



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Corso di laurea in Medicina e Chirurgia

TESI DI LAUREA

Livelli sierici di fattori pro-angiogenici e angiostatici
nella sclerosi sistemica

RELATORE

Prof.ssa Paola Migliorini

CANDIDATO

Lavinia Maggiorini

ANNO ACCADEMICO 2013/2014

1. ABSTRACT.....	3
2. INTRODUZIONE.....	5
3. SCOPO DELLA TESI.....	22
4. MATERIALI E METODI.....	22
5. RISULTATI.....	26
6. DISCUSSIONE.....	33
7. BIBLIOGRAFIA.....	37

1. ABSTRACT

La sclerodermia o sclerosi sistemica progressiva (SSc) è una malattia cronica e progressiva del tessuto connettivo, ad eziologia multifattoriale e patogenesi autoimmune, caratterizzata da alterazioni del sistema immunitario, disfunzione endoteliale e progressivo accumulo di tessuto fibroso a carico della cute e degli organi interni. Alterazioni funzionali e strutturali dei vasi con conseguente rimodellamento della parete endoteliale sono dimostrati già nelle fasi iniziali della SSc. Tali alterazioni sembrano essere responsabili dei cambiamenti del microcircolo con successiva perdita dei capillari e comparsa di aree avascolari. Studi sui fattori pro-angiogenici ed angiostatici in corso di SSc hanno spesso riportato risultati discordanti, in particolare quelli relativi ai dosaggi sierici di VEGF, FGF-2 ed endostatina. Lo scopo dello studio è quello di valutare in un ampio gruppo di pazienti con SSc i livelli circolanti di fattori pro-angiogenici (VEGF, FGF-2) ed angiostatici (Endostatina, TSP-1), di marcatori circolanti di disregolazione endoteliale (sICAM-1) ed il loro potenziale ruolo nella malattia. Abbiamo studiato 41 pazienti con SSc, caratterizzati dal punto di vista clinico, sierologico e strumentale. Nel siero di tali pazienti abbiamo dosato, mediante metodica immunoenzimatica, VEGF, FGF-2, endostatina, TSP-1 ed sICAM-1 e ne abbiamo confrontato i livelli con quelli dosati in 31 soggetti sani.

Nel nostro studio i pazienti con SSc presentavano livelli dei fattori pro-angiogenici VEGF ed FGF-2 sovrapponibili a quelli dei controlli. Tra i fattori angiostatici abbiamo riscontrato nel siero dei pazienti con SSc livelli significativamente aumentati di endostatina ma non di TSP-1. I pazienti con SSc presentano livelli significativamente aumentati di sICAM-1 rispetto a quelli dei soggetti di controllo. All'interno del gruppo dei pazienti con SSc non abbiamo riscontrato differenze significative di sICAM-1, né di endostatina tra la forma diffusa e limitata. Nel nostro studio i livelli sierici di sICAM-1 correlano positivamente con i valori della VES e della PCR e i livelli di endostatina con la riduzione del complemento (C4). Dei 41 pazienti studiati 24 sono stati inoltre sottoposti ad indagine ultrasonografica transtoracica per quantificare la severità della fibrosi polmonare attraverso l'identificazione di comete ultrasoniche polmonari. Nel nostro studio il numero di comete correla positivamente con i valori di DLCO ed è significativamente ridotto nel gruppo ACA positivo rispetto al gruppo ACA negativo.

In conclusione, nei pazienti con SSc abbiamo riscontrato un'alterazione del fattore angiostatico endostatina e una disregolazione endoteliale. Inoltre da indagini strumentali

non invasive quale l'ecografia transtoracica e' stato possibile identificare una correlazione tra le comete ultrasonografiche e parametri di interstiziopatia polmonare (DLCO).

2. INTRODUZIONE

2.1 SCLEROSI SISTEMICA

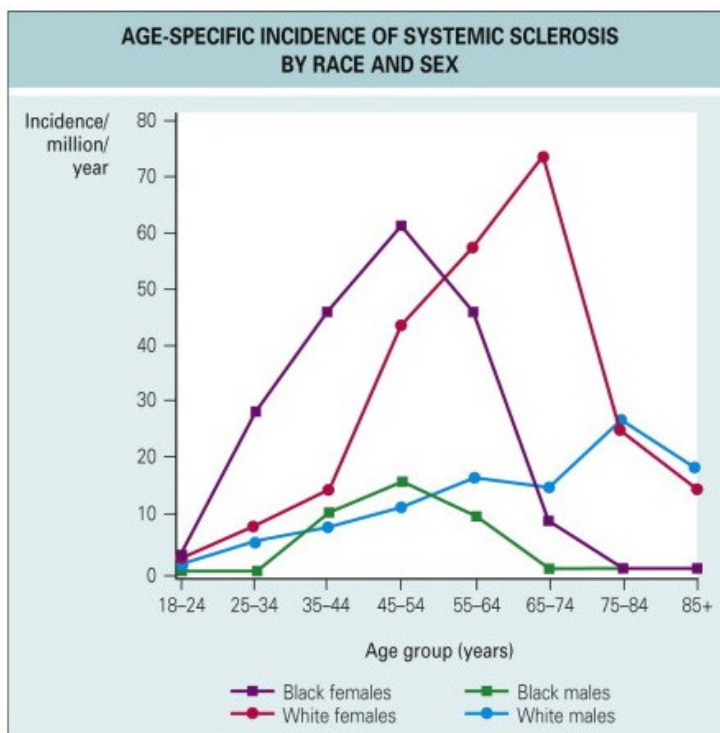
La sclerodermia o sclerosi sistemica progressiva (SSc) è una malattia cronica e progressiva del tessuto connettivo, ad eziologia multifattoriale e patogenesi autoimmune, caratterizzata da alterazioni del sistema immunitario, disfunzione endoteliale e progressivo accumulo di tessuto fibroso a carico della cute e degli organi interni. All' interno della SSc si distingue una forma di Sclerodermia Localizzata, suddivisa nei due sottotipi di Morfea (placche eritematose, uniche o diffuse, che esitano in lesioni sclerotiche con ipopigmentazione centrale e assenza di autoanticorpi) e Sclerodermia Lineare (ad esordio infantile e con interessamento lineare degli strati profondi e superficiali della pelle) ed una forma di Sclerodermia Sistemica, classificata sulla base all'entità dell'interessamento cutaneo e viscerale in forme diffuse, intermedie, limitate e "sine scleroderma", quest'ultima ad impegno esclusivamente viscerale.

2.1.1 EPIDEMIOLOGIA

La SSc è una malattia rara a distribuzione ubiquitaria. L'incidenza e la prevalenza della SSc variano in maniera significativa in vari studi condotti in differenti aree geografiche e in periodi diversi. Tale variabilità potrebbe essere ascrivibile alle differenze cliniche della malattia e all'assenza di criteri diagnostici e di classificazione ampiamente accettati, anche se potrebbe realmente riflettere differenze geografiche (diversa suscettibilità genetica e differenti esposizioni a supposti agenti eziopatogenetici ambientali). L'incidenza è stimata da 9 a 19 casi per milione di abitanti all'anno, con una prevalenza che va da 28 a 253 casi per milione di abitanti negli Stati Uniti (1) e di 120 casi per milione nel Regno Unito (2). Basandosi sull'incidenza e sui tassi di sopravvivenza, si stima che ci siano 75.000-100.000 casi di SSc negli Stati Uniti. Come altre connettiviti, la SSc è molto più frequente nelle donne che negli uomini, con un rapporto che varia da 4:1 a 6:1 (3). L'età di esordio varia in base al sesso e al gruppo etnico di appartenenza: l'incidenza è più alta e l'età di esordio più precoce tra gli Afro-Americani rispetto ai bianchi. Inoltre gli Afro-Americani affetti da sclerodermia presentano un coinvolgimento cutaneo diffuso, fibrosi polmonare e mostrano una prognosi più infausta (4). Il picco di incidenza cade tra i 45 e i 54 anni per le donne

afro-americane, mentre tra le donne bianche tra i 65 e i 74 anni. Negli uomini l'incidenza nei due gruppi è simile. Recenti studi hanno riportato un miglior tasso di sopravvivenza rispetto a dati precedentemente pubblicati: ciò potrebbe dipendere da una diagnosi più precoce rispetto al passato o dai progressi ottenuti nel trattamento delle complicanze potenzialmente mortali della SSc. Un recente studio ha riportato le variazioni nelle cause di mortalità organo-specifiche negli ultimi 25 anni (5): l'interessamento polmonare, includendo sia la fibrosi sia l'ipertensione polmonare, è diventato la prima causa di morte in pazienti affetti da SSc, subentrando alla crisi renale sclerodermica, che in passato era la principale causa di morte, prima dell'avvento dei farmaci ACE inibitori. Le altre cause di mortalità sono rappresentate dalla presenza e dalla gravità dell'interessamento renale e cardiaco (6).

Incidenza età-correlata della SSc per razza e sesso



2.1.2 EZIOLOGIA

L'eziologia della SSc è attualmente sconosciuta. Sono stati chiamati in causa come fattori scatenanti la presenza di microchimerismo, alcuni agenti infettivi (CMV e Parvovirus B19), l'esposizione a fattori ambientali come polvere di silice, cloruro di vinile, benzene,

toluene e altri solventi organici e l'assunzione di farmaci come la bleiomicina. Lo stress ossidativo e la formazione di radicali liberi sembra essere un possibile candidato come fattore contribuente alla progressione della malattia.

2.1.2.1 AGENTI INFETTIVI

Secondo la teoria del mimetismo molecolare autoanticorpi sarebbero prodotti dall'organismo contro antigeni self contenenti epitopi che presentino analogie strutturali con proteine batteriche o virali. L'ipotesi di un ruolo di agenti virali come fattori scatenanti è supportata da diverse osservazioni:

- 1) una maggiore prevalenza di IgA anti-CMV nei pazienti affetti da SSc;
- 2) la dimostrazione di sequenze omologhe in proteine retrovirali e nella topoisomerasi 1, che è il bersaglio degli anticorpi anti- Scl-70;
- 3) l'espressione di proteine retrovirali in fibroblasti umani normali induce l'acquisizione di un fenotipo simil sclerodermico.

2.1.2.2 MICROCHIMERISMO

Il microchimerismo è stato definito come la presenza di un basso numero di cellule circolanti trasferite bidirezionalmente da un individuo ad un altro durante la gravidanza, trasfusioni di sangue o trapianto di organi e midollo (7). Il passaggio e la permanenza di un piccolo numero di cellule fetali nel siero materno è una normale conseguenza della gravidanza. In uno studio recente dove è stata valutata la quantità di DNA maschile in donne con SSc e donne sane che avevano avuto almeno una gravidanza (8) è emerso che le donne affette da SSc presentavano livelli di DNA maschile molto più alti dei controlli. Ancora non è noto il meccanismo per il quale il microchimerismo sia tollerato dal sistema immunitario e se il riconoscimento di queste cellule esogene possa provocare una malattia autoimmune. Il concetto che il microchimerismo possa contribuire allo sviluppo di una patologia autoimmune è emerso dall'osservazione del chimerismo iatrogeno dopo un trapianto: il GVHD condivide infatti molte caratteristiche cliniche con le malattie autoimmuni, tra le quali anche la SSc. Inoltre le malattie autoimmuni sono molto più frequenti nelle donne, soprattutto negli anni successivi alle gravidanze. Recenti studi hanno dimostrato che questo dato potrebbe essere collegato alla presenza di microchimerismo

fetale sviluppato appunto durante eventuali gravidanze. L'ipotesi che tale processo possa indurre una malattia autoimmune ha coinvolto anche la relazione tra il sistema HLA del feto (donatore) e dell'ospite (la madre), che, come è noto, è un componente critico sia nel GVHD cronico sia nel rigetto da trapianto (9). Dati recenti descrivono un probabile ruolo delle cellule microchimeriche nella risposta materna al danno tissutale (10). Le cellule microchimeriche potrebbero potenzialmente funzionare sia da cellule effettrici sia da target di una risposta immunitaria. Alcuni studi hanno riportato la reattività di cloni linfocitari T maschili isolati in madri (con figli maschi) contro antigeni HLA materni non condivisi (11). Un altro meccanismo potrebbe essere la presentazione di peptidi da cellule Mc (ad esempio derivati da HLA paterni) tra due cellule dell'ospite, meccanismo analogo di riconoscimento che avviene nel rigetto cronico da trapianto di organi. Un'eccessiva affinità del sistema HLA tra cellule materne e fetali, in assenza di una completa identità HLA, potrebbe ostacolare il riconoscimento di cellule estranee: l'autoimmunità potrebbe essere indotta dalla simultanea presentazione di peptidi derivati dall'HLA, cosicché il Mc può avere effetti avversi o neutri, in base ai geni HLA coinvolti e alla relazione tra le differenti popolazioni cellulari.

2.1.3 PATOGENESI E PREDISPOSIZIONE GENETICA

Il ruolo di fattori genetici è suggerito dall'osservazione di una distribuzione familiare della malattia, con il frequente riscontro di altre patologie autoimmuni o della positività per autoanticorpi tra i membri della stessa famiglia, nonché dalla maggiore prevalenza della patologia in determinate etnie e dall'aumentata prevalenza di alcuni aplotipi HLA nei soggetti affetti.

Nella patogenesi della malattia vengono descritti tre tipi di fenomeni responsabili delle manifestazioni cliniche:

- 1) danno vascolare, principalmente della microcircolazione;**
- 2) attivazione del sistema immune/infiammazione;**
- 3) fibrosi.**

2.1.3.1 DANNO VASCOLARE

La vasculopatia è un evento precoce che precede la fibrosi e consiste in una

microangiopatia del distretto cutaneo, gastro-intestinale, cardiaco e polmonare risultante da una iperreattività dell'endotelio a una serie di stimoli. Il danno endoteliale, mediato dalle citochine prodotte dai linfociti attivati e dagli anticorpi diretti contro la cellula endoteliale, determina una produzione disregolata di vasodilatatori (NO e prostaciline) e vasocostrittori (endotelina-1) con aumento della permeabilità nei confronti delle cellule leucocitarie. C'è un intenso richiamo di leucociti nel tessuto, soprattutto linfociti T helper (Th2) accompagnato da attivazione piastrinica e dall'iperproduzione di citochine e chemochine pro-fibrotiche (TGF- β , CTGF, PDGF). Le cellule muscolari lisce migrano nell'intima dove si differenziano in miofibroblasti determinando un restringimento del lume vascolare con conseguente diminuzione del flusso sanguigno che sarà la causa di manifestazioni come il fenomeno di Raynaud, l'ischemia e le ulcere digitali.

2.1.3.2 PROFILO ANTICORPALE

Una percentuale di pazienti con SSc tra l'85 e il 90% presenta una positività per gli anticorpi anti-nucleo mediante test di immunofluorescenza indiretta. La maggior parte (60-70%) risulta positivo per uno dei tre anticorpi SSc-specifici di più largo utilizzo e mutuamente esclusivi (12): questi includono gli anticorpi anticentromero (ACA), anti-topoisomerasi 1 (Scl-70) e gli anti-RNA polimerasi III. Inoltre gli anti-PM-Scl sono un quarto tipo di autoanticorpo che identifica una piccola porzione di pazienti affetti da sindrome da overlap polimiosite-sclerodermia. Esistono poi altri due autoanticorpi altamente specifici per la sclerodermia, anti-U3RNP (anti-fibrillarina) e anti-Th/To, ma non essendo ancora disponibili metodi standardizzati per la loro determinazione di questi anticorpi la loro utilizzazione nella pratica clinica è limitata. Oltre ad essere mutuamente esclusivi, gli autoanticorpi presenti nella SSc tendono a positivizzarsi al momento o anche prima dell'esordio dei sintomi e molto raramente cambiano nel corso della malattia (13). I vari anticorpi sono associati ai vari pattern di malattia, anche se esistono molte eccezioni: gli ACA sono i più attendibili indicatori della forma di sclerodermia limitata, di una maggiore sopravvivenza e di un più basso rischio di interstiziopatia polmonare severa. Comunque questi pazienti sono a rischio di sviluppare ipertensione arteriosa polmonare come complicanza a lungo termine (14), motivo per cui non è possibile definire "benigna" questa variante di malattia. Gli anticorpi antitopoisomerasi I (Scl-70) sono più frequentemente associati alla forma diffusa, ma talvolta possono risultare positivi nelle

forme limitate e sono buoni indicatori di malattia interstiziale polmonare severa (15). Anche gli anti-RNA-polimerasi III sono associati più frequentemente alla forma diffusa di malattia e conferiscono un alto rischio di sviluppare crisi renale (16), anche se tale condizione clinica è stata registrata anche in caso di negatività degli ANA.

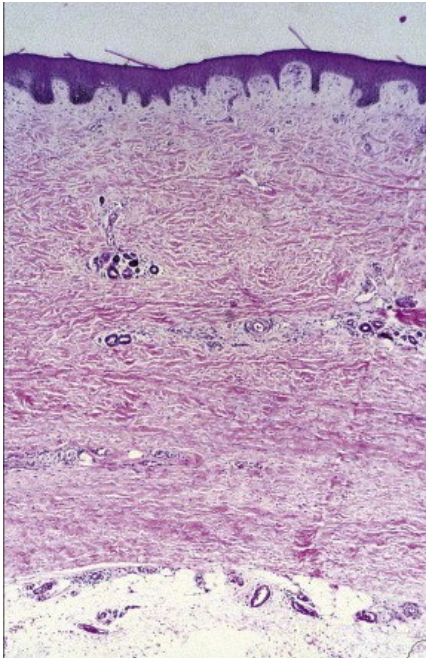
Indipendentemente dalla valutazione dello stato anticorpale, è comunque raccomandato un attento monitoraggio clinico, per la diagnosi precoce delle complicanze potenzialmente fatali. Infatti, non esiste ancora la possibilità di predire lo sviluppo e la severità del coinvolgimento viscerale nelle fasi precoci di malattia.

2.1.3.3 FIBROSI

La fibrosi rappresenta l'ultimo step dei meccanismi patogenetici alla base della SSc, responsabile delle più importanti manifestazioni cliniche.

I fibroblasti dei pazienti con SSc presentano un alterato controllo della crescita e della produzione di collagene (soprattutto di tipo I e III) con conseguente deposizione della matrice extracellulare in particolare a carico del derma reticolare. A questo livello si osserva anche un aumento di espressione di collagene di tipo VII e di fibre muscolari mature a scapito delle fibre elastiche con conseguente indurimento e scarsa mobilità cutanea. Questi fibroblasti detti "anarchici" esprimono anche anomalie dell'espressione dei recettori di membrana per il PDGF e un numero aumentato di recettori per il TGF β . Il TGF β prodotto da monociti e linfociti attivati svolge un ruolo fondamentale nella stimolazione della sintesi di matrice extracellulare ed è inoltre responsabile dell'inibizione della produzione e dell'attivazione delle metalloproteinasi deputate alla degradazione del collagene. Nel siero di pazienti con SSc sono recentemente stati scoperti anticorpi diretti contro PDGFR che indurrebbero un accumulo di specie reattive dell'ossigeno.

Eccessiva deposizione di collagene nel derma di paziente affetto da SSc



2.1.4 MANIFESTAZIONI CLINICHE

2.1.4.1 CUTE E TESSUTO CONNETTIVO

La comparsa di manifestazioni cutanee nella SSc è generalmente preceduta o accompagnata dal fenomeno di Raynaud. Esso consiste in una vasocostrizione episodica delle piccole arterie ed arteriole delle dita delle mani e dei piedi, del naso e delle orecchie, scatenata dall'esposizione al freddo, da brusche variazioni di temperatura, da stimoli meccanici ripetuti (es. le vibrazioni) o anche da stress emotivi. È caratterizzato dalla presenza di una classica triade in cui ritroviamo una prima fase con pallore cutaneo (fase ischemica), seguita da una fase di cianosi ed infine una fase iperemica; può essere inoltre accompagnato da dolore (più o meno intenso) e parestesie. L'attacco può avere durata variabile da 1 minuto a diverse ore. Come conseguenza del fenomeno e dell'ischemia cronica possono insorgere a livello delle estremità delle dita delle ulcere che tendono a guarire lentamente con aumentata probabilità di infezione fino a quadri gravi di osteomielite e gangrena che possono esitare nell'amputazione digitale.

Fenomeno di Raynaud



L'interessamento cutaneo porta al progressivo istaurarsi di quadri tipici come la facies sclerodermica (completamente amimica) o di deformità a carico delle estremità (dita ad artiglio) con ipotrofia muscolare secondaria al disuso. Nei casi più gravi l'irrigidimento della gabbia toracica può esitare in un'insufficienza ventilatoria anche in assenza di fibrosi polmonare. Alla caratteristica sclerosi della cute posso associarsi alterazioni discromiche e calcinosi.

Facies sclerodermica



Mani sclerodermiche



2.1.4.2 TRATTO GASTROINTESTINALE

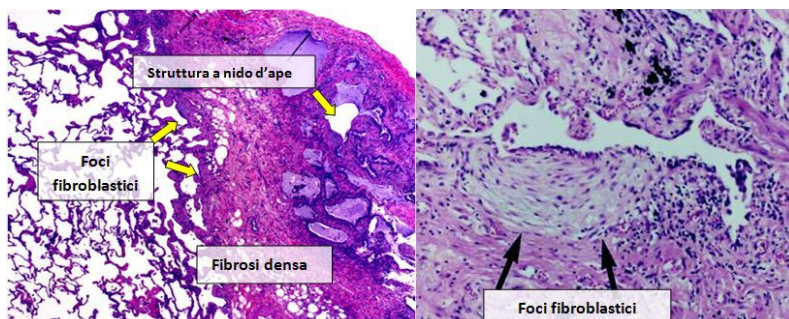
La fibrosi può interessare l'intero tratto intestinale. Dismotilità esofagea con diminuzione della peristalsi e incontinenza dello sfintere esofageo inferiore si ritrovano in un 75- 90% dei pazienti. Disfagia e reflusso con piroisi e rigurgito sono i sintomi più comuni. Gastroparesi e dismotilità del piccolo intestino interessano un 50-70 % dei pazienti con sintomi quali nausea, vomito, ripienezza post-prandiale e dolori addominali. Il piccolo intestino risulta atonico e perde la sua capacità propulsiva; questo favorisce lo sviluppo batterico che può portare a quadri di malassorbimento (7).

2.1.4.3 POLMONE

L'interessamento polmonare rappresenta una delle principali cause di morbilità e mortalità nei pazienti sclerodermici.

Processi alveolitici e modificazioni della struttura microvascolare possono progredire fino alla fibrosi e all'ipertensione polmonare. Dispnea, ipossiemia e tosse non produttiva sono i principali segni dell'instaurarsi della fibrosi, anche in assenza di evidenza radiologica di danno polmonare. All'auscultazione toracica sono caratteristici i crepitii bibasilarari che possono associarsi, in caso di ipertensione polmonare a un rinforzo del secondo tono all'auscultazione cardiaca insieme ad eventuali segni di scompenso. I test di funzionalità respiratoria sono tipici della malattia restrittiva polmonare con diminuzione di DLCO e dei volumi polmonari statici.

Fibrosi polmonare



2.1.4.3.1 IPERTENSIONE POLMONARE

L'ipertensione polmonare è una grave complicanza della SSc che si instaura in conseguenza dell'aumento delle resistenze vascolari polmonari dovuto alla fibrosi. La causa precisa del fenomeno è ancora sconosciuta, ma è associata a una disregolazione del flusso sanguigno che esita in una vasocostrizione simile a quella che determina il fenomeno di Raynaud. Un ruolo fondamentale in questo processo è svolto dall'endotelina-1, un potente vasocostrittore i cui valori sono stati trovati aumentati nel sangue e nei tessuti polmonari dei pazienti con SSc.

2.1.4.4 APPARATO CARDIOVASCOLARE

Il cuore può essere interessato da una fibrosi coinvolgente il miocardio e il sistema di conduzione. L'interessamento spesso è subclinico, ma può anche manifestarsi con sintomi quali astenia, dispnea e palpitazioni dovute a fenomeni tachiaritmici. Altri meccanismi patogenetici chiamati in causa sono una neuropatia autonoma e un vasospasmo arteriolare simile a quello alla base del fenomeno di Raynaud in assenza di danno organico.

2.1.4.5 APPARATO URINARIO

L'interessamento renale è di tipo vascolare ischemico dovuto a un ispessimento delle arteriole afferenti con attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone e conseguente ipertensione arteriosa. E' spesso silente e può progredire lentamente verso l'insufficienza renale cronica, ma può anche presentarsi improvvisamente in quella che è chiamata "crisi renale". In questo caso si avrà un repentino rialzo della pressione arteriosa accompagnato da cefalea, alterazioni del visus, versamento pericardico, scompenso cardiaco, anemia emolitica microangiopatica con trombocitopenia e insufficienza renale acuta.

2.1.5 DIAGNOSI

Nuovi criteri di diagnosi della SSc sono stati sviluppati nel 2013 dall' American College of Rheumatology (ACR) e dall' European League Against Rheumatism (EULAR). Sulla base

di tali criteri un paziente che presenta un ispessimento della cute nella parte mediana delle dita sarebbe da classificare come affetto da SSc, indipendentemente da altri dati clinici (criterio maggiore). In assenza di questo criterio altri sette elementi opportunamente “pesati”, permettono una diagnosi di SSc in base ad un punteggio ottenuto superiore a 9:

- Altro ispessimento della cute della dita, come nella sclerodattilia (4 punti)
- Lesioni dei polpastrelli (3 punti)
- Telangiectasia (2 punti)
- Anomalie dei capillari sottoungueali (2 punti)
- Malattia intestinale polmonare e/o ipertensione arteriosa polmonare (2 punti)
- Fenomeno di Raynaud (3 punti)
- Autoanticorpi (es: anticentromero, anti-topoisomerasi I-SCL-70, o anti-RNA polimerasi III (3 punti)

2.1.6 TRATTAMENTO

Gli studi clinici non dimostrano che un particolare trattamento farmacologico possa prevenire la progressione della malattia. Fino ad ora e' opinione comune che la terapia immunospressiva non svolga un effetto sulla regressione dei processi fibrotici una volta che si sono instaurati sia a livello cutaneo che a carico degli organi interni.

Basse dosi di Metotrexate per os hanno dimostrato un'efficacia nel ridurre l'ispessimento cutaneo ma non la disfunzione d'organo. La ciclofosfamide ha mostrato un beneficio in termini di stabilizzazione della funzione polmonare e di aumento della sopravvivenza. L'utilizzo del micofenolato ha dimostrato inoltre un effetto benefico sulla funzionalità polmonare in soggetti con SSc ed interstiziopatia che non hanno risposto in modo ottimale alla ciclofosfamide (17).

Nella scorsa decade è emersa una nuova strategia di trattamento basata sul trapianto di cellule staminali ematopoietiche, inizialmente gravata da un alto tasso di mortalità. Ad oggi, in seguito alla definizione di nuovi criteri per la selezione dei pazienti basati sullo stadio di malattia, il trapianto di cellule staminali ha sensibilmente migliorato la qualità di vita dei pazienti.

Inibitori di pompa protonica. anti H2 e farmaci procinetici possono essere utili nei pazienti con interessamento gastrointestinale.

Vasodilatatori come calcio antagonisti (nifedipina, diltiazem) o analoghi della prostaciclina (Iloprost) vengono utilizzati per migliorare la circolazione sanguigna e sono inoltre risultati efficaci contro la dispnea. Tali farmaci aumentano la tolleranza allo sforzo nei pazienti con ipertensione polmonare. Nei soggetti non responsivi alla monoterapia è stata dimostrata l'efficacia dell'uso combinato di sildenafil e antagonisti del recettore dell'endotelina.

Qualora si sviluppi ipertensione arteriosa è consigliato l'utilizzo precoce di farmaci ACE-inibitori che migliorano la prognosi renale, anche se il loro ruolo nel prevenire la crisi renale è ancora da chiarire.

2.2 ANGIOGENESI

Con il termine angiogenesi si intende il processo di formazione di nuovi vasi sanguigni da vasi pre-esistenti, strettamente controllato da un delicato equilibrio tra fattori pro-angiogenici ed angiostatici. L'angiogenesi è fondamentale sia in processi fisiologici, quali lo sviluppo fetale, la cicatrizzazione delle ferite ed il ciclo riproduttivo, che in condizioni patologiche come l'infiammazione, il rimodellamento tissutale, la fibrosi ed i processi tumorali/metastatici. L'angiogenesi è il risultato finale di una serie di eventi che si succedono in una sequenza ben programmata. Il primo step è caratterizzato dalla liberazione di mediatori pro-angiogenici (fattori di crescita e metalloproteinasi) da parte di cellule del sistema immunitario (linfociti, monociti e neutrofilo) e di cellule strutturali (cellule epiteliali, cheratinociti, fibroblasti, sinoviociti). Questi fattori promuovono la degradazione della membrana basale endoteliale e lo scollamento dalla parete vascolare di cellule connettivali dette periciti. Tale processo favorisce la successiva migrazione e proliferazione delle cellule endoteliali ed è regolato da fattori di crescita quali il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ed il Fibroblast Growth Factor (FGF)-2. Nell'area perivascolare si viene quindi a creare il "primary sprout" o germoglio primario, dal quale si formerà un nuovo capillare ad ansa. Il nuovo vaso necessita di una successiva stabilizzazione con formazione di una nuova parete da parte dei periciti che si assemblano intorno alle cellule endoteliali a formare una guaina. Una volta che la parete vasale è formata i fattori angiostatici endogeni vengono rilasciati per controbilanciare i fattori angiogenici ed interrompere il processo di vascolarizzazione. Mentre nei processi fisiologici i fattori angiogenici ed angiostatici sono in equilibrio tra loro, in corso di eventi

patologici i fattori angiogenici sembrano prevalere su quelli angiostatici con conseguente formazione di una eccessiva vascolarizzazione (18).

2.2.1 FATTORI PRO-ANGIOGENICI

I fattori che regolano l'angiogenesi vengono in parte rilasciati dalle cellule infiammatorie che infiltrano il tessuto flogistico ed in parte dalle cellule stromali. Tra questi mediatori ricordiamo i fattori di crescita, le citochine, le chemochine, i componenti della matrice extracellulare (ECM), gli enzimi proteolitici e le molecole di adesione (19).

I fattori di crescita una volta rilasciati si legano alla ECM, ai proteoglicani e alle membrane cellulari dove rimangono legati in forma inattiva. Dopo azione proteolitica da parte di alcune metalloproteinasi della matrice (MMPs) questi fattori di crescita vengono liberati e vanno ad attivare le cellule endoteliali e altre cellule tissutali quali le cellule epiteliali e i fibroblasti. A loro volta tali cellule liberano fattori pro-infiammatori, pro-angiogenici e pro-fibrotici amplificando e prolungando i processi di infiammazione e fibrosi.

2.2.1.1 VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF)

Tra i fattori di crescita endoteliale il VEGF è il fattore più importante con un ruolo prevalentemente mitogenico selettivo per tali cellule. Con il termine VEGF si indica una specifica sottofamiglia di fattori di crescita coinvolta sia nella vasculogenesi (intesa come genesi ex-novo di un sistema circolatorio in età embrionale) sia nell'angiogenesi (la formazione di vasi da strutture già esistenti). La proteina più importante di questa categoria è il VEGF-A, in origine chiamato VEGF prima della scoperta di altre forme della proteina. La famiglia del VEGF, oltre il VEGF-A include la PlGF (proteina placentare coinvolta nello sviluppo prenatale), il VEGF-B, il VEGF-C ed il VEGF-D. Tutti i membri della famiglia VEGF stimolano risposte cellulari mediante legame con i recettori tirosin-chinasici espressi sulla superficie della cellula endoteliale. Il legame VEGF-recettore determina la dimerizzazione di quest'ultimo e la sua attivazione tramite transfosforilazione. Il VEGF-A si lega ai recettori VEGFR-1 e VEGFR-2: di questi il secondo (detto anche recettore funzionale) è quello responsabile della maggior parte delle risposte cellulari

indotte dal VEGF. Il primo invece, meno conosciuto, si pensa svolga un ruolo di modulazione del VEGFR-2. Un'ipotesi recente è che il VEGFR-1 possa agire da inibitore competitivo nei confronti del VEGFR-2 soprattutto in età embrionale (20).

IL VEGF viene sintetizzato principalmente da cellule del sistema immunitario quali macrofagi e monociti in risposta allo stimolo di citochine pro-infiammatorie (TNF- α e IL-1). Tramite legame con il VEGFR-2, tale fattore stimola la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali con conseguente formazione di nuovi vasi. L'ipossia è stata recentemente identificata come condizione rilevante nella produzione di VEGF in corso di infiammazione. La riduzione della tensione di ossigeno a carico del tessuto porterebbe all'aumento della produzione di fattori appartenenti alla famiglia dell' hypoxia inducible factors (HIF-1 e HIF-2) da parte di cellule infiammatorie quali macrofagi e monociti con successiva sintesi di VEGF. Altri meccanismi chiamati in causa nella regolazione della produzione di VEGF sono la sintesi di ossido nitrico (NO) e la produzione di prostaglandine (18,19).

2.2.1.2 FIBROBLAST GROWTH FACTOR (FGFs)

L'FGF-1 e l'FGF-2 appartenenti alla famiglia degli FGFs sono potenti fattori mitogenici per le cellule endoteliali e cellule strutturali. Svolgono un ruolo fondamentale nelle prime fasi dell'angiogenesi e nei processi fisiologici di riparazione tissutale. Con il termine FGFs si indica una famiglia di fattori di crescita (22 membri) coinvolti in numerosi processi: stimolano la proliferazione delle cellule endoteliali, partecipano alla fisiologica riparazione tissutale promuovendo la proliferazione dei fibroblasti e la formazione del tessuto di granulazione nonché la migrazione e differenziazione dei cheratinociti; sono fondamentali per un corretto sviluppo embrionale. Svolgono inoltre un ruolo importante nella neuronogenesi e sembrano anche implicati nella regolazione della plasticità sinaptica nell'adulto. Nello specifico, FGF-1 e FGF-2 sono fisiologicamente presenti nella membrana basale e nella ECM subendoteliale dei vasi sanguigni dove si trovano in stato di inattivazione. Mediante proteolisi da parte delle MMPs tali fattori di crescita vengono liberati e attivati. L'eparan solfato è stato identificato come responsabile di questa attivazione sia in condizioni fisiologiche che nei tessuti tumorali (21).

2.2.2 FATTORI ANGIOSTATICI

L'angiogenesi, in condizioni fisiologiche, è regolata dall'equilibrio tra fattori pro- ed anti-angiogenici, responsabile dell'omeostasi vascolare. Sono state identificate numerose molecole ad azione anti-angiogenica di origine naturale e molte sono state sintetizzate ex-novo. Alcune di esse sono già state proposte come terapia per inibire la neovascolarizzazione durante processi tumorali e/o infiammatori. Gli inibitori endogeni dell'angiogenesi sono proteine o frammenti di proteine prodotte dall'organismo che inibiscono la formazione dei vasi. Esistono almeno 27 diverse molecole con questa funzione e possono essere frammenti di molecole della ECM, frammenti di ormoni, fattori della coagulazione o proteine del sistema immunitario.

2.2.2.1 ENDOSTATINA

L'Endostatina, fattore di inibizione dell'angiogenesi, è stato purificato per la prima volta nel 1997 dall'emangioma di topo; è riconosciuto come antagonista endogeno principale per il VEGF. L'Endostatina è un polipeptide di 184 amminoacidi dal peso molecolare di 20-22 KDa costituito dal frammento carbossi-terminale del collagene di tipo XVIII (componente della ECM dei vasi sanguigni). L'endostatina inibisce la migrazione e la proliferazione delle cellule endoteliali causandone l'arresto cellulare in fase G1 e inducendone l'apoptosi. Tali effetti sono dovuti all'azione di blocco del legame delle isoforme VEGF165 e VEGF121 con il loro recettore funzionale VEGFR-2, e all'inibizione della ciclina D1. Partecipa inoltre alla down-regolazione della trasduzione di segnale avviata da TNF- α e Nf κ B e ha un effetto di stabilizzazione sui legami tra cellule-cellule e cellule-ECM.

2.2.2.2 TROMBOSPONDINA-1 (TSP-1)

Insieme all'endostatina, la TSP-1 rappresenta un importante fattore angiostatico implicato nella regolazione di processi di adesione, motilità, proliferazione e survival cellulare. È una glicoproteina della ECM fisiologicamente prodotta dai macrofagi e da altre cellule

quali fibroblasti e sinoviociti. In condizioni fisiologiche la TSP-1 si trova adesa alla superficie cellulare o sulla ECM mediante il suo dominio N-terminale. La sua funzione anti-angiogenica sembra dovuta soprattutto all'inibizione di fattori di crescita pro-angiogenici legati all'eparina (22). Nonostante il suo ruolo di stabilizzazione della parete vascolare, recentemente è stato dimostrato che se overespressa la TSP-1 promuoverebbe lo scollamento delle cellule endoteliali dalla ECM circostante (23).

2.2.3 ANGIOGENESI NELLA SCEROSI SISTEMICA

Il danno vascolare con conseguente rimodellamento della parete endoteliale è dimostrato già nelle fasi iniziali di SSc. Tali alterazioni sembrano essere responsabili dei cambiamenti strutturali e funzionali del microcircolo osservabili mediante capillaroscopia periungueale (megacapillari, capillari bizzarri) con successiva perdita dei capillari e comparsa di aree avascolari. Nella SSc, nonostante il ridotto afflusso di sangue e la presenza di una condizione di ipossia, vi è un'alterazione della vasculogenesi, formazione di nuovi vasi a partire da cellule progenitrici. Tale processo è principalmente causato da un'alterata capacità dei precursori delle cellule endoteliali circolanti (EPC) di aderire alla parete vascolare e permettere la normale formazione di nuovi vasi (24). Studi sull'angiogenesi in corso di SSc hanno spesso riportato risultati discordanti. Se da una parte è stato dimostrato che monociti e linfociti purificati dal sangue periferico di pazienti con SSc esercitano un effetto anti-angiogenico *in-vitro*, inibendo la proliferazione delle cellule endoteliali, dall'altra è stato riportato che nel siero di tali pazienti vi sia un aumento di fattori pro-angiogenici, quali VEGF, IL-8 e FGF-2, con un paradossale aumento dei fattori angiostatici (PF4 e TSP-1). Recentemente è stato ipotizzato che alla base dell'alterazione dei meccanismi di angiogenesi nella SSc vi sia un'alterazione funzionale delle cellule endoteliali. Recenti studi hanno infatti dimostrato come nelle biopsie cutanee di soggetti con SSc le cellule endoteliali presentino una bassa espressione del VEGFR-2, suggerendo una riduzione della risposta delle cellule endoteliali al VEGF. Tale ipotesi non è però stata confermata da studi condotti *in-vitro* su cellule endoteliali cutanee di SSc e microvascolari dove paradossalmente è stato dimostrato un aumento del VEGFR-2 (25).

2.3 MOLECOLE DI ADESIONE

Le molecole di adesione intercellulare sono proteine di membrana che permettono ai linfociti di migrare nei tessuti e negli organi linfatici secondari (homing); ai leucociti di migrare verso la zona di infiammazione (diapedesi); ai linfociti T e B di interagire tra di loro e con altre cellule coinvolte nella risposta infiammatoria.

2.3.1 ICAM-1

La molecola di adesione intercellulare ICAM-1 anche nota come CD54 (Cluster of Differentiation 54) è una glicoproteina, appartenente alla superfamiglia delle Ig, che in condizioni fisiologiche è espressa a basse concentrazioni sulla superficie delle cellule endoteliali e delle cellule del sistema immunitario. E' stato dimostrato che la sua espressione aumenta sensibilmente in seguito a stimoli pro-infiammatori, quali la iperproduzione delle citochine IL-1 β e TNF- α . A sua volta la stessa ICAM-1 potrebbe essere responsabile di un feedback positivo: la sua espressione di membrana aumenterebbe l'attivazione cellulare con produzione di citochine pro-infiammatorie. Il legame tra ICAM-1 e l'integrina LFA-1 permette l'interazione del linfocita T con la cellula presentante l'antigene (APC). Inoltre tale legame favorirebbe l'infiltrazione delle cellule infiammatorie nel tessuto (26).

La forma solubile dell' ICAM-1 (sICAM-1) risulta dal clivaggio proteolitico della ICAM-1 da parte di enzimi proteolitici quali per esempio le MMPs. Questo clivaggio è regolato dal TNF- α che attiva diversi enzimi proteolitici e proteine chinasi (MAP-chinasi, PI3-chinasi). La forma solubile della molecola è funzionalmente attiva: e' stato dimostrato come da una parte la sICAM-1 ha la capacità di inibire l'interazione tra leucociti e cellula endoteliale, dall'altra promuove l'angiogenesi e stimola la produzione di fattori pro-infiammatori quali TNF- α , IFN- γ , IL-6.

2.4 DISREGOLAZIONE VASCOLARE NELLA SCLEROSI SISTEMICA

Recenti dati della letteratura hanno dimostrato un aumento della sICAM-1 nel siero dei pazienti con SSc. Questi valori sembrano correlare con l'attività di malattia, risultando più elevati nei soggetti con SSc diffusa rispetto a quelli con SSc limitata. I valori più elevati sono stati riscontrati in caso di esteso interessamento cutaneo (27).

Aumentati livelli di sICAM si sono riscontrati anche in pazienti affetti da SSc limitata con ipertensione polmonare. In questo caso la condizione di ipossia è stata ipotizzata essere il fattore scatenante del danno vascolare con ispessimento dell'intima dovuto a proliferazione cellulare e deposizione di ECM. In questi pazienti si hanno inoltre elevati livelli di TNF- α e IL-1 β che a loro volta indurrebbero l'espressione genica di ICAM (28).

La sICAM-1 e la forma solubile della molecola di adesione vascolare (sVCAM-1) sono attualmente considerati biomarcatori di disfunzione endoteliale e livelli elevati di tali molecole sono quindi indicativi di uno stato di infiammazione vascolare e possono essere considerati come un indice di aumentato rischio cardiovascolare oltre che di uno stato di infiammazione generalizzata (29,30).

3 SCOPO DELLA TESI

Lo scopo dello studio è quello di valutare in pazienti con SSc i livelli sierici circolanti di fattori angiogenici (VEGF e FGF-2) ed angiostatici (Endostatina e TSP-1) e della forma solubile della molecola di adesione ICAM-1 (sICAM-1), marcatore di disregolazione endoteliale, correlando i risultati ottenuti con i principali parametri sierologici e clinici della malattia.

4 PAZIENTI E METODI

4.1 PAZIENTI

Abbiamo selezionato presso l'U.O. Reumatologia e l' U.O. di Immunologia Clinica 41 pazienti con SSc in cui la diagnosi è stata formulata sulla base dei criteri ACR e EULAR

(31). Di questi pazienti 12 presentano una forma diffusa della malattia mentre 29 sono affetti da una forma limitata.

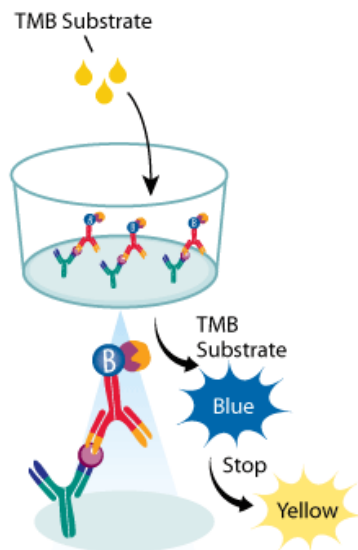
In tutti i pazienti sono stati valutati i seguenti parametri clinici: durata della malattia, presenza del fenomeno di Raynaud, interessamento esofageo, presenza di sclerodattilia, gravità ed estensione della fibrosi cutanea espressa dallo skin score, calcinosi, interessamento polmonare (interstiziopatia ed ipertensione polmonare) e cardio-vascolare. Come parametri sierologici sono stati valutati gli indici di flogosi (VES e PCR), la presenza di autoanticorpi (anti-nucleo, SCL-70 e ACA) e complemento (C3 e C4). Abbiamo inoltre valutato il rischio di insufficienza cardiaca mediante dosaggio della proteina NT-proBNP. I pazienti sono stati sottoposti ad indagini strumentali: capillaroscopia, ecocardiogramma, spirometria (DLCO), TC torace ad alta risoluzione ed ecografica transtoracica. Mediante quest'ultima indagine strumentale abbiamo valutato la presenza delle comete ultrasoniche polmonari, segno ecografico di ispessimento dei setti interlobulari sub pleurici e segno indiretto di edema interstiziale polmonare (32). Le comete sono state considerate assenti se <5 nel totale degli spazi, "lievi" se tra 5 e 15, "moderate" tra 15 e 30 e "gravi" se >30.

4.2 METODI

Una volta ottenuto il consenso informato, tutti i pazienti con SSc sono stati sottoposti ad un prelievo di 4 ml di sangue venoso periferico. Dopo separazione mediante centrifugazione a 2000 rpm per 10 minuti, il siero ottenuto è stato congelato a -20 °C per dosare i fattori angiogenici/angiostatici e la sICAM-1. Trentuno donatori sani (NHS) provenienti dal centro trasfusionale dall'AOUP sono stati inclusi come controlli.

Il dosaggio dei mediatori sierici (VEGF, FGF-2, Endostatina, TSP-1 ed sICAM-1) dei pazienti e dei controlli è stato eseguito mediante analisi quantitativa "sandwich ELISA" (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (Duo-Set R&D, Systems Minneapolis, MN, USA), come da protocollo. In particolare, il test prevede l'analisi quantitativa di citochine e fattori di crescita utilizzando una piastra da 96 pozzetti. Il primo step prevede l'incubazione sulla superficie della piastra di un anticorpo monoclonale di topo diretto verso la molecole da dosare. Dopo 18 ore di incubazione a temperatura ambiente, la piastra è stata lavata tre volte con PBS contenente 0,05% Tween 20 per eliminare l'eccesso di anticorpo. La piastra è stata quindi saturata con PBS contenente 1% di albumina sierica

bovina (BSA) per un'ora a temperatura ambiente. Per la valutazione quantitativa è stato necessario preparare la curva standard utilizzando una quantità nota dell'antigene ricombinante da dosare. La curva comprende 7 concentrazioni scalari dell'antigene ricombinante. Come controllo negativo è stato utilizzato un campione in cui l'antigene è stato omesso. Dopo un ulteriore lavaggio, i pozzetti sono stati caricati in duplicato o con siero di pazienti con SSc e NHS opportunamente diluito in BSA 1%, oppure con i sieri di controlli o con la curva standard. Dopo 2 ore di incubazione, l'eccesso di antigene è stato eliminato mediante 3 lavaggi con PBS, Tween 0,05% e la piastra è stata incubata con un anticorpo secondario (anticorpo policlonale prodotto nella capra, legato alla biotina e diretto verso gli antigeni umani da dosare). Successivamente, dopo aver lavato l'anticorpo secondario in eccesso con i tre lavaggi in PBS, Tween 0,05%, i pozzetti sono stati incubati per 20 minuti a temperatura ambiente con la streptavidina coniugata con perossidasi di rafano diluita 1/200. La reazione è stata sviluppata mediante incubazione per 20 minuti con il substrato Tetra Metil Benzidina (TMB- Sigma-Aldrich). La reazione enzimatica è stata successivamente bloccata con H₂SO₄ (2N) e la piastra è stata letta allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda (OD) di 450 nm. La quantità di antigene è stata ottenuta sulla base dei valori della curva standard, utilizzando il programma Excel.



Nel test sandwich-ELISA, le molecole da dosare (VEGF, FGF-2, Endostatina e TSP-1, sICAM-1) funzionano da “ponte”: maggiore è la quantità di antigene presente nei campioni, maggiore sarà la densità ottica rilevata dallo spettrofotometro. Questa metodica è altamente specifica poiché vengono ridotte le possibili cross-reattività od interferenze con altre isoforme dei mediatori dosati. Solo nel caso del VEGF il nostro test riconosce due isoforme della molecola, l'isoforma 165 e 121, quelle maggiormente presenti nell'uomo.

4.2.1 DOSAGGIO DEI FATTORI ANGIOGENICI E ANGIOSTATICI

Per il dosaggio sierico del VEGF, dell' FGF-2, dell' Endostatina e della TSP-1 nei soggetti con SSc e nei controlli sani sono stati utilizzati i Duo-set ELISA (catalog number DY293B

per il VEGF, DY233 per l' FGF-2, DY1098 per l'Endostatina e DY3074 per la TSP-1). La procedura precedentemente descritta prevede l'utilizzo di un anticorpo monoclonale di topo diretto verso le quattro sostanze da dosare (Capture Antibody) che viene diluito in PBS 1% alla concentrazione finale di 1.0 µg/ml per il VEGF e per la TSP-1, di 2.0 µg/mL per l'FGF-2 e di 4.0 µg/ml per l'Endostatina. Per la preparazione della curva standard sono state eseguite diluizioni scalari ottenendo 7 concentrazioni comprese, nel caso del VEGF, tra 2000 pg/ml e 31,25 pg/ml, per l'FGF-2 tra 1000 pg/ml e 15,65 pg/ml e per l'Endostatina tra 4000 pg/ml e 62,5 pg/ml e per la TSP-1 tra 100 ng/ml e 1,5625 ng/ml. Il Detection Antibody (anticorpo policlonale prodotto nella capra, legato alla biotina e diretto rispettivamente verso gli antigeni umani VEGF165,121 , FGF-2, Endostatina, TSP-1) è stato diluito alla concentrazione di 100 ng/ml per VEGF ed Endostatina, di 250 ng/ml per FGF-2 e 200 ng/ml per la TSP-1. I sieri sono stati caricati indiluiti per il VEGF e l'FGF-2, diluiti 1/200 per Endostatina e TSP-1. I dati quantitativi dei fattori VEGF, FGF-2 e endostatina sono espressi in pg/ml; quelli della TSP-1 in ng/ml.

4.2.2 DOSAGGIO sICAM-1

Il dosaggio della forma solubile della ICAM-1 e' stato condotto mediante metodo ELISA, utilizzando Human ICAM-1/CD54 Allele-specific Quantikine ELISA Kit (R&D, Systems Minneapolis, MN, USA). Per la preparazione della curva standard sono state eseguite diluizioni scalari ottenendo 7 concentrazioni comprese tra 50 ng/ml e 1.56 ng/ml, La sensibilità del kit e'0.254 ng/ml.

4.3 ANALISI STATISTICA

I dati relativi ai dosaggi di VEGF, FGF-2, Endostatina ,TSP-1 e sICAM-1 sono espressi come media \pm deviazione standard di ogni campione valutato in duplicato. Per lo studio statistico è stato utilizzato il Software GraphPad ed il programma GraphPad Prism 5 per l'analisi dei dati. I dati dei 2 gruppi (patologici e normali) e dei sottogruppi dei pazienti con SSc sono stati analizzati mediante il test non parametrico di Mann-Whitney. La probabilità inferiore a 0.05 è stata considerata statisticamente significativa. Per le analisi di correlazione tra livelli sierici dei mediatori dosati e i parametri clinici e' stato utilizzato il test di correlazione non parametrico (Spearman's test).

5 RISULTATI

5.1 CARATTERISTICHE CLINICHE DEI PAZIENTI CON SCLEROSI SISTEMICA

Abbiamo selezionato 41 pazienti con diagnosi di SSc [età: 56 (22-82); M/F: 1/41] e una durata media della malattia di 120 mesi (6-456). Di questi pazienti 12 presentano una forma diffusa della malattia mentre 29 sono affetti da una forma limitata, la media del Rodnan skin score modificato e' di 7 (0-27). Dei 41 pazienti studiati 34 pazienti presentano interessamento esofageo con sintomi di disfagia e piroso, 3 calcinosi, 21 interstiziopatia polmonare e 6 ipertensione polmonare.

5.2 CARATTERISTICHE SIEROLOGICHE DEI PAZIENTI CON SCLEROSI SISTEMICA

Tra i 41 pazienti con SSc, 24 presentano aumento degli indici di flogosi (VES e PCR): 18 aumento della VES [53 mm/h (32-82)] e 6 della PCR [2 mg/dl (0,503-3,59)]; 7 pazienti presentano una riduzione del C4 [12,5 mg/dl (6-17,7)]; 14 presentano positività degli anticorpi SCL-70 e 16 degli anticorpi ACA.

I valori di NT-proBNP risultano superiori alla norma in 17 dei 41 pazienti analizzati con un valore medio di 801 pg/ml (127-5853) e correlano positivamente con i valori di pressione arteriosa polmonare (PAP) (P=0,0114).

5.3 VALUTAZIONE STRUMENTALE NEI PAZIENTI CON SCLEROSI SISTEMICA

Per valutare la presenza di interstiziopatia polmonare (ILD) abbiamo sottoposto a TC ad alta risoluzione (HRCT) 30 pazienti: di questi 21 presentano segni di ILD. Per valutare la presenza o meno di ipertensione polmonare 35 pazienti hanno eseguito ecocardiogramma e di questi 6 presentano ipertensione polmonare [PAP media 43,5 (37-52)]. In tutti i pazienti la frazione di eiezione (FE) e' nella norma.

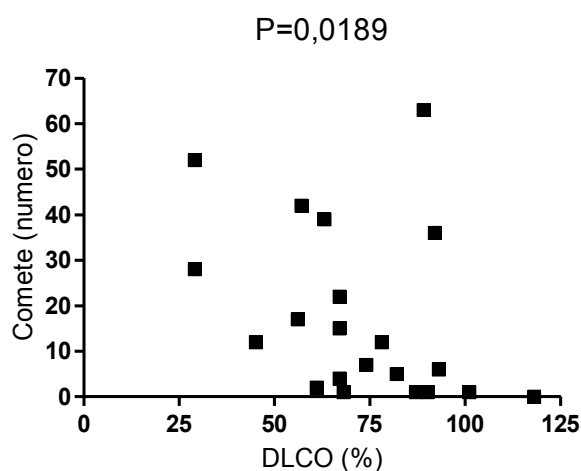
Infine abbiamo valutato mediante spirometria la capacità di diffusione del CO attraverso la

membrana alveolo-capillare: 25 dei nostri pazienti presentano valori ridotti di DLCO [in media 59 % del valore normale (29-78)].

5.4 VALUTAZIONE DELLE COMETE ULTRASONOGRAFICHE POLMONARI NEI PAZIENTI CON SCLEROSI SISTEMICA

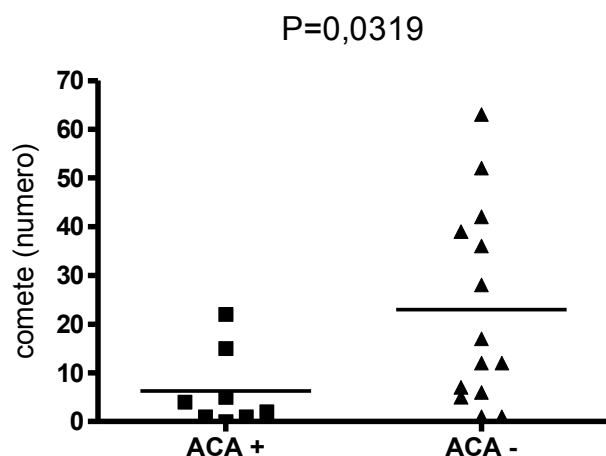
Dei 41 pazienti studiati 24 sono stati sottoposti ad ecografia toracica per valutare la presenza o meno di comete. Sulla base del numero di comete identificate abbiamo suddiviso i nostri pazienti in 4 gruppi corrispondenti a quadri di congestione polmonare progressivamente più severa (negativo se <5 comete nel totale degli spazi, lieve se tra 5 e 15, moderato tra 15 e 30 e grave se >30). Dei 24 pazienti studiati 9 non presentano comete; 5 una media di comete pari a 9 (5-12), 4 una media di 20 comete (15-28), 6 un numero medio di 44 comete (32-63). Il numero delle comete correla positivamente e significativamente ($P=0,0189$) con i valori di DLCO (**Figura 1**).

Figura 1



Dall' analisi statistica abbiamo inoltre osservato che i pazienti ACA positivi presentano un numero significativamente ridotto di comete polmonari rispetto al gruppo ACA negativi ($P=0,0391$) (**Figura 2**).

Figura 2



Nei pazienti appartenenti al gruppo dei moderati abbiamo inoltre riscontrato livelli di NT-proBNP, marker di rischio cardiovascolare, significativamente più elevati rispetto a quelli ottenuti nei pazienti classificati come lievi o negativi ($P= 0,0063$). Tale significatività è verosimilmente causata dal valore estremamente elevato di NT-proBNP riscontrato in 2 pazienti (5853 e 1081 pg/ml).

5.5 VALUTAZIONE DEI FATTORI PRO-ANGIOGENICI NELLA SCLEROSI SISTEMICA

Come si evince dalla **Figura 3**, l'analisi dei livelli sierici dei fattori angiogenici VEGF ed FGF-2 non ha dimostrato differenze significative nè di VEGF (**A**) nè di FGF-2 (**B**) tra il gruppo di pazienti con SSc e quello di controllo.

Figura 3A

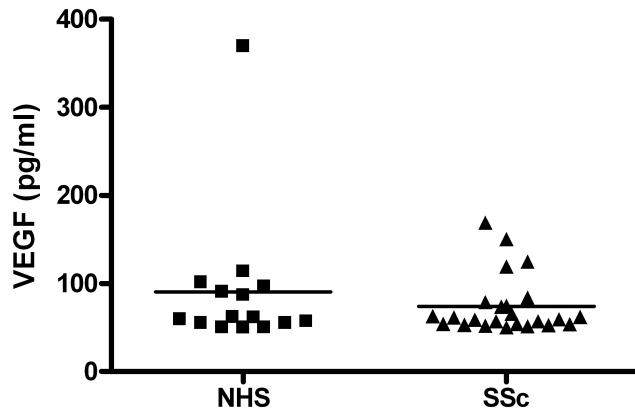
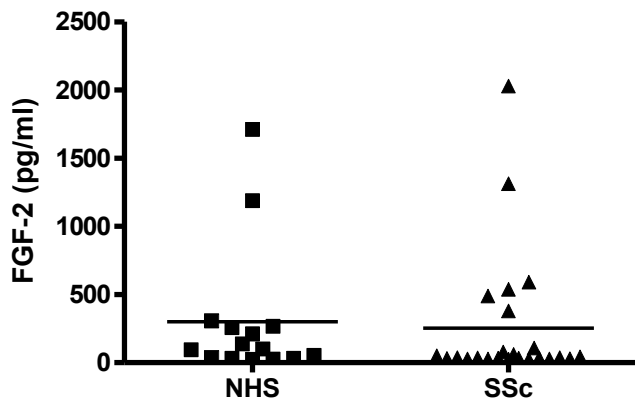


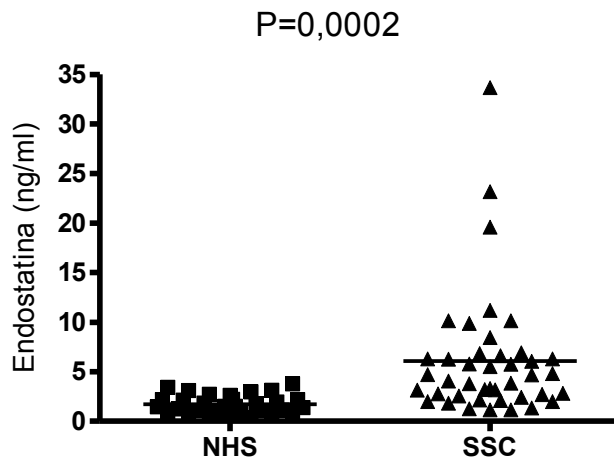
Figura 3B



5.6 DOSAGGIO DEI FATTORI ANGIOSTATICI NELLA SCLEROSI SISTEMICA

Tra i fattori angiostatici dosati nel siero dei pazienti con SSc i livelli di Endostatina sono risultati significativamente aumentati rispetto a quelli dei soggetti sani ($P=0,0002$) (**Figura 4A**).

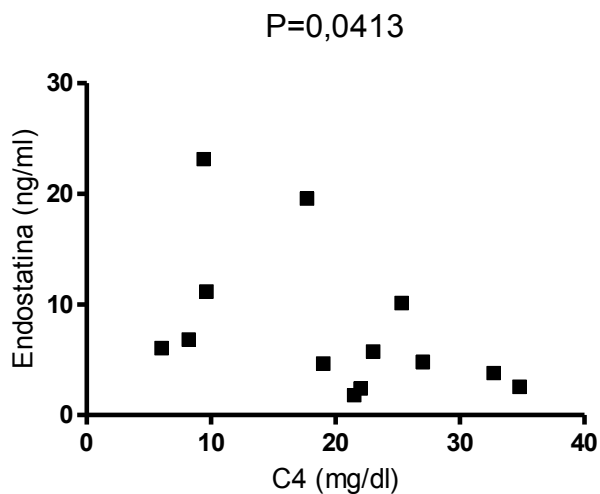
Figura 4A



All' interno del gruppo dei pazienti con SSc non abbiamo trovato differenze significative tra la forma diffusa e quella limitata, né nei vari sottogruppi. In particolare, non abbiamo riscontrato differenze significative dei livelli di endostatina tra i gruppi di pazienti con e senza ipertensione polmonare, ne' correlazione con i valori di pressione sistolica stimata del ventricolo destro.

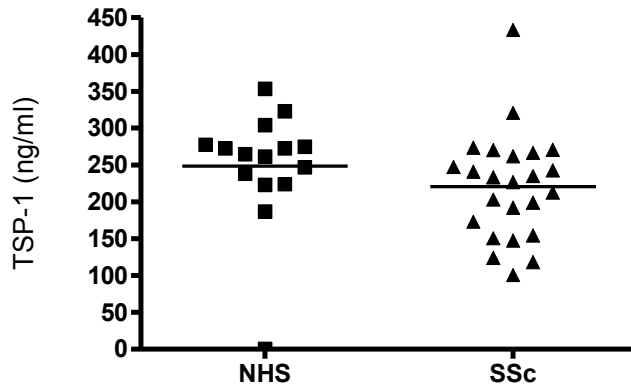
Nel nostro studio i livelli di endostatina correlano invece positivamente ($P=0,0427$) con la riduzione del C4 ma non con altri parametri sierologici (**Figura 4B**).

Figura 4B



I livelli di TSP-1 circolanti sono risultati sovrapponibili tra il gruppo dei pazienti con SSc e quello dei controlli (**Figura 5**).

Figura 5



5.7 DOSAGGIO DI sICAM-1 NELLA SCLEROSI SISTEMICA

Come riportato nella **Figura 6** nei pazienti con SSc i livelli di sICAM-1, marcatore di disregolazione endoteliale, sono risultati significativamente aumentati rispetto a quelli riscontrati nei controlli ($P=0,0036$) (**A**). Nei pazienti con SSc i livelli sierici di sICAM-1 correlano positivamente con i valori della VES ($P=0,0319$) (**B**) e con i valori della PCR ($P=0,0461$) (**C**).

Figura 6A

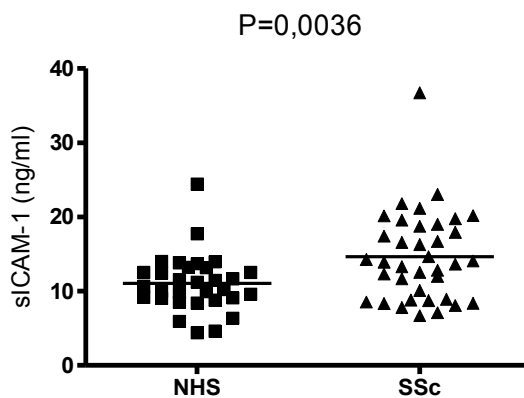


Figura 6B

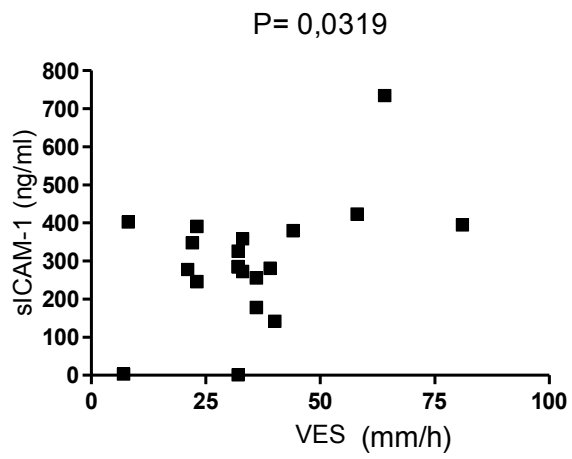
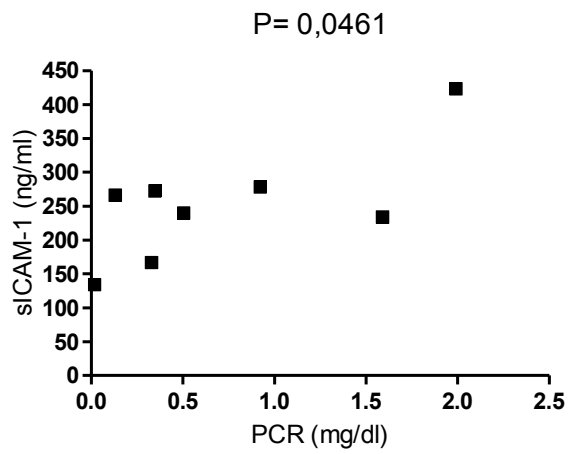


Figura 6C



6 DISCUSSIONE

Il danno vascolare con conseguente rimodellamento della parete endoteliale e' dimostrabile già nelle fasi iniziali di SSc. Tali alterazioni sembrano essere responsabili dei cambiamenti strutturali e funzionali del microcircolo osservabili mediante capillaroscopia periungueale (megacapillari, capillari bizzarri) con successiva perdita dei capillari e comparsa di aree avascolari. Studi sull'angiogenesi in corso di SSc hanno spesso riportato risultati discordanti. Se da una parte e' stato dimostrato che monociti e linfociti purificati dal sangue periferico di pazienti con SSc esercitano un effetto anti-angiogenico *in-vitro*, inibendo la proliferazione delle cellule endoteliali, dall'altra e' stato riportato che nel siero di tali pazienti vi sia un aumento di fattori pro-angiogenici (VEGF, IL-8 e FGF-2) con un paradossale aumento dei fattori angiostatici (PF4 e TSP-1). Uno studio condotto su un gruppo limitato di pazienti con SSc dimostra un aumento dei livelli sierici di endostatina che si associano al grado di severità della fibrosi cutanea e polmonare (33). Pertanto nel nostro studio abbiamo voluto valutare in un piu' ampio gruppo di pazienti con SSc sia i fattori angiogenici che i loro down-regolatori endogeni. In particolare abbiamo dosato i livelli sierici di VEGF ed FGF-2 in 41 pazienti con SSc. In parallelo negli stessi sieri sono stati misurati endostatina e TSP-1, fattori angiostatici rispettivamente del VEGF ed FGF-2.

Nel nostro studio i livelli di entrambi i fattori pro-angiogenici sono risultati sovrapponibili a quelli del gruppo di controllo, indicando una mancata disregolazione dei fattori pro-angiogenici circolanti in corso di SSc. In parallelo, abbiamo invece riscontrato un significativo aumento dell'endostatina.

Il riscontro di valori elevati di endostatina è un risultato frequente negli studi sui fattori pro- ed anti-angiogenici nella SSc, ma è spesso accompagnato ad un parallelo aumento dei livelli di VEGF (34-35).

I livelli di VEGF tendono comunque ad essere più alti nelle fasi iniziali di malattia e possono essere modificati dalle terapie, ad es. dalle infusioni di prostanoidi (36). Nella nostra casistica non ci sono pazienti all'esordio della malattia e la maggior parte è sottoposta a terapia con prostanoidi: differente durata di malattia e terapie praticate possono spiegare risultati diversi rispetto agli studi precedenti.

I dati da noi ottenuti sono invece simili a quanto riportato da Dzionkowska-Bartkowiak et al (37) su una popolazione limitata di SSc, in cui è stato riscontrato un aumento significativo di endostatina con valori di VEGF nel range di normalità.

L'endostatina è un polipeptide di 184 amminoacidi dal peso molecolare di 20-22 KDa costituito dal frammento carbossi-terminale del collagene di tipo XVIII. Tale mediatore non è solo un potente fattore angiostatico (antagonista endogeno del VEGF), ma è anche il prodotto finale di degradazione di un componente della matrice extracellulare. La produzione di endostatina è infatti il risultato dell'azione proteolitica da parte delle MMPs sul collagene XVIII. L'aumento di endostatina non è solo il risultato di un meccanismo regolatorio endogeno che si innesca per down-regolare i fattori pro-angiogenici, ma può essere il risultato di disregolazione della ECM tissutale con aumento delle MMPs, che precede la formazione di tessuto fibrotico. La fibrosi rappresenta l'ultimo step dei meccanismi patogenetici alla base della SSc, responsabile delle più importanti manifestazioni cliniche. Alla luce dei nostri dati e quelli ottenuti da Dzionkowska-Bartkowiak (37), sarebbe quindi importante valutare i livelli di endostatina sierica nei pazienti con SSc in fase iniziale e in fase tardiva della malattia e durante il follow-up.

Nel nostro studio, i livelli di endostatina sono risultati inversamente correlati con quelli di C4, suggerendo un rapporto fra regolazione dell'angiogenesi e della ECM e sistema complementare. È noto che nella SSc i livelli di fattori del complemento quali C3 e C4 e l'attività complementare, misurata come complemento emolitico, sono nella maggior parte dei casi nei limiti di norma. Alcune recenti osservazioni suggeriscono però che alterazioni funzionali del complemento, quali una ridotta capacità di solubilizzazione degli immunocomplessi, siano presenti nella SSc e siano fortemente correlate con la concentrazione di C4 (38). È stato anche osservato che in pazienti con SSc i livelli di C4 e PCR sono ridotti dalla terapia con rosuvastatina in parallelo con il miglioramento della funzione endoteliale: questo dato suggerisce che anche in questa malattia i livelli di C4 e PCR vadano interpretati come risultato di stimoli pro-infiammatori che sono controllati dalle statine (39). Recentemente è stato ipotizzato che alla base dell'alterazione dei meccanismi di angiogenesi nella SSc vi sia un'alterazione funzionale delle cellule endoteliali. Il danno endoteliale è spesso causato da citochine prodotte dai linfociti attivati e/o da anticorpi diretti contro cellule endoteliali. Il danno endoteliale si traduce in produzione disregolata di vasodilatatori (NO e prostaciline) e vasocostrittori (endotelina-1) con aumento della permeabilità nei confronti delle cellule leucocitarie. La forma

solubile della molecola di adesione intercellulare (sICAM-1) rappresenta un importante biomarcatore di disfunzione endoteliale. L'aumento dei suoi livelli sierici e' indicativo di infiammazione vascolare ed e' stato recentemente proposto come indice di aumentato rischio cardiovascolare.

Per valutare quindi nei nostri pazienti lo stato di infiammazione vascolare, abbiamo dosato in parallelo ai fattori pro ed anti-angiogenici i livelli sierici di sICAM-1. Nel gruppo dei pazienti con SSc abbiamo riscontrato un aumento significativo dei livelli di sICAM-1 che correlano significativamente con i valori di PCR, confermando lo stato di attivazione endoteliale.

Poiche' l'interessamento polmonare rappresenta una delle principali cause di morbilità e mortalità nei pazienti sclerodermici abbiamo valutato tale parametro non solo mediante HRCT (tecnica di comprovata validità, ma associata a rischi radiologici a lungo termine), ma anche mediante indagine ultrasonografica meno costosa e meno invasiva. In particolare abbiamo sottoposto 24 dei nostri pazienti a studio ultrasonografico transtoracico per valutare le comete, segno ecografico di ispessimento dei setti interlobulari subpleurici. Tale dato e' stato recentemente utilizzato per valutare l'interstiziopatia polmonare. Anche se non ancora validato nella fibrosi polmonare in pazienti con SSc, lo studio delle comete mediante ultrasonografia transtoracica rappresenterebbe una metodica semplice, economica ed attendibile per lo studio del polmone sclerodermico. Nel nostro studio abbiamo infatti riscontrato una correlazione positiva tra numero di comete e DLCO, parametro di interstiziopatia. Poiche' la presenza degli ACA e' considerata il più attendibile indicatore della forma di sclerodermia limitata, di una maggiore sopravvivenza e di un più basso rischio di interstiziopatia polmonare severa, abbiamo confronto il numero di comete tra il gruppo di pazienti ACA positivi e quello ACA negativi. Dall' analisi statistica abbiamo osservato che i pazienti ACA positivi presentano un numero significativamente ridotto di comete polmonari rispetto al gruppo ACA negativi, ulteriore conferma della validità dello studio ultrasonografico delle comete polmonari nei pazienti con SSc.

Abbiamo inoltre valutato i livelli di BNP e NT pro-BNP nei nostri pazienti. Il BNP (Brain Natriuretic Peptide) viene secreto soprattutto dai ventricoli in risposta ad un eccessivo allungamento delle loro cellule muscolari. Nei soggetti sani il BNP è presente in circolo in concentrazioni inferiori a 100 pg/ml; tali valori, oltre ad aumentare con l'invecchiamento, si elevano sensibilmente nei pazienti con ipertrofia ventricolare sinistra e scompenso cardiaco. Il BNP può elevarsi anche nelle patologie edematose che comportino un aumento

della pressione atriale e ventricolare e in presenza di angina instabile ed ipertensione polmonare. Il dosaggio del frammento N-terminale del BNP (NT pro-BNP) è preferibile per la sua maggior stabilità e perchè presente in circolo in concentrazioni maggiori (VN 0-125 pg/ml). Nella SSc, i livelli di BNP e NT pro-BNP sono indicativi di ipertensione polmonare, oltre ad essere associati a riduzione della funzionalità ventricolare, e costituiscono quindi uno strumento fondamentale per la diagnosi dell'interessamento cardiaco (40). Nei nostri pazienti abbiamo infatti riscontrato una correlazione positiva tra i valori di NT pro-BNP e quelli di pressione arteriosa polmonare, confermando l'utilità di questo biomarker nel follow-up dei pazienti con SSc come "surrogato" della valutazione di ipertensione polmonare.

7 BIBLIOGRAFIA

1. Mayes MD, Lacey Jr. JV, Beebe-Dimmer J, et al. *Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population.* Arthritis Rheum 2003; 48:2246- 2255
2. Allcock RJ, Forrest I, Corris PA, et al. A study of the prevalence of systemic sclerosis in northeast England. Rheumatology (Oxf) 2004; 43:596-602
3. Chiffrot H, Fautrel B, Sordet C, et al. *Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review.* Semin Arthritis Rheum 2008; 37:223-235
4. Nietert PJ, Mitchell HC, Bolster MB, et al. *Racial variation in clinical and immunological manifestations of systemic sclerosis.* J Rheumatol 2006; 33:263-268
5. Steen VD, Medsger TA. *Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972-2002.* Ann Rheum Dis 2007;66:940-944
6. Ioannidis JP, Vlachoyiannopoulos PG, Haidich AB, et al. *Mortality in systemic sclerosis: an international meta-analysis of individual patient data.* Am J Med 2005;118:2-10
7. *Eular Compendium of Rheumatic Diseases.* Editor Johannes WJ Bijlsma, 2009 BMJ Publishing Group and European League Against Rheumatism.
8. Nelson JL, et al. *Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma.* Lancet 1998;351(9102):559–562
8. Samura O. *Fetal microchimerism and autoimmune disease,* Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi. 2010;33(6):293-303
9. Nelson JL. *Maternal-fetal immunology and autoimmune disease: is some autoimmune disease autoalloimmune or allo-autoimmune?* Arthritis Rheum 1996;39(2):191–194
10. Leveque L, Khosrotehrani K. [Feto-maternal allo-immunity, regulatory T cells and predisposition to auto-immunity: Does it all start in utero?](#), Chimerism 2014; 10;5(2).
11. Scaletti C, et al. *Th2-oriented profile of male offspring T cells present in women with systemic sclerosis and reactive with maternal major histocompatibility complex antigens.* Arthritis Rheum 2002;46(2):445–450
12. Steen VD. *The many faces of scleroderma.* Rheum Dis Clin North Am 2008; 34:1-15
13. Ho KT, Reveille JD. *The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma.* Arthritis Res Ther 2003; 5:80-93
14. Steen V, Medsger Jr TA. *Predictors of isolated pulmonary hypertension in patients*

- with systemic sclerosis and limited cutaneous involvement*. Arthritis Rheum 2003; 48:516-522
15. Steen V. *Predictors of end stage lung disease in systemic sclerosis*. Ann Rheum Dis 2003; 62:97-99
16. Okano Y, Steen VD, Medsger Jr TA. *Autoantibody reactive with RNA polymerase III in systemic sclerosis*. Ann Intern Med 1993; 119:1005-1013
17. [Yilmaz N](#), [Can M](#), [Kocakaya D](#), [Karakurt S](#), [Yavuz S](#). *Two-year experience with mycophenolate mofetil in patients with scleroderma lung disease: a case series*. [Int J Rheum Dis](#). 2014 May 26
18. Koch AE, Distler O. *Vasculopathy and disordered angiogenesis in selected rheumatic diseases: rheumatoid arthritis and systemic sclerosis*. Arthritis Res Ther. 2007;9 Suppl 2:S3
19. Szekanecz Z, Besenyei T, Paragh G, Koch AE. *New insights in synovial angiogenesis*. Joint Bone Spine 2010;77(1):13-9
20. De Paulis A et al. *Expression and function of the vascular endothelial growth factors and their receptors in human basophils*. J Immunol 2006;177:7322-7322
21. Butt C, Lim S, Greenwood C, Rahman P. *VEGF, FGF1, FGF2 and EGF gene polymorphisms and psoriatic arthritis*. BMC Musculoskeletal Disorders 2007;8:1
22. Ribatti D. *Endogenous inhibitors of angiogenesis: A historical review*. Leukemia Research 2009;33:638-644
23. Fan TP D, Kohn E C. *The new angiotherapy*. Humana Press 2002
24. Liakouli V, Cipriani P, Marrelli, Alvaro S, Ruscitti P, Giacomelli R, *Angiogenic cytokines and growth factors in systemic sclerosis*, Elsevier B.V 2011
25. Rabquer B.J, Koch AE., *Angiogenesis and Vasculopathy in Systemic Sclerosis: involving concepts*, Curr Rheumatol Rep 2012 14:56-63
- 26 Hasegawa M, Asano Y, Endo H, Fujimoto M, Goto D, et al. *Serum Adhesion Molecule Levels as Prognostic Markers in Patients with Early Systemic Sclerosis: A Multicentre, Prospective, Observational Study*. PLoS ONE 2014; 9(2): e88150
27. Vettori S, Cuomo G, Iudici M, D'Abrosca V, Giacco V, Barra G, De Palma R, Valentini G. [Early systemic sclerosis: serum profiling of factors involved in endothelial, T-cell, and fibroblast interplay is marked by elevated interleukin-33 levels](#). J Clin Immunol. 2014;34(6):663-8
28. Pendergrass SA, Hayes E, Farina G, Lemaire R, Farber HW, Whitfield ML, Lafyatis R.

Limited systemic sclerosis patients with pulmonary arterial hypertension show biomarkers of inflammation and vascular injury. PLoS One 2010; 17;5(8):e12106

29..Dessein P.H, Joffe B.I., Sing S, *Biomarkers of endothelial dysfunction, cardiovascular risk factor and atherosclerosis in rheumatoid arthritis.* Arthritis Res Ther 2005; 7:R634-R643

30. Non AL, Rimm EB, Kawachi I, Rewak MA, Kubzansky LD, *The effect of stress at work and at home on inflammation and endothelial dysfunction,* PLoS ONE 2014; 9(4): e94474

31. Van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, Matucci-Cerinic M, Naden RP, Medsger TA Jr, Carreira PE, Riemekasten G, Clements PJ, Denton CP, Distler O, Allanore Y, Furst DE, Gabrielli A, Mayes MD, van Laar JM, Seibold JR, Czirjak L, Steen VD, Inanc M, Kowal-Bielecka O, Müller-Ladner U, Valentini G, Veale DJ, Vonk MC, Walker UA, Chung L, Collier DH, Csuka ME, Fessler BJ, Guiducci S, Herrick A, Hsu VM, Jimenez S, Kahaleh B, Merkel PA, Sierakowski S, Silver RM, Simms RW, Varga J, Pope JE. 31. *2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative* *Arthritis Rheum.* 2013;65(11):2737-47

32. Gargani L, Doveri M, D'Errico L, Frassi F, Bazzichi ML, Delle Sedie A, Scali MC, Monti S, Mondillo S, Bombardieri S, Caramella D, Picano E, *Ultrasound lung comets in systemic sclerosis: a chest sonography hallmark of pulmonary interstitial fibrosis,* Rheumatology 2009;48:1382–1387

33. Farouk HM, Hamza SH, El Bakry SA, Youssef SS, Aly IM, Moustafa AA, Assaf NY, El Dakrony AH, *Dysregulation of angiogenic homeostasis in systemic sclerosis,* International Journal of Rheumatic Diseases 2013; 16: 448–454

34. Hebbbar M, Peyrat JP, Hornez L, Hatron PY, Hachulla E, Devulder B. *Increased concentrations of the circulating angiogenesis inhibitor endostatin in patients with systemic sclerosis.* Arthritis Rheum 2000; 43:889–93

35. Hummers LK, Hall A, Wigley FM, Simons M. *Abnormalities in the regulators of angiogenesis in patients with scleroderma.* J Rheumatol. 2009;36(3):576-82

36. Mittag M, Beckheinrich P, Hausteil UF. *Systemic sclerosis-related Raynaud's phenomenon: effects of iloprost infusion therapy on serum cytokine, growth factor and soluble adhesion molecule levels.* Acta Derm Venereol. 2001; 81:294–7

37. [Dziankowska-Bartkowiak B](#), [Waszczykowska E](#), [Dziankowska-Zaboroszczyk E](#), [de Graft-Johnson JE](#), [Zalewska A](#), [Łuczyńska M](#), [Nowak D](#). *Decreased ratio of circulatory vascular endothelial growth factor to endostatin in patients with systemic sclerosis--association with pulmonary involvement*. [Clin Exp Rheumatol](#). 2006;24(5):508-13
38. [Arason GJ](#), [Geirsson AJ](#), [Kolka R](#), [Vikingsdóttir T](#), [Valdimarsson H](#). *Deficiency of complement-dependent prevention of immune precipitation in systemic sclerosis*. [Ann Rheum Dis](#). 2002 Mar;61(3):257-60
39. Timár O, Szekanecz Z, Kerekes G, Végh J, Oláh AV, Nagy G, Csiki Z, Dankó K, Szamosi S, Németh Á, Soltész P, Szücs G. *Rosuvastatin improves impaired endothelial function, lowers high sensitivity CRP, complement and immunocomplex production in patients with systemic sclerosis--a prospective case-series study*. [Arthritis Res Ther](#). 2013;15(5):R105
40. Allanore Y, Meune C. *N-terminal pro brain natriuretic peptide: the new cornerstone of cardiovascular assessment in systemic sclerosis*. [Clin Exp Rheumatol](#). 2009;27:59-63