

## ***La valutazione della gravità del coinvolgimento del midollo osseo nella Malattia di Gaucher per mezzo della scintigrafia con <sup>99m</sup>Tc-Sestamibi***

Giuliano Mariani MD<sup>1,2</sup>, Mirella Filocamo PhD<sup>3</sup>, Fiorina Giona MD<sup>4</sup>, Giuseppe Villa MD<sup>5</sup>, Angela Amendola MD<sup>4</sup>, Paola Erba MD<sup>1</sup>, Ferdinando Buffoni MD<sup>5</sup>, Francesco Copello MD<sup>6</sup>, Anna Pierini MSc<sup>2</sup>, Fabrizio Minichilli MSc<sup>2</sup>, Rosanna Gatti MD<sup>3</sup>, Roscoe O. Brady MD<sup>7</sup>

(Traduzione dall'Inglese a cura di Ivana Cicognani, dell'articolo pubblicato su "The Journal of Nuclear Medicine" Vol.44 No.8 Agosto 2003)

<sup>1</sup>Centro Regionale di Medicina Nucleare, Università di Pisa, Italia; <sup>2</sup>Istituto di Fisiologia Clinica del Consiglio Nazionale Italiano di Ricerca, Pisa, Italia; <sup>3</sup>Laboratorio di Diagnosi pre e post natale delle Malattie Metaboliche, Ospedale Pediatrico G.Gaslini, Genova, Italia; <sup>4</sup>Dipartimento di Biotecnologia molecolare ed Ematologia, Università La Sapienza, Roma, Italia; <sup>5</sup>Servizio di Medicina Nucleare, Dipartimento di Medicina Interna e Specialistica, Università di Genova, Italia; <sup>6</sup>Medicina del Lavoro, Ospedale S.Martino, Genova, Italia; <sup>7</sup>Dipartimento di Neurologia, Istituto Nazionale dei Disordini Neurologici e dello Stroke, Istituto Nazionale della Salute, Bethesda, Maryland, USA

---

La Malattia di Gaucher, il disturbo da accumulo lisosomiale più comune, è una patologia genetica rara. La sua frequenza è di circa 1 su 40.000 – 80.000 nuovi nati, con l'eccezione della popolazione Ashkenazi in cui l'incidenza è 100 volte superiore.

L'accumulo di glucosylceramide nelle cellule reticoloendoteliali di fegato, milza e midollo osseo porta ad aumento di volume di fegato e milza, anemia, trombocitopenia e osteopenia. Le manifestazioni scheletriche secondarie all'infiltrazione del midollo osseo da parte delle cellule Gaucher, sono valutabili radiograficamente solo negli stadi avanzati di malattia.

L'entità del coinvolgimento midollare può essere misurata indirettamente con tecniche di risonanza magnetica o con la scintigrafia ossea con radiocolloidi.

Comunque, entrambe le tecniche mancano di specificità perché non valutano il processo patologico. Lo scopo di questo studio è quello di misurare l'attendibilità della scintigrafia ossea con il <sup>99m</sup>Tc-Sestamibi nella valutazione diretta dell'infarcimento midollare.

### **Metodi**

Hanno partecipato allo studio 72 pazienti con Malattia di Gaucher di Tipo 1 e 2 pazienti di Tipo 3, 35 maschi e 39 femmine.

L'età dei pazienti andava da 3 a 76 anni, con una media di  $31,9 \pm 16,5$ .

La durata dall'insorgenza dei sintomi al momento della scintigrafia variava da 0 a 44 anni con una media di 10,5.

Su 74 pazienti, 43 non avevano mai ricevuto la terapia enzimatica sostitutiva (ERT), mentre 31 erano già in trattamento.

Il <sup>99m</sup>Tc-Sestamibi è stato iniettato per via endovenosa in dosi di 6/8 MBq/Kg di peso corporeo.

L'immagine del plateau di accumulo è stata registrata agli arti inferiori dopo 30 minuti dall'iniezione.

Le scansioni sono state valutate visivamente assegnando un punteggio semiquantitativo basato sull'estensione e sull'intensità della captazione nel midollo osseo degli arti inferiori. Tale punteggio va da un valore "0" che indica nessuna captazione a un valore "8" di massima attività.

I dati scintigrafici ottenuti sono stati analizzati statisticamente e confrontati con una serie di parametri chimici, clinici e ematologici che definiscono la severità della malattia (Scala di Zimran).

## Risultati

La scintigrafia con  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi ha evidenziato che 71 dei 74 pazienti aveva un certo grado di coinvolgimento midollare.

Il punteggio scintigrafico era altamente correlato agli altri indici di gravità clinica, in particolare con il chitotriosidase del siero.

Nei pazienti in trattamento con ERT c'è relazione con l'epatomegalia e l'emoglobina, in quelli non trattati con ERT la relazione è con il chitotriosidase, il punteggio radiografico e i segni clinici di severità di malattia (Scala di Zimran).

## Conclusioni

La procedura è semplice da eseguire ed è tollerata sia dagli adulti che dai bambini.

Il punteggio scintigrafico di captazione del  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi identifica la situazione reale di infarcimento del midollo osseo da parte delle cellule Gaucher. E' efficace come metodo di definizione di severità di coinvolgimento del midollo osseo e come metodo comparativo tra i pazienti. Le informazioni topografiche sui siti coinvolti fornite dalla scintigrafia sono altamente correlabili ad altri parametri di gravità di malattia e con la risposta al trattamento con ERT.

Pensiamo che il ruolo principale della tecnica scintigrafia non sia in fase diagnostica ma, piuttosto, come procedura aggiuntiva nel valutare la severità della malattia e la sua risposta alla ERT.

**Parole chiave:** Malattia di Gaucher; coinvolgimento del midollo osseo;  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi; punteggio scintigrafici; severità della malattia

## J Nucl Med 2003; 44:1253-1262

Ricevuto il 16 Dicembre 2002; revisione accettata il 24 Aprile 2003. Per corrispondenze e ristampe contattare: Dr Giuliano Mariani, Centro Regionale di Medicina Nucleare, Università di Pisa, Via Roma 67, 56126 Pisa, Italia

E-mail: [g.mariani@med.unipi.it](mailto:g.mariani@med.unipi.it)

---

La Malattia di Gaucher, il disordine da accumulo lisosomiale più frequente, è quasi sconosciuta nella popolazione generale in quanto colpisce approssimativamente 1 su 40.000 – 80.000 nuovi nati, con l'eccezione degli Ebrei Ashkenazi dove l'incidenza può essere 100 volte superiore.

La patologia è un disordine cronico multisistemico con una grande variabilità di manifestazioni cliniche e da un diverso decorso medico. E' causata da una deficienza di glucocerebrosidase, che idrolizza il glucosylceramide in glucosio e ceramide.

Come risultato di questa deficienza, il glucosylceramide si accumula nei lisosomi delle cellule reticoloendoteliali producendo le caratteristiche cellule di Gaucher. La riduzione dell'attività del glucocerebrosidase è la condizione necessaria per avere la Malattia di Gaucher; comunque lo sviluppo e la progressione delle manifestazioni cliniche dipende da molteplici fattori. Quindi, la sola attività enzimatica non è un indice reale della gravità della malattia. L'accumulo di glucosylceramide nei macrofagi della milza e nelle cellule di Kupffer del fegato si associa ad un aumento di volume di questi organi; la conseguenza della splenomegalia è lo sviluppo di anemia e trombocitopenia. L'accumulo nel midollo osseo si associa a osteopenia e lesioni litiche, fratture patologiche, dolore cronico osseo, episodi acuti di dolore intenso (le cosiddette crisi ossee), infarti ossei e osteonecrosi.

Anche se l'anemia e la trombocitopenia sono gravi, è frequentemente la malattia ossea che a lungo termine porta maggiormente a invalidità o disabilità. Tutte e tre le varianti della Malattia di Gaucher (Tipo I, il più comune, a decorso cronico non neuropatico; Tipo II, il più raro, con una precoce insorgenza di sintomi neurologici che portano a morte entro i 3 anni d'età; Tipo III, subacuto, a insorgenza giovanile, è una neurodegenerazione con un decorso più lento ma progressivo) hanno in comune la malattia ossea. I pazienti di Tipo II, comunque, raramente sopravvivono abbastanza a lungo per manifestare gravi sintomi ossei.

L'interessamento osseo si osserva nell'80% dei pazienti, con complicazioni severe in quasi la metà di loro. Una diagnosi precoce e un monitoraggio del coinvolgimento osseo, anche se asintomatico,

sono fondamentali in quanto il danno è progressivo se non trattato adeguatamente. La terapia enzimatica sostitutiva (ERT) è rapida ed efficace nel far regredire alcune delle manifestazioni cliniche della Malattia di Gaucher (anemia, trombocitopenia e, in poco più tempo, l'epatosplenomegalia) ma la risposta scheletrica è molto più lenta e molto limitata se la somministrazione inizia quando già si sono verificati cambiamenti ossei irreversibili.

Anche se le mutazioni ossee causate dall'infiltrazione estensiva del midollo osseo da parte delle cellule di Gaucher possono essere evidenziate con una radiografia planare al momento in cui producono le deformità, la visualizzazione diretta dell'infarcimento del midollo osseo rimane ancora molto problematica. In particolare, la RMN identifica una perdita del segnale dell'immagine pesata in T1 dovuta alla riduzione della normale frazione di grasso del midollo osseo nell'adulto, causata dall'infiltrazione delle cellule di Gaucher. La scintigrafia con colloidali radiolabili viene descritta come un mezzo di valutazione della funzione reticoloendoteliale del midollo osseo normale. I pazienti con Malattia di Gaucher presentano una ridotta visibilità del midollo osseo. Entrambi i metodi hanno degli inconvenienti, soprattutto perché si basano su una valutazione indiretta e quindi mancano di specificità; viene evidenziato il midollo osseo normale e non il processo patologico. Inoltre, nei bambini l'interpretazione viene complicata dalla fisiologica conversione in midollo giallo del midollo rosso ematopoietico, e l'attrezzatura richiesta per un'analisi più sofisticata è disponibile solo in centri di ricerca specializzati.

La visualizzazione diretta del midollo osseo infiltrato dalle cellule di Gaucher si è resa possibile con la somministrazione dello  $^{133}\text{Xe}$  (Xeno 133), un gas radioattivo liposolubile. L'uso di una maschera orofacciale pone però delle limitazioni, specialmente nei bambini. Le immagini hanno una bassa risoluzione geometrica; il wash-out della traccia del gas accumulato nei depositi di cellule Gaucher è molto veloce; la quantificazione dei dati non è soddisfacente e, infine, lo  $^{133}\text{Xe}$  non è largamente disponibile.

Il  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi è un catione lipofilo introdotto in medicina nucleare inizialmente per la scintigrafia miocardica. Questo composto entra nelle cellule con un gradiente ionico ed in seguito viene accumulato nei mitocondri dove è trattenuto in risposta ai potenziali elettrici di membrana.

Il pattern di distribuzione ha suggerito l'uso del  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi in applicazioni mediche diverse dalla scintigrafia della perfusione miocardica; attualmente viene impiegato anche per indagare i tumori delle paratiroidi e del torace, e l'infiltrazione neoplastica del midollo osseo in caso di mieloma multiplo o altre patologie.

Come abbiamo accennato in precedenza, con il  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi riusciamo a visualizzare con successo l'infiltrazione del midollo osseo da parte delle cellule di Gaucher, nei pazienti adulti con Malattia di Gaucher di Tipo I. Questo studio, stimolato da quella osservazione iniziale e dai susseguenti risultati, ha coinvolto un relativamente ampio gruppo di pazienti. Ha avuto come scopo quello di valutare l'affidabilità della scintigrafia con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi nel misurare la severità dell'infiltrazione del midollo osseo. Questo parametro risulta importante per monitorare l'efficacia della ERT, cosa ancora problematica con le attuali tecniche per immagini.

## **Materiali e metodi**

### **Pazienti**

Tra il 1994 e il 2002 sono stati arruolati 74 pazienti. Il protocollo è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università di Pisa e dell'Università di Genova. È stato firmato il consenso informato da parte di tutti i pazienti o dei loro tutori se minorenni.

Settantadue erano italiani: 12 dal Nord, 33 dal Centro e 27 dal Sud e Isole. Rappresentano quasi la metà della popolazione italiana Gaucher (dati del Registro Italiano per la Malattia di Gaucher). Un paziente proveniva dall'Argentina e uno dalla Croazia. Sono stati raccomandati allo studio scintigrafico, in base alle manifestazioni scheletriche, primariamente dall'Associazione Italiana Gaucher. La diagnosi di Gaucher era stata fatta in base al livello enzimatico in tutti i pazienti, con una dimostrata riduzione di attività del glucocerebrosidase nei globuli bianchi del sangue periferico

o nei fibroblasti o nei linfoblasti. Per analizzare l'attività dell'enzima è stato utilizzato il 4-methylumbellifer- $\beta$ -glucopyranoside come substrato della presenza di sodio deoxitaurocolato.

I pazienti erano 35 maschi e 39 femmine con una età media di  $31,9 \pm 16,5$  anni (mediana 31,5; range 3-76 anni). 72 pazienti erano classificati come Tipo I e due come Tipo III in accordo con i parametri clinici, inclusi l'età di insorgenza di organomegalia, presenza di malattia ossea, di segni neurologici e sopravvivenza. L'età media di diagnosi di Malattia di Gaucher era di 18,95 anni (mediana 13,5; range 1-76 anni), e la durata media delle manifestazioni della malattia al momento dell'esecuzione dello studio scintigrafico era di 12,95 anni (mediana 10,5; range 0-44 anni).

Nessuno dei pazienti aveva discendenze ebrae. Per quanto riguarda la mutazione genetica, solo 4 su un totale di 138 alleli non sono stati identificati. Solo 5 pazienti avevano una mutazione omozigote del gene del glucocerebrosidase: L444P e F2131 (entrambi pazienti di Tipo III), N370S (in due classici Tipi I) e il D409H (in un paziente di Tipo I senza nessun segno di interessamento cardiaco). La mutazione più comune era la N370S (per un totale di 62 alleli) seguita dalla L444P (32 alleli). Le altre varianti erano le R120W, F2131, IVS2G>A, R285H, R131C, D409H, recNCI (3 alleli ognuna), Complex I, V214H, H451R, G202R, Y313H (2 alleli ciascuna), P159T, 2023insA, I119S,  $\delta$ -55, W312S, R170P e una delezione (un allele ognuna).

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad una valutazione completa clinica, biochimica, radiografica ed ecografia con in aggiunta, per alcuni, di una RMN. Questo ha permesso di classificarli secondo l'indice di severità della malattia (SSI) descritta da Zimran e coll. La media dei valori del SSI di tutti i pazienti era di 9,12 (mediana 8; range 1-26). I livelli di chitotriosidase del siero erano disponibili per 38 pazienti per una valutazione statistica; in 13 casi i dati sono stati esclusi a causa di una mutazione del gene del chitotriosidase (omozigote in un caso, eterozigote in 12). Venticinque dei 74 pazienti erano stati splenectomizzati al momento dell'arruolamento allo studio. Quarantatré di loro non avevano mai ricevuto la ERT, mentre 31 erano in trattamento (inizialmente con il Ceredase sostituito poi negli anni 1997-1998 con il Cerezyme). La dose media di ERT era di  $36,7 \pm 17,8$  U/kg di peso corporeo ogni 2 settimane (mediana 33 U/Kg di peso corporeo; range 10-85 U/Kg di peso corporeo al mese), mentre la durata media di trattamento con ERT era di  $49,1 \pm 27,1$  mesi (mediana 52 mesi; range 7-96 mesi). L'unica differenza significativa tra i pazienti non in trattamento e quelli in trattamento con la ERT era inerente la durata di malattia (media di  $9,67 \pm 1,78$  anni contro  $17,48 \pm 1,98$  anni), i livelli di chitotriosidase serico ( $16,794 \pm 2,909$  nmol/mL/h contro  $7,238 \pm 2,272$  nmol/mL/h) e il valore di emoglobina ( $12,38 \pm 0,25$  g/dL contro  $13,43 \pm 0,31$  g/dL). Una variazione statistica borderline è stata osservata per l'età di diagnosi ( $23,02 \pm 2,88$  contro  $13,29 \pm 1,97$  anni). Nei pazienti non trattati la conta piastrinica era marcatamente più alta nei splenectomizzati ( $236.875 \pm 25.790$  piastrine/ $\mu$ L) rispetto ai pazienti non splenectomizzati ( $101.407 \pm 8.159$  plt/ $\mu$ L), mentre non c'era differenza statistica significativa nella conta piastrinica dei pazienti in trattamento con ERT splenectomizzati oppure non splenectomizzati. D'altro canto, i pazienti senza terapia e non splenectomizzati avevano una conta piastrinica significativamente più bassa dei pazienti non splenectomizzati che ricevevano la ERT, mentre non c'era nessuna differenza statistica tra i pazienti non trattati splenectomizzati e i pazienti splenectomizzati in trattamento.

### **Protocollo Scintigrafico**

Il  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi (Cardiolite; Bristol-Meyers-Squibb) è stato preparato in accordo con le istruzioni del fornitore, con un campo radiochimico di oltre il 98%. Dopo che i pazienti avevano riposato per almeno 30 minuti, il tracciante è stato iniettato per via intravenosa in bolo singolo con dose di 6-8 MBq/kg di peso corporeo (circa la metà della dose usata normalmente per una scansione della perfusione miocardica). Sono state usate delle gammacamere a testata singola e doppia a largo campo, con bassa energia e alta risoluzione.

Per i primi 15 pazienti la scintigrafia dinamica è stata registrata a partire dall'iniezione del bolo di  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi, con la testata della gammacamera posizionata sugli arti inferiori, usando una matrice 64x64 e una inquadratura al minuto per 30 minuti. Le immagini statiche sono state

registrate sugli arti inferiori (matrice 256x256; tempo di acquisizione 600 secondi), sull'addome, sul torace e le spalle.

La captazione locale della radioattività nel midollo osseo durante le scansioni, normalmente non osservabile dopo la somministrazione di  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi, è stata considerata un indice di infiltrazione delle cellule di Gaucher. Sulla base del pattern scintigrafico osservato negli studi iniziali, è stato sviluppato un punteggio combinato semiquantitativo del coinvolgimento midollare osseo, modificando un indice precedentemente descritto per i pazienti con infiltrazione midollare da mieloma multiplo.

Il determinante principale in un tale punteggio semiquantitativo è l'interessamento dell'area del ginocchio, cioè l'epifisi distale del femore e l'epifisi prossimale della tibia, che si estende prossimamente nel femore e distalmente sulla tibia. L'attenzione è stata posta sul ginocchio è il sito più frequente e primario dei cambiamenti scheletrici tipici della Malattia di Gaucher. Una deformità a fiasca di Erlenmeyer si ritrova in più dell'80% dei pazienti, anche se asintomatici. Inoltre, la valutazione scintigrafica del ginocchio con  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi è particolarmente favorita dal fatto che l'immagine di questa area non è influenzata dall'escrezione fisiologica renale ed epatobiliare, che ostacola invece la visualizzazione dell'infiltrazione midollare nel femore prossimale, nelle ossa pelviche e nella colonna vertebrale. In questi ultimi siti, le complicazioni dovute all'infiltrazione da parte delle cellule di Gaucher sono meno frequenti; la necrosi avascolare dell'anca si osserva nel 9% - 26% e il crollo vertebrale nel 5,5% - 12% dei pazienti. Il punteggio scintigrafico è la somma delle valutazioni visive di estensione e di intensità della captazione. Per l'estensione (E), viene dato il punteggio seguente: E0 = nessuna evidenza di captazione midollare, E1 = captazione nell'epifisi distale del femore, E2 = captazione nel femore distale e nell'epifisi prossimale della tibia, E3 = captazione estesa alla diafisi femorale, E4 = captazione che si estende anche alla diafisi tibiale, E5 = captazione che coinvolge interamente femori e tibie. Per l'intensità (I), I0 = nessuna evidenza di captazione midollare, I1 = captazione midollare inferiore a quella del muscolo, I2 = captazione midollare della stessa intensità di quella del muscolo, I3 = captazione midollare più alta di quella muscolare.

Quindi, il punteggio combinato uguale a "0" indica la non captazione midollare ossea della radioattività, mentre il minimo coinvolgimento ottiene un punteggio "2" e il massimo punteggio ottenibile risulta essere "8". **Fig.1**

### **Analisi statistica**

L'approccio statistico definito come analisi dei principali componenti è stato scelto per valutare come le variabili considerate per ognuno dei pazienti si accomunassero, prestando particolare attenzione nel correlare il punteggio ottenuto con la scintigrafia con il  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi con le altre variabili che definiscono la severità della malattia. L'analisi è stata basata su 10 variabili per ciascun paziente: variabili continue (durata della malattia, conta piastrinica, concentrazione di emoglobina), variabili semiquantitative (punteggio scintigrafico, punteggio scala di Zimran, epatomegalia, dolore osseo, punteggio radiografico) e variabili binarie (splenectomia, ERT prima della scintigrafia). Inoltre un'altra variabile continua era disponibile per 38 pazienti (chitotriosidase del siero) e, nei non splenectomizzati, anche la splenomegalia è stata presa come variabile. Infine, per quei pazienti che al momento dello studio erano in trattamento con la ERT, sono state considerate altre 3 variabili continue: la durata di terapia, dose di ERT assunta al mese, dose totale assunta dall'inizio del trattamento con ERT.

### **Risultati**

La scintigrafia con il  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi ha rivelato il coinvolgimento del midollo osseo nella maggior parte dei pazienti arruolati nello studio (71 su 74, il 96% dell'intero gruppo). Tra i pazienti che hanno mostrato una captazione, il pattern scintigrafico predominante (osservato in 66 pazienti su 71) era rappresentato da un iniziale infiltrazione nell'epifisi distale dei femori (nei casi più lievi) che si estendeva progressivamente all'epifisi prossimale delle tibie, quindi alla porzione diafisaria

dei femori e delle tibie e, infine, nei casi più gravi, alla virtuale totalità di femori e tibie. L'intensità della captazione del  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi variava da bassa a alta rispetto alla captazione muscolare. Occasionalmente, il coinvolgimento delle teste femorali e della parte prossimale dei femori è stata osservata in associazione con il coinvolgimento dei femori distali, senza un accumulo radioattivo visibile nella diafisi femorale. Cinque pazienti con scintigrafia positiva hanno mostrato una inversione di pattern di infiltrazione midollare, con partenza dalle teste femorali nei casi lievi e coinvolgimento progressivo alla diafisi femorale. In questi 5 pazienti il punteggio combinato scintigrafico, come descritto in "materiali e metodi", è stato assegnato adottando criteri di estensione ed intensità di captazione del tracciante in analogia al scintigrafico predominante nell'intero gruppo di pazienti.

La visualizzazione del midollo osseo era in genere abbastanza omogenea nei siti di deposito delle cellule di Gaucher, benché ci fosse una progressiva diminuzione dell'intensità rispetto ai siti con più alta concentrazione di accumulo di tracciante. I pazienti che avevano avuto già episodi di osteonecrosi o fratture mostravano una certa disomogeneità nella distribuzione della radioattività nel midollo osseo infiltrato consistente in aree fotoopache corrispondenti alle zone dell'evento patologico pregresso.

La registrazione dinamica effettuata dal momento dell'iniezione del bolo di  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi mostra che il tracciante comincia ad accumularsi nel midollo osseo infiltrato entro i primi 5 minuti. La captazione raggiunge il plateau entro 15-20 minuti e rimane costante per quasi 2 ore. In 2 pazienti, che abbiamo potuto riprendere dopo 24 ore dall'iniezione del tracciante, il declino della captazione radioattiva nei siti del midollo infiltrato era solo il 15% - 20% del picco di attività (dopo correzione per il decadimento fisico dell'emivita del  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi). In accordo col protocollo standard, è stata considerata ottimale la scansione a 30 minuti, rappresentativa del livello di più alto accumulo radioattivo nei siti infiltrati del midollo osseo. **Fig.2**

In genere i pazienti non trattati con la ERT avevano punteggi significativamente più alti di quelli che ricevevano la terapia.

### **Fig.3**

I risultati di una valutazione statistica più complessa, basata sulle componenti principali comuni a tutti i 74 pazienti, sono stati riportati su un diagramma. Non sono stati inclusi i dati sul chitotriosidase (disponibile solo per una parte dei pazienti) e la splenomegalia (alcuni pazienti erano splenectomizzati). Sull'asse della X (orizzontale) sono riportate le variabili di severità di malattia come la scala di Zimran, l'epatomegalia e il punteggio radiografico, tutte caratterizzate da un alto carico positivo. Altre variabili sono rilevanti ma inversamente proporzionali alle prime, come la concentrazione di emoglobina e il trattamento con la ERT. Dall'altra parte, sull'asse (verticale) della Y, sono incluse le informazioni sulla durata della malattia, la splenectomia, il dolore osseo e la conta piastrinica. Il diagramma mostra che il punteggio scintigrafico si allinea con i parametri che definiscono la severità di malattia. Il punteggio mostra relazioni positive con la scala combinata SSI secondo Zimran, con l'epatomegalia, col punteggio radiografico secondo Hermann, la pregressa splenectomia e il dolore osseo. IL punteggio scintigrafico è inversamente correlabile all'emoglobina e alla ERT in atto. Non c'è nessuna correlazione statistica tra la scintigrafia con il  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi e la durata della malattia o la conta piastrinica (probabilmente perché non è stata fatta nessuna distinzione fra splenectomizzati e non splenectomizzati).

Nel sottogruppo di 49 pazienti che non sono stati splenectomizzati non esiste relazione statistica tra il punteggio scintigrafico e la splenomegalia. Esiste invece un'alta relazione statistica tra il punteggio scintigrafico e i livelli di chitotriosidase del siero nel sottogruppo di 38 pazienti per cui i dati erano disponibili.

### **Fig.4**

Un altro diagramma di analisi statistica illustra i risultati nei pazienti che non hanno mai ricevuto la ERT. In questo gruppo il punteggio scintigrafico è in associazione con le componenti che definiscono la severità di malattia. In particolare, la correlazione positiva del punteggio del  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi è confermata dal punteggio radiografico, mentre è statisticamente borderline la

correlazione con la scala SSI di Zimran. Nel sottogruppo di 19 pazienti di cui erano disponibili i dati sul chitotriosidase il punteggio scintigrafico è strettamente correlato con questo marker biochimico.

In un altro diagramma sono stati riportati i dati dell'analisi statistica effettuata per i pazienti in trattamento con ERT. **Fig.5**

In questo sottogruppo i dati relativi alla durata di trattamento, dose mensile, dose totale dall'inizio del trattamento e durata di malattia, sono molto variabili e diversificati e, quindi, vengono a trovarsi sull'asse orizzontale della X. L'intero gruppo delle variabili che definiscono la severità di malattia scivolano appena verso l'asse della Y. Anche in questa configurazione il punteggio scintigrafico mostra una correlazione positiva con la scala di Zimran SSI e con l'epatomegalia, mentre non c'è relazione significativa con i parametri della ERT. La significatività statistica del punteggio scintigrafico in relazione all'emoglobina è borderline (in negativo), così come lo è (in positivo) con il chitotriosidase serico nel sottogruppo di 19 pazienti.

## Discussione

I risultati di questo studio in un relativamente ampio gruppo di pazienti con Malattia di Gaucher confermano le nostre osservazioni iniziali sull'abilità della scintigrafia con il  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi nel dare un'immagine diretta del midollo osseo infiltrato dalle cellule di Gaucher. La nostra esperienza ha provato che la scintigrafia è una procedura facile ed altamente praticabile nei bambini come negli adulti. Si dovrebbe notare il fatto che il pattern visualizzato con la scintigrafia con il  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi è in qualche modo diverso da quello che si ottiene con la RMN. L'anormalità più frequentemente riportata dalla RMN è la riduzione dell'intensità del segnale nelle immagini pesate in T1 e T2 degli spazi del midollo osseo. La riduzione dell'intensità del segnale, che sembra estendersi progressivamente da prossimale a distale nelle ossa lunghe, è attribuita comunemente al progressivo piazzamento del midollo ematopoietico ricco di grasso. Comunque un fattore che potrebbe contribuire alla riduzione del segnale della RMN è rappresentato dall'edema, la cui presenza nel tessuto infiltrato può essere legato alla produzione locale di citochine proinfiammatorie come l'interleuchina-6 e l'interleuchina-10, in risposta alla presenza di macrofagi patologici.

D'altra parte, non si può escludere la possibilità che il pattern di iniziale interessamento incentrato selettivamente intorno al ginocchio risulti semplicemente un effetto somma scintigrafico su immagini planari. Infatti sia il femore distale che la tibia prossimale sono le parti più spesse di queste ossa lunghe, e potrebbero apparire iperattive anche con un accumulo omogeneo di radioattività nello spazio midollare, piuttosto che vi sia un accumulo preferenziale in questi siti. Tuttavia il pattern scintigrafico osservato è identico a quello dei depositi di cellule di Gaucher visualizzati dopo una iniezione di  $^{123}\text{I}$ -marcatore macrofagi-bersaglio Alglucerase, la preparazione per la ERT in questi pazienti. Patterns simili di distribuzione sono stati osservati nei pazienti Gaucher dopo iniezione di una lipoproteina a bassa densità marcata con  $^{99m}\text{Tc}$ , che marca i macrofagi attivati. Dovrebbe essere anche puntualizzato che, nei pazienti sottoposti contemporaneamente a RMN e scintigrafia con il  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi, i patterns di anormalità midollare ossea descritto nelle due immagini erano quasi sovrapponibili. **Fig.6** Con alcuni pazienti abbiamo avuto la possibilità di ripetere la scintigrafia dopo un anno dalla prima valutazione, un periodo durante il quale i pazienti hanno seguito diversi regimi di trattamento (ERT o non ERT). I risultati preliminari di questo follow-up confermano che la spontanea progressione o la regressione legata alla ERT dell'infiltrazione midollare segue un pattern incentrato nella zona del ginocchio. **Fig.7**

Tutte le precedenti affermazioni sono compatibili con l'asserzione che la captazione della radioattività nel midollo osseo infiltrato rispecchia realmente l'accumulo intracellulare di  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi dentro i macrofagi marcati da glucocerebroside che sono stati trasformati in cellule di Gaucher. Le applicazioni cliniche della scintigrafia con il  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi sono basate sulla sua proprietà di concentrarsi attivamente nelle cellule con un aumentato consumo metabolico, come i miocardociti, le cellule tumorali ecc. Una caratteristica ben nota ai pazienti con Malattia di Gaucher è l'aumentato tempo di recupero per le energie spese ed è stata attribuita direttamente

all'energia richiesta dalle cellule di Gaucher. Il meccanismo di accumulo del  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi nei depositi Gaucher non si basa solo sulla lipofilia del composto (come nel caso del gas  $^{133}\text{Xe}$ ) ma riflette lo stato metabolico reale delle cellule di Gaucher al momento dell'iniezione del tracciante. Il pattern di distribuzione è coerente con l'osservazione delle aree fotoopache in cui il tessuto fibroso ha sostituito il midollo a causa di episodi di necrosi o frattura. La scintigrafia con un indicatore positivo come il  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi rappresenta un vantaggio rispetto ad una scintigrafia con radiocolloidi. Quest'ultima infatti si basa sull'identificazione del midollo osseo che funziona normalmente e quindi non può distinguere tra un'infiltrazione di cellule di Gaucher e un tessuto fibroso di sostituzione. Ad eccezione dei protocolli più sofisticati, che non sono largamente disponibili, la RMN del midollo osseo ha limitazioni simili a quelle della scintigrafia con radiocolloidi, perché si basa sull'identificazione di perdita di segnale del midollo osseo normale.

L'accumulo di  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi nei depositi Gaucher non è limitato al midollo osseo, ma si può osservare in altri organi tipicamente coinvolti dalla malattia, come il fegato e la milza. **Fig.8** Chiaramente l'accumulo di  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi nel midollo osseo non è specifico per l'infiltrazione da parte di cellule di Gaucher. Crediamo comunque che il ruolo possibile di questa tecnica scintigrafica non sia in fase diagnostica iniziale ma, piuttosto, come un esame aggiuntivo per valutare la gravità della malattia.

Il punteggio scintigrafico descritto in questo studio si è dimostrato utile nel definire semiquantitativamente la severità dell'infiltrazione midollare da parte delle cellule di Gaucher. E' stato così possibile usare questo parametro numerico per un'analisi statistica complessa allo scopo di valutare le possibili correlazioni tra questo punteggio scintigrafico e gli altri parametri convenzionali, comunemente disponibili, che definiscono la gravità di malattia. L'analisi statistica non ha incluso i dati della RMN, in quanto reperibili solo per alcuni pazienti; questi provenivano da diverse realtà di assistenza medica e di accesso a tecnologie per immagini avanzate.

Le analisi dei dati con il più alto peso statistico hanno incluso tutti i 74 pazienti, indipendentemente dal fatto che ricevessero o meno la ERT. In questi pazienti il punteggio scintigrafico ha un'alta coerenza, sia positiva che negativa, sia con la scala combinata di Zimran (SSI), sia con alcuni dei parametri che contribuiscono a questa SSI (epatomegalia, punteggio radiografico, pregressa splenectomia, dolore osseo, emoglobina). Una relazione altamente significativa in negativo è stata riscontrata tra il punteggio scintigrafico e la ERT, conferma ulteriore dell'affidabilità della scintigrafia con il  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi come indicatore della risposta alla terapia. L'analisi statistica richiesta dal grande numero di variabili prese in esame deve fare affidamento su un campione misurabile di popolazione, così come è avvenuto nel nostro studio. Questa considerazione può spiegare perché un primo tentativo, di correlare un punteggio scintigrafico semplificato con i parametri di severità di malattia e di trattamento, basato su solo 11 pazienti, sia fallito.

Va enfatizzato che la correlazione statistica più alta del punteggio scintigrafico è stata trovata con il chitotriosidase, che recentemente si sta dimostrando un potente indicatore di severità di malattia. Perciò, la scintigrafia con il  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi appare come un complemento utile per indicare topograficamente i siti interessati dall'infiltrazione midollare insieme al grado globale di severità di malattia indicato dal chitotriosidase serico.

L'alta correlazione tra il punteggio scintigrafico e la concentrazione serica di chitotriosidase è stata confermata nei pazienti valutati prima dell'assunzione della ERT, mentre la correlazione risulta borderline nei pazienti già in trattamento con la ERT. Va considerato che in quest'ultimo gruppo i parametri di trattamento erano molto diversi; la dose di ERT variava da 10 a 85 U/Kg di peso corporeo al mese, e la durata di trattamento andava da 7 a 96 mesi.

## Conclusioni

I risultati ottenuti in questo studio confermano la reale possibilità di rendere in immagini l'infiltrazione midollare ossea nella Malattia di Gaucher mediante scintigrafia con il  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi. Il punteggio scintigrafico qui descritto è basato sulla valutazione di zone limitate dello scheletro (gli arti inferiori) dove l'analisi visiva delle scansioni non viene influenzata dalla



distribuzione fisiologica del  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi nell'area addominale, una fonte possibile di interpretazioni sbagliate quando vengono esaminate le ossa iliache o la colonna vertebrale. Nondimeno, le correlazioni statisticamente alte trovate con i parametri comprovati di severità di malattia indicano che il pattern scintigrafico osservato in queste limitate regioni è un indicatore sensibile della generale severità di cambiamenti scheletrici che colpiscono i malati Gaucher. Il punteggio scintigrafico può così essere usato per valutare il grado di infiltrazione del midollo osseo e permette la comparazione tra i vari pazienti. Oltre ad essere altamente coerente con gli altri parametri indipendenti di severità di malattia, il punteggio scintigrafico mostra una correlazione anche con la risposta alla ERT, almeno in uno studio incrociato come questo. La capacità del punteggio con il  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi di essere un parametro topografico e quantitativo nel monitoraggio dell'efficacia della ERT nel singolo paziente, così come la sua capacità di prevedere il rischio di complicanze ossee e danni irreversibili, rimane un approfondimento da chiarire con ulteriori futuri studi. I benefici importanti ottenuti usando questa tecnica sono prontamente ottenibili nei centri convenzionali di medicina nucleare.

### **Appendice**

Il metodo usato per la valutazione statistica, l'analisi dei principali componenti, riduce le dimensioni ad una variabile multipla della  $X_1 \dots X_p$ , e spiega come le variabili appaiano molto vicine in una matrice multidimensionale. Le componenti principali (X e Y) sono rappresentate da una combinazione lineare delle variabili originali classificate in ordine decrescente. Quindi la componente principale è la variabile caratterizzata dalla più alta variazione, la seconda (non necessariamente correlata alla prima variabile) ha la frazione principale della variazione residua e così via. L'analisi delle componenti principali è, di volta in volta, un'analisi fattoriale, in quanto produce una serie di componenti principali che possono essere considerate delle nuove variabili. Nello scegliere un numero adeguato di fattori, ci si può riferire alla frazione di variazione giustificata da ogni fattore, o sui valori assoluti dei singoli fattori (che deve essere più alto di 1). I coefficienti lineari di ogni variabile corrispondono agli autovettori della matrice di correlazione.

### **Ringraziamenti**

Gli autori ringraziano tutte le singole persone e le organizzazioni che hanno contribuito grandemente alla realizzazione dello studio, a cominciare da tutti i pazienti che si sono sottoposti volontariamente alla scintigrafia. Senza la loro entusiastica partecipazione e senza il continuo supporto dell'Associazione Italiana Gaucher, questo studio non avrebbe avuto luogo. Il Dr Assuero Giorgetti e il Tecnico Isabella Raugei ci hanno aiutato nell'effettuare alcune scansioni con il  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi all'Istituto di Fisiologia Clinica del Consiglio Nazionale Italiano di Ricerca di Pisa (Italia). Si ringraziano anche il Dr Paolo Tomà e il Dr Mauro Occhi (Servizio di Radiologia dell'Ospedale G. Gaslini di Genova, Italia) per la lettura delle lastre radiografiche e l'assegnazione del punteggio di Hermann. Alcune scintigrafie sono state fatte dalla Dr.sa Paola Marozzi (Servizio di Medicina Nucleare, Ospedale V. Cervello, Palermo, Italia) e dal Dr Stefano Fanti (Servizio di Medicina Nucleare, Ospedale Malpighi – S.Orsola, Bologna, Italia). I seguenti medici ci hanno fornito i nominativi di alcuni pazienti per lo studio : Dr Clodoveo Ferri (Unità di Reumatologia, Università di Pisa, Italia), Dr Gaetano Giuffrida (Divisione di Ematologia, Università di Catania, Italia), Dr Massimo Morfini e Dr.sa Silvia Linari (Divisione di Ematologia, Ospedale di Careggi, Firenze, Italia), Dr Marco Spada (Divisione di Pediatria, Ospedale Regina Margherita, Torino, Italia), Dr.sa Stefania Zoboli (Unità di Oncoematologia, Centro dell'Associazione Italiana di Oncoematologia Pediatrica, Modena, Italia), Dr.sa Maria Cappellini (Divisione di Medicina Interna, Padiglione Granelli, Ospedale Maggiore, Università di Milano, Italia). Gli esami sul DNA per la tipizzazione genetica sono stati ottenuti dalla "Banca del DNA dei Pazienti Affetti da Malattie

Genetiche” (<http://www.gaslini.org/labdppm.htm>) coi fondi concessi dalla Telethon Italiana (progetto GTF01009). Un contributo finanziario è stato fornito dalla Genzyme Corp., durante alcune fasi dello studio, che quindi ringraziamo sentitamente.