

Ad ogni paziente veniva eseguita una capillaroscopia periungueale e perilesionale mediante videomicroscopio a sonda ottica.

La qualità di vita del paziente è stata valutata con scala visuoanalogica (VAS) e con un questionario (HAQ).

Ai 26 pazienti sclerodermici, dopo aver ottenuto consenso informato, veniva somministrato Filgrastim sotto cute, alla dose di 5 µg/Kg per 5 giorni consecutivi, monitorando giornalmente il numero

dei leucociti (GB); secondo un protocollo stabilito in precedenza, il suo dosaggio doveva essere ridotto a  $2.5 \mu\text{g}/\text{kg}$  al giorno in caso di  $\text{GB} >25 \times 10^9/\text{L}$ , mentre la somministrazione del farmaco doveva essere interrotta in caso di  $\text{GB} >50 \times 10^9/\text{L}$ .

La medicazione delle ulcere cutanee con idrocolloidi, e alginati veniva eseguita tre volte alla settimana.

## RISULTATI

A tutti i pazienti è stato somministrato Filgrastim alla dose di  $5 \mu\text{g}/\text{Kg}$  s.c. per 5 giorni consecutivi. Nei 26 pz si osservava leucocitosi inferiore, comunque, al cut-off stabilito, dopo due somministrazioni di filgrastim; l'incremento dei GB si manteneva fino al 5 giorno di terapia, i valori ematocimici rientravano nella norma entro 48 dalla fine del trattamento. Dopo due mesi di terapia si è osservato un miglioramento delle ulcere in tutti i pazienti: in particolare, una riduzione di dimensioni in 22/26 (84%) e risoluzione completa della lesione in 4/26 (16%).

12/26 pazienti presentavano all'inizio dello studio una persistente infezione della lesione cutanea (tampone positivo: 7 per gram+, 5 per anaerobi) nonostante la terapia antibiotica eseguita per via si-

stemica in base alle indicazioni dell'antibiogramma. Dopo una fase essudativa molto intensa seguita alla somministrazione di G-CSF, si è assistito ad una rapida risoluzione delle infezioni, senza terapia antimicrobica in 10 dei 12 pazienti con ulcere infette.

A 8 settimane dal trattamento si è osservato un netto miglioramento della VAS da  $88 \pm 13$  a  $55 \pm 28$  ( $p < 0,0001$ ) e dello stato di salute, valutato con HAQ, che passava da  $2,12 \pm 0,45$  a  $1,28 \pm 0,30$  ( $p < 0,0001$ ). Anche lo score di gravità delle ulcere subiva una significativa riduzione passando da  $17,5 \pm 3,3$  a  $8,1 \pm 3,2$  ( $p < 0,0001$ ).

Tre pazienti hanno riferito durante il trattamento artromialgie, che comunque non hanno richiesto trattamento specifico.

Durante il trattamento con fattore di crescita non si sono resi necessari interventi chirurgici sulla lesione cutanea (debridement o amputazione) e nei pazienti con ulcere multiple (18/26) non si sono osservate infezione o aggravamento delle ulcere secondarie.

La capillaroscopia evidenziava focali fenomeni di neoangiogenesi presenti nella zona perilesionale, mentre rimaneva inalterato il quadro capillaroscopico periungueale.

Alla fine del follow up (6 mesi), le ulcere risultavano guarite in 22/26 pazienti (84%) (Fig. 1), in



**Figura 1** - Risoluzione graduale di una lesione cutanea (a) con evidente pulizia del fondo dell'ulcera (b), progressione dei margini (c) e completa risoluzione alla fine del follow up (d).

due si assisteva a riduzione del numero e delle dimensioni delle lesioni, ed infine in due malati è stato necessario un trapianto eterologo di cute.

## CONCLUSIONI

Questo studio preliminare ha dimostrato un'efficacia terapeutica di G-CSF sulle ulcere cutanee in soggetti con SSc. In particolare, si è rilevata una rapida risoluzione delle infezioni a carico della lesione, che ha fornito un adeguato "wound bed" su cui si sono potuti innescare i processi riparativi tissutali (13). L'attività del G-CSF come "antimicrobico" potrebbe essere dovuta alla chemiotassi e all'attivazione dei granulociti neutrofili (14). Alcune situazioni cliniche note, come il diabete mellito, malattie renali, immunodepressione e/o assunzioni di steroidi possono ridurre la produzione endogena di G-CSF e/o i suoi effetti in risposta ad un processo infettivo (10). La somministrazione sotto cute di G-CSF potrebbe riequilibrare il probabile deficit di fattore di crescita e rendere più efficace l'attività antimicrobica a livello cutaneo.

In nostre precedenti esperienze su un numero limitato di pazienti con ulcere vasculitiche, le somministrazioni di Filgrastim direttamente in sede perilesionale non avevano portato a risultati incoraggianti, molto probabilmente a causa della rapida degradazione del farmaco per opera dei neutrofili presenti sulle lesioni cutanee. La somministrazione sistemica, dunque, appare fondamentale per il buon esito della terapia.

I risultati ottenuti da questo studio sono in discordanza con i dati di De Lalla e quelli di Kstenbauer (9-15). In questi studi venivano trattati pazienti

diabetici che presentavano ulcere cutanee da un più lungo periodo di tempo, complicate da infezioni più severe. I nostri dati, invece, correlano con quelli evidenziati da Gough et al. su ulcere cutanee infette di pazienti diabetici, ma di recente insorgenza (10).

La terapia con G-CSF è stata ben tollerata, e gli effetti collaterali registrati sono stati di minor entità rispetto a quelli riportati in precedenti lavori (16). In particolare, nonostante l'osservazione del 1987 sulla possibile correlazione fra leucocitosi e sviluppo di complicanze ischemiche (17), nei pazienti da noi trattati non si sono evidenziate alterazioni cardiovascolari. La videocapillaroscopia eseguita in zona periungueale rimaneva invariata nel corso della terapia, così come la gravità dei fenomeni acrosfittici. Mentre il riscontro di fenomeni di neoangiogenesi evidenziati con la videocapillaroscopia in sede perilesionale meriterebbe ulteriori approfondimenti. È già nota la capacità del G-CSF di mobilizzare le cellule endoteliali in vitro ed in vivo (8, 18), ed è stata recentemente ipotizzata la possibilità G-CSF di mobilizzare un pool di cellule "totipotenti" a livello follicolare perilesionale (19).

Il trattamento si è dimostrato privo d'effetti collaterali rilevanti in tutti i pazienti, probabilmente anche per la sua relativa brevità.

Il G-CSF può rappresentare un nuovo valido strumento nella terapia delle ulcere cutanee sclerodermiche resistenti alle comuni terapie, per le quali attualmente si richiedono lunghi periodi di trattamento, con notevole dispendio di risorse umane e materiali. Sono auspicabili, comunque, ulteriori studi controllati, per valutare l'attività terapeutica di vari fattori di crescita e/o loro combinazioni con più lunghi periodi di follow-up.

### RIASSUNTO

Nei pazienti con SSc è frequente la comparsa di gravi ulcere cutanee resistenti alle comuni terapie. Scopo dello studio è stato quello di valutare l'efficacia del fattore di crescita G-CSF.

Sono stati studiati 26 pazienti affetti da SSc con ulcere cutanee resistenti ai precedenti trattamenti. Sono stati valutati: caratteristiche e score di gravità delle ulcere; alterazioni capillaroscopiche; VAS e HAQ-DI. A tutti i pz veniva somministrato G-CSF sotto cute alla dose di 5µg/kg per 5 giorni consecutivi. Dopo il trattamento si assisteva ad una rapida risoluzione delle infezioni, con miglioramento statisticamente significativo della VAS e dell' HAQ-DI, in assenza di effetti collaterali. Alla fine del follow up, le ulcere risultavano guarite in 22/26 pazienti (84%), in due si assisteva a riduzione di numero e dimensioni, ed in due pazienti è stato necessario un trapianto eterologo di cute.

Questo studio suggerisce che la terapia con G-CSF permette di ottenere in un'elevata percentuale di pz la guarigione delle ulcere cutanee. Il riscontro di neoangiogenesi in sede perilesionale potrebbe contribuire al miglioramento delle ulcere.

**Parole chiave** - Sclerosi sistemica, ulcere cutanee croniche, fattore di crescita delle colonie granulocitarie.

**Key words** - Systemic sclerosis, non healing skin ulcers, granulocyte-colony stimulating factor.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Medsger TA jr. Systemic sclerosis (scleroderma): clinical aspect In: Koopman WJ, editor. *Arthritis and allied conditions. A textbook of rheumatology* 13° ed. Baltimore: Williams e Wilkins 1997; 1437-9.
2. Harding KG, Morris HL, Patel GK. Science, medicine and the future: healing chronic wounds. *BMJ* 2002; 324: 160-3.
3. Rothe MJ, Falanga V. Growth Factors and wound healing. *Clin Dermatol.* 1991; 9: 553-9.
4. David R Thomas. The promise of topical growth factors in healing pressure ulcers. *Ann Intern Med* 2003; 139: 694-5.
5. Albert S. Cost-effective management of recalcitrant diabetic foot ulcers. *Clin podiatr Med Surg* 2002; 19: 483-91.
6. Almann RM, Goode PS, Burst N, Bartolucci AA, Thomas DR. Pressure ulcers, hospital complications, and disease severity: impact on hospital costs and length of stay. *Adv wound Care*, 1999; 12: 22-30.
7. Metcalf D, Nicola NA. Proliferative effects of purified granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on normal mouse hemopoietic cells. *J Cell Physiol* 1983; 116: 198-206.
8. Bussolino F, Wang JM, Defilippi P et al. Granulocyte and granulocyte-macrophage colony factor induce human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature* 1989; 337: 471-3.
9. De Lalla F, Pellizzeri G, Strazzabosco M, Martini Z, Du Jardin G, Lora L, et al. Randomized Prospective Controlled Trial of Recombinant Colony Stimulating factors as Adjunctive Therapy for Limb-threatening diabetic Foot infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1094-8.
10. Gough A, Clapperton M, Rolando N, Foster AVM, Philpott-Howard J, Edmonds ME. Randomised placebo-controlled trial of granulocyte-colony stimulating factor in diabetic foot infection. *Lancet* 1997; 350: 855-59.
11. Giuggioli D, Sebastiani M, Ferri C. Uso dei fattori di crescita ematopoietici nella terapia delle ulcere cutanee associate a Sclerosi Sistemica e Crioglobulinemia: studio pilota. *Atti congresso Terapia Ulcere cutanee arto inferiore: stato dell'arte.* Lucca, Palazzo Guinigi 2002.
12. Subcommittee for Sclerodermia Criteria of American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23: 581-90.
13. Falanga V. Classifications for wound bed preparation and stimulation of chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2000; 8: 347-52.
14. Kawakami M, Tsutsumi H, Kumakawa T, Abe H, Hirai M, Kurosawa S, et al. Levels of serum granulocyte colony stimulating factor in patient with infections. *Blood* 1990; 76: 1962-4.
15. Kastenbauer T, Hornlein B, Sokol G, Irsigler K. Evaluation of granulocyte-colony stimulating factor (Filgrastim) in infected diabetic foot ulcers. *Diabetologia* 2003; 46: 27-30.
16. Hollingshead LM, Goa KL. Recombinant granulocyte colony-stimulating factor (rG-CSF): a review of its pharmacological properties and prospective role in neutropenic conditions. *Drugs* 1991; 42: 300-30.
17. Ernst E, Hammerschmidt DE, Bagge U, Matrai A, Dormandy JA. Leucocytes and the risk of ischemic disease. *Jama* 1987; 257: 2316-24.
18. Bussolino B, Ziche M, Wang JM, Alessi D, Morbidelli L, Cremona O, et al. In vitro and in vivo activation of endothelial cells by colony stimulating factors. *J Clin Invest* 1991; 87: 986-95.
19. De Luca M, "Skin" *Atti del congresso. Adult Stem Cell Transplantation: A Challenge for the Future.* Bologna 22-24, 2004.