



UNIVERSITÀ DI PISA
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN MEDICINA E CHIRURGIA

“Il rimodellamento inadeguato del ventricolo sinistro è associato con i markers di apoptosi miocitaria in pazienti con scompenso cardiaco cronico”

RELATORE

CHIAR.MO PROF. Stefano Taddei

CANDIDATO
Elisa Dal Canto

RIASSUNTO

pag.4

INTRODUZIONE

1. Il rimodellamento ventricolare nello scompenso cardiaco cronico

pag. 7

2. Ruolo della morte cellulare attraverso il meccanismo apoptotico nella genesi e progressione del rimodellamento ventricolare

pag 11

3. Mediatori biologici e markers del processo apoptotico

- 3.1 Il sistema FAS e FAS L e il ruolo nella genesi e progressione dello scompenso cardiaco cronico

pag 18

- 3.2 Il TNF- α ed il ruolo prognostico nello scompenso cardiaco cronico

pag 25

SCOPO DELLO STUDIO

pag 30

Dosaggio di Fas/APO-1, TNF- α , TNFR1e TNFR2

pag 32

Analisi statistica

pag 33

RISULTATI

pag 35

DISCUSSIONE

pag 37

CONCLUSIONI

pag 40

TABELLE

pag 41

BIBLIOGRAFIA

pag 43

RINGRAZIAMENTI

pag 51

Ai miei genitori,

Enrica e Dante

e ai miei nonni,

Edda e Gianni.

Tra i numerosi fattori che sono coinvolti nello sviluppo e nella progressione dello scompenso cardiaco cronico (SCC), la perdita di cardiomiociti dovuta a morte cellulare per fenomeni apoptotici contribuisce in maniera rilevante ad una alterazione strutturale della parete del ventricolo sinistro (VS) e spesso alla dilatazione della camera cardiaca, realizzando il quadro morfologico e funzionale tipico del rimodellamento ventricolare.

Il rimodellamento ventricolare sinistro, che è caratterizzato da dilatazione ventricolare sinistra, diminuita frazione di eiezione e ipertrofia inappropriata, è uno dei processi fisiopatologici che porta allo scompenso cardiaco diastolico e sistolico. In particolare, il rimodellamento inadeguato del ventricolo sinistro è caratterizzato dall'instaurarsi di una disproporzione tra la massa del VS e il volume telediastolico dello stesso, a cui consegue un alterato rapporto massa/volume (M/V), con importanti modificazioni funzionali sulla meccanica cardiaca e sull'impatto prognostico del paziente.

Attualmente è possibile valutare direttamente in “vivo” il tasso di apoptosi tissutale tramite la misurazione dei livelli plasmatici di Fas/Apo-1, una molecola presente sulla superficie cellulare che trasduce

FAS/Apo-1 possa riflettere il processo di rimodellamento inadeguato del VS e dunque essere associato ad un ruolo prognostico sfavorevole nei pazienti in cui tali parametri risultano alterati.

Sono stati arruolati nello studio ottantuno pazienti con disfunzione sistolica ventricolare sinistra, frazione di eiezione (EF) del VS $\leq 45\%$ e volume telediastolico ventricolare $> 75 \text{ ml/m}^2 \text{ s}$. Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad un esame ecocardiografico per via transtoracica per la valutazione del volume VS, della FE, della massa VS, del rapporto M/V e parametri di funzione diastolica (onda E, onda A, E/A, tempo di decelerazione dell'onda E rilevati durante campionamento PW-Doppler del flusso transmitralico). Sono stati dosati i valori circolanti di Fas/Apo-1, TNF-alfa, forma solubile del recettore di tipo 1 per il TNF (sTNFR1), forma solubile del recettore di tipo 2 per il TNF (sTNFR2) e Nt-proBNP.

I pazienti che hanno mostrato un ridotto rapporto M/V e aumentati livelli di FAS/Apo-1 hanno mostrato la più bassa FE ($p=0.0035$), più alti livelli di TNF-alfa ($p=0.0008$), sTNFR1 ($p=0.0039$) e sTNFR2 ($p=0.012$). La sopravvivenza globale è stata del 17% nei pazienti con un ridotto rapporto M/V e livelli aumentati di FAS/Apo-1, rispetto al

Pertanto i dati preliminari in nostro possesso sembrano indicare che in pazienti con disfunzione sistolica ventricolare sinistra, una riduzione del rapporto M/V e l'aumento del valore plasmatico di FAS/Apo-1 siano associati con alterazioni più severe di funzionalità sisto-diastolica del ventricolo sinistro e con una prognosi peggiore.

1. Il rimodellamento ventricolare nello scompenso cardiaco cronico.

Lo scompenso cardiaco cronico non è il semplice risultato di un disordine di pompa del ventricolo sinistro, ma una sindrome clinica caratterizzata da complesse modificazioni a livello endocrino, neuroendocrino, immunitario e del sistema infiammatorio (1).

A seguito di un danno acuto, quale l'ischemia miocardica, o in risposta ad una modificazione cronica del carico emodinamico, si attivano complessi meccanismi compensatori – tra cui il sistema renina-angiotensina, il sistema nervoso simpatico, il sistema neuroendocrino ed immunitario – che tuttavia sono anche responsabili della transizione fra ipertrofia compensatoria e rimodellamento ventricolare. Con il termine di rimodellamento del ventricolo sinistro si sottintende una serie di modificazioni strutturali e funzionali che si verificano a livello della componente cellulare e della componente extracellulare del tessuto miocardico con importanti ripercussioni sulla morfologia e sulla funzionalità del tessuto (vedi Tabella 1).

Per quanto riguarda la componente cellulare, durante la progressione si evidenzia l'allungamento, l'ipertrofia e il riarrangiamento dei cardiomiociti all'interno della matrice del miocardio ("slippage"), sino ad arrivare alla morte cellulare e alla sostituzione con tessuto fibroso. (2)

La matrice extracellulare miocardica (ECM) è una rete strutturale di supporto dinamica e altamente integrata che è essenziale nel mantenere la normale geometria ventricolare sinistra e la funzione di pompa.

Al contrario di quanto si pensava fino a qualche tempo fa, la ECM rappresenta una struttura biologicamente attiva e dinamica: al suo interno si verificano una serie numerosa di processi biochimici atti a mantenere un equilibrio far sintesi e degradazione dei suoi vari componenti.

Il collagene, uno dei componenti più rappresentati a livello della ECM e prodotto dai fibroblasti, è un importante determinante dell'architettura del miocardio che forma un complesso reticolo tridimensionale in cui sono alloggiati i cardiomiociti. Diversi stimoli

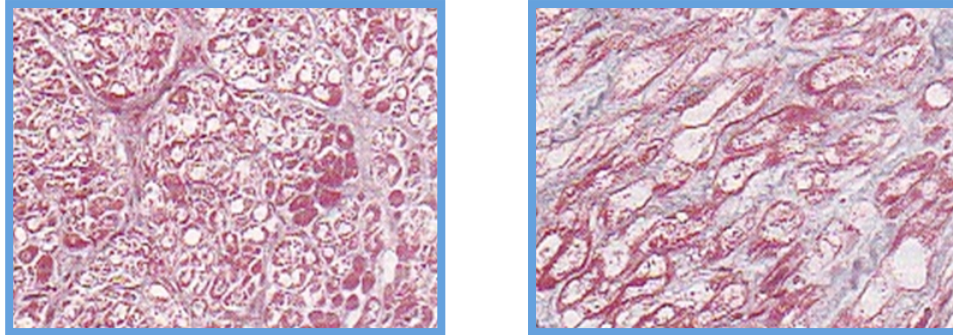


Figura 1. *Sezioni istologiche di tessuto miocardico normale ed in fase avanzata di rimodellamento in cui risulta evidente la perdita cellulare e l'estesa fibrosi tissutale.*

Il processo di rimodellamento è un fenomeno graduale e progressivo in cui inizialmente si evidenzia l'ipertrofia dei cardiomiociti ed il conseguente incremento della massa cardiaca; dunque in fase precoce appare come un meccanismo con finalità compensatorie, che aiuta a mantenere una buona gittata sistolica nonostante le mutate condizioni di riempimento e carico emodinamico. Tuttavia, il continuo sovraccarico di volume/pressione ha un effetto nocivo che favorisce la dilatazione cardiaca e l'assottigliamento delle pareti miocardiche, con profonde ripercussioni funzionali che esitano nel

cardiaco, è possibile valutare in vivo alcune delle modificazioni morfologiche (volume telediastolico del VS, volume telesistolico del VS, spessore parietale e del setto interventricolare in sistole e diastole, il rapporto M/V, il parametro RWT) e funzionali, sistoliche (frazione di eiezione) e diastoliche (parametri Doppler di riempimento diastolico: onda transmitralica E, onda transmitralica A, rapporto E/A, tempo di decelerazione dell'onda E), che si verificano durante il processo di rimodellamento.

nella genesi e progressione del rimodellamento ventricolare

L'apoptosi è un processo di morte cellulare "programmata" caratterizzato da interazioni tra numerose molecole pro- ed anti-apoptotiche, che innescano vie di trasduzione del segnale che esitano nell'attivazione di enzimi che degradano il DNA nucleare e le proteine citosoliche. (4).

L'apoptosi da un punto di vista morfologico è caratterizzata da cambiamenti cellulari quali:

- la riduzione del volume cellulare;
- le alterazioni della morfologia nucleare, inclusa la condensazione della cromatina e la sua frammentazione, con rottura del DNA;
- la formazione di estroflessioni citoplasmatiche;
- la formazione dei "corpi apoptotici".

Esistono due principali vie di trasduzione del segnale che sono in grado di innescare il processo di apoptosi cellulare: la via intrinseca e la via estrinseca. Nella prima un'ampia varietà di stimoli (tra cui la deprivazione dei fattori di crescita, lo stress ossidativo, il danno al DNA) sono in grado di provocare "direttamente" la degradazione

plasmatica e attivano le vie di trasduzione del segnale che portano alla lisi cellulare. (Figura 2)

Ambedue le vie convergono in una fase effettrice rappresentata da una cascata proteolitica di cui fanno parte enzimi appartenenti alla famiglia delle *caspasi* in grado di effettuare il clivaggio delle proteine citosoliche e della matrice nucleare, distruggendo quindi il citoscheletro e portando alla frammentazione del nucleo.

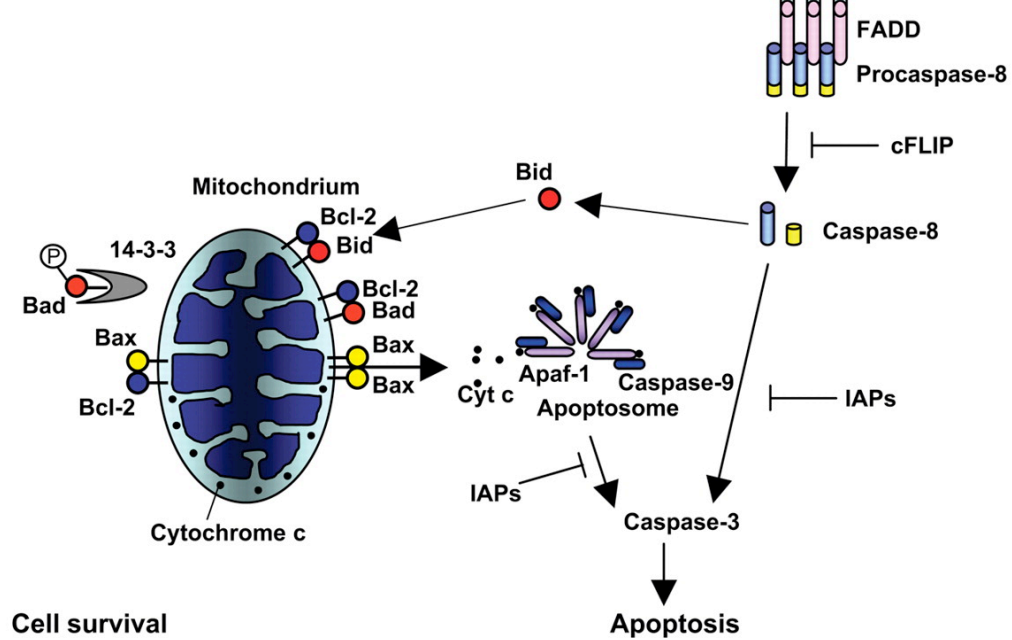


Figura 2. *Esemplificazione dei meccanismi molecolare coinvolti nella via intrinseca ed estrinseca dell'apoptosi. van Empel et al. Cardiovascular Research 2004 (5)*

In letteratura esistono molti studi che sottolineano come l'apoptosi contribuisca alla perdita di cardiomiociti sia in modelli animali (6, 7) ed umani (8, 9) di cardiopatie sia primitive che secondarie, concorrendo dunque al processo di rimodellamento inadeguato del VS.

L'apoptosi è un fenomeno presente, ma raro, nel miocardio sano, con tassi riportati di un cardiomiocita apoptotico su 10000 - 100000 ma

dimostrato essere coinvolta nella perdita di cellule cardiache che si realizza sia in fase precoce di uno stimolo lesivo (come ad esempio durante l'infarto del miocardio) sia in fase più tardiva, anche a distanza di mesi/anni dall'insulto (come ad esempio nel rimodellamento post-infartuale o nel rimodellamento secondario a sovraccarico di pressione/volume) (11). Infatti, numerosi studi hanno dimostrato come l'apoptosi sia evidenziabile in sezioni tissutali istologiche sia in fase acuta, nella zone di confine dell'area necrotica infartuale, (9) che dopo settimane anche in zone distanti dall'insulto ischemico, sottolineandone così il ruolo patogenetico nel rimodellamento cardiaco e nel successivo sviluppo di disfunzione sistolica ventricolare sinistra (11). Il processo apoptotico che si verifica in fase acuta è quantitativamente diverso da quello che si verifica in cronico: si ha un'abbondante ma temporalmente limitata perdita di cardiomiociti in fase acuta; una prolungata ma esigua perdita di cardiomiociti nelle fasi di rimodellamento (12).

Durante il processo apoptotico, l'attivazione delle caspasi porta infatti alla frammentazione di varie proteine citoplasmatiche e non necessariamente si associa alla frammentazione nucleare e alla

necessarie per determinare la contrazione del citoscheletro e gli scambi ionici (2). Con tali meccanismi l'attivazione della cascata apoptotica può causare un numero di alterazioni a livello cellulare e sub cellulare maggiore rispetto al "solo fenotipo" evidenziabile nelle sezioni istologiche del tessuto. Dunque l'importante processo di attivazione bioumorale che si verifica nelle fasi avanzate di SCC porta ad alterazioni mediate da segnali apoptotici che vanno a coinvolgere un numero di cellule molto più ampio rispetto ai soli cardiomiociti che vengono convogliati verso la lisi cellulare.

La spiegazione del perché si verifichi il processo di morte cellulare programmata non è completamente noto, bisogna tuttavia sottolineare che il processo di ipertrofia e quello di apoptosi non sono completamente separati ma risultano estesamente interconnessi. La perdita dei cardiomiociti per apoptosi, è stato infatti proposto essere uno dei meccanismi responsabili della transizione dall'ipertrofia compensatoria allo scompenso cardiaco. (14)

Ipertrafia ed apoptosi vengono infatti indotti da stimoli simili e si estrinsecano attraverso vie di trasduzione del segnale in parte

adattativo "favorevole" mentre l'ipertrofia patologica, come l'ipertrofia indotta dal sovraccarico di pressione/volume, è una risposta inadeguata ad uno stimolo patologico, e, come tale, può evolvere verso l'insufficienza cardiaca. A livello morfologico l'ipertrofia fisiologica è associata con una normale struttura cardiaca e con un programma di espressione genica conservato mentre la maggior parte dei modelli di ipertrofia patologica sono caratterizzati da fibrosi interstiziale, associata a rimodellamento della ECM (15).

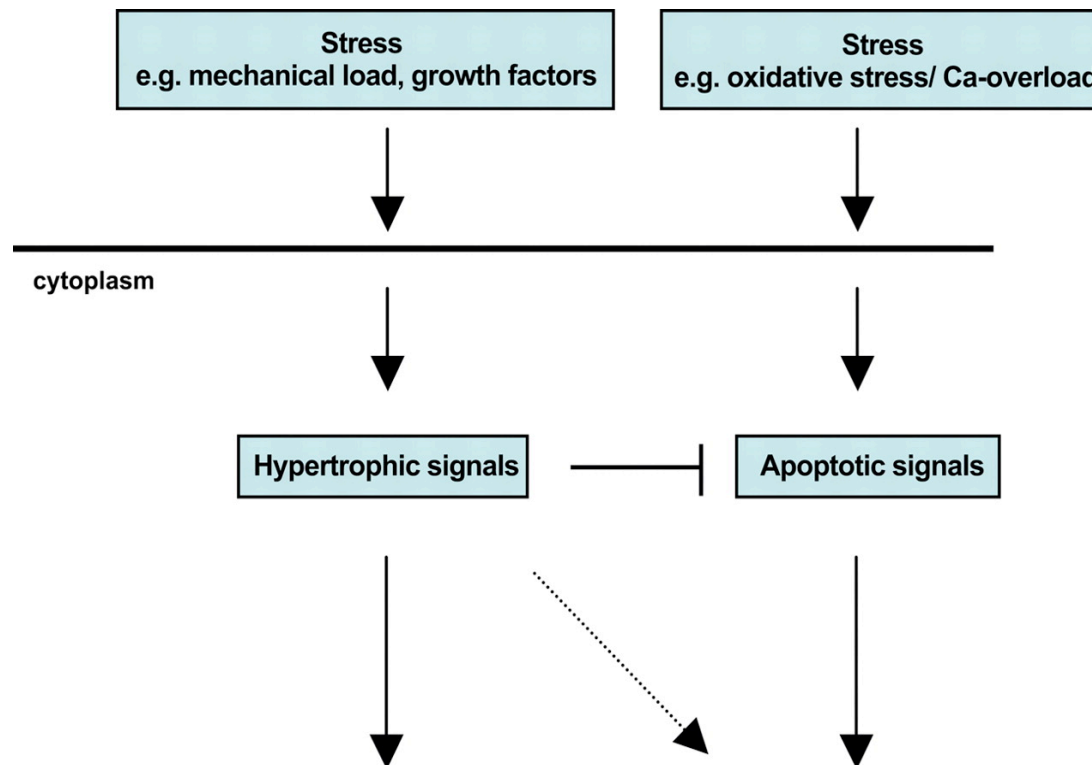


Figura 3. *Esemplificazioni di come ipertrofia e apoptosi sono due vie di segnale coinvolte nell'insufficienza cardiaca con meccanismi in parte sovrapponibili.*
van Empel et al. Cardiovascular Research 2004. (5)

3.1 Il sistema FAS e FAS L e il ruolo nella genesi e progressione dello SCC

Fas (Fas receptor), membro della più grande famiglia dei recettori del fattore di necrosi tumorale (TNFR), è un recettore presente sulla membrana plasmatica che media la morte cellulare. I membri di questa famiglia recettoriale sono diversi nella struttura primaria, ma presentano un modello strutturale simile caratterizzato dalla presenza di sequenze altamente conservate tra cui il dominio di morte o “death domain” che agisce come effettore dell'intero processo apoptotico. Tuttavia, la presenza di differenti domini di legame a livello della porzione extracellulare permette il riconoscimento del recettore ad opera di ligandi differenti, con specificità e talvolta con esclusività. (vedi Tabella 2)

Il recettore Fas è stato identificato per la prima volta nel 1989 come bersaglio di anticorpi in grado di indurre sperimentalmente apoptosi in diverse linee cellulari umane. (16)

Il legame tra il recettore Fas e il proprio ligando o Fas ligand (**FasL**), innesca il processo di morte cellulare programmata attraverso la via

clivaggio proteolitico e resa libera in forma solubile (sFasL) direttamente nel torrente circolatorio. (17)

Fas e FasL giocano un ruolo fisiologico importante principalmente in tre condizioni di apoptosi tissutale : la delezione periferica di cellule T mature attivate; l'uccisione di bersagli (come cellule infettate da virus o cellule tumorali) e l'eliminazione di cellule infiammatorie a livello di siti immunoprivilegiati come ad esempio l'occhio. (18)

La forma solubile di FasL (sFasL) è in grado di indurre apoptosi in cellule che esprimono il recettore Fas sulla plasmamembrana. E' stato evidenziato in letteratura che le concentrazioni sieriche di sFas correlano con l'espressione del suo recettore a livello tissutale, pertanto l'aumentata concentrazione sierica di sFas riflette in vivo l'attivazione del sistema Fas/FasL. (19)

La risposta all'attivazione di Fas è stato inoltre dimostrato essere strettamente cellulo-specifica; alcuni tipi cellulari che rispondono al legame di sFas/Fas non innescano il programma di morte cellulare ma determinano l'induzione di fattori di trascrizione genica implicati nella differenziazione. (figura 4). Tale comportamento avvalora pertanto quanto precedentemente espresso dal legame

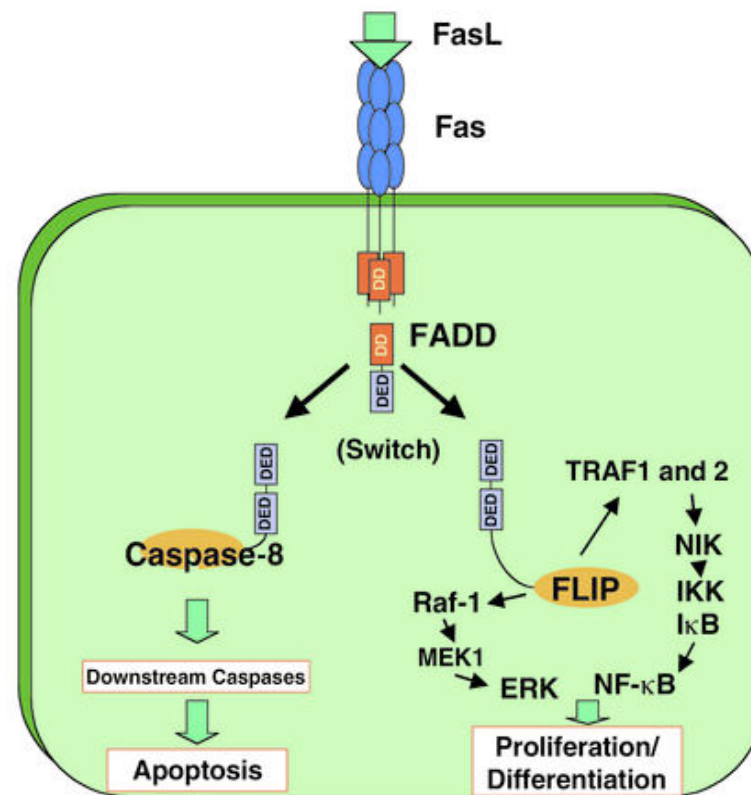


Figura 4. Il legame di FasL a Fas può indurre sia morte cellulare che proliferazione a seconda della via di segnale che viene attivata. Ralph C. Budd. et al. *J Clin Invest.* 2002. (20)

Utilizzando RT-PCR e Western Blotting, è stato rilevato che l'mRNA di FasL e la relativa proteina sono espressi costitutivamente anche a livello del mitocondrio dove FasL è principalmente localizzato

le concentrazioni rilevabili nel sangue aortico. (21) e che l'espressione di Fas/FasL risulta up-regolata in caso di ischemia, ischemia/riperfusion, sovraccarico di volume/pressione. (18); sottolineando dunque come l'attivazione "in loco" del processo apoptotico mediato da Fas svolga un ruolo in tali quadri patologici.

Infatti sperimentalmente il ruolo del sistema Fas è stato dimostrato in studi che hanno correlato l'over-stress di parete ventricolare con il tasso di apoptosi evidenziabile attraverso colorazioni istologiche nel tessuto e l'evidenza in circolo di FasL (14, 23)

Nello studio di L. Jiang è stata poi messo in relazione il grado di pressione telediastolica ventricolare sinistra e lo stress di parete del VS con l'attivazione di Fas/FasL. (22) (figura 5), trovando una diretta proporzionalità fra i due fenomeni, a dimostrare che uno stimolo lesivo è in grado di attivare il sistema Fas mediando così l'apoptosi cellulare e concorrendo al rimodellamento del tessuto.

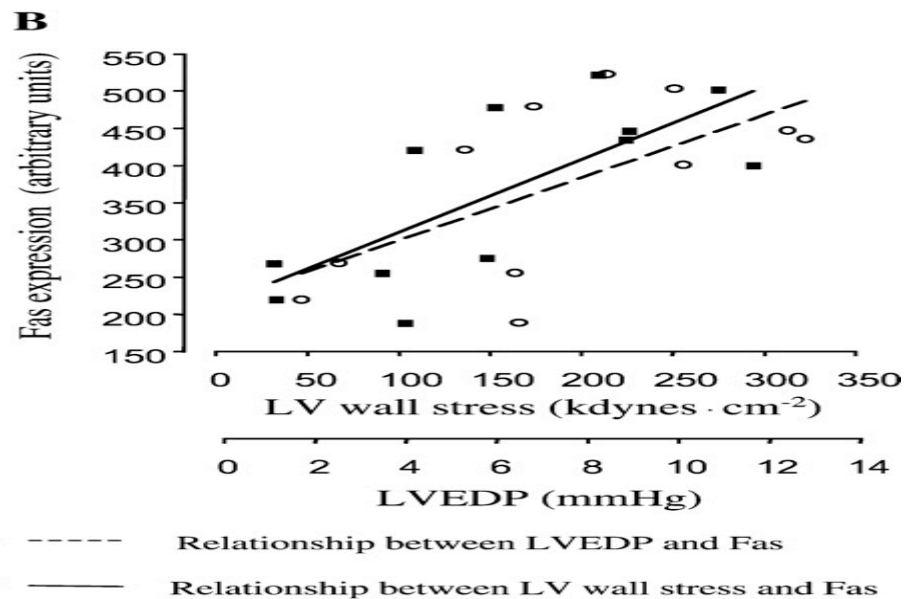
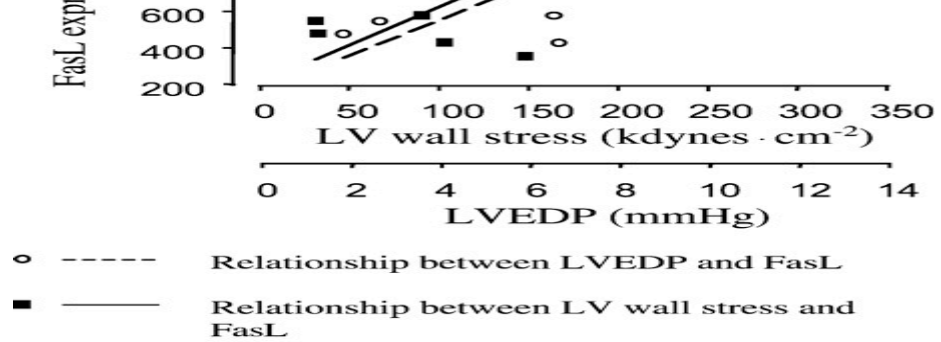


Figura 5. *Correlazione lineare tra l'espressione di Fas/FasL e lo stress di parete del VS e con LVEDP (pressione telediastolica ventricolare sinistra).*

L. Jiang, et al. European Heart Journal 2003. (22)

del processo di rimodellamento cardiaco e con dati funzionali come la classe NYHA. (25-28) (Figura 6)

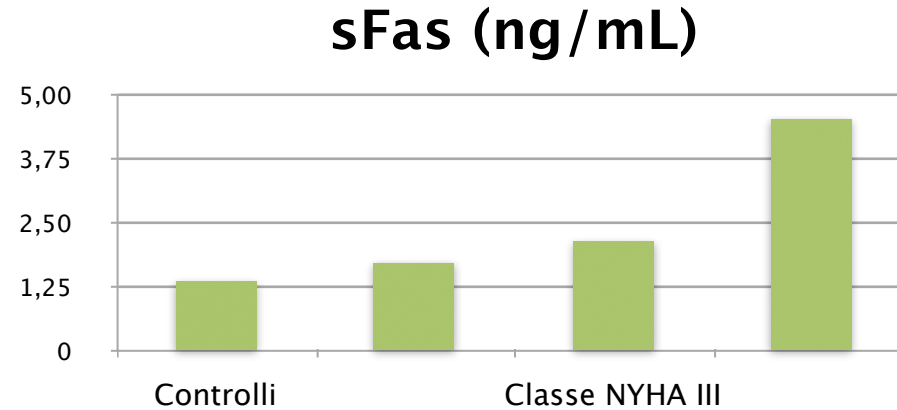


Figura 6. Concentrazioni di Fas solubile (sFas) nei controlli e nelle tre classi funzionali NYHA. Fiorina P *J Clin Immunol.* 2000 (29)

Diversi studi, tra cui quello di Alexander Niessser (30), hanno poi valutato il ruolo prognostico di Fas/Fas-L nei pazienti affetti a SCC, evidenziando una correlazione fra aumento in circolo della forma solubile del marker con il rischio di mortalità. (Figura 7)

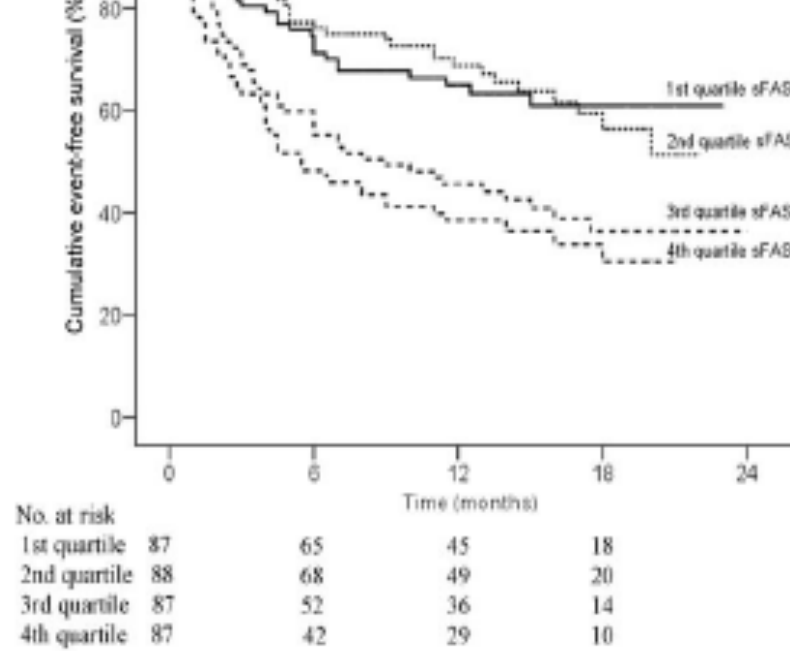


Figura 7. Curve di sopravvivenza di pazienti affetti da SCC in relazione a sFas. Il rischio di eventi clinici aumenta con l'aumentare della concentrazione ematica di sFas nei pazienti con SCC in fase avanzata: risulta essere di 2-4 volte superiore nel 4 quartile (sFas 12.967-22.457 pg/ml) rispetto al 1 quartile (sFas 4.646-8.807 pg/ml) Hoke M, Epub 2011 (30)

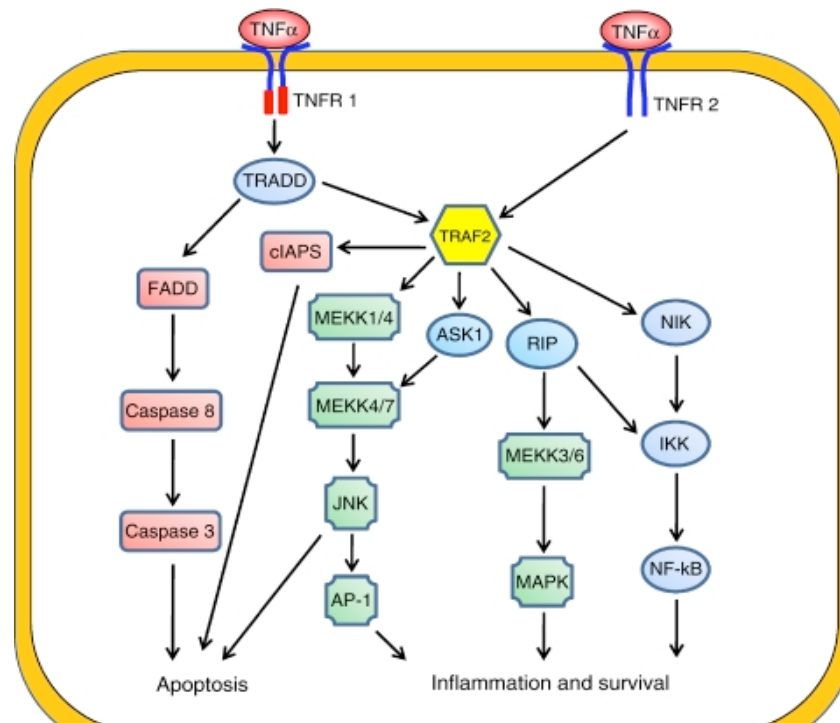
Il fattore di necrosi tumorale α è una citochina coinvolta nell'infiammazione sistemica e membro di un gruppo più ampio di mediatori coinvolti nella reazione di fase acuta. TNF è prodotto sotto forma di proteina transmembrana di tipo II e solo successivamente subisce un clivaggio proteolitico ad opera dell'enzima di conversione TACE o ADAM17 e rilasciato nel torrente circolatorio.

La molecola deve il nome dall'osservazione sperimentale che la proteina esercita in vitro e in modelli animali alcuni effetti anti-tumorali. Studi più approfonditi hanno poi chiarito che il TNF svolge molteplici funzioni biologiche; oltre agli effetti citotossici e citostatici, è in grado di inibire la replicazione virale, regolare le cellule del sistema immunitario, indurre infiammazione e morte cellulare apoptotica, influenzare la crescita e la differenziazione cellulare.

La molecola esplica i propri effetti biologici tramite il legame con due tipi di recettori: **TNF-R1** (recettore per il TNF di tipo 1; CD120a; p55/60) e **TNF-R2** (recettore per il TNF di tipo 2; CD120b; p75/80). TNF-R1 è espresso costitutivamente nella maggior parte dei tessuti e può essere attivato sia dalla frazione di TNF legata alla

Dopo il legame con il ligando, i recettori formano delle strutture trimeriche che espongono la regione attiva permettendo così alla proteina adattatrice (TRADD) di dare origine ad una cascata di trasduzione del segnale in grado di attivare tre distinte vie intracellulari (Figura 8).

La prima, tramite il fattore nucleare NF- κ B, media la trascrizione di un vasto numero di proteine coinvolte nella sopravvivenza e proliferazione cellulare, la seconda tramite la via delle MAP chinasi (MAPK): svolge una funzione sia pro-apoptotica che anti-apoptotica mentre la terza determina l'induzione di segnali di morte cellulare .



Sebbene tradizionalmente sia sempre stato ipotizzato che le citochine pro-infiammatorie come il TNF vengano prodotte esclusivamente da cellule specializzate del sistema immune, una delle più recenti evidenze in letteratura ha dimostrato che in realtà tutte le cellule nucleate sono capaci di sintetizzarlo.

Tuttavia né l'mRNA di TNF né la proteina sembrano essere costitutivamente espressi nel cuore normale dei mammiferi; entrambi sono invece rapidamente sintetizzati, da macrofagi, fibroblasti, cardiomiociti, in risposta a determinati stimoli stressogeni e nell'insufficienza cardiaca, (32) suggerendo come la sovraespressione di citochine possa essere uno dei meccanismi che portano al processo di rimodellamento inadeguato e alla progressione dello SCC. (33).

Sperimentalmente è dimostrato che la stimolazione con TNF di tessuto miocardico isolato produce tre differenti effetti ugualmente importanti nel processo di rimodellamento ventricolare: fibrosi della ECM, ipertrofia e morte cellulare tramite apoptosi.

TNF- α . (tabella 3).

Gli studi di Levine et al. (34) sono stati i primi ad evidenziare che i livelli di TNF- α risultano più elevati in pazienti con insufficienza cardiaca, rispetto a controlli sani, e che individui affetti da SCC con i più alti livelli di TNF- α presentano una sintomatologia più severa e una prognosi peggiore rispetto al gruppo di controllo. (Figura 9)

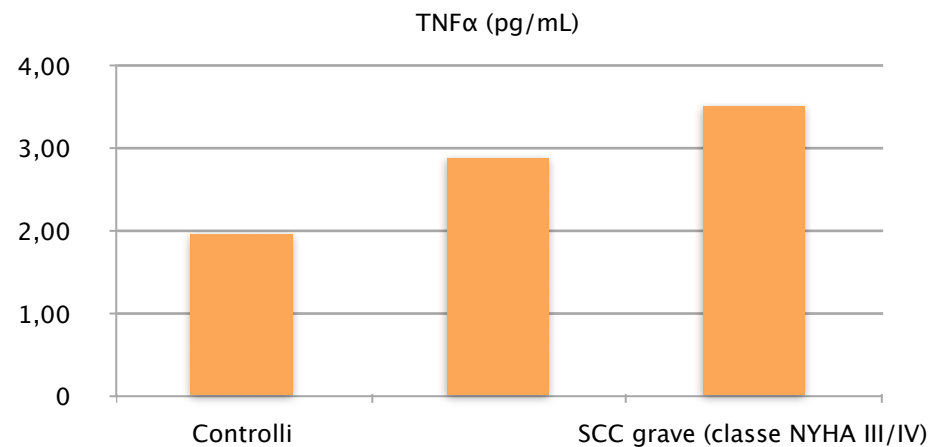


Figura 9. Takayoshi T, *The European Journal of Heart Failure*

Molti studi presenti in letteratura hanno poi dimostrato che anche i livelli delle forme recettoriali della citochina (TNF-RI, TNF-RII)

inevitabilmente caratterizzata da profonde alterazioni del tessuto cardiaco e da estesa fibrosi extracellulare comportando un rapido deterioramento della funzione sistole/diastolica della camera ventricolare.

In base alle evidenze presenti in letteratura abbiamo ipotizzato che la valutazione dell'attivazione immuno - infiammatoria a livello cardiaco, associata a parametri morfologici di rimodellamento, possa rappresentare una fase avanzata del processo di rimodellamento inadeguato del VS e di conseguenza avere un ruolo prognostico nei pazienti affetti da disfunzione sistolica ventricolare sinistra. Pertanto, utilizzando la riduzione del rapporto M/V misurato con tecnica ecocardiografica, (parametro di rimodellamento inadeguato) associato all'incremento dei valori plasmatici di FAS/APO-1 (marker di apoptosi tissutale), come indicatori del processo di rimodellamento inadeguato del ventricolo sinistro, abbiamo valutato il ruolo prognostico di questi parametri in pazienti con SCC.

Popolazione

Ottantuno pazienti con diagnosi di disfunzione sistolica del ventricolo sinistro secondaria a cardiopatia ischemica, ipertensiva, valvolare ed idiopatica sono stati arruolati nello studio. Tutti i pazienti erano stati in precedenza ospedalizzati a causa di presenza di segni e/o sintomi di scompenso cardiaco congestizio. I criteri d'inclusione sono stati i seguenti:

- disfunzione sistolica del ventricolo sinistro, definita come frazione di eiezione (FE) del ventricolo sinistro (VS) $< 45\%$;
- volume telediastolico indicizzato del VS $> 75 \text{ mL/m}^2$;

I criteri di esclusione comprendevano: valvulopatia di severa entità, presenza di protesi valvolari meccaniche, presenza di neoplasie note, malattie autoimmuni sistemiche e IRC severa.

I pazienti sono stati seguiti con monitoraggio ambulatoriale per un periodo di follow-up di 24 ± 8 mesi. L'end-point dello studio è stato preventivamente stabilito come mortalità per tutte le cause. I dati circa la sopravvivenza sono stati ottenuti attraverso il follow-up dei

EcocolorDoppler cardiaca

Tutti i pazienti arruolati sono stati sottoposti ad una valutazione clinica ambulatoriale ed ad un esame ecocardiografico trans-toracico, che prevedeva una valutazione standard bidimensionale, monodimensionale e color-Doppler per lo studio degli indici di funzione diastolica (apparecchio Acuson Sequoia C256- Siemens Medical Solutions USA, Inc, Mountain View, California, sonde da 3.5 MHz). La valutazione ecocardiografica ha compreso: misure standard delle camere cardiache, volume del VS, massa ventricolare sinistra indicizzata per la superficie corporea e per l'altezza, la FE del VS, il rapporto M/V e lo studio color-Doppler dei flussi valvolari; tutte le misurazioni sono state ottenute attenendosi alle attuali linee guida della Società Americana di Ecocardiografia. (39)

Dosaggio di FAS/Apo-1, TNF-alfa, sTNFR1, sTNFR2

I valori circolanti di FAS/Apo-1, TNF-alfa, forma solubile del recettore di tipo 1 per il TNF (sTNFR1), forma solubile del recettore di tipo 2 per il TNF (sTNFR2) e Nt-proBNP. sono stati dosati

Le variabili di tipo continuo sono state espresse come valor medio \pm deviazione standard (SD) se distribuite normalmente, o come mediana o range interquartile (IQRs). La probabilità di sopravvivenza cumulativa è stata valutata utilizzando il metodo delle curve attuariali di Kaplan-Meyer.

E' stata eseguita inoltre l'analisi di regressione lineare uni variata e multivariata (secondo Cox). Sono state valutate le seguenti variabili: età, genere, classe funzionale NYHA (New York Heart Association), massa indicizzata del VS, misura indicizzata del volume telediastolico e telesistolico, frazione di eiezione del ventricolo sinistro, rapporto M/V, tempo di decelerazione dell'onda E, valore di **FAS/Apo-1, TNF-alfa, sTNFR1, sTNFR2, nt-PROBNP**

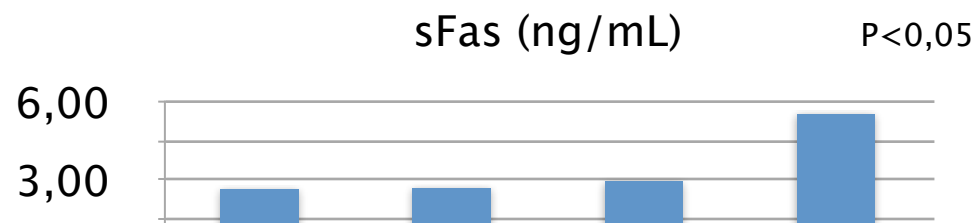
Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato significativo ai fini dell'analisi statistica.

L'età media dei pazienti arruolati nello studio è risultata di 66 ± 11 anni, il 78% di pazienti (n=63) erano di sesso maschile e il 22% (n=18) di sesso femminile. Per quanto riguarda la classe funzionale NYHA, tra questi pazienti 6 (7,4%) erano in classe I, 27 (33,3%) in classe II, 43 (53%) in classe III e 5 pazienti (6%) in classe IV.

Di questi pazienti, la patogenesi dello scompenso era da riferire in 35 pazienti (43.2%) a cardiomiopatia dilatativa idiopatica (CMD), in 37 pazienti (49.4%) a cardiopatia ischemica, in 4 paziente (6.2%) a malattia ipertensiva e in 1 paziente (1,2%) a malattia valvolare.

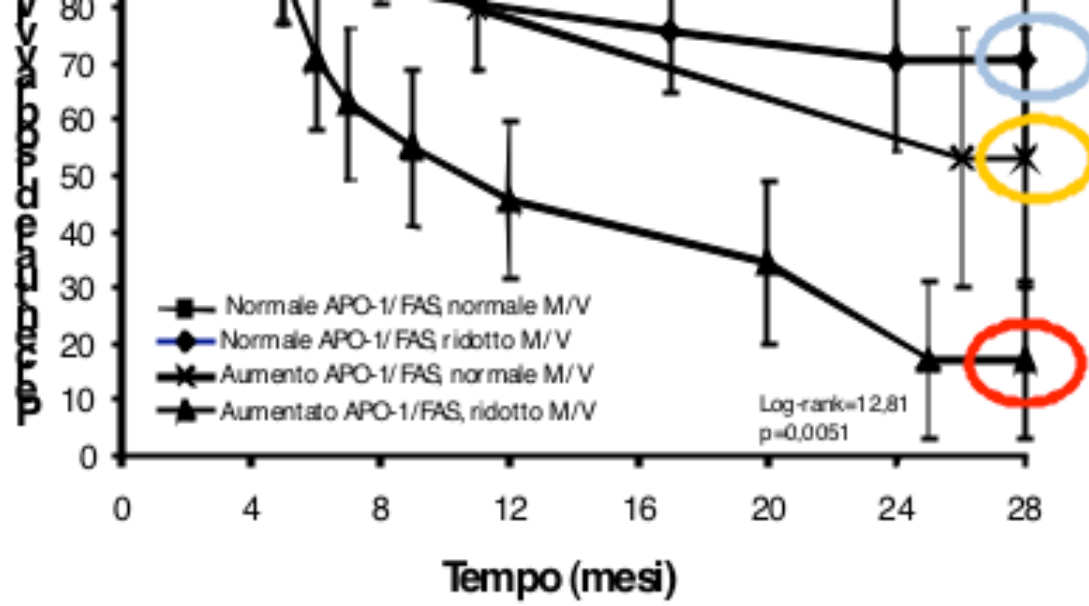
Il valor medio della FE è risultato di $29 \pm 8\%$; il 90.2 % dei pazienti presentavano un ritmo sinusale.

La concentrazione media totale di Fas/Apo-1 rilevata nei pazienti è stata di 2.9 ng/mL con un valor medio di $2.66 \pm 0,3$ ng/mL per i pazienti in classe NYHA I, $2.7 \pm 0,42$ ng/mL nei pazienti in classe NYAH II, $2.95 \pm 0,3$ nei pazienti in classe NYAH III $5.52 \pm 0,5$ ng m/L nei pazienti in classe NYHA IV ($p < 0.05$).



rapporto M/V ed aumento del valore plasmatico di Fas/Apo-1 presentavano : più bassi valori percentuali di FE ($p=0.0035$), più elevati livelli plasmatici di TNF α ($p=0.0008$), più elevati livelli plasmatici di sTNFR1 ($p=0.0039$) e più elevati livelli plasmatici di sTNFR2 ($p=0.012$)

Costruendo le curve di sopravvivenza di Kaplan-Meyer si evidenzia che la sopravvivenza globale è stata del 17% nei pazienti con un ridotto rapporto M/V e livelli aumentati di FAS/Apo-1, rispetto al 53% dei pazienti con un normale rapporto M/V e aumentati livelli di FAS/Apo-1, al 71% di quelli con un ridotto rapporto M/V e normali livelli di FAS/Apo-1, e al 94% di quelli con un normale rapporto M/V e normali valori di FAS/Apo-1 (log-rank:12.81, $p=0.0051$).



ricerca in questo ambito, sia in termini etiopatogenetici che in relazione all'utilizzo di nuovi interventi terapeutici. Le evidenze presenti in letteratura sull'implicazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone e dell'attivazione neuroendocrina nella progressione dello scompenso cardiaco ha fatto nascere numerosi studi randomizzati di intervento con beta-bloccanti e inibitori del sistema renina-angiotensina-aldosterone, i quali hanno dimostrato che l'utilizzo di queste classi di farmaci riduce in maniera significativa la mortalità totale e migliora la storia clinica di pazienti con SCC.

Nelle ultime due decadi, la ricerca in questo settore ha fornito nuove evidenze, tra le quali il ruolo dei sistemi immunitario ed infiammatorio come importanti fattori fisiopatologici coinvolti nel processo di progressione dello scompenso cardiaco (40). Alti livelli di citochine sono stati, infatti, rilevati sia in circolo sia in biopsie miocardiche di individui affetti da SCC. Le citochine (TNF- α ; IL-6) sembrano essere implicate in varie fasi della progressione dello SCC: attivazione dell'apoptosi miocitaria, progressione della disfunzione endoteliale, alterazione dei sistemi di attivazione dell'inotropismo

Più alte concentrazioni di TNF- α sono state associate con un significativo peggioramento del quadro clinico in pazienti con SCC e sono correlate con i livelli di attivazione neuro-ormonale e con la severità della classe funzionale NYHA. (41)

Nei pazienti in fase avanzata di SCC (classe NYHA IV) si evidenziano livelli plasmatici di FAS-Apo1 più elevati rispetto ai soggetti in classe NYHA I-II-III, a dimostrare che l'attivazione del sistema apoptotico è presente e concorre al quadro di rimodellamento inadeguato, specie nelle fasi più avanzate di malattia. Similmente è stato dimostrato che in pazienti in cui è presente il rimodellamento inadeguato del VS (definito dal rapporto M/V e dai valori di sFas) anche il TNF e i suoi recettori presentano valori plasmatici più elevati rispetto ai pazienti nelle altre classi funzionali. Dunque tali mediatori biologici risultano implicati nei processi che sottendono il rimodellamento inadeguato del VS specie in fasi più avanzate quando è presente il deterioramento funzionale del tessuto. (29, 38)

Tali mediatori biologici vengono ad acquisire anche un ruolo prognostico correlando con la mortalità dei pazienti in quanto vengono a riflettere una fase avanzata del processo di

In accordo con i dati presenti in letteratura, i risultati del nostro studio confermano un ruolo importante del sistema infiammatorio nella progressione verso un rimodellamento patologico del ventricolo sinistro nei pazienti con SCC; infatti, nella nostra popolazione di pazienti con cardiopatia dilatativa idiopatica e secondaria e ridotta funzione sistolica del ventricolo sinistro, si è dimostrata una significativa correlazione tra elevati livelli plasmatici di FAS-Apo 1 e ridotto rapporto M/V misurato all'ecocardiografia. Inoltre, i nostri risultati hanno indicato che livelli maggiori di attivazione del sistema delle citochine e maggiore severità dei dati ecocardiografici di rimodellamento inadeguato si associano a prognosi peggiore, dimostrando una sopravvivenza a 12 mesi significativamente inferiore nei pazienti con basso rapporto M/V e alti livelli di FAS-Apo 1 rispetto al gruppo con normali valori di rapporto M/V e livelli di citochine.

La valutazione combinata dei valori circolanti di FAS/Apo1 e dei parametri di rimodellamento inadeguato del ventricolo sinistro può migliorare la stratificazione prognostica dei pazienti con disfunzione sistolica ventricolare sinistra.

I dati preliminari in nostro possesso indicano che in pazienti affetti da scompenso cardiaco cronico da cardiopatia dilatativa idiopatica e secondaria, la riduzione del rapporto M/V (utilizzato come parametro del rimodellamento inadeguato del VS) e l'aumento dei livelli plasmatici di Fas/Apo-1 (marker di apoptosi tissutale) si associano ad alterazioni ecocardiografiche di disfunzione sisto-diastolica più severe ed a una prognosi peggiore.

Tabella 1. Bersagli sub-cellulari colpiti durante lo sviluppo dell'insufficienza cardiaca congestizia. (3)

Targets	Sites Affected	Functional Abnormalities
Sarcolemma	Na ⁺ -Ca ²⁺ exchanger, Na ⁺ -H ⁺ exchanger, Ca ²⁺ -channels, Na ⁺ -K ⁺ ATPase, adrenoceptors, phospholipases	Ca ²⁺ -handling, arrhythmias, contractile dysfunction
Sarcoplasmic reticulum	Ca ²⁺ -pump ATPase, Ca ²⁺ -release channels, phospholamban	Ca ²⁺ -handling, defective relaxation, defective contraction
Myofibrils	Myosin heavy chain isozymes, troponin isoforms, myosin light chain	Contractive dysfunction, defects in energy utilization, changes in Ca ²⁺ -sensitivity
Mitochondria	Electron transport system, oxidative phosphorylation, cation channels	Defect in energy production
Nucleus	Transcriptional factors, translational factors	Changes in gene expression, apoptosis
Extracellular matrix	Collagen proteins, matrix metalloproteinases	Fibrosis, cardiac stiffness

Tabella 2. Recettori di morte (TNFR) e loro ligandi.

Nome del recettore di morte	Ligando del recettore di morte
Fas (CD95, Apo1) <u>TNFR1</u> (p55, CD120a)	CD95L (FasL) and DAXX <u>TNF</u> and Lymphotoxin alpha
DR3 (Apo3, WSL-1, TRAMP, LARD)	Apo3L (TWEAK)
DR4	TRAIL (Apo2L)
DR5 (Apo2, TRAIL R2, TRICK2)	TRAIL (Apo2L)

Tabella 3 : I potenziali effetti indesiderati di TNF nello scompenso cardiaco. (32)

Determina disfunzione ventricolare sinistra
Determina edema polmonare nell'uomo
Determina cardiomiopatia nell'uomo
E' associato con una ridotta perfusione della massa muscolare scheletrica nell'uomo
Promuove sperimentalmente il rimodellamento del ventricolo sinistro
Promuove sperimentalmente il tromboembolismo Produce sperimentalmente delle anomalie nel metabolismo miocardico
Produce sperimentalmente anoressia e cachessia Produce sperimentalmente il disaccoppiamento dei β -recettori dall'adenilato ciclasi
Anomalie nella produzione di energia da parte di mitocondri
Attivazione a livello sperimentale di un programma di geni fetali
Produce sperimentalmente apoptosi dei cardiomiociti

- 1) David R. Buvat de Virginy. Heart Failure Review (2006) 11:333-334. “Novel and potential future biomarkers for assessment of the severity and prognosis of chronic heart failure”.
- 2) Gerald W. Dorn II. Cardiovascular Research (2009) 81, 465-473. “Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodelling”.
- 3) Naranjan S. Dhalla, PhD, MD, DSc, Melissa R. Dent, MSc, Paramjit S. Tappia, PhD, Rajat Sethi, PhD, Judit Barta, MD, PhD, and Ramesh K. Goyal, PhD. J Cardiovasc Pharmacol Therapeut 11(1):31–45, 2006. “Subcellular Remodeling as a Viable Target for the Treatment of Congestive Heart Failure”.
- 4) Kazuhiko Nishida, MD; Kinya Otsu, MD. Circulation Journal Supplement A 2008; A-17 -A-21 “Cell Death in Heart Failure”.
- 5) van Empel VP, De Windt LJ. Cardiovascular Research 63 (2004) 487-499. “Myocyte hypertrophy and apoptosis: a balancing act.”
- 6) L. Jiang, Y. Huang, S. Hunyor, C G dos Remedios. European Heart Journal 2003; 24: 742-751. “Cardiomyocyte apoptosis

- 7) Catherine Communal, Marius Sumandea, Pieter de Tombe, Jagat Narula, R. John Solaro, and Roger J. Hajjar. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 April 30; 99(9): 6252–6256. “Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes”,
- 8) Olivetti G, Quaini F, Sala R, et al. J Mol Cell Cardiol. 1996; 28:2005–2016. “Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart”.
- 9) Nam-Ho Kim, MD1 and Peter M. Kang. Korean Circ J. 2010 July; 40(7): 299–305. “Apoptosis in Cardiovascular Diseases: Mechanism and Clinical Implications”.
- 10) Hein S, Arnon E, Kostin S, Schönburg M, Elsässer A, Polyakova V, Bauer EP, Klövekorn WP, Schaper J. Circulation. 2003 Feb 25;107(7):984-91. “Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms”.
- 11) Takemura G, Ohno M, Hayakawa Y, et al. Circ Res.

- 12) Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA et al. N Engl J Med 1996; 335:1190-1196. “Apoptosis in the Failing Human Heart”.
- 13) Narula J, Haider N, Virminani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ et al. N Engl J Med 1997; 336: 1182-1189. “Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure”.
- 14) Wei Cheng, Baosheng Li, Jan Kajstura, Peng Li, Michael S. Wolin, Edmund H. Sonnenblick, Thomas H. Hintze, Giorgio Olivetti, and Piero Anversa. J Clin Invest. 1995 Nov; 96(5):2247-2259. “Stretch-induced Programmed Myocyte Cell Death”.
- 15) Kang PM, Yue P, Liu Z, Tarnavski O, Bodyak N, Izumo S. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004 Jul;287(1):H72-80. Epub 2004 Mar 4. “Alterations in apoptosis regulatory factors during hypertrophy and heart failure”.
- 16) Trauth, 1989, Science, 245: 301
- 17) N Kayagaki, A Kawasaki, T Ebata, H Ohmoto, S Ikeda, S Inoue, K Yoshino, Ko Okumura, and H Yagita. J Exp Med. 1995 December 1; 182(6): 1777–1783 “Metalloproteinase-

ischemic heart failure: prohypertrophy or proapoptosis”

- 19) Iio S, Hayashi N, Mita E, Ueda K, Mochizuki K, Hiramatsu N, et al. J Hepatol 1998; 29:517-523. “Serum levels of soluble Fas antigen in chronic hepatitis C patients”.
- 20) Ralph C. Budd. J Clin Invest. 2002 February 15; 109(4): “Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis”.
- 21) Wollert KC, Heineke J, Westermann J, Lüdde M, Fiedler B, Zierhut W, Laurent D, Bauer MK, Schulze-Osthoff K, Drexler H. Circulation. 2000 Mar 14;101(10):1172-8. “The cardiac Fas (APO-1/CD95) Receptor/Fas ligand system: relation to diastolic wall stress in volume-overload hypertrophy in vivo and activation of the transcription factor AP-1 in cardiac myocytes”.
- 22) L. Jiang, Y. Huang, S. Hunyor, C G dos Remedios. European Heart Journal 2003. 24, 742-751. “Cardiomyocyte apoptosis is associated with increased wall stress in chronic failing left ventricle”.
- 23) N Moorjani, S Westaby, J Narula, P A. Catarino, R Brittin, T

Pathways in the Transition to Heart Failure”.

- 24) Yamaguchi S, Yamaoka M, Okuyama M, Nitoube J, Fukui A, Shirakabe M, Shirakawa K, Nakamura N, Tomoike H. Am J Cardiol. 1999 May 15;83(10):1500-3, A8. “Elevated circulating levels and cardiac secretion of soluble Fas ligand in patients with congestive heart failure”.
- 25) Ohtsuka T, Hamada M, Sasaki O, Suzuki M, Hara Y, Shigematsu Y, Ohtani T, Honda T, Hiwada K. Coron Artery Dis. 1999 Jun;10(4):221-5. “Clinical implications of circulating soluble Fas and Fas ligand in patients with acute myocardial infarction”.
- 26) Shimizu M, Fukuo K, Nagata S, Suhara T, Okuro M, Fujii K, Higashino Y, Mogi M, Hatanaka Y, Ogihara T. J Am Coll Cardiol. 2002 Feb 20;39(4):585-90. “Increased plasma levels of the soluble form of Fas ligand in patients with acute myocardial infarction and unstable angina pectoris”.
- 27) T Soeki, Y Tamura, H Shinohara, K Sakabe, Y Onose, and N Fukuda. Heart. 2003 March; 89(3): 339–341. “Relation between circulating soluble Fas ligand and subsequent

Myocardial Damage in Chronic Heart Failure is Related to Activated Tumor Necrosis Factor and Fas/Fas Ligand System”.

29) Fiorina P, Astorri E, Albertini R, Secchi A, Mello A, Lanfredini M, Craveri A, Olivetti G, Quaini F. *J Clin Immunol*. 2000 Mar;20(2):101-6. “Soluble antiapoptotic molecules and immune activation in chronic heart failure and unstable angina pectoris”.

30) Hoke M, Schillinger M, Zorn G, Wonnerth A, Amighi J, Mlekusch W, Speidl W, Maurer G, Koppensteiner R, Minar E, Wojta J, Niessner A. *Stroke*. 2011 Sep;42(9):2465-70. Epub 2011 Jul 14. “The prognostic impact of soluble apoptosis-stimulating fragment on mortality in patients with carotid atherosclerosis”.

31) Wu Y, Zhou BP. *Br J Cancer*. 2010 Feb 16;102(4):639-44. Epub 2010 Jan 19. “TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion”.

32) Mann DL. *Heart Fail Rev*. 2001 Mar;6(2):71-80. “Recent insights into the role of tumor necrosis factor in the failing

functional significance of TNF receptors in human myocardium”.

- 34) Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit H, Packer M. N Engl J Med. 1990; 323: 236-41.1990 “Elevated circulating levels of tumoral necrosis factor in severe chronic heart failure”.
- 35) Candia AM, Villacorta H Jr, Mesquita ET. Arq Bras Cardiol. 2007 Sep;89(3):183-90, 201-8”.Immune-inflammatory activation in heart failure”.
- 36) Hasper D, Hummel M, Kleber FX, Volk HD. “Systemic inflammation in patients with heart failure”. Eur Heart J. 1998; 19(5): 761-5
- 37) Anker S, Egerer K, Volk H, Kox W, Poole-Wilson P, Coats A. “Elevated soluble receptors and altered cytokines in chronic heart failure”. Am J Cardiol. 1997; 79: 1426-30.
- 38) Petretta M, Condorelli GL, Spinelli L, Scopacasa F, de Caterina M, Leosco D, Vicario ML, Bonaduce D. Am Heart J. 2000 Dec;140(6):E28. “Circulating levels of cytokines and their site of production in patients with mild to severe chronic heart failure”.

Standards Committee; Task Force on Chamber Quantification; American College of Cardiology Echocardiography Committee; American Heart Association ; European Association of Echocardiography, European Society of Cardiology. Eur J Echocardiogr. 2006 Mar;7(2): 79-108. Epub 2006 Feb 2. Review. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology.

40) Torre-Amione G. Am J Cardiol. 2005 Jun 6;95(11A):3C-8C; discussion 38C-40C. "Immune activation in chronic heart failure".

41) Levine B, Kalman J, Mayer I et al. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe congestive heart failure. N. Engl J Med 1990; 223-236-82.

Ringrazio il professor Stefano Taddei per avermi dato l'opportunità di inserirmi in un lavoro per me stimolante e di occuparmi della sua redazione.

Ringrazio la dott.ssa Simona Buralli che mi ha seguito scrupolosamente nella realizzazione di questo lavoro, indicandomi la strada da seguire, per il suo valido supporto, la sua disponibilità e gentilezza.

Ringrazio il dott. Luca Faconti per la sua importante e preziosa collaborazione nella stesura della tesi, e la dott.ssa Ilenia Boggioni per la sua cortesia e disponibilità.