

# TRATTAMENTO CON ADACOLUMN LEUCOCITAFERESI PER LA RIMOZIONE DEL VIRUS C NEI PAZIENTI IN LISTA PER TRAPIANTO DI RENE. STUDIO PRELIMINARE

**Gilnardo Novelli<sup>1</sup>, Giancarlo Ferretti<sup>2</sup>, Vincenzo Morabito<sup>1</sup>, Paola Cinti<sup>1</sup>, Luca Poli<sup>1</sup>, Renzo Pretagostini<sup>1</sup>, Pasquale B. Berloco<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Dipartimento "P. Stefanini" Chirurgia Generale e Trapianti d'Organo, La Sapienza Università di Roma, Roma

<sup>2</sup>Dipartimento di Malattie Infettive e Tropicali, La Sapienza Università di Roma, Roma

## Adacolumn apheresis for hepatitis C virus in patients waiting for kidney transplant. Preliminary study

*Hepatitis C virus (HCV) infection occurs much more frequently in the hemodialysis population than in the general population. Patients with chronic kidney disease with persistent HCV infection may develop serious and progressive chronic liver disease, with associated long-term morbidity and mortality related to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Monocytes and macrophages are known to produce extrahepatic breeding sites and spread the disease. Our aim was to lower the levels of macrophages, granulocytes, monocytes, proinflammatory cells and viremia using an extracorporeal device: the Adacolumn® leukocyte apheresis system (Otsuka).*

*The Adacolumn is a direct hemoperfusion-type leukapheresis device. The column is a single-use (disposable) polycarbonate column with a capacity of about 335 mL, filled with 220-g cellulose acetate beads of 2 mm in diameter bathed in physiological saline. The carriers adsorb "activated" granulocytes and monocytes/macrophages that bear Fc and complement receptors. The patients underwent five 1-hour sessions for five consecutive days. The column was placed in an extracorporeal setting with a perfusion rate of 30 mL/min and a duration of 60 minutes.*

*A reduction of viremia was observed in all patients in association with a decrease in cytokine levels and a proportional decrease in immune cells.*

*Although this study investigated responses in a small number of patients, it was shown that the Adacolumn changed the cellular immunity and promoted early viral response.*

Conflict of interest: None

### KEY WORDS:

Kidney transplant,  
Cytokines,  
Viral hepatitis,  
Apheresis

### PAROLE CHIAVE:

Trapianto renale,  
Citochine,  
Epatite virale,  
Aferesi

### Indirizzo degli Autori:

Prof. Gilnardo Novelli  
Dipartimento "P. Stefanini"  
Chirurgia Generale e Trapianti  
d'Organo  
La Sapienza Università di Roma  
Viale del Policlinico 155  
00161 Roma  
e-mail: novelligilnardo@virgilio.it

## INTRODUZIONE

Le principali vie di trasmissione del Virus C nell'ambito della dialisi includono le trasfusioni, le procedure per l'accesso vascolare e la contaminazione all'interno dell'unità di dialisi (1-4). In Italia, la prevalenza di anticorpi anti-HCV nei pazienti in trattamento emodialitico è tra il 10% e il 50% (5) e l'incidenza dell'infezione è di circa 9.5 casi/1.000 pazienti-anno (6). L'impatto dell'HCV sulla sopravvivenza in emodialisi è stato illustrato in una meta-analisi di quattro studi clinici con

2.341 pazienti in cui è stato evidenziato come l'infezione da HCV può essere associata a un aumentato rischio di mortalità di 1.57 volte (95% CI 1.33-1.86) (6). La combinazione di farmaci quali l'Interferone pegilato (INF-PEG) e la Ribavirina (RBV) rappresenta il trattamento *standard* dell'epatite cronica C (CHC), anche se presenta molti limiti, sia per quanto riguarda la reale efficacia sia per gli effetti secondari, che la rendono inadatta o, addirittura, controindicata per alcuni pazienti (7). Sebbene l'HCV sia un patogeno epatocellulare, c'è una crescente evidenza che il Virus

può infettare altre cellule e persistervi. In particolare, granulociti e monociti/macrofagi sono noti per costituire siti extraepatici per la replicazione e la disseminazione del *Virus* (8-10). Da poco tempo, è diventato possibile rimuovere selettivamente questi leucociti dal sangue periferico mediante l'uso di un'aferesi: l'Adacolumn (Giappone Immunore-Laboratori di ricerca, Takasaki, Giappone) aferesi leucocitaria (11-13). L'adesione dei granulociti e dei monociti alle sfere di acetato di cellulosa dell'Adacolumn si produce per attivazione della cascata del complemento in presenza di Ca<sup>++</sup> e IgG. L'unione dei prodotti di degradazione del complemento ai recettori specifici attiva segnali intracellulari che modificano l'espressione di proteine di membrana leucocitaria. L'attivazione del complemento provoca la degranolazione di neutrofili e la liberazione di mediatori antiinfiammatori e radicali liberi *in situ*. La modifica di espressione delle proteine di superficie provoca una modulazione dei meccanismi di migrazione dal *pool* intravascolare a quello extravascolare. La modifica della funzionalità leucocitaria provoca

una diminuzione della capacità di espressione delle citochine pro-infiammatorie. Infine, si produce un reclutamento di granulociti immaturi nel *pool* intravascolare. Lo scopo di questo studio preliminare è quello di valutare l'efficacia dell'Adacolumn leucocitaferesi nel diminuire la viremia, in tre pazienti affetti da epatite C in lista d'attesa per trapianto di rene.

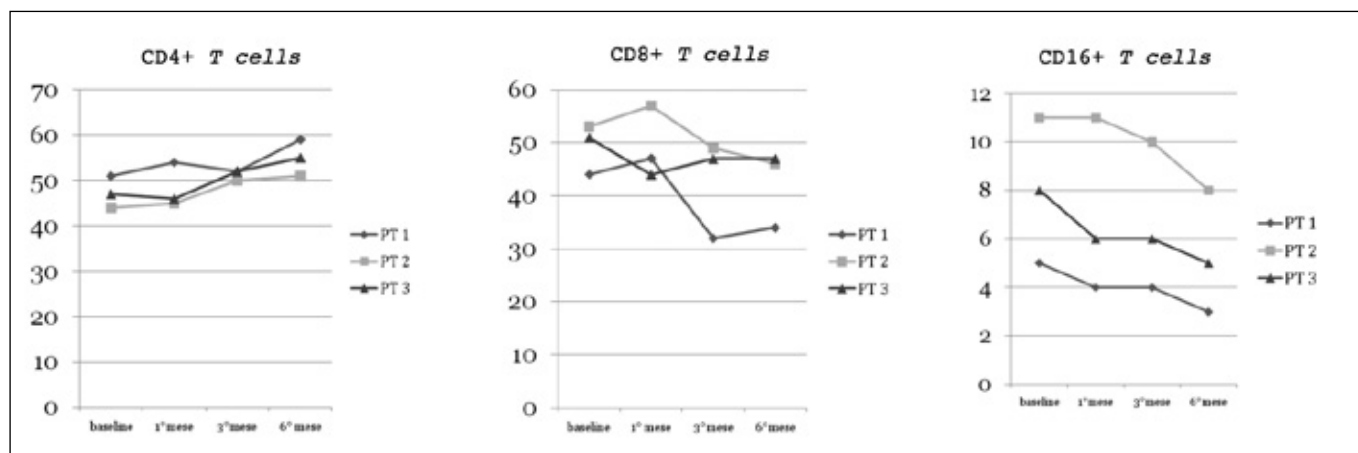
### MATERIALI E METODI

Le caratteristiche demografiche e cliniche dei 3 pazienti (1 maschio e 2 femmine) con un'età media di 50 anni, che erano stati arruolati per la terapia con Adacolumn aferesi in questo studio, da Aprile a Giugno 2010, sono riportate nella Tabella I. Tutti i pazienti presentavano una diagnosi di epatite cronica da *Virus* C, erano già sottoposti a un trattamento farmacologico *standard* con INF-PEG e RBV ma erano *No Responder* alla terapia. Il tempo medio di attesa in lista per trapianto di rene era di 18±7.9 mesi. I pazienti

**TABELLA I** - CARATTERISTICHE CLINICHE DEI 3 PAZIENTI PRIMA DELL'INIZIO DEL CICLO DI TRATTAMENTI

Pazienti	Età	Sex	HCV genotipo	Viral Load (mil copies)	Fibrosis status	ALT. (mg/dl)	AST (mg/dl)
Pt 1	45	M	1b	11.5	S1	156	156
Pt 2	58	F	1a	30	S2	568	568
Pt 3	49	F	1b	8	S1	1.1	180

Abbreviazioni: HCV: Virus C; ALT: Alanina aminotransferasi; AST: Alanina aspartato



**Fig. 1** - Variazioni dell'immuno-modulazione durante il follow-up.

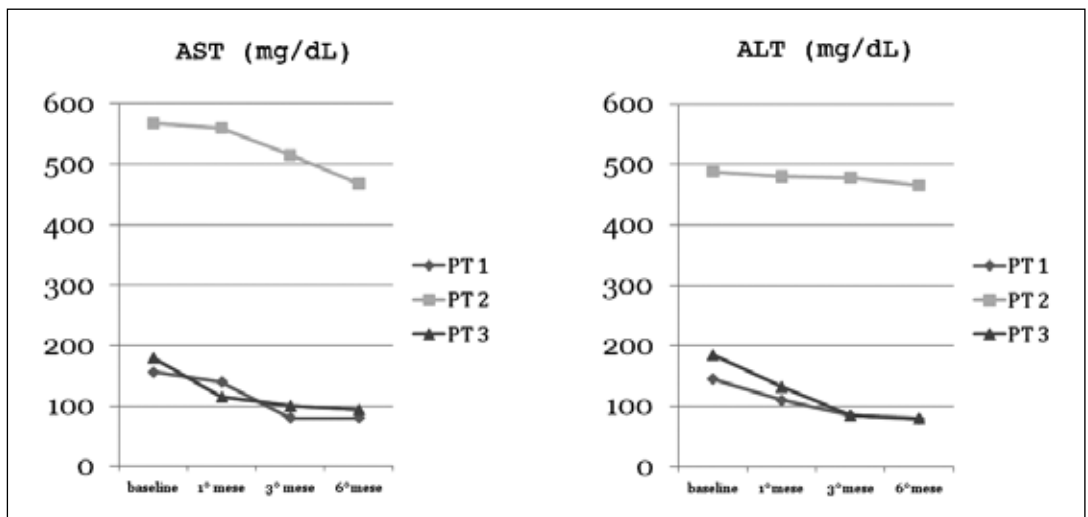
sono stati sottoposti a cinque sessioni di un'ora, per cinque giorni consecutivi. L'impostazione della pompa volumetrica del sangue era di 30 mL/min e la durata del trattamento era di 60 minuti. L'accesso al sangue è stato ottenuto tramite una puntura venosa nella vena antecubitale di un braccio con ritorno al paziente tramite una puntura venosa nel braccio controlaterale. Per la terapia anticoagulante, un bolo di 2.500 unità di eparina non frazionata è stato iniettato nel sistema extracorporeo all'inizio del trattamento. I pazienti sono stati valutati durante i 5 giorni dall'inclusione, con un *follow-up* a uno, a tre e a sei mesi. I parametri valutati durante lo studio sono stati: l'HCV-RNA quantitativo (milioni/copie), le citochine pro-infiammatorie (*Tumor Necrosis Factor alpha* e *Interleuchina-6*), i cambiamenti di immuno-modulazione (CD4+, CD8+, CD16+) e i parametri renali ed epatici. Inoltre, prima del trattamento extracorporeo, il consenso informato

è stato ottenuto da tutti i pazienti verbalmente e per iscritto dopo che erano stati informati delle finalità dello studio e del tipo di procedura.

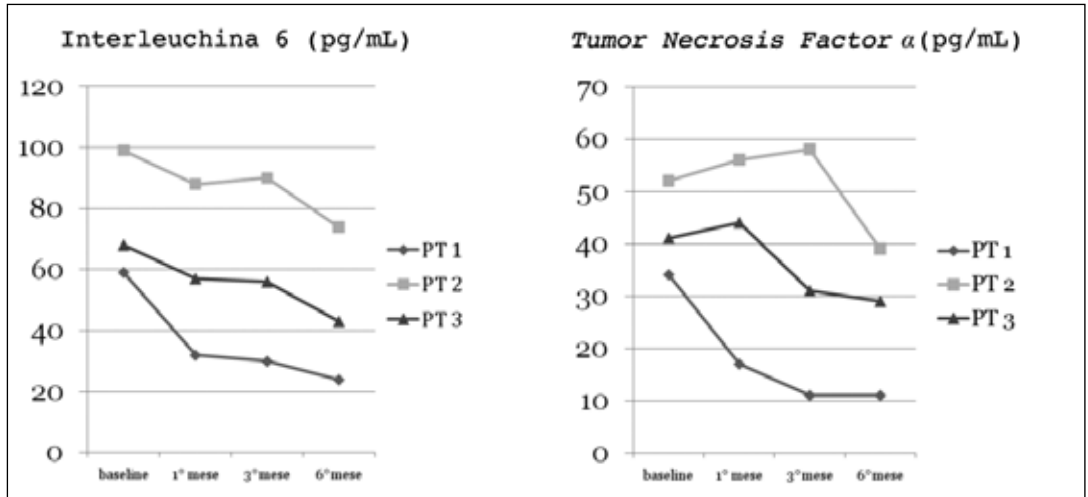
**RISULTATI**

Dopo cinque trattamenti giornalieri mediante l'afesi, non sono stati osservati cambiamenti delle copie di HCV-RNA, dei livelli delle cellule pro-infiammatorie, dell'immuno-modulazione e dei parametri epatici. Abbiamo osservato una riduzione della viremia in associazione con una diminuzione dei livelli di citochine e un rapporto equilibrato delle popolazioni sottolinfocitarie dopo 1 mese in un paziente (Pt1) e dopo 3 mesi di *follow-up* in due pazienti (Pt2, Pt3). Nella Figura 1 sono riportate le variazioni delle popolazioni sottolinfocitarie valutate. Il paziente

**Fig. 2 -** Variazioni dei parametri epatici durante il follow-up. ALT: Alanina aminotransferasi; AST: Alanina aspartato.



**Fig. 3 -** Modificazioni dei livelli di citochine pro-infiammatorie durante il follow-up.



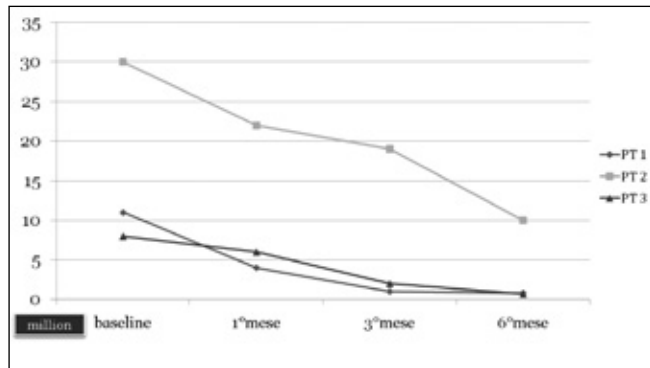


Fig. 4 - HCV-RNA (milioni/copie).

1 presentava un rapporto CD4+/CD8+ equilibrato che si è mantenuto tale anche nei mesi successivi del *follow-up*. Il paziente 2 ha evidenziato un rapporto alterato che si è equilibrato dopo il terzo mese dal trattamento. Anche il paziente 3 evidenziava un rapporto CD4+/CD8+ alterato che, però, si è riequilibrato dopo il 1° mese. I pazienti 1 e 3 hanno mostrato una maggiore riduzione degli indici epatici ( $p < 0.02$ ) rispetto al paziente 2 come riportato nella Figura 2 che, al momento dell'arruolamento, presentava un MELD score e uno stato di fibrosi epatica più elevati rispetto agli altri due pazienti. La valutazione delle citochine, come riportato nella Figura 3 ha mostrato una riduzione dell'IL-6 in tutti i pazienti. In due pazienti (Pt1, Pt3), c'è stata una riduzione del TNF-alfa a 1 mese e a 3 mesi, rispettivamente. Il paziente 2 ha mostrato una riduzione del TNF- $\alpha$  solo dopo 6 mesi dal trattamento aferetico. A 6 mesi dall'inizio della terapia con Adacolumn tutti i pazienti hanno mostrato una diminuzione importante della viremia (Fig. 4).

## DISCUSSIONE

Molti dati suggeriscono che le manifestazioni cliniche e l'evoluzione del danno epatico HCV-correlato sono determinate dalla risposta immunologica dell'ospite. L'immunità adattiva dipende dal "sensing" del Virus attraverso vari meccanismi dell'immunità innata. L'interferenza virale sul riconoscimento della risposta innata potrebbe contribuire a determinare una perdita progressiva della risposta adattiva durante le prime fasi dell'infezione cronica. L'ipotesi è che l'Adacolumn aferesi (AA) potrebbe cambiare l'immunità cellulare agendo sulla risposta immunitaria adattiva con una riduzione dei livelli di cellule pro-infiammatorie e promuovendo una risposta virologica precoce. In questo studio, tutti i

pazienti hanno presentato una riduzione dei livelli di citochine. Andoh et al. hanno evidenziato una significativa diminuzione delle citochine pro-infiammatorie dopo il trattamento con AA (14). Questi risultati suggeriscono che sia la soppressione funzionale dei leucociti circolanti che la rimozione quantitativa dei leucociti attivati contribuiscono all'efficacia di questa terapia non farmacologica. In concordanza con Hanai et al. (15, 16) abbiamo riportato un'evidente riduzione della popolazione sottolinfocitaria CD16+. Il fenotipo CD16+ è noto per rilasciare grandi quantità di TNF-alfa (17) con una conseguente espansione cellulare in condizioni infiammatorie (18). Il paziente [Pt1] è stato l'unico caso in cui la riduzione dei livelli di citochine, con la diminuzione di elementi CD16+, è stata seguita da una riduzione della viremia dopo 1 mese dal trattamento aferetico. In conclusione, questo studio preliminare ha dimostrato che Adacolumn aferesi non ha presentato alcun tipo di complicazioni emodinamiche e infettive e ha confermato una riduzione su monociti, macrofagi e citochine, con una riduzione della viremia nei pazienti trattati. La comprensione del vero meccanismo d'azione dell'Adacolumn può contribuire allo sviluppo di una nuova alternativa terapeutica per i pazienti con epatite cronica C. AA potrebbe essere usato da solo in pazienti non rispondenti alla terapia antivirale con PEG-IFN, in associazione con la Ribavirina o in combinazione con questi farmaci, al fine di ridurre il dosaggio e i tempi di utilizzo.

## RIASSUNTO

*L'infezione da Virus C nei pazienti che effettuano trattamenti emodialitici rappresenta ancora una problematica attuale. Le terapie farmacologiche con interferone e ribavirina non possono essere applicate a tutti i pazienti per la comparsa di effetti collaterali importanti. Inoltre i pazienti che vengono sottoposti a tali terapie devono prolungare il loro tempo in lista di attesa per un eventuale trapianto di rene. Poiché monociti, macrofagi e granulociti sono considerati siti extraepatici per la replicazione e disseminazione del virus, abbiamo utilizzato un'aferesi per rimuovere queste cellule infettate dal sangue periferico. Il trattamento che viene effettuato per cinque giorni consecutivi e non presenta alcun tipo di effetto collaterale è in grado di ridurre la viremia in questi pazienti.*

## DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 558-67.
2. Meyers CM, Seeff LB, Stehman-Breen CO, Hoofnagle JH. Hepatitis C and renal disease: An update. *Am J Kidney Dis* 2003; 42: 631-6.
3. Bergman S, Accortt N, Turner A, Glaze J. Hepatitis C infection is acquired pre-ESRD. *Am J Kidney Dis* 2005; 45: 684-9.
4. Fissell RB, Bragg-Gresham JL, Woods JD, et al. Patterns of hepatitis C prevalence and seroconversion in hemodialysis units from three continents: The DOPPS. *Kidney Int* 2004; 65: 2335-42.
5. Di Napoli A, Di Giulio S. Epidemiology of hepatitis C virus among long-term dialysis patients: a 9-year study in an Italian region. *Am J Kidney Dis* 2004; 48: 629-37.
6. Fabrizi F, Martin P, Dixit V, Bunnapradist S, Dulai G. Meta-analysis: effect of hepatitis C virus infection on mortality in dialysis. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 (11-12): 1271-7.
7. Ghany M, Strader DB, Thomas D, Seeff LB. Diagnosis, management and treatment of hepatitis C: An Update. *AASLD Practice guidelines. Hepatology* 2009; 4: 1335-64.
8. Cravatto M, Pozzato G, Zorat F, Pusini E, Sentini G. Peripheral blood neutrophils from hepatitis C virus-infected patients are replication sites for the virus. *Haemat* 2000; 85: 356-61.
9. Caussin-Scwemling C, Scmitt C, Stoll-Keller F. Study of the infection of human blood derived monocyte/macrophage with hepatitis C virus in vitro. *J Med Virol* 2001; 65: 14-22.
10. Bouffard P, Hayashi PH, Acevedo R, Levy N, Zeldis JB. Hepatitis C is detected in a monocyte macrophage subpopulation of peripheral blood mononuclear cells of infected patients. *J Infect Dis* 1992; 166: 1276-80.
11. Shimoyama T, Sawada K, Hiwatashi N, et al. Safety and efficacy of granulocyte and monocyte adsorption apheresis in patients with active ulcerative colitis: a multicenter study. *J Clin Apher* 2001; 16: 1-9.
12. Saniabadi AR, Hanai H, Takeuchi K, Bjarnason I, Lofberg R. Adacolumn, an adsorptive carrier based granulocyte and monocyte apheresis device for the treatment of inflammatory and refractory diseases associated with leukocytes. *Ther Apher Dial* 2003; 7: 48-59.
13. Sawada K, Muto T, Shimoyama T, et al. Multicenter randomized controlled trial for the treatment of ulcerative colitis with a leukocytapheresis column. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 307-21.
14. Andoh A, Tsujikawa T, Inatomi O, et al. Suppression of inflammatory cytokines secretion by granulocyte/monocytes adsorptive apheresis in active ulcerative colitis. *Ther Apher Dial* 2005; 2: 123-7.
15. Hanai H, Watanabe F, Saniabadi A. Correlation of serum soluble TNF-alpha receptors I and II levels with disease activity in patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1532-8.
16. Hanai H, Iida T, Watanabe F, Saniabadi A. Effects of Adacolumn selective leukocytapheresis on plasma cytokines during active disease in patients with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3393-9.
17. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Ziegler-Heibrock L. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 2002; 168: 3536-42.
18. Scherberich JE. Proinflammatory blood monocytes: main effector and target cells in systemic and renal disease; background and therapeutic implications. *Int J Pharmacol Ther* 2003; 41: 459-64.