

Cellule endoteliali circolanti quale marker diretto di danno endoteliale in corso di sclerosi sistemica*

Raised levels of circulating endothelial cells in systemic sclerosis

N. Del Papa¹, M. Cortiana², W. Maglione¹, D.P. Comina¹, I. Silvestris², L. Moronetti Mazzeo², N. Fracchiolla², F. Fantini¹, A. Cortelezzi²

¹Dip. Reumatologia, Ospedale G. Pini, Milano;

²Dip. di Ematologia, IRCCS Policlinico, Università di Milano

SUMMARY

Objective: *Circulating endothelial cells (CECs) have been described in different conditions with vascular injury. Vascular abnormalities play a key role in the pathogenesis of Systemic Sclerosis (SSc). The aim of our study was to look for the presence of CECs in SSc patients and to evaluate their clinical significance.*

Methods: *We studied 52 SSc patients and 40 healthy controls (HC). Five-parameter, 3-color flow cytometry was performed with a FACScan. CECs were defined as CD45 negative, CD31 and P1H12 positive, and activated CECs as CD45 negative and P1H12, CD62, or CD106 positive. Results: Total and activated CEC counts were significantly higher in SSc patients when compared with HC and positively correlated with disease activity score. We found a significant association between CECs and disease activity; as regard with organ involvement, CEC number correlate with the severity of pulmonary hypertension.*

Conclusions: *Raised counts of CECs may represent direct evidence of active vascular disease in SSc as regard as visceral involvement, the association between CECs and pulmonary hypertension suggest a relevant role for CECs as a marker of prominent endothelial involvement.*

Reumatismo, 2005; 57(1):29-35

INTRODUZIONE

La sclerosi sistemica (SSc) è una patologia autoimmunitaria sistemica caratterizzata da una vasculopatia per lo più del microcircolo e da iperproduzione di collagene e di altre componenti della matrice connettivale con deposizione a carico della cute e di organi interni (1-3). Sebbene il meccanismo iniziale responsabile della malattia non sia ancora stato chiarito, si ritiene che il danno vascolare rappresenti un elemento chiave nella patogenesi della malattia sclerodermica (4, 5). È ipotizzabile che il ripetuto danno endoteliale indotto dall'ischemia e riperfusione conduca ad un'altera-

zione funzionale e ad una perdita irreversibile dell'integrità vasale con distacco cellulare, apoptosi necrosi e conseguente sofferenza tissutale. Sebbene un'ampia letteratura sottolinei sulla base dei dati clinici e anatomo-patologici l'importanza patogenetica della vasculopatia sclerodermica (6), la ricerca in questo campo risulta notevolmente limitata dalla inaccessibilità dell'endotelio sclerodermico. Recentemente diversi studi hanno messo in evidenza l'importanza delle cellule endoteliali circolanti (CEC) quale utile marker *in vivo* di danno vascolare. Nell'uomo le CEC sono state descritte in diverse patologie accomunate dal danno endoteliale quali le sindromi coronariche acute, le infezioni da *Rickettsia conorii* o Citomegalovirus, l'anemia falciforme, la porpora trombotica trombocitopenica, la malattia di Behçet, il lupus eritematoso sistemico e le vasculiti (7-15).

In tutti questi disordini vascolari le CEC costituiscono verosimilmente un'evidenza diretta della lesione endoteliale nonché possono offrire materiale interessante per studiare *ex vivo* le caratteristiche

*Lavoro premiato al XL Congresso SIR, Udine 2003.

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott.ssa Nicoletta Del Papa
Dip. Reumatologia, Ospedale G. Pini
Via Pini, 9
20122 Milano
E-mail: delpapa@gpini.it

fenotipiche e/o funzionali dell'endotelio danneggiato.

Scopo di questo studio è stato quello di valutare mediante un'analisi citofluorimetrica se nel sangue periferico di pazienti con SSc sono presenti CEC e quale sia il loro fenotipo. Abbiamo inoltre studiato se la presenza delle CEC in corso di SSc si correli all'attività di malattia, alle caratteristiche cliniche e/o a parametri plasmatici di danno endoteliale.

MATERIALI E METODI

Pazienti

Sono stati studiati 52 pazienti affetti da SSc, 49 donne e 3 uomini, età mediana 58 anni (range 24-71 anni). La diagnosi di SSc era stata posta sulla base dei criteri classificativi per la SSc proposti dall'American College of Rheumatology (17). In base alla classificazione di Le Roy (18), i pazienti sono stati suddivisi in due gruppi, 26 pazienti con SSc variante limitata (lcSSc) e 26 pazienti con SSc variante diffusa (dcSSc). La valutazione dell'attività di malattia è stata fatta utilizzando i criteri di Valentini (19). L'interessamento d'organo è stato fatto come precedentemente riportato (17). Tutti i pazienti erano in terapia con calcio-antagonisti e/o ACE-inibitori. 25 pazienti erano in terapia con prostaciclina sintetica; in questo caso, il campione per la ricerca delle CEC veniva prelevato almeno a distanza di 1 mese dall'ultima infusione. Sono stati esclusi dallo studio pazienti in terapia immunosoppressiva.

Il gruppo di controllo era rappresentato da 40 soggetti sani, paragonabili come età e sesso al gruppo patologico.

Determinazione delle CEC mediante analisi al citofluorimetro

100 µL di sangue periferico in Eparina sodica sono stati incubati con 10 µL di un pannello di anticorpi monoclonali (anti-CD45, -CD31, -CD106, -CD62 e P1H12) marcati con fluorescina isotiocianato (FITC), R-phicoeritrina (PE) o peridinin chlorophyll protein (PerCP), per 20 minuti a temperatura ambiente (RT). I globuli rossi sono stati quindi lisati mediante incubazione in una soluzione FACS lisante (Becton Dickinson, San Jose, CA) per 10 min a temperatura ambiente. Il pellet di globuli bianchi è stato poi lavato due volte con una soluzione di FACS flow (Becton Dickinson). Sono state usate appropriate finestre di analisi per con-

tare il numero totale di CEC, nonché il numero di CEC attivate. Le CEC sono state definite come CD45 negative, CD31+ e P1H12+. Le CEC attivate sono state definite come P1H12+, CD62+ e/o CD106+. La lettura al citofluorimetro FACS con 15-mW argon laser (excitation a 488 nm) (Becton Dickinson) è stata seguita a tre colori/cinque parametri. La sensibilità dei determinanti di fluorescenza è stata settata e monitorata usando Calibrite Beats (Becton Dickinson) secondo le indicazioni della ditta produttrice. Cellule colorate con IgG1 isotipic controls marcate con FITC o PE sono state usate come controllo negativo. Sono state acquisite almeno 100.000 cellule per campione: le analisi sono state considerate informative quando un adeguato numero di eventi (>100) è stato acquisito nelle finestre di valutazione delle CEC. I dati sono stati analizzati mediante CELLquest software (Becton Dickinson).

Dosaggio plasmatico di SE-Selectina e IL6

I livelli plasmatici di E-selectina solubile e IL6 sono stati determinati mediante metodica ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay; R&D System, Mineapolis, MN) e calcolati mediante l'uso di una curva di riferimento standard, secondo le indicazioni della ditta.

Analisi statistica

Sono stati messi a confronto i valori di CEC dei sierici dei pazienti sclerodermici con quelli dei controlli sani mediante il test di Mann-Whitney. È stato considerato significativo un valore di $P < 0.05$. Inoltre, le correlazioni tra il numero di CEC ed i differenti parametri clinici e strumentali di patologia sclerodermica sono state studiate mediante il test di correlazione di Spearman.

RISULTATI

Caratteristiche cliniche dei pazienti

I pazienti, tutte donne, avevano un'età media di 53 anni (range compreso tra 24 e 72 anni). 26 pazienti erano affetti da lcSSc e 26 da dcSSc. La durata media di malattia era di 5.5 anni (range 1-23). Tutti i pazienti riferivano fenomeno di Raynaud all'esposizione a basse temperature. Le ulcere cutanee sono state riscontrate in 17 pazienti su 52 (32.6%). Riguardo al coinvolgimento polmonare 12 pazienti su 52 (23,9%) avevano fibrosi con ipertensione polmonare e 16 su 52 (30,4%) avevano ipertensione polmonare primitiva. La valutazione

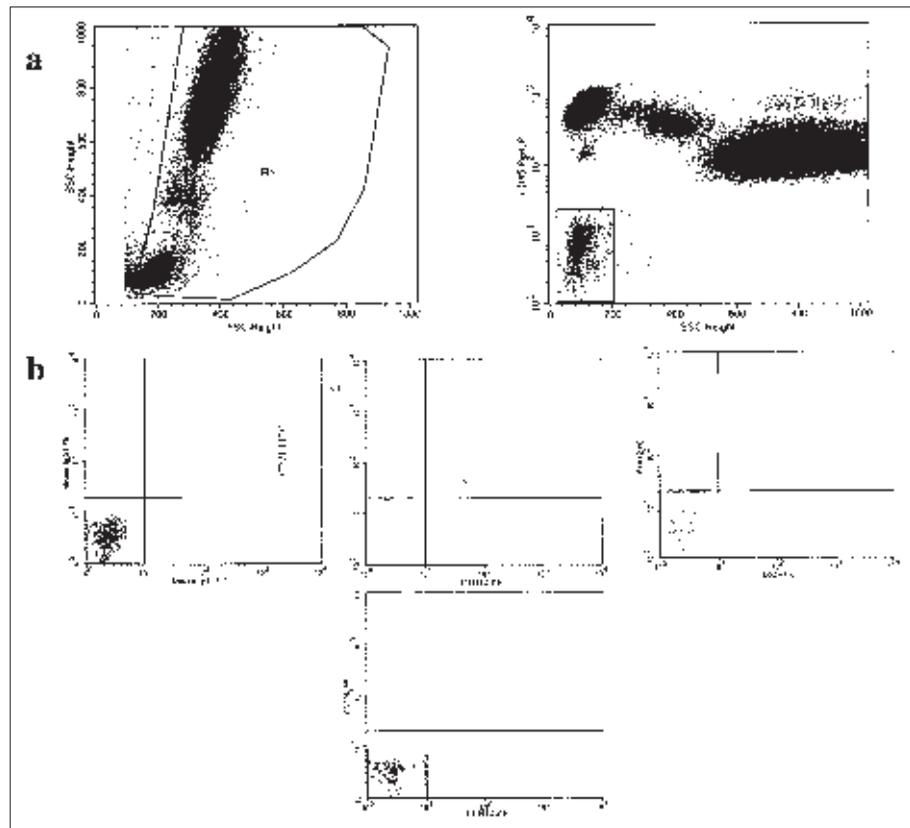


Figura 1 - Valutazione citofluorimetrica delle cellule endoteliali circolanti (CEC). a) Pannello di analisi che evidenzia le finestre di analisi utilizzate per escludere le piastrine e i detriti cellulari. b) Pannello di analisi che mostra il controllo negativo, le CEC totali e le CEC attivate. PerCP = peridinin chlorophyll protein; PE = phycoerythrin; FITC = fluorescein isothiocyanate.

dell'attività di malattia secondo i criteri del Gruppo Europeo di Sclerodermia indicava che 28 pazienti su 52 avevano una malattia attiva.

Determinazione quantitativa delle CEC

Le CEC sono state identificate come negative per il marker ematopoietico CD45 e positive per il CD31 e per il marcatore endoteliale specifico (P1H12) (Fig. 1). Il numero medio di CEC nei pazienti sclerodermici è risultato 317/mL (95% CI 243-375) e significativamente più alto rispetto ai controlli sani 77/mL (95% CI 69-110; $P < 0.00001$). Analizzando i subset di malattia, sia i pazienti con lcSSc che i pazienti con dcSSc mostrano livelli significativamente aumentati di CEC rispetto ai controlli sani (rispettivamente $P < 0.05$ e $P < 0.001$) (Fig. 2). I pazienti con dcSSc avevano un maggior numero di CEC rispetto ai pazienti con lcSSc, ma la differenza non era statisticamente significativa (valore medio 376 cell/mL e 236 cell/mL).

Le CEC mostravano una forte correlazione con l'attività di malattia ($r_s = 0.728$, $P = 0.001$) (Fig. 3). Non è stata trovata alcuna correlazione tra i livelli di CEC e le ulcere digitali, i parametri cutanei (i.e. skin score totale e sclerodermia) e il coinvolgi-

mento articolare o muscolare. Per quanto riguarda il coinvolgimento polmonare le CEC mostravano una correlazione significativa con i valori di pressione arteriosa polmonare in tutti i pazienti sclerodermici ($r_s = 0.379$, $P < 0.05$) (Fig. 4) e nella forma limitata ($r_s = 0.515$, $P < 0.05$). Inoltre è stato evidenziato un rapporto inversamente proporzionale tra il numero di CEC e DLCO (capacità vitale e diffusione alveolare) unicamente nella lcSSc ($r_s = 0.416$, $P < 0.005$). Non è stata osservata nessuna correlazione significativa tra livelli di CEC e le concomitanti terapie in atto.

Fenotipo delle CEC

Per valutare se le CEC presentano un fenotipo attivato, abbiamo valutato l'espressione del P1H12 e delle molecole espresse sulla superficie dell'endotelio attivato (Fig. 1). Il numero delle CEC che esprimevano sE-selectina o VCAM-1 (rispettivamente CD62 e CD106) risultavano marcatamente aumentate in pazienti sclerodermici rispetto ai controlli sani (rispettivamente $P = 0.01$ e $P = 0.001$) (Fig. 5), rappresentando il 20% del totale delle CEC. Il numero e il fenotipo delle CEC attivate non variava nei differenti sottotipi di malattia. È stato os-

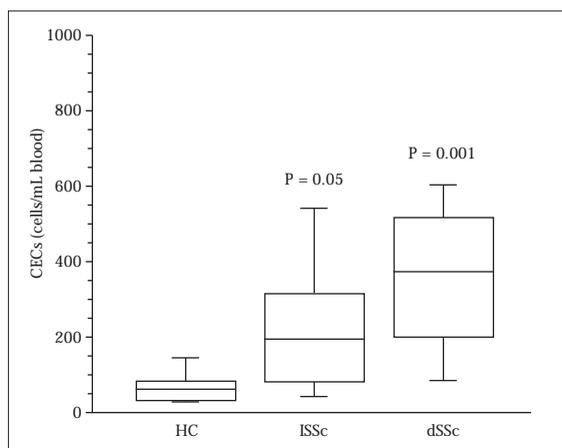


Figura 2 - Correlazione tra il numero di cellule endoteliali circolanti nei pazienti sani e nei due sottogruppi di sclerodermia, limitata e diffusa.

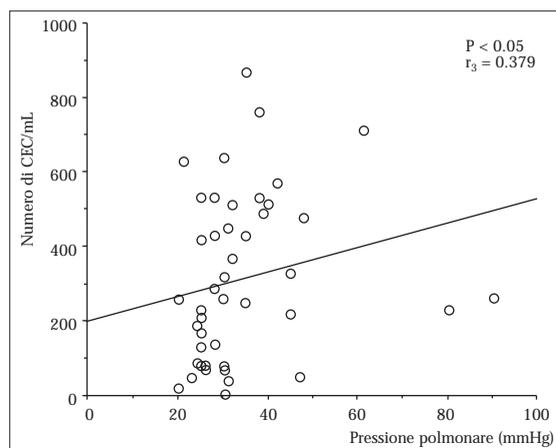


Figura 4 - Correlazione tra i livelli di cellule endoteliali circolanti e i valori di pressione polmonare arteriosa nei pazienti sclerodermici.

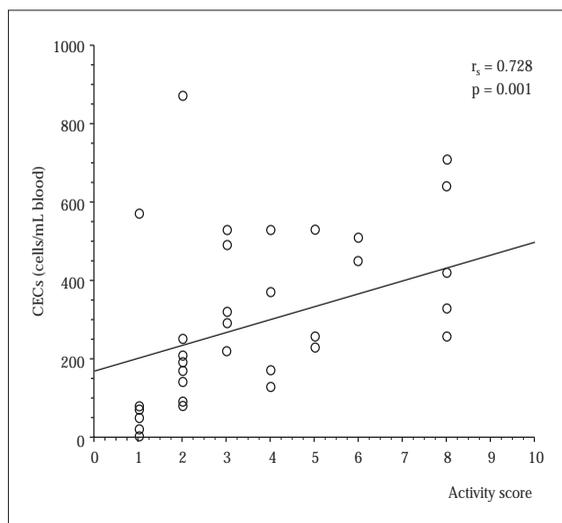


Figura 3 - Correlazione tra il numero di cellule endoteliali circolanti e l'attività di malattia.

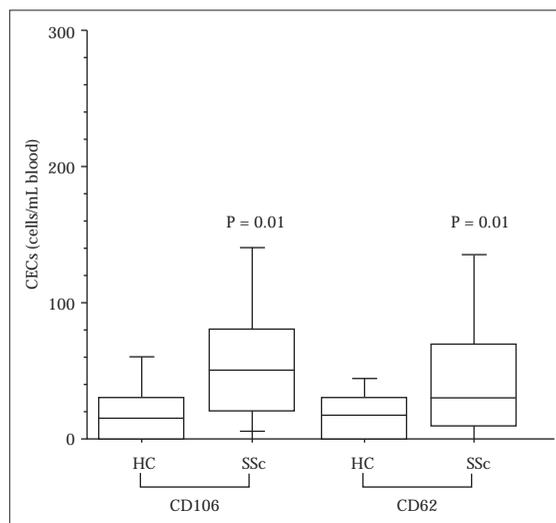


Figura 5 - Correlazione tra il numero di cellule endoteliali attivate (CD62) e totali (CD106) nei soggetti sani e nei pazienti sclerodermici.

servato un numero più elevato di CEC in pazienti con malattia attiva (pazienti con score di attività di malattia >3) rispetto a pazienti in buon controllo clinico; analogamente, si è evidenziata una correlazione significativa tra il numero di CEC attivate e score di attività di malattia ($r_s = 0.375$, $P = 0.005$).

Livelli plasmatici di marcatori di danno endoteliale

Sia i livelli plasmatici di sE-selectina che di IL6 risultavano significativamente elevati nei pazienti sclerodermici rispetto ai controlli sani, rispettivamente sE-selectina 42.30 ± 23.7 ng/mL nei pazienti sclerodermici e 8.8 ± 8.7 nei pazienti sani ($P < 0.0001$) e IL 6 98 pg/mL nei pazienti scleroder-

mici e 31.3 pg/mL nei pazienti sani ($P = 0.01$). In particolare i parametri di sE-selectina mostravano una correlazione con i livelli di CEC totali e attivate (rispettivamente $r_s = 0.594$, $P < 0.01$) (Fig. 6). I livelli di IL 6 appaiono aumentati nei pazienti sclerodermici rispetto ai sani, ma non c'è correlazione con la quantità di CEC.

DISCUSSIONE

Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare se nel sangue periferico di pazienti con SSc sono evidenzabili CEC e di valutarne la correlazio-

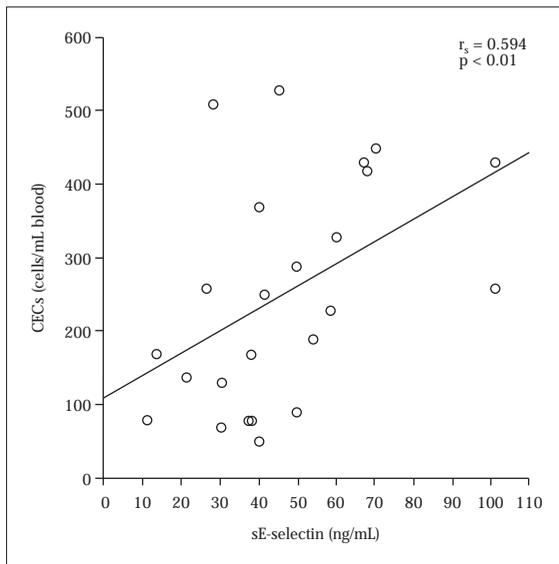


Figura 6 - Correlazione tra il numero di cellule endoteliali e la concentrazione di livelli citoplasmatici di sE-selectina.

ne con i differenti sottotipi e stadi di malattia. I risultati dello studio mostrano che i pazienti con SSc hanno alti livelli di CEC sia totali che attivate; inoltre, la presenza ed il numero di CEC correla con l'attività di malattia e, per quanto riguarda il coinvolgimento d'organo, con la presenza di ipertensione polmonare.

La determinazione delle CEC nel sangue periferico è stata di recente proposta come parametro attendibile di danno endoteliale in differenti patologie vascolari, quali la sindrome coronaria acuta, l'anemia falciforme, la porpora trombotica trombocitopenica, le infezioni da Rickettsia e da Citomegalovirus, la malattia di Behcet, il Lupus Eritematoso Sistemico e le vasculiti dei piccoli vasi ANCA-correlate. Analogamente a tali patologie, anche la SSc è una patologia fortemente caratterizzata da una microangiopatia come evidenziato dal riscontro istologico di anomalie del microcircolo a livello del derma, caratterizzate dalla perdita delle giunzioni intercellulari e da aspetti di sofferenza (fino alla morte) delle cellule endoteliali. Pertanto il riscontro delle CEC in corso di SSc costituisce un'ulteriore conferma del ruolo chiave svolto dall'endotelio nella patogenesi della malattia. È quindi lecito pensare che qualunque sia il meccanismo patogenetico responsabile del danno del microcircolo, il ripetersi della sofferenza endoteliale può condurre alla irreversibile perdita di integrità con distacco, apoptosi e necrosi delle cellule endoteliali. Il numero di CEC riscontrate in pazienti sclerodermici non differisce nei diversi sottotipi di ma-

lattia. Tale dato è ulteriormente supportato dal fatto che diversi studi hanno dimostrato che sia nella forma limitata che in quella diffusa sono presenti elementi istologici di danno vascolare sia nei tessuti danneggiati che in quelli apparentemente sani (21-23). Inoltre il numero di CEC riscontrate nella SSc è paragonabile a quello rilevato in pazienti affetti da altre patologie caratterizzate da un esteso danno vascolare, quali l'anemia a cellule falciformi, le infezioni di Rickettsia e da Citomegalovirus e le vasculiti ANCA associate (9-10-12, 15).

I marcatori di attivazione e di danno endoteliale, quali le molecole di adesione solubili (sVCAM ed sE-selectina) sono stati presi in considerazione quali possibili parametri per valutare l'attività e la severità della malattia sclerodermica (24). I nostri risultati mostrano che in corso di SSc il numero delle CEC è strettamente correlato con l'attività di malattia, suggerendo che queste cellule possano essere considerate un marcatore addizionale di attività di malattia nei pazienti sclerodermici. Tali dati sono ulteriormente avvalorati dal fatto che l'attività di malattia è stata valutata applicando un metodo validato (19). Tutti gli studi precedenti definivano invece l'attività di malattia in maniera assolutamente "empirica" e personale, e comunque non validata, considerando attivi quei pazienti che avevano una rapida progressione di malattia o mostravano una alterazione degli indici di flogosi (20). Riguardo al coinvolgimento d'organo, è stata riscontrata una netta correlazione tra livelli di CEC e ipertensione polmonare nel complesso delle SSc e in particolare nel sottogruppo delle lcSSc. In quest'ultimo sottogruppo di pazienti si è riscontrata un'associazione tra i livelli di CEC e la compromissione della DLCO. Questi risultati sono ben comprensibili se si considera che i meccanismi responsabili dell'ipertensione polmonare nella lSSc sono profondamente differenti rispetto a quelli effettivi nell'ipertensione polmonare della forma diffusa di malattia. Diversi studi hanno ampiamente dimostrato che l'endotelio danneggiato sia dal punto di vista funzionale che strutturale ha un ruolo critico nell'insorgenza e nella progressione dell'ipertensione polmonare della SSc. Le conseguenze del persistente danno endoteliale includono il vasospasmo, il rimodellamento vascolare e la trombosi, a loro volta responsabili sia dell'incremento delle resistenze vascolari polmonari sia dell'alterato rapporto ventilazione/perfusione. Tali meccanismi che possono essere attribuiti ad una malattia polmonare puramente endoteliale, sono particolar-

mente attivi in pazienti con lcSSc. Tali pazienti hanno un rischio maggiore di sviluppare una progressiva ipertensione polmonare in assenza di alterazioni fibrotiche interstiziali; al contrario, in pazienti affetti da dcSSc lo sviluppo di ipertensione polmonare è solitamente tardivo e dovuto principalmente a fibrosi polmonare risultato finale di un alveolite polmonare evoluta.

Il riscontro di un numero elevato di CEC con fenotipo pro-adesivo conferma i dati noti dalla letteratura che le cellule endoteliali possono essere presenti in forma attivata nei piccoli vasi di pazienti SSc (21, 25-28). Molti studi hanno infatti dimostrato che in questi pazienti vi è un' aumentata espressione di molecole di adesione come sE-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 a livello cutaneo, nonché un aumento delle concentrazioni plasmatiche delle forme solubili delle molecole di adesione come sE-selectina, ICAM-1 e VCAM-1. La sE-selectina è la molecola di adesione altamente specifica per le cellule endoteliali; i suoi elevati livelli plasmatici e l' aumentata espressione nei tes-

suti sclerodermici sembrano essere strettamente correlati all' attivazione endoteliale. Nel nostro studio ciò è confermato dal riscontro nei pazienti con SSc di livelli plasmatici significativamente elevati di sE-selectina. Inoltre, tali livelli correlano strettamente con il numero totale di CEC. Sulla base di tali osservazioni, le CEC attivate possono essere considerate un parametro importante per la valutazione endoteliale *in vivo*.

In conclusione, i nostri dati evidenziano la presenza in pazienti sclerodermici di un numero rilevante di cellule endoteliali mature circolanti come possibile risultato del distacco dalle pareti vasali danneggiate. La stretta correlazione fra l' attività di malattia e il numero delle CEC suggerisce che queste ultime possono essere considerate un marker promettente di danno vascolare e di progressione della malattia, con particolare riguardo allo sviluppo di ipertensione polmonare in pazienti con lcSSc. Inoltre, la possibilità di individuare precocemente pazienti con patologia vascolare attiva potrebbe essere utile per monitorare l' efficacia di tali trattamenti.

RIASSUNTO

Studi recenti hanno evidenziato la presenza di cellule endoteliali circolanti (CEC) in diverse patologie accomunate da un danno vascolare. La Sclerosi Sistemica (SSc) è primariamente caratterizzata importanti elementi di sofferenza vascolare. Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare se nel sangue periferico di pazienti con SSc sono presenti CEC e di valutarne il loro significato clinico.

Materiali e Metodi: Sono stati studiati mediante analisi citofluorimetrica i campioni di sangue periferico di 52 pazienti con SSc e 40 soggetti sani (HC). Le CEC sono state identificate come CD45 negative, CD31 e P1H12 positive, e le CEC attivate come CD45 negative e P1H12, CD62, or CD106 positive.

Risultati: Il numero di CEC totali e attivate era significativamente più alto nei pazienti con SSc rispetto ai controlli sani. Inoltre è stata riscontrata una associazione significativa tra il numero delle CEC e l' attività di malattia. Relativamente all' interessamento d' organo, le CEC correlavano significativamente con l' ipertensione polmonare

Conclusioni: L' elevato numero di CEC riscontrato in corso di SSc attiva costituisce un' ulteriore evidenza del danno vascolare caratteristico di questa patologia. Tali dati suggeriscono inoltre che le CEC potrebbero essere utilizzate in futuro come marker di malattia attiva nonché nel monitoraggio della progressione della patologia.

Parole chiave - Cellule endoteliali, sclerosi sistemica, ipertensione polmonare.

Key words - *Endothelial cells, systemic sclerosis, pulmonary hypertension.*

BIBLIOGRAFIA

1. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA Jr, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988; 15: 202-5.
2. Fleischmajer R. The pathophysiology of scleroderma. *Int J Dermatol* 1977; 16: 310-8.
3. Systemic sclerosis: current pathogenetic concepts and future prospects for targeted therapy. *Lancet* 1996; 347: 1453-8.
4. Campbell PM, LeRoy EC. Pathogenesis of systemic sclerosis: a vascular hypothesis. *Semin Arthritis Rheum* 1975; 4: 351-68.
5. Freemont AJ, Hoyland J, Fielding P, Hodson N, Jayson MI. Studies of the microvascular endothelium in uninvolved skin of patients with systemic sclerosis: direct evidence for a generalized microangiopathy. *Br J Dermatol* 1992; 126: 561-8.
6. Denton CP. Vascular cells and their products in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Sem Clin Immunol* 2000; 2: 7-13.

7. George F, Brisson C, Poncelet P, Laurent JC, Massot O, Arnoux D, et al. Rapid isolation of human endothelial cells from whole blood using S-Endo 1 monoclonal antibody coupled to immunomagnetic beads: demonstration of endothelial injury after angioplasty. *Thromb Haemost* 1992; 67: 147-53.
8. Mutin M, Canavy I, Blann A, Bory M, Sampol J, Dignat-George F. Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood* 1999; 93: 2951-8.
9. Solovey A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Heibel RP. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Engl J Med* 1997; 337: 1584-90.
10. Lefevre P, George F, Durand JM, Sampol J. Detection of circulating endothelial cells in thrombotic thrombocytopenic purpura letter. *Thromb Haemost* 1993; 69: 522.
11. George F, Brouqui P, Boffa MC, Mutin M, Drancourt M, Brisson C, et al. Demonstration of Rickettsia conorii-induced endothelial injury in vivo by measuring circulating endothelial cells, thrombomodulin, and von Willebrand factor in patients with Mediterranean spotted fever. *Blood* 1993; 82: 2109-16.
12. Grefte A, van der Giessen M, van Son W. The TH. Circulating cytomegalovirus (CMV)-infected endothelial cells in patients with an active CMV infection. *J Infect Dis* 1993; 167: 270-7.
13. Camoin-Jau L, Kone-Paut I, Chabrol B, Sampol J, Dignat-George F. Circulating endothelial cells in Behçet's disease with cerebral thrombophlebitis. *Thromb Haemost* 2000; 83: 631-2.
14. Clancy R, Marder G, Martin V, Belmont HM, Abramson SB, Buyon J. Circulating activated endothelial cells in systemic lupus erythematosus: further evidence for diffuse vasculopathy. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1203-8.
15. Woywodt A, Streiber F, de Groot K, Regelsberger H, Haller H, Haubitz M. Circulating endothelial cells as markers for ANCA associated small-vessel vasculitis. *Lancet* 2003; 361: 206-10.
16. Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23: 581-90.
17. Ferri C, Valentini G, Cozzi F, Sebastiani M, Michelassi C, La Montagna G, et al. Systemic sclerosis: demographic, clinical, and serologic features and survival in 1.012 Italian patients. *Medicine (Baltimore)* 2002; 81: 139-53.
18. Valentini G, Della Rossa A, Bombardieri S, Bencivelli W, Silman AJ, D'Angelo S, et al. European multicentre study to define disease activity criteria for systemic sclerosis. II. Identification of disease activity variables and development of preliminary activity indexes. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 592-8.
19. Valentini G, Bencivelli W, Bombardieri S, D'Angelo S, Della Rossa A, Silman AJ, et al. European Scleroderma Study Group to define disease activity criteria for systemic sclerosis. III. Assessment of the construct validity of the preliminary activity criteria. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 901-3.
20. Claman HN, Giorno RC, Seibold JR. Endothelial and fibroblastic activation in scleroderma: the myth of the "uninvolved skin." *Arthritis Rheum* 1991; 34: 1495-501.
21. Prescott RJ, Freemont AJ, Jones CJ, Hoyland J, Fielding P. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *J Pathol* 1992; 166: 255-63.
22. McHugh NJ, Distler O, Giacomelli R, Riemekasten G. Non organ based laboratory markers in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2003; 21 (3 Suppl 29): S32-8.
23. Freemont AJ, Holyand J, Fielding P, Hadson N, Jayson MI. Studies of microvascular endothelium in uninvolved skin of patients with systemic sclerosis: direct evidence for a generalized microangiopathy. *Br J Dermatol* 1992; 126: 561-8.
24. Stratton RJ, Coghlan JG, Pearson JD, Burns A, Sweny P, Abraham DJ, et al. Different patterns of endothelial cell activation in renal and pulmonary vascular disease in scleroderma. *QJM* 1998; 91: 561-6.
25. Kraling BM, Jimenez SA, Sorger T, Maul GG. Isolation and characterization of microvascular endothelial cells from the adult human dermis and from skin biopsies of patients with systemic sclerosis. *Lab Invest* 1994; 71: 745-54.
26. Majewski S, Hunzelmann N, Johnson JP, Jung C, Mauch C, Ziegler-Heitbrock HW, et al. Expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the skin of patients with systemic scleroderma. *J Invest Dermatol* 1991; 97: 667-71.
27. Sollberg S, Peltonen J, Uitto J, Jimenez SA. Elevated expression of beta 1 and beta 2 integrins, intercellular adhesion molecule 1, and endothelial leukocyte adhesion molecule 1 in the skin of patients with systemic sclerosis of recent onset. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 290-8.