



**Studio degli effetti biologici della somministrazione del
fattore di crescita granulocitario peghilato
(PEGFILGRASTIM) sui granulociti neutrofilici circolanti di
pazienti affette da carcinoma mammario trattate con schemi
di chemioterapia dose-dense**

Gallia A.¹, Travaglino E.¹, Matti V.¹, Grasso D.², De Angelis E.¹,
Brugnatelli S.², Danova M.², Riccardi A.², Invernizzi R.¹

¹*Clinica Medica III e* ²*U.O. di Oncologia Medica, Università degli Studi di
Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia*

INTRODUZIONE

I neutrofilici circolanti, che rappresentano la prima difesa contro le infezioni batteriche e fungine, sono cellule prodotte nel midollo osseo a partire dalle cellule staminali mieloidi, differenziate in modo terminale. Tali elementi cellulari sono caratterizzati da una breve emivita (8-20 ore), che tuttavia può aumentare in corso di infezioni o infiammazioni; i neutrofilici invecchiati vanno incontro spontaneamente ad apoptosi prima di essere rimossi ad opera dei macrofagi. Nell'infiammazione acuta il numero dei neutrofilici a livello tissutale può essere elevato non solo per l'afflusso dalla circolazione sanguigna con concomitante espansione del pool periferico dovuto ad

aumentata produzione e maturazione nel midollo osseo, ma anche perché il loro costitutivo *pathway* apoptotico è ritardato dall'azione dei mediatori locali dell'infiammazione [1]. In letteratura diverse evidenze suggeriscono che la disregolazione dell'apoptosi dei neutrofilii gioca un ruolo chiave nell'espansione/riduzione del *pool* periferico sia in condizioni patologiche che fisiologiche [1, 2].

I neutrofilii apoptotici sono caratterizzati da alterazioni morfologiche e funzionali che si traducono in un arresto della funzionalità cellulare: infatti tali elementi non sono in grado di muoversi per chemotassi, di degranularsi e di produrre specie tossiche dell'ossigeno.

Anche se i meccanismi biologici che regolano l'apoptosi dei neutrofilii circolanti non sono ancora completamente chiariti [3], è noto che molti fattori tra cui citochine, fattori di crescita, glucocorticoidi e agenti microbici, possono accelerare o sopprimere tale processo di morte cellulare programmata *in vitro* ed *in vivo* [4]. In particolare è doveroso ricordare che tutti gli agenti chemioterapici agiscono sulle cellule neoplastiche principalmente inducendo apoptosi: la mancanza di selettività citotossica di questi farmaci esita in effetti collaterali dose-dipendenti talora anche gravi, come ad esempio la mielosoppressione che si manifesta con leucopenia e neutropenia, spesso associate ad infezioni [5-10].

Per questo motivo, tra i mediatori che promuovono la sopravvivenza dei neutrofilii periferici circolanti, il fattore di crescita granulocitario G-CSF è tra quelli clinicamente più rilevanti ed ampiamente utilizzati nel trattamento della neutropenia chemioterapia-dipendente e non [11]. Oltre alla stimolazione dei precursori mieloidi midollari, questo fattore di crescita esercita un chiaro effetto antiapoptotico sui neutrofilii maturi [12, 13].

Recentemente è stata introdotta nella pratica clinica la forma peghilata (PEGFILGRASTIM) del fattore di crescita granulocitario. I vantaggi legati alla peghilazione, che ha dimostrato le stesse capacità stimolatorie della forma non peghilata (FILGRASTIM), consistono principalmente nel rallentamento della *clearance* plasmatica (emivita più prolungata, da 46 a 62 ore), nell'eliminazione delle ampie fluttuazioni nelle concentrazioni plasmatiche del farmaco, nell'aumento della stabilità (protezione da una metabolizzazione troppo rapida), e nel miglioramento della solubilità. Il farmaco mostra inoltre capacità peculiari di autoregolazione poiché rimane in circolo fino a quando il paziente è neutropenico e viene rapidamente eliminato quando la conta dei neutrofili risale [14]. Infine studi clinici hanno dimostrato che una singola iniezione sottocutanea di PEGFILGRASTIM per ciclo di chemioterapia è efficace e sicura almeno quanto un ciclo di iniezioni di FILGRASTIM nel ridurre la neutropenia e le complicanze ad essa correlate in pazienti in trattamento con cicli di chemioterapia a base di antracicline/taxani [15, 16].

Nella Sezione di Medicina Interna ed Oncologia Medica del Dipartimento di Medicina Interna e Terapia Medica dell'Università degli Studi di Pavia sono in corso due Studi Clinici Multicentrici volti a valutare gli effetti del PEGFILGRASTIM nell'ambito di regimi chemioterapici dose-dense in pazienti affette da carcinoma mammario sia in ambito adiuvante sia neoadiuvante. Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare l'influenza e gli effetti del PEGFILGRASTIM su alcuni indici delle funzioni biologiche dei neutrofili nelle pazienti arruolate. In particolare, oltre alla valutazione del numero assoluto di neutrofili circolanti e di eventuali anomalie morfologiche a loro carico, alla determinazione della

percentuale di precursori mieloidi circolanti ed all'osservazione dell'outcome clinico delle pazienti arruolate, ci siamo proposti di studiare:

- i livelli di apoptosi nei neutrofili circolanti;
- la distribuzione della F-actina o actina polimerica. Il movimento dei neutrofili è principalmente legato alla capacità dell'actina di cambiare rapidamente tra la forma monomerica (G) e la forma filamentosa/polimerica (F);
- l'attività della fosfatasi alcalina leucocitaria (FAL), un marker endogeno sensibile di differenziazione mieloide.

MATERIALI E METODI

Effettuando strisci di sangue periferico e dei globuli bianchi arricchiti dopo sedimentazione al tempo dell'arruolamento e dopo ogni ciclo di chemioterapia, abbiamo condotto le nostre indagini su 17 pazienti trattate con PEGFILGRASTIM, 7 trattate con FILGRASTIM e 6 con la sola chemioterapia e 5 soggetti sani. E' importante sottolineare che tutti i pazienti hanno ricevuto uno o più cicli chemioterapici a base di antracicline, ed erano tutti di sesso femminile, con un'età compresa tra i 45 ed i 50 anni ed affetti da carcinoma mammario.

L'esame emocromocitometrico e l'analisi microscopica dello striscio di sangue periferico ci hanno permesso di valutare rispettivamente il numero assoluto di neutrofili, e le eventuali anomalie morfologiche presenti, oltre che la percentuale di precursori mieloidi circolanti.

L'indice apoptotico (IA) è stato misurato sugli strisci di globuli bianchi arricchiti contando la percentuale di elementi nucleati positivi alla tecnica TUNEL dopo osservazione microscopica; tale metodica si basa sull'evidenziazione delle

estremità terminali 3'OH libere mediante marcatura con deossiuridina trifosfato (dUTP) legata dall'enzima terminal-desossinucleotidiltransferasi (TdT). A tal fine è stato utilizzato il kit commerciale "In situ Cell Death Detection Kit AP" (Roche, Mannheim, Germany).

L'organizzazione dell'actina polimerica o F-actina è stata valutata sugli strisci di globuli bianchi arricchiti colorati con falloidina FITC-coniugata (Molecular Probes, Eugene, OR) ed osservati al microscopio a fluorescenza. Infine l'attività della fosfatasi alcalina leucocitaria è stata determinata sugli strisci di sangue periferico attraverso colorazione citoenzimatica utilizzando naftol-AS-MX fosfato e Fast Garnet GBC, calcolando un punteggio in base al grado di positività dei neutrofilo alla reazione [17].

Per l'analisi statistica descrittiva delle variabili continue sono stati calcolati non solo la media e la deviazione standard (d.s.), ma anche la mediana ed il *range* interquartile (RIQ), data la loro ampia dispersione. La significatività delle differenze tra i diversi gruppi e tra i diversi tempi di trattamento considerati è stata calcolata tramite test statistici parametrici di analisi della varianza (ANOVA). Calcolando il coefficiente di correlazione di Spearman, abbiamo infine valutato la forza di associazione tra alcuni parametri biologici analizzati. Tutti i test statistici erano a due code ed un valore di $p < 0,05$ veniva considerato statisticamente significativo. Per il calcolo sono stati utilizzati i seguenti software: Statistica 8.0, MedCalc® 9.3 e Microsoft Excel® 2000.

RISULTATI

Neutrofili circolanti: numero assoluto ed alterazioni displastiche

In condizioni basali tutte le pazienti arruolate mostravano una conta assoluta di neutrofili circolanti nei limiti della norma. Già dopo il I ciclo di CT, nelle pazienti che avevano ricevuto il fattore di crescita si osservava un aumento del numero assoluto di neutrofili periferici, senza differenze significative tra forma peghilata e non ($p=0.54$). Inoltre, mentre in tutte le pazienti che avevano ricevuto il FILGRASTIM il numero assoluto di neutrofili periferici, pur aumentando, rimaneva in media nel *range* di normalità durante tutto il periodo di trattamento, 11 pazienti che avevano ricevuto il PEGFILGRASTIM (65%) presentavano leucocitosi neutrofila. Infine, il numero assoluto di neutrofili periferici risultava significativamente aumentato rispetto al basale sin dalla prima somministrazione di PEGFILGRASTIM ($p=0.006$, figura 1).

Nei soggetti che avevano ricevuto la sola chemioterapia non abbiamo osservato una significativa riduzione farmaco-dipendente della conta assoluta dei neutrofili circolanti.

Alterazioni displastiche di lieve entità (anisocitosi, anomala segmentazione nucleare, ipergranulosità, ecc) sono state osservate in tutte le pazienti dopo il primo ciclo di CT, senza differenze significative tra i vari gruppi di trattamento ($p=0.78$). In particolare, mentre nelle pazienti trattate con la sola chemioterapia la percentuale di neutrofili distrofici circolanti tendeva ad aumentare rispetto alle condizioni basali, nei soggetti che avevano ricevuto il fattore di crescita si non si osservavano né riduzione né aumento significativi di tale percentuale durante tutto il periodo di trattamento.

Percentuale di precursori mieloidi circolanti

In condizioni basali tutte le pazienti arruolate presentavano una percentuale minima di precursori mieloidi circolanti (promielociti, mielociti, meta mielociti, neutrofilo a banda, media 7, *range* 3-10). Già dopo il I ciclo di CT abbiamo osservato che tale percentuale risultava significativamente superiore nel gruppo delle pazienti trattate con PEGFILGRASTIM sia rispetto a quelle che avevano ricevuto il FILGRASTIM, sia rispetto a quelle trattate con la sola CT (rispettivamente $p=0.0471$ e $p=0.0132$, figura 2). Tale percentuale inoltre rimaneva significativamente aumentata rispetto all'osservazione basale durante tutto il periodo di trattamento in tutte le pazienti che avevano ricevuto stimolazione con PEGFILGRASTIM ($p=0.0153$) ed in 3/4 delle pazienti trattate con FILGRASTIM ($p=0.0256$).

Nei soggetti che avevano ricevuto la sola chemioterapia non abbiamo osservato né riduzione né aumento significativi di tale percentuale durante tutto il periodo di trattamento.

Indice apoptotico

I livelli basali di apoptosi dei neutrofilo circolanti di tutte le pazienti arruolate erano simili a quelli osservati nei soggetti sani ($p=0.26$, tabella 1); dopo il I ciclo di CT non abbiamo osservato differenze significative circa tali livelli tra i diversi gruppi di trattamento, anche se i valori più elevati appartenevano al gruppo di pazienti a cui non era stato somministrato nessun fattore di crescita ($p=0.43$, tabella 1).

Durante il periodo di trattamento l'IA dei neutrofilo periferico aumentava significativamente rispetto alle condizioni basali sia nel gruppo di pazienti trattate con PEGFILGRASTIM ($p=0.008$, figura 3) sia in quelle trattate con

FILGRASTIM ($p=0.019$); in entrambi i gruppi circa il 60% dei casi presentava livelli di apoptosi significativamente più elevati rispetto alla norma.

Nei soggetti che avevano ricevuto la sola chemioterapia non abbiamo osservato né riduzione né aumento significativi dei livelli di apoptosi dei neutrofili circolanti.

Organizzazione dell'actina polimerica

Per quanto riguarda l'organizzazione dell'F-actina, nei soggetti sani e nei prelievi basali delle pazienti arruolate, la maggior parte dei neutrofili mostrava un pattern di reattività alla colorazione con falloidina diffuso (figura 4A). Già dopo il I ciclo di CT con o senza fattore di crescita la percentuale di neutrofili che mostravano anomali addensamenti focali dell'actina polimerica, spesso posti in prossimità della membrana cellulare (figura 4B), aumentava, ed in particolare nelle pazienti a cui era stato somministrato il PEGFILGRASTIM ($p=0.12$, tabella 2).

Durante il periodo di trattamento la quota di neutrofili con questa particolare distribuzione dell'actina polimerica aumentava continuamente fino a rappresentare in media più della maggior parte dei neutrofili circolanti e risultava essere significativamente più elevata rispetto alle condizioni basali sia nel gruppo di pazienti trattate con PEGFILGRASTIM ($p=0.0252$, figura 5) sia in quelle trattate con FILGRASTIM ($p=0.0117$); inoltre alla fine del periodo di trattamento quasi l'80% delle pazienti che avevano ricevuto il fattore di crescita peghilato e solo il 20% di quelle trattate con FILGRASTIM mostravano un numero di neutrofili con distribuzione anomala della F-actina più elevato rispetto alla norma ($p=0.007$).

Nei soggetti che avevano ricevuto la sola chemioterapia non abbiamo osservato né riduzione né aumento significativi di tale percentuale durante tutto il periodo di trattamento.

Attività della fosfatasi alcalina leucocitaria

In condizioni basali circa 1/3 delle le pazienti arruolate presentavano livelli di attività della fosfatasi alcalina leucocitaria superiori alla norma; già dopo il primo ciclo di CT tali livelli di attività enzimatica erano superiori nelle pazienti che avevano ricevuto stimolazione con fattore di crescita rispetto a quelli osservati nei pazienti trattati con sola CT, ma in modo significativo solo per il gruppo trattato con PEGFILGRASTIM ($p=0.0015$, figura 6). Inoltre la maggior parte delle pazienti che avevano ricevuto il FILGRASTIM e tutte le pazienti trattate con PEGFILGRASTIM mostravano livelli di attività della FAL superiori alla norma durante tutto il periodo di trattamento. Infine, il livello di attività della FAL risultava significativamente aumentato rispetto al basale sin dalla prima somministrazione del fattore di crescita, raggiungendo la significatività statistica solo nel gruppo trattato con PEGFILGRASTIM ($p<0.0001$, figura 7).

Nei soggetti che avevano ricevuto la sola chemioterapia non abbiamo osservato né riduzione né aumento significativi di tali livelli di attività enzimatica.

Outcome clinico

Dal punto di vista clinico non abbiamo registrato né eventi infettivi chemioterapia-correlati né particolari effetti collaterali imputabili all'assunzione del fattore di crescita granulocitario.

Correlazioni tra i parametri

Mentre nelle pazienti che avevano ricevuto la sola CT ed in quelle stimulate con FILGRASTIM non si sono evidenziate particolari associazioni tra i

parametri analizzati, nel gruppo di soggetti a cui era stato somministrato il fattore di crescita peghilato abbiamo osservato che il numero assoluto di neutrofili circolanti risultava essere indipendente dai livelli di apoptosi ($p=0.20$ e $R=0.17$), e significativamente correlato alla percentuale di elementi immaturi periferici ($p<0.0001$ e $R=0.51$) ed ai livelli di attività della FAL ($p=0.0134$ e $R=0.31$). Inoltre l'indice apoptotico risultava tendenzialmente correlato alla percentuale di neutrofili con anomala organizzazione dell'actina polimerica ($p=0.06$ e $R=0.31$, figura 8).

DISCUSSIONE

La neutropenia è una complicanza frequente e spesso dose-limitante dei trattamenti chemioterapici. I fattori di crescita granulocitari accelerano la risalita dei neutrofili durante la chemioterapia permettendo una diminuzione dell'incidenza della neutropenia febbrile, una riduzione delle ospedalizzazioni e dell'utilizzo di terapie antibiotiche ed aumentano la possibilità di somministrare i trattamenti alle dosi e nei tempi pianificati [11]. Il principale meccanismo d'azione del fattore di crescita granulocitario G-CSF consiste nell'aumento della produzione e della maturazione dei granulociti dai precursori mieloidi midollari [18]. Tuttavia molti autori suggeriscono che la neutrofilia mediata dalle citochine non è semplicemente dovuta alla stimolazione dell'emopoiesi: i fattori di crescita granulocitari, infatti, possono anche ritardare la morte spontanea per apoptosi dei granulociti, aumentandone di conseguenza la sopravvivenza in circolo. La spiegazione di questo effetto antiapoptotico non è chiara: potrebbe dipendere dalla up- o down-regolazione di molecole apoptosi-relate, specialmente quelle coinvolte nel *pathway* intrinseco mitocondriale [19].

Recentemente un coniugato covalente polietilenglicole del G-CSF ricombinante (PEGFILGRASTIM) è stato introdotto nella pratica clinica per il trattamento della neutropenia indotta da chemioterapia [14]; l'aumentato tempo di eliminazione dovuto alla diminuzione della *clearance* rende sufficiente una sola somministrazione di tale stimolante per ciclo chemioterapico [15]. I dati sugli effetti biologici del PEGFILGRASTIM sono attualmente ancora molto pochi. Noi abbiamo studiato alcuni di tali effetti all'interno di due studi clinici volti a valutare l'utilità clinica di questo fattore di crescita all'interno di regimi chemioterapici *dose-dense* nel trattamento neoadiuvante ed adiuvante del carcinoma della mammella. Clinicamente, dopo stimolazione con G-CSF, abbiamo osservato in tutte le pazienti arruolate, senza differenze tra forma peghilata e non, un aumento del numero assoluto dei neutrofili, stabile per tutta la durata del trattamento e nessun evento infettivo. Come atteso, il trattamento chemioterapico induceva apoptosi nei neutrofili circolanti. Tuttavia, in tutte le pazienti trattate con fattore di crescita granulocitario, specie nei soggetti a cui era stata somministrata la forma peghilata, abbiamo notato una riduzione del tasso di apoptosi in confronto a quanto osservato nel gruppo di controllo costituito da pazienti che avevano ricevuto la sola chemioterapia standard. Apparentemente questo effetto sulla sopravvivenza dei neutrofili era dovuto non solo all'aumento di cellule circolanti immature, ma anche ad una riduzione dell'apoptosi delle cellule giunte a completa maturazione, ipotesi sostenuta anche dall'evidenza di un significativo aumento dell'attività della fosfatasi alcalina leucocitaria, enzima che può essere considerato un *marker* dell'ultimo stadio di differenziazione mieloide. In modo interessante inoltre abbiamo osservato che, nella maggior parte dei neutrofili stimolati dal

fattore di crescita, ed in particolare dal PEGFILGRASTIM, erano presenti anomalie nell'assemblaggio dell'actina polimerica, alterazioni indicative di cambiamenti nell'organizzazione della struttura del citoscheletro. Queste osservazioni sono in linea con i dati riportati in letteratura, in cui si evidenziano cambiamenti della struttura del citoscheletro ed altre alterazioni morfologiche e biochimiche dei neutrofilii circolanti indotte dalla somministrazione *in vivo* di G-CSF [20, 21].

Riassumendo, le osservazioni raccolte dal nostro studio suggeriscono che, oltre a stimolare il midollo emopoietico per la produzione di nuovi elementi maturi da immettere in circolo, il PEGFILGRASTIM interviene anche sulla sopravvivenza dei neutrofilii periferici riducendone il tasso di apoptosi. Inoltre si può ipotizzare che vi sia una relazione diretta tra l'apoptosi farmaco-indotta e le alterate funzioni del citoscheletro, ipotesi sostenuta dall'evidenza di una correlazione tendenzialmente positiva tra indice apoptotico e anomala distribuzione dell'actina polimerica. Tuttavia sono necessarie ulteriori indagini volte a chiarire la relazione tra queste anomalie e la funzionalità, ed eventualmente la sopravvivenza, cellulare.

Gruppo di trattamento	Basale	Dopo il I ciclo di CT
<i>Controlli</i>	9±2,3% (3-14%)	--
<i>Solo CT</i>	7±0,6% (1-11%)	27±8,6% (3-49%)
<i>PEGFILGRASTIM</i>	7±1,8% (0-12%)	18±5,9% (1-23%)
<i>FILGRASTIM</i>	8±1,4% (2-12%)	12±5,4% (3-26%)

Tabella 1. Indice apoptotico basale e appena prima del II ciclo di CT nei diversi gruppi di trattamento (media±errore standard e *range*).

<i>Gruppo di trattamento</i>	<i>Basale</i>	<i>Dopo il I ciclo di CT</i>
<i>Controlli</i>	12±2,7% (5-18%)	--
<i>Solo CT</i>	18±3,7% (6-33%)	23±2,6% (7-31%)
<i>PEGFILGRASTIM</i>	16±3,6% (1-29%)	32±8% (8-76%)
<i>FILGRASTIM</i>	12±1,4% (7-15%)	24±5,2% (15-44%)

Tabella 2. Percentuale di neutrofili circolanti con anomala disposizione della F-acitina basale e appena prima del II ciclo di CT nei diversi gruppi di trattamento (media±errore standard e range).

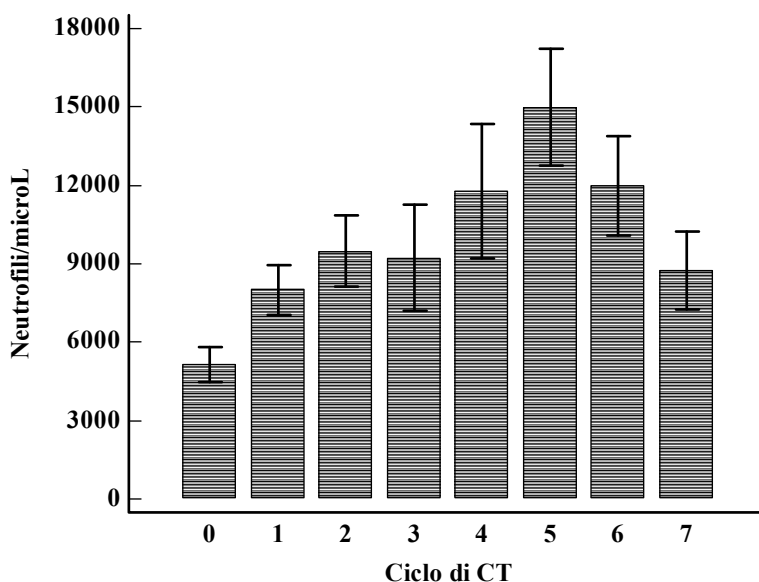


Figura 1. Variazioni (media±errore standard) del numero assoluto di neutrofili circolanti nel gruppo di pazienti trattate con PEGFILGRASTIM.

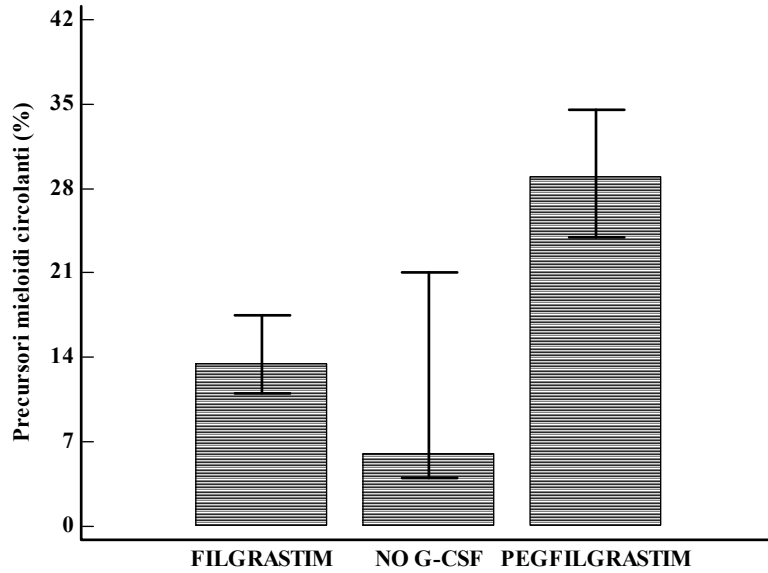


Figura 2. Percentuale di precursori mieloidi circolanti (media±errore standard) nei diversi gruppi di trattamento appena prima del II ciclo di CT ($p=0.0141$).

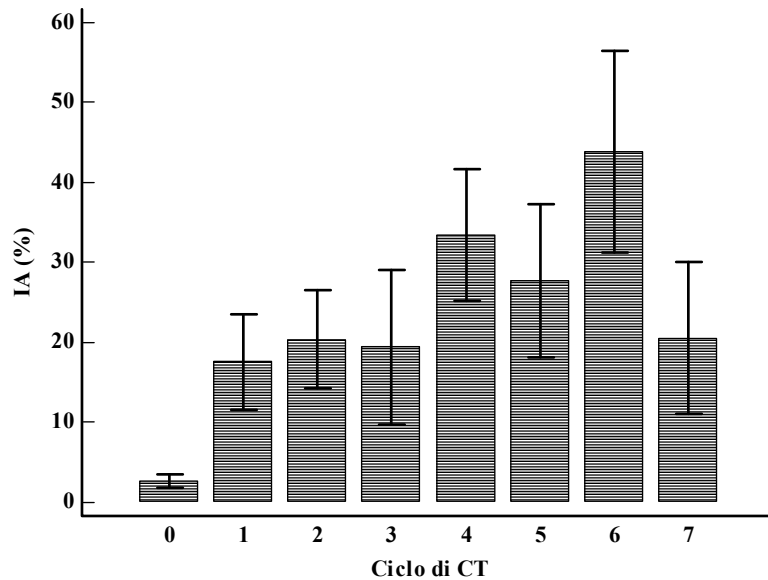


Figura 3. Variazioni (media±errore standard) dei livelli di apoptosi nei neutrofilii circolanti nel gruppo di pazienti trattate con PEGFILGRASTIM.

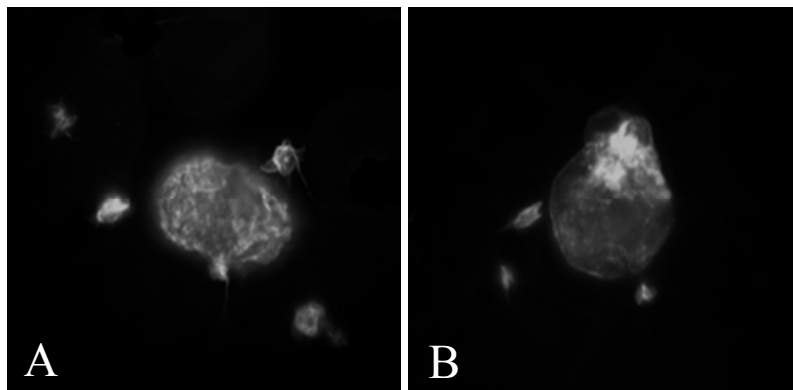


Figura 4. Distribuzione normale (A) ed anomala (B) della F-actina in neutrofilo circolanti.

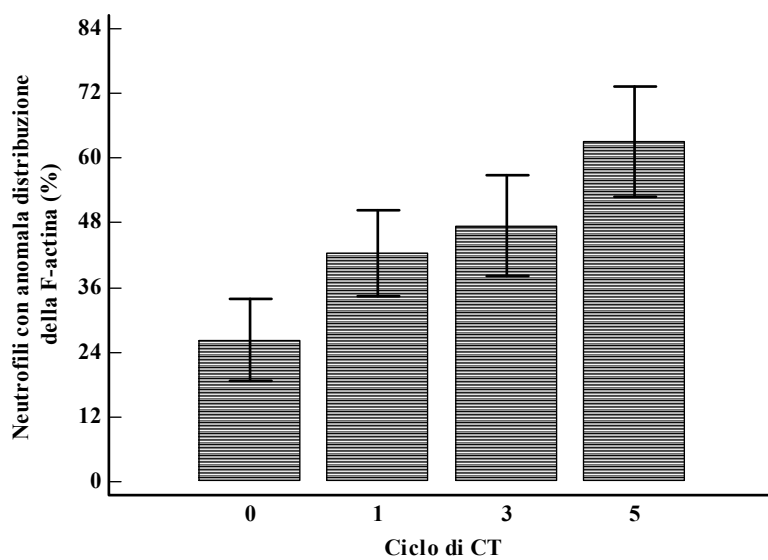


Figura 5. Variazioni (media+errore standard) della quota di neutrofilo circolanti con anomala distribuzione dell'actina polimerica nel gruppo di pazienti trattate con PEGFILGRASTIM.

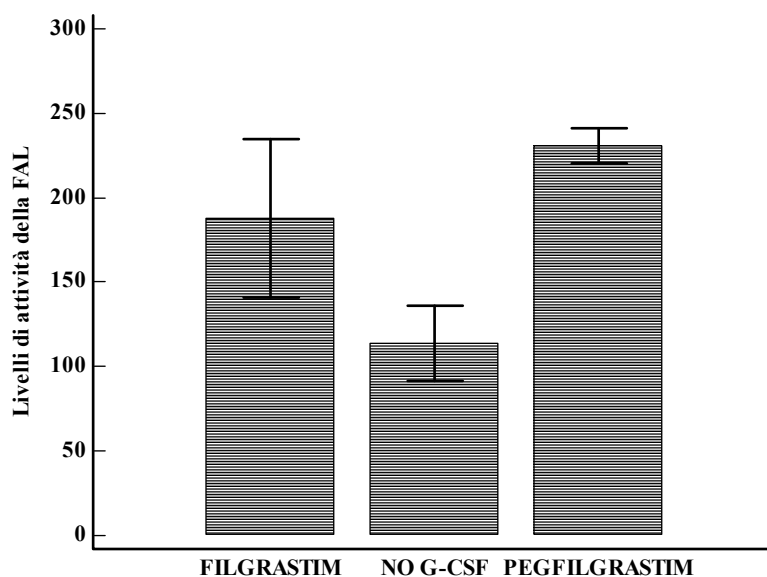


Figura 6. Livelli di attività della FAL (media±errore standard) nei diversi gruppi di trattamento appena prima del II ciclo di CT (p=0.0066).

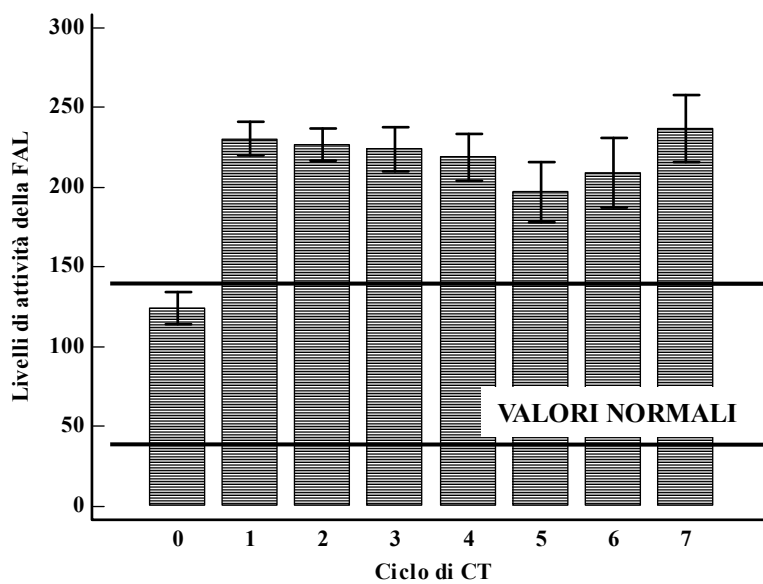


Figura 7. Variazioni (media±errore standard) dei livelli di attività della FAL nel gruppo di pazienti trattate con PEGFILGRASTIM.

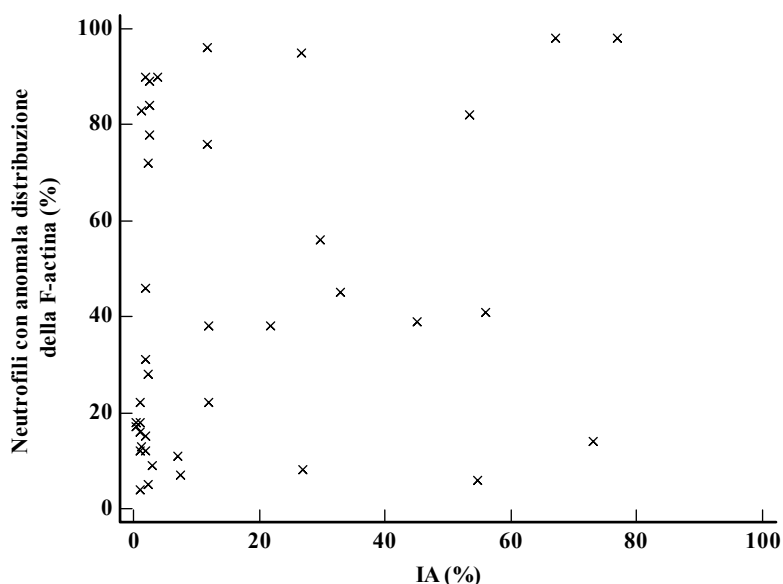


Figura 8. Correlazione tra percentuale di neutrofili circolanti con anomala distribuzione dell'actina polimerica e indice apoptotico nel gruppo di pazienti trattate con PEGFILGRASTIM.

RIASSUNTO

Il PEGFILGRASTIM, coniugato covalente polietilenglicole del fattore di crescita granulocitario FILGRASTIM, è caratterizzato da un'emivita più lunga dovuta ad una ridotta *clearance*. Scarse sono ancora le conoscenze circa gli effetti biologici di tale fattore di crescita. Nel nostro centro sono in corso due Studi Clinici Multicentrici volti a valutare gli effetti del PEGFILGRASTIM nell'ambito di regimi chemioterapici dose-dense in pazienti affette da carcinoma mammario in ambito adiuvante e neoadiuvante. Noi ci siamo proposti di studiare alcuni parametri dei neutrofili periferici di 17 pazienti arruolate nei due studi, e di confrontare i risultati con quelli ottenuti in 7 pazienti trattate con FILGRASTIM, in 6 pazienti che avevano ricevuto la sola CT ed in 5 soggetti sani. In particolare sugli strisci di sangue periferico e di globuli bianche arricchiti dopo

sedimentazione delle pazienti eseguiti in condizioni basali e prima di ogni ciclo chemioterapico, abbiamo voluto studiare i seguenti parametri: il numero assoluto di neutrofili circolanti ed eventuali anomalie morfologiche a loro carico, la presenza di precursori mieloidi immaturi in circolo, i livelli di apoptosi, la maturazione mieloide tramite l'attività della fosfatasi alcalina e l'organizzazione del citoscheletro mediante la distribuzione dell'actina polimerica. Il nostro scopo era quello di valutare gli effetti del PEGFILGRASTIM in pazienti sottoposte a chemioterapia.

Dopo stimolazione con G-CFS, e specie con il PEGFILGRASTIM, in tutte le pazienti abbiamo osservato un aumento del numero assoluto di neutrofili periferici e della percentuale di precursori mieloidi circolanti, aumento rimasto stabile durante tutto il periodo di trattamento. Non abbiamo osservato alterazioni displastiche significative né registrato eventi infettivi o particolari effetti collaterali. L'indice apoptotico dei neutrofili periferici aumentava in tutte le pazienti che avevano ricevuto la chemioterapia, ma in minor misura in quelle trattate anche con fattore di crescita, specie in quelle trattate con PEGFILGRASTIM. Inoltre, nelle pazienti stimulate con G-CSF, sia l'attività della fosfatasi alcalina che la percentuale di neutrofili con anomala distribuzione della F-actina risultavano significativamente aumentate rispetto alle condizioni basali. Queste differenze erano più marcate nel gruppo di soggetti trattati con PEGFILGRASTIM.

In conclusione i nostri risultati suggeriscono che il PEGFILGRASTIM può migliorare la funzionalità dei neutrofili periferici nelle pazienti sottoposte a chemioterapia; tale fattore di crescita, oltre a stimolare il midollo emopoietico per la produzione di nuovi elementi maturi da immettere in circolo, interviene anche sulla sopravvivenza dei neutrofili periferici

riducendone il tasso di apoptosi. Inoltre si può ipotizzare che vi sia una relazione diretta tra l'apoptosi farmaco-indotta e le alterate funzioni del citoscheletro, ipotesi sostenuta dall'evidenza di una correlazione tendenzialmente positiva tra indice apoptotico e anomala distribuzione dell'actina polimerica. Tuttavia sono necessarie ulteriori indagini volte a chiarire la relazione tra queste anomalie e la funzionalità, ed eventualmente la sopravvivenza, cellulare.

SUMMARY

Pegfilgrastim is a covalent conjugate of filgrastim and polyethylene glycol with an increased elimination half-life due to decreased serum *clearance*. Few data are available on biological effects of pegylated granulocyte colony-stimulating factor. At our center two clinical trials are currently ongoing that will further evaluate pegfilgrastim utilized in dose-dense regimens for breast cancer patients both as neoadjuvant and adjuvant approach. We analyzed some parameters in peripheral neutrophils of 17 patients enrolled in two different dose-dense multicenter clinical trials, of 7 patients who received FILGRASTIM stimulation, of 6 patients who only received chemotherapy and of 5 healthy subjects. On peripheral blood and peripheral blood buffy coat smears obtained before starting treatment and immediately before each chemotherapy course we analyzed the following parameters: peripheral neutrophils absolute number and their dysplastic change, myeloid precursor and immature neutrophil peripheral presence, apoptotic index, alkaline phosphatase activity and actin polymerization. Our aim was to evaluate the influence of PEGFILGRASTIM on these biological features in patients exposed to chemotherapy.

After stimulation with G-CSF, especially with PEGFILGRASTIM, in all patients we observed: stability of the absolute neutrophil count and of myeloid precursor percentage for the whole duration of treatment and no infectious events or adverse effects. After chemotherapy courses we observed neutrophil dysplastic change of mild entity. After chemotherapy courses we observed a less increased neutrophil apoptosis rate and a significant increase, in comparison with basal condition, of alkaline phosphatase activity and of abnormalities of actin assembly in neutrophils in patients who received G-CSF stimulation, especially in PEGFILGRASTIM-group.

In conclusion, these results suggest that PEGFILGRASTIM may improve the neutrophil function in patients with cancer exposed to chemotherapy by stimulating bone marrow myeloid precursors and inhibiting the accelerated drug-induced apoptosis. Besides, a direct relationship between drug-induced apoptosis and altered cytoskeletal functions could be hypothesized, since a tendential positive correlation was found between neutrophil AI and actin polymerization. However, the influence of these abnormalities on cell functional activity as well as, possibly, on cell survival remains to be elucidated.

BIBLIOGRAFIA

1. Weinmann P, Scharffetter-Kochanek K, Forlow SB et al. A role for apoptosis in the control of neutrophil homeostasis in the circulation: insights from CD18-deficient mice. *Blood* 2003;101:739-746
2. Wesche DE, Lomas-Neira JL, Perl M et al. Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *J Leukoc Biol* 2005;78:325-337
3. Akgul C, Moulding DA, Edwards SW. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Letters* 2001;487:318-322
4. Colott F, Re F, Polentarutti N et al. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 1992;80:2012-2020

5. Chucklovin A. Enhanced ex vivo apoptosis of peripheral granulocytes is a sufficient factor of neutropenia following myeloablative chemotherapy. *Leuk Res* 2000;24:507-509
6. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994;73:2013-2026
7. Hannun AY. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood* 1994;89:1845-1853
8. Kaufmann HS, Earnshaw CW. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 2000;256:42-49
9. Schmitt AC, Lowe WS. Apoptosis and therapy. *J Pathol* 1999;187:127-137
10. Kimhi O, Drucker L, Neumann A et al. Fluorouracil induces apoptosis and surface molecule modulation of peripheral blood leukocytes. *Clin Lab Haematol* 2004;26:327-333
11. Morstyn G, Campbell L, Souza LM et al. Effect of granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia induced by cytotoxic chemotherapy. *Lancet* 1988;1:667-672
12. Adachi S, Kubota M, Lin YW et al. In vivo administration of granulocyte colony-stimulating factor promotes neutrophil survival in vitro. *Eur J Haematol* 1994;53:129-134
13. Molloy EJ, O'Neill A, Grantham JJ et al. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor have differential effects on neonatal and adult neutrophil survival and function. *Ped Res* 2005;57:806-812
14. Molineux G, Kinstler O, Briddell B et al. A new form of Filgrastim with sustained duration in vivo and enhanced ability to mobilize PBPC in both mice and humans. *Exp Hematol* 1999;27:1724-1734
15. Holmes FA, O'Shaughnessy JA, Vukelja S et al. Blinded randomized multicenter study to evaluate single administration pegfilgrastim once cycle versus daily filgrastim as an adjunct to chemotherapy in patients with high risk stage II or stage III/IV breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:727-731
16. Green MD, Koelbl H, Baselga J et al. A randomized double-blind multicenter phase III study of fixed-dose single-administration pegfilgrastim versus daily filgrastim in patients receiving myelosuppressive chemotherapy. *Ann Oncol* 2003;14:29-35
17. Hayhoe FGJ, Quaglino D. Cytochemical demonstration and measurement of leucocyte phosphatase activity in normal and pathological states by modified azo-dye coupling techniques. *Br J Haematol* 1958;4:375-389

18. Gabrilove JL. Introduction and overview of hematopoietic growth factors. *Semin Hematol* 1989;26:1-4
19. Maianski NA, Roos D, Kuijpers TW, Bid truncation, Bid/Bax targeting to the mitochondria, and caspase activation associated with neutrophil apoptosis are inhibited by granulocyte colony-stimulating factor, *J Immunol*, 2004, 172:7024-7030
20. Mattii L, Azzarà A, Fazzi R et al. Glycosylated or non-glycosylated G-CSF differently influence human granulocyte functions through RhoA. *Leuk Res* 2005;29:1285-1292
21. Carulli G, Mattii L, Azzarà A et al. Actin polymerization in neutrophils from donors of peripheral blood stem cells: divergent effects of glycosylated and nonglycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Am J Hematol* 2006; 81:318-323