



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dottorato di Ricerca in

Fisiopatologia Cardiorespiratoria

Ciclo XXV

Tesi

**Sistema Dopaminergico
nell'Ipertensione Polmonare**

Dottorando

Dott. Pierdonato Bruno

Anno accademico 2011/2012

Sistema Dopaminergico nell'Ipertensione Polmonare

INDICE

Ipertensione Polmonare - 3

Sistema dopaminergico polmonare - 10

L'endotelina e i suoi recettori nell'Ipertensione
Polmonare - 12

Obiettivi - 14

Pazienti, Materiali e Metodi - 15

Risultati - 19

Discussione e Conclusioni - 30

Ipertensione Polmonare

L'ipertensione polmonare (IP), nella sua accezione più semplice, si riferisce ad ogni aumento della PAP superiore al normale. La presenza di ipertensione polmonare può riflettere una grave malattia vascolare polmonare sottostante, che può essere progressiva e fatale, o semplicemente un innalzamento obbligato passivo della PAP in risposta a elevate pressioni del cuore sinistro. Di conseguenza una diagnosi accurata della causa di IP in un paziente è essenziale per stabilire un programma di terapia efficace. Inoltre, terapie che possono essere di beneficio nei pazienti affetti da alcune forme di ipertensione polmonare possono essere dannose nei pazienti con altri tipi di ipertensione polmonare. La diagnosi di ipertensione polmonare si basa sul riscontro di una elevazione della PAP superiore alla norma. Norme pubblicate provengono da cateterismi cardiaci eseguiti in soggetti giovani a riposo senza alcuna evidenza di malattia cardiopolmonare. Il limite normale più alto di pressione media dell'arteria polmonare è di 19 mmHg. Tuttavia, ciò presuppone che non vi siano alterazioni nelle pressioni a valle dell'atrio o del ventricolo sinistro oppure un aumento della gittata cardiaca. Questo in quanto un malato può avere ipertensione polmonare dal punto di vista di una elevata PAP, ma normali RVP. Recentemente, sono stati pubblicati parametri di pressione arteriosa sistolica polmonare normale derivati da studi eco-doppler che suggeriscono che il limite fisiologico superiore di pressione arteriosa sistolica polmonare nella popolazione generale può essere più alto di quanto in precedenza valutato.

Vi sono pazienti con emodinamica a riposo normale che presentano notevoli aumenti della pressione polmonare sotto sforzo. E' stato ipotizzato che questo rappresenti uno stadio precoce della malattia vascolare polmonare. Tuttavia, poiché i

pazienti possono presentare una risposta ipertensiva all'esercizio in riferimento all'apparato vascolare sistemico, un tipo di risposta simile può verificarsi nella malattia vascolare polmonare oppure può essere difficile accertare una ridotta compliance della circolazione polmonare, peraltro normale. Nel 1998, una nuova classificazione per l'ipertensione polmonare era stata messa a punto al World Symposium on Pulmonary Hypertension co-sponsorizzato dall'OMS. Questa classificazione ha catalogato le condizioni cliniche sulla base di comuni caratteristiche patobiologiche per essere da guida nella valutazione clinica e nel trattamento di questi pazienti. Inoltre, è stata sviluppata una classificazione funzionale, sul modello della classificazione della New York Health Association per la patologia cardiaca, per permettere il confronto tra pazienti per quanto riguarda la gravità clinica del processo patologico[1].

Classificazione clinica dell'ipertensione polmonare (Dana Point, 2008).

1. Ipertensione arteriosa polmonare (IAP)

1.1 Idiopatica

1.2 Ereditaria

1.2.1 BMPR2

1.2.2 ALK1, endoglin (con o senza teleangectasia emorragica familiare)

1.2.3 Non nota

1.3 Legata all'assunzione di farmaci e tossine

1.4 Associata (IAPA)

1.4.1 Malattie del tessuto connettivo

1.4.2 Infezione da HIV

1.4.3 Ipertensione portale

1.4.4 Cardiopatie congenite

1.4.5 Schistosomiasi

1.4.6 Anemie emolitiche croniche

1.5 Ipertensione polmonare persistente del neonato

1'. Malattia veno-occlusiva polmonare e/o emangiomatosi capillare polmonare

2. Ipertensione polmonare dovuta a malattie del cuore sinistro

2.1 Disfunzione sistolica

2.2 Disfunzione diastolica

2.3 Patologie delle valvole

3. Ipertensione polmonare dovuta a malattie del parenchima polmonare e/o ipossiemia

3.1 Broncopneumopatia cronica ostruttiva

3.2 Malattie interstiziali polmonari

3.3 Patologie polmonari con pattern misto ostruttivo e restrittivo

3.4 Disordini della ventilazione durante il sonno

3.5 Ipoventilazione alveolare

3.6 Esposizione cronica ad elevate altitudini

3.7 Anomalie dello sviluppo

4. Cuore polmonare cronico tromboembolico

5. IP con meccanismi patogenetici non chiari e/o multifattoriali

5.1 Patologie ematologiche: disturbi mieloproliferativi, splenectomia

5.2 Patologie sistemiche: sarcoidosi, istiocitosi polmonare a cellule di Langerhans,

linfangioleiomiomatosi, neurofibromatosi, vasculite

5.3 Patologie metaboliche: glicogenosi, malattia di Gaucher, patologie tiroidee

5.4 Altro: ostruzione tumorale, mediastinite fibrosante, insufficienza renale

cronica in dialisi.

Ipertensione arteriosa polmonare si riferisce alla malattia vascolare polmonare che colpisce le arteriole, producendo un aumento della pressione e delle resistenze vascolari. Sebbene l'IPP sia relativamente rara, con un'incidenza stimata di 1-2 per milioni di abitanti, la IP grave associata ad altre condizioni risulta più comune. L'eziologia più comune è associata a patologie del tessuto connettivo, soprattutto la sclerodermia, incluse la sindrome CREST (calcinosi cutanea, fenomeno di Raynaud, disfunzione esofagea, sclerodattilia e telangectasia) e malattie del tessuto connettivo miste [2]. La IP è relativamente frequente anche nei pazienti con cardiopatie congenite, specialmente in quelli con difetti del setto interventricolare o con dotto arterioso pervio. Le altre comorbilità includono la

cirrosi con ipertensione portale e l'infezione da virus dell'immunodeficienza umana (HIV).

Cateterismo cardiaco

Oltre a confermare la diagnosi e permettere l'esclusione di altre cause, il cateterismo cardiaco è anche in grado di stabilire la gravità della malattia e permette di stabilire una valutazione prognostica. Per definizione i pazienti con IP devono avere una pressione polmonare di incuneamento bassa o normale. Quando la pressione di incuneamento non può essere ottenuta, è consigliabile una misurazione diretta della pressione tele diastolica ventricolare sinistra[3]. Se la pressione di incuneamento è aumentata, potrebbe essere correlata alla pressione tele diastolica del ventricolo sinistro e non attribuita a una lettura "falsamente elevata". È stato dimostrato che la compliance diastolica del ventricolo sinistro diviene significativamente alterata in pazienti con IP e va di pari passo con la gravità della malattia; pertanto, la pressione polmonare di incuneamento capillare tende ad aumentare solo lievemente negli ultimi stadi della IP, anche se raramente supera i 16 mmHg. Per essere corrette, le misurazioni di tutte le pressioni del cuore destro sono fatte in telespirazione, onde evitare di includere la pressione negativa intratoracica. Può essere estremamente difficile introdurre un catetere dentro l'arteria polmonare in un paziente con ipertensione polmonare a causa dell'insufficienza tricuspide, della dilatazione dell'atrio e del ventricolo destro e per la bassa gittata cardiaca. Per i pazienti con ipertensione polmonare è stato sviluppato uno specifico catetere a palloncino per la termo diluizione (American Edwards Laboratories, Irvine, CA); è dotato di una porta aggiuntiva per il posizionamento di una guida metallica di

0,812 cm, che conferisce una maggiore rigidità al catetere. Il rischio associato al cateterismo cardiaco nei pazienti con ipertensione polmonare è molto basso in mani esperte, ma sono stati riportati alcuni decessi.

Valutazione in acuto dei vasodilatatori

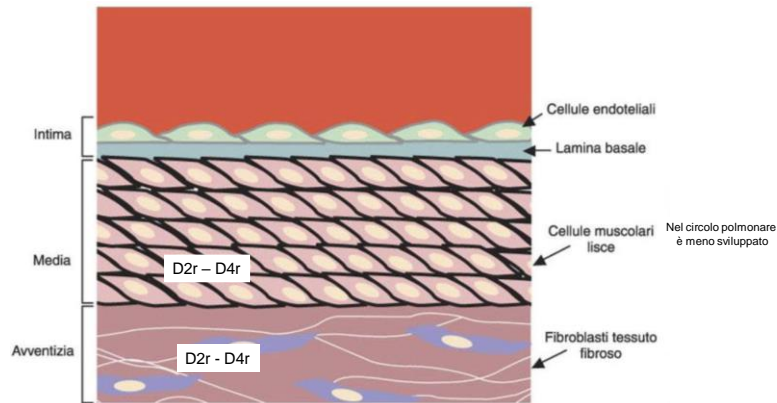
Molti vasodilatatori sono importanti per valutare la reattività vascolare polmonare nei pazienti con IP. L'adenosina è un prodotto intermedio del metabolismo dell'adenosintrifosfato che ha una potente proprietà vasodilatatrice per la sua azione sui recettori vascolari specifici. Si pensa che essa stimoli la cellula endoteliale e i recettori della cellula muscolare liscia vascolare di tipo A₂, che determinano il rilasciamento delle fibre muscolari lisce dei vasi per aumento dell'adenosinmonofosfato ciclico. Nei pazienti con IP, l'adenosina si è dimostrata un vasodilatatore potente e predittivo degli effetti cronici della prostaciclina somministrata per via endovenosa o dei calcio antagonisti per via orale. L'adenosina ha un'emivita estremamente breve (<5 sec) e questo garantisce la sicurezza del suo impiego, poiché la sua rapida dissoluzione evita la comparsa di effetti indesiderati. E' somministrata per via endovenosa in infusione alla dose di 50 mcg/Kg/min e aumentata ogni 2 minuti finché non si sviluppano effetti indesiderati (come difficoltà respiratorie o dispnea). L'epoprostenolo è stato anche utilizzato come test acuto per valutare la reattività vasale nei pazienti con IP. Così come per l'adenosina, la sua breve emivita permette l'interruzione del farmaco quando si verifica qualche effetto collaterale. Come l'adenosina, viene somministrata a dosi crescenti, iniziando da 2 ng/Kg/min e aumentando ogni 15-30 minuti fino alla comparsa di effetti sistemici quali cefalea, flushing o nausea, che limita l'aumento della dose acuta. Gli effetti acuti favorevoli dell'epoprostenolo sono predittivi di una

risposta favorevole all'uso dei calcio antagonisti per via orale
[4].

Sistema dopaminergico Polmonare

La dopamina esercita un ruolo importante nel controllo della circolazione polmonare com'è stato dimostrato da studi funzionali, morfologici e farmacologici[5]. La dopamina induce vasodilatazione dell'arteria polmonare attraverso un meccanismo endotelio-mediato[6]. L'espressione e la localizzazione dei recettori D1 (D1, D5) e D2 (D2, D3, D4) è stata indagata nelle arterie polmonari ilari, lobari e intraparenchimali dell'uomo mediante immunoblotting e immunoistochimica. L'arteria polmonare esprime i recettori dei sottotipi D1, D2, D4 e D5 ma non i D3. I sottotipi D1 e, in minor misura, il D5 sono presenti maggiormente sull'endotelio dei rami extrapolmonari delle arterie. Una debole immunoreattività dei recettori D1 e D5 è stata trovata nella tonaca media delle arterie polmonari extraparenchimali e in quelle di grosso calibro che penetrano nell'organo ma non in quelle di medio e piccolo calibro. I sottotipi D2 e, in misura minore, D4 hanno una immunoreattività localizzata nella media e nell'avventizia nelle arterie polmonari di vario calibro sia intra che extra parenchimali (Fig. 1) [7,8].

Fig. 1 Localizzazione recettori DA nella parete vascolare polmonare



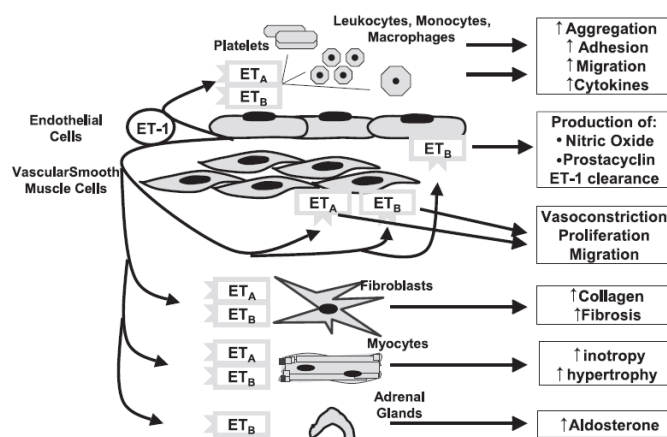
Queste osservazioni suggeriscono un possibile ruolo dei recettori della dopamina nell'attività vaso regolatrice endotelio mediata della circolazione polmonare [9]. I recettori D1 sembrano essere i più coinvolti in tale meccanismo. I recettori D2 localizzati a livello del plesso simpatico, potrebbero essere in relazione al controllo vasomotore correlato al plesso nervoso perivascolare. La distribuzione eterogenea e la densità dei sottotipi di recettori della dopamina lungo l'albero arterioso polmonare dell'uomo potrebbe essere correlato a differenti ruoli funzionali della dopamina a differenti livelli nel piccolo circolo [10,11].

L'endotelina e i suoi recettori nell'Ipertensione Polmonare

L'endotelina (ET) svolge un ruolo autocrino e paracrino in molti tessuti mediante l'attivazione dei recettori ET_A ed ET_B. L'ET ha probabilmente un ruolo nel mantenimento del tono basale vasomotorio e della pressione arteriosa mediante l'interazione a vario livello con i suoi recettori. L'attivazione di ET_A ed ET_B da parte di ET-1 sulle cellule muscolari lisce ha un effetto vaso costrittivo e mitogeno. La stimolazione dei recettori ET_B promuove il rilascio di NO e prostaciclina, previene l'apoptosi, e media l'eliminazione polmonare dell'ET circolante. Studi in vitro hanno dimostrato che l'NO inibisce l'espressione di ET-1 indotta dall'ipossia [12,13]. La presenza dell'ET-1 e dei suoi recettori è stata dimostrata sia nel plasma che nel tessuto polmonare di pazienti e modelli animali con IP. Il recettore ET-A è predominante nelle grandi arterie polmonari, mentre l'ET-B nel muscolo liscio delle vie aeree, alveoli e capillari. Il 50% dell'endotelina viene rimossa tramite i recettori ET-B a livello polmonare.

Nell'IP osserviamo un progressivo incremento delle resistenze vascolari polmonari che a lungo andare porta allo scompenso ventricolare destro e alla morte. La sua patogenesi coinvolge meccanismi complessi, che includono anche una disfunzione endoteliale nella circolazione polmonare, con conseguente rimodellamento vascolare e vasocostrizione.

Fig. 2 Interazione ET 1 con ETa ed ETb nel circolo polmonare



Galè N, Manes A, Branzi A. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. Cardiovascular Research 2004;61:227-37

I livelli plasmatici di endotelina circolante, nel sangue venoso di soggetti sani, sono bassi, intorno ad 1-2 pg/ml[14]. Livelli aumentati di ET-1 sono stati trovati nei soggetti con diverse forme di ipertensione polmonare. Nei pazienti con la forma idiopatica, l'elevazione dei livelli plasmatici di ET-1 probabilmente riflette la severità della malattia.

In un recente studio effettuato su 25 pazienti con IP, il valore mediano di ET-1 era di 18,7 pg/ml. In base a tale valore, i pazienti venivano poi divisi in 2 gruppi che evidenziavano una risposta diversa al trattamento con un antagonista recettoriale dell'ET-1. Solamente i pazienti con valori di partenza superiori a 18,7 pg/ml, mostravano una riduzione di questi al controllo dopo 6 mesi [15].

Obiettivi

Lo scopo primario dello studio è quello di indagare il possibile ruolo della dopamina, dei suoi recettori e trasportatori nella regolazione della circolazione polmonare nei soggetti affetti dalle varie forme di ipertensione polmonare correlandolo con i dati di funzionalità respiratoria e gli indici del cateterismo cardiaco destro; successivamente confrontare tali dati con i livelli di ET-1 ed ET_A ET_B in modo da analizzare possibili relazioni tra eventuali disfunzioni del sistema dopaminergico polmonare e sistema dell'endotelina.

Pazienti, Materiali e Metodi

Pazienti

Si sono arruolati, previo consenso informato, Polmonare e 40 pazienti con Ipertensione arteriosa polmonare (24 m/16 f) età media 65 ± 12 e 10 soggetti senza ipertensione arteriosa polmonare (6 m/4 f) età media 74 ± 7 .

Al fine dell'elaborazione dei dati i pazienti con Ipertensione Arteriosa Polmonare (PAH) sono stati suddivisi nei seguenti gruppi in base al tipo di patologia: IP Tromboembolica (10 pts), IP Pneumopatia (10 pts), IP Idiopatica (10 pts), IP Patologie cuore sin. (10 pts) e in base alla gravità della patologia misurata dalla pressione nell'arteria polmonare (PAP): IP grave ($PAP \geq 45$) = 20 pts, IP moderata ($35 \leq PAP < 45$) = 10 pts, IP lieve ($25 \leq PAP < 35$) = 10 pts.

Per ogni soggetto è stata compilata una scheda con le seguenti informazioni: dati anagrafici, anamnesi familiare, farmacologica, patologica remota e prossima, funzionalità respiratoria (spirometria, emogasanalisi, six minute walking test) e indici di cateterismo cardiaco destro.

Durante ogni cateterismo cardiaco destro veniva prelevato 30 cc di sangue arterioso polmonare e 30 cc di sangue arterioso periferico che veniva utilizzato per le determinazioni delle catecolamine circolanti, recettori (D1DR-D5DR) e trasportatori (V-Mat-1, V-Mat-2, h-Dat) della dopamina, endotelina (ET 1) e recettori dell'endotelina (ETa ETb).

Si sono isolati linfociti (PBMC) dal sangue periferico, in quanto alcuni studi hanno confermato che in numerose patologie (M.di Parkinson, M di Alzheimer, S. di Meniere, Iperattività delle vie aeree) lo stato dei recettori linfocitari può essere utilizzato come modello in grado di rappresentare lo

stato del sistema colinergico e dopaminergico [16,17,18]. La distribuzione recettoriale a livello della membrana linfocitaria è indicativo, quindi, di eventuali alterazioni d'organo riguardanti il sistema colinergico e dopaminergico [19,20].

Preparazione dei linfociti dal sangue periferico

Il sangue è stato raccolto in provette contenenti EDTA come anticoagulante; le cellule venivano separate dal “Ficoll-Hypaque” (Histopaque-1077, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA) mediante centrifugazione. Questa procedura permetteva di ottenere una concentrazione finale di 1×10^6 cells/ml, con una contaminazione di eritrociti meno del 10% e la rimozione della maggior parte delle piastrine (Ricci and Amenta, 1994; Ricci et al., 1995). Lo strato di PBMC veniva lavato due volte in soluzione salina tamponata (PBS) (LONZA) e conservato a -80°C .

Analisi mediante Western blot dei recettori dopaminergici (D1DR-D5DR) e dei trasportatori (V-Mat-1, V-Mat2 and h-Dat) e dei recettori dell'ET1 (ETa, ETb)

I linfociti T sono stati lisati in sospensione (Tween 20, Glycerol, NaCl 2.5M, Hepes 1M ph 7.6, MgCl₂ 2M, CaCl₂ 0.1M, NaF 1M, Na₂P₂O₇ 0.1M, NaVO₃ 0.1M, PMSF 0.1M) (Roche) e successivamente centrifugati a 14,000 rpm per 10 min a 4°C . La concentrazione di proteine è stata determinata in accordo con il protocollo Bradford usando il Bio-Rad (protein

assay reagent). Le proteine sono state separate mediante elettroforesi su gel (10% SDS-polyacrylamide gel) e quindi trasferite su una membrana di nitrocellulosa (0,45 m Bio-Rad) con un tampone (Tris-glicine 1X, SDS 1X, 20% methanol). Le gocce sono state incluse con latte al 5% per un'ora e incubate per la notte a 4°C con anticorpi policlonali contro i recettori e i trasportatori in studio (1:500) e anti-vinculina (1:10000) (SIGMA). Membrane leganti gli anticorpi primari sono state incubate per un'ora a temperatura ambiente con HRP-coniugato con anticorpo secondario (1:4000): anti-capra o anti-topo. Per l'individuazione della reazione immune è stata usata un sistema a chemiluminescenza ECL (GE Healthcare Amersham).

Analisi catecolamine mediante HPLC (Cromatografia liquida ad alta prestazione)

L'analisi delle catecolamine è stata effettuata usando il Catecholamine Dual Kit (Eureka srl, Chiaravalle, Italy) come da istruzioni del fabbricante. In breve, i campioni di plasma sono stati centrifugati a 4°C, distribuiti in aliquote e conservati a -80°C. la separazione cromatografica è stata effettuata su una colonna a fase inversa (150x2.0 mm, Luna C18 (2), 5 µm, 100 Å pore size, Phenomenex, Torrance, CA, USA) dotata di una precolonna di sicurezza (Phenomenex) contenente lo stesso materiale. Il sistema di cromatografia liquida era composto da una pompa binaria (LabFlow 4000, LabService Analytica, Anzola Emilia, Italy), un mixer dinamico (811C, Gilson, Middleton, WI, USA), un autosampler (Model 231, Gilson) e una colonna forno (LabService Analytica). La colonna era mantenuta a temperatura ambiente. Il volume introdotto era 5 µL e il tempo totale d'analisi 20 min. Gli analiti erano individuati da un rivelatore di fluorescenza (ProStar, Varian,

Walnut Creek, CA, USA) usando 360 nm come lunghezza d'onda di eccitazione e 490 nm come lunghezza d'onda d'emissione. L'analisi dei dati è stata effettuata usando la Star Workstation software version 6.20 (Varian).

Analisi Statistica

Mediante i test di Kruskal Wallis e di Mann Whitney sono state analizzate le differenze tra il gruppo di controllo e i pazienti, sia nel loro complesso che divisi per gravità e patologia. Si è studiata la correlazione tra i livelli di catecolamine, i recettori e trasportatori della dopamina e i parametri di funzionalità respiratoria e quelli derivanti dal cateterismo cardiaco destro. L'elaborazione statistica è stata condotta utilizzando il software SPSS (versione 19.0, IBM-SPSS, Chicago, IL, USA).

Risultati

Analizzando le correlazioni tra gli indici del cateterismo cardiaco destro, la funzionalità respiratoria i dosaggi delle catecolamine circolanti, dei recettori e dei trasportatori della dopamina si sono ottenuti i seguenti risultati statisticamente significativi (Tab. 1-7) suddivisi per tipo e gravità della patologia.

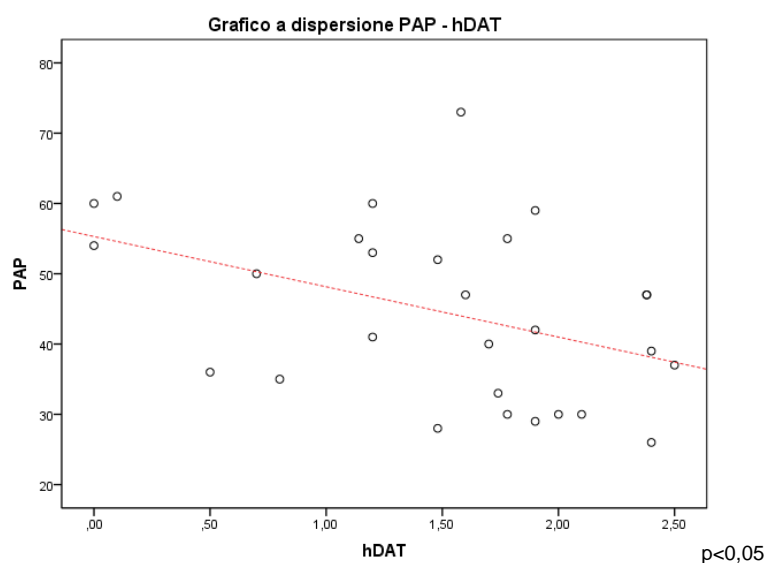
Tab. 1: Pazienti con **Ipert. Polm.** (40 pts) (+) Correlazione positiva

/ (-) Correlazione negativa

	PAP	Dopa pol.	Dopa perif.	hDAT	D2r	D4r
Adren perif	(+) p<0,05					
h-DAT	(-) p<0,05		(+) p<0,05			
Dopa perif.		(+) p<0,01		(+) p<0,05		(+) p<0,05
Dopa polm.						(+) p<0,05
DApo - DAper.	(-) p<0,05		(-) p<0,05		(+) p<0,01	
D4r		(+) p<0,05	(+) p<0,05			
PAD				(-) p<0,05		
PAP				(-) p<0,05		
SpO2					(+) p<0,05	

Nei pazienti (40 pts) con ipertensione polmonare l'aumento della PAP è correlato ($p < 0.05$) ad una diminuzione dei trasportatori transmembrana della dopamina (hDAT) (Fig. 3) e ad un aumento della concentrazione di adrenalina nel circolo periferico ($p < 0,05$) (Tab. 1).

Fig. 3 Correlazione PAP - hDAT



Nei pazienti con Ipertensione Polmonare (40 pts) l'aumento del differenziale tra la dopamina polmonare - dopamina femorale è correlato ad una diminuzione della PAP ($p < 0,05$) ed un aumento dei D2r ($p < 0,05$); l'aumento del differenziale è dovuto ad una diminuzione della dopamina femorale ($p < 0,05$) e quindi ad un maggiore consumo della dopamina a livello polmonare (Tab. 1).

Tab. 2: Pazienti con **PAP** ≥ 45 mmHg (20 pts) (+) Correlazione positiva / (-) Correlazione negativa

	PAP	Dopa pol.	Dopa perif.	hDAT	D2r	D4r
Tiff.	(-) p<0,01					
RV (residue volume)	(+) p<0,01					
Mot.	(+) p<0,01					
pCO2	(+) p<0,05					
h-DAT			(+) p<0,05			
Dopa perif.		(+) p<0,01		(+) p<0,05		(+) p<0,01
Dopa polm.			(+) p<0,01			(+) p<0,05
D4r		(+) p<0,05	(+) p<0,01			
PAD				(-) p<0,05		
pO2					(+) p<0,05	

Tab. 3: Pazienti con $35 < \text{PAP} < 45$ mmHg (10 pts) (+) Correlazione positiva / (-) Correlazione negativa

	Dopa pol.	Dopa perif.	D2r	Vmat1
Mot.				(+) p<0,01
Dopa perif.	(+) p<0,01			
Dopa polm.		(+) p<0,01		
D4r			(+) p<0,01	
pO2				(+) p<0,05
SpO2				
Noradren. polm.			(+) p<0,05	
6mWT		(+) p<0,05	(-) p<0,05	

Nei pazienti con ipertensione polmonare moderata (10 pts) l'aumento dei recettori dopaminergici (D2r) è correlato (p<0,05) ad una diminuzione della distanza percorsa al 6mWT (Tab. 3).

Tab. 4: Pazienti con $25 < \text{PAP} \leq 35$ mmHg (10 pts) (+) Correlazione positiva / (-) Correlazione negativa

	D2r	D4r
RV (residue volume)	(+) p<0,01	
Mot.	(+) p<0,01	
FVC	(-) p<0,05	
PAD		(+) p<0,01
PO l/min.		(+) p<0,01

Nei pazienti con ipertensione polmonare lieve (10 pts) l'aumento della pressione atriale destra (PAD) e della portata cardiaca (PO) è correlato (p<0,01) ad un aumento dei recettori della dopamina (D4r) (Tab. 4).

Tab. 5: Pazienti con **Iper. Pol. Tromboemb.** (10 pts) (+)

Correlazione positiva / (-) Correlazione negativa

	Dopa pol.	Dopa perif.	Vmat1	Vmat2	D2r	D4r
Dopa perif.	(+) p<0,01					
Dopa polm.		(+) p<0,01				(+) p<0,05
D4r	(+) p<0,05	(+) p<0,01				
PAD			(-) p<0,01	(-) p<0,05		
RVP				(+) p<0,01		
pO2	(+) p<0,05	(+) p<0,05			(+) p<0,01	
SpO2			(+) p<0,05		(+) p<0,05	
Tiff.	(-) p<0,05					
RV (residue volume)			(+) p<0,05			
Vmat2			(+) p<0,05			

Tab. 6: Pazienti con **Ipert. Polm.** con **Pneumopatia** (10 pts) (+)

Correlazione positiva / (-) Correlazione negativa

	PAP	Dopa pol.	Dopa perif.	Vmat2	D2r
Adren. polm.	(+) p<0,05				
Adren. perif.	(+) p<0,05				
RVP		(+) p<0,05		(-) p<0,05	(-) p<0,05
RVS					(-) p<0,05
pO2		(-) p<0,05	(-) p<0,05		
SpO2		(-) p<0,05	(-) p<0,05		
FEV ₁	(-) p<0,05		(+) p<0,05		
FVC			(+) p<0,05		

Tab. 7: Pazienti con **Ipert. Polm. Idiopatica** (10 pts) (+)

Correlazione positiva / (-) Correlazione negativa

	PAP	Dopa pol.	Dopa perif.	Vmat1	Vmat2	D2r	hDAT
Dopa perif.		(+) p<0,01				(-) p<0,05	(+) p<0,05
Dopa polm.			(+) p<0,01				
Adren. perif.	(-) p<0,01						
Noradren polm		(+) p<0,01	(+) p<0,01				
Noradren perif		(+) p<0,05	(+) p<0,05				
D2r			(-) p<0,05				
hDAT			(+) p<0,05		(+) p<0,05		
Vmat2							(+) p<0,05
RVS						(-) p<0,05	
Tiff.		(+) p<0,05					
6mWT				(-) p<0,05		(-) p<0,05	

Riguardo le determinazioni dell'ET1 e dei suoi recettori i risultati sono seguenti: ET1 femorale ed ET1 polmonare hanno due distribuzioni statisticamente diverse (Test di Mann-Whitney, $p < 0,001$) essendo la concentrazione della ET 1 polmonare più elevata della femorale.

ETa ed ETb non hanno invece differenze significative (Test di mann-Whitney, non significativo).

Per quanto concerne le correlazioni statisticamente significative ($p < 0,05$) con il sistema dopaminergico, gli indici di cateterismo cardiaco e di funzionalità respiratoria, risulta:

ET1 femorale correla positivamente con Pao mmHg ($r = 0,352$).

ET1 polmonare correla positivamente con la PAD (pressione atriale destra) mmHg ($r = 0,396$) ed IC (indice cardiaco) L/min/m² ($r = 0,352$) ma negativamente con Vmat-2 ($r = - 0,414$).

Il differenziale tra ET1 femorale – ET1 polmonare correla positivamente con PO (portata cardiaca) L/min. ($r = 0,395$) ed IC L/min/m² ($r = 0,398$) ma negativamente con h-DAT ($r = - 0,406$) e Vmat-2 ($r = - 0,401$).

La concentrazione di ET1 nella circolazione polmonare è più elevata rispetto a quella arteriosa periferica ($p < 0,001$) nei pazienti con IP (40 pts); all'aumento dell'ET1 polmonare si ha una diminuzione del Vmat-2 ($p < 0,05$). Aumentando il differenziale tra ET1 femorale - ET1 polmonare si ha una riduzione di h-DAT e Vmat-2 ($p < 0,05$).

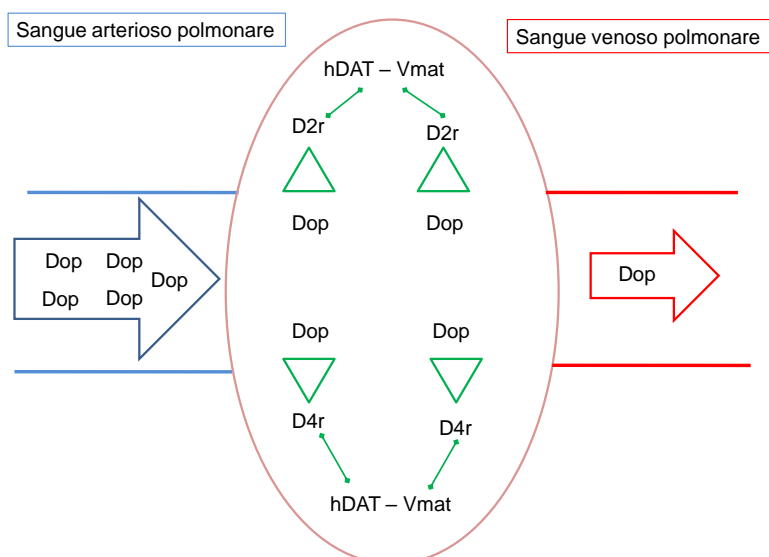
Le correlazioni non riportate sono state calcolate e non rappresentate, per motivi di spazio e ordine, poiché non statisticamente significative.

Nel gruppo di controllo composto da soggetti senza Ipertensione Polmonare sono state eseguite le medesime analisi dei dati che non hanno evidenziato correlazioni statisticamente significative tra gli indici di cateterismo cardiaco, il sistema dopaminergico e l'endotelina.

Discussione e Conclusioni

Interpretando i risultati si può affermare che nelle fasi iniziali dell'Ipertensione Polmonare il sistema dopaminergico del piccolo circolo tenta di compensare l'aumento della PAP incrementando il consumo locale di dopamina che avrebbe un effetto vasodilatatore: difatti si osserva un aumento dei livelli di dopamina e una up regulation dei recettori dopaminergici (in particolare D2r) (Fig. 4).

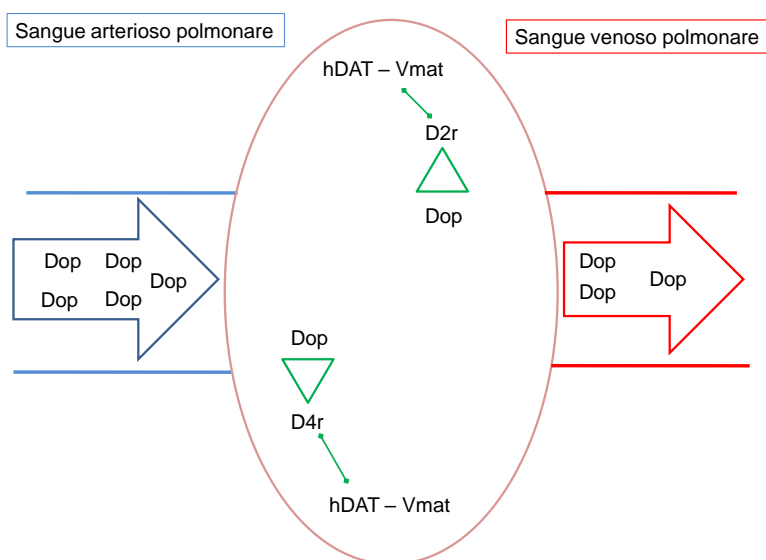
Fig. 4 Compenso dopaminergico nelle fasi iniziali dell'IP



Meccanismo di compenso dopaminergico nelle fasi iniziali dell'ipertensione Polmonare

Questo meccanismo di compenso, tuttavia, non riesce a bloccare la naturale evoluzione della malattia; difatti all'aumentare ulteriore della PAP, accompagnato da un aumento dell'ET1 polmonare, diminuiscono i trasportatori della dopamina (h-DAT e Vmat-2) e quindi il suo effetto locale (Fig. 5).

Fig. 5 Sistema dopaminergico ad alti valori di PAP



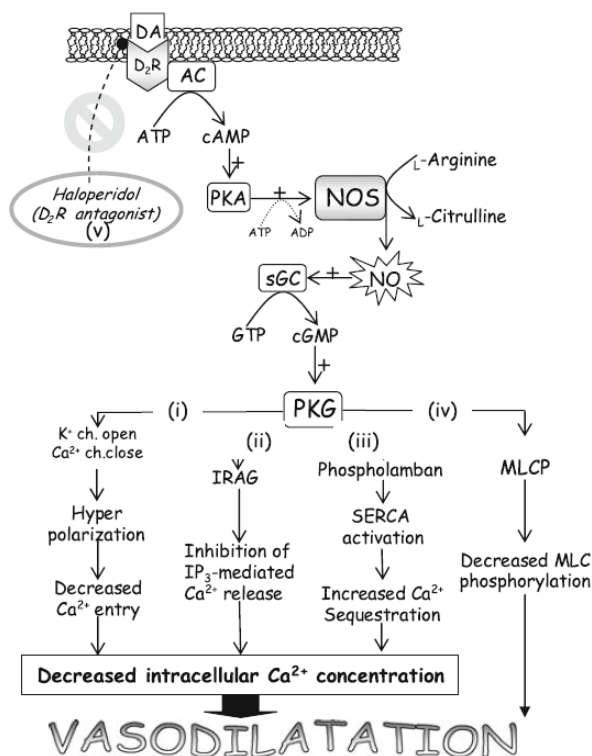
Mancato compenso dopaminergico nelle fasi avanzate dell'Ipertensione Polmonare

Le concentrazioni di dopamina non variano in maniera statisticamente significativa tra il gruppo di controllo e i pazienti con IP: quello che si modifica, in quest'ultimi, è la distribuzione tra piccolo e grande circolo per il consumo a livello polmonare in base alla PAP, pur mantenendo la concentrazione totale nel range fisiologico. Aumenta la produzione di dopamina ma si incrementa anche il consumo locale a livello polmonare.

L'effetto vasodilatatore della dopamina nel piccolo circolo è mediato probabilmente dal sistema dell'ossido nitrico (Fig. 6); studi sulla circolazione cerebrale e retinica hanno, infatti, dimostrato che la dopamina interagendo con il recettore D2 aumenta i livelli di cAMP (AMP ciclico) e quindi della iNOS ed eNOS (ossido nitrico sintetasi inducibile ed endoteliale) [21,22]. D'altronde l'effetto vasodilatatore dell'NO (ossido nitrico) a livello della circolazione polmonare e la sua correlazione con l'endotelina è ben noto [14].

Fig. 6 Vasodilatazione: dopamina e ossido nitrico

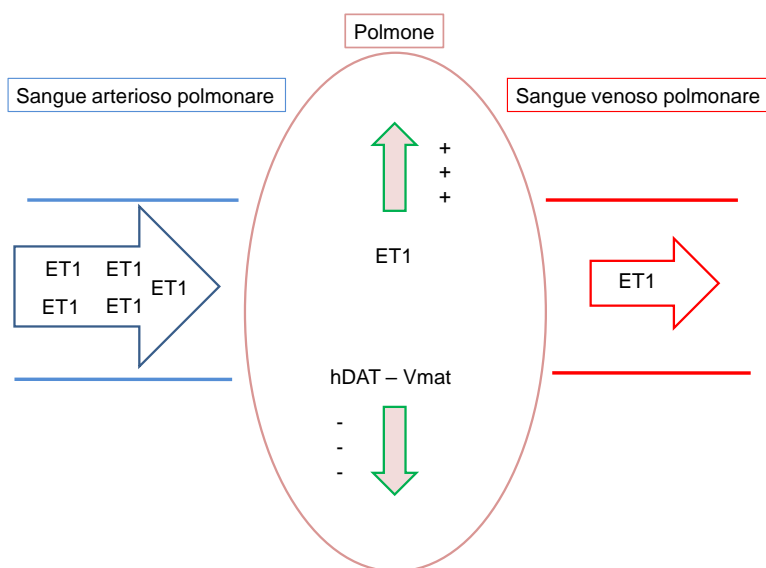
(Pyne-Geithman GJ, Dopamine D₂-Receptor-Mediated Increase in Vascular and Endothelial NOS Activity Ameliorates Cerebral Vasospasm After Subarachnoid Hemorrhage In Vitro. Neurocrit Care 2009;10:225-231).



Il ruolo della dopamina nell'ipertensione polmonare è contrastato dall'endotelina visto le correlazioni inverse tra l'ET1 e i trasportatori e recettori della DA; come descritto in letteratura [14,15] l'endotelina svolge un ruolo vasocostrittivo diretto e di rimodellamento vascolare nell'IP e tale meccanismo sembra, alla lunga, prevalere sull'iniziale tentativo di compenso dopaminergico.

Nelle fasi avanzate dell'IP la vasodilatazione indotta localmente dalla dopamina è meno efficace poiché contrastata dall'endotelina 1: l'ET1 interagendo con i recettori ETa ed ETb stimola i fibroblasti a deporre collagene aumentando la fibrosi e irrigidendo la parete del vaso che quindi reagisce meno allo stimolo dilatatorio. Le alterazioni anatomico strutturali della parete vasale stimulate dall'endotelina 1 potrebbero essere responsabili della diminuzione dei recettori (D2, D4) e dei trasportatori (Vmat, hDAT) della dopamina in tale sede (Fig. 7).

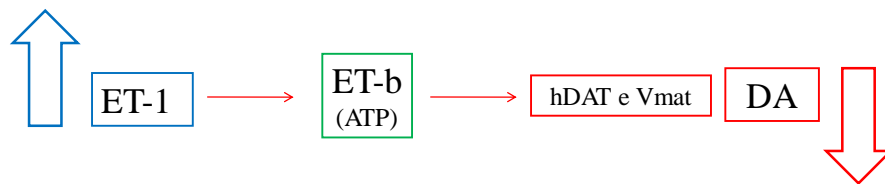
Fig. 7 Endotelina e dopamina nelle fasi avanzate dell'IP



Fasi avanzate di IP: correlazioni tra ET1 e trasportatori della dopamina

L'endotelina 1, inoltre, interagendo con il recettore ET B inibisce il rilascio di ATP intracellulare e quindi la liberazione di dopamina come dimostrato da studi in vitro (Fig. 8) [23].

Fig. 8 ET-1 inibisce tramite ET-B l'utilizzo di DA



Concludendo, la patogenesi e l'evoluzione dell'IP coinvolgono l'endotelina da una parte, che induce un aumento della pressione nel piccolo circolo con meccanismi ben noti [14,15], inizialmente compensato dal sistema dopaminergico che, nella fasi più avanzate della malattia, si esaurisce a causa dell'inibizione dell'ATP da parte dell'ET B, stimolato dal legame con ET 1 (Fig. 8), e per il rimodellamento vascolare che rende le pareti del piccolo circolo anatomicamente e funzionalmente meno reattivi alla vasodilatazione.

Queste conclusioni spingono a sfruttare il sistema dopaminergico nell'Ipertensione Polmonare nelle fasi precoci della malattia in vista di una possibile applicazione terapeutica.

Bibliografia

1. Simonneau G, Robbins I, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, Elliott CG, Gaine S, Gladwin MT, Jing ZC, Krowka MJ, Langleben D, Nakanishi N, Souza R. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54: S43-S54.
2. Hachulla E, Gressin V, Guillevin L, Carpentier P, Diot E, Sibilia J, Kahan A, Cabane J, Francès C, Launay D, Mouthon L, Allanore Y, Tiev KP, Clerson P, de Groote P, Humbert M. Early detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: a French nationwide prospective multicenter study. *Arthritis Rheum.* 2005;52:3792-800.
3. Kovacs G, Berghold A, Scheidl S, Olschewski H. Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review. *Eur Respir J.* 2009;34:888-94.
4. Ghofrani HA, Voswinckel R, Reichenberger F, Olschewski H, Haredza P, Karadaş B, Schermuly RT, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F. Differences in hemodynamic and oxygenation responses to three different phosphodiesterase-5 inhibitors in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized prospective study. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:1488-96.
5. Johnson RL. Low dose dopamine and oxygen transport by the lung. *Circulation* 1998;98:97-99.

6. Ciarka A, Vincent JL, van de Borne P. The effects of dopamine on the respiratory system: friend or foe. *Pulm Pharmacol Ther* 2007;20:607-15.
7. Vohra PK, Hoepfner LH, Sagar G, Dutta SK, Misra S, Hubmayr RD, Mukhopadhyay D. Dopamine inhibits pulmonary edema through the VEGF-VEGFR2 axis in a murine model of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012;30:185-92.
8. Ricci A, Mignini F, Tomassoni D, Amenta F. Dopamine receptor subtypes in the human pulmonary arterial tree. *Auton Autacoid Pharmacol*. 2006;26:361-9.
9. Amenta F, Ricci A, Tayebati SK, Zaccheo D. The peripheral dopaminergic system: morphological analysis, functional and clinical applications. *Ital J Anat Embryol* 2002;107:145-67.
10. Martyn J, Wilson RS, Burke JF. Right ventricular function and pulmonary hemodynamics during dopamine infusion in burned patients. *Chest* 1986;89:357-60.
11. Yamauchi M, Kobayashi Y, Shimoura K, Hattori K, Nakase A. Endothelium-dependent and -independent relaxation by dopamine in the rabbit pulmonary artery. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1992;19:401-10.
12. Blumberg FC, Wolf K, Sandner P, Lorenz C, Riegger GAJ, Pfeifer M. The NO donor molsidomine reduces endothelin-1 gene expression in chronic hypoxic rat lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;280:258-263.

13. Sampaio AL, Rae GA, Henriques MG. Effects of endothelin ETA receptor antagonism on granulocyte and lymphocyte accumulation in LPS-induced inflammation. *J Leukoc Biol.* 2004;76:210-6.
14. Galiè N, Manes A, Branzi A. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovascular Research* 2004;61;227-37.
15. Vizza CD, Letizia C, Petramala L, Badagliacca R, Poscia R, Zeponi E, Crescenzi E, Nona A, Benedetti G, Ferrante F, Sciomer S, Fedele F. Venous endothelin-1 (ET-1) and brain natriuretic peptide (BNP) plasma levels during 6 month bosentan treatment for pulmonary arterial hypertension. *Regul Pept* 2008;151:48-53.
16. Tayebati SK, Amenta F, Amici S, El-Assouad D, Gallai V, Ricci A, Parnetti L. Peripheral blood lymphocytes muscarinic cholinergic receptor subtypes in Alzheimer's disease: a marker of cholinergic dysfunction? *Journal of Neuroimmunology* 2001;121;126-31.
17. Tayebati SK, Codini M, Gallai V, Mannino F, Parnetti L, Ricci A, Sarchielli P, Amenta F. Radioligand binding assay of M1-M5 muscarinic cholinergic receptor subtypes in human peripheral blood lymphocytes. *Journal of Neuroimmunology* 1999;99;224-29.
18. Ricci A, Mannino F, Bronzetti E, Felici L, Adani O, Gemma D, Amenta F. Peripheral blood lymphocyte muscarinic cholinergic receptors in airway hyperresponsiveness: a marker of cholinergic dysfunction? *Journal of Autonomic Pharmacology* 1998;18;251-55.

19. Ricci A, Amenta F, Bronzetti E, Mannino F, Mariotta S, Tayebati SK. Expression of peripheral blood lymphocyte muscarinic cholinergic receptor subtypes in airway hyperresponsiveness. *Journal of Neuroimmunology* 2002;129:178-85.
20. Ricci A, Mariotta S, Amenta F, Tayebati SK, Terzano C. Changes in muscarinic cholinergic receptor expression in human peripheral blood lymphocytes in allergic rhinitis patients. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics* 2008;21:79-87.
21. Sekaran S, Cunningham J, Neal MJ, Hartell NA, Djamgoz MBA. Nitric oxide release is induced by dopamine during illumination of the carp retina: serial neurochemical control of light adaptation. *European Journal of Neuroscience* 2005;21:2199-2208.
22. Pyne-Geithman GJ, Caudell DN, Cooper M, Clark JF, Shutter LA. Dopamine D₂-Receptor-Mediated Increase in Vascular and Endothelial NOS Activity Ameliorates Cerebral Vasospasm After Subarachnoid Hemorrhage In Vitro. *Neurocrit Care* 2009;10:225-231.
23. A. Gardner, T. C. Westfall, and H. Macarthur. Endothelin (ET)-1-Induced Inhibition of ATP Release from PC-12 Cells Is Mediated by the ETB Receptor: Differential Response to ET-1 on ATP, Neuropeptide Y, and Dopamine Levels. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;313:1109-17.