

## **Indice**

<b>Introduzione</b>	<b>2</b>
<b>La malattia renale cronica</b>	<b>2</b>
<b>La stiffness aortica</b>	<b>4</b>
<b>Cos'è la stiffness aortica</b>	<b>4</b>
<b>Come si misura la stiffness</b>	<b>5</b>
<b>Stiffness aortica ed eventi cardiovascolari</b>	<b>8</b>
<b>Fattori che influenzano la stiffness</b>	<b>10</b>
<b>Stiffness e CKD</b>	<b>11</b>
<b>Scopo</b>	<b>13</b>
<b>Protocollo di studio</b>	<b>13</b>
<b>Popolazione dello studio</b>	<b>13</b>
<b>Metodi di laboratorio</b>	<b>15</b>
<b>ABPM</b>	<b>17</b>
<b>Misurazione della PWV e dell'Aix</b>	<b>17</b>
<b>Statistica</b>	<b>18</b>
<b>Risultati</b>	<b>20</b>
<b>Discussione</b>	<b>23</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>29</b>
<b>Tabelle e figure</b>	<b>37</b>

# **Fattori associati all' aumento della “stiffness” aortica**

## **in pazienti con malattia renale cronica**

### **Introduzione**

#### ***La malattia renale cronica***

La malattia renale cronica (CKD) rappresenta un importante problema di sanità pubblica mondiale: infatti, l'incidenza di insufficienza renale terminale (ESRD) che richiede il trattamento sostitutivo mediante dialisi o trapianto è in continua crescita e comporta costi sempre più elevati (1-3). Il problema assume dimensioni ancora più rilevanti se si considera che la prevalenza di CKD iniziale è 100 volte più elevata di quella dell'ESRD (4).

Negli Stati Uniti è stato riportato che addirittura il 16,8% della popolazione adulta sia affetta da CKD (2). Negli ipertesi tale prevalenza raggiunge proporzioni allarmanti (5). In una indagine recente (lo studio REDHY) condotta su oltre 1800 pazienti afferenti al nostro Centro di Riferimento Regionale per l'Ipertensione Arteriosa e la Prevenzione Cardiovascolare è stato stimato che circa il 28% degli ipertesi presenta segni di disfunzione renale, il più spesso di grado lieve o moderato (6).

La CKD non necessariamente progredisce fino allo stadio di ESRD, ma contribuisce invece in maniera significativa ad aumentare il rischio cardiovascolare (4).

Le patologie cardiovascolari, infatti, rappresentano la prima causa di morte nei pazienti affetti da CKD; in particolare, è ben noto come nei soggetti con ESRD la mortalità per cause cardiovascolari superi il 50% della mortalità totale, con un rischio che risulta essere da 3 a 30 volte maggiore rispetto alla popolazione generale, specie nei soggetti più giovani (7, 8).

Anche nell'insufficienza renale iniziale è stato più recentemente dimostrato come il rischio di sviluppare complicanze cardiovascolari sia già aumentato e tenda a crescere con il progredire della malattia renale (9-12). Per tale motivo la Task Force costituita dalla National Kidney Foundation (NKF) raccomanda di comprendere nella categoria dei soggetti ad alto rischio cardiovascolare anche i pazienti con CKD (4).

Il miglioramento delle tecniche dialitiche e della terapia delle patologie cardiovascolari avvenuto negli ultimi anni sembra aver modificato solo modestamente l'outcome di questi pazienti: infatti interventi che appaiono significativamente efficaci nei soggetti con normale funzione renale, quali la terapia ipolipemizzante, risultano solo parzialmente utili nei pazienti in dialisi (13).

La spiegazione della stretta associazione esistente tra CKD e complicanze cardiovascolari e degli scarsi successi terapeutici ottenuti in questi pazienti può essere data sia da un aumento della prevalenza dei fattori di rischio tradizionali, sia dallo sviluppo di fattori non tradizionali, propri della CKD (9,10,12); infatti, sebbene la prevalenza di ipertensione arteriosa, di diabete e di dislipidemia sia più elevata nei pazienti con insufficienza renale cronica che nei soggetti con normale funzione renale, tale riscontro non spiega in misura adeguata l'incremento significativo dei tassi di mortalità dei pazienti nefropatici.

Tra i fattori di rischio non tradizionali associati alle malattie renali croniche vanno annoverate le alterazioni della struttura e della funzionalità delle grandi arterie (14). Infatti il pattern di malattia vascolare che caratterizza la popolazione con CKD differisce da quello dei pazienti con normale funzione renale: la malattia vascolare "tradizionale" è caratterizzata da interessamento principale dell'intima con formazione di placche prevalentemente lipidiche, che possono determinare stenosi focali e che possono complicarsi con rottura di placca e trombosi; nella CKD il processo degenerativo vascolare generalmente si caratterizza per un marcato e diffuso processo di calcificazione, anche in assenza, almeno inizialmente di placche aterosclerotiche, che coinvolge principalmente la media e che, sebbene età-dipendente, appare più precoce e più severo rispetto al normale processo di calcificazione tipico dell'invecchiamento (15).

## ***La stiffness aortica***

### *Cos'è la stiffness aortica*

In dipendenza dall'età e da svariati altri fattori quali la pressione arteriosa, la parete delle grandi arterie di conduttanza subisce un intenso processo di rimaneggiamento che comporta alterazioni delle proprietà visco-elastiche della parete stessa. Il risultato di ciò è un diffuso processo di arteriosclerosi, caratterizzato da arterie più rigide o, in altri termini, da una ridotta elasticità o compliance arteriosa. L'elasticità dell'aorta e delle grandi arterie è di importanza critica per l'assorbimento di energia durante la sistole; infatti, circa la metà della gittata sistolica progredisce durante la diastole, grazie al ritorno elastico delle pareti arteriose. In presenza di arterie irrigidite questo processo è alterato e risulta in un aumento del post-carico ed, in ultima analisi, in ipertrofia del ventricolo sinistro e ridotta perfusione coronarica. Quando le arterie si irrigidiscono, si dilatano e la parete vascolare si ipertrofizza; le ovvie conseguenze cliniche di questo processo sono un aumento della pressione sistolica, la riduzione della pressione diastolica e l'aumento della pressione differenziale: tutte e tre queste modificazioni si associano ad incremento del rischio cardiovascolare nella popolazione generale. Inoltre, in un circolo vizioso l'aumento della pressione arteriosa di per sé incrementa la stiffness (16).

La rigidità arteriosa può essere quindi considerata come un fattore potenziale di inizio e progressione dell'aterosclerosi e dell'ipertensione sistolica (Figura 1); inoltre essa è associata ad altri fattori di rischio cardiovascolari noti come l'età avanzata, il sesso maschile, le alterazioni dell'assetto lipidico, il diabete e la sindrome metabolica. Pertanto l'incrementata rigidità arteriosa può essere considerata un marker precoce per evidenziare le alterazioni morfo-funzionali arteriose provocate dai vari fattori di rischio su esposti (17). Non sorprende pertanto che numerosi studi longitudinali abbiano dimostrato il suo potente valore predittivo in termini di sviluppo di eventi cardiovascolari (17-25).

### *Come si misura la stiffness aortica*

La consapevolezza dell'importante ruolo svolto dalle alterazioni della meccanica delle grandi arterie nello sviluppo degli eventi cardiovascolari ha stimolato la ricerca di metodi di misurazione non invasivi della compliance arteriosa, alcuni dei quali sono tuttavia complessi e necessitano di apparecchiature sofisticate per cui la loro applicazione nella pratica clinica è risultata limitata (17).

Tra i diversi indici di stiffness a livello sistemico (compliance sistemica), regionale (pulse wave velocity carotido-femorale) e locale (arteria carotide comune o altra arteria periferica) valutati negli ultimi anni nell'ambito di svariati studi clinici, sono emersi come particolarmente affidabili l'impiego della pulse wave velocity (PWV) e dell'augmentation index (AIx); entrambi infatti risultano di semplice rilevazione e forniscono risultati riproducibili. La PWV aortica, inoltre, appare ampiamente validata in termini di significato prognostico (17-18).

Il principio di base della PWV misurata lungo l'asse aorto-iliaco è che l'onda sfigmica si propaga lungo le pareti dell'albero arterioso ad una velocità che dipende dall'elasticità delle pareti stesse: tanto più sono rigide (meno elastiche) le pareti tanto più alta è la velocità di propagazione (17).

La PWV aortica è generalmente considerata il golden standard per la determinazione della rigidità vascolare, poiché l'aorta, rappresentando la principale arteria di conduttanza dell'organismo, è responsabile degli effetti fisiopatologici della stiffness arteriosa e poiché un suo aumento si associa ad incremento della mortalità sia nei pazienti nefropatici che nei non nefropatici (17-25), a differenza della PWV determinata in altri distretti arteriosi come quello carotido-radiale o femoro-tibiale (22, 25).

L'AIx esprime l'aumento della pressione pulsatoria generato dalla riflessione dell'onda sfigmica dalla periferia; esso è dato dalla differenza tra il primo picco della curva pressoria, legato all'onda incidente ed il secondo picco, dato dall'onda riflessa, divisa per la pressione pulsatoria. La morfologia dell'onda sfigmica è

infatti l'espressione dell'interazione dinamica fra l'onda anterograda, generata dall'eiezione ventricolare, e quella riflessa dalla periferia, profondamente influenzata dalla rigidità aortica, ma anche dalle caratteristiche morfologiche e funzionali del microcircolo, responsabile di buona parte del fenomeno della riflessione dell'onda sfigmica.

L'AIx è pertanto un parametro composito che può essere ritenuto un indice indiretto di rigidità arteriosa, anche se il "golden standard" rimane indubbiamente la PWV (17, 27-28).

Attualmente i metodi più diffusi per la rilevazione della stiffness arteriosa sono il sistema del Complior e lo SphygmoCor; il primo registra contemporaneamente le onde pressorie a livello carotideo ed a livello femorale rilevate mediante trasduttori piezoelettrici e calcola automaticamente, con metodica computerizzata, la PWV, dividendo la distanza (misurata manualmente), tra i due siti di rilevazione, per il tempo percorso dall'onda sfigmica per raggiungere, dal sito prossimale (in genere la carotide), il sito distale (in genere femorale) (17).

Lo SphygmoCor utilizza, invece, un tonometro ad appianazione che viene abitualmente applicato a livello dell'arteria radiale, per l'analisi dell'onda di polso di tale vaso, da cui poi attraverso sofisticata elaborazione matematica (analisi di Fourier) viene ricostruita la morfologia dell'onda sfigmica dell'aorta, da cui si ricava, in maniera non invasiva l' Aix e la pressione centrale. Con lo stesso dispositivo, con una metodica sequenziale, si può misurare la PWV aortica, attraverso rilevazioni tonometriche successive dell'onda sfigmica a livello carotideo e femorale che vengono messe in fase mediante la traccia elettrocardiografica, utilizzando come riferimento l'apice dell'onda R (17).

L'Arteriograph è, invece, un dispositivo computerizzato di recente introduzione che utilizza un metodo oscillometrico per determinare contemporaneamente PA brachiale, PWV ed Aix (Figura 2). Inizialmente l'apparecchio misura la pressione arteriosa a livello dell'arto superiore con metodo oscillometrico, quindi produce nel bracciale una pressione superiore di 35 mmHg rispetto alla pressione sistolica misurata; le fluttuazioni della parete dell'arteria brachiale, vengono rilevate dal bracciale, trasmesse al software ed analizzate come onde sfigmiche. L'assenza di flusso ematico che si determina per effetto dell'insufflazione a

pressione sovrastolica del bracciale facilita l'identificazione, nel contesto della curva pressoria registrata, di due componenti: una'onda diretta (o primaria o incidente) ed un'onda riflessa (o tardiva). Dal rapporto tra la distanza misurata dal giugulo alla sinfisi ( $Jug - Sy$ ) (assunta come corrispondente al tragitto aortico) ed il tempo che intercorre tra l'inizio dell'onda incidente (o primaria) e l'inizio dell'onda riflessa (o tardiva) [definito *return time* (RT)] si ricava la PWV aortica (PWVao) espressa in m/sec (29). Il *return time* viene diviso per due visto che l'onda sfigmica percorre lo stesso tragitto in senso anterogrado e retrogrado (Figure 2, 3, 4 e 5).

La formula che esprime tale relazione è la seguente: **PWVao (m/sec) = Jug/Sy (m)/RT/2 (sec)**. Lo stesso apparecchio è in grado simultaneamente di fornire la stima del valore di AIx a livello brachiale come rapporto tra la differenza delle ampiezze dell'onda riflessa (P2) e dell'onda incidente (P1) e la pressione di polso (PP) (**AIx = P2-P1/PP x 100**). Con un apposita equazione di regressione (ottenuta da studi effettuati confrontando il valore ottenuto di AIx brachiale con l'AIx aortico rilevato invasivamente) si deriva poi l'augmentation index aortico (Figure 2 , 3, 4 e 5).

L'Arteriograph, è stato validato rispetto al Complior ed allo SphygmoCor nella popolazione generale (29) (Figura 6) e negli ipertesi (30-32). Recentemente, inoltre, l'AI e la PWV misurate con metodo oscillometrico hanno mostrato una strettissima correlazione con i valori ottenuti con metodiche invasive, ancora più stretta rispetto a quella degli altri metodi non invasivi prima citati (Figura 7) (32).

Infine, in termini comparativi, l'Arteriograph risulta di più semplice utilizzo e meno criticamente dipendente dal posizionamento dei sensori al di sopra delle arterie carotide e femorale (nel Complior) e radiale (nello SphygmoCor) (29).

### *Stiffness aortica ed eventi cardiovascolari*

La stiffness aortica ha mostrato di possedere un valore predittivo indipendente per mortalità cardiovascolare, malattia coronarica e stroke fatale in diversi gruppi di pazienti (17-28): negli ipertesi essenziali (19-20), negli uremici (14, 21-23), nei diabetici (23-24) e nella popolazione generale (25)

Le nuove Linee Guida Europee dell' ESC ( European Society of Cardiology ) e dell' ESH (European Society of Hypertension) del 2007 relative alla gestione dell'Ipertensione pongono in evidenza tra i pazienti ad alto ed altissimo rischio quelli con Stiffness (Rigidità) arteriosa aumentata ed attribuiscono alla misura della Pulse Wave Velocity (PWV) aortica, un elevato valore prognostico, in termini di aumentata morbilità e mortalità cardiovascolare (26).

Il primo studio longitudinale sul ruolo prognostico negativo della PWV è stato pubblicato da Blacher e coll nel 1999 ed ha riguardato pazienti emodializzati. In seguito a correzione per i fattori di confondimento, la PWV aortica risultò essere il più importante predittore di mortalità, seguito dall'età dialitica (14). L'odds ratio associato ad una PWV > 12 (rispetto ad una PWV < 9.4 m/s) era di 5.4 per la mortalità totale e di 5.9 per la mortalità cardiovascolare. Lo stesso gruppo di ricerca, in uno studio successivo su un campione più ampio dello stessa tipologia di pazienti ha dimostrato, inoltre, che solo l'incremento della PWV carotido-femorale (che equivale alla PWV aortica) ha un significato prognostico negativo, mentre l'aumento della PWV misurata in altri distretti (femoro-tibiale, carotido-radiale) non comporta un incremento del rischio CV (22) (Figura 8).

Una recente analisi dello studio di Framingham, ha permesso di rilevare che una PWV carotido-femorale elevata nella popolazione generale della cittadina statunitense, si associava ad un aumento del 46% del rischio di sviluppare un evento cardiovascolare, anche dopo aver corretto per vari fattori confondenti. Anche in questo studio la PWV carotido-radiale è apparsa priva di influenza sulla prognosi cardiovascolare, così come l'augmentation index aortico (25).



Ancora più recentemente una meta-analisi ad opera di Vachopoulos e collaboratori ha confermato il ruolo prognostico della PWV aortica assemblando i dati relativi a 17 studi (compreso lo studio di Framingham prima citato) in cui sono stati coinvolti 15.877 soggetti, comprendenti pazienti con ipertensione, diabete, insufficienza renale terminale, patologia coronarica, e soggetti sani (popolazione generale) (18) (Figura 9)

Gli Autori hanno effettuato delle metanalisi separate per ciascun outcome (eventi cardiovascolari totali, mortalità cardiovascolare, e mortalità per tutte le cause). È stato calcolato il rischio relativo dei pazienti con elevata PWV rispetto ai soggetti con bassa PWV. Inoltre il rischio relativo è stato calcolato anche in relazione all'incremento della PWV di 1 m/s o di una deviazione standard (SD).

Il rischio relativo (RR) nei pazienti con PWV elevata è stato 2.26 per quanto concerne gli eventi cardiovascolari (Figura 9). Il rischio relativo di eventi cardiovascolari per un incremento di PWV di 1 m/s corrisponde ad un incremento del rischio del 14%; un incremento della PWV di 1 SD, invece, è associata ad un RR di 1.47 (18).

Il RR per una PWV aortica elevata è stato più alto nella popolazione a rischio maggiore rispetto alla popolazione a più basso rischio (2.44 nei primi contro 1.68 nei secondi). In particolare, gli Autori hanno osservato che il RR correlato alla PWV era di gran lunga incrementato nei pazienti con ERSD (patologia renale terminale) e nei pazienti ipertesi, rispetto alla popolazione generale (RR 2.81 nei pazienti con ERSD, 2.46 nei pazienti ipertesi) (18).

Il RR di mortalità cardiovascolare è risultato più alto nei pazienti con PWV elevata rispetto ai soggetti con PWV più bassa (Figura 9); per ogni incremento della PWV di 1 m/s o di 1 SD si assiste ad un incremento del RR rispettivamente del 15% e del 47%. Anche qui, il rischio relativo in pazienti con PWV più elevata era maggiore nella popolazione ad alto rischio rispetto a quella a rischio basso (2.48 vs 1.68). (18)

Il rischio relativo di mortalità per tutte le cause è risultato più alto nei pazienti con PWV aortica elevata rispetto ai soggetti con bassa stiffness aortica (Figura 9) e il rischio relativo all'incremento di 1 m/s della PWV è di 1.15 o di 1.42 per ogni incremento di 1 SD (18).

Al contrario di quanto osservato per la PWV carotido-femorale, le evidenze relative al significato prognostico dell'Aix, indipendentemente dai classici fattori di rischio CV, appaiono meno chiare. Infatti, accanto ad alcuni studi che attribuiscono a tale parametro un valore predittivo indipendente (17, 33), ne esistono degli altri, come il già ricordato Framingham Heart Study (25) e lo studio ANBP2, condotto in donne anziane ipertese (34), in cui non è stata confermata una associazione indipendente tra Aix ed eventi cardiovascolari.

### *Fattori che influenzano la stiffness*

Molti fattori influenzano la PWV, quali l'età, la pressione arteriosa, il diametro dell'arteria in esame, lo spessore parietale, la viscosità del sangue, le proprietà elastiche intrinseche della parete arteriosa e vari noti fattori di rischio cardiovascolare tradizionali e non tradizionali (17, 27-28, 35).

I fattori tuttavia riconosciuti di gran lunga come più rilevanti sono l'età e la pressione arteriosa, come recentemente confermato da un amplissimo studio collaborativo internazionale, finalizzato a definire i valori di riferimento della PWV aortica ed in cui sono stati raccolti i dati di quasi 17000 soggetti in 13 centri di 8 paesi europei, in cui è stata misurata la PWV ed i parametri clinici di base (35). L'analisi di questo ampio database ha permesso di evidenziare che l'effetto dell'età sulla PWV aortica sembra essere amplificato nei soggetti con livelli pressori più elevati. E' noto da più tempo, inoltre, che l'incremento, correlato all'età, dei valori della PWV è più pronunciato nelle arterie elastiche centrali, rispetto a quelle muscolari periferiche. In aorta, il cambiamento maggiormente rilevante avviene tra i 10 e i 50 anni, con un incremento approssimativo del 60%, nelle arterie periferiche tale incremento è di gran lunga minore e non supera il 20% a livello degli arti (17).

Per quanto riguarda la relazione tra rigidità aortica e pressione arteriosa questa è da intendersi in senso bidirezionale. Infatti, l'aumento della pressione ed in particolare della pressione arteriosa media causa una distensione della parete arteriosa che, determinando un maggiore trasferimento della forza tensile dalle fibre di elastina a quelle, più rigide, di collagene conduce ad un aumento della stiffness (17). Per tale motivo non si

può non tenere conto, ai fini statistici, della pressione arteriosa media, rilevata al momento della misurazione della stiffness, così come dell'età, quando si voglia valutare l'influenza di qualsiasi altro fattore sulla rigidità arteriosa (17). D'altra parte, è ben noto che un aumento della stiffness aortica determina un aumento della pressione sistolica e della pressione di polso, per cui queste due componenti pressorie finiscono per essere in genere quelle più strettamente correlate alla PWV aortica (17, 27-28). Questo meccanismo che lega la rigidità aortica ai valori tensivi sistolici caratterizza la senescenza vascolare ed è responsabile dell'aumentata prevalenza dell'ipertensione sistolica isolata nei soggetti anziani (17, 27-28).

### *Stiffness e CKD*

Nel corso degli ultimi anni si è consolidata l'evidenza che la popolazione con CKD, specie terminale, è caratterizzata da un processo di irrigidimento delle arterie più severo rispetto alla popolazione generale di pari età e con pari livelli di pressione arteriosa (17, 27-28, 36-38).

I meccanismi sottostanti l'incremento della stiffness nei pazienti uremici non sono chiaramente definiti ma possono includere il sovraccarico di fluidi, calcificazioni delle arterie, microinfiammazione, iperattività del sistema nervoso simpatico, iperattivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone, aumentata ossidazione lipidica ed anomalie del sistema dell'ossido nitrico (27-28).

Oltre alla velocità dell'onda di polso aortica (14, 21-23), anche l'augmentation index (35) è risultato predittore indipendente di morbilità e mortalità nei pazienti affetti da insufficienza renale terminale in trattamento emodialitico. In questi pazienti, ad ogni incremento di AIx (%) pari a 10, il rischio di mortalità per cause cardiovascolari o di altra natura era aumentato di circa il 50% (38).

Anche se il valore prognostico indipendente dell'AIx aortico è oggi messo in discussione da alcuni studi, prima ricordati (25, 34) in passato è stata dimostrata l'associazione tra incremento dell'AIx ed altre affezioni ad alta

prevalenza nei pazienti nefropatici cronici, quali l'ipertensione arteriosa (39), il diabete (40-42), l'aterosclerosi (43) e l'ipercolesterolemia (44).

Numerosi studi hanno mostrato come vi sia una relazione inversa tra funzione renale e rigidità arteriosa (45-56), evidenziabile anche per modeste riduzioni della filtrato glomerulare (46-47) ed in soggetti con GFR nel range di normalità (54-56).

Inoltre, è stata documentata una relazione positiva tra escrezione urinaria di albumina ed aumento della rigidità aortica, pur in presenza di normali valori di filtrazione glomerulare (56-64).

Recentemente, è stata anche descritta una relazione tra un aumento della rigidità aortica ed un più rapido declino della funzione renale in una coorte di 133 pazienti con CKD in stadio 3 e 4 (65), associazione in realtà non confermata dai risultati del Framingham Heart study (57) e dai dati ottenuti da uno studio successivo condotto su 225 soggetti con CKD stadi 2-4 (66).

Gli studi sui fattori correlati con un aumento della rigidità arteriosa nei soggetti nefropatici sono poco numerosi e condotti per lo più in pazienti affetti da insufficienza renale terminale; in questa popolazione la stiffness aortica è risultata dipendente esclusivamente dai valori pressori medi, mentre la rigidità del distretto arterioso femoro-tibiale appariva influenzata dai livelli plasmatici di endotelina e di omocisteina (67).

Per quanto riguarda invece soggetti con minore compromissione della funzione renale ed in trattamento conservativo, pur essendo stato dimostrato un incremento della rigidità arteriosa, anche in età pediatrica (68), poco indagati sono i determinanti delle alterazioni delle elasticità delle grandi arterie.

## **Scopo**

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare i principali fattori demografici, antropometrici, clinici e bioumorali associati alle alterazioni della meccanica delle grandi arterie nei pazienti con CKD stadi 1-4 (classificazione NKF) (4).

## **Protocollo di studio**

Lo studio è stato condotto in accordo alla Dichiarazione di Helsinki ed i soggetti arruolati hanno fornito il proprio consenso informato.

## ***Popolazione dello studio***

I soggetti arruolati nello studio sono stati reclutati tra i pazienti ipertesi afferenti presso l'Unità Operativa di Medicina Interna, Nefrologia ed Ipertensione ed il Centro di Riferimento Regionale per l'Ipertensione Arteriosa e la Prevenzione Cardiovascolare.

In tutti i soggetti sono stati eseguiti un'accurata anamnesi e l'esame obiettivo.

Per la definizione di CKD e la stadiazione della funzione renale è stata utilizzata la classificazione della National Kidney Foundation (NKF) – Kidney Disease Outcome Quality Initiative (K/DOQI): stadio 1:  $GFR \geq 90$  ml/min/1.73 m<sup>2</sup> (filtrato glomerulare normale in presenza di anomalie urinarie, quali proteinuria ed alterazioni del sedimento urinario) ; stadio 2:  $GFR$  89-60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> (lieve riduzione del filtrato glomerulare con o senza anomalie urinarie); stadio 3:  $GFR$  59-30 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> (riduzione moderata del filtrato glomerulare) e stadio 4:  $GFR$  29-15 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> (riduzione severa del filtrato glomerulare) (4).

Sono stati considerati nefropatici i soggetti con riduzione già nota del  $GFR$ , confermata successivamente dalla nostra valutazione, e coloro i quali pur avendo valori di  $GFR > 60$  ml/min/1,73 m<sup>2</sup>, presentavano microalbuminuria o macroalbuminuria

La microalbuminuria e la macroalbuminuria sono state inizialmente ricercate mediante test semiquantitativi [Micral test (Boehringer Mannheim, Germania) e Multistix (Bayer Diagnostici, Germania) rispettivamente] e successivamente si è effettuato dosaggio quantitativo dell'albuminuria, mediante metodica immunoenzimatica.

L'albuminuria stata definita come un'escrezione urinaria di albumina (AER)  $> 20 \mu\text{g}/\text{min}$ .

Sono stati definiti microalbuminurici coloro i quali presentavano sia positività al Micral test che valori di AER compresi tra 20 e 200  $\mu\text{g}/\text{min}$ , mentre sono stati definiti macroalbuminurici soggetti positivi al Multistix e con valori di AER  $> 200 \mu\text{g}/\text{min}$ .

A tutti i pazienti è stato raccomandato di evitare eccessivi sforzi fisici, il giorno prima e durante la raccolta delle urine delle 24 ore. La determinazione quantitativa dell'albuminuria è stata posticipata nelle donne in fase mestruale ed in caso di malattie febbrili o infezioni delle vie urinarie

I soggetti di età compresa tra 30 e 75 anni e con CKD stadio 1-4 sono stati considerati arruolabili nello studio.

Sono stati applicati i seguenti criteri di esclusione: body mass index (BMI)  $> 35 \text{ kg}/\text{m}^2$ ; storia di ipertensione endocrina o maligna; insufficienza cardiaca; fibrillazione atriale, GFR  $< 15 \text{ ml}/\text{min}/1.73 \text{ m}^2$  o in terapia sostitutiva, storia o segni clinici di cardiopatia ischemica; storia o segni clinici di malattia cerebrovascolare; patologie maggiori non cardiovascolari; errori nella raccolta delle urine delle 24 ore (difetto nella raccolta: creatininuria  $< 10 \text{ mg}/\text{kg}$  per le donne ed  $< 15 \text{ mg}/\text{kg}$  per gli uomini; eccesso nella raccolta: creatininuria  $> 25 \text{ mg}/\text{kg}$  per le donne e  $> 30 \text{ mg}/\text{kg}$  per gli uomini) .

Il campione finale è risultato costituito da 126 soggetti con nefropatia cronica, di cui il 44% affetti da nefropatia ipertensiva, il 27% da nefropatia diabetica, il 16% da nefropatia ignota, il 4% da rene policistico dell'adulto, il 2% da pielonefrite cronica, il 2% da nefropatia ischemica, il 4% da glomerulonefrite cronica e meno dell'1% da vasculite crioglobulinemica.

Come previsto dal protocollo del progetto di ricerca sono inoltre stati reclutati 57 ipertesi con normale funzione renale (GFR stimato > 60 ml/min) e con AER < 20 µg/min.

I pazienti sono stati definiti ipertesi in accordo alle Linee-Guida 2007 della European Society of Hypertension (ESH) e della European Society of Cardiology (ESC) (26).

La pressione arteriosa clinica è stata ottenuta come media di tre misurazioni effettuate dopo 5 minuti di riposo in posizione seduta.

Tutti i pazienti reclutati sono stati sottoposti, in condizioni basali, ad esami ematochimici di routine, ed a prelievo ematico per il dosaggio dell'aldosteronemia, dell'escrezione urinaria di albumina, delle molecole di adesione (ICAM-1, VCAM-1), del TGF-β, dell'endotelina-1, del propeptide del collagene tipo I, della cardiotropina-1, della proteina C reattiva ad alta sensibilità (hs-PCR), dell'interleuchina-6, dell'8-ISO-PGF 2α, della fetuina (di questo parametro per motivi tecnici sono disponibili dati solo di un ristretto numero di pazienti). Solo nei pazienti nefropatici è disponibile inoltre il dosaggio del paratormone,

In tutti i soggetti sono stati altresì eseguiti monitoraggio ambulatorio dinamico della pressione delle 24 ore e valutazione della stiffness aortica mediante misurazione della velocità dell'onda sfigmica (PWV) e dell'augmentation index aortico.

### ***Metodi di laboratorio***

I parametri bioumorali di routine sono stati dosati con tecniche standard mediante un autoanalyser (ILab 300 Plus, Lexington MA, USA). In particolare, per il dosaggio della creatinina è stato impiegato il metodo al picrato alcalino, non ID-MS tracciabile.

Il filtrato glomerulare (GFR) è stato stimato mediante l'equazione a 4 variabili dello studio MDRD:  $186 \times \text{creatininemia (mg/dl)}^{-1.154} \times \text{età (anni)}^{-0.203}$  (x 0.742 per le donne) (69). Il fattore di correzione per la razza

nera non è stato utilizzato, poiché tutti i soggetti arruolati nello studio erano di razza caucasica. Questo metodo di stima del GFR è stato utilizzato per la stadiazione dei pazienti. Tuttavia, il GFR è stato anche stimato mediante la formula di Cockcroft e Gault  $:(140 - \text{età}) \times \text{Peso Corporeo(Kg)} / (72 \times \text{creatininemia (mg/dl)})$  (se donna  $\times 0,85$ ), corretta per la superficie corporea (70).

Le molecole di adesione, il transforming growth factor (TGF)- $\beta$ , l'endotelina-1 (ET1), il propeptide del collagene tipo I (PIP), la cardiotropina-1 (CT-1), la proteina C-reattiva ad alta sensibilità (hs-PCR), l'interleuchina-6 (IL-6), l'8-ISO-prostaglandina (PG) F-2 $\alpha$  e la fetuina sono stati dosati con metodica ELISA. In particolare, ICAM-1 e VCAM-1 sono state dosate con kit commerciale Bender MedSystem Diagnostics GmbH (Vienna, Austria), la cui sensibilità è rispettivamente di 3.3 e 0.9 ng/ml ed il cui coefficiente di variazione (CV) è 4 e 3.1%, rispettivamente. Il TGF-  $\beta$  è stato dosato mediante kit Amersham Biosciences (Little Chalfont, Buckinghamshire, Inghilterra) la cui sensibilità è  $<5$  pg/ml ed il CV  $<10\%$ . L'ET-1 è stata preliminarmente estratta dal plasma utilizzando colonne C2 Amprep e dosata mediante kit Amersham (Amersham International, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inghilterra), la cui sensibilità è 0.14 pg/ml, il CV intra-assay è 2.9% ed il CV inter-assay è 3.3%. Il PIP è stato dosato mediante kit Takara Bio Inc (Otsu, Giappone) la cui sensibilità è 10 ng/ml, ed il coefficiente di precisione inter-assay è  $\leq 6.3\%$ . Il CT-1 è stato dosato mediante kit Biovendor GmbH (Heidelberg, Germania) la cui sensibilità è 1 pg/ml, il CV inter-assay è 7.8% ed il CV intra-assay è  $<9\%$ .

La Proteina C-reattiva ad alta sensibilità è stata determinata mediante kit (Diagnostic Biochem, London, Ontario, Canada) la cui sensibilità è di 10 ng/ml, il coefficiente di variazione inter-assay  $< 10\%$ . ed il coefficiente di variazione intra-assay  $< 8\%$ . L'interleuchina-6 è stata analizzata mediante il kit Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA), la cui sensibilità è  $<1$  pg/mL

L' 8-ISO-PGF 2 $\alpha$  è stata determinata mediante kit (Assay Design Inc, Ann Arbor, Michigan, USA), la cui sensibilità è pari a 16.3 pg/ml ed il coefficiente di variazione inter-assay  $< 9\%$ .

La fetuina-A è stata dosata per mezzo del kit Epitope Diagnostics Inc. (San Diego, CA, USA, la cui sensibilità è 2.5 ng/mL).



Aldosterone e paratormone (PTH) sono stati dosati con metodica radioimmunologica . L'aldosterone con il kit ALDCTK-2 (Sorin Biomedica Diagnostics, Saluggia, (TO), Italia) i cui CV inta-assay ed inter-assay sono rispettivamente 5.3 e 7%. Il paratormone è stato dosato come PTH intatto con il metodo immunoradiometrico a due siti (Diagnostic System Laboratories, Webster, TX, USA), la cui sensibilità è 6 pg/ml ed i CV intra-assay ed inter-assay sono, rispettivamente, 2.6 e 5.2 %.

L'escrezione urinaria di albumina delle 24 ore (AER) è stata determinata con metodo immuno-enzimatico (Microalbumin-ELISA, DRG diagnostics, Malburg, Germania). La sensibilità di questo metodo è 0.5µg/ml, e il coefficiente di variazione intra- e inter-assay è rispettivamente  $\leq 3.6\%$  e  $\leq 2.9\%$ .

### ***ABPM***

Un registratore portatile, non invasivo (SpaceLabs 90207 recorder, Redmond, Washington, USA) è stato utilizzato per effettuare il monitoraggio ambulatoriale della pressione arteriosa delle 24 ore (ABPM). Le registrazioni dei valori pressori sono state eseguite automaticamente ogni 15 minuti durante il giorno (dalle ore 7:00 alle ore 22:00) ed ogni 20 minuti durante la notte (dalle ore 22:00 alle ore 7:00).

La lettura e l'analisi dei dati sono stati eseguiti mediante l'interfaccia SpaceLabs ABP90209, versione 2.40.23. Le pressioni sistoliche (PAS)  $> 260$  mmHg o  $< 70$  mmHg, le pressioni diastoliche (PAD)  $> 150$  mmHg o  $< 40$  mmHg, e le pressioni di polso  $> 150$  mmHg o  $< 20$  mmHg sono state scartate automaticamente .

Sono state accettati soltanto gli ABPM con più del 80 % di dati validi.

### ***Misurazione della pulse wave velocity e dell'augmentation index***

PWV ed AIx sono stati determinati tramite la metodica Arteriograph (TensioMed Ltd, Budapest, Ungheria), precedentemente descritta..

## *Statistica*

I dati per le variabili continue sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard, tranne nelle figure dove sono presentate come medie  $\pm$  errore standard (SEM).

Le variabili la cui distribuzione sia risultata non gaussiana sono state trasformate logaritmicamente e sono presentate come mediana e range interquartile.

Le differenze tra i gruppi sono state valutate mediante i test ANOVA e t di Student per campioni indipendenti per quanto riguarda le variabili continue, e mediante il test chi-quadro ( $\chi^2$ ) con la correzione di Yates per le variabili categoriche.

Quando appropriato, le differenze sono state corrette per età e pressione arteriosa media (PAM), mediante l'analisi della covarianza (ANCOVA).

Le associazioni tra le variabili sono state valutate mediante analisi di regressione lineare semplice ed analisi di regressione lineare multipla stepwise. Quest'ultima è stata condotta dapprima nell'intero gruppo di 183 soggetti, e poi nel sottogruppo dei pazienti con CKD, considerando la PWV come variabile dipendente, ed includendo nel modello l'età, il sesso, la PAM, il precedente trattamento farmacologico praticato (codificato nel modo seguente: 0 = assenza di trattamento, 1 = ACE-inibitori o sartani; 2 = Ace-inibitori e/o sartani associati a diuretici; 3 = beta-bloccanti; 4 = calcio.antagonisti; 5 = associazioni delle precedenti classi di farmaci anti-ipertensivi con o senza altre classi farmacologiche) e tutte le variabili risultate associate alla PWV all'analisi univariata.

Il diabete è stato incluso come variabile dicotomica.

Per evitare bias statistici legati all'elevato reciproco grado di colinearità, e per evitare "overload" dei modelli multivariati causati da un eccessivo numero di variabili, le seguenti molecole 8-ISO-PGF 2 $\alpha$ , ICAM-1, VCAM-1, TGF- $\beta$ , ET-1, PIP, CT-1, HS-PCR, IL-6 e fetuina, pur se correlate all'analisi univariata con la

PWV, sono state aggiunte successivamente, una alla volta, al modello di regressione multipla, iniziando dalla variabile con il più elevato coefficiente di Pearson, vale a dire l'8-iso-PGF2- $\alpha$ .

Analogo procedimento è stato eseguito per analizzare i fattori associati in modo indipendente all'Aix.

E' stato considerato statisticamente significativo un valore di  $p < 0.05$ .

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

## **Risultati**

La tabella 1 mostra i principali parametri demografici e clinici della popolazione dello studio suddivisa nei due sottogruppi di pazienti con e senza CKD.

I pazienti con CKD sono risultati mediamente più anziani rispetto ai soggetti ipertesi con normale funzione renale. I valori di pressione arteriosa sistolica e della pressione di polso, sia clinica che delle 24 ore, sono risultati più elevati nei pazienti nefropatici, che inoltre praticavano terapia antipertensiva in percentuale più elevata.

Inoltre, si è osservata una prevalenza nettamente maggiore di diabete nei soggetti con CKD e valori più elevati di trigliceridemia e più bassi di colesterolo HDL.

Infine, come atteso, i pazienti nefropatici presentavano livelli più elevati di albuminuria e livelli inferiori di emoglobina rispetto ai controlli.

Nella tabella 2 sono elencate i parametri del metabolismo calcio-fosforo, le molecole di derivazione endoteliale, gli indici di flogosi subclinica, i markers di sintesi e di degradazione del collagene, e di stress ossidativo dei due sottogruppi di pazienti con e senza CKD. Come atteso, i pazienti con CKD hanno mostrato valori più bassi di fetuina e valori più elevati per quanto riguarda tutte le altre molecole studiate.

La PWV è risultata significativamente più elevata nel gruppo di soggetti con CKD, anche dopo correzione mediante ANCOVA per età e PAM (figura 10). Inoltre, suddividendo i soggetti del gruppo CKD in base allo stadio di disfunzione renale (4), si è osservato un progressivo e statisticamente significativo incremento della PWV passando dallo stadio 1 allo stadio 4; anche in questo caso le differenze hanno mantenuto significatività statistica anche dopo correzione (ANCOVA) per età e PAM (figura 11).

L'Aix, come la PWV, è risultato significativamente maggiore nel gruppo di soggetti con CKD, anche dopo correzione mediante ANCOVA per età e PAM (figura 10), ma, a differenza di quanto osservato per la PWV,

suddividendo i soggetti con CKD in funzione dello stadio di malattia renale, non è sono state osservate differenze significative (figura 11).

L'analisi di correlazione univariata (tabella 3) eseguita nell'intera popolazione di 183 pazienti ha mostrato correlazioni significative tra la PWV e numerose variabili quali l'età, il BMI, PAS, PP e PAM (sia cliniche che delle 24 ore), creatininemia, GFR, albuminuria, parametri metabolici (glicemia, trigliceridi, uricemia), fosforemia e prodotto calcio-fosforo, le molecole di derivazione endoteliale, i markers di sintesi e di degradazione del collagene, gli indici di flogosi subclinica e di stress ossidativo. La PWV ha mostrato, inoltre, una strettissima correlazione con l'Aix ( $r = 0.68$ ;  $p < 0.0001$ ). Risultati sostanzialmente sovrapponibili sono stati ottenuti limitando l'analisi ai 126 pazienti con CKD (tabella 3), in cui tuttavia le correlazioni della PWV con l'HDL e con l'uricemia non hanno raggiunto la significatività statistica. Per molti di questi parametri le correlazioni sono rimaste significative, sia nel gruppo con CKD che nella totalità dei pazienti esaminati, anche quando la PWV è stata corretta per l'età e la PAM (vedi figure 11-17). Inoltre, le molecole di adesione, il TGF- $\beta$ , l'endotelina-1, il PIP, la CT-1, la PCR-HS, l'IL-6, l'8-ISO-PGF  $2\alpha$  e la fetuina hanno mostrato reciproche correlazioni di elevatissima significatività statistica, con coefficienti di Pearson compresi tra 0,69 e 0,90 (dati non mostrati).

La PWV aortica, anche dopo correzione per età e PAM, è risultata più elevata nei diabetici rispetto ai non diabetici, sia nel gruppo dei nefropatici (figura 18), sia nella totalità dei soggetti esaminati ( $p < 0.0001$ ). Nessuna differenza è stata osservata tra i due sessi per quanto concerne la PWV aortica, mentre i fumatori hanno mostrato una maggiore PWV ( $p = 0.02$ ) solo nell'intero gruppo dei soggetti esaminati, ma non nel gruppo dei nefropatici, dove la differenza non ha raggiunto la significatività statistica.

Valori più elevati di PWV aortica, corretti per età e PAM, sono stati riscontrati tra i soggetti trattati con terapia anti-ipertensiva rispetto ai soggetti non trattati, sia in tutta la popolazione studiata ( $p < 0.0001$ ), che nei soggetti con CKD ( $p = 0.002$ ).

La tabella 4 mostra i risultati dell'analisi di regressione multipla stepwise. Quest'ultima è stata condotta dapprima nell'intero gruppo di 183 soggetti, e poi nel sottogruppo dei pazienti con CKD, considerando la PWV come variabile dipendente, ed includendo nel modello variabili demografiche quali l'età ed il sesso, nonché tutte le variabili che avessero mostrato una relazione statisticamente significativa con la PWV all'analisi univariata. Le variabili che hanno mostrato una relazione indipendente con la PWV, nell'intera popolazione di 183 pazienti, erano età, fumo di sigaretta, PAM, prodotto calcio-fosforo, albuminuria e 8-iso-PGF2-alfa. Nel gruppo dei soggetti con CKD i predittori indipendenti della PWV sono risultati l'età, il diabete, la PAM, il prodotto calcio-fosforo, l'albuminuria e l'8-iso-PGF2-alfa. L'inserimento successivo (non simultaneo) nel modello multivariato, con le modalità e per i motivi prima descritti, di ICAM-1, VCAM-1, TGF- $\beta$ , ET-1, PIP, CT-1, HS-PCR, IL-6 e fetuina, non ha comunque modificato i risultati, in quanto nessuna di tali molecole ha mostrato una associazione indipendente con la PWV ed in nessun caso la relazione indipendente tra l'8-iso-PGF2-alfa e PWV ha perduto significatività statistica.

Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata riguardo ai valori di AIX, corretti per età e PAM, tra diabetici e non diabetici, tra fumatori e non fumatori, tra soggetti in terapia farmacologica anti-ipertensiva e non trattati, mentre l'AIX è risultata più elevata nelle donne rispetto agli uomini ( $p = 0.01$ ) nella totalità dei soggetti studiati, ma non nel gruppo con CKD.

La tabella 5 riporta i coefficienti di correlazione di Pearson tra l'augmentation index e vari altri parametri sia in tutti i soggetti valutati che nel gruppo dei pazienti con CKD. Tra tutti i fattori che hanno mostrato una relazione con l'AIX all'analisi univariata, quelli rimasti associati significativamente, in modo indipendente, all'analisi di regressione multipla con tale indice indiretto di stiffness nella totalità dei pazienti esaminati, sono stati: l'età, il sesso (valori più elevati nella donna), la pressione arteriosa media, ed inversamente l'altezza e la frequenza cardiaca. (tabella 6). Queste stesse variabili, con l'eccezione del sesso, sono risultate associate in modo indipendente con l'AIX nel gruppo dei soggetti con CKD (tabella 6).

## Discussione

I risultati principali di questo studio, finalizzato a valutare i fattori associati ad un incremento della stiffness arteriosa in una popolazione di pazienti nefropatici in terapia conservativa, sono stati il riscontro di valori di PWV e di AIx più elevati nel gruppo di soggetti con CKD, indipendentemente dall'età e dalla PAM, con un progressivo incremento, per quanto riguarda la PWV, dallo stadio 1 allo stadio 4.

Inoltre, la PWV ha mostrato una correlazione indipendente con l'albuminuria, ma non con il GFR, e con l'8-iso-PGF2-alfa, un marker di stress ossidativo.

In diversi studi i valori di PWV riscontrati nei pazienti nefropatici sono risultati significativamente più elevati di quelli della popolazioni generale ed anche dei pazienti ipertesi. Nonostante un incremento dei valori medi di stiffness di circa il 10-15% ogni dieci anni nei soggetti sani (28), infatti, nel paziente nefropatico le arterie risultano interessate da un più pronunciato grado di rigidità in ogni fascia d'età.

E' inoltre ben documentato come l'incremento della stiffness arteriosa contribuisca significativamente all'incremento del rischio di infarto miocardico e di stroke sia nella popolazione generale che in diverse specifiche condizioni cliniche quali l'ipertensione, le alterazioni del metabolismo del glucosio e la malattia renale cronica (14, 18-25).

In uno studio recente, condotto in un'ampia popolazione di oltre 6000 coreani di età superiore a 50 anni e con un GFR medio di  $68 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ , si è evidenziata una relazione tra PWV e GFR, indipendentemente dall'albuminuria. Inoltre, come nel nostro studio, al decrescere del GFR si sono osservati valori progressivamente crescenti di PWV (53).

Risultati in parte sovrapponibili sono emersi anche nello studio Hoorn, condotto su 806 soggetti di età compresa fra i 50 e gli 87 anni con disfunzione renale di grado lieve, in cui, indipendentemente dall'età, dalla PAM, dal sesso e dalla tolleranza al glucosio, per ogni  $5 \text{ ml/min/1.73 m}^2$  di decremento del GFR si è osservato un incremento della stiffness arteriosa periferica, ma non di quella centrale (misurata in questo studio come

AIx) (52). In questo studio la stiffness arteriosa ha mostrato associazioni significative, indipendenti l'una dall'altra, sia con il GFR che con l'albuminuria (anche al di sotto del range della microalbuminuria) (52).

Nello studio CRIC la PWV è stata misurata in oltre 2500 soggetti con CKD (GFR medio circa 40 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>, prevalenza di diabete di poco inferiore al 50%). Anche in questo studio è stata evidenziata una relazione inversa tra GFR e PWV; in particolare per ogni 10 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> di decremento del GFR si osservava un incremento di 0.4 m/s della PWV. La relazione tra GFR e PWV era simile anche nel sottogruppo di soggetti nei quali il GFR è stato misurato mediante la clearance dello iotalamato (71).

E' interessante notare come sia stata riportata una relazione significativa tra PWV e funzione renale anche nei soggetti senza CKD. In uno studio di Mourad et al, condotto su 1290 soggetti con normale creatinemia, i soggetti nel terzile inferiore di clearance della creatinina mostravano una PWV più elevata, indipendentemente dalla pressione arteriosa e da altri fattori di rischio CV. Tale relazione era specialmente evidente nei soggetti più giovani, in cui la clearance della creatinina risultava responsabile del 20% circa della variabilità della compliance carotidea (45).

Un recente studio del nostro gruppo, condotto su 222 ipertesi con GFR > 60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> ed esenti da malattie CV, ha mostrato come la PWV si associasse sia con l'albuminuria che con una clearance della creatinina < 90 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>. Inoltre in questo studio l'interazione tra albuminuria e ridotta clearance ha mostrato di incrementare ulteriormente la PWV (56).

In uno studio di popolazione condotto su circa 2000 giapponesi con GFR > 60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>, la PWV è stata misurata all'inizio dello studio e dopo una follow-up di 5 anni; valori basali di PWV più elevati sono risultati associati ad un GFR più basso al termine del follow-up, nonché ad una più rapida velocità di declino annuale del GFR. In particolare, per ogni m/s di incremento della PWV basale, si è osservato un incremento del 36% del rischio di avere un GFR < 60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> al termine del follow-up. Al contrario, il GFR basale non è risultato associato alla PWV al termine del follow-up (72). L'associazione tra stiffness aortica e velocità di



declino della funzione renale è stata confermata anche in un recente studio che ha coinvolto 133 pazienti con CKD stadi 3 e 4 (66).

Nel Framingham Heart Study, nel quale la prevalenza di CKD era del 6,7% e quella di microalbuminuria era del 8,2%, la stiffness arteriosa, misurata sia come PWV che come AIx, non è risultata associata alla CKD all'analisi di regressione multipla, mentre correlava indipendentemente con l'albuminuria (57). I risultati del Framingham Heart Study appaiono in parte coerenti con quelli rilevati nel nostro studio, nel quale l'albuminuria, ma non il GFR, ha mostrato una associazione indipendente con la PWV (tabella 4).

La riduzione della compliance arteriosa nel paziente nefropatico è attribuibile alle stesse modificazioni osservabili nell'invecchiamento nella popolazione generale. E' noto infatti come, a differenza di quanto accade negli ipertesi essenziali, nei quali la rigidità arteriosa, pressione dipendente, sembra essere associata più semplicemente allo spessore della parete arteriosa, nei pazienti con CKD e nei pazienti con ESRD il sistema arterioso vada incontro ad un rimodellamento sovrapponibile per caratteristiche a quello tipico dell'invecchiamento, ma notevolmente accelerato; tale processo appare caratterizzato da dilatazione e, in minor grado, da ipertrofia intimo-mediale, che determinano un irrigidimento arterioso attraverso le alterazioni delle proprietà intrinseche della parete arteriosa (27-28).

L'ipertrofia arteriosa nel paziente con ESRD si caratterizza, da un punto di vista ultrastrutturale, per l'ispessimento fibro-elastico dell'intima, le calcificazioni della lamina elastica, l'incremento della matrice extracellulare ed un aumento relativo delle fibre collagene rispetto alle fibre elastiche: la conseguenza funzionale di tali alterazioni è la compromissione della proprietà elastica intrinseca della parete arteriosa, che, sebbene parzialmente compensata dalla dilatazione arteriosa, si associa a un incremento della rigidità arteriosa osservabile già negli stadi più precoci della malattia renale e prima dell'ingresso in dialisi (27-28). A conferma del ruolo causale svolto dalle alterazioni strutturali della parete arteriosa nel determinare l'incremento della stiffness nel paziente nefropatico, dopo trapianto renale, sebbene si osservi un transitorio decremento della

stiffness, non è evidenziabile un miglioramento a lungo termine e la rigidità arteriosa rimane solitamente elevata (28).

Le proprietà elastiche della parete arteriosa sono influenzate, oltre che da fattori non specifici, quali l'età, l'assetto genetico, i valori pressori, il diabete e le anomalie lipidiche, anche da fattori associati più specificamente alla CKD; in particolare, mentre nel paziente in ESRD le modificazioni del metabolismo minerale sembrano svolgere un ruolo del tutto preminente nella genesi delle calcificazioni arteriose e nell'incremento della stiffness, nel paziente con CKD più precoce il processo di irrigidimento arterioso sembra essere il risultato di una genesi multifattoriale, dipendente da svariati fattori tra i quali sembra essere rilevante il ruolo dell'infiammazione (27-28).

Il nostro gruppo ha recentemente evidenziato, in un gruppo di soggetti ipertesi mai trattati farmacologicamente con normale funzione renale, una relazione indipendente tra PWV carotido-femorale e proteina C-reattiva ad alta sensibilità, il più studiato marcatore di flogosi subclinica (63). Questa associazione è stata confermata anche dallo studio attuale che ha mostrato una correlazione, indipendente da età e pressione arteriosa media, tra PWV aortica e PCR-HS (figura 15), oltre che tra PWV e IL-6 (tabella 3), altro noto marker di infiammazione. Analogo significato è attribuibile alle relazioni da noi osservate tra PWV e molecole di adesione ICAM-1 (Figura 16) e VCAM-1 (tabella 3), sostanze che come è noto consentono l'adesione dei leucociti all'endotelio partecipando alle fasi iniziali dell'aterogenesi, processo che di fatto è riconducibile ad un meccanismo flogistico. Tuttavia, le relazioni di tutte queste molecole con la PWV hanno perduto significatività statistica, quando PCR-HS, IL-6, ICAM-1 e VCAM-1 sono state separatamente incluse in modelli multivariati comprendenti anche l'8-iso-PGF2 $\alpha$ , suggerendo che l'effetto della flogosi sulla stiffness aortica possa essere mediato, almeno in parte, da un aumento dello stress ossidativo. D'altra parte indici di flogosi e marker di stress ossidativo sono tra loro intimamente connessi, come confermato dai risultati dell'attuale studio e da precedenti lavori del nostro gruppo, che hanno mostrato in pazienti ipertesi come i livelli plasmatici di 8-iso-PGF2a siano strettamente correlati alle concentrazioni di PCR-HS ed ICAM-1 (73-74).

E' ben noto come nei pazienti con ESRD siano evidenziabili elevate concentrazioni di molecole della fase acuta ed elevati livelli di stress ossidativo, entrambi associati con accelerazione dell'aterogenesi ed incremento della morbilità e mortalità CV. In anni più recenti diversi studi hanno evidenziato come anche nel paziente con CKD più precoce i processi di infiammazione e stress ossidativo siano decisamente attivati in confronto ai soggetti della popolazione generale o in confronto ai soggetti ipertesi (77).

In vivo lo stress ossidativo viene valutato con varie metodiche, tra le quali una delle più utilizzate e condivise, si basa sul dosaggio dei prodotti della perossidazione lipidica, quali l'8-ISO-prostaglandina-F2alfa (8-ISO-PGF2alfa), provvisto di proprietà vasocostrittrici e attivanti le piastrine (76-77). Diversi studi hanno dimostrato come i livelli di stress ossidativo siano più elevati, rispetto alla popolazione generale, in diverse condizioni patologiche quali l'ipertensione arteriosa, le dislipidemie, le malattie CV e la CKD (75-77). In particolare, i soggetti con CKD mostrano valori di 8-ISO-PGF2alfa più elevati in confronto ai soggetti con ipertensione arteriosa essenziale, ed i livelli di stress ossidativo si incrementano al decrescere della funzione renale. In un recente studio del nostro gruppo, in un ampio campione di 626 soggetti ipertesi con diversi gradi di disfunzione renale è stata dimostrato come la concentrazione di 8-ISO-PGF2alfa si incrementi passando dallo stadio 1 allo stadio 5 di CKD, ed è stata evidenziata una relazione inversa tra 8-ISO-PGF2alfa e GFR, indipendentemente da potenziali fattori confondenti (75).

Oltre che nel processo di aterogenesi in senso stretto, lo stress ossidativo, e dunque l'8-ISO-PGF2alfa, appare coinvolto nel danno vascolare che esita nella riduzione della compliance arteriosa. Uno studio di Kals et al, che ha coinvolto un piccolo gruppo di soggetti con arteriopatia periferica, ha evidenziato una relazione indipendente tra 8-ISO-PGF2alfa urinario e PWV aortica (77) Inoltre, un altro marker di stress ossidativo lipidico quale la concentrazione sierica di LDL modificate dalla malondialdeide, ha mostrato una associazione con la PWV carotido-femorale in un studio condotto su 51 soggetti sani (78)

Nel nostro studio, l'analisi di regressione multipla ha evidenziato come l'8-ISO-PGF2alfa fosse significativamente ed indipendentemente correlato con la PWV sia nell'intero gruppo di soggetti studiati, che –

e ciò costituisce il risultato centrale dello studio – nel gruppo dei pazienti con CKD. Tale relazione è risultata, in particolare, indipendente dal GFR. Anzi l'associazione tra quest'ultimo e la PWV ha perduto significatività statistica dopo l'introduzione nel modello multivariato dell'8-iso-PGF2-alfa. Il che fa supporre che gli effetti del declino della funzione renale sull'elasticità aortica possano essere in parte mediati da un aumento dello stress ossidativo.

L'associazione tra stress ossidativo e stiffness aortica è biologicamente plausibile. Infatti, è noto che un aumento delle specie reattive dell'ossigeno, e quindi dello stress ossidativo, determina una riduzione della biodisponibilità di ossido nitrico che rappresenta uno dei più importanti regolatori della elasticità arteriosa in vivo (80).

La relazione da noi osservata tra endotelina-1 plasmatica e PWV, corretta per età e PAM, sembra essere in accordo con numerosi dati della letteratura. L'infusione di ET-1 in soggetti sani, in quantità tali da determinare livelli plasmatici di tale peptide comparabili con quelli che si osservano nei soggetti con ESRD, si accompagna ad un incremento della PWV aortica. Inoltre, gli antagonisti del recettore A dell'endotelina somministrati a pazienti nefropatici sono in grado di ridurre contemporaneamente la proteinuria e la PWV aortica, in maniera indipendente dall'azione anti-ipertensiva di tali farmaci. La mancata conferma dell'associazione statistica tra ET-1 e PWV quando il modello multivariato comprende anche l'8-iso-PGF2 $\alpha$ , sembra indicare, anche in questo caso, che gli effetti negativi dell'ET-1 sulla stiffness vascolare, possano essere parzialmente legati ad un incremento dello stress ossidativo indotto dall'ET-1.

In conclusione questo studio, finalizzato a valutare i determinanti della stiffness arteriosa in un gruppo di soggetti con CKD stadio 1-4, ha mostrato come tali variabili fossero, oltre all'età ed alla pressione arteriosa media, il diabete, l'albuminuria e l'8-ISO-PGF2alfa. Il dato relativo alla relazione indipendente tra 8-ISO-PGF2alfa e PWV sembra confermare il ruolo di centrale importanza svolto dallo stress ossidativo nelle alterazioni vascolari che caratterizzano i pazienti con CKD.

## Bibliografia

1. US Renal Data System: USRD 2006 Annual Data Report. National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Bethesda, MD, 2006.
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevalence of Chronic Kidney Disease and Associated Risk Factors --- United States, 1999—2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2007; 56: 161-165
3. Thorp ML, Eastman L, Smith DH, Johnson ES. Managing the burden of chronic kidney disease. *Dis Manag* 2006;9:115-121.
4. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002; 39 (Suppl 1): S1-S266.
5. Coresh J, Byrd-Holt D, Astor BC, *et al* Chronic Kidney Disease Awareness, Prevalence, and Trends Among U.S. Adults, 1999 to 2000 *J Am Soc Nephrol.* 2005;16: 180-188
6. Cerasola G, Mule' G, Cottone S, Nardi E, Cusimano P. Hypertension, microalbuminuria and renal dysfunction. The REDHY (REnal Dysfunction in HYpertension) study. *J Nephrol* 2008; 21: 368-373
7. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 32:S112-S119, 1998 (suppl 3)
8. Go AS, Chertow GM, Fan D, *et al*: Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 2004; 351:1296-305.
9. Levey AS, Beto JA, Coronado BE, *et al*. 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. *Am J Kidney Dis* 1998; 32: 853-906.
10. Sarnak MJ, Levey AS. Cardiovascular disease and chronic renal disease: a new paradigm. *Am J Kidney Dis* 2000; 35 (Suppl 1): S117-S131.

11. Shulman NB, Ford CE, Hall WD, et al. Prognostic value of serum creatinine and effect of treatment of hypertension on renal function. Results from the hypertension detection and follow-up program. The Hypertension Detection and Follow-up Program Cooperative Group. *Hypertension* 1989; 13 (Suppl): I80-I93.
12. Culeton BF, Larson MG, Wilson PW, Evans JC, Parfrey PS, Levy D. Cardiovascular disease and mortality in a community-based cohort with mild renal insufficiency. *Kidney Int* 1999; 56: 2214-2219.
13. Wanner C, Krane V, Marz W *et al.* German Diabetes and Dialysis Study Investigators: Atorvastatin in patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis. *N Engl J Med.* 2005; 353: 238–48.
14. Blacher J, Guerin AP, Pannier B, *et al.* Impact of aortic stiffness on survival in end-stage renal disease. *Circulation* 1999;99:2434-2439.
15. Kerr PG, Guerin AP Arterial calcification and stiffness in chronic kidney disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34: 683-687.
16. Safar ME Peripheral pulse pressure, large arteries, and microvessels. *Hypertension* 2004; 44: 121-122.
17. Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, et al. European Network for Non-invasive Investigation of Large Arteries. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J* 2006;27:2588–605.
18. Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Stefanidis C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness. *JACC* 2010; 55: 1318-1327.
19. Boutouyrie P, Tropeano AI, Asmar R et al. Aortic stiffness is an independent predictor of primary coronary events in hypertensive patients: a longitudinal study. *Hypertension* 2002; 39: 10–15.
20. Laurent S, Boutouyrie P, Asmar R et al. Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients. *Hypertension* 2001; 37: 1236–1241.
21. Blacher J, Safar ME, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, London GM. Aortic pulse wave velocity index and mortality in end-stage renal disease. *Kidney Int* 2003;63:1852– 60..

22. Pannier B, Guerin AP, Marchais SJ, Safar ME, London GM: Stiffness of capacitive and conduit arteries: Prognostic significance for end-stage renal disease patients. *Hypertension* 2005; 45: 592–596
23. Shoji T, Emoto M, Shinohara K, et al: Diabetes mellitus, aortic stiffness, and cardiovascular mortality in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:2117-2124.
24. Cruickshank K, Riste L, Anderson SG et al. Aortic pulse-wave velocity and its relationship to mortality in diabetes and glucose intolerance: an integrated index of vascular function? *Circulation* 2002; 106: 2085–2090.
25. Mitchell GF, Hwang SJ, Vasan RS, et al. Arterial stiffness and cardiovascular events. The Framingham Heart Study. *Circulation* 2010;121:505–511.
26. 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
27. Guerin A, Pannier B, Metivier F et al: Assessment and significance of arterial stiffness in patients with chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008; 17:635-641
28. Covic A, Gusbeth-Tatomir P, Goldsmith D. Arterial stiffness in renal patients: an update. *Am J Kidney Dis* 2005; 45: 965-977.
29. Baulmann J, Schillings U, Rickert S, Uen S, Dusing R, Illyes M, et al. A new oscillometric method for assessment of arterial stiffness: comparison with tonometric and piezo-electronic methods. *J Hypertens* 2008; 26:523–528.
30. Rajzer M, Klocek M, Wojciechowska W, IPalka I, Brzozowska-Kiszka M, Kawecka-Jaszcz K. Comparison of Complior, SphygmoCor and Arteriograph for assessment of aortic pulse wave velocity in patients with arterial hypertension. *J Hypertens* 2008; 26:2001–2007.

31. Jatoi NA, Mahmud A, Bennett K et al: Assessment of arterial stiffness in hypertension: comparison of oscillometric (Arteriograph), piezoelectronic (Complior) and tonometric (Shygmocor) techniques. *J Hypertens* 2009, 27: 2186-2191
32. Horvath IH, Nemeth A, Lenkey Z. Invasive validation of a new oscillometric device (Arteriograph) for measuring augmentation index, central blood pressure and aortic pulse wave velocity. *J Hypertens* 2010, 28:2068-2075
33. Vlachopoulos C, Aznaouridis K, O'Rourke MF, et al. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with central haemodynamics: a systematic review and meta-analysis. *Eur Heart J* 2010; 31:1865-1871
34. Dart AM, Gatzka CD, Kingwell BA, et al. Brachial blood pressure but not carotid arterial waveforms predict cardiovascular events in elderly female hypertensives. *Hypertension* 2006; 47: 785–790.
35. The Reference Values for Arterial Stiffness' Collaboration. Determinants of pulse wave velocity in healthy people and in the presence of cardiovascular risk factors: 'establishing normal and reference values' *Eur Heart J* 2010; 31: 2338-2350
36. Konings CJ, Hermans M, Kooman JP, et al: Arterial stiffness and renal replacement therapy. *Perit Dial Int* 2004; 24:318-322,
37. London GM, Marchais SJ, Guerin AP, et al: Arterial structure and function in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17:1713-1724.
38. London GM, Blacher J, Pannier B, et al. Arterial wave reflections and survival in end-stage renal failure. *Hypertension* 2001;38:434-38
39. Liao D, Arnett DK, Tyroler HA, et al. Arterial stiffness and the development of hypertension. The ARIC study. *Hypertension* 1999;34:201-206
40. Brooks B, Molyneaux L, Yue DK. Augmentation of central arterial pressure in Type 1 diabetes. *Diabetes Care* 1999;22:1722-1727.



41. Wilkinson IB, MacCallum H, Rooijmans DF, *et al.* Increased augmentation index and systolic stress in Type 1 diabetes mellitus. *QJMed* 2000;93:441-8.
42. Shram MT, Henry R, van Dijk R, *et al.* Increased arterial stiffness is impaired in glucose metabolism and Type 2 diabetes. The HOORN study. *Hypertension* 2003;43:176-181.
43. McLeod A, Uren AL, Wilkinson AB, *et al.* Non-invasive measures of pulse wave velocity correlate with coronary arterial plaque load in humans. *J Hypertens* 2004;22:363-368.
44. Wilkinson IB, Prasad K, Hall IR, *et al.* Increased central pulse pressure and augmentation index in subjects with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:1005-1011
45. Mourad JJ, Pannier B, Blacher J, *et al* Creatinine clearance, pulse wave velocity, carotid compliance and essential hypertension. *Kidney Int* 2001; 59: 1834 –1841
46. Wang MC, Tsai WC, Chen JY, Huang JJ. Stepwise increase in arterial stiffness corresponding with the stages of chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2005; 45: 494 –501
47. Gosse P, Safar ME. Arterial stiffness and plasma creatinine in untreated hypertensive patients. *Am J Hypertens*. 2005;18:1140 –1145
48. Lacy P, Carr SJ, O'Brien D, *et al.* Reduced glomerular filtration rate in pre-dialysis non-diabetic chronic kidney disease patients is associated with impaired baroreceptor sensitivity and reduced vascular compliance. *Clin Sci (Lond)* 2006; 110: 101–108
49. Ohya Y, Iseki K, Iseki C, *et al.* Increased pulse wave velocity is associated with low creatinine clearance and proteinuria in a screened cohort. *Am J Kidney Dis* 2006; 47: 790 –797
50. Briet M, Bozec E, Laurent S, *et al.* Arterial stiffness and enlargement in mild-to-moderate chronic kidney disease. *Kidney Int* 2006; 69: 350 –357
51. Ilyas B, Dhaun N, Markie D, Stansell P, Goddard J, Newby DE, *et al.* Renal function is associated with arterial stiffness and predicts outcome in patients with coronary artery disease. *QJM* 2009; 102: 183 – 191

52. Hermans M, Henry R, Dekker JM et al. Estimated glomerular filtration rate and urinary albumin excretion are independently associated with greater arterial stiffness: the Hoorn Study. *J Am Soc Nephrol* 2007;18: 1942–1952.
53. Choi SW, Kim HY, Lee YH et al. eGFR is associated with subclinical atherosclerosis independent of albuminuria: The Dong-gu Study. *Atherosclerosis* 2010; 212: 661–667.
54. Mulè G, Cottone S, Cusimano P et al. Inverse relationship between ambulatory arterial stiffness index and glomerular filtration rate in arterial hypertension. *Am J Hypertens* 2008; 21: 35-40
55. Schillaci G, Pirro M, Mannarino MR, et al. Relation between renal function within the normal range and central and peripheral arterial stiffness in hypertension. *Hypertension* 2006;48:616-621
56. Mulè G, Cottone S, Cusimano P, et al Unfavourable interaction of microalbuminuria and mildly reduced creatinine clearance on aortic stiffness in essential hypertension. *Int J Cardiol* 2010; 145: 372-375.
57. Upadhyay A, Hwang SJ, Mitchell GF, et al Arterial stiffness in mild-to-moderate CKD. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 2044–2053
58. Mulè G, Cottone S, Vadalà A et al. Relationship between albumin excretion rate and aortic stiffness in untreated essential hypertensive patients. *J Intern Med* 2004; 256: 22-29.
59. Yokoyama H, Aoki T, Imahori M, Kuramitsu M. Subclinical atherosclerosis is increased in type 2 diabetic patients with microalbuminuria evaluated by intima-media thickness and pulse wave velocity. *Kidney Int* 2004 ; 66: 448-454.
60. Ishimura E, Taniwaki H, Tsuchida T, et al Urinary albumin excretion associated with arterial wall stiffness rather than thickness in type 2 diabetic patients. *J Nephrol* 2007; 20: 204-211.
61. Munakata M, Miura Y, Yoshinaga K; J-TOPP study group. Higher brachial-ankle pulse wave velocity as an independent risk factor for future microalbuminuria in patients with essential hypertension: the J-TOPP study. *J Hypertens* 2009; **27**: 1466-1471.
62. Ishikawa T, Hashimoto J, Morito RH, et al Association of microalbuminuria with brachial-ankle pulse wave velocity: the Ohasama study. *Am J Hypertens* 2008 ; 21: 413-418

63. Mulè G, Cottone S, Cusimano P, et al. The association of microalbuminuria with aortic stiffness is independent of C-reactive protein in essential hypertension. *Am J Hypertens* 2009; 22: 1041-1047
64. Smith A, Karalliedde J, De Angelis L, Goldsmith D, Viberti G. Aortic pulse wave velocity and albuminuria in patients with type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 1069-1075.
65. Ford ML, Tomlinson LA, Chapman TP, et al. Aortic stiffness is independently associated with rate of renal function decline in chronic kidney disease stages 3 and 4. *Hypertension* 2010; 55: 1110-1115
66. Chue CD, Edwards NC, Davis LJ, et al. Serum phosphate but not pulse wave velocity predicts decline in renal function in patients with early chronic kidney disease *Nephrol Dial Transplant*, January 19, 2011
67. Blacher J, Demuth K, Guerin A, et al. Influence of Biochemical Alterations on Arterial Stiffness in Patients With End-stage Renal Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:535-541.
68. Bakiler AR, Yavascan O, Harputuoglu N, et al. Evaluation of aortic stiffness in children with chronic renal failure. *Pediatr Nephrol* 2007; 22:1911–1919.
69. Levey AS, Greene T, Kusek J, et al. A simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 155A
70. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976; 16: 31-41.
71. Townsend RR, Wimmer NJ, Chirinos JA, et al. Aortic PWV in chronic kidney disease: a CRIC ancillary study. *Am J Hypertens* 2010; 23:282-289
72. Tomiyama H, Tanaka H, Hashimoto H, et al Arterial stiffness and declines in individuals with normal renal function/early chronic kidney disease. *Atherosclerosis* 2010; 212: 345-350.
73. Cottone S, Mulè G, Nardi E, et al Relation of C-reactive protein to oxidative stress and to endothelial activation in essential hypertension. *Am J Hypertens* 2006; 19:313–318
74. Cottone S, Mule' G, Nardi E et al. C-reactive protein and Icam-1 are stronger predictors of oxidant stress than blood pressure in established hypertension. *J Hypertens* 2007; 25: 423-428

75. Cottone S, Mulè G, Guarneri M, et al. Endothelin-1 and F2-isoprostane relate to and predict renal dysfunction in hypertensive patients. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 497-203
76. Patrono C, FitzGerald GA. Isoprostanes: potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:2309–2315.
77. Morrow JD. Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:279–286.
78. Kals J, Kampus P, Kals M, et al Inflammation and oxidative stress are associated differently with endothelial function and arterial stiffness in healthy subjects and in patients with atherosclerosis. *Scand J Clin Lab Invest* 2008; 9:1-8.
79. K. Noma *et al.*, Roles of rho-associated kinase and oxidative stress in the pathogenesis of aortic stiffness, *J Am Col. Cardiol* 2007; 49: 698–705
80. Wilkinson IB, Franklin SS, Cockcroft JR. Nitric oxide and the regulation of large artery stiffness: from physiology to pharmacology. *Hypertension*. 2004; 44: 112–116.
81. Vuurmans TJ, Boer P, Koomans HA. Effects of endothelin-1 and endothelin-1 receptor blockade on cardiac output, aortic pressure, and pulse wave velocity in humans. *Hypertension* 2003;41:1253-1258.
82. Dhaun N, Macintyre IM, Melville V, et al. Blood pressure-independent reduction in proteinuria and arterial stiffness after acute endothelin-a receptor antagonism in chronic kidney disease. *Hypertension* 2009; 54: 113-119
83. Fink GD, Watts SW, Northcott CA, et al Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelin(A)-NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension. *Circulation* 2003; 107: 1053–1058
84. Pollock DM. Endothelin, Angiotensin, and Oxidative Stress in Hypertension *Hypertension* 2005;45:477-480

