

Endotelina-1 e sclerosi sistemica

Endothelin-1 in systemic sclerosis

M.E. Secchi, A. Sulli, C. Pizzorni, M. Cutolo

Laboratorio di Ricerca e U.O.C. di Reumatologia. Dipartimento di Medicina Interna, Università degli Studi di Genova

SUMMARY

We evaluated endothelin-1 (ET-1) plasma levels in patients affected by primary Raynaud's phenomenon (PRP), as well as in patients with systemic sclerosis (SSc) and secondary Raynaud's phenomenon (SRP). Furthermore, ET-1 levels were investigated in SSc patients with different patterns of peripheral microvascular damage, as evaluated by nailfold videocapillaroscopy (NVC).

Methods: 23 PRP patients, 67 SSc patients according to ACR criteria, and 23 healthy subjects were enrolled. SSc microvascular involvement was classified in three different patterns (Early, Active, and Late) by NVC, as previously described.

Results: ET-1 was found significantly higher in both PRP and SRP, when compared with controls (median \pm IQR: 3.3 ± 2.8 , 2.7 ± 2.2 , 2.0 ± 2.2 , respectively) ($p=0.05$). No statistically significant difference of ET-1 levels was observed between PRP and SRP patients. ET-1 was found higher in patients with Late NVC pattern, when compared with both Active and Early NVC patterns (median \pm IQR: 3.4 ± 2.5 , 2.4 ± 2.2 , 2.5 ± 2.1 , respectively), but without statistical significance. Patients with Late NVC pattern showed significantly higher ET-1 plasma levels than controls ($p=0.03$). No correlation was found between ET-1 levels and disease duration in both groups, as well as between ET-1 levels and age of patients.

Conclusions: These data support previous studies, reporting increased ET-1 plasma levels in both PRP and SRP patients. Interestingly, patients with the Late NVC pattern of microangiopathy showed higher ET-1 plasma levels than controls. The high levels of ET-1 detected in the Late NVC pattern of microangiopathy might be related to the larger fibrotic involvement typical of the advanced stages of disease.

Reumatismo, 2007; 59(2):129-134

INTRODUZIONE

La sclerosi sistemica (SSc) è una connettivite ad eziologia multifattoriale e patogenesi autoimmune, caratterizzata da danno endoteliale e fibrosi progressiva a carico di cute, vasi sanguigni, tubo digerente, polmoni, cuore e reni (1). Le alterazioni vascolari sono un evento precoce nella SSc: esse interessano le arterie di piccolo calibro, le arteriole ed i capillari; questi ultimi vanno inizialmente incontro a dilatazione con formazione di capillari giganti e tortuosi e, in fase avanzata di malattia, a distruzione con successiva loro rarefazione. Tali alterazioni risultano ben documentabili mediante videocapillaroscopia periungueale (VCP),

un'indagine strumentale che consente, appunto, lo studio delle anomalie morfo-funzionali del microcircolo (2, 3).

L'osservazione di una microangiopatia sembra rappresentare il miglior fattore predittivo valutabile per lo sviluppo della SSc, potendo precedere gli altri segni e sintomi della malattia anche di molti anni, essendo facilmente evidenziabile, già nelle sue fasi iniziali, mediante VCP. Infatti, la VCP possiede un alto valore sia diagnostico, sia prognostico, anche in presenza di un fenomeno di Raynaud (FR) isolato (3).

La VCP si conferma quindi un'indagine strumentale idonea ed efficace per la diagnosi differenziale tra fenomeno di Raynaud primitivo (FRP) e secondario (FRS) e per la diagnosi precoce della microangiopatia sclerodermica, mediante il riconoscimento dello "scleroderma pattern" appunto di tipo "iniziale". Inoltre, l'identificazione di distinti pattern videocapillaroscopici risulta utile per la stadiazione ed il monitoraggio della progressione della microangiopatia stessa (3).

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott.ssa Maria Elena Secchi
U.O.C. Clinica Reumatologica
Dipartimento di Medicina Interna
Università degli Studi di Genova
Viale Benedetto XV, 6 - 16132 Genova
E-mail: secchime@yahoo.it

Il fenomeno di Raynaud, espressione dell'alterata regolazione del flusso sanguigno periferico dovuta al danno microvascolare, rappresenta il sintomo d'esordio nella maggioranza dei pazienti affetti da SSc e può precedere le manifestazioni cutanee di mesi o, spesso, di anni.

Esso consiste in una vasocostrizione episodica delle piccole arterie ed arteriole delle dita delle mani o dei piedi provocata, generalmente, dall'esposizione al freddo, da brusche variazioni di temperatura, da stimoli meccanici ripetuti (es. le vibrazioni) o anche da stress emotivi. Tuttavia, la maggior parte dei soggetti con FR isolato non sviluppa successivamente una connettivite; pertanto si parla di FRP in tutti i casi in cui è possibile escludere un'eziologia secondaria (4). L'endotelina-1 (ET-1), prodotta dalle cellule endoteliali, è il più potente agente vasocostrittore conosciuto, funge da regolatore del tono vascolare (5) ed è, inoltre, in grado di modulare la crescita e la differenziazione di numerosi tipi cellulari (6). In seguito a queste osservazioni si è quindi ipotizzato che questo peptide possa svolgere un ruolo anche nell'ipossia secondaria osservabile in corso di fibrosi polmonare e SSc (7, 8). È stato dimostrato, infatti, che la concentrazione plasmatica di ET-1 risulta significativamente più elevata nei pazienti affetti da SSc rispetto ai soggetti sani; in particolare, i valori più elevati sono stati osservati nella variante diffusa della malattia (9). Considerato il coinvolgimento dell'ET-1 nella microangiopatia che si osserva nella SSc e l'importanza della VCP nel documentare tali alterazioni morfologiche, scopo del nostro studio è stato quello di valutare i livelli plasmatici di ET-1 in pazienti con FRP ed in pazienti affetti da SSc con FRS, in relazione ai differenti pattern microangiopatici, documentati mediante VCP.

PAZIENTI E METODI

Sono stati valutati 23 pazienti con FRP (età media 46 ± 19 anni, durata media di malattia 6 ± 10 anni), 67 pazienti con SSc (età media 59 ± 12 anni, durata media di malattia 8 ± 9 anni) e 23 soggetti sani di controllo (età media 51 ± 17 anni).

I pazienti affetti da SSc rispondevano ai criteri dell'ACR (10) e, in base al grado di impegno cutaneo, sono stati suddivisi in due gruppi, con impegno cutaneo limitato (limSSc) e con impegno cutaneo diffuso (difSSc), secondo la classificazione di LeRoy (1). I pazienti non avevano assunto farmaci immunosoppressori né vasodilatatori, ACE-

inibitori o calcio-antagonisti negli ultimi 15 giorni prima del prelievo di sangue.

I livelli plasmatici di endotelina-1 sono stati valutati mediante Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA), (kit BIOMEDICA GRUPPE, Vienna, A), CV% inter-assay 6,1-6,9%, CV intra-assay 3,9-4,9%, i valori sono stati espressi in femtomoli/ml.

Il plasma è stato ottenuto da campioni di sangue immediatamente centrifugati in una centrifuga refrigerata e conservati a -80 °C prima dell'analisi.

La microangiopatia sclerodermica è stata classificata, mediante VCP, in 3 differenti pattern microangiopatici: 23 pazienti "Early", 26 pazienti "Active", 18 pazienti "Late", come precedentemente riportato (3). Sono stati considerati i seguenti parametri: capillari ectasici, capillari giganti, microemorragie, riduzione del numero di capillari, sovertimento dell'architettura vascolare, capillari ramificati (2). Sulla base delle anomalie VCP, i pazienti sono stati distribuiti nel pattern appropriato: "Early", "Active" o "Late".

La riduzione del numero di capillari, il sovertimento dell'architettura vascolare e le ramificazioni capillari sono stati utilizzati quali parametri di valutazione della microangiopatia sclerodermica. Per quantizzare i singoli parametri è stata adottata una scala di valutazione semiquantitativa, con punteggio da 1 = cambiamenti minimi a 3 = cambiamenti massimi. I singoli score sono stati sommati (punteggio massimo = 9).

La valutazione statistica è stata realizzata tramite metodiche non-parametriche.

RISULTATI

Nessuna correlazione statisticamente significativa è stata osservata tra l'età dei singoli gruppi di soggetti ed i livelli plasmatici di ET-1 (Fig. 1).

I livelli plasmatici di ET-1 sono risultati significativamente più elevati nei pazienti affetti da FRP ($3,3 \pm 2,8$ fmol/ml) e nei pazienti sclerodermici ($2,7 \pm 2,2$ fmol/ml), rispetto ai soggetti di controllo ($2,0 \pm 2,2$ fmol/ml) ($p=0,05$) (Fig. 2). Nessuna differenza statisticamente significativa è stata, invece, osservata tra i pazienti con FRP ed i pazienti sclerodermici (Fig. 2).

Non sono state osservate differenze statisticamente significative dei livelli di ET-1 tra i tre gruppi di pazienti sclerodermici ("Early" $2,5 \pm 2,1$, "Active" $2,4 \pm 2,2$ e "Late" $3,4 \pm 2,5$ fmol/ml), pur risultando i livelli di ET-1 più elevati nei pazienti con pattern

capillaroscopico di tipo “Late” (Fig. 3). Confrontando i livelli plasmatici di ET-1 tra i tre gruppi di pazienti con differente pattern VCP ed i soggetti sani, si è riscontrata una significatività statistica solo tra pazienti con pattern VCP di tipo “Late” e i controlli ($p=0,03$), pur presentando tutti e tre i gruppi di pazienti livelli di ET-1 più elevati dei controlli (Fig. 4). Non sono state rilevate differenze statisticamente significative nei livelli di ET-1 tra pazienti con limSSc e difSSc (Fig. 5).

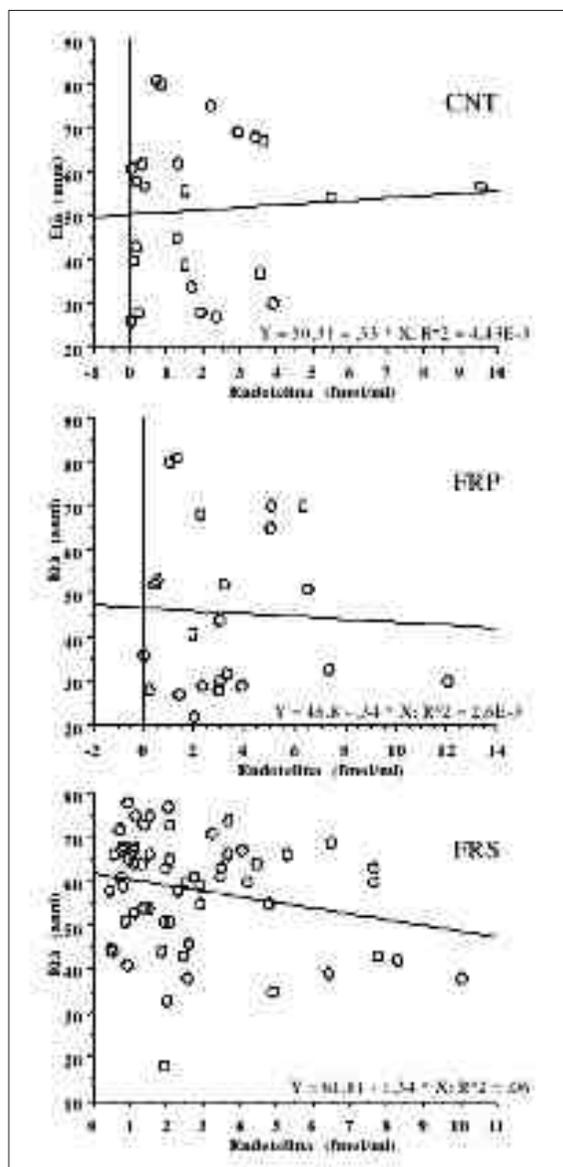


Figura 1 - Correlazione tra l'età dei singoli gruppi di soggetti (controlli, soggetti con fenomeno di Raynaud primitivo e soggetti con fenomeno di Raynaud secondario) ed i livelli plasmatici di endotelina (CNT = controlli, FRP = fenomeno di Raynaud primitivo, FRS = fenomeno di Raynaud secondario).

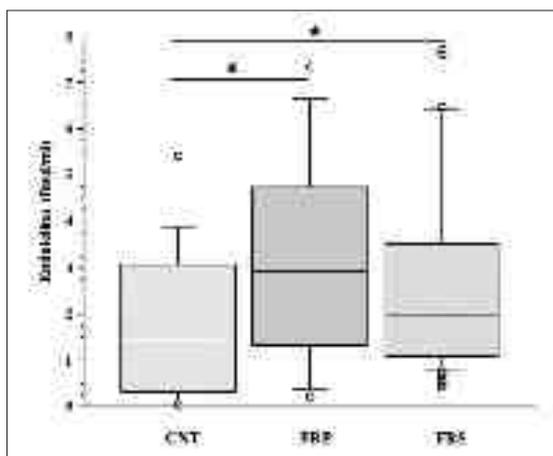


Figura 2 - Livelli plasmatici di endotelina rispettivamente nei controlli (CNT), nei pazienti con fenomeno di Raynaud primitivo (FRP) e con fenomeno di Raynaud secondario (FRS) (* $p = 0,05$).

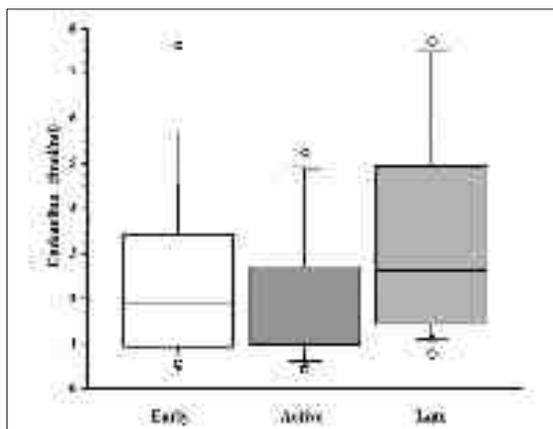


Figura 3 - Livelli plasmatici di endotelina nei tre gruppi di pazienti sclerodermici con pattern videocapillaroscopico di tipo “Early”, “Active”, “Late” ($p = n.s.$).

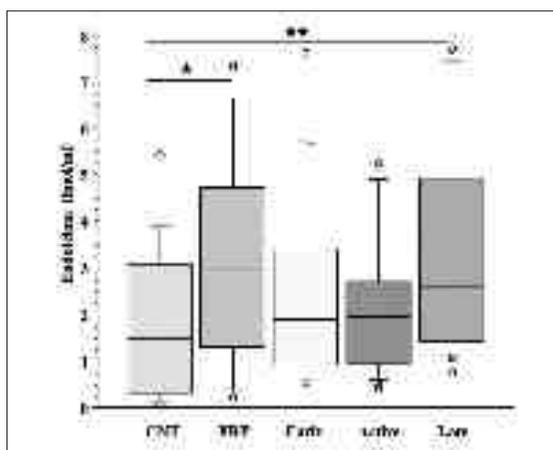


Figura 4 - Livelli plasmatici di endotelina nei controlli (CNT), nei soggetti con fenomeno di Raynaud primitivo (FRP) e nei tre pattern microangiopatici sclerodermici, “Early”, “Active”, “Late” (* $p = 0,05$, ** $p = 0,03$).

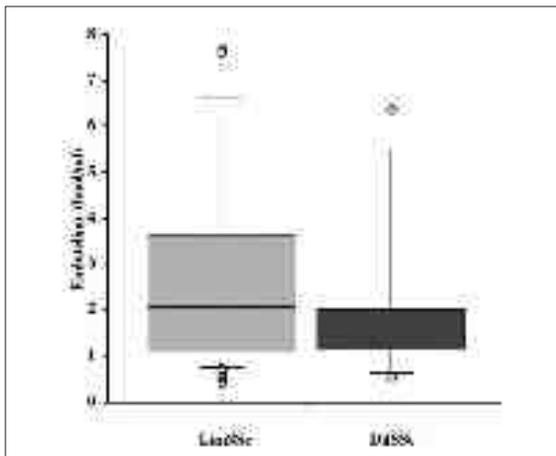


Figura 5 - Livelli plasmatici di endotelina nei pazienti con sclerosi sistemica limitata (limSSc) e sclerosi sistemica diffusa (difSSc) ($p=n.s.$).

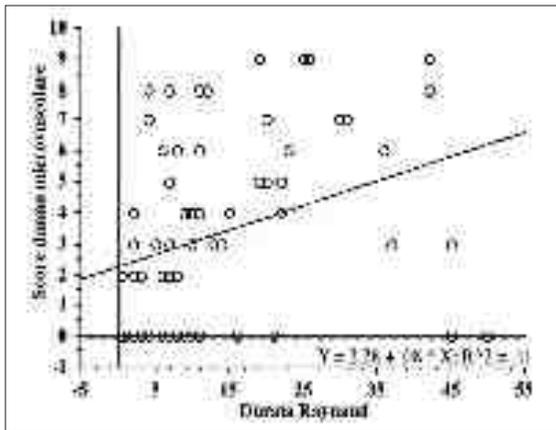


Figura 6 - Correlazione tra l'entità del danno microvascolare, valutato mediante videocapillaroscopia periungueale, nei pazienti sclerodermici e la durata della malattia, calcolata dall'insorgenza del fenomeno di Raynaud ($p=0,0003$).

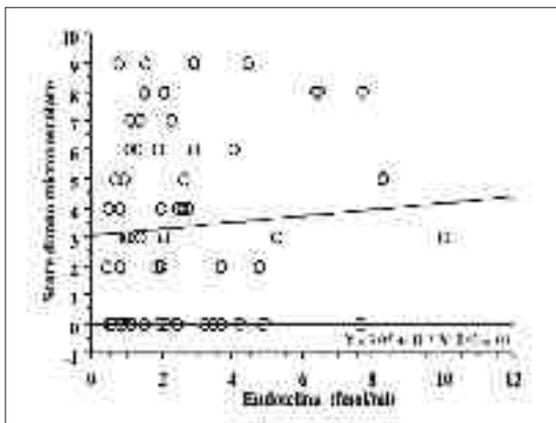


Figura 7 - Correlazione tra l'entità del danno microvascolare, valutato mediante videocapillaroscopia periungueale ed i livelli plasmatici di endotelina nei pazienti sclerodermici ($p=n.s.$).

L'entità del danno microvascolare nei pazienti sclerodermici, valutato mediante VCP, correlava in maniera statisticamente significativa con la durata della malattia, calcolata dall'insorgenza del fenomeno di Raynaud ($p=0,0003$) (Fig. 6). Tuttavia, nessuna correlazione statisticamente significativa è stata osservata tra morfologia del danno microvascolare e livelli di ET-1 in tutti i gruppi di soggetti (Fig. 7).

DISCUSSIONE

I risultati del nostro studio dimostrano che sia i pazienti con FRP sia i pazienti con FRS presentano concentrazioni plasmatiche di ET-1 più elevate rispetto ai soggetti di controllo. Questi dati concordano comunque con quelli di precedenti studi che hanno documentato un'aumentata produzione di ET-1 in corso di SSc (9, 11), la quale potrebbe contribuire alle alterazioni vascolari associate a questa patologia (12). Concentrazioni plasmatiche di ET-1 osservate nei pazienti con SSc sono risultate tre volte più elevate rispetto a quelle osservate nei soggetti di controllo (12). Nel nostro studio, sebbene con i limiti di una ridotta casistica, i livelli di ET-1 nei pazienti con SSc risultavano circa una volta più elevati rispetto ai controlli, mentre non sono emerse differenze significative dei livelli di ET-1 tra soggetti con FRP e pazienti con FRS, a dimostrazione del fatto che i livelli di ET-1 potrebbero essere senz'altro implicati nella patogenesi del vasospasmo del FR indipendentemente dalla sua associazione con una connettivite; inoltre, nemmeno l'età dei pazienti sembra essere un fattore che correla in maniera statisticamente significativa con i livelli di ET-1. Nel nostro studio, i pazienti sclerodermici sono stati suddivisi, in base al reperto videocapillaroscopico, in 3 pattern microangiopatici ("Early", "Active", "Late") i quali correlano positivamente con la durata del FR e della SSc e sembrano, quindi, riflettere l'evoluzione del danno microvascolare a livello periferico (3).

Con i limiti di una casistica limitata, dai nostri dati, non emerge una significativa differenza dei livelli di ET-1 tra i diversi pattern VCP, pur essendo più elevata la concentrazione di ET-1 nei pazienti con pattern di tipo avanzato ("Late"). Le alterazioni morfologiche caratteristiche dei pazienti sclerodermici con "Late" VCP pattern potrebbero associarsi ad una maggiore produzione di ET-1 da parte delle cellule endoteliali stesse, che si realizza nella maggiore suscettibilità di questi pazienti a

presentare lesioni ischemiche nei distretti periferici, in considerazione della potente attività vasocostrittrice, e non solo, esercitata dall'ET-1. Uno studio precedente ha dimostrato livelli di ET-1 più elevati nei soggetti con difSSc (9); questo risultato non è stato confermato dal nostro studio ma ciò potrebbe essere attribuito al piccolo numero di soggetti studiati che non consente una valutazione statistica di questo tipo. D'altra parte, una completa definizione dei meccanismi responsabili degli aumentati livelli plasmatici di ET-1 nella SSc non è ancora disponibile; la causa più probabile sembra essere legata al danno a carico delle cellule endoteliali che induce fibrosi attraverso un aumento della sintesi di collagene a livello dei fibroblasti (13). Infatti, recentemente, sono stati dimostrati livelli di ET-1 significativamente più elevati in colture di fibroblasti sclerodermici rispetto a quelli osservati nei fibroblasti normali, a supporto del ruolo che l'ET-1 svolgerebbe nell'insorgenza della fibrosi in corso di SSc (14). L'ET-1 verrebbe rilasciata dalle cellule endoteliali principalmente nel compartimento baso-laterale della cellula: in realtà, nelle cellule endoteliali in coltura, soltanto il 20% viene rilasciato nel versante laterale (15). Questa osservazione sembra suggerire che i livelli circolanti di ET-1 potrebbero non riflettere la reale concentrazione presente a livello della parete vasale e, quindi, l'ET-1 dovrebbe essere considerata un fattore di regolazione paracrino, piuttosto che un ormone circolante (15). In pazienti con insufficienza cardiaca congestizia, è stato osservato che gli elevati livelli di ET-1 correlano in maniera specifica con la gravità dell'ipertensione polmonare (16). Questi dati sembrano indicare che l'ET-1 può contribuire all'incremento del tono vascolare ed alla prolife-

razione delle cellule muscolari lisce a livello del circolo polmonare. Infine, recentemente, è stato dimostrato che, nei pazienti con SSc, l'ET-1 è coinvolta nella risposta ischemica anche a livello miocardico: l'esposizione al freddo sembra, infatti, indurre un vasospasmo intermittente che provoca un difetto di perfusione miocardica (17). D'altra parte, la valutazione delle concentrazioni plasmatiche di ET-1, prima e dopo esposizione al freddo (immersione della mano e dell'avambraccio in acqua ghiacciata), in soggetti con FRP e FRS, ha prodotto risultati interessanti (18). Secondo questo studio, infatti, nel primo gruppo di soggetti i livelli plasmatici di ET-1 tendevano ad aumentare dopo esposizione al freddo, mentre nei pazienti con FRS non sono stati osservati aumenti significativi. In quest'ultimo gruppo di soggetti, evidentemente, il fenomeno vasospastico presenta una minore importanza mentre è molto più rilevante il danno organico che si esprime nella microangiopatia, indipendentemente dagli stimoli esogeni (18).

Quindi, alla luce dei risultati fin qui prodotti, si può affermare che l'ET-1 è sicuramente coinvolta nella patogenesi vascolare del FR. Tuttavia, la maggiore produzione di ET-1 che sembra verificarsi nelle fasi avanzate della microangiopatia sclerodermica (pattern "Late" della VCP) è un dato, qui descritto per la prima volta, che consentirebbe di attribuire all'endotelina un ruolo patogenetico anche sulla fase fibrotica della malattia. Infatti, lo stadio "Late" della microangiopatia sclerodermica, caratterizzato da una importante desertificazione capillare, si associa alla presenza di un'intensa fibrosi tissutale (11, 14, 19). In conclusione, si può pertanto affermare che ET-1 sembra comportarsi come la "citochina pluripotente" della SSc.

RIASSUNTO

Obiettivi: Scopo di questo studio è stato quello di valutare i livelli plasmatici di ET-1 in pazienti con fenomeno di Raynaud (FR) primitivo (FRP) ed in pazienti affetti da sclerosi sistemica (SSc) con FR secondario (FRS), in relazione con i differenti pattern microangiopatici ("Early", "Active" e "Late"), documentati mediante videocapillaroscopia periungueale (VCP).

Risultati: I livelli plasmatici di ET-1 sono risultati significativamente più elevati nei pazienti affetti da FRP ($3,3 \pm 2,8$ fmol/ml) e nei pazienti sclerodermici ($2,7 \pm 2,2$ fmol/ml), rispetto ai soggetti di controllo ($2,0 \pm 2,2$ fmol/ml) ($p=0,05$). In particolare, i livelli di ET-1 risultavano più elevati nei pazienti con pattern capillaroscopico di tipo "Late".

Conclusioni: Questo studio evidenzia aumentati livelli plasmatici di ET-1 in pazienti con FR primitivo e FR secondario. I pazienti con "Late" VCP pattern presentano concentrazioni plasmatiche di ET-1 significativamente più elevate rispetto ai controlli, probabilmente da attribuire al maggiore coinvolgimento vascolare e fibrotico caratteristico delle fasi avanzate della malattia sclerodermica.

Parole chiave - Endotelina-1, sclerosi sistemica, fenomeno di Raynaud, videocapillaroscopia periungueale.

Key words - Endothelin-1, systemic sclerosis, Raynaud's phenomenon, nailfold videocapillaroscopy.

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. Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Accardo S. Nailfold videocapillaroscopy assessment of microvascular damage in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2000; 27: 155-60.
3. Cutolo M, Pizzorni C, Tuccio M, Burrioni A, Craviotto C, Basso M, et al. Nailfold videocapillaroscopic patterns and serum autoantibodies in systemic sclerosis. *Rheumatology* 2004; 43: 719-26.
4. Cutolo M, Grassi W, Matucci-Cerinic M. Raynaud's phenomenon and the role of capillaroscopy. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 3023-30.
5. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332: 411-15.
6. Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins. Molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology and pathophysiology. *Pharmacol Rev* 1994; 46: 325-415.
7. Ferri C, Bellini C, Deangelis C, De Sisti L, Perrone A, Properzi G, et al. Circulating endothelin-1 concentrations in patients with chronic hypoxia. *J Clin Pathol* 1995; 48: 519-24.
8. Sulli A, Montagna P, Capellino S, Pizzorni C, Secchi ME, Villaggio B, et al. Endothelin plasma levels in systemic sclerosis and in primary Raynaud's phenomenon. *Arthritis Rheum* 2005; 9: S169 (371).
9. Yamane K, Miyauchi T, Suzuki N, Yuhara T, Akama T, Suzuki H, et al. Significance of plasma endothelin-1 levels in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1992; 19: 1566-71.
10. 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.
11. Kahaleh MB. Endothelin, an endothelial-dependent vasoconstrictor in scleroderma. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 978-83.
12. Morelli S, Ferri C, Poletti E, Bellini C, Gualdi GF, Pittoni V, et al. Plasma endothelin-1 levels, pulmonary hypertension and lung fibrosis in patients with systemic sclerosis. *Am J Med* 1995; 99: 255-60.
13. Vancheeswaran R, Magoulas T, Efrat G, Wheeler-Jones C, Olsen I, Penny R, et al. Circulating endothelin-1 levels in systemic sclerosis subsets – a marker of fibrosis or vascular dysfunction? *J Rheumatol* 1994; 21: 1838-44.
14. Kawaguchi Y, Suzuki H, Hara M, Hidaka T, Ishizuka T, Kawagoe M, et al. Increased endothelin-1 production in fibroblasts derived from patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 1994; 53: 506-10.
15. Yoshimoto S, Ishizaki Y, Mori A, Sasaki T, Takakura K, Murota S. The role of cerebral microvessel endothelium in regulation of cerebral blood flow through production of endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17: S260-3.
16. Cody RJ, Haas GJ, Binkley PF, Capers Q, Kelley R. Plasma endothelin correlates with the extent of pulmonary hypertension in patients with chronic congestive heart failure. *Circulation* 1992; 85: 504-9.
17. Gustafsson R, Mannting F, Kazzam E, Waldenstrom A, Hallgren R. Cold-induced reversible myocardial ischaemia in systemic sclerosis. *Lancet* 1989; ii: 475-9.
18. Dorffler-Melly J, Luscher TF, Wenk M, Wen S, Bollinger A. Endothelin-1 and cold provocation in health, primary Raynaud's phenomenon and progressive systemic sclerosis. *Microvascular Research* 1996; 52: 193-7.
19. Cutolo M, Pizzorni C, Sulli A. Capillaroscopy. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2005; 19: 437-52.