

Stress ossidativo e disfunzione endoteliale

C. URSO, G. CAIMI

OXIDATIVE STRESS AND ENDOTHELIAL DYSFUNCTION

Endothelial dysfunction and oxidative stress are the main pathophysiological mechanisms of several diseases such as hypertension, atherosclerosis, dyslipidemia, diabetes mellitus, cardiovascular disease, renal failure and ischemia-reperfusion injury. Reactive oxygen species (ROS) can modulate cellular function, receptor signals and immune responses in physiological conditions, but when present in excess, they mediate progressive endothelial damage through growth and migration of vascular smooth muscle and inflammatory cells, alteration of extracellular matrix, apoptosis of endothelial cells, activation of transcription factors (NFkB, AP-1), over-expression of inflammatory cytokines and adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, E-selectin). Recent evidences suggest that the major source of ROS is the NADPH-oxidase, especially activated by angiotensin II, shear stress and hyperglycemia. The unbalance between production of free radicals and the ability to neutralize them by antioxidant systems causes a condition of "oxidative stress". ROS alter vascular tone by increasing concentration of cytosolic calcium and especially causing a decreased availability of nitric oxide, the principal agent of endothelial function with vasodilating action. The data emerged from experimental and clinical studies confirm that endothelium-dependent vasodilation is altered in many diseases.

Key words: Endothelium - Stress, oxidative - Reactive oxygen species - Nitric oxide.

Ricevuto il 29 settembre 2010.
Accettato il 18 ottobre 2010.

Autore di contatto: Prof. G. Caimi, via del Vespro 129, 90127 Palermo, Italia. E-mail: caimigre@unipa.it

*Dipartimento di Medicina Interna
Malattie Cardiovascolari e Nefrourologiche
Università degli Studi di Palermo
Palermo, Italia*

L'endotelio non costituisce solo una barriera meccanica tra il sangue e la parete vascolare muscolare ma rappresenta un vero e proprio organo con la funzione di modulare il tono vasale e il flusso ematico in risposta a stimoli umorali, nervosi e meccanici. Esso svolge un ruolo significativo nel processo di angiogenesi, permeabilità vasale, regolazione dell'attivazione piastrinica e dell'infiammazione¹.

La regolazione fisiologica del tono vasale si esplica attraverso la produzione di fattori vasoattivi ad azione vasodilatatrice quali il monossido di azoto (NO), le prostaciline, il fattore iperpolarizzante di derivazione endoteliale mentre i vasoconstrictori endoteliali comprendono l'endotelina-1 (ET-1), l'angiotensina II (Ang II), il trombossano A2 e le specie reattive dell'ossigeno (ROS). L'ossido nitrico e alcune molecole di adesione quali ICAM-1, VCAM-1 ed E-selectina sono, inoltre, modulatori dell'infiammazione endoteliale. L'endotelio è coinvolto anche nella regolazione dell'emostasi attraverso l'attivatore del plasminogeno, il tissue factor inhibitor, il fattore di Von Willebrand, la

prostaciclina, il trombossano A₂, l'inibitore dell'attivazione del plasminogeno e il fibrinogeno². La modulazione dell'omeostasi vasale da parte dell'endotelio è relata alla sua integrità anatomica e soprattutto funzionale. Alterazioni della funzione endoteliale concorrono allo sviluppo dell'aterosclerosi e delle sue complicanze³.

L'ossido nitrico rappresenta il più importante mediatore della funzione endoteliale determinando una marcata azione vasodilatatrice e l'inibizione dell'attivazione piastrinica, della migrazione delle cellule muscolari lisce, dell'espressione delle molecole di adesione, dell'adesione dei monociti e della sintesi di endotelina, sostanze e meccanismi coinvolti nella patogenesi della trombosi e dell'aterosclerosi. Nel 1980 venne dimostrato che in segmenti di aorta di coniglio la presenza dell'endotelio era indispensabile perché l'acetilcolina causasse il rilasciamento vascolare⁴. Poco tempo dopo si dimostrò che la sostanza responsabile della vasodilatazione endotelio-dipendente era il NO⁵. Il NO è prodotto dalla trasformazione dell'aminoacido L-arginina in citrullina per ossidazione del suo nitrogruppo terminale guanidico ad opera della NO-sintasi (NOS) in presenza di diversi cofattori. Il NO diffonde rapidamente dall'endotelio alle sottostanti cellule muscolari lisce dove attiva la guanilato ciclasi reagendo con il gruppo eme; ne consegue pertanto un aumento di GMPc che induce il rilassamento delle cellule muscolari lisce attivando una proteina chinasi, capace di allontanare il calcio dal citoplasma attraverso una calcio-magnesio ATP-asi di membrana. Esistono tre diverse isoforme di NOS: endoteliale (eNOS), inducibile (iNOS) e neuronale (nNOS). La eNOS e la nNOS sono espresse costitutivamente nelle cellule e la loro attività è Ca²⁺-calmodulina-dipendente. Al contrario, la iNOS è principalmente espressa in corso di infiammazione e non necessita del complesso Ca²⁺-calmodulina. La biosintesi di NO richiede l'attivazione della NOS in presenza di alcuni cofattori tra cui la nicotinammide adenina dinucleotide fosfato (NADPH), la flavina mononucleotide, la

flavina adenina dinucleotide, la tetraidrobiopterina (BH₄) e l'eme. La L-arginina è, infatti, prima idrossilata come prodotto intermedio che poi va incontro ad ossidazione per essere convertita in NO e L-citrullina. Entrambe le fasi richiedono ossigeno, NADPH e BH₄. Gli elettroni necessari a questo processo derivano dalla NADPH e attraverso le flavine ridotte, sono veicolati al gruppo eme⁶. L'attivazione della NOS in presenza di bassi livelli di BH₄ determina un disaccoppiamento (eNOS uncoupling) tra riduzione dell'ossigeno e ossidazione della L-arginina che determina la produzione di radicali liberi⁷.

L'attività della eNOS in condizioni fisiologiche viene stimolata da diverse sostanze quali la bradichinina, l'adenosina, l'acetilcolina, dal vascular endothelial growth factor (VEGF) in risposta all'ipossia, dalla serotonina rilasciata durante l'attivazione piastrinica⁸ e da forze meccaniche, principalmente lo shear stress⁹.

Il rilasciamento della muscolatura liscia sarebbe dovuto, inoltre, a un effetto iperpolarizzante NO-indipendente determinato dall'apertura dei canali del potassio ad opera di fattori iperpolarizzanti di derivazione endoteliale¹⁰.

Tra le sostanze che determinano vasocostrizione, l'endotelina gioca un ruolo essenziale. Esistono tre forme di endotelina (ET 1, 2 e 3), delle quali solo l'ET1 è prodotta dalle cellule endoteliali, oltre che dalle cellule muscolari lisce. L'ET1 viene sintetizzata a partire da un precursore inattivo, la pre-pro-ET1; questa viene trasformata in pro-ET1 e poi ad opera dell'enzima ECE-1 (Endothelin-1 Converting Enzyme), in ET1. Le azioni dell'ET1 sono mediate da due recettori denominati ETA ed ETB. I primi sono presenti sulla cellula muscolare liscia e determinano vasocostrizione, mentre i secondi sono rappresentati sia sull'endotelio (dove determinano vasodilatazione inducendo la produzione di NO) sia sulle cellule muscolari lisce. L'ET1 possiede anche un'azione mitogena per le cellule muscolari lisce vascolari, un'azione chemiotattica per i macrofagi e ha effetti secretagoghi su vari ormoni tra cui l'aldosterone, la vasopressina e le catecolammine¹¹.

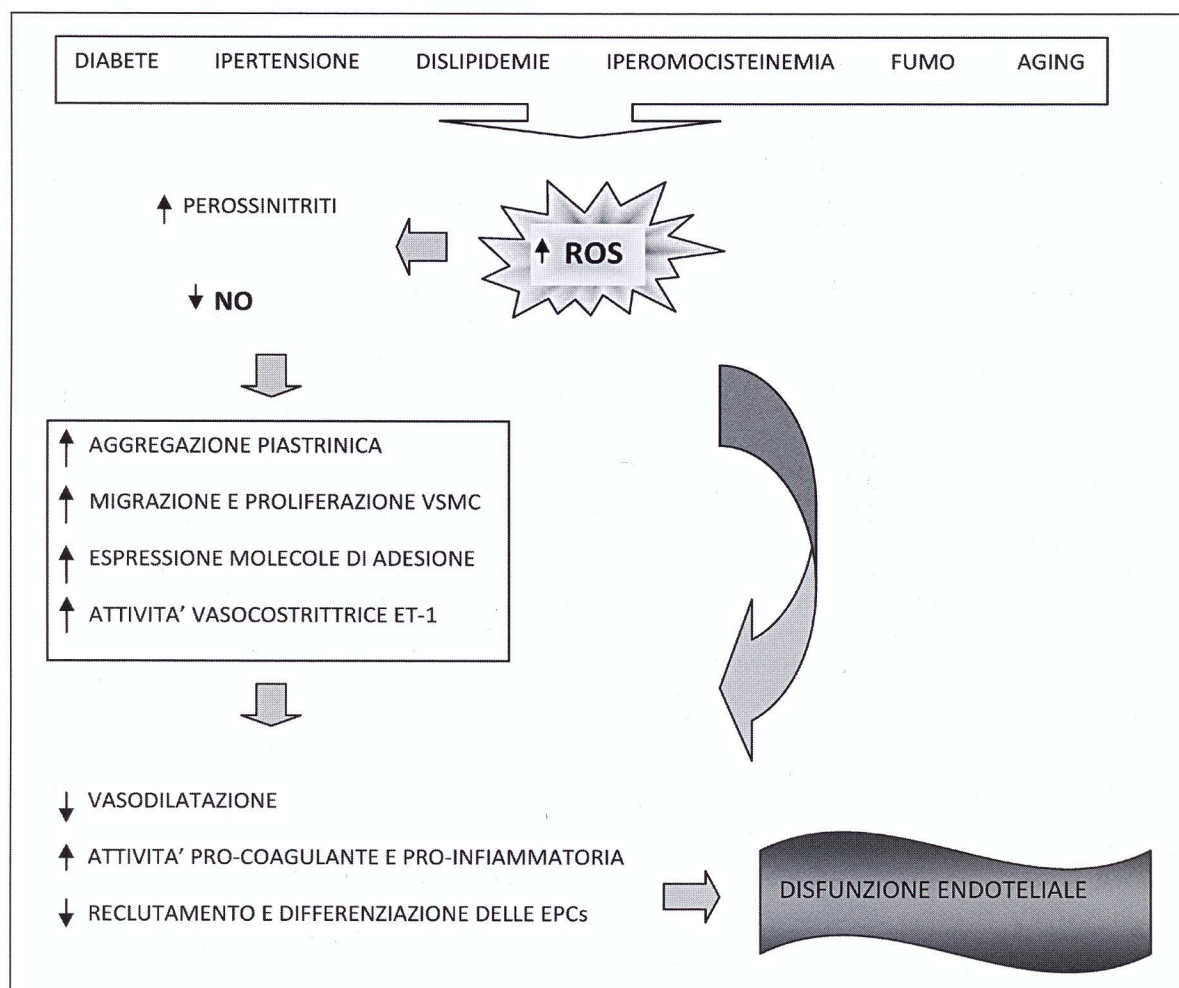


Figura 1. — Fisiopatologia della disfunzione endoteliale.

La funzione endoteliale viene in genere valutata con studi di reattività vascolare. In particolari distretti vascolari quali l'arteria brachiale e il circolo coronarico è possibile attivare le cellule endoteliali con agonisti specifici (acetilcolina, metacolina, bradichinina, serotonina) o bloccare la produzione di NO con antagonisti della NOS (come la L-NMMA). In queste condizioni sperimentali qualsiasi variazione di flusso misurato con la pletismografia venosa o con tecnica doppler è indice di mutazione delle resistenze vascolari locali. Una tecnica di uso comune, in genere applicata a livello dell'arteria radiale o omerale, è la "Flow Mediated Dilation" (FMD) che consiste nel misurare con un ecografo vascolare l'aumento di calibro del vaso indotto dall'aumento del flusso arte-

rioso e quindi dall'aumento dello shear stress dopo cinque minuti di ischemia del segmento distale dell'avambraccio indotta attraverso uno sfigmomanometro¹². Varie evidenze indicano che la FMD è diminuita nei pazienti con aterosclerosi e coronaropatia e può essere considerata un indice di disfunzione endoteliale nelle dislipidemie, nell'ipertensione e nel diabete¹³.

Definizione di disfunzione endoteliale e ruolo ROS

Il termine "disfunzione endoteliale" identifica una condizione patologica caratterizzata da ridotta vasodilatazione e da attività

procoagulante e proinfiammatoria, correlata a una ridotta biodisponibilità di NO, a un eccesso ossidativo e a un'augmentata azione dell'ET-1¹⁴. I ROS hanno un ruolo nella disfunzione endoteliale in quanto determinano l'inattivazione dell'NO e la produzione di perossinitriti (Figura 1). Questi ultimi alterano la funzione delle proteine delle cellule endoteliali, aumentano l'effetto proaterogeno delle LDL e riducono la biodisponibilità di NO, inibendone la sintesi, oppure inattivando direttamente l'NO per un eccesso di anione superossido¹⁵.

La disfunzione endoteliale è associata a varie patologie cardiovascolari e rappresenta uno dei meccanismi attraverso cui i fattori di rischio cardiovascolare determinano un'augmentata produzione di ROS, predispongono allo sviluppo di aterosclerosi, instabilità di placca e trombosi¹⁶. L'aumento della concentrazione intracellulare di ROS attiva il fattore nucleare NF- κ B, determinando un aumento della trascrizione di geni pro-infiammatori e l'espressione di molecole di adesione (E-selectina, VCAM-1, ICAM-1). In condizioni fisiologiche l'NO esercita un'importante azione inibitoria su tale fattore¹⁷.

Di recente è stato sottolineato il ruolo delle cellule endoteliali progenitrici circolanti (EPCs) come importanti markers biologici di rischio cardiovascolare. Tali cellule sono coinvolte nella riparazione endoteliale e nel processo di angiogenesi. La mobilitazione delle EPCs sembra essere in parte NO-dipendente mentre lo stress ossidativo¹⁸ interferisce con il reclutamento, la differenziazione e la funzione di tali cellule riducendo la capacità di riparazione endoteliale¹⁹.

Lo stress ossidativo viene considerato uno dei meccanismi patogenetici principali della disfunzione endoteliale e dell'aterosclerosi e correla in modo significativo con lo sviluppo di eventi cardiovascolari²⁰.

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

mina una condizione di "stress ossidativo". Tutte le specie reattive dell'ossigeno radicaliche (anione superossido O_2^- , radicale idrossile HO \cdot , radicale idroperossile ROO \cdot , ossido nitrico NO, radicali lipidici) e non radicaliche (ossigeno singoletto, perossido di idrogeno, perossinitrito ONOO $^-$, acido ipocloroso HOCl) possiedono attività ossidante. L'ossidazione, ovvero il trasferimento di uno o più elettroni, è la base chimica dello stress ossidativo. I radicali liberi sono dotati di elevata reattività ed instabilità chimica; una volta generati reagiscono con molecole organiche ed inorganiche (proteine, lipidi, carboidrati), producendo altri radicali e dando vita a reazioni a catena. A basse concentrazioni di ROS corrisponde un ruolo fisiologico nella regolazione delle risposte cellulari, attraverso una modulazione delle vie di trasduzione del segnale. I ROS intervengono nei normali processi di crescita e morte cellulare e sono coinvolti nelle risposte infiammatorie, nella regolazione del tono vascolare e nella produzione di eritropoietina in relazione alla tensione di ossigeno, inoltre gli agenti ossidanti prodotti da macrofagi e granulociti svolgono un ruolo fondamentale nell'immunità "naturale". In condizioni patologiche, l'eccessiva presenza di radicali liberi, quando non adeguatamente controbilanciata dal sistema antiossidante, induce importanti alterazioni patologiche tra cui: la perossidazione lipidica, l'apoptosi, la proteolisi incontrollata, l'azione mutagenica sul DNA e l'alterata espressione genica, implicati nella patogenesi di neoplasie, diabete mellito, aterosclerosi, danno ischemia/riperfusion, insufficienza renale, malattie neurodegenerative e infiammatorie croniche oltre che nella patogenesi dell'aging²¹.

I ROS, soprattutto l'anione superossido e il perossido d'idrogeno, fungono da molecole segnale nelle cellule cardiovascolari e da secondi messaggeri nell'attivazione di diverse proteine chinasi tra cui c-Src, p38 MAPK, Akt e conseguente trascrizione di geni con importanti ruoli funzionali nella fisiopatologia vascolare. Essi determinano, infatti, la crescita e la migrazione delle cellule muscolari lisce,

la modulazione della funzione endoteliale, l'espressione di un fenotipo pro-infiammatorio (VCAM-1, MCP-1) e la modificazione della matrice extracellulare regolando l'espressione delle metallo-proteasi; tutti questi eventi assumono un ruolo chiave nelle patologie cardiovascolari ²².

Produzione e metabolismo dei ROS

La disfunzione endoteliale è accelerata dall'inattivazione di NO da parte dei ROS. Questo fenomeno è presente in diverse condizioni cliniche quali l'ipercolesterolemia, l'aterosclerosi, l'ipertensione, il diabete e lo scompenso cardiaco. Fonti di ROS sono la respirazione mitocondriale, la lipossigenasi, la ciclossigenasi, il citocromo p450, l'eme ossigenasi, la xantina ossidasi, la NADH/NADPH ossidasi, la NO sintasi. In particolare queste ultime tre sono state studiate nella patologia vascolare ²³.

La Xantina ossidasi catalizza l'ossidazione di ipoxantina e xantina nel metabolismo delle purine. Riduce il NAD⁺ producendo O₂⁻ e H₂O₂. Nelle cellule endoteliali la sua attività è potenziata dall'INF- γ . L'O₂⁻ prodotto altera la disponibilità di NO, come risulta evidente in ratti spontaneamente ipertesi (SHRs) presentanti elevati livelli endoteliali di xantina-ossidasi. In questi animali la terapia con un inibitore della xantina-ossidasi riduce i livelli tensivi arteriosi ²⁴. Anche l'ipercolesterolemia si associa all'aumentata produzione di O₂⁻ da parte della xantina ossidasi e, infatti, la somministrazione di allopurinolo ripristina i livelli di ROS ²⁵.

La NADH/NADPH ossidasi è la maggiore fonte di O₂⁻. La NADPH ossidasi di origine vascolare ha una struttura simile alla forma fagocitaria caratterizzata dalle subunità di membrana (gp91phox-Nox2- e p22phox), da quelle citosoliche (p47 phox, p67 phox) e dalle G proteine regolatrici (rac1 o rac2). Le cellule endoteliali e i fibroblasti dell'avventizia possiedono tutti i componenti dell'ossidasi fagocitaria. Le cellule muscolari lisce vascolari esprimono Nox 1 e Nox 4 (omologhi del gp91 phox) ma non p67 phox. Uno dei primi

steps nell'attivazione della NADPH è la fosforilazione e traslocazione di p47 phox. L'attività enzimatica è stimolata da vari agonisti recettoriali legati alle G proteine quali Ang II, trombina, endotelina, serotonina, da fattori di crescita e citochine (PDGF, EGF, TNF- α , IL-1) ²⁶⁻²⁹, da stimoli meccanici quali lo shear stress e da fattori metabolici (iper-glicemia, iperinsulinemia, acidi grassi liberi, AGE) ³⁰. Recentemente è stato accertato che nelle coronarie aterosclerotiche la produzione di ROS e di LDL ossidate è associata all'espressione della subunità p22 phox di NADPH ossidasi ³¹. Ciò suggerisce che i ROS catalizzano la formazione di LDL ossidate, inoltre la produzione di ROS è maggiore nell'angina instabile suggerendo che essi possano modulare la stabilità della placca inducendo l'espressione di metallo-proteinasi di matrice ³²⁻³⁴.

La NO sintasi catalizza il trasporto di elettroni da un eme gruppo prostetico al nitro gruppo terminale guanidico dell'L-arginina formando NO e L-citrullina. In condizioni di deficit di substrato (L-arginina) o del cofattore BH₄ la NO sintasi endoteliale disaccoppiata produce O₂⁻ e H₂O₂ ³⁵. La produzione di O₂⁻ altera la vasodilatazione e, inoltre, il perossinitrito prodotto dalla reazione tra NO e O₂⁻ ossida la BH₄ causandone un ulteriore deficit che determina la persistenza della forma disaccoppiata di eNOS e l'aumentata produzione di ROS. Tale condizione è stata osservata nell'aterosclerosi, nel diabete, nell'iperomocisteinemia e nell'ipertensione ³⁶.

ROS MITOCONDRIALI

I mitocondri sono la sede della fosforilazione ossidativa, processo fondamentale per la produzione di ATP. La forza di tale processo è il trasferimento degli elettroni dall'NADH all'ossigeno molecolare. Durante il processo di formazione di ATP l'1-2% dell'ossigeno si trasforma in O₂⁻ e viene eliminato dalla MnSOD. In alcune condizioni patologiche la produzione di ROS mitocondriale aumenta; ne consegue un danno del DNA mitocondriale che aumenta la disfunzione endoteliale e la predispo-

sizione allo sviluppo di aterosclerosi come dimostrato in topi apo E (-/-) con deficit di MnSOD/SOD₂³⁷.

SISTEMI ANTIOSSIDANTI

In condizioni fisiologiche nelle cellule sono presenti sistemi enzimatici (superossido-dismutasi o SOD, catalasi, glutazione perossidasi) e non enzimatici (glutazione, acido ascorbico, alfa tocoferolo) per la protezione dagli effetti dannosi dei ROS. Gli antiossidanti endogeni interagiscono con i radicali liberi e, donando loro un elettrone, li neutralizzano. Le sostanze antiossidanti assunte con la dieta agiscono invece da scavenger, contribuendo così a prevenire il danno cellulare e tissutale.

Stress ossidativo e ipertensione

L'ipertensione arteriosa è associata a un aumentato stress ossidativo che a sua volta è responsabile della minore disponibilità di NO e della trascrizione di geni coinvolti nella regolazione della pressione arteriosa³⁸. La ridotta disponibilità di NO si associa a un'aumentata attività vasocostrittrice della ET1. In condizioni fisiologiche, l'ET1 attraverso i suoi recettori ETB endoteliali attiva la produzione di NO che a sua volta inibisce la sintesi dell'endotelina stessa. In condizioni di ridotta disponibilità di NO viene a mancare questo meccanismo di autoregolazione e pertanto si realizza la possibilità di un aumento sia della produzione che dell'effetto vasocostrittore dell'ET1. Tale condizione è stata documentata nell'uomo a livello della circolazione periferica dell'avambraccio. L'infusione di TAK-044, un agonista dei recettori ETA/B dell'ET1 determina nei soggetti normotesi un modesto grado di vasodilatazione (aumento di circa il 20% del flusso basale), mentre in pazienti con ipertensione arteriosa essenziale, caratterizzati da ridotta biodisponibilità di NO, l'effetto vasodilatante del TAK-044 è significativamente aumentato (aumento di circa il 90% del flusso basale), indicando quindi un maggior risultato vasocostrittore

dell'ET1 endogena nei pazienti ipertesi³⁹. Numerosi studi hanno dimostrato che la somministrazione di L-arginina sarebbe in grado di aumentare la produzione di NO, migliorare la FMD a livello dell'arteria brachiale⁴⁰ e ridurre i valori tensivi arteriosi in molti modelli sperimentali di ipertensione⁴¹. In quelli murini è stata riscontrata inoltre un'aumentata espressione dell'enzima arginasi, che metabolizza la L-arginina a L-ornitina e urea riducendo la disponibilità di substrati per la sintesi di NO; l'inibizione di tale attività enzimatica sembrerebbe migliorare la funzione endoteliale⁴². Ruolo predominante sembra avere anche l'angiotensina II⁴³ che modula l'ipertensione attraverso l'effetto sul sistema renina angiotensina e la stimolazione del recettore AT1 che determina l'attivazione della NADPH ossidasi nelle cellule vascolari e la produzione di ROS⁴⁴. Il trattamento con inibitori dei recettori AT1 riduce i livelli tensivi arteriosi e quelli di MDA, indicatore di stress ossidativo⁴⁵. L'Ang II può regolare direttamente l'attivazione di NADPH ossidasi inducendo la fosforilazione e traslocazione di p47phox e di rac-1 sulla membrana cellulare^{46, 47}.

Il ruolo dello stress ossidativo nell'ipertensione è stato dimostrato in vari modelli animali. Topi transgenici che esprimono rac-1 a livello delle cellule muscolari lisce vascolari mostrano un fenotipo ipertensivo e un'aumentata produzione di ROS⁴⁸. Studi su topi con deficit di Nox-1 hanno evidenziato una ridotta produzione di O₂⁻ e un minore aumento dei valori tensivi arteriosi in risposta all'Ang II⁴⁹. La terapia con inibitori della NADPH ossidasi riduce la produzione di O₂⁻, previene il rimodellamento cardiovascolare e riduce lo sviluppo di ipertensione in topi trattati con Ang II⁵⁰⁻⁵². Anche la maggiore espressione di ET-1 induce rimodellamento vascolare e alterazione della funzione endoteliale tramite l'attivazione della NADPH ossidasi e la produzione di O₂⁻⁵³ (Figura 2). È stato osservato, inoltre, che anche lo stress ossidativo determinato da elevati livelli di lipossigenasi è implicato nello sviluppo di ipertensione in modelli murini, suggerendo che i meccanismi ossidativi coinvolti nell'ipertensione sono molteplici

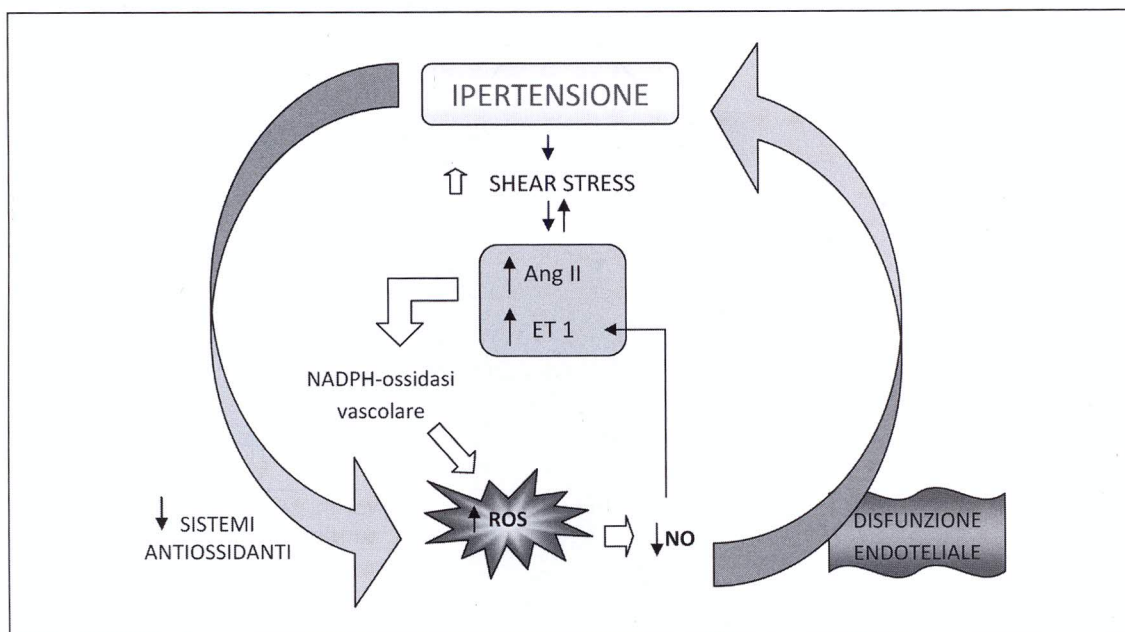


Figura 2. — Ipertensione stress ossidativo e disfunzione endoteliale.

⁵⁴. Aumentati livelli di O_2^- possono reagire con l'ossido nitrico e favorire la formazione di perossinitrito. L'anione superossido ed il perossido di idrogeno aumentano, inoltre, la concentrazione di calcio nelle cellule della muscolatura liscia vascolare e nelle cellule endoteliali attivando l'inositolo trifosfato e inibendo l'attività della Ca^{2+} -ATPasi alterando, quindi, il tono vascolare ⁵⁵. In pazienti ipertesi è stata evidenziata una maggiore produzione di H_2O_2 , osservata anche nei soggetti normotesi con familiarità positiva per ipertensione, suggerendo la presenza di una possibile componente genetica responsabile dell'elevata produzione di ROS ⁵⁶. La maggiore produzione di ROS negli ipertesi è associata ad una sovra regolazione della NADPH ossidasi vascolare ed è stato dimostrato che polimorfismi di tale attività enzimatica sono associati con l'aumentato sviluppo di aterosclerosi e ipertensione ^{57, 58}. Oltre alla maggiore produzione di ROS, nei soggetti ipertesi si osserva una ridotta attività degli enzimi antiossidanti (SOD, catalasi, glutatione perossidasi) e delle vitamine A, C ed E ⁵⁹. In base a tali evidenze, negli ultimi anni la ricerca ha focalizzato l'attenzione

sulle possibili strategie terapeutiche finalizzate alla riduzione dello stress ossidativo attraverso la modulazione di attività enzimatiche e la terapia con sostanze antiossidanti. A tale proposito numerosi trial hanno mostrato risultati discordanti ⁶⁰. Nei soggetti ipertesi è stata riscontrata anche una maggiore espressione di molecole di adesione (E-selectin, ICAM-1, VCAM-1), di Tissue factor (TF) e Von Willebrand factor (vWF) sulle cellule endoteliali, marker di uno stato proinfiammatorio e procoagulativo che aumenta il rischio di aterosclerosi e trombosi ⁶¹. Al riguardo l'ang II sembra avere un ruolo fondamentale nell'attivazione della cascata coagulativa stimolando l'espressione del TF e del PAI, l'attivazione piastrinica e della trombina ⁶². I livelli di vWF correlano inoltre con l'entità del flow-mediated dilatation (FMD) ⁶³.

Stress ossidativo, diabete e aterosclerosi

Diabete mellito e sindrome metabolica sono caratterizzati da uno stato proin-

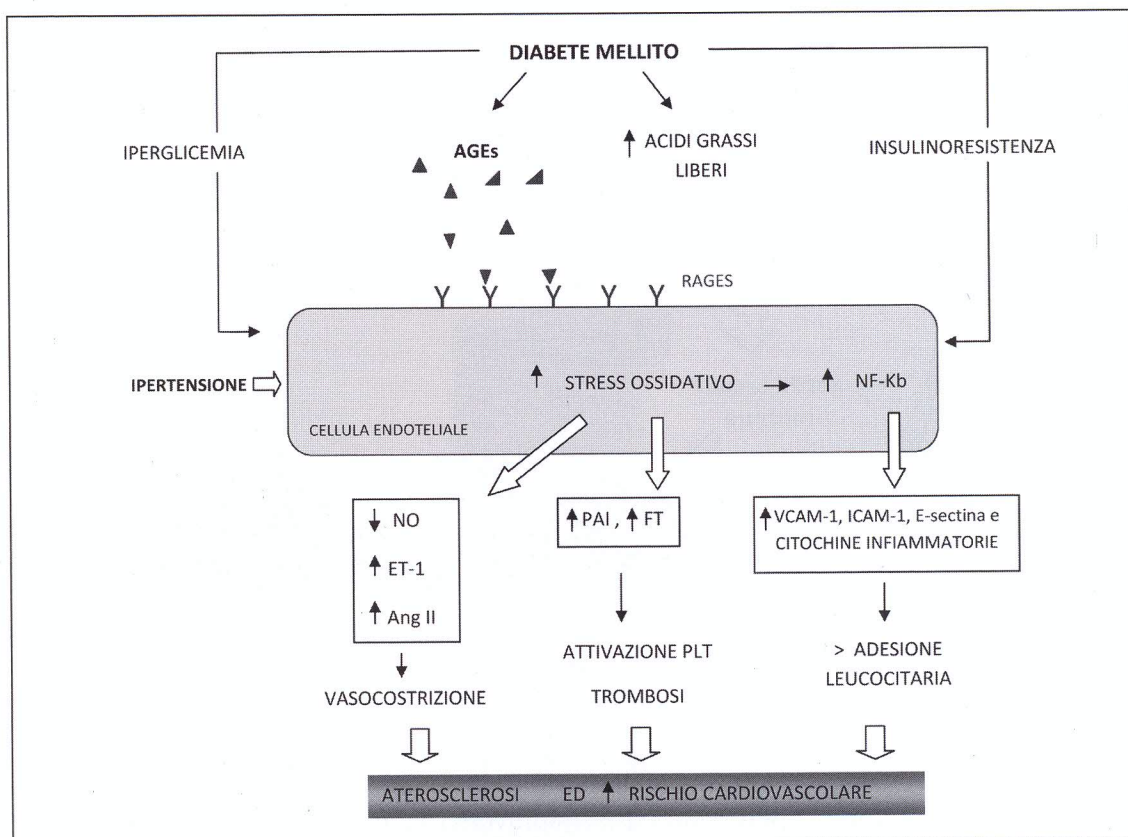


Figura 3. — Ruolo del diabete mellito nella disfunzione endoteliale.

fiammatorio basale che svolge un ruolo nella genesi della disfunzione endoteliale, dell'aterosclerosi e delle sue complicanze. L'iperglicemia, attraverso una via comune PKC- β dipendente, comporta un aumentato stress ossidativo con conseguente flogosi vascolare caratterizzata da un'aumentata attività di NFkB e dall'espressione di molecole di adesione (VCAM-1, ICAM-1 e P-selectina) ⁶⁴. L'iperglicemia può indurre stress ossidativo attraverso diversi meccanismi che coinvolgono l'azione diretta del glucosio e l'attivazione di diverse attività enzimatiche quali la NADPH-ossidasi, la xantina-ossidasi, le lipossigenasi, i citocromi P 450 e la NOS. L'autoossidazione del glucosio e la glicazione non enzimatica delle proteine genera O²⁻, che facilita la perossidazione lipidica e la disfunzione endoteliale. Gli AGE, interagendo con i recettori RAGEs producono ROS attraverso l'attivazione della NADPH-ossidasi.

Gli AGEs correlano con la disfunzione endoteliale nei pazienti con diabete mellito di tipo 2 ⁶⁵ e hanno un ruolo nella genesi della micro e macroangiopatia diabetica ⁶⁶ (Figura 3). L'esposizione delle cellule endoteliali ad elevate concentrazioni di glucosio provoca una up-regulation delle eNOS inducibili con aumentata produzione di ROS che favoriscono la sintesi di perossinitrito e una sottrazione di NO tale da determinare un vero e proprio "stress nitrosativo". La ridotta disponibilità di NO è a sua volta responsabile dell'incrementata produzione di prostanoidi ad attività vasocostrittrice e dell'aumentata espressione di NFkB ⁶⁷. In topi con diabete indotto da streptozocina è stata evidenziata una deplezione di BH4 e di L-arginina, rispettivamente cofattore essenziale e precursore della NOS, con conseguente alterato rilascio vascolare, migliorato dopo somministrazione di BH4 ⁶⁸. Inoltre, la produzione mitocondri-

ale di ROS attraverso l'inibizione della catena di trasporto degli elettroni, il disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa e l'alterata espressione di SOD svolge un ruolo non marginale nel danno cardiovascolare da iperglicemia⁶⁹. Numerosi studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato l'importanza della proteina p66Shc nella regolazione dello stato ossido-riduttivo cellulare. La p66Shc può essere attivata dall'iperglicemia mediante la sua fosforilazione ad opera della PKC; ne consegue il suo trasferimento dal citosol al mitocondrio dove attiva la produzione di ROS, agendo sulla catena respiratoria mitocondriale. L'aumento dei ROS altera la permeabilità della membrana mitocondriale determinando il rilascio di fattori pro-apoptici. In topi knockout per p66Shc, la funzione endoteliale è preservata nonostante gli elevati livelli glicemici e ciò sottolinea il suo ruolo nella risposta allo stress ossidativo⁷⁰. L'aumentato stress ossidativo che caratterizza la malattia diabetica, è dimostrato anche dagli aumentati livelli di isoprostano 8-epi-PGF2 α che si riducono dopo trattamento con vitamina E e C, i cui livelli basali sono di solito ridotti⁷¹. L'insulina esercita funzioni opposte nell'emodinamica vascolare: attraverso la via della PI 3 chinasi essa regola la produzione di NO endoteliale determinando vasodilatazione, aumento del flusso ematico e l'ingresso di glucosio nel muscolo scheletrico attraverso la traslocazione del trasportatore GLUT4; tale via è inibita dai ROS e dagli AGE. Attraverso la via MAPK-dipendente, invece, l'insulina stimola la secrezione di ET-1 e l'espressione delle molecole di adesione VCAM-1, ICAM-1 ed E-selectina sull'endotelio. In condizioni di insulino-resistenza si osserva la prevalenza della via MAPK-dipendente⁷² con aumentata produzione di ET-1 che induce l'espressione di NADPH ossidasi e la produzione di O₂⁻⁷³. È stato osservato, inoltre, che la severità della disfunzione endoteliale correla con l'entità dell'obesità viscerale e con i livelli di uricemia, HDL e trigliceridi nella sindrome metabolica⁷⁴. Oltre alla malattia diabetica, vari altri fattori possono contribuire all'attivazione endoteliale o allo sviluppo di danno/disfunzione

predisponenti l'aterosclerosi, tali fattori includono elevati livelli di LDL ossidate e ridotte HDL, stress ossidativo indotto dal fumo di sigaretta, ipertensione e iperomocisteinemia. La presenza di un aumentato stress ossidativo, la disfunzione endoteliale e l'attivazione della cascata procoagulativa sono da ritenere componenti della risposta infiammatoria dell'aterosclerosi. Lo stress ossidativo determina una elevazione dei livelli di perossidazione lipidica e ossidazione proteica. L'accumulo delle LDL ossidate nello spazio intinale 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 possono favorire la progressione e l'instabilità delle lesioni esercitando un'azione chemiotattica sulle cellule infiammatorie, alterando il bilancio proteasi/antiproteasi nella matrice connettivale e stimolando la proliferazione dei fibroblasti e delle cellule muscolari lisce⁷⁵.

Ruolo dell'ipercolesterolemia

Dati sperimentali e clinici dimostrano che elevate concentrazioni plasmatiche di colesterolo totale e LDL si associano ad alterazione della funzione endoteliale indipendentemente dalla coesistenza di altro danno vascolare. Risulta dimostrato che in pazienti con o senza coronaropatia, l'ipercolesterolemia e l'ipertensione alterano in maniera indipendente la risposta vasodilatante indotta dall'esercizio fisico in arterie coronarie angiograficamente indenni⁷⁶. L'ipercolesterolemia è un fattore predittivo di alterata risposta all'acetilcolina a livello del microcircolo coronarico e sussiste una relazione inversa con la colesterolemia totale⁷⁷.

La vasodilatazione endotelio-dipendente in risposta all'acetilcolina, alla serotonina e alla bradichinina è alterata in modelli animali e in soggetti ipercolesterolemici. Una ridotta FMD a carico dell'arteria omerale è stata osservata anche in bambini e adulti con ipercolesterolemia familiare⁷⁸. È stato evidenziato che la disfunzione endoteliale è associata ad uno specifico pro-

filo lipoproteico caratterizzato da ridotto colesterolo HDL ⁷⁹. In pazienti con coronaropatia, la risposta all'acetilcolina delle arterie epicardiche correla con la concentrazione delle HDL. Il colesterolo HDL è un fattore predittivo indipendente della FMD in soggetti con malattia coronarica e correla in modo positivo con l'entità della riserva del flusso coronarico in quelli asintomatici ⁸⁰. Una diminuita biodisponibilità di NO sembra essere la condizione responsabile della disfunzione endoteliale nell'ipercolesterolemia. Non a caso, la somministrazione del precursore L-arginina è in grado di contrastare la disfunzione endoteliale indotta dalle LDL-ossidate, suggerendo o una ridotta attività della NO sintetasi o una ridotta biodisponibilità del precursore stesso. L'infusione di L-arginina migliora la vasodilatazione endotelio-dipendente sia a livello del microcircolo coronarico che dei vasi di resistenza dell'avambraccio ⁸¹. Negli ultimi anni è stato identificato un analogo della L-arginina, la N^G-dimetil-L-arginina asimmetrica (ADMA), che agisce come un inibitore endogeno competitivo della NOS. Poiché l'ipercolesterolemia è associata a elevati livelli di ADMA è ipotizzabile che la somministrazione di L-arginina permetta di superare l'inibizione competitiva della NOS sostenuta dall'aumentata concentrazione di ADMA.

Per valutare se la ridotta sintesi di NO sia causata da un'alterazione delle specifiche vie di trasduzione del segnale, sono state studiate le risposte endotelio-dipendenti all'acetilcolina e alla bradichinina, che stimolano la sintesi di NO attraverso differenti complessi recettore/proteina G ed è stato ipotizzato che la ridotta funzione endoteliale osservata nell'ipercolesterolemia possa essere in parte spiegata da un deficit selettivo della via di trasduzione del segnale recettoriale. Per ciò che riguarda il ruolo dello stress ossidativo, è noto che l'emivita dell'NO è determinata dall'interazione con i ROS che determinano la produzione di perossinitrito, il quale ossida le LDL che a loro volta inibiscono l'espressione e la funzione delle proteine G endoteliali riducendo, in ultima analisi, la sintesi di NO ⁸². Il peross-

initrito ossida anche la BH₄ diminuendo ulteriormente la sintesi di NO. In soggetti ipercolesterolemici la somministrazione di BH₄ annulla il difetto di sintesi di NO, riduce la produzione di O₂⁻ e ripristina l'alterata vasodilatazione endotelio-dipendente. È stato ipotizzato che a livello vascolare il sistema della xantina-ossidasi sia una delle principali fonti di O₂⁻. Nei soggetti ipercolesterolemici l'infusione di ossipurinolo, un inibitore della xantina-ossidasi, migliora la risposta vascolare dell'acetilcolina nel microcircolo dell'avambraccio ⁸³. Nell'ipercolesterolemia quindi la ridotta biodisponibilità di NO è stata identificata come il meccanismo principale della disfunzione endoteliale. Tale alterazione non è probabilmente causata da un singolo difetto, ma da vari meccanismi che intervengono sulla sintesi e/o la degradazione dell'NO. Tra questi, l'aumento dello stress ossidativo indotto dal disaccoppiamento della eNOS sembra essere il meccanismo patogenetico più importante.

Ruolo del fumo di sigaretta

Anche i soggetti fumatori presentano una ridotta risposta vasodilatante endotelio-dipendente. È stato osservato che nei fumatori con vasi epicardici angiograficamente indenni, l'acetilcolina determina una vaso-costrizione dose-dipendente, mentre causa vasodilatazione nei non fumatori. Anche la FMD risulta ridotta nelle arterie epicardiche ed omerali dei fumatori e risulta inversamente correlata al numero di sigarette/die fumate ⁸⁴. Secondo altri studi anche il fumo passivo avrebbe effetti negativi sulla funzione endoteliale ⁸⁵. La nicotina induce disfunzione endoteliale attraverso un aumento dello stress ossidativo che riduce la disponibilità di NO. È stato dimostrato che il trattamento con vitamina E (600 UI/die) per 4 settimane non migliorava, ma preveniva in parte, il peggioramento della FMD osservata a due ore di distanza dal fumo di una sigaretta ⁸⁶. Questo mancato effetto dell'antiossidante può essere spiegato dal fatto che la bassa dose di vitamina E utilizzata era insufficiente per raggiungere concentrazioni plasmatiche e tissutali tali da inibire lo stress ossidativo

endoteliale. Simili risultati sono stati ottenuti con la somministrazione di vitamina C ⁸⁷. È stata valutata l'ipotesi che la xantina ossidasi possa avere un ruolo nel determinare la disfunzione endoteliale nei fumatori ed è stato osservato che la somministrazione di allopurinolo nel microcircolo dell'avambraccio di soggetti fumatori potenzia la risposta vascolare all'acetilcolina ⁸⁸.

Iperomocisteinemia e disfunzione endoteliale

Un'elevata concentrazione plasmatica di omocisteina è considerata fattore di rischio indipendente per le patologie vascolari aterosclerotiche ⁸⁹. L'omocisteina è un aminoacido tiolico, non proteino-genico, che deriva dalla demetilazione della metionina. Le sue concentrazioni plasmatiche sono determinate da due distinte vie metaboliche: il ciclo della metionina e la sequenza di trans-sulfurazione a formare cisteina. Nel plasma solo l'1% dell'omocisteina si trova nella forma ridotta, cioè sulfidrilica, mentre la maggior parte si trova in forma ossidata come vari disolfuri. Circa il 70-80% dell'omocisteina è legata all'albumina, mentre il resto esiste in forma libera. La maggior parte degli studi clinici fa riferimento all'omocisteina plasmatica totale. Sulla base di numerosi studi epidemiologici, si considerano nella norma i valori di omocisteina a digiuno compresi tra 5 e 15 mmol/l. L'iperomocisteinemia viene quindi definita di grado lieve per valori compresi tra 15 e 30 mmol/l, intermedia (tra 30 e 100 mmol/l) e severa (>100 mmol/l). Numerosi studi hanno evidenziato che concentrazioni plasmatiche di omocisteina moderatamente elevate (>15 μmol/l) sono associate a patologie vascolari, coronariche e cerebrovascolari ⁹⁰. La condizione di iperomocisteinemia (Hcy) può essere evidenziata, rispettivamente, nel 30% dei pazienti coronaropatici e nel 42% dei soggetti con malattie cerebrovascolari ⁹¹. In soggetti sani con normali livelli plasmatici di omocisteina a digiuno, diversi studi hanno valutato gli effetti dell'iperomocisteinemia acuta, una condizione metabolica temporanea ottenuta in

seguito a un carico orale di metionina (100 mg/kg *per os*) osservando una minore FMD a livello dell'arteria brachiale ⁹². I possibili meccanismi aterogenici dell'Hcy includono: l'alterazione della funzione piastrinica, la stimolazione della proliferazione delle cellule muscolari lisce, la disfunzione endoteliale diretta o indotta da un aumento di stress ossidativo. In particolare, in condizioni di Hcy, si osserva un'inibizione dell'attività degli enzimi antiossidanti, come la glutatione perossidasi o l'eme ossigenasi-1, l'attivazione delle NADPH ossidasi con produzione di O₂⁻, che determina una maggiore ossidazione di omocisteina e l'induzione del processo di perossidazione lipidica ⁹³⁻¹⁰¹. L'Hcy potrebbe quindi compromettere la normale funzione dell'endotelio sia interferendo con il *signaling* ossido-riduttivo cellulare ¹⁰², sia riducendo la biodisponibilità di NO. È noto che l'omocisteina nel plasma va incontro a un rapido processo di auto-ossidazione, durante il quale si formano H₂O₂ e O₂⁻, responsabili della distruzione dell'NO. In condizioni fisiologiche le cellule endoteliali sono in grado di annullare l'effetto dell'omocisteina rilasciando NO, che si lega ad essa formando S-nitroso-omocisteina, in grado di impedire la produzione di perossido di idrogeno durante l'autossidazione dell'omocisteina. Nell'Hcy cronica la quantità di NO prodotto non è più sufficiente, ne consegue una minore produzione di S-nitroso-omocisteina e quindi uno sbilanciamento a favore del danno ossidativo ¹⁰³. L'Hcy, inoltre, è in grado di diminuire la sintesi di NO inibendo il catabolismo della dimetil-arginina asimmetrica (ADMA), inibitore competitivo della NOS ¹⁰⁴. L'omocisteina è responsabile anche del processo di apoptosi delle EPCs attraverso un meccanismo p38 MAPK-dipendente, che sembra essere inibito dalla terapia con atorvastatina ¹⁰⁵.

Ruolo dello stress ossidativo nello scompenso cardiaco e nel danno da ischemia-riperfusion

Diverse evidenze hanno supportato il ruolo dello stress ossidativo nella fisiopatologia

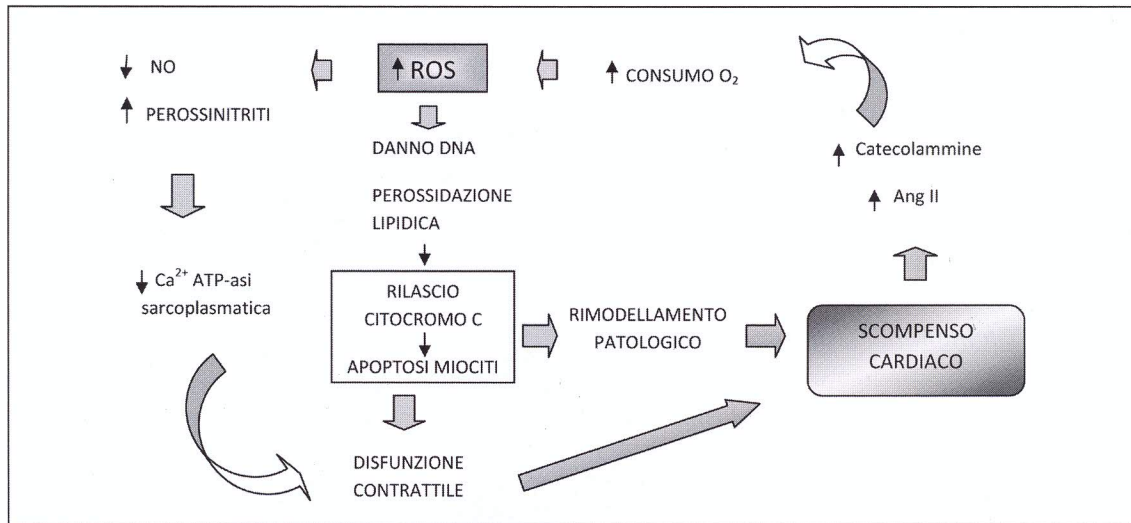


Figura 4. — Stress ossidativo e scompenso cardiaco.

dell'insufficienza cardiaca. Un'esposizione prolungata ai ROS porta ad attivazione/deattivazione enzimatica, rottura del DNA e perossidazione lipidica che sono responsabili della successiva apoptosi dei miociti e del rimodellamento patologico che si osserva nell'insufficienza cardiaca. Le catecolamine e l'angiotensina II inducono ipertrofia tramite la produzione di ROS. Inoltre una sovraespressione di catalasi riduce l'ipertrofia indotta da Ang II e la presenza di p22phox antisense riduce la produzione di H_2O_2 . Ciò sembra suggerire che lo stress ossidativo indotto dalla NADPH ossidasi è coinvolto nello sviluppo dell'ipertrofia miocardica¹⁰⁶. Anche i ROS prodotti dalla xantina ossidasi¹⁰⁷ e dai mitocondri¹⁰⁸ e il deficit di glutazione perossidasi¹⁰⁹ risultano coinvolti nella disfunzione contrattile. I ROS diminuiscono la disponibilità di NO e compromettono la funzione diastolica; inoltre i perossinitriti prodotti inattivano la Ca^{2+} ATP-asi sarcoplasmatica e alterano l'omeostasi del calcio determinando la disfunzione contrattile dei miocardiociti^{110, 111}. Il ruolo dell'NO nel

cuore scompensato è complesso; esso è presente come una molecola liberamente diffusibile che inibisce la risposta inotropica positiva alla stimolazione β -adrenergica. Per la normale funzione contrattile sono necessarie piccole quantità fisiologiche di NO prodotte dalla NOS costitutiva. Nel cuore scompensato, invece, viene sovraespressa la forma inducibile di NOS (iNOS) che determina un peggioramento dell'insufficienza cardiaca poiché elevati livelli di NO possono esercitare effetti proapoptotici e citotossici sulle cellule miocardiche a causa dell'aumentato stress ossidativo (Figura 4). I ROS determinano, infatti, la fuoriuscita del citocromo c dai mitocondri dove si trova associato al fosfolipide cardiopolina a livello della membrana mitocondriale interna; fenomeni di perossidazione lipidica possono destabilizzare questa associazione molecolare, ed al contempo l'ossidazione di gruppi SH da parte dei ROS può indurre il rilascio di citocromo c nel citoplasma¹¹². Il ruolo dello stress ossidativo nello scompenso cardiaco è sottolineato dalla possibilità che la terapia con antiossidanti sia in grado di prevenire la progressione dell'ipertrofia cardiaca, dell'apoptosi dei miociti e del danno ischemia/riperfusion.

Il ripristino del flusso sanguigno in un tessuto dopo un periodo di ischemia, si

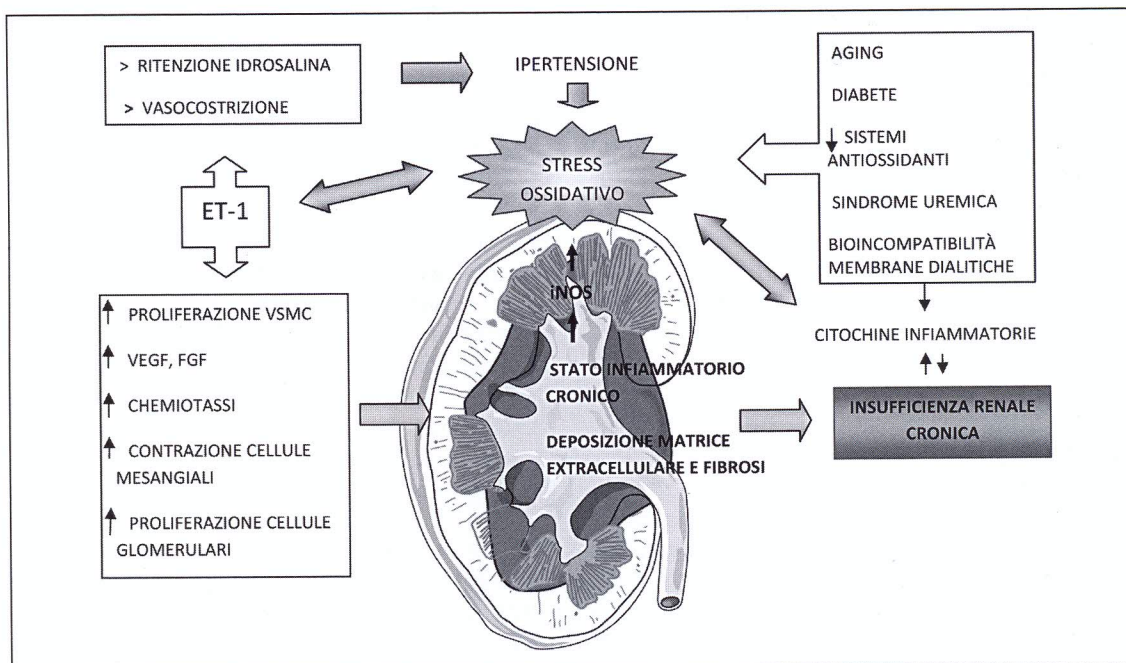


Figura 5. — Ruolo dello stress ossidativo nella patogenesi dell'insufficienza renale cronica.

accompagna a condizioni di stress ossidativo che può produrre grave danno tissutale. Già durante il periodo di ischemia si può osservare un moderato innalzamento dei livelli di ROS, probabilmente a genesi mitocondriale. L'aumento massivo di ROS al momento della ri-perfusione deriva dall'attivazione della xantina ossidasi, a seguito dell'accumulo nel tessuto di cataboliti purinici dell'ATP consumato durante la fase anossica, ciò comporta la produzione intracellulare di O_2^- e H_2O_2 . Inoltre l'adesione di granulociti all'endotelio danneggiato durante la fase ischemica si accompagna alla loro attivazione, con produzione di elevati livelli extracellulari di agenti pro-ossidanti che inducono la perossidazione lipidica, l'ossidazione proteica e danno al DNA. La risposta infiammatoria sembra essere mediata dall'azione dei Toll like receptors (TLRs) ¹¹³. ROS e prodotti della perossidazione lipidica causano disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa mitocondriale, alterando il trasporto di Ca^{2+} intracellulare. In alcuni modelli murini il deficit di enzimi antiossidanti quali la SOD_2 ¹¹⁴ e della

glutazione perossidasi ¹¹⁵ determina una maggiore estensione dell'area ischemica, una precoce attivazione della caspasi 3 e apoptosi. Studi su topi con deficit di NOS neuronale e inducibile hanno evidenziato, invece, un minore danno ischemico. Un aumento dei livelli di omocisteina, di lipoperossidi, di NO, dei fagociti circolanti e una diminuzione dei livelli di vitamina C sono stati osservati nei pazienti con stroke ed aumentata produzione di ROS. Tutte queste osservazioni delineano il ruolo dello stress ossidativo nel danno ischemico ¹¹⁶⁻¹¹⁸.

Stress ossidativo e patologia renale

Lo stress ossidativo e la disfunzione endoteliale che caratterizzano l'ipertensione ed il diabete mellito costituiscono i principali fattori di rischio nella patologia renale. Tra i marker di disfunzione endoteliale, fondamentale importanza ha l'endotelina-1. Essa oltre all'azione vasocostrittrice stimola la produzione dei ROS, la proliferazione delle cellule muscolari lisce, la produzione

di citochine e dei fattori di crescita (VEGF e FGF), potenzia gli effetti del TGF- β e del PDGF, favorisce l'aggregazione piastrinica e la chemiotassi. A livello renale, l'ET-1 determina vasocostrizione, contrazione delle cellule mesangiali e aumento della proliferazione cellulare glomerulare. Numerosi studi indicano che l'ET-1 risulta coinvolta nella patogenesi di diverse nefropatie, quali l'insufficienza renale acuta ischemica, la nefropatia da mezzo di contrasto, l'eccessiva deposizione di matrice extracellulare e la fibrosi che si verificano nell'insufficienza renale cronica (IRC) e nella nefropatia diabetica (Figura 5). Inoltre, una sua aumentata produzione nel nefrone può causare un'inappropriata ritenzione idrosalina, contribuendo allo sviluppo e/o al mantenimento dell'ipertensione ¹¹⁹.

Uno studio sperimentale ha dimostrato come in cavie mantenute a dieta ipercolesterolemizzante e sottoposte successivamente a biopsia renale, il quadro istologico mostrava l'aumentata produzione di O₂⁻, la presenza di infiltrati infiammatori e di fibrosi, evidenziando il legame fra flogosi e stress ossidativo quali mediatori principali del processo aterosclerotico nell'insufficienza renale ¹²⁰. I pazienti ipertesi affetti da IRC presentano un incremento dei marker di infiammazione e di stress ossidativo, come risultato di una ridotta capacità antiossidante (ridotta disponibilità di vit. C e selenio, ridotti livelli di vit. E, ridotta attività del glutatione) e un'aumentata capacità pro-ossidante (età avanzata, elevata frequenza di diabete, stato infiammatorio cronico, sindrome uremica, bioincompatibilità delle membrane dialitiche) ¹²¹. Durante l'emodialisi si determina una maggiore produzione di interleuchine ed anafilotosine che attivano la NADPH ossidasi con produzione di ROS a cui si associa una ridotta disponibilità di antiossidanti. Inoltre l'uremia di per sé aumenta l'attivazione leucocitaria e il burst ossidativo. Lo stress ossidativo che ne consegue è implicato nelle complicanze dell'insufficienza renale quali l'anemia, l'amiloidosi, l'aterosclerosi e la malnutrizione ¹²². Tra i biomarcatori principalmente impiegati nella valutazione del

danno renale e cardiovascolare un ruolo importante è svolto dalla microalbuminuria, che rappresenta il primo marker di nefropatia e predice non soltanto la progressione del danno renale, ma soprattutto la mortalità e morbilità cardiovascolare complessiva ¹²³. Alcune ricerche sembrano evidenziare la relazione fra attivazione leucocitaria, flogosi e stress ossidativo nei nefropatici ^{124, 125}. Lo stress ossidativo, valutato attraverso le concentrazioni plasmatiche di 8-Iso-Prostaglandina F₂ α , aumenta in modo parallelo al declino della funzione renale. Inoltre, nei nefropatici, le concentrazioni plasmatiche di proteina C-reattiva risultano essere associate, alla presenza di ipertrofia ventricolare sinistra. L'identificazione di fattori di rischio cardiovascolare tradizionali e di nuovi biomarcatori devono rappresentare il primo obiettivo terapeutico precoce e finalizzato alla prevenzione del danno e degli eventi cardiovascolari, nonché al rallentamento del declino della funzione renale ¹²⁶.

Conclusioni

Le attuali evidenze scientifiche sono concordi nel ritenere che lo stress ossidativo costituisce uno dei fattori di rischio emergenti in patologia umana. Ad esso, infatti, risultano associati non solo l'invecchiamento precoce, ma anche una serie di quadri morbosi di natura degenerativa ad andamento cronico ed è considerato uno dei meccanismi patogenetici fondamentali della disfunzione endoteliale e dell'aterosclerosi. Le cellule endoteliali svolgono un ruolo essenziale nel controllo della funzione vascolare e l'NO ne costituisce il principale mediatore. Tutti i fattori di rischio cardiovascolare sono relati alla presenza di disfunzione endoteliale, causata dalla produzione di stress ossidativo che riduce la disponibilità di NO. L'endotelio malfunzionante favorisce la patogenesi dell'aterosclerosi e degli eventi atero-trombotici e costituisce quindi un fattore predittivo indipendente di eventi cardiovascolari. Considerato il ruolo dello stress ossidativo, negli ultimi anni è stata rivolta una crescente attenzione sui possibili effetti

di terapie antiossidanti. Gli studi che hanno valutato l'impiego della vitamina C ed E hanno mostrato risultati discordanti, mentre la riduzione delle fonti di stress ossidativo potrebbe avere effetti positivi¹²⁷. Una dieta ricca di frutta e verdura, olio di oliva¹²⁸, vino rosso¹²⁹ e tè sembrano ridurre la disfunzione endoteliale grazie all'elevato contenuto di vitamine antiossidanti e di flavonoidi. Farmaci utilizzati nel trattamento dell'insulinoreistenza quali la metformina e le statine riducono il rischio cardiovascolare e migliorano la funzione endoteliale. Le statine aumentano l'attivazione della eNOS, riducono i livelli di PCR e delle molecole di adesione sICAM-1 (atorvastatina), sVCAM-1 ed E-selectina (simvastatina). La somministrazione di farmaci antipertensivi, quali gli ACE-inibitori e i sartani migliorano la funzione endoteliale attraverso la riduzione dell'azione dell'angiotensina II, che incrementa l'attività della NADPH ossidasi con conseguente aumentata produzione di ROS e inattivazione di NO¹³⁰. Infine, una regolare attività fisica migliora la funzione endoteliale determinando una maggiore produzione di NO¹³¹.

Riassunto

La disfunzione endoteliale e lo stress ossidativo rappresentano i meccanismi fisiopatologici principali di varie patologie quali l'ipertensione, l'aterosclerosi, le dislipidemie, il diabete, le malattie cardiovascolari, l'insufficienza renale e il danno da ischemia-riperfusion. Le specie reattive dell'ossigeno (*reactive oxygen species*, ROS) possono modulare la funzione cellulare, i segnali recettoriali e le risposte immuni in condizioni fisiologiche, ma quando presenti in eccesso mediano un progressivo danno endoteliale attraverso la crescita e la migrazione delle cellule muscolari lisce vascolari e delle cellule infiammatorie, l'alterazione della matrice extracellulare, l'apoptosi delle cellule endoteliali, l'attivazione di fattori di trascrizione (NFκB, AP-1), l'espressione di citochine infiammatorie e di molecole di adesione (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina). Recenti evidenze suggeriscono che la maggiore fonte di ROS è la NADPH ossidasi, attivata soprattutto dall'angiotensina II, dallo shear stress e dall'iperglicemia. La mancanza di equilibrio tra la produzione di radicali liberi e la capacità di neutralizzarli da parte dei sistemi antiossidanti deter-

mina una condizione di "stress ossidativo". I ROS alterano il tono vascolare tramite l'aumento della concentrazione di calcio citosolico e soprattutto determinando una minore disponibilità di ossido nitrico, principale mediatore della funzione endoteliale ad azione vasodilatatrice. I dati emersi da studi sperimentali su animali e sull'uomo confermano che la vasodilatazione dipendente dall'endotelio è alterata in molte patologie.

Parole chiave: Disfunzione endoteliale - Stress ossidativo - Specie reattive dell'ossigeno - Ossido nitrico.

Bibliografia

1. Verma S, Buchanan MR, Anderson TJ. Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. *Circulation* 2003;108:2054-9.
2. Schiffrin EL. A critical review of the role of endothelial factors in the pathogenesis of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;38(Suppl 2):S3-S6.
3. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:1928-9.
4. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-6.
5. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM. Endothelium-derived relaxina factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 1987;61:866-79.
6. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthase: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001;357:593-615.
7. Zou MH, Shi C, Cohen RA. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest* 2002;109:817-26.
8. Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280:F193-F206.
9. Thacher TN, Silacci P, Stergiopoulos N, da Silva RF. Autonomous effects of shear stress and cyclic circumferential stretch regarding endothelial dysfunction and oxidative stress: an ex vivo arterial model. *J Vasc Res* 2009;47:336-45.
10. Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci* 2002;3:374-80.
11. Haynes WG, Webb DJ. Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. *Lancet* 1994;344:852-4.
12. Vogel RA. measurement of endothelial function by brachial artery flow-mediated vasodilation. *Am J Cardiol* 2001;88:31E-4E.
13. Moens AL, Goovaerts I, Claeys MJ, Vrints CJ. Flow-mediated vasodilation. A diagnostic instrument, or an experimental tool? *Chest* 2005;127:2254-63.
14. Haynes WG, Webb DJ. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. *J Hypertens* 1998;16:1081-98.
15. Griendling KK, Fitzgerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury. Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 2003;108:1912-6.
16. Widlansky ME, Gokce N, Keaney F, Vita JA. The clin-

- ical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:1149-60.
17. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:4651-5.
 18. Case J, Ingram DA, Haneline LS. Oxidative stress impairs endothelial progenitor cell function. *Antioxid Redox Signal* 2008;10:1895-907.
 19. John E Deanfield MB, Julian P, Ton J. Endothelial function and dysfunction. *Circulation* 2007;115:1285-95.
 20. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001;104:2673-8.
 21. Wulf Droge. Free radical in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;82:47-95.
 22. Griendling KK, Sorescu D, Lassègue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2175-83.
 23. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000;87:840-4.
 24. Suzuki H, Swee A, Zweifach BW. In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats: hydroethine microfluorography. *Hypertension* 1995;25:1083-9.
 25. OharaY, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 1993;91:2546-51.
 26. De Keulenaer GW, Alexander RW, Ushio-Fukai M, Ishizaka N, Griendling KK. Tumour necrosis factor α activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *Biochem J* 1998;329:653-7.
 27. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994;74:1141-8.
 28. Holland JA, Meyer JW, Chang MM, O'Donnell RW, Johnson DK, Ziegler LM. Thrombin stimulated reactive oxygen species production in cultured human endothelial cells. *Endothelium* 1998;6:113-21.
 29. Marumo T, Schini-Kerth VB, Fisslthaler B, Busse R. Platelet-derived growth factor-stimulated superoxide anion production modulates activation of transcription factor NF- κ B and expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human aortic smooth muscle cells. *Circulation* 1997;96:2361-7.
 30. Hwang J, Ing MH, Salazar A, Lassegue B, Griendling K, Navab M *et al*. Pulsatile versus oscillatory shear stress regulates NADPH oxidase subunit expression: implication for native LDL oxidation. *Circ Res* 2003;93:1225-32.
 31. Azumi H, Inoue N, Ohashi Y. Superoxide generation in directional coronary atherectomy specimens of patients with angina pectoris: important role of NAD(P)H oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1838-44.
 32. Channon KM. Oxidative stress and coronary plaque stability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1751-2.
 33. Kalinina N, Agrotis A, Tararak E, Antropova Y, Kanellakis P, Ilyinskaya O *et al*. Cytochrome b558-dependent NAD(P)H oxidase-phox units in smooth muscle and macrophages of atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:2037-43.
 34. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* 1996;98:2572-9.
 35. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H *et al*. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:9220-5.
 36. Ulrich Forstermann. Endothelial NO synthase as a source of NO and superoxide. *Eur J Clin Pharmacol* 2006;62:5-12.
 37. Ballinger S, Patterson C, Knight-Lozano CA, Burrow DL, Conklin CA, Hu Z *et al*. Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. *Circulation* 2002;106:544-9.
 38. Garbers DL, Dubois SK. The molecular basis of hypertension. *Annu Rev Biochem* 1999;68:127-55.
 39. Taddei S, Ghiadoni L, Virdis A. Vasoconstriction to endogenous endothelin-1 is increase in the peripheral circulation of patient with essential hypertension. *Circulation* 1999;100:1680-3.
 40. Lekakis JP, Papaioannou TG, Papamichael CM. Oral L-arginine improve endothelial dysfunction in patients with essential hypertension. *Int J Cardiol* 2002;86:317-23.
 41. Gokce N. L-arginine and hypertension. *J Nutr* 2004;134:28075-11S.
 42. Johnson FK, Johnson RA, Peyton KJ. Arginase inhibition restore arteriolar endothelial function in Dahl rats with salt-induced hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R1057-62.
 43. Touyz RM. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res* 2004;37:1263-73.
 44. Zalba G, San Jose G, Moreno M, Fortuno M, Fortuno A, Beaumont F *et al*. Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension* 2001;38:1395-9.
 45. Koh K, Ahn J, Han S, Kim D, Jin D, Kim H *et al*. Pleiotropic effects of angiotensin II receptor blocker in hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:905-10.
 46. Wassmann S, Laufs U, Bäumer AT, Müller K, Konkol C, Sauer H *et al*. Inhibition of geranylgeranylation reduces angiotensin II-mediated free radical production in vascular smooth muscle cells: involvement of angiotensin AT1 receptor expression and Rac1 GTPase. *Mol Pharmacol* 2001;59:646-54.
 47. Touyz RM, Yao G, Schiffrin EL. c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox: role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:981-7.
 48. Gregg D, Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ. Rac regulates cardiovascular superoxide through diverse molecular interactions: more than a binary GTP switch. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;285:C723-34.
 49. Gavazzi G, Banfi B, Deffert C, Fiette L, Schappi M, Herrmann F *et al*. Decreased bloodpressure in NOX1-deficient mice. *FEBS Lett* 2006;580:497-504.
 50. Hu L, Zhang Y, Lim PS, Miao Y, Tan C. Apocynin but non L-arginine prevents and reverses dexamethasone-induced hypertension in the vrat. *Am J Hypertens* 2006;19:413-8.
 51. Rey FE, Cifuentes ME, Kiarash A, Quinn MT. Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O₂⁻ and systolic blood pressure in mice. *Circ Res* 2001;89:408-14.
 52. Virdis A, Neves MF, Amiri F, Touyz RM. Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice. *J Hypertension* 2004;22:535-42.

53. Amiri F, Virdis A, Neves MF, Iglarz M, Seidah NG, Touyz RM *et al.* Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction. *Circulation* 2004;110:2233-40.
54. DelliPizzi A, Guan H, Tong X, Takizawa H, Nasjletti A. Lipoxygenase-dependent mechanisms in hypertension. *Clin Exp Hypertens* 2000;22:181-92.
55. Lounsbury KM, Hu Q, Ziegelstein RC. Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1362-9.
56. Lacy F, Kailasam MT, O'Connor DT, Schmid-Schonbein GW, Parmer RJ. Plasma hydrogen peroxide production in human essential hypertension: role of heredity, gender, and ethnicity. *Hypertension* 2000;36:878-84.
57. Zalba G, San Jose G, Moreno MU, Fortuno A, Diez J. NADPH oxidase-mediated oxidative stress: genetic studies of the p22 (phox) gene in hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:1327-36.
58. Moreno MU, Jose GS, Fortuno A, Beloqui O, Diez J, Zalba G. The C242T CYBA polymorphism of NADPH oxidase is associated with essential hypertension. *J Hypertens* 2006;24:1299-306.
59. Simic DV, Mimic-Oka J, Pljesa-Ercegovac M, Savic-Radojevic A, Opacic M, Matic D *et al.* Byproducts of oxidative protein damage and antioxidant enzyme activities in plasma of patients with different degrees of essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2006;20:149-55.
60. Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 2008;31(Suppl 2):S170-80.
61. Ferroni P, Basili S, Paoletti V, Davi G. Endothelial dysfunction and oxidative stress in arterial hypertension. *Nutrition, Metabolism e Cardiovascular Disease* 2006;16:222-33.
62. Nishimura H, Tsuji H, Masuda H. The effects of angiotensin metabolites on the regulation of coagulation and fibrinolysis in cultured rat aortic endothelial cells. *Thromb Haemost* 1999;82:1516-21.
63. Felmeden DC, Blann AD, Spencer CG. A comparison of flow-mediated dilatation and von Willebrand factor as marker of endothelial cell function in health and in hypertension: relationship to cardiovascular risk and effects of treatment: a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003;14:425-519.
64. Del Prato S, Sesti G, Bolli GB. Target glicemici e rischio micro e macrovascolare nel diabete. *Il diabete* 2009;21:189-211.
65. Tan KC, Chow WS, Ai VH, Metz C, Bucala R, Lam KS. Advanced glycation end products and endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002;25:1055-9.
66. Yamagishi S. Advanced glycation end products and receptor-oxidative stress system in diabetic vascular complications. *Ther Apher Dial* 2009;13:534-9.
67. Stevens MJ. Oxidative-nitrosative stress as a contributing factor to cardiovascular disease in subjects with diabetes. *Curr Vasc Pharmacol* 2005;3:253-66.
68. Heitzer T, Krohn K, Albers S, Meinertz T. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 2000;43:1435-8.
69. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y *et al.* Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000;404:787-90.
70. Camici GG, Schiavoni M, Francia P. Genetic deletion of p66(Shc) adaptor protein prevents hyperglycemia-induced endothelial dysfunction and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;104:5217-22.
71. Davi G, Ciabattini G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S *et al.* In vivo formation of 8-iso-prostaglandin f2alpha and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation* 1999;99:224-9.
72. Kim J, Montagnani M, Koh KK. Reciprocal relationship between insulin resistance and endothelial dysfunction. *Circulation* 2006;113:1888-904.
73. Arcaro G, Cretti A, Balzano S. Insulin causes endothelial dysfunction in human. *Circulation* 2002;105:576.
74. Tziomalos K, Athyros VG, Karagiannis A. Endothelial dysfunction in metabolic syndrome: prevalence, pathogenesis and management. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010;20:140-6.
75. Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004;84:1381-478.
76. Zeiher AM, Drexler H, Saurbier B. Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. *J Clin Invest* 1993;92:652-62.
77. Seiler C, Hess OM, Buechi M. Influence of serum cholesterol and other coronary risk factors on vasomotion of angiographically normal coronary arteries. *Circulation* 1993;88:2139-48.
78. Steinberg HO, Bayazeed B, Hook G. Endothelial dysfunction is associated with cholesterol levels in the high normal range in humans. *Circulation* 1997;96:3287-93.
79. Sattar N, Petrie JR, Jaap AJ. The atherogenic lipoprotein phenotype and vascular endothelial dysfunction. *Atherosclerosis* 1998;138:229-35.
80. Li XP, Zhao SP, Zhang XY. Protective effects of high density lipoprotein on endothelium-dependent vasodilatation. *Int J Cardiol* 2000;73:231-6.
81. Mullen MJ, Kharbanda RK, Cross J. Heterogeneous nature of flow mediated dilatation in human conduit arteries in vivo: relevance to endothelial dysfunction in hypercholesterolemia. *Circ Res* 2001;88:145-51.
82. Liao JK, Clark SL. Regulation of G-protein alpha i2 subunit expression by oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995;95:1457-63.
83. Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO. Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol impairs endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. *Hypertension* 1997;30:57-63.
84. Jacobs MC, Lenders JW, Kapma JA. Effects of chronic smoking on endothelium-dependent vascular relaxation in humans. *Clin Sci* 1993;85:51-5.
85. Celermajer DS, Adams MR, Clarkson P. Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adults. *N Engl J Med* 1996;334:150-4.
86. Neunteufl T, Priglinger U, Heher S. Effects of vitamin E on chronic and acute endothelial dysfunction in smokers. *Jam Coll Cardiol* 2000;35:277-83.
87. Motoyama T, Kawano H, Kugiyama K. Endothelium-dependent vasodilation in the brachial artery is impaired in smokers: effect of vitamin C. *Am J Physiol* 1997;273:1644-50.
88. Guthikonda S, Simkey C, Barenz T. Xanthine oxidase inhibition reverses endothelial dysfunction in heavy smokers. *Circulation* 2003;107:416-21.

89. Bautista LE, Arenas IA, Peñuela A. Total plasma homocysteine level and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis of prospective cohort studies. *J Clin Epidemiol* 2002;55:882-7.
90. Squellero I, Marenzi G, Veglia F, Cighetti G, Tremoli E, Cavalca V. Omocisteina, stress ossidativo e alterata sintesi di monossido d'azoto nelle patologie coronariche. *Biochimica clinica* 2009;33:1.
91. Stein JH, McBride PE. Hyperhomocysteinemia and atherosclerotic vascular disease: pathophysiology, screening and treatment. *Arch Intern Med* 1998;158:1301-6.
92. Bellamy MF, McDowell IF, Ramsey MW. Hyperhomocysteinemia after an oral methionine load acutely impairs endothelial function in healthy adults. *Circulation* 1998;98:1848-52.
93. Weiss N. Mechanisms of increased vascular oxidant stress in hyperhomocysteinemia and its impact on endothelial function. *Curr Drug Metab* 2005;6:27-36.
94. Kanani PM, Sinkey CA, Browning RL. Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocysteinemia in humans. *Circulation* 1999;100:1161-8.
95. Topal G, Brunet A, Millanvoye E. Homocysteine induces oxidative stress by uncoupling of NO synthase activity through reduction of tetrahydrobiopterin. *Free Radic Biol Med* 2004;36:1532-41.
96. Tawakol A, Omland T, Gerhard M. Hyperhomocysteinemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in humans. *Circulation* 1997;95:1119-21.
97. Starkebaum G, Harlan JM. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest* 1986;77:1370-6.
98. Radomski MW, Salas E. Nitric oxide-biological mediator, modulator and factor of injury: its role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1995;118:S69-80.
99. McCully K. Homocysteine and vascular disease. *Nat Med* 1996;2:386-9.
100. Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:6369-73.
101. Harker LA, Ross R, Slichter SJ. Homocysteine-induced arteriosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J Clin Invest* 1976;58:731-41.
102. Zou CG, Banerjee R. Homocysteine and redox signaling. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:547-59.
103. Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxin factor and related oxides of nitrose. *J Clin Invest* 1993;91:308-18.
104. Stühlinger MC, Oka RK, Graf EE. Endothelial dysfunction induced by hyperhomocysteinemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2003;108:933-8.
105. Bao XM, Wu CF, Lu GP. Atorvastatin inhibits homocysteine-induced oxidative stress and apoptosis in endothelial progenitor cells involving Nox4 and p38MAPK. *Atherosclerosis* 2009 [Epub ahead of print].
106. Li J, Gall NP, Grieve DJ, Chen M, Shah AM. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertension* 2002;40:477-84.
107. Ekelund U, Harrison RW, Shokek O, Thakkar RN, Tunin RS, Senzaki H *et al.* Intravenous allopurinol decreases myocardial oxygen consumption and increases mechanical efficiency in dogs with pacing-induced heart failure. *Circ Res* 1999;85:437-45.
108. Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N *et al.* Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res* 1999;85:357-63.
109. Ardanaz N, Yang XP, Cifuentes ME, Haurani MJ, Jackson KW, Liao TD *et al.* Lack of glutathione peroxidase 1 accelerates cardiac-specific hypertrophy and dysfunction in angiotensin II hypertension. *Hypertension* 2010;55:116-23.
110. Klebl B, Ayoub AT, Pette D. Protein oxidation, tyrosine nitration, and inactivation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in low-frequency stimulated rabbit muscle. *FEBS Lett* 1998;422:381-4.
111. Ferdinandy P, Danial H, Ambrus I, Rothery RA, Schulz R. Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. *Circ Res* 2000;87:241-7.
112. Petrosillo G, Ruggiero FM, Paradies G. Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria. *Faseb J* 2003;17:2202-8.
113. Gill R, Tsung A, Billiar TR. Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. *Free Radic Biol Med* 2010 [Epub ahead of print].
114. Keller J, Kindy MS, Holsberg FW. Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *J Neurosci* 1998;18:687-97.
115. Crack P, Taylor JM, Flentjar NJ, de Haan J, Hertzog P, Iannello RC *et al.* Increased infarct size and exacerbated apoptosis in the glutathione peroxidase-1 (Gpx-1) knockout mouse brain in response to ischemia/reperfusion injury. *J Neurochem* 2001;78:1389-99.
116. Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Fishman MC, Moskowitz MA. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 1994;265:1883-5.
117. Iadecola C, Zhang F, Casey R, Nagayama M, Ross ME. Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J Neurosci* 1997;17:9157-64.
118. El Kossi M, Zakhary MM. Oxidative stress in the context of acute cerebrovascular stroke. *Stroke* 2000;31:1889-92.
119. Schiffrin EL. Endothelin and endothelin antagonists in hypertension. *J Hypertens* 1998;16:1891-5.
120. Chade AR, Lerman A, Lerman LO. Kidney in early atherosclerosis. *Hypertension* 2005;45:1042-9.
121. Sowers JR. Hypertension, angiotensin II, and oxidative stress. *N Engl J Med* 2002;346:1999-2001.
122. Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM. The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int* 2002;62:1524-38.
123. Pedrinelli R, Dell'Olmo G, Di Bello V. Low grade inflammation and microalbuminuria in hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:2114-9.
124. Caimi G, Carollo C, Montana M, Iatrino R, Bondi B, Lo Presti R. Nitric oxide metabolites, leukocyte activation markers and oxidative status in dialyzed subjects. *Blood Purif* 2009;27:194-8.
125. Caimi G, Carollo C, Montana M, Vaccaro F, Lo Presti R. Elastase, myeloperoxidase, nitric oxide metabolites and oxidative status in subjects with clinical stable chronic renal failure on conservative treatment. *Clin Hemorheol Microcirc* 2009;43:251-6.
126. Morena M, Delbosc S, Dupuy AM, Canaud B, Cristol JP. Overproduction of reactive oxygen species in

- end-stage renal disease patients: a potential component of hemodialysis-associated inflammation. *Hemodial Int* 2005;9:37-46.
127. Salonen JT, Nyyssonen K, Salonen N. Antioxidant supplementation in atherosclerosis prevention study: a randomised trial of the effects of vitamins E and C on 3 years progression of carotid atherosclerosis. *J Intern Med* 2000;248:377-86.
128. Javier S, Moruno R, Gutierrez. The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *J Nutr Biochem* 2006;17:429-45.
129. Kane MO, Etienne-Selloum N, Madeira SV, Sarr M, Walter A, Dal-Ros S *et al.* Endothelium-derived contracting factors mediate the Ang II-induced endothelial dysfunction in the rat aorta: preventive effect of red wine polyphenols. *Pflugers Arch* 2009 [Epub ahead of print].
130. Ghiadoni L, Magagna A, Versari D. Different effect of antihypertensive drugs on conduit artery endothelial function. *Hypertension* 2003;41:1281-6.
131. Higashi Y, Yoshizumi M. Exercise and endothelial function: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. *Pharmacol Ther* 2004;102:87-96.