



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

---

## **XXXI ciclo di Dottorato di Ricerca in Medicina Clinica e Scienze del Comportamento**

Coordinatore: *Prof. Antonio Pinto*

### STUDIO DEI PARAMETRI DELLO STRESS OSSIDATIVO, DELLE METALLOPROTEASI E DELLE DETERMINANTI EMOREOLOGICHE NELL'ATEROSCLEROSI CAROTIDEA PRECLINICA

Tesi di Dottorato della

Dott.ssa *CATERINA URSO*

MED/09- Medicina Interna

Il Coordinatore

Ch.mo Prof. *ANTONIO PINTO*

Il Tutor

Prof. *BALDASSARE CANINO*

I Co-Tutors

Prof.ssa *ROSALIA LO PRESTI*

Prof. *GREGORIO CAIMI*

## *Ringraziamenti*

*Raggiunta questa ulteriore tappa di un percorso formativo iniziato diversi anni orsono, sento il dovere di ringraziare tutti coloro che hanno contribuito alla mia crescita professionale e umana.*

*Ringrazio in primo luogo il mio Maestro, Professor Gregorio Caimi, per aver saputo sapientemente coltivare la mia curiosità e passione, elementi essenziali nella realizzazione di ogni progetto.*

*Un sentito ringraziamento al Professor Corrado Amato per il prezioso tempo dedicatomi, per l'entusiasmo e la pazienza con cui mi ha affiancato nella valutazione ecocolordoppler dei soggetti studiati.*

*Grazie alla Dottoressa Maria Montana che con appassionata professionalità ha curato la valutazione degli esami di laboratorio.*

*Un grazie al mio tutor, Prof Baldassare Canino, e alla Professoressa Rosalia Lo Presti per la dedizione, il sostegno e il prezioso contributo all'analisi statistica.*

*Un doveroso e mai bastevole grazie alla mia famiglia per essere rimasta costantemente al mio fianco e per avermi supportato in ogni mia scelta.*

*Infine un grazie speciale a tutti i pazienti, fonte inesauribile di conoscenza e veri Maestri di vita.*

*Caterina Urso*

## **INDICE**

INTRODUZIONE .....	4
1. Stress ossidativo e aterosclerosi .....	6
2. Metalloproteasi ed aterosclerosi .....	10
3. La viscosità ematica e le principali determinanti emoreologiche .....	12
4. Determinanti emoreologiche ed aterosclerosi .....	15
5. Leucociti e rischio cardiovascolare .....	19
SCOPO DELLA RICERCA .....	21
SOGGETTI E METODI.....	21
ANALISI STATISTICA.....	22
RISULTATI .....	23
TABELLE.....	28
CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE.....	39
BIBLIOGRAFIA .....	47

## INTRODUZIONE

Le malattie cardiovascolari riconoscono come causa principale l'aterosclerosi, la cui storia naturale si caratterizza per una protratta fase asintomatica che precede di decenni la comparsa delle manifestazioni cliniche che ne costituiscono l'epifenomeno. I primi segni e sintomi si manifestano, infatti, quando il processo aterosclerotico risulta in grado di alterare il profilo emodinamico sistemico e/o distrettuale.

Le tappe iniziali di tale processo identificano una condizione nota come “*aterosclerosi preclinica*” ovvero una fase in cui la flogosi di parete, pur alterando l'anatomia del vaso non ne compromette la funzionalità, rimanendo quindi clinicamente silente.

Le strategie di prevenzione primaria devono quindi intervenire sulla fase iniziale della malattia, quando il danno risulta ancora suscettibile di correzione.

L'aterosclerosi preclinica può essere indagata mediante approcci differenti quali:

- lo studio ultrasonografico con ecocolorDoppler delle arterie carotidi che permette l'identificazione di alterazioni specifiche di parete quali l'aumento dello spessore medio-intimale (IMT) o la presenza di placca asintomatica carotidea (PCA),
- la misurazione dell'indice di pressione caviglia-braccio (Ankle-Brakial pressure Index – ABI),
- la valutazione non invasiva della funzione endoteliale, intesa come risposta di vasodilatazione ad una condizione di iperafflusso post-ischemico (flow-mediated dilatation, FMD),
- il calcium score coronarico (CSC) e la valutazione del circolo coronarico con tomografia computerizzata multidetettore (Novo, 2008).

L'identificazione dell'aterosclerosi preclinica costituisce un marker precoce di danno vascolare ed esprime la suscettibilità a sviluppare la malattia aterosclerotica, a prescindere dalla presenza di uno o più fattori di rischio. L'ispessimento medio-intimale (IMT) carotideo, la presenza di placca carotidea asintomatica (IMT >1,5 mm) o la ridotta perfusione periferica in un paziente con un cluster di fattori di rischio, conferisce un rischio cardiovascolare maggiore di quello calcolabile dall'analisi dei soli fattori (Lee et al, 2006).

La possibilità di utilizzare metodiche diagnostiche non invasive e ripetibili ha permesso di elaborare una definizione più accurata dell'estensione della malattia già in una fase precoce del processo aterosclerotico.

Studi recenti mostrano che l'aterosclerosi preclinica ha una elevata prevalenza nella popolazione di età media; nei soggetti di sesso maschile, il territorio ilio-femorale è quello maggiormente coinvolto negli stadi precoci. Molti soggetti classificati come ad elevato rischio dalle tradizionali scale di valutazione presentano aterosclerosi preclinica, evidenziata anche in quasi il 60 % della popolazione classificata come a basso rischio (Fernandez Ortiz et al, 2013; Fernandez et al, 2015). È dimostrato come una condizione di aterosclerosi carotidea si associ a malattia aterosclerotica pluridistrettuale, asintomatica e non, all'estensione e alla severità di quella coronarica e periferica (Graner et al, 2006; Alan et al, 2003). Soggetti con evidenza obiettiva di aterosclerosi preclinica hanno un rischio di eventi cardiovascolari a breve e lungo termine maggiore rispetto ai controlli di uguale età, sesso e razza e lo stesso rischio è superiore a quello determinato dall'analisi simultanea dei fattori di rischio presenti.

Le prime fasi della malattia diventano quindi target fondamentale per una diagnosi precoce e per il raggiungimento di soddisfacenti risultati in ambito prognostico (Leary et al, 1999; Lorenz et al, 2007). Tutti i fattori di rischio sono relati alla presenza di disfunzione endoteliale e di stress ossidativo che riduce la disponibilità di NO. L'endotelio disfunzionante favorisce la patogenesi dell'aterosclerosi e degli eventi atero-trombotici e costituisce un fattore predittivo indipendente di eventi cardiovascolari (Cai et al, 2000); parallelamente le alterazioni emoreologiche possono svolgere un ruolo nella patogenesi e progressione di malattia, assumendo inoltre valore prognostico (Ernst et al, 1993). Negli ultimi anni è stato sottolineato il ruolo dei neutrofili nella progressione dell'aterosclerosi e nella destabilizzazione di placca; la conta dei neutrofili e il rapporto neutrofili/linfociti (N/L ratio) infatti sono considerati indicatori emergenti della presenza e della severità della coronaropatia (Soehnlein et al, 2012; Arbel et al, 2012; Kalay et al, 2012; Nilsson et al, 2014; Yu et al, 2015; Wang et al, 2017). L'analisi dei parametri dello stress ossidativo, dei biomarkers

immuno/infiammatori e delle determinanti emoreologiche risulta quindi utile nella valutazione della patogenesi e progressione della malattia aterosclerotica.

## **1. Stress ossidativo e aterosclerosi**

La presenza di aterosclerosi carotidea è un sicuro rischio per eventi cerebrovascolari; sono riportati tassi di ictus ischemico annuali compresi tra 0,35% e 1,3% in soggetti asintomatici con stenosi carotidea moderata (Den Hartog et al, 2013) e dallo 0,5% a circa il 5% per un grado maggiore di stenosi asintomatica (Inzitari D et al, 2000).

La valutazione della progressione dell'aterosclerosi e la caratterizzazione del ruolo dell'instabilità di placca nella patogenesi della sindrome ischemica acuta sono stati di certo i principali obiettivi della ricerca negli ultimi decenni; tuttavia, i meccanismi alla base della instabilità di placca rimangono in parte oscuri.

La presenza di un aumentato stress ossidativo, la disfunzione endoteliale e l'attivazione della cascata pro-coagulativa sono da ritenersi componenti della risposta infiammatoria dell'aterosclerosi. L'eccessiva presenza di radicali liberi, quando non adeguatamente controbilanciata dal sistema antiossidante, induce alterazioni patologiche tra cui: la perossidazione lipidica, l'apoptosi, l'ossidazione proteica, l'azione mutagenica sul DNA e l'alterata espressione genica, implicati nella patogenesi della malattia aterosclerotica, ma anche del danno da ischemia/riperfusion e delle malattie infiammatorie croniche (Wulf et al, 2002).

Oltre alla malattia diabetica, diverse altre condizioni possono contribuire all'attivazione endoteliale o allo sviluppo di danno/disfunzione predisponenti l'aterosclerosi, tali condizioni includono livelli elevati di LDL ossidate (ox-LDL), stress ossidativo indotto dal fumo, ipertensione e iperomocisteinemia. È stato osservato che elevate concentrazioni plasmatiche di colesterolo totale e LDL si associano ad alterazione della funzione endoteliale indipendentemente dalla coesistenza di altro danno vascolare (Steinberg et al, 1997). L'accumulo delle ox-LDL nello spazio intimale costituisce un segnale di attivazione per numerosi tipi cellulari

capaci di azione pro-ossidante, in primo luogo i macrofagi. I ROS prodotti a livello della placca aterosclerotica tendono a 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 sia la proliferazione dei fibroblasti che delle cellule muscolari lisce (Stocker et al, 2004). L'aumento della concentrazione intracellulare di ROS attiva il fattore nucleare NF- $\kappa$ B, determinando un aumento della trascrizione di geni pro-infiammatori e l'espressione di molecole di adesione. I ROS determinano inoltre 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. I livelli dei metaboliti dell'NO, nitriti e nitrati (NO<sub>x</sub>) possono essere considerati indicatori dell'attività dell'ossido nitrico sintasi (NOS), la quale viene inibita dall'ADMA (dimetil-arginina asimmetrica) che aumenta in associazione ai principali fattori di rischio cardiovascolare (Urso et al, 2011; Husain et al, 2015).

Oltre all'ossido nitrico sono state descritte altre due molecole-target a livello delle cellule vascolari, l'idrogeno solforato (H<sub>2</sub>S) e il monossido di carbonio (CO); tali molecole potrebbero avere un ruolo protettivo attraverso l'attivazione di pathways antiapoptotici e antiossidanti. L'H<sub>2</sub>S è generato dalla cisteina ad opera della cistationina beta-sintasi (CBS), della cistationina  $\gamma$ -liasi (CSE) e della 3-mercaptopiruvato sulfur-transferasi (3-MST). Ridotti livelli di H<sub>2</sub>S sembrerebbero avere un ruolo nella disfunzione endoteliale e quindi nella patogenesi dell'aterosclerosi (Andreadou et al, 2015). Il CO endogeno è liberato dalla eme-ossigenasi (HO-1 e HO-2) come risultato della degradazione dell'eme e insieme alla biliverdina, rapidamente ridotta a bilirubina avrebbe proprietà antiossidanti; tuttavia gli effetti di CO e H<sub>2</sub>S sulla stabilità della placca aterosclerotica risultano non univoci (Siow et al, 1999).

Risultati recenti hanno mostrato che le placche carotidee definite istologicamente stabili sono caratterizzate da una ridotta espressione di HIF- $\alpha$  (hypoxia-inducible factor) e da una down regulation dei suoi targets NOX-4, HO-1 e iNOS e quindi da ridotti livelli di nitrotirosina (NT). Si nota inoltre una buona biodisponibilità di NO

secondaria alla upregulation della eNOS e una ridotta espressione degli enzimi generanti H<sub>2</sub>S e nello specifico una riduzione di CBS e CSE; questi ultimi sono invece correlati alla instabilità di placca insieme all'incrementata attività di HIF-1, NOX-4, HO-1 e iNOS e agli aumentati livelli di ox-LDL e NT (Sigala et al, 2010; Sigala et al, 2017).

L'aumentata espressione di HO-1 sembrerebbe ridurre la produzione di iNOS/NO, l'infiammazione e l'apoptosi a livello di placca (Li et al, 2011). Tuttavia, una ulteriore ricerca ha osservato una upregulation di HO-1 in placche instabili come possibile risposta antiossidante contro la progressione dell'aterosclerosi (Cheng C et al, 2009). Inoltre la ridotta produzione di NO dalla eNOS determinerebbe una parallela aumentata espressione di HO-1 che bilancia la concomitante upregulation di iNOS (Siow RC et al, 1999). Sigala et al hanno osservato che l'espressione di HO-1 è significativamente aumentata nei soggetti con placche instabili come probabile risposta antiossidante all'aumentata espressione di NOX-4 e agli elevati livelli di NT (Sigala et al, 2017).

L'uso di simvastatina avrebbe sicuri effetti positivi quali il miglioramento della funzione endoteliale, la riduzione dello stress ossidativo e la riduzione della instabilità di placca attraverso la riduzione dell'espressione di CSE e HIF-1  $\alpha$ , la down regulation di HO-1 e iNOS e la upregulation di eNOS (Sigala et al, 2017).

Gli svariati effetti dei ROS sottolineano l'utilità dell'identificazione di markers di stress ossidativo e anche il loro valore predittivo nella valutazione delle patologie cardiovascolari. Sussiste una correlazione tra progressione dell'aterosclerosi carotidea ed elevati livelli dei markers di perossidazione lipidica (Signorelli et al, 2001). Anche la riduzione dello stato antiossidante totale (TAS) sembra essere un biomarker della severità dell'aterosclerosi (Niculescu et al, 2001). Tra i prodotti della perossidazione lipidica, i più studiati sono gli isoprostani (IsoPs) e la malonildialdeide (MDA) (Morrow et al, 2005; Lee et al, 2012; Ho et al, 2013). La MDA, generata *in vivo* dalla perossidazione degli acidi grassi polinsaturi, è quantificata attraverso la reazione con l'acido barbiturico e la misurazione dei livelli di thiobabituric acid-reactive substances (TBARS); questi ultimi sono da ritenere indicatori di stress ossidativo in diversi



modelli di patologia umana. Gli elevati livelli di TBARS sembrerebbero predire gli eventi cardiovascolari maggiori e la progressione dell'aterosclerosi carotidea (Ho et al, 2013). A riguardo, è stato osservato che i livelli di MDA, dei prodotti della carbonilazione proteica e dei nitrati risultano aumentati nei soggetti con ispessimento medio intimale carotideo e con fattori di rischio cardiovascolari; i livelli di tali markers di stress ossidativo sono più elevati anche nei soggetti con coronaropatia (Madisetty et al, 2016). A livello della placca aterosclerotica sono stati evidenziati elevati livelli dei prodotti della perossidazione lipidica e in particolare quelli derivati dall'acido arachidonico quali gli acidi idrossieicosatetraenoici (HETEs) e gli F2-isoprostani; gli HETEs sembrerebbero relati alla instabilità di placca in soggetti con aterosclerosi carotidea (Mallat et al, 1999).

Secondo i risultati di uno studio recente, condotto su soggetti senza manifestazioni cliniche di aterosclerosi, i markers di stress ossidativo e nello specifico i prodotti di ossidazione del DNA (8-oxodG) misurati a livello urinario e dei leucociti circolanti, costituirebbero fattori di rischio indipendenti per la disfunzione vascolare e sarebbero più accurati predittori di rischio rispetto al fumo e al profilo glicemico e lipidico (Majer et al, 2017).

## **2. Metalloproteasi ed aterosclerosi**

Le metalloproteasi (MMP) sono enzimi ad attività proteasica, prodotti in particolar modo dai macrofagi, in grado di degradare costituenti della matrice extracellulare, ma anche molecole di adesione, citochine ed inibitori delle proteasi e di attivare MMPs in forma latente (pro-MMP). Vengono distinte in collagenasi, stromelisine, matrilisine e gelatinasi, in relazione al loro substrato, o membrane type (MT-MMP) se espresse sulla superficie cellulare (Amalinei et al, 2010).

L'espressione dei geni delle MMPs viene stimolata dall'interazione con specifici costituenti della matrice extracellulare, da citochine proinfiammatorie e dallo stress ossidativo (Kar et al, 2010; Klein T et al, 2011; Cimmino et al, 2012). MMP-2 e MMP-9 (gelatinasi) sono coinvolte nella degradazione di collagene di tipo IV, gelatina e laminina ed hanno un ruolo nel rimodellamento vascolare e nel processo aterosclerotico (Amalinei et al, 2007).

Aumentati livelli di gelatinasi si riscontrano in corso di obesità, diabete, ipertensione arteriosa e dislipidemia (Death et al, 2003; Derosa et al, 2009; Papazoglou et al, 2010). L'aumentata attività di MMP-2 e -9 e di TIMP-1 correla con la pulse wave velocity e pertanto con la rigidità di parete arteriosa (Zhou et al, 2007). Nei dislipidemicici è stata accertata una correlazione tra MMP-9 e LDL-colesterolo. Sembra infatti che le LDL ossidate siano in grado di indurre l'espressione di MMP-9, tanto che i livelli plasmatici di MMP-9 nei dislipidemicici potrebbero essere considerati indicatori precoci di aterosclerosi (Zhang et al, 2008).

Uno squilibrio nell'espressione di MMPs e dei loro inibitori (TIMPs) si associa ad un incremento della mortalità cardiovascolare (Onal et al, 2009; Vegagaleti et al, 2010); in particolare il TIMP-1 (che inibisce MMP-9) correla con il rischio di stroke, mentre la MMP-9 è ritenuta un fattore di rischio indipendente per l'infarto del miocardio (Ferroni et al, 2003; Hansson et al, 2011). È descritta un'aumentata espressione di MMP-9 a livello delle lesioni aterosclerotiche, responsabile del processo di rimodellamento caratterizzato da fibrosi, degradazione della matrice ed angiogenesi

con conseguente instabilità e rottura di placca; è stata osservata inoltre una correlazione positiva tra i livelli di tale gelatinasi e la presenza di macrofagi nella placca (Alvarez et al, 2004). MMP-2 sembra invece associarsi al fenotipo di placca stabile. (Newby et al, 2008; Soumyrani et al, 2012). MMP-9 potrebbe quindi avere un ruolo chiave nella ulcerazione della placca cui consegue l'avvio dei sintomi (Loftus et al, 2000). Alcuni studi effettuati in soggetti con sindrome coronarica acuta supportano tale ipotesi e hanno evidenziato un acuto e transitorio incremento dei livelli plasmatici di MMP-9 e -2 (Kai et al, 1998).

Di contro altri hanno osservato elevati livelli di MMP-9 e TIMP-1 in soggetti con aterosclerosi carotidea asintomatica e con morfologia di placca stabile (Baroncini et al, 2011).

Negli ultimi anni è stato appurato che la produzione di ROS è in grado di influenzare l'attivazione di alcune metalloproteinasi. Nello specifico infatti attraverso rilievi immunoistochimici è stato accertato che la produzione di anione superossido, ad opera della NADPH ossidasi, correla con i livelli plasmatici di MMP-9 in soggetti affetti da aterosclerosi preclinica. Elevati livelli di ROS e MMP-9 identificano un gruppo di soggetti con predisposizione alla rottura di placca e conseguenti eventi aterotrombotici. (Ridker et al, 2004; Zalba et al, 2007).

Le metalloproteinasi potrebbero costituire quindi un target farmacologico e un miglioramento del profilo MMP/TIMP potrebbe ridurre sia la morbilità che la mortalità cardiovascolare (Hopps et al, 2015).

### 3. La viscosità ematica e le principali determinanti emoreologiche

L'emoreologia è la disciplina che studia le determinanti reologiche applicate al flusso ematico e le caratteristiche del flusso in relazione alla intensità, alla durata e alla velocità di applicazione di una forza.

Le proprietà del flusso sanguigno dipendono sia dalla componente plasmatica (albumina, globuline, immunoglobuline, fibrinogeno, glicoproteine, lipoproteine) sia da quella cellulare (numero delle cellule circolanti, deformabilità e aggregabilità eritrocitaria, reologia leucocitaria e piastrinica) e sono quindi influenzate dalla viscosità ematica definibile come la resistenza che il tessuto sangue oppone al suo scorrimento.

In un fluido non newtoniano come il sangue, che scorre in vasi con differente diametro ed elasticità per azione di una pressione intermittente e variabile, la *viscosità* è determinata dal rapporto tra *shear stress* (o "sforzo di taglio" o, ancora, "stress tangenziale", inteso come forza applicata parallelamente alla superficie del vaso, misurata in Pascal-Pa) e *shear rate* (o "velocità di taglio" o, anche, "gradiente di velocità", inteso come differenza di velocità tra due strati di liquido separati da una distanza minima e misurato in  $\text{sec}^{-1}$ ).

Un fluido newtoniano, a temperatura costante, si caratterizza per un rapporto stabile fra shear stress e shear rate e pertanto la sua viscosità non subisce variazioni. Il sangue invece è un fluido non newtoniano il cui comportamento cambia nelle varie condizioni di flusso. Alla riduzione dello shear stress non si associa una proporzionale riduzione dello shear rate. Il rapporto shear stress/shear rate tende ad aumentare ai bassi shear rate e solo agli alti shear rate ( $>100 \text{ sec}^{-1}$ ) il sangue assume un comportamento newtoniano e quindi una viscosità costante.

Il sangue è anche caratterizzato da uno *yield stress*, cioè da una forza minima richiesta per mettere in moto la colonna liquida; nei distretti circolatori ove il flusso a volte si arresta, si deve vincere lo yield stress affinché il sangue possa riprendere a scorrere.

Le determinanti emoreologiche comprendono: l'ematocrito, la viscosità plasmatica, la deformabilità e l'aggregabilità eritrocitaria; la viscosità ematica è quindi la risultante di tutte queste determinanti (Baskurt, 2007).

La viscosità ematica si misura in una unità standard chiamata centipoise (cp), calcolata in rapporto alla viscosità dell'acqua, alla quale è teoricamente attribuito il valore di 1cp alla temperatura di 20°C.

La viscosità plasmatica è correlata all'entità del contenuto di acqua e alle componenti macromolecolari; il plasma è infatti una soluzione ad elevato contenuto proteico il cui effetto sulla viscosità dipende dal peso molecolare e soprattutto dalla struttura delle proteine. Il fibrinogeno, nonostante corrisponda solo al 4 % delle proteine plasmatiche, per la sua struttura asimmetrica costituisce uno dei più importanti determinanti della viscosità in quanto influenza in modo significativo sia la viscosità plasmatica che l'aggregazione eritrocitaria (Lee et al,1997).

In condizioni fisiologiche i valori della viscosità plasmatica sono compresi in un range tra 1,4 e 1,8 cp e l'incremento oltre la soglia dei 3 cp configura di certo una sindrome da iperviscosità. Sebbene diversi studi ne abbiano confermato il ruolo nella progressione della coronaropatia e dell'arteriopatia periferica, la valutazione della viscosità plasmatica è stata non sempre utilizzata nella pratica clinica. (Junker et al, 1998; Kesmarky et al, 2008).

La viscosità ematica dipende anche dalle cellule sospese nel plasma e tale dipendenza assume connotazione diversa nei vari distretti dell'albero vascolare. Nei grossi vasi è determinante l'ematocrito, mentre nel microcircolo esso ha un ruolo secondario e assumono un ruolo di rilievo sia la deformabilità cellulare che la viscosità del plasma (Marossy A et al, 2009).

I fattori responsabili della *deformabilità eritrocitaria* sono il rapporto superficie/volume, la fluidità del contenuto intracellulare e la visco-elasticità di membrana.

Gli eritrociti, per effetto del flusso, assumono una forma ellissoidale che si orienta nel senso del moto. La loro viscosità citoplasmatica dipende soprattutto dalle caratteristiche dell'emoglobina e risulta quindi alterata in alcune emoglobinopatie e in caso di percentuale elevata di emoglobina glicata. I leucociti sono meno deformabili degli eritrociti sia per la loro forma sferica che per la complessità citoplasmatica

contenente il nucleo, organuli ed elementi contrattili; un leucocita attivato inoltre risulta più resistente alla deformazione (Tran son tay et al, 2007).

*L'aggregabilità* dipende dall'interazione tra proteine plasmatiche (concentrazione, dimensione, densità) ed emazie.

Nei vasi in cui il sangue scorre a basso shear rate l'aggregabilità eritrocitaria assume un ruolo predominante; gli eritrociti formano in questa circostanza aggregati lineari detti rouleaux per valori di shear stress  $< 0.05$  Pa. La loro aggregazione è secondaria ad un processo di adsorbimento di proteine ad alto peso molecolare tra le quali il fibrinogeno e alfa 2-macroglobulina sulla superficie di cellule adiacenti. Fisiologicamente i rouleaux hanno legami intercellulari facilmente scindibili, ma in condizioni di flogosi, l'aumento del fibrinogeno e delle altre proteine di fase acuta porta alla formazione di aggregati che tendono a resistere anche ad elevati shear stress. Gli aggregati eritrocitari, disponendosi centralmente al flusso, spingono i leucociti e le piastrine verso le pareti vasali favorendone l'adesione (Gaetgensetal, 1987).

Il flusso ematico dipende però anche dalla geometria vasale e in particolare dal rapporto tra diametro delle cellule circolanti e diametro del vaso. Nei vasi con diametro  $< 300 \mu$  gli eritrociti si dispongono lungo l'asse centrale, lasciando uno strato di plasma povero di cellule a contatto con la parete (effetto Fahraeus). L'effetto Fahraeus si fa più marcato al ridursi del calibro del vaso fino a 20-10  $\mu$  ed è responsabile dell'effetto Fahraeus-Lindqvist, fenomeno per cui al diminuire del calibro del vaso la viscosità apparente si riduce fino al raggiungimento di un lume capillare critico al di sotto del quale si osserva un brusco incremento della viscosità dipendente soprattutto dalla deformabilità eritrocitaria e in parte dalla presenza di eventuali leucociti (Baskurt, 2007).

Le alterazioni emoviscosimetriche giocano uno specifico ruolo nella microcircolazione in condizioni potenzialmente ischemiche. Alcune alterazioni a carico del microcircolo si determinano in relazione al diametro e alla permeabilità dei microvasi, al metabolismo cellulare e al profilo emoreologico. Fisiologicamente il flusso sanguigno è relata alla velocità del sangue, al diametro e alla struttura del vaso e alla viscosità ematica. Dati clinici e sperimentali hanno accertato che mentre l'aggregazione

eritrocitaria avviene a bassi shear rate, la deformabilità e la viscosità plasmatica hanno un ruolo significativo agli alti shear rate.

L'aggregazione eritrocitaria influenza soprattutto la resistenza al flusso in vivo (Cabel et al, 1997) ed è la principale determinante della viscosità ematica a bassi shear rate. Essa è regolata dalle caratteristiche intrinseche degli eritrociti e dalla concentrazione di macromolecole o dai livelli plasmatici di alcune proteine e in particolare del fibrinogeno (Lee et al,1997; Rampling et al, 2004).

#### **4. Determinanti emoreologiche ed aterosclerosi**

Le turbe emoreologiche sembrano costituire un fattore di rischio per lo sviluppo delle malattie cardiovascolari attraverso gli effetti sull'aterogenesi, la trombogenesi e l'ischemia tissutale (Ernst et al, 1993; Koenig et al, 1998; Lowe, 1999). Dati clinici e sperimentali indicano il ruolo delle determinanti emoreologiche nella patogenesi dell'aterotrombosi, considerata la stretta interdipendenza che sussiste fra pattern emoreologico e condizioni di flusso. I meccanismi fisiopatologici che collegano le condizioni emodinamiche alla formazione dell'ateroma possono essere influenzati dal profilo emoreologico. Le placche aterosclerotiche si realizzano, infatti, per lo più a livello delle biforcazioni vascolari e in zone a basso shear rate dove la viscosità ematica aumenta per incremento dell'aggregazione eritrocitaria. Un aumento dell'ematocrito e/o del fibrinogeno accentua questi fenomeni e facilita l'adesione all'endotelio delle piastrine e dei leucociti e la loro attivazione (Turitto et al, 1980). Nelle zone stenotiche si realizzano elevati shear stress che provocano l'attivazione piastrinica, l'innescò della cascata coagulativa e favoriscono inoltre le complicanze della placca (rottura, ulcerazione ed embolizzazione) (Ernst et al, 1993; Koenig et al, 1998). Nella zona post-stenotica a basso shear rate, le piastrine attivate possono aggregarsi formando un trombo occludente e/o microemboli (Cerletti et al, 1993; Koenig et al, 1998).

I risultati di diversi studi mostrano che le alterazioni della viscosità ematica sono correlate all'insorgenza e alla progressione di patologie cardiovascolari (Velcheva et

al, 2006; Marossy et al, 2009). L'entità delle alterazioni emoreologiche è correlata alla severità della malattia, alla prognosi e alla presenza di complicanze. L'iperviscosità plasmatica limita la perfusione tissutale nelle aree a basso flusso; essa può essere considerata un semplice marker di aterosclerosi precoce e un utile parametro prognostico nell'identificazione dei soggetti a rischio di complicanze cardiovascolari (Koenig, 1998; Gori et al, 2011).

I parametri emoreologici sembrano correlare con l'entità della stenosi carotidea sia nei soggetti sintomatici che in quelli asintomatici (Harrison et al, 1981; Levenson et al, 2000; Assayag et al, 2008). Diversi studi hanno mostrato che le alterazioni emoreologiche correlano con il grado di stenosi carotidea (Szapary et al, 2004). Altri studi condotti su soggetti asintomatici, al fine di esaminare il possibile ruolo dei parametri emoreologici nell'aterosclerosi preclinica, hanno evidenziato risultati controversi. Sebbene sia noto il ruolo della viscosità plasmatica come marker di aterosclerosi e di ispessimento medio-intimale carotideo, e che l'aggregazione eritrocitaria insieme al fibrinogeno promuovono la formazione della placca, altri autori hanno asserito che i parametri emoreologici avrebbero solo un ruolo minore nell'aterosclerosi precoce e non è chiaro se le alterazioni della reologia ematica siano una conseguenza tardiva degli eventi cerebrovascolari o se siano markers di aterosclerosi carotidea e quindi contribuiscano alla patogenesi delle sue complicanze (Totsimon et al, 2016).

Alcuni autori hanno messo in evidenza un incremento della viscosità ematica e dell'ematocrito in soggetti con aterosclerosi carotidea preclinica (Lee et al, 1998; Levenson J et al, 2000); tali alterazioni sembrerebbero essere indipendenti dalla presenza dei classici fattori di rischio per aterosclerosi (Carallo et al, 1998). In uno studio non recente, Baker et al. hanno osservato una ridotta deformabilità eritrocitaria in soggetti aterosclerotici indipendentemente dalla esposizione al fumo di sigaretta. La ridotta deformabilità eritrocitaria promuoverebbe una maggiore adesione piastrinica e quindi avrebbe un ruolo attivo nella progressione della placca (Baker et al, 1993). In soggetti con aterosclerosi carotidea asintomatica, l'aggregazione eritrocitaria sembrerebbe correlare con l'entità della stenosi (Assayag et al, 2008).



Secondo altri autori, la viscosità ematica correla con il BMI, con l'ispessimento medio intimale (IMT) e con la ridotta dilatazione flusso mediata (FMD) allorché è stata valutata in giovani obesi (Zhu et al, 2005). In ricerche più recenti, sebbene sia condiviso il ruolo della viscosità plasmatica nella patogenesi delle malattie cardiovascolari e nella mortalità, l'associazione con tali eventi sembra essere relata agli effetti dei fattori di rischio cardiovascolari maggiori; tuttavia la viscosità plasmatica potrebbe essere inclusa in futuri score per una migliore stratificazione del rischio cardiovascolare (Peters et al, 2017).

Una condizione di iperviscosità secondaria è stata descritta in corso di diabete mellito, ipertensione arteriosa, sindrome metabolica e dislipidemia dove si osservano un aumento della viscosità ematica e plasmatica, un aumento della fibrinogenemia e della aggregabilità eritrocitaria e una ridotta deformabilità eritrocitaria (Caimi et al, 1993; Hopps et al, 2008; Caimi et al, 2013; Lo presti et al, 2014; Sloop et al, 2015, Caimi et al, 2018) anche indipendentemente dalla presenza di aterosclerosi. Questa osservazione tenderebbe a complicare l'analisi della relazione causa-effetto tra turba emoreologica e aterosclerosi (Vosseler et al, 2012).

Diversi studi, seppur con risultati non univoci, hanno valutato l'esistenza di una associazione tra le determinanti emoreologiche e aterosclerosi sia a carico del distretto carotideo che coronarico. Danesh et al hanno effettuato una metanalisi di diversi trials che hanno riguardato la relazione tra ematocrito, viscosità ematica e plasmatica e incidenza di coronaropatia. Gli studi che hanno considerato il ruolo della viscosità ematica hanno mostrato un rischio di coronaropatia pari a 1.24 ( $p > 0.1$ ). In sintesi, nonostante l'esistenza di una significativa associazione tra viscosità ematica e coronaropatia, il rischio conferito dall'iperviscosità, specie quando corretto per altri fattori di rischio (sesso, attività fisica, fumo e obesità), risulta di poco superiore all'unità e la sua rilevanza rimane incerta (Danesh et al, 2000).

Per ciò che riguarda il distretto carotideo, alcuni autori hanno messo in evidenza un modesto incremento della viscosità ematica in soggetti con attacchi ischemici transitori ma non in quelli con ictus (Velcheva et al, 2006) e non è stata riportata alcuna correlazione tra IMT e viscosità ematica (Carallo et al, 1998). Risultati controversi

sono stati riportati anche in merito alla relazione tra viscosità ed estensione dell'aterosclerosi sia a livello coronarico che carotideo (Vosseler et al, 2012). Altri autori hanno invece dimostrato un'associazione tra viscosità e IMT anche in giovani obesi (Levenson et al, 2000; Zhu et al, 2005).

Questi dati sottolineano la complessa relazione tra funzione vascolare e viscosità. Se da un lato, è noto il ruolo dello shear stress sulla funzione endoteliale e sul processo aterogenetico (progressione e instabilità della placca), dall'altro, nei soggetti con maggiore rischio cardiovascolare, l'iperviscosità potrebbe agire come un meccanismo di equilibrio, stimolando la funzione endoteliale e quindi l'attivazione di processi antiaterogenetici.

Non deve sorprendere quindi come l'effetto netto di questi due processi opposti porta all'assenza di un dato definitivo riguardante la relazione tra viscosità ed evidenza clinica di aterosclerosi (Vosseler et al, 2012).

## 5. Leucociti e rischio cardiovascolare

L'infiammazione gioca un ruolo fisiopatologico di rilievo nell'intero processo aterosclerotico: inizio, progressione e destabilizzazione della placca. Oltre ai tanti markers infiammatori, negli ultimi anni è stata rivolta l'attenzione alla conta leucocitaria, semplice indicatore dello stato infiammatorio sistemico (Hoffman et al, 2004) che sembra costituire un fattore di rischio indipendente e un marker prognostico per le malattie cardiovascolari. (Danesh et al, 1998; Madjid et al, 2013). Il numero di monociti, linfociti e neutrofili sembrerebbe meglio predire il rischio cardiovascolare più che la conta leucocitaria totale (Wheeler et al, 2004; Waterhouse et al, 2008; Nunez et al, 2011; Guasti et al, 2011; Lassale et al, 2017). Tuttavia, sono disponibili pochi dati in merito alla capacità predittiva delle sottoclassi leucocitarie, indipendentemente dai tradizionali fattori di rischio cardiovascolari ed in soggetti asintomatici.

I linfociti svolgono un ruolo nella modulazione della risposta infiammatoria del processo aterosclerotico. Una bassa conta linfocitaria è di comune riscontro in corso di risposta infiammatoria sistemica ed è stata osservata un'aumentata incidenza di eventi cardiovascolari in presenza di linfopenia, come nel caso dei soggetti sottoposti a trapianto renale, in soggetti affetti da infezione da HIV e da malattie autoimmuni (Nunez et al, 2011).

La conta dei neutrofili ha, ad oggi, mostrato una forte associazione con l'incidenza di eventi cardiovascolari e con la mortalità; la neutrofilia è inoltre strettamente correlata alla compromissione della perfusione microvascolare (Kirtane et al, 2004; Wheeler et al, 2004; Gillum et al, 2005).

Secondo diverse ricerche, il rapporto neutrofili / linfociti (NLR) avrebbe un maggiore potere predittivo del rischio cardiovascolare rispetto al numero dei singoli sottotipi leucocitari (Horne et al, 2005; Dragu et al, 2006; Yu et al, 2015).

Un NLR più alto, nonostante un normale numero dei leucociti totali, si associa a un rischio più elevato di malattia aterosclerotica (Horne et al, 2005). Esso, infatti, costituisce un indicatore di infiammazione cronica di basso grado o subclinica che ha un ruolo di rilievo nella disfunzione endoteliale in corso di diabete mellito, obesità,

dislipidemia, ipertensione arteriosa e sindrome metabolica (Kloner et al, 1991; Balta et al, 2014; Nam et al, 2017).

NLR è risultato correlato alla rigidità arteriosa e agli indicatori dell'estensione della malattia coronarica (Park et al, 2011; Bhat et al, 2013; Yaman et al, 2016; Nam et al, 2017; Wang et al, 2017) e inoltre alla formazione di trombi in corso di sindrome coronarica acuta (Yilmaz et al, 2015).

In questo contesto è stato suggerito che NLR influenzi l'outcome a breve e a lungo termine, specialmente nei pazienti con infarto miocardico con sopraslivellamento del segmento ST (STEMI) sottoposti a PCI primaria (Sawant et al, 2014). Nei pazienti sottoposti a PCI non urgente, un valore NLR maggiore aumenta il rischio di infarto periprocedurale, specialmente per valori  $\geq 3$  (Verdoia et al, 2016).

Placche aterosclerotiche asintomatiche sono presenti nel 50-99 % dei casi di stroke ischemico. NLR potrebbe costituire un significativo predittore clinico del grado di stenosi carotidea in soggetti con stroke ischemico (Goldstein et al, 2011; Koklu et al, 2014; Hyun et al, 2015; Jiang et al, 2017).

La valutazione del rapporto tra neutrofili e linfociti, recentemente emerso tra i marcatori di flogosi, è un parametro a basso costo, facilmente reperibile tra gli esami ematochimici di routine; esso costituirebbe un indipendente marker di disfunzione endoteliale in soggetti asintomatici e potrebbe migliorare la stratificazione del rischio dei soggetti con malattia cardiovascolare (Arbel et al, 2012; Kalay et al, 2012; Urbistondo et al, 2015; Nam et al, 2017).

## **SCOPO DELLA RICERCA**

Sulla base delle precedenti considerazioni, lo scopo della ricerca è stato quello di esaminare, in soggetti affetti da aterosclerosi carotidea asintomatica, la perossidazione lipidica, i metaboliti dell'ossido nitrico (NOx), le metalloproteasi MMP-2 e MMP-9, ed i loro inibitori TIMP-1 e TIMP-2, il rapporto neutrofili/linfociti (NLR), la viscosità sia ematica che plasmatica e l'ematokrito (Htc).

## **SOGGETTI E METODI**

Tra i soggetti sottoposti ad uno studio eco-color-doppler dei vasi epiaortici in regime ambulatoriale con apparecchio Esaote MyLab 25 e sonda lineare 7.5/11 MHz, sono stati arruolati 104 soggetti (45 uomini e 59 donne) di età (media  $\pm$  D.S.)  $64,2 \pm 8,5$  anni, range 45-73 anni. I soggetti sono stati selezionati per l'evidenza di lesioni parietali carotidee, monolaterali (n.43) e bilaterali (n.61), che all'anamnesi e alla valutazione della documentazione clinica, sono risultate "asintomatiche" e, di conseguenza, "precliniche" (sia dal punto di vista della sintomatologia che di eventuali alterazioni strumentali relative a patologia aterosclerotica a varia localizzazione. Nessuno dei soggetti, infatti, presentava sintomi riferibili ad ischemia cerebrale né aveva una storia di cardiopatia ischemica o di arteriopatia obliterante periferica). Le placche erano tutte di natura fibrosclerotica e non emodinamicamente significative. Al momento dell'esame nessuno dei soggetti era affetto da malattie infiammatorie acute o lo era stato nei tre mesi precedenti.

Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad una attenta anamnesi mirata all'identificazione dei principali fattori di rischio cardiovascolare, la cui distribuzione è indicata nelle tabelle 1a e 1b. Sono stati sottoposti inoltre ad esame elettrocardiografico ed alla misurazione dei valori tensivi arteriosi, al rilevamento dei parametri antropometrici e dei principali esami di laboratorio (tabelle 2a e 2b).

I soggetti, arruolati nella ricerca previo consenso informato, sono stati sottoposti ad un prelievo di sangue venoso al mattino a digiuno.

Sono state valutate sia la viscosità ematica che plasmatica ad alti shear rates utilizzando un viscosimetro Wells-Brookfield ½ LVT, mentre quelle a bassi shear rates sono state valutate impiegando un viscosimetro Contraves LS30. L'aggregabilità eritrocitaria è stata determinata usando l'aggregometro della Myrenne. È stato inoltre valutato l'ematocrito e il rapporto neutrofili/linfociti.

La perossidazione lipidica è stata valutata come concentrazione plasmatica delle sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS) mediante fluorimetria, utilizzando una curva standard ottenuta idrolizzando 8.2 µl di 1.1.3.3-tetrametossipropano con HCl. La determinazione della concentrazione dei metaboliti stabili dell'NO è stata effettuata in due tappe: la prima consiste nella conversione del nitrato in nitrito con l'impiego della nitrato-reduttasi; nella seconda tappa il nitrito è convertito in un azocomposto di color rosso porpora misurabile fotometricamente. La concentrazione plasmatica delle gelatinasi (MMP-2 e MMP-9) e dei loro inibitori (TIMP-1 e TIMP-2) è stata valutata con metodica ELISA.

## **ANALISI STATISTICA**

I dati sono stati espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (D.S). Il test "t" di Student per dati non appaiati è stato utilizzato per il confronto fra i soggetti di controllo e quelli con aterosclerosi preclinica (APC) e, nell'ambito dei soggetti con APC, per confrontare quelli con e senza i più comuni fattori di rischio. L'analisi della varianza (ANOVA) ad una via, seguita dal post-test di Tukey, è stata impiegata per confrontare il comportamento dei parametri nei controlli e nei soggetti con APC suddivisi rispettivamente in base al numero di fattori di rischio e all'estensione (mono- o bilaterale) dell'aterosclerosi carotidea. Lo studio delle correlazioni è stato effettuato mediante regressione lineare semplice.

## RISULTATI

Preliminarmente abbiamo valutato la frequenza dei fattori di rischio tradizionali nell'intero gruppo dei soggetti con aterosclerosi carotidea preclinica.

Da questa valutazione (Tab 1a) emerge che il 70,2 % dei soggetti presenta una ipercolesterolemia e che solo il 14,4 % risulta essere affetto da diabete mellito di tipo 2. Gli ipertesi inclusi nell'intero gruppo risultano essere il 63,5 %, i fumatori il 50 % mentre la familiarità per patologie cardiovascolari è del 60,6 %.

Successivamente (Tab 1b) abbiamo suddiviso l'intero gruppo in relazione alla presenza dei fattori di rischio. Questa suddivisione mostra che il 16,4 % presenta 0-1 fattori di rischio, il 28,8 % 2 fattori di rischio, il 36,5 % 3 fattori di rischio e il 18,3 % presenta 4-5 fattori di rischio.

Al fine di valutare in modo analitico i soggetti oggetto dello studio abbiamo considerato rispettivamente i parametri dello stress ossidativo, del profilo MMPs/TIMPs e infine di quello emoreologico.

Relativamente ai parametri dello stress ossidativo, al quale abbiamo anche associato il rapporto N/L, dal confronto tra gruppo controllo e soggetti con aterosclerosi carotidea preclinica (APC) si mette in evidenza (Tab 3) che né la perossidazione lipidica, né il NO<sub>x</sub>, né il rapporto N/L distinguono questi soggetti dai controlli.

Tenendo conto della elevata percentuale dei fattori di rischio, abbiamo poi suddiviso l'intero gruppo dei soggetti con APC in normo e ipercolesterolemici, in normotesi e ipertesi e in quelli senza e con familiarità per malattie cardiovascolari.

Relativamente alla suddivisione in normo e ipercolesterolemici (Tab 3a) operata a carico dell'intero gruppo emerge che né i parametri dello stress ossidativo, né la conta dei sottotipi leucocitari, né il rapporto N/L risulta operare alcuna distinzione. Suddividendo l'intero gruppo in normotesi e ipertesi (Tab 3b), i dati ottenuti non sembrano operare alcuna differenziazione sia nei confronti dello stress ossidativo che dei sottotipi leucocitari e del rapporto N/L. La suddivisione effettuata sulla base della familiarità per malattie cardiovascolari (Tab 3c) mostra invece solo un diverso comportamento della conta linfocitaria.

Successivamente abbiamo invece indagato i parametri dello stress ossidativo e il rapporto N/L nei soggetti con APC in relazione sia al numero dei fattori di rischio (Tab 4) che alla presenza uni o bilaterale delle placche carotidee (Tab 5). Tuttavia, la duplice suddivisione, i cui dati sono stati approcciati con l'analisi della varianza ha confermato quanto già osservato nell'intero gruppo e cioè che i parametri considerati non sembrano operare alcuna significativa distinzione, anche se nell'intero gruppo e nei due sottogruppi si intravede un moderato incremento del rapporto N/L; quest'ultimo sembra avere una media più elevata sia nei soggetti rientranti nel sottogruppo con 3-5 fattori di rischio che in quelli presentanti lesioni aterosclerotiche bilaterali.

La valutazione delle gelatinasi e dei loro inibitori nell'intero gruppo di soggetti con APC ha evidenziato dati di sicuro interesse. Nell'intero gruppo (Tab 6) si osserva infatti un significativo incremento delle gelatinasi (MMP-2 e MMP-9) associato a un modesto decremento del TIMP-1 e ad un moderato incremento del TIMP-2. In tutti i soggetti risulta evidente un significativo incremento del rapporto MMP-2/TIMP-2 e del rapporto MMP-9/TIMP-1. Abbiamo altresì effettuato lo studio delle correlazioni tra gelatinasi e loro inibitori, accertando che mentre nell'intero gruppo dei soggetti con APC è evidente una positiva correlazione ( $p < 0.01$ ) fra MMP-2 e TIMP-2 (Fig 1), nessuna correlazione sembra invece registrarsi tra MMP-9 e TIMP-1 (Fig 1). Tra MMP-2 e TIMP-2 e MMP-9 e TIMP-1 non viene invece messa in evidenza alcuna correlazione nel gruppo controllo (Fig 1).

Analogamente a quanto effettuato per i parametri dello stress ossidativo e per il rapporto N/L, abbiamo suddiviso l'intero campione in normo e ipercolesterolemici, in normotesi e ipertesi e in soggetti senza e con familiarità per patologie cardiovascolari. La suddivisione effettuata relativamente alla presenza o meno di ipercolesterolemia (Tab 6 a), alla condizione o meno di ipertensione arteriosa (Tab 6b) e alla presenza di familiarità per malattie cardiovascolari (Tab 6c) non ha però registrato alcuna variazione relativamente al pattern MMPs/TIMPs.



Successivamente abbiamo indagato sulle gelatinasi e sui loro inibitori in relazione al numero dei fattori di rischio (Tab 7) e alla presenza uni o bilaterale delle placche aterosclerotiche carotidee (Tab 8).

Relativamente ai fattori di rischio (Tab 7) si conferma appieno quanto registrato nell'intero gruppo. MMP-2 risulta infatti aumentato in modo significativo sia nel sottogruppo di soggetti con 0-2 fattori di rischio che nel sottogruppo di soggetti con 3-5 fattori di rischio; comportamento analogo si osserva per MMP-9. Il TIMP-1 risulta invece ridotto sia nel sottogruppo con 0-2 fattori di rischio che in quello con 3-5 fattori di rischio. Il TIMP-2 risulta invece aumentato in modo significativo nei due sottogruppi. Comportamento sovrapponibile si registra per il rapporto MMP-2/TIMP-2 ed MMP-9/TIMP-1 che analogamente a quanto osservato nell'intero gruppo, risultano aumentati nei due sottogruppi.

Lo stesso approccio è stato effettuato suddividendo l'intero gruppo in base alla presenza uni o bilaterale di placche aterosclerotiche carotidee (Tab 8). Questa diversa suddivisione evidenzia che MMP-2 e MMP-9 risultano aumentate nei due sottogruppi, il TIMP-1 risulta ridotto nei due sottogruppi, mentre il TIMP-2 risulta invece incrementato. Il rapporto MMP-2/TIMP-2 e il rapporto MMP-9/TIMP-1 risultano aumentate sia nei soggetti con placche aterosclerotiche unilaterali che in quelli con placche bilaterali.

Nell'intero campione dei soggetti con APC, lo studio delle principali determinanti emoreologiche suscita controverse riflessioni. Da questa valutazione (Tab 9) emerge che la viscosità ematica al più alto shear rate ( $450 \text{ sec}^{-1}$ ) discrimina i controlli dai soggetti con APC. Tale distinzione tuttavia non emerge dal rilievo della viscosità ematica al più basso shear rate ( $0.51 \text{ sec}^{-1}$ ) e della viscosità plasmatica. Allo stesso tempo entrambi i rapporti tra viscosità ematica/ematocrito x 100 distinguono i soggetti controllo da quelli da noi esaminati. Nell'intero campione non si evidenzia variazione alcuna nei riguardi dell'ematocrito, mentre, anche se non risulta significativo, sembra evidenziarsi un lieve-moderato incremento dell'aggregabilità eritrocitaria.

Anche per le determinanti emoreologiche abbiamo operato la suddivisione dell'intero gruppo in normo e ipercolesterolemici, in normotesi e ipertesi e in soggetti senza e con

familiarità per malattie cardiovascolari. La suddivisione in normo e ipercolesterolemici (Tab 9a) mette in evidenza solo in questi ultimi un lieve-moderato decremento del rapporto viscosità ematica/ematocrito x 100, mentre quella in normotesi ed ipertesi (Tab 9b) non evidenzia alcuna distinzione. La suddivisione operata sulla scorta della familiarità per malattie cardiovascolari (Tab 9 c) registra invece una lieve-moderata variazione del valore dell'ematocrito.

Abbiamo suddiviso quindi l'intero gruppo sia in relazione al numero dei fattori di rischio (Tab 10) che alla presenza uni o bilaterale di placche aterosclerotiche carotidee (Tab 11). Nella suddivisione effettuata sulla scorta del numero di fattori di rischio (Tab 10), suggestivo risulta il comportamento sia della viscosità ematica, esplorata a più alto shear rate, che della viscosità plasmatica. Per entrambi i parametri, l'analisi della varianza risulta significativa sebbene i due parametri, le cui medie sono più elevate nel sottogruppo con 3-5 fattori di rischio rispetto al gruppo controllo, assumono un comportamento divaricante nei confronti del sottogruppo che include soggetti con 0-2 fattori di rischio; infatti mentre la viscosità plasmatica, anche se a basso livello statistico ( $p < 0.05$ ) discrimina i due sottogruppi, ciò non sembra accadere per la viscosità ematica, la quale non differenzia il sottogruppo con 3-5 fattori di rischio da quello con 0-2 fattori di rischio. L'analisi della varianza risulta anche significativa per il rapporto  $VE\ 450\ sec^{-1}/Ht\ x\ 100$  sebbene lo stesso rapporto non eserciti distinzione alcuna tra i due sottogruppi. Con questa suddivisione, interessante appare invece il comportamento dell'aggregabilità eritrocitaria che alla analisi statistica risulta significativo, anche se a basso livello statistico ( $p < 0.05$ ); l'aggregabilità eritrocitaria mostra una media più elevata nel sottogruppo con 3-5 fattori di rischio.

Effettuando la suddivisione sulla scorta della presenza uni o bilaterale di lesioni aterosclerotiche carotidee (Tab 11) emerge che solamente la viscosità ematica, determinata al più alto shear rate, distingue ciascuno dei due sottogruppi dal gruppo controllo. Dalla stessa analisi invece, non sembra quindi emergere alcuna apprezzabile differenza né per la viscosità plasmatica né per l'aggregabilità eritrocitaria. Anche con questa suddivisione, il rapporto  $VE\ 450\ sec^{-1}/Ht\ x\ 100$  risulta aumentato nei due sottogruppi rispetto al gruppo controllo.

Nell'intero gruppo dei soggetti con APC abbiamo anche valutato, utilizzando la regressione lineare semplice, la correlazione tra viscosità plasmatica e fibrinogenemia e tra fibrinogenemia e aggregabilità eritrocitaria (dati non tabulati) senza tuttavia accertare alcuna relazione fra i parametri considerati. Analogo risultato si è ottenuto allorché la suddetta correlazione ha esaminato i due sottogruppi (per numero di fattori di rischio e per la presenza uni o bilaterale delle placche aterosclerotiche carotidee).

## TABELLE

**Tabella 1a**

	N° pazienti	%
Ipercolesterolemia	73	70,2
Ipertensione arteriosa	66	63,5
Familiarità per malattie cardiovascolari	63	60,6
Fumatori + ex-fumatori	52	50,0
Diabete mellito	15	14,4

**Tabella 1b**

	N° pazienti	%
0-1 fattore di rischio	17	16,4
2 fattori di rischio	30	28,8
3 fattori di rischio	38	36,5
4-5 fattori di rischio	19	18,3

**Tabella 2a**

	Medie $\pm$ D.S.	range
Peso (Kg)	74,5 $\pm$ 13,4	47 - 125
Altezza (m)	1,63 $\pm$ 0,09	1,43 - 1,82
BMI	28,15 $\pm$ 4,37	17,99 - 43,25
Circonferenza vita (cm)	96,37 $\pm$ 11,82	67 - 125
PAO sistolica (mmHg)	129,4 $\pm$ 12,9	100 - 160
PAO diastolica (mmHg)	76,9 $\pm$ 7,3	60 - 100

**Tabella 2b**

	Medie $\pm$ D.S.	range
Glicemia (mg/dl)	101,1 $\pm$ 24,87	77 - 237
Colesterolemia tot. (mg/dl)	203,3 $\pm$ 40,7	108 - 338
Colesterolo HDL	54,24 $\pm$ 15,37	22 - 103
Colesterolo LDL	126,3 $\pm$ 37,2	51,4 - 246,8
Trigliceridi	113,9 $\pm$ 50,1	44 - 309
PCR (mg/l)	2,95 $\pm$ 1,75	0,3 - 9,5
Uricemia (mg/dl)	4,64 $\pm$ 1,03	1,1 - 7,7
Fibrinogenemia (mg/dl)	316,7 $\pm$ 45,8	199 - 518
Creatininemia (mg/dl)	0,84 $\pm$ 0,31	0,40 - 3,50

**Tabella 3**

	Controlli	APC
TBARS (nmol/ml)	5,93 ± 1,21	5,73 ± 1,27
NOx (micromol/l)	28,07 ± 18,83	30,87 ± 7,12
Neutrofili (N°/mmc)	3331 ± 784	3844 ± 1251*
Linfociti (N°/mmc)	2089 ± 518	2423 ± 2839
NLR	1,679 ± 0,539	1,894 ± 0,789

\*  $p < 0,05$  vs controlli (test "t" di Student per dati non appaiati)

**Tabella 3a**

	APC con normocolesterolemia	APC con ipercolesterolemia
TBARS (nmol/ml)	5,646 ± 1,296	5,771 ± 1,274
NOx (micromol/l)	29,40 ± 5,56	31,47 ± 7,62
Neutrofili (N°/mmc)	3777 ± 1066	3873 ± 1328
Linfociti (N°/mmc)	2121 ± 735	2182 ± 674
NLR	1,939 ± 0,794	1,890 ± 0,768

**Tabella 3b**

	APC normotesi	APC ipertesi
TBARS (nmol/ml)	5,69 ± 1,29	5,76 ± 1,28
NOx (micromol/l)	29,90 ± 8,03	31,43 ± 6,55
Neutrofili (N°/mmc)	3817 ± 1343	3860 ± 1206
Linfociti (N°/mmc)	2192 ± 880	2147 ± 559
NLR	1,953 ± 0,963	1,876 ± 0,645

**Tabella 3c**

	APC senza familiarità per MCV	APC con familiarità per MCV
TBARS (nmol/ml)	5,72 ± 1,22	5,75 ± 1,32
NOx (micromol/l)	31,55 ± 7,61	30,43 ± 6,82
Neutrofili (N°/mmc)	3657 ± 1212	3967 ± 1271
Linfociti (N°/mmc)	1989 ± 589	2278 ± 730*
NLR	1,955 ± 0,742	1,872 ± 0,796

§ p < 0,05 vs APC senza familiarità (test "t" di Student per dati non appaiati)

**Tabella 4**

	Controlli	0-2 FR	3-5 FR	F
TBARS (nmol/ml)	5,93 ± 1,21	5,70 ± 1,35	5,76 ± 1,22	0,382
NOx (micromol/l)	28,07 ± 18,83	31,03 ± 7,40	30,75 ± 6,95	0,852
Neutrofili (N°/mmc)	3331 ± 784	3554 ± 1067	4084 ± 1347***#	6,036 <sup>b</sup>
Linfociti (N°/mmc)	2089 ± 518	2004 ± 592	2296 ± 740	2,922
NLR	1,679 ± 0,539	1,864 ± 0,778	1,918 ± 0,805	1,371

\*\* p < 0,01 vs controlli # p < 0,05 vs 0-2 FR (post-test di Tukey)

<sup>b</sup> p < 0,01 (ANOVA)

**Tabella 5**

	Controlli	lesioni monolaterali	lesioni bilaterali	F
TBARS (nmol/ml)	5,93 ± 1,21	5,82 ± 1,40	5,67 ± 1,19	0,524
NOx (micromol/l)	28,07 ± 18,83	31,93 ± 6,87	30,13 ± 7,27	1,146
Neutrofili (N°/mmc)	3331 ± 784	3809 ± 1077	3869 ± 1369	3,065 <sup>a</sup>
Linfociti (N°/mmc)	2089 ± 518	2190 ± 649	2146 ± 722	0,256
NLR	1,679 ± 0,539	1,844 ± 0,628	1,929 ± 0,889	1,471

<sup>a</sup> p < 0,05 (ANOVA)

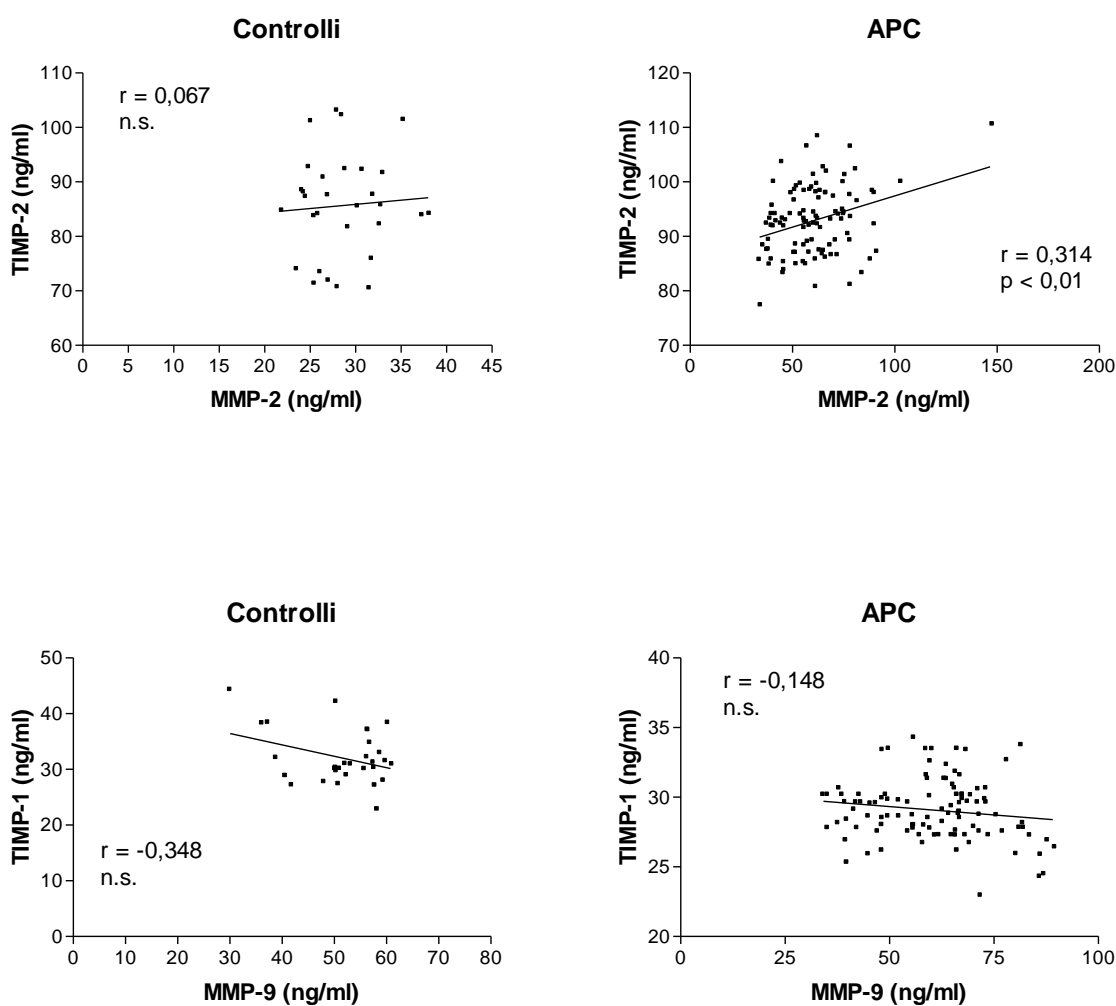


**Tabella 6**

	Controlli	APC
MMP-2 (ng/ml)	28,66 ± 4,15	60,86 ± 17,19***
MMP-9 (ng/ml)	51,55 ± 8,14	60,78 ± 13,60***
TIMP-1 (ng/ml)	32,05 ± 4,80	29,07 ± 2,19***
TIMP-2 (ng/ml)	85,67 ± 9,40	92,92 ± 6,27***
MMP-2/TIMP-2	0,338 ± 0,059	0,654 ± 0,173***
MMP-9/TIMP-1	1,652 ± 0,376	2,109 ± 0,539***

\*\*\* p < 0,001 vs controlli (test "t" di Student per dati non appaiati)

**Figura 1**



**Tabella 6a**

	APC con normocolesterolemia	APC con ipercolesterolemia
MMP-2 (ng/ml)	61,88 ± 18,17	60,45 ± 16,88
MMP-9 (ng/ml)	59,11 ± 13,60	61,46 ± 13,63
TIMP-1 (ng/ml)	28,71 ± 2,51	29,22 ± 2,05
TIMP-2 (ng/ml)	90,64 ± 5,85	93,85 ± 6,24§
MMP-2/TIMP-2	0,683 ± 0,200	0,643 ± 0,161
MMP-9/TIMP-1	2,089 ± 0,590	2,117 ± 0,521

§ p < 0,05 vs APC con normocolesterolemia (test “t” di Student per dati non appaiati)

**Tabella 6b**

	APC normotesi	APC ipertesi
MMP-2 (ng/ml)	59,39 ± 15,68	61,71 ± 18,06
MMP-9 (ng/ml)	59,42 ± 12,73	61,57 ± 14,11
TIMP-1 (ng/ml)	28,92 ± 2,19	29,16 ± 2,20
TIMP-2 (ng/ml)	92,30 ± 6,45	93,28 ± 6,19
MMP-2/TIMP-2	0,645 ± 0,173	0,660 ± 0,174
MMP-9/TIMP-1	2,069 ± 0,493	2,132 ± 0,566

**Tabella 6c**

	APC senza familiarità per MCV	APC con familiarità per MCV
MMP-2 (ng/ml)	62,19 ± 15,80	60,00 ± 18,10
MMP-9 (ng/ml)	60,85 ± 16,20	60,74 ± 11,74
TIMP-1 (ng/ml)	28,42 ± 2,24	29,50 ± 2,07§
TIMP-2 (ng/ml)	93,47 ± 5,08	92,56 ± 6,95
MMP-2/TIMP-2	0,665 ± 0,163	0,647 ± 0,180
MMP-9/TIMP-1	2,162 ± 0,644	2,074 ± 0,461

§ p < 0,05 vs APC senza familiarità (test “t” di Student per dati non appaiati)

**Tabella 7**

	Controlli	0-2 FR	3-5 FR	F
MMP-2 (ng/ml)	28,66 ± 4,15	61,06 ± 14,81***	60,70 ± 19,05***	51,15 <sup>c</sup>
MMP-9 (ng/ml)	51,55 ± 8,14	59,63 ± 14,24*	61,73 ± 13,10**	6,592 <sup>b</sup>
TIMP-1 (ng/ml)	32,05 ± 4,80	28,73 ± 2,22***	29,35 ± 2,14***	12,29 <sup>c</sup>
TIMP-2 (ng/ml)	85,67 ± 9,40	91,81 ± 5,61***	93,84 ± 6,68***	13,39 <sup>c</sup>
MMP-2/TIMP-2	0,338 ± 0,059	0,666 ± 0,162***	0,645 ± 0,182***	48,39 <sup>c</sup>
MMP-9/TIMP-1	1,652 ± 0,376	2,098 ± 0,586***	2,117 ± 0,503***	9,362 <sup>c</sup>

\* p < 0,05 \*\* p < 0,01 \*\*\* p < 0,001 vs controlli (post-test di Tukey)

<sup>b</sup> p < 0,01 <sup>c</sup> p < 0,001 (ANOVA)

**Tabella 8**

	Controlli	lesioni monolaterali	lesioni bilaterali	F
MMP-2 (ng/ml)	28,66 ± 4,15	60,59 ± 15,29***	61,06 ± 18,53***	51,16 <sup>c</sup>
MMP-9 (ng/ml)	51,55 ± 8,14	58,42 ± 12,92	62,45 ± 13,92***	7,627 <sup>c</sup>
TIMP-1 (ng/ml)	32,05 ± 4,80	29,37 ± 1,86***	28,86 ± 2,39***	12,07 <sup>c</sup>
TIMP-2 (ng/ml)	85,67 ± 9,40	92,73 ± 5,73***	93,06 ± 6,67***	12,16 <sup>c</sup>
MMP-2/TIMP-2	0,338 ± 0,059	0,654 ± 0,166***	0,654 ± 0,179***	47,96 <sup>c</sup>
MMP-9/TIMP-1	1,652 ± 0,376	1,996 ± 0,458*	2,189 ± 0,580***	11,46 <sup>c</sup>

\* p < 0,05 \*\*\* p < 0,001 vs controlli (post-test di Tukey)

<sup>c</sup> p < 0,001 (ANOVA)

**Tabella 9**

	Controlli	APC
VE 450 sec <sup>-1</sup> (mPa·s)	3,073 ± 0,427	3,381 ± 0,403***
VE 0,51 sec <sup>-1</sup> (mPa·s)	23,97 ± 4,24	25,34 ± 5,80
VP 450 sec <sup>-1</sup> (mPa·s)	1,223 ± 0,063	1,251 ± 0,075
Ht (%)	41,19 ± 3,28	40,52 ± 3,52
VE450/Ht x100	7,462 ± 0,860	8,388 ± 0,807***
VE0,51/Ht x100	57,93 ± 7,17	62,14 ± 11,04*
MEA	11,85 ± 2,02	12,54 ± 2,23

\* p < 0,05 \*\*\* < 0,001 vs controlli (test "t" di Student per dati non appaiati)

**Tabella 9a**

	APC con normocolesterolemia	APC con ipercolesterolemia
VE 450 sec <sup>-1</sup> (mPa·s)	3,480 ± 0,387	0,338 ± 0,405
VE 0,51 sec <sup>-1</sup> (mPa·s)	24,25 ± 5,05	25,80 ± 6,06
VP 450 sec <sup>-1</sup> (mPa·s)	1,250 ± 0,063	1,250 ± 0,805
Ht (%)	40,35 ± 4,07	40,59 ± 3,29
VE450/Ht x100	8,641 ± 0,721	8,278 ± 0,823 §
VE0,51/Ht x100	59,65 ± 8,61	63,19 ± 11,82
MEA	12,02 ± 2,08	12,76 ± 2,27

§ p < 0,05 vs APC con normocolesterolemia (test "t" di Student per dati non appaiati)

**Tabella 9b**

	APC normotesi	APC ipertesi
VE 450 sec <sup>-1</sup> (mPa·s)	3,406 ± 0,384	3,367 ± 0,416
VE 0,51 sec <sup>-1</sup> (mPa·s)	25,67 ± 5,95	25,15 ± 5,75
VP 450 sec <sup>-1</sup> (mPa·s)	1,239 ± 0,076	1,258 ± 0,075
Ht (%)	40,95 ± 3,52	40,27 ± 3,53
VE450/Ht x100	8,360 ± 0,646	8,405 ± 0,891
VE0,51/Ht x100	62,19 ± 10,91	62,11 ± 11,21
MEA	12,20 ± 2,30	12,74 ± 2,18

**Tabella 9c**

	APC senza familiarità per MCV	APC con familiarità per MCV
VE 450 sec <sup>-1</sup> (mPa·s)	3,299 ± 0,423	3,437 ± 0,383
VE 0,51 sec <sup>-1</sup> (mPa·s)	25,09 ± 4,61	25,51 ± 6,48
VP 450 sec <sup>-1</sup> (mPa·s)	1,233 ± 0,078	1,262 ± 0,072
Ht (%)	39,59 ± 2,94	41,13 ± 3,75 §
VE450/Ht x100	8,340 ± 0,860	8,421 ± 0,717
VE0,51/Ht x100	63,16 ± 9,48	61,47 ± 11,98
MEA	12,21 ± 2,10	12,76 ± 2,30

§ p < 0,05 vs APC senza familiarità (test "t" di Student per dati non appaiati)

**Tabella 10**

	Controlli	0-2 FR	3-5 FR	F
VE 450 sec <sup>-1</sup> (mPa·s)	3,073 ± 0,427	3,289 ± 0,392	3,460 ± 0,400***	9,208 <sup>c</sup>
VE 90 sec <sup>-1</sup> (mPa·s)	4,249 ± 0,488	4,106 ± 0,479	4,329 ± 0,525	2,580
VE 20,4 sec <sup>-1</sup> (mPa·s)	6,125 ± 0,795	6,153 ± 0,893	6,537 ± 0,949	3,216 <sup>a</sup>
VE 0,51 sec <sup>-1</sup> (mPa·s)	23,97 ± 4,24	24,32 ± 4,97	26,18 ± 6,31	2,259
VP 450 sec <sup>-1</sup> (mPa·s)	1,223 ± 0,063	1,232 ± 0,067	1,266 ± 0,079*#	4,674 <sup>a</sup>
Ht (%)	41,19 ± 3,28	39,77 ± 3,40	41,14 ± 3,53	2,531
VE450/Ht x100	7,462 ± 0,860	8,280 ± 0,789***	8,481 ± 0,819***	16,00 <sup>c</sup>
VE0,51/Ht x100	57,93 ± 7,17	60,80 ± 9,48	63,24 ± 12,16	2,722
MEA	11,85 ± 2,02	12,06 ± 2,13	12,95 ± 2,25	2,296 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> p < 0,05 <sup>c</sup> p < 0,001 (ANOVA)

\* p < 0,05 \*\*\* p < 0,001 vs controlli # p < 0,05 vs 0-2 FR (post-test di Tukey)

**Tabella 11**

	Controlli	lesioni monolaterali	lesioni bilaterali	F
VE 450 sec <sup>-1</sup> (mPa·s)	3,073 ± 0,427	3,387 ± 0,367**	3,377 ± 0,430**	6,700 <sup>b</sup>
VE 90 sec <sup>-1</sup> (mPa·s)	4,249 ± 0,488	4,247 ± 0,529	4,216 ± 0,509	0,066
VE 20,4 sec <sup>-1</sup> (mPa·s)	6,125 ± 0,795	6,234 ± 0,997	6,455 ± 0,893	1,581
VE 0,51 sec <sup>-1</sup> (mPa·s)	23,97 ± 4,24	24,90 ± 6,46	25,65 ± 5,31	0,978
VP 450 sec <sup>-1</sup> (mPa·s)	1,223 ± 0,063	1,258 ± 0,080	1,246 ± 0,072	2,088
Ht (%)	41,19 ± 3,28	40,05 ± 3,49	40,85 ± 3,53	1,135
VE450/Ht x100	7,462 ± 0,860	8,530 ± 0,831***	8,289 ± 0,782***	16,37 <sup>c</sup>
VE0,51/Ht x100	57,93 ± 7,17	61,72 ± 12,79	62,43 ± 9,73	2,040
MEA	11,85 ± 2,02	12,59 ± 2,42	12,51 ± 2,10	1,201

<sup>b</sup> p < 0,01 <sup>c</sup> p < 0,001 (ANOVA)

\*\* p < 0,01 \*\*\* p < 0,001 vs controlli (post-test di Tukey)

## CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Né nell'intero campione né nelle suddivisioni, operate sia per numero di fattori di rischio che per sede (uni o bilaterale) delle lesioni aterosclerotiche, non si mette in evidenza variazione alcuna né della perossidazione lipidica né del NOx. Tenendo conto che il 54,8 % dei soggetti studiati è portatore di 3-5 fattori di rischio, la non variazione della perossidazione lipidica così come del NOx suscita una qualche perplessità; molti di questi fattori di rischio favoriscono infatti la perossidazione lipidica i cui principali prodotti (MDA, HNE, ONE) derivano dalla ossidazione degli acidi grassi polinsaturi (PUFA) a cui vanno aggiunti le lipoproteine a bassa densità ossidate (oxLDL), gli isoprosatani e le sostanze reattive all'acido tiobarbiturico. Gli stessi fattori di rischio risultano anche favorire la sintesi dei prodotti finali non stabili dell'ossido nitrico ( $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- = \text{NOx}$ ). Considerando infatti che alcuni di questi fattori, in particolare ipertensione arteriosa e malattia diabetica, rilasciano molecole infiammatorie, usualmente l'incremento del NOx risulta correlato alla sovrapproduzione di NO da parte dei macrofagi, nei quali l'attivazione funzionale della NOS inducibile (iNOS) risulta causata da citochine quali il TNF, l'interleuchina 1  $\beta$  e l'interferone  $\gamma$  (Moncada et al, 1991; Fostermann et al, 1995; Weinberg et al, 1998) e quindi il dato relativo al NOx riscontrato in questa coorte di soggetti, non sembra trovare sul piano dottrinale una plausibile spiegazione.

Un certo interesse viene fuori dal comportamento del NLR, che sebbene non raggiunge livelli statisticamente significativi, sembra tuttavia discostarsi sia nell'intero gruppo che nelle due suddivisioni, da quello del gruppo controllo e risulta avere una media più elevata sia nel sottogruppo che include soggetti con il maggior numero di fattori di rischio che in quello con la presenza bilaterale di placche carotidee. È noto che i leucociti svolgono un ruolo decisivo nello sviluppo e nella progressione dell'aterosclerosi a causa della loro attivazione che giocoforza tende a ripercuotersi sulla loro reologia, sulla espressione delle molecole di adesione, e anche sulla produzione di citochine e di enzimi proteolitici e delle specie reattive dell'ossigeno (ROS).

I sottotipi leucocitari risultano correlati ad alcuni fattori di rischio ed infatti la glicemia basale e l'ipertensione arteriosa risultano essere in stretta correlazione con i neutrofili, l'uricemia con i neutrofili e i monociti, mentre il fumo sembra correlato a tutti i sottotipi (Kokaman et al, 2011). Sebbene il ruolo dei neutrofili risulta ben codificato nella malattia aterosclerotica, meno conosciuto è quello dei linfociti, anche se è stato suggerito che il ridotto numero di linfociti possa ritenersi un predittore negativo di ischemia miocardica e di mortalità cardiovascolare (Ommen et al, 1997; Nunez et al, 2008). Diversi sono gli studi retrospettivi e non (Hyun et al, 2015; Koklu et al, 2016; Jiang et al, 2017) che hanno riguardato il comportamento dell'NLR in soggetti con aterosclerosi carotidea extracranica e non extracranica dai quali emerge che detto rapporto può essere utile non solo per predire l'entità della stenosi carotidea ma anche quale predittore dell'ictus ischemico acuto. Al riguardo risulterà di particolare interesse rivalutare lo stesso rapporto nel prosieguo di tempo.

Nel gruppo dei soggetti con APC, il marcato coinvolgimento del pattern MMP/TIMP è più che palese. Quanto riscontrato a carico delle gelatinasi e dei loro inibitori tissutali, si poteva solo in parte prevedere tenuto conto dei numerosi fattori di rischio presenti nel campione preso in esame. Il dato complessivo da considerare è di certo l'aumento significativo delle gelatinasi contestualmente associato a quello dei rapporti tra ciascuna di essa e il suo principale fisiologico inibitore.

Nell'intero campione e nella suddivisione riguardante sia i fattori di rischio che la presenza uni o bilaterale di placche aterosclerotiche carotidiche risulta costante la riduzione della concentrazione del TIMP-1 rispetto al gruppo controllo. Questa riduzione del TIMP-1 spiega la mancata relazione fra MMP-9 e TIMP-1 registrata nell'intero gruppo dei soggetti che non viene osservata allorquando la suddetta correlazione è stata esaminata tra MMP-2 e TIMP-2.

Qualche altro utile spunto sembra emergere allorquando l'intero gruppo è stato suddiviso in normo e ipercolesterolemici o in presenza di familiarità o meno per malattie cardiovascolari. Tra normo e ipercolesterolemici è evidente una variazione del TIMP-2 mentre la familiarità sembra intervenire sul comportamento del TIMP-1.



Tuttavia quanto riscontrato relativamente al pattern MMP/TIMP si allinea in massima parte a quanto finora è stato osservato nei soggetti dislipidemici, negli ipertesi, nei diabetici, negli obesi e nei soggetti con sindrome metabolica.

Nei soggetti con dislipidemia mista, a dire il vero, non tutte le concentrazioni delle gelatinasi sono risultate più elevate rispetto ai controlli (Derosa et al, 2009). Analogo risultato è stato registrato in soggetti con dislipidemia familiare mista confrontati con soggetti affetti da sindrome metabolica (Beaudeau et al, 2003; Cicero et al, 2007). In soggetti dislipidemici asintomatici, altri autori hanno messo in evidenza come il pattern MMP/TIMP risultava più alterato in quelli che presentavano placche aterosclerotiche carotidee (Xu et al, 1999) mentre in corso dello stesso studio sono state riscontrate significative correlazioni tra MMP-9 e LDL colesterolo e tra MMP-9 e rapporto colesterolo totale/HDL-colesterolo (Xu et al, 1999). Anche in soggetti con ipercolesterolemia familiare sono stati osservati elevati livelli di MMP-9 e TIMP-1 (Malik et al, 2005); variazioni sovrapponibili dello stesso pattern sono stati osservati in soggetti con isolata ipercolesterolemia (Ercan et al, 2004). Altri autori invece si sono addirittura spinti a ritenere che le concentrazioni plasmatiche della MMP-9 possono essere considerate indicatori precoci di aterosclerosi (Jormisio et al, 2001).

Anche nei soggetti ipertesi l'alterazione del pattern MMP/TIMP è stata precedentemente riscontrata (Derosa et al, 2006; Fontana et al, 2011); altri autori (Tan et al, 2007) hanno evidenziato inoltre una positiva correlazione tra MMP-9 e TIMP-1 con la pulse wave velocity carotido-femorale. Dati interessanti sono quelli che hanno analizzato il pattern MMP/TIMP allorchè la malattia ipertensiva si associava all'insufficienza renale cronica (Friese et al, 2009). Esaminando una sub popolazione del Framingham Offspring Study è stato anche accertato che soggetti con valori elevati di MMP-9 presentavano un rischio più alto di sviluppare nel tempo elevati valori pressori rispetto a quelli con livelli più bassi di MMP-9 (Dhingra et al, 2009). Il pattern MMP/TIMP sembra risultare più alterato allorquando la malattia ipertensiva si associa a ipertrofia ventricolare sinistra (Franz et al, 2009) sebbene altri autori (Li-Saw-Hee et al, 2000) non avevano in precedenza osservato tale dipendenza tra livelli di metalloproteasi e massa ventricolare sinistra.

Diverse sono le informazioni che riguardano il comportamento delle metalloproteasi e dei loro inibitori nella malattia diabetica. Alcuni autori non hanno evidenziato differenza alcuna nella concentrazione di MMP-2 e MMP-9 tra diabetici e soggetti controlli (Papazafiropoulou et al, 2010). Nei diabetici di tipo 1 sono state descritte elevate concentrazioni di MMP-2, MMP-9 e TIMP-1 (Maxwell et al, 2001); le stesse variazioni sono state osservate in diabetici di tipo 2 e in particolare in quelli complicati da patologia coronarica (Derosa et al, 2007). Da altri (Zayani et al, 2012), in diabetici di tipo 2, sono state invece documentate alterazioni funzionali delle gelatinasi e ridotte concentrazioni del TIMP-1 e del TIMP-2.

Nei soggetti obesi, i dati relativi al pattern MMP/TIMP non sono univoci. È opportuno considerare nelle considerazioni conclusive anche l'obesità (MBI >30 Kg/m<sup>2</sup>) in quanto il 27.8 % dell'intero campione dei soggetti con APC presentava questi valori del Body Mass Index. Da alcuni autori (Kosmala et al, 2008) in donne obese sono state osservate, rispetto alle normopeso, più alte concentrazioni di MMP-9 e TIMP-1 associate a bassi livelli di MMP-2; altri (Derosa et al, 2008) hanno invece osservato, in soggetti obesi aumentati livelli delle due gelatinasi. L'alterato comportamento delle gelatinasi, associato o meno a quello dei loro inibitori, sembra essere confermato anche dai dati più recenti di altri autori (Andrade et al, 2012; Luizon et al, 2016). Dieta ipocalorica, dieta associata ad esercizio, dieta associata ad esercizio più metformina e infine la chirurgia bariatrica sono state finora le strategie messe in atto per migliorare l'alterato rapporto MMP/TIMP in questa patologia.

Infine, considerando che il 37.5 % dei soggetti presi in esame sembrava presentare una sindrome metabolica, abbiamo ritenuto utile esaminare a tale riguardo i dati della letteratura. Alcuni autori (Goncalves et al, 2009) hanno descritto nella sindrome metabolica un significativo incremento della pro-MMP-9 e del TIMP-1 senza alcuna variazione del TIMP-2 e della MMP-2; altri (Mieczkowska et al, 2011) hanno invece documentato l'incrementata attività funzionale della MMP-9 e del TIMP-1. L'aumentata concentrazione plasmatica delle gelatinasi, dei loro inibitori e dei loro rispettivi rapporti è stata riscontrata in un gruppo di 90 soggetti affetti da tale sindrome (Hopps et al, 2013).

Tenendo conto di quanto ora accertato nel campione dei soggetti con aterosclerosi preclinica relativamente al pattern MMP/TIMP e considerando i molteplici fattori di rischio cardiovascolari presenti nei soggetti di questa casistica, non ci si può non soffermare sul fatto che la scelta di farmaci da impiegare per ciascuno di detti fattori non tenga conto di questo squilibrio relativo alle due gelatinasi e a loro inibitori tissutali. Nei soggetti ipercolesterolemici quindi il trattamento con statine dovrà considerare che l'atorvastatina (Ercan et al, 2004; Malik et al, 2005), la pravastatina (Kalela et al, 2001), la simvastatina (Koh et al, 2002; Koh et al, 2004), ed in parte la rosuvastatina (Qu et al, 2009, Cevik et al, 2011) tendono a migliorare l'equilibrio riguardante le metalloproteasi e i loro inibitori.

Diverse sono anche le ricerche che hanno studiato l'azione di alcuni farmaci antipertensivi sulla concentrazione e l'attività funzionale delle metalloproteasi. Questi farmaci includono gli ACE inibitori e gli inibitori dei recettori dell'angiotensina quali enalapril, lisinopril, trandolapril, candesartan, irbesartan, telmisartan (Onal et al, 2009; Hopps et al, 2017); sembrano svolgere questa stessa azione anche i calcio antagonisti quali lercarnidipina, azelnidipina e barnidipina e i diuretici quali spironolattone, eplerenone e canrenone (Hopps et al, 2017). Migliorano il pattern MMP/TIMP diverse molecole ipoglicemizzanti tra le quali metformina, glibenclamide e pioglitazone sono di certo quelle più considerate (Hopps et al, 2015). Anche la sospensione del fumo, (il 50 % dei soggetti inclusi nell'intero gruppo sono fumatori o ex fumatori) dovrà essere debitamente considerata in quanto sia in studi clinici (Lo et al, 2018) che sperimentali (Ghosh et al, 2015) risulta accertato che il fumo stimola la sintesi delle gelatinasi.

Non di agevole interpretazione risultano i dati relativi al profilo emoreologico osservati nell'intero campione di soggetti con aterosclerosi carotidea preclinica. All'aumento della viscosità ematica, allo shear rate più elevato e all'incremento dei rapporti  $VE/Htc \times 100$ , non sia associa infatti l'incremento della viscosità plasmatica la cui media risulta di certo più elevata rispetto al gruppo controllo, anche se non statisticamente significativa. Il dato quindi, nel suo insieme, sembra discostarsi soprattutto da quanto è stato riportato da alcuni autori (Peters et al, 2017) nello studio Scottish Heart Health Extended Cohort i cui dati sintetizzano una ricerca durata 17

anni e che ha incluso 3386 uomini e donne di età compresa tra 30 e 74 anni. Il lavoro, che tra l'altro richiama precedenti ricerche, mette in relazione la presenza di mortalità per malattie cardiovascolari e di mortalità totale con i valori della viscosità plasmatica, della viscosità ematica (assoluta, corretta e relativa) e con l'ematocrito. Da questa complessa analisi emerge che sebbene viscosità ematica e plasmatica abbiano un sicuro ruolo nella patogenesi della malattia e della mortalità cardiovascolare, contestualmente ai principali fattori di rischio cardiovascolari tradizionali, risulta tuttavia essere la viscosità del plasma ad avere un incontrovertibile ruolo discriminante.

Nella nostra ricerca anche la suddivisione dell'intero campione sulla base della colesterolemia, dei valori tensivi arteriosi e della familiarità per malattie cardiovascolari, non sembra operare alcuna effettiva distinzione. Assai diverso risulta il comportamento del profilo emoreologico nella suddivisione effettuata per numero di fattori di rischio e per sede (uni o bilaterale delle placche aterosclerotiche carotidee). Soprattutto nella suddivisione per fattori di rischio viene fuori che nel sottogruppo con 3-5 fattori di rischio, non solo risulta significativamente aumentata la viscosità ematica, ma anche quella plasmatica; quest'ultima risulta addirittura incrementata non solo nei confronti del gruppo controllo ma anche nei confronti del sottogruppo con 0-2 fattori di rischio. Nella stessa suddivisione per fattori di rischio, dato interessante è quello riguardante l'aggregabilità eritrocitaria. Viscosità plasmatica e aggregabilità eritrocitaria non sembrano invece essere influenzate dalla estensione delle placche aterosclerotiche carotidee stimate con la loro presenza uni o bilaterale.

Nel campione dei soggetti con APC sono i fattori di rischio tradizionali ad influenzare il pattern emoreologico; quest'ultimo risente tra l'altro anche dei livelli dei lipidi plasmatici. Molte ricerche hanno riguardato, nelle decadi precedenti, l'associazione tra lipidi plasmatici e proprietà reologiche del sangue (Jung et al, 1992; Koenig et al, 1992; Brun et al, 1993; Crowley et al, 1994; Eterovic et al, 1995; Sloop et al, 1997; Rosenson et al 2001; Rosenson et al, 2002), mentre recentemente altri autori (Irace et al, 2014) hanno accertato che il colesterolo LDL e HDL influenzano, anche se limitatamente, la viscosità del plasma ma non quella ematica. Molteplici sono i dati

che riguardano il comportamento emoreologico nell'ipertensione arteriosa e nel diabete mellito così come risulta emergere da una recente rassegna (Caimi et al, 2018). Analogamente tanti sono i dati che hanno riguardato le variazioni del profilo emoreologico evidenziate sia nell'obesità che nella sindrome metabolica.

Nei soggetti obesi alcune ricerche hanno evidenziato soprattutto l'incremento della viscosità plasmatica (Ercan et al, 2006); altre hanno confermato l'incremento della viscosità plasmatica evidenziando anche un significativo aumento della viscosità ematica ad ematocrito corretto (Sola' et al, 2007). In quest'ultima ricerca è stato evidenziato che viscosità plasmatica e viscosità ematica ad ematocrito nativo erano in grado di discriminare gli obesi con BMI <45 kg/m<sup>2</sup> da quelli con BMI ≥ 45 kg/m<sup>2</sup>. Altri autori (Vaya et al, 2014) invece, esaminando un gruppo di 395 soggetti sani, hanno ipotizzato che obesità addominale e BMI sono da ritenersi predittori indipendenti del profilo emoreologico, mentre altri ancora (Guiraudou et al, 2013) hanno dimostrato delle positive correlazioni tra viscosità ematica e BMI e tra viscosità ematica e rapporto vita/fianchi; nella stessa ricerca, significativa è risultata la correlazione tra viscosità plasmatica e aggregabilità eritrocitaria e tra quest'ultima e il BMI (Guiraudou et al, 2013). Nello stesso studio, che ha incluso un campione di 129 donne obese, la viscosità ematica si correlava addirittura sia alla percentuale di massa grassa che di massa magra valutate mediante tecnica bioimpedenziometrica (Guiraudou et al, 2013).

Alterazioni emoreologiche sono state osservate in soggetti con sindrome metabolica (Lo Presti et al, 2002; Zhang et al, 2006; Vaya et al, 2011); dette alterazioni sembrano coinvolgere quasi tutte le determinanti emoreologiche ma in modo particolare la viscosità ematica e plasmatica e l'aggregabilità eritrocitaria. Da questi studi emerge inoltre che il comportamento emoreologico non sempre sembra variare al variare del numero delle componenti della sindrome stessa. Assai interessante risulta essere il dato osservato da alcuni autori (Lo Presti et al, 2002) riguardante invece la correlazione tra viscosità plasmatica e gli indicatori di insulino-resistenza valutata con la tecnica del clamp euglicemico iperinsulinemico.

Una evidente alterazione emoreologica è stata riscontrata non solo nei fumatori (Almarshard et al, 2016) ma anche negli ex fumatori (Os et al, 2003; Alkan et al, 2014; Ergun et al, 2016). Questa considerazione merita di essere sottolineata considerando che il 50 % dei soggetti esaminati dichiarava di essere fumatore o ex fumatore. Smettere di fumare, tra l'altro, sembra comportare, tra la miriade di benefici, anche la riduzione già a tre mesi della viscosità ematica (Shimanda et al, 2011).

In conclusione:

- nell'intero campione di soggetti con aterosclerosi carotidea preclinica, quanto osservato a carico dei diversi parametri presi in esame sembra quasi del tutto addebitabile alla presenza dei fattori di rischio; solo 4 soggetti dell'intero campione infatti non presentavano alcun fattore di rischio.
- Il risultato più eclatante riguarda di certo il comportamento del pattern MMP/TIMP sebbene qualche dato di un certo interesse sembra aversi anche nei riguardi del profilo emoreologico.
- Splittando i dati sulla scorta del numero dei fattori di rischio si riesce meglio a delineare il comportamento della viscosità plasmatica; al riguardo risulta ormai validato il legame tra quest'ultima e il rischio di malattie cardiovascolari così come la relazione che sussiste tra la viscosità plasmatica e la severità della malattia vascolare aterosclerotica.
- Quanto accertato sembra tra l'altro avere il vantaggio di potere operare strategie terapeutiche mirate considerando che molte molecole impiegate nella terapia ipolipemizzante, antiipertensiva e ipoglicemizzante esercitano una indiscussa influenza sul pattern MMP/TIMP e parzialmente anche sul profilo emoreologico.
- Indirettamente i dati più salienti dell'intero progetto risultano essere un monito a sollecitare tutti i soggetti portatori di uno o più fattori di rischio a sottoporsi ad una periodica valutazione ecocolordoppler dei vasi epiaortici.

## **BIBLIOGRAFIA**

Alan S, Ulgen M, Ozturk O. Relation between coronary artery disease, risk factors and intima-media thickness of carotid artery, arterial distensibility and stiffness index. *Angiology* 2003; 54:261-7.

Alkan FA, Cakmak G, Karis D et al. The evaluation of plasma viscosity and endothelial dysfunction in smoking individuals. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 2014; 58: 403-413.

Almarshad HA, Hassan FM. Alterations in blood coagulation and viscosity among young male cigarette smokers of Al-Jouf region in Saudi Arabia. *Clinical and applied Thrombosis/Hemostasis* 2016; 22: 386-89.

Alvarez B, Ruiz C, Chacon P et al. Serum values of metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 as relates to unstable plaque and inflammatory cells in patients with greater than 70 % carotid artery stenosis. *J Vasc Surg* 2004; 40: 469-75.

Amalinei C, Căruntu ID, Giușcă SE et al. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Rom J Morphol Embryol.* 2010; 51(2): 215-22.

Amalinei C, Caruntu ID, Balan RA. Biology of metalloproteinases. *Rom J Morphol Embryol* 2007; 48: 323-334.

Andrade VL, Petruceli E, Belo VA et al. Evaluation of plasmatic MMP-8, MMP-9;TIMP-1 and MPO levels in obese and lean women. *Clin Biochem* 2012; 45 (6): 412-5.

Andreadou I, Iliodromitis EK, Rassaf T et al. The role of gastransmitters NO, H<sub>2</sub>S and CO in myocardial ischaemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning and remote conditioning, *Br. J. Pharm.* 2015; 172: 1587–1606.

Arbel Y, Finkelstein A, Halkin A et al. Neutrophil/lymphocyte ratio is related to the severity of coronary artery disease and clinical outcome in patients undergoing angiography. *Atherosclerosis* 2012; 225: 456–60.

Assayag E.B, Bova I, Kesler A et al. Erythrocyte aggregation as an early biomarker in patients with asymptomatic carotid stenosis. *Disease Markers* 2008; 24: 33–39.

Baker CW, Anderson KW, Beaty MM. Decreased red blood cell membrane deformability in smokers and non-smokers with atherosclerosis. *Clinical Hemorheology* 1993; 13: 671-678.

Balta S, Kurtoglu E, Kucuk U et al. Neutrophil-lymphocyte ratio as an important assessment tool. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2014; 12 (5): 537–8.

Baroncini LA, Pazin AF, Murta LO et al. Videodensitometric analysis of advanced carotid plaque: correlation with MMP-9 and TIMP-1 Expression. *Cardiovascular ultrasound* 2011; 9: 24.

Baskurt OK. *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*. IOS Press 2007

Beaudeau JL, Giral P, Bruckert E et al. Serum matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 as potential markers of carotid atherosclerosis in infraclinical hyperlipidemia. *Atherothrombosis. Curr Atherosler Rep.* 2011; 13: 162-169.

Bhat T, Teli S, Rijal J et al. Neutrophil to lymphocyte ratio and cardiovascular diseases: a review. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2013; 11 (1): 55–9.

Brun J.F., Fons C., Supparo I et al. Orsetti, Relationships between metabolic and hemorheologic modifications associated with overweight, *Clinical Hemorheology* 1993; 13:201–213.

Cabel M, Meiselman HJ, Popel AS, Johnson PC (1997) Contribution of red blood cell aggregation to venous vascular resistance in skeletal muscle. *Am J Physiol* 272 (2): 1020–32.

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87 (10): 840-4.

Caimi G, Contorno A, Serra A et al. Red cell metabolic parameters and rheological determinants in essential hypertension. *Clin Hemorheol* 1993; 13(1): 35–44.

Caimi G. Erythrocyte and polymorphonuclear leukocyte rheology in diabetes mellitus. *Clin Hemorheol Microcirc* 2013; 54: 131.

Caimi G, Hopps E, Urso C et al. The role of secondary hemorheological disorders in the pathophysiology of leg ulcers in several clinical conditions. *Wounds International*, 2018.Epub.

Carallo C, Pujia A, Irace C et al. Whole blood viscosity and haematocrit area associated with internal carotid atherosclerosis in men. *Coronary Artery Disease* 1998; 9:113-117.

Cerletti C, De Gaetano G. Current concepts of platelet physiopathology. *Int J Artif Organs* 1993;16 (5): 205-8.

Cevik C, Nugent K, Meyerrose G et al. Rosuvastatin therapy does not affect serum MMP-1 3 or TIMP-1 levels in hypercholesterolemic patients. *Tex Heart Inst J* 2011; 38: 229-233.



Cheng C, Noordeloos AM, Jeney V et al. Heme oxygenase 1 determines atherosclerotic lesion progression into a vulnerable plaque, *Circulation* 2009; 119: 3017–27.

Cicero AF, Derosa G, Manca M et al. Vascular remodeling and prothrombotic markers in subjects affected by familial combined hyperlipidemia and /or metabolic syndrome in primary prevention for cardiovascular disease. *Endothelium* 2007; 14 (4-5): 193-198.

Cimmino G, Ragni M, Cirillo P et al. C-reactive protein induces expression of matrix metalloproteinase-9: a possible link between inflammation and plaque rupture. *Int J Cardiol* 2013; 168(2):981-6.

Crowley JP, Metzger J, Assaf A et al. Low density lipoprotein and whole blood viscosity, *Ann Clin Lab Sci* 1994; 24: 533–541.

Danesh J, Collins R, Appleby P et al. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. *JAMA*. 1998; 279:1477–1482.

Danesh J, Collins R, Peto R et al. Haematocrit, viscosity, erythrocyte sedimentation rate: Meta-analyses of prospective studies of coronary heart disease, *European heart journal* 2000; 21: 515–520.

Death AK, Fisher EJ, McGrath KC et al. High glucose alters matrix metalloproteinase expression in two key vascular cells: potential impact on atherosclerosis in diabetes. *Atherosclerosis* 2003;168 (2): 263-9.

Den Hartog AG, Achterberg S, Molletal FL. Asymptomatic carotid artery stenosis and the risk of ischemic stroke according to subtype in patients with clinical manifest arterial disease, *Stroke* 2013; 44: 1002–1007.

Derosa G, D'Angelo A, Cicarelli L et al. Matrix metalloproteinase-2, -9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in patients with hypertension. *Endothelium* 2006; 13: 227-31.

Derosa G, D'Angelo A, Scalise F et al. Comparison between metalloproteinases-2 and -9 in healthy subjects, diabetics and subjects with acute coronary syndrome. *Heart vessels* 2007; 22:361-70.

Derosa G, Ferrari I, D'Angelo A et al. Matrix metalloproteinase-2 and -9 levels in obese patients. *Endothelium* 2008; 15: 219-24.

Derosa G, Maffioli P, D'Angelo A et al. Evaluation of metalloproteinase 2 and 9 levels and their inhibitors in combined dyslipidemia. *Clin Invest Med* 2009; 32(2): 124-32.

Dhingra R, Pencina Mj, Schrader P et al. Relations of matrix remodeling biomarkers to blood pressure progression and incidence of hypertension in the community. *Circulation* 2009; 119: 1101-7.

Dragu R, Huri S, Zuckerman R, et al. Predictive value of white blood cell subtypes for long-term outcome following myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2008; 196 (1): 405-12. (Epub 2006).

Ercan E, Tengiz I, Altuglu I et al. Atorvastatin treatment decreases inflammatory and proteolytic activity in patients with hypercholesterolemia. *Kardiol Pol* 2004; 60: 454-458.

Ergun DD, Karis D, Alkan FA Effects of cigarette smoking on hemorheologic parameters, plasma osmolality and lung function Dilek Duzgun. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 2016; 63: 313-24.

Ernst E, Koenig W. Hemorheology, thrombogenesis, and atherosclerosis. *Semin Thromb Hemost* 1993; 19: 99-103.

Eterovic I, Pintaric J, Tocilj Z. Determinants of plasma viscosity in primary hyperlipoproteinemias, *Clin Hemorheol* 1995;15 (6): 841–850.

Fernandez F, Penalvo J, Fernandez A et al. Prevalence, Vascular Distribution, and Multiterritorial Extent of Subclinical Atherosclerosis in a Middle-Aged Cohort: The PESA (Progression of Early Subclinical Atherosclerosis) Study. *Circulation* 2015; 131 (24): 2104-13.

Fernandez-Ortiz A, Jimenez-Borreguero LJ, Penalvo JL. The progression and early detection of subclinical atherosclerosis (PESA) study: rationale and design. *Am Heart J* 2013;1666: 990-998.

Ferroni P et al. Serum metalloproteinase 9 levels in patients with coronary artery disease: a novel marker of inflammation. *J Invest Med* 2003; 51:295-300.

Fontana V, Silva PS, Belo VA et al. Consistent alterations of circulating matrix metalloproteinases levels in untreated hypertensives and in spontaneously hypertensive rats: a relevant pharmacological target. *Basic clin pharmacol toxicol* 2011; 109 (2): 130-7.

Forstermann U, Kleinert H, Gath I et al. Expression and expressional control of nitric oxide synthases in various cell types. *Adv Pharmacol* 1995; 34: 171-86.

Franz M, Berndt A, Altendorf-Hofmann A et al. Serum levels of large tenascin-C variants, matrix metalloproteinase-9, and tissue inhibitors of metalloproteinases in concentric versus eccentric left ventricular hypertrophy. *Eur J Heart Fail* 2009; 11:1057-62.

Friese RS, Rao F, Khandrika S et al. Matrix metalloproteinases: discrete elevations in essential hypertension and hypertensive end-stage renal disease. *Clin Exp Hypertens* 2009; 31:521-33.

Gaehdgens P, Pries AR, Ley K. Structural, hemodynamic and rheological characteristics of blood flow in the circulation. In: Chien S, Dormandy J, Ernst E, Matrai (Eds) *Clinical Hemorheology*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht 1987, pp.97-124.

Ghosh A, Pechota A, Coleman D et al. Cigarette smoke-induced MMP-2 and MMP-9 secretion from aortic vascular smooth cells is mediated via the Jak/Stat pathway. *Hum Pathol*. 2015 Feb; 46 (2): 284-94.

Gillum RF, Mussolino ME, Madans JH. Counts of neutrophils, lymphocytes, and monocytes, cause-specific mortality and coronary heart disease: the NHANES-I epidemiologic follow-up study. *Ann Epidemiol*. 2005; 15:266-71.

Goldstein LB, Bushnell CD, Adams RJ, et al. Guidelines for the primary prevention of stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2011; 42: 517-584.

Goncalves FM, Jacob-Ferriera ALB, Gomes V et al. Increased circulating levels of matrix metalloproteinase MMP-8, MMP-9 and pro-inflammatory markers in patients with metabolic syndrome. *Clin Chim Acta* 2009; 403:173-177.

Gori T. Viscosity, platelet activation and hematocrit: progress in understanding their relationship with clinical and subclinical vascular disease. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 2011; 49:37-42.

Graner M, Varpula M, Kahri J et al. Association of carotid intima-media thickness with angiographic severity and extent of coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2006; 97: 624-9.

Guasti L, Dentale F, Castigliani L et al. Neutrophils and clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes and/or cardiac revascularisation. A systematic review on more than 34,000 subjects. *Thromb. Haemost.* 2011; 106: 591-599.

Guiraudou M, Varlet-Marie E, Raynaud de Mauverger E et al. Obesity-related increase in whole blood viscosity includes different profiles according to fat localization. *Clin Hemorheol and microcirc* 2013; 55: 63-73.

Hansson J, Vasan RS, Anlov E et al. Biomarkers of extracellular matrix metabolism (MMP-9 and TIMP-1) and risk of stroke, myocardial infarction, and cause-specific mortality: Cohort study. *PLOS ONE* 2011; 6: e16185.

Harrison M.J, Kendall B.E, Pollock S. et al. Effect of haematocrit on carotid stenosis and cerebral infarction, *Lancet* 1981; 2:114–115.

Ho E, Galougahi K, Liu C et al. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biology* 2013; 1: 483-91.

Hoffman M, Blum A, Baruch R, et al. Leukocytes and coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 2004; 172:1-6.

Hopps E, Camera A, Caimi G. Polimorphonuclear leukocytes and diabetes mellitus. *Minerva Med* 2008; 99 (2): 197-202.

Hopps E, Lo Presti R, Montana M et al. Gelatinases and their tissue inhibitors in a group of subjects with metabolic syndrome. *J Invest Med* 2013; 61: 978-83.

Hopps E, Caimi G. Matrix metalloproteases as a pharmacological target in cardiovascular diseases. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2015; 19: 2583-89.

Hopps E, Lo Presti R, Caimi G. Matrix Metalloproteases in Arterial Hypertension and their Trend after Antihypertensive Treatment. *Kidney Blood Press Res* 2017; 42: 347-357.

Horne BD, Anderson JL, John JM et al. Which white blood cell subtypes predict increased cardiovascular risk? *J Am Coll Cardiol* 2005; 45 (10): 1638–43.

Horne BD, Anderson JL, John JM, et al. Intermountain Heart Collaborative Study Group: Which white blood cell subtypes predict increased cardiovascular risk? *J Am Coll Cardiol*. 2005; 45:1638–43.

Husain K, Hernandez W, Ansari RA et al. Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis. *World J Biol Chem* 2015; 6 (3): 209-217.

Hyun S, Kwon S, Cho S et al. Can the Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Appropriately Predict Carotid Artery Stenosis in Patients with Ischemic Stroke?-A Retrospective Study.*J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2015; 11: 2646-51.

Inzitari D, Eliasziw M, Gates P et al. The causes and risk of stroke in patients with asymptomatic internalcarotid-artery stenosis. North American symptomatic Carotid Endarterectomy trial Collaborators, *New Engl. J. Med* 2000; 342: 1693-1700.

Irace C, Carallo C, Scavelli F et al. Influence of blood lipids on plasma and blood viscosity. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2014;57(3):267-74.

Jiang H, Zhang J, Wu J. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Correlates with Severity of Extracranial Carotid Stenosis-A Study Using Digital Subtraction Angiography. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 2017; 26 (6):1182–90.

Jormisjo S, Whatling C, Walter DH et al. Allele-specific regulation of matrix metalloproteinase-7 promoter activity is associated with coronary artery luminal dimension among hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1834-9.

Jung F., Pindur G., Kiesewetter H. Plasma, Viscosity Dependence on Proteins And Lipoproteins: Results Of The Aachen-Study, *Clin Hemorheol* 1992;12: 557-571.

Junker R, Heinrich J, Ulbrich H et al. Relationship between plasma viscosity and the severity of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 870-875.

Kai H, Ikeda H, Yasukawa H et al. Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and 9 are elevated in patients with acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 368-372.

Kalay N, Dogdu O, Koc F et al. Hematologic parameters and angiographic progression of coronary atherosclerosis. *Angiology* 2012; 63:213-7.

Kalela A, Laaksonen R, Lehtimäki T et al. Effect of pravastatin in mildly hypercholesterolemic young men on serum matrix metalloproteinases. *Am J Cardiol* 2001; 88: 173-175.

Kar S, Subbaram S, Carrico PM et al. Redox-control of Matrix Metalloproteinase-1: a critical link between free radicals, matrix remodeling and degenerative disease. *Respir Physiol Neurobiol*. 2010;174 (3): 299-306.

Kesmarky G, Kenyeres P, Rabai M et al. Plasma viscosity: a forgotten variable. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 2008; 39: 243-246.

Kirtane AJ, Bui A, Murphy SA, et al. Association of peripheral neutrophilia with adverse angiographic outcomes in ST-elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2004; 93:532–6.

Klein T, Bishoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino acids* 2011; 41:271-90.

Kloner RA, Giacomelli F, Alker KJ et al. Influx of neutrophils into the walls of large epicardial coronary arteries in response to ischemia/reperfusion. *Circulation* 1991; 84: 1758-72.

Kokaman SA, Sahinarslan A, Kunak T et al. The particular interactions of the traditional cardiovascular risk factors with different circulating specific leukocyte subtype counts in blood: An observational study, *Anadolu Kardiyoloji Dergisi* 2011; 11: 573-581.

Koenig W, Sund M, Filipiak B et al. Plasma viscosity and the risk of coronary heart disease: results from the MONICA-Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18 (5): 768-72.

Koenig W, Sund M, Ernst E et al. Association between rheology and components of lipoproteins in human blood; results from the MONICA project, *Circulation* 1992; 85: 2197–2204.

Koh K, Son Jw, Ahn JY et al. Comparative effects of diet and statin on NO bioactivity and matrix metalloproteinases in hypercholesterolemic patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: e19-e23.

Koh K, Ahn Jy, Jin DK et al. Comparative effects of statin and fibrate on nitric oxide bioactivity and matrix metalloproteinase in hyperlipidemia. *Int J Cardiol* 2004; 97: 239-244.

Köklü E, Yüksel IO, Arslan S et al. Is Elevated Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio a Predictor of Stroke in Patients with Intermediate Carotid Artery Stenosis? *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 2016; 25 (3): 578–584.

Kosmala W, Plaksej R, Przewlock-Kosmala M et al. Matrix metalloproteinase 2 and 9 and their tissue inhibitors 1 and 2 in premenopausal obese women: relationship to cardiac function. *Int J Obes* 2008; 32:763-71.

Lassale C, Curtis A, Abete I et al. Elements of the complete blood count associated with cardiovascular disease incidence: Findings from the EPIC-NL cohort study. *Sci Rep.* 2018; 8 (1):3290.

Leary DH, Polak JF, Kronmal RA et al. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. *Cardiovascular Health Study Collaborative research group. New Eng J Med* 1999; 340:14-22.

Lee AJ. The role of rheological and haemostatic factors in hypertension. *J Hum Hypertens* 1997; 11 (12): 767–6.

Lee J, Mowbray PI, Lowe GD et al. Blood viscosity and elevated carotid intima-media thickness in men and women: The Edinburgh Artery Study. *Circulation* 1998; 97: 1467–1473.

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.

Lee YH, Cui LH, Shin MH et al. Associations between carotid-media thickness, plaque and cardiovascular risk factors. *J Prev Med Public Health* 2006; 39: 477-84.

Levenson J, Gariépy M, Del-Pino et al. Association of plasma viscosity and carotid thickening in a French working cohort, *Am J Hypertens* 2000; 13: 753–758.

Li T, Tian H, Zhao Y et al. Heme oxygenase-1 inhibits progression and destabilization of vulnerable plaques in a rabbit model of atherosclerosis, *Eur. J. Pharm* 2011; 672:143–152.

Li-Saw-Hee FL, Edmunds E, Blann AD et al. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor metalloproteinase-1 levels in essential hypertension. Relationship to left ventricular mass and anti-hypertensive therapy. *Int J Cardiol* 2000; 75:43-7.

Lo CY, Huang HY, He JR et al. Increased matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio in smokers with airway hyperresponsiveness and accelerated lung function decline. *International Journal of COPD* 2018;13: 1135-44.

Lo Presti R, Sinagra D, Montana M et al. Haemorheological profile in metabolic syndrome. *Clinical Hemorheology and microcirculation* 2002; 26: 241-247.

Lo Presti R, Hopps E, Caimi G. Hemorheological abnormalities in human arterial hypertension. *Korea-Australia Rheol J* 2014; 26 (2): 199–204.

Loftus IM, Naylor AR, Goodall S et al. Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques. A potential role in acute plaque disruption. *Stroke* 2000; 31: 40-47.

Lorenz MW, Markus HS, Bots ML et al. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness. A systematic review and meta-analysis. *Circulation* 2007;115: 459-67.

Lowe GD. Rheological influences on thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 1999; 12 (3): 435-49.

Luizon MR, Belo VA, Fernandes KS et al. Plasma matrix metalloproteinase-9 levels, MMP-9 gene haplotypes, and cardiovascular risk in obese subjects. *Mol Biol Rep* 2016; 43 (6): 463-71.

Madisetty MK, Kumaraswami K, Katkam S et al. Assessment of Oxidative Stress Markers and Carotid Artery Intima-Media Thickness in Elderly Patients Without and with Coronary Artery Disease. *Ind J Clin Biochem* 2016; 31 (3): 278-285.

Madjid M, Fatemi O. Components of the complete blood count as risk predictors for coronary heart disease: in-depth review and update. *Tex. Heart Inst. J.* 2013; 40: 17–29.

Majer M, Gackowski D, Różalski R et al. Systemic oxidoreductive balance and vascular function in individuals without clinical manifestation of atherosclerosis. *Arch Med Sci Atheroscl Dis* 2017; 2: 37-45.

Malik J, Stulc T, Ceska R. Matrix metalloproteinases in isolated hypercholesterolemia. *Int Angiol* 2005; 24 (3): 300-303.

Mallat Z, Nakamura T, Ohan J. The relationship of hydroxyeicosatetraenoic acids and F2-isoprostanes to plaque instability in human carotid atherosclerosis. *J Clin Invest* 1999;103: 421-427.

Marossy A, Svorc P, Kron I et al. Hemorheology and circulation. *Clin Hemorheol Microcirc* 2009; 42 (4): 239-58.

Maxwell PR, Timms PM, Chandran S et al. Peripheral blood level alterations of TIMP-1, MMP-2 and MMP-9 in patients with type 1 diabetes. *Diabet Med* 2001;18: 777-80.

Mieczkowska J, Mosiewicz J, Barud W et al. Changes in the activity of connective tissue matrix enzymes in the metabolic syndrome. *Arch Med Sci* 2011; 7: 634-642.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-42.

Morrow JD. Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 5: 279–286.

Nam SH, Kang SG, Song SW. The neutrophil-lymphocyte ratio is associated with coronary artery calcification in asymptomatic Korean males: a cross-sectional study. *Biomed Res Int* 2017; 2017: 1989417.

Newby AC. Metalloproteinases expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 2108-2114.



Niculescu L, Stancu C, Sima A et al. the total peroxyl radical trapping potential in serum- an assay to define the stage of atherosclerosis. *J Cell Mol Med* 2001; 5 (3): 285-94.

Nilsson L, Wieringa WG, Pundziute G et al. Neutrophil/Lymphocyte ratio is associated with non-calcified plaque burden in patients with coronary artery disease. *PLoS One*. 2014; 30 (9):e108183.

Novo S. Aterosclerosi preclinica e rischio cardiovascolare globale. Monografie di cardiologia-Società italiana di cardiologia, Roma 2008.

Nunez J, Nunez E, Bod V. Et al. Usefulness of the neutrophil to lymphocyte ratio in predicting long-term mortality in ST segment elevation myocardial infarction, *American Journal of Cardiology* 2008; 101: 747–752.

Nunez J, Minana G, Bodi V et al. Low lymphocyte count and cardiovascular diseases. *Curr. Med. Chem.* 2011; 18: 3226–3233.

Ommen SR, Gibbons RJ, Hodge D.O et al. Usefulness of the lymphocyte concentration as a prognostic marker in coronary artery disease, *American Journal of Cardiology* 1997;79 :812–814.

Onal IK, Altun B, Onal ED et al. Serum levels of MMP-9 and TIMP-1 in primary hypertension and effect of antihypertensive treatment. *Eur j Intern Med* 2009; 20: 369-372.

Os I, Hoiegggen A, Larsen A et al. Smoking and relation to other risk factors in postmenopausal women with coronary artery disease, with particular referene to whole blood viscosity and beta-cell function. *Journal of Internal Medicine* 2003; 253: 232-39.

Papazafiropoulou A, Perrea D, Moyssakis I et al. Plasma levels of MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 are not associated with arterial stiffness in subjects with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complication* 2010; 24:20-7.

Papazoglou D, Papaytheodorou K, Papanas N et al. Matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 levels in severely obese patinets: what is the effect of weight loss? *Exp clin endocrinol diab* 2010; 118:730-4.

Park BJ, Shim JY, Lee HR, et al. Relationship of neutrophil-lymphocyte ratio with arterial stiffness and coronary calcium score. *Clin Chim Acta* 2011; 412 (11-12): 925–9.

Peters SA, Woodward M, Rumley Aet al. Plasma and blood viscosity in the prediction of cardiovascular disease and mortality in the Scottish Heart Health Extended Cohort Study. *Eur J Prev Cardiol.* 2017; 24 (2): 161-167.

Qu Hy, Xiao Yw, Jiang GH et al. Effect of atorvastatin versus rosuvastatin on levels of serum lipids, inflammatory markers and adiponectin in patients with hypercholesterolemia. *Pharm Res* 2009; 26: 958-964.

Rampling MW, Meiselman HJ, Neu B, et al. Influence of cell-specific factors on red blood cell aggregation. *Biorheology* 2004; 41(2): 91-112.

Ridker PM, Brown NJ, Vaughan DE. Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events. *Circulation* 2004; 109:6-19.

Rosenson R.S, Shott., S., Lu L et al. Hypertriglyceridemia and other factors associated with plasma viscosity, *Am J Med* 2001; 110:488-492.

Rosenson R.S., Shott S, Tangney C.C. Hypertriglyceridemia is associated with an elevated blood viscosity, *Atherosclerosis* 2002; 161: 433-439.

Sawant AC, Adhikari P, Narra SR, et al. Neutrophil to lymphocyte ratio predicts short and long term mortality following revascularization therapy for ST elevation myocardial infarction. *Cardiol J.* 2014; 21: 500-508.

Shimada S, Hasegawa K, Wada H et al. High blood viscosity is closely associated with cigarette smoking and markedly reduced by smoking cessation. *Circulation Journal* 2011; 75: 185-89.

Sigala F, Kotsinas A, Savari P. Oxidized LDL in human carotid plaques is related to symptomatic carotid disease and lesion instability. *J Vasc Surg* 2010; 52: 704-13.

Sigala F, Efentakis P, Karageorgiad D et al. Reciprocal regulation of eNOS, H<sub>2</sub>S and CO-synthesizing enzymes in human atheroma: Correlation with plaque stability and effects of simvastatin. *Redox Biol* 2017; 12: 70-81.

Signorelli S, Neri L, Di Pino et al. Oxidative stress and endothelial damage in patients with asymptomatic carotid atherosclerosis. *Clin Exp Med* 2001; 1: 9-12.

Siow RC, Sato H, Mann GE. Heme oxygenase-carbon monoxide signaling pathway in atherosclerosis: anti-atherogenic actions of bilirubin and carbon monoxide? *Cardiovasc. Res* 1999; 41: 385-394.

Sloop G.D, Garber D.W. The effects of low-density lipoprotein and high-density lipoprotein on blood viscosity correlate with their association with risk of atherosclerosis in humans, *Clin Sci* 1997; 92: 473-479.

Sloop GD, Weidman JJ, St Cyr JA. The systemic vascular resistance response: a cardiovascular response modulating blood viscosity with implications for primary hypertension and certain anemias. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2015; 9 (6): 403–11.

Soehnlein O. Multiple roles for neutrophils in atherosclerosis. *Circ Res* 2012; 110 (6): 875–88.

Sola' E, Vaya A, Simo M et al. Fibrinogen, plasma viscosity and blood viscosity in obesity. Relationship with insulin resistance. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 2007; 37: 309-318.

Soumyarani VS, Jayakumari N. Oxidatively modified high density lipoprotein promotes inflammatory response in human monocytes-macrophages by enhanced production of ROS, TNF- $\alpha$ , MMP-9 and MMP-2. *Mol Cell Biochem* 2012; 366 (1-2): 277-85.

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.

Stocker R, Keaney JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004; 84: 1381-478.

Szapary L, Horvath B, Marton Z et al. Hemorheological disturbances in patients with chronic cerebrovascular diseases, *Clin Hemorheol Microcirc* 2004; 31: 1–9.

Tan J, Hua Q, Xing X et al. Impact of the metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 system on large arterial stiffness in patients with essential hypertension. *Hypertens Res* 2007; 30: 959-63.

Totsimon K, Nagy A, Biro K et al. Hemorheological alterations in carotid artery stenosis. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 2016; 64: 55-63.

Tran-Son-Tay R, Nash GB. Mechanical properties of leukocytes and their effects on the circulation. In: (eds.) Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, Meiselman HJ. *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*. IOS Press, 2007 Amsterdam pp 137–52.

Turitto VT, Weiss HJ, Baumgartner HR. The effect of shear rate on platelet interaction with subendothelium exposed to citrated human blood. *Microvasc Res* 1980;19 (3):352-65.

Urbistondo D, Beltrán A, Beloqui O. The neutrophil–lymphocyte ratio as a marker of systemic endothelial dysfunction in asymptomatic subjects. *Nefrologia*. 2016; 36: 397–403.

Urso C, Caimi G. Stress ossidativo e disfunzione endoteliale. *Minerva Med* 2011; 102: 59-77.

Vaya A, Hernandez-Mijares A, Bonet E et al. Association between hemorheological alterations and metabolic syndrome. *Clinical hemorheology and microcirculation* 2011; 49: 493-503.

Vaya A, Alis R, Bautista D et al. Are abdominal obesity and body mass index independent predictors of hemorheological parameters? *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 2014; 56: 83-85.

Vegaleti RS, Gona P, Sundstrom J et al. Relations of biomarkers of extracellular matrix remodeling to incident cardiovascular events and mortality. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 2283-8.

Velcheva I, Antonova N, Titianova E et al. Hemorheological parameters in correlation with the risk factors for carotid atherosclerosis, *Clin Hemorheol Microcirc* 2006; 35: 195–198.

Verdoia M, Schaffer A, Barbieri L. Impact of neutrophil-to-lymphocyte ratio on periprocedural myocardial infarction in patients undergoing non-urgent percutaneous coronary revascularisation. *Neth Heart J*. 2016; 24 (7-8): 462-74.

Vosseler M, Beutel A, Schafer S. Parameters of blood viscosity do not correlate with the extent of coronary and carotid atherosclerosis and with endothelial function in patients undergoing coronary angiography *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 2012; 52: 245–254.

Wang H, Hu Y, Geng Y, The relationship between neutrophil to lymphocyte ratio and artery stiffness in subtypes of hypertension. *J Clin Hypertens*. 2017; 19 (8):780-785.

Waterhouse DF, Cahill RA, Sheehan F, Mc Creery C. Prediction of calculated future cardiovascular disease by monocyte count in an asymptomatic population. *Vasc. Health Risk Manag*. 2008; 4: 177–187.

Weinberg JB. Nitric oxide production and nitric oxide synthase type 2 expression by human mononuclear phagocytes. *Mol Med* 1998; 4: 557-591.

Wheeler JG, Mussolino ME, Gillum RF, Danesh J. Associations between differential leucocyte count and incident coronary heart disease: 1764 incident cases from seven prospective studies of 30.374 individuals. *Eur. Heart J*. 2004; 25:1287-1292.

Wulf Droge: Free radical in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.*2002; 82: 47-95.

Xu XP, Mesiel SR, Ong JM et al. Oxidized low-density lipoprotein regulates matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 1999; 99 (8): 993-998.

Yaman M, Arslan U, Beton O et al. Early and late aortic propagation velocity values in STEMI patients after successful primary PCI and their relationship with neutrophil to lymphocyte ratio. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016; 20 (5): 912–8.

Yilmaz M, Tenekecioglu E, Arslan B, et al. White Blood Cell Subtypes and Neutrophil-Lymphocyte Ratio in Prediction of Coronary Thrombus Formation in Non-ST-Segment Elevated Acute Coronary Syndrome. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2015; 21: 446–452.

Yu XY, Li XS, Li Y et al. Neutrophil-lymphocyte ratio is associated with arterial stiffness in postmenopausal women with osteoporosis. *Arch Gerontol Geriatr* 2015; 61 (1): 76–80.

Zalba G, Fortuno A, Orbe J et al. Phagocytic NADPH Oxidase-dependent superoxide production stimulates matrix metalloproteinase-9. Implications for humans atherosclerosis. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 587-593.

Zayani Y, Allal-Elasmi M, Jacob MP et al. Abnormal circulating levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in diabetes mellitus. *Clin Lab* 2012; 58 (7-8):779-85.

Zayani Y, Allal-Elasmi M, Zidi W et al. Abnormal circulating levels of metalloproteinase and their inhibitor in hypertensive patients. *Clin Lab* 2016; 62 (4): 527-33.

Zhang L, Pu K, Zhang SY et al. Blood rheological properties are strongly related to the metabolic syndrome in middle-aged Chinese. *International Journal of cardiology* 2006;112: 229-233.

Zhang SD, Yang L, Yu GL et al. Quantitative ultrasonic integrated backscatter of the intima-media complex, serum level of matrix metalloproteinase-9 and simvastatin in hyperlipemia patients. *Zhong Nan Da Ban* 2008; 3160-4.

Zhou S, Feely J, Spiers JP et al matrix metalloproteinase-9 polymorphism contributes to blood pressure and arterial stiffness in essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2007; 21 (11): 861-867.

Zhu W, Li M, Huang X et al. Association of hyperviscosity and subclinical atherosclerosis in obese school children. *Eur J Pediatr* 2005; 164: 639–645.

