

22° CICLO

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE CLINICHE E SPERIMENTALI

RELAZIONE SULL'ATTIVITA' SVOLTA DALLA DOTT. SSA VERONICA BOCCIOLETTI

Durante il triennio di dottorato in Scienze Mediche Cliniche e Sperimentali, la Dott.ssa Veronica Boccioletti, ha svolto la propria attività di ricerca focalizzando lo studio sul ruolo dello stress ossidativo nell'indurre infiammazione come momento patogenetico fondamentale della disfunzione endoteliale (primo step patogenetico nello sviluppo della malattia aterosclerotica)

Durante questo periodo ha dimostrato notevole interesse per la formazione e la ricerca, seguendo con costanza e profitto le attività formative organizzate dalla Clinica Medicina Interna D.

Il lavoro di ricerca si è focalizzato sullo studio della disfunzione endoteliale come marker precoce di malattia aterosclerotica. La valutazione del danno endoteliale, veniva eseguita mediante parametri biomolecolari (misurazione degli indici di stress ossidativo, con in particolare sul dosaggio dei fosfolipidi ossidati e liso-fosfatidilcolina e valutazione del grado di attivazione del sistema antiossidante Nrf2-ARE mediato) e clinici (misurazione IMT carotideo e FMD dell'arteria brachiale).

Lo studio si rivolgeva e confrontava soggetti sani, soggetti con uno o più fattori di rischio cardiovascolare e soggetti con malattia aterosclerotica conclamata (coronaropatia o aterosclerosi carotidea). Il candidato ha perfezionato le proprie conoscenze sulla gestione del paziente ad elevato rischio cardiovascolare, in termini di prevenzione, diagnostica e trattamento.

Ha svolto costante attività assistenziale, attinente alla ricerca stessa, in termini di esecuzione di ecocolordoppler arterioso e venoso.

Ha svolto assistenza all'attività didattica nel corso di Metodologia Clinica e Semeiotica Medica dell'Università degli Studi di Verona.

Ha partecipato alla pubblicazione dei seguenti articoli scientifici:

1. A. Fratta Pasini, U. Garbin, M.C. Nava, C. Stranieri, M. Pellegrini, V. Boccioletti, M.L. Luchetta, P. Fabrizzi, V. Lo Cascio, L. Cominacini. Effect of sulphhydryl and non sulphhydryl ACE-inhibitors on endothelial function in essential hypertensive patients. *Am J Hypertens* 2007; 20: 443-450.
2. A. Fratta Pasini, M. Anselmi, U. Garbin, E. Franchi, C. Stranieri, M.C. Nava, V. Boccioletti, C. Vassanelli, L. Cominacini. Enhanced levels of Oxidized Low-Density Lipoprotein prime monocytes to cytokine overproduction via up-regulation of CD 14 and Toll-Like Receptor 4 in Unstable angina. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 1991-1997
3. U. Garbin, A. Fratta Pasini, C. Stranieri, S. Manfro, C. Mozzini, V. Boccioletti, A. Pasini, M. Cominacini, S. Evangelista, L. Cominacini. Effects of nebivolol on endothelial gene expression during oxidative stress in human umbelical vein endothelial cells. *Mediators Inflamm* 2008; 28: 367-375.
4. A. Fratta Pasini, U. Garbin, C. Stranieri, V. Boccioletti, C. Mozzini, S. Manfro, A. Pasini, M. Cominacini, L. Cominacini. Nebivolol treatment reduces serum levels of asymmetric dimethylarginine and improves endothelial dysfunction in essential hypertensive patients. *Am J Hypertens*. 2008 Nov; 21(11): 1251-1257.

Per tali ragioni si propone di ammettere il candidato all'esame finale per il dottorato di ricerca.

Il Tutor

Il Coordinatore
Prof. Corrado Vassanelli

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI VERONA
SCUOLA DI DOTTORATO IN
SCIENZE DELLA VITA E DELLA SALUTE
CORSO DI DOTTORATO IN SCIENZE MEDICHE CLINICHE E SPERIMENTALI

**MECCANISMI DI DISFUNZIONE ENDOTELIALE ED
ATEROSCLEROSI:
RUOLO DELLO STRESS OSSIDATIVO E INFIAMMAZIONE**

COORDINATORE: PROF CORRADO VASSANELLI
TUTOR: PROF LUCIANO COMINACINI
DOTTORANDO: DR.SSA VERONICA BOCCIOLETTI

INDICE:

1	INTRODUZIONE	1
1.1	EZIOPATOGENESI ATEROSCLEROSI:.....	2
1.1.1	DISFUNZIONE ENDOTELIALE E ATEROSCLEROSI:.....	2
1.1.2	STRESS OSSIDATIVO E ATEROSCLEROSI	3
1.1.2.1	PRODOTTI DI PEROSSIDAZIONE LIPIDICA: FOSFOLIPIDI OSSIDATI (ox-PAPC).....	3
1.1.2.2	PRODOTTI DI PEROSSIDAZIONE LIPIDICA: LISO-FOSFATIDILCOLINA (liso-PC).....	4
1.1.2.3	RISPOSTA CELLULARE ALLO STRESS OSSIDATIVO:.....	4
1.1.3	STRESS OSSIDATIVO E INFIAMMAZIONE: RUOLO DEL FATTORE DI TRASCRIZIONE NFKB.....	6
1.2	VALUTAZIONE DELL' ATEROSCLEROSI PRECOCE.....	7
1.2.1	ISPESSENTAMENTO INTIMA-MEDIA (IMT)	7
1.3	VALUTAZIONE DELLA DISFUNZIONE ENDOTELIALE:.....	7
1.3.1	FLOW-MEDIATED DILATATION (FMD)	7
2	SCOPO DELLA TESI	9
3	MATERIALI E METODI	10
3.1	SELEZIONE DEI PAZIENTI:.....	11
3.1.1	STUDIO FUMATORI	11
3.1.2	STUDIO PAZIENTI A RISCHIO CARDIOVASCOLARE INTERMEDIO-ELEVATO:	11
3.2	MISURAZIONE DI IMT CAROTIDEO.....	12
3.3	VALUTAZIONE FUNZIONE ENDOTELIALE	12
3.4	DETERMINAZIONE DEGLI ox-PAPC PLASMATICI E NELLE MEMBRANE DEI LINFOMONOCITI CIRCOLANTI (LMC).....	13
3.5	DETERMINAZIONE DELLA liso-PC PLASMATICA	14
3.6	DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE PLASMATICA E CELLULARE DI GSH.....	14
3.7	SEPARAZIONE DEI LMC DA SANGUE PERIFERICO	15
3.8	ESPRESSIONE GENICA NEI LMC.....	16
3.8.1	ESTRAZIONE DELL' RNA TOTALE	16
3.8.2	CONTROLLO QUALITATIVO E QUANTITATIVO DELL'RNA	16
3.8.3	REAL TIME PCR.....	16
3.9	ANALISI STATISTICA.....	17
4	RISULTATI	18
4.1	STUDIO SOGGETTI FUMATORI	18
4.2	STUDIO PAZIENTI A RISCHIO CARDIOVASCOLARE INTERMEDIO-ELEVATO	21
5	DISCUSSIONE	23
5.1	STUDIO SOGGETTI FUMATORI	23
5.2	STUDIO PAZIENTI A RISCHIO INTERMEDIO-ELEVATO.....	26
6	CONCLUSIONI	28
7	TABELLE E FIGURE	30
8	BIBLIOGRAFIA	44

1 INTRODUZIONE

1.1 EZIOPATOGENESI ATEROSCLEROSI:

La placca aterosclerotica è caratterizzata dall'attivazione delle cellule endoteliali, dall'infiltrazione di cellule derivate dal sangue circolante, soprattutto monociti e linfociti e dalla migrazione di cellule muscolari lisce dalla media all'intima. L'aterosclerosi è un processo in progressione che dopo un periodo silente più o meno lungo può divenire clinicamente manifesta.

I fattori patogenetici fondamentali sono (1):

- disfunzione endoteliale.
- stress ossidativo e ossidazione delle LDL
- infiammazione

1.1.1 DISFUNZIONE ENDOTELIALE E ATEROSCLEROSI

L'endotelio vascolare svolge un ruolo critico nelle funzioni omeostatiche e fisiologiche della struttura vascolare. In risposta a stimoli biochimici e meccanici le cellule endoteliali sintetizzano ed elaborano numerosi fattori in grado di modulare il tono vascolare, i processi infiammatori e trombotici ed infine la crescita vascolare (2).

Una varietà di insulti possono danneggiare la struttura e/o la funzione dell'endotelio vascolare; essi comprendono insulti fisici, biochimici e immunitari. Tali insulti inducono a livello endoteliale uno sbilanciamento nel rilascio di fattori vasocostrittori e vasodilatatori con conseguente alterazione della vasodilatazione endotelio-dipendente, definita come "disfunzione endoteliale"(3).

Alcuni fattori di rischio sono stati strettamente associati alla disfunzione endoteliale. Si tratta dei classici fattori di rischio cardiovascolare non modificabili, quali età e sesso, e modificabili, quali l'ipercolesterolemia (che appare essere il fattore di rischio maggiormente implicato nella patogenesi della malattia aterosclerotica), il fumo di sigaretta, il diabete mellito, l'ipertensione arteriosa, l'iperomocisteinemia (4-8).

Numerosi studi hanno dimostrato che lo stress ossidativo e l'infiammazione giocano un ruolo fondamentale nella patogenesi della disfunzione endoteliale (9) che è comunemente attribuita ad una ridotta disponibilità di ossido di azoto (NO) (10).

1.1.2 STRESS OSSIDATIVO E ATEROSCLEROSI

I ROS (Reactive Oxygen Species) sono molecole reattive che contengono ossigeno; tra questi quelli biologicamente più importanti sono il superossido (O_2^-), il perossido di idrogeno (H_2O_2) ed il radicale idrossilico (OH^-) (11).

Tutte le cellule producono normalmente ROS a livello mitocondriale, tramite xantina ossidasi, citocromo P450 (CYP-1), mieloperossidasi e soprattutto NADPH ossidasi (12). Normali livelli intracellulari di ROS mediano la traduzione di vie di segnale intracellulare mentre all'opposto, livelli elevati possono causare l'inizio di un processo infiammatorio, di apoptosi o di necrosi (13) .

Numerose evidenze indicano che lo stress ossidativo che è determinato dall'aumento dei ROS, soprattutto (O_2^-), innesca ed amplifica il processo aterosclerotico mediante induzione di alterazioni a carico dell'espressione genica, promozione dell'infiammazione e disfunzione endoteliale (13-15).

Benchè gli studi sperimentali abbiano osservato che esiste uno stretto legame eziologico tra l'incremento dello stress ossidativo a livello vascolare e lo sviluppo di aterosclerosi, la principale difficoltà della misurazione dei ROS in vivo è dovuta al fatto che la loro emivita è molto breve (16). La maggior parte delle metodiche per il dosaggio dei ROS non è utilizzabile nell'uomo o in altri organismi viventi (17).

Nell'uomo lo stress ossidativo si misura indirettamente e si ricercano biomolecole ossidate, quali le oxLDL, i perossidi dei lipidi o loro derivati come l' MDA, altre modificazioni ossidative di proteine (es: nitrotirosine) o prodotti ossidati dell'acido arachidonico o di altri acidi grassi poliinsaturi (es:isoprostani).

1.1.2.1 PRODOTTI DI PEROSSIDAZIONE LIPIDICA: FOSFOLIPIDI OSSIDATI (ox-PAPC)

Il fosfolipide 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine (PAPC) è il principale componente delle membrane cellulari e delle lipoproteine. L' ossidazione del PAPC (ox-PAPC) dà luogo ad una pletora di differenti prodotti di reazione di uguale peso molecolare ma diversa formula di struttura. Gli ox-PAPC che sono presenti nei siti di infiammazione cronica, nelle membrane delle cellule apoptotiche e nelle ox-LDL, vengono considerati un marker affidabile di aterosclerosi (18).

Il principale effetto proinfiammatorio degli ox-PAPC e dei loro componenti è dovuto alla loro capacità di aumentare l'adesione ed il binding dei monociti alle cellule endoteliali e di impedire l'adesione dei neutrofili inibendo la produzione di E-selectin

indotta da lipopolisaccaride (18). Infine, gli ox-PAPC generati dal processo infiammatorio o dall'apoptosi, modulano la risposta infiammatoria, inducendo l'espressione di numerosi geni inerenti la via di segnale NF-E2-related factor 2/antioxidant related element (Nrf2/ARE), che codificano per la fase II di detossificazione e per proteine antiossidanti (19).

1.1.2.2 PRODOTTI DI PEROSSIDAZIONE LIPIDICA: LISO-FOSFATIDILCOLINA (liso-PC)

La liso-PC è localmente generata a livello sottoendoteliale per azione della fosfolipasi A2 (Lp-PLA2) secretoria da parte dei macrofagi. La liso-PC induce la chemiotassi dei monociti e T linfociti (20), la produzione di molecole di adesione (20), la produzione di fattori di crescita (PDGF,FGF) (21), favorisce la migrazione e proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari (22-25), inibisce la sintesi del nitrossido (NO) a livello endoteliale (26). La liso-PC, dopo essere stata prodotta, in parte si riversa in circolo dove è trasportata dalle ox-LDL (20)

Takeishi e collaboratori hanno osservato che la liso-PC, induce la produzione di ROS attraverso la via NADPH ossidasi in cellule endoteliali(25).

Evidenze in vivo dimostrano che in pazienti con diabete mellito, soprattutto con complicanze macrovascolari, i livelli di liso-PC nelle LDL sono più elevati rispetto ai non diabetici (27,28). La dimostrazione di un'aumentata produzione di liso-PC nella circolazione coronarica di pazienti con aterosclerosi in fase iniziale e del ruolo fondamentale che la liso-PC gioca anche nella disfunzione endoteliale indotta dalla Lp-PLA2 suggeriscono che la liso PC possa giocare un ruolo importante anche nelle fasi precoci dell'aterosclerosi. (28-29).

1.1.2.3 RISPOSTA CELLULARE ALLO STRESS OSSIDATIVO GLUTATIONE (GSH)

Il tripeptide l- γ -glutamyl-l-cysteinyl-glycina, o glutatione (GSH), un tiolo ubiquitario, è un fondamentale antiossidante che svolge un ruolo chiave nel mantenimento dello stato ossido-riduttivo (redox) cellulare e dei meccanismi di difesa cellulare aumentati dallo stress ossidativo (30). Numerose evidenze infatti dimostrano che condizioni associate ad aumentato stress ossidativo modulano i segnali intracellulari redox-mediati alterando l'equilibrio omeostatico del GSH.

La γ -glutamylcisteina sintasi (gGCS), è uno degli enzimi chiave nella sintesi di GSH. Il maggior antiossidante intracellulare è il glutatione (GSH). Il GSH è sintetizzato a

partire da cisteina, glicina e glutammato e la disponibilità di cisteina è l'elemento limitante (31)

Il GSH regola l'espressione e l'attivazione di fattori di trascrizione redox-sensibili indotti da stress ossidativi (32).

Si è osservato un incremento dell'ossidazione GSH nel diabete mellito tipo 2 (33) e durante esposizione al fumo di sigaretta (34,35). Il fumo di sigaretta contiene composti (come acroleina) che reagiscono con il GSH, così come i ROS che ossidano il GSH alla sua forma disulfidica (GSSG), determinando una riduzione dei livelli plasmatici di GSH (35,36).

1.1.2.3.1 SISTEMA ANTIOSSIDANTE VIA NRF2-ARE MEDIATA

Nuclear erythroid-related factor 2 (Nrf2) è un fattore di trascrizione redox-sensibile che svolge un ruolo fondamentale nella antioxidant response element (ARE)-mediata induzione di enzimi di detossificanti di fase II e di enzimi antiossidanti. La via di segnale Nrf2/ARE è coinvolta in numerosi processi immuni ed infiammatori; inoltre ci sono numerose evidenze del suo ruolo protettivo a livello dei macrofagi e delle cellule endoteliali (37,38).

Sono molti gli studi che riportano che tutti questi enzimi "Nrf2 correlati" svolgono un ruolo critico nella protezione di numerosi tessuti fornendo spesso in modo sinergico un'azione citoprotettiva, antiossidante ed anti-infiammatoria (39,40). L'attivazione dei geni che contengono la regione ARE dipende da un fattore di trascrizione chiamato Nrf2 che si trova nel citoplasma in forma inattiva legato all'inibitore Keap1; segnali di attivazione dell'ARE staccano il legame Nrf2-Keap1 e permettono la traslocazione nel nucleo dell'Nrf2 con attivazione delle sequenze ARE e conseguentemente dei geni degli enzimi e proteine detossificanti, quali: NADP(H):quinone ossidoriduttasi 1 (NQO1, superossido dismutasi (SOD), glutatione-S-trasferasi (GST), glutatione per ossidasi, gGCS (41).

Da quanto appena esposto appare evidente che questi enzimi "Nrf2 correlati" svolgono un fondamentale ruolo antiossidante e citoprotettivo

1.1.3 STRESS OSSIDATIVO E INFIAMMAZIONE: RUOLO DEL FATTORE DI TRASCRIZIONE NFKB

Qualora i sistemi di antiossidazione non siano efficienti nel mantenere lo stato redox cellulare, l'escalation ossidativa condurrebbe ad attivazione della cascata delle MAPKs con conseguente espressione di citochine proinfiammatorie, chemochine e molecole di adesione (42). Tale espressione avviene sotto il controllo del fattore di trascrizione Nuclear Factor (NF)- κ B, il primo fattore di trascrizione redox-sensibile che è stato dimostrato rispondere direttamente allo stress ossidativo.

L' NF κ B nelle cellule non stimolate si localizza nel citoplasma tramite legame con le proteine inibitorie della famiglia kappa B (I κ B)(42). In risposta a numerosi stimoli cellulari (come fumo di sigaretta, AGEs, oxLDL, citochine, LPS, shear stress, etc.) l'I κ B-alfa viene staccato dal complesso con l' Nf κ B e sottoposto a degradazione proteolitica. Questo processo coinvolge la fosforilazione dell'I κ B-alfa per azione di membri della famiglia I κ B-chinasi (IKK). La degradazione dell'I κ B-alfa permette l' "attivazione" dell'Nf- κ B, cioè la sua traslocazione dal citoplasma al nucleo, dove legandosi a specifici elementi promoter del DNA induce la trascrizione di numerosi geni infiammatori, tra i quali citochine, chemochine e molecole di adesione (42).

In condizione fisiologiche l'NO esercita un' importante azione inibitoria sull' Nf κ B (80), mentre una caratteristica comune degli stimoli in grado di attivare tale sistema sembra essere l'aumento della concentrazione intracellulare dei ROS ed in particolare il superossido ed il perossido di idrogeno. Sembra quindi logico ipotizzare che in presenza di fattori di rischio che determinino una riduzione della biodisponibilità di NO, secondaria ad un'aumentata produzione di ROS, esista un forte stimolo all'attivazione dell'NFKb (43)

1.2 VALUTAZIONE DELL' AT EROSCLEROSI PRECOCE

1.2.1 ISPESSIMENTO INTIMA-MEDIA (IMT)

Decenni di alterazioni silenziose delle pareti arteriose precedono l'evento clinico cardiovascolare, che quindi riflette la presenza di una patologia aterosclerotica avanzata. Le prime alterazioni morfologiche delle pareti arteriose possono essere visualizzate tramite ultrasonografia (US) B-mode. Questa metodica non invasiva, ad elevata risoluzione è una delle migliori per l'identificazione delle fasi più precoci dell'aterosclerosi perché consente una risoluzione migliore rispetto all'angiografia sia tradizionale che con risonanza magnetica (44). Pertanto l'US è stata utilizzata in numerosi studi per valutare lo spessore dell'intima-media (IMT) a livello della carotide comune, come marker di aterosclerosi preclinica (45). È stato ampiamente dimostrato che in presenza di fattori di rischio per aterosclerosi si ha un'accelerazione dell'IMT, che è strettamente correlata all'incidenza di eventi cardiovascolari (45,46). Inoltre recenti studi epidemiologici hanno dimostrato che la riduzione dell'IMT è significativamente correlata con la riduzione del rischio cardiovascolare (45).

1.3 VALUTAZIONE DELLA DISFUNZIONE ENDOTELIALE:

1.3.1 FLOW-MEDIATED DILATATION (FMD)

Il termine "disfunzione endoteliale" identifica una condizione patologica caratterizzata da cellule endoteliali anatomicamente integre, ma la cui attivazione, invece di determinare esclusivamente la produzione di NO, attiva in modo parallelo la formazione di stress ossidativo. L'NO in condizioni di stress ossidativo tende a reagire con i ROS formando perossinitrito (ONOO⁻), che è altamente reattivo ed in grado di esacerbare lo stress ossidativo ed infiammatorio in atto. La disfunzione endoteliale è pertanto una condizione patologica caratterizzata da una ridotta biodisponibilità di NO.

È stata da tempo descritta una progressiva riduzione della funzionalità endoteliale con il progredire dell'età (47,48); il meccanismo che ne sta alla base rimane

sconosciuto, ma può essere relazionabile alla maggior produzione di ROS che si osserva come fenomeno età-correlato (49). nei pazienti con ipertensione arteriosa si ha una riduzione FMD a livello periferico (50) e dei vasi coronarici (51,52); grado di disfunzione endoteliale dipende dalla severità e dalla durata dell'ipertensione arteriosa (50).

La disfunzione endoteliale dimostrata nei pazienti affetti da diabete mellito tipo 2 è mediata da elevati livelli di glucosio. e sembra secondaria a minor biodisponibilità di NO causata dal maggior rilascio di ROS (53,54)

Anche l'ipercolesterolemia si associa ad un'alterata risposta vasodilatante verosimilmente dovuta a inattivazione di NO mediata dai ROS generati dalle LDL nello spazio subendoteliale (55).

La riduzione della FMD che è stata dimostrata sia nei fumatori (56,57) che nei soggetti esposti a fumo passivo (57,58), sembra correlata al numero di sigarette fumate e risulta solo parzialmente reversibile dopo cessazione dell'abitudine tabagica (56).

Anche in questo caso, come già dimostrato per gli altri fattori di rischio, l'alterata vasodilatazione sembra essere causata da una ridotta biodisponibilità di NO (60-63). L'importanza della valutazione FMD è dimostrata dal fatto che "sentinella" di eventi aterogenetici (64).

Il riscontro strumentale di disfunzione dell'endotelio rappresenta una spia di malattia cardiovascolare, un potenziale strumento per una migliore stratificazione del rischio e un elemento d'ausilio nell'identificazione di soggetti con lesioni stabili avanzate (65-67).

Molti studi confermano un aumento del rischio a breve e a lungo termine associato alla progressiva compromissione FMD (68).

2 SCOPO DELLA TESI

Da quanto finora esposto appare evidente che la disfunzione endoteliale e lo spessore intima-media sono fenomeni precoci che precedono la formazione delle placche aterosclerotiche, e potenzialmente reversibili. Anche se è noto il ruolo patogenetico dello stress ossidativo nella disfunzione endoteliale, i meccanismi fisiopatologici che li legano sono complessi e non ancora completamente chiariti.

Lo stress ossidativo è in grado di attivare il fattore di trascrizione redox-sensibile Nf-kB, che gioca un ruolo chiave nell'induzione genica di molecole di adesione e citochine, nonché la via Nrf2/ARE, che è fondamentale nel mantenere un'attività antiossidante contro i radicali liberi.

Poiché il fumo di sigaretta è considerato uno dei principali induttori di stress ossidativo, in quanto contiene enormi quantità di radicali liberi, lo scopo di questo progetto è stato inizialmente di valutare in soggetti sani di giovane età fumatori confrontati con non fumatori:

- a) la presenza di disfunzione endoteliale ed aterosclerosi subclinica.
- b) la presenza di stress ossidativo, mediante la misurazione della concentrazione plasmatica e nelle cellule circolanti dei fosfolipidi ossidati.
- c) le difese antiossidanti, mediante la concentrazione plasmatica e cellulare di GSH ed il grado di infiammazione, mediante la misurazione dei livelli circolanti di hsPCR
- d) l'espressione genica di Nrf2 e g-GCS e di IκBa nei linfomonociti circolanti dei soggetti.

Successivamente, e alla luce di questi primi dati, abbiamo esteso lo studio a soggetti a rischio cardiovascolare (intermedio ed elevato) nei quali abbiamo valutato:

- e) la presenza di aterosclerosi subclinica;
- f) la concentrazione plasmatica di liso-PC, un nuovo ed emergente marker di stress ossidativo,
- g) le difese antiossidanti, mediante la concentrazione plasmatica e cellulare di GSH ed il grado di infiammazione mediante la misurazione dei livelli circolanti di hs-PCR
- h) l'espressione genica di Nrf2 e IκBa nei linfomonociti circolanti dei soggetti.

3 MATERIALI E METODI

3.1 SELEZIONE DEI PAZIENTI:

3.1.1 STUDIO FUMATORI

Hanno partecipato allo studio 90 giovani soggetti sani, di cui 32 non fumatori, 32 fumatori (5-10 sigarette/die, per almeno 3 anni) e 26 fumatori grandi fumatori (25-40 sigarette/die, per almeno 3 anni)

Sono stati esclusi i soggetti con infezione acuta in atto e con fattori di rischio cardiovascolare (ipertensione arteriosa, dislipidemia, circonferenza vita >88 cm per le femmine e 102 cm per i maschi).

In tutti i soggetti stati valutati peso, altezza, circonferenza vita, pressione arteriosa e frequenza cardiaca.

L'abitudine tabagica è stata valutata con un questionario nel quale veniva chiesto il numero di sigarette fumate al giorno, gli anni di abitudine al fumo e l'eventuale sospensione temporanea dell'abitudine tabagica (indicando la durata). E' stata inoltre misurata l'emissione di CO nell'aria espirata, come parametro oggettivo dell'abitudine tabagica (Smokerlyzer, Bedfont, Upchurch, UK). I prelievi sono stati eseguiti dopo 12 ore di digiuno. L'esame emocromocitometrico, il profilo lipidico (colesterolo totale, colesterolo HDL e colesterolo LDL e trigliceridi), glicemia, AST, ALT, GGT e funzionalità renale sono stati determinati con i metodi standard. Per la determinazione quantitativa della PCR-hs plasmatica è stata utilizzata una metodica ad elevata sensibilità.

Tutti i soggetti hanno aderito allo studio dopo consenso informato.

3.1.2 STUDIO PAZIENTI A RISCHIO CARDIOVASCOLARE INTERMEDIO-ELEVATO:

Sono stati selezionati soggetti di ambo i sessi, di età compresa tra 35 e 75 anni, che avessero almeno 2 fattori di rischio cardiovascolare. Sono stati esclusi dallo studio: pazienti con evento vascolare in atto o nei precedenti 6 mesi, pazienti con insufficienza renale cronica, patologie neoplastiche o infiammatorie croniche.

I soggetti partecipanti allo studio sono stati suddivisi in due gruppi, il primo (RISCHIO INTERMEDIO) costituito da pazienti a rischio cardiovascolare intermedio, con almeno due fattori di rischio (ipertensione arteriosa, abitudine tabagica >10 sigarette/die, obesità addominale, dislipidemia e familiarità); il secondo gruppo (RISCHIO ELEVATO,) formato da soggetti ad alto rischio, cioè con malattia aterosclerotica nota (anamnesi per coronaropatia e/o arteriopatia periferica ed

evento ischemico cerebrale) o con diabete mellito tipo II.

Quantificazione del rischio cardiovascolare

Per la valutazione del rischio cardiovascolare abbiamo utilizzato l'Heart Score per Paesi europei a basso rischio, che utilizza come parametri rispettivamente l'età, il sesso, la pressione arteriosa sistolica, il colesterolo totale e l'abitudine tabagica. Non abbiamo utilizzato l'ATP III perché è calcolato sul paziente statunitense e se applicato alla nostra popolazione tende a sovrastimarne il rischio; il Progetto Cuore, invece, che è stato disegnato per la popolazione italiana, non considera pazienti di età superiore ai 69 anni, quindi escludeva alcuni soggetti del nostro campione di studio.

3.2 MISURAZIONE DI IMT CAROTIDEO

Nel nostro studio la misurazione dell' IMT è stata eseguita secondo quanto dichiarato nel consensus IMT di Mannheim (44). In particolare tutte le immagini sono state ottenute con un Ecografo B-Mode (Envisor CHD, Philips) utilizzando una sonda lineare da 7.5 MHz. L'IMT è stato misurato in proiezione longitudinale sulla parete lontana a livello del centimetro distale della carotide comune, della biforcazione carotidea ed al centimetro prossimale della carotide interna sia a destra che a sinistra. Tale misurazione combinata che comprende tutti e tre i settori rappresenta un indicatore più potente di aterosclerosi rispetto alla sola carotide comune (43) . Per ogni sede è stato inoltre misurato sia lo spessore medio che lo spessore massimo. Ciascun valore di IMT è stato calcolato in modo automatizzato tramite un software (IMT studio, CNR Pisa), che attraverso la selezione del segmento di arteria (1 cm) in esame, consente di ottenere un valore che è la media di 150 misurazioni eseguite in un periodo estremamente breve (<0.1 secondi). Il valore di IMT (sia medio che massimo) riportato nel nostro studio per ogni singolo soggetto è pertanto la media di 6 misurazioni.

3.3 VALUTAZIONE FUNZIONE ENDOTELIALE

E' stata effettuata tramite valutazione della FMD come precedentemente descritto (69) .E' stata utilizzata una sonda lineare da 7.5 mHz ed un ecografo vascolare (Envisor CHD, Philips). Poiché con questa tecnica è possibile misurare variazioni di calibro dell'arteria che sono dell'ordine di decimi di mm, abbiamo utilizzato un reggisonda a regolazione micrometrica che permette di mantenere la stessa posizione della sonda per tutta la durata dell'esame ed un software (FMD studio,

CNR Pisa) che permette l'analisi continuativa del calibro vascolare in modo da poter identificare con precisione il momento di maggior aumento di calibro. Dopo individuazione dell'arteria brachiale e misurazione per circa 1 min del diametro basale, viene indotta l'ischemia (per 5 min) a livello dell'avambraccio attraverso il pompaggio di un manicotto a 250 mmHg. Dopo il gonfiaggio l'arteria brachiale è stata continuamente monitorata per 5 min (vasodilatazione endotelio dipendente).

Dopo 15 min di riposo è stato nuovamente misurato il diametro basale per un 1 min; successivamente la vasodilatazione endotelio indipendente è stata ottenuta con la somministrazione di 25 ug di nitroglicerina (GTN) sublinguale.

L'FMD e la vasodilatazione GTN-indotta sono state calcolate come la variazione massima percentuale del diametro dell'arteria brachiale rispetto al basale, utilizzando un software (FMD studio, CNR Pisa).

3.4 DETERMINAZIONE DEGLI ox-PAPC PLASMATICI E NELLE MEMBRANE DEI LINFOMONOCITI CIRCOLANTI (LMC)

L'estrazione, la separazione e l'identificazione degli ox-PAPC dai campioni plasmatici e LMC, è stata eseguita come precedentemente descritto con alcune modifiche. In breve: a 120 µl di campione biologico sono stati aggiunti 300 µl di metanolo, 900 µl di cloroformio e 180 µl di fosfato di potassio monobasico (KH₂PO₄) 0,5 M. Dopo vigorosa agitazione per 10 min a temperatura ambiente della miscela, i campioni sono stati centrifugati a 2000g per 10 min. al fine di ottenere una distinta separazione tra la fase organica e quella acquosa. Completato il trasferimento della fase organica ed ottenuta l'evaporazione sotto flusso di azoto, l'estratto secco è stato ripreso con miscela di cloroformio-metanolo 1:5 contenente 0,01% di BHT. Prima dell'analisi i campioni sono stati nuovamente centrifugati a 2000g per 15 min a 4°C. Il sistema che è stato utilizzato per la separazione e l'identificazione dei fosfolipidi consta di un HPLC-MS Agilent, serie 1100 con una colonna C8, 5.0 µm Waters Spherisorb® (4.6x250 mm), eluizione isocratica con una miscela composta da metanolo e acetato ammonio (0.5 M) con rapporto 95:5; velocità di flusso 300 µl/min, termostatazione della colonna 35°C; volume di campione iniettato 8 µl. Parametri specifici del sistema di rivelazione dello spettrometro di massa a trappola ionica con interfaccia di ionizzazione ESI: dry temperatura 350°C, dry gas 8 l/min, nebulizer 35 PSI; voltaggio d'ingresso del capillare 3500 V. Sono stati presi in considerazione i seguenti oxPAPC: 1-hexadecanoyl-2-(5,6-epoxyisoprostane E2

oyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (PEIPC); 1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-phosphorylcholine(POVPC);1-palmitoyl-2-glutaroyl-sn-glycero-3phosphorylcholine (PGPC). Modalità di acquisizione utilizzata: single ion monitoring; rapporti m/z specifici impostati: 782.7 (PAPC), 828.5 (PEIPC), 610.2 (PGPC) e 594.2 (POVPC).

3.5 DETERMINAZIONE DELLA liso-PC PLASMATICA

L'estrazione della lisoPC dai campioni plasmatici è stata eseguita utilizzando il metodo Bligh&Dyer con alcune modifiche: a 120 µl di campione biologico sono stati aggiunti 300 µl di metanolo, 900 µl di cloroformio e 180 µl di fosfato di potassio monobasico (KH₂PO₄) 0,5 M. Dopo vigorosa agitazione per 10 min a temperatura ambiente della miscela, i campioni sono stati centrifugati a 2000 g per 10 min al fine di ottenere una distinta separazione tra la fase organica e quella acquosa. Completato il trasferimento della fase organica ed ottenuta l'evaporazione sotto flusso di azoto, l'estratto secco è stato ripreso con miscela di cloroformio-metanolo 1:5 contenente 0,01% di BHT. Prima dell'analisi i campioni sono stati nuovamente centrifugati a 2000 g per 15 min a 4°C. Il sistema che è stato utilizzato per la separazione e l'identificazione delle liso-PC consta di un HPLC-MS Agilent, serie 1100 con una colonna C8, 5.0 µm Waters Spherisorb® (4.6x250 mm), eluizione isocratica con una miscela composta da metanolo e acetato ammonio (0.5 M) con rapporto 95:5; velocità di flusso 300 µl/min, termostattizzazione della colonna 35°C; volume di campione iniettato 1 µl. Parametri specifici del sistema di rivelazione dello spettrometro di massa a trappola ionica con interfaccia di ionizzazione ESI: dry temperatura 350°C, dry gas 8 l/min, nebulizer 35 PSI; voltaggio d'ingresso del capillare 3500 V. E' stata presa in considerazione la 1-palmitoillisofosfatidilcolina (LisoPC 16:0); Modalità di acquisizione utilizzata: single ion monitoring; rapporto m/z specifico impostato: 496.2.

3.6 DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE PLASMATICA E CELLULARE DI GSH

A 240 µl di campione di plasma sono stati aggiunti 25 µl di IS (N-acetil-L-cisteina) 2 mM, 30 µl di tri-n-butilfosfina (10%) e raffreddato a 4° C per 30 min.

Successivamente il campione viene deproteinizzato con l'aggiunta di 300 µl di TCA 10% e centrifugato a 3000 rpm per 10 min.

A 50 µl di surnatante vengono aggiunti 200 µl di tampone borato 0.2 M (pH 9.5 +

EDTA 4 mM) e 50 μ l di una soluzione derivatizzante di SBDF (7-fluoro-benzo-2-cheto-1,3-diazol-4-solfonato) 1 mg/ml. Dopo agitazione, il campione viene incubato a 80° C per 30 min, e raffreddato in ghiaccio. 50 μ l del campione ottenuto vengono iniettati in colonna HPLC Superspher C18 4 μ m (150mm x 4.6 mm I.D. Merck) mediante autocampionatore AspecXL Gilson; come fase mobile è stata utilizzata una soluzione di tampone fosfato (pH 2.1, acetonitrile 10%) con velocità di flusso di 1.3 ml/min. Rivelatore di sistema: spettrofluorimetro Jasco ad eccitazione 385 nm ed emissione: 515 nm (74).

3.7 SEPARAZIONE DEI LMC DA SANGUE PERIFERICO

I LMC dei soggetti sono stati separati mediante Vacutainer Cell Preparation Tube (Beckton Dickinson), contenente sodio eparina, gel thixotropico e soluzione Ficoll Hypaque.

Entro mezz'ora dal prelievo il tubo di separazione contenente le soluzioni con 7 ml di sangue periferico veniva centrifugato a 1500 rpm per 20 minuti a 20°C. Lo strato superiore formato dai LMC, veniva trasferito in provette Falcon da 15 cc e portato a volume con PBS sterile. Dopo centrifugazione a 1200 rpm per 5 minuti veniva aspirato il sovrnatante e risospeso il pellet in PBS (2ml) da cui sono state prelevate due aliquote, rispettivamente di 1500 μ l per la determinazione dei oxPAPC e di 500 μ l per l' estrazione dell' RNA.

3.8 ESPRESSIONE GENICA NEI LMC

3.8.1 ESTRAZIONE DELL' RNA TOTALE

Per l'estrazione dell' RNA cellulare totale è stato utilizzato l'RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany), seguendo i consigli descritti nel protocollo della ditta. In breve, le cellule in coltura dopo il distacco con tripsina, sono state centrifugate a 1200 rpm e il pellet risospeso in Buffer di lisi RLT mentre i LMC venivano lisati direttamente. A tutti i campioni, dopo essere stati omogenati e centrifugati a 14000 rpm per 1', è stato aggiunto etanolo 70%; successivamente la soluzione veniva fatta passare attraverso una membrana per l'assorbimento dell'RNA alla stessa. Dopo alcuni lavaggi, veniva infine eluito con 30 µl di H₂O RNase-free. L'RNA veniva conservato a -20°C fino al momento dell'uso.

3.8.2 CONTROLLO QUALITATIVO E QUANTITATIVO DELL'RNA

Una piccola aliquota (1µl) dell' RNA totale ottenuto è stata utilizzata per eseguire i controlli qualitativo e quantitativo tramite Agilent 2100 Bioanalyzer dotato di Chip RNA 6000 Nano. La valutazione oggettiva qualitativa e quantitativa dei singoli campioni è stata determinata tramite software dedicato.

3.8.3 REAL TIME PCR

PCR Real Time è una tecnica che permette di amplificare un miliardo di volte l'RNA di una regione selezionata di un genoma, dopo essere stata trascritta in DNA attraverso trascrittasi inversa, purchè si conosca già almeno una parte della sua sequenza nucleotidica. La parte nota della sequenza viene utilizzata per disegnare due oligonucleotidi sintetici che si trovano ai lati della regione che deve essere amplificata e su filamenti diversi. Questi oligonucleotidi servono da primer per la sintesi di cDNA in vitro catalizzata da DNA polimerasi. Ogni ciclo richiede un breve riscaldamento per separare i due filamenti della doppia elica del cDNA genomico. Un successivo raffreddamento del cDNA in presenza di un grande eccesso dei due primer permette a questi oligonucleotidi di ibridizzarsi a sequenze complementari del cDNA genomico. La miscela ibridizzata è incubata con DNA polimerasi e la regione a valle di ciascuno dei due primer sono sintetizzate selettivamente. Sono necessari da 20 a 30 cicli di reazione per amplificare efficacemente il cDNA. Questa metodica è stata condotta con SYBRGreen SuperMix utilizzando MyiQ Thermal Cycler

(BIORAD, Hercules CA) per la valutazione dell'espressione dei geni HMOX-1, Nrf-2 e Ikb α . I primers dei geni gGCS, Nrf-2 e Ikb α sono stati selezionati usando le sequenze pubblicate e il software Beacon Designer e sintetizzati dalla MWG.

3.9 ANALISI STATISTICA

I risultati sono stati espressi come media \pm deviazione standard (SD). Per il confronto tra variabili continue è stato utilizzato il test t di Student per dati non appaiati; per l'analisi statistica tra 3 gruppi è stata utilizzata l'ANOVA e per il confronto post-hoc il test di Newmann-Keuls. L'analisi statistica è stata effettuata tramite SPSS 11.04 PER Macintosh (SPSS, Chicago, Ill.) ed è stata considerata statisticamente significativa una probabilità $p < 0.05$.

4 RISULTATI

4.1 STUDIO SOGGETTI FUMATORI

SELEZIONE DEI PAZIENTI, DATI ANTROPOMETRICI E PARAMETRI BIOUMORALI

I tre gruppi di soggetti studiati sovrapponibili per età e sesso, mostravano valori di pressione arteriosa sia sistolica che diastolica, frequenza cardiaca e circonferenza vita, body mass index (BMI) nei limiti di norma. Il profilo lipidico e la glicemia rientravano nel range di normalità sia nei soggetti fumatori che nei non fumatori così come la funzionalità renale ed epatica. Per quanto riguarda l'abitudine tabagica, i soggetti fumatori riferivano un consumo medio di $9,7 \pm 4,6$ sigarette/die da $9,2 \pm 3,4$ anni, i grandi fumatori di $30,2 \pm 7,1$ sigarette/die, da $8,4 \pm 5,1$ anni. Come atteso abbiamo riscontrato un significativo aumento del CO nell'aria espirata nei soggetti fumatori rispetto ai non fumatori (rispettivamente $8,9 \pm 2,8$ ppm nei fumatori, $19,2 \pm 4,2$ ppm nei grandi fumatori e $0,3 \pm 0,01$ ppm nei non fumatori, $P < 0,001$). (dati non presentati).

VALUTAZIONE DELLA FUNZIONE ENDOTELIALE E DELLO SPESSORE INTIMA-MEDIA (IMT)

Per valutare la presenza di aterosclerosi subclinica abbiamo inoltre misurato l'IMT a livello carotideo. I risultati del nostro studio dimostrano un progressivo significativo aumento dell'IMT nei tre gruppi di soggetti: rispettivamente $0,48 \pm 0,046$ mm nei non fumatori, $0,565 \pm 0,038$ mm nei fumatori e $0,66 \pm 0,048$ mm fumatori ($p < 0,02$). (Figura 1A)

I valori di FMD a livello dell'arteria brachiale, misura che riflette la funzione endoteliale, sono risultati significativamente diminuiti nei soggetti fumatori rispetto ai non fumatori (rispettivamente $2,3 \pm 1,1$ % nei grandi fumatori, $3,4 \pm 1,36$ % nei fumatori e $4,8 \pm 1,5$ % ($p < 0,0$) (Figura 2A)

Come atteso, la risposta vasodilatatoria indotta dal nitrato è risultata simile in tutti i gruppi di soggetti (rispettivamente $6,83 \pm 1,87\%$ nei non fumatori, $7,24 \pm 1,98$ nei fumatori e $6,59 \pm 1,71$ nei grandi fumatori). Analogamente il diametro basale medio dell'arteria brachiale era sovrapponibile in tutti i gruppi (rispettivamente $3,82 \pm 0,74$ mm nei fumatori, $3,91 \pm 0,91$ nei grandi fumatori e $3,59 \pm 0,62$ mm nei non fumatori) (dati non presentati).

PARAMETRI CIRCOLANTI DI INFIAMMAZIONE E STRESS OSSIDATIVO

Nei soggetti fumatori abbiamo riscontrato un significativo aumento ($p < 0,01$) dei livelli plasmatici di ox-PAPC rispetto ai non fumatori; inoltre, i soggetti grandi fumatori presentavano valori significativamente più elevati rispetto ai fumatori ($p < 0,01$). (Figura 3A)

Nei tre gruppi di soggetti studiati abbiamo inoltre determinato gli ox-PAPC sulle membrane cellulari dei LMC circolanti, nell'ipotesi che i ROS presenti nel fumo di sigaretta potessero ossidare anche i fosfolipidi delle membrane cellulari. I risultati del nostro lavoro dimostrano un significativo aumento ($p < 0,01$) degli ox-PAPC anche sulle membrane dei LMC dei soggetti fumatori rispetto ai non fumatori; inoltre, i soggetti grandi fumatori presentavano valori significativamente più elevati rispetto ai fumatori ($p < 0,01$). (Figura 4A)

I livelli circolanti di GSH sono risultati ridotti nei soggetti fumatori rispetto ai soggetti non fumatori in modo statisticamente significativo (non fumatori 6.8 ± 0.71 uM; fumatori 5.1 ± 0.47 uM, grandi fumatori 3.2 ± 0.38) ($p < 0.01$ fumatori verso non fumatori e $p < 0,01$ grandi fumatori verso fumatori). Allo stesso modo i livelli di GSH a livello LMC risultano ridotti nei soggetti fumatori rispetto ai non fumatori in modo statisticamente significativo (non fumatori $2,4 \pm 0.22$; fumatori $1.9 \pm 0,21$; grandi fumatori 1.1 ± 0.13 uM ($p < 0.01$ fumatori verso non fumatori e $p < 0,01$ grandi fumatori verso fumatori) (tabella 1A).

Inoltre nei soggetti fumatori abbiamo evidenziato un significativo aumento dei parametri di infiammazione considerati. In particolare: il numero dei leucociti totali e dei neutrofili, nei limiti di norma in tutti e tre i gruppi, è risultato significativamente aumentato nei grandi fumatori e fumatori rispetto ai non fumatori (rispettivamente 7800 ± 881 mm³, 6776 ± 970 mm³, 6279 ± 965 mm³, e 4821 ± 754 mm³, 3713 ± 1441 e 2825 ± 751 mm³) ($p < 0,01$). Analogamente la PCR, seppur nel range di normalità nei tre gruppi di soggetti è risultata significativamente aumentata nei grandi fumatori e fumatori rispetto ai non fumatori (rispettivamente 3.5 ± 0.33 mg/dl, 1.3 ± 0.15 mg/dL e 0.6 ± 0.07 mg/dL) ($p < 0.01$). (tabella 1A).

DATI ESPRESSIONE GENICA

Abbiamo infine valutato mediante analisi Real Time PCR nei LMC dei tre gruppi di soggetti studiati l'espressione genica di I κ B- α , del fattore di trascrizione Nrf2 e

dell'enzima g-GCS. Nei soggetti fumatori i livelli di espressione genica di I κ B- α sono risultati significativamente aumentati rispetto ai non fumatori: (espressione media grandi fumatori 8.7 ± 2.5 ; fumatori 5.12 ± 2.73 e non fumatori $3,14 \pm 1.86$) ($p < 0.01$ grandi fumatori verso fumatori e fumatori verso non fumatori).

L'espressione genica di Nrf2, risulta essere significativamente aumentata nei soggetti fumatori rispetto ai non fumatori (espressione media $8,50 \pm 2,45$ nei fumatori e $4,5 \pm 1,86$ nei non fumatori $p < 0.01$); mentre risulta essere significativamente ridotta nei grandi fumatori rispetto ai fumatori ($p < 0,01$)

Analogamente l'espressione genica di g-GCS risulta essere aumentata nei soggetti fumatori rispetto ai non fumatori; mentre risulta essere ridotta nei grandi fumatori rispetto ai fumatori ($p < 0.01$) (Figura 5A).

4.2 STUDIO PAZIENTI A RISCHIO CARDIOVASCOLARE INTERMEDIO-ELEVATO

DATI ANTROPOMETRICI E PARAMETRI BIOUMORALI

Di 50 soggetti selezionati, 37 sono stati inclusi nello studio e così suddivisi: 16 nel gruppo RISCHIO INTERMEDIO (61.6±13.8 anni, M/F: 9/7) e 21 nel gruppo RISCHIO ELEVATO (66.7±6 anni, M/F: 10/11). I due gruppi era sostanzialmente sovrapponibili per quanto riguarda la presenza di ipertensione arteriosa, obesità e l'abitudine tabagica; al contrario i due gruppi differivano per la presenza di dislipidemia (significativamente ridotta) e familiarità (significativamente aumentata) nel gruppo RISCHIO INTERMEDIO rispetto al gruppo RISCHIO ELEVATO. In questo ultimo gruppo il 48% dei soggetti era diabetico, ed era presente coronaropatia nel 42% e patologia carotidea e/o agli arti inferiori nel 28%. Per quanto concerne le terapie farmacologiche, i due gruppi non differivano per l'uso di ACE-inibitori, beta-bloccanti e diuretici, mentre come atteso, l'uso di statine ed antiaggreganti era significativamente più elevato nel gruppo RISCHIO ELEVATO (tabella 1B).

Inoltre i due gruppi di soggetti non mostravano differenze significative per quanto riguarda i parametri antropometrici (età, sesso, BMI), i valori di pressione sistolica e diastolica e la frequenza cardiaca.

Infine per quanto concerne gli esami di laboratorio relativi al profilo glicolipidico, solamente i valori di trigliceridi e di glicemia a digiuno erano significativamente più elevati nel gruppo RISCHIO ELEVATO.

ECOCOLORDOPPLER TSA

Un primo dato significativo che emerge dai nostri risultati è la dimostrazione che l'85% dei pazienti del gruppo RISCHIO INTERMEDIO aveva un esame patologico: in particolare nel 31% dei soggetti si riscontrava aumento dell'IMT, mentre nel 54% era presente almeno una placca aterosclerotica. Per quanto riguarda il gruppo RISCHIO ELEVATO, il 94% dei soggetti aveva un esame patologico; di questi il 6% aveva l'IMT aumentato, mentre l'88% aveva almeno una placca (Figura 1B)

PARAMETRI DI INFIAMMAZIONE E DI STRESS OSSIDATIVO

La hs-PCR è risultata significativamente più elevata nel gruppo RISCHIO

ELEVATO rispetto al gruppo RISCHIO INTERMEDIO (rispettivamente 4.65 ± 1.35 mg/L e 2.65 ± 1.17 mg/L; $P < 0,05$), come evidenziato in (Figura 2B)

I livelli circolanti di liso-PC sono risultati significativamente più elevati nel gruppo RISCHIO ELEVATO rispetto al gruppo RISCHIO INTERMEDIO (rispettivamente 244.6 ± 21 μ mol/L e 102.6 ± 13.2 μ mol/L; $P < 0,02$) (figura 3B)

I livelli plasmatici di GSH sono risultati significativamente ridotti nei soggetti a RISCHIO ELEVATO rispetto ai soggetti a RISCHIO INTERMEDIO (rispettivamente $4,6 \pm 1,2$ μ M/L e $3.1 \pm 1,3$ μ M) ($p < 0,01$) (figura 4B)

DATI ESPRESSIONE GENICA:

L'espressione genica di Nrf-2 è risultata significativamente ridotta nei soggetti ad RISCHIO ELEVATO verso i soggetti a RISCHIO INTERMEDIO ($p < 0,01$)(Figura 5B)

L'espressione genica di I κ B-alfa è risultata aumentata nei soggetti a RISCHIO ELEVATO rispetto al RISCHIO INTERMEDIO ma in modo non statisticamente significativo (Figura 6B)

5 DISCUSSIONE

5.1 STUDIO SOGGETTI FUMATORI

Decenni di alterazioni morfologiche e funzionali delle pareti arteriose precedono l'evento clinico cardiovascolare che quindi riflette la presenza di una patologia aterosclerotica avanzata. E' noto che la disfunzione endoteliale inizia e accompagna tutte le fasi dell'aterosclerosi e riveste un importante valore predittivo per lo sviluppo di eventi cardiovascolari (66). In questo studio abbiamo dapprima valutato la presenza di disfunzione endoteliale ed aterosclerosi preclinica in due gruppi di fumatori sani di giovane età, confrontato con un gruppo di non fumatori. Abbiamo utilizzato la FMD a livello dell'arteria brachiale e l'IMT a livello delle carotidi, perché riconosciuti markers di aterosclerosi precoce (70-71). Un primo importante risultato del nostro lavoro è la dimostrazione che il fumo di sigaretta è in grado di determinare disfunzione endoteliale ed aterosclerosi preclinica già in soggetti giovani (di età inferiore a 30 anni) ed in assenza di altri fattori di rischio cardiovascolari. Mentre è noto che in soggetti di età media-avanzata il fumo di sigaretta induce disfunzione endoteliale e aterosclerosi precoce (57) rari sono gli studi che hanno valutato soggetti più giovani. In questo contesto è stato recentemente pubblicato un lavoro che ha dimostrato in soggetti Cinesi apparentemente sani, di età attorno a 40 anni, che il fumo di sigaretta determinava una riduzione della FMD ed un aumento dell'IMT (72). A nostra conoscenza questo è il primo lavoro che dimostra tali alterazioni anche in soggetti di età inferiore a 30 anni.

Sebbene il fumo di sigaretta costituisca uno dei maggiori fattori di rischio per aterosclerosi (6), non sono ancora completamente chiariti i meccanismi patogenetici attraverso i quali il fumo induce danno vascolare. L' elevata concentrazione di sostanze ossidanti nel fumo di sigaretta e la conseguente attivazione delle cellule endoteliali e dei leucociti suggerisce che lo stress ossidativo sia fondamentale nell'iniziare tale processo (73,74). E' stato ipotizzato che la disfunzione endoteliale nei fumatori sia causata da una ridotta disponibilità di NO, la più potente molecola ad attività vasodilatante prodotta dall'endotelio (75,76). Infatti in condizioni di stress ossidativo, l'NO tende reagire con i ROS formando perossinitrito, sostanza priva di attività vasodilatante ed in grado di esacerbare lo stress ossidativo ed infiammatorio in atto (77).

Per cercare di identificare i possibili meccanismi attraverso i quali il fumo induce disfunzione endoteliale, abbiamo inizialmente valutato se nei due gruppi di fumatori vi fosse un aumentato stress ossidativo ed una riduzione delle difese antiossidanti.

I nostri risultati dimostrano come la concentrazione plasmatica di ox-PAPC, che sono considerati un marker affidabile di stress ossidativo (78), fosse significativamente superiore nei grandi fumatori rispetto ai fumatori e ai non fumatori. Al contrario abbiamo osservato che i soggetti fumatori, rispetto ai non fumatori, presentavano una riduzione della concentrazione plasmatica di GSH. E' da sottolineare che nei soggetti grandi fumatori la concentrazione di ox-PAPC era significativamente più elevata e la concentrazione di GSH significativamente diminuita rispetto ai soggetti fumatori, a dimostrazione che anche nei soggetti giovani l'efficacia dei sistemi antiossidanti è correlata al grado di esposizione al fumo)

Allo scopo di dimostrare se l'aumento dello stress ossidativo nel plasma fosse in grado di ossidare i fosfolipidi sulle membrane delle cellule circolanti, abbiamo misurato gli oxPAPC nei LMC provenienti dai tre gruppi di soggetti. I nostri risultati dimostrano un significativo e progressivo aumento degli ox-PAPC nei LMC provenienti dai soggetti non fumatori, fumatori e grandi fumatori.

Inoltre poiché è stato dimostrato in vitro che gli ox-PAPC modulano la risposta infiammatoria inducendo l'espressione di numerosi geni della via Nrf2/ARE (79,80), abbiamo valutato l'espressione genica del fattore di trascrizione Nrf2 e di g-GCS, enzima fondamentale nella sintesi di GSH. Nei soggetti fumatori, rispetto ai non fumatori, abbiamo dimostrato un aumento dell'espressione genica di Nrf2 e di gGCS; al contrario e sorprendentemente, i soggetti grandi fumatori presentavano una ridotta espressione genica di Nrf2 e g-GCS rispetto ai fumatori.

Abbiamo infine valutato l'espressione genica di IκBa che riflette l'attivazione del fattore di trascrizione redox-sensibile NF-κB, elemento chiave nell'induzione genica di molecole di adesione e citochine (81,82). Contrariamente a Nrf2, l'espressione genica di IκBa aumentava progressivamente nei fumatori e nei grandi fumatori rispetto ai non fumatori.

Studi in vitro hanno suggerito come lo stress ossidativo indotto dal fumo sia in grado di attivare l'NFκB, nonché la via Nrf2/ARE, che è fondamentale nel mantenere un'attività antiossidante contro i radicali liberi normalmente presenti nel fumo di sigaretta (83). E' stato ipotizzato che qualora questa protezione dovesse

venire meno, l'escalation ossidativa condurrebbe all' espressione di citochine proinfiammatorie, chemochine e molecole di adesione (41), sotto il controllo del fattore di trascrizione NF-kB. La novità più importante del nostro studio, ottenuta nei LMC circolanti dei soggetti fumatori, supporta questa ipotesi dimostrando come nel soggetto grande fumatore, l'aumentato stress ossidativo induca un' attivazione cellulare in grado di alterare il bilancio tra fattori citoprotettivi e proinfiammatori. In questo contesto possiamo interpretare il significativo aumento dei livelli di PCR ad alta sensibilità riscontrato nei soggetti fumatori rispetto ai non fumatori. (84)

In conclusione i risultati di questo studio sono la prima dimostrazione in vivo che il fumo di sigaretta è in grado di attivare non solo le cellule delle vie aeree direttamente esposte al fumo, ma anche i LMC circolanti. Un altro aspetto estremamente rilevante è che questa attivazione è presente precocemente in soggetti di età inferiore a 30 anni, ed in assenza di altri fattori di rischio per aterosclerosi.

5.2 STUDIO PAZIENTI A RISCHIO INTERMEDIO-ELEVATO

L'importanza di identificare precocemente l'aterosclerosi subclinica, a prescindere dal rischio calcolato per singolo individuo, nasce da alcune importanti considerazioni: i classici fattori di rischio spiegano solamente la metà degli eventi cardiovascolari; ancora oggi la diagnosi viene fatta spesso nel momento in cui il paziente ha un evento acuto; studi post mortem, eseguiti in soggetti giovani deceduti per altre cause hanno dimostrato la presenza di placche fibrolipidiche a livello coronarico (85). Dal nostro studio è emerso come primo dato importante che anche se i pazienti nel gruppo a RISCHIO ELEVATO mostrano una patologia carotidea di grado significativamente più avanzato, il dato più sorprendente è che solamente una minima percentuale dei soggetti a RISCHIO INTERMEDIO non ha un interessamento della patologia aterosclerotica a livello carotideo. E' da segnalare inoltre che tra i pazienti con reperto ecografico patologico, in circa la metà dei soggetti è stata riscontrata la presenza di almeno una placca carotidea. I nostri risultati concordano con due recenti studi epidemiologici che hanno valutato la presenza di patologia carotidea in diverse categorie di rischio cardiovascolare ed hanno evidenziato una prevalenza di placche carotidee nel 30-35% dei pazienti classificati come a rischio basso o intermedio (86,87). Appare evidente che il rischio calcolato con le carte attualmente in uso, sia sottostimato in questi pazienti che dovrebbero essere quindi riclassificati come a rischio elevato

Abbiamo quindi voluto verificare l'ipotesi che in presenza di numerosi fattori di rischio cardiovascolare e di malattia aterosclerotica evidente, la produzione di ROS fosse aumentata e potesse determinare una perdita della capacità dei sistemi citoprotettivi antiossidanti di rispondere adeguatamente al danno cellulare indotto dallo stress ossidativo. Dal nostro studio è emerso che i soggetti a rischio elevato rispetto ai soggetti a rischio intermedio presentano un maggior grado di perossidazione lipidica, confermata dall'osservazione di una più elevata concentrazione plasmatica di liso-PC. Concordemente in questi soggetti si è osservata una riduzione dei livelli plasmatici di GSH e dell'espressione genica di Nrf2 nei LMC circolanti (parametri indiretti di difesa cellulare antiossidante).

Alla dimostrazione di un maggior grado di stress ossidativo, nei soggetti a rischio elevato si accompagna il riscontro di un maggior grado di infiammazione come dimostrato dal significativo aumento dei livelli di hs-PCR rispetto ai soggetti a rischio

intermedio. Va comunque sottolineato che anche nei soggetti a rischio intermedio i livelli medi di hsPCR risultavano superiori al livello soglia di basso rischio, pari a 1 mg/L. L'espressione genica di I κ B α , parametro indiretto di attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B si è dimostrata più elevata nei soggetti a rischio elevato rispetto a rischio intermedio, a conferma di uno "stato proinfiammatorio" più accentuato in questi soggetti.

In conclusione i dati di questo studio evidenziano che esiste una fascia di popolazione (a Rischio intermedio, con un basso rischio a 10 anni), con evidenza di aterosclerosi subclinica ed un pattern "infiammatorio" per la quale è necessario intervenire precocemente indipendentemente dai livelli del calcolo del rischio cardiovascolare.

6 CONCLUSIONI

Con questa tesi si voleva approfondire la relazione patogenetica stress ossidativo – infiammazione - disfunzione endoteliale - malattia aterosclerotica precoce, con l'aspettativa di individuare markers bioumorali, molecolari e strumentali di danno vascolare precoce.

Dall'analisi dei risultati ottenuti con i due studi, siamo portati a trarre le seguenti conclusioni:

1. Soggetti esposti ai comuni fattori di rischio cardiovascolare (singolo o multipli) e/o con malattia aterosclerotica già clinicamente evidente, presentano un grado di stress ossidativo di entità diversa in funzione del grado di esposizione al singolo fattore o all'associazione di più fattori. Ciò sostenuto da un aumento dei prodotti di per ossidazione lipidica a livello plasmatici (ox-PAPC e liso-PC)
2. la risposta cellulare allo stress ossidativi, misurata indirettamente con il dosaggio plasmatici del GSH e l'espressione genica del fattore di trascrizione Nrf2, risulta essere aumentata in presenza anche di un solo fattore di rischio cardiovascolare (quale, il fumo di sigaretta).
3. quando il grado di stress ossidativo risulta essere elevato, si osserva una riduzione della risposta antiossidante (come nei grandi fumatori o nei soggetti con elevato rischio cardiovascolare).
4. in tutti i gruppi di soggetti studiati si è osservato un aumento di hs-PCR e GB (markers circolanti di infiammazione), proporzionale al grado di esposizione al singolo fattore (grandi fumatori) e al rischio cardiovascolare globale.
5. Lo stesso comportamento della hs-PCR, si è osservato per l'espressione genica di IκBa.
6. Soggetti giovani con esposizione al singolo fattore di rischio cardiovascolare (il più diffuso nella popolazione giovanile, il fumo di sigaretta), presentano già disfunzione endoteliale e aumento IMT carotideo. Analogamente i soggetti a rischio cardiovascolare intermedio presentano in circa il 90% dei casi malattia aterosclerotica carotidea, di cui nel 30% dei casi in fase precoce (aumento IMT senza placche aterosclerotiche)

Alla luce di queste conclusioni, sarebbe auspicabile, che ulteriori parametri

vengano introdotti nelle tabelle di valutazione del rischio cardiovascolare per una più efficace prevenzione primaria.

Sicuramente la valutazione della disfunzione endoteliale e la misurazione dell'IMT carotideo sono due parametri di grande importanza. Infatti, entrambi sono alterazioni vascolari precoci potenzialmente reversibili, nonché un loro miglioramento si associa ad una riduzione del rischio cardiovascolare.

Tra i markers di stress ossidativo, che possono essere più agevolmente misurati in vivo potrebbero essere presi in considerazione: hs-PCR e markers di perossidazione lipidica (liso-PC).

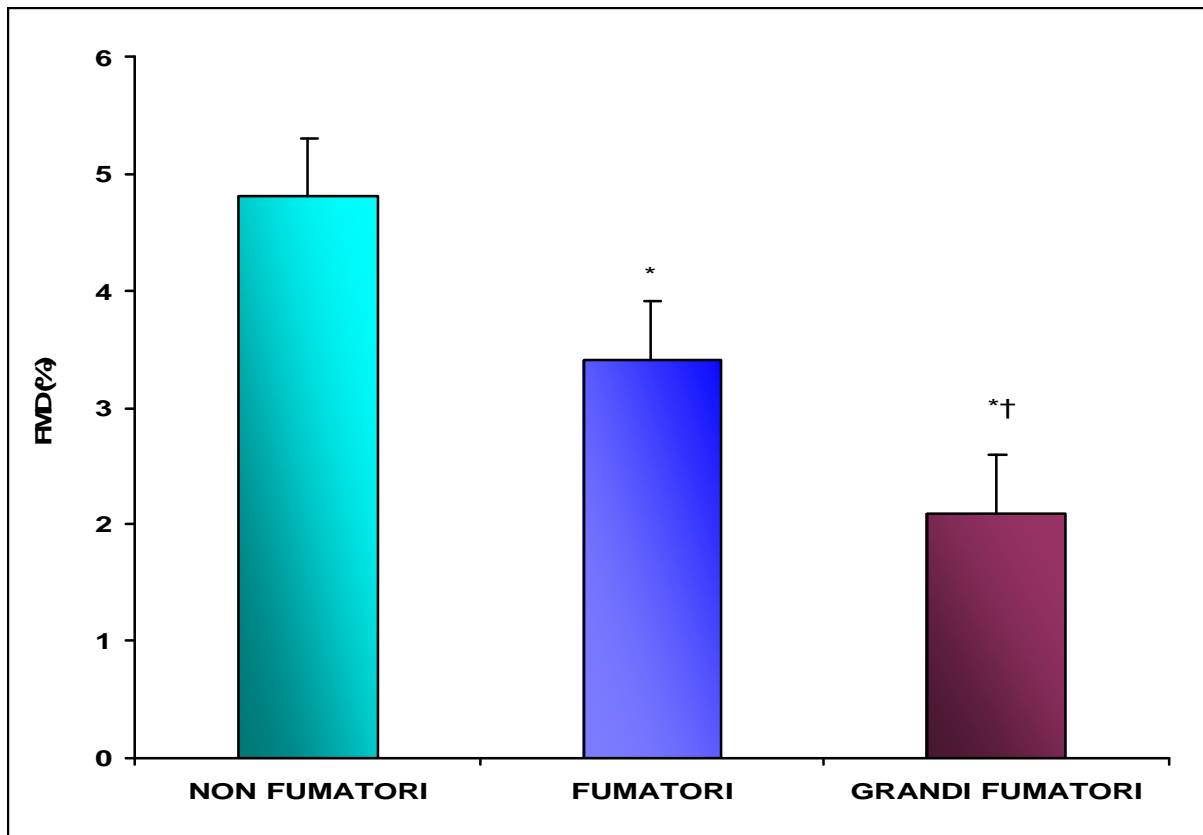
7 TABELLE E FIGURE

TABELLA 1A. PARAMETRI INFIAMMATORI E CONCENTRAZIONI DI GSH NEI PAZIENTI NON FUMATORI, FUMATORI E GRANDI FUMATORI

*P<0.01 vs non fumatori; †P<0.01 vs fumatori.

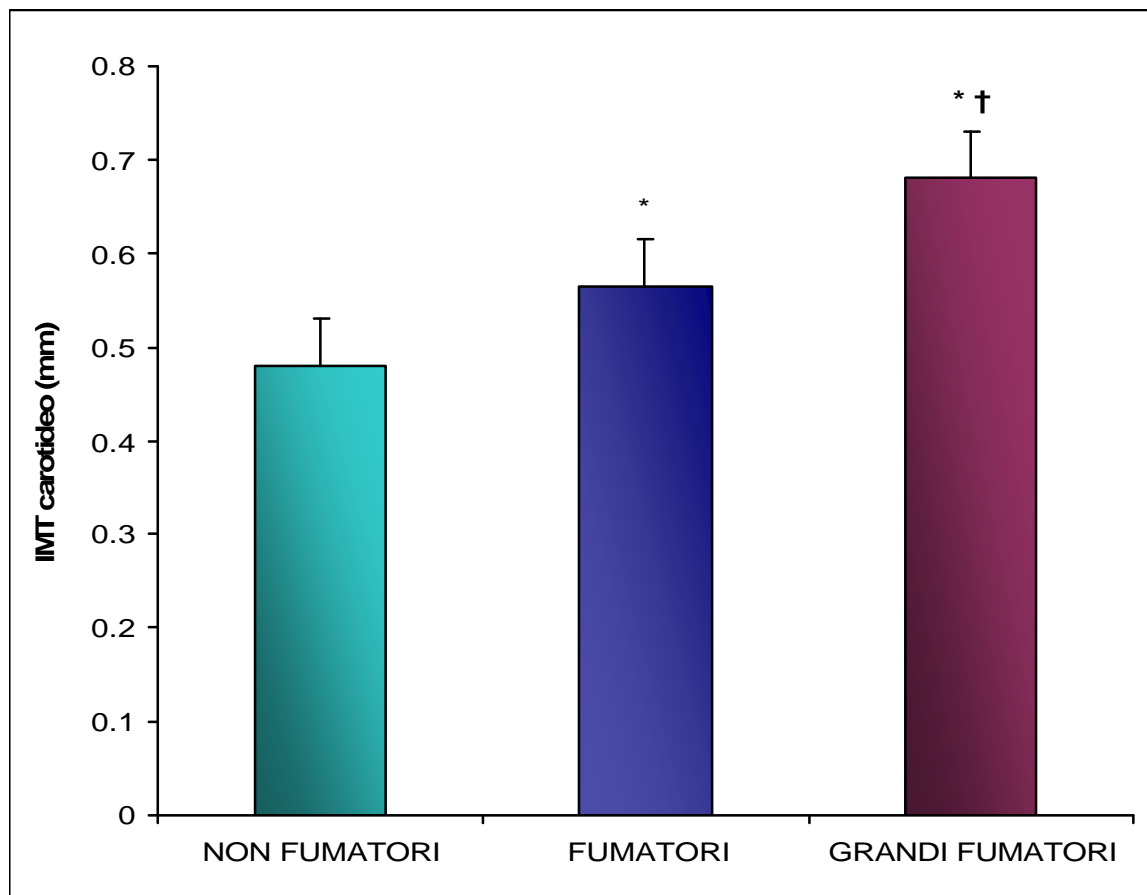
	NON FUMATORI (n = 32)	FUMATORI (n = 32)	GRANDI FUMATORI (n = 26)	P
Globuli	6279.6±965.3	8±970.4*	7800.8±881*†	<0.01
Neutrofili	3±751.7	7±1441.6*	4821.8±754*†	<0.01
Linfociti (mmc)	6±365.3	4±656.5	2024.5±411	ns
Monociti (mmc)	±171.0	±168.5	411.7±181	ns
s-PCR (mg/L)	.07	.15*	3.5±0.33*†	<0.01
MC GSH (ng/mg cell protein)	.22	.21*	1.1±0.13*†	<0.01
Plasma GSH (µmol/L)	.71	.47*	3.2±0.38*†	<0.01

FIGURA 1A. VASODILATAZIONE FLUSSO-MEDIATA NEI SOGGETTI NON FUMATORI, FUMATORI E GRANDI FUMATORI



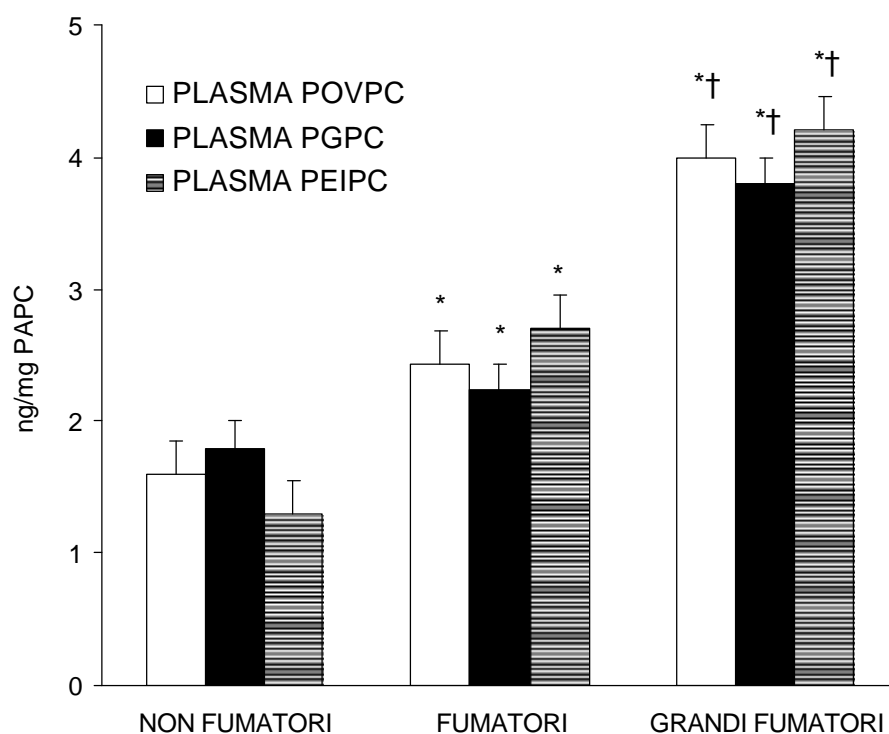
LEGENDA: FMD=vasodilatazione flusso-mediata. I dati sono espressi come media±DS; *P<0.01 vs non fumatori; †P<0.01 vs fumatori.

FIGURA 2A. SPESSORE INTIMA-MEDIA A LIVELLO CAROTIDEO NEI SOGGETTI NON FUMATORI, FUMATORI E GRANDI FUMATORI



Legenda: IMT= spessore intima-media; i dati sono espressi come media±DS;
*P<0.01 vs non fumatori; †P<0.01 vs fumatori

FIGURA 3A. CONCENTRAZIONE PLASMATICA DI POVPC, PGPC E PEIPC IN SOGGETTI NON FUMATORI, FUMATORI E GRANDI FUMATORI



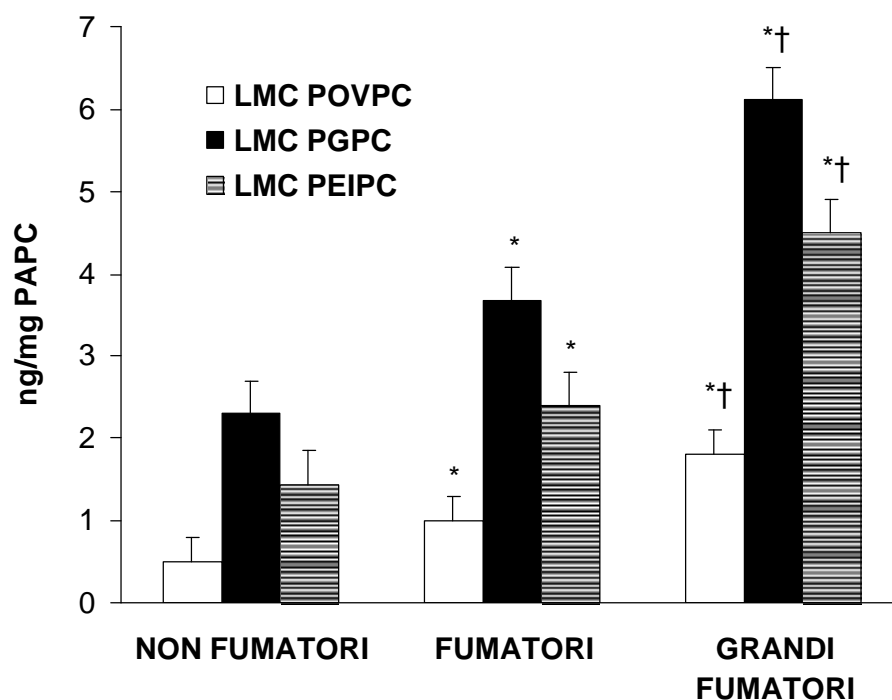
Legenda : i dati sono espressi come media \pm DS;*P<0.01 vs non fumatori; †P<0.01 vs fumatori.

POVPC= 1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-phosphorylcholine

PAPC= 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine

PEIPC= 1-palmitoyl-2-epoxyisoprostane-sn-glycero-3-phosphorylcholine

FIGURA 4A. CONCENTRAZIONE DI POVPC, PGPC E PEIPC SULLE MEMBRANE DEI LMC CIRCOLANTI IN SOGGETTI NON FUMATORI, FUMATORI E GRANDI FUMATORI



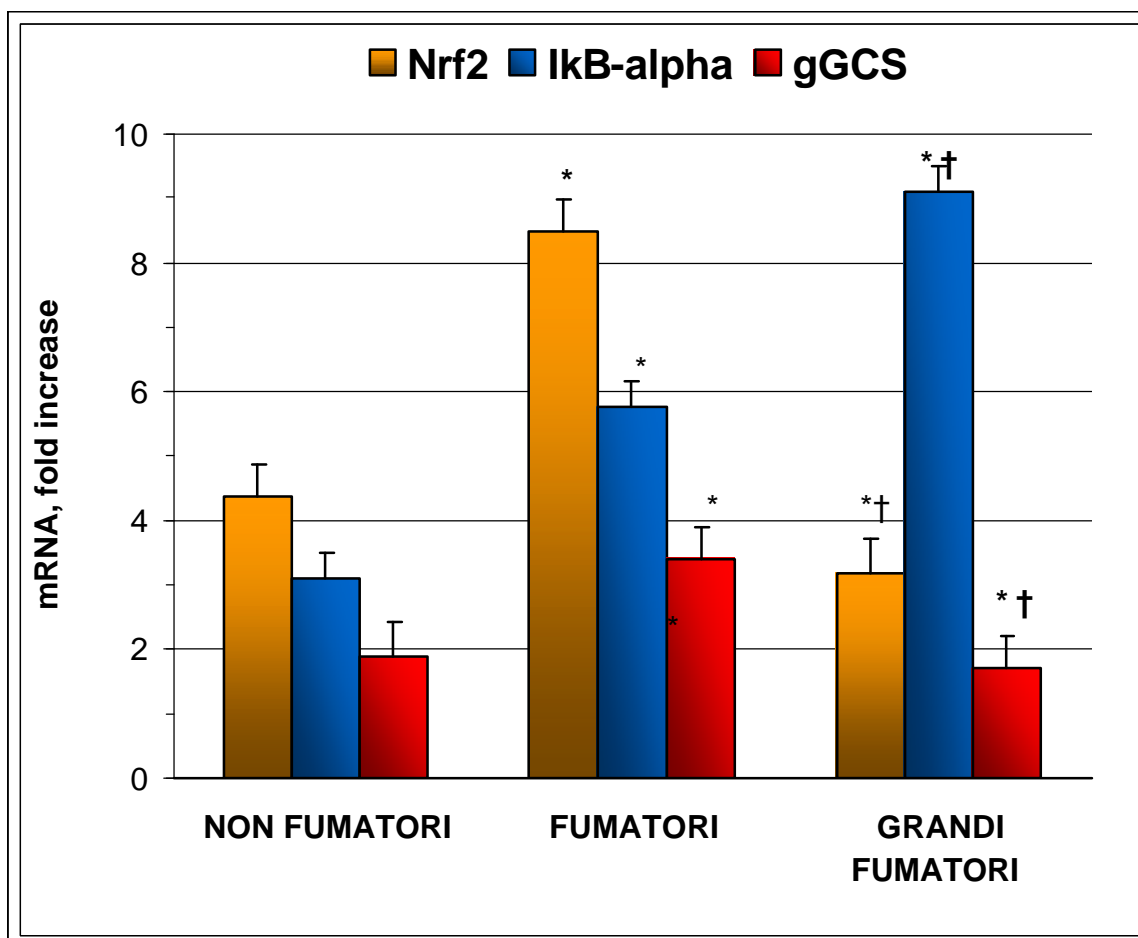
Legenda : i dati sono espressi come media \pm DS;*P<0.01 vs non fumatori; †P<0.01 vs fumatori.

POVPC= 1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-phosphorylcholine

PAPC= 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine

PEIPC= 1-palmitoyl-2-epoxyisoprostane-sn-glycero-3-phosphorylcholine

FIGURA 5A. ESPRESSIONE GENICA DEI LMC CIRCOLANTI IN SOGGETTI NON FUMATORI, FUMATORI E GRANDI FUMATORI



LEGENDA: : i dati sono espressi come media+DS

L'mRNA dell'Ikb-a è stato analizzato mediante PCR Real Time, come descritto nei Materiali e Metodi ed è stato normalizzato per i livelli di mRNA della β -actina; Ikb-a= inibitore di NF-Kb;

Nrf2= NF-E2-related factor 2; g GCS. Gglutamyl-citeina sintasi

*p<0,01 verso non fumatori

+ p<0,01 verso fumatori

TABELLA 1B: FATTORI DI RISCHIO CARDIOVASCOLARE E PRESENZA DI ATEROSCLEROSI NEI DUE GRUPPI DI PAZIENTI

	RISCHIO INTERMEDIO (n=16)	RISCHIO ELEVATO (n=21)	P
Ipertensione arteriosa	12/16, (75%)	18/21, (85,7%)	n.s.
Fumo di sigaretta	4/16, (28,6%)	4/21, (19%)	n.s.
Dislipidemia	9/16, (56,5%)	17/21, (81%)	n.s..
Obesità (BMI>30)	5/16, (31,3%)	8/21, (38,1%)	n.s.
Diabete mellito	0/16	10/21, (47%)	<0,05
Familiarità	10/16, (62,5%)	7/21, (33,3%)	n.s.
Aterosclerosi Coronarica	0/16	9/21, (42%)	<0,05
Aterosclerosi Carotide e/o Arti inferiori	0/16	6/21, (28,4%)	<0.05

FIGURA 1B. PATOLOGIA CAROTIDEA PAZIENTI A RISCHIO CARDIOVASCOLARE

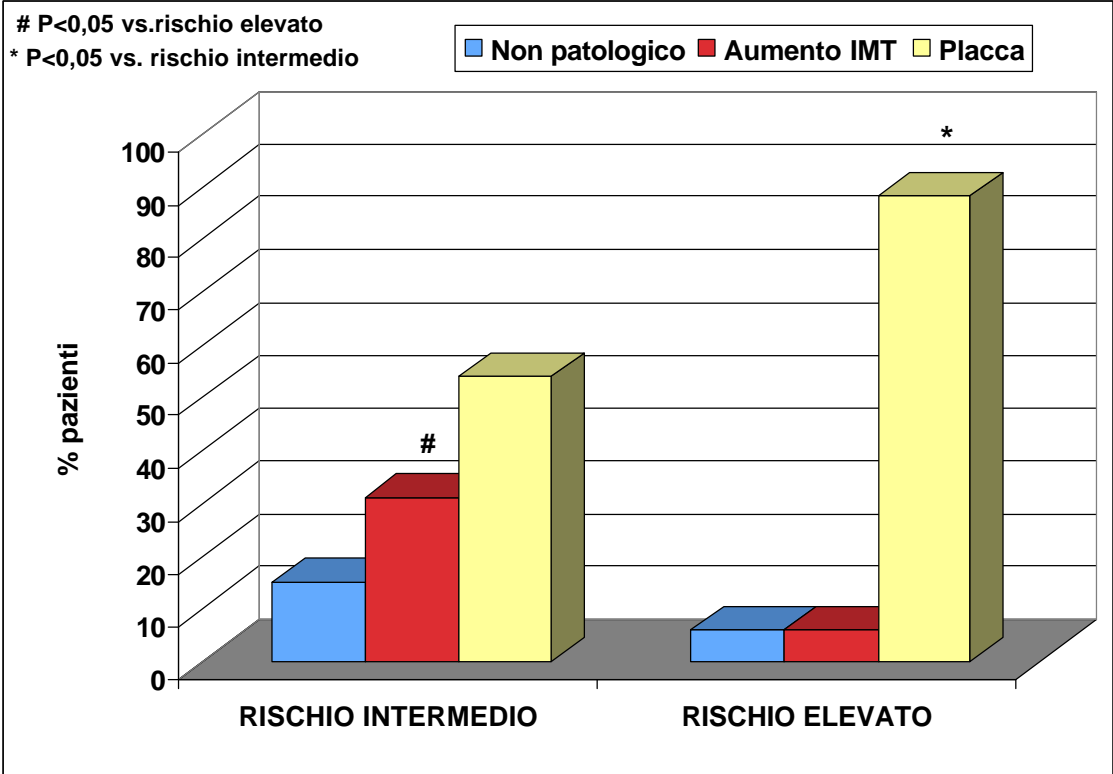
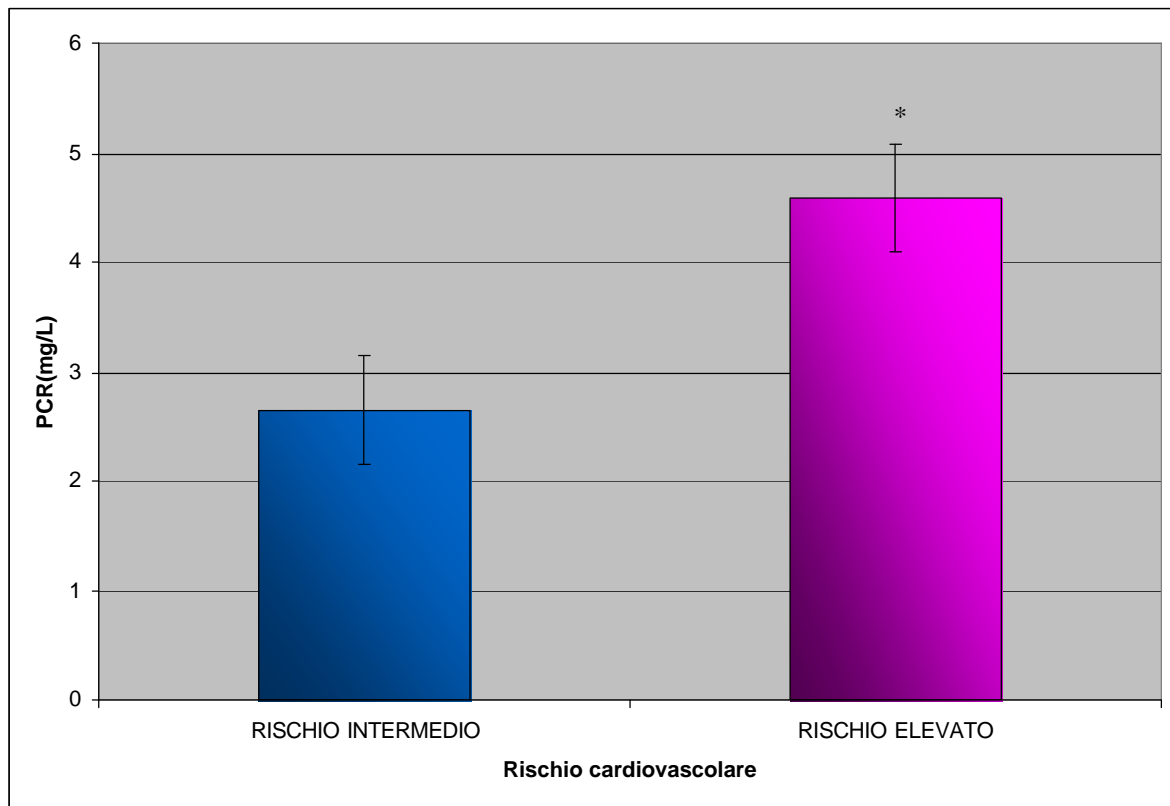
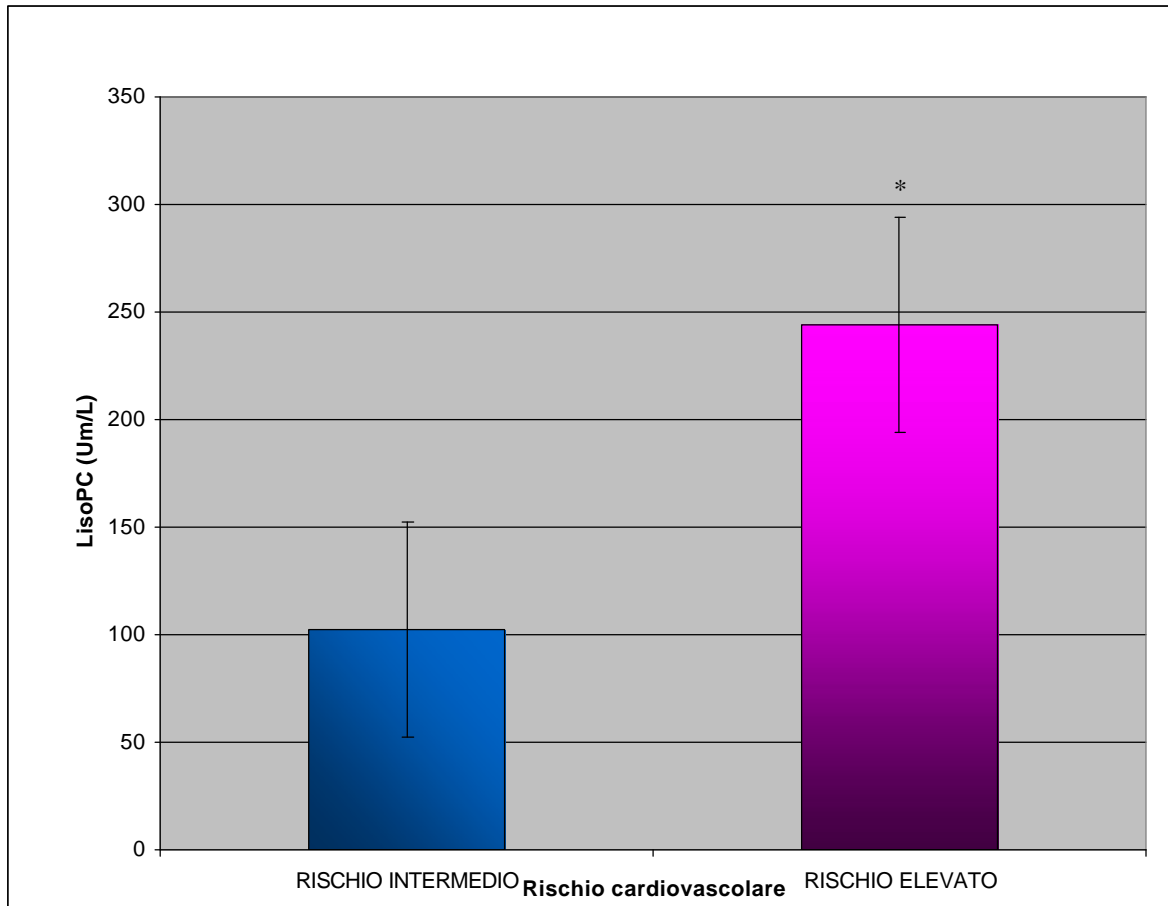


FIGURA 2B. CONCENTRAZIONE PLASMATICA DI hs-PCR NEI DUE GRUPPI DI PAZIENTI



***p<0,05**

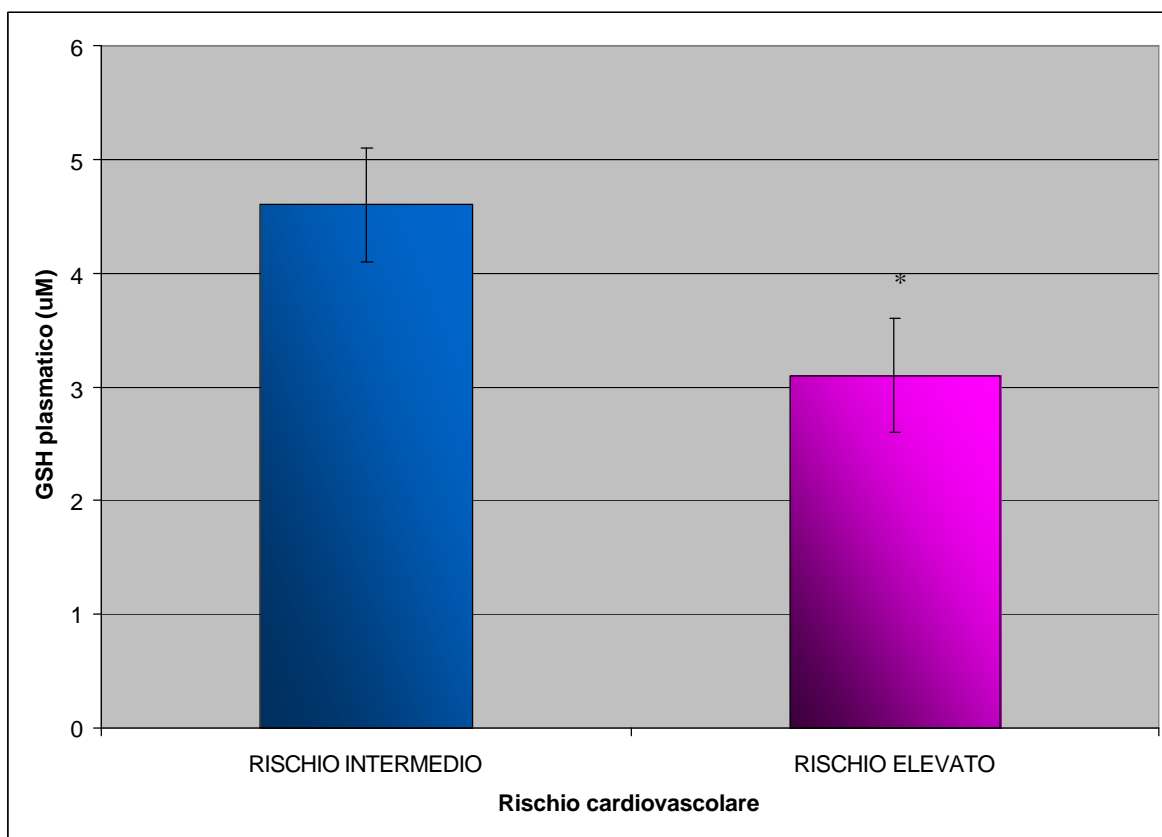
FIGURA 3B. CONCENTRAZIONE PLASMATICA DI Liso-PC NEI PAZIENTI A RISCHIO CARDIOVASCOLARE



*p

<0,02

FIGURA 4B. CONCENTRAZIONE PLASMATICA GSH NEI PAZIENTI A RISCHIO CARDIOVASCOLARE INTERMEDIO ED ELEVATO

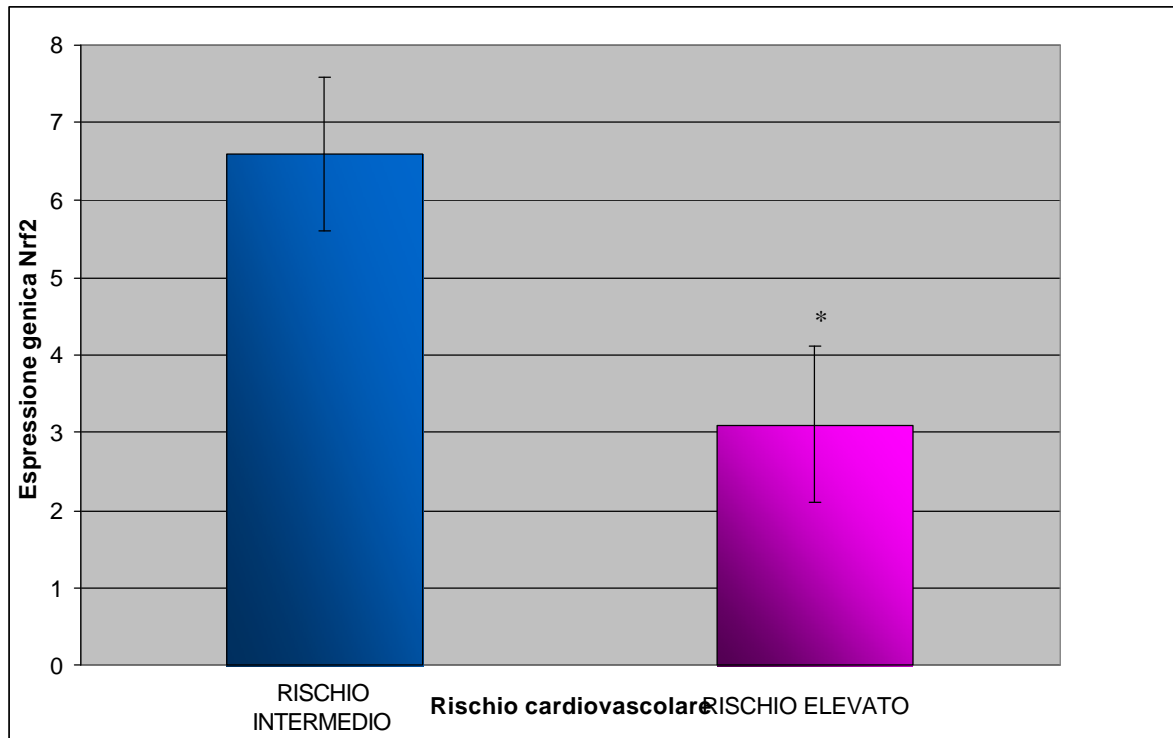


*

p

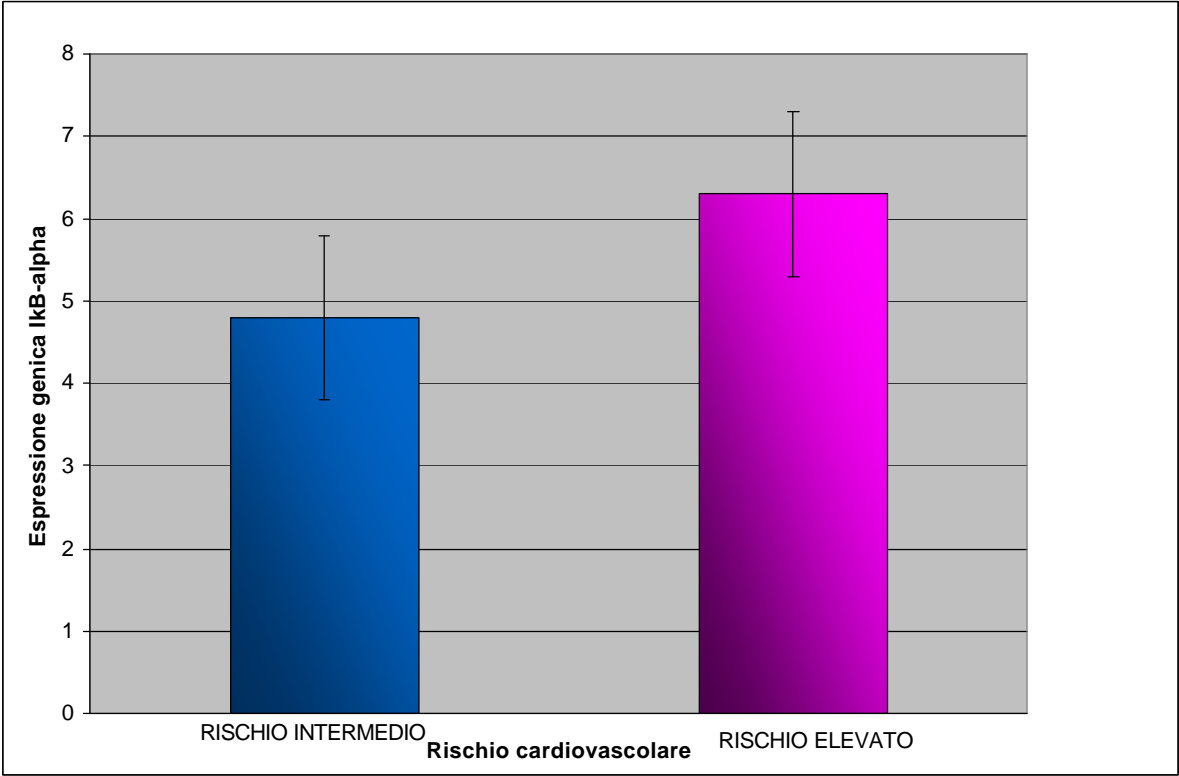
<0,01

FIGURA 5B. ESPRESSIONE GENICA NRF2 NEI PAZIENTI A RISCHIO CARDIOVASCOLARE INTERMEDIO ED ELEVATO



* $p < 0,01$

FIGURA 6B. ESPRESSIONE GENICA IKBa NEI PAZIENTI A RISCHIO CARDIOVASCOLARE INTERMEDIO ED ELEVATO



8 BIBLIOGRAFIA

1. Khot UN, Khot MB, Bajzer CT, Sapp SK, Ohman EM, Brener SJ, Ellis SG, Lincoff AM, Topol EJ. Prevalence of conventional risk factors in patients with coronary heart disease. *JAMA*. 2003;290: 898-904.
2. Kharbanda RK, Deanfield JE. Functions of the healthy endothelium. *Coron Artery Dis*. 2001 12(6):485-91.
3. Behrendt D, Ganz P. Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol*. 2002;90(10C):40L-48L
4. Vita JA, Treasure CB, Nabel EG, McLenachan JM, Fish RD, Yeung AC, Vekshtein VI, Selwyn AP, Ganz P. Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation*. 1990;81(2):491-7.
5. Allen S, Khan S, Al-Mohanna F, Batten P, Yacoub M. Native low density lipoprotein-induced calcium transients trigger VCAM-1 and E-selectin expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest*. 1998 ;101(5):1064-75.
6. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, Deanfield JE. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation*. 1993;88(5 Pt 1):2149-55.
7. Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, Cusco JA, Lee BK, Creager MA. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation*. 1993;88(6):2510-6.
8. Bellamy MF, McDowell IF, Ramsey MW, Brownlee M, Bones C, Newcombe

RG, Lewis MJ. Hyperhomocysteinemia after an oral methionine load acutely impairs endothelial function in healthy adults. *Circulation*. 1998;98(18):1848-52.

9. Griendling KK and FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury. Part I. Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 108: 1912–1916, 2003
10. Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291:H985-1002.
11. Tarpey MM, Fridovich I.: Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ Res* 2001; 89:224-236.
12. Tahara S, Matsuo M, Kaneko T. Age-related changes in oxidative damage to lipids and DNA in rat skin. *Mech Ageing Dev* 2001; 122: 415-26
13. Griendling KK, FitzGerald GA.: Oxidative stress and cardiovascular injury. Part II. Animal and human studies. *Circulation* 2003; 108:2034–2040.
14. Stocker R, Kearny JF. Role of oxidative modification in atherosclerosis. *Physiol rev* 2004; 84:1381-478.
15. Ganji SH, Qin S, Zhang L, Kamanna VS, Kashyap ML. Niacin inhibits vascular oxidative stress, redox-sensitive genes, and monocyte adhesion to human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis*, 2009; 202:68-75.
16. Tarpey MM, Fridovich I.: Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ Res* 2001; 89:224-236.

-
17. Fruhwirth GO, Loidl A, Hermetter H.: Oxidized phospholipids: from molecular properties to disease. *Biochim et Biophys Acta* 2007; 1772: 718-736.
 18. Chen L, Liang B, Foroese DE. Oxidative modification of low density lipoprotein in normal and hyperlipidemic patients: effect of lysophosphatidylcholine composition on vascular relaxation. *J Lipid Res* 1997;38:546-53.
 19. Lee JM, Johnson JA.: An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol* 2004; 37:139-143.
 20. Quin MT, Parthasarathy S, Steinberg D. Lysophosphatidylcholine. A chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988,85:2805-9.
 21. Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone Jr MA. Lysophosphatidylcholine transcriptionally induces growth factor gene expression in cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 1994;93:907-11.
 22. Kohno M, Yokokama K, Yasunari K. Induction by lysophosphatidylcholine, a major phospholipids component of atherogenic lipoproteins, of human coronary artery smooth muscle cell migration. *Circulation* 1998;98:353-9
 23. Stiko A, Regnstrom J, Shah PK. Active oxygen species and lysophosphatidylcholine are involved in oxidized low density lipoprotein activation of smooth muscle cell DNA synthesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996,16:194-200.
 24. Watanabe T, Pakala r, Koba S. Oxidized low-density lipoproteins potentiate the mitogenic effect of 5-hydroxytryptamine on vascular smooth muscle cells. *Jpn Heart J* 2002;43.
 25. Takeshita S, Inoue N, Gao D. Lysophosphatidylcholine enhances superoxid anions production via endothelial NADH/NADPH oxidase. *J Arterioscler Thromb* 2000;7:238-46

-
26. Shi AH, Yoshinari M, Wakisaka M, Iwase. Lysophosphatidylcholine molecular species in low density lipoprotein of type 2 diabetes. *Horm Metab Res* 1999;31:283–6.
 27. Sonoki K, Iwase M, Iino K. Atherogenic role of lysophosphatidylcholine in low-density lipoprotein modified by phospholipase A2 and in diabetic patients: protection by nitric oxide donor. *Metabolism* 2003;52:308–14.
 28. Shahar Lavi, Joseph P. McConnell. Local Production of Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 and Lysophosphatidylcholine in the Coronary Circulation Association With Early Coronary Atherosclerosis and Endothelial Dysfunction in Humans. *Circulation*;115;2715-2721; 2007
 29. Kougias P, Chai H, Lin PH. Lysophosphatidylcholine and secretory phospholipase A2 in vascular disease: mediators of endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Med Sci Monit.* 2006;12:RA5–RA16
 30. Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* 263, 17205–17208.
 31. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med.* 2009;30:42-11.
 32. Haddad, J.J., Land, S.C., 2000. O₂-evoked regulation of HIF-1 α and NF- κ B in perinatal lung epithelium requires glutathione biosynthesis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 278, L492–503.
 33. Samtec PS, Drew-Bothsch C, Flagg EW. Glutathione in human plasma. Decline in association with aging, age related macular degenerative, and diabetes. *Free Radical Biol Med* 1998;24:699-704.
 34. Wang NP, Lim PS, Chen TT, Thien LM, Wang TH. Smoking is associated with alterations of blood thiol-group related antioxidants in patients in emodialysis. *Nephron* 2002;92:772-9.

-
35. Moriarty SE, Shah JH, Lynn M. oxidation of glutathione and cystein in human plasma associated with smoking. *Free Radical Biol Med* 2003,35:1582-8
 36. Huang Y, Wang L, Sun L. elevated peroxidative glutathione redox status in atherosclerotic patients with increased thickness of carotid intima-media. *Chinese Medical Journal* 122(23):2827-37
 37. Jaiswal AK.: Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radical Biol Med* 2004; 36:1199-1207.
 38. Chen X, Dodd G, Thomas S, Zhang X, Wasserman M, Rovin B, Kunsch C.: Activation of Nrf2/ARE pathway protect endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290:H1862-1870.
 39. Dinkova-Kostova AT, Talalay P. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr food Res* 2008; 52:128-38.
 40. Motohashi H, Yamamoto M. nrf2-keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med* 2004,10:549-57.
 41. McMahon M, Itoh K, Yamamoto M. The cap'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 controls both constitutive and inducible expression in intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. *Cancer Res* 2001;61:3299-307.
 42. De Martin R, Hoeth M, Hofer-Warbinek R, Schmid JA.: The transcription factor NF-kappa B and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:e83–e88.
 43. Peng HB, Libby P, Liao JK. Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J Biol Chem* 1995; 270:14214-14219.

-
44. Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, Bornstein N, Csiba L, Desvarieux M, Ebrahim S, Fatar M, Hernandez Hernandez R, Jaff M, Kownator S, Prati P, Rundek T, Sitzer M, Schminke U, Tardif JC, Taylor A, Vicaud E, Woo KS, Zannad F, Zureik M.: Mannheim carotid intima-media thickness consensus (2004-2006). An update on behalf of the Advisory Board of the 3rd and 4th Watching the Risk Symposium, 13th and 15th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, and Brussels, Belgium, 2006. *Cerebrovasc Dis* 2007; 23:75-80.
45. O'Leary DH, Polak JF.: Intima-media thickness: a tool for atherosclerosis imaging and event prediction. *Am J Cardiol* 2002; 90:18L-21L.
46. Ebrahim S, Papacosta O, Whincup P. Carotid plaque, intima media thickness, cardiovascular risk factors, and prevalent cardiovascular disease in men and women. *Stroke*.1999;30:841-50
47. Celermajer DS, Sorensen KE. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J. Am Coll. Cardiol* 1994;24:471-6
48. Herrington DM, Fan I, Drum M. Brachial flow mediated vasodilator responses in population-based research: methods, reproducibility and effects of age, gender, and baseline diameter. *J Cardiovasc Risk* 2001;8:319-328.
49. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:7915-22.
50. Duffy SJ, Gokce N, Holbrook M. Effect of ascorbic acid treatment on conduit vessel endothelial dysfunction in patient with hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H528-534
51. Antony I, Lerebours G, Nitenberg A. Loss of flow-dependent coronary artery dilatation in patients with hypertension. *Circulation* 1995;91:162-8

-
52. Solzbach U, Hornig B, Jeserich M. Vitamin C improved endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries in hypertensive patients. *Circulation* 1997;96:1513-9
 53. Cosentino F, Hishikawa K, Katusic ZS. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation* 2004;109:613-9
 54. Tack CJ, Ong MK, Lutterman JA, Insulin-induced vasodilation and endothelial function in obesity/insuline resistance: effects of troglitazone. *Diabetologia* 1998;41:569-76
 55. Galle J, Bengen J, Schollmeyer P. Impairment of endothelium-dependent dilatation in rabbit renal arteries by oxidized lipoprotein(a: role of oxygen-derived radicals. *Circulation* 1995;92:1582-9.
 56. Celermajer DS, Sorensen KE and Georgakopoulos D et al.: Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* 1993; 88:2149–2155.
 57. Thomas GN, Chook P, Yip TW, Kwong SK, Chan TY, Qiao M, Huang XS, Guo DS, Feng JZ, Chan SW, Leong HC, Celermajer DS, Woo KS.: Smoking without exception adversely affects vascular structure and function in apparently healthy Chinese: implications in global atherosclerosis prevention. *Int J Cardiol* 2008; 128:172-177.
 58. Celermajer DS, Adams MR, Clarkson P, Robinson J, McCredie R, Donald A, Deanfield JE.: Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adults. *N Engl J Med* 1996; 334:150-154.
 59. Giannini D, Leone A, Di Bisceglie D, Nuti M, Strata G, Buttitta F, Masserini L, Balbarini A. The effects of acute passive smoke exposure on endothelium-

-
- dependent brachial artery dilation in healthy individuals. *Angiology* 2007; 58:211-217.
60. Antoniades C, Tousoulis D, Tentolouris C, Toutouzas P and Stefanadis C.: Oxidative stress, antioxidant vitamins, and atherosclerosis. From basic research to clinical practice. *Herz* 2003; 28:628–638.
61. Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, Strauss WE, Oates JA, Roberts LJ 2nd.: Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med* 1995; 332:1198–1203.
62. Green D. Point: Flow-mediated dilation does reflect nitric oxide-mediated endothelial function. *J Appl Physiol* 2005;99(3):1233-4
63. Lekakis J, Papamichael C, Vemmos C. effect of acute sigarete smoking on endothelium-dependent brachial artery dilatation in healty individuals. *Am J Cardiol* 1997,79:529-31.
64. Taddei S. Clinical significance of the assessment of endothelial function. *Ital Heart Suppl* 2004;5:357-65
65. Gokce M. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via non invasive assesment of endothelial function: a prospective study. *Circulation* 2002; 105(13):1567-72.
66. Taddei S, Ghiadoni L, Viridis A, Versari D, Salvetti A.: Clinical significance of the assessment of endothelial function. *Ital Heart J Suppl* 2004; 5:357-365.
67. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asyntomatic subjects related to coronary risk factors and their interaction. *A Am Cooll Cardiol* 1994;24: 1468-74
68. Neunteufl T, Heher S, Katzenschlager R, Wöfl G, Kostner K, Maurer G,
-

-
- Weidinger F. Late prognostic value of flow-mediated dilation in the brachial artery of patients with chest pain. *Am J Cardiol* 2000; 86:207-210.
69. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R.: International Brachial Artery Reactivity Task Force. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39:257-265.
70. Bonithon-Kopp C, Scarabin PY, Taquet A. Risk factors for early carotid atherosclerosis in middle aged French women. *Arterioscl Thromb* 1991; 11:966-72
71. Zureij M, Toboul PJ, Bonithon-Kopp C. cross-sectional and 4-year longitudinal associations between brachial pulse pressure and common carotid intima-media thickness in a general population. The EVA Study. *Stroke*. 1999,30:841-50
72. Thomas GN, Chook P, Yip TW, Kwong SK, Chan TY, Qiao M, Huang XS, Guo DS, Feng JZ, Chan SW, Leong HC, Celermajer DS, Woo KS.: Smoking without exception adversely affects vascular structure and function in apparently healthy Chinese: implications in global atherosclerosis prevention. *Int J Cardiol* 2008; 128:172-177.
73. Burke A, Fitzgerald GA.: Oxidative stress and smoking-induced vascular injury. *Prog Cardiovasc Dis* 2003; 46:79-90.
74. Ambrose JA, Barua RS.: The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43:1731-1737.
75. Napoli C, Ignarro LJ.: Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric Oxide* 2001; 5:88-97.

-
76. Celermajer DS, Sorensen KE and Georgakopoulos D et al.: Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* 1993; 88:2149–2155.
 77. Wolin MS, Davidson CA, Kaminski PM, Fayngersh RP, Mohazzab HK.: Oxidant-nitric oxide signalling mechanisms in vascular tissue. *Biochemistry* 1998; 63: 810-816
 78. Kuller LH, Tracy RP, Shaten J, Meilahn EN.: Relation of C-reactive protein and coronary heart disease in the MRFIT nested case-control study. Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am J Epidemiol.* 1996;144:537-547
 79. Lee JM, Johnson JA.: An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol* 2004; 37:139-143.
 80. Li N, MI Venkatesan, A Miguel, R Kaplan, C Gujuluva, J Alam, A Nel.: Induction of heme oxygenase-1 expression in macrophages by diesel exhaust particle chemicals and quinines via the antioxidant-responsive element. *J Immunol* (2000); 165: 3393-3398
 81. Pinot, F, el Yaagoubi AE, Christie P, Dinh-Xuan AT, and Polla BS.: Induction of stress proteins by tobacco smoke in human monocytes: modulation by antioxidants. *Cell Stress Chaperones* 2 1997; 156-161.
 82. Vayssier-Taussat M, Camilli T, Aron Y, Meplan C, Hainaut P, Polla BS, Weksler B.: Effects of tobacco smoke and benzo[a]pyrene on human endothelial cell and monocyte stress responses. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H1293-1300.
 83. Pryor WA, Prier DG, Church DF.: Electron-spin resonance study of mainstream and sidestream cigarette smoke: nature of the free radicals in gas-phase smoke and in cigarette tar. *Environ Health Perspect* 1983; 47: 345-355.

-
84. O'Loughlin J, Lambert M, Karp I, McGrath J, Gray-Donald K, Barnett TA, Delvin EE, Levy E, Paradis G.: Association between cigarette smoking and C-reactive protein in a representative, population-based sample of adolescents. *Nicotine Tob Res* 2008; 10:525-532.
 85. BAasso C. Post-mortem diagnosis in sudden cardiac death victims:macroscopic, microscopic and molecular findings. *Cardiovasc Res* 2001;50:280-330
 86. Folsom AR. ARIC Stusy investigators, association of hemostatic variables with prevalence cardiovascular disease and asyntomatic artery atherosclerosis. *Arterioscl. Thromb* 1993;13:1829-36
 87. Heiss G. Carotid atherosclerosis measured by Bmode ultrasound in poulations: associations with cardiovascular risk factors in the Aric Study. *Am J Epidemiol* 1991;134:250-256.