

MINERVA

CARDIOANGIOLOGICA

VOL. 63 · SUPPL. I · No. 6 · DECEMBER 2015



Società Italiana di Angiologia e Patologia Vascolare  
Italian Society for Angiology and Vascular Medicine

GIORNATE NAZIONALI DI ANGIOLOGIA  
2015

XXXVII CONGRESSO NAZIONALE - SIAPAV

Palermo, 26-28 novembre 2015



E D I Z I O N I · M I N E R V A · M E D I C A

## Interrelazioni tra disfunzione endoteliale e stress ossidativo; valutazione della perossidazione lipidica in particolari quadri clinici

C. URSO, E. HOPPS, R. LO PRESTI, G. CAIMI

*Dipartimento Biomedico  
di Medicina Interna e Specialistica  
Università degli Studi di Palermo, Palermo*

Il termine "disfunzione endoteliale" identifica una condizione patologica caratterizzata da ridotta vasodilatazione e da attività procoagulante e pro-infiammatoria, correlata ad una ridotta biodisponibilità di ossido nitrico (NO), ad un eccesso ossidativo e ad un'aumentata azione dell'endotelian 1 (ET-1) <sup>1</sup>.

I ROS (reactive oxygen species) hanno un ruolo nella disfunzione endoteliale in quanto determinano l'inattivazione dell'NO e la produzione di perossinitriti. Questi ultimi alterano la funzione delle cellule endoteliali, aumentano l'effetto proaterogeno delle LDL e riducono la biodisponibilità di NO, inibendone la sintesi, oppure inattivando direttamente l'NO per l'eccesso di anione superossido. L'aumento della concentrazione intracellulare di ROS attiva il fattore nucleare NF-kB, determinando un aumento della trascrizione di geni pro-infiammatori e l'espressione di molecole di adesione <sup>2</sup>.

In condizioni fisiologiche vi è uno stato di equilibrio tra la produzione endogena di radicali liberi e la capacità di neutralizzarli da parte dei sistemi antiossidanti. Quando la produzione di specie reattive eccede la capacità dell'organismo di eliminarle si determina una condizione di "stress ossidativo".

Tutte le specie reattive dell'ossigeno radicaliche (anione superossido-O<sub>2</sub><sup>-</sup>, radicale idrossile-HO·, radicale idroperossile-ROO·, NO, radicali lipidici) e non radicaliche (ossi-

geno singoletto, perossido di idrogeno, perossinitrito-ONOO<sup>-</sup>, acido ipocloroso-HOCl) possiedono attività ossidante. L'eccessiva presenza di radicali liberi, quando non adeguatamente controbilanciata dal sistema antiossidante, induce alterazioni patologiche tra cui: la perossidazione lipidica, l'apoptosi, la proteolisi incontrollata, l'azione mutagenica sul DNA e l'alterata espressione genica, implicati nella patogenesi di neoplasie, diabete mellito, malattia aterosclerotica, danno ischemia/riperfusion, insufficienza renale cronica (IRC) e malattie neurodegenerative ed infiammatorie croniche <sup>3</sup>.

I ROS originano da diverse fonti quali la respirazione mitocondriale, la lipossigenasi, la ciclossigenasi, il citocromo p450, l'eme ossigenasi, la xantina ossidasi, la NO sintasi (NOS) e soprattutto la NADH/NADPH ossidasi che è la maggiore fonte di O<sub>2</sub><sup>-</sup> <sup>4</sup>.

### **Stress ossidativo e i principali fattori di rischio cardiovascolari**

La maggiore produzione di ROS nei soggetti ipertesi è associata ad una sovra rego-



lazione della NADPH ossidasi vascolare<sup>5</sup>. I radicali prodotti aumentano la concentrazione di calcio nelle cellule della muscolatura liscia vascolare e nelle cellule endoteliali attivando l'inositolo trifosfato e inibendo l'attività della Ca<sup>2+</sup>-ATPasi, alterando, quindi, il tono vascolare<sup>6</sup>. Oltre alla maggiore produzione di ROS, nei soggetti ipertesi si osservano una ridotta attività degli enzimi antiossidanti ed una maggiore espressione endoteliale di molecole di adesione, Tissue factor (TF) e Von Willebrand factor (vWF), markers di uno stato pro-infiammatorio e pro-coagulativo che aumenta il rischio di aterosclerosi e trombosi<sup>7</sup>.

Ruolo non secondario è quello dell'iper-glicemia che può indurre stress ossidativo attraverso diversi meccanismi che coinvolgono l'azione diretta del glucosio e l'attivazione di diverse attività enzimatiche, quali la NADPH-ossidasi, la xantina-ossidasi, le lipossigenasi, i citocromi P 450 e la eNOS<sup>8,9</sup>.

Dati sperimentali e clinici dimostrano che elevate concentrazioni plasmatiche di colesterolo totale e LDL si associano ad alterazione della funzione endoteliale indipendentemente dalla coesistenza di altro danno vascolare<sup>10</sup>. I ROS prodotti a livello della placca aterosclerotica possono favorire la progressione e l'instabilità delle lesioni esercitando un'azione chemiotattica sulle cellule infiammatorie, alterando il bilancio proteasi/antiproteasi nella matrice connettivale e stimolando la proliferazione dei fibroblasti e delle cellule muscolari lisce<sup>11</sup>. La ridotta biodisponibilità di NO sarebbe causata da vari meccanismi tra cui il disaccoppiamento della eNOS sembra essere il più importante. Anche i soggetti fumatori presentano una ridotta risposta vasodilatante endotelio-dipendente determinata dalla ridotta disponibilità di NO causata dalla nicotina<sup>12</sup>.

Un'elevata concentrazione plasmatica di omocisteina è considerata fattore di rischio indipendente per la malattia aterosclerotica. In presenza di iperomocisteinemia si osserva un'inibizione dell'attività degli enzimi antiossidanti, come la glutatione perossidasi o l'eme ossigenasi-1, l'attivazione delle NADPH ossidasi con produzione di O<sub>2</sub><sup>-</sup>,

che determina una maggiore ossidazione dell'omocisteina, l'induzione del processo di perossidazione lipidica e l'inibizione del catabolismo di ADMA, inibitore competitivo della NOS<sup>13</sup>.

Lo stress ossidativo e la disfunzione endoteliale che caratterizzano l'ipertensione ed il diabete mellito costituiscono, inoltre, i principali fattori di rischio nella patologia renale. L'uremia di per sé aumenta l'attivazione leucocitaria ed il burst ossidativo. Lo stress ossidativo che ne consegue è implicato nelle complicanze dell'IRC quali l'anemia, l'amiloidosi, l'aterosclerosi e la malnutrizione. L'entità dello stress ossidativo correla con il declino del GFR<sup>14,15</sup>.

I risultati di diversi studi sottolineano il ruolo dell'OSAS (obstructive sleep apnea syndrome) come fattore di rischio indipendente per le malattie cardiovascolari. L'ipossia intermittente che caratterizza l'OSAS, promuove la formazione di ROS similmente a quanto osservato in corso di ischemia / riperfusione<sup>16</sup>. Diverse ricerche hanno evidenziato elevati livelli di ADMA nei soggetti affetti da OSAS che, in associazione all'incremento dei livelli di superossido, riducono la disponibilità di NO inducendo disfunzione endoteliale<sup>17</sup>.

I complessi effetti dei ROS sottolineano l'importanza dell'identificazione di biomarkers di stress ossidativo ed il loro valore predittivo nella valutazione delle patologie cardiovascolari. Sono diversi i prodotti di ossidazione derivati da lipidi, proteine e DNA. Nello specifico, nell'ambito delle malattie cardiovascolari diversi studi hanno valutato il ruolo dei prodotti della perossidazione lipidica, tra i più studiati gli isoprostani (IsoPs) e la malonildialdeide (MDA)<sup>18,19</sup>.

Gli IsoPs sono generati dalla perossidazione dell'acido arachidonico; tra questi, gli F2-IsoPs sono più stabili e di maggiore utilità come biomarkers. Diversi studi hanno mostrato che i livelli plasmatici e urinari di IsoPs correlano *in vivo* con lo stress ossidativo<sup>20,21</sup>. Gli IsoPs risultano elevati in associazione con diversi fattori di rischio cardiovascolare<sup>22</sup>, così come nell'ischemia / riperfusione miocardica e nell'IRC<sup>23,24</sup>. Essi risultano inoltre aumentati a livello delle le-



sioni aterosclerotiche e avrebbero un ruolo nella patogenesi dell'aterosclerosi attraverso gli effetti sulla vasocostrizione, sull'aggregazione piastrinica e sulla proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari<sup>25</sup>. Diversi trials che hanno valutato la terapia con antiossidanti al fine di diminuire la produzione di IsoPs hanno mostrato risultati contrastanti, sebbene sia noto che la loro riduzione correla con la riduzione del rischio cardiovascolare<sup>26</sup>.

La MDA è generata *in vivo* dalla perossidazione degli acidi grassi polinsaturi; essa reagisce con le proteine e risulta di per sé aterogena. MDA è quantificata attraverso la reazione con l'acido barbiturico e la misurazione dei livelli di thiobaburic acid-reactive substances (TBARS); questi ultimi sono considerati indicatori di stress ossidativo in diversi modelli di patologia umana: I TBARS correlano con i livelli di ICAM-1 ed essi avrebbero un valore prognostico indipendente dagli altri markers di flogosi (IL-6, PCR). Gli elevati livelli di TBARS sembrerebbero predire gli eventi cardiovascolari maggiori e la progressione dell'aterosclerosi carotidea.

Anche in corso di OSAS si riscontrano diversi markers di stress ossidativo derivati dalla perossidazione lipidica, dalla carbonizzazione proteica e dall'ossidazione del DNA. In differenti studi i livelli di TBARS risultano significativamente più elevati nei soggetti affetti da OSAS severa rispetto ai controlli.

Tenuto conto di tale premessa, abbiamo valutato, nel tempo, i valori della perossidazione lipidica in diversi gruppi.

### Soggetti e risultati

Sono stati presi in considerazione i seguenti gruppi di soggetti.

Il primo includeva 25 soggetti (19 uomini e 6 donne, età media  $44,4 \pm 7,7$  anni) affetti da ipertensione arteriosa essenziale lieve-moderata non trattata. In questo gruppo, in cui la durata media dell'ipertensione era di  $19,3 \pm 32,8$  mesi, la pressione diurna sistolica e diastolica era di  $133,80 \pm 8,12$  e di

$86,05 \pm 6,79$  mmHg, la pressione notturna sistolica e diastolica era di  $120,40 \pm 10,86$  e di  $75,00 \pm 7,65$  mmHg, mentre la pressione sistolica e diastolica delle 24 ore risultava essere di  $128,00 \pm 8,50$  e di  $81,73 \pm 6,36$  mmHg. Questi ipertesi sono stati paragonati ad un gruppo controllo di 27 soggetti (20 uomini e 7 donne, età media  $41,30 \pm 6,2$  anni). Negli ipertesi la perossidazione lipidica, valutata come thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) analogamente ai restanti gruppi considerati, era marcatamente aumentata rispetto al gruppo controllo ( $N=5,75 \pm 1,21$  nmol/ml *vs.*  $EH=12,00 \pm 1,69$  nmol/ml,  $p < 0,001$ ). I valori di TBARS non risultavano correlati né ai valori tensivi sistolici e diastolici, né ai parametri metabolici, né ai parametri antropometrici.

Il secondo includeva 55 soggetti (50 uomini e 5 donne, età media  $41,2 \pm 4,9$  anni) con pregresso infarto acuto del miocardio. Relativamente ai principali fattori di rischio cardiovascolare, al momento dell'evento acuto 17 presentavano da 0 a 1 fattore di rischio, 15 presentavano 2 fattori di rischio e 23 più di 2. 47 di questi soggetti erano stati sottoposti in fase iniziale ad indagine coronarografica che aveva evidenziato coronarie indenni in 8, il coinvolgimento di un solo vaso in 24 ed il coinvolgimento di 2 o 3 vasi in 15. Questo gruppo è stato messo a confronto con un gruppo controllo di 51 soggetti (39 uomini e 12 donne, età media  $36,2 \pm 7,8$  anni). Nel gruppo di ex-infartuati la perossidazione lipidica risultava aumentata ( $N=5,59 \pm 1,27$  nmol/ml *vs.*  $Ex-infartuati=7,75 \pm 1,87$  nmol/ml,  $p < 0,001$ ).

Il terzo includeva 41 soggetti (25 uomini e 16 donne, età media  $64,7 \pm 11,1$  anni) affetti da IRC in trattamento conservativo. Le cause dell'IRC erano la pielonefrite cronica in 9, la nefroangiosclerosi in 6, la pielonefrite cronica associata a nefroangiosclerosi in 8, la glomerulonefrite cronica in 5, la nefropatia diabetica in 8 ed il rene policistico in 5. In questo gruppo la creatinina sierica era di  $3,05 \pm 1,79$  e la clearance della creatinina endogena di  $28,56 \pm 17,13$  ml/min, la conta leucocitaria di  $7498 \pm 2844$  ed il livello di emoglobina di  $12,2 \pm 2,1$  g/dl. I soggetti con IRC sono stati inoltre suddivisi in relazione all'età; 22 soggetti infatti avevano meno



di 65 anni e 19 soggetti più di 65 anni. I soggetti con IRC sono stati paragonati con un gruppo controllo di 51 soggetti (39 uomini e 12 donne, range di età 24-60 anni). Nei soggetti con IRC la perossidazione lipidica risultava marcatamente incrementata ( $N=5,59\pm 1,27$  nmol/l *vs.* IRC= $10,61\pm 1,95$  nmol/l,  $p<0,001$ ) e non influenzata dall'età dei soggetti. I valori della perossidazione lipidica inoltre non risultavano correlati alla creatinina ed alla sua clearance, alla conta leucocitaria ed ai livelli di emoglobina.

Il quarto gruppo includeva 106 soggetti (61 uomini e 45 donne, età media  $53,5\pm 8,9$  anni) con sindrome metabolica (MS), successivamente suddivisi in relazione alla presenza o meno del diabete ed in base al rapporto TG/HDL (indice indiretto di insulino-resistenza). Nell'intero gruppo il valore medio di circonferenza dell'addome era di  $106,7\pm 11,2$  cm, il BMI di  $32,21\pm 4,53$ , i valori tensivi arteriosi di  $132,1\pm 16,3/81,2\pm 9,9$  mmHg, la glicemia di  $114,3\pm 44,3$  mg/dl, la colesterolemia di  $213,9\pm 53,0$  mg/dl, il colesterolo-HDL di  $40,0\pm 10,8$  mg/dl, il colesterolo-LDL di  $133,2\pm 46,5$  mg/dl ed i trigliceridi di  $220,2\pm 147,8$  mg/dl. Il gruppo controllo includeva 41 soggetti (27 uomini e 14 donne con età media di  $41,6\pm 7,9$  anni). Nei soggetti con MS la perossidazione lipidica risultava aumentata ( $N=5,902\pm 1,211$  nmol/l *vs.* MS= $8,983\pm 0,722$  nmol/l,  $p<0,001$ ) e non influenzata né dalla presenza del diabete né dal grado di insulino resistenza, anche se nell'intero gruppo era presente una correlazione positiva tra TBARS e TG/HDL ( $r=0,250$ ,  $p<0,01$ ).

Il quinto gruppo includeva 48 soggetti (36 uomini e 12 donne, età media  $49,7\pm 14,6$  anni) affetti da OSAS. Nell'intero gruppo il valore medio della circonferenza addome era di  $118,8\pm 16,1$  cm, il BMI di  $35,37\pm 7,31$ , la circonferenza collo di  $44,41\pm 4,53$  cm, l'indice apnea/ipopnea (AHI) di  $38,47\pm 25,66$ , la saturazione media di ossigeno ( $mSO_2$ )  $91,1\pm 3,68\%$  e l'indice di desaturazione di ossigeno (ODI)  $39,34\pm 29,03$ . L'intero gruppo è stato poi suddiviso in relazione ai valori di AHI in due sottogruppi: 21 soggetti con AHI $<30$  e 27 soggetti con AHI $>30$ . Il gruppo con OSAS è stato paragonato ad un gruppo controllo di 59 soggetti (43 uomini

e 16 donne, età media  $36,24\pm 8,25$  anni). Nell'intero gruppo di OSAS la perossidazione lipidica risultava lievemente aumentata ( $N=5,71\pm 1,42$  nmol/l *vs.* OSAS= $6,43\pm 1,63$  nmol/l,  $p<0,05$ ); suddividendo i soggetti in base all'AHI, invece, nel gruppo con AHI $<30$  la perossidazione lipidica risultava sovrapponibile al gruppo controllo, mentre nel gruppo con AHI $>30$  i suoi valori risultavano incrementati rispetto al gruppo controllo. Nei soggetti con OSAS la perossidazione lipidica correlava con i valori di AHI ed ODI e con la  $mSO_2$ .

L'ultimo gruppo includeva invece 42 soggetti (21 uomini e 21 donne, età media  $66,83\pm 14,8$  anni) affetti da IRC in trattamento dialitico cronico. Le cause dell'IRC erano la nefroangiosclerosi in 12, la glomerulonefrite cronica in 4, la nefropatia diabetica in 10, il rene policistico in 4, mentre la causa dell'IRC è rimasta non accertata in 12. La durata della dialisi era di  $55,3\pm 43,5$  mesi. Questo gruppo è stato paragonato con un gruppo controllo di 51 soggetti (39 uomini e 12 donne, età media  $36,2\pm 7,8$  anni). Nei dializzati si è riscontrato l'aumento della perossidazione lipidica ( $N=5,59\pm 1,27$  nmol/l *vs.* D= $8,67\pm 1,43$  nmol/l,  $p<0,001$ ). Negli stessi 42 soggetti la valutazione della perossidazione lipidica è stata eseguita prima e dopo seduta dialitica (Pre= $8,67\pm 1,43$  nmol/l *vs.* Post= $9,27\pm 1,81$  nmol/l).

## Conclusioni

Questi dati, pur relativi a differenti casistiche, tendono ad avvalorare il fatto che allorché si ha a che fare con patologie croniche non solo di stretta pertinenza cardiovascolare, ma anche nelle quali è tuttavia elevato il coinvolgimento cardiovascolare, la perossidazione lipidica, indicatore maggiore dello stress ossidativo, si discosta in misura netta dai valori normali.

## Bibliografia

1. Haynes WG, Webb DJ. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. *J Hypertens* 1998; 16: 1081-1098.



2. Urso C, Caimi G. Stress ossidativo e disfunzione endoteliale. *Minerva Med* 2011; 102:59-77
3. Wulf Droge: Free radical in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.
4. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87(10): 840-4.
5. Zalba G, San Jose G, Moreno MU, Fortuno A, Diez J. NADPH oxidase-mediated oxidative stress: genetic studies of the p22 (phox) gene in hypertension. *Antioxid Redox Signal*. 2005;1327-1336.
6. Lounsbury KM, Hu Q, Ziegelstein RC. Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature. *Free radical biology and medicine*, 28: 1362-1369.
7. Ferroni P, S Basili, V paoletti, G Davì. Endothelial dysfunction and oxidative stress in arterial hypertension. *Nutrition, metabolism e cardiovascular disease* 2006; 16: 222-33.
8. Yamagishi S. Advanced glycation end products and receptor-oxidative stress system in diabetic vascular complications. *Ther Apher Dial*. 2009;13(6):534-9.
9. Stevens MJ. Oxidative-nitrosative stress as a contributing factor to cardiovascular disease in subjects with diabetes. *Curr Vasc Pharmacol*. 2005; 3:253-66
10. Steinberg HO, Bayazeed B, Hook G. Endothelial dysfunction is associated with cholesterol levels in the high normal range in humans. *Circulation* 1997; 96: 3287-3293
11. Stocker R, Keane JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004; 84:1381-478.
12. Jacobs MC, Lenders JW, Kapma JA. Effects of chronic smoking on endothelium-dependent vascular relaxation in humans. *Clin Sci* 1993; 85:51-55.
13. Weiss N. Mechanisms of increased vascular oxidant stress in hyperhomocysteinemia and its impact on endothelial function. *Curr Drug Metab* 2005;6:27-36.
14. Morena M, Delbosc S, Dupuy AM, Canaud B, Cristol JP. Overproduction of reactive oxygen species in end-stage renal disease patients: a potential component of hemodialysis-associated inflammation. *Hemodial Int*. 2005;9(1):37-46.
15. Salonen JT, Nyyssonen K, Salonen N. Antioxidant supplementation in atherosclerosis prevention study: a randomised trial of the effects of vitamins E and C on 3 years progression of carotid atherosclerosis. *J Intern Med* 2000; 248:377-386
16. Crack P, Taylor JM, Flentjar NJ, de Haan J, Hertzog P, Iannello RC *et al*. Increased infarct size and exacerbated apoptosis in the glutathione peroxidase-1 (Gpx-1) knockout mouse brain in response to ischemia/reperfusion injury. *J Neurochem*. 2001; 78: 1389-1399.
17. Badran M, Golbidi S, Ayas N. Nitric Oxide Bioavailability in Obstructive Sleep Apnea: Interplay of Asymmetric Dimethylarginine and Free Radicals. *Sleep Disorders*; 2015, Article ID 387801
18. Lee R Margaritis M, Channon KM *et al*. Evaluating Oxidative Stress in Human Cardiovascular Disease: Methodological Aspects and Considerations *Current Medicinal Chemistry*, 2012; 19: 2504-2520.
19. Ho E, Galougahi K K, Liu C *et al*. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice *RedoxBiology* 2013;483-491.
20. Griffiths HR, Moller L, Bartosz G *et al*. Biomarkers, Molecular Aspects of Medicine. 2002; 23:101-208.
21. Fam SS, Morrow JD. The isoprostanes: unique products of arachidonic acid oxidation *Current Medicinal Chemistry* 2003;10:1723-1740.
22. Morrow JD. Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* . 2005;5:279-286.
23. Delanty N, Reilly MP, Pratico D *et al*. 8-epiPGF2alpha generation during coronary reperfusion. A potential quantitative marker of oxidant stress *in vivo*. *Circulation* 1997;95:2492-2499.
24. Moore KP, Holt SG, Patel RP *et al*. A causative role for redox cycling of myoglobin and its inhibition by alkalization in the pathogenesis and treatment of rhabdomyolysis-induced renal failure. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273:1731-31737.
25. Gniwotta C, Morrow J.D., Roberts LJ *et al*. Prostaglandin F2-like compounds, F2-isoprostanes, a represent in increased amounts in human atherosclerotic lesions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1997;17:3236-3241.
26. Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress, *FASEB Journal* 2004;18:1791-1800.