



## INTRODUZIONE

Le malattie cardiovascolari su base aterosclerotica (infarto miocardico ed Ictus cerebrale) rappresentano la prima causa di mortalità e morbilità della popolazione, nei paesi industrializzati.

I classici fattori di rischio cardiovascolari quali l'età avanzata, l'ipertensione arteriosa, il diabete, il fumo di sigaretta, l'ipercolesterolemia, l'ipertrofia ventricolare sinistra, l'insufficienza cardiaca e l'inattività fisica rappresentano i principali fattori di rischio nello sviluppo delle complicanze cardiovascolari e sono tutti caratterizzati da un aumentato stress ossidativo e dalla presenza di disfunzione endoteliale.

Lo stress ossidativo e l'infiammazione sono profondamente collegati, in quanto lo stimolo infiammatorio può portare alla produzione, da parte delle cellule fagocitiche di numerosi radicali liberi; entrambi sono legati alla disfunzione endoteliale, in quanto l'endotelio può essere sorgente ed obiettivo dello stress ossidativo e partecipa alla risposta infiammatoria.

Lo stress ossidativo è definito come il danno tissutale derivato dallo squilibrio tra un'eccessiva generazione di composti ossidanti e la insufficienza dei meccanismi di difesa.

La generazione di composti ossidanti avviene fisiologicamente in risposta ad insulti infiammatori e nei processi di riparazione tissutali. D'altro canto un'impropria attivazione dei processi ossidativi può essere cronicamente presente in situazioni patologiche, come ad esempio l'ipertensione arteriosa ed il diabete mellito, contribuendo al danno tissutale e cellulare.

Le patologie cardiovascolari rappresentano la principale causa di mortalità nei pazienti uremici (1,2,3). La mortalità cardiovascolare di un paziente in dialisi di 45 anni è 100 volte superiore che nella popolazione generale. In molti studi trasversali nei pazienti in dialisi, è stato

evidenziato che i fattori di rischio tradizionali come ad esempio l'ipertensione e l'ipercolesterolemia non siano dotati di un grosso valore predittivo, mentre nuovi fattori di rischio, definiti "non tradizionali", quali ad esempio l'infiammazione, l'anemia, le alterazioni del metabolismo Calcio-Fosforo, o la malnutrizione siano ampiamente correlati con la mortalità cardiovascolare(4,5). Dati emergenti dimostrano come il rischio cardiovascolare aumenti progressivamente al decrescere della funzione renale. L'ipotesi più avvalorata del legame fisiopatologico fra infiammazione, malnutrizione e complicanze cardiovascolari nel paziente nefropatico è data dallo stress ossidativo. Tale ipotesi nasce dall'osservazione del maggiore stato ossidativo del paziente nefropatico, che porta ad un incremento dell'ossidazione di proteine, lipidi e carboidrati ed aumenta progressivamente il decrescere della funzione renale. Il risultato principale è lo sviluppo più precoce o "accelerato" dell'aterosclerosi(6,9).

Lo stress ossidativo e l'infiammazione sono profondamente collegati, in quanto lo stimolo infiammatorio, agendo sulle cellule fagocitiche, provoca la produzione di numerosi radicali liberi; inoltre, entrambi i processi sono legati alla disfunzione endoteliale, essendo l'endotelio sia sorgente che bersaglio dello stress ossidativo e partecipando alla risposta infiammatoria.(10)

L'ipertensione arteriosa, svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo delle alterazioni cardiache dei pazienti con CKD, soprattutto mediante l'induzione dell'ipertrofia ventricolare sinistra (IVS) (11-12). Inoltre, la riduzione della riserva coronarica e della densità capillare che spesso si verificano nei pazienti con CKD li espongono ad un elevato rischio di ischemia miocardica (13).

L'IVS è un'anomalia strutturale cardiaca frequentissima tra i pazienti con ESRD, con una prevalenza superiore al 70% (14,15); la presenza di IVS, inoltre, si associa con una peggiore prognosi cardiovascolare (16,17). Mentre questi dati sono ormai ben consolidati per quanto riguarda i pazienti con ESRD, meno dati sono disponibili in letteratura riguardo l'IVS in pazienti con CKD non uremici. Tuttavia, i dati della letteratura indicano in questi pazienti una

prevalenza di IVS compresa tra il 34 ed il 78%; è interessante notare come la prevalenza si incrementi di pari passo al decrescere della funzione renale (15).

Recentemente, la presenza di massa ventricolare sinistra (LVM) inappropriata ha mostrato un impatto negativo sulla prognosi cardiovascolare dei pazienti con ipertensione arteriosa (18).

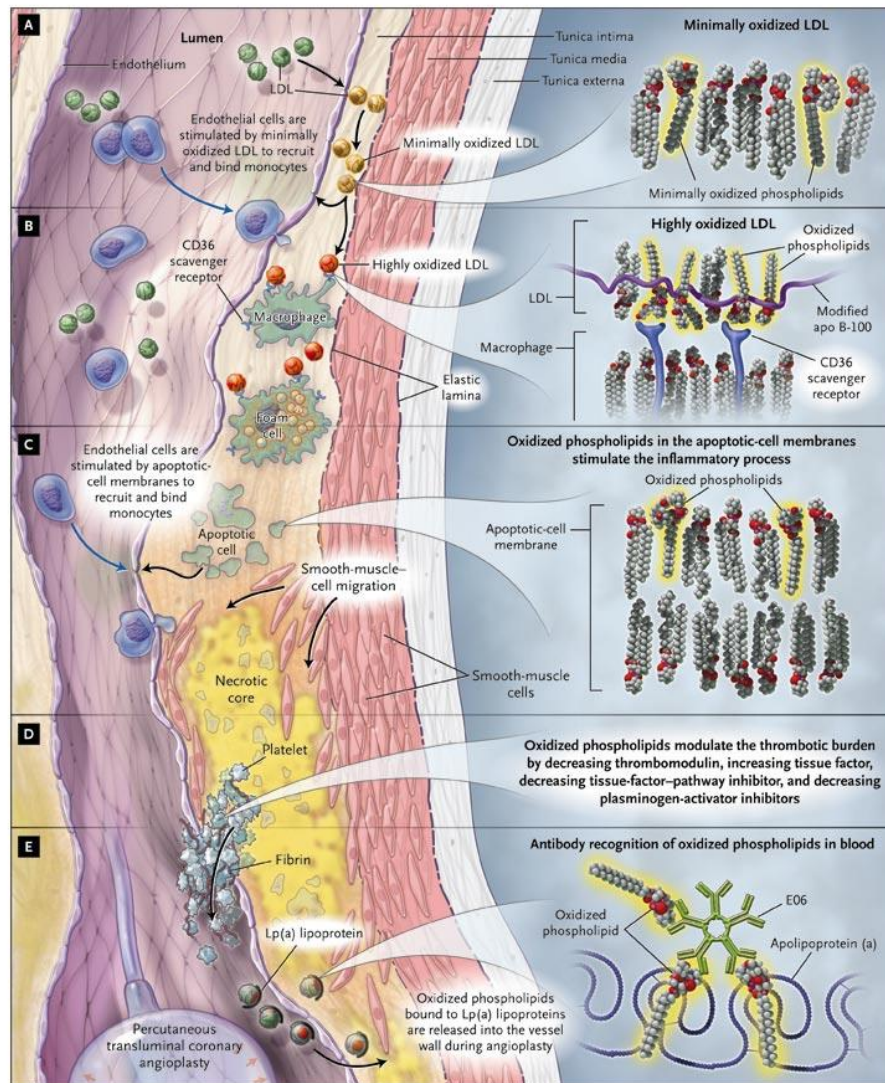
## STRESS OSSIDATIVO

Lo stress ossidativo, definito come un'eccessiva attività dei ROS, è associato all'ipertensione così come in numerose patologie quali l'ipercolesterolemia, il diabete, l'invecchiamento.

Nel 1989 Steinberg ed il suo gruppo avanzarono l'ipotesi che l'aterogenicità delle LDL era aumentata dalle modificazioni ossidative. Studi sperimentali hanno evidenziato come i ROS possano essere coinvolti in diversi aspetti del processo aterosclerotico. I ROS possono promuovere l'infiammazione, alterare il tono vascolare, attivare le metalloproteinasi, causare aggregazione piastrinica, stimolare la proliferazione di cellule muscolari lisce. Tutti questi eventi sono coinvolti nella lesione aterosclerotica. Le cellule endoteliali, le cellule muscolari lisce, i macrofagi sono una sorgente di ossidanti che possono favorire l'ossidazione delle LDL. La teoria "response to injury" dell'aterosclerosi ipotizza che l'endotelio possa essere danneggiato da un fattore fisico o chimico, dall'infezione o dalle stesse OX LDL. Le OX LDL possono danneggiare direttamente le cellule endoteliali ed indurre l'espressione di molecole di adesione e fattori chemio tattici. Questi processi portano all'attivazione e legame dei monociti e T linfociti alle cellule endoteliali. Quindi le cellule endoteliali, i leucociti e le cellule muscolari lisce producono chemochine che favoriscono la migrazione dei monociti e dei linfociti nello spazio sub endoteliale, dove si avrà la formazione delle Foam Cell e della successiva placca (19).

Il ruolo fondamentale dello stress ossidativo nell'aterosclerosi è stato evidenziato in un modello sperimentale su cavie apoE deficienti, un modello di aterosclerosi, dove l'escrezione urinaria di 8-ISO PGF 2alpha era aumentata(20,21); inoltre, nell'uomo l'8-ISO PGF 2alpha è stato trovato localizzato nella placca aterosclerotica (22,23).

Esistono evidenze recenti da studi sperimentali e clinici che lo stress ossidativo possa essere coinvolto nella patogenesi dell'aterosclerosi ed altre complicanze dell'uremia quali l'amiloidosi, l'anemia e la malnutrizione.



**Berliner J and Watson A. N Engl J Med 2005;353:9-11**

Le Low-density lipoprotein (LDL) raggiungono lo spazio subendoteliale e vengono ossidate.

Le cellule infiammatorie vengono attratte dalla parete vascolare, entrano in contatto con le ox-LDL attraverso i recettori scavenger e si trasformano in foam cells.

Le membrane cellulari delle cellule andate incontro ad apoptosi continuano a richiamare cellule infiammatorie,

I fosfolipidi ossidati possono promuovere la trombosi attraverso la modulazione di fattori trombotici.

Lp(a) lipoprotein, che si accumula nelle lesioni aterosclerotiche, può essere riscontrata in elevate concentrazioni mediante l'uso di E06, un anticorpo diretto contro i fosfolipidi ossidati

## PATOGENESI

I processi ossidativi avvengono principalmente nei mitocondri, dove l'enzima citocromo ossidasi è responsabile di circa il 90% del metabolismo dell'ossigeno. Questo enzima agisce trasferendo 4 elettroni all'ossigeno in una reazione che produrrà 2 molecole d'acqua come prodotto finale. Questo complesso enzima contiene 4 gruppi redox, ognuno dei quali immagazzina un elettrone. Solo quando tutti e quattro i gruppi saranno ridotti avverrà il trasferimento simultaneo dei 4 elettroni alla molecola di ossigeno, senza passaggi intermedi che potrebbero portare alla formazione di prodotti intermedi dell'ossigeno altamente reattivi. Nonostante ciò una piccola frazione (1-2%) avviene attraverso passaggi intermedi che portano alla formazione di radicali liberi. In risposta a questo problema nei mammiferi si sono evoluti sistemi intracellulari con attività antiossidante, tali sistemi includono sistemi enzimatici idrofili e lipofili che possono legarsi con questi radicali liberi e favorirne l'eliminazione, prima che essi possano recare danno alle componenti strutturali funzionali della cellula (24,25).

Mentre i mitocondri sono produttori "accidentali" di stress ossidativo, i fagociti deliberatamente utilizzano alti livelli di ossigeno per difendersi dai patogeni. La catena respiratoria di questi fagociti è nota utilizzare 4 enzimi (NADPH ossidasi, superossido dismutasi, ossido nitrico sintetasi e mieloperossidasi) per produrre le specie reattive intermedie

quali: l'anione superossido, idrogeno perossido,ossido nitrico e acido ipocloroso per la distruzione dei microorganismi. Più recentemente è stata individuata una nuova via ossidativa che permette la nitrosilazione degli agenti patogeni direttamente per mezzo della mieloperossidasi (26,27).

Ognuno di questi ossidi di derivazione fagocitica può danneggiare direttamente i tessuti, recenti studi hanno enfatizzato il ruolo delle reazioni ossidative cloranti catalizzate dalla mieloperossidasi. La mieloperossidasi è una delle proteine più abbondanti dei fagociti, costituendo approssimativamente il 5% delle proteine dei neutrofilo e l'1% delle proteine dei monociti. La mieloperossidasi viene rapidamente secreta sotto stimolo. L'analisi istologica del tessuto aterosclerotico ha mostrato la presenza di mieloperossidasi attiva nelle Foam Cell, 3-Clorotirosina e di tirosina (prodotti dell'ossidazione della tirosina da parte della mieloperossidasi) nelle LDL ossidate e nelle lesioni aterosclerotiche (27). Queste reazioni sottolineano il ruolo centrale dell'attivazione fagocitica e delle reazioni associate all'infiammazione nell'aumentato stato ossidativo e nell'aterosclerosi.

## SISTEMI DI DIFESA

Per contrastare gli effetti dei radicali liberi e lo stress ossidativo in natura sono presenti sistemi di difesa enzimatici e non enzimatici.

La superossido dismutasi (SOD) agisce come prima linea di difesa nei confronti delle molecole di ossigeno; La catalasi riduce l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in acqua mentre l'enzima glutazione perossidasi (GSH-Px) riduce i lipidi perossidi utilizzando il GSH come donatore di elettroni (28,29).

L'anti ossidante non enzimatico più attivo è il Glutazione, che è uno scavenger per H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH<sup>+</sup> e ossidanti clorinati. La Vitamina E protegge le membrane cellulari dalla perossidazione lipidica formando un radicale tocoferolico a bassa reattività. La vitamina C lega direttamente



O<sub>2</sub>- e OH<sup>-</sup>. Le proteine come la ferritina, la transferrina l'albumina esercitano un'azione anti ossidante non enzimatica legando ioni reattivi.(30,31,35) Nel plasma il più importante sistema antiossidante è fornito dai gruppi tiolici, che sono largamente localizzati sulle molecole di albumina (32,33).

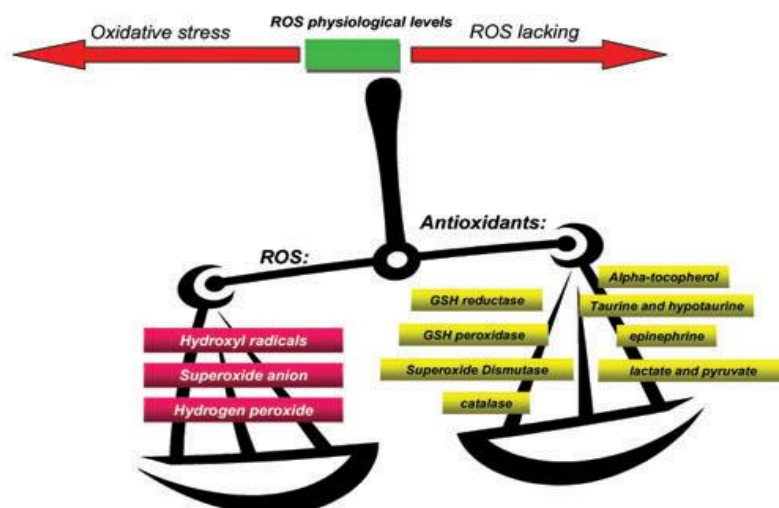
Anche l'ascorbato è un importante sistema extracellulare antiossidante ma l'albumina per mezzo di tali gruppi tiolici fornisce una protezione antiossidante almeno dieci volte superiore.

Stenvinkel ha recentemente dimostrato che l'ossidazione dei gruppi tiolici liberi sull'albumina è una delle caratteristiche principali di stress ossidativo nell'uremico, inoltre l'albumina è il principale target plasmatico per la formazione di gruppi carbonilici. L'albumina agisce quindi come proteina legante i prodotti dell'ossidazione dei carboidrati, dei lipidi, e delle proteine.

In accordo con questa ipotesi, appare quindi evidente come i pazienti con malnutrizione e minor concentrazione plasmatica di albumina hanno una diminuita capacità antiossidante per la ridotta disponibilità di gruppi tiolici (34).

Uno studio sui pazienti con sindrome nefrosica ha evidenziato una correlazione diretta fra capacità antiossidante plasmatica e concentrazione di albumina.

Un altro studio ha dimostrato come i pazienti malnutriti con CKD avessero un aumentato stress ossidativo paragonato ai ben nutriti di pari funzionalità renale.



## BIOMARKER DI STRESS OSSIDATIVO

Il termine biomarker è stato assunto dalla epidemiologia molecolare dai biologi per descrivere il cambiamento molecolare di una molecola indotto dalla reazione con una sostanza reattiva:ossigeno, nitrato o aldeide. Questo termine è applicato per prodotti derivati dai lipidi, dalle proteine o dal consumo di antiossidanti; le reazioni chimiche che producono tali reazioni possono essere di differente natura.

Lo Stress Ossidativo esercita la sua azione quando la produzione di sostanze ossidanti supera la capacità antiossidante dell'organismo. Quando ciò accade ne risulta l'ossidazione di macromolecole quali proteine, lipidi, carboidrati e DNA. Data la minima quantità e la breve emivita dei Radicali liberi, clinicamente la quantificazione dello Stress Ossidativo si effettua sulla misura di differenti sostanze più stabili prodotte dalle reazioni ossidative (prodotti di perossidazione lipidica, AGE, prodotti dell'ossidazione di proteine e lipidi, derivati dell'ossidazione dell'Acido nucleico) o anticorpi diretti contro epitopi ossidati (anticorpi antiLDLossidate)(35,36).

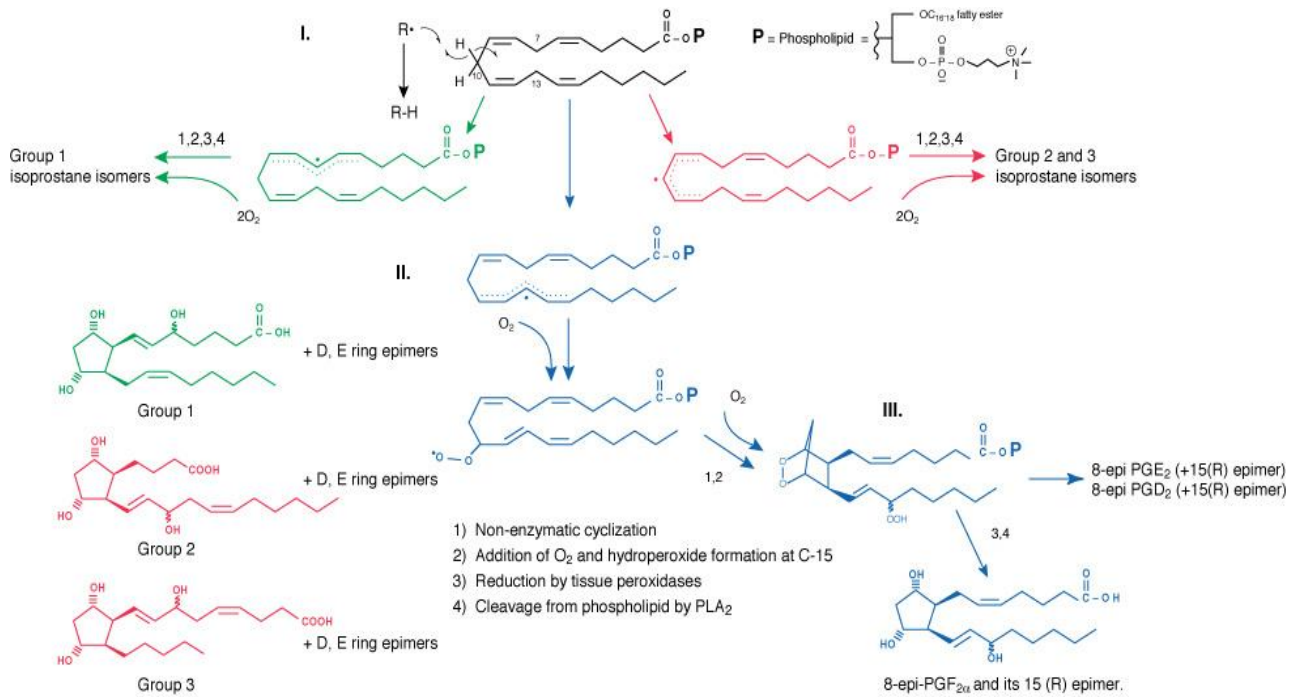
Allo stesso modo possono essere quantificati antiossidanti enzimatici (superossido dismutasi, catalasi, glutatione perossidasi) e non enzimatici (Glutazione, Vitamina C, Vitamina E, Proteine di fase acuta negativa). (37)

## Markers of Oxidative stress and anti-oxidants

<b>Markers of Oxidative Stress</b>	<b>Anti-Oxidants</b>
<b>Lipid Peroxidation</b>	
Acroleyn	
Malonyldialdehyde	<b>Enzymatic</b>
4-Hydroxynonenal	Superoxide dismutase
F2-isoprostanes	Catalase
TBARS	Glutathione peroxidase
<b>Advance Lipid oxidation products</b>	
Oxidized LDL antibodies	<b>Non-Enzymatic</b>
	Glutathione
<b>Protein Oxidation</b>	Vitamin E
Advance oxidat protein products	Vitamin C
	Ferritin
<b>Carbohydrate oxidation</b>	Transferrin
AGE	Albumin
	Etc..
<b>Nucleic Acid oxidation</b>	
8-Hydroxy-2-deoxiguanosine	

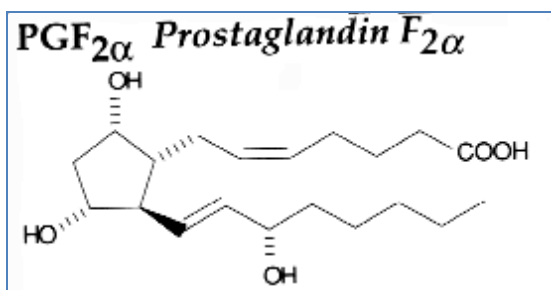
### PEROSSIDAZIONE LIPIDICA E ISOPROSTANI

Nel plasma dei pazienti uremici sono state riscontrate elevate concentrazioni di prodotti di ossidazione lipidica in confronto ai soggetti sani. Per esempio, l'acido arachidonico è stato dimostrato andare incontro ad una reazione di perossidazione per via non enzimatica, indotta dai radicali liberi, producendo una serie composti simil prostaglandinici (F2 like) chiamati F2 isoprostani. (38)



Le sorgenti di radicali liberi che principalmente contribuiscono alla formazione di isoprostani in vivo sono multiple. Queste includono la produzione di anione superossido da parte di radicale idrossilico dal sistema mitocondriale di trasporto degli elettroni, la generazione di anione superossido dalla NADPH ossidasi, radicali idroperossilici dalla lipoossigenasi

Gli F2 isoprostani, vengono dapprima sintetizzati sui fosfolipidi, e secondariamente rilasciati nel plasma, dove possono essere dosati in forma libera o legati ai fosfolipidi, e rappresentano quindi un valido metodo di stima di stress ossidativo.



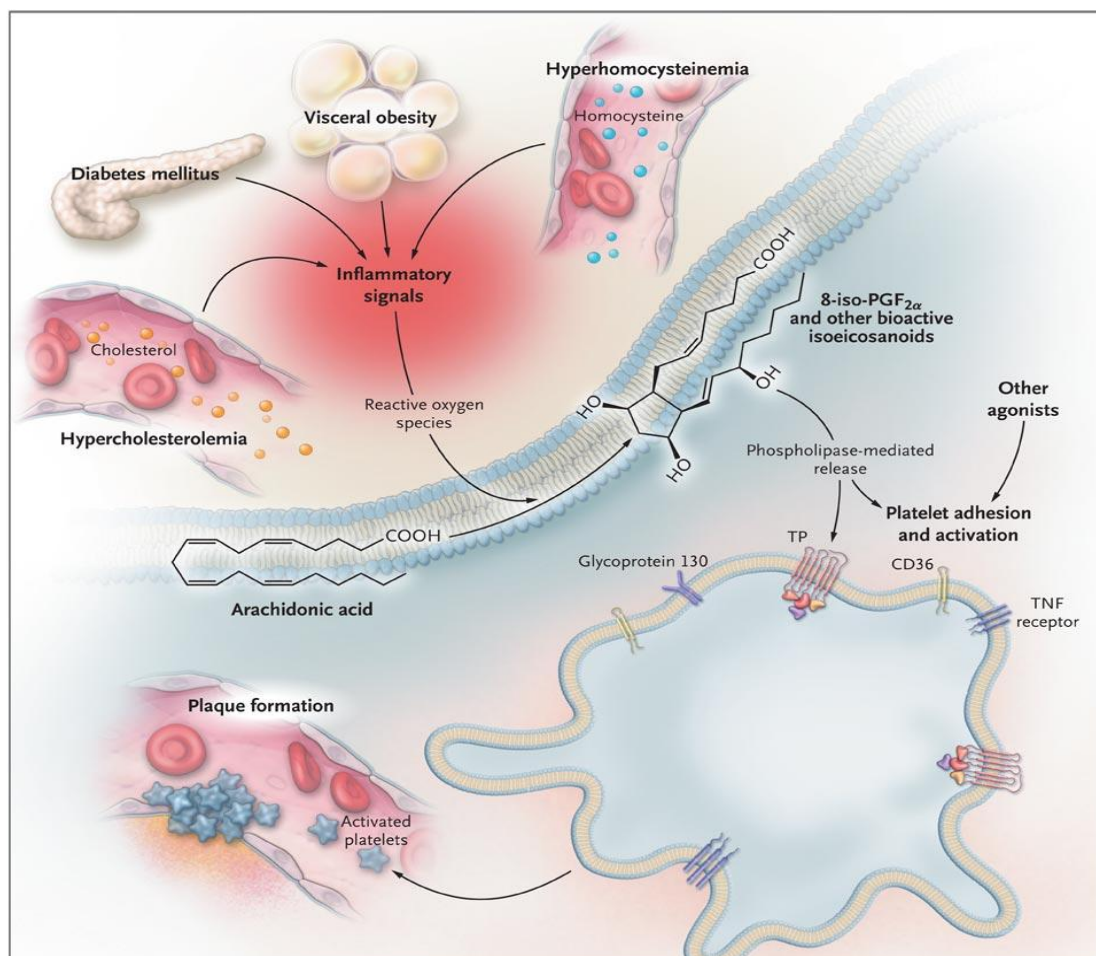
La somministrazione di isoprostani nelle cavie da esperimento induce una potente vasocostrizione a livello renale provocando riduzione del flusso plasmatico renale e del GFR.

Inoltre, gli isoprostani possono indurre una significativa produzione ET1 da parte di cellule endoteliali aortiche bovine.

Un'importante evidenza è quella che l'attività vasocostrittiva degli isoprostani può essere bloccata dall'antagonista del recettore trombossanico SQ20548, anche se molte evidenze indirette hanno dimostrato che l'azione sulla muscolatura liscia endoteliale è differenziata da quella dei trombossani.

Gli isoprostani posseggono diverse attività proaterogene che includono la vasocostrizione in diversi letti vascolari, favoriscono l'aggregazione piastrinica e stimolano la produzione delle cellule muscolari lisce.

Le concentrazioni plasmatiche di isoprostani dipendono principalmente dalla loro produzione, piuttosto che dal metabolismo ed escrezione, pertanto risultano ottimi indicatori di stress ossidativo in vivo.(39)

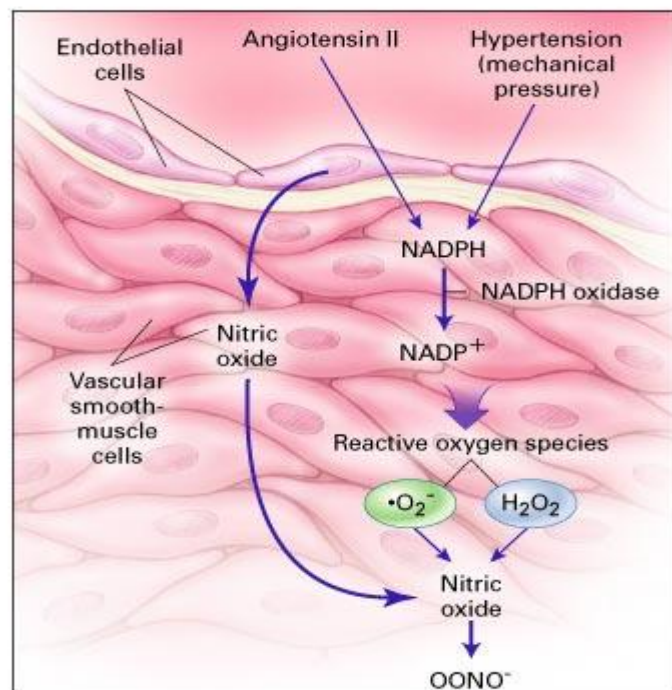


**Davi G and Patrono C. N Engl J Med 2007;**

Il Biomarker of Oxidative Stress Study (BOSS), ha mostrato che gli isoprostani sono il miglior indice di stress ossidativo in vivo.

Una diminuita disponibilità di NO ed un aumentato stress ossidativo sono stati riscontrati in numerosi studi sull'ipertensione arteriosa. Gli isoprostani urinari sono stati riscontrati elevati nei pazienti a rischio per futuri eventi cardiovascolari. Minuz ha evidenziato che i soggetti ipertesi hanno un'elevata escrezione di 8ISO-PGF2alpha e Trombassano. In tale studio l'autore ha inoltre evidenziato che fra gli ipertesi quelli che presentavano un maggiore danno d'organo avevano concentrazioni più elevate di isoprostani.

Evidenze sperimentali indicano che l'Angiotensina II favorisce la produzione di 8ISO-PGF2alpha, e partecipa all'aumento dei valori pressori e a mantenere lo status ipertensivo.

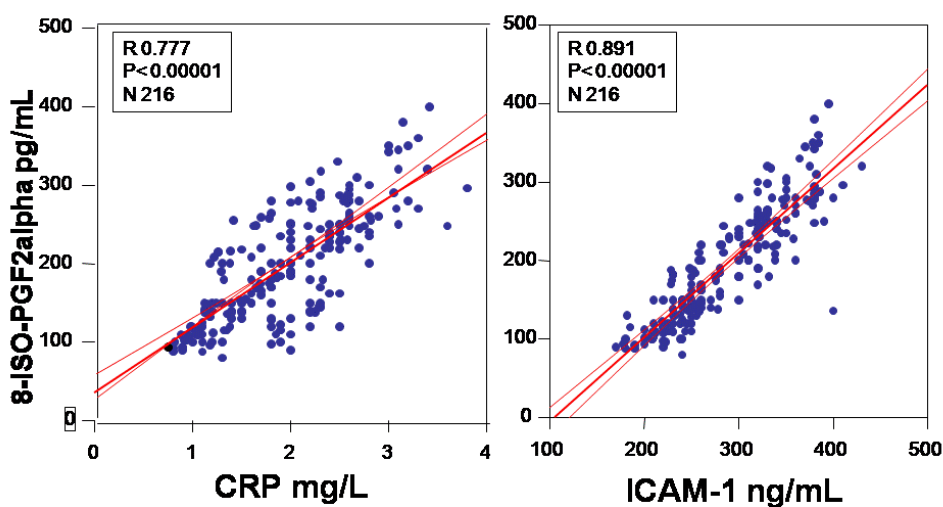


Sowers J. N Engl J Med 2002;346:1999-2001

In pazienti con ipertensione renovascolare, una patologia secondaria sostenuta spesso dall'attivazione del sistema renina angiotensina, l'escrezione urinaria di 8ISO-PGF2alpha è aumentata e correla positivamente con il rapporto reninico, un indice di attivazione del RAS.

In un nostro studio abbiamo suddiviso 216 pazienti ipertesi in quartili di 8ISO-PGF2alpha. In tali pazienti abbiamo dosato i markers di disfunzione endoteliale Intercellular adhesion molecule (ICAM-1) e vascular adhesion molecule (VCAM-1), ed abbiamo visto come le concentrazioni di tali molecole aumentassero al crescere dei quartili di 8ISO-PGF2alpha, con differenze significative fra ogni quartile per ogni parametro esaminato. All'analisi multivariata, il valore predittivo della hsCRP nei confronti dell'8ISO-PGF2alpha, marker di stress ossidativo, indipendentemente dai livelli di pressione arteriosa, e da altri fattori confondenti. Nello stesso studio l'analisi di molecole di adesione, ICAM1 e VCAM1, coinvolte nel processo aterosclerotico, risultavano dotate di valore prognostico predittivo dello stress ossidativo.(40)

### **C-reactive protein and intercellular adhesion molecule-1 are stronger predictors of oxidant stress than blood pressure in established hypertension**



S.Cottone, G. Cerasola et al. J. Hypertens 2007, 25:423-428

Livelli elevati di F2isoprostani sono stati riscontrati da 2 a 4 volte più elevati nel plasma di soggetti uremici rispetto ai soggetti di controllo e sono stati dimostrati correlare strettamente con la Proteina C Reattiva.(41)

Un'altra famiglia di composti generati dalla ossidazione lipidica dell'acido arachidonico è quella delle isolevuglandine, che a differenza degli isoprostani non circolano libere nel plasma ma legate a proteine a causa della loro estrema reattività. Salomon ha dimostrato come i livelli plasmatici nei pazienti in dialisi fossero il doppio rispetto ai soggetti sani.(42,43)

Un'altra tecnica di quantificazione dell'azione dello stress ossidativo sui lipidi è la misura dell'amino gruppo ossidato della proteina APO B100 per evidenziare le modificazioni delle LDL. Ziouzenkova et al hanno riscontrato nei pazienti in dialisi valori più elevati di tali molecole rispetto ai soggetti sani sottolineando il ruolo dello stress ossidativo nello sviluppo dell'aterosclerosi.

## EVIDENZE DA TRIALS CLINICI

Il ruolo emergente del legame fra uremia e aumentato stress ossidativo e patologia cardiovascolare necessiterà di nuovi approcci terapeutici disegnati per migliorare le conseguenti devastanti della patologia vascolare in questi pazienti.

È logico quindi l'utilizzo di antiossidanti quali la Vitamina C e la Vitamina E; attenzione deve essere posta nella somministrazione di grosse dosi di Vitamina C che può avere funzione sia antiossidante che pro ossidante.(44)

La somministrazione di Vitamina E è una strategia più promettente, la somministrazione di Vitamina E nei pazienti uremici è stata associata con miglioramento delle misure biochimiche



di stress ossidativo e miglioramento dell'anemia dell'insufficienza renale cronica come risultato di una minore distruzione eritocitaria ossidativo mediata

Tepel (45) ha valutato l'effetto dell'acetilcisteina ( 600 mg 2vv/die ) vs 'placebo' in un trial randomizzato su 134 pazienti in emodialisi. L'uso di acetilcisteina era associato con una significativa riduzione della progressione verso l'end-point primario (morbilità e mortalità cardiovascolare).

I livelli di LDL ossidati erano confermati essere significativamente ridotti nel gruppo trattato con N-acetilcisteina. Il limite di tale studio era dato dalla breve durata e dal fatto che le LDL ossidate fossero l'unico marker di stress ossidativo misurato. Un altro trial nei pazienti con insufficienza renale cronica è stato il Secondary Prevention with Antioxidants of Cardiovascular disease in End-Stage renal disease (SPACE Study)(46), che ha valutato l'effetto della Vitamina E (800 IU/die) vs placebo in 196 emodializzati con patologie cardiovascolari preesistenti per un periodo medio di 519 giorni.

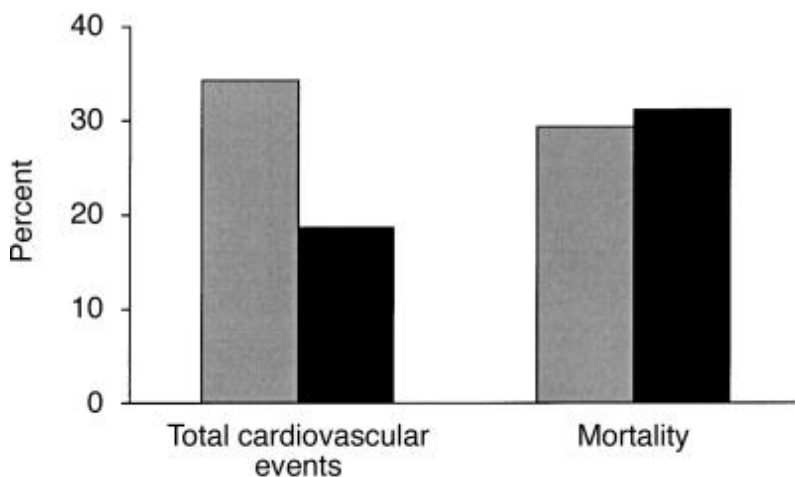
I pazienti che hanno ricevuto la Vitamina E avevano un rischio significativamente più basso di avere patologie cardiovascolari.

Ma i livelli di stress ossidativo non sono stati misurati al follow-up non potendo definire la correlazione diretta tra eventi cardiovascolari e stress ossidativo. I grossi benefici della somministrazione di Vitamina E contrastano con quelli del Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) study, un trial che non ha evidenziato differenze di comparsa di eventi cardiovascolari in 9541 soggetti ad alto rischio cardiovascolare (di cui 993 con CKD) sottoposti a somministrazione di Vitamina E (400 IU/die). L'apparente disaccordo fra i due studi può essere spiegata dalle più alte dosi di Vitamina E usata dalla severità della funzione renale e dal più frequente uso di Vitamina C (che ha un effetto antiossidante aggiuntivo) o la maggiore frequenza di eventi cardiovascolari dei soggetti dello SPACE trial.

L'utilizzo di una terapia antiossidante è stato recentemente ri valutato dalla pubblicazione dei risultati del Anti-oxidant Therapy in Chronic renal insufficiency (ATIC) study.

93 pazienti con CKD lieve moderata, non diabetici senza patologie cardiovascolari venivano randomizzati ad un trattamento farmacologico che includeva pravastatina ( 40 mg / die ) , seguita da Vitamina E ( 300 mg / die ) e terapia riducente l'omocistinemia ( acido folico 5 mg al giorno, piridossinaidrocloreto 100 mg, cianocobalamina 1 mg ) o a placebo per un periodo consecutivo di 6 mesi; lo scopo di questo studio era quello di valutare l'impatto della riduzione di stress ossidativo sul IMT carotideo, dilatazione flusso mediata dall'arteria brachiale, sull'albuminuria e sulla funzione renale. I livelli plasmatici di LDL ossidate e LDL colesterolo erano significativamente ridotti mentre non vi erano significativi cambiamenti nelle concentrazioni di malondialdeide.

Venivano evidenziati inoltre una significativa riduzione di IMT carotideo ed un aumento della FMD nel braccio sottoposto a trattamento. l'escrezione urinaria di proteine veniva inoltre ridotta dalla terapia antiossidante sebbene non fossero evidenziati benefici sulla funzione renale. Sfortunatamente gli effetti benefici di ciascun trattamento non potevano essere discriminati quindi non è stato possibile trarre conclusioni definitive sul ruolo della terapia antiossidante nei CKD. (47-49)



**Major end points of the SPACE Study.** Symbols are: (□) placebo; (■) vitamin E. (Adapted with permission from Boaz et al, *Lancet* 356:1213–1218, 2000.)

## **DISFUNZIONE ENDOTELIALE**

La definizione più accettata di disfunzione endoteliale riguarda il bilancio tra produzione di sostanze vaso dilatanti o vaso costringenti da parte di cellule endoteliali.

Recentemente è stato suggerito che la disfunzione endoteliale includa non soltanto una ridotta vasodilatazione, bensì una condizione pro infiammatoria pro trombotica associata ad una ridotta vasodilatazione in risposta a specifici stimoli dell'endotelio.(50,51)

La disfunzione endoteliale può partecipare all'elevazione dei valori tensivi e può contribuire al danno vascolare legato all'ipertensione, quest'ultimo aspetto è dovuto principalmente all'acquisizione di proprietà pro infiammatorie da parte dell'endotelio. La disfunzione endoteliale, che è coinvolta nello sviluppo dell'aterosclerosi, è stato dimostrato aumentare il rischio cardio e cerebro vascolare.(52)

Numerosi studi hanno dimostrato che l'ipertensione è associata con la disfunzione endoteliale. Fisiologicamente lo shear stress o agonisti che si legano a recettori sull'endotelio, attivano la Ossido Nitrico Sintetasi endoteliale (eNOS) per produrre Ossido Nitrico (NO), che è prodotto dall'L-Arginina in presenza di eNOs, l'NO attiva la guanilato ciclasi citosolica, aumenta la concentrazione guanosina monofosfato ciclica, contenuta nelle cellule muscolari vascolari, portando al rilassamento del tono vascolare. E' verosimile che la disfunzione endoteliale agisca sul pathway L-Arginina-NO.cGMP.

L'ossido nitrico gioca un ruolo fondamentale nella regolazione del tono vascolare. Nei pazienti ipertesi, la vasodilatazione endotelio-dipendente all'avambraccio è stato visto essere ridotta.

L'endotelio è una delle principali fonti di ROS, ma è anche il principale bersaglio di tali sostanze. Utilizzando la vasodilatazione dell'arteria omerale in risposta all'acetilcolina come indice di funzione endoteliale si è visto che l'infusione di Vitamina C (che antagonizza

direttamente i ROS) ne migliora la risposta. Tale evidenze sono state ottenute da uno studio che ha dimostrato come in 2 gruppi di pazienti quelli con la risposta peggiore a tale esame avevano un'incidenza di eventi cardiovascolari maggiore, suggerendo lo stretto legame fra produzione di ROS a livello endoteliale, disfunzione endoteliale e danno cardiovascolare.

A livello endoteliale la più importante reazione consiste nella generazione di ossido nitrico dalla L-Arginina per mezzo dell'enzima Ossido nitrico sintetasi. La presenza di Stress Ossidativo può agire direttamente sulla Tetraidrobiopterina, è un fattore essenziale per la funzione del NOS. Quando avviene l'ossidazione di tale molecola la sintesi di NO si riduce. Inoltre, l'ossido nitrico sintetasi può cominciare a generare anione superossido aumentando lo stress ossidativo già presente. Antiossidanti quali la Vitamina C e il GSH possono riconvertire la Tetraidrobiopterina alla forma non ossidata e normalizzare la sintesi di NO.

Va detto inoltre che l'ossigeno può reagire direttamente con NO, infatti si può avere la generazione di Perossinitrito, un composto altamente reattivo che aggiunge nitrati ai residui tirosinici delle proteine, potendo alterare le funzioni di molti enzimi e danneggiare i tessuti.

Diversi inibitori della NOs partecipano alla disfunzione endoteliale; il più noto è l'ADMA (dimetil arginina asimmetrica) (53). Quando la concentrazione di tale sostanza è elevata la produzione di NO è ridotta. In piccole quantità può essere eliminato per via renale, ma la metabolizzazione dell'adma dipende principalmente dall'attività dell'enzima dimetil diamino idrolasi (DDHA), che trasforma l'adma in citrullina. L'attività di questo enzima è bloccata dallo stress ossidativo. Condizioni quali l'ipercolesterolemia, iperomocisteinemia, il fumo di sigaretta sono caratterizzate da levate concentrazioni di ADMA. Lo studio CREED condotto su 225 pazienti in ESRD ha evidenziato come i pazienti con i livelli più elevati di ADMA avessero un aumentato rischio di eventi cardiovascolari. (54,55,56)

## INFIAMMAZIONE

L'inflammation e la disfunzione endoteliale sono associate con diverse patologie cardiovascolari quali l'ipertensione arteriosa, la patologia coronarica, e l'insufficienza renale.

L'American Heart Association nel 2002 ha indicato la proteina C reattiva ad alta sensibilità come marker di scelta nella stratificazione del rischio cardiovascolare. Sebbene numerosi altri marker infiammatori (come il fibrinogeno, la conta dei leucociti, la proteina amiloide A) siano stati testati, la PCR ha mostrato la maggiore sensibilità, stabilità, precisione ed accuratezza.

In particolare, riguardo il rischio cardiovascolare, dai dati basati sullo studio di oltre 40000 persone, è stato proposto di stabilire che una hsPCR <1mg/L indica un basso rischio, tra 1 e 3 rischio moderato, >3 rischio elevato.

La Proteina C Reattiva appartiene alla famiglia delle pentrassine, è una proteina nonglicosilata, prodotta principalmente a livello epatico, anche se recentemente è stato ipotizzato che possa essere prodotta dai macrofagi e dalle cellule muscolari lisce nelle lesioni aterosclerotiche, nel rene, neuroni e nei macrofagi alveolari.(57)

Opinione diffusa è che la sintesi avvenga sotto stimolo di Interleuchina 6 (IL-6), ma anche altre citochine quali il Tumor Necrosis Factor alpha (TNFalpha) e Interleuchina 1 (IL-1) possono indurre la produzione. Recenti evidenze suggeriscono che stimolo per la produzione di PCR possa essere dato dalla perossidazione lipidica o da infezioni da citomegalovirus che possono portare alla produzione di citochine pro infiammatorie che porteranno al rilascio di Proteina C Reattiva .Anche il tessuto adiposo può produrre citochine quali il TNFalpha e IL-6. (58-60)

Patologie che sono state dimostrate essere associate ad elevati livelli di Proteina C Reattiva includono l'inflammation cronica, la sindrome metabolica, il diabete tipo 2, l'ipertensione e l'insufficienza renale cronica(61,62).

La Proteina C Reattiva è presente nella parete vascolare dove induce l'espressione di molecole di adesione VCAM1 e ICAM1 da parte delle cellule endoteliali e funge da chemochina per i macrofagi. La Proteina C Reattiva lega le cellule danneggiate ed attiva il sistema del complemento in un processo che porterà alla formazione della placca aterosclerotica; la Proteina C Reattiva è associata alla disfunzione endoteliale ed alla aterosclerosi probabilmente attraverso processi che riducono la sintesi di ossido nitrico.

In uno studio condotto su 83 pazienti con ipertensione essenziale confrontati con 50 soggetti sani di controllo abbiamo valutato le concentrazioni plasmatiche di hsCRP, 8-ISO-PGF2alpha, ICAM-1, VCAM-1 e TNFalpha. Nei soggetti ipertesi abbiamo evidenziato concentrazioni maggiori di tali molecole rispetto ai controlli sani, successivamente, dividendo gli ipertesi secondo la classificazione di rischio cardiovascolare in base ai valori della hsCRP in <1, tra 1 e 3, e >3 mg/l, abbiamo osservato come al crescere della hsCRP le concentrazioni plasmatiche di tali molecole aumentassero parallelamente con differenze significative fra ogni terzile. L'analisi di regressione multipla condotta utilizzando la hsCRP come variabile dipendente, ha confermato la relazione con la pressione arteriosa sistolica e con l'8ISO-PGF2alpha indipendentemente da altri fattori confondenti. (63)

La Proteina C Reattiva è stato dimostrato essere predittore di mortalità e morbilità cardiovascolare nei pazienti in dialisi.

## MOLECOLE DI ADESIONE

Le molecole di adesione comprendono la famiglia delle Selectine (composta dalle E-selectine, P-selectine e L-selectine) e la famiglia delle Immunoglobuline che includono Intercellular Adhesion Molecule (ICAM-1) e Vascular Adhesion Molecule (VCAM-1).

Le molecole di adesione sono proteine che regolano l'interazione tra endotelio e leucociti; un aumento della loro espressione sulla superficie endoteliale induce un'aumentata adesione dei leucociti all'endotelio, in particolare dei monociti. Questo processo rappresenta la prima tappa della formazione dell'ateroma. Il particolare modo le cellule endoteliali presenti nelle lesioni aterosclerotiche esprimono elevate concentrazioni di ICAM-1, VCAM-1 ed E-Sel.

Studi clinici hanno evidenziato l'importanza delle molecole di adesione in numerose patologie legate all'infiammazione. E' stato dimostrato che i ROS peggiorano la vasodilatazione endotelio dipendente per mezzo della ridotta produzione di NO, ma studi in vitro su cellule endoteliali umane hanno evidenziato come i ROS possano altresì provocare la produzione di NF-KB, un fattore nucleare in grado di indurre la stimolazione del gene per V-CAM.(64)

Numerosi studi che hanno valutato il legame tra molecole di adesione, aterosclerosi e patologia cardiovascolare, hanno dimostrato che i livelli plasmatici di ICAM-1 e VCAM-1 sono legati alla patogenesi dello stroke, patologia coronarica e morte.

L'Endotelina-1 (ET-1), un peptide endotelio derivato di 21 aminoacidi, è il più potente vasocostrittore noto.(65) E' sintetizzato a partire da un precursore inattivo (preproET-1) che viene trasformato in proET-1 e quindi convertito nelle cellule endoteliali in ET-1 da un enzima specifico (endothelin 1 converting enzyme).

Oltre ad essere prodotta dall'endotelio, viene sintetizzata anche da altre cellule quali i Leucociti, i Macrofagi, le cellule muscolari lisce, i Cardiomiociti e le Cellule mesangiali.

L'ET-1 viene in gran parte (circa 80%) secreta abluminalmente verso le Cellule muscolari lisce. Solo una piccola quota (circa il 20%) passa direttamente in circolo dove possiede una lunga emivita plasmatica (45 minuti).

La produzione di ET-1 è stimolata da numerosi mediatori quali: l'Adrenalina, l'Angiotensina II, la Trombina, l'Insulina, l'Arginina e la Vasopressina, anche se lo stimolo più potente nell'uomo è dato dall'ipossia.

Anche vasocostrittori, Fattori di Crescita, Citochine e Molecole di Adesione stimolano la sintesi di ET-1.

Inibitori della sintesi, invece, sono: l'Ossido Nitrico, le Prostacicline, il Peptide Natriuretico Atriale e gli Estrogeni.

Le azioni dell'ET-1 sono mediate da due recettori pressori: ET-A ed ET-B.

Sulle Cellule muscolari lisce sono rappresentati entrambi i tipi recettoriali, la cui stimolazione da parte dell'ET-1 provoca costrizione cellulare e quindi vasocostrizione.

I Recettori ET-B sono presenti anche sulle Cellule Endoteliali e mediano il rilasciamento delle Cellule muscolari lisce e la vasodilatazione per stimolazione diretta della produzione di NO.

L'ET-1, oltre alla potente azione vasocostrittrice, ha un effetto trofico e mitogeno, stimolando la proliferazione delle Cellule muscolari lisce. Inoltre, stimola la produzione di Citochine e di Fattori di Crescita (VEGF e FGF), induce la formazione delle proteine che compongono la Matrice Extracellulare, potenzia gli effetti del TGF-beta e del PDGF e stimola l'aggregazione piastrinica e la chemiotassi dei Neutrofili.(66)

A livello renale l'ET-1 determina vasocostrizione dei vasi renali, contrazione delle cellule mesangiali, inibizione del riassorbimento idrico-salino e aumento della proliferazione cellulare glomerulare (67). Numerosi studi indicano che l'ET-1 è coinvolta nella patogenesi in un ampio



spettro di patologie renali, quali l'insufficienza renale acuta ischemica, la nefrotossicità da Ciclosporina, la Nefropatia da mezzo di contrasto, etc..

L'ET-1 media anche l'eccessiva deposizione di Matrice Extracellulare e la Fibrosi che si verificano nell'insufficienza renale cronica e nel Diabete Mellito; inoltre, una sua aumentata produzione nel nefrone può causare un'inappropriata ritenzione idrico-salina contribuendo allo sviluppo e/o mantenimento dell'ipertensione.(68-70)

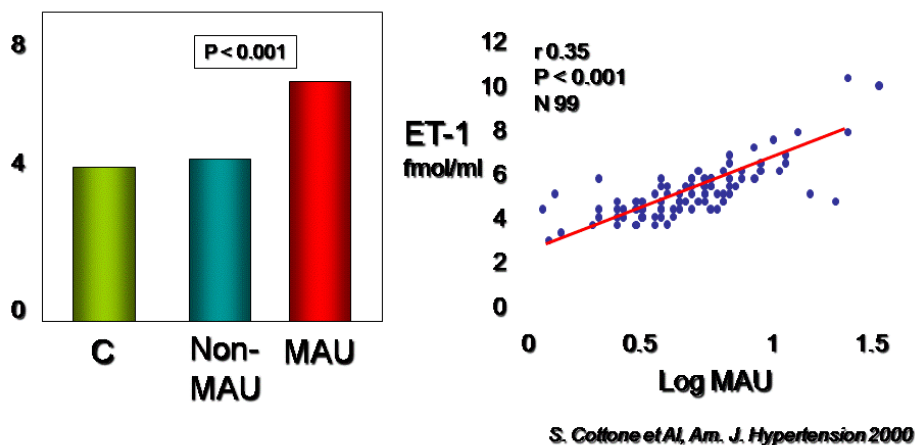
Il Transforming Growth Factor Beta è un Fattore di Crescita, coinvolto attivamente nello sviluppo e nella differenziazione dei tessuti.(71) Favorisce la deposizione di Matrice Extracellulare, incrementando la sintesi e riducendo la degradazione delle Molecole che la compongono; infatti, è il principale modulatore del processo rigenerativo che si verifica in seguito ad un danno tissutale.(72) E' un mediatore di Fibrosi ed è implicato nella patogenesi di molteplici malattie. Inoltre, è coinvolto nello sviluppo del danno renale: in glomerulopatie sperimentalmente indotte è stato dimostrato un aumento del TGF Beta che determina un accumulo di Collagene e conseguente Glomerulosclerosi.(73)

E' noto che la Microalbumuria,(MAU) nell'ipertensione arteriosa, rappresenta un indice di disfunzione endoteliale generalizzata e correla con il rischio cardiovascolare. La MAU è un predittore non soltanto di danno renale progressivo, ma anche di morbilità cardiovascolare complessiva(74); infatti, le Linee guida delle Società europee dell'ipertensione arteriosa e di cardiologia ed il Seventh Report of the Joint National Committee hanno incluso la microalbuminuria tra i maggiori fattori in grado di influenzare la prognosi e la stratificazione del rischio cardiovascolare aggiuntivo.(75,76) Lo studio PREVEND ha evidenziato come l'escrezione urinaria di proteine avesse un rapporto di continuità con il rischio di mortalità cardiovascolare.(77) La stretta relazione tra MAU e rischio cardiovascolare è stata altresì evidenziata nello studio LIFE, dove nei pazienti ipertesi la maggior prevalenza di MAU si associava ad una maggiore prevalenza di ipertrofia ventricolare sinistra. (78)

La microalbuminuria inoltre, è risultata associata ad un maggiore impatto dei fattori di rischio, quali elevati valori pressori, iperattività del sistema renina angiotensina, dislipidemia, infiammazione oltre che associarsi ad una maggiore disfunzione endoteliale generalizzata.

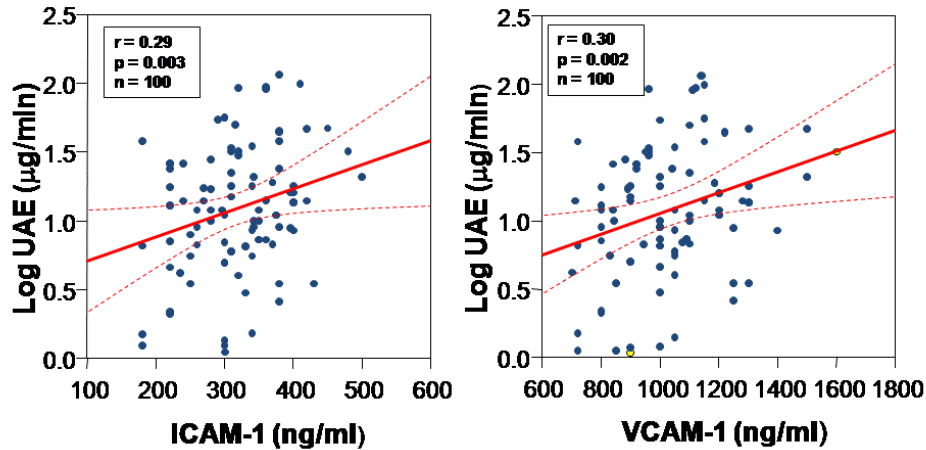
In un nostro studio (79) abbiamo dimostrato come nell'ipertensione essenziale caratterizzata dalla presenza della microalbuminuria, i livelli plasmatici di alcuni fattori di origine endoteliale, quali l'ET-1 e il TGF beta siano aumentati e correlino direttamente con la MAU.

### Endothelium-derived Factors in Microalbuminuric and Non-microalbuminuric Essential Hypertensives



In uno studio più recente (80) condotto su pazienti affetti da ipertensione essenziale e con funzione renale normale, distinti in microalbuminurici e non microalbuminurici, abbiamo evidenziato come gli ipertesi microalbuminurici fossero caratterizzati da maggiori concentrazioni plasmatiche di ICAM-1 e VCAM-1 rispetto ai pazienti non microalbuminurici; inoltre, i pazienti non microalbuminurici rispetto ai soggetti sani di controllo mostravano differenze statisticamente significative tra microalbuminuria (9 vs 6 ug/min) ICAM e VCAM a sottolineare come già a livelli di microalbuminuria  $< 20$  ug/min è presente uno stato di attivazione endoteliale.

## MICROALBUMINURIA AND EARLY ENDOTHELIAL ACTIVATION IN ESSENTIAL HYPERTENSION



Cottone S., Cerasola G. et al J. Human Hypertens 2007

Una metodica non invasiva di valutazione della funzione endoteliale sempre più usata negli studi clinici è la dilatazione flusso-mediata (FMD) dell'arteria brachiale, cioè l'aumento di calibro del vaso indotto dall'aumento del flusso arterioso (shear-stress) post-ischemia; maggiore è la vasodilatazione indotta dall'ischemia e maggiore è la funzionalità endoteliale.

La disfunzione endoteliale, marker precoce di aterosclerosi, comporta una riduzione della FMD e una ridotta vasodilatazione a sostanze agoniste che normalmente determinano una vasodilatazione endotelio-dipendente, quali bradichinina, istamina, sostanza P e soprattutto acetilcolina.

Per escludere che eventuali differenze di risposta ad agonisti endoteliali siano in realtà causate da un'alterata risposta contrattile delle cellule muscolari lisce, la risposta degli agonisti endotelio-dipendenti è confrontata con la risposta indotta da una sostanza (nitroglicerina) che induce vasodilatazione endotelio-indipendente attraverso la stimolazione diretta delle cellule muscolari lisce.

Diversi studi prospettici e retrospettivi hanno mostrato come la valutazione della funzione endoteliale possa essere utile per identificare i soggetti ad alto rischio di aterosclerosi così come per la stratificazione del rischio in pazienti con malattia coronarica già conclamata (51).

La disfunzione endoteliale, secondaria ad una riduzione della sintesi e della biodisponibilità di NO di produzione endoteliale, si suppone sia implicata nella patogenesi delle fasi precoci dello sviluppo di aterosclerosi (81).

## **SCOPO DELLO STUDIO**

Scopo di questo studio è di valutare le alterazioni morfofunzionali cardiovascolari in pazienti con insufficienza renale cronica affetti da ipertensione arteriosa e da ipertensione arteriosa associata a diabete mellito. Verranno analizzate le eventuali interazioni fra lo stress ossidativo, i marcatori della flogosi e della fibrosi, coinvolti nello sviluppo della malattia aterosclerotica e nella genesi del danno d'organo subclinico.

Verrà valutata la disfunzione endoteliale tramite l'analisi di molecole di adesione e la valutazione della Flow mediated dilation all'avambraccio

## **SOGGETTI E METODI**

In accordo con la dichiarazione di Helsinki e la linee guida istituzionali, il protocollo è stato approvato dal comitato etico locale e i pazienti erano a conoscenza della natura investigativa dello studio e d'accordo a partecipare dopo firma di consenso informato

### **POPOLAZIONE DI STUDIO**

I soggetti studiati sono stati sottoposti ad un'accurata anamnesi e ad esami di laboratorio di routine.

Durante l'arruolamento dei pazienti sono stati applicati i seguenti criteri di esclusione:

età < 20 o > 75 anni, GFR > 60 ml/min/1.73m<sup>2</sup>; anamnesi positiva per malattie cardiovascolari (pregressa malattia coronarica, storia di infarto miocardico o angina, aritmie cardiache, scompenso cardiaco, anomalie valvolari moderate o severe, pregresso ictus o attacco ischemico transitorio), attuale o pregressa terapia sostitutiva della funzione renale (dialisi o trapianto), altre patologie maggiori non cardiovascolari.

Dopo l'applicazione dei criteri di esclusione, sono stati arruolati 236 soggetti caucasici con CKD ed ipertensione (maschi/femmine: 148/88; età media 62,09±12,2- anni).

I pazienti sono stati definiti ipertesi in accordo con le Linee-Guida 2007 della European Society of Hypertension (ESH) e della European Society of Cardiology (ESC) (82). La pressione arteriosa (PA) clinica è stata considerata come media di tre misurazioni effettuate mediante uno sfigmomanometro a mercurio, dopo aver mantenuto il soggetto in posizione supina per 5 minuti.

106 pazienti erano inoltre diabetici. I pazienti sono stati definiti diabetici se la glicemia a digiuno era  $\geq 126$  mg/dL, e/o se la glicemia 2 ore dopo carico orale di 75 g di glucosio era  $\geq 200$  mg/dL 83), o in caso di pregressa diagnosi di diabete o attuale uso di farmaci anti-diabetici.

Il GFR è stato stimato in tutti i soggetti mediante l'equazione di MDRD. Il GFR medio per l'intero gruppo è risultato  $40,1 \pm 11,6$  ml/min/1.73 m<sup>2</sup>.

I pazienti con CKD sono stati stratificati utilizzando la classificazione della National Kidney Foundation (NKF) – Kidney Disease Outcome Quality Initiative (K/DOQI): stage 3 (CKD moderata): GFR 59-30 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>; stage 4 (CKD severa): GFR 29-15 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>; stage 5 (ESRD): GFR < 15 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>. I pazienti in stage 1-2 CKD o in trattamento dialitico sono stati esclusi dallo studio.

I pazienti arruolati sono stati pertanto suddivisi come segue: 105 pazienti (45%) erano nello stage 3, 87(37%) in stage 4, e 44 (18%) in stage 5.

La causa presunta di CKD è stata ricavata dalla revisione della documentazione clinica: ipertensione e/o diabete (65%), glomerulonefrite cronica (7%), malattia policistica renale autosomica dominante (3%), da causa sconosciuta (15%).

Tutti i pazienti erano in trattamento farmacologico anti-ipertensivo.

I farmaci impiegati erano i seguenti: 32% ACE-inibitori (da soli o in combinazione con un diuretico); 31% bloccanti dei recettori dell'angiotensina II (da soli o in combinazione con un diuretico); 6%  $\beta$ -bloccanti or  $\alpha$ - $\beta$ -bloccanti; 1%  $\alpha$ -bloccanti; 10% calcio-antagonisti (CCB); 2% solo diuretico; 18% una combinazione di due o più dei precedenti.

Il 24% dei pazienti era in trattamento con eritropoietina umana ricombinante.

Nel gruppo dei pazienti diabetici il 70 % riceveva terapia insulinica; il valore medio di HbA1c era di 7,3%.

Abbiamo arruolato 236 pazienti CKD Stadi III-V NKF che erano definiti ipertesi quando la pressione arteriosa sistodiastolica era maggiore di 140/90 ml/Hg o quando erano in trattamento con terapia anti ipertensiva.

I soggetti studiati venivano sottoposti ad un'anamnesi dettagliata e ad esami di laboratorio comprendenti la determinazione di creatinina ed elettroliti sierici ed urinari, glicemia, colesterolemia, trigliceridemia, catecolamine plasmatiche, ecografia renale ed ecocolordoppler delle arterie renali.

La pressione arteriosa clinica era considerata come la media di tre misurazione consecutive mediante uno sfigmomanometro a mercurio dopo che il soggetto era rimasto a riposo per almeno 5 minuti.

La stima del filtrato glomerulare è stata effettuata mediante formula MDRD in tutti i soggetti. Il giorno dello studio i pazienti, a digiuno in posizione supina venivano sottoposti a prelievo venoso per il dosaggio di:

- Molecole di adesione (ICAM-1, VCAM-1)
- Fattori di crescita (Endotelina-1, )
- Markers di infiammazione (hs-PCR, TNF-alpha)
- Markers di fibrosi (TGF-Beta)
- Marker di Stress Ossidativo (8-ISO-PGF 2alpha)

Contemporaneamente veniva misurata la pressione arteriosa.

Inoltre i pazienti venivano sottoposti a:

- Ecocardiogramma color-Doppler, valutazione della funzione diastolica con Doppler transmitralico e Doppler tissutale.
- Monitoraggio ambulatorio dinamico pressorio 24 h



- Eco-color-doppler dei TSA, con valutazione dello spessore intimo-mediale carotideo.
- dell'Augmentation index (AIX)
- Valutazione ultrasonografica della funzione endoteliale mediante distensibilità dell'arteria brachiale. (FMD - Flow Mediated Dilation)

## **METODI DI LABORATORIO**

Tutti i parametri di natura endoteliale venivano misurati con metodica ELISA, le curve di standardizzazione sono state stabilite usando concentrazione appropriate per ogni fattore. Precauzioni venivano prese per evitare interferenze con altri componenti sierici. Dopo centrifugazione a 4°C i campioni di sangue venivano congelati a -80°C.

Lo stress ossidativo misurato come 8-ISO-PGF<sub>2</sub>α, è stato utilizzato mediante un kit commerciale AssayDesignink, Ann,Arbor,USA.

La proteina C-reattiva HS è stata misurata con un kit elisa (Diagnostic Biochem London,Ontario, Canada),TGF beta è stato saggiato mediante un kit Amersham Biosciences.

La creatininemia è stata misurata mediante metodica di Jaffe'.

## **ABPM**

Per effettuare il Monitoraggio ambulatorio dinamico pressorio 24 h è stato utilizzato un registratore portatile non.invasivo Spacelabs 90207 (Redmond, Washington, USA).

La misurazione dei parametri pressori veniva automaticamente eseguita ad intervalli di 15 minuti durante il giorno (07:00-22:00), e ad intervalli di 20 minuti durante il riposo notturno (22:00-7:00).

La lettura, stampa ed analisi dei dati veniva svolta dall'interfaccia Spacelabs ABP90209 ver. 2.40.23). Valori di pressione sistolica superiori a 260 mmHg o minori di 70 mmHg, valori di pressione diastolica superiori a 150 mmHg ed inferiori a 40 mmHg, e valori di Pulse Pressure superiori a 150 mmHg o inferiori a 20 mmHg sono stati automaticamente eliminati.

Sono state accettate soltanto le registrazioni con più del 80% di dati validati.

## **ECOCARDIOGRAFIA**

L'esame ecocardiografico è stato effettuato utilizzando un apparecchio Acuson Sequoia 512 (Siemens, Mountain View, CA, USA). Le immagini sono state acquisite in parziale decubito laterale sinistro. L'ecocardiogramma mono-dimensionale (M-mode) è stato eseguito per valutare il diametro tele-diastolico (LVEDD) e tele-sistolico (LVESD) del ventricolo sinistro, lo spessore del setto interventricolare (IVST) e della parete posteriore (PWT), ed il diametro dell'atrio sinistro, in accordo con le indicazioni della American Society of Echocardiography (ASE) (84). Soltanto i frame con ottimale visualizzazione di tutte le interfacce e con visualizzazione contemporanea di setto, parete posteriore e diametri sono stati utilizzati per la lettura dei dati.

La massa del ventricolo sinistro (LVM) è stata determinata mediante la formula dell'ASE (85) ed è stata indicizzata sia per la superficie corporea (LVMI) che per l'altezza elevata a 2.7 (LVMH<sup>2.7</sup>) (86)

L'IVS è stata definita in accordo con le Linee-Guida 2007 ESH/ESC [27] Lo spessore parietale relativo (RWT) è stato calcolato come  $2PWT/LVEDD$ . L'IVS concentrica è stata definita come massa del ventricolo sinistro indicizzata per la superficie corporea (LVMI)  $>125$  g/m<sup>2</sup> nell'uomo e  $>110$  g/m<sup>2</sup> nella donna, con RWT  $>0.45$ ; l'IVS eccentrica è stata definita come LVMI  $>125$  g/m<sup>2</sup> nell'uomo e  $>110$  g/m<sup>2</sup> nella donna, con RWT  $<0.45$ .

La frazione di eiezione (EF) del ventricolo sinistro è stata misurata mediante ecocardiografia bidimensionale (87)

I dati ecocardiografici sono espressi come media di cinque cicli cardiaci completi. Le immagini sono state acquisite da un singolo cardiologo, in cieco rispetto alle caratteristiche cliniche dei pazienti.

### **VALUTAZIONE DELL'ISPESSIMENTO MEDIO-INTIMALE (IMT)**

Per la scansione ultrasonografica delle carotidi è stato utilizzato un ecografo dotato di sonda lineare (7-10 MHz). Il valore di IMT è stato ottenuto dalla migliore immagine in scansione longitudinale e proiezione laterale dei seguenti segmenti:

- ultimi 10 mm della carotide comune
- bulbo carotideo
- primi 10 mm della carotide interna distalmente alla biforcazione.

Nelle immagini ottenute sono stati misurati i seguenti parametri:

- IMT medio in ogni segmento arterioso (definito come la distanza tral'interlinea lume-intima e media-avventizia)
- IMT massimo in ogni segmento arterioso
- diametri lume-lume e avventizia-avventizia in carotide comune.

I valori di IMT sono stati espressi come:

- IMT mean (media cumulativa degli IMT medi misurati in ciascun segmento dell'asse carotideo analizzato)

- IMT-MAX (media cumulativa di tutti i massimi IMT misurati in ciascun segmento arterioso dell'asse carotideo analizzato)

Per convenzione si considera limite normale per l'IMT un ispessimento  $<0,9$  mm.

I valori compresi tra 0,9 e 1,3 sono stati considerati indicativi di ispessimento intimale. La placca viene definita come un ispessimento focale dell'IMT di 0,5 mm in più all'IMT normale circostante o un incremento dell'IMT del 50% o un IMT superiore a 1,3 mm.

### **VALUTAZIONE DELLA DILATAZIONE FLUSSO-MEDIATA (FMD)**

La valutazione della dilatazione endotelio-dipendente (FMD) è stata ottenuta mediante scansione longitudinale B-mode dell'arteria brachiale, circa 5-10 cm sopra la piega del gomito, usando un ecografo dotato di sonda lineare. La sonda era tenuta in posizione attraverso l'utilizzo di un braccio meccanico reggisonda con possibilità di un fine aggiustamento dell'immagine durante l'esame,

utilizzando delle viti micrometriche. Per indurre l'ischemia il manicotto di uno sfigmomanometro è stato posizionato nell'avambraccio appena sotto il gomito.

Dopo l'acquisizione del diametro basale dell'arteria, il manicotto è stato gonfiato mantenendo per 5 minuti una pressione di 250 mmHg e poi sgonfiato per indurre una iperemia reattiva post-ischemia (risposta all'aumentato shear-stress).

La dilatazione endotelio-indipendente è stata ottenuta attraverso la somministrazione di basse dosi (25 ug) di trinitrato di glicerina (GTN) sublinguale.

L'FMD e la GNT sono state calcolate come l'incremento percentuale del diametro dell'arteria brachiale rispetto al valore basale

## ANALISI STATISTICA

I risultati sono forniti come medie più deviazione standard.

Abbiamo analizzato dapprima 236 ipertesi nefropatici che successivamente abbiamo suddiviso in due gruppi basati sulla presenza o meno di Diabete Mellito.

Sono stati così ottenuti due Gruppi:

CKD: 130 soggetti

D-CKD: 106 soggetti

le differenze tra gruppi sono state valutate mediante ANOVA e TUKEY test per confronti multipli.

L'analisi della covarianza (ANCOVA) è stata condotta per aggiustare per eventuali fattori confondenti quali età, sesso, glicemia, valori pressori e trattamento farmacologico.

L'analisi di regressione semplice e multipla per testare le relazioni del eGFR con l'8ISOPGF2alpha e le altre variabili che abbiamo utilizzato.

Il modello di regressione multipla è stato costruito considerando eGFR come variabile dipendente ed includendo: glicemia, LDL, valori pressori, hsCRP, TGFbeta, ET1, 8ISOPGF2alpha, età, BMI, sesso e trattamento antipertensivo ( codificate come segue: 0 : nessun trattamento; 1: trattamento pregresso; 2: ACE I O ARB; 3: DIURETICI; 4: BB; 5: antiadrenergici centrali; 6: combinazione di due o più farmaci ).

L'ipotesi nulla veniva rifiutata per una  $P < 0.05$ .

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando software systat data e medcalc.

## RISULTATI

Le tabelle seguenti forniscono le caratteristiche cliniche e bioumorali dell'intero Gruppo di pazienti nefropatici.

ETA' anni	62,09±12,2
Sesso M/F	148/88
Fumatori	56%
BMI Kg/m <sup>2</sup>	28,5±5,39
Glicemia mg/dl	115,6±13
Creatininemia mg/dl	2,79±1,67
eGFR ml/min/1,73m <sup>2</sup>	40,1±11,6
Proteinuria g/24h	1,18±2,02
Colesterolo Totale mg/dl	189,23±48,14
Colesterolo HDLmg/dl	45,58±14,2
Trigliceridimg/dl	153,27±82,24
Colesterolo LDLmg/dl	115,48±42,2
Emoglobina g/dl	12,1±2,3
PTH	149,75±72,2

eGFR= MDRD Estimated Glomerular Filtration Rate;

PAS mmHg	139,8±22
PAD mmHg	79,6±13,4
PAS 24h mmHg	140,07±19,73
PAD 24h mmHg	77,3±13,3
PAM24h mmHg	1001,2±14,04

LVMI g/m <sup>2</sup>	125,08±37,27
LVH %	40% (94/236)

LVH=Left Ventricular Hypertrophy

IMT Medio mm	1,04±0,24
IMT Max mm	1,10±0,28
IMT > 0,9 mm	73% (172/236)

IMT=Intima Media Thickness

8ISOPGF2alphapg/mL	395,9±128,8
ET-1pg/mL	4,43±0,84
ICAM-1 ng/ml	420,4±66,9
VCAM-1 ng/ml	1348±225
FMD %	6,02±2,35
TNFalphapg/ml	4,77±2,35
TGFbetang/mL	38,7±8,6
hs-CPRmg/L	3,18±1.36

Successivamente si sono ottenuti due sottogruppi in base alla presenza o meno di Diabete

	CKD (n=130)	D-CKD (n=136)	p
ETA' anni	60,11±13,5	63,3±11,2	NS
Sesso M/F	76/54	52/36	NS
Fumatori	61%	54%	NS
BMI Kg/m2	27,98±5	30,98±5	<0.001
Glicemia mg/dl	93,47±13	182,86±45	<0.0001
Creatininemia mg/dl	2,6±1,6	2,5±1,5	NS
eGFR ml/min/1,73m2	41,06±23,46	38,07±22,7	NS
Proteinuria g/24h	2,6±1,6	2,5±1,5	NS
Colesterolo Totale mg/dl	190±49	193±46	NS
Colesterolo HDL mg/dl	45,7±14	42,8±13,3	NS

Trigliceridi mg/dl	150,17±85	167,2±73	<0.05
Colesterolo LDL mg/dl	117,8±44	119±38	NS
Emoglobina g/dl	12,3±2,1	11,7±1,8	NS
PTH pg/ml	155±75,2	123±36,7	<0.05

	CKD (n=130)	D-CKD (n=136)	p
PAS mmHg	140,2±22	142,8±24	NS
PAD mmHg	82,4±13,5	78,2±12,8	NS
PAS 24h mmHg	139,9±19	141,6±18	NS
PAD 24h mmHg	80±16,45	77,2±16,7	NS
PAM24h mmHg	99,1±18	102,8±14,6	NS
LVMI g/m <sup>2</sup>	125±38	126±29	NS
LVH %	37% (48/130)	43% (46/106)	<0.05*
IMT Medio mm	1,04±0,24	1,07±0,42	NS
IMT Max mm	1,08±0,22	1,11±0,27	NS
IMT > 0,9 mm	71% (92/130)	75% (80/106)	NS

	CKD (n=130)	D-CKD (n=136)	p
8ISOPGF2alpha pg/mL	396±134	395±109	NS
ET-1 pg/mL	4,42±0,8	4,44±0,76	NS
ICAM-1 ng/ml	420±69,8	421,5±55,4	NS
VCAM-1 ng/ml	1342±232	1365±202	NS
FMD %	6,48±2	4,78±2,5	<0.05
TNFalpha pg/ml	4,78±2,63	4,664±0,8	NS
TGFbeta ng/mL	38,6±9	38,8±7,2	NS
hs-CPR mg/L	3,17±1,4	3,18±1,2	NS



Il confronto tra i due Gruppi CKD e D-CKDM non ha mostrato differenze statisticamente significative riguardo l'analisi dei principali parametri clinico-bioumorali ad eccezione del Body Mass Index ( $p < 0.001$ ), della Glicemia ( $p < 0.0001$ ) e della Trigliceridemia ( $p < 0,05$ ). I due Gruppi sono risultati sovrapponibili per l'età, il grado di disfunzione renale, i valori di Colesterolemia, Emoglobina ed Paratormone.

I valori pressori clinici e ottenuti dalla registrazione dell'ABPM non sono risultati differenti fra i due Gruppi.

Lo studio ecocardiografico ha evidenziato nei pazienti diabetici una maggiore prevalenza di ipertrofia ventricolare sinistra ( $p < 0.05$ ) ed un lieve aumento del LVMI seppure non statisticamente significativo.

L'esame ultrasonografico del Tronchi Sovra Aortici ha mostrato, nei pazienti diabetici, un lieve aumento dello spessore Intimo-Mediale Carotideo ed una lieve prevalenza di Spessore Intimo-Mediale Carotideo aumentato, entrambi non statisticamente significativi.

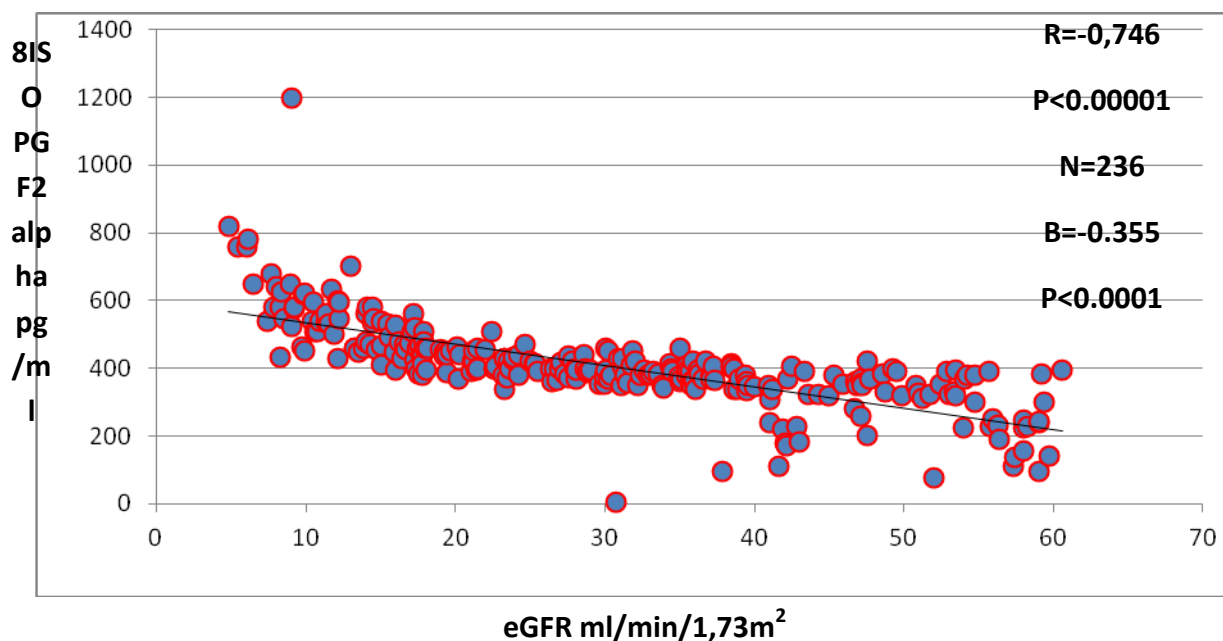
Le concentrazioni plasmatiche medie dei biomarcatori di Stress Ossidativo, Infiammazione e di Disfunzione Endoteliale sono risultate sovrapponibili fra i due Gruppi.

Il Gruppo di pazienti diabetici mostrava, rispetto ai non diabetici, una riduzione della Flow Mediated Dilation ( $p < 0.05$ ). Con ANCOVA questa differenza veniva osservata anche dopo l'aggiustamento statistico per età, trattamento e pressione sistolica e diastolica e in assenza del eGFR tra le covariabili. Ma quando L'eGFR veniva aggiunto come covariabile, la differenza tra i due Gruppi diventava non significativa.

## Analisi univariata e multivariata delle correlazioni del EGFR

Nei 236 pazienti l'analisi di correlazione lineare ha indicato, correlazioni significative ed inverse del eGFR con i biomarcatori da noi analizzati: 8-ISO-PGF 2alpha (  $R = -0.746$ ,  $P < 0.00001$  ), ET1 (  $R = -0.715$ ,  $P < 0.00001$  ), hsCRP (  $R = -0.8$ ,  $P < 0.0001$  ), ICAM-1 (  $R = -0.7898$ ,  $P < 0.0001$  ), VCAM-1 (  $R = -0.65454$ ,  $P < 0.0001$  ) e TGFbeta (  $R = -0.698$ ,  $P < 0.000001$  ).

L'Analisi di regressione multipla sviluppata considerando eGFR come variabile dipendente, ed includendo nel modello 8-ISO-PGF 2alpha, hsCRP, TGFbeta, Molecole di Adesione, valori pressori, glicemia, col LDL, età, BMI, sesso e trattamento ipertensivo ha mostrato che nei gli ipertesi i livelli plasmatici di 8-ISO-PGF 2alpha (  $B = -0.1297$ ,  $P < 0.001$  ) ET1 (  $B = 0,8559$ ,  $P < 0.001$  ) correlavano indipendentemente con eGFR.



L'analisi univariata è stata inoltre condotta nei due gruppi di pazienti diabetici e non diabetici. E sono state osservate correlazioni negative e significative del eGFR con 8-ISO-PGF 2alpha ( R= -0.74804 e R=-0.74301, P< 0.0001 rispettivamente) e ET1 (R=-0.7330 e R=-0.7110, P< 0.0001 rispettivamente)

Inoltre, nei 236 pazienti l'analisi di correlazione lineare ha indicato, correlazioni significative ed inverse del eGFR con LVMI (R=-0.223; p<0.001).

## DISCUSSIONE

Numerosi Studi hanno evidenziato il ruolo della funzione renale sulla morbilità e mortalità cardiovascolare. Un eGFR ridotto predice in maniera indipendente il rischio coronarico (88).

Dall'analisi del Second National Health and Nutrition Examination Survey Mortality Study si è osservato che i pazienti con eGFR < 70 ml/min, confrontati con pazienti con eGFR >90ml/min, avevano il 68% in più di Rischio di mortalità cardiovascolare.

Le ragioni dell'aumentato rischio cardiovascolare nei pazienti con CKD possono essere spiegate non soltanto dall'aumentata prevalenza dei classici fattori di rischio "tradizionali", ma dalla presenza di fattori di rischio "non-tradizionali" che includono lo stress ossidativo, l'infiammazione e la disfunzione endoteliale.

Basandoci su nostri dati precedenti (63,89) che evidenziavano come nei pazienti ipertesi lo stress ossidativo, misurato come 8-ISO-PGF 2alpha, aumenti parallelamente al decrescere della funzione renale e correli con essa, abbiamo voluto valutare, confrontandole, le relazioni esistenti fra stress ossidativo ed insufficienza renale cronica (eGFR<60ml/min/1,73m<sup>2</sup>) in un gruppo di pazienti ipertesi diabetici e non diabetici, ed abbiamo voluto valutare la prevalenza di Ipertrofia Ventricolare sinistra e di aumentato Spessore Intimo Mediale Carotideo, due fattori di rischio cardiovascolare.

I risultati di questo studio confermano la nostra ipotesi, dimostrando che nei pazienti con insufficienza renale cronica, le concentrazioni plasmatiche medie del biomarker di stress ossidativo aumentano progressivamente col declino della funzione renale, indipendentemente dai valori pressori.

Diversi studi sperimentali e clinici hanno dimostrato il ruolo dello stress ossidativo nel danno renale.(90-93)

Il meccanismo appare coinvolto nell'evoluzione dell'aterosclerosi, dalla disfunzione endoteliale alla rottura della placca. I ROS possono determinare disfunzione endoteliale e aumentare lo stato proinfiammatorio sistemico ed intrarenale, aumentano i fattori fibrotici, scatenando una sequenza di meccanismi coinvolti nell'aterosclerosi e nel danno renale.

Gli isoprostani sono derivati prostaglandinici prodotti dalla per ossidazione dell'acido arachidonico, un acido grasso polinsaturo ubiquitario(94). Le sorgenti di radicali liberi che contribuiscono alla formazione di 8-ISO-PGF 2alpha in vivo sono molteplici. Queste includono la formazione di ROS come l'anione superossido da parte della catena mitocondriale e da parte dell'enzima NADPH ossidasi (95).

Un aspetto importante riguardo la quantificazione dell'8-ISO-PGF 2alpha è che la loro concentrazione nei fluidi biologici rappresenta il grado di stress ossidativo (96). Roberts e Morrow (96,97) hanno dimostrato che i livelli circolanti di isoprostani dipendono dalla produzione piuttosto che dal metabolismo e dall'escrezione, suggerendo che rappresentino un indice del livello di stress ossidativo in vivo. Conseguentemente nel nostro studio l'aumento del biomarker di stress ossidativo parallelamente il declino della funzione renale, non è dovuto ad un aumentato metabolismo o clearance dell'8-ISO-PGF 2alpha ma ad un eccesso di stress ossidativo.

Gli isoprostani possono essere prodotti nel rene. E' stato dimostrato che la somministrazione esogena di isoprostani nei ratti produce un potente effetto vasocostrittore sull'arteriola afferente, riducendo il Flusso plasmatico renale ed il GFR.(93-95)

Nel nostro studio, abbiamo inoltre dimostrato mediante l'analisi di regressione multipla, considerando il eGFR come variabile dipendente, che nei pazienti ipertesi l'eGFR correla inversamente con l'8-ISO-PGF 2alpha.

Un altro aspetto del nostro studio riguarda l'ET1. Infatti, le concentrazioni plasmatiche di ET1 nei pazienti ipertesi aumentano col decrescere del eGFR, correlano negativamente con l'eGFR indipendentemente dai valori pressori e predicono il declino della funzione renale.

In un nostro studio abbiamo già dimostrato che nell'insufficienza renale cronica, l'incremento delle concentrazioni plasmatiche di ET1 non è dovuta principalmente ad una ridotta clearance.

E' stato dimostrato che l'ET1 esercita effetti rimarcabili sull'emodinamica renale(99-100). Inoltre, ratti transgenici per l'endotelina, sviluppano glomerulo-sclerosi; così è ipotizzabile che il sistema autocrino/paracrino dell'endotelio è ipotizzabile sia implicato nella regolazione della funzione renale. E' ipotizzabile che la vascostrizione indotta dall'endotelina sia responsabile della produzione di anione superossido.(101)

In uno studio epidemiologico condotto su 1492 soggetti, Hirai ha evidenziato una correlazione positiva della creatinina con le concentrazioni plasmatiche di ET1, mentre nessuna correlazione è stata dimostrata con i valori pressori, suggerendo che l'ET1 non sia relata tanto all'ipertensione quanto alla disfunzione renale subclinica.(102)

Nel nostro studio, non vi erano differenze significative fra le concentrazioni plasmatiche medie delle molecole da noi analizzate fra pazienti diabetici e non diabetici. Ciò non sorprende, considerando la funzione renale ridotta dell'intero gruppo di pazienti studiati.

Abbiamo dimostrato che la disfunzione endoteliale si attiva già nelle prime fasi dell'Ipertensione Arteriosa: in uno studio (80) condotto su pazienti affetti da ipertensione essenziale e con funzione renale normale, distinti in microalbuminurici e non microalbuminurici, abbiamo evidenziato come gli ipertesi microalbuminurici fossero caratterizzati da maggiori concentrazioni plasmatiche di ICAM-1 e VCAM-1 rispetto ai pazienti non microalbuminurici; inoltre, i pazienti non microalbuminurici rispetto ai soggetti sani di controllo mostravano differenze statisticamente significative tra microalbuminuria (9 vs 6

ug/min) ICAM e VCAM a sottolineare come già in presenza di livelli di microralbuminuria < 20 ug/min è presente uno stato di attivazione endoteliale.

Il presente Studio conferma l'aumentata prevalenza di LVH in pazienti con Insufficienza Renale Cronica. Sebbene la patogenesi dell'Ipertrofia Ventricolare sinistra nella CKD sia da considerare multifattoriale, l'ipertensione arteriosa, le alterazioni del metabolismo minerale, il sovraccarico di volume e l'anemia sono da considerarsi i principali determinanti. Altri fattori quali l'inappropriata attivazione del Sistema Renina Angiotensina, lo Stress Ossidativo, l'Infiammazione e l'iperattivazione dei fattori di crescita del Collagene e delle Cellule muscolari lisce possono avere un ruolo rilevante.(104-105)

In uno Studio di Levin (106) et al. condotto su 318 pazienti con CKD, il 34% presentava LVH, la cui prevalenza aumentava al decrescere del filtrato glomerulare, raggiungendo circa il 70% nel sottogruppo dei pazienti uremici. Dopo un anno di follow up la pressione sistolica e la riduzione della concentrazione emoglobinica risultavano essere i predittori di aumento di Massa Ventricolare sinistra. Tra questi soggetti studiati, il 39% aveva un'anamnesi positiva per precedenti cardiovascolari, il 25,8% erano diabetici. Il eGFR medio era minore di 40 ml/min.

Nello Studio Hoorn è stata valutata la relazione tra LVH e disfunzione renale in 742 soggetti.

Una relazione tra LVH e GFR è stata osservata soltanto negli uomini, ma quando nel modello venivano inclusi i parametri di rigidità arteriosa, la relazione perdeva significatività statistica. Gli Autori hanno concluso che la disfunzione renale porta ad un aumento della Massa Ventricolare sinistra attraverso l'aumento della stiffness arteriosa.(107)

Nel presente studio abbiamo inoltre osservato un'associazione fra aumentato spessore Intimomediale carotideo ed eGFR. Uno Studio Cinese su popolazione (soggetti con età >40 anni) ha evidenziato come lo spessore Intimo Mediale Carotideo sia significativamente aumentato nei soggetti con CKD di grado lieve-moderato. Si è evidenziata una correlazione inversa fra eGFR

e IMT che perdeva significatività statistica dopo correzione per i classici fattori di rischio cardiovascolare. Gli Autori indicavano la rilevante presenza dei classici fattori di rischio cardiovascolari nei pazienti con CKD come causa dell'aumentato IMT. (108)

Uno Studio Giapponese più recente condotto su oltre 400 soggetti nefropatici ha evidenziato una relazione diretta tra eGFR ed IMT in maniera indipendente dai classici fattori di rischio cardiovascolare e progressiva al decrescere della funzione renale. (109)

Tenendo conto dell'elevato rischio cardiovascolare dei pazienti nefropatici e dell'impatto negativo dato dalla presenza di LVH e di aumentato IMT ulteriori studi sono necessari per una più completa comprensione dei meccanismi fisiopatologici sottesi allo sviluppo delle complicanze cardiovascolari nei pazienti nefropatici.

Concludendo i nostri risultati sono un'utile e chiara dimostrazione della significativa ed inversa correlazione dello stress ossidativo col declino della funzione renale nei pazienti ipertesi;

Questo suggerisce l'utilità di studi longitudinali atti a valutare la relazione tra complicanze aterosclerotiche e insufficienza renale nei pazienti ipertesi.



## BIBLIOGRAFIA

1. Chronic renal failure--a vasculopathic state. Luke RG. *N Engl J Med.* 1998 Sep 17;339(12):841-3.
2. Cardiovascular disease in chronic renal failure: the challenge continues. Registro Lombardo Dialisi e Trapianto. Locatelli F, Marcelli D, Conte F, D'Amico M, Del Vecchio L, Limido A, Malberti F, Spotti D. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15 Suppl 5:69-80. Review.
3. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. *Am J Kidney Dis.* 1998 Nov;32(5 Suppl 3):S112-9. Review.
4. Controlling the epidemic of cardiovascular disease in chronic renal disease: what do we know? What do we need to learn? Where do we go from here? National Kidney Foundation Task Force on Cardiovascular Disease. Levey AS, Beto JA, Coronado BE, Eknoyan G, Foley RN, Kasiske BL, Klag MJ, Mailloux LU, Manske CL, Meyer KB, Parfrey PS, Pfeffer MA, Wenger NK, Wilson PW, Wright JT Jr. *Am J Kidney Dis.* 1998 Nov;32(5):853-906.
5. Profile of patients on RRT in Europe and death rates due to major causes of death groups. The EDTA Registration Committee. Brunner FP, Selwood NH. *Kidney Int Suppl.* 1992 Oct;38:S4-15
6. Reassessing the cardiac risk profile in chronic hemodialysis patients: a hypothesis on the role of oxidant stress and other non-traditional cardiac risk factors. Becker BN, Himmelfarb J, Henrich WL, Hakim RM. *J Am Soc Nephrol.* 1997 Mar;8(3):475-86.
7. Atherosclerotic cardiovascular disease risks in chronic hemodialysis patients. Cheung AK, Sarnak MJ, Yan G, Dwyer JT, Heyka RJ, Rocco MV, Teehan BP, Levey AS. *Kidney Int.* 2000 Jul;58(1):353-62.
8. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. *N Engl J Med.* 1989 Apr 6;320(14):915-24. Review.
9. Cardiovascular risk in uraemic patients-is it fully explained by classical risk factors? Zoccali C. *Nephrol Dial Transplant.* 2000 Apr;15(4):454-7. Review.
10. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. Pryor WA. *Annu Rev Physiol.* 1986;48:657-67. Review.
11. Locatelli F, Bommer J, London GM, Martín-Malo A, Wanner C, Yaqoob M, Zoccali C. Cardiovascular disease determinants in chronic renal failure: clinical approach and treatment. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16:459–468.

12. Amann K, Breitbach M, Ritz E, Mall G. Myocyte/capillary mismatch in the heart of uremic patients. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9:1018 –1022.
13. Amann K, Miltenberger-Miltenyi G, Simonoviciene A, Koch A, Orth S, Ritz E. Remodeling of resistance arteries in renal failure: effect of endothelin receptor blockade. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:2040 –2050.
14. Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, Kent GM, Martin CJ, Murray DC, Barre PE. Clinical and ecocardiographic disease in patients starting end stage renal disease therapy. *Kidney Int* 1995; 47:186-192.
15. Levin A, Thompson C, Ethier J, Carlisle EJ, Tobe S, Mendelssohn D, et al. Left ventricular mass index increase in early renal disease: Impact in decline in haemoglobin. *Am J Kidney Dis* 1999; 34:125-134.
16. Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, Kent GM, Murray DC, Barré PE. The prognostic importance of left ventricular geometry in uremic cardiomyopathy. *J Am Soc Nephrol* 1995; 5:2024-2031.
17. Stack AG, Saran R. Clinical correlates and mortality impact of left ventricular hypertrophy among new ESRD patients in the United States. *Am J Kidney Dis* 2002; 40:1202-1210.
18. Muiesan ML, Salvetti M, Paini A, Monteduro C, Galbassini G, Bonzi B, et al. Inappropriate left ventricular mass changes during treatment adversely affects cardiovascular prognosis in hypertensive patients. *Hypertension* 2007; 49:1077-1083.
19. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. *Circulation*. 1995 May 1;91(9):2488-96. Review.
20. Increased advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of patients with end-stage renal disease. Sakata N, Imanaga Y, Meng J, Tachikawa Y, Takebayashi S, Nagai R, Horiuchi S. *Atherosclerosis*. 1999 Jan;142(1):67-77.
21. Oxidative cross-linking of ApoB100 and hemoglobin results in low density lipoprotein modification in blood. Relevance to atherogenesis caused by hemodialysis. Ziouzenkova O, Asatryan L, Akmal M, Tetta C, Wratten ML, Loseto-Wich G, Jürgens G, Heinecke J, Sevanian A. *J Biol Chem*. 1999 Jul 2;274(27):18916-24.
22. Detecting oxidative modification of biomolecules with isotope dilution mass spectrometry: sensitive and quantitative assays for oxidized amino acids in proteins and tissues. Heinecke JW, Hsu FF, Crowley JR, Hazen SL, Leeuwenburgh C, Mueller DM, Rasmussen JE, Turk J. *Methods Enzymol*. 1999;300:124-44.
23. Inflammatory and atherosclerotic interactions in the depleted uremic patient. Stenvinkel P. *Blood Purif*. 2001;19(1):53-61. Review.
24. Pryor WA. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reaction. *Annu Rev Physiol* 1986; 174:305-319.

25. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging.Papa S, Skulachev VP.Mol Cell Biochem. 1997 Sep;174(1-2):305-19. Review.
26. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils.Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van der Vliet A.Nature. 1998 Jan 22;391(6665):393-7.
27. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions.Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW.J Clin Invest. 1994 Jul;94(1):437-44.
28. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo?Halliwell B.Free Radic Res. 1996 Nov;25(5):439-54. Review.
29. Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins. Lee SH, Oe T, Blair IA.Science. 2001 Jun 15;292(5524):2083-6.
30. Thiol-based antioxidants.Deneke SM.Curr Top Cell Regul. 2000;36:151-80. Review.
31. Determination of the in vivo redox status of cysteine, cysteinylglycine, homocysteine, and glutathione in human plasma.Mansoor MA, Svardal AM, Ueland PM.Anal Biochem. 1992 Feb 1;200(2):218-29.
32. Glutathione-related antioxidant defenses in human atherosclerotic plaques.Lapenna D, de Gioia S, Ciofani G, Mezzetti A, Ucchino S, Calafiore AM, Napolitano AM, Di Ilio C, Cuccurullo F.Circulation. 1998 May 19;97(19):1930-4.
33. Antioxidant potential of anaerobic human plasma: role of serum albumin and thiols as scavengers of carbon radicals.Soriani M, Pietraforte D, Minetti M.Arch Biochem Biophys. 1994 Jul;312(1):180-8.
34. Reduced, oxidized and protein-bound forms of homocysteine and other aminothiols in plasma comprise the redox thiol status--a possible element of the extracellular antioxidant defense system.Ueland PM, Mansoor MA, Guttormsen AB, Müller F, Aukrust P, Refsum H, Svardal AM.J Nutr. 1996 Apr;126(4 Suppl):1281S-4S. Review.
35. Redox state of glutathione in human plasma.Jones DP, Carlson JL, Mody VC, Cai J, Lynn MJ, Sternberg P.Free Radic Biol Med. 2000 Feb 15;28(4):625-35.
36. Oxidative stress status: OSS, BOSS, and "Wild Bill" Donovan.Pryor WA.Free Radic Biol Med. 1999 Dec;27(11-12):1135-6.
37. Oxidative stress status-the second set.Pryor WA.Free Radic Biol Med. 2000 Feb 15;28(4):503-504.
38. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure.Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillère-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, Dayer JM, Jungers P, Drüeke T, Descamps-Latscha B.J Immunol. 1998 Sep 1;161(5):2524-32.

39. A series of prostaglandin F<sub>2</sub>-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ 2nd. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Dec;87(23):9383-7.
40. C-reactive protein and intercellular adhesion molecule-1 are stronger predictors of oxidant stress than blood pressure in established hypertension. Cottone S, Mulè G, Nardi E, Vadalà A, Lorito MC, Guarneri M, Arsena R, Palermo A, Cerasola G. *J Hypertens*. 2007 Feb;25(2):423-8.
41. Elevated plasma F<sub>2</sub>-isoprostanes in patients on long-term hemodialysis. Handelman GJ, Walter MF, Adhikarla R, Gross J, Dallal GE, Levin NW, Blumberg JB. *Kidney Int*. 2001 May;59(5):1960-6.
42. Plasma F<sub>2</sub>-isoprostane levels are elevated in chronic hemodialysis patients. Ikizler TA, Morrow JD, Roberts LJ, Evanson JA, Becker B, Hakim RM, Shyr Y, Himmelfarb J. *Clin Nephrol*. 2002 Sep;58(3):190-7.
43. Isolevuglandin-protein adducts in humans: products of free radical-induced lipid oxidation through the isoprostane pathway. Salomon RG, Batyreva E, Kaur K, Sprecher DL, Schreiber MJ, Crabb JW, Penn MS, DiCorletoe AM, Hazen SL, Podrez EA. *Biochim Biophys Acta*. 2000 May 31;1485(2-3):225-35.
44. MRC/BHF Heart Protection Study of antioxidant vitamin supplementation in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. Heart Protection Study Collaborative Group. *Lancet*. 2002 Jul 6;360(9326):23-33.
45. The antioxidant acetylcysteine reduces cardiovascular events in patients with end-stage renal failure: a randomized, controlled trial. Tepel M, van der Giet M, Statz M, Jankowski J, Zidek W. *Circulation*. 2003 Feb 25;107(7):992-5.
46. Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial. Boaz M, Smetana S, Weinstein T, Matas Z, Gafer U, Iaina A, Knecht A, Weissgarten Y, Brunner D, Fainaru M, Green MS. *Lancet*. 2000 Oct 7;356(9237):1213-8.
47. Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease. Brown BG, Zhao XQ, Chait A, Fisher LD, Cheung MC, Morse JS, Dowdy AA, Marino EK, Bolson EL, Alaupovic P, Frohlich J, Albers JJ. *N Engl J Med*. 2001 Nov 29;345(22):1583-92.
48. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. *Lancet*. 1996 Mar 23;347(9004):781-6.
49. Effect of a treatment strategy consisting of pravastatin, vitamin E, and homocysteine lowering on carotid intima-media thickness, endothelial function, and renal function in patients with mild to moderate chronic kidney disease: results from the Anti-Oxidant Therapy in Chronic Renal Insufficiency (ATIC) Study. Nanayakkara PW, van Guldener C, ter Wee PM, Scheffer PG, van Ittersum FJ, Twisk JW, Teerlink T, van Dorp W, Stehouwer CD. *Arch Intern Med*. 2007 Jun 25;167(12):1262-70.

50. Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. Deanfield J, Donald A, Ferri C, Giannattasio C, Halcox J, Halligan S, Lerman A, Mancia G, Oliver JJ, Pessina AC, Rizzoni D, Rossi GP, Salvetti A, Schiffrin EL, Taddei S, Webb DJ; Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens*. 2005 Jan;23(1):7-17.
51. Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J, Donald A, Ferrannini E, Halcox J, Kiowski W, Lüscher TF, Mancia G, Natali A, Oliver JJ, Pessina AC, Rizzoni D, Rossi GP, Salvetti A, Spieker LE, Taddei S, Webb DJ; Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens*. 2005 Feb;23(2):233-46.
52. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Münzel T. *Circulation*. 2001 Nov 27;104(22):2673-8.
53. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukui T, Harrison DG. *Circulation*. 2001 Mar 6;103(9):1282-8.
54. Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: relationship to treatment method and atherosclerotic disease. Kielstein JT, Böger RH, Bode-Böger SM, Schäffer J, Barbey M, Koch KM, Frölich JC. *J Am Soc Nephrol*. 1999 Mar;10(3):594-600.
55. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. Zoccali C, Bode-Böger S, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L, Cataliotti A, Bellanuova I, Fermo I, Frölich J, Böger R. *Lancet*. 2001 Dec 22-29;358(9299):2113-7.
56. Nitric oxide production is reduced in patients with chronic renal failure. Wever R, Boer P, Hijmering M, Stroes E, Verhaar M, Kastelein J, Versluis K, Lagerwerf F, van Rijn H, Koomans H, Rabelink T. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 May;19(5):1168-72.
57. Clinical use of high sensitivity C-reactive protein for the prediction of adverse cardiovascular events. Torres JL, Ridker PM. *Curr Opin Cardiol*. 2003 Nov;18(6):471-8. Review.
58. Infection and inflammation induce LDL oxidation in vivo. Memon RA, Staprans I, Noor M, Holleran WM, Uchida Y, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld C. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Jun;20(6):1536-42.
59. Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. Nguyen-Khoa T, Massy ZA, De Bandt JP, Kebede M, Salama L, Lambrey G,

- Witko-Sarsat V, Drüeke TB, Lacour B, Thévenin M. *Nephrol Dial Transplant*. 2001 Feb;16(2):335-40.
60. C-reactive protein in the arterial intima: role of C-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis. Torzewski M, Rist C, Mortensen RF, Zwaka TP, Bienek M, Waltenberger J, Koenig W, Schmitz G, Hombach V, Torzewski J. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Sep;20(9):2094-9.
  61. Pentosidine, carotid atherosclerosis and alterations in left ventricular geometry in hemodialysis patients. Zoccali C, Mallamaci F, Asahia K, Benedetto FA, Tripepi G, Tripepi R, Nicocia G, Buemi M, Miyata T. *J Nephrol*. 2001 Jul-Aug;14(4):293-8.
  62. End-stage renal disease, atherosclerosis, and cardiovascular mortality: is C-reactive protein the missing link? Arici M, Walls J. *Kidney Int*. 2001 Feb;59(2):407-14. Review.
  63. Relation of C-reactive protein to oxidative stress and to endothelial activation in essential hypertension. Cottone S, Mulè G, Nardi E, Vadalà A, Guarneri M, Briolotta C, Arsenà R, Palermo A, Riccobene R, Cerasola G. *Am J Hypertens*. 2006 Mar;19(3):313-8.
  64. Growth factors and endothelial dysfunction. Bauters C, Six I, Meurice T, Van Belle E. *Drugs*. 1999;59 Spec No:11-5.
  65. Endothelin in hypertension: a role for receptor antagonists? Moreau P. *Cardiovasc Res*. 1998 Sep;39(3):534-42. Review.
  66. Target molecules for anti-angiogenic therapy: from basic research to clinical trials. Hagedorn M, Bikfalvi A. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2000 May;34(2):89-110. Review.
  67. Endothelins in the normal and diseased kidney. Kohan DE. *Am J Kidney Dis*. 1997 Jan;29(1):2-26. Review.
  68. Endothelins: vasoactive modulators of renal function in health and disease. Naicker S, Bhoola KD. *Pharmacol Ther*. 2001 Apr;90(1):61-88. Review.
  69. Role of endothelin-1 in clinical hypertension: 20 years on. Dhaun N, Goddard J, Kohan DE, Pollock DM, Schiffrin EL, Webb DJ. *Hypertension*. 2008 Sep;52(3):452-9. Epub 2008 Aug 4.
  70. Endothelin-1 and hypertension: from bench to bedside. Kohan DE. *Curr Hypertens Rep*. 2008 Feb;10(1):65-9. Review.
  71. TGF-beta-dependent cell growth arrest and apoptosis. Lee KY, Bae SC. *J Biochem Mol Biol*. 2002 Jan 31;35(1):47-53. Review.
  72. Transforming growth factor beta and cardiovascular diseases: the other facet of the 'protective cytokine'. Dabek J, Kułach A, Monastyrska-Cup B, Gasior Z. *Pharmacol Rep*. 2006 Nov-Dec;58(6):799-805.
  73. Transforming growth factor-beta, basement membrane, and epithelial-mesenchymal transdifferentiation: implications for fibrosis in kidney disease. Stahl PJ, Felsen D.

Am J Pathol. 2001 Oct;159(4):1187-92. Review.

74. The relationship of cardiovascular risk factors to microalbuminuria in older adults with or without diabetes mellitus or hypertension: the cardiovascular health study. Barzilay JI, Peterson D, Cushman M, Heckbert SR, Cao JJ, Blaum C, Tracy RP, Klein R, Herrington DM. *Am J Kidney Dis.* 2004 Jul;44(1):25-34.
75. 2007 ESH-ESC Practice Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: ESH-ESC Task Force on the Management of Arterial Hypertension. *J Hypertens.* 2007
76. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA.* 2003 May 21;289(19):2560-72.
77. Microalbuminuria is common, also in a nondiabetic, nonhypertensive population, and an independent indicator of cardiovascular risk factors and cardiovascular morbidity. Hillege HL, Janssen WM, Bak AA, Diercks GF, Grobbee DE, Crijs HJ, Van Gilst WH, De Zeeuw D, De Jong PE; Prevend Study Group. *J Intern Med.* 2001 Jun;249(6):519-26.
78. Albuminuria and cardiovascular risk in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy: the LIFE study. Wachtell K, Ibsen H, Olsen MH, Borch-Johnsen K, Lindholm LH, Mogensen CE, Dahlöf B, Devereux RB, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Julius S, Kjeldsen SE, Kristianson K, Lederballe-Pedersen O, Nieminen MS, Okin PM, Omvik P, Oparil S, Wedel H, Snapinn SM, Aurup P. *Ann Intern Med.* 2003 Dec 2;139(11):901-6.
79. Endothelium-derived factors in microalbuminuric and nonmicroalbuminuric essential hypertensives. Cottone S, Vadalà A, Mangano MT, Riccobene R, Vella MC, Neri AL, Mulè G, Piazza G, Amato F, Zagarrigo C, Cerasola G. *Am J Hypertens.* 2000 Feb;13(2):172-6.
80. Microalbuminuria and early endothelial activation in essential hypertension. Cottone S, Mulè G, Nardi E, Lorito MC, Guarneri M, Arsena R, Briolotta C, Vadalà A, Cerasola G. *J Hum Hypertens.* 2007 Feb;21(2):167-72.
81. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004;109(Suppl 1): III 27-32
82. Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, et al. 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens* 2007; 25:1105-1187.
83. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20:1183-1197

84. Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation* 1978; 58:1072-1073.
85. Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, Gottlieb GJ, Campo E, Sachs I, Reichek N. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol* 1986; 57:450-458.
86. De Simone G, Daniels SR, Devereux RB, Meyer RA, Roman MJ, de Divitiis O, Alderman MH. Left ventricular mass and body size in normotensive children and adults: assessment of allometric relations and the impact of overweight. *J Am Coll Cardiol* 1992; 20:1251-1260.
87. Skiller N, Shah PM, Crawford M, DeMaria A, Devereux R, Feigenbaum H, et al. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. *J Am Soc Echocardiogr* 1989; 2:358-367.
88. Rahman M, Pressel S, Davis BR, et al ALLHAT Collaborative Research Group. Cardiovascular outcomes in high risk hypertensive patients stratified by baseline glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 144:172-180, 2006
89. Endothelin-1 and F2-isoprostane relate to and predict renal dysfunction in hypertensive patients. Cottone S, Mulè G, Guarneri M, Palermo A, Lorito MC, Riccobene R, Arsena R, Vaccaro F, Vadalà A, Nardi E, Cusimano P, Cerasola G. *Nephrol Dial Transplant*. 2009 Feb;24(2):497-503. Epub 2008 Sep 4.
90. Endothelin-1 receptor blockade prevents renal injury in experimental hypercholesterolemia. Chade AR, Best PJ, Rodriguez-Porcel M, Herrmann J, Zhu X, Sawamura T, Napoli C, Lerman A, Lerman LO. *Kidney Int*. 2003 Sep;64(3):962-9.
91. Angiotensin II AT1 receptor blockade improves renal perfusion in hypercholesterolemia. Chade AR, Rodriguez-Porcel M, Rippentrop SJ, Lerman A, Lerman LO. *Am J Hypertens*. 2003 Feb;16(2):111-5
92. The role of oxidative stress-altered lipoprotein structure and function and microinflammation on cardiovascular risk in patients with minor renal dysfunction. Kaysen GA, Eiserich JP. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Mar;15(3):538-48. Review.
93. A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ 2nd. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Dec;87(23):9383-7.
94. Glomerular actions of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-epi-prostaglandin F2 alpha, in the rat. Evidence for interaction with thromboxane A2 receptors. Takahashi



- K, Nammour TM, Fukunaga M, Ebert J, Morrow JD, Roberts LJ 2nd, Hoover RL, Badr KF. *J Clin Invest*. 1992 Jul;90(1):136-41.
95. The isoprostanes: unique products of arachidonic acid oxidation-a review. Fam SS, Morrow JD. *Curr Med Chem*. 2003 Sep;10(17):1723-40. Review.
96. Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. Roberts LJ, Morrow JD. *Free Radic Biol Med*. 2000 Feb 15;28(4):505-13. Review.
97. Mass spectrometric quantification of F2-isoprostanes in biological fluids and tissues as measure of oxidant stress. Morrow JD, Roberts LJ 2nd. *Methods Enzymol*. 1999;300:3-12.
98. Honing ML, Hijmering ML, Ballard DE, Yang YP, Padley RJ, Morrison PJ, Rabelink TJ. Selective ET(A) receptor antagonism with ABT-627 attenuates all renal effects of endothelin in humans. *Am Soc Nephrol*. 2000 Aug;11(8):1498-504.
99. Effects of endothelin-1 and endothelin-1-receptor blockade on renal function in humans. Vuurmans JL, Boer P, Koomans HA. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 Nov;19(11):2742-6. Epub 2004 Aug 24.
100. Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension. Hocher B, Thöne-Reineke C, Rohmeiss P, Schmager F, Slowinski T, Burst V, Siegmund F, Quertermous T, Bauer C, Neumayer HH, Schleuning WD, Theuring F. *J Clin Invest*. 1997 Mar 15;99(6):1380-9.
101. Role of reactive oxygen species in endothelin-induced hypertension. Sedeek MH, Llinas MT, Drummond H, Fortepiani L, Abram SR, Alexander BT, Reckelhoff JF, Granger JP. *Hypertension*. 2003 Oct;42(4):806-10. Epub 2003 Jul 21.
102. Plasma endothelin-1 level is related to renal function and smoking status but not to blood pressure: an epidemiological study. Hirai Y, Adachi H, Fujiura Y, Hiratsuka A, Enomoto M, Imaizumi T. *J Hypertens*. 2004 Apr;22(4):713-8.
103. Diabetes mellitus and hypertension: key risk factors for kidney disease. Lea JP, Nicholas SB. *J Natl Med Assoc*. 2002 Aug;94(8 Suppl):7S-15S.
104. Impact of type 2 diabetes on left ventricular geometry and diastolic function in hypertensive patients with chronic kidney disease. Nardi E, Palermo A, Mulè G, Cusimano P, Cottone S, Cerasola G. *J Hum Hypertens*. 2011 Mar;25(3):144-51. Epub 2010 Oct 14.
105. Epidemiology and pathophysiology of left ventricular abnormalities in chronic kidney disease: a review. Cerasola G, Nardi E, Palermo A, Mulè G, Cottone S. *J Nephrol*. 2011 Jan-Feb;24(1):1-10. Review.
106. Levin A, Thompson C, Ethier J et al. Left ventricular Mass Index increase in early renal disease: impact in decline in Haemoglobin. *Am J Kidney Dis*: 1999;34 125-34

107. Henry RM, Kamp O, Kostense PJ et al. Mild renal insufficiency is associated with increased left ventricular mass in men, but not in women. An Arterial stiffness –related phenomenon – The Hoorn Study. *Kidney Int* 2005; 68, 673-9
108. Zhang L, Zhao F, Yang Y et al Association between carotid artery intima-media thickness and early stage CKD in a Chinese Population. *Am J Kidney Dis* 49: 786-792, 2007
109. Kawamoto R, Ohtsuka N, Kusunoki T, Yorimitsu N An Association between eGFR and Carotid Atherosclerosis *Inter Med* 47: 391-398, 2008