

Introduzione

E' noto che la malattia renale cronica è tra i maggiori fattori di rischio cardiovascolare; con il declino della funzione renale, numerosi fattori di rischio modificabili e non modificabili giocano un ruolo negativo sulla prognosi cardiovascolare ed infatti, numerosi studi mostrano come al declino del filtrato glomerulare corrisponda un aumento della morbilità e della mortalità cardiovascolari.

Go e coll. hanno dimostrato come in un'ampia popolazione di pazienti ipertesi, il rischio di eventi cardiovascolari aumenta fino al 40% in relazione ad un filtrato renale che si riduce da oltre 60 ml/min a 59-45 ml/min; il rischio aumenta poi dal 40 al 180% per un filtrato che si riduce da 59-45 ml/min a 29-15 ml/min giungendo ad un incremento del rischio pari al 240% per un filtrato inferiore a 15 ml/min (1).

In soggetti affetti da ipertensione arteriosa, la prevalenza di elevati valori di creatininemia aumenta con l'aumentare del rischio cardiovascolare (2), infatti le linee guida ESH 2007 indicano la microalbuminuria tra i fattori da considerare quali marcatori di danno renale oltre che elemento di rischio cardiovascolare globale del paziente iperteso.

Lo studio Prevend ha dimostrato come nella popolazione generale, la microalbuminuria sia strettamente associata ad un aumentato rischio cardiovascolare (3).

Inoltre lo studio LIFE ha dimostrato che in pazienti ipertesi, la microalbuminuria si associa ad un'aumentata prevalenza di ipertrofia ventricolare sinistra (4).

A conferma di quanto detto, il Third Copenhagen Heart Study ha dimostrato come in soggetti ipertesi il rischio di mortalità cardiovascolare è aumentato ed associato a valori di MAU inferiori all'attuale valori di riferimento di 20 mcg/min.

In linea con questi dati prospettici, in un nostro studio osservazionale-trasversale è stato dimostrato che le concentrazioni plasmatiche medie di ICAM e VCAM, markers di attivazione endoteliale, sono già significativamente superiori nei soggetti ipertesi non microalbuminurici rispetto ai soggetti sani di controllo, suggerendo che a livelli di microalbuminuria < 20 mcg/min sia già avviato il processo di sviluppo della malattia aterosclerotica (5).

Quando detto conferma quindi che nei pazienti ipertesi, “l’insulto endoteliale” inizia abbastanza precocemente, ancor prima che si realizzi una riduzione del filtrato glomerulare e compaia la proteinuria.

Per quanto fin qui detto, appare di fondamentale importanza l’attendibilità della metodica e dei parametri di riferimento utilizzati per la valutazione della funzione renale.

La creatinina è stata indicata quale predittore negativo ed indipendente della morbilità per eventi cardiovascolari. Tuttavia la creatinina, essendo secreta a livello tubulare, sovrastima il filtrato glomerulare renale, calcolato come clearance, del 19% circa. Inoltre, nonostante la sua specificità, la creatininemia è poco sensibile, soprattutto negli stadi iniziali della malattia renale cronica e sono ben note le difficoltà di stima del filtrato glomerulare, nei pazienti con diverso grado di funzione renale, anche adottando le più recenti formule ed equazioni per il calcolo del filtrato glomerulare.

Per questo motivo, negli ultimi anni, è stata focalizzata l’attenzione sulla cistatina C, proteina con basso peso molecolare, prodotta da tutte le cellule nucleate, viene filtrata, riassorbita, ma non secreta dal tubulo renale e che agisce bloccando la cisteina proteinasi lisosomiale.

Fliser e Ritz, considerando come gold standard la clearance dell'inulina, hanno dimostrato che, in pazienti con creatininemia entro il range di normalità, la cistatinemia è un marker di disfunzione renale (6).

In pazienti diabetici, l'inverso della sua concentrazione plasmatica correla con il filtrato glomerulare calcolato con metodica radioisotopica (CrEDTA) (7).

Il maggiore valore predittivo della cistatina C rispetto a quello della creatinina è stato dimostrato in uno studio osservazionale condotto su una popolazione di 4637 soggetti in follow-up per 10 anni. I parametri di funzionalità renale considerati sono stati la creatinina e la cistatina C ed è stata osservata la morbilità e la mortalità per eventi cardiovascolari. In particolare, dai dati dello studio, è emerso che un incremento significativo del rischio di mortalità è stato osservato per valori di cistatinemia compresi tra 1 ed 1.1 mg/l che corrispondevano ad un filtrato glomerulare stimato di 72 ± 12 ml/min. Il rischio aumentava significativamente solo per elevati valori di creatininemia ≥ 1.26 mg% M e ≥ 0.96 mg% e per un filtrato < 56 ml/min, confermando che la cistatinemia rispecchia più fedelmente il filtrato glomerulare rispetto alla creatininemia (8). Tuttavia, gli Autori dello studio hanno precisato che la relazione tra cistatina C e morbilità potrebbe essere influenzata da alcuni fattori confondenti che aumentano la sua

concentrazione, quali l'età avanzata, il sesso maschile, il fumo, l'obesità e l'infiammazione (9).

Scopo

E' stato quello di valutare in pazienti affetti da ipertensione arteriosa essenziale e con normale funzione renale ed in pazienti ipertesi con disfunzione renale lieve (I e II stadio NKF) l'attendibilità del dosaggio della cistatina C nel predire precocemente le prime fasi del declino del filtrato glomerulare, confrontando tale risultato con il filtrato radioisotopico, considerato gold standard.

E' stata valutata la capacità di cistatina C di correlarsi con i biomarcatori di attivazione endoteliale endoteliale (ICAM e VCAM) e con il biomarcatore di stress ossidativo 8iso-prostaglandina-F2alfa.(8iso-PFG α). Inoltre, è stato analizzato il potere predittivo della Cistatina C nei confronti delle alterazioni endoteliali e vascolari.

E' stato ancora confrontato il potere predittivo rispetto alle alterazioni vascolari del filtrato glomerulare stimato con i diversi metodi di valutazione:

- 1) Clearance della Creatinina
- 2) Metodica radioisotopica
- 3) Formula di Cockroft e Gault/BSA
- 4) Equazione MDRD (4 variabili)
- 5) Equazione CKD-EPI

6) Formula di Perkins

Criteri di inclusione

Sono stati reclutati 156 pazienti affetti da ipertensione arteriosa di grado lieve moderato con normale funzione renale e con insufficienza renale di grado lieve (eGFR compreso tra 90 e 60 ml/min)

Età compresa tra 18 e 65 anni.

BMI < 30 Kg/m².

Criteri di esclusione

Sono stati esclusi soggetti:

- Fumatori
- Insufficienza renale cronica di grado moderato severo ed in trattamento sostitutivo
- Patologia neoplastica e tiroidea
- Diabetici in condizioni di cattivo controllo glicometabolico (HbA1c > 7% ed in trattamento insulinico).

Protocollo di studio

Tutti i pazienti reclutati sono stati sottoposti a:

- valutazione clinica, PAO, ECG

- esami ematochimici comprendenti:
 - Emocromo con formula leucocitaria
 - Glicemia
 - Insulinemia
 - Azotemia
 - Esame urine
 - Micral test
 - Microalbuminuria
 - Creatininemia
 - Cistatina C
 - Clearance della creatinina
 - Proteinuria 24 h
 - Natriemia
 - Potassemia
 - Calcemia
 - Fosforemia
 - FA
 - TGO/TGP
 - γ GT
 - P-ches
 - Elettroforesi sieroproteica
 - Sideremia
 - Ferritina
 - Colesterolemia totale
 - HDL-Col
 - LDL-Col
 - Trigliceridemia
 - VES
 - ICAM-1, VCAM-1
 - 8iso-PGF2 α

- Renogramma e Scintigrafia Renale

- Eco-color-doppler dei tronchi sovra-aortici con valutazione dello spessore intimo-mediale carotideo
- Ecocardiogramma ed eco-colo-doppler cardiaco

MATERIALI E METODI

Popolazione dello 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, 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 154 soggetti caucasici affetti da ipertensione arteriosa (maschi/femmine: 105/49; età media $44,6 \pm 13,4$ 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) (10)

Le forme di ipertensione secondaria sono state escluse mediante l'esame clinico, la valutazione di creatinina e GFR, elettroliti sierici ed urinari, catecolamine plasmatiche, attività reninica plasmatica ed aldosterone, ecografia renale, eco-color-Doppler delle arterie renali.

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.

Al momento dell'arruolamento, i pazienti non erano in trattamento farmacologico.

Metodi di laboratorio

La misurazione dei parametri biochimici di routine è stata eseguita mediante un autoanalyser (Boehringer Mannheim for Hitachi system 911, Germany).

Tutti i soggetti sono stati sottoposti prima a prelievo ematico per esami bioumorali di routine, per l'analisi della creatininemia e della cistatinemia e per il dosaggio di molecole di origine endoteliale.

I campioni ematici sono stati raccolti alle ore 09:00 del mattino, con i pazienti in condizioni di digiuno da 12 ore.

I soggetti sono stati invitati altresì a recare un campione di urine del mattino per l'esame chimico-fisico e per l'analisi del sedimento ed un campione delle urine delle 24 ore per il dosaggio della microalbuminuria.

La creatininemia è stata dosata con metodica colorimetrica di Jaffè (Instrumentation Laboratori Company, Lexington, MA, USA) mediante un autoanalizzatore.

La cistatinemia è stata dosata con metodica nefelometrica (N Latex Cistatina C, Dade- Behring). Particelle di polistirene, ricoperte con anticorpi specifici anti cistatina C umana, vengono agglutinate quando sono miscelate con campioni contenenti cistatina C umana. Tali aggregati causano scattering della luce passante attraverso il campione. L'intensità della luce deviata è proporzionale alla concentrazione della corrispondente proteina del campione. Il risultato viene valutato per confronto con uno standard a concentrazione nota.

Il filtrato glomerulare è stato valutato con metodica radioisotopica utilizzando come radiofarmaco l'acido dietilene-triamino pentacetico chelato con Tecnezio 99 .

Utilizzando la creatinina come marker endogeno di filtrato glomerulare, quest'ultimo è stato stimato con la formula di C&G, con l'equazione MDRD e con l'equazione CKD-EPI, misurato con la clearance della creatinina, mentre utilizzando la cistatina C come marker endogeno di filtrato glomerulare, è stato calcolato con la formula di Perkins.

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) (10). La massa del ventricolo sinistro (LVM) è stata determinata mediante la formula dell'ASE (Devereaux) ed è

stata indicizzata sia per la superficie corporea (LVMI) che per l'altezza elevata a 2.7 ($LVMH^{2.7}$) (11).

L'IVS è stata definita in accordo con le Linee-Guida 2007 ESH/ESC (12). 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) $>125 \text{ g/m}^2$ nell'uomo e $>110 \text{ g/m}^2$ nella donna, con $RWT >0.45$; l'IVS eccentrica è stata definita come LVMI $>125 \text{ g/m}^2$ nell'uomo e $>110 \text{ g/m}^2$ nella donna, con $RWT <0.45$.

La frazione di eiezione (EF) del ventricolo sinistro è stata misurata mediante ecocardiografia bidimensionale (13)

La funzione diastolica è stata valutata mediante l'analisi del flusso trans-mitralico e mediante Doppler tissutale, in accordo con le indicazioni dell'ASE (14). Il flusso trans-mitralico è stato misurato nella proiezione apicale "quattro camere" mediante Doppler pulsato, con il volume campione allineato parallelamente alla direzione del flusso. Sono stati misurati l'onda E (E), l'onda A (A), ed il rapporto E/A.

Il Doppler tissutale dell'anello mitralico è stato ottenuto dalla proiezione apicale "quattro camere", utilizzando un volume campione di 1-2 mm posizionato sull'anello mitralico laterale, per valutare la velocità di spostamento in protodiastole (E_m).

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.

Analisi statistica

I dati per le variabili continue sono espressi come media \pm deviazione standard.

Le associazioni univariate tra le variabili sono state testate mediante i coefficienti di correlazione di Pearson.

L'analisi statistica è stata eseguita mediante il software SYSTAT DATA, versione 5.2 (Systat, Evanston, IL, USA).

Risultati

La tabella 1 mostra le caratteristiche demografiche e cliniche dei 154 soggetti arruolati.

Nella tabella 2 sono riportati i valori medi di creatininemia, di cistatinemia , di filtrato glomerulare renale radio isotopico e di filtrato glomerulare renale calcolato con la clearance della creatinina, con l'equazione di Perkins, con l'equazione dello studio MDRD, con l'equazione CKD-EPI e con la formula di Cockcroft-Gault.

La tabella 3 mostra l'analisi di correlazione lineare del filtrato glomerulare radio isotopico con i valori medi di creatininemia, di cistatinemia e del filtrato glomerulare calcolato e stimato con le formule e le equazioni che utilizzano la creatininemia e la cistatinemia come biomarcatori di funzione renale nei 154 soggetti ipertesi.

Nella tabella 4 sono riportati i valori medi di biomarcatori di alterazione endoteliale della popolazione arruolata.

Le tabelle 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f, 4g e 4 h mostrano l'analisi di correlazione lineare della creatininemia, della cistatinemia e del filtrato glomerulare con i biomarcatori di disfunzione endoteliale.

La tabella 5 mostra i valori medi di massa ventricolare sinistra indicizzata e di E/A della popolazione arruolata.

Nella tabella 5a è riportata l'analisi di correlazione lineare della massa del ventricolo sinistro con il filtrato glomerulare radio isotopico e con i valori medi di creatininemia, di cistatinemia e del filtrato glomerulare calcolato e stimato con le formule che utilizzano la creatinina e la cistatina C come biomarcatori di funzione renale in 90 soggetti arruolati e sottoposti ad esame ecocardiografico ed eco-color-doppler cardiaco, mentre la tabella 5b mostra l'analisi di correlazione lineare della E/A con il filtrato glomerulare radioisotopico e con i valori medi di creatininemia, di cistatinemia e del filtrato glomerulare calcolato e stimato con le formule che utilizzano la creatinina e la cistatina C come biomarcatori di funzione renale.

Tabella 1. Caratteristiche demografiche e cliniche dei 154 soggetti arruolati

Partecipanti	154
M/F	105/49
Età (anni)	44,6 ± 13,4
PAS (mmHg)	143 ± 27,2
PAD (mmHg)	90,9 ± 16,5
BMI (Kg/m ²)	28,05 ± 5,4
Glicemia (mg/dl)	91,8 ± 17,3
Col. Tot (mg/dl)	194 ± 40,3
Col. HDL (mg/dl)	45,4 ± 13,4
Col. LDL (mg/dl)	126,5 ± 38,6
Trigl. (mg/dl)	137,5 ± 37,3

Tabella 2. Valori medi della cistatinemia, della creatininemia, del filtrato glomerulare renale radio isotopico e del filtrato glomerulare calcolato e stimato con le formule che utilizzano la creatinina e la cistatina C come biomarcatori di funzione renale nei 154 soggetti arruolati

Cistatina C (g/dl)	0,98 ± 0,23
Creatininemia (mg/dl)	0,92 ± 0,20
eGFR radioisotopico	118,1 ± 34,10
GFR Perkins (ml/min)	106,2 ± 23,06
Clearance della creatinina (ml/min)	99,71 ± 33,4
eGFR (MDRD) (ml/min/1,73m ²)	87,14 ± 20,2
eGFR (CKD-EPI) (ml/min/1,73m ²)	93,87 ± 19,1
GFR (C&G) (ml/min/1,73m ²)	114,15 ± 46,2

Tabella 3. Analisi di correlazione lineare del filtrato glomerulare radioisotopico con i valori medi di creatinemia, di cistatinemia e del filtrato glomerulare calcolato e stimato con le formule che utilizzano la creatinina e la cistatina C come biomarcatori di funzione renale nei 154 soggetti arruolati

GFR radioisotopico	r	p
Cistatina C (g/dl)	-0,3992	0.0001
Creatininemia (mg/dl)	-0,3783	0.0001
GFR Perkins (ml/min)	0,3685	0.0001
Clearance della creatinina (ml/min)	0,3820	0.0001
eGFR (MDRD) (ml/min/1,73m ²)	0,4813	0.0001
eGFR (CKD-EPI) (ml/min/1,73m ²)	0,5518	0.0001
GFR (C&G) (ml/min/1,73m ²)	0,4655	0.0001

Tabella 4: Valori medi delle molecole di disfunzione endoteliale degli 80 soggetti ipertesi

	Media	DS
ICAM (ng/mL)	299.9	75.5
VCAM (ng/mL)	1023	198
8isoPGF2α(pg/mL)	210.9	112.9

Tabella 4a. Analisi di correlazione lineare del filtrato glomerulare radioisotopico con le molecole di disfunzione endoteliale in 80 soggetti arruolati

GFR radioisotopico	r	p
ICAM (ng/mL)	-0,1885	0.08
VCAM (ng/mL)	-0,2159	0.05
8isoPGF2 α (pg/mL)	-0,1616	ns

Tabella 4b. Analisi di correlazione lineare della cistatinemia media con le molecole di disfunzione endoteliale in 80 soggetti arruolati

Cistatinemia (g/l)	r	p=
ICAM (ng/mL)	0,274	0,01
VCAM (ng/mL)	0,308	0,006
8isoPGF2 α (pg/mL)	0,14	ns

Tabella 4c. Analisi di correlazione lineare della creatininemia media con le molecole di disfunzione endoteliale in 80 soggetti arruolati

Creatininemia (mg/dL)	r	p =
ICAM (ng/mL)	0,3042	0,006
VCAM (ng/mL)	0,361	0,001
8isoPGF2 α (pg/mL)	0,263	ns

Tabella 4d. Analisi di correlazione lineare del filtrato glomerulare renale calcolato con la formula di Perkins con le molecole di disfunzione endoteliale in 80 soggetti arruolati

GFR Perkins (ml/min)	r	p =
ICAM (ng/mL)	-0,2495	0.02
VCAM (ng/mL)	-0,2872	0.008
8isoPGF2α(pg/mL)	-0,1167	ns

b

Tabella 4e. Analisi di correlazione lineare della clearance della creatinina con le molecole di disfunzione endoteliale in 80 soggetti arruolati

Clearance creatinina (ml/min)	r	p =
ICAM (ng/mL)	-0,1751	ns
VCAM (ng/mL)	-0,2695	0.01
8isoPGF2α(pg/mL)	-0,2399	0.02

b

Tabella 4f. Analisi di correlazione lineare del filtrato glomerulare renale stimato con l'equazione MDRD con le molecole di disfunzione endoteliale in 80 soggetti arruolati

eGFR MDRD (ml/min/1,73m²)	r	p =
ICAM (ng/mL)	-0,1998	ns
VCAM (ng/mL)	-0,2482	0.02
8isoPGF2α(pg/mL)	-0,1799	ns

Tabella 4g. Analisi di correlazione lineare del filtrato glomerulare renale stimato con l'equazione EPI con le molecole di disfunzione endoteliale in 80 soggetti arruolati

eGFR CKD-EPI (ml/min/1,73m²)	r	p =
ICAM (ng/mL)	-0,2943	0.007
VCAM (ng/mL)	-0,3382	0.001
8isoPGF2α(pg/mL)	-0,2733	0.01

Tabella 4h. Analisi di correlazione lineare del filtrato glomerulare renale stimato con la formula C&G con le molecole di disfunzione endoteliale in 80 soggetti arruolati

GFR C&G (ml/min/1,73m²)	r	p =
ICAM (ng/mL)	-0,2526	0,02
VCAM (ng/mL)	-0,3314	0,001
8isoPGF2α(pg/mL)	-0,2018	0,06

Tab.5 Valori medi della massa del ventricolo sinistro e di E/A in 90 soggetti arruolati

	Media	DS
LVMI (g/m²)	126.2	31.2
E/A	1.24	0.43

Tab.5a Analisi di correlazione lineare della massa del ventricolo sinistro con il filtrato glomerulare radio isotopico e con i valori medi di creatininemia, di cistatinemia e del filtrato glomerulare calcolato e stimato con le formule che utilizzano la creatinina e la cistatina C come biomarcatori di funzione renale in 90 soggetti arruolati

LVMI (g/m²)	r	p=
GFR radioisotopico	-0,181	0.08
Cistatina C (g/dl)	0,3467	0.0007
Creatininemia (mg/dl)	0,4999	0.0001
GFR Perkins (ml/min)	-0,3140	0.002
Clearance della creatinina (ml/min)	-0,129	ns
eGFR (MDRD) (ml/min/1,73m ²)	-0,263	0.01
eGFR (CKD-EPI) (ml/min/1,73m ²)	-0,2444	0.01
GFR (C&G) (ml/min/1,73m ²)	-0,03	ns

Tab.5a Analisi di correlazione lineare della E/A con il filtrato glomerulare radioisotopico e con i valori medi di creatininemia, di cistatinemia e del filtrato glomerulare calcolato e stimato con le formule che utilizzano la creatinina e la cistatina C come biomarcatori di funzione renale in 90 soggetti arruolati

E/A	r	p=
GFR radioisotopico	0,2809	0.006
Cistatina C (g/dl)	-0,3025	0.003
Creatininemia (mg/dl)	-0,1487	ns
GFR Perkins (ml/min)	0,3262	0.001
Clearance della creatinina (ml/min)	0,2985	0.003
eGFR (MDRD) (ml/min/1,73m ²)	0,4019	0.0001
eGFR (CKD-EPI) (ml/min/1,73m ²)	0,4487	0.0001
GFR (C&G) (ml/min/1,73m ²)	0,4088	0.0001

Discussione

La corretta stima del filtrato glomerulare renale è di fondamentale importanza per identificare la malattia renale.

E' noto infatti che la creatininemia come marker di funzione renale presenti dei limiti, quali l'influenza dell'età, del sesso, della massa muscolare e la scarsa sensibilità nell'identificazione della malattia renale nella fase iniziale.

I marker esogeni di filtrato glomerulare renale consentono di ottenere una stima del filtrato glomerulare più fedele rispetto alla creatinina, ma il loro impiego pone non poche difficoltà in termini di invasività e costi dell'indagine. Negli ultimi anni la cistatina C è stata indicata quale marcatore di funzionalità renale e predittore precoce di malattia renale, sebbene presenti dei limiti legati alla non facile eseguibilità del dosaggio perché prevede l'impiego di metodiche tecnicamente complesse, con costi superiori a quelli della diagnostica di laboratorio di routine.

Inoltre in relazione alla funzione immunomodulante svolta dalla cistatina C, la sua concentrazione plasmatica è influenzata da processi infiammatori e/o neoplastici.

Fliser e Ritz, considerando come gold standard la clearance dell'inulina, hanno dimostrato che in pazienti con creatininemia entro il range di normalità, la cistatinemia è un marker di disfunzione renale **(6)**

Nel nostro studio, i valori medi di cistatinemia dei 154 soggetti ipertesi arruolati sono risultati superiori rispetto ai valori medi di creatininemia.

Inoltre, considerando il filtrato valutato con metodica radio-isotopica come gold standard, abbiamo osservato che il filtrato radio-isotopico correla con il filtrato stimato con le equazioni MDRD e CKD-EPI ($r = 0,4813$ $p=0,0001$; $r = 0,5518$ $p= 0,0001$ rispettivamente) con una significatività statistica superiore rispetto alle correlazioni ottenute con le altre equazioni e formule che considerano come variabili sia la cistatina C che la creatinina.

Numerosi studi hanno dimostrato che nei soggetti ipertesi le alterazioni funzionali dell'endotelio si appalesano ancor prima della riduzione del filtrato glomerulare renale (15-16).

Nella popolazione oggetto del nostro studio, i biomarcatori di attivazione endoteliale ICAM e VCAM correlano con la cistatina C, la creatinina e con il filtrato glomerulare stimato e calcolato con i vari metodi, con una significatività statistica sovrapponibile fatta eccezione per il filtrato stimato con l'equazione MDRD; quest'ultimo infatti non

correla né con ICAM né con VCAM. Ciò è verosimilmente dovuto all'evidenza che l'equazione MDRD essendo stata sviluppata in soggetti nefropatici, sottostima il filtrato glomerulare nei soggetti con normale funzione renale e con disfunzione renale lieve.

Abbiamo altresì valutato nella popolazione in esame la relazione tra i vari metodi di stima e di calcolo del filtrato glomerulare e lo stress ossidativo. Numerosi studi sperimentali dimostrano che le ROS svolgono un ruolo fondamentale nello sviluppo dell'ipertensione arteriosa (17). Il contributo delle ROS allo sviluppo dell'ipertensione è dovuto in larga parte all'eccessiva produzione di anione superossido (O_2^-) ed alla ridotta biodisponibilità di ossido nitrico sia nel distretto vascolare che in quello renale. Gli isoprostani sono composti prostaglandino-simili che derivano dalla perossidazione dell'acido arachidonico (18). Gli isoprostani agiscono direttamente sul rene: la somministrazione di basse dosi nel ratto produce una marcata vasocostrizione renale, esercitata preferenzialmente sul distretto arteriolare afferente, che riduce sia il flusso plasmatico renale che la velocità di filtrazione glomerulare (19). In un nostro studio è stata osservata, in un'ampia popolazione di pazienti ipertesi con differente grado di funzione renale, una stretta e significativa correlazione inversa tra $8\text{isoPGF}_2\alpha$ e GFR stimato mediante

l'equazione MDRD. Questa correlazione veniva poi confermata all'analisi multivariata, in cui il GFR veniva considerato come variabile dipendente (20).

Nel presente studio abbiamo osservato che l' 8isoPGF2 α non correla con la cistatinemia né con la creatininemia, ma, seppur debolmente, con la clearance della creatinina.

E' altresì noto che riduzione della funzionalità renale, anche nei primi stadi della malattia renale cronica, si associa ad una elevata morbilità cardiovascolare. In uno studio osservazionale (21) condotto su 358 ipertesi mai trattati farmacologicamente, 69 dei quali caratterizzati da lieve insufficienza renale (clearance della creatinina 78 ml/min) è stata osservata una maggiore prevalenza di ipertrofia ventricolare sinistra ed un maggiore ispessimento mio-intimale carotideo. E' da rilevare che i 69 pazienti con CKD lieve ed i 289 con funzione renale normale, differivano significativamente per età, pressione arteriosa media, durata della malattia ipertensiva e microalbuminuria. Tuttavia, all'analisi statistica condotta dopo aggiustamento per tutti questi fattori di rischio, il rischio per la presenza di danno d'organo aumentava del 43% per ogni riduzione della clearance della creatinina pari ad una deviazione standard. Pertanto i pazienti con lieve insufficienza renale avevano maggiori

probabilità di essere portatori di ipertrofia ventricolare sinistra e/o di ispessimento mio-intimale carotideo (22).

Ciò è stato confermato da Slipak et al (23), in uno studio longitudinale condotto su 4637 soggetti di età superiore ai 65 anni in un follow-up di dieci anni. I parametri di funzionalità renale considerati sono la creatininemia e cistatinemia ed è stata osservata la morbilità e la mortalità per eventi cardiovascolari. In particolare, dai dati dello studio è emerso che un incremento significativo di rischio di mortalità era rilevabile per valori di cistatinemia compresi tra 1 ed 1,1 mg/l che corrispondono ad un filtrato stimato di 72 ± 12 ml/min/1,73m². Il rischio aumentava significativamente solo per valori di creatininemia $\geq 1,26$ nei maschi e $\geq 0,96$ nelle femmine e per un filtrato < 56 ml/min confermando che la cistatinemia indica più fedelmente il filtrato glomerulare rispetto alla creatininemia. Tuttavia, gli autori dello studio sottolineavano che la relazione tra cistatina C e morbilità potrebbe essere influenzata da alcuni fattori confondenti che quali l'età avanzata, il sesso maschile, il fumo, l'obesità e l'infiammazione. Di questi fattori confondenti nella popolazione arruolata nel nostro studio sono presenti la prevalenza del sesso maschile e l'obesità. Pertanto, non possiamo

escludere che i nostri dati abbiano risentito dell'effetto svolto da questi fattori.

In uno studio prospettico condotto su 6814 soggetti disegnato per valutare la malattia cardiovascolare subclinica e la sua progressione, elevati livelli di cistatina C sono risultati associati ad un aumentato spessore intimo-mediale carotideo, inducendo ad identificare nell'aterosclerosi accelerata il legame tra declino della funzione renale e danno cardiovascolare subclinico. Inoltre, nello stesso studio, in un sottogruppo di 4971 soggetti, per un filtrato glomerulare valutato con la cistatina $< 75 \text{ ml/min/1,73m}$, si associava ad un aumentato rischio di sviluppare ipertrofia ventricolare (24).

Nello studio da noi condotto, l'applicazione delle curve ROC, ha dimostrato che sia la cistatina C che la creatinina non hanno un valore predittivo nei confronti dell'ispessimento mio-intimale carotideo. Questo dato contrasta con quanto la letteratura ha finora mostrato, e tale discordanza potrebbe essere legata all'esiguità numerica del campione da noi preso in esame. Da quanto fin qui detto, appare chiaro che la cistatina C non è unicamente un marcatore della funzione renale, ma può fungere anche da fattore di rischio indipendente per danno cardiovascolare. Nei pazienti affetti da ipertensione essenziale, è stato

confermato il suo ruolo di marcatore precoce di morbilità cardiovascolare (25). Inoltre, la cistatina C sierica è un importante marcatore di danno cardiovascolare nella sindrome coronarica acuta ed elemento predittivo degli esiti clinici nella arteriopatia coronarica (26-27).

Djoussè ed al (28) hanno mostrato, in soggetti ipertesi, un'associazione tra i livelli di cistatina C nel siero e un aumento del rischio di insufficienza cardiaca.

I nostri dati mostrano che la creatinina ed il filtrato glomerulare renale stimato con le equazioni MDRD e CKD_EPI correlano con la massa ventricolare sinistra, mentre non risulta alcuna correlazione della massa ventricolare con la cistatina C e le altre formule oggetto di studio, in contrasto con quanto riportato in letteratura.

Tuttavia, risulta interessante notare che il parametro ecocardiografico di disfunzione diastolica E/A correla con la cistatinemia con una significatività statistica maggiore rispetto alla correlazione con la creatininemia ($p = 0,006$ vs $p = 0,003$), suggerendo una maggiore sensibilità della cistatinemia nel predire precocemente la disfunzione diastolica rispetto alla creatinina. Questi dati suggeriscono che la

cistatina C è un marcatore delle alterazioni funzionali che si sviluppano nella malattia ipertensiva.

Tuttavia, i nostri risultati dimostrano che il legame tra la cistatina C e le alterazioni cardiovascolari viene meno con l'instaurarsi delle alterazioni morfologiche cardiache verosimilmente perché, nella malattia ipertensiva, l'instaurarsi di un danno strutturale sottende l'azione di diversi fattori bioumorali di tipo infiammatorio che influenzano la concentrazione plasmatica della cistatina C, inficiando quindi la sua funzione di marker precoce di danno cardiovascolare.

Bibliografia

1. Go As, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, HSU CY Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. N. Engl J Med 2004 Sep 23; 351 (13): 1296- 305.
2. Ruilope LM, Salvetti A, Jamerson K, Warnold I, Wedel H, Zanchetti A. Renal function and intensive lowering of blood pressure in the hypertensive subjects of the Hypertension Optimal Treatment (HOT) study. J Am Soc Nephrol 2001, 12: 218-225.
3. Hillege HL, Fidler V, Diercks G, Van Gilst W, de Zeeuw D, van Veldhuisen DJ et al. Urinary albumin excretion predicts cardiovascular and non cardiovascular mortality in general population. Circulation 2002; 106: 1777-1782.
4. Watchell K, Dahlof B, Rokkedal J, Papademetriou V, Nieminen MS, Smith G, Gerds E, Boman K, Bella JN, Devereux RB Change of left ventricular geometric pattern after 1 year of antihypertensive treatment: the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension (LIFE) study: Am Heart j.2002 Dec; 144 (6): 1057-64.
5. Cottone S, Mulè G, Nardi E, Lorito MC, Guarneri M, Arsena R, Briolotta C, Vadalà A and G Cerasola Microalbuminuria and early endothelial activation in essential hypertension. J of Human Hypertension (2007) 21, 167-172.
6. Fliser D, Ritz E. Serum cystatin C concentration as a marker of renal dysfunction in the elderly. Am J Kidney Dis 2001; 37: 79-83.

7. Mussap M, Dalla Vestra M, Fioretto P, Saller A, VAragnolo MC, Nosadini R and Plebani M. Cystatin C is more sensitive marker than creatinine for the estimation of GFR in type 2 diabetic patients. *Kidney International*, Vol 61 (2002, pp.1453-1461).
8. Shlipak MG, Sarnak MJ, Katz R, Fried L, Seliger SI, Newmann AB, Siscovick DS, and Stehman Breen C.
Cystatin c and the Risk of Death and Cardiovascular Events among Elderly Person.

NEJM May 19, 2005 vol. 352 n 20; 2049-2060
9. Knight EL, Verhave JC, Spiegelman D, et al Factors influencing serum cystatin C levels other than renal function and the impact on renal function measurement. *Kidney International* 2004; 65: 1416-21.
10. 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.
11. 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.
12. 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.

13. 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.
14. Quiñones MA, Otto CM, Stoddard M, Waggoner A, Zoghbi WA. Recommendations for Quantification of Doppler Echocardiography: A Report From the Doppler Quantification Task Force of the Nomenclature and Standards Committee of the American Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 2002; 15:167-184.
15. Klausen K, Borch-Johnsen K, Feldt-Rasmussen B, et al. Very low level of microalbuminuria are associated with an increased risk of coronary heart disease and death independently of renal function, hypertension and diabetes. *Circulation* 2004; 110:32-5
16. Cottone S, Vadalà A, Mangano M.T., Riccobene R, et al. Endothelium-Derived Factors in Microalbuminuric and Nonmicroalbuminuric Essential Hypertensives. *Am Journal of Hypertension*, 2000;13:172-176.
17. Rajagopalan S, Kurz S Angiotensin II mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest.* 1996; 97:1916-1923).
18. Morrow JD. The isoprostanes: their quantification as an index of oxidant stress status in vivo. *Drug Metab Rev* 2000;32:377-385).
19. Morrow JD, Hill KA, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non cyclooxygenase, free radical catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87:9383-9387).

20. Cottone S, Lorito MC, Riccobene R, Nardi E, et al. Oxidative stress, inflammation and cardiovascular disease in chronic renal failure. *J Nephrol* 2008; 21: 175-179.
21. Leoncini G, Viazzi F, Parodi D, Vettoretti S. Mild renal dysfunction and subclinical cardiovascular damage in primary hypertension. *Hypertension* 2003 Jul; 42 (1):14-18.
22. Bui AL, Katz R, Kestenbaum B et al. Cystatin C and carotid intima-media thickness in asymptomatic adults: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA)
23. Shlipak MG, Sarnak MJ, Katz R, et al. Cystatin C and the risk of death and cardiovascular events among elderly persons. *New England of Medicine*
24. Moran A, Katz R, Jenny NS et al. Left ventricular hypertrophy in mild and moderate reduction in kidney function determined using cardiac magnetic resonance imaging and cystatin c: Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA)
25. Watanabe S, Okura T, Liu J, Miyoshi K, Fukuoka T, Hiwada K, et al. Serum cystatin C level is a marker of end-organ damage in patients with essential hypertension. *Hypertens Res.* 2003;26:895-899).
26. Jernberg T, Lindahl B, James S, Larsson A, Hansson LO, Wallentin LL. Cystatin C: a novel predictor of outcome in suspected or confirmed non ST elevation acute coronary syndrome. *Circulation.* 2004; 110: 2342-2348
27. Koenig W, Twardella D, Brenner H, Rothenbacher D. Plasma concentrations of cystatin C in patients with coronary heart disease and risk for secondary cardiovascular events: more than a simply marker of glomerular filtration rate. *Clin Chem.* 2005;51:321-327)
28. Djoussè L, Kurth T, Gaziano JM. Cystatin C and the risk of heart failure in the Physicians' Health Study (PHS). *Am Heart J.* 2008; 155:82-86)

