

L'INIZIO DELLA STORIA

Novembre 1844

John Mentheit, 28 anni, viene ricoverato all'ospedale di Edinburgo.

Sintomi principali: indebolimento progressivo, febbre e rigonfiamento addominale.

Curato con applicazione di sanguisughe e purganti viene dimesso

ma ben presto viene ricoverato nuovamente e muore il 15 marzo 1845.

Il dr. John Hughes Bennet esegue l'autopsia e descrive il caso in un lavoro che viene pubblicato il 1 ottobre 1845 con il titolo: *Su un caso di ipertrofia della milza e del fegato in cui la morte ebbe luogo per suppurazione del sangue.*

Marzo 1845

Marie Stride, 50 anni, viene ricoverata all'ospedale della Charitè a Berlino.

Sintomi principali: indebolimento e malessere da quattro anni, tumefazione dell'addome.

La paziente muore quattro mesi dopo e il dr. Rudolph Virchow esegue l'autopsia e descrive il caso in un breve lavoro pubblicato nel novembre del 1845, sei settimane dopo quello di Bennet.

Il titolo è: *Sangue bianco.*

Entrambi gli autori sottolineano che i vasi sanguigni sono pieni di qualcosa di simile al pus. Nasce così nell'autunno del 1845 la conoscenza di una entità morbosa caratterizzata da una peculiare alterazione del sangue nella quale i globuli bianchi aumentano grandemente il loro numero conferendo al sangue un colorito grigiastro simile a quello del pus.





DA UNA MALATTIA DEL SANGUE A UNA MALATTIA DEL MIDOLLO

1856

Virchow riassume in un fondamentale lavoro i suoi studi sulla leucemia, sottolineando che l'aumento dei globuli bianchi non è, preso a sé, una malattia, mentre la leucemia è una condizione apparentemente autonoma, progressiva, caratterizzata non solo da un aumento dei globuli bianchi nel sangue ma quasi sempre da un ingrossamento del fegato e della milza.

Egli propone inoltre di distinguere due forme principali di leucemia, una linfatica ed una splenica, che doveva poi essere riconosciuta come mieloide.

1857

Nikolaus Friedreich, patologo di Wurzburg, descrive il caso di un paziente di 46 anni che era andato da lui 6 settimane prima della sua morte. La rapidità dell'evoluzione ed i reperti autoptici lo inducono a pensare che si possa trattare di una leucemia in forma acuta.

Ma devono passare più di 20 anni prima che Ebstein (1879) confermi su più ampia casistica l'esistenza di una leucemia acuta.

1868-1872

Ernest Neumann, patologo di Königsberg, giunge alla conclusione che sia i globuli rossi che i globuli bianchi hanno origine nel midollo osseo e che la leucemia è una malattia del midollo osseo.

Negli stessi anni Giulio Bizzozzero, un medico ventiduenne di Pavia, giunge alla conclusione che i globuli rossi, cellule prive di nucleo, provengono da precursori nucleati presenti nel midollo osseo dove si formano anche i globuli bianchi. Bizzozzero poi arriverà ad identificare il terzo tipo di componente cellulare del sangue, le piastrine.



INIZIA L'ERA MORFOLOGICA DELLA EMATOLOGIA

1880

Paul Herlich pubblica un lavoro in cui mette in luce che nel sangue esistono cinque diversi tipi di leucociti, tre con nucleo plurilobato e due con nucleo unico.

Il citoplasma di quelli con il nucleo plurilobato (polinucleati) contiene granuli con affinità variabile per i coloranti: alcuni hanno affinità scarsa (neutrofili), altri hanno spiccata affinità per i coloranti acidi come l'eosina (eosinofili) altri ancora hanno affinità per i coloranti basici come il blu di metilene (basofili). Ehrlich distingue anche i due tipi di mononucleati in linfociti e monociti.

Nasceva così l'epoca morfologica dell'ematologia e si poteva stabilire con chiarezza che le leucemie a decorso cronico sono mieloidi o linfatiche, mentre quelle acute venivano considerate linfatiche, presentando nel sangue solo cellule mononucleate.

Solo dopo molti anni, e molte polemiche, veniva riconosciuto che una parte delle leucemie acute è mieloide. Ma già Ehrlich stesso, e molto di più gli studiosi che vennero dopo, furono coinvolti in un dibattito relativo all'esistenza di una cellula emopoietica primitiva pluripotente, oggi identificabile come staminale, che Ehrlich identificava nel linfocita.



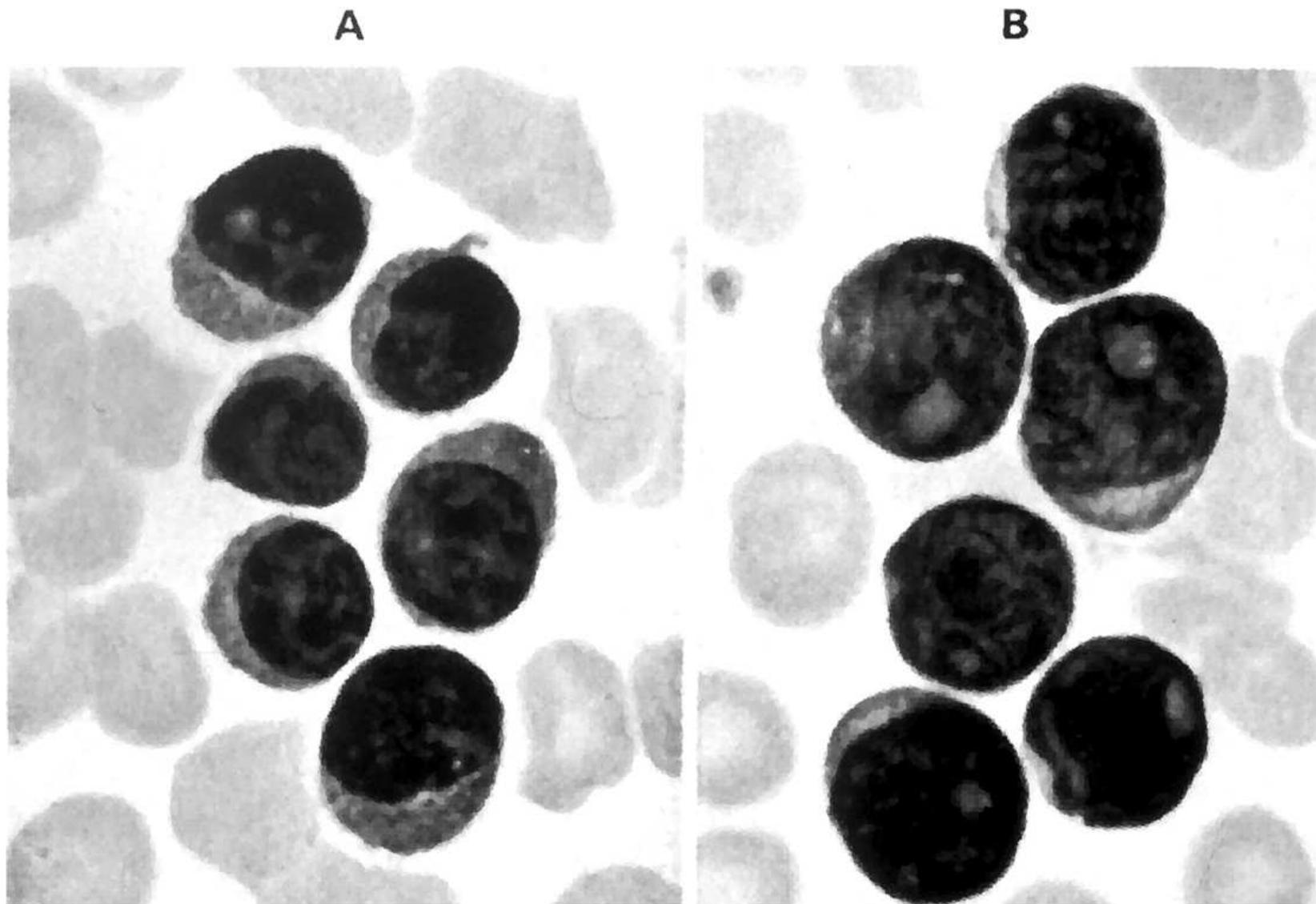


Figura 5 - A) Linfociti maturi. B) Linfoblasti di un
dell'adulto. E' facile rendersi conto di come fosse difficile distinguerli, tenendo conto
dei metodi di colorazione e degli strumenti disponibili alla fine del XIX secolo.

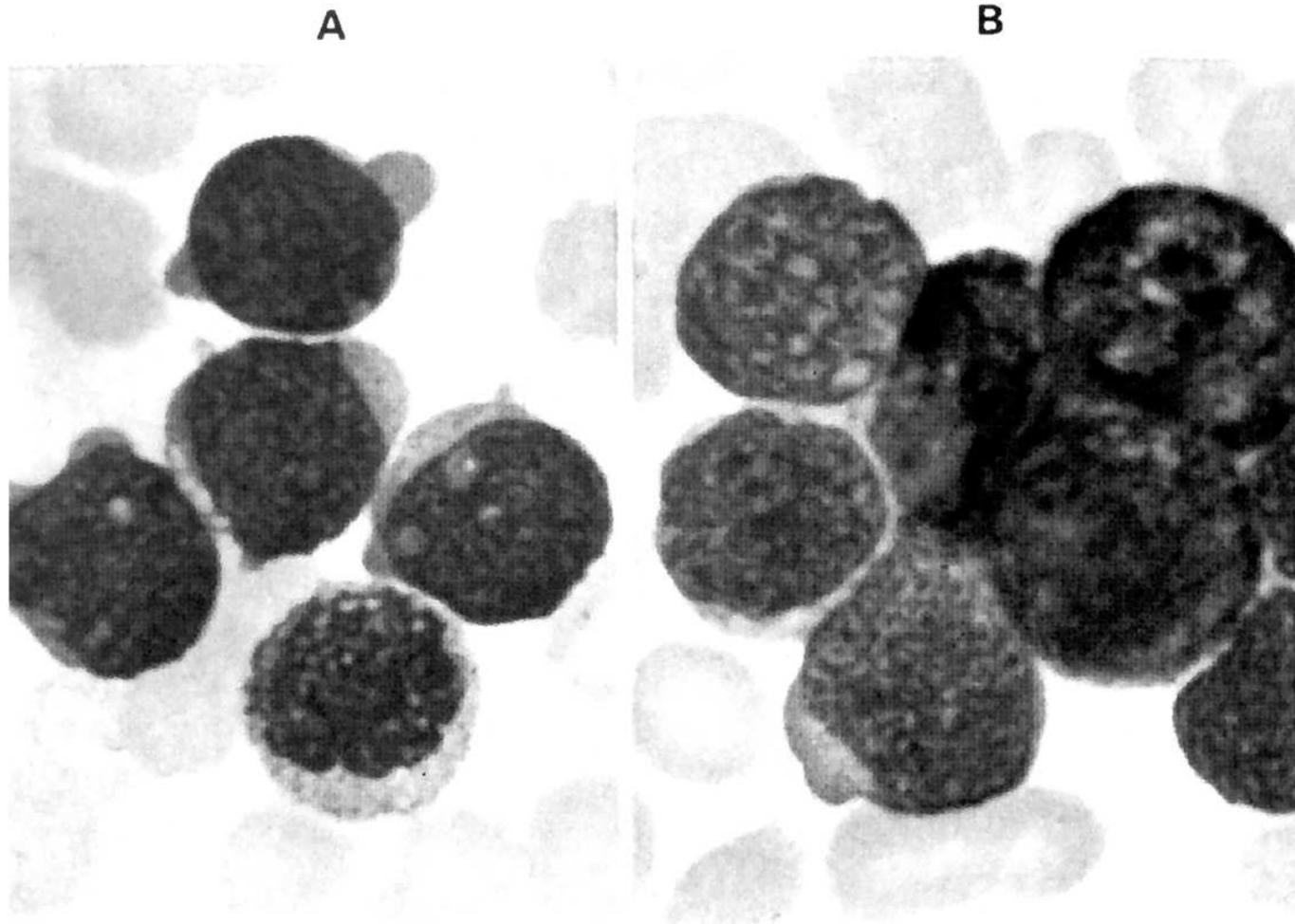


Figura 6 - A) Mieloblasti di un caso di leucemia acuta mieloide dell'adulto. Anche in questo caso è facile rendersi conto di come fosse difficile, per gli ematologi della fine del XIX secolo, distinguerli dalle cellule linfoidi della figura precedente. B) Cellule dello stesso caso colorate con la reazione per le parossidasi. E' evidente la grande utilità della reazione per distinguere i mieloblasti più "matu

LA RIPOPOLAZIONE DEI TESSUTI EMOPOIETICI

Il principio informatore di tutte le esperienze di questo tipo è il seguente: la morte di un animale di laboratorio esposto ad una panirradiazione letale deve essere attribuita, entro determinate e ben definite condizioni di esperimento alla completa distruzione dei suoi tessuti emopoietici e alle conseguenze infettive ed emorragiche determinatesi.

Pertanto, ottenere la sopravvivenza degli animali significa ottenere la ripopolazione precoce dei tessuti emopoietici e in queste condizioni parlare di sopravvivenza equivale a parlare di ripopolazione ematopoietica.

Jacobson e coll. dimostrarono per primi nel 1949 che proteggendo con uno scudo di piombo la milza esteriorizzata dall'addome dell'animale si otteneva il salvataggio del 70% dei topi irradiati con una dose letale e poco tempo dopo venne dimostrato che lo stesso effetto si poteva ottenere proteggendo un femore. Ma particolare rilievo ebbero le osservazioni di Lorenz e coll. che dimostravano che la somministrazione di sospensioni di midollo osseo a topi irradiati con dosi letali ne permetteva la sopravvivenza in notevole percentuale. Le esperienze di protezione dal danno da radiazioni hanno così avuto una grande importanza per lo sviluppo dell'ematologia, rappresentando la base su cui si sarebbe sviluppata la teoria e la pratica del trapianto di midollo, che tanta importanza hanno avuto per la terapia delle leucemie.

Ma il risultato forse più importante fu che da queste esperienze nacque la domanda fondamentale: che tipo di cellula è in gioco in questo processo?

E agli studiosi divenne ben presto evidente che non poteva che trattarsi di cellule altamente indifferenziate.

I LEUCOCITI DEL SANGUE PERIFERICO SONO IN GRADO DI RIPOPOLARE IL MIDOLLO DI ANIMALI IRRADIATI

Validissime prove dell'esistenza di cellule altamente indifferenziate ma *pluripotenti* vennero dalle esperienze dirette a provare che cellule capaci di ripopolare il midollo si trovano anche nel sangue periferico.

Già nel 1951 Brecher e Cronkite avevano dimostrato che la rigenerazione ematopoietica nei ratti irradiati viene accelerata se gli animali sono posti in parabiosi con animali normali, cioè se i loro apparati circolatori sono resi comunicanti.

La ripopolazione dei tessuti emopoietici può ottenersi anche irradiando in rapida successione le due metà del corpo, in modo che una parte del sangue sfugga all'irradiazione. Che anche in queste esperienze sia in gioco un meccanismo di ripopolazione cellulare da parte di leucociti circolanti venne confermato da diverse brillanti esperienze.

Ad esempio Merwin dimostrò che iniettando sangue di animali con leucocitosi elevata in topi resi aplastici dall'irradiazione, dopo poco tempo la maggior parte delle cellule midollari è del tipo del donatore.

Popp dimostrò che leucociti di sangue normale possono dare origine a eritrociti maturi se iniettati ad animali irradiati.

È quindi evidente che posto che la più diretta conseguenza osservabile, cioè una rapida ripopolazione dei tessuti emopoietici, è identica ed ha luogo con identiche modalità,

tutti i dati resi noti inducevano a ritenere che il meccanismo del fenomeno fosse simile, sia che si iniettassero sospensioni di cellule spleniche o midollari sia che si iniettassero leucociti periferici.

LA TECNICA DELLE COLONIE SPLENICHE

Nel 1961 Till e McCulloch mettevano a punto una tecnica che rappresentava un grande passo avanti nella dimostrazione dell'esistenza di cellule staminali in una popolazione di cellule ematiche.

La loro tecnica consiste essenzialmente nel preparare una sospensione monocellulare di cellule midollari e iniettarla nella vena caudale di topi irradiati con dosi letali di radiazioni.

Dopo vari intervalli di tempo (da 8 a 15 giorni) gli animali vengono sacrificati e si prelevano le milze.

Si può allora vedere che alla superficie del viscere è comparsa una serie di noduli che vengono contati ed esaminati microscopicamente.

Si può così vedere che i noduli sono formati da granulociti e loro precursori, da eritroblasti e da megacariociti. Si tratta quindi di una popolazione di cellule mieloidi, originatesi da una singola cellula, evidentemente *pluripotente*. Studi ulteriori hanno dimostrato che

le colonie spleniche originano effettivamente da una singola cellula, sono cioè *clonali*. Il lavoro di Till e McCulloch rappresenta il punto di arrivo di un gran numero di esperienze di radioprotezione dimostrando direttamente l'esistenza di un elemento iniziale della filiera emopoietica.

Ma quel che è importante sottolineare a questo punto è che questa è la popolazione che è colpita dalla leucemia: è in questa minima frazione della popolazione leucocitaria che si verifica il disastroso evento della *trasformazione leucemica*. Anzi, in una sola cellula di questa popolazione. Fialkow e coll. sono stati i primi a dimostrare, negli anni intorno al 1970, che l'intera popolazione dei leucociti eritrociti e piastrine di un soggetto affetto da leucemia mieloide cronica è *clonale*, cioè originata da una sola cellula.

IL CROMOSOMA FILADELFIA

Nel 1960 due studiosi di Filadelfia, P. Nowell e D. Hungerford osservarono in due pazienti affetti da leucemia mieloide cronica una singolare anomalia:

il braccio lungo di uno dei cromosomi della coppia 21 o 22 era mancante dando luogo ad un piccolo cromosoma abnorme.

L'osservazione trovò rapida conferma, venne stabilito che questa anomalia era caratteristica della leucemia mieloide cronica e si accettò che il piccolo cromosoma fosse chiamato *cromosoma Philadelphia*.

Rimaneva da stabilire se questo cromosoma “nuovo” fosse da attribuire alla coppia 21 o alla coppia 22,

ma grazie alla introduzione della chinacrina come colorante dei cromosomi Caspersson nel 1970 poté stabilire che il cromosoma Philadelphia era un membro della coppia 22.

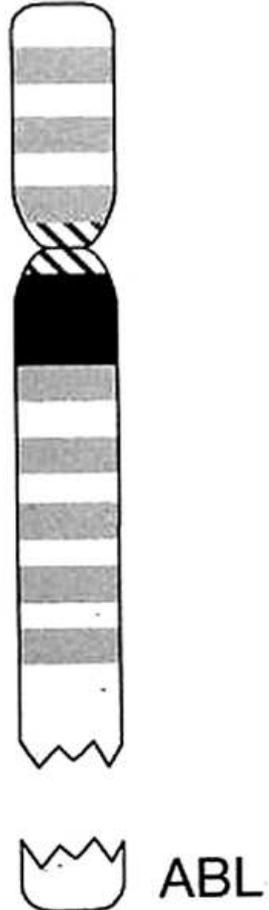
Un ulteriore decisivo passo avanti venne compiuto nel 1973 da una brillante studiosa statunitense, J.Rowley,

che poté stabilire che il materiale mancante del cromosoma 22 non era perduto dalla cellula ma era traslocato sul segmento terminale del braccio lungo del cromosoma 9, e che la quantità traslocata sul cromosoma 9 era approssimativamente equivalente a quella persa dal cromosoma 22, così da far pensare che potesse esserci stato uno scambio reciproco 9–22 e 22—9.

Successivamente i punti di rottura vennero localizzati sulla banda 34 del braccio lungo del 9 e sulla banda 11 del braccio lungo del 22, cosicché il classico cromosoma Ph+ si indica con (t9;22)(q34;q11).

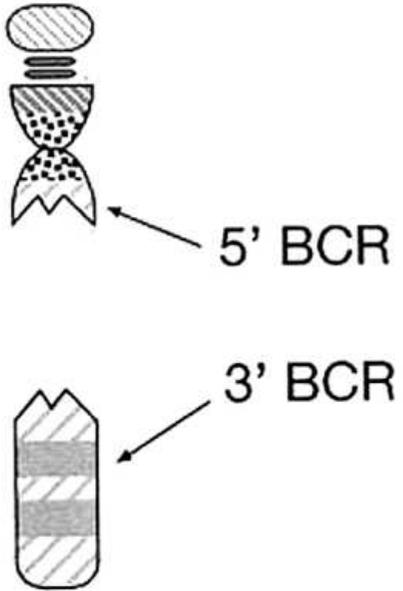


Normale

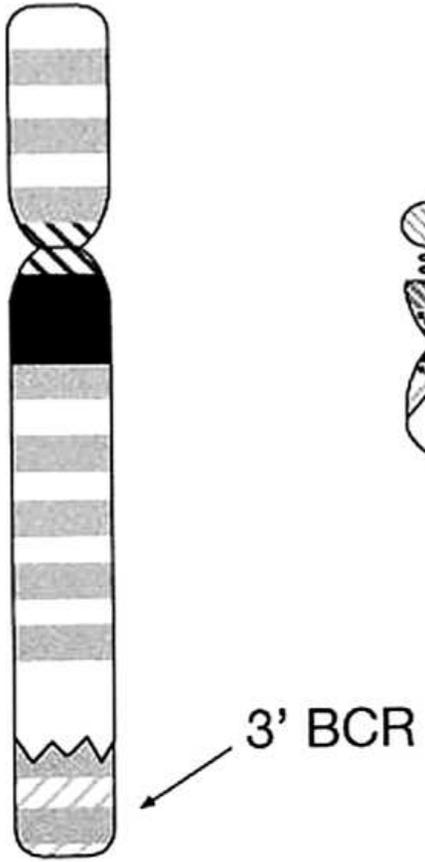


9

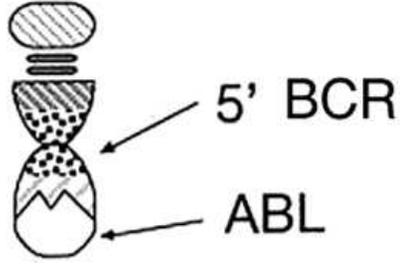
Leucemia



22



9q⁺



22q⁻

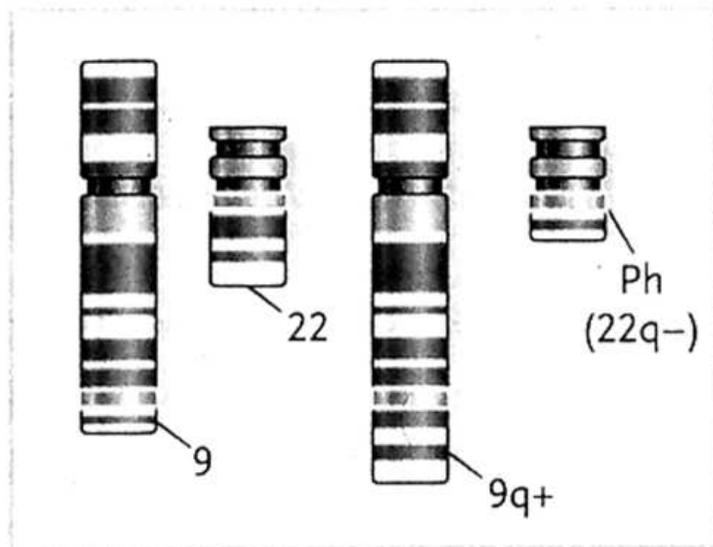
IL CONTENUTO GENICO DEL CROMOSOMA FILADELFIA

Nel 1982 Heisterkamp e coll. stabilirono che l'omologo cellulare umano (c-ABL) dell'oncogene del virus della leucemia di Abelson del topo (v-ABL) è localizzato sul cromosoma umano numero 9 e successivamente sempre gli stessi autori dimostrarono che ABL è situato sul segmento del cromosoma 9 che è traslocato sul cromosoma 22.

Venne inoltre dimostrato che i punti di rottura (breakpoints) sul cromosoma 9 sono raggruppati strettamente in una regione del primo tratto del gene ABL mentre i punti di rottura sul cromosoma 22 sono sparsi in una regione molto più ampia di un gene che proprio per questa ragione è stato chiamato BCR (Breakpoint Cluster Region).

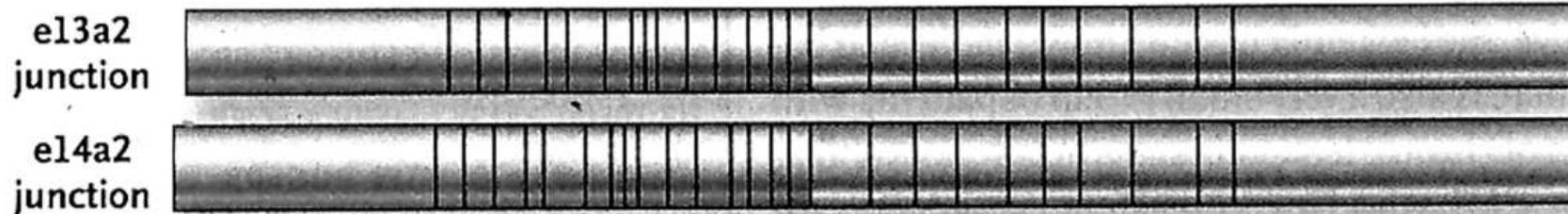
Infine, nel 1984-85 diversi autori dimostravano che nelle cellule della LMC si trova un messaggero che è trascritto dal nuovo *gene di fusione* prodotto dalla fusione della porzione di BCR rimasta sul cromosoma 22 con la porzione del gene ABL traslocata dal cromosoma 9.

Questo *messaggero chimerico* dà origine ad una proteina indicata con la sigla P210 che è una *tirosina chinasi*, cioè un enzima capace di legare un gruppo fosforico all'aminoacido tirosina di una proteina. Vista la stretta correlazione tra l'esistenza della malattia e la presenza di una iperattività tirosina chinasi venne quindi affacciata l'ipotesi che BCR-ABL sia sostanzialmente la causa della leucemia mieloide cronica. Le esperienze del gruppo di Baltimore e del gruppo di Heisterkamp alla fine degli anni '80 dimostrarono incontrovertibilmente che l'espressione di BCR-ABL nelle cellule midollari degli animali porta alla leucemia.

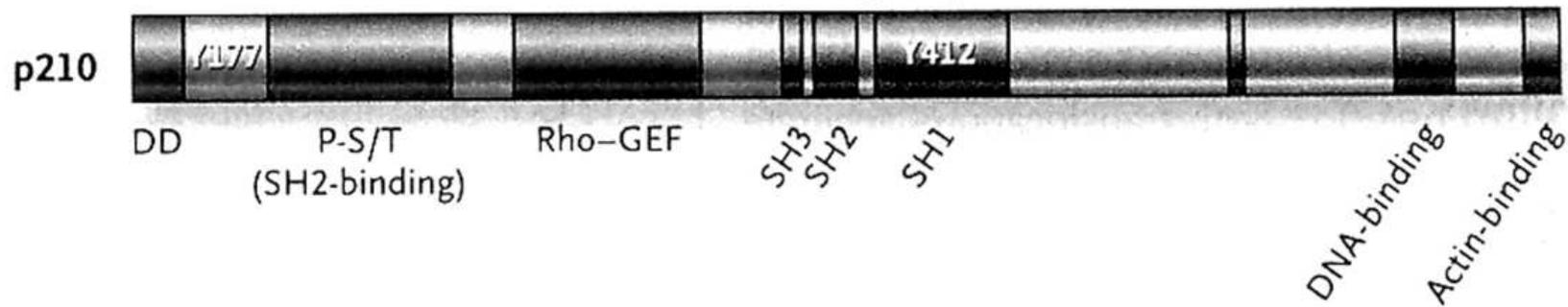


BCR-ABL oncogene
t(9;22)(q34;q11)

BCR-ABL mRNA transcripts



BCR-ABL oncoprotein



LE PROPRIETA' BIOLOGICHE DELLE CELLULE BCR-ABL+

I meccanismi principali sino ad oggi implicati nella
“trasformazione maligna” indotta da BCR-ABL sono tre:

- 1) *alterata adesione allo stroma cellulare e alla matrice extracellulare*
- 2) *un segnale mitogenico permanentemente attivo*
- 3) *la riduzione dell'attività apoptotica*

1) Alterazione delle proprietà adesive della cellula.

Tenendo conto che l'adesione allo stroma inibisce la proliferazione cellulare, è evidente che le cellule della LMC sfuggono a questo controllo proprio a causa della perdita di adesività. Esaminando poi quali proteine regolino l'adesione cellulare, si è visto che un ruolo importante svolgono le proteine indicate come *beta-integrine*.

Nella LMC le cellule esprimono una variante della beta-integrina che inibisce l'adesione e che non si trova nei progenitori normali.

2) Attivazione permanente del segnale mitogenico.

Si è visto sin dai primi studi sulla funzione della proteina P210 che la sua presenza nella cellula implica una attività continua del segnale mitogenico, cioè dello stimolo alla divisione cellulare.

BCR-ABL svolge la sua azione attraverso una via di protein-chinasi attivate da mitogeni, la più importante delle quali è quella rappresentata dall'oncogene RAS, che rimane permanentemente attivo e a sua volta attiva il gene RAF che inizia una catena di segnali che infine portano all'attivazione del macchinario trascrizionale della cellula.

3) Inibizione della apoptosi.

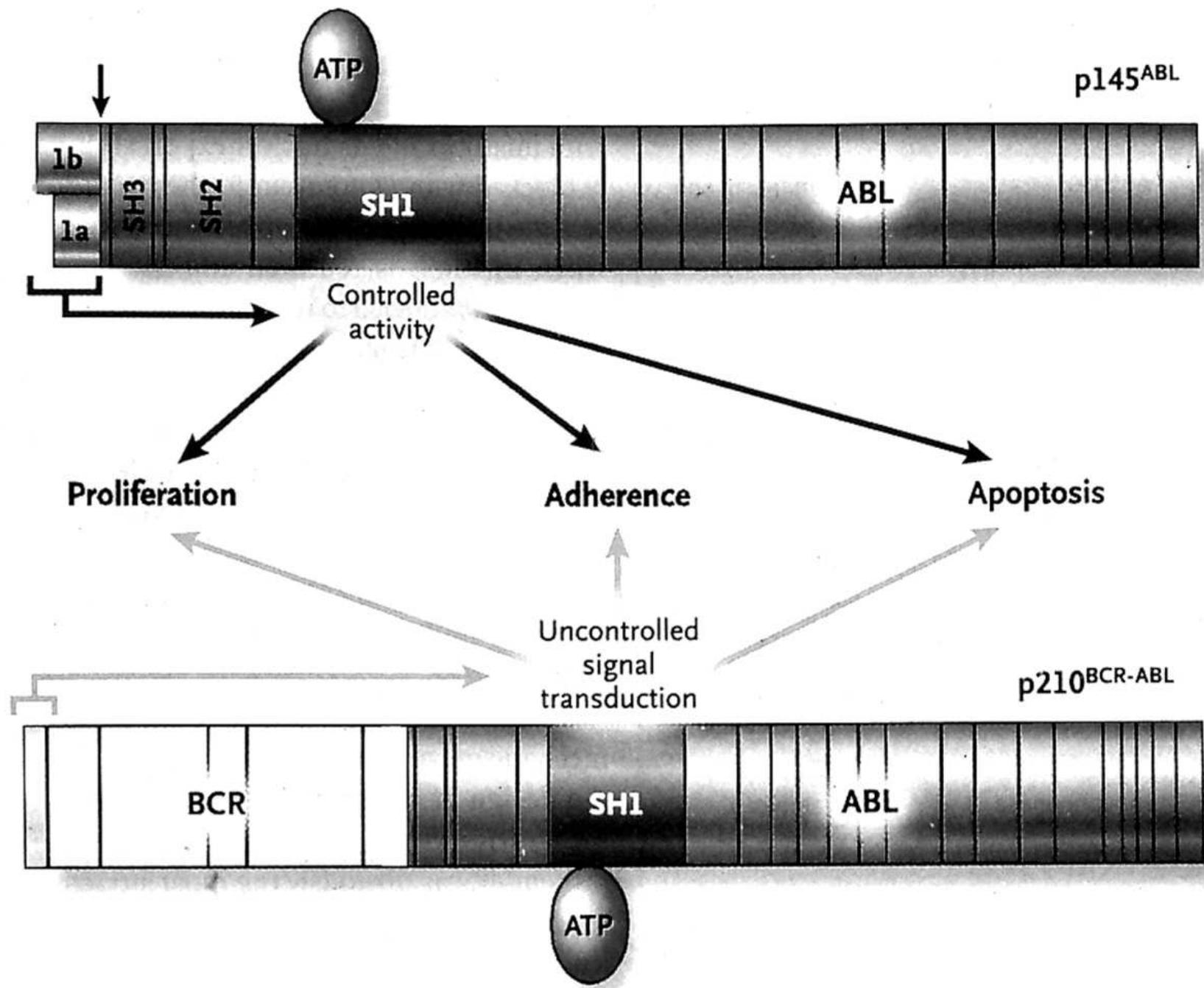
Conviene ricordare che l'apoptosi (*morte cellulare programmata*) è una modalità fisiologica di morte cellulare che assicura la eliminazione di elementi cellulari non più necessari all'organismo. In realtà, l'apoptosi è il processo fisiologico che assicura l'integrità di un tessuto normale tanto quanto la proliferazione cellulare. Infatti il processo apoptotico è sotto controllo genico e perciò può essere modulato attivamente e la sua soppressione può avere un ruolo determinante nella trasformazione neoplastica della cellula. Occorre tener presente che l'apoptosi di una cellula non danneggia le cellule adiacenti poiché le membrane cellulari rimangono intatte durante la morte, evitando così la perdita di materiale e l'intervento di cellule infiammatorie. Al contrario, la classica necrosi di solito coinvolge gruppi di cellule che in seguito alla perdita di energia e del normale controllo ionico si rigonfiano, vanno incontro alla perdita di ampie parti della membrana e degli organuli cellulari e si lisano, liberando nei tessuti cellulari enzimi che inducono una massiva risposta infiammatoria. Si è visto che l'espressione di ABL-BCR in linee cellulari umane e murine inibisce l'apoptosi, un effetto che è in stretto rapporto con l'attività chinasi ed è correlato all'attivazione di RAS.

Inoltre, parecchi studi hanno mostrato che le linee cellulari ABL-BCR positive sono resistenti all'apoptosi indotta dal danno al DNA.

I meccanismi biologici di questo fenomeno non sono del tutto chiariti.

ABL-BCR blocca il rilascio del citocromo C dai mitocondri e quindi inibisce l'attivazione delle *caspasi*, gli enzimi che determinano l'apoptosi.

In definitiva ABL-BCR agisce inibendo l'apoptosi mentre simultaneamente dà uno stimolo proliferativo.



LA SOLUZIONE DEL PROBLEMA

La proteina specifica responsabile della trasformazione maligna della cellula staminale ematopoietica è una tirosina-chinasi, cioè una proteina capace di attivare altre proteine legando alla loro molecola un gruppo fosforico PO₄.

Si pensò pertanto di cercare un composto chimico di piccole dimensioni che occupasse la piccola “tasca” nella molecola proteica di BCR-ABL che contiene il gruppo PO₄ stesso, inibendo la sua funzione bloccando le modifiche di forma dei substrati e quindi l'intera catena di reazioni a valle, inibendo la trasmissione del segnale oncogenico al nucleo.

La ricerca di una sostanza con queste caratteristiche si rivelò fruttuosa.

Nel corso dei primi anni novanta vennero individuati numerosi inibitori dell'attività tirosino chinasi, e di gran lunga il più efficace tra questi si rivelò l'Imatinib, una piccola molecola, una 2- fenilaminopirimidina capace di inibire a concentrazioni micromolecolari l'attività chinasi di tutte le proteine che contengono ABL. Questo composto fu usato per la prima volta nel 1998 per trattare pazienti refrattari all'interferone e i risultati mostrarono che l'Imatinib otteneva una normalizzazione ematologica completa in più del 95% dei pazienti e portava all'impossibilità di dimostrare la presenza del cromosoma Philadelphia in circa il 40 % di essi. Tutta la amplissima sperimentazione successiva confermava questi risultati cosicché nel 2001 la FDA autorizzava l'impiego del farmaco nella LMC.

150 ANNI DI TERAPIA

Per più di un secolo, la terapia fu sostanzialmente sintomatica:

chinino per la febbre, oppiacei per la diarrea e il dolore, ferro per le anemie.

Nel 1865, un medico tedesco, Lissauer, cominciò ad usare il liquore arsenicale di Fowler (soluzione all'1% di triossido di arsenico) in una paziente affetta da LMC ottenendo un notevole miglioramento, e così le preparazioni arsenicali continuarono ad essere usate nella leucemia mieloide cronica fino ai primi anni del XX secolo.

Ma nel 1895 Wilhelm Roentgen scoprì i raggi X e pochi anni dopo Nicolas

Senn, un chirurgo di Chicago, osservò che l'irradiazione della milza provocava una rapida riduzione delle dimensioni dell'organo e una caduta dei leucociti circolanti. Il trattamento radiante entrò quindi nella terapia della leucemia mieloide cronica e vi rimase per molti anni.

Ma divenne ben presto evidente che era sì possibile ottenere delle “remissioni” della malattia, ma che comunque dopo alcuni anni si sarebbe comunque presentata la “crisi blastica”, cioè la trasformazione in leucemia acuta costantemente fatale.

Pochi ricordano che nel 1912 venne proposto per il trattamento della LMC l'uso del benzene, che però ebbe scarsissima diffusione tranne in Germania, dove fu impiegato in alternativa alla radioterapia fino alla seconda guerra mondiale.

E ancora una volta dobbiamo ricordare che eventi ad essa collegati furono determinanti nel provocare una svolta nelle ricerche sulla terapia delle leucemie.

Infatti, durante la seconda guerra mondiale gli alleati credevano che

la Germania avrebbe potuto usare aggressivi chimici come l'iprite,

il “gas mostarda”, e furono pertanto condotti molti studi sugli effetti

farmacologici delle cosiddette mostarde azotate, le betacloroalchilamine,

studi i cui risultati vennero tenuti segreti e furono resi noti solo dopo la fine della guerra.

Era diventato evidente, da questi studi, che l'esposizione a queste sostanze provoca negli organismi animali una profonda depressione dei leucociti circolanti.

Nel giro di pochi anni, a partire dal 1947, le ricerche di Haddow e colleghi, del Chester Beatty Research Institute permettevano di identificare diversi “alchilanti” come il busulfano, il chlorambucil, il melfalan.

Nella leucemia mieloide cronica il busulfano (Myleran) rimaneva il farmaco più usato per molti anni, sostituito poi dall'idrossiurea, che venne sperimentata per la prima volta qui a Modena. All'inizio degli anni '80 Talpaz e colleghi comunicarono che l'interferone permetteva di ottenere “remissioni complete” in più del 70% dei casi, e che in qualche caso si assisteva alla scomparsa delle cellule midollari Ph+. Divenne ben presto chiaro che con l'interferone non si vinceva la malattia, ma si otteneva un significativo aumento della durata della fase cronica, essendo possibile ottenere la “remissione citogenetica”, cioè l'impossibilità di trovare cellule midollari Ph+. Questo non significa certo la scomparsa delle cellule leucemiche dall'organismo, ma semplicemente che queste non sono più rilevabili dal citogenetista, essendo in numero troppo basso.

Veniva così al centro dell'attenzione il concetto di *malattia minima residua*, cioè del numero minimo di cellule leucemiche rimaste nell'organismo.

Se valutiamo che un paziente con LMC abbia un carico di cellule leucemiche di 1×10^{12} , si parla di remissione citogenetica quando si è ottenuta una riduzione sotto 1×10^9 .

In questa condizione però non abbiamo certo debellato la malattia.

Per ottenere questo dobbiamo scendere sotto 1×10^6 , e questo è difficilissimo ottenerlo con l'interferone. Nell'ultimo decennio del secolo scorso alcuni studiosi hanno tentato nella fase cronica della LMC un trattamento mieloablativo seguito da trapianto allogenico, ma con risultati deludenti.

NEL 1858 VIRCHOW SCRIVEVA

*Ad ogni modo, io non voglio concludere che
la malattia in questione è inesorabile:
spero al contrario che alla lunga anche per essa
si troveranno dei rimedi.*

La speranza del grande patologo si è realizzata,
ma soltanto dopo un secolo e mezzo