

Protocollo di studio

Valutazione dei livelli circolanti di “markers” di attivazione endoteliale in pazienti con Sclerosi Sistemica con e senza ulcere cutanee prima e dopo trattamento con prostanoide o prostanoide più inibitori dell’endotelina

Dott.ssa Martina Burlando

Premessa

La Sclerodermia Sistemica (SSc) è una patologia cronica ad eziologia sconosciuta caratterizzata da sclerosi della cute e di altri organi od apparati e alterazioni vascolari anch’esse cutanee e/o sistemiche. La patologia può presentarsi con diversi gradi di gravità ed evoluzione. La sclerosi cutanea può presentare una estensione variabile, da forme che coinvolgono solamente le aree acrali, in particolare mani e volto, a forme molto diffuse con coinvolgimento anche di tutto l’ambito cutaneo. Il coinvolgimento sistemico può interessare soltanto l’esofago oppure può essere rapidamente progressivo ed interessare polmone, rene e cuore fino ad essere fatale. La manifestazione iniziale è il fenomeno di Raynaud , seguito dall’edema e dalla sclerosi della cute delle dita. Il vasospasmo delle arteriole e delle arterie digitali , associato all’edema e/o alla sclerosi può portare alla formazione di ulcere trofiche sui polpastrelli delle dita. Ulcere in questa sede si possono riscontrare in circa il 30% dei pazienti con SSc. Le ulcere sono generalmente molto dolorose tanto da richiedere anche l’uso di potenti analgesici, sono molto difficili da guarire e possono complicarsi con infezione secondaria (3-8% dei casi). Nei casi più gravi (0.5-1.5% per anno) si possono presentare anche lesioni necrotiche o gangrena che impone l’amputazione. Le ulcere rappresentano quindi una notevole fonte di disabilità per il paziente sclerodermico, possono avere una influenza negativa sul lavoro e su attività quotidiane anche molto elementari quali l’atto di vestirsi o di lavarsi determinando una notevole riduzione della qualità della vita.

I farmaci che possono essere utilizzati per il trattamento delle ulcere sono i calcio-antagonisti, che tuttavia non sono particolarmente efficaci, i prostanoide, quali l’Iloprost che riduce la frequenza e gli attacchi di vasospasmo ma con scarso effetto sulla cicatrizzazione delle ulcere e sul rischio di gangrena, ed il Bosentan, antagonista dei recettori dell’endotelina che in vari studi ha

dimostrato un'una buona azione nel prevenire la comparsa di nuove ulcere digitali nei pazienti con SSc (1, 2). I prostanoidi e il bosentan possono essere associati nel trattamento dei pazienti con SSc.

Recenti dati della letteratura indicano che nei pazienti con SSc il riscontro di elevati livelli di "markers" di attivazione e danno endoteliale si associa con la presenza di ulcere e fibrosi cutanea (3-5). Per quanto a nostra conoscenza, non sono stati ancora effettuati studi volti alla determinazione di tali parametri in corso di terapia e alle potenziali correlazioni fra loro eventuali modificazioni ed efficacia del trattamento.

Scopo dello studio

Sulla base di quanto esposto nelle premesse, viene pertanto proposto un protocollo di studio volto alla valutazione dei livelli circolanti di "markers" di attivazione endoteliale in pazienti sclerodermici, con e senza ulcere cutanee, prima e durante trattamento con prostanoidi o prostanoidi più inibitori dell'endotelina o inibitori dell' endotelina da soli o con calcio antagonisti.

Descrizione dello studio:

Lo studio è suddiviso in 2 fasi: la prima di arruolamento, doveva essere di 3 mesi, ma successivamente, per motivi di numero, è stata prolungata a 6 mesi; la seconda fase di follow up, prevede controlli a 3-6 e 12 mesi.

Nella prima fase, iniziata a giugno 2012, sono stati arruolati 100 pazienti affetti da SSc presso gli Ambulatori e Day Hospital delle U.O. Clinica Dermatologica e Clinica di Medicina Interna ad Orientamento Immunologico.

Per ciascuno è stata fatta un' anamnesi mirata a documentare la durata del Fenomeno di Raynaud e l'evoluzione verso la sclerosi cutanea; valutazione della estensione della patologia e misurazione del Rodnan skin score; valutazione del possibile interessamento sistemico (gastroenterico polmonare, cardiaco, ecc.); valutazione del profilo anticorpale attraverso la titolazione degli anticorpi anti-centromero, anti-Scl 70/topoisomerasi I e anti-nucleolo o altre specificità più rare; videocapillaroscopia digitale.

I pazienti sono stati classificati nei due subset di malattia: SSc limitata e SSc diffusa secondo i criteri proposti da LeRoy.

Per ciascuno è stata fatta un' anamnesi farmacologica, sono state valutate le eventuali ulcere cutanee (numero, dimensione, fondo, bordo, profondità) anche con la raccolta di materiale fotografico e valutato il grado di dolore ad esse riferito, secondo la scala VAS.

E' stato inoltre, somministrato un questionario sulla qualità della vita (DLQI).

I pazienti sono stati suddivisi in 3 gruppi : a) pazienti con ulcere cutanee in trattamento con prostanoïdi; b) pazienti con ulcere cutanee in trattamento con prostanoïdi in associazione a bosentan; c) pazienti senza ulcere cutanee non in trattamento con prostanoïdi e/o bosentan; d) pazienti in trattamento con solo bosentan; e) pazienti in trattamento con calcio-antagonisti.

A ciascuno è stato eseguito a tempo 0, prelievo ematico per la determinazione basale dei livelli circolanti di "markers" di attivazione endoteliale.

Nella seconda fase, tutt'ora in corso, i pazienti vengono rivalutati a mesi 3, 6 e 12 utilizzando gli stessi parametri clinici della visita basale e vengono eseguiti prelievi ematici agli stessi tempi, per la determinazione dei livelli circolanti di "markers" di attivazione endoteliale.

Indagini di laboratorio

Dai prelievi ematici effettuati a ciascun tempo sono stati ottenuti campioni di siero e plasma che sono stati aliquotati e conservati congelati a -30°C fino al momento dell'uso. Scopo dello studio è stato quello di determinare i livelli circolanti dei "markers" di attivazione endoteliale quali: endotelina-1, "vascular endothelial growth factor" (VEGF), "placental growth factor" (PIGF), "vascular cell adhesion molecule" (VCAM) solubile.

Quanto sopra è possibile realizzare grazie ad una metodica immunoenzimatica (ELISA) sui campioni di siero e/o plasma dei pazienti. Poichè questo materiale è molto costoso, abbiamo aspettato di raccogliere un numero significativo di sieri, prima di usarlo, questo spiega come mai il tempo di arruolamento si sia allungato, così come la raccolta dei risultati laboratoristici.

Conclusioni preliminari

Da giugno 2012 a marzo 2013 sono state arruolate negli Ambulatori e Day Hospital delle U.O. Clinica Dermatologica e Clinica di Medicina Interna ad Orientamento Immunologico, 100 pazienti donne, di età compresa tra i 18 ed i 73 anni.

Per ciascuna è stata fatta un' anamnesi mirata, è stata valutata l' eventuale presenza di ulcere, valutato il dolore secondo la scala VAS, valutata la qualità della vita con il questionario DLQI, raccolta l' anamnesi farmacologica. Inoltre è stato fatto un prelievo di sangue a tempo 0, dopo 3,6 e 12 mesi per valutare il livello dei markers di attivazione endoteliale.

Ad oggi abbiamo processato solo i sieri di 18 pazienti a 0 e 3 mesi, data la necessità di standardizzazione della metodica e la necessità di testare i sieri in doppio, almeno nella prima fase del lavoro.

Le 18 pazienti, tutte donne, presentano un' età media di 68 anni: 14 sono affette da una cutanea di sclerodermia (LcSSc) , di queste, 3 hanno anche un'ipertensione polmonare arteriosa; 2 presentano una forma diffusa (DfSSc), di cui 1 con ipertensione polmonare arteriosa; 1 sindrome CREST (calcinosi, fenomeno di Raynaud, dismotilità esofagea, sclerodattilia e teleangectasie); 1 sindrome Overlap (SSc+ AR).

13 pazienti su 18 sono in trattamento solo con Calcio antagonisti, 7su 18 presentano ulcere digitali e solo 2 di queste sono in terapia con Bosentan (62,5 mg 2 vv/die per un mese , seguito da una dose di 125 mg 2vv /die come mantenimento), gli altri 5 solo in terapia con calcio-antagonisti.

In tutte le pazienti, i livelli di endotelina-1 (ET-1) sono più alti che il normale (n.v. <1a 3 pg/ml), con valori compresi tra 3,2 e 24pg/ml .Il valore più elevato di ET-1 (24 pg/ml) è stato trovato nel siero di una paziente che presentava una grave compromissione non solo cutanea ma anche sistemica. Al contrario i livelli di ET-1 vicini alla normalità (3,2 pg/ml) si sono ritrovati in una paziente affetta da una forma lieve di sclerodermia. Come già si evince dalla letteratura, non c'è alcuna correlazione tra i livelli di ET-1 e l'età di insorgenza della malattia nè con i livelli circolanti di anticorpi anti- nucleo (ANA).

Anticorpi anti nucleo-estabili (ENA) sono stati trovati in 6 su 18 pazienti, che presentavano anche valori di ET-1, lievemente più alti rispetto ai pazienti ENA-negativi.

Curiosamente il paziente 4 (vedi tabella) presentava a tempo 0 , positività per gli ENA e livelli leggermente più alti di ET-1, quest'ultimo valore dopo 3 mesi si è normalizzato insieme alla negativizzazione degli ENA.

Per quanto riguarda i pazienti trattati con Bosentan, si è osservato una riduzione dei livelli di ET-1 (da 8.1 a 6.9 pg/ml) per quei pazienti in cura da lungo tempo, (oltre i 9 mesi), mentre una breve terapia con Bosentan (meno di 3 mesi), non induce nè una diminuzione dei livelli circolanti di ET-1, nè un miglioramento clinico significativo delle ulcere digitali.

A tutte le pazienti che presentavano ulcere cutanee è stata fatta una capillaroscopia che evidenziava una perdita severa di capillari, con vaste aree prive di vasi, megacapillari e neoangiogenesi, nelle forme più gravi.

Facendo una dettagliata anamnesi alle pazienti, abbiamo osservato che nelle pazienti affette da LfSSc la comparsa di ulcere digitali è di circa 10 anni dall' insorgenza della malattia mentre nelle forme DfSSc la latenza media è di circa 5 anni.

Le pazienti trattate con Bosentan (n.1; n.5) hanno avuto nel giro di 3 mesi, una riduzione delle ulcere e conseguentemente del dolore ad esso associate, correlate a una riduzione dei livelli di ET-1. Inoltre nessuna di loro ad oggi, ha sviluppato nuove ulcere, come già riportato in letteratura.

Abbiamo al contrario osservato come le pazienti trattate solo con calcio- antagonisti (n.3;n.8; n. 10; n.12; n.13) vanno in remissione clinica dopo più tempo e sono a rischio di sviluppare infezioni (Pseudomonas Aaeruginosa, Stafilococco Aureo)

Abbiamo visto come i pazienti con SSC presentano più alti livelli di Et-1 rispetto ai valori normali, valori più alti del normali sia in quelli con ulcere che senza, pertanto si può dire non correlino con la comparsa di ulcere digitali.

I nostri dati preliminari hanno comunque dimostrato come il Bosentan migliori le ulcere cutanee.

Queste sono considerazioni preliminari che dovranno essere confrontate con i dati che ci aspettiamo di ottenere presto dall' analisi dei sieri rimanenti.

Table 1. correlazione tra (DfSSc, LcSSc, CREST, Overlap syndrome), presenza di ulcere, livelli sierici di ANA, ENA ed ET-1 e diverse terapie (CA, Bosentan). Abbreviazioni: DfSSc: sclerodermia diffusa; LcSSc: sclerodermia cutanea; PAH:ipertensione polmonare arteriosa; DUs:ulcere digitali; ANA:anticorpi anti-nucleo; ENA:anticorpi antigene estaribile; ET: endotelina;

Pazienti	DUs	terapia	ANA(IgG) 1° Siero	ENA		ET-1 concentrazione (pg/ml)	
				1°Siero	2° Siero	1°Siero	2° Siero
1. DfSSc, PAH	si	Bosentan	1/1280	Pos	Pos	8,1	6,9
2. DfSSc	no	CA	1/1280	Pos	Pos	7,3	3,7
3. LcSSc, PAH	si	CA	1/80	Neg	Neg	4,6	4,6
4. LcSSc, PAH	no	Bosentan	1/1280	Pos	Neg	5,7	4,6
5. LcSSc, PAH	si	Bosentan	1/640	Neg	Neg	4,8	3,7
6. LcSSc	no	CA	1/320	Pos	Pos	4,6	4,4
7. LcSSc	no	Bosentan	1/1280	Neg	Neg	3,8	3,5
8. LcSSc	si	CA	1/280	Pos	Pos	24	4,1
9. LcSSc	no	Bosentan	1/280	Neg	Neg	6,0	4,9
10. LcSSc	si	CA	1/640	Neg	Neg	4,35	4,6
11. LcSSc	no	CA	1/1280	Pos	Pos	5,0	4,6
12. LcSSc	si	CA	1/640	Neg	Neg	4,2	4,2
13. LcSSc	si	CA	1/640	Neg	Neg	4,0	3,6
14. LcSSc	no	CA	1/120	Neg	Neg	4,0	3,7
15. LcSSc	no	CA	1/1280	Neg	Neg	4,3	3,75
16. LcSSc	no	CA	1/1280	Pos	Pos	3,3	4,5
17. CREST	no	CA	1/1280	Neg	Neg	4,3	3,2
18. Overlap syndrome	no	CA	1/320	Pos	Pos	6,4	7,2

Bibliografia

- 1- Korn JH et al. Digital ulcers in systemic sclerosis: prevention by treatment with bosentan, an oral endothelin receptor antagonist. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3985-93
- 2- Matucci-Cerinic M et al. Bosentan treatment of digital ulcers related to systemic sclerosis: results from the RAPIDS-2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis* 2011; 70: 32-8
- 3- Distler O et al. Angiogenic and angiostatic factors in systemic sclerosis: increased levels of vascular endothelial growth factor are a feature of the earliest disease stages and are associated with the absence of fingertip ulcers. *Arthritis Res* 2002; 4: R11
- 4- Himaguchi Y et al. Elevated serum placenta growth factor (PlGF) levels in patients with systemic sclerosis: a possible role in the development of skin but not lung fibrosis. *J Dermatol Sci* 2010; 58:229-31
- 5- Avouac J et al. Angiogenic biomarkers predict the occurrence of digital ulcers in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2012; 71: 394-9