



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA
IN SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E SPERIMENTALI
INDIRIZZO SCIENZE REUMATOLOGICHE
XXI CICLO

**FISIOPATOLOGIA ED APPROCCIO TERAPEUTICO
ALL'IPERTENSIONE POLMONARE SECONDARIA
ALLE CONNETTIVITI SISTEMICHE**

**STUDIO DEL MICROCIRCOLO CORONARICO
NELLA SCLEROSI SISTEMICA**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Antonio Tiengo

Direttore dell'Indirizzo: Ch.mo Prof. Leonardo Punzi

Supervisor: Ch.mo Prof. Franco Cozzi

Ch.mo Prof. Francesco Tona

Dottoranda: Dr.ssa Helga Marotta

RIASSUNTO

Il lavoro svolto nei tre anni di dottorato si è articolato in due argomenti: follow-up di pazienti affetti da ipertensione arteriosa polmonare secondaria alle connettiviti e studio del microcircolo coronarico in pazienti affetti da sclerodermia associata o meno a ipertensione arteriosa polmonare (PAH).

Fisiopatologia ed approccio terapeutico all'ipertensione polmonare secondaria alle connettiviti sistemiche

L'ipertensione arteriosa polmonare è una temibile complicanza delle connettiviti sistemiche, in particolare della sclerodermia. La Cattedra e UOC di Reumatologia è un Centro regionale per la diagnosi ed il trattamento della PAH. Dal 2003 ad oggi, abbiamo reclutato 43 pazienti, di cui attualmente vengono seguiti 25 in follow-up. La diagnosi di PAH è stata posta con ecocardiografia transtoracica per valori di PSVD > 45 mmHg. Dapprima a cadenza trimestrale e successivamente semestrale, i pazienti venivano sottoposti alla valutazione ecocardiografica e al 6m-WT per verificare l'efficacia della terapia o cogliere precocemente un eventuale peggioramento della malattia polmonare.

Il nostro studio riporta i risultati di un follow-up a breve e a lungo termine; nei primi 13 pazienti trattati per un anno con bosentan, vi è stata una riduzione della PSVD statisticamente significativa dopo 3, 6 e 12 mesi. La distanza percorsa al 6m-WT è aumentata in media di 14 metri dopo 3 mesi, 27 metri dopo 6 mesi e 30 metri dopo 12 mesi. In 8 soggetti vi è stato anche il miglioramento della classe funzionale WHO.

Dopo due anni di terapia, nei 12 pazienti il bosentan ha mantenuto ridotti rispetto al baseline i valori di PSVD, assestandoli su quelli registrati a 12 mesi. La tolleranza allo sforzo fisico invece è diminuita in modo significativo. Si sono manifestate

alcune complicanze delle connettiviti a carico degli arti inferiori (in tre casi trombosi venosa, tendinite, artrite) e peggioramento della concomitante fibrosi polmonare in un caso, che hanno inciso notevolmente sulla riduzione della distanza percorsa in 6 minuti (in media di 108 metri); peraltro, anche negli altri 8 pazienti la capacità funzionale si è ridotta e la distanza percorsa è diminuita in media di 79 metri. Questi dati suggeriscono che il 6m-WT non rappresenta un adeguato test di valutazione della capacità di esercizio nei pazienti affetti da PAH secondaria alle connettiviti sistemiche, in accordo con i dati della letteratura.

Negli anni successivi, nei 9 pazienti in follow-up più lungo, la PSVD tendeva a risalire, seppur in modo non statisticamente significativo; in particolare, al quinto anno è rimasta ridotta in 3 pazienti, sovrapponibile al baseline in 2 ed aumentata in 4. Dopo cinque anni di trattamento, 5 pazienti erano ancora in grado di eseguire il 6m-WT, ma la distanza media percorsa al 6m-WT si è ridotta di 122 metri rispetto al baseline ($p < 0,001$). Gli altri 4 pazienti non erano in grado di eseguire il test per il peggioramento della concomitante fibrosi polmonare in due di essi e per il deterioramento della PAH con dispnea ingravescente e scompenso cardiaco negli altri due.

Questi dati mostrano che la risposta al bosentan è buona nel primo anno di terapia, si assesta su valori stabilizzati nel secondo, per poi mediamente ridursi negli anni successivi; ciò suggerisce l'opportunità di potenziarne l'effetto associandovi un secondo farmaco, che agisca con un meccanismo d'azione diverso sulla PAH, in modo da intervenire su più targets etiopatogenetici; infatti, i trattamenti di combinazione sembrano costituire il gold standard nella terapia di questa temibile complicanza delle connettiviti sistemiche.

Studio del microcircolo coronarico nella sclerosi sistemica

La sclerodermia è una malattia del tessuto connettivo caratterizzata da lesioni prima funzionali e poi organiche del microcircolo; l'interessamento cardiaco è segnalato dal 50 all'80% dei pazienti, ma spesso senza segni e sintomi evidenti; in particolare, le arterie coronarie epicardiche sono angiograficamente indenni, mentre vi è una riduzione del flusso coronarico. Abbiamo perciò studiato la microangiopatia coronarica in 37 pazienti consecutivi affetti da sclerodermia grazie alla valutazione della riserva coronarica (CFR): tale metodo non invasivo si avvale di un ecocardiogramma transtoracico, durante infusione di adenosina, e può individuare precocemente un'alterazione del circolo coronarico in pazienti asintomatici. Anche nel nostro studio la CFR è risultata ridotta rispetto ai valori normali ($\geq 2,5$) nel 60% dei pazienti ($2,4 \pm 0,8$ vs $3,3 \pm 0,4$).

Abbiamo correlato i valori della CFR con la forma clinica della connettivite, il pattern anticorpale, la durata della malattia, la concomitante presenza della PAH e in questo gruppo di pazienti, la terapia con bosentan. Nessun paziente presentava sintomi da riferirsi ad interessamento cardiaco.

La CFR è risultata maggiormente ridotta nei pazienti con la forma limitata di malattia ed ACA positivi, sebbene non statisticamente significativa; non vi è correlazione con la durata della connettivite. I valori medi di CFR nei pazienti sclerodermici con e senza PAH sono sostanzialmente sovrapponibili.

Considerando i nostri dati e quelli della letteratura, riteniamo che non vi sia correlazione tra CFR e PAH, bensì che i pazienti sclerodermici affetti dalla forma diffusa di malattia vadano maggiormente incontro alla microangiopatia del circolo coronarico e quelli affetti dalla forma limitata all'interessamento vascolare polmonare.

In altri termini la correlazione è tra forma diffusa ed endotelio coronarico da una parte e forma limitata ed endotelio polmonare dall'altro.

ABSTRACT

The study during my Ph.D concerned two topics: follow-up of patients with pulmonary arterial hypertension related to connective tissue diseases and study of coronary microangiopathy in patients with systemic sclerosis, complicated or not by pulmonary arterial hypertension (PAH).

Physiopathology and therapy of pulmonary arterial hypertension related to connective tissue diseases

Pulmonary arterial hypertension is a severe complication of the connective tissue diseases, in particular systemic sclerosis. The Cattedra and UOC of Rheumatology is a regional Centre for the diagnosis and treatment of PAH. Since 2003, we have recruited 43 patients, 25 being still in follow-up nowadays. The diagnosis of PAH was performed by Doppler ultrasound examination (PSVD > 45 mmHg). Exercise capacity by 6m-WT and Doppler ultrasound were performed initially every 3 months and later every 6 months to verify the efficacy of the treatment or to highlight worsening of the vascular disease.

Our study presents the results of short and long-term follow-up; in the 13 patients treated with bosentan for one year, there was a statistically significant reduction of PSVD after 3, 6, and 12 months. The walking distance at 6m-WT was improved with a mean increase of 14 meters after 3 months, 27 meters after 6 months and 30 meters after 12 months. 8 patients improved also the WHO functional class.

In the 12 patients treated with bosentan for 2 years, the final mean values of PSVD were maintained at the levels registered after 12 months of therapy. The exercise capacity was instead statistically significantly reduced; in three cases there were complications of connective tissue diseases of the legs (venous thrombosis, tendonitis or arthritis) and in one case worsening of pulmonary fibrosis, which

caused a reduction of the walking distance (mean value of 108 meters); moreover, the exercise capacity was reduced by a mean value of 79 meters even in the other 8 patients. These data suggest that the 6m-WT is not an adequate test to evaluate the exercise capacity in patients with PAH related to connective tissue diseases, according to literature.

In the following years, in the long-term follow-up of 9 patients, the PSVD tended to go up again, even if in not statistically significant amount: in particular, after 5 years, the PSVD was reduced in 3 patients, similar to the baseline in 2 and increased in 4. 5 patients were still able to perform the 6m-WT, but the mean walking distance was reduced of 122 meters compared to the baseline ($p<0,001$). The other 4 patients were unable to perform the test due to deterioration of PAH with dyspnoea in 2 cases and to heart failure in the other 2 cases.

These data demonstrate that the bosentan is a good therapy during the first year of treatment, maintains the stabilized values of PSVD during the second year, but loses efficacy in the following years; this suggests to improve its effect with a second drug having a different mechanism of action on PAH, to intervene on different etiopathological targets. In fact, the combination therapy appears to be the gold standard for PAH treatment.

Study of coronary microcirculation in systemic sclerosis

Systemic sclerosis is a connective tissue disease characterized by lesions of microcirculation, firstly functional and later organic. Heart is affected in 50-80% of patients, but frequently without signs and symptoms. In particular, the epicardial coronary arteries are angiographically normal, but the coronary flow is reduced. We investigated the coronary microangiopathy in 37 consecutive patients with systemic sclerosis by the non-invasive determination of coronary flow reserve (CFR); CFR is performed by transthoracic Doppler echocardiography, during infusion of adenosine, to detect early dysfunctions in cardiovascular system in asymptomatic patients. Also in our study CFR was reduced with respect to normal values ($\geq 2,5$) in 60% of the patients ($2,4 \pm 0,8$ vs $3,3 \pm 0,4$).

We correlated CFR with cutaneous involvement subsets, specific serum autoantibodies, duration of the disease, PAH related to systemic sclerosis and, in this group of patients, bosentan treatment. Nobody presented signs and symptoms of heart disease.

CFR is more reduced in the patients with limited scleroderma and positive ACA, even if in not statistically significant amount; there is no correlation with duration of the connective tissue disease. Mean values of CFR in patients with and without PAH are similar.

Our data and the literature demonstrate the absence of any correlation between CFR and PAH, instead patients with diffuse scleroderma and with limited scleroderma are easily predisposed to coronary microangiopathy and pulmonary vascular involvement, respectively.

In other words, the correlation is between diffuse scleroderma and coronary endothelium and between limited scleroderma and pulmonary endothelium.

INDICE

Introduzione	1
Fisiologia del circolo polmonare.....	4
Patogenesi dell'ipertensione arteriosa polmonare.....	5
Lesioni anatomico-patologiche.....	7
PAH idiopatica e familiare.....	8
PAH secondaria alle connettiviti.....	9
Manifestazioni cliniche dell'ipertensione arteriosa polmonare.....	11
Valutazione strumentale dell'ipertensione polmonare.....	12
Trattamento dell'ipertensione arteriosa polmonare.....	13
Terapie convenzionali.....	13
Terapie specifiche.....	13
Inibitori recettoriali dell'endotelina-1.....	14
Inibitori della 5-fosfodiesterasi.....	15
Ossido nitrico.....	16
Prostanoidi.....	16
Terapia di associazione.....	17
Scopo dello studio	19
Pazienti e metodi	21
Ipertensione arteriosa polmonare secondaria alle connettiviti.....	21
Pazienti.....	21
Studio della microangiopatia coronarica in pazienti affetti da sclerodermia.....	23
Pazienti.....	23

Metodi.....	24
Ecocardiografia transtoracica.....	24
Ecocardiografia Doppler trans toracica con infusione di adenosina.....	25
Analisi statistica.....	27
Risultati.....	29
Pazienti affetti da PAH secondaria alle connettiviti.....	29
Follow-up di pazienti affetti da PAH secondaria a connettiviti sistemiche in terapia con bosenta.....	31
Follow-up a due anni di pazienti affetti da PAH secondaria a connettiviti sistemiche in terapia con bosentan.....	35
Follow-up di pazienti affetti da PAH secondaria alle connettiviti sistemiche in terapia con bosentan.....	39
Studio della microangiopatia coronarica in pazienti affetti da sclerodermia.....	43
Discussione e conclusioni.....	63
Studio di pazienti affetti da PAH secondaria alle connettiviti.....	63
Studio della microangiopatia coronarica in pazienti affetti da sclerodermia.....	66
Bibliografia.....	69

INTRODUZIONE

L'ipertensione arteriosa polmonare (PAH) è una severa malattia caratterizzata da rimodellamento e proliferazione della parete vascolare, tale da determinare un progressivo incremento delle resistenze vascolari del piccolo circolo; i valori pressori normali in arteria polmonare sono 18-30 mmHg per la sistolica e 4-12 mmHg per la diastolica; tali valori dipendono essenzialmente dalla resistenza vascolare polmonare e dal flusso sanguigno polmonare. Nella PAH, al cateterismo cardiaco destro, la pressione media in arteria polmonare (mPAP) è > 25 mmHg a riposo e > 30 mmHg dopo esercizio fisico (1,2).

La classificazione dell'ipertensione polmonare attualmente recepita a livello internazionale è stata formulata nel corso del "Third World Symposium on PAH" tenutosi a Venezia nel 2003 e modificata da Simonneau *et al.*; è costituita da cinque categorie, sulla base di caratteristiche patologiche, fisiopatologiche e terapeutiche simili. Il gruppo I comprende l'ipertensione arteriosa polmonare idiopatica (IPAH), familiare, associata (a connettiviti, ipertensione portale, infezione da HIV, droghe e tossine, shunts congeniti sistemico-polmonari) o con interessamento venoso o capillare; il gruppo II, ipertensione polmonare con malattia del cuore sinistro; il gruppo III, ipertensione polmonare associata a malattia polmonare o ipossiemia; il gruppo IV, ipertensione polmonare secondaria a malattie tromboemboliche croniche; il gruppo V comprende malattie che non hanno trovato collocazione nei gruppi precedenti (tabella 1) (3).

Nella popolazione generale, l'incidenza della PAH è di 1-2 casi per milione per anno, con una maggiore prevalenza delle donne e con un rapporto maschi/femmine compreso tra 1,7 e 3,5; la prevalenza della malattia è di circa 13 casi per milione (4).

Tabella 1 – Classificazione dell’ipertensione polmonare

<p>Gruppo I. Ipertensione arteriosa polmonare</p> <p>Idiopatica</p> <p>Familiare</p> <p>Associata a: connettiviti sistemiche; cardiopatie congenite; ipertensione portale; infezione da HIV; droghe o sostanze tossiche (farmaci anoressizzanti, L-triptofano, metamfetamina, cocaina);</p> <p>altre malattie: distiroidismo; glicogenosi; malattia di Gaucher; teleangectasia emorragica ereditaria; emoglobinopatie; disordini mieloproliferativi; splenectomia</p> <p>Associata a interessamento venoso o capillare: malattia polmonare veno-occlusiva emangiomatosi capillare polmonare</p> <p>Ipertensione polmonare persistente dei neonati</p>
<p>Gruppo II. Ipertensione venosa polmonare</p> <p>Cardiopatìa dell’atrio o del ventricolo di sinistra</p> <p>Valvulopatia del cuore sinistro</p>
<p>Gruppo III. Ipertensione polmonare associata ad ipossiemia</p> <p>Broncopneumopatia cronica ostruttiva</p> <p>Interstiziopatia polmonare</p> <p>Sindrome delle apnee notturne</p> <p>Disordini da ipoventilazione alveolare</p> <p>Esposizione cronica alle elevate altitudini</p> <p>Malattia polmonare del neonato</p> <p>Displasia alveolo-capillare</p>
<p>Gruppo IV. Ipertensione polmonare causata da trombosi cronica, embolia o entrambe</p> <p>Tromboembolismo delle arterie polmonari prossimali</p> <p>Tromboembolismo delle arterie polmonari distali</p> <p>Embolismo polmonare (neoplasie, parassitosi, materiali estranei)</p>
<p>Gruppo V. Miscellanea</p> <p>Sarcoidosi; istiocitosi delle cellule di Langerhans polmonari; linfangiomatosi, compressione dei vasi polmonari (neoplasie, adenopatie, mediastinite fibrosante)</p>

I pazienti vengono classificati secondo la capacità di compiere gli atti quotidiani della vita e i sintomi presenti (dispnea, astenia, dolore toracico, ecc.) nella classificazione WHO (World Health Organization) modificata da quella NYHA (New York Heart Association) per lo scompenso cardiaco; rimangono le quattro classi, mentre la differenza principale tra le due risiede nell'aver introdotto la sincope nella classe funzionale IV WHO (Tab. 2) (4,5).

Tabella 2 – Classificazione funzionale World Health Organization dell'ipertensione polmonare (6)

Classe I - pazienti affetti da ipertensione polmonare senza limitazione dell'attività fisica
Classe II - pazienti affetti da ipertensione polmonare con lieve limitazione dell'attività fisica; asintomatici a riposo, l'attività fisica consueta provoca affaticamento, cardiopalmo o dispnea.
Classe III - pazienti affetti da ipertensione polmonare con marcata limitazione dell'attività fisica; asintomatici a riposo; l'attività fisica inferiore al normale causa affaticamento, dolore toracico o dispnea.
Classe IV - pazienti affetti da ipertensione polmonare incapaci di eseguire qualsiasi attività fisica senza sintomi; dispnea ed affaticamento possono essere presenti anche a riposo.

La prognosi della PAH è severa; infatti negli anni Ottanta, la sopravvivenza media era di 2,8 anni dal momento della diagnosi nei pazienti affetti da PAH idiopatica, senza trattamento terapeutico (7); studi prospettici recenti hanno mostrato come essa possa variare dal 68 al 77%, dal 40 al 56% e dal 22 al 38% rispettivamente ad un anno, a due anni a cinque anni dalla diagnosi (4,7). L'aspettanza di vita è influenzata da diversi fattori, quali la malattia a cui è correlata,

per esempio, pazienti con PAH secondaria a malattia cardiaca congenita hanno una prognosi migliore rispetto a quelli affetti da PAH idiopatica o secondaria alle connettiviti; molti studi mostrano come la prognosi sia peggiore per pazienti in classe funzionale WHO III e IV, con elevate pressioni in atrio destro, riduzione della frazione di eiezione, elevate resistenze vascolari polmonari, desaturazione arteriosa e ridotta distanza percorsa al 6-minutes walking test (1,8,9). L'identificazione di parametri predittori dell'outcome della malattia è utile nella pratica clinica per selezionare quei pazienti che necessitano di un approccio terapeutico più aggressivo (4).

Fisiologia del piccolo circolo polmonare

In condizioni fisiologiche, la pressione del piccolo circolo polmonare è inferiore ad un decimo di quella sistemica. La resistenza vascolare è generalmente misurata come il gradiente pressorio al flusso medio (ΔP espresso in mmHg), secondo la legge di Ohm modificata (4). Molti fattori contribuiscono alla regolazione del tono vasale, tra cui controllo adrenergico, ipossia, altitudine, età ed esercizio fisico. I vasi polmonari esprimono recettori α e β -adrenergici, che causano rispettivamente vasocostrizione e vasodilatazione (10). La vasocostrizione da ipossia è un importante meccanismo adattativo fisiologico; l'ipossia alveolare infatti causa vasocostrizione locale deviando il flusso sanguigno verso le zone più ventilate del polmonare. Se in acuto questa risposta è di indubbio beneficio, nell'ipossia cronica si concretizza nel persistente aumento della pressione arteriosa polmonare, sostenuto dal rimodellamento del microcircolo, quindi nell'ipertensione polmonare (11).

La pressione arteriosa polmonare e la resistenza vascolare polmonare aumentano con l'età, come parimenti accade per la pressione arteriosa sistemica: le arterie polmonari presentano fibrosi dell'intima ed ispessimento muscolare. Nell'esercizio fisico di moderata intensità, l'ampio aumento del flusso sanguigno nel piccolo circolo è normalmente seguito da un modesto incremento della pressione arteriosa polmonare; l'attività fisica provoca l'aumento della pressione in atrio sinistro in modo proporzionale all'intensità dello sforzo (12).

Patogenesi dell'ipertensione arteriosa polmonare

Le principali alterazioni fisiopatologiche nella PAH sono la vasocostrizione, la proliferazione delle cellule muscolari lisce e delle cellule endoteliali e la trombosi in situ. Ciò suggerisce la presenza di uno sbilanciamento nel normale rapporto tra fattori di vasocostrizione e vasodilatazione, fattori di inibizione della crescita e fattori mitogeni, tra determinanti antitrombotici e protrombotici; tale sbilanciamento è causato da una disfunzione endogena della cellula dell'endotelio polmonare o da una noxa patogena esterna non ancora nota (13). I meccanismi principali implicati nella patogenesi della malattia hanno come targets l'endotelina, l'ossido nitrico e la prostaciclina; altri fattori poi possono contribuire, quali la serotonina, il peptide vasoattivo intestinale, il VEGF, IGF-1, PDGF (4).

L'identificazione delle molecole che svolgono un ruolo etiologico nella PAH ha risvolti clinici importanti poiché queste divengono i bersagli del trattamento farmacologico; sulla base del gruppo della PAH e quindi della prevalenza di un meccanismo patogenetico rispetto ad un altro, è possibile operare scelte terapeutiche mirate e quindi almeno teoricamente più efficaci.

Prostaciclina e trombossano sono due metaboliti delle cellule vascolari a partire dall'acido arachidonico; la prima, ad azione vasodilatatrice, inibisce l'attivazione piastrinica e ha proprietà antiproliferative; la seconda è un potente vasocostrittore ed un agonista piastrinico. Nella PAH, vi è una maggiore produzione di trombossano; infatti nelle urine dei pazienti ammalati, vi è una riduzione del metabolita della prostaciclina (6-cheto-prostaciclina F) ed un incremento di quello del trombossano (trombossano B2). Inoltre, la prostaciclina sintasi ha una ridotta concentrazione nelle piccole e medie arterie polmonari, soprattutto nella PAH idiopatica severa, dimostrando come l'attività vasodilatatrice sia ridotta (4,14).

La sintesi dell'ossido nitrico (NO), potente vasodilatatore ed inibitore dell'attivazione piastrinica e della proliferazione delle cellule muscolari lisce vasali, è catalizzata dalla famiglia dell'NO sintasi. Bassi livelli dell'isoforma NO sintasi endoteliale sono stati osservati nel tessuto vasale polmonare dei pazienti con PAH, in particolare in quelli affetti dalla forma idiopatica. L'NO sintasi endoteliale è invece

aumentato nelle lesioni plessiformi della PAH idiopatica dove probabilmente promuove la proliferazione delle cellule endoteliali (15).

I bassi livelli di prostaciclina sintasi e NO sintasi nell'endotelio dei pazienti con PAH idiopatica correlano inversamente con l'estensione e la severità delle lesioni vascolari (16).

L'endotelina-1, peptide prodotto dalle cellule endoteliali e scoperto nel 1988, oltre ad essere un potente vasocostrittore, induce anche vasodilatazione e mitosi, promuove l'infiammazione e la proliferazione cellulare; tale azione dualistica è regolata da due recettori, ETa ed ETb, situati sulla parete delle cellule lisce muscolari vascolari e sulle cellule endoteliali rispettivamente. In condizioni fisiologiche, le principali azioni di ET-1 sono mediate dai recettori endoteliali ETb (vasodilatazione ed effetto antiproliferativo) con l'intervento del nitrossido e delle prostaciclinae, che ne regolano anche la produzione con un feedback negativo (17); in condizioni patologiche, l'up regulation dei recettori ETb fa sì che essi abbiano un effetto analogo ad ETa, causando vasocostrizione e proliferazione cellulare (4,18). Recenti dati mostrano che le cellule muscolari lisce ed endoteliali sintetizzano e rilasciano ET-1 quando sono stimulate da citochine (19). I pazienti affetti da PAH presentano livelli di ET-1 nelle cellule endoteliali delle arterie polmonari aumentati ed inversamente proporzionali alla severità delle pressioni in arteria polmonare ed alla frazione di eiezione, suggerendo come i parametri emodinamici siano influenzati direttamente dall'endotelina (4,19).

Rispetto ai soggetti sani, quelli affetti da PAH presentano livelli plasmatici arteriosi di ET-1 maggiori rispetto a quelli venosi, suggerendo una produzione aumentata a livello polmonare o una ridotta clearance (18)

La serotonina è un vasocostrittore e promuove l'ipertrofia e l'iperplasia delle cellule muscolari lisce, nonché la microtrombosi in situ (3,20). Elevati livelli plasmatici di serotonina ed un ridotto contenuto di tale mediatore nelle piastrine sono stati evidenziati nella PAH idiopatica e persistono anche dopo normalizzazione dei valori pressori del piccolo circolo dopo trapianto di polmone (3). Il difetto piastrinico nel re-uptake della serotonina si associa alla PAH: i pazienti in terapia per più di tre mesi con anoressizzanti come la dexfenfluramina, che incrementa il rilascio della serotonina e ne inibisce il re-uptake, hanno un'incidenza maggiore di PAH (21). E'

comunque probabile che i livelli di serotonina non costituiscano da soli un determinante nella patogenesi della PAH poiché gli inibitori selettivi del re-uptake (SSRI), che aumentano i livelli del peptide ma ne inibiscono il trasporto, non sono associati ad una maggiore incidenza di PAH e potrebbero invece svolgere un ruolo protettivo nelle condizioni di ipossia (22).

L'adrenomedullina è sintetizzata da varie cellule nel tessuto polmonare normale e determina incremento del flusso sanguigno nel piccolo circolo; elevati livelli di adrenomedullina si ritrovano sia nella PAH che in quella secondaria a ipossia e correlano con le pressioni in arteria polmonare e con le resistenze vascolari polmonari. Secondo dati recenti l'adrenomedullina sarebbe un marcatore di PAH piuttosto che un agente patogenetico (23).

Il peptide intestinale vasoattivo, potente vasodilatatore sistemico, riduce la pressione arteriosa polmonare e le resistenze vascolari in ratti con PAH indotta da monoclorotalina; in vivo, inibisce anche l'attivazione piastrinica e gioca un ruolo antiproliferativo delle cellule muscolari lisce vasali (3). Uno studio ha riportato livelli ridotti di peptide vasoattivo nel siero e nel tessuto polmonare dei pazienti affetti da PAH (24).

Nell'ipossia acuta e cronica, la produzione del fattore di crescita dell'endotelio vasale (VEGF, vascular endothelial growth factor) è aumentata nel tessuto polmonare. Nella PAH, la stimolazione angiogenetica indotta dal VEGF causa le lesioni plessiformi e l'espansione clonale delle cellule endoteliali (11,26).

L'ipossia acuta inibisce i canali del potassio voltaggio-dipendenti nelle cellule muscolari lisce con successiva depolarizzazione della membrana, incremento del calcio citoplasmatico e quindi vasocostrizione. L'ipossia acuta causa modifiche del tono vasale reversibili, mentre l'ipossia cronica induce il rimodellamento, la proliferazione e la migrazione delle cellule muscolari lisce (11).

Lesioni anatomico-patologiche nell'ipertensione arteriosa polmonare

Dal punto di vista istopatologico, le lesioni presenti nella PAH sono tipiche di una arteriopatia che interessa i vasi polmonari di diverso calibro. I diversi stimoli proliferativi (PDGF, TGF- β , FGF, VEGF, ecc) hanno come bersaglio le cellule

muscolari lisce, le cellule endoteliali e la matrice extracellulare. Si evidenziano perciò la muscolarizzazione delle arteriole periferiche, determinata dalla proliferazione clonale delle cellule muscolari lisce; l'ipertrofia della media delle arteriole muscolari; la proliferazione dell'intima, che può causare anche la completa occlusione dei vasi; la perdita di piccole arteriole precapillari (27,28,29,30).

Nella PAH avanzata, le lesioni plessiformi sono patognomiche e causate dalla moltiplicazione clonale apoptosi-resistente delle cellule endoteliali per cui si formano canalini aberranti nel lume suboccluso delle arteriole e nell'avventizia dei vasi (27,28). Vi è anche incremento della produzione di proteine del tessuto connettivo, come l'elastina, il collagene e la fibronectina. Lo stato protrombotico vasale è dato dall'interazione tra i fattori di crescita, le piastrine e la parete vasale e si manifesta nella trombosi in situ delle piccole arterie polmonari con la deposizione di trombina intraluminale. L'attivazione piastrinica è implicata anche nel rilascio di granuli citoplasmatici che contengono agenti mitogeni e sostanze vasocostrittrici (4,31,32).

PAH idiopatica e familiare

La diagnosi di ipertensione polmonare idiopatica (PPH), o primitiva secondo la precedente classificazione (3), viene posta quando sono state escluse le altre cause di PAH e perciò l'etiologia della malattia appare sconosciuta. Le manifestazioni cliniche, l'età di insorgenza, le lesioni anatomo-patologiche rendono la PPH un'entità clinica a sé. Dal punto di vista patogenetico, nella PPH vi è una riduzione dei mediatori della vasodilatazione ed un incremento dei fattori che regolano la vasocostrizione; infatti, nell'endotelio dei pazienti affetti, vi sono bassi livelli di prostaciclina sintasi e NO sintasi, aumentata concentrazione di ET-1 e un difetto genetico dei canali del potassio voltaggio dipendenti (33). La PPH ha una prognosi severa, ma risponde meglio alle terapie specifiche rispetto ad esempio all'ipertensione arteriosa polmonare secondaria alle connettiviti.

La PAH familiare rappresenta il 6% di tutti i casi di ipertensione polmonare; il difetto genetico, trasmesso come autosomico dominante, si ritrova nel 10-20% dei casi e presenta la caratteristica dell'anticipazione genetica, per cui nelle generazioni successive, la PH si manifesta in pazienti più giovani e con maggiore severità

(34,35). Due geni sono associati alla forma familiare, BMPR2 (bone morphogenetic protein receptor type 2) e ALK1, appartenenti alla famiglia dei recettori del TGF- β . Sono state scoperte 45 mutazioni (mutazioni puntiformi e delezioni) del gene BMPR2, che causano la disfunzione del recettore con la conseguente mancata azione antiproliferativa e apoptotica sulle cellule muscolari lisce vasali; le mutazioni genetiche di ALK1 sono più rare e interferiscono nella medesima via (35,36,37). Recentemente, Du *et al.* ha ipotizzato che tutte le forme di PAH presentano anomalie nella stessa via comune di regolazione del rimodellamento vasale: una noxa non nota causa l'aumento dell'espressione dell'angiopoietina e del suo recettore specifico TIE2 e di conseguenza il down-regulation di BMPR2 (38). Anche la via serotoninergica gioca probabilmente un ruolo chiave nell'etiologia della PH familiare (20).

PAH secondaria alle connettiviti

L'ipertensione arteriosa polmonare può essere una complicanza di tutte le connettiviti; più frequentemente è secondaria alla sclerosi sistemica, specialmente nella forma cutanea limitata. La PAH può complicare anche il lupus eritematoso sistemico, la connettivite mista e meno frequentemente l'artrite reumatoide e la dermato-polimiosite (39).

Nella sclerodermia, la PAH costituisce una severa complicanza ed una delle maggiori cause di mortalità, unitamente alla crisi renale sclerodermica e all'interstiziopatia polmonare. In base alle casistiche omogenee o meno ed al metodo di diagnosi utilizzato, la PAH può manifestarsi fino al 25% dei pazienti con sclerodermia, ed essere isolata o associata alla pneumopatia interstiziale (39,40).

Nella sclerodermia, l'endotelio gioca un ruolo cruciale nell'interfaccia sangue-tessuto ed è coinvolto in numerosi meccanismi della risposta immune come la capacità di presentare l'antigene e l'espressione di molecole di adesione sulla superficie cellulare. Nella storia naturale di questa connettivite, i meccanismi di regolazione del tono vasale sono alterati in risposta ad una lesione o uno stimolo inappropriato che causa la malattia vascolare, caratterizzata da proliferazione inadeguata, alterato rimodellamento vascolare o un'alterata risposta della parete

vasale. Inizialmente, l'aumento della vasocostrizione o del vasospasmo provocano alterazioni strutturali del microcircolo. La lesione endoteliale potrebbe insorgere precocemente come conseguenza dell'alterata apoptosi o attivazione endoteliale; tale lesione richiama cellule dell'infiammazione verso l'endotelio alterato e successivamente si verificano un'adesione piastrinica eccessiva e una riduzione del fattore di Von Willebrand con conseguente proliferazione dell'intima fibrosi dell'avventizia che alla fine porta all'occlusione vasale. Molti studi hanno mostrato come alcune molecole siano aumentate in risposta alla disfunzione dell'endotelio e che probabilmente intervengono nell'etiopatogenesi della malattia: l'endotelina-1 è prodotto dalle cellule endoteliali nei pazienti sclerodermici ed è il primer della fibrosi vascolare e perivasale dei vasi polmonari; TGF- β stimola la produzione dei componenti della matrice extracellulare come fibronectina e proteoglicani e regola la trascrizione dei geni della famiglia delle proteine Smad, coinvolta nella sclerosi cutanea e nella fibrosi d'organo; il PDGF stimola la produzione di radicali liberi dell'ossigeno e la proliferazione dei fibroblasti; IL-8 chemokina prodotta dai fibroblasti polmonari e dai macrofagi alveolari promuove la chemiotassi dei neutrofili e probabilmente ricopre anche un ruolo angiogenetico; TNF- α regola la risposta immune vasale ed il metabolismo del tessuto connettivo mediante l'azione di fibroblasti; endoglin, glicoproteina delle cellule endoteliali, avrebbe un ruolo cruciale nelle complicanze cardiovascolari grazie alle capacità angiogenetiche (41).

Molti studi hanno dimostrato come la PAH è più frequentemente associata alla forma limitata piuttosto che a quella diffusa di sclerodermia, alla positività degli anticorpi anti-centromero, ai pazienti con malattia di lunga durata e stabilizzata dal punto di vista cutaneo con una media di 14 anni dalla diagnosi (42,43,44).

La prognosi della PAH secondaria alle connettiviti è assai severa e la sopravvivenza era del 67% ad un anno, 41% a due anni e 37% a tre anni (9), precedentemente alle terapie specifiche adottate negli ultimi anni.

Manifestazioni cliniche dell'ipertensione arteriosa polmonare

L'aspecificità dei sintomi di esordio della PAH giustifica il ritardo con cui si arrivava alla diagnosi, con una mediana di quasi due anni negli anni Settanta e di 1,2 anni negli anni Ottanta secondo il National Institutes of Health Patient Registry for the Characterization of Primary Pulmonary Hypertension (45); attualmente, ciò può essere valido solo per la forma idiopatica, dato che la diagnosi è sostanzialmente per esclusione; la caratterizzazione clinica delle malattie che possono causare la PAH è divenuta nel tempo più precisa per cui il clinico, nella gestione della patologia di base, esegue periodicamente e precocemente indagini volte a scoprire anche forme iniziali di PAH (ecocardiogramma, prove di funzionalità respiratorie, ecc).

I sintomi d'esordio sono sostanzialmente quelli presenti al momento della diagnosi ovvero, in ordine di frequenza, dispnea (60-98%), ridotta tolleranza anche a sforzi fisici moderati (30-60%), astenia marcata (20-73%), dolore toracico (10-50%), sincope (8-35%), edemi degli arti inferiori (3-37%), cardiopalmo (5-35%). Essi sono causati da un'aumentata ipossiemia da alveoli ventilati e non perfusi, riduzione dell'output cardiaco rispetto alle richieste metaboliche, fino allo scompenso cardiaco congestizio. Altri sintomi presenti ma in misura inferiore sono l'anoressia, l'emottisi, la distensione addominale (45); raramente si riscontra disfonia, causata dalla compressione del nervo laringeo ricorrente di sinistra dalla dilatazione dell'arteria polmonare, descritta nella sindrome di Ortner (46).

L'obiettività, comune a tutte le forme di ipertensione polmonare, è caratterizzata dall'accentuazione del secondo tono, conseguenza della maggiore forza di chiusura della valvola polmonare, e può essere palpato e auscultato all'apice cardiaco. I suoni eiettivi polmonari, come click sistolico e il murmure di eiezione medio sistolico, sono pure apprezzabili, ma nelle forme più severe. Il quarto tono cardiaco, modificabile con l'inspirio, è presente in quasi la metà dei pazienti e riflette la ridotta compliance del ventricolo destro ipertrofico. Con la progressione della malattia, il ventricolo destro si dilata e si apprezzano il soffio olosistolico del rigurgito della valvola tricuspide, la distensione delle vene del collo con il turgore delle giugulari e il fegato da stasi, segni dello scompenso del cuore destro. La dilatazione dell'anulus della valvola tricuspide causa insufficienza valvolare con soffio diastolico (47).

La comparsa del terzo tono si associa allo scompenso cardiaco ed è associato dal punto di vista ecocardiografico all'incremento delle pressioni polmonari ed alla riduzione dell'indice cardiaco; obiettivamente, si riscontrano distensione delle vene giugulari con reflusso epatogiugulare, epatomegalia, ascite, edemi declivi fino all'anasarca, cianosi del prolabio e delle estremità ed ipotensione (45,46,47).

Valutazione strumentale dell'ipertensione polmonare

Una diagnosi clinica di PAH è spesso ritardata di 12-18 mesi per l'aspecificità dei sintomi. La maggior parte dei pazienti sono classificati in classe III e IV nella classificazione WHO (45).

Le alterazioni dell'ECG, come la deviazione assiale destra in presenza di marcata ipertrofia ventricolare destra e l'onda P polmonare, espressione di dilatazione dell'atrio di destra si osservano nelle forme di PAH severa.

L'ecocardiogramma bidimensionale con doppler è un'indagine non invasiva che consente di valutare la pressione arteriosa polmonare e l'eventuale compromissione morfo-funzionale delle cavità cardiache di destra. Tale esame risulta meno preciso nel misurare i parametri emodinamici rispetto al cateterismo cardiaco destro; tuttavia è un esame insostituibile per lo screening dei soggetti a rischio di sviluppare la malattia ipertensiva polmonare (ad esempio pazienti affetti da connettiviti sistemiche) e per il follow-up dei pazienti in trattamento farmacologico specifico (48,49,50).

Il cateterismo cardiaco destro rappresenta il gold standard per la diagnosi di PAH, poiché consente una misurazione diretta della pressione (sistolica, diastolica e media) in arteria polmonare, delle pressioni nelle camere cardiache di destra, della pressione polmonare di incuneamento capillare e della gittata cardiaca (51).

Il 6-minute walking test (6M-WT) consente una valutazione oggettiva della ridotta tolleranza allo sforzo fisico, espressa come distanza percorsa, ed è utile per stabilire la risposta alla terapia e la prognosi dei pazienti con ipertensione polmonare (52,53).

Trattamento dell'ipertensione arteriosa polmonare

Terapie convenzionali

L'utilizzo di digitale, anticoagulanti, diuretici ed ossigeno che venivano comunemente somministrati prima dei farmaci ad azione specifica, non si basa su studi clinici controllati, ma piuttosto sulla pratica clinica. Nello scompenso cardiaco congestizio, che si instaura in una PAH severa, si utilizza la terapia diuretica; la digossina come inotropo positivo; l'anticoagulante trova il suo razionale nell'ipercoagulabilità correlata alle elevate pressioni ed alla stasi nel circolo polmonare secondo alcuni studi non controllati aumenterebbe la sopravvivenza a tre anni dal 21 al 47% (54,55). La riduzione delle resistenze polmonari si può ottenere utilizzando i calcio-antagonisti ma l'elevato dosaggio terapeutico è solitamente poco tollerato dai pazienti (56) e comunque è da limitare a quei pazienti con test di vasoreattività acuta positivo al cateterismo cardiaco (54,57).

Terapie specifiche

La storia naturale dell'ipertensione arteriosa polmonare si è modificata radicalmente nell'ultimo decennio, quando sono stati formulati farmaci con un bersaglio d'azione selettivo su quattro versanti che corrispondono alle molecole protagoniste nei tre meccanismi patogenetici principali: antagonisti recettoriali dell'endotelina (bosentan, ambrisentan, sitaxentan), inibitore della 5-fosfodiesterasi (sildenafil, tadalafil), ossido nitrico (ossido nitrico, L-arginina) e derivati dei prostanoidei (treprostinil per via sottocutanea, prostaciclina per via endovenosa, beraprost per os, iloprost per aerosol) (1,58).

Studi clinici in corso testano molecole sempre più specifiche: Garcia *e al.* ha trattato con imatinib, antagonista del platelet-derived growth factor con attività antiproliferativa, quattro pazienti affetti da PAH refrattari ai trattamenti specifici anche in combinazione; il miglioramento dei parametri emodinamici si è avuto in un solo paziente, che però poi è deceduto per epatotossicità del farmaco (59).

Inibitori recettoriali dell'endotelina-1

Il bosentan è un antagonista competitivo di entrambi i sottotipi recettoriali ETa ed ETb e previene efficacemente la vasocostrizione indotta dall'endotelina-1 a livello dei vasi polmonari. Secondo le indicazioni ministeriali, è indicato nei pazienti affetti da ipertensione arteriosa polmonare in classe funzionale WHO III e IV; la via di somministrazione è quella orale ed il dosaggio iniziale è di 125 mg/die per il primo mese e poi 250 mg/die fino al dosaggio massimo di 500 mg/die.

Ha un metabolismo prevalentemente epatico e gli eventi avversi principali sono le alterazione della funzionalità epatica e della crasi ematica, cefalea, flushing ed ipotensione correlati all'effetto vasodilatatorio.

Presenta interazioni farmacocinetiche con le sostanze che hanno i medesimi citocromi nelle vie metaboliche ovvero CYP3A4 e CYP2C9: simvastatina, warfarina, glibenclamide, ciclosporina, chetoconazolo (17).

Diversi studi in doppio cieco con placebo (Channick *et al.* 2001, Rubin *et al.* 2002, Galiè *et al.* 2003) hanno mostrato come il bosentan determini un miglioramento sia dal punto di vista emodinamico, con la riduzione delle resistenze vascolari polmonari, che funzionale, con l'aumento della distanza percorsa al 6-minutes walking test e riduzione dell'indice di dispnea di Borg; complessivamente in tutti e tre gli studi, si è ottenuto un miglioramento della classe funzionale WHO dopo 16 settimane di terapia con bosentan (60,61,62), che viene mantenuto anche dopo un anno di trattamento (63).

Secondo l'ampio studio monocentrico di Provencher *et al.* (2006), la sopravvivenza dei pazienti affetti da ipertensione polmonare primitiva in classe funzionale III e IV è stimata in 92, 89 e 72% rispettivamente dopo 1, 2 e 3 anni di terapia con bosentan (64), rispetto a quella predittiva pari a 71, 61 e 51% sulla base dei dati del NIH registry (7).

Nella PAH secondaria alle connettiviti, la risposta alla terapia con bosentan è meno eclatante rispetto ai pazienti affetti da PAH primitiva, probabilmente per i diversi meccanismi patogenetici e per l'età più avanzata in cui compare la complicità (39); i due studi pilota placebo-controllati (60,61) mostrano un aumento della distanza percorsa, ma non statisticamente significativo; la sopravvivenza è

dell'81-87% ad un anno e 71-79% a due anni in base agli studi considerati (60,61,64,65).

Galiè *et al.* (38) ha recentemente mostrato che il bosentan, utilizzato in pazienti affetti da ipertensione polmonare primitiva o associata ad infezione da HIV o anoressizzanti in classe funzionale II (studio EARLY), migliora i parametri emodinamici e previene il deterioramento clinico con stabilizzazione della classe funzionale.

Sitaxsentan è l'antagonista recettoriale di ETa; tale selettività potrebbe essere vantaggiosa nel bloccare la vasocostrizione dell'endotelina-1 sui vasi polmonari, mantenendo l'azione vasodilatatrice mediata da ETb. Si somministra per os, al dosaggio di 100 mg/die in monodose (67,68).

Nello studio multicentrico con sitaxsentan (STRIDE-1, Barst *et al.* 2006), nei pazienti affetti da PAH idiopatica e secondaria alle connettiviti si è ottenuto un miglioramento statisticamente significativo della tolleranza allo sforzo, espressa come metri percorsi al 6M-WT, della classe funzionale WHO e dell'indice di Borg (69). Il profilo di sicurezza è migliore di quello del bosentan, con minore epatotossicità (67).

Ambrisentan è il secondo antagonista recettoriale selettivo di ETa, approvato dalla Food and Drug Administration nel 2007; gli studi in doppio cieco e placebo-controllati mostrano risultati simili ottenuti con il sitaxsentan ed un profilo di sicurezza anche maggiore (70,71); sono in corso studi a lungo termine (70).

Inibitori della 5-fosfodiesterasi

Sildenafil è un inibitore selettivo della 5-fosfodiesterasi particolarmente presente nel tessuto polmonare, che aumenta i livelli intracellulari di cGMP causando rilasciamento delle cellule muscolari lisce vascolari e conseguente riduzione delle resistenze polmonari (72). E' stato dapprima approvato nella terapia dei disturbi erettili e dal 2007 è indicato anche nella PAH idiopatica e secondaria. Si assume per os al dosaggio di 60 mg/die in tre somministrazioni. E' molto ben tollerato con un profilo di sicurezza simile al placebo (72). Migliora la tolleranza allo sforzo fisico, riduce le resistenze vascolari polmonari e migliora la classe funzionale WHO sia nei

pazienti affetti dalla forma idiopatica (57,72,73,74) che in quella secondaria alle connettiviti (57,72,73) anche dopo due anni di terapia (26). Una meta-analisi di studi randomizzati controllati mostra invece come la terapia con sildenafil non migliori la resistenza allo sforzo nei pazienti affetti da PAH secondaria alle connettiviti, probabilmente per l'esiguo numero di studi e per la scarsa sensibilità del 6M-WT, influenzato dalle comorbidità associate alle connettiviti stesse (75).

Ossido nitrico

L'ossido nitrico per via inalatoria ha effetto vasodilatatore, ma la breve emivita rende indaginoso la terapia per le molte somministrazioni quotidiane e quindi non trova un valido impiego clinico; inoltre, l'interruzione del trattamento provoca un rapido deterioramento emodinamico (1).

Casi aneddotici riportano che l'utilizzo della L-arginina, substrato dell'ossido nitrico sintasi, riduca le resistenze vascolari polmonari ed aumenti la tolleranza allo sforzo fisico (1).

Prostanoidi

L'epoprostenolo può essere somministrato solo in infusione continua endovenosa data la breve emivita della molecola (pari a tre minuti) e la sua inefficacia a bassi pH; il dosaggio efficace dipende dal peso corporeo e dalle condizioni cliniche del paziente.

Sia nei pazienti affetti dalla forma primitiva che secondaria di PAH, l'epoprostenolo migliora la tolleranza allo sforzo fisico e i parametri emodinamici; in due ampi studi osservazionali (Sitbon *et al.* 2002, McLaughlin *et al.* 2002), la sopravvivenza è aumentata nella forma idiopatica di malattia ed è pari all'85% ad un anno, 70% a due anni, 63% a tre anni e 55% a cinque anni (76,77) rispetto al gruppo di controllo del NHI registry, rispettivamente 58%, 43%, 33% e 28%. Tale dato non è invece confermato nella forma di ipertensione polmonare secondaria alla sclerodermia, in cui non vi sarebbe alcun miglioramento della sopravvivenza (78).

Un analogo stabile della prostaciclina è il treprostinil, somministrato in infusione continua sottocutanea; migliora la tolleranza allo sforzo fisico, i parametri emodinamici e i sintomi clinici nelle forme di PAH idiopatica e secondaria (79,80); aumenta la sopravvivenza in modo significativo soprattutto nel gruppo di pazienti con PAH idiopatica (91-72% nell'intervallo 1-4 anni) (80).

Iloprost somministrato per via inalatoria rappresenta una valida scelta terapeutica per pazienti affetti da PAH idiopatica e secondaria; lo svantaggio risiede nella breve durata d'azione per cui sono necessarie dalle 6 alle 12 inalazioni quotidiane. Migliora la performance fisica e la classe funzionale WHO nei pazienti poco responsivi alla terapia con bosentan (81).

Beraprost è il primo analogo della prostaciclina per via orale in quattro somministrazioni quotidiane; migliora la tolleranza allo sforzo fisico, soprattutto nella PAH idiopatica, ma non influisce sui parametri emodinamici né sulla classe funzionale WHO (57,82).

Terapia di associazione

Secondo le più recenti indicazioni, la terapia di associazione che utilizza farmaci indicati nella PAH con diverso meccanismo d'azione rappresenta il gold standard e trova il suo razionale nel colpire diversi targets implicati nella complessa patogenesi della malattia (83).

L'American College of Chest Physicians (ACCP) ha formulato raccomandazioni per la terapia dell'ipertensione arteriosa polmonare in base ai livelli di evidenza clinica; tali criteri sono stati formulati nel 2004 (83) e poi rivisti nel 2007 (57) e sono validi per le forme di ipertensione polmonare idiopatica e secondaria alle connettiviti o ai farmaci anoressizzanti.

Sulla base di tali indicazioni, la terapia di prima linea è rappresentata dal bosentan a cui si può associare il sildenafil nel momento in cui vi sia un peggioramento della dispnea o dell'astenia, della classe funzionale WHO o della performance fisica con una riduzione della distanza percorsa superiore ai 30 metri (84,85).

L'associazione bosentan e sildenafil determina miglioramento clinico dei pazienti affetti dalla forma idiopatica di ipertensione polmonare; nella forma secondaria alle

connettiviti, il bosentan non migliora la tolleranza allo sforzo fisico e anche la terapia di associazione non permette alcun guadagno della distanza percorsa al 6M-WT (84).

Se necessario, all'antagonista recettoriale dell'endotelina e all'inibitore della 5-fosfodiesterasi, è possibile aggiungere il prostaglandino per via inalatoria oppure ad infusione endovenosa continua (85).

Hoepfer *et al* (85) ha riportato come in una coorte di pazienti, affetti da ipertensione polmonare sia idiopatica che secondaria, dopo due anni di terapia con bosentan, più del 40% di essi passò alla terapia di associazione con sildenafil e per il 20% sia necessario aggiungere anche un prostanoloide.

SCOPO DELLO STUDIO

L'ipertensione arteriosa polmonare rappresenta una delle principali cause di morbilità e mortalità nei pazienti affetti da connettiviti sistemiche, in particolare da sclerodermia.

Nell'ultimo ventennio sono state studiate molecole farmacologiche efficaci nella terapia di questa temibile complicanza ed approvate dall'AIFA, quali il bosentan, il sildenafil, l'iloprost per via inalatoria e l'epoprostenolo per via infusiva continuativa; tali farmaci sono in grado di migliorare la storia naturale della malattia, in termini di aumentata resistenza allo sforzo fisico e miglioramento dei parametri emodinamici (76,77,80)

Il lavoro svolto nei tre anni di dottorato si è articolato in due argomenti:

- 1) follow-up di pazienti affetti da PAH secondaria alle connettiviti in terapia con farmaci specifici;
- 2) studio del microcircolo coronarico nei soggetti affetti da sclerodermia associata o meno alla PAH.

1) Dal 2003, la Cattedra e l'UOC di Reumatologia è un Centro Regionale per la diagnosi ed il trattamento della PAH secondaria alle connettiviti con il bosentan, farmaco antagonista recettoriale dell'endotelina. Nel 2008, il sildenafil e l'iloprost per via inalatoria hanno ottenuto l'indicazione per questa malattia e perciò sono divenuti un'ulteriore opzione terapeutica che abbiamo utilizzato in associazione con il bosentan.

Abbiamo seguito 43 pazienti, afferenti agli ambulatori della Cattedra e UOC di Reumatologia, affetti da PAH secondaria alle connettiviti utilizzando la terapia specifica più adeguata e cercando di cogliere precocemente eventuali peggioramenti clinici o scarsa risposta al trattamento in atto.

2) La sclerodermia è una malattia autoimmune del tessuto connettivo caratterizzata da lesioni prima funzionali e poi organiche del microcircolo.

Tali lesioni innescano da un lato alterazioni della risposta immunitaria, con attivazione dei linfociti T e liberazione in vivo di varie citochine, e dall'altro un'attivazione della funzione fibroblastica, con abnorme aumento del tessuto connettivo e conseguente fibrosi.

Le lesioni del microcircolo svolgono un ruolo patogenetico nelle manifestazioni viscerali che spesso complicano la malattia; tra queste un'importanza fondamentale occupa la miocardiopatia sclerodermica, presente nel 50-80% dei pazienti sclerodermici, ma spesso asintomatica (86,87); essa interessa sia il miocardio da lavoro che il tessuto di conduzione. I vasi arteriosi intramiocardici mostrano proliferazione intimale e conseguente subocclusione del lume vasale come conseguenza dei fenomeni ischemici parcellari da vasospasmo (fenomeno di Raynaud viscerale) con ischemia, necrosi e riperfusione; dal punto di vista istologico, le lesioni con deposizione di collagene perivasale e perimisiale appaiono simili a quelle precoci dell'infarto miocardico (bande di necrosi). La fibrosi del miocardio interessa entrambi i ventricoli e causa ipertrofia del ventricolo sinistro e disfunzione diastolica con funzione sistolica conservata.

Abbiamo voluto studiare l'interessamento del microcircolo coronarico in pazienti affetti da sclerodermia, grazie alla valutazione della riserva coronarica (CFR, coronary flow reserve); attraverso tale metodica abbiamo anche voluto studiare se la CFR sia maggiormente compromessa nei pazienti sclerodermici che presentano come complicanza l'ipertensione arteriosa polmonare.

PAZIENTI E METODI

Ipertensione arteriosa polmonare secondaria alle connettiviti

Pazienti

La Cattedra e UOC di Reumatologia dell'Università di Padova è un Centro Regionale per la diagnosi ed il trattamento dell'ipertensione arteriosa secondaria alle connettiviti in terapia con bosentan, antagonista recettoriale dell'endotelina.

Dal 2003 a gennaio del 2009 abbiamo arruolato 43 pazienti consecutivi, affetti da PAH secondaria a diverse forme di connettivite, diagnosticate in base ai criteri validi a livello internazionale: sclerodermia, lupus eritematoso sistemico, connettivite mista, connettivite indifferenza, sindromi overlap.

Si trattava di 43 pazienti, 32 donne ed 11 uomini, con età media di 60 ± 13 anni (range 33-85) al momento dell'inizio dello studio; 34 (79%) pazienti erano affetti da sclerodermia, di cui 27 dalla forma limitata e 7 da quella diffusa; 2 (4,6%) soggetti erano affetti da lupus eritematoso sistemico, 1 (2,3%) da polimiosite, 1 (2,3%) da connettivite mista, 1 (2,3%) da connettivite indifferenziata, 4 (1 da sindrome overlap (sindrome da anti-Jo1, 1 da overlap sclerodermia/polimiosite, e 2 da overlap sclerodermia/artrite reumatoide). La durata media della connettivite era di $9 \pm 4,5$ anni (range 5-25), mentre la durata della PAH, dal momento della diagnosi, era di $2,5 \pm 1,7$ anni (range 4 mesi- 5 anni).

La diagnosi di PAH è stata posta con metodo indiretto tramite ecocardiocolordoppler transtoracico eseguito presso la Clinica di Cardiologia dell'Università di Padova; veniva eseguito anche il 6minutes-walking test (6m-WT) per valutare la performance fisica.

I pazienti assumevano già terapia vasodilatatrice con calcio-antagonisti, che veniva comunque mantenuta, come anche bassi dosaggi di steroidi, gastroprotettori, diuretici, procinetici, alendronato.

La terapia con bosentan veniva intrapresa per quei soggetti che soddisfacevano i criteri di ammissione che prevedevano pazienti affetti da PAH primitiva o secondaria a sclerodermia senza tuttavia pneumopatia interstiziale, classificati in III o IV classe funzionale WHO o NYHA e valori di pressione nel circolo polmonare >40 mm Hg al cateterismo cardiaco oppure >45 mm Hg all'eco-doppler cardiaco per la pressione sistolica in ventricolo dx e/o >25 mm Hg al cateterismo cardiaco oppure >30 mm Hg all'eco-doppler cardiaco per la pressione media in arteria polmonare.

Il bosentan veniva somministrato al dosaggio più basso nel primo mese (125 mg/die in due somministrazioni) e poi a dosaggio terapeutico di 250 mg/die. Mensilmente, venivano eseguiti controllo bioumorale di emocromo e transaminasi, vista la nota interferenza con la crasi ematica, soprattutto anemia, ed epatotossicità.

Qualora vi fosse ipertransaminasemia inferiore di 3 volte il limite superiore, si proseguiva con il dosaggio più basso del farmaco oppure si dimezzava la dose se il paziente assumeva già quello massimo; si interrompeva la terapia, qualora le transaminasi aumentavano più di 5 volte il limite superiore.

Il sildenafil è stato somministrato in monoterapia a quei pazienti che avevano presentato epatotossicità al bosentan oppure in associazione al bosentan stesso in caso di peggioramento dei valori pressori all'ecocardioppler transtoracico o della classe funzionale WHO. Il dosaggio era di 60 mg/die per via orale.

Nella nostra casistica, due soggetti hanno assunto il sildenafil in associazione al bosentan, di cui una paziente per un solo mese a causa di malessere generale e scarsa compliance, l'altra con buona tollerabilità; una paziente assumeva l'inibitore della 5-fosfodiesterasi in monoterapia a causa di ipertransaminasemia da bosentan.

In due pazienti affetti da PAH severa in IV classe funzionale, lo schema terapeutico è stato potenziato con iloprost somministrato per via inalatoria cinque volte al di, associato al bosentan in uno e a bosentan e sildenafil nell'altro.

Durante il follow-up, tutti i pazienti venivano sottoposti all'ecocardioppler transtoracico ed al 6m-WT dapprima a cadenza trimestrale nel primo anno e poi

semestrale, per seguire l'efficacia della terapia e valutare i valori pressori in arteria polmonare e la performance fisica.

Studio della microangiopatia coronarica in pazienti affetti da sclerodermia

Pazienti

Per lo studio della microangiopatia coronarica, abbiamo sottoposto 38 pazienti consecutivi affetti da sclerodermia all'ecocardiografia transtoracica con infusione di adenosina, per valutare la CFR (coronary flow reserve); si trattava di 30 donne e 8 uomini, di età media di $59,1 \pm 13,5$ anni (range 36-85 anni).

Di questi, 12 (31,5%) soggetti presentavano anche PAH correlata alla connettivite, si trattava di 8 donne e 4 uomini, con età media di $66,1 \pm 11,6$ anni (range 46-85 anni); 3 pazienti avevano la forma diffusa di sclerodermia, 9 quella limitata; la durata della malattia era di $11,3 \pm 8,3$ anni (range 1-30 anni), la durata della PAH era di $3,6 \pm 2,1$ anni (range 6 mesi-6 anni); 10 pazienti erano in terapia con bosentan.

I pazienti affetti da sclerodermia non complicata erano 26 (68,5%), di cui 22 donne e 4 uomini con età media di $55,8 \pm 13,4$ ani (range 36-83 anni) e durata di malattia media di $13,5 \pm 9,3$ anni (range 1-33 anni); 13 avevano la forma diffusa di sclerodermia e 13 la limitata.

Metodi

Sia l'ecocardi Doppler transtoracico che l'ecocardiografia con infusione di adenosina sono state eseguite presso le strutture della Cattedra ed UOC di Cardiologia dell'Università di Padova.

Ecocardiografia transtoracica

L'ecocardiografia transtoracica è stata eseguita con paziente in decubito laterale sinistro, mediante apparecchio dotato di sistema Doppler pulsato e continuo (sonda a doppia frequenza, operante a 3,5 MHz per l'esame ecocardiografico bidimensionale e a 2 MHz per lo studio Doppler).

Tale indagine strumentale non invasiva, ripetibile e ben tollerata dai pazienti, ha consentito una stima della pressione arteriosa in arteria polmonare basandosi sullo studio del rigurgito tricuspide, in particolare sulla misurazione della massima velocità di tale rigurgito.

Per visualizzare la tricuspide sono state utilizzate le posizioni esplorative standard dell'ecocardiografia bidimensionale (parasternale, apicale e sottocostale).

Accertata la presenza di rigurgito tricuspide mediante Doppler pulsato e color-Doppler, il sistema è stato convertito al modo continuo, e dopo aver allineato il fascio ultrasonoro con la direzione del getto rigurgitante, si è proceduto alla misurazione della massima velocità dello stesso (V). Eseguita tale misurazione è stato possibile calcolare il picco di gradiente pressorio sistolico tra ventricolo ed atrio destro (ΔP) attraverso l'equazione di Bernoulli:

$$\Delta P \text{ (mmHg)} = 4 \times V^2 \text{ (m/s)}$$

Il gradiente pressorio trans-tricuspide equivale alla differenza tra le pressioni ventricolare ed atriale di destra. Aggiungendo ad esso il valore della pressione media dell'atrio di destra si è ottenuta una stima della pressione del ventricolo di destra.

In assenza di condizioni patologiche responsabili di un gradiente tra il ventricolo destro e l'arteria polmonare, come ad esempio la stenosi polmonare, la pressione del ventricolo di destra coincide con la pressione sistolica in arteria polmonare (mPAP) (88).

Sono stati considerati normali valori di PSVD inferiori a 45 mmHg; mentre nei pazienti affetti da sclerodermia complicata da PAH sono stati considerati come patologici valori di PSVD superiori a 45 mmHg.

Il requisito fondamentale per la misurazione della PAP mediante tale metodica strumentale è la presenza del rigurgito tricuspide. Tale fenomeno, di origine funzionale, è presente in quasi tutti i pazienti affetti da PAH ed aumenta in rapporto alla severità dello stato ipertensivo. La sua assenza rappresenta una limitazione a tale indagine.

L'errore standard della stima della PSVD, ottenuta mediante l'ecocardiogramma bidimensionale con Doppler, rispetto alle misurazioni effettuate in corso di cateterismo cardiaco destro, è compreso tra 5 e 9 mmHg.

Tale errore dipende da diversi fattori come l'imprecisione nella valutazione della pressione in atrio destro, l'angolazione scorretta tra la direzione del fascio ultrasonoro e quella del flusso rigurgitante e l'incertezza nell'assegnazione del valore della massima velocità al segnale Doppler creato dal rigurgito.

Ecocardiografia Doppler transtoracica con infusione di adenosina

In tutti i soggetti reclutati è stata inoltre valutata, in maniera non invasiva mediante ecocardiografia transtoracica, la CFR a livello della porzione distale dell'arteria coronarica discendente anteriore sinistra (DA). Sono stati considerati pazienti affetti da sclerodermia in assenza di sintomi cardiologici.

L'ecocardiogramma bidimensionale è stato eseguito prima e dopo l'infusione e.v. di adenosina utilizzando un ecocardiografo (Sequoia C256, Acuson, Mountain View, California), con trasduttore ad ampio spettro, dotato di seconda armonica.

Un ecocardiogramma completo di M-mode, bidimensionale, doppler (spettrale e color) è stato eseguito su tutti i pazienti per valutare le camere cardiache, la morfologia valvolare e la frazione di eiezione. Una volta completato

l'ecocardiogramma di routine, è stata eseguita la CFR, utilizzando un doppler transtoracico.

La CFR è stata valutata nella porzione distale della coronaria sinistra discendente anteriore (DA) con l'ecodoppler transtoracico (ECO-TT) durante l'infusione di adenosina (Adenoscan, Sanofi-Synthelabo, Berlin, Germany) al dosaggio di 0.14 mg/kg/min (140 µg/kg/min) della durata di 5 minuti.

Sono stati monitorati a riposo e durante l'infusione di adenosina ad ogni minuto la pressione arteriosa e l'elettrocardiogramma (87,89).

La valutazione della CFR è stata eseguita con successo in assenza del mezzo di contrasto nel 96% dei pazienti valutati. Solo in 1 paziente si è utilizzata la somministrazione del mezzo di contrasto (Levovist, Schering AG, Berlin, Germany) che è stata attuata sia prima che durante la somministrazione endovena di adenosina. Tale sostanza di contrasto è in grado di risaltare l'ecocardio-doppler; viene infusa e.v. attraverso una pompa alla concentrazione di 300 mg/ml con una velocità di 1 mg/min (range 0,5-2 ml/min), considerando la qualità e l'entità del segnale del Doppler.

Studi dimostrano che durante l'infusione di adenosina, la frequenza cardiaca è aumentata rispetto al valore basale, la pressione sistolica invece è ridotta come la diastolica mentre il picco della velocità diastolica nella coronaria discendente sinistra è aumentato (86,87,89).

La terapia cardiologica che i pazienti assumevano precedentemente, non è stata sospesa prima dell'esecuzione dell'esame. Le bevande contenenti metil-xantine (coca-cola, tè, caffè, cioccolata) sono state proibite per le 24 ore precedenti allo studio.

La CFR nella coronaria discendente sinistra è stata calcolata da un ecocardiografista esperto, ignaro dei dati clinici inerenti al paziente, come rapporto della velocità di picco diastolico durante iperemia e il picco della velocità diastolica a riposo. Per ogni parametro è stata eseguita la media dei tre valori più alti.

E' stato considerato come normale un valore di CFR $\geq 2,5$; valori inferiori a 2 sono altamente specifici (98%) e sensibili (50%) per una severa compromissione, come presenza di stenosi, del flusso nella coronaria discendente anteriore sinistra (89).

Sono stati esclusi dallo studio soggetti affetti da asma bronchiale e BPCO riacutizzata per le controindicazioni all'assunzione di adenosina.

Tutti i pazienti sottoposti allo studio CFR hanno ben tollerato l'esame, presentando raramente accelerazione della frequenza respiratoria e nausea, della durata di qualche minuto e spontaneamente regrediti.

ANALISI STATISTICA

I dati sono espressi come media \pm SD.

L'analisi statistica è stata eseguita con il test di Student per dati appaiati, Mann Whitney test e Wilcoxon rank test; l'elaborazione è avvenuta in SPSS.

E' stata assunta come significativa una $p < 0,05$.

RISULTATI

Pazienti affetti da PAH secondaria alle connettiviti

Abbiamo reclutato 43 pazienti consecutivi affetti da connettivite sistemica, complicata da PAH secondaria.

Dopo la diagnosi ecografica di PAH fatta con l'ecocardi Doppler (in 3 casi anche con il cateterismo cardiaco destro) e la valutazione preliminare della tolleranza allo sforzo fisico con il 6m-WT, hanno intrapreso terapia con l'antagonista recettoriale dell'endotelina, bosentan.

Attualmente sono in follow-up presso il nostro ambulatorio dedicato alla PAH secondaria alle connettiviti 25 pazienti, dei quali, 20 affetti da sclerodermia, 2 da LES, 1 da sindrome overlap da anti-Jo1, 1 da polimiosite, 1 connettivite mista; l'età media alla diagnosi era di 60 ± 12 anni (range 33-82) con durata media della PAH di $3,0 \pm 1,8$ anni (range 4 mesi-5 anni). 13 pazienti erano in III classe funzionale WHO, 8 in IV classe ed altri 4 erano borderline tra II e III classe (tabella 3).

21 soggetti erano in terapia con bosentan, di cui 17 a dosaggio di 250 mg/die e 4 a dosaggio maggiore (325 mg/die), 1 con sildenafil, 1 con l'associazione bosentan-sildenafil, 1 con associazione bosentan-sildenafil-iloprost inalatorio.

Le cause che hanno determinato drop-out dei 18 pazienti dal nostro studio sono, in dettaglio: ipertransaminasemia in 2 casi, 4 per scarsa compliance, 1 paziente ha presentato riaccensione dell'artrite e un'altra della miosite, 1 paziente è stato sottoposto a trapianto di polmone, 5 deceduti per cause non correlate alla PAH, 4 deceduti per cause correlabili alla PAH (scompenso cardiaco congestizio, morte improvvisa), 2 dei quali avevano sospeso il trattamento per inefficacia.

Tabella 3 – Caratteristiche demografiche dei pazienti affetti PAH secondaria alle connettiviti sistemiche attualmente seguiti presso la UOC di Reumatologia

paziente	sexso	età	connettivite	durata connettivite	anticorpi	durata PAH
A.L.	F	73	sclerodermia	8	ACA	2
B.G.	M	82	sclerodermia	7	ACA	3
B.L.	F	60	sclerodermia	12	ACA	5
B.P.	M	51	sclerodermia	7	ACA	1
C.Ma.	F	65	sclerodermia	5	ACA	2
C.M.	F	43	connettivite mista	9	anti-nRNP	5
C.G.	F	54	sclerodermia	4	ACA	4 mesi
C.F.	M	54	sclerodermia	16	Scl70	5
C.B.	F	72	sclerodermia	7	ACA	5
D.P.F.	F	50	sclerodermia	12	Scl70	3
D.L.	F	68	sclerodermia	5	ACA	5 mesi
F.T.	F	67	sclerodermia	9	aspecifico	4
G.I.	F	62	sclerodermia	5	aspecifico	2
M.S.	M	41	LES	9	anti-DNAn	5
M.F.	M	61	polimiosite	7	aspecifico	5
P.T.	F	71	sclerodermia	9	Scl70	2
P.D.	F	74	sclerodermia	6	ACA	2
R.ML.	F	52	clerodermia	10	Scl70	5
R.W.	M	73	sclerodermia	5	ACA	4 mesi
R.AM.	F	57	s. anti-Jo1	12	anti-Jo1	5
S.D.	M	72	sclerodermia	8	Scl70	1
T.S.	F	43	sclerodermia	25	aspecifico	5
T.D.	F	63	sclerodermia	5	ACA	6 mesi
V.B.	F	33	LES	15	anti-DNAn	5
Z.R.	F	67	sclerodermia	7	Scl70	2

Follow-up ad un anno in pazienti affetti da PAH secondaria a connettiviti sistemiche in terapia con bosentan

I primi 13 pazienti affetti da PAH secondaria a connettiviti sistemiche hanno raggiunto un anno di terapia con bosentan erano affetti da sclerodermia in 9 casi, LES in 2, connettivite mista 1 e sindrome overlap sclerodermia/polimiosite in 1 soggetto. All'inizio dello studio, l'età media era di $53,6 \pm 13,6$ anni (range 33-75) e la durata media della connettivite era di $14 \pm 9,1$ anni (range 5-36); 7 pazienti erano in III classe funzionale WHO e 6 erano borderline tra II e III classe. Le caratteristiche demografiche dei pazienti sono riportate in tabella 4.

La PSVD si era ridotta in modo statisticamente significativo dopo 3 mesi ($65,4 \pm 21,2$ mmHg; $p=0,013$), dopo 6 ($59,2 \pm 22,6$ mmHg; $p=0,0005$) e 12 mesi ($863,9 \pm 21,3$ mmHg; $p=0,013$). Si era ridotta in 9 pazienti (69%), era rimasta invariata in 3 (23%) ed aumentata in 1 (8%) (Tab. 5).

La mPAP, non valutata in tutti i soggetti, non aveva presentato variazioni significative durante l'anno di trattamento.

La distanza media percorsa al 6m-WT al baseline era di $463,5 \pm 170,6$ metri ed era migliorata dopo 3 mesi ($450,0 \pm 168,6$ metri), 6 mesi ($463,9 \pm 165,8$) e 12 mesi ($466,4 \pm 170,8$) di terapia con bosentan; la significatività statistica era presente solo nella valutazione a 6 mesi ($p=0,030$) (Tab. 6). La distanza percorsa era aumentata in 7 (54%) pazienti, era rimasta invariata in 3 (23%) ed era ridotta in altri 3 (23%).

Alla fine dello studio, 3 pazienti (23%) erano in III classe funzionale WHO, 6 (46%) erano borderline tra la II e la III classe e 4 (30,5%) in II classe funzionale WHO; complessivamente, vi era stato un miglioramento della classe funzionale per 4 pazienti (30,5%).

Effetti collaterali dovuti alla terapia sono stati rilevati in 2 pazienti che hanno presentato ipertransaminasemia, inferiore a tre volte il limite superiore, regredita con la riduzione del dosaggio del bosentan da 250 mg/die a 125 mg/die.

Tabella 4 – Caratteristiche demografiche dei 13 pazienti affetti da PAH secondaria a connettiviti sistemiche in follow-up da un anno

pazienti	sexso	età (anni)	connettivite	durata connettivite	anticorpi
B.L.	F	60	sclerodermia	12	ACA
B.O.	F	62	sclerodermia	8	ACA
B.S.	F	75	sclerodermia	36	ACA
C.M.	F	43	connettivite mista	12	anti-nRNP
C.P.	F	35	s. overlap	6	aspecifico
C.B.	F	72	sclerodermia	7	ACA
G.G.	M	64	sclerodermia	13	ACA
L.L.	F	60	sclerodermia	5	anti-Scl70
M.S.	M	41	LES	9	anti-DNAn
R.ML	F	52	sclerodermia	10	anti-Scl70
T.A.	F	57	sclerodermia	25	ACA
T.S.	F	43	sclerodermia	25	aspecifico
V.B.	F	33	LES	15	anti-DNAn

Tabella 5 – Pressione sistolica del ventricolo destro (mmHg) in pazienti affetti da connettiviti sistemiche in terapia con bosentan da un anno

paziente	baseline	3 mesi	6 mesi	12 mesi
B.L.	81	75	70	76
B.O.	110	110	104	110
B.S.	65	60	51	55
C.M.	97	98	100	97
C.P.	48	40	36	39
C.B.	80	65	50	60
G.G.	71	70	70	71
L.L.	70	75	45	45
M.S.	63	60	54	58
R.ML	50	38	35	45
T.A.	50	47	42	45
T.S.	50	47	42	55
V.B.	82	65	70	75
media	70,5	65,4	59,2	63,9
± SD	19,3	21,1	22,6	21,3
<i>p</i>		0,013	0,0005	0,013

Tabella 6 – Distanza percorsa al 6m-WT in pazienti affetti da PAH secondaria alle connettiviti sistemiche in terapia con bosentan da un anno

paziente	baseline	3 mesi	6 mesi	12 mesi
B.L.	250	270	270	280
B.O.	225	292	337	350
B.S.	112	112	135	135
C.M.	517	450	517	630
C.P.	630	620	620	570
C.B.	485	485	450	460
G.G.	540	537	562	540
L.L.	260	250	260	230
M.S.	672	650	675	698
R.ML	450	460	450	450
T.A.	551	600	585	620
T.S.	518	607	607	520
V.B.	464	517	520	580
media	436,7	450,0	463,9	466,4
± SD	170,6	168,6	165,8	170,8
<i>p</i>		n.s.	0,030	n.s.

Follow-up a due anni in pazienti affetti da PAH secondaria a connettiviti sistemiche in terapia con bosentan

I primi 12 pazienti affetti da PAH secondaria a connettiviti sistemiche che hanno raggiunto i due anni di terapia erano affetti da sclerosi sistemica in 8 casi, LES in 2 casi, connettivite mista in 1, polimiosite in 1. All'inizio dello studio, l'età media era di $54,4 \pm 14$ anni (range 33-72), la durata media della connettivite era di $12,4 \pm 6,5$ anni (range 5-25). Al baseline, 6 erano in classe funzionale WHO III e 6 borderline tra II e III. Le caratteristiche demografiche sono descritte nella tabella 7.

La PSVD media della nostra casistica al basale era di $66,9 \pm 15,9$ mmHg ed era diminuita significativamente dopo 6 mesi ($54,4 \pm 19,5$ mmHg; $p < 0,001$), si è mantenuta ridotta rispetto al basale dopo 12 mesi ($60,6 \pm 17,4$ mmHg; $p = 0,018$), dopo 18 mesi ($61,6 \pm 20,5$ mmHg; $p = 0,048$) e dopo 24 mesi ($60,1 \pm 22,4$ mmHg; $p = 0,038$) di terapia con bosentan. La PSVD era ridotta in 8 pazienti (67%) ed era rimasta invariata rispetto al basale in 2 casi (17%) dopo un anno di terapia; era rimasta ridotta in 9 pazienti (75%) mentre era aumentata in 3 casi (25%) rispetto al baseline dopo due anni di trattamento (Tab. 8).

La mPAP non ha mostrato variazioni significative rispetto al basale nei due anni di trattamento con bosentan.

La distanza media percorsa al 6m-WT al basale era di $484,1 \pm 121,7$ metri ed era aumentata in maniera non significativa dopo 6 mesi ($489,8 \pm 127,2$ metri) e dopo 12 mesi ($492,0 \pm 148,9$ metri), mentre si è ridotta significativamente dopo 18 mesi ($376,0 \pm 107,1$ metri; $p < 0,001$) e 24 mesi ($395,1 \pm 113,8$ metri; $p < 0,001$) (Tab. 9).

Dopo un anno di terapia, 2 pazienti erano in III e 10 in II classe funzionale WHO; dopo due anni di follow-up, 4 erano in III e 8 mantenevano la II classe funzionale.

Effetti collaterali dovuti alla terapia sono stati rilevati in 2 pazienti che hanno presentato un rialzo significativo delle transaminasi nei primi mesi di trattamento; peraltro riducendo la dose del bosentan a 125 mg/die i segni di epatotossicità sono regrediti.

Tabella 7 - Caratteristiche demografiche dei pazienti affetti da PAH secondaria alle connettiviti sistemiche in terapia con bosentan da due anni

paziente	sexso	età (anni)	connettivite	durata connettivite	anticorpi
B.L.	F	60	sclerodermia	12	ACA
C.M.	F	43	connettivite mista	12	anti-U1RNP
C.B.	F	72	sclerodermia	7	ACA
G.G.	M	64	sclerodermia	13	ACA
F.T.	F	67	sclerodermia	9	ACA
M.F.	M	61	polimiosite	7	aspecifico
L.L.	F	60	sclerodermia	5	anti-Scl70
M.S.	M	41	LES	9	anti-DNAn
R.M.L.	F	52	sclerodermia	10	anti-Scl70
T.A.	F	57	sclerodermia	25	ACA
T.S.	F	43	sclerodermia	25	nucleolare
V.B.	F	33	LES	15	anti-DNAn

Tabella 8 - Pressione arteriosa polmonare in ventricolo destro (mmHg) in pazienti affetti da PAH secondaria alle connettiviti sistemiche in terapia da due anni

paziente	PSVD al baseline	PSVD a 3 mesi	PSVD a 6 mesi	PSVD a 12 mesi	PSVD a 18 mesi	PSVD a 24 mesi
B.L.	81	75	70	76	95	85
C.M.	97	98	100	97	100	105
C.B.	80	65	50	60	72	70
G.G.	71	70	0	71	85	85
F.T.	60	50	40	65	58	55
M.F.	70	75	45	45	45	38
L.L.	49	37	35	35	40	35
M.S.	63	60	54	58	60	55
R.ML.	50	38	35	45	35	38
T.A.	50	47	42	45	45	44
T.S.	50	47	42	55	48	46
V.B.	82	65	70	75	80	65
media	66,9	60,6	54,4	60,6	63,6	60,1
± SD	15,9	17,8	19,5	17,4	22,3	22,4
<i>p</i>		0,009	0,0009	0,036	n.s.	n.s.

Tabella 9 – Distanza percorsa al 6m-WT in pazienti affetti da PAH secondaria alle connettiviti sistemiche in terapia con bosentan da due anni

paziente	6m-WT al baseline	6m-WT a 3 mesi	6m-WT a 6 mesi	6m-WT a 12 mesi	6m-wt a 18 mesi	6m-WT a 24 mesi
B.L.	250	270	270	280	214	230
C.M.	517	450	560	630	364	360
C.B.	485	485	450	460	378	440
G.G.	540	537	562	540	308	374
F.T.	517	390	420	360	396	368
M.F.	260	250	260	230	242	240
L.L.	585	500	518	538	524	565
M.S.	672	650	675	698	512	576
R.ML.	450	460	450	450	252	270
T.A.	551	600	585	620	432	442
T.S.	518	607	607	520	510	480
V.B.	464	517	520	580	380	396
media	484,1	476,3	489,8	492,2	376,0	395,1
± SD	121,6	124,6	127,2	142,9	107,1	113,8
<i>p</i>		n.s.	n.s.	n.s.	0,0002	0,0002

Follow-up a cinque anni in pazienti affetti da PAH secondaria a connettiviti sistemiche in terapia con bosentan

9 pazienti hanno raggiunto cinque anni di follow-up; si trattava di 6 donne e 3 uomini, di età media al momento della diagnosi di $52,5 \pm 12$ anni (range 33-72); 5 erano affetti da sclerodermia, 2 da LES, 1 da connettivite mista e 1 da sindrome da anti-Jo1. Le caratteristiche demografiche sono descritte in tabella 10.

La PSVD al baseline era di $69,2 \pm 17,0$ mmHg (range 45-97) e si era ridotta, in modo statisticamente significativo, nei primi 2 anni di trattamento per poi assestarsi ai valori iniziali durante il quarto ($69,1 \pm 22,6$ mmHg; range 35-98) ed aumentare durante il quinto anno di follow-up ($72,7 \pm 29,2$ mmHg; range 35-125) senza significatività statistica ($p = n.s.$) (tab. 11).

Al momento dell'arruolamento, la distanza media percorsa da 8 pazienti era di $502,5 \pm 127,0$ metri (range 250-672). Dopo 5 anni, solo 5 pazienti (55,5%) erano ancora in grado di eseguire il 6m-WT, in media pari a $444,8 \pm 37,1$ metri (Tab. 12 e 13); gli altri 3 pazienti erano limitati sia dalla dispnea ingravescente legata al peggioramento della PAH sia da cause correlate alla connettivite, come la fibrosi polmonare, le tendiniti, le trombosi venose degli arti inferiori, l'esaurimento muscolare, i crolli vertebrali da osteoporosi.

Tutti erano stati trattati con bosentan a dosaggio pieno (250 mg/die). In 3 pazienti, a causa del peggioramento della PAH sia dal punto di vista emodinamico che della performance fisica, era stato necessario aumentare il bosentan o associarvi il sildenafil.

In particolare, 2 pazienti erano passati al dosaggio ancora maggiore del bosentan (325 mg/die), associando poi ad 1 il sildenafil, che però era stato assunto per soli due mesi per scarsa compliance; una paziente è passata a sildenafil in monoterapia per inefficacia dell'antagonista recettoriale dell'endotelina. 4 pazienti erano in ossigenoterapia.

All'inizio dello studio, 1 paziente era in II classe funzionale WHO, 2 erano borderline tra la II e la III classe e 6 erano in III classe funzionale; al termine dei cinque anni, 1 paziente ha mantenuto la II classe funzionale, 3 sono in III classe e 5 in IV classe funzionale. Complessivamente, il 56% dei pazienti aveva presentato nei

primi 3 anni di terapia una riduzione delle pressioni polmonari; a partire dal quarto anno di follow-up, abbiamo assistito ad un incremento dei valori pressori che si assestavano ai valori del baseline e nel quinto anno ad un ulteriore aumento; parallelamente vi è stato anche il peggioramento della performance fisica fino all'impossibilità di eseguire il 6m-WT.

Tabella 10 – Caratteristiche demografiche dei 9 pazienti affetti da PAH secondaria alle connettiviti sistemiche in terapia con bosentan da cinque anni

paziente	età	connettivite	durata connettivite	anticorpi
B.L.	60	sclerodermia	12	ACA
C.M.	43	connettivite mista	12	Anti-U1-RNP
C.B.	72	sclerodermia	7	ACA
C.F.	54	sclerodermia	16	Sc170
M.S.	41	LES	9	anti-DNAn
M.F.	61	polimiosite	7	aspecifico
R.ML.	52	sclerodermia	10	Sc170
R.AM.	57	s. anti-Jo1	12	anti-Jo1
V.B.	33	LES	15	Anti-DNAn

Tabella 11 – Pressione arteriosa polmonare in ventricolo destro nei 9 pazienti affetti da PAH secondaria alle connettiviti sistemiche in terapia con bosentan da cinque anni

paziente	PSVD al baseline	PSVD ad 1 anno	PSVD a 2 anni	PSVD a 3 anni	PSVD a 4 anni	PSVD a 5 anni
B.L.	81	75	78	90	95	125
C.M.	97	98	95	100	94	95
C.B.	80	65	72	86	98	99
C.F.	60	58	55	60	70	70
M.S.	49	35	37	35	35	35
M.F.	45	38	45	38	50	50
R.ML.	63	60	45	50	50	60
R.AM.	66	45	55	45	60	45
V.B.	82	75	80	75	70	75
media	69,2	61,0	62,4	64,3	69,1	72,7
± SD	17,0	20,1	19,6	24,2	22,6	29,2
<i>p</i>		0,012	0,014	n.s.	n.s.	n.s.

Tabella 12 – Distanza percorsa al 6m-WT nei 9 pazienti affetti da PAH secondaria alle connettiviti sistemiche in terapia con bosentan da cinque anni

paziente	6m-WT baseline	6m-WT a 5 anni
B.L.	250	//
C.M.	517	416
C.B.	485	//
C.F.	596	484
M.S.	672	468
M.F.	590	460
R.ML.	450	//
R.AM.	//	//
V.B.	464	396
Media	502,5	444,8
± SD	127,0	37,1

Tabella 13 – Distanza percorsa al baseline dopo 5 anni di terapia con bosentan nei 5 pazienti

paziente	6m-WT baseline	6m-WT a 5 anni
C.M.	517	416
C.F.	592	484
M.F.	590	460
M.S.	672	468
V.B.	464	396
media	567,0	444,8
± SD	79,5	37,1
<i>p</i>		<0,0001

Studio della microangiopatia coronarica in pazienti affetti da sclerodermia

Nel nostro studio sono stati reclutati 37 pazienti consecutivi affetti da sclerodermia, secondo i criteri dell'American College of Rheumatology; si trattava di 29 donne (78%) e 8 uomini (22%), l'età media era di 59 ± 13 anni (range 36-85), la durata media della connettivite era di 13 ± 9 anni (range 2-33); 21 (57%) erano affetti dalla forma limitata di malattia e 16 (43%) da quella diffusa.

In 11 casi (30%), la sclerodermia era complicata da PAH, si trattava di 4 uomini e 7 donne, di età media di 69 ± 10 anni (range 48-85); la durata media della connettivite era di $13,5\pm 7,6$ anni (range 7-30) e della PAH era di $2,8\pm 2$ anni (range 6 mesi-5 anni).

Gli anticorpi anti-nucleo erano positivi in tutti i pazienti, in particolare 13 (35%) con specificità anti-centromero (ACA), 15 (40%) con anticorpi anti-Scl70 positivi e 9 (25%) con anticorpi aspecifici.

Le caratteristiche demografiche della nostra casistica sono riassunte in tabella 14.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad ecografia transtoracica con color-Doppler per la valutazione della pressione sistolica in ventricolo destro (PSVD). I valori della PSVD sono riportati in tabella 15, nella quale si specifica se i pazienti presentavano come complicanza la PAH.

Tabella 14 - Caratteristiche demografiche dei pazienti

Paziente	Sesso	Età (anni)	Durata sclerodermia	Forma clinica	Auto-anticorpi	PAH	Durata PAH
A.L.	F	75	8	limitata	ACA	sì	2 anni
B.G.	M	85	9	limitata	ACA	sì	3 anni
B.V.	M	62	10	limitata	ACA	no	-
B.M.	F	40	11	diffusa	Scl70	no	-
C.M.	M	66	7	limitata	Scl70	sì	6 mesi
C.A.	F	46	14	diffusa	Scl70	no	-
C.R.	F	73	1	limitata	Scl70	no	-
C.Mar.	F	60	10	diffusa	aspecifico	no	-
C.G.	M	65	8	diffusa	aspecifico	sì	1 anni
C.F.	M	59	21	diffusa	Scl70	sì	5 anni
C.B.	F	77	14	limitata	ACA	sì	5 anni
D.Z.L.	F	68	19	limitata	ACA	no	-
D.L.	F	68	14	limitata	aspecifico	sì	5 mesi
D.O.	F	49	18	diffusa	ACA	no	-
D.P.	F	38	2	diffusa	Scl70	no	-
E.G.	M	51	16	limitata	Scl70	no	-
F.D.	M	57	5	limitata	ACA	no	-
F.G.	F	68	21	diffusa	ACA	no	-
F.A.	F	83	33	limitata	Scl70	no	-
F.E.	F	68	22	limitata	ACA	no	-
G.E.	F	66	23	limitata	ACA	no	-
L.D.	F	42	10	limitata	aspecifico	no	-
M.M.	F	36	2	limitata	aspecifico	no	-
M.Ma.	F	55	4	diffusa	aspecifico	no	-
M.S.	F	41	10	diffusa	Scl70	no	-
M.Mar	F	70	22	limitata	ACA	sì	6 anni
P.G	F	63	19	limitata	Scl70	no	-
P.D.	F	75	7	limitata	ACA	sì	1 anno
R.V.	F	54	12	diffusa	Scl70	no	-
R.M.	F	61	33	diffusa	Scl70	no	-
S.P.	F	37	2	limitata	aspecifico	no	-
S.L.	F	50	1	diffusa	aspecifico	no	-
T.S.	F	48	30	limitata	aspecifico	sì	5 anni
T.B.	F	39	10	diffusa	Scl70	no	-
V.R.	M	77	16	diffusa	Scl70	no	-
Z.M.	F	68	27	limitata	ACA	no	-
Z.R.	F	69	9	diffusa	Scl70	sì	2 anni

Tabella 15- PSVD nei pazienti affetti da sclerodermia con o senza PAH

Paziente	Sesso	Età (anni)	PAH	PSVD (mmHg)
A.L.	F	75	sì	57
B.G.	M	85	sì	50
B.V.	M	62	no	25
B.M.	F	40	no	25
C.M.	M	66	sì	45
C.A.	F	46	no	31
C.R.	F	73	no	25
C.Mar.	F	60	no	23
C.G.	M	65	sì	50
C.F.	M	59	sì	25
C.B.	F	77	sì	99
D.Z.L.	F	68	no	39
D.L.	F	68	sì	65
D.O.	F	49	no	30
D.P.	F	38	no	33
E.G.	M	51	no	25
F.D.	M	57	no	25
F.G.	F	68	no	28
F.A.	F	83	no	30
F.E.	F	68	no	25
G.E.	F	66	no	40
L.D.	F	42	no	29
M.M.	F	36	no	34
M.Ma.	F	55	no	30
M.S.	F	41	no	30
M.Mar	F	70	sì	72
P.G.	F	63	no	28
P.D.	F	75	sì	75
R.V.	F	54	no	31
R.M.	F	61	no	25
S.P.	F	37	no	28
S.L.	F	50	no	33
T.S.	F	48	sì	45
T.B.	F	39	no	20
V.R.	M	77	no	43
Z.M.	F	68	no	33
Z.R.	F	69	sì	72

Nei 26 pazienti (70%) affetti da sclerodermia non complicata da PAH il valore medio della PSVD era di $29 \pm 5,3$ mmHg (range 20-43).

Negli 11 casi (310%) in cui la sclerodermia era complicata da PAH il valore medio della PSVD era di 65 ± 18 mmHg (range 45-99).

Dopo aver valutato la PSVD, tutti i pazienti eseguivano un'ecocardiografia trans toracica con infusione endovenosa di adenosina. Mediante tale metodica strumentale non invasiva è stato possibile misurare la velocità di flusso diastolico nell'arteria coronarica discendente anteriore prima e durante l'infusione di adenosina.

La frequenza cardiaca (FC) e la pressione arteriosa (PA) sono state monitorate sia a riposo che ad ogni minuto di infusione. Nel nostro studio sono stati valutati i valori della frequenza cardiaca e della pressione arteriosa in condizioni basali e all'ultimo minuto di infusione di adenosina, riportati nella tabella 16.

Tabella 16 – Frequenza cardiaca (bpm) e pressione arteriosa sistolica e diastolica (mmHg) durante l'esecuzione della CFR, prima e all'ultimo minuto di infusione dell'adenosina

Paziente	Sesso	Frequenza cardiaca		PAO sistolica		PAO diastolica	
		basale	adenosina	basale	adenosina	basale	adenosina
A.L.	F	85	94	125	120	75	60
B.G.	M	63	78	185	140	85	70
B.V.	M	72	70	110	90	70	50
B.M.	F	77	113	100	90	60	50
C.M.	M	59	94	120	125	80	80
C.A.	F	72	110	110	115	80	80
C.R.	F	71	71	115	115	80	80
C.Mar.	F	70	82	150	110	80	50
C.G.	M	78	57	140	150	80	80
C.F.	M	78	57	160	140	85	80
C.B.	F	80	86	140	120	80	80
D.Z.L.	F	80	84	150	145	70	70
D.L.	F	70	75	110	90	70	60
D.O.	F	81	101	100	80	70	50
D.P.	F	87	118	120	115	70	65
E.G.	M	68	70	120	115	70	65
F.D.	M	77	102	140	120	80	70
F.G.	F	58	71	150	130	80	70
F.A.	F	69	73	110	115	70	65
F.E.	F	76	91	120	140	70	50
G.E.	F	75	80	120	110	80	70
L.D.	F	90	91	115	110	65	60
M.M.	F	81	112	140	120	80	70
M.Ma.	F	79	97	160	150	90	80
M.S.	F	70	82	90	90	60	60
M.Mar	F	62	66	150	130	80	60
P.G.	F	68	91	120	140	80	70
P.D.	F	97	100	140	120	70	60
R.V.	F	76	112	115	115	70	70
R.M.	F	67	78	100	100	60	55
S.P.	F	106	133	120	120	80	70
S.L.	F	85	98	125	95	65	50
T.S.	F	75	91	130	95	70	60
T.B.	F	83	95	120	120	70	70
V.R.	M	72	68	110	100	60	60
Z.M.	F	76	89	125	90	70	60
Z.R.	F	88	89	140	130	90	70

Durante l'esecuzione della CFR, la frequenza cardiaca è risultata aumentata mentre la pressione arteriosa sistolica e diastolica si sono ridotte nella maggior parte dei pazienti, come anche descritto in numerosi studi (34).

In dettaglio, la frequenza cardiaca è aumentata in 33 pazienti (89%), si è ridotta in 2 (5,5%) ed è rimasta invariata in 2 casi (5,5%) (Fig. 1).

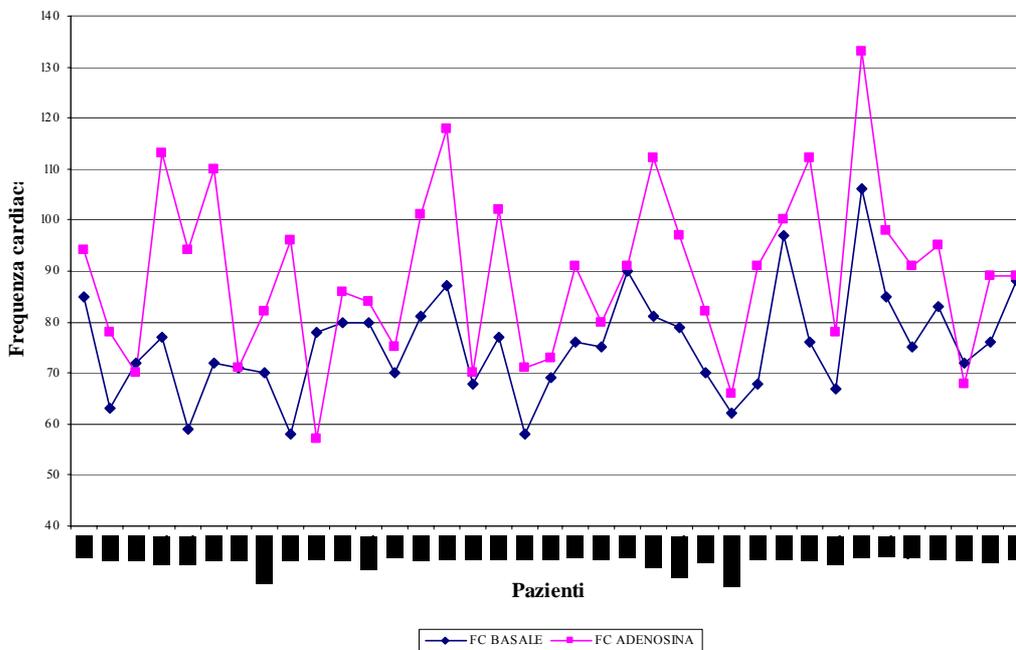


Figura 1 – Variazioni della frequenza cardiaca (bpm) prima e durante l'ultimo minuto di infusione dell'adenosina in corso di CFR.

La pressione arteriosa sistolica è risultata ridotta in 26 pazienti (70%), aumentata in 7 (19%) ed è invariata in 4 pazienti (11%) (Fig. 2)

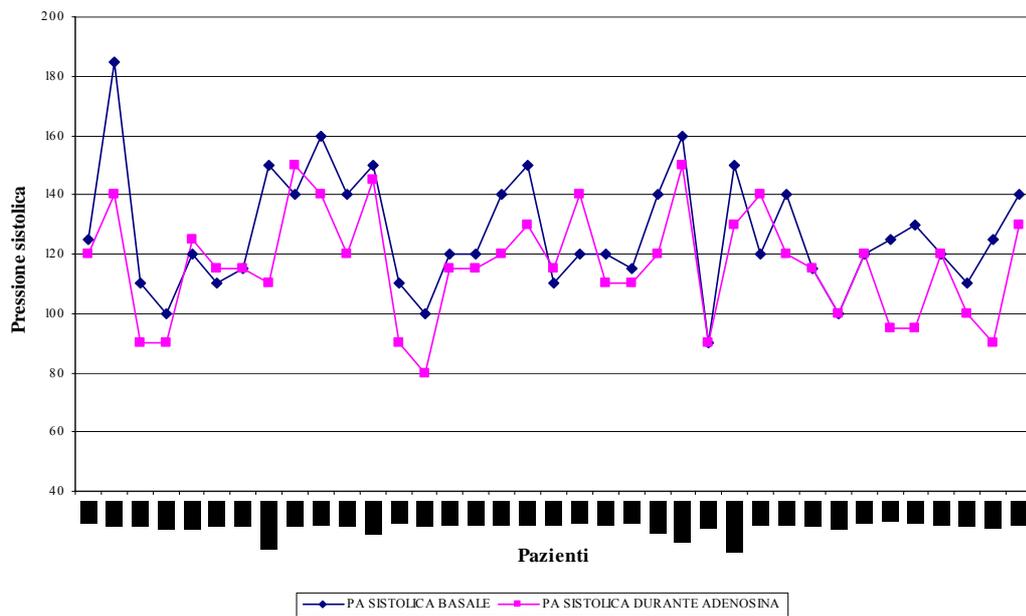


Figura 2 – Variazioni della pressione arteriosa sistolica (mmHg) prima e durante l'ultimo minuto di infusione di adenosina in corso di CFR.

La pressione arteriosa diastolica è risultata ridotta rispetto al basale in 27 pazienti (73%), invariata in 10 (27%) e non si è registrato alcun incremento in nessun caso (Fig. 3).

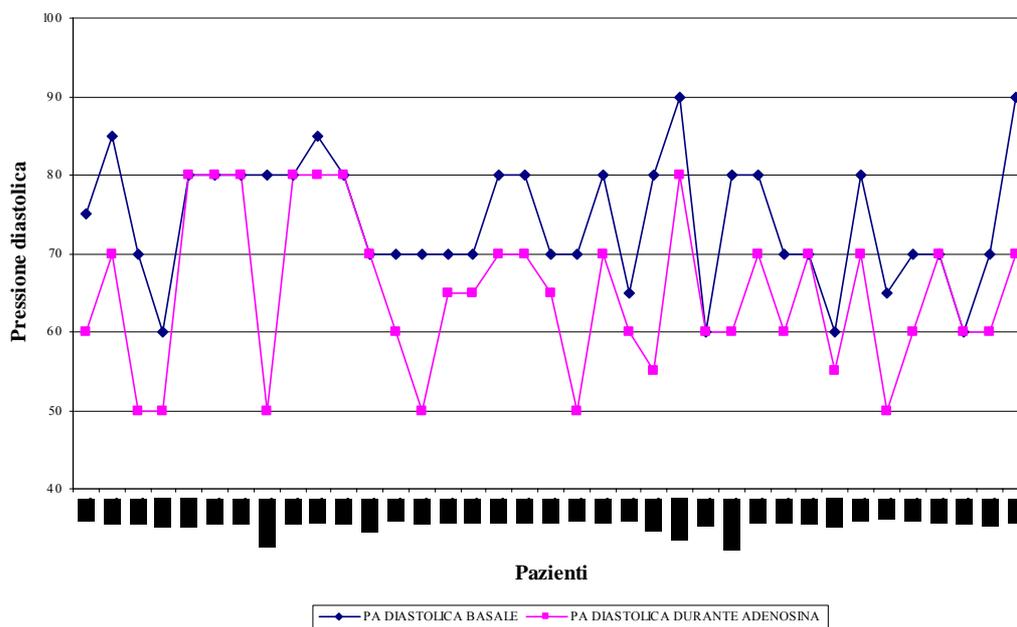


Figura 3. Variazioni della pressione arteriosa diastolica (mmHg) prima e durante l'ultimo minuto di infusione dell'adenosina in corso di CFR.

In tutti i 38 pazienti dello studio abbiamo valutato la riserva del flusso coronarico (CFR, coronary flow reserve) nell'arteria coronaria discendente anteriore; i valori sono riportati in tabella 17.

Tale valore è dato dal rapporto tra il flusso coronarico al picco durante infusione endovenosa di adenosina ed il flusso al basale ed è stato calcolato attraverso la formula:

$$\text{CFR} = \text{Vmax durante adenosina} / \text{Vmax basale}$$

Abbiamo considerato come normale un valore di $\text{CFR} \geq 2,5$. La media della CFR nella nostra casistica era pari a $2,44 \pm 0,79$; è risultata inferiore a 2,5 in 22 pazienti (60%), mentre nei restanti 15 pazienti (40%) è risultata maggiore o uguale al valore di riferimento con media di $3,11 \pm 0,62$.

Nella popolazione dei pazienti sclerodermici, la CFR è risultata significativamente inferiore rispetto ad un gruppo di controllo di pari sesso ed età ($2,44 \pm 0,79$ versus $3,3 \pm 0,4$; $p < 0,0001$).

Scopo del nostro studio è stato di identificare i determinanti della CFR in pazienti affetti da sclerodermia complicata o meno da PAH.

Nella nostra casistica, vi è una maggiore frequenza di pazienti con valore di CFR compreso tra 2 e 3 (19 pazienti, 51%); in particolare, 12 soggetti (32%) hanno una CFR compresa tra 2 e 2,4 e 7 soggetti (19%) presentano valori tra 2,5 e 3.

Tabella 17 – Valori della CFR nella nostra casistica

Paziente	Sesso	Età (anni)	CFR
A.L.	F	75	2,5
B.G.	M	85	4,0
B.V.	M	62	1,9
B.M.	F	40	2,5
C.M.	M	66	1,1
C.A.	F	46	3,4
C.R.	F	73	2,1
C.Mar.	F	60	2,7
C.G.	M	65	1,8
C.F.	M	59	2,3
C.B.	F	77	1,1
D.Z.L.	F	68	1,3
D.L.	F	68	2,4
D.O.	F	49	2,0
D.P.	F	38	2,6
E.G.	M	51	2,1
F.D.	M	57	3,2
F.G.	F	68	3,3
F.A.	F	83	1,5
F.E.	F	68	2,4
G.E.	F	66	1,9
L.D.	F	42	1,3
M.M.	F	36	4,8
M.Ma.	F	55	3,3
M.S.	F	41	3,5
M.Mar	F	70	2,1
P.G	F	63	2,3
P.D.	F	75	1,7
R.V.	F	54	2,3
R.M.	F	61	3,2
S.P.	F	37	1,0
S.L.	F	50	2,3
T.S.	F	46	2,5
T.B.	F	39	2,2
V.R.	M	77	1,5
Z.M.	F	68	2,7
Z.R.	F	69	2,4

Abbiamo valutato se le forme cliniche di sclerodermia, forma cutanea limitata e diffusa, possano influire sulla CFR. Nella nostra casistica, 16 pazienti (43%) avevano la forma diffusa con CFR media di $2,59 \pm 0,58$; 21 (57%) avevano quella limitata con CFR media di $2,32 \pm 0,94$. La media risulta lievemente inferiore per i pazienti affetti dalla forma limitata della sclerodermia, senza significatività statistica ($p=0,18$) (Fig. 4).

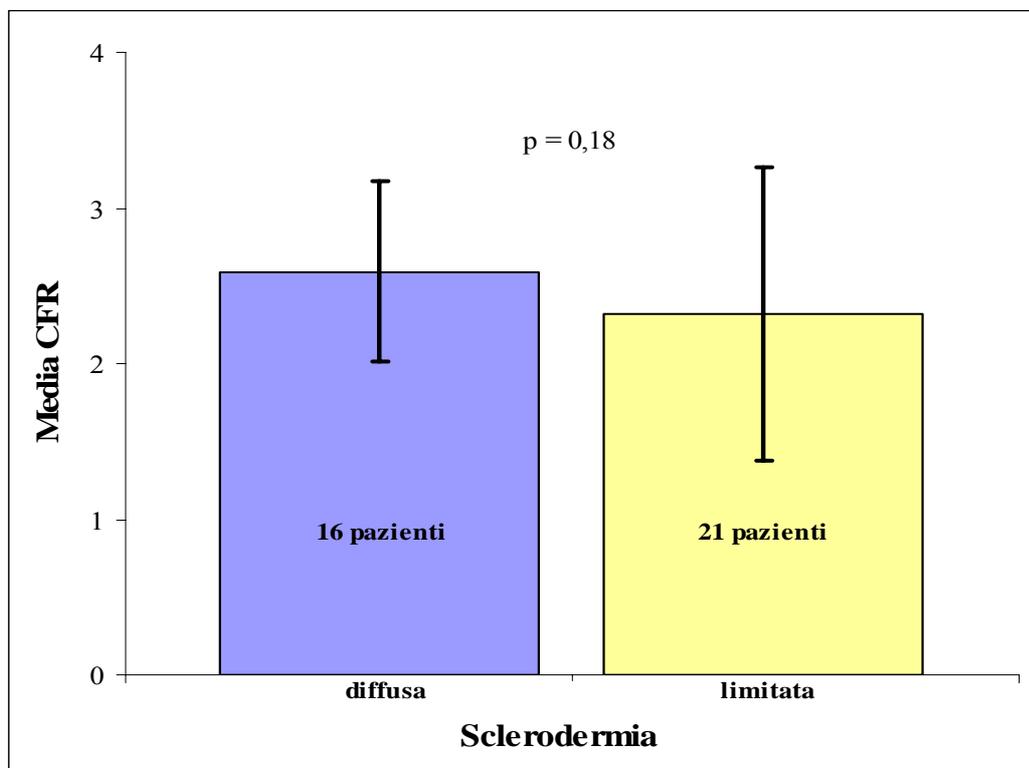


Figura 4. Istogramma dei valori di CFR nei pazienti affetti da sclerodermia, forma cutanea diffusa e limitata.

Abbiamo confrontato il valore della CFR tra i due gruppi anticorpali specifici, considerando i pazienti ACA positivi ed anti-Scl70 positivi; in dettaglio, i pazienti con positività per l'anticorpo ACA erano 13 (35%) e la media della CFR era di $2,23 \pm 0,76$, quelli con positività dell'anticorpo anti-Scl70 erano 15 (40%) e il valore medio della CFR era di $2,46 \pm 0,59$ (Fig. 5).

La media della CFR dei pazienti ACA positivi risulta inferiore rispetto a quelli Scl70 positivi; tuttavia la differenza tra le due medie non è risultata statisticamente significativa ($p=0,24$)

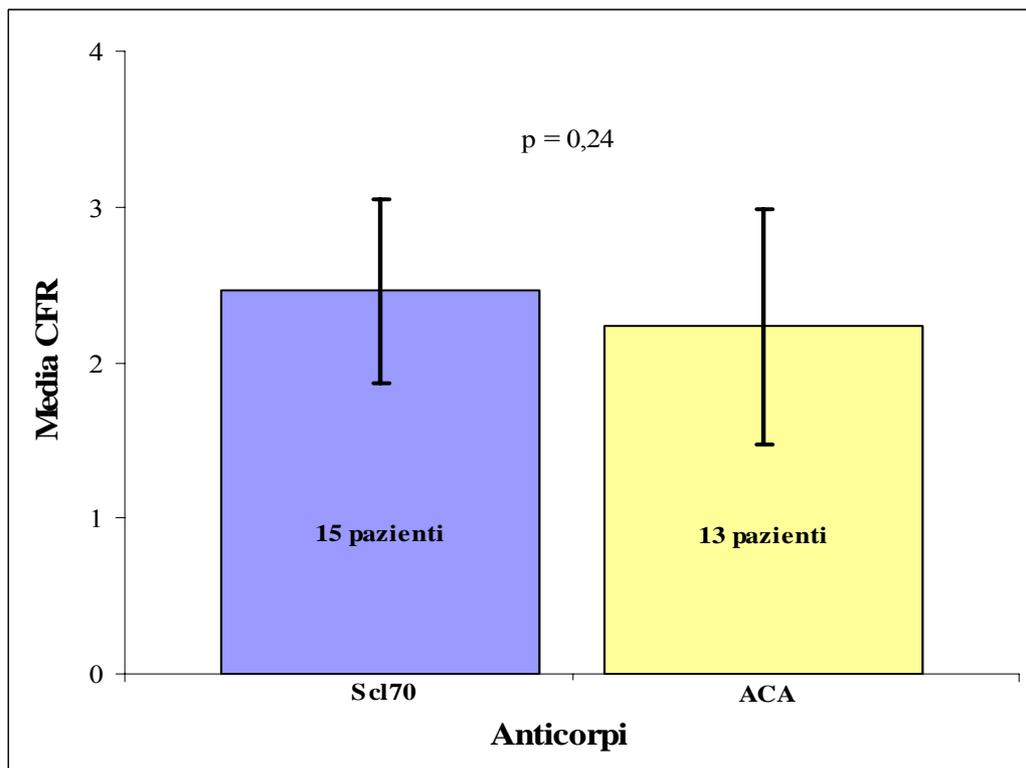


Figura 5 – Istogramma dei valori della CFR nei pazienti con positività degli anticorpi ACA ed Scl70.

Abbiamo poi studiato se la durata della connettivite potesse essere un fattore implicato nella microangiopatia coronarica e che quindi potesse influenzare la CFR.

La durata media della sclerodermia nella nostra casistica era di 13 ± 9 anni (range 2-33). Abbiamo suddiviso i pazienti in fasce di intervalli di 5 anni.

Le caratteristiche demografiche e la media dei valori di CFR per durata di malattia sono riassunte nelle tabelle 18 e 19.

Tabella 18 – Caratteristiche demografiche, durata di malattia e valori di CFR della nostra casistica

Paziente	Sesso	Età (anni)	Durata sclerodermia	CFR
A.L.	F	74	5	2,5
B.G.	M	85	5	4,0
B.V.	M	62	10	1,9
B.M.	F	40	11	2,5
C.M.	M	66	7	1,1
C.A.	F	46	14	3,4
C.R.	F	73	1	2,1
C.Mar.	F	60	10	2,7
C.G.	M	65	1	1,8
C.F.	M	58	17	2,3
C.B.	F	72	9	1,1
D.Z.L.	F	68	19	1,3
D.L.	F	68	14	2,4
D.O.	F	49	18	2,0
D.P.	F	38	2	2,6
E.G.	M	51	16	2,1
F.D.	M	57	5	3,2
F.G.	F	68	21	3,3
F.A.	F	83	33	1,5
F.E.	F	68	22	2,4
G.E.	F	66	23	1,9
L.D.	F	42	10	1,3
M.M.	F	36	2	4,8
M.Ma.	F	55	4	3,3
M.S.	F	41	10	3,5
M.Mar	F	70	22	2,1
P.G	F	63	19	2,3
P.D.	F	75	13	1,7
R.V.	F	54	12	2,3
R.M.	F	61	33	3,2
S.P.	F	37	2	1,0
S.L.	F	50	1	2,3
T.S.	F	46	30	2,5
T.B.	F	39	10	2,2
V.R.	M	77	16	1,5
Z.M.	F	68	27	2,7
Z.R.	F	68	8	2,4

Abbiamo suddiviso i pazienti in base alla durata della connettivite in 5 gruppi; nel primo gruppo sono compresi 10 pazienti (27%) affetti da sclerodermia negli ultimi 5 anni (CFR media di $2,76\pm 1,10$), nel secondo 8 (21,5%) pazienti avevano la connettivite da 6 a 10 anni ($2,02\pm 0,79$), nel terzo, 5 soggetti (13,5%) ammalati da 11 a 15 anni ($2,46\pm 0,61$), nel quarto la sclerodermia aveva una durata da 16 a 20 anni per 6 casi (16,5%) con CFR media di $1,91\pm 0,42$, nel quinto gruppo 8 pazienti (21,5%) avevano la connettivite da più di 20 anni ($2,45\pm 0,61$).

Tabella 19 – Suddivisione dei pazienti in base alla durata di malattia in quinquenni

gruppo	durata di malattia	pazienti	CFR
I	0 – 5 anni	10	$2,76\pm 1,10$
II	6 – 10 anni	8	$2,02\pm 0,79$
III	11 – 15 anni	5	$2,46\pm 0,61$
IV	16 – 20 anni	6	$1,91\pm 0,42$
V	> 20 anni	8	$2,45\pm 0,61$

Nel gruppo di pazienti con più breve storia di sclerodermia, solo 4 (40%) avevano una CFR ridotta; nei gruppi successivi, all'aumentare della durata della connettivite, aumentava anche il numero di pazienti con CFR ridotta fino al gruppo con storia di connettivite dai 16 ai 20 anni in cui tutti i 6 pazienti avevano una CFR ridotta.

La differenza tra le medie risulta significativa quando vengono confrontati il gruppo I con il gruppo IV ($p=0,05$) (Fig.6).

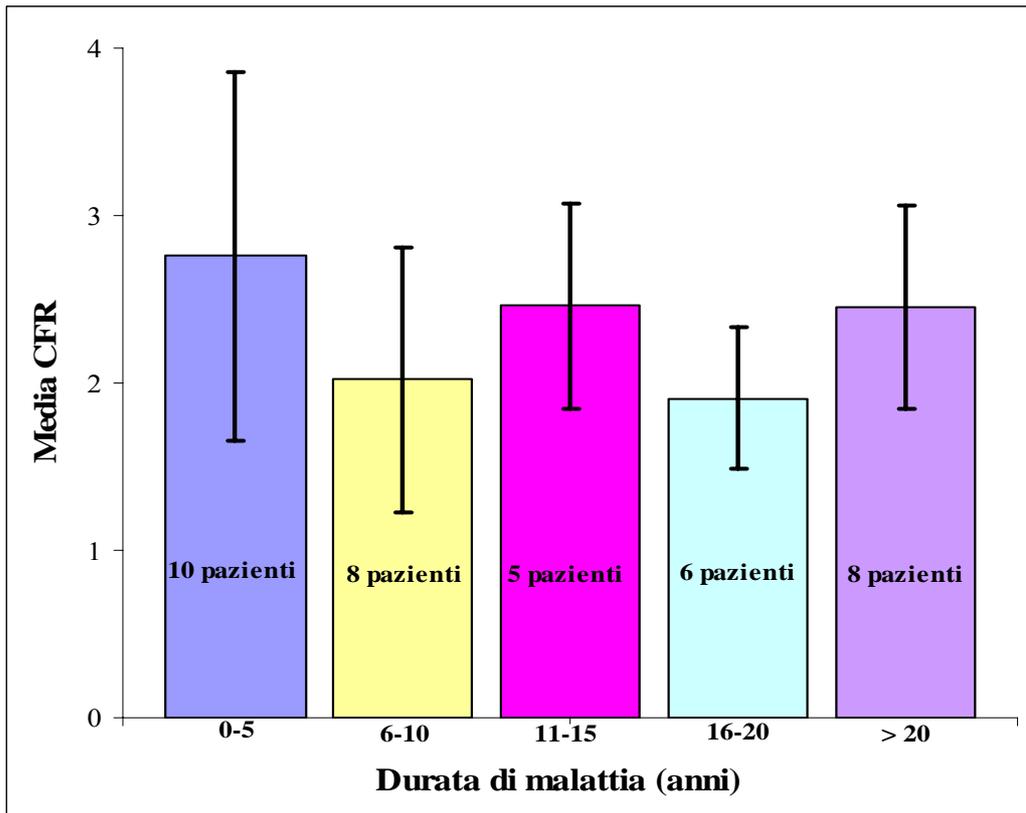


Figura 6 – Istogramma della CFR in base ai gruppi di pazienti suddivisi per durata di malattia.

Abbiamo confrontato il valore medio di CFR nei pazienti affetti da sclerodermia complicata o meno da PAH. La media di CFR nei pazienti affetti dalla connettivite non complicata da PAH è di $2,34 \pm 0,86$; quella nei soggetti in cui la sclerodermia è complicata dalla PAH è di $2,38 \pm 0,78$. Le caratteristiche demografiche dei pazienti complicati da PAH sono riassunti in tabella 20.

La presenza di PAH non modifica in modo statisticamente significativo il valore della CFR rispetto ai pazienti che hanno una connettivite complicata da tale malattia ($p=0,67$) (Fig. 7)

Tabella 20 – Valori di CFR nei pazienti con sclerodermia complicata da PAH

Paziente	Sesso	Età (anni)	CFR
A.L.	F	75	2,5
B.G.	M	85	4,0
C.A.	F	46	3,4
C.G.	M	65	1,8
C.B.	F	77	1,1
C.F.	M	59	2,3
D.L.	F	68	2,4
M.Mar	F	70	2,1
P.D.	F	75	1,7
T.S.	F	46	2,5
Z.R.	F	69	2,4

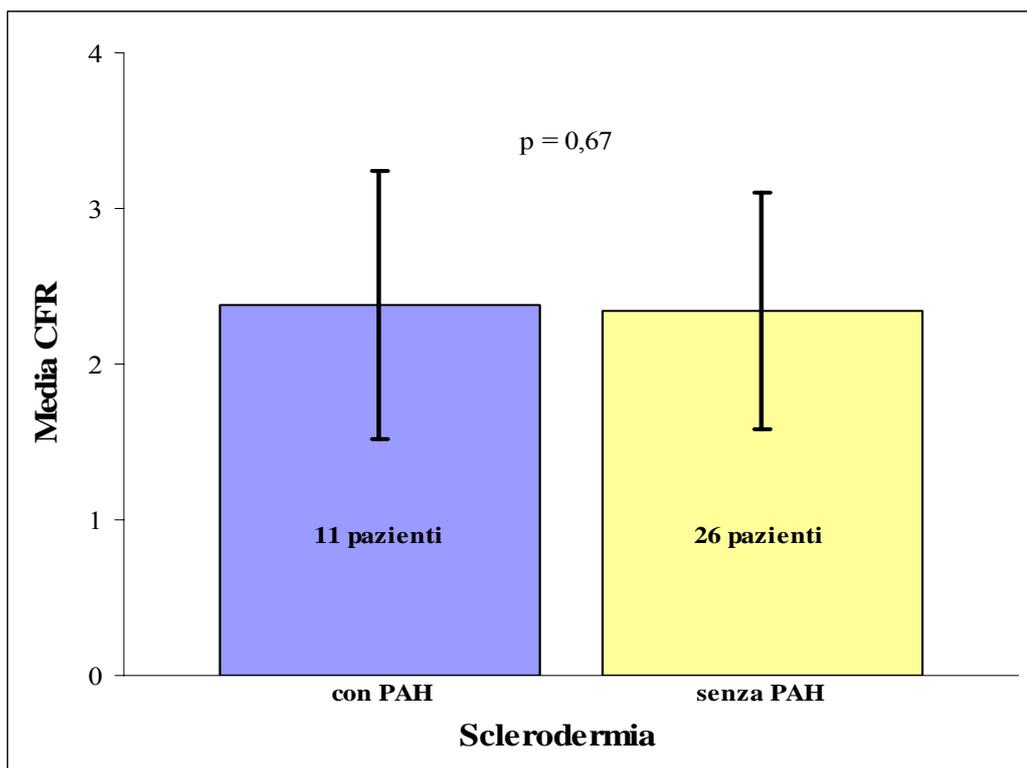


Figura 7 – Istogramma della CFR in pazienti affetti da sclerodermia complicata o meno da PAH.

Tra gli 11 pazienti complicati da PAH, 8 erano in terapia con bosentan; la CFR media era di $2,36 \pm 0,82$; negli altri 3 casi, in cui la PAH non era trattata era di $2,43 \pm 0,85$; la differenza tra le medie non è statisticamente significativa ($p=0,59$) (Fig.8).

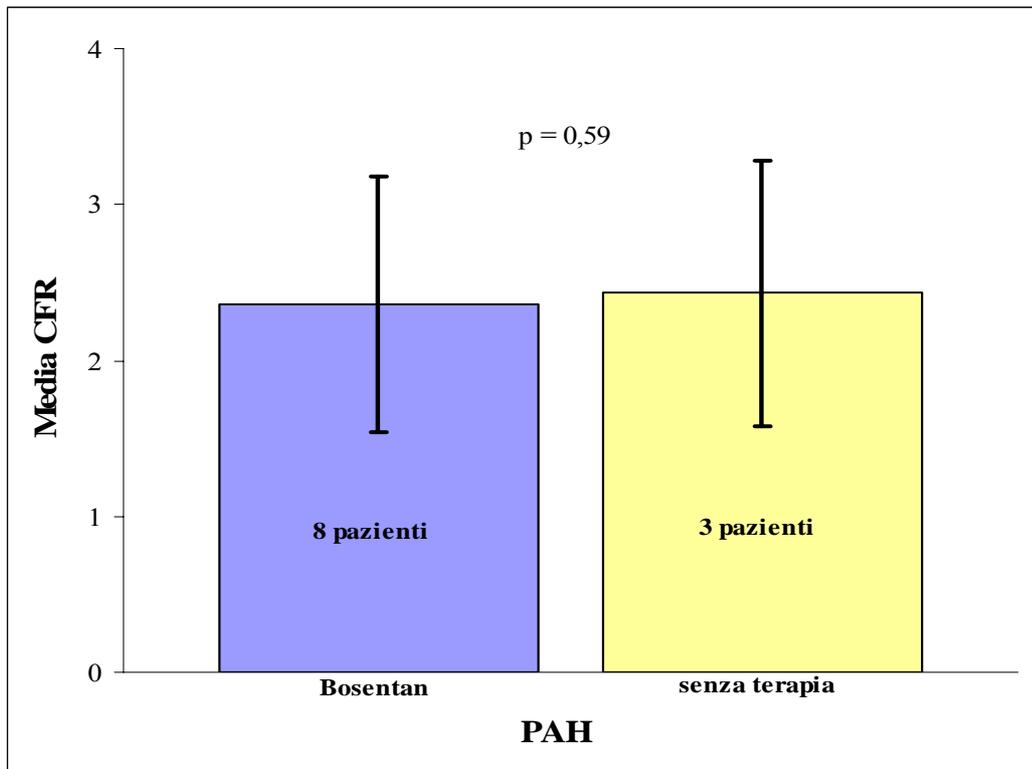


Figura 8 – Istogramma della CFR dei pazienti con PAH in terapia con bosentan e senza trattamento

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Studio di pazienti affetti da PAH secondaria alle connettiviti

Nell'ultimo ventennio, la terapia della PAH si è avvalsa di nuove molecole che hanno permesso di migliorare la prognosi della malattia. Tra esse, i prostanoidi giocano un ruolo di rilievo: l'epoprostenolo in infusione continua endovenosa è in grado di migliorare la sopravvivenza a lungo termine nei pazienti affetti da ipertensione polmonare idiopatica (76,77); il treprostnil, somministrato in infusione continua sottocutanea, incrementa la tolleranza all'esercizio fisico e riduce le resistenze vascolari polmonari (79,80); l'iloprost per via inalatoria agisce sul 6m-WT e nel miglioramento della classe funzionale WHO (81); il beraprost, il primo analogo della prostaciclina a somministrazione orale, aumenta la tolleranza all'esercizio fisico in pazienti affetti dalla forma idiopatica di PAH (57,82). Tra gli altri farmaci, il sildenafil, inibitore della 5-fosfodiesterasi, ha un effetto vasodilatatore selettivo sul piccolo circolo polmonare, riducendo le resistenze vascolari (57,22,23).

L'antagonista recettoriale dell'endotelina-1, bosentan, ha acquisito in questi anni un'importanza strategica nella terapia della PAH idiopatica e secondaria alle connettiviti. Due studi pilota randomizzati in doppio cieco (Channick *et al.*, 2001; Rubin *et al.*, 2002) hanno mostrato il miglioramento della performance funzionale e la riduzione delle resistenze vascolari polmonari dopo 16 settimane di terapia (60,61). Secondo McLaughlin *et al.* (2006), la sopravvivenza in 169 pazienti affetti da ipertensione polmonare idiopatica in monoterapia con bosentan era dell'85% ad un anno e del 70% a due anni (81), mentre quella predittiva secondo il NHI Registry era rispettivamente del 69% e 57%. Nei pazienti con PAH secondaria alla sclerodermia, la sopravvivenza ad uno, a due ed a tre anni risultava rispettivamente dell'82%, 67% e 64%, contro il 45%, 35% e 28% dei pazienti che avevano assunto solo terapia convenzionale. Tali dati sono stati confermati anche da Williams *et al.* (90), secondo

il quale la sopravvivenza ad uno e a due anni era dell'81% e del 71% nei pazienti trattati con bosentan, contro rispettivamente il 68% e il 47% del gruppo storico del NHI Registry.

Il nostro studio riporta i risultati di un follow-up a breve e a lungo termine in un gruppo di pazienti affetti da connettiviti trattati con bosentan. Nel primo anno di terapia, vi è stata una riduzione della PSVD statisticamente significativa dopo 3, 6 e 12 mesi. La distanza percorsa al 6m-WT è aumentata in media di 14 metri dopo 3 mesi, 27 metri dopo 6 mesi e 30 metri dopo 12 mesi. In 8 soggetti (62%) vi è stato anche il miglioramento della classe funzionale WHO.

Dopo due anni di terapia, il bosentan ha mantenuto ridotti rispetto al baseline i valori di PSVD, assestandoli su quelli registrati a 12 mesi. La tolleranza allo sforzo fisico invece è diminuita in modo significativo. Si sono manifestate alcune complicanze delle connettiviti a carico degli arti inferiori (in tre casi trombosi venosa, tendinite, artrite) e peggioramento della concomitante fibrosi polmonare in un caso, che hanno inciso notevolmente sulla riduzione della distanza percorsa in 6 minuti (in media di 108 metri); peraltro, anche negli altri 8 pazienti (67%) la capacità funzionale si è ridotta e la distanza percorsa è diminuita in media di 79 metri. Questi dati suggeriscono che il 6m-WT non rappresenta un adeguato test di valutazione della capacità di esercizio nei pazienti affetti da PAH secondaria alle connettiviti sistemiche, in accordo con i dati della letteratura (52,85).

Negli anni successivi, la PSVD tendeva a risalire, seppur in modo non statisticamente significativo; in particolare, al quinto anno è rimasta ridotta in 3 pazienti, sovrapponibile al baseline in 2 ed aumentata in 4. Dopo cinque anni di trattamento, 5 pazienti erano ancora in grado di eseguire il 6m-WT, ma la distanza media percorsa al 6m-WT si è ridotta di 119 metri rispetto al baseline ($p < 0,001$). Gli altri 4 pazienti non erano in grado di eseguire il test sia per le complicanze correlate alle connettiviti (fibrosi polmonare) per il peggioramento della concomitante fibrosi polmonare in due di essi e per deterioramento della PAH con dispnea ingravescente e scompenso cardiaco negli altri due.

Questi dati mostrano che la risposta al bosentan è buona nel primo anno di terapia, si assesta su valori stabilizzati nel secondo, per poi mediamente ridursi negli anni successivi; ciò suggerisce l'opportunità di potenziarne l'effetto associandovi un

secondo farmaco, che agisca con un meccanismo d'azione diverso sulla PAH, in modo da intervenire su più targets etiopatogenetici.

In effetti i trattamenti di combinazione sembrano costituire il gold standard nella terapia di questa temibile complicanza delle connettiviti sistemiche (85). Al bosentan si associa un altro farmaco qualora vi sia un peggioramento clinico o un mancato miglioramento della classe funzionale. Il farmaco aggiunto può essere il sildenafil, l'iloprost per via inalatoria o l'epoprostenolo in infusione continua endovenosa secondo la terapia di combinazione sequenziale (60,83,84,91); quest'ultimo è l'unico dimostratosi efficace nel migliorare la sopravvivenza nei pazienti in IV classe funzionale WHO (57). Non vi sono però criteri standardizzati che possano guidare il clinico nell'individuare il timing per modificare la terapia della PAH; secondo Mathai *et al.* (84), alla terapia con bosentan è necessario associare sildenafil nel momento in cui vi è il peggioramento della dispnea e dell'astenia o della classe funzionale WHO o una riduzione di almeno 30 metri al 6m-WT. Secondo i dati della letteratura, si considera in media che il bosentan migliori i valori emodinamici e la performance fisica per un periodo in media di due anni, poi la sua efficacia tende a ridursi nel tempo; a questo punto perciò si dovrebbe associare un altro farmaco. Nella nostra esperienza, tale dato è confermato, ma abbiamo avuto la possibilità di utilizzare il sildenafil e l'iloprost per via inalatoria solo nell'ultimo anno di follow-up, per cui spesso abbiamo incrementato il dosaggio dell'antagonista dell'endotelina a 325 mg/die. Il profilo di sicurezza del bosentan si è mantenuto anche a tali dosaggi.

Un'altra opzione terapeutica è di iniziare subito con la terapia di combinazione in modo tale da agire su diversi targets etiopatologici della PAH riducendo gli eventi avversi correlati al singolo farmaco e senza attendere l'inefficacia della monoterapia o il peggioramento dei parametri emodinamici e funzionali. Solo uno studio (BREATHE-2) ha confrontato la terapia di combinazione bosentan-epoprostenolo in infusione continua con epoprostenolo in monoterapia: con il trattamento di combinazione vi è stata una maggiore riduzione delle resistenze vascolari polmonari, sebbene non significativa, senza però ottenere un miglioramento della distanza percorsa al 6m-WT (92).

Studio della microangiopatia coronarica in pazienti affetti da sclerodermia

Nella sclerosi sistemica, l'interessamento cardiaco è segnalato dal 50 all'80% dei pazienti, ma spesso senza segni e sintomi evidenti (86,87); in particolare, le arterie coronarie epicardiche sono angiograficamente indenni, mentre vi è una riduzione del flusso coronarico (87). Abbiamo perciò studiato la microangiopatia coronarica in pazienti affetti da sclerodermia grazie alla valutazione della riserva coronarica (CFR): tale metodo non invasivo si avvale di un ecocardiogramma transtoracico e può individuare precocemente un'alterazione del circolo coronarico in pazienti asintomatici.

Nel nostro studio abbiamo correlato i valori della CFR con la forma clinica della connettivite, il pattern anticorpale, la durata della malattia, la concomitante presenza della PAH e in questo gruppo di pazienti, la terapia con bosentan. Nessun paziente presentava sintomi da riferirsi ad interessamento cardiaco.

I pazienti affetti dalla forma diffusa di sclerodermia presentano una CFR maggiore rispetto a quelli con la forma limitata, sebbene la differenza tra le medie non sia statisticamente significativa; Montisci *et al.* (93) e Sulli *et al.* (87) hanno invece dimostrato come pazienti affetti dalla forma diffusa di malattia presentino maggiormente un interessamento cardiaco con valori di CFR ridotti rispetto al gruppo con la forma limitata di sclerodermia. Bisogna considerare che nel nostro studio 6 dei 22 pazienti con la forma limitata di malattia erano in terapia con bosentan per la concomitante PAH.

Prendendo in considerazione il pattern anticorpale specifico, la CFR del gruppo di pazienti ACA positivo era maggiormente ridotta rispetto a quelli anti-Scl70, sebbene in modo non statisticamente significativo; ciò in accordo con la letteratura (87,93).

I valori di CFR non sono risultati correlati neanche con la durata della malattia, mentre altri Autori (93) hanno descritto un trend, sebbene non significativo, tra CFR e durata di malattia, per cui vi sarebbe una progressiva riduzione della CFR man mano che la sclerodermia diventa di vecchia data.

Nel nostro studio abbiamo dimostrato che la CFR media dei pazienti con la forma limitata di malattia e con positività degli anticorpi ACA non è risultata

significativamente ridotta rispetto ai pazienti affetti dalla forma diffusa e con positività dell'anticorpo anti-Scl70.

Una riduzione della CFR nei pazienti sclerodermici verosimilmente indica un coinvolgimento del microcircolo coronarico: Kahan *et al.* (1985) e successivamente Vacca *et al.* (2006) hanno dimostrato che una ridotta CFR in questi pazienti non è causata da stenosi delle arterie coronariche epicardiche, ma da una disfunzione del microcircolo coronarico (94,95).

E' ormai noto che pazienti affetti dalla forma limitata di sclerodermia e positività degli anticorpi ACA hanno un maggior rischio di sviluppare PAH, con una mediana di 14 anni dalla diagnosi della connettivite (42,43). Tali pazienti richiedono perciò un regolare monitoraggio delle resistenze vascolari polmonari mediante ecocardiografia transtoracica. La correlazione delle CFR dei pazienti con e senza PAH non si è dimostrata statisticamente significativa e la presenza di elevate resistenze vascolari polmonari non ha modificato significativamente il valore della CFR rispetto ai pazienti affetti da sclerodermia non complicata. 8 pazienti affetti da PAH erano in terapia con il bosentan, a dosaggio di 250 mg/die. Secondo Allanore *et al.* (96), la perfusione miocardica è aumentata in corso di terapia con bosentan nei pazienti affetti da sclerodermia non complicata da PAH in modo statisticamente significativo rispetto ai controlli; tale dato veniva verificato con la risonanza magnetica cardiaca.

Al contrario, nel nostro studio abbiamo utilizzato la CFR, metodica completamente differente che permette di valutare direttamente il flusso coronarico; i pazienti affetti da PAH in trattamento con l'antagonista recettoriale dell'endotelina-1 hanno una CFR media simile a quella dei pazienti senza terapia; il bosentan non ha perciò un'azione vasodilatatrice sul microcircolo coronarico preso in esame perché non è suscettibile di ulteriore vasodilatazione.

Riteniamo infatti che la CFR non sia ridotta nei pazienti sclerodermici con la forma cutanea limitata di malattia, maggiormente a rischio di sviluppare la PAH come complicanza della connettivite, poiché il substrato endoteliale target è rappresentato da quello polmonare e perciò la microangiopatia coronarica non è particolarmente espressa in questi soggetti. Dall'altro lato, i pazienti affetti dalla forma diffusa hanno una CFR ridotta rispetto ai controlli, come descritto da Montisci

et al. (2003), Sulli *et al.* (2004) e Vacca *et al.* (2006) perché è il microcircolo coronarico in questi pazienti ad essere coinvolto (87,93,95).

Riteniamo quindi che non vi sia correlazione tra CFR ed ipertensione polmonare, ovvero circolo polmonare e microcircolo coronarico, endotelio polmonare ed endotelio coronarico quanto piuttosto che ipertensione polmonare e CFR debbano essere considerati rispetto alla forma cutanea di malattia; la correlazione è perciò tra forma limitata di sclerodermia e l'ipertensione polmonare ovvero l'endotelio polmonare da una parte, la forma diffusa e la riduzione della CFR, ovvero l'endotelio coronarico, dall'altro.

I dati della letteratura mostrano che nella sclerodermia il coinvolgimento del circolo polmonare prevale su quello coronarico. L'alterazione endoteliale del piccolo circolo ha sul cuore effetti devastanti provocando lo scompenso cardiaco grave, con conseguente aumento di morbilità e mortalità. Il coinvolgimento del circolo coronarico nel decorso della connettivite, invece, richiede ancora studi approfonditi.

La valutazione della CFR grazie ad un'ecocardiografia Doppler transtoracica nei pazienti sclerodermici in assenza di segni e sintomi indicanti un coinvolgimento cardiaco è una metodica non invasiva, ben tollerata ed efficace per lo studio del microcircolo coronarico.

La riduzione della CFR dovrebbe essere considerata come un indice di coinvolgimento preclinico coronarico della scleroderma; tuttavia, il suo significato prognostico dovrà essere ulteriormente indagato.

Nel nostro studio, la casistica considerata è comunque limitata, soprattutto esiguo era il campione di pazienti con PAH secondaria. Se i successivi dati confermeranno un progressivo coinvolgimento della CFR nel decorso clinico della sclerodermia, la sua valutazione con metodo non invasivo attraverso l'ecocardiografia transtoracica potrebbe essere considerato uno strumento utile di screening per stimare l'attività di malattia sul circolo coronarico. Potrebbero essere valutati in tal modo anche i segni precoci di microangiopatia coronarica nei pazienti sclerodermici ed essere così monitorati sia la progressione della malattia che gli effetti della terapia coronaro-attiva.

BIBLIOGRAFIA

1. Humbert M, Sitbon O, Simonneau G. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *The New England Journal of Medicine*. 2004; 351:1425-36.
2. Galiè N, Torbicki A, Barst R. Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal*. 2004; 25:2243-2278.
3. Simonneau G, Galiè N, Rubin LJ. Clinical classification of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004; 43:5S-12S.
4. McLaughlin VV, Rich S. Pulmonary hypertension. *Current Problems in Cardiology*. 2004; 29(10):575-634.
5. Galiè N, Manes A, Branzi A. Evaluation of pulmonary arterial hypertension. *Current Opinion in Cardiology*. 2004; 19:575-581.
6. Barst RJ, McGoon M, Torbicki A. Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension. *Journal of American College of Cardiology*. 2004; 42:40S-47S.
7. D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM. Survival in patients with primary pulmonary hypertension: results from a national prospective registry. *Annals of Internal Medicine*. 1991; 115:343-349.

8. Mukerjee D, St George D, Coleiro B, Knight C, Denton CP, Davar J, Black CM, Coghlan JG. Prevalence and outcome in systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension: application of a registry approach. *Annals of the Rheumatic Disease*. 2003; 62:1088-1093.
9. McLaughlin VV. Survival in patients with pulmonary arterial hypertension treated with first-line bosentan. *European Journal of Clinical Investigation*. 2006; 36(S3):10-15.
10. Salvi SS. Alpha1-adrenergic hypothesis for pulmonary hypertension. *Chest*. 1999; 115:1708-1719.
11. Cutai M, Rounds S. Hypoxic pulmonary vasoconstriction physiologic significant, mechanism and clinic relevance. *Chest*. 1990; 97:709-718.
12. Ghali JK, Liao Y, Cooper RS, Cao G. Changes in pulmonary hemodynamics with aging in a predominantly hypertensive population. *American Journal of Cardiology*. 1992;70:367-370.
13. Farber HW, Loscalzo J. Mechanism of disease: pulmonary arterial hypertension. *The New England Journal of Medicine*. 2004; 351:1655-1665.
14. Tuder RM, Cool CD, Geraci MW. Postacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*. 1999; 159:1925-32.
15. Mason NA, Springall DR, Burke M. High expression of endothelial nitric oxide synthase in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Journal of Pathology* 1994; 266:L46-L52.

16. Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *New England Journal of Medicine*. 1995; 333:214-221.
17. Prakash A, Perry CM. Bosentan. *American Journal Cardiovascular Drugs*. 2002; 5:335-342.
18. Hachulla E, Coghlan JG. A new era in the management of pulmonary arterial hypertension related to scleroderma: endothelin receptor antagonism. *Annals of the Rheumatic Disease*. 2004; 63:1009-1014.
19. Price LC, Howard LS. Endothelin receptor antagonists for pulmonary arterial hypertension: rationale and place in therapy. *American Journal of Cardiovascular Drugs*. 2008;8(3):171-85. Review.
20. MacLean MR. Pulmonary hypertension and the serotonin hypothesis: where are we now? *International Journal of Clinical Practice*. 2007; 61 (S156), 27-31.
21. Abenhaim L, Moride Y, Brenot F. Appetite-suppressant drugs and the risk of primary pulmonary hypertension. *The New England Journal of Medicine*. 1996;335:609-616.
22. Marcos E, Adnot S, Pham MH. Serotonin transporter inhibitors protect against hypoxic pulmonary hypertension. *American Journal Respiratory Critical Care Medicine*. 2003; 168:487-493.
23. Kakishita M, Nishimiki T, Okano Y. Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with pulmonary Hypertension. *Clinical Science*. 1999; 96:33-39.

24. Petkov V, Mosgoeller W, Ziesche R. Vasoactive intestinal peptide as a new drug for treatment of primary pulmonary hypertension. *Journal of Clinical Investigation*. 2003;111:1339-1346.
25. Said SI. The vasoactive intestinal peptide gene is a key modulator of pulmonary vascular remodeling and inflammation. *Annals of the New York Academy Science*. 2008 Nov;1144:148-53.
26. Tuder RM, Flook BE, Voelkel NF. Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or chronic hypoxia: modulation of gene expression by nitric oxide. *Journal of Clinical Investigation*. 1995; 95:1798-1807
27. Sehgal PB, Mukhopadhyay S. Dysfunctional intracellular trafficking in the pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2007; 37:31-37.
28. White RJ, Meoli DF, Swarthout RF, Kallop DY, Galaria II, Harvey JL, Miller CM, Blaxall BC, Hall CM, Pierce RA, Cool CD, Taubman MB. Plexiform-like lesions and increased tissue factor expression in a rat model of severe pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2007; 293:583-590.
29. Montani D, Perros F, Dorfmüller P, Durand-Gasselin I, Eddahibi S, Simonneau G, Souza R, Humbert M. Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American Journal Respiratory Critical Care Medicine*. 2008;178(1):81-88.
30. Humbert M, Montani D, Perros F, Dorfmüller P, Adnot S, Eddahibi S. Endothelial cell dysfunction and cross talk between endothelium and smooth muscle cells in pulmonary arterial hypertension. *Vascular Pharmacology*. 2008 Oct-Dec;49(4-6):113-8

31. Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *The Journal of Clinical Investigation*. 2008 Jul;118(7):2372-9. Review.
32. Peled N, Bendayan D, Shitrit D, Fox B, Yehoshua L, Kramer MR. Peripheral endothelial dysfunction in patients with pulmonary arterial hypertension. *Respiratory Medicine*. 2008 Dec;102(12):1791-6.
33. McLaughlin VV, Shillington A, Rich S. Survival in primary pulmonary hypertension. The impact of epoprostenol therapy. *Circulation*. 2002;106:1477-1482
34. Rachel J. Davies and Nicholas W. Morrell. Molecular mechanisms of pulmonary arterial hypertension: role of mutations in the bone morphogenetic protein type II receptor. *Chest*. 2008; 1271–1277.
35. Star GP, Giovinazzo M, Langleben D. Effects of bone morphogenic proteins and transforming growth factor-beta on In-vitro production of endothelin-1 by human pulmonary microvascular endothelial cells. *Vascular Pharmacology*. 2009;50(1-2):45-50.
36. Hong HK, Lee YJ, Lee E, Park SO, Han C, Beppu H, Li E, Raizada MK, Bloch KD, Oh SP. Genetic ablation of the BMPR2 gene in pulmonary endothelium is sufficient to predispose to pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2008; 12;118:722-730.
37. Rubin LJ. BMPR2 mutation and outcome in pulmonary arterial hypertension: clinical relevance to physicians and patients. *American Journal of the Respiratory Critical Care Medicine*. 2008; 15;177(12):1300-1301.
38. Du L, Sullivan CC, Chu D. Signaling molecule in non-familial pulmonary hypertension. *The New England Journal of Medicine*. 2003; 348:500-509.

39. Hoepfer MM. Pulmonary arterial hypertension in collagen vascular disease. *European Respiratory Journal*. 2002; 19:571-579.
40. Ahmadi-Simab K, Hellmich B, Gross WL. Bosentan for severe pulmonary arterial hypertension related to systemic sclerosis with interstitial lung disease. *European Journal of Clinical Investigation*. 2006; 36S:44-48.
41. Coral-Alvarado P, Quintana G, Garces FM, Cepeda LA, Caminos JE, Rondon F, Iglesias-Gamarra A, Restrepo JF. Potential biomarkers for detecting pulmonary arterial hypertension in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology*. 2008;25:455-467.
42. Schachna L, Wigley FM, Chang B, White B, Wise RA, Gelber AC. Age and risk of pulmonary arterial hypertension in scleroderma. *Chest*. 2003; 124:2098-2104.
43. Battle RW, Davitt MA, Cooper SM, Buchley LM, Leib ES, Beglin PA, Tischler MD. Prevalence of pulmonary hypertension in limited and diffuse scleroderma. *Chest*. 1996; 110:1515-1519.
44. Hanitsch LG, Burmester GR, Witt C, Hunzelmann N, Genth E, Krieg T, Lehmacher W, Melchers I, Meurer M, Müller-Ladner U, Schulze-Lohoff E, Becker M, Sunderkoetter C; DNSS centers, Riemekasten G. Skin sclerosis is only of limited value to identify SSc patients with severe manifestations--an analysis of a distinct patient subgroup of the German Systemic Sclerosis Network (DNSS) Register. *Rheumatology*. 2009 Jan;48(1):70-3.
45. Hegewald MJ, Markewitz B, Elliot CG. Pulmonary hypertension: clinical manifestations, classification and diagnosis. *International Journal of Clinical Practice*. 2007;61(suppl.156),5-14.
46. Gaine S. Pulmonary hypertension. *JAMA*. 2000; 284:3160-3168.

47. Gaine S, Rubin LJ. Primary pulmonary hypertension. *Lancet* 1998; 352:719-725.
48. McLure LER, Peacock AJ. Imaging of the heart in pulmonary hypertension. *International Journal of Clinical Practice*. 2007; 61 (suppl. 156), 15-26.
49. Ciurzyński M, Bienias P, Lichodziejewska B, Kurnicka K, Szewczyk A, Glińska-Wielochowska M, Kurzyna M, Błaszczuk M, Liszewska-Pfejfer D, Pruszczyk P. Non-invasive diagnostic and functional evaluation of cardiac involvement in patients with systemic sclerosis. *Clinical Rheumatology*. 2008;27(8):991-7.
50. Ghio S, Klersy C, Magrini G, D'Armini AM, Scelsi L, Raineri C, Pasotti M, Serio A, Campana C, Viganò M. Prognostic relevance of the echocardiographic assessment of right ventricular function in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *International Journal of Cardiology*. 2008 Dec; 11:366-371.
51. Hemnes AR, Champion HC. Right heart function and haemodynamics in pulmonary hypertension. *International Journal of Clinical Practice*. 2008 Jul;(S160):11-9. Review
52. The 6-minute walk test in scleroderma--how measuring everything measures nothing. Impens AJ, Wangkaew S, Seibold JR. *Rheumatology*. 2008 Oct;47 S5:68-9.
53. American Thoracic Society. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *American Journal Respiratory Critical Care Medicine*. 2002;166:111-117.

54. Galiè N, Seeger W, Naeije R, Simonneau G, Rubin LJ. Comparative analysis of clinical trials and evidence-based treatment algorithm in pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004; 43(12S):81-88.
55. Fuster V, Steele PM, Edwards WD, Gersh BJ, McGoon MD, Frye RL. Primary pulmonary hypertension: natural history and the importance of thrombosis. *Circulation*. 1984;70:580-587.
56. Rich S, Kaufmann E, Levy PS. The effect of high doses of calcium channel blockers on survival pulmonary hypertension. *The New England Journal of Medicine*. 1992;327:76-81.
57. Badesch DB, Abman SH, Simonneau G, Rubin LJ, McLaughlin VV. Medical therapy for pulmonary arterial hypertension. Updated ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2007; 131:1917-1928.
58. Gabbay E, Fraser J, McNeil K. Review of bosentan in the management of pulmonary arterial hypertension. *Vascular Health and Risk management*. 2007; 3(6): 887-900.
59. Garcia Hernández FJ, Castillo Palma MJ, González León R, Garrido Rasco R, Ocaña Medina C, Sánchez Román J. Experience with Imatinib to treat pulmonary arterial hypertension. *Arch Broncopneumology* 2008; 44(12):689-691.
60. Channick RN, Simonneau G, Sitbon O. Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet*. 2001;358:1119-1123.
61. Rubin IJ, Badesch DB, Barst RJ. Bosentan therapy for the pulmonary arterial hypertension. *The New England Journal of Medicine*. 2002;346:896-903.

62. Galiè N, Hinderliter AL, Torbicki A. Effects of the oral endothelin-receptor antagonist Bosentan on echocardiographic and Doppler measures in patients with pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Cardiology*. 2003;41:1380-1386.
63. Sitbon O, Badesch DB, Channick RN. Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a 1-year follow-up study. *Chest*. 2003;124:247-254.
64. Provencher S, Sitbon O, Humbert M. Long-term outcome with first line bosentan therapy in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *European Heart Journal*. 2006;27:589-595.
65. Girgis RF, Mathai SC, Krishnan JA. Long-term outcome of bosentan treatment in idiopathic pulmonary arterial hypertension and pulmonary arterial hypertension associated with the scleroderma spectrum diseases. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2005;24:1626-1631.
66. Galiè N, Rubin LJ, Hoeper MM, Jansa P, Al-Hiti H, Meyer GMB, Chiossi E, Kusic-Pajic A, Simmoneau G. Treatment of patients with mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension with bosentan (EARLY study): a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2008; Jun 21:2093-2100.
67. Waxman AB. A review of sitaxsentan sodium in patients with pulmonary arterial hypertension. *Vascular Health and Risk management*. 2007; 3(1): 151-157.
68. Sitaxsentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: a 1-year, prospective, open-label observation of outcome and survival. Benza RL, Barst RJ, Galiè N, Frost A, Girgis RE, Highland KB, Strange C, Black CM, Badesch DB, Rubin L, Fleming TR, Naeije R. *Chest*. 2008 Oct;134(4):775-82.

69. Barst RJ, Langleben D, Badesch D. Treatment of pulmonary arterial hypertension with the selective endothelin-a receptor antagonist sitaxsentan. *American Journal College of Cardiology*. 2006;47:2049-2056.
70. Cheng JW. Ambrisentan for the management of pulmonary arterial hypertension. *Clinical Therapy*. 2008; 30(5): 825-833.
71. Galiè N, Olschewski H, Oudiz RJ, Torres F, Frost A, Ghofrani HA, Badesch DB, McGoon MD, McLaughlin VV, Roecker EB, Gerber MJ, Dufton C, Wiens BL, Rubin LJ. Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: results of the ambrisentan in pulmonary arterial hypertension, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, efficacy (ARIES) study 1 and 2. *Circulation*. 2008 Jun 10;117(23):3010-9.
72. Garg N, Sharma MK, Sinha N. Role of oral sildenafil in sever pulmonary arterial hypertension: clinical efficacy and dose response relationship. *International Journal of Cardiology*. 2007; 120:306-316.
73. Badesch DB, Hill NS, Burges G, Rubin LJ, Barst RJ, Galiè N, Simonneau G. Sildenafil for pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue disease. *The Journal of Rheumatology*. 2007;34:1-6.
74. Ruiz MJ, Escribano P, Delgado JF, Jimenez C, Tello R, Gomez A, Sarnz de la Calzada C. Efficacy of sildenafil as a rescue therapy for patients with severe pulmonary arterial hypertension and given long-term treatment with prostanoids: 2-year experience. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2006; 25:1353-7.
75. Avouac J, Wipff J, Kahan A, Allanore Y. Effects of oral treatment on exercise capacity in systemic sclerosis related pulmonary arterial hypertension: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Annals of the Rheumatic Disease*. 2007;49:1-15.

76. Sitbon O, Humbert M, Nunes H. Long term intravenous epoprostenol infusion in primary pulmonary arterial hypertension: prognostic factors and survival. *Journal of American College of Cardiology*. 2002;40:780-788.
77. McLaughlin VV, Shillington A, Rich S. Survival in primary pulmonary hypertension: the impact of epoprostenol therapy. *Circulation*. 2002;106:1477-1482.
78. Badesch DB, Tapson VF, McGoon MD. Continuous intravenous epoprostenol for pulmonary hypertension due to the scleroderma spectrum of disease: a randomised, controlled trial. *Annals of Internal Medicine*. 2000;132:425-434.
79. Oudiz RJ, Schilz RJ, Barst RJ, Galiè N, Rich S, Rubin LJ, Simonneau G. Treprostinil, a prostacyclin analogue, in pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue disease. *Chest*. 2004; 126:420-427.
80. Barst RJ, Galiè N, Naeije R, Simonneau G, Jeffs R, Arneson C, Rubin LJ. Long-term outcome in pulmonary arterial hypertension patients treated with subcutaneous treprostinil. *European Respiratory Journal*. 2006; 28:1195-1203.
81. McLaughlin VV, Oudiz RJ, Frost A. Randomised study of adding inhaled iloprost to existing bosentan in pulmonary arterial hypertension. *American Journal Respiratory Critical Care Medicine*. 2006;174:1257-1263.
82. Galiè N, Humbert M, Vachiery JL, Vizza CD, Kneussl M, Mane A, Sitbon O, Torbicki A, Delcoix m, Naeije R, Hoeper M, Chaouat A, Morand S, Besse B, Simonneau G. Effects of beraprost sodium, an oral prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002; 39:1496-1502.

83. Badesh DB, Abman SH, Ahearn GS, Barst RJ, McCrory DC, Simmoneau G, McLaughlin VV. Medical therapy for pulmonary arterial hypertension. ACCP Evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2004; 126: 35-62.
84. Mathai SC, Girgis RE, Fisher MR, Champion HC, Moustier-Harris T, Zaiman A, Hassoun PM. Addition of sildenafil to bosentan monotherapy in pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Journal*. 2007; 29:469-475.
85. Hoeper MM, Markevych E, Spiekerkoetter E, Welte T, Niedermeyer J. Goal-oriented treatment and combination therapy for pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Journal*. 2005; 26:858-863.
86. D'Andrea A, Stisi S, Bellissimo S, Vigorito F, Scotto di Uccio F, Tozzi N, Moscato F, Pezzullo E, Calabrò R, Scherillo M. Early impairment of myocardial function in systemic sclerosis: non invasive assessment by Doppler myocardial and strain rate imaging. *European Journal of Echocardiography*. 2005;6:407-418.
87. Sulli A, Ghio M, Bezante GP, Deferrari L, Craviotto C, Sebastiani V, Setti M, Barsotti A, Cutolo M, Indiveri F. Blunted coronary flow reserve in sistemi sclerosis. *Rheumatology*. 2004;43:505-509.
88. Trad S, Amoura Z, Beigelman C, Haroche J, Costedoat N, Boutinle TH. Pulmonary arterial hypertension is a major mortality factor in diffuse systemic sclerosis, independent of interstitial lung disease. *Arthritis and Rheumatism*. 2006;54:184-191.
89. Tona F, Caforio AL, Montisci R, Angelini A, Ruscazio M, Gambino A. Coronary flow reserve by contrast-enhanced echocardiography: a new non-invasive diagnostic tool for cardiac allograft vasculopathy. *American Journal of Transplantation*. 2006;6:998-1003.

90. Williams MH, Das C, Handler EC, Akram MR, Davas J, Denton CP. Systemic sclerosis associated pulmonary hypertension treated with first-line bosentan. *European Journal of Clinical Investigation*. 2006;36:10-15.
91. Boulet K, Montani D, Jais X, Yaici A, Sitbon O, Simmoneau G, Humbert M. Therapeutic advances in pulmonary arterial hypertension. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*. 2008;2(4):249-265.
92. Humbert M, Barst RJ, Robbins IM, Channick RN, Galiè N, Boonstra A. Combination of bosentan with epoprostenol in pulmonary arterial hypertension: breathe-2. *European Respiratory Journal*. 2004;24:353-359.
93. Montisci R, Vacca A, Garau P, Colonna P, Ruscazio M, Passiu G, Iliceto S, Mathieu A. Detecyion of early impairment of coronary flow reserve in patients with systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Disease*. 2003;62:890-893.
94. Kahan A, Nitemberg A, Foulst JM, Amor B, Menkes CJ, Devaux JY. Decreased coronary reserve in primary sclerodermamyocardial disease. *Arthritis and Rheumatism*. 1985;28:637-646.
95. Vacca A, Siotto P, Cauli A, Montisci R, Garau P, Ibba V, Mameli A, Passiu G, Iliceto S, Mathieu A. Absebce of epicardial coronary stenosis in patients with sistemi sclerosis with severe impairment of coronary flow reserve. *Annals of the Rheumatic Disease*. 2006;65:274-275.
96. Allanore Y, Meune C, Vignaux O, Weber S, Legman P, Kahan A. Bosentan increases myocardial perfusion and function in systemic sclerosis: a magnetic resonance imaging and tissue-Doppler echography study. *Journal of Rheumatology*. 2006;33:2464-2469.

