



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari

**Scuola di Dottorato di Ricerca in
Scienze Mediche, Cliniche e Sperimentali**

Indirizzo: Fisiopatologia Clinica e Scienze Nefrologiche

XXVI ciclo

**EFFETTO DEL BLOCCO DEL RECETTORE AT1R
DELL'ANGIOTENSINA II SULLO STRESS
OSSIDATIVO E SUL SIGNALLING MEDIATO
DALLO STRESS OSSIDATIVO NEL DANNO
CARDIOVASCOLARE ED ENDOTELIALE DEL
PAZIENTE IPERTESO.
STUDIO *EX VIVO* NELL'UOMO CON APPROCCIO
BIOLOGICO MOLECOLARE.**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. GAETANO THIENE

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. ALDO BARITUSSIO

Supervisore: Dr. LORENZO A. CALÒ

Dottoranda: Dott.ssa LUCIA DAL MASO

INDICE

	RIASSUNTO	1
	SUMMARY	7
CAPITOLO 1	INTRODUZIONE	13
CAPITOLO 2	SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA	15
	2.1 Signalling dell'Angiotensina II via recettore AT1 (AT1R)	17
	2.2 Signalling dell'Angiotensina II via recettore AT2 (AT2R)	19
CAPITOLO 3	STRESS OSSIDATIVO	23
	3.1 Radicali liberi e le loro fonti	24
	3.1.1 Sistema NADH/NADPH ossidasi	26
	3.2 Sistemi antiossidanti	28
	3.2.1 Il sistema dell'eme ossigenasi	29
	3.3 Effetti dello stress ossidativo su componenti e funzioni cellulari	33
	3.2.3 Mitogen activated protein kinase (MAPK)	35
CAPITOLO 4	DISFUNZIONE ENDOTELIALE	39
	4.1 L'endotelio e le sue funzioni	39
	4.2 Disfunzione endoteliale	41
	4.2.1 Disfunzione endoteliale nell'ipertensione arteriosa	42
	4.3 Cellule progenitrici endoteliali circolanti (EPC)	43
	4.3.1 EPC e rigenerazione endoteliale	44
	4.3.2 EPC e neovascolarizzazione	45
	4.3.3 Fenotipo delle EPC	47

	4.4	Ipertensione ed EPC	48
	4.5	Calcitonin Gene Related Peptide(CGRP)	50
CAPITOLO 5		I SARTANI	53
CAPITOLO 6		SCOPO DEL LAVORO	59
CAPITOLO 7		PAZIENTI E METODI	63
	7.1	Pazienti	63
	7.2	Metodi	64
	7.2.1	Separazione delle cellule mononucleate da sangue periferico	64
	7.2.2	Ottenimento del lisato proteico	65
	7.2.3	Determinazione della concentrazione di proteine	65
	7.2.4	Separazione elettroforetica delle proteine e trasferimento su membrana di nitrocellulosa (Western Blot)	66
	7.2.5	Formazione e visualizzazione degli immunocomplessi	67
	7.2.6	Determinazione delle LDL ossidate plasmatiche	68
	7.2.7	Determinazione della concentrazione plasmatica del calcitonin gene-related peptide (CGRP)	69
	7.2.8	Valutazione del numero delle EPC circolanti mediante citofluorimetria	69
	7.2.9	Test di valutazione dell'apoptosi di EPC circolanti mediante Annessina V in citofluorimetria	71
	7.3	Analisi statistica	72
CAPITOLO 8		RISULTATI	73
	8.1	Valutazione dei livelli di pressione arteriosa di pazienti ipertesi essenziali dopo 3 e 6 mesi di terapia con Olmesartan	73

8.2	Valutazione dell'espressione proteica di p22 ^{phox} in cellule mononucleate del sangue di pazienti ipertesi essenziali dopo 3 e 6 mesi di terapia con Olmesartan	75
8.3	Valutazione dell'espressione proteica di HO-1 in cellule mononucleate del sangue di pazienti ipertesi essenziali dopo 3 e 6 mesi di terapia con Olmesartan	76
8.4	Valutazione dello stato di fosforilazione di ERK 1/2 in cellule mononucleate del sangue di pazienti ipertesi essenziali dopo 3 e 6 mesi di terapia con Olmesartan	77
8.5	Valutazione della concentrazione plasmatica delle LDL ossidate di pazienti ipertesi essenziali dopo 3 e 6 mesi di terapia con Olmesartan	78
8.6	Valutazione dell'espressione proteica di HO-1 in cellule mononucleate del sangue della seconda coorte di pazienti ipertesi essenziali dopo 3 e 6 mesi di terapia con Olmesartan	79
8.7	Valutazione della concentrazione plasmatica del peptide CGRP in pazienti ipertesi essenziali dopo 3 e 6 mesi di terapia con Olmesartan	80
8.8	Effetto del trattamento con Olmesartan sul numero di cellule progenitrici endoteliali circolanti (EPC) in pazienti ipertesi essenziali dopo 3 e 6 mesi di terapia	81
8.9	Effetto del trattamento con Olmesartan sull'apoptosi di cellule progenitrici endoteliali circolanti (EPC) in pazienti ipertesi essenziali dopo 3 e 6 mesi di terapia	84
CAPITOLO 9	DISCUSSIONI E CONCLUSIONI	85
	BIBLIOGRAFIA	95

RIASSUNTO

L'ipertensione arteriosa è il più importante fattore di rischio per le malattie cardiovascolari, l'infarto del miocardio, lo scompenso cardiaco, l'insufficienza renale e le vasculopatie periferiche.

Lo stress ossidativo, dovuto all'aumentata produzione delle specie reattive all'ossigeno (ROS), svolge un importante ruolo fisiopatologico nello sviluppo dell'ipertensione arteriosa e delle sue complicanze a lungo termine, quali il rimodellamento cardiovascolare e l'aterosclerosi (Touyz RM et al, 2004).

Vari fattori di rischio (fumo, diabete, aumento di LDL, oltre che ipertensione) portano ad un aumento dello stato redox, determinando disfunzione endoteliale, aumento dell'espressione di geni pro-infiammatori redox sensibili ed attivazione delle cellule muscolari lisce (Luft FC, 2001).

In pazienti ipertesi, il sistema Renina-Angiotensina (RAAS) è attivato, causando un aumento di produzione dell'Angiotensina (Ang II) (Ruster C et al, 2006). L'Ang II, potente vasocostrittore (in grado di aumentare le resistenze periferiche totali e quindi la pressione arteriosa) è un potente induttore di stress ossidativo.

L'Ang II media le sue azioni attraverso due recettori distinti: AT1R e AT2R (Dihn DT et al, 2001; Mehta PK et al, 2007; Calò LA et al, 2010). La stimolazione del recettore AT1R, per il quale l'Ang II presenta maggiore affinità, determina sia vasocostrizione attraverso un signalling cellulare a breve termine ma anche rimodellamento vascolare e aterosclerosi attraverso un signalling a lungo termine che coinvolge l'attivazione dell'NADPH ossidasi, produttore di anione superossido (O_2^-) (Griendling KK et al, 2000). Il legame al recettore AT2R da parte dell'Ang II controbilancia gli effetti mediati dall'attivazione di AT1R, inducendo vasodilatazione, antiproliferazione, differenziazione cellulare, segnali antiapoptotici; esso ha quindi un ruolo omeostatico nel controbilanciare un eccesso di stimolazione di AT1R (Volpe et al, 2003; Zhuo et al, 2008; Yamamoto et al, 2008).

Lo stress ossidativo, è considerato uno dei meccanismi patogenetici fondamentali della disfunzione endoteliale. Per disfunzione endoteliale si intende un quadro molecolare e biochimico complesso che comprende infiammazione, proliferazione, anomalie strutturali e funzionali dei vasi. Le cellule progenitrici endoteliali (EPC) circolanti di derivazione midollare, svolgono un importante ruolo di

protezione da queste alterazioni (Hill JM et al, 2003) in quanto sono in grado di riparare l'endotelio danneggiato attraverso un continuo processo di re-endotelializzazione e/o neovascolarizzazione (Heiss C et al, 2005).

Nell'ipertensione il numero di EPC circolanti è ridotto e la loro funzione è alterata; tale situazione rappresenta un ulteriore fattore di rischio nello sviluppo di eventi cardiovascolari. E' stato dimostrato, infatti, che l'Ang II, che causa un aumento dello stress ossidativo, svolge un ruolo centrale nell'insorgenza dell'invecchiamento e nella inibizione della capacità proliferativa delle EPC circolanti (Imanishi T et al, 2005). Il calcitonin gene-related peptide (CGRP), invece, è un potente vasodilatatore, che previene l'invecchiamento delle EPC circolanti, indotto anche da Ang II (Zhou Z et al, 2010).

L'importante ruolo che gioca lo stress ossidativo nei processi di remodelling cardiovascolare ed aterogenesi che si osservano nell'ipertensione arteriosa, ha indotto i ricercatori a porre sempre maggior attenzione e ad investigare i potenziali effetti pleiotropici dei farmaci antiipertensivi sullo stress ossidativo.

I farmaci maggiormente studiati sono gli ACE inibitori (ACEIs) e i bloccanti il recettore AT1R dell'Angiotensina (ARBs), le due più importanti classi di farmaci che agiscono limitando l'attività del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS).

L'Olmesartan Medoxomil, bloccante il recettore AT1R dell'Ang II, ampiamente usato nel trattamento dell'ipertensione, blocca tutte le attività dell'Ang II mediate dal recettore AT1R, indipendentemente dall'origine e dalla via di sintesi dell'Ang II; l'ormone, perciò, si rende disponibile per il legame con il suo recettore AT2R, la cui stimolazione determina vasodilatazione, effetti antifibrotici e antinfiammatori e determina una riduzione, a lungo termine, dose-dipendente, della pressione arteriosa. Inoltre, è stato dimostrato che l'Olmesartan possiede attività antiossidante in quanto riduce i livelli plasmatici del marker di stress ossidativo 8-isoprostano (Fliser D et al, 2005), e attiva il sistema del monossido d'azoto (NO) attraverso un aumento della fosforilazione della eNOS (Oyama N et al, 2010; Kanematsu Y et al, 2006).

Con il nostro studio abbiamo valutato un possibile effetto antiossidante e vasoprotettivo dell'Olmesartan Medoxomil in pazienti ipertesi essenziali, utilizzando un approccio biologico molecolare.

Lo studio è stato effettuato in tempi differenti utilizzando due coorti di pazienti con caratteristiche cliniche simili trattati per 6 mesi con Olmesartan Medoximil. Sulla prima coorte sono stati analizzati markers di stress ossidativo e della pathway del rimodellamento cardiovascolare, oltre che i livelli di LDL ossidate; sulla seconda coorte di pazienti sono stati valutati oltre che l'espressione proteica di HO-1, i livelli plasmatici di CGRP e il numero e la sopravvivenza delle EPC circolanti.

In particolare, nella prima fase sono state valutate p22^{phox} subunità della NADPH ossidasi essenziale per la produzione di anione superossido, ed Heme Oxygenase-1 (HO-1), isoforma inducibile di HO, in grado di proteggere dallo stress ossidativo. Abbiamo, inoltre, valutato lo stato di fosforilazione delle ERK, proteine effettrici dello stress ossidativo nel rimodellamento cardiovascolare, e lo stato di marker plasmatici di stress ossidativo come le lipoproteine ossidate a bassa densità (LDL ossidate), cruciali nello sviluppo della reazione infiammatoria cronica a livello della tonaca intima delle arterie.

Nella seconda fase dello studio abbiamo preso in considerazione gli effetti vasoprotettivi dell'Olmesartan valutando parametri quali: HO-1, proteina che oltre ad avere una potente attività anti-ossidante ed anti-infiammatoria, è contraddistinta da un potente effetto favorente la re-endothelializzazione, giustificato dalla sua capacità di aumentare il numero e di ridurre l'invecchiamento di cellule progenitrici endoteliali (EPC) circolanti ed il CGRP, peptide stimolato dall'HO-1 che protegge l'endotelio e previene l'invecchiamento delle EPC circolanti mediato da Ang II. Inoltre, sono stati valutati il numero e la sopravvivenza delle EPC circolanti.

I risultati della prima fase hanno dimostrato come il farmaco Olmesartan, oltre a normalizzare la pressione arteriosa in pazienti ipertesi essenziali già a 3 mesi di terapia, ha ridotto significativamente i livelli di espressione proteica di p22^{phox} già a 3 mesi di terapia rispetto al basale (rispettivamente 0.71 ± 0.26 vs 0.93 ± 0.24 unità densitometriche (u.d.), $p < 0.001$), riduzione che è risultata significativa anche a 6 mesi rispetto sia al basale (0.45 ± 0.12 vs 0.93 ± 0.24 u.d., $p < 0.001$) che a 3 mesi (0.45 ± 0.12 vs 0.71 ± 0.26 u.d., $p < 0.02$).

Il trattamento con Olmesartan ha ridotto significativamente anche i livelli di fosforilazione delle ERK 1/2 sia dopo 3 mesi rispetto al baseline (rispettivamente 0.39 ± 0.14 vs 0.56 ± 0.11 u.d., $p = 0.001$) che a 6 mesi di terapia, rispetto al basale

(0.19 ± 0.08 vs 0.56 ± 0.11 , u.d., $p=0.001$) e rispetto a 3 mesi (0.19 ± 0.08 vs 0.39 ± 0.14 u.d., $p=0.001$).

I livelli di LDL ossidate sono risultati significativamente ridotti dopo 6 mesi di terapia, sia rispetto al basale (171.92 ± 61.83 vs 300.84 ± 109.13 ng/ml, $p=0.001$), che rispetto a 3 mesi (171.92 ± 61.83 vs 270.06 ± 100.34 ng/ml, $p=0.002$) mentre a 3 mesi rispetto al basale la riduzione non era significativa (270.06 ± 100.34 vs 300.84 ± 109.13 ng/ml, $p=ns$).

Il trattamento con Olmesartan ha, invece, determinato un significativo aumento dei livelli di espressione proteica di HO-1 rispetto al basale sia a 3 mesi di terapia (1.10 ± 0.19 vs 0.77 ± 0.071 u.d., $p=0.001$) che a 6 mesi (1.11 ± 0.19 vs 0.77 ± 0.071 u.d., $p=0.001$), mentre la variazione non è risultata significativa tra 3 e 6 mesi di trattamento (1.10 ± 0.19 vs 1.11 ± 0.19 u.d., $p=ns$).

Nella seconda parte dello studio, confermando quanto riscontrato precedentemente, il trattamento con Olmesartan ha incrementato significativamente i livelli di espressione proteica di HO-1 rispetto al basale sia a 3 mesi (0.95 ± 0.21 vs 0.81 ± 0.21 u.d., $p=0.031$) che a 6 mesi (1.1 ± 0.26 vs 0.81 ± 0.21 u.d., $p=0.001$) con un aumento significativo anche nel confronto tra 3 e 6 mesi (0.95 ± 0.21 vs 1.1 ± 0.26 u.d., $p=0.01$).

L'Olmesartan ha, inoltre, indotto un significativo aumento dei livelli plasmatici di CGRP dopo 6 mesi di terapia sia rispetto al basale (263.91 ± 43.08 vs 198.81 ± 51.98 pg/ml, $p=0.001$), che rispetto a 3 mesi (263.91 ± 43.08 vs 218.97 ± 41.13 pg/ml, $p=0.03$). Un aumento nel numero di EPC circolanti, espresse come $CD34^+KDR^+$, $CD133^+KDR^+$ e $CD34^+CD133^+KDR^+$, è risultato significativo a 6 mesi di trattamento con Olmesartan sia rispetto al basale (rispettivamente 112.89 ± 53.44 vs 35.11 ± 25.98 , $p=0.005$ per $CD34^+KDR^+$; 107.60 ± 37.09 vs 20.90 ± 14.58 , $p=0.0001$ per $CD133^+KDR^+$; 38.11 ± 19.64 vs 3.67 ± 3.61 , $p=0.0007$ per $CD34^+CD133^+KDR^+$) che a 3 mesi (112.89 ± 53.44 vs 59.11 ± 35.30 , $p=0.002$ per $CD34^+KDR^+$; 107.60 ± 37.09 vs 49.50 ± 45.20 , $p=0.003$ per $CD133^+KDR^+$; 38.11 ± 19.64 vs 15.78 ± 18.59 , $p=0.0028$ per $CD34^+CD133^+KDR^+$).

L'apoptosi delle cellule EPC, valutata mediante analisi citofluorimetrica del legame tra annessina V e fosfatidilserina espressa sulle cellule $CD133^+KDR^+$, è risultata significativamente ridotta già a 3 mesi di trattamento con Olmesartan ($27.24 \pm 9.64\%$ vs $44.28 \pm 12.38\%$, $p<0.01$) e si è ulteriormente ridotta in modo significativo a 6 mesi sia rispetto al basale ($16.83 \pm 15.68\%$ vs $44.28 \pm 12.38\%$,

p<0.001) che rispetto a 3 mesi (16.83±15.68 vs 27.24±9.64% %, p< 0.004) (Calò LA et al, 2014).

In conclusione, questo studio dimostra un effetto inibitorio dell'Olmesartan sullo stress ossidativo e sulle proteine correlate coinvolte nel signalling intracellulare dello stress ossidativo in pazienti con ipertensione essenziale. Inoltre, dimostra che l'Olmesartan possiede un effetto vasoprotettivo mediato dalla riduzione dello stress ossidativo indotto dall'Ang II e dall'aumento degli effetti benefici del CGRP sulla disfunzione endoteliale, dovuti anche all'aumento del numero delle EPC circolanti e della loro sopravvivenza/funzionalità.

I nostri dati, inoltre, forniscono un razionale meccanicistico dell'azione anti-ossidante, anti-infiammatoria e vasoprotettiva, forniscono il razionale meccanicistico agli effetti anti-aterosclerotici, antiinfiammatori e di anti-remodeling di Olmesartan riportati da trials clinici come MORE (Stumpe KO et al 2007), OLIVUS (Hirohata A et al, 2010), EUTOPIA (Fliser D et al, 2004) e VIOS (Smith RD et al, 2006).

SUMMARY

High blood pressure is a major risk factor for cardiovascular disease, myocardial infarction, heart failure, kidney failure and peripheral vascular disease.

Oxidative stress, due to increased production of reactive oxygen species (ROS), plays an important pathophysiological role in the development of hypertension and its long-term complications, such as cardiovascular remodeling and atherosclerosis (Touyz RM et al, 2004).

Various risk factors (smoking, diabetes, increased LDL, as well as hypertension) lead to an increase of the redox state, resulting in endothelial dysfunction, increased expression of pro-inflammatory redox sensitive genes and activation of smooth muscle cells (Luft FC, 2001).

In hypertensive patients, the Renin-Angiotensin-Aldosterone system (RAAS) is activated and this causes an increase of Angiotensin (Ang II) production (Ruster C et al, 2006). Ang II causes vasoconstriction, increases total peripheral resistance and, consequently, blood pressure but at the same time strongly induces oxidative stress.

Ang II mediates its actions through two distinct receptors: AT1R (for which Ang II has more affinity) and AT2R (Dihn DT et al, 2001; Mehta PK et al, 2007; Calò LA et al, 2010). Many of the Ang II-related events are mediated via activation of the AT1R receptor followed by both a short term signaling, which causes vasoconstriction, and a long term signaling, which leads to vascular remodeling and atherosclerosis through the activation of NADPH oxidase and consequently production of superoxide anion (O_2^-) (Griendling KK et al, 2000). Ang II signaling via AT2R stimulation has been suggested to counteract many actions mediated by AT1R inducing vasodilatation, anti-proliferation, cell differentiation, anti-apoptotic signals; it therefore has a role in the homeostatic counterbalance of an excessive stimulation of AT1R (Volpe et al, 2003; Zhuo et al, 2008; Yamamoto et al, 2008).

Oxidative stress is well recognized to play a crucial role in the pathogenic mechanisms of endothelial dysfunction. Endothelial dysfunction defines a complex molecular and biochemical picture of inflammatory, proliferative, structural and functional abnormalities of the vasculature. Endothelial progenitor cells (EPCs), derived from bone marrow, play an important role for the protection

from these abnormalities (Hill JM et al, 2003), as they are able to repair the damaged endothelium, through a continuous process of re-endothelialization and/or neovascularization (Heiss C et al, 2005). In hypertension the number of circulating EPCs is reduced and their function is altered; this situation represents an additional risk factor in the development of cardiovascular events. It has been shown that Ang II and AngII-induced oxidative stress play a pivotal role in EPC status by accelerating the onset of their senescence, which, in turn, leads to impairment of their proliferative activity (Imanishi T et al, 2005). The calcitonin gene-related peptide (CGRP), instead, is a potent vasorelaxant, which prevents circulating EPC senescence and reverses AngII-induced senescence of EPC (Zhou Z et al, 2010).

The important role that oxidative stress plays in the cardiovascular remodelling and atherogenetic processes, that are observed in hypertension, has led researchers to investigate the potential pleiotropic effects of antihypertensive drugs on oxidative stress.

In particular, two drugs families are more intensive studied: ACE inhibitors (ACEIs) and the Ang II type 1 receptor blocker (ARBs) which both reduce RAAS activity.

Olmesartan Medoxomil, widely used in the treatment of hypertension, blocks specifically AT1R receptor and consequently its actions via short and long term signaling independently of the Ang II source. AngII is, then, available for binding to AT2R inducing vasodilatation, anti-inflammatory and antifibrotic effects and causing a dose-dependent reduction of blood pressure.

Furthemore, the treatment with Olmesartan has been shown to possess antioxidant-related effects such as reduction of the plasma levels 8-isoprostane, a marker of oxidative stress (Fliser D et al, 2005), and activation of Nitric Oxide (NO) system, through increase of eNOS phosphorylation (Oyama N et al, 2010; Kanematsu Y et al, 2006).

The aim of our study was, therefore, to evaluate a possible anti-oxidant and vasoprotective effect of the Olmesartan Medoxomil, in essential hypertensive patients, using a molecular biology approach.

The study was carried out at different times, using two cohorts of essential hypertensive patients with similar clinical features treated for six months with Olmesartan Medoxomil. On the first cohort of patients we analyzed markers of

oxidative stress and cardiovascular remodelling-related pathways, as well as the level of oxidized LDL; on the second cohort of patients, we evaluated both the protein expression of HO-1, the plasma levels of CGRP and circulating EPCs number and senescence.

In particular, in the first phase of the study, we evaluated p22^{phox}, subunit of NADPH oxidase, essential for the production of superoxide anion (O₂⁻), and heme oxygenase-1 (HO-1), inducible isoform of HO, known to protect from oxidative stress. We also evaluated the state of phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2), an oxidative stress protein effector for cardiovascular remodeling, and the plasma level of the low-density lipoproteins (OxLDL), a plasma marker of oxidative stress, which is crucial in the development of arteries chronic inflammation at intima level.

In the second phase of the study, we evaluated the vasoprotective effects of Olmesartan, considering parameters such as: HO-1, potent anti-oxidant and anti-inflammatory protein, characterized by a strong effect on re-endothelialization, which is linked to its ability to increase the number and to reduce the senescence of circulating EPC; CGRP, peptide-stimulated by HO-1, that protect the endothelium and prevents circulating EPCs senescence. Moreover, were evaluated the number and survival of circulating EPCs.

The results of the first phase of the study, have demonstrated that Olmesartan Midoxomil, besides inducing blood pressure normalization in essential hypertensive patients since the third month of treatment, significantly reduced p22^{phox} protein level after 3 months compared to baseline (0.71 ± 0.26 vs 0.93 ± 0.24 densitometric unit (d.u.), $p < 0.001$), and moreover significantly reduced p22^{phox} at 6 months both compared to baseline (0.45 ± 0.12 vs 0.93 ± 0.24 d.u., $p < 0.001$) and to 3 months (0.45 ± 0.12 vs 0.71 ± 0.26 d.u., $p < 0.02$).

Olmesartan treatment also significantly decreased phosphorylated ERK 1/2 levels, both after 3 months compared to baseline (0.39 ± 0.14 vs 0.56 ± 0.11 d.u., $p = 0.001$), and at 6 months compared to baseline (0.19 ± 0.08 vs 0.56 ± 0.11 , d.u., $p = 0.001$) and to 3 months (0.19 ± 0.08 vs 0.39 ± 0.14 , d.u., $p = 0.001$).

oxLDL plasma levels were significantly reduced after 6 months of treatment, both compared to baseline (171.92 ± 61.83 vs 300.84 ± 109.13 ng/ml, $p = 0.001$), and to 3 months (171.92 ± 61.83 vs 270.06 ± 100.34 ng/ml, $p = 0.002$), whereas at 3 months the reduction was not significant.

Furthermore, Olmesartan treatment caused a significant increase of HO-1 protein expression levels at 3 months of the therapy compared to baseline (1.10 ± 0.19 vs 0.77 ± 0.071 d.u., $p=0.001$) and at 6 months of the therapy compared to baseline (1.11 ± 0.19 vs 0.77 ± 0.071 d.u., $p=0.001$). There was no significant increase of HO-1 protein expression between 6 and 3 months of Olmesartan treatment (1.11 ± 0.19 vs 1.10 ± 0.19 d.u., $p=ns$).

In the second phase of the study, confirming the previously shown increase of HO-1, we found that Olmesartan significantly increased HO-1 protein level, both at 3 months compared to baseline (0.95 ± 0.21 vs 0.81 ± 0.21 d.u., $p=0.031$), and at 6 months compared to baseline (1.1 ± 0.26 vs 0.81 ± 0.21 d.u., $p=0.001$) and to 3 months (1.1 ± 0.26 vs 0.95 ± 0.21 d.u., $p=0.01$).

Moreover, we observed a significantly increase of CGRP plasma levels after 6 months of therapy, both compared to baseline (263.91 ± 43.08 vs 198.81 ± 51.98 pg/ml, $p=0.001$), and to 3 months (263.91 ± 43.08 vs 218.97 ± 41.13 pg/ml, $p=0.03$). Circulating EPC number, defined by cell surface antigens $CD34^+KDR^+$, $CD133^+KDR^+$ e $CD34^+CD133^+KDR^+$, increased after 6 months of Olmesartan treatment both compared to baseline (respectively, 112.89 ± 53.44 vs 35.11 ± 25.98 , $p=0.005$; 107.60 ± 37.09 vs 20.90 ± 14.58 , $p=0.0001$; 38.11 ± 19.64 vs 3.67 ± 3.61 , $p=0.0007$) and compared to 3 months (respectively, 112.89 ± 53.44 vs 59.11 ± 35.30 , $p=0.002$; 107.60 ± 37.09 vs 49.50 ± 45.20 , $p=0.003$; 38.11 ± 19.64 vs 15.78 ± 18.59 , $p=0.0028$).

Olmesartan significantly reduced EPC apoptosis, evaluated by gating on $CD133^+KDR^+$ cells events based on Annexin V expression, at 3 months compared to baseline ($27.24 \pm 9.64\%$ vs $44.28 \pm 12.38\%$, $p<0.01$) and further significantly reduced it at 6 months both compared to baseline ($16.83 \pm 15.68\%$ vs $44.28 \pm 12.38\%$, $p<0.001$) and to 3 months ($16.83 \pm 15.68\%$ vs $27.24 \pm 9.64\%$, $p<0.004$) (Calò LA et al, 2014).

In conclusion, this study demonstrates Olmesartan's inhibitory effect on oxidative stress and oxidative stress-related proteins involved in oxidative stress signaling in essential hypertensive patients. Moreover, it demonstrates a vasoprotective effect of Olmesartan via reduction of Ang II-mediated oxidative stress and increased CGRP-mediated improvement of endothelial dysfunction, likely due also to the increased number of circulating EPC and their improved survival/function.

In addition, our data provide a mechanistic rationale for the Olmesartan's antioxidant and anti-inflammatory potential translation, in the long term, toward antiatherosclerotic and antiremodeling effects reported in clinical trials such as MORE (Stumpe KO et al 2007), OLIVUS (Hirohata A et al, 2010), EUTOPIA (Fliser D et al, 2004) e VIOS (Smith RD et al, 2006).

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

L'ipertensione arteriosa è il più frequente disordine cardiovascolare ed è un potentissimo fattore di rischio per malattie cerebrovascolari, cardiomiopatia ischemica, infarto del miocardio, scompenso cardiaco, insufficienza renale, retinopatia, e vasculopatie periferiche. Ha un costo umano ed economico enorme e costituisce un problema di salute pubblica da affrontare precocemente e con efficacia.

Nelle Linee Guida della European Society of Hypertension (ESH) è definita come una patologia complessa, ad origine multifattoriale, determinante per lo sviluppo dell'aterosclerosi e del danno d'organo cerebrale, cardiaco e renale, che colpisce un quarto della popolazione adulta (20 milioni in Italia, 60 milioni negli USA, 1 miliardo di persone nel mondo) ed è la prima causa di morte nel mondo occidentale.

I dati relativi all'Italia indicano che oltre 20 milioni di persone soffrono di ipertensione arteriosa, che causa ogni anno circa 200.000 casi di ictus, 100.000 casi di infarto miocardico, 200.000 casi di scompenso cardiaco, 2000 casi di insufficienza renale terminale che richiede la dialisi.

Nonostante esistano ancora molte ombre sui meccanismi che alterano la normale regolazione fisiologica della pressione arteriosa, essi dipendono, per la maggior parte dei soggetti, da un intreccio complesso tra fattori igienico-ambientali (quali stress, fumo, vita sedentaria, sovrappeso) e genetici.

E' dimostrato che l'aumento nella produzione di specie reattive all'ossigeno (ROS), con conseguente aumento dello stress ossidativo (SO), svolge un'importante ruolo fisiopatologico nello sviluppo dell'ipertensione arteriosa (Touyz RM et al, 2004). Lo SO contribuisce alle disfunzioni vascolari, determinando infiammazione del tessuto vascolare, associato con la migrazione di cellule pro-infiammatorie, aumento dell'espressione di geni pro-infiammatori redox sensibili, fibrosi e attivazione delle cellule muscolari lisce, oltre a riduzione della biodisponibilità di monossido di azoto (NO), causando disfunzione endoteliale (Luft FC, 2001). Questi processi sono alla base del rimodellamento cardiovascolare, (complicanza a lungo termine dell'ipertensione arteriosa), causati dalle proteine vasoconstrictrici, tra cui la più importante è l'Angiotensina II (Ang II) (Jons DG et al, 2000).

L'Ang II è un potente induttore di stress ossidativo e alcune classi di farmaci anti-ipertensivi, attraverso il loro meccanismo d'azione, sono in grado di ridurre la produzione di Ang II (ACE inibitori) o di modularne negativamente il segnale che essa trasduce (Bloccanti del recettore dell'Ang II).

I farmaci che agiscono sul sistema Renina-Angiotensina assumono quindi un importante ruolo nel contrastare lo stress ossidativo, indotto dall'Ang II ed in pazienti ipertesi essenziali, oltre a ridurre la pressione arteriosa, modulano la risposta mediata dall'Ang II, e ci permettono di investigare e fornire una spiegazione meccanicistica del ruolo dello SO nelle complicanze a lungo termine dell'ipertensione arteriosa, oltre a valutare gli effetti mediati da tali farmaci sullo S.O.

CAPITOLO 2

SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

Il sistema Renina-Angiotensina (RAAS), è una cascata bioenzimatica che, attraverso la generazione di mediatori cellulari, svolge un ruolo importante nel controllo della pressione arteriosa, del tono vascolare e nella omeostasi idrosalina e del volume plasmatico regolando le funzioni renali (Dinh DT et al, 2001; Atlas SA, 2007).

La renina è un enzima proteolitico depositato a livello delle cellule iuxtaglomerulari del rene, e viene secreto dal rene in risposta alla diminuzione della volemia e della pressione sanguigna, ai diuretici o alla bassa concentrazione di sodio che comportano una riduzione del volume sanguigno circolante. La renina ha come substrato l'angiotensinogeno (peptide prodotto a livello epatico), che lo scinde in un decapeptide inattivo, l'Ang I. Quest'ultimo passa poi alla forma attiva grazie all'enzima ACE (Angiotensin Converting Enzyme), prodotto a livello dell'endotelio dei capillari, diventando Ang II (octapeptide), un potente vasocostrittore in grado di determinare un aumento delle resistenze periferiche totali e della pressione arteriosa.

I soggetti con ipertensione arteriosa presentano alti livelli di Ang II nel sangue (Ruster C et al, 2006).

L'Ang II è un'ormone multi-funzionale con importanti azioni fisiologiche.

Nel sistema cardiovascolare, l'Ang II attiva vie di trasduzione del segnale che portano alla contrazione delle cellule muscolari lisce (VSMC), mantenendo il tono vascolare. Inoltre attivano la sintesi e il rilascio di aldosterone e aumentano l'assorbimento renale Na^+ . A livello del sistema nervoso centrale l'Ang II è fondamentale nel mantenere l'efflusso simpatico per il sistema vascolare e autoregolare il flusso sanguigno cerebrale. L'Ang II è un punto focale nella integrazione di tutti questi processi complessi, per mantenere la pressione sanguigna e la perfusione degli organi vitali.

Quando l'equilibrio del RAAS è perturbato (a causa di fattori genetici e/o ambientali), si sviluppano gli effetti patologici di Ang II (Mehta PK et al, 2007).

Evidenze sperimentali dimostrano, infatti, che l'Ang II, oltre ad avere funzioni emodinamiche, ha anche azione come fattore di crescita e stimola il rilascio di

citochine pro-infiammatorie, provocando alterazioni a livello di specifici organi (Das UN, 2005).

L'Ang II è coinvolta nel rimodellamento cardiovascolare, indotto a lungo termine dall'ipertensione arteriosa, agendo come fattore di crescita, che induce un incremento dell'espressione di altri fattori di crescita in cellule muscolari lisce (VSMC), come platelet-derived growth factor (PDGF), basic fibroblast growth factor (BFGF), insulin-like growth factor (IGF) e transforming growth factor (TGF- β), determinando un aumento dell'azione profibrotica e ipertrofia cardiovascolare (Dzau et al, 2001).

A livello cellulare l'Ang II modula la contrazione, la crescita cellulare, la differenziazione e l'apoptosi; può favorire la produzione di altre citochine infiammatorie (ad es. IL-6), l'espressione di molecole di adesione e il conseguente richiamo di cellule infiammatorie, la chemiotassi, l'attivazione dei macrofagi, la crescita dei fibroblasti e la sintesi delle proteine della matrice extracellulare attivando il processo di rimodellamento tissutale.

A livello renale, l'Ang II modula la crescita e la sintesi di matrice extracellulare, determinando fibrogenesi e ipertrofia delle cellule tubulari renali (Ruster C et al, 2011). Uno dei principali target dell'Ang II nella fibrosi renale è il TGF- β , citochina pro-fibrotica; essa infatti ne stimola la sintesi e la trascrizione, e induce specifici recettori per TGF- β , potenziando la fibrogenesi, l' accumulo di matrice extra-cellulare, l'infiammazione e l'apoptosi (Ruster C et al, 2011). Tutto questo porta a lungo termine all'instaurarsi dell'insufficienza renale.

L'Ang II media tutti questi processi soprattutto incrementando la produzione di ROS, quindi inducendo lo stress ossidativo, il quale svolge un ruolo importante nel rimodellamento cardiovascolare e renale, conseguente all'ipertensione arteriosa (Touyz RM, 2005). In particolar modo l'Ang II attiva la NADPH ossidasi, che rappresenta la maggior fonte di produzione di ROS, in particolar modo dello ione superossido (O_2^-) e riduce la biodisponibilità di ossido nitrico (NO), vasodilatatore e inibitore endogeno della crescita e migrazione delle cellule muscolari lisce vascolari (VSMC), in quanto O_2^- reagisce con NO e forma perossinitrito ($ONOO^-$), una specie reattiva dell'ossigeno molto più tossica (Harrison D et al, 2003), aumenta l'attività di trascrizione del fattore nucleare associato all'infiammazione NF-kB, e dell'espressione di molecole pro-infiammatorie (Ruiz-Ortega M et al, 2000).

2.1 Signalling dell' Angiotensina II via recettore AT1 (AT1R)

L'Ang II media le sue azioni di regolazione della funzione e della struttura vascolare, attraverso due recettori distinti accoppiati alle proteine G, legati alla membrana cellulare, l'AT1R e l'AT2R (Dihn DT et al, 2001; Mehta PK et al, 2007; Calò LA et al, 2010).

L' AT1R appartiene alla superfamiglia di recettori con sette domini transmembrana accoppiati a proteine G, con un classico sistema di secondi messaggeri che mediano un signaling a breve termine dell'Ang II che comprende gli effetti emodinamici ed endocrini dell'ormone come la vasocostrizione, e uno a lungo termine, caratterizzato maggiormente da rimodellamento cardiovascolare e renale ed aterosclerosi. Sono recettori ampiamente distribuiti in tutti gli organi, compreso rene, fegato, cervello cuore, intestino, endotelio e sistema vascolare. Il recettore AT1R è formato da 359 amminoacidi ed il gene umano è stato mappato sul cromosoma 3 (Metha PK et al, 2007).

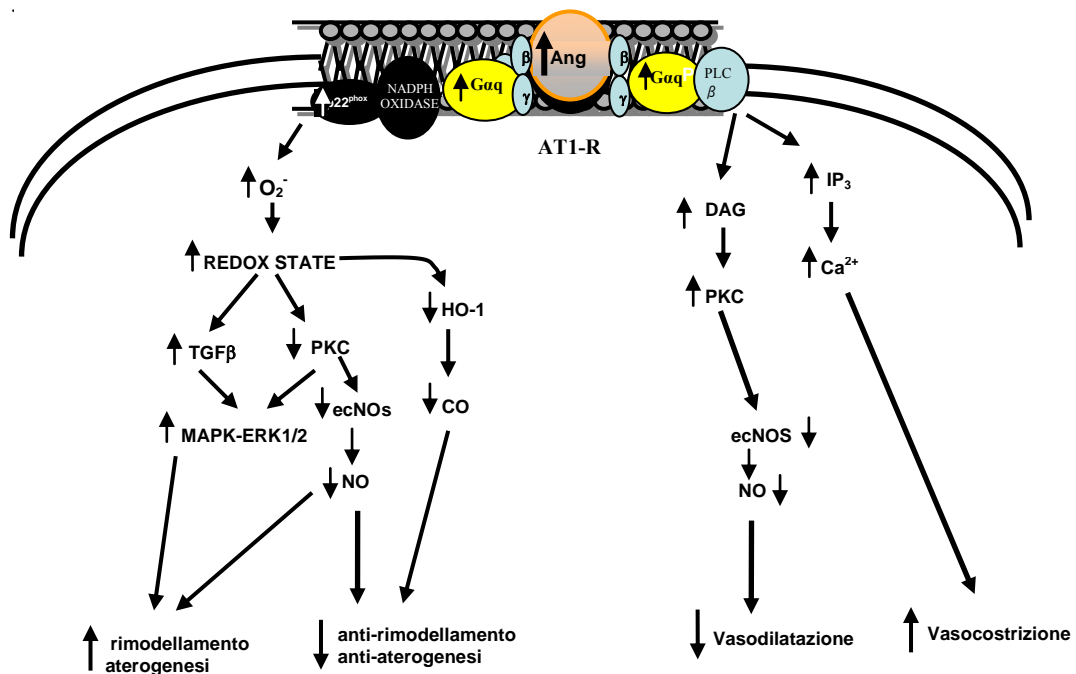


Figura 2.1: schema del signalling intracellulare dell' angiotensina II mediato dal recettore AT1 in un soggetto iperteso dove sia il segnale a breve termine che quello a lungo termine sono attivati comportando rispettivamente vasocostrizione e rimodellamento cardiovascolare. (Calò LA et al, 2007).

La stimolazione del recettore AT1R, accoppiato alla proteina G, determina l'innescamento del classico sistema di secondi messaggeri (Fig. 2.1) che mediano il signalling a breve termine dell'Ang II che regola in particolar modo la contrazione della muscolatura liscia vascolare.

La subunità α della proteina G α trasduce il segnale alla fosfolipasi C (PLC) per generare inositolo trifosfato (IP₃) e diacil glicerolo (DAG). L'IP₃ è generato dall'idrolisi enzimatica dei fosfolipidi di membrana contenenti inositolo (Berridge MJ, 1993), e stimola la liberazione di Ca²⁺ dal reticolo endoplasmatico (Davis et al, 1999).

La PLC, inoltre, libera il diacilglicerolo (DAG), attivatore della protein chinasi C (PKC), che rimane nella membrana e regola la contrazione delle cellule muscolari lisce (Dihn DT et al, 2001; Calò LA et al, 2003). Aumentati livelli di Ca²⁺ intracellulare e attivazione di PKC, mediano la vasocostrizione.

Questo processo è controbilanciato dall'attività vasodilatatoria e antiproliferativa del sistema del monossido d'azoto (NO). NO è prodotto attraverso la NO sintetasi costitutiva endoteliale (ecNOs) che catalizza la conversione di L-arginina in L-citrullina (Palmer et al, 1988). Questo enzima lega la calmodulina in modo calcio dipendente e può essere attivata da stimoli che aumentano la concentrazione del calcio libero intracellulare (Marsden et al. 1993). NO diffonde nella muscolatura liscia vasale dove riduce il tono vascolare attraverso il suo effetto sul Ca²⁺ intracellulare. Il monossido d'azoto, infatti, attiva la Guanilato ciclasi che produce cGMP che, attraverso l'attivazione della G-chinasi, riduce la produzione di IP₃, attiva l'estruzione del Ca²⁺ tramite pompe Ca²⁺-ATPasiche, defosforila la chinasi della catena leggera della miosina, riduce i livelli di calcio e porta quindi a vasodilatazione (Clementi, 1998; Moncada et al, 1993).

Gli effetti cellulari mediati dal segnale a lungo termine dell'Ang II, causano principalmente rimodellamento cardiovascolare (CVD) e renale, aterosclerosi e danni cardiaci, complicanze a lungo termine dell'ipertensione arteriosa, modulati principalmente dallo stress ossidativo cellulare.

Come illustrato in figura 2.1, l'Ang II, via segnale a lungo termine, determina un aumento dello stato redox, tramite attivazione del sistema NADH/NADPH ossidasi, principale fonte di produzione dell'anione superossido (O₂⁻) (Griendling KK et al, 2000). L'attivazione della p22^{phox}, una subunità di 22 KDa del citocromo b₅₅₈, inclusa nella NADH/NADPH ossidasi, svolge un ruolo chiave

nella produzione di O_2^- . Questi processi coinvolgono inoltre l'induzione di effettori correlati allo stress ossidativo come un aumento del TGF β (Nath KA et al, 1998) e di PKC, che attiva a sua volta altre chinasi relative allo stress ossidativo come la mitogen-activated protein kinase (MAPKs) (in particolare le ERK 1/2) (Haurani et al, 2007, Grendling KK et al, 2000), implicate nella crescita cellulare e nell'ipertrofia cardiaca.

In condizioni fisiologiche esistono differenti meccanismi che contrastano l'aumento dello SO.

Tra questi il sistema del monossido di azoto (NO) (Dubey RK et al, 1995) protegge dallo SO ed è il principale fattore anti-aterogeno della parete vascolare, nonché uno dei maggiori sistemi per il controllo del tono vasomotorio per la sua mediazione nel rilassamento della muscolatura liscia.

Esso controbilancia quindi sia gli effetti a lungo termine, che quelli a breve termine, dell'Ang II via AT1R ed è fondamentale per il mantenimento di uno stato di vasodilatazione basale (Moncada S et al, 1991; Maines MD et al, 2000; Datla SR et al, 2010). Anche il sistema di heme oxygenase-1 (HO-1) gioca un ruolo importante nel contrastare l'aumento di SO; infatti la biliverdina e il monossido di carbonio (CO), indotti da HO-1, hanno effetti anti-ossidanti, anti-infiammatori e vasodilatatori (Maines MD, 1997; Stocker R et al, 2006).

2.2 Signalling dell' Angiotensina II via recettore AT2 (AT2R)

L'AT2R appartiene alla superfamiglia di recettori con sette domini transmembrana, accoppiati a proteine G; è caratterizzato dal classico sistema di secondi messaggeri; ha il 34% di omologia con la sequenza amminoacidica di AT1R. E' formato da 363 amminoacidi, con massa molecolare di 41 kDa e il gene umano si trova sul cromosoma X (Dihn DT et al, 2001; Koike G. et al, 1994; Mukoyama M. et al, 1993).

In accordo con il loro ruolo nei processi di sviluppo e di differenziazione cellulare, durante la vita fetale i recettori AT2R sono espressi in maniera ubiquitaria in quasi tutti i tessuti, sia nell'uomo che in altre specie animali, e nell'età adulta sono maggiormente espressi nel rene, nel cervello, nella midollare del surrene e nel tessuto riproduttivo (Zhuo J et al, 1995). E' stato dimostrato che l'espressione di questi recettori è sovra regolato in condizioni patologiche, quali ad esempio nel

danno vascolare, nell'insufficienza renale, nell'insufficienza cardiaca, nell'infarto del miocardio (Ohkubo N et al, 1997; Chung O et al, 1998). Sono stati identificati diversi agenti responsabili dell'aumento dell'espressione di taluni recettori, in particolare Ang II, IGF, II-1 beta (Horiuchi M et al, 1995; Ichiki T et al, 1995; Li JY et al, 1998).

L'Ang II si lega con meno affinità ad AT2R, rispetto all'AT1R, e il suo signalling è tuttora non completamente chiarito. Evidenze recenti hanno mostrato che i segnali mediati da questo recettore controbilanciano gli effetti mediati da AT1R; sono infatti implicati nell'antiproliferazione, nella differenziazione cellulare, nei segnali antiapoptotici, nella rigenerazione neuronale. Possono inoltre indurre vasodilatazione e inibire il segnale implicato nel processo infiammatorio ed hanno quindi un ruolo omeostatico controbilanciando un eccesso di stimolazione di AT1R (Volpe et al, 2003; Zhou et al, 2008; Yamamoto et al, 2008). Il signaling vasodilatatorio è dato dall'attivazione della cascata bradichinina (BK)-Ossido nitrico (NO)-ciclina guanosina 3-5 monofosfato (cGMP) (Siragy HM et al, 1996, Siragy HM et al, 1997).

Dato che NO è il principale fattore antiaterogeno della parete vascolare e le ERK1/2 l'ultimo effettore della via della MAPK family, che è il meccanismo a capo del rimodellamento, la stimolazione dei recettori AT2R risulta di primaria importanza sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Il blocco dei recettori AT1R, con bloccanti specifici, fa infatti aumentare notevolmente la concentrazione plasmatica di Ang II che si rende così disponibile per lo stimolo dei recettori AT2R e questa azione potrebbe contribuire alla loro attività antiipertensiva. Hein e collaboratori (1995) e Ichiki (1995) hanno dimostrato in modelli sperimentali di topo ipertesi come il knock-out dei recettori AT1R, determini un effetto vasodepressorio, via BK/NO, e quindi un effetto opposto a quello mediato dal recettore AT1R. Cosentino e collaboratori (Cosentino et al, 2005), invece, hanno dimostrato, in vitro, in ratti ipertesi, una risposta vasodilatante mediata da AT2R, dovuta al blocco dei recettori AT1R con losartan, farmaco anti-ipertensivo, bloccante del recettore AT1R. Questi risultati sono stati confermati nell'uomo in un modello sperimentale umano opposto all'ipertensione arteriosa, la Sindrome di Bartter e di Gitelman, tubulopatie genetiche, in cui nonostante gli elevati livelli di Ang II e di altri ormoni vasoattivi i pazienti presentano normo-ipotensione a causa di una anomalia della trasmissione del

segnale dell'Ang II via AT1R (Calò LA, 2006; Calò LA et al, 2007) mentre presentano un'attivazione del signalling dell'Ang II mediata da AT2R (Calò LA et al, 2010).

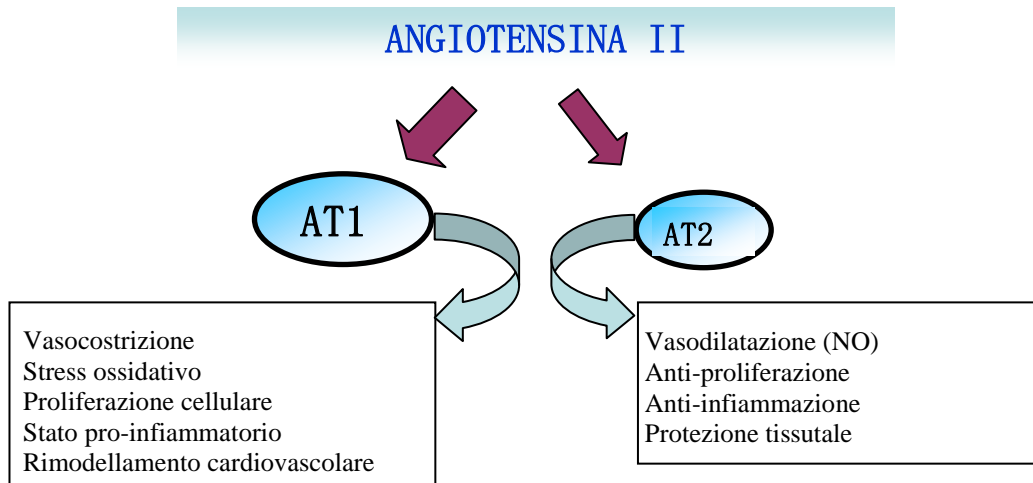


Figura 2.2: confronto degli effetti mediati tra recettore AT1 e recettore AT2.

CAPITOLO 3

STRESS OSSIDATIVO

La prima definizione di stress ossidativo risale al 1985 ad opera di Sies H. che così lo descrive: “Una modificazione dell’equilibrio tra fattori pro e anti-ossidanti in favore dei primi che può determinare un potenziale danno” (Sies H, 1985) (Sies H, 1991).

Lo stress ossidativo è quindi una condizione patologica causata dalla rottura dell'equilibrio fisiologico in un organismo vivente fra la produzione e l'eliminazione, da parte dei sistemi di difesa antiossidanti, di specie chimiche ossidanti. Viene generalmente utilizzato per descrivere il livello raggiunto di danno ossidativo presente nelle cellule, nei tessuti o negli organi, causato dalle specie reattive all'ossigeno (ROS). Tale danno può riguardare una molecola specifica, un tessuto o l'intero organismo.

E' ampiamente documentato che lo stress ossidativo partecipa alla patogenesi o al mantenimento di numerose malattie come ad esempio, ipertensione, aterosclerosi, artrite reumatoide e danno da ischemia-riperfusion (Irani K, 2000) (Babior BM, 1999).

Le ROS, come perossidi, radicali superossido e idrossilico, rappresentano una classe di molecole che derivano dal normale metabolismo dell'ossigeno e pertanto sono presenti naturalmente in tutti gli organismi aerobi. L'ossigeno molecolare, infatti, agendo da accettore finale d'elettroni nella respirazione mitocondriale aerobica, contribuisce alla formazione delle ROS.

Esistono inoltre, sorgenti di ROS esogene come: il fumo di sigaretta, l'inquinamento ambientale, gas di scarico delle automobili, un consumo di alcol in eccesso, l'esposizione a radiazioni ionizzanti.

Questi agenti ossidanti possono provocare danni cellulari (comunemente riferiti allo stress ossidativo) dovuti all'ossidazione di:

- 1) acidi nucleici, con accumulo di mutazioni ed alterazioni dell'espressione genica
- 2) proteine, dove l'ossidazione dei residui di cisteina e di altri amminoacidi finisce per causare alterazioni della struttura e perdita della funzione enzimatica, di trasporto recettoriale
- 3) lipidi di membrana, fino alla distruzione delle stesse con perdita della compartimentazione e dei trasporti selettivi.

Inoltre i ROS possono attivare fattori di trascrizione e influenzare proteine target che regolano le funzioni cellulari come ad esempio la crescita cellulare e la differenziazione, ossidazione delle LDL plasmatiche, inattivazione delle funzioni dell' NO e stimolare l'espressione di chinasi e citochine pro-infiammatorie.

L'organismo ha tuttavia sviluppato un elaborato meccanismo di difesa nei confronti di questi prodotti secondari del suo metabolismo ed ha cercato anche di utilizzarli nei processi fisiologici al fine di assicurarsi la sopravvivenza (Calò LA,1999).

Negli eucarioti si sono sviluppati, infatti, meccanismi anti-ossidanti enzimatici, e non, deputati alla difesa della cellula contro gli effetti deleteri dati dalle ROS.

Vari studi hanno dimostrato che lo stress ossidativo, inoltre, induce l'espressione di alcuni specifici enzimi, tra cui le Heat Shock Protein (HSP) e l'eme ossigenasi-1 (HO-1).

L'incremento nella produzione di ossidanti, la riduzione della biodisponibilità di NO e la ridotta capacità delle difese anti-ossidanti giocano un'importante ruolo nello sviluppo di malattie cardiovascolari, quali ipertensione, aterosclerosi, diabete e ipertrofia cardiaca (Majzunova M et al, 2013).

3.1 Radicali liberi e le loro fonti

I radicali liberi e le altre specie reattive dell'ossigeno sono molecole che contengono un elettrone spaiato nell'orbitale esterno. Essi si formano durante la riduzione incompleta dell'ossigeno molecolare quando l'ossigeno accetta un solo elettrone. Tale conformazione è energeticamente instabile per cui le molecole che si formano risultano altamente reattive inducendo reazioni ossidative a catena.

A seconda della composizione chimica i radicali ossidanti vengono distinti in due grandi categorie: le specie radicali dell'ossigeno (ROS) e le specie radicali dell'azoto (RNS).

Anione superossido (O_2^-), perossido di idrogeno (H_2O_2), radicale ossidrile (OH^-) e acido ipocoloroso ($HOCl$) sono le principali molecole che costituiscono la classe di ROS (Descamps-Latscha B et al, 2001). La classe dei RNS, invece, è costituita principalmente di NO e la specie radicale che si forma per ossidazione di NO, il perossinitrito ($ONOO^-$) (Davis KL, 2001).

L' O_2^- è il primo composto intermedio della riduzione dell'ossigeno e rappresenta la forma predominante delle ROS; un eccesso di produzione di O_2^- può indurre la formazione di composti altamente reattivi e tossici come il radicale idrossilico ($OH\cdot$) ed il perossinitrito ($ONOO^-$). A parte l'azione lesiva di quest'ultimo composto, il processo porta ad una riduzione netta dell' NO disponibile, ostacolandone l'azione vasodilatatrice, inibitrice della proliferazione delle cellule muscolari lisce, l'inibizione dell'aggregazione piastrinica e l'attività ipotensiva.

L' H_2O_2 si forma per dismutazione del superossido, reazione che si può verificare spontaneamente o per catalisi ad opera dell'enzima superossido dismutasi (SOD). Di per sé, essa non risulta molto reattiva, ma in vivo può diffondere attraverso le membrane biologiche e generare il radicale idrossilico $OH\cdot$ altamente reattivo, ossidante e tossico ma con un'emivita molto breve e una ridotta capacità di diffondere (Calò LA, 1999).

Le fonti di radicali liberi e ROS sono varie e possono essere il prodotto secondario di alcune reazioni metaboliche cellulari oppure dovute all'azione di enzimi specifici che li sintetizzano attivamente. Del primo caso fa parte la catena di trasporto degli elettroni attraverso le creste mitocondriali, mediata dalle fosforilazioni ossidative, durante la quale l'1-2% degli elettroni sfugge portando alla formazione di O_2^- (Descamps-Latscha B et al, 2001) (Finkel T et al, 2000) (Kamata H et al, 1999). Del secondo caso, sono prodotti intermedi di reazioni, mediate da enzimi specifici come l'NADPH ossidasi, la xantina ossidasi, la lipoossigenasi, la cicloossigenasi e la citocromo p450 ossigenasi (Fig. 3.1) in risposta a vari stimoli, quali i mediatori proinfiammatori (IL-1), il fattore di necrosi tumorale (TNF), il fattore di attivazione delle piastrine (PAF), i batteri, le endotossine (Morena et al, 2001).

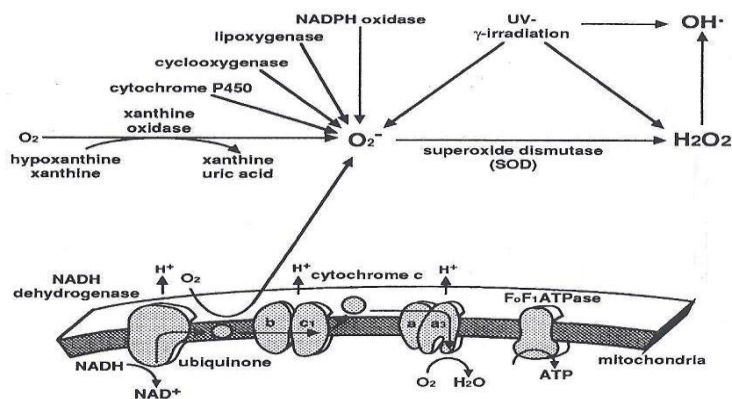
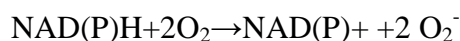


Figura 3.1: produzione secondaria di anione superossido (Kamata H et al, 1999)

3.1.1 Sistema NADH/NADPH ossidasi

Il delicato bilancio tra stato ossidativo e riduttivo (redox) è mantenuto da una serie di enzimi e molecole pro-ossidanti ed anti-ossidanti. Tra questi, assume particolare attenzione, l'NADPH ossidasi, enzima associato alle membrane plasmatiche (Babior BM et al, 1999). L'enzima NADH/NADPH ossidasi si è rivelato infatti essere una fonte molto importante di O_2^- (Griendling KK et al, 2000).

La NADPH ossidasi, infatti, catalizza la produzione di anione superossido, attraverso la riduzione dell'ossigeno, sfruttando l' NADPH quale donatore dell'elettrone:



L'anione superossido, prodotto da questa reazione, determina la produzione di altri ossidanti reattivi, inclusi i radicali liberi. Tali ossidanti, nella loro azione fisiologica, sono sfruttati dai fagociti, per uccidere i microorganismi esogeni, ma sono anche la causa di danno ai tessuti vicini, onde per cui la loro regolazione viene rigidamente controllata.

Il nucleo enzimatico di NADH/NADPH ossidasi comprende cinque componenti: $p40^{phox}$, $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p22^{phox}$ e $gp91^{phox}$. Nelle cellule a riposo, $p40^{phox}$, $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, formano un complesso nel citoplasma. Le altre due, $p22^{phox}$ e $gp91^{phox}$, sono localizzate nelle membrane delle vescicole secretorie e di granuli specifici, e costituiscono il centro di ossido-riduzione eterodimerico, conosciuto come il flavocitocromo b_{558} .

$p22^{phox}$ è essenziale per l'assemblaggio e l'attivazione dell' NADPH ossidasi ed è responsabile della maggior produzione di anione superossido (Cahilly C et al, 2000, Griendling KK et al, 2000).

La separazione dei due gruppi, citoplasmatico e quello di membrana, con i rispettivi componenti, fa sì che l'ossidasi rimanga inattivata. Quando però le cellule vengono esposte ad uno dei numerosi stimoli, la componente $p47^{phox}$ viene fosforilata e l'intero complesso citosolico migra dal citoplasma, verso la membrana, dove si unisce al citocromo b_{558} per assemblare l'ossidasi attiva. L'ossidasi così assemblata e attivata può trasferire elettroni dal substrato all'ossigeno (Sirker A et al, 2007). [fig. 3.2].

L'attivazione del sistema richiede però anche la co-partecipazione di altre due proteine che legano i nucleotidi guanidinici: Rac 2, proteina G monomerica a basso peso molecolare, presente nel citosol, e inattiva quando si trova associata in un complesso dimerico con Rho-GDI (*Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor*), e Rap1 A, proteina G monomerica a basso peso molecolare, associata alla membrana.

Nella fase di attivazione, Rac 2 lega il GTP e migra verso la membrana con il complesso presente nel citosol; nello stesso istante il citocromo b₅₅₈ e il Rap1 A si distribuiscono sulla superficie cellulare, grazie alla fusione delle membrane delle vescicole secretorie e successivamente grazie alla fusione delle membrane di granuli specifici con la membrana plasmatica della cellula. Questo processo di fusione attiva il rilascio del contenuto degli organelli, verso l'ambiente esterno (Sirker A et al, 2007).

Quando si attiva la fagocitosi, la membrana plasmatica viene inglobata come parete delle vescicole fagocitarie, in questo modo quella che prima era la parete esterna della membrana, ora diventa la parete interna della vescicola. Da questa posizione l'enzima riversa O₂⁻ nella vescicola e la rapida conversione di questo anione nei prodotti successivi invade l'ambiente interno con tutta una serie di agenti ossidanti letali. In tale contesto la subunità p22^{phox} risulta essere un componente critico della generazione di anioni superossido (Masuko UF et al, 1996; Sirker A et al, 2007).

Il sistema NADH/NADPH ossidasi svolge un ruolo importante anche a livello del sistema vascolare ed endoteliale dove l'NADPH ossidasi agisce come fonte primaria di ROS ed è particolarmente importante nella patofisiologia dell'ipertensione. L'aumentata produzione di ROS via NADPH ossidasi è attivata da agenti vasocostrittori, in questo caso Ang II, che legandosi al suo recettore AT1R causa aumento della produzione di specie reattive all'ossigeno (Majzunova M et al, 2013) con incremento dello stato ossidativo cellulare.

Griendling KK e collaboratori (1994), hanno dimostrato che l'infusione di Ang II, in ratti normo-ipotesi, stimola la produzione di O₂⁻, via NADPH ossidasi, e induce risposte pressorie (Griendling KK et al, 1994).

Ulteriori studi hanno dimostrato che in topi a cui veniva somministrata Ang II e trattati con siRNA per p22^{phox}, presentavano una ridotta attività di NADPH ossidasi, con conseguente diminuzione nella produzione di ROS, e attenuazione

della pressione arteriosa, suggerendo quindi che tale subunità è importante per lo sviluppo di stress ossidativo e ipertensione (Modlinger P et al, 2006).

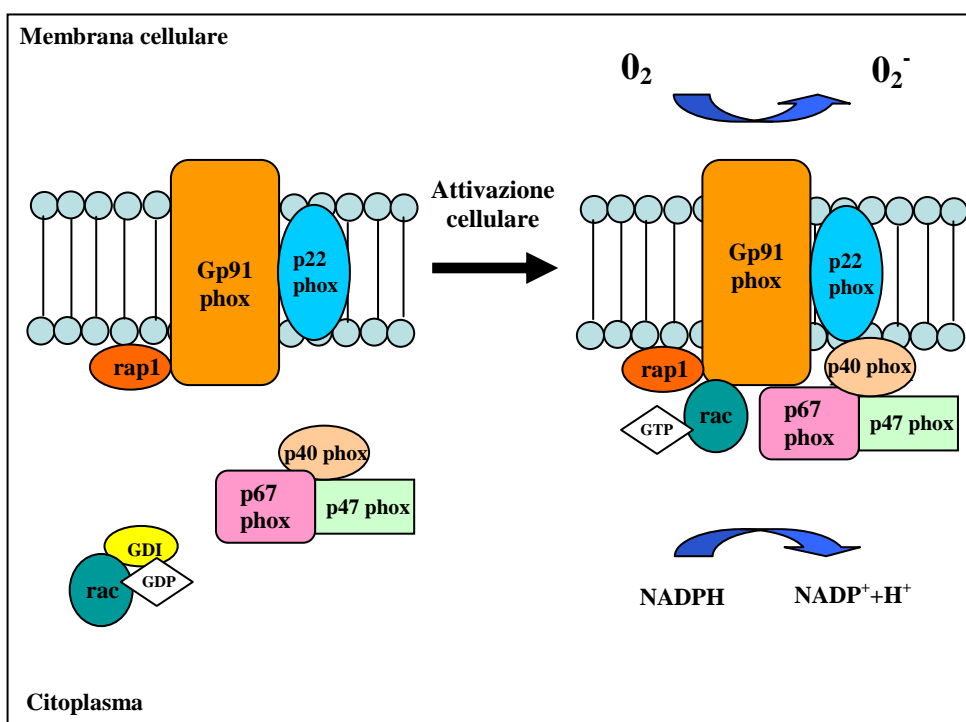


Figura 3.2: Modello di attivazione della NADPH ossidasi leucocitaria e suo assemblaggio

3.2 Sistemi antiossidanti

Nell'organismo sono presenti diversi sistemi di difesa, enzimatici e non enzimatici, deputati alla difesa contro gli effetti date dalle ROS. Le difese non enzimatiche comprendono le vitamine (ad esempio vitamina C e D), il glutanione, la bilirubina, albumina, la ceruloplasmina e la transferrina-lactoferrina (Choi AMK et al. 1996). In particolare in quest'ultime tre proteine l'attività antiossidante è dovuta al sequestro degli ioni metallici di transizione coinvolti nella formazione della maggior parte delle specie radicaliche (Deschamps-Latscha et al, 2001). Gli enzimi anti-ossidanti quali super-ossido dismutasi (SOD), glutanione perossidasi (GP) e la catalasi (CAT), detossificano le ROS per proteggere l'organismo dai loro effetti deleteri. Ad esempio la SOD, metalloproteina presente in tutte le cellule vascolari, detossifica l'anione superossido, mentre la CAT (antiossidante localizzato nei perissosomi cellulari)

converte H_2O_2 in H_2O e O_2^- . La GP gioca un ruolo fondamentale nella riduzione dell' H_2O_2 e dei lipidi perossidi in acqua e alcoli lipidici.

Studi effettuati in modelli *in vitro* ed *in vivo*, sono stati fatti per studiare a livello molecolare le risposte allo stress ossidativo con lo scopo di migliorare le conoscenze sui meccanismi che stanno alla base della fisiopatologia delle numerose malattie in cui esso è implicato.

In cellule in coltura, la presenza di sostanze ossidanti determina l'induzione dei geni codificanti per enzimi antiossidanti tra cui MnSOD, CuZnSOD, e CAT. La funzione principale di tali enzimi consiste nell'agire da scavenger nei confronti delle ROS ed aiutare così la cellula ad attenuare lo stato proossidante per mantenere la normale omeostasi cellulare (Choi AMK et al, 1996).

Esistono diversi studi in cui è stato dimostrato che lo stress ossidativo induce l'espressione di alcuni particolari enzimi, tra cui le Heat Shock Protein (HSP) e l'eme ossigenasi-1 (HO-1).

3.2.1 Il sistema dell'eme ossigenasi

Il sistema dell'eme ossigenasi (HO) è composto da tre isoforme: la proteina HO-1 (anche nota come HSP 32), inducibile dallo stress ossidativo, e di due isoforme costitutive: HO-2, stimolata maggiormente da corticosteroidi e di HO-3, quest'ultima isolata dal cervello di ratto e di scarso interesse biochimico (Nath KA, 2006).

Nonostante HO-1 e HO-2 catalizzino la stessa reazione biochimica, ci sono fondamentali differenze tra le due isoforme sia per quanto riguarda l'origine genetica, la struttura primaria, il peso molecolare, (Wagener FA et al, 2003) sia per la regolazione e la distribuzione tissutale (Maines MD, 1997).

Tuttavia entrambe catalizzano la degradazione dell'eme mediante la rottura del ponte alfa-metenico della molecola dell'eme per dare quantità equimolari di biliverdina, monossido di carbonio (CO, un importante secondo messaggero) e ferro (cofattore essenziale di molti enzimi cellulari e proteine riducenti) [Fig. 3.3]. Successivamente la biliverdina viene convertita, dalla biliverdina reduttasi, in bilirubina, che viene poi coniugata con l'acido glucuronico ed escreta.

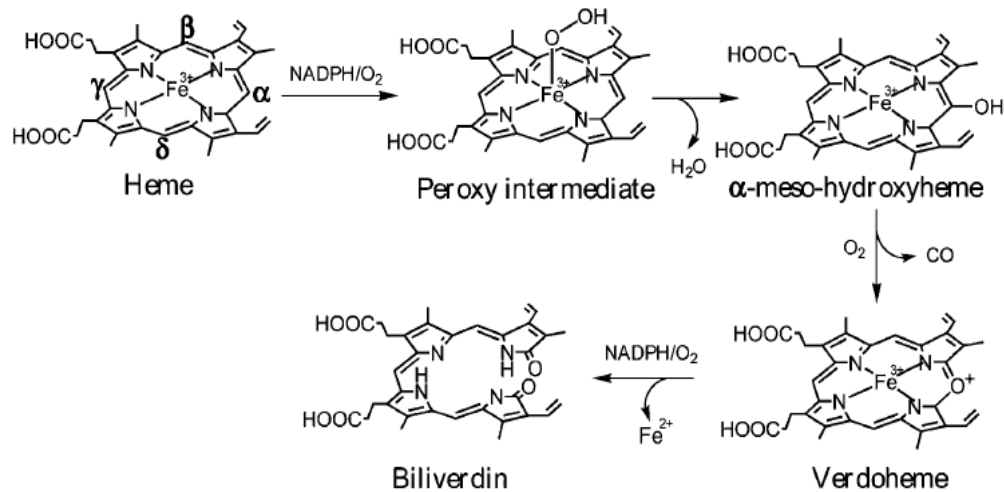


Figura 3.3: Reazione catalitica dell'eme ossigenasi-1; esso catalizza la conversione dell'eme a biliverdina, rilasciando ferro²⁺ e CO; la biliverdina riduttasi successivamente catalizza la conversione della biliverdina a bilirubina (Lad et al, 2003).

Aumentati livelli di HO-1 correlano con una maggiore difesa antiossidante grazie alla conversione di un substrato proossidante, l'eme, in un potente antiossidante, la bilirubina (Borger DR et al, 1998). E' ormai noto che la bilirubina presenta potenti proprietà antiossidanti e citoprotettive.

L'eme rappresenta il principale induttore di HO-1, anche se differenti studi hanno dimostrato che l'attività di HO (più tardi attribuita all'HO-1), può essere stimolata da altri prodotti non-eme, come metalli pesanti, endotossine ed ormoni (Choi AMK et al, 1996). Tra gli induttori di HO-1, ci sono il sodio arsenito, il H₂O₂, le radiazioni ultraviolette, l'ipertermia, l'ipossia, e i reagenti sulfidrilici.

La caratteristica comune tra gli induttori di HO-1, incluso l'eme, è la capacità di facilitare la produzione di ROS e/o modificare i livelli di glutanione (potente antiossidante). L'osservazione che la bilirubina, uno dei prodotti finali del catabolismo dell'eme, funziona come antiossidante, ha portato all'ipotesi che l'HO-1 sia parte di una risposta generale allo stress ossidativo, e che in tali condizioni questo enzima giochi un ruolo protettivo.

Inoltre il monossido di carbonio (CO), prodotto dalla degradazione enzimatica dell'eme, ha spiccate proprietà anti-infiammatorie, in quanto sopprime citochine e chemochine pro-infiammatorie, come tumor necrosis factor-alfa (TNF-α), interleuchina 1-beta (IL-β), interleuchina-6 (IL-6), monocyte chemoattractant

protein-1 (MCP-1) (Otterbein LE et al, 2003; Minamino T et al, 2001) e incrementa l'espressione della citochina anti-infiammatoria interleuchina-10 (IL-10) (Lee TS et al, 2002). Inoltre il CO può attivare la guanil-ciclastasi e regolare così i livelli di cGMP, che causa rilassamento della muscolatura liscia e inibizione dell'aggregazione piastrinica (Morita T et al, 1995). Mimando le funzioni dell'ossido nitrico, il CO potrebbe funzionare come un messaggero cellulare e regolare il tono vascolare.

Queste osservazioni suggeriscono che l'enzima possa giocare un ruolo importante nel mantenimento dell'omeostasi cellulare in risposta allo stress ossidativo (Ryter SW et al, 2007).

Già dal 1989 l'induzione dell'HO-1 è stata oggetto di studio per quanto riguarda la sua azione citoprotettiva, cioè da quando HO è stata identificata come una proteina di 32 KDa indotta nelle cellule danneggiate. Per spiegare l'induzione di HO-1, si è ipotizzato che esso attivi una risposta antiossidante protettiva che rende capaci le cellule, non solo di rimuovere l'eme, proossidante, ma anche di rimpiazzarlo con la bilirubina, potente antiossidante (Nath KA, 2006).

Il preciso meccanismo con cui l'HO-1 conferisce protezione contro lo stress cellulare è ancora non completamente chiarito. Come detto precedentemente i prodotti generati dalla degradazione dell'eme, da parte di HO-1, ci potrebbero fornire alcuni suggerimenti. Il catabolismo dell'eme produce il CO che modula le vie intracellulari di trasduzione del segnale determinando effetti antiossidanti, antiinfiammatori, antiproliferativi e vasodilatatori.

Similmente ad NO, il CO incrementa i livelli intracellulari di cGMP mediante l'attivazione della guanilato ciclastasi. Tra le altre risposte fisiologiche, l'aumento di cGMP causa rilassamento della muscolatura liscia e inibizione dell'aggregazione piastrinica. L'effetto vasodilatatore del CO potrebbe essere critico nel mantenimento di un'adeguata ossigenazione e perfusione tissutale durante il danno acuto generato dagli stimoli dello stress ossidativo. Ci sono studi che dimostrano, che il CO prodotto via HO-1 da cellule muscolari lisce esercita effetti paracrini sulle cellule endoteliali poiché aumenta il cGMP endoteliale e diminuisce l'espressione di mitogeni quali l'endotelina-1 e il PDGF (Ryter SW et al, 2007). Inoltre, il CO può contribuire al mantenimento dell'integrità delle pareti vascolari bloccando direttamente l'apoptosi cellulare, inibendo il rilascio delle citochine infiammatorie pro-apoptotiche dalla parete dei vasi, agendo sui canali

del potassio o inibendo l'aggregazione piastrinica e il citocromo p450 (Durante W, 2002; Ryter SW et al, 2007). Perciò il CO, via HO-1, potrebbe anche modulare le interazioni intercellulari e la proliferazione cellulare nelle pareti vasali dopo stress di varia natura, mantenendo l'omeostasi cardiovascolare (Ohta K et al, 2004; Ryter SW et al, 2007).

Un ulteriore prodotto ottenuto dalla degradazione dell'eme è la bilirubina, un potente antiossidante. In vitro si è visto che la bilirubina è in grado di intrappolare i radicali perossidici tanto efficacemente quanto l'alfa-tocoferolo che è considerato il più potente antiossidante della perossidazione lipidica. Si è visto inoltre che l'aggiunta diretta di bilirubina al terreno di coltura è in grado di proteggere le cellule endoteliali e altri tipi di cellule da fattori ossidanti e dalla citotossicità indotta *in vitro* (Clark JE et al, 2000; Baranano DE et al, 2002).

Inoltre il ferro rilasciato dalla degradazione dell'eme, può promuovere la sintesi di ferritina, un potente agente citoprotettivo, che agisce sequestrandolo. Ci sono infatti prove che gli effetti deleteri delle ROS dipendano dalla presenza di questo metallo. Il pool intracellulare di ferro libero può reagire sia con l' H_2O_2 che con l'anione superossido, dando origine al radicale idrossilico, molecola estremamente tossica. Poiché la catalisi dell'eme da parte dell'HO rilascia ferro libero, la ferritina potrebbe essere indotta dal rilascio del ferro e servire come una riserva per impedire allo stesso di partecipare alla reazione di formazione dei radicali tossici.

È stato dimostrato *in vitro* sia in cellule endoteliali che in cellule muscolari lisce di ratto che la bilirubina inibisce la produzione di radicali perossido da parte dell'NADH/NADPH ossidasi in seguito a stimolazione con Ang II. Questa azione diretta potrebbe essere dovuta ad un'azione della bilirubina che interferisce con l'assemblaggio dell'enzima NADPH ossidasi, e successiva attivazione (Datla SR et al, 2007). In molti studi *in vivo*, gli aumentati livelli di bilirubina sierica sono stati correlati con protezione vascolare e resistenza allo stress ossidativo (Ryter SW et al, 2007).

L'HO-1 viene indotta in molte patologie e nel danno di vari organi, in particolare quelli dell'apparato cardiovascolare, ed è stato dimostrato che la produzione di questa isoforma è protettiva verso gli effetti deleteri del danno indotto da stress ossidativo (Datla SR et al, 2007).

L'induzione dell'HO-1 in condizioni di stress ossidativo per la cellula, indica che la citoprotezione mediata dall'espressione dell'HO-1 oltre ad altri geni considerati protettivi e/o antiapoptotici, può rappresentare un meccanismo generale di difesa della cellula in risposta a stimoli nocivi (Nath KA, 2006). L'espressione dell'isoforma HO-1 quindi risulta strettamente regolata dalle condizioni correlate allo stress ossidativo che alterano il bilancio ossido-riduttivo della cellula.

3.3 Effetti dello stress ossidativo su componenti e funzioni cellulari

Gli effetti principali dei radicali liberi in generale e delle ROS in particolare consistono essenzialmente nella distruzione dell'equilibrio esistente all'interno dei sistemi biologici danneggiando molecole di importanza primaria per le funzioni cellulari come le proteine, il DNA e i lipidi, fino a portare la cellula a morte (Calò LA, 1999).

Gli acidi grassi polinsaturi e le lipoproteine sono particolarmente suscettibili all'azione ossidativa dei radicali liberi e delle ROS che inducono perossidazione lipidica, dovuta molto spesso alla formazione di radicali idrossilici ad opera della reazione con metallo-ioni come il ferro o il rame (Aust SD et al, 1985). Ne deriva un danno rilevante alla membrana cellulare particolarmente ricca di lipidi e una compromissione delle funzioni di membrana. Mediante l'ossidazione delle LDL, le ROS facilitano la loro cattura da parte dei macrofagi attraverso il recettore CD36, portando alla formazione di cellule schiumose, evento chiave nello sviluppo di placche aterosclerotiche (Aslam S, 2008; Silverstein RL, 2009). Le LDL ossidate sono inoltre implicate in altri meccanismi potenzialmente coinvolti nello sviluppo dell'aterosclerosi, come ad esempio azioni chemiotattiche o citotossiche nei riguardi dei monociti e inibizione della motilità dei macrofagi. La conseguente attivazione dell'endotelio porta al rilascio di citochine proinfiammatorie e di recettori di superficie.

Le proteine che subiscono l'attacco ossidativo si possono frammentare e/o reagire e/o aggregare. Ne derivano anomalie della funzione di canali ionici, di recettori cellulari posti a livello della membrana cellulare, alterazioni delle fosforilazioni ed una generale alterazione delle strutture proteiche e lipidiche associate alla membrana cellulare, che compromette in definitiva le funzioni della cellula interessata.

Il danno a carico del DNA può indurre distruzione di basi ed interruzioni della doppia elica, mutagenesi, carcinogenesi e morte cellulare (Birboim HC et al, 1987; Aruoma OI et al, 1989).

I radicali liberi e gli altri ossidanti, possono anche indurre la crescita cellulare grazie all'inattivazione del monossido di azoto di origine endoteliale (NO), nota sostanza vasodilatatrice ed antiproliferativa. Si favoriscono così risposte tissutali come l'ipertrofia e l'iperplasia delle cellule muscolari lisce vascolari, [fig. 3.4], il cui significato patologico e prognostico nell'evoluzione dell'aterosclerosi è ben noto. L'incremento dello stress ossidativo, infatti, risulta associato a quasi tutti i fattori di rischio dell'aterosclerosi e delle sue complicanze come l'ipercolesterolemia, l'ipertensione arteriosa, il diabete mellito, il fumo di sigaretta, il deficit di estrogeni nella donna, l'iperomocisteinemia (Griendling KK et al, 1997; Harrison D et al, 2003).

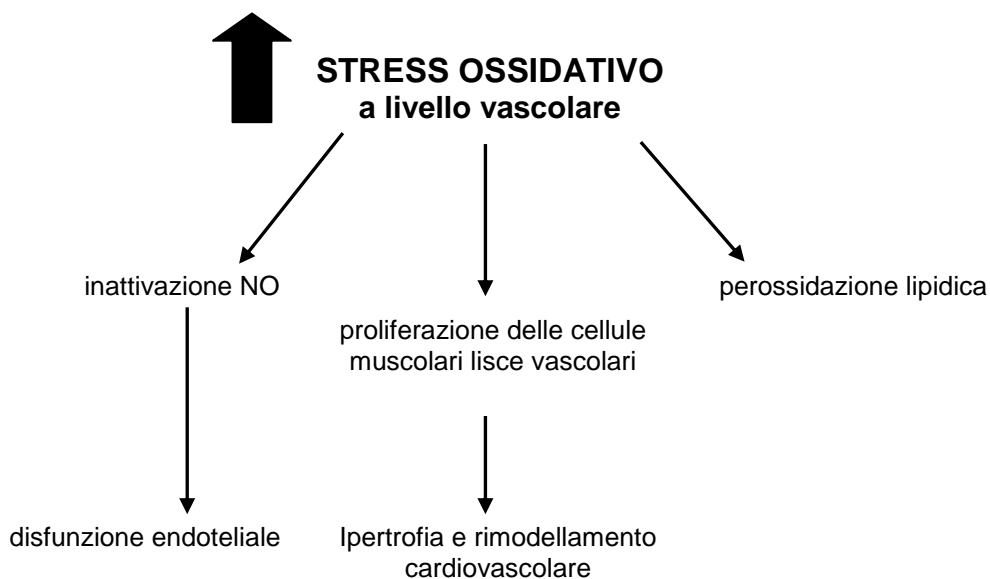


Figura 3.4: Principali conseguenze dello stress ossidativo a livello vascolare.

3.3.1 Mitogen activated protein kinase (MAPK)

Le MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) sono una famiglia di serin-treonin chinasi espresse in tutte le cellule eucariotiche, coinvolte nella traduzione di stimoli extracellulari in risposte intracellulari.

Le MAPK sono attivate per fosforilazione in seguito a diversi stimoli extracellulari (citochine, fattori di crescita e neurotrasmettitori) o in seguito all'adattamento nei confronti di condizioni di stress ambientale (irradiazioni da raggi ultravioletti, shock termico, antiossidanti, inibitori di sintesi proteica o cambio di osmolarità di membrana) (Robinson MJ et al, 1997).

Anche lo S.O è importante perché induce l'attivazione delle MAPK pathways (Torres M et al, 2003).

Vengono attivate rapidamente attraverso una cascata enzimatica costituita da un modulo di tre chinasi sequenziali (Raman M et al, 2007):

1. MKKK (Map Kinase Kinase Kinase);
2. MKK (Map Kinase Kinase) o MEK;
3. MAPK.

Le MAPK più importanti sono:

- p38 e JNK/SAPK (JUN NH₂-terminal Kinase/Stress-Activated Protein Kinase): sono proteine presenti in diversi tipi cellulari, implicate nelle risposte nei confronti di condizioni di stress ambientale, infiammazione e apoptosi. I membri di entrambe le famiglie sono attivati dai liposaccaridi, dalle citochine proinfiammatorie, dal TNF- α (Tumor Necrosis Factor), dai raggi UV e dai farmaci chemioterapici antitumorali.
- ERK (extracellular signal-regulated kinase): è la MAPK maggiormente coinvolta nel differenziamento e nella proliferazione cellulare. ERK1 e ERK2, due isoforme ubiquitariamente espresse, stimulate da fattori di crescita o agenti differenziativi, sono capaci di determinare l'attivazione di fattori di trascrizione e di altre proteine chinasi;

Queste vie di traduzione del segnale sono coinvolte in numerosi processi cellulari, tra cui la regolazione della proliferazione cellulare, la differenziazione, la risposta allo stress ossidativo, la trasformazione e la morte cellulare, oltre che nella vasocostrizione e nel rimodellamento cardiovascolare (Haangenson KK et al, 2010).

In particolare le chinasi ERK 1/2 (extracellular Regulated Kinase) sono importanti chinasi, della famiglia MAPK, coinvolte nella crescita e nel differenziamento cellulare, in diversi tipi cellulari.

Le due isoforme ERK1 e ERK2, definite come ERK, hanno peso molecolare rispettivamente di 44 e 42 kDa, e si attivano in seguito a differenti stimoli che convergono sulle proteine G, di cui fa parte la proteina Ras. Quest'ultima viene attivata in seguito al suo legame con il GTP. Il complesso Ras-GTP è sotto controllo dei GEF (Guanosine Exchange Factors) che catalizzano lo scambio del GDP con GTP su Ras, e conseguente stimolazione del Ras, e dei fattori attivanti l'attività GTPasica di Ras (GAP), che causano la trasformazione del Ras-GTP in Ras-GDP, riducendo di conseguenza l'attivazione del Ras.

L'attivazione del Ras causa un'attivazione a cascata di varie chinasi, iniziando con la chinasi RAF, che a sua volta si attiva e fosforila residui di serina o treonina della chinasi MEK 1/2, una chinasi a doppia specificità, la quale si attiva e a sua volta fosforila sia residui di tirosina che di treonina di ERK 1/2. L'attivazione di ERK 1/2 da parte di MEK è specifica, essendo ERK 1/2 l'unico substrato conosciuto di MEK (Thomas GM et al, 2004).

L'attivazione della MAPK comporta successivamente una sua traslocazione dal citosol al nucleo, dove causa fosforilazione di diversi substrati, tra cui anche fattori di trascrizione responsabili della produzione di mRNA codificanti per proteine coinvolte nella replicazione cellulare.

La via di trasduzione del segnale mediata dalla ERK 1/2, causa un aumento della sopravvivenza cellulare grazie ad un meccanismo che comprende la modifica post-trasduzionale, l'inattivazione di componenti della via della morte cellulare programmata e l'aumento di trascrizione di geni coinvolti nella sopravvivenza cellulare.

L'ERK 1/2 è un potente target a valle dell'AT1R che media fattori di trascrizione coinvolti nel rimodellamento cardiovascolare, in quanto è in grado di agire sulla crescita, sull'adesione, sulla differenziazione e migrazione delle cellule vascolari,

oltre che sulla fibrosi, traducendo il segnale dalla membrana al nucleo (Mehta PK et al, 2007; Papparella I et al, 2005). Questa attivazione sembra essere mediata dalle ROS. Una maggiore responsività della ERK 1/2 è stata osservata nei pazienti ipertesi in conseguenza ad un aumentato livello di stress ossidativo (Semplicini A et al, 2006).

Il segnale a lungo termine dell'Ang II, via AT1R, e lo stress ossidativo ad esso correlato, sono infatti dei meccanismi che portano all'instaurarsi e all'evolversi del processo di rimodellamento cardiovascolare, che nel tempo possono portare allo sviluppo e alla progressione dell'aterosclerosi, oltre che a danno d'organo.

CAPITOLO 4

DISFUNZIONE ENDOTELIALE

4.1 L'endotelio e le sue funzioni

L'endotelio, lo strato di cellule endoteliali che riveste la superficie luminale dei vasi sanguigni (oltre che quella dei vasi linfatici e del cuore), è considerato il più grande organo autocrino e paracrino dell'organismo. Agisce come una barriera funzionale e strutturale tra il sangue e la parete del vaso, previene l'adesione e l'aggregazione delle piastrine e dei leucociti, controlla la filtrazione e la permeabilità dei fluidi (ormoni, elettroliti), e modula il flusso sanguigno. La normale funzione dell'endotelio dipende strettamente dalla sua integrità anatomica e funzionale (Vane JR et al, 1990).

L'endotelio, svolge un'importante ruolo nella regolazione cardiovascolare; modula il tono vascolare bilanciando la produzione di vasodilatatori (come Monossido d'Azoto, NO) e vasocostrittori (come endotelina-1, ET-1) in risposta ad una varietà di stimoli nervosi, umorali o meccanici (Furchgott RF et al, 1980). Inoltre presenta azione anti-proliferativa e anti-infiammatoria e regola la fibrinolisi e il processo di coagulazione, mantenendo l'equilibrio tra la produzione di fattori anticoagulanti (tissue Plasminogen Activator (tPA), trombomodulina, etc.) e procoagulanti (tissue Factor, (TF)), von Willebrand factor (vWF) etc., mantenendo così le proprietà emostatiche dei vasi sanguigni (Libby P et al, 2006). L'NO, importante mediatore della normale funzione vascolare, è rilasciato dall'endotelio e diffonde all'interno della parete vasale, causando dilatazione e inibizione della proliferazione delle cellule muscolari lisce, rilassamento delle miofibrille, in risposta agli stimoli che agiscono su specifici recettori situati sulla membrana delle cellule endoteliali. Gli stimoli comprendono diverse sostanze endogene, quali l'acetilcolina, la bradichinina, la sostanza P, l'istamina e la serotonina, oltre che all'ischemia e stimoli meccanici, come lo shear stress (Vallance P et al, 2001).

NO è sintetizzato dall'enzima ossido nitrico sintetasi endoteliale (eNOS), a partire dall'amminoacido L-arginina, attraverso reazioni che richiedono la presenza di alcuni fattori, quali la nicotinammide adenina dinucleotide fosfato (NADPH), la

flavin mononucleotide (FMN), la flavin adenina dinucleotide (FAD) (Daff S, 2010). Diffonde poi alle cellule muscolari lisce vasali e attiva la guanilato ciclasi (sGC) portando alla conversione di GTP in cGMP (guanosina 3',5-monofosfato ciclico), [fig. 4.1], che a sua volta causa rilasciamento delle cellule muscolari lisce, modificando le concentrazioni di Ca^{2+} , oltre ad avere effetti antiproliferativi (Marti CN et al, 2012) ed una potente attività anti-aggregante piastrinica (Radomski MW et al, 1987).

NO svolge un'importante ruolo nel mediare la funzione vasodilatatrice dell'endotelio, e una sua ridotta biodisponibilità è spesso usata come misura di funzione endoteliale (Celermajer DS et al, 1992; Corretti MC et al, 2002).

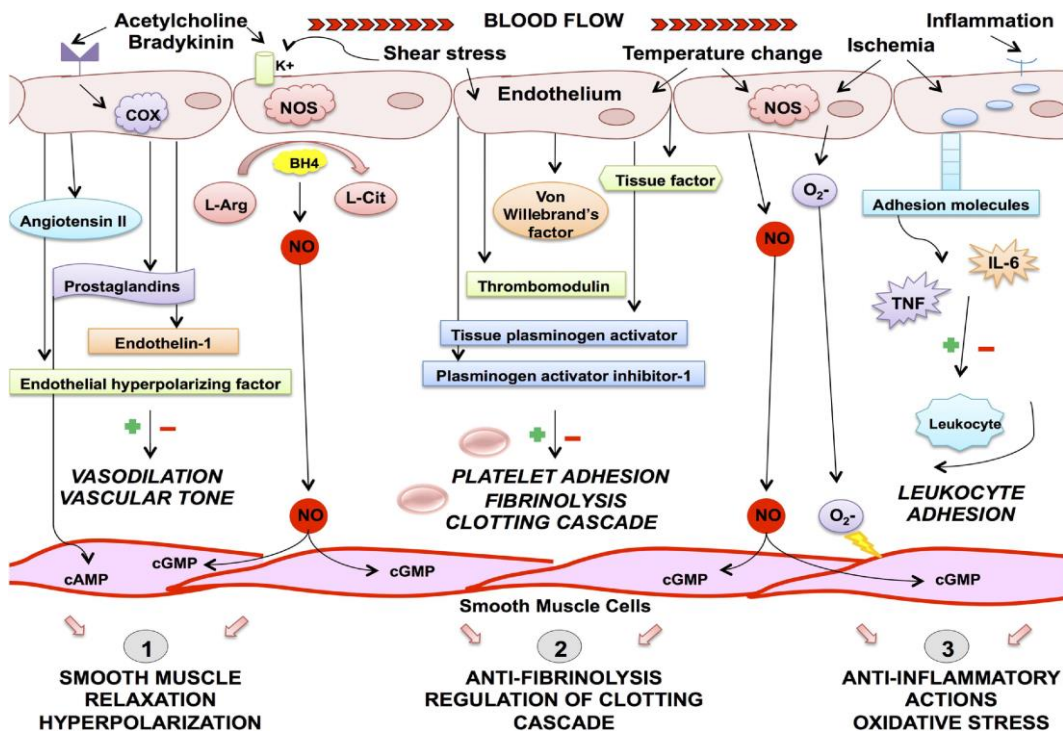


Figura 4.1: L'endotelio è responsabile di una serie di funzioni fisiologiche, tra cui: 1) regolazione del tono vascolare attraverso la produzione bilanciata di vasodilatatori e vasocostrittori, 2) controllo della fluidità del sangue e la coagulazione mediante la produzione di fattori che regolano l'attività piastrinica, la cascata di coagulazione, e il sistema fibrinolitico e 3) regolazione dei processi infiammatori attraverso l'espressione di citochine e molecole di adesione (Marti CN et al, 2012).

4.2 Disfunzione endoteliale

Per disfunzione endoteliale si intende un'alterazione della normale funzione endoteliale, che comporta la perdita di alcune caratteristiche strutturali e/o funzionali.

La disfunzione endoteliale si manifesta con l'aumento del tono vascolare, della proliferazione e migrazione delle cellule muscolari lisce, dell'aggregabilità piastrinica e dell'adesività leucocitaria, oltre che causare ossidazione delle LDL, tutti eventi che possono favorire la comparsa e la progressione delle lesioni aterosclerotiche. Le cellule endoteliali danneggiate possono andare incontro ad apoptosi, staccandosi dalla parete vascolare e lasciando un'area senza endotelio che costituisce una superficie altamente adesiva e trombotica (Hadi HA et al, 2005).

Essa è associata con la maggior parte dei fattori di rischio cardiovascolare, come l'ipertensione, il diabete, l'insufficienza renale cronica, l'insufficienza cardiaca (Rajendran P et al, 2013).

E' ampiamente accettato che il più importante meccanismo che porta a disfunzione endoteliale è la ridotta biodisponibilità di NO. Una sua riduzione può dipendere da un'alterata espressione/attività della eNOS, oppure da un eccesso di degradazione di NO, solitamente dovuto all'interazione con lo ione O_2^- , per formare perossinitriti ($ONOO^-$) (Beckman JS et al, 1996).

L'endotelio è infatti un'importante target per lo stress ossidativo (SO). Lo SO causa in particolar modo un aumento della permeabilità endoteliale vascolare, oltre che promuovere l'adesione leucocitaria, tutti fenomeni che poi si traducono in un aumento dello stato infiammatorio (Lum H et al, 2001).

I radicali liberi, infatti, possono deturpare l'equilibrio di NO, danneggiare l'endotelio e causare un'eccessiva permeabilità, permettendo così alle tossine di passare all'interno dei tessuti del corpo (Rubanyi GM et al, 1986).

4.2.1 Disfunzione endoteliale nell'ipertensione arteriosa

La disfunzione endoteliale è strettamente correlato all'ipertensione arteriosa.

Nell'ipertensione arteriosa si osserva una ridotta produzione di fattori vasodilatatori endoteliali e/o una loro ridotta efficacia, oltre che un'aumentata produzione o maggior sensibilità agli agenti vasocostrittori.

In particolar modo, l'aumento nella produzione delle ROS, che si osserva nei soggetti con ipertensione essenziale, porta ad una ridotta biodisponibilità di NO (Taddei S et al, 1996). In accordo con quanto riportato da Taddei e collaboratori, è stato dimostrato che gli antiossidanti (Chen X et al, 2001) e l'uso di specifici farmaci quali Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor (ACEI's) o Angiotensin Receptor Blockers (ARB's) (Schiffrin EL et al, 2002) migliorano la funzione endoteliale, oltre che la vasodilatazione endotelio-dipendente. L'aumento dello stress ossidativo che si osserva nei soggetti ipertesi è dovuto principalmente all'incremento dei livelli di Ang II, un potente vasocostrittore e induttore di stress ossidativo, che attraverso il signalling via recettore AT1R è in grado di stimolare l'NADPH ossidasi a generare un aumento nella produzione delle ROS, causando danno all'endotelio, associato soprattutto all'aumento dello stato infiammatorio, oltre che all'incremento del tono vascolare (Touyz RM et al, 2002).

In queste condizioni si osserva un cambiamento del fenotipo endoteliale, verso uno stato pro-infiammatorio e pro-trombotico (Landmesser U et al, 2004), con aumento dell'espressione di molecole di adesione leucocitaria (es. VCAM-1), e citochine (es. MCP-1). Questi cambiamenti si associano con un aumento dell'adesione dei monociti e dell'infiltrazione attraverso la parete vascolare, oltre che alla deposizione lipidica. Tutto questo comporta, oltre a danno endoteliale, all'instaurarsi e al successivo sviluppo dell'aterosclerosi, cruciale per il rimodellamento cardiovascolare.

La riduzione di NO, è una delle principali cause di tale cambiamento fenotipico. Il ruolo antiaterogeno di NO è supportato da studi in modelli sperimentali di topo che sviluppano aterosclerosi, nei quali l'inibizione nella produzione di NO endoteliale accelera la formazione di lesioni a livello dell'aorta e delle arterie coronarie. Un meccanismo che diminuisce la biodisponibilità di NO è l'eccessiva produzione di anione superossido (Landmesser U et al, 2001). Inoltre, esperimenti *in vitro* hanno dimostrato che le LDL ossidate, importanti mediatori di aterogenesi,

inibiscono la produzione di NO (Eizawa Z et al, 1995), oltre che diminuire l'espressione e la funzione di eNOS (Chan H et al, 2003).

Sia i lipidi sia gli ossidanti, riducono la biodisponibilità di NO, attivando il pathway proinfiammatorio, mediato da NFκB. Inoltre, in risposta ai mediatori infiammatori che vengono rilasciati dai monociti attivati, le cellule endoteliali e quelle muscolari lisce secernono fattori di crescita che potenziano lo sviluppo dell'aterogenesi (Galley HF et al, 2004).

La disfunzione endoteliale causa inoltre instabilità della placca ateromatosa, con possibile rottura della placca, dovuto all'inefficiente funzione anti-aggregante, antitrombotica e fibrinolitica (Rajendran P et al, 2013).

4.3 Cellule Progenitrici endoteliali circolanti (EPC)

Le lesioni dell'endotelio vascolare sono normalmente riparate grazie alle cellule endoteliali mature che si trovano ai margini della lesione o derivanti da adiacenti diramazioni vascolari, e una volta rientrate nel ciclo cellulare, possono proliferare migrare verso l'area del danno, per ripristinare l'anatomia funzionale endoteliale e riottenere così un endotelio integro. Tuttavia questo processo è lento e inefficiente. Fisiologicamente, il ripristino anatomico e funzionale dell'endotelio avviene anche con il contributo delle cellule progenitrici endoteliali (EPC) circolanti (Reidy MA et al, 1981; Werner N et al, 2002).

Evidenze sperimentali dimostrano che queste cellule, di derivazione midollare, sono coinvolte nella riparazione del danno endoteliale e contribuiscono a riformare un endotelio integro e funzionale in corrispondenza del sito di lesione (Patti G et al, 2005).

Nel 1997 Asahara e collaboratori, hanno documentato la presenza nel circolo periferico di cellule che possono dare origine a cellule endoteliali in coltura. Queste sono state quindi chiamate cellule progenitrici endoteliali e rappresentano un sottogruppo di cellule pluripotenti staminali di origine midollare (Asahara T et al, 1997) [fig. 4.2].

Per definizione quindi le cellule EPC, sono cellule di derivazione midollare, circolano nel sangue periferico, proliferano e si differenziano in cellule endoteliali mature.

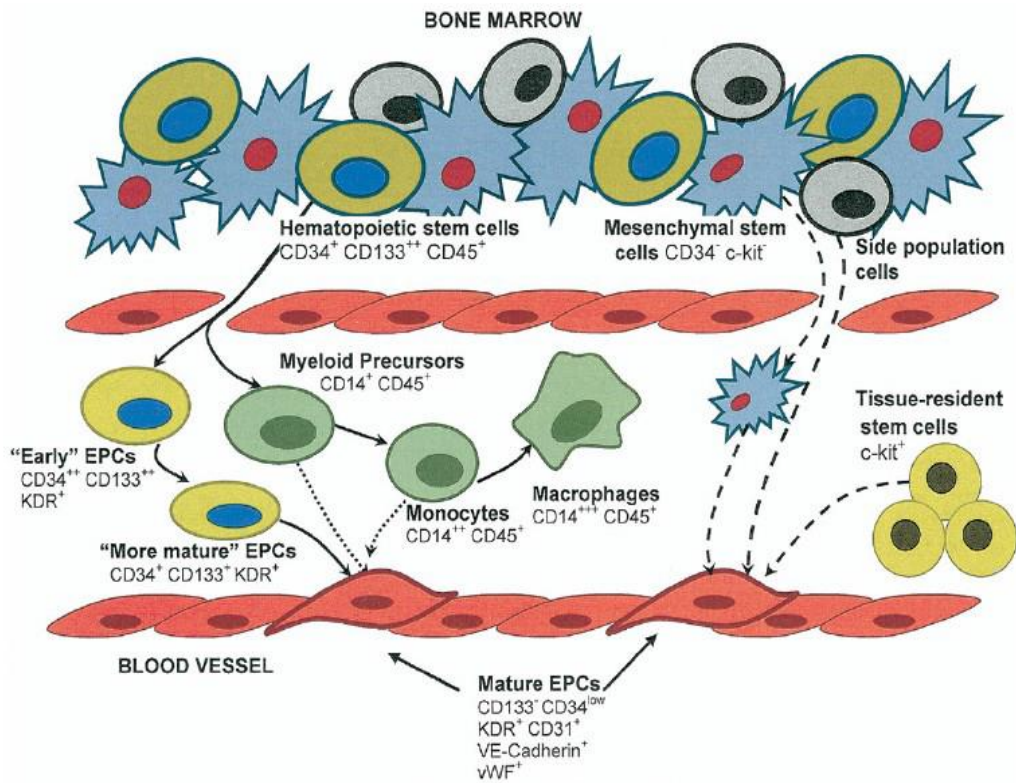


Figura 4.2: schema del processo di maturazione delle cellule EPC, esprimenti gli specifici antigeni di superficie.

Le EPC giocano un importante ruolo nel mantenimento della funzione endoteliale dei vasi sanguigni attraverso un continuo processo di re-endotelializzazione e neovascolarizzazione (Heiss C et al, 2005). [fig. 4.3].

Sono importanti nella rigenerazione dei vasi sanguigni danneggiati, oltre che avere funzione di neovascolarizzazione post-natale.

4.3.1 EPC e rigenerazione endoteliale

In passato la rigenerazione dell'endotelio danneggiato era attribuito alla sola migrazione e proliferazione di cellule endoteliali vicine. Studi più recenti hanno dimostrato come le EPC circolanti giocano un'importante ruolo nella riparazione e rigenerazione endoteliale.

Werner e collaboratori, oltre che ad altri gruppi di ricerca, hanno dimostrato come la trasfusione o l'intrinseca mobilitazione di EPC circolanti ripristinano l'endotelio, dopo denudazione endoteliale locale focalizzata, contribuendo inoltre ad una ridotta formazione della neointima (Werner N et al, 2002; Werner N et al, 2005; Walter DH et al, 2002). E' stato dimostrato inoltre che in un modello sperimentale di topo con danno all'endotelio indotto da iperlipidemia, la trasfusione di EPC ha portato al miglioramento della disfunzione endoteliale, dimostrando ancora una volta l'importante ruolo delle EPC nella ricostituzione dell'endotelio danneggiato. Inoltre, in modelli sperimentali di topo con lesioni aterosclerotiche, le cellule EPC si sono dimostrate abili a ridurre la formazione della placca aterosclerotica (Rauscher FM et al, 2003).

Il mantenimento, quindi, del monostrato endoteliale è importante nel prevenire le complicanze trombotiche e lo sviluppo di lesioni aterosclerotiche (Urbich C et al, 2004).

4.3.2 EPC e neovascolarizzazione

Un'altra importante funzione svolta dalle EPC circolanti è la neovascolarizzazione. E' un importante processo di recupero funzionale dell'endotelio da condizioni patologiche, quali ad esempio malattie ischemiche e/o la guarigione delle ferite (Lin CP et al, 2013).

Angiogenesi e vasculogenesi sono le due maggiori forme di neovascolarizzazione post-natale e svolgono un ruolo sinergico nel processo di rigenerazione endoteliale. L'angiogenesi è il processo di formazione di nuovi vasi sanguigni (circolo capillare) a partire da vasi già esistenti. Le EPC, infatti, producono svariate citochine pro-angiogeniche e fattori di crescita (effetto paracrino), che promuovono la proliferazione, la migrazione, oltre che la sopravvivenza, di cellule endoteliali mature vicino al sito del danno endoteliale, permettendo così l'angiogenesi e contribuendo alla rigenerazione e al ripristino dell'omeostasi tissutale.

La vasculogenesi è il processo che porta alla formazione e alla maturazione "de novo" di nuovi vasi sanguigni. Essa è in particolar modo caratterizzata dalla migrazione, proliferazione, differenziazione, e/o incorporazione delle EPC nel sistema vascolare in fase di rigenerazione.

La dimostrazione che le cellule derivate dal midollo osseo possono essere richiamate ai siti di danno vascolare dove contribuiscono alla rivascularizzazione di aree ischemiche, ed esprimono marker di origine endoteliale, ha spinto i ricercatori all'utilizzo, a scopo terapeutico, di queste cellule staminali ematopoietiche isolate o di EPC per stimolare la vasculogenesi (Urbich C et al, 2004). L'infusione di cellule isolate dal midollo osseo o coltivate ed espanse *ex vivo*, hanno dimostrato aumentare la densità capillare e la neovascolarizzazione di tessuti ischemici. In modelli animali di infarto miocardico, l'iniezione di EPC coltivate ed espanse *ex vivo* significativamente hanno migliorato il flusso sanguigno e la funzionalità cardiaca (Kawamoto A et al, 2001; Kocher AA et al, 2001). Similarmente, l'infusione di EPC derivate da cellule mononucleate del sangue periferico e coltivate *ex vivo*, in modelli sperimentali di topi nudi o ratti, con ischemia degli arti posteriori, hanno fornito una migliore neovascolarizzazione. Uno studio pilota su pazienti con infarto del miocardio, ha dimostrato che il trapianto di cellule progenitrici endoteliali ha significativamente incrementato il flusso coronarico e la funzionalità ventricolare sinistra (Assmus B et al, 2002).

Le EPC, quindi, sono indice di funzionalità ed integrità dell'endotelio, e svolgono un ruolo cruciale nel mantenimento del tono e della struttura vascolare (Reidy MA et al 1981; Werner N et al, 2002), oltre che dell'omeostasi vascolare, e sia il loro numero che la loro funzionalità possono essere influenzate dalla presenza di fattori di rischio cardiovascolari.

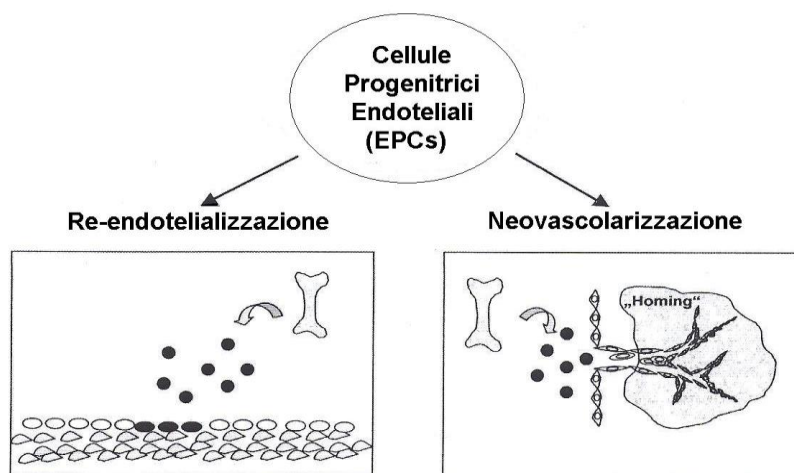


Figura 4.3: ruolo delle EPC nell'endotelio vascolare (Urbich C et al, 2004).

4.3.3 Fenotipo delle EPC

A tutt'oggi, gli unici strumenti disponibili per identificare le cellule staminali sono i marcatori di superficie, riconoscibili mediante anticorpi specifici, identificate tramite citofluorimetria di flusso (analisi immunofenotipica) o da saggi formanti-colonie in vitro. Utilizzando le diverse combinazioni di marcatori è possibile classificare, riconoscere ed isolare le differenti popolazioni cellulari. Tuttavia questo sistema soffre di importanti limitazioni, come il fatto che molti marcatori sono condivisi da numerosi tipi cellulari e si dimostrano, quindi, scarsamente specifici.

Le EPC rappresentano un sottogruppo di cellule pluripotenti staminali di origine midollare.

Per definire il fenotipo delle EPC, si deve usare almeno un marker di immaturità, oltre che ad uno specifico della linea endoteliale. Nell'uomo, i marcatori di immaturità/staminalità più usati sono il CD34 e il CD133.

Il CD34 è una glicoproteina di tipo transmembranoso dal peso molecolare di 110 kDa, espressa sui precursori delle cellule emopoietiche e rappresenta il principale marcatore utilizzato per la caratterizzazione delle cellule staminali del midollo osseo. Probabilmente funziona come una molecola di adesione per le interazioni fra cellule endoteliali e precursori ematopoietici, ed una sua delezione causa sia difetti ematopoietici che vascolari (Cheng J et al, 1996).

Il CD133 (anche conosciuto come AC133 negli umani, e prominin-1 nei topi), è una glicoproteina di 120 kDa, ed è un marcatore precocemente espresso sulla superficie delle cellule staminali ematopoietiche, oltre che essere presente anche sulle cellule progenitrici endoteliali (Yin AH et al, 1997). L'esatta funzione di questa molecola è ancora sconosciuta, ma vari studi hanno dimostrato che colture selettive arricchite di cellule positive per il marcatore di superficie CD133, hanno la capacità di differenziarsi in multipli fenotipi, inclusa la linea endoteliale (Gehling UM et al, 2000).

L'antigene a carattere endoteliale che più caratterizza queste cellule è rappresentato dal KDR/Flk-1 (Kinase Insert Domain Receptor nell'uomo, e Fetal Liver Kinase-1 in topo), che corrisponde al recettore per il VEGF (Vascular Endothelium Growth Factor) detto VEGFR2. KDR è il recettore che trasmette i segnali di VEGF nelle cellule endoteliali, e media la proliferazione, la migrazione

e la formazione di vasi capillari. Anche il CD31 o PECAM-1 (platelet-endothelial cells adhesion molecole) e vWf (von Willebrand factor) sono markers utilizzati per la caratterizzazione endoteliale.

A differenza di CD34, il marcatore CD133 non è mai espresso sulle cellule endoteliali mature, e pertanto cellule $CD133^{+}KDR^{+}$ potrebbero meglio corrispondere al fenotipo delle EPC. Purtroppo però il marcatore CD133 è indice di staminalità assoluta, espresso su cellule più immature rispetto al CD34, e per questa ragione, cellule $CD133^{+}KDR^{+}$ sono molto più rare di cellule $CD34^{+}KDR^{+}$, in circolo, in condizioni normali (Friedrich EB et al, 2006).

Nonostante questi limiti, entrambe le popolazioni cellulari $CD34^{+}KDR^{+}$ e $CD133^{+}KDR^{+}$ possono essere prese in considerazione in quanto presentano fenotipi antigenici per EPC. L'intersezione fra queste due, $CD34^{+}CD133^{+}KDR^{+}$, può essere preso come fenotipo restrittivo per EPC, ma queste cellule doppiamente marcate, sono molto rare nel circolo sanguigno (Fadini GP et al, 2008).

Il preciso criterio per identificare le EPC, rimane ancora una questione controversa, anche se l'espressione combinata di almeno un marker di immaturità/staminalità, come appunto CD34 o CD133, e di almeno un antigene di origine endoteliale (di solito il KDR) è generalmente accettato come criterio stringente per l'identificazione delle EPC (Sen S et al, 2011).

Studi sperimentali, inoltre, hanno dimostrato come il numero di cellule EPC circolanti con fenotipo $CD34^{+}KDR^{+}$, sia inversamente correlato con eventi di danno vascolare e con l'incremento di rischio cardiovascolare (Fadini GP et al, 2008; Schmidt-Luke C et al 2005; Werner N et al, 2005), mentre le EPC circolanti con fenotipo $CD133^{+}KDR^{+}$ e $CD34^{+}133^{+}KDR$ sono probabilmente correlate allo stato ossidativo cellulare e alla funzione endoteliale (Calò LA et al, 2011).

4.4 Ipertensione ed EPC

Il numero delle EPC circolanti è inversamente correlato con i fattori di rischio cardiovascolare, quali l'ipertensione, il diabete, l'ipercolesterolemia, il fumo di sigaretta, l'età, e l'identificazione di composti capaci di aumentare i livelli di EPC e di migliorare la loro attività funzionale è tuttora di notevole interesse clinico.

Le EPC circolanti, di derivazione midollare, hanno un importante ruolo di riparazione e rigenerazione dell'endotelio, e sono perciò le "candidate" ideali per la rigenerazione vascolare (Werner N et al, 2005); una loro riduzione in termini di numero e/o funzione, causa disfunzione endoteliale, oltre che essere predittive dello sviluppo di eventi cardiovascolari (Vasa M et al, 2001; Hill JM et al, 2003), e in parte contribuire alla patogenesi ipertensiva.

Sono stati condotti numerosi studi in vivo e in vitro, per dimostrare che condizioni associate con l'incremento di stress ossidativo, dovuto all'aumentata produzione delle ROS, non solo diminuiscono il numero assoluto di EPC circolanti, ma anche alterano le loro funzioni, causando effetti deleteri all'omeostasi vascolare (Lin CP et al, 2013). Inoltre, un aumento dello stato ossidativo, comporta una ridotta biodisponibilità di NO, che si traduce, oltre che in una progressione verso lo stato aterosclerotico, anche in una ridotta funzionalità di EPC circolanti (Tousoulis D et al, 2008).

Nell'ipertensione il numero e la sopravvivenza delle EPC circolanti è ridotto, e questo rappresenta un ulteriore rischio nello sviluppo di eventi cardiovascolari.

Studi sperimentali su modelli di ratto spontaneamente iperteso e in pazienti con ipertensione arteriosa essenziale, hanno dimostrato una riduzione nel numero di EPC circolanti, oltre che un'alterata funzione, attraverso l'insorgenza di invecchiamento precoce nelle EPC circolanti. Questo potrebbe influenzare il processo di rimodellamento cardiovascolare (Imanishi T et al, 2005).

Uno studio successivo, svolto dal medesimo gruppo, utilizzando modelli sperimentali in vitro, ha dimostrato come l'Ang II, che è un potente induttore di stress ossidativo, sia proprio la causa dell'aumento dell'invecchiamento nelle EPC circolanti, e di una loro ridotta sopravvivenza, oltre che causare un'alterata capacità proliferativa delle stesse (Imanishi T et al, 2005). Questo comporta un'alterata capacità rigenerativa dell'endotelio con evidente disfunzione endoteliale.

A tal riguardo, è stato dimostrato come l'uso di bloccanti del recettore AT1R dell'Ang II (ARB) siano in grado di migliorare le disfunzioni di EPC, dando un'ulteriore prova che lo stress ossidativo, mediato da Ang II, influisce sul numero e funzione delle EPC, e conseguente disfunzione endoteliale (Imanishi T et al, 2005; Yao EH et al, 2007).

4.5 Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP)

Il sistema cardiovascolare è ampiamente innervato sia dal sistema simpatico, sia dai nervi sensoriali capsaicina-sensibili, i quali giocano un importante ruolo nel controllo del tono della resistenza vascolare attraverso il rilascio di vasocostrittori e vasodilatatori.

CGRP, è un potente peptide vasodilatatore, ed è il principale neurotrasmettitore dei nervi sensoriali capsaicina-sensibili, e gioca un'importante ruolo nel modulare la resistenza periferica totale del circolo sistemico.

Il peptide CGRP è formato da 37 amminoacidi e deriva dal gene della calcitonina. CGRP esiste in due forme, α -CGRP e β -CGRP. Queste due isoforme condividono le stesse attività biologiche, ma sono trascritte da due geni distinti, a differenti siti sul cromosoma 11. CALC I forma calcitonina e α -CGRP, mentre CALC II forma β -CGRP. L' α -CGRP è prodotto dallo splicing alternativo del trascritto primario del gene della calcitonina, mentre β -CGRP è trascritto dal proprio gene distinto.

Queste due isoforme, α e β in topi, e I e II nell'uomo, differiscono nella loro sequenza peptidica per uno/tre amminoacidi rispettivamente, e condividono le stesse attività biologiche. La principale isoforma che viene espressa nel sistema nervoso centrale e periferico è l' α -CGRP (Smillie SJ et al, 2011; Deng PY et al, 2005).

Il principale sito di sintesi del CGRP, nel sistema nervoso periferico, è il ganglio spinale, che contiene i corpi cellulari dei neuroni sensoriali capsaicina-sensibili; i processi periferici di questi neuroni terminano sui vasi sanguigni e trasportano CGRP alle terminazioni nervose.

I recettori per questo peptide sono stati individuati sia nella media che nell'intima dei vasi sanguigni di resistenza.

Questo peptide è stimolato dall'HO-1/CO pathway (Peng J et al, 2001). L'HO-1, oltre ad avere una potente attività antiossidante, antinfiammatoria (Kim YM et al, 2011; Stocker R et al, 2006), e di riduzione dello stress ossidativo indotto dall'Ang II (Datla SR et al, 2007), è stato dimostrato avere un effetto favorente la re-endotelializzazione, legato alla sua capacità sinergica di aumentare il numero di EPC circolanti e di ridurre l'invecchiamento (Wu BJ et al, 2009).

Quest'ultima azione, in particolar modo, è legata alla capacità di HO-1 di essere un potente induttore del peptide Calcitonin Gene-related Peptide (CGRP).

Il CGRP è in grado di ridurre la pressione arteriosa. Studi sperimentali infatti dimostrano come la somministrazione sistemica di CGRP diminuisce, in modo dose-dipendente, la pressione arteriosa sia in animali che in soggetti normotesi. Inoltre, la riduzione della pressione arteriosa avviene anche in ratti ipertesi spontanei, mentre un suo incremento è stato dimostrato in topi knock-out per il gene α -CGRP/calcitonina (Gangula PR et al, 2000).

Il meccanismo primario che porta alla riduzione della pressione arteriosa, è dovuta alla sua potente azione vasodilatatoria, sul sistema arterioso periferico, dimostrando che il CGRP gioca un ruolo importante nella regolazione della resistenza vascolare e del flusso sanguigno, sia in condizioni fisiologiche, che nella patofisiologia dell'ipertensione.

La sua azione vasodilatatoria è dovuta alla sua capacità di: 1) riduzione di Ca^{2+} intracellulare, via inibizione di influsso e di rilascio di Ca^{2+} dal reticolo sarcoplasmatico; 2) ridurre la sensibilità di risposta dell'unità contrattile di Ca^{2+} ; 3) incrementare i livelli intracellulari di cAMP; 4) attivazione dei canali del K^+ ; 5) rilascio di NO. La risposta vasodilatatoria mediata da NO è endotelio-dipendente, mentre gli altri meccanismi influiscono direttamente sulla muscolatura liscia vasale.

CGRP inoltre è in grado di proteggere l'endotelio, inibendo la proliferazione di cellule muscolari lisce, ed evitando così il processo di rimodellamento cardiovascolare, base strutturale per lo sviluppo e il mantenimento dell'ipertensione. A conferma di questo, diversi studi hanno dimostrato come il CGRP inibisce la proliferazione di cellule muscolari lisce aortiche e polmonari (Chattergon NN et al, 2005), oltre che inibire la proliferazione delle cellule muscolari lisce indotto dall'Ang II (Qin XP et al, 2004).

Tale peptide, inoltre, previene l'invecchiamento precoce e incrementa il numero delle EPC circolanti, ma l'espressione e la sintesi di CGRP è significativamente ridotta in pazienti ipertesi. Zhou e collaboratori hanno infatti dimostrato che esiste una correlazione tra il CGRP e l'insorgenza di invecchiamento precoce delle EPC in pazienti ipertesi essenziali e in modelli di ratto spontaneamente iperteso. In particolar modo si è visto che ridotti livelli plasmatici di CGRP correlano con un aumento dell'invecchiamento di EPC circolanti nell'ipertensione, e questo rappresenta un ulteriore fattore di rischio per eventi cardiovascolari, legati maggiormente alla disfunzione endoteliale che si riscontra nell'ipertensione.

E' stato inoltre dimostrato che anche le EPC circolanti, sono abili nel sintetizzare e nel secernere il CGRP. Una riduzione nella sintesi e rilascio di CGRP invece si è visto in EPC circolanti provenienti da soggetti ipertesi essenziali, oltre che in modelli di ratto ipertesi spontanei. Si ipotizza quindi che le EPC circolanti giocano un importante ruolo nel mantenimento della funzione cardiovascolare grazie alla sintesi e al rilascio di questo peptide. Quindi il CGRP potrebbe agire come una sostanza protettiva endogena nel contrastare l'aumento di invecchiamento delle EPC circolanti in ipertensione, e stimolarne la produzione potrebbe rappresentare una strategia per proteggere le EPC dal precoce invecchiamento, oltre che incrementarne il numero in circolo, e garantire perciò un ulteriore effetto protettivo per l'endotelio (Zhou Z et al, 2010).

CAPITOLO 5

I SARTANI

L'ipertensione arteriosa costituisce una patologia complessa, caratterizzata da un aumento dello stato pressorio, in grado di incidere in maniera rilevante sul profilo di rischio cardiovascolare del paziente.

Gli antiipertensivi sono farmaci utilizzati per ridurre la pressione arteriosa che, se presenta valori superiori a 90/140 mmHg, costituisce un importante fattore di rischio cardiovascolare.

A questa categoria di farmaci appartengono molte classi di molecole, diversificate in base al meccanismo d'azione.

Nei pazienti ipertesi il sistema Renina-Angiotensina (RAS) è attivato e causa un aumento di produzione di Ang II, un potente vasocostrittore, in grado di aumentare la pressione arteriosa e le resistenze periferiche totali, oltre che essere un importante induttore di stress ossidativo, attraverso il suo signalling via recettore AT1R, che determina a lungo termine rimodellamento cardiovascolare e aterosclerosi, modulati dallo stress ossidativo cellulare.

Se quindi la sovrastimolazione del RAS e il signalling intracellulare mediato da Ang II hanno un ruolo fondamentale nell'instaurarsi dell'ipertensione in un individuo, inibire questo sistema ha una valenza terapeutica notevole per la cura della stessa e delle sue complicanze a medio-lungo termine.

Il blocco di questo sistema può avvenire a diversi livelli, attraverso l'uso di farmaci, diversificati in base al loro meccanismo d'azione (β -bloccanti, inibitori dell'enzima ACE, calcio antagonisti, bloccanti del recettore AT1R).

I principali farmaci antiipertensivi usati per inibire il RAS sono gli Angiotensin Converting Enzyme (ACEI's) e gli Angiotensin Receptor Blocker (ARB's), bloccanti il recettore dell'Angiotensina II.

Le azioni farmacologiche di questi due tipi di farmaci sono differenti.

Mentre i farmaci ACE inibitori, sono farmaci inibitori dell'enzima di conversione dell'Ang (ACE) e inibiscono quindi la conversione dell'Ang I (forma inattiva) in Ang II (forma attiva), i bloccanti del recettore AT1R, bloccano in modo selettivo, il legame dell'Ang II al recettore AT1R, e quindi tutti gli effetti dell'Ang II da essa esplicati, indipendentemente dall'origine e dalla via di sintesi dell'Ang II.

L'ormone si rende così disponibile per un legame con il recettore AT2R, inducendo la vasodilatazione con rilascio di NO, l'antiproliferazione e la differenziazione cellulare, oltre ad aumentare i segnali antiapoptotici, e inibire risposte pro-infiammatorie, controbilanciando così gli effetti mediati dal legame dell'Ang II al recettore AT1R (Schiffrin EL, 2002; Siragy HM et al, 2008) [fig. 5.1].

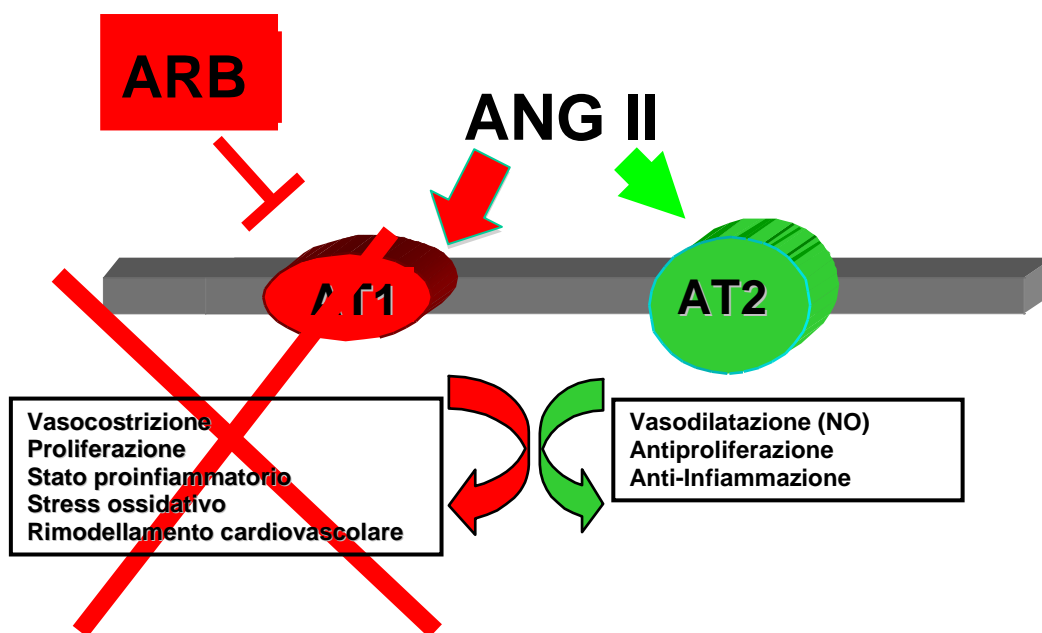


Figura 5.1: I farmaci bloccanti del recettore AT1 (ARB), bloccano il recettore AT1, per cui l'Ang II si rende disponibile al legame con il recettore AT2, con gli effetti che essa media.

Gli ARB appartengono alla classe farmacologica dei sartani. La loro struttura è costituita da un gruppo tetrazolico (un anello formato da quattro atomi di azoto e da un atomo di carbonio) e uno o due gruppi imidazolici [fig. 5.2].

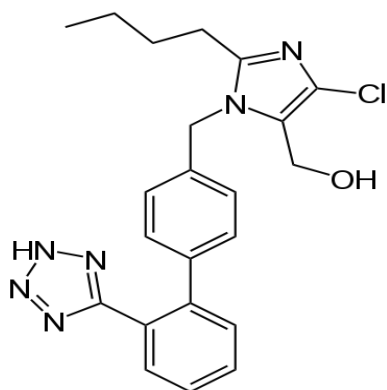


Figura 5.2: struttura chimica del Losartan, il primo bloccante del recettore dell'Ang II.

Le molecole appartenenti a questo gruppo di farmaci sono il Losartan, l'Ibersantan, l'Olmesartan, il Telmisartan. Il Vasartan nella sua struttura, include solo un gruppo tetrazolico.

I farmaci, se da un lato presentano caratteristiche simili nel ridurre la pressione arteriosa, mostrano differenti peculiarità per quel che riguarda effetti non caratteristici della classe di questi farmaci.

In particolare, il riconoscimento che lo stress ossidativo indotto da Ang II gioca un importante ruolo nell'ipertensione e nel rimodellamento cardiovascolare, ha portato ad investigare i potenziali effetti che hanno i farmaci antiipertensivi sullo stress ossidativo (Calò LA et al, 2011)

Vari studi sperimentali *in vivo e in vitro* hanno dimostrato come i sartani, oltre a ridurre la pressione arteriosa nel 90% di pazienti con ipertensione essenziale, esplicano un'azione benefica sulla struttura e sulla funzione vascolare, attraverso la riduzione dello stress ossidativo (Schiffrin EL, 2002).

In modello animale di ratti ipertesi spontanei, il trattamento con bloccanti del recettore dell'Ang II, riduce i livelli di anione O_2^- , con un conseguente aumento della biodisponibilità di NO, migliorando così la vasodilatazione endotelio-dipendente e la disfunzione endoteliale (Brosnan MJ et al, 2002).

In altri modelli animali, la somministrazione di antagonisti del recettore AT1R, riduce la formazione delle placche aterosclerotiche, tramite l'inibizione delle risposte proliferative ed infiammatorie (Strawn WB et al, 2000).

Inoltre, è stato dimostrato come l'Ang II e lo stress ossidativo indotto da Ang II, gioca un ruolo cruciale nell'aumento dell'invecchiamento delle EPC circolanti, che a sua volta porta ad una ridotta capacità proliferativa delle stesse con conseguente disfunzione endoteliale (Imanishi T et al, 2005), mentre i sartani sono in grado di ripristinare la funzione endoteliale, aumentando il numero e la sopravvivenza delle EPC circolanti (Yao EH et al, 2007; Honda A et al, 2009; Bahlmann FH et al, 2005).

In particolar modo, l'Olmesartan Medoxomil [fig. 5.3], ampiamente usato nel trattamento dell'ipertensione, è stato dimostrato possedere importanti effetti antiossidanti, che correlano con l'attivazione del sistema dell'NO.

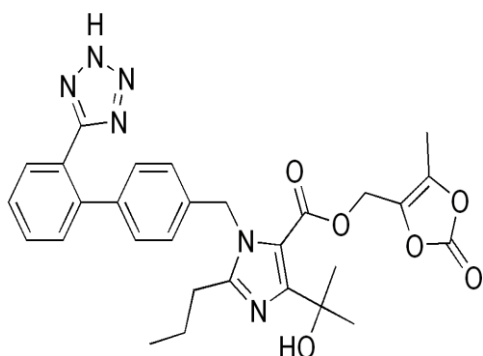


Figura 5.3: struttura chimica del farmaco Olmesartan Medoxomil

In pazienti in emodialisi, trattati con il farmaco Olmesartan, è stata riscontrata una ridotta concentrazione di albumina ossidata, un marker di stress ossidativo, dimostrando perciò l'attività antiossidante propria del farmaco (Kadowaki D et al, 2007).

La terapia farmacologica con Olmesartan, in pazienti con diabete mellito di tipo 2, inoltre, ha ridotto i livelli plasmatici dell'8-isoprostano 15(S)-8-isoprostaglandina F2 α , un marker di stress ossidativo, oltre a diminuire la resistenza vascolare intrarenale (Fliser D et al, 2005).

E' stato dimostrato che olmesartan aumenta la fosforilazione e la conseguente attivazione di eNOS, e aumenta i livelli di NO nel sangue (Oyama N et al, 2010; Kanematsu Y et al, 2006).

Inoltre, anche se indirettamente, gli effetti vasoprotettivi, anti-infiammatori e antiaterosclerotici di Olmesartan che sono stati dimostrati dai quattro trials clinici condotti sull'uomo, MORE (Stumpe KO et al,2007), EUTOPIA (Fliser D et al, 2004), VIOS (Smith RD et al, 2006) e OLIVUS (Hirohata A et al, 2010), sono in linea con l'effetto inibitorio di questo farmaco sullo stress ossidativo e sul signalling ad esso associato, oltre che sul rimodellamento cardiovascolare correlato allo stress ossidativo (Calò LA et al, 2011).

In particolare, i dati ottenuti dai quattro trials clinici sopramenzionati, oltre a dimostrare l'efficacia di questo sartano nel ridurre la pressione arteriosa, sono i seguenti:

- nel trials clinico EUTOPIA (EUropean Trial on Olmesartan and Pravastatin in Inflammation and Atherosclerosis Investigators) è stato dimostrato che il trattamento con il farmaco Olmesartan, in pazienti ipertesi essenziali, riduce significativamente il livello di infiammazione vascolare, già a 6 settimane di terapia. Nello specifico, il farmaco Olmesartan, ha ridotto i livelli sierici di proteina C reattiva, IL-6 e TNF- α , tipici markers biochimici dell'infiammazione, in particolar modo infiammazione vascolare (Fliser D et al, 2004);

- nel trials clinico MORE (Multicenter Olmesartan atherosclerosis Regression Evaluation trial), invece, è stato dimostrato che, in pazienti ipertesi essenziali con aterosclerosi carotidea, il trattamento con Olmesartan riduce sia lo spessore che il volume delle placche aterosclerotiche nelle carotidi, dando un ulteriore prova che l'attivazione del recettore AT1 è decisamente coinvolto nell'inizio e nella progressione dell'aterosclerosi (Stumpe KO et al 2007);

- nel trials clinico OLIVUS (Impact of Olmesartan on progression of coronary atherosclerosis: evaluation by IntraVascular UltraSound) sono stati arruolati pazienti con l'ipertensione arteriosa essenziale e Angina Pectoris Stabile, e sottoposti a terapia con Olmesartan. Dopo un follow-up di 14 mesi, è stato visto,

per la prima volta, come questo farmaco abbia la capacità di ridurre il volume e la progressione delle placche aterosclerotiche nelle arterie coronarie, prendendo in considerazione anche il lume, la placca e la consistenza dell'ateroma stesso; grazie a questo studio, si sarebbe dunque osservato che, somministrando Olmesartan, gli ateromi coronarici subiscono una significativa diminuzione a tutto vantaggio della salute di questi pazienti (Hirohata A et al, 2010);

- nel trials clinico VIOS (Vascular Improvement with Olmesartan medoxomil Study), è stato affrontato il problema dell'ispessimento delle piccole arterie. Innanzitutto questo studio ha dimostrato che negli ipertesi il rapporto ispessimento intimale/lume è più alto rispetto ai normotesi. Il trattamento con il farmaco Olmesartan ha causato un notevole miglioramento dello spessore, tanto da riportare il rapporto ispessimento intimale/lume ad un livello pari a quello dei normotesi (Smith RD et al, 2006).

Da tutti questi studi emerge che Olmesartan può migliorare il danno d'organo delle piccole e grandi arterie e che quindi, nei pazienti ipertesi, questo farmaco è importante non solo per abbassare la pressione arteriosa, ma anche per ridurre l'ispessimento intimale e conseguente rimodellamento cardiovascolare, che sono le complicanze a lungo termine dell'ipertensione arteriosa.

CAPITOLO 6

SCOPO DEL LAVORO

Lo stress ossidativo svolge un importante ruolo nella fisiopatologia dell'ipertensione arteriosa.

L'ipertensione è principale fattore di rischio per lo sviluppo di malattie cardiovascolari. Numerose evidenze sperimentali suggeriscono sempre più che lo stress ossidativo, che si traduce in una eccessiva produzione di specie reattive all'ossigeno (ROS), ha un ruolo chiave nella patogenesi dell'ipertensione.

In condizioni fisiologiche, basse concentrazioni di ROS intracellulari hanno un ruolo importante per mantenimento della funzione e dell'integrità vascolare. Tuttavia, in condizioni fisiopatologiche, l'aumento dei livelli di ROS contribuiscono al rimodellamento cardiovascolare, all'aterosclerosi e alla disfunzione vascolare, condizioni che sono presenti nei pazienti ipertesi.

Le ROS, infatti, possono alterare l'espressione genica modulando l'attivazione di fattori di trascrizione, influenzando le proteine che regolano le funzioni cellulari come la crescita e la differenziazione cellulare, modulare la produzione e la degradazione di matrice extracellulare. Sono in grado di ridurre, inoltre, la biodisponibilità dell'NO, un potente agente vasodilatatore e antiproliferativo, che provoca un'anormale regolazione del tono vascolare e il rimodellamento cardiovascolare, oltre a stimolare l'espressione di svariate chinasi e citochine pro-infiammatorie (Majzunova M et al, 2013).

L'Ang II, vasocostrittore e induttore dello stress ossidativo, media le sue azioni biologiche, legandosi a due distinti recettori legati alla membrana cellulare, AT1R e AT2R. Essa si lega con maggior affinità al recettore AT1, attraverso il quale causa un aumento dello stato ossidativo, oltre che la vasocostrizione, la crescita e l'infiammazione.

I bloccanti del recettore AT1R, tra cui l'Olmesartan Medoxomil, sono farmaci ampiamente usati nel trattamento dell'ipertensione. Essi, oltre a ridurre lo stato pressorio, sono in grado di bloccare il legame dell'Ang II al recettore AT1R, bloccando così gli effetti mediati dal legame dell'Ang II a questo recettore; l'Ang II si rende così disponibile al legame con il recettore AT2R, che controbilancia gli effetti mediati dal legame dell'Ang II al recettore AT1R.

In differenti studi sperimentali si è visto, come l'uso dei bloccanti il recettore AT1R dell'Ang II, siano in grado di ridurre lo stato ossidativo, oltre che migliorare la disfunzione endoteliale. In particolare Olmesartan è stato il più utilizzato tra le molecole di questa classe per studiare gli effetti di questi farmaci sullo stress ossidativo (Izuhara Y et al, 2005) e, sebbene indirettamente, gli effetti vasoprotettivi, anti-infiammatori e antiaterosclerotici di Olmesartan che sono stati dimostrati da quattro trials clinici condotti sull'uomo, MORE (Stumpe KO et al, 2007), EUTOPIA (Fliser D et al, 2004), VIOS (Smith RD et al, 2006) e OLIVUS (Hirohata A et al, 2010), sono in linea con l'effetto inibitorio di questo farmaco sullo stress ossidativo e sul signalling ad esso associato, oltre che sul rimodellamento cardiovascolare correlato allo stress ossidativo (Calò LA et al, 2011).

Non sono però disponibili evidenze per un razionale meccanicistico della traslazione dell'effetto antiossidante ed antiinfiammatorio di Olmesartan nel lungo termine verso gli effetti antiaterosclerotici ed antiremodeling dimostrati dal farmaco nei trials clinici sopramenzionati.

Lo scopo del nostro studio, quindi, è stato quello di valutare il possibile effetto antiossidante e vasoprotettivo dell'Olmesartan Medoxomil in pazienti ipertesi essenziali usando un approccio biologico molecolare.

In particolare, lo studio si è svolto in due fasi: nella prima fase, in una prima coorte di pazienti ipertesi essenziali, sono stati presi in esame parametri di stress ossidativo per valutare gli effetti antiossidanti dell'Olmesartan, mentre nella fase successiva, in una seconda coorte di pazienti ipertesi essenziali, sono stati presi in esame gli effetti vasoprotettivi di Olmesartan.

Nella prima fase dello studio, abbiamo valutato quindi, mediante un approccio biologico molecolare, i markers di stress ossidativo quali:

♦ **p22^{phox}** : subunità del citocromo b₅₅₈ inclusa nella NADH/NADPH ossidasi, localizzata nelle membrane delle vescicole secretorie e di granuli specifici. L'enzima catalizza il trasferimento di elettroni dall'NADPH all'ossigeno molecolare, con la conseguente produzione di anioni superossido (Griendling KK et al, 2000);

♦ **Heme ossigenasi (HO-1):** isoforma inducibile del sistema dell'heme ossigenasi, in grado di proteggere dallo stress ossidativo. Questa proteina catalizza la reazione iniziale del catabolismo dell'heme per dare quantità equimolari di biliverdina, monossido di carbonio (CO) e ferro. La biliverdina viene successivamente convertita in bilirubina per azione della biliverdina reduttasi (Choi e Alam, 1996), un potente antiossidante. Questo enzima viene indotto da molti fattori ossidanti (metalli pesanti, endotossine, sodio arsenito, H₂O₂, ipertermia e ipossia...) ed è capace di esplicare azione antiossidante (Applegate et al, 1991).

♦ **ERK (extracellular signal-regulated kinases):** è una proteina effettrice dello stress ossidativo; il suo segnale intracellulare, strettamente correlato allo stress ossidativo, rappresenta un importante effettore dei processi che come tappa finale portano al rimodellamento cardiovascolare e all'aterosclerosi. ERK1/2, un membro della famiglia MAPK, favorisce una risposta ipertrofica via fosforilazione di target nucleari (as es. c-myc, c-jun e ATF-2), determinando una riprogrammazione trascrizionale ed un'alterata espressione genica associata ad ipertrofia (Kim et al, 2000).

Sono stati inoltre valutati marker plasmatici di stress ossidativo come le lipoproteine ossidate a bassa densità (**oxLDL**), cruciali nello sviluppo della reazione infiammatoria cronica dell'intima: l'intrappolamento nella matrice extracellulare dello spazio sub-endoteliale dà infatti il via al processo aterosclerotico (Meisinger et al, 2005; Galle et al, 2006).

Nella seconda fase dello studio, abbiamo valutato gli effetti vasoprotettivi dell'Olmesartan, prendendo in considerazione parametri quali:

♦ **HO-1:** oltre ad essere una proteina con potente attività anti-ossidante e anti-infiammatoria, presenta un potente effetto favorente la re-endotelializzazione, che è stato legato alla sua capacità di aumentare il numero e di ridurre l'invecchiamento di cellule progenitrici endoteliali circolanti (EPC) (Wu BJ et al, 2009);

◆ **Calcitonin gene-related peptide (CGRP):** stimolato dall'HO-1/CO pathway (Peng J et al, 2001); è un potente vasodilatatore e svolge un'azione protettiva l'endotelio, inibendo la proliferazione delle cellule muscolari lisce; esso previene, inoltre, l'invecchiamento delle cellule progenitrici endoteliali circolanti, indotta anche da Ang II (Zhou Z et al, 2010);

◆ **Numero e sopravvivenza di EPC circolanti:** svolgono un'importante ruolo nel mantenimento della funzione endoteliale dei vasi sanguigni attraverso un continuo processo di re-endotelializzazione e neovascolarizzazione (Heiss C et al, 2005).
Le EPC sono indice di funzionalità ed integrità dell'endotelio, e svolgono un ruolo cruciale nel mantenimento del tono, dell'omeostasi e della struttura vascolare (Reidy MA et al 1981; Werner N et al, 2002).

CAPITOLO 7

PAZIENTI E METODI

7.1 Pazienti

Lo studio è stato effettuato in tempi differenti utilizzando due coorti di pazienti ipertesi essenziali con caratteristiche simili. Sulla prima coorte sono stati analizzati markers di stress ossidativo e del pathway del rimodellamento cardiovascolare, oltre che i livelli di LDL ossidate; sulla seconda coorte di pazienti sono stati valutati oltre che l'espressione proteica di HO-1, i livelli plasmatici di CGRP e il numero e sopravvivenza delle cellule progenitrici endoteliali (EPC).

In particolare la prima coorte era costituita da 20 pazienti ipertesi essenziali, non fumatori (14 maschi, 6 femmine, di età compresa tra i 38 e i 61 anni). La pressione arteriosa era compresa tra i 142 e i 156 mmHg per la sistolica e tra 94 e 98 mmHg per la diastolica.

La seconda coorte comprendeva 20 pazienti ipertesi essenziali, non fumatori (15 maschi, 5 femmine, di età compresa tra i 36 e i 60 anni). La pressione arteriosa era compresa tra 144 e 155 mmHg per la sistolica e 93 e 99 mmHg per la diastolica.

Tutti i pazienti considerati non avevano mai assunto farmaci antiipertensivi nel momento in cui si sono presentati per la prima volta alla Clinica dell'Ipertensione, Dipartimento di Medicina, Clinica Medica 4°, dell'Università degli Studi di Padova.

Dagli studi, sono stati esclusi pazienti diabetici, valutati mediante test sui livelli sierici di glucosio a digiuno (<126 mg/dl), pazienti con funzione renale compromessa con livelli di creatinina sierica < 1, 0 mg/dl e pazienti con escrezione urinaria di albumina <30 mg/g.

L'ipertensione arteriosa secondaria è stata esclusa valutando i livelli di attività di plasma renina (PRA) e i livelli di aldosterone prima e dopo aver assunto 50 mg di captopril (captopril test).

Il profilo lipidico dei pazienti era normale e i pazienti non hanno mai assunto farmaci ipolipemizzanti o l'aspirina.

L'indice di Massa Corporea (IMC) era normale (<25 Kg/m²).

Nessuno dei pazienti ha avuto infarto del miocardio e/o evidenza di malattie coronariche ed è stata esclusa una possibile ipertrofia ventricolare sinistra con ecocardiografia M-mode.

Il consenso informato è stato ottenuto da tutti i pazienti partecipanti allo studio.

Dopo l'arruolamento (baseline), i pazienti hanno iniziato la terapia con il farmaco Olmesartan Medoxomil (20 mg/giorno) per 6 mesi. I pazienti sono stati visti il mese successivo l'inizio della terapia, per le valutazioni cliniche, e dopo 3 e 6 mesi per misurare la pressione arteriosa e per ulteriori valutazioni cliniche. La pressione arteriosa è stata misurata mediante uno sfigmomanometro a mercurio. La media di tre misure consecutive, è stata usata per l'analisi dei risultati.

Al baseline, 3 mesi e 6 mesi sono stati prelevati, per ciascun paziente a digiuno, 35 ml di sangue periferico per eseguire gli esperimenti *ex vivo* di biologia molecolare.

Tutti i pazienti, inoltre, sono stati sottoposti ad una dieta, contenente approssimamente 150 mmoli di sodio per giorno, e a 3 e 6 mesi dall'inizio del trattamento, tramite uno specifico questionario, è stato verificato che non ci fossero sostanziali differenze tra le diete dei pazienti, in particolar modo per quanto riguarda il consumo di sali e di alcool.

7.2 Metodi

7.2.1 Separazione delle cellule mononucleate da sangue periferico

Dopo separazione del plasma da 35 ml di sangue intero anticoagulato con EDTA, ottenuta per centrifugazione a 1450 rpm per 10 minuti a 20°C, la separazione dei linfo-monociti è stata effettuata in gradiente utilizzando Ficoll-Plaque Plus (GE Healthcare Bioscience AB, Uppsala, Svezia). Sopra una soluzione di opportuna densità e forza osmotica formata da Ficoll, agente polimerico aggregante gli eritrociti, e diatrizoato sodico, è stato stratificato il sangue intero anticoagulato con EDTA. Il sistema a due fasi è stato quindi centrifugato a 1650 rpm per 30 minuti a 20°C. Una volta recuperato l'anello di linfo-monociti, è stata aggiunta una soluzione isotonica (PBS) per effettuare i lavaggi. La sospensione è stata poi centrifugata a 1250 rpm per 10 minuti a 20 °C. Quest'ultima operazione è stata effettuata due volte, e il pellets cellulare ottenuto, è stato poi risospeso in uno

specifico Buffer di lisi e congelato a -80°C . Il plasma prelevato, è stato conservato a -80°C .

7.2.2 Ottenimento del lisato proteico

Per ottenere un' estratto totale di proteine, i linfo-monociti isolati dal sangue intero anticoagulato con EDTA, sono state lisati con uno specifico Buffer di Lisi composto da Tris HCl 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5.0 mM, Niaproof 1.5%, Na_3VO_4 1.0 mM, SDS 0.1%. Al momento dell'uso sono stati addizionati gli inibitori delle proteasi (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche Diagnostic, NJ, USA), Fenil-Metil-Sulfonil Fluoride (PMSF, 1 mM) e cocktail di inibitori della fosfatasi (Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 ,Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA).

La soluzione contenente il buffer di lisi e le cellule, è stata sottoposta a 3 cicli di 30 secondi di sonicazione, in ghiaccio, con il sonicatore UP200S (Hielscher Gimbla Teltow, Germania), per rompere le cellule e liberare così la maggior quantità di proteine in soluzione.

La soluzione è stata poi centrifugata a 4°C , per 10 minuti a $10000\times g$, ed è stato recuperato il surnatante contenente le proteine in soluzione.

7.2.3 Determinazione della concentrazione di proteine

La determinazione della concentrazione delle proteine è stata effettuata utilizzando il saggio dell'acido Bicinconinico (BCA).

Il BCA assay (Pierce, Rockford, USA) è un metodo colorimetrico, che combina la reazione del biureto (una proteina che in ambiente alcalino è in grado di ridurre il Cu^{2+} in Cu^{+}) con la determinazione colorimetrica data dal rame rameoso che chela due molecole di acido bicinconinico.

25 μl della soluzione contenente delle proteine e la stessa quantità del tampone di lisi sono state diluite per un opportuno fattore di diluizione (1:10) con acqua DEPC. Sono state poi caricate in triplo in una piastra a 96 pozzetti (Falcon, Necton Dickinson, Labware, New Jersey USA) assieme allo standard (albumina sierica bovina, BSA) a diverse concentrazioni note. Ogni pozzetto è stato riempito con 200 μl di reagente composto da 50 parti di reagente BCA A (sodio carbonato,

sodio bicarbonato, acido bicinconinico, sodio tartrato in sodio idrossido 0,1M) e 1 parte di reagente BCA B (contenente 4% di solfato rameico). La piastra è stata successivamente incubata a 37°C per 30 minuti e letta allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 540 nm (Labsystems Multiscan EX, Virginia, USA). È stata creata una curva standard dell'albumina, mettendo sull'asse delle X le concentrazioni note di albumina, e sull'asse delle Y, i rispettivi valori di assorbanza. Sostituendo poi i valori ottenuti di assorbanza dei campioni in analisi all'incognita x dell'equazione della retta dell'albumina, è stato possibile ricavare le concentrazioni delle proteine.

7.2.4 Separazione elettroforetica delle proteine e trasferimento su membrana di nitrocellulosa (Western Blot)

Per valutare l'espressione proteica di p22^{phox}, di HO-1, e lo stato di fosforilazione di ERK 1/2, è stata fatta la separazione elettroforetica delle proteine, mediante la tecnica di Western Blot.

60 µg di proteine per p22^{phox}, 100 µg di proteine per HO-1, 40 µg di proteine per p-ERK 1/2 sono state denaturate per 5 minuti in presenza di *Loading Buffer* (10 mM Tris HCl, pH 6.8, 20mM DTT, 0,4% SDS, 0.025% bromofenolo blu e 2% glicerolo). I campioni sono stati portati a 4°C e caricati su gel di poliacrilammide al 12%.

I gel erano così costituiti:

- ◆ *stacking gel* (o gel di impaccamento) (40% acrilammide/bis-acrilammide 29:1, 1,0 M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 10% APS, TEMED): è la parte superiore del gel e la sua funzione è quella di concentrare il campione proteico caricato negli appositi pozzetti, in modo che tutti i campioni comincino la loro migrazione dallo stesso punto di partenza;
- ◆ *Running gel* (o gel di separazione) (40% acrilammide/bis-acrilammide 29:1, 1,5 M Tris-HCl pH 8.8, 10% SDS, 10% APS, TEMED): è la parte inferiore e la sua funzione è quella di separare le proteine dei vari campioni in base al loro peso molecolare. Il running gel si differenzia dallo stacking gel non solo per la concentrazione salina e il pH, ma soprattutto per la concentrazione di acrilammide. Essa varia infatti in base alla porosità desiderata e quindi al peso molecolare della proteina di interesse.

Il marker molecolare utilizzato era il *full range rainbow* (GE Healthcare Bioscience AB, Uppsala, Svezia).

La corsa elettroforetica è stata effettuata a 80/110 Volt per 4-5 ore, in presenza di Running Buffer così composto: 25 mM Tris, 0,25 M glicina, 3,47 mM SDS.

Le proteine separate elettroforicamente su gel, sono quindi state trasferite (fase di blotting) su membrana di nitrocellulosa (Hybond ECL, GE Healthcare Bioscience AB, Uppsala, Svezia) per 1 ora a 80 V a 4°C, usando uno specifico tampone di trasferimento a 4°C (39 mM glicina, 48 mM Tris base, 0,037% SDS, 20% metanolo).

7.2.5 Formazione e visualizzazione degli immunocomplessi

Le membrane di nitrocellulosa, sono state messe ad agitare per un'ora con PBS addizionato dello 0,1% di Tween-20 (Merck Schuchardt, Germania) (tPBS) e il 5% di latte scremato in polvere (*Non Fat Dry Milk*, Nestlé, Svizzera).

Successivamente sono state incubate con soluzioni di anticorpi primari specifici per tutta la notte a 4°C, come riportato in Tabella 1.

Il giorno seguente, le membrane sono state rimesse ad agitare ancora per un paio d'ore con l'anticorpo primario specifico. Dopodichè le membrane sono state lavate 3 volte per 15 minuti a temperatura ambiente con tPBS e incubate con lo specifico anticorpo secondario (Tabella 1), coniugato con Horseradish Peroxidase (HRP) per 1 ora a temperatura ambiente.

Dopo 3 lavaggi da 15 minuti ciascuno con tPBS, a temperatura ambiente, le membrane sono state incubate per 5 minuti con una soluzione chemiluminescente (soluzione preparata al momento, composta da luminolo e perossido in uguali volumi (Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, Rockford USA).

Gli immunocomplessi formati sono quindi stati visualizzati a seguito di impressione su lastra radiografica (GE Healthcare, Uppsala, Svezia) e successivo sviluppo.

Le bande corrispondenti alle tre proteine in esame prese singolarmente sono state quantificate densitometricamente per mezzo della densità pixel utilizzando il *software* NIH Image. Il rapporto tra l'espressione proteica rispettivamente di p22^{phox} e GAPDH e HO-1 e GAPDH (*Housekeeping*) è stato utilizzato come

indice dell'espressione proteica. Il rapporto tra i prodotti di blotting di phosphoERK1/2 e GAPDH è stato utilizzato come indice dell'attivazione della proteina.

Tabella 1

Linfo-monociti	p22^{phox} policlonale (22 KDa)	HO-1 policlonale (32 KDa)	p-ERK 1/2 (42-44 KDa)	GAPDH (monoclonale) 36 KDa
Anticorpo primario	(Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA) 1:500	(Stressgen, Victoria, BC, Canada) 1:750	(Cell Signaling Danvers, MA, USA) 1:1000	(Chemicon International, Temecula, CA, USA) 1:5000
Anticorpo secondario	Anti Rabbit (GE Healthcare, Uppsala, Svezia) 1:2000	Anti Rabbit (GE Healthcare, Uppsala, Svezia) 1:5000	Anti Rabbit (GE Healthcare, Uppsala, Svezia) 1:1000	Anti Mouse (GE Healthcare, Uppsala, Svezia) 1:20000

7.2.6 Determinazione delle LDL ossidate plasmatiche

La concentrazione plasmatica delle LDL ossidate (ox-LDL) è stata misurata utilizzando un kit ELISA, come da protocollo della ditta produttrice (Immundiagnostik AG, Bensheim, Germany).

In breve, i campioni di plasma sono stati incubati per 4 ore a temperatura ambiente con un anticorpo ad alta affinità adeso alle pareti dei pozzetti della piastra. Dopo 5 lavaggi con buffer apposito, è stato addizionato un anticorpo secondario perossidasi-coniugato per 1 ora.

Come substrato cromogeno è stato utilizzato la tetrametilbenzidina in ambiente acido. L'intensità del colore, direttamente proporzionale alla concentrazione delle ox-LDL presenti nel campione, è stata rilevata a 450 nm. I risultati sono stati riportati ad una curva standard ottenuta da campioni a concentrazione nota di ox-LDL.

7.2.7 Determinazione della concentrazione plasmatica del calcitonin gene-related peptide (CGRP)

La concentrazione plasmatica del peptide CGRP, è stata misurata utilizzando un kit ELISA, seguendo il protocollo della ditta produttrice (Human CGRP ELISA kit, Usen, Wuhan, China).

In breve, i campioni di plasma sono stati incubati per 4 ore a temperatura ambiente con un anticorpo ad alta affinità adeso alle pareti dei pozzetti della piastra. Dopo 5 lavaggi con buffer apposito, è stato addizionato un anticorpo secondario perossidasi-coniugato per 1 ora.

Come substrato cromogeno è stato utilizzato la tetrametilbenzidina in ambiente acido. L'intensità del colore, direttamente proporzionale alla concentrazione del CGRP presente nel campione, è stata rilevata a 450 nm. I risultati così ottenuti sono stati riportati contro la curva standard per trovare la concentrazione del peptide CGRP in ogni campione e i valori ottenuti sono stati espressi in pg/ml.

7.2.8 Valutazione del numero delle EPC circolanti mediante citofluorimetria

La citofluorimetria usa i principi della rifrazione luminosa e dell'emissione della fluorescenza per analizzare particelle e cellule e produrre dati multi-parametrici.

Le particelle vengono incanalate mediante un fluido laminare nella camera di lettura, dove una sorgente di luce monocromatica, le colpisce singolarmente.

La cellula che viene colpita, emette diversi tipi di segnali:

- Rifrazione frontale, direttamente proporzionale al volume cellulare;
- Rifrazione Laterale, e la luce che viene rifratta dipende dalla forma del nucleo, dalla densità della cromatina nucleare, e dalla granulosità del citoplasma.
- Fluorescenza, la quale misura l'emissione di particolari fluorocromi, legati in modo covalente agli anticorpi monoclonali utilizzati per riconoscere strutture antigeniche all'interno o sulla superficie cellulare. La presenza di un dato antigene viene perciò rilevata ed utilizzata come indicatore dell'appartenenza di una cellula ad una data linea cellulare, nonché del suo livello maturativo.

L'unione di questi parametri consente una eccezionale classificazione delle diverse popolazioni presenti in una sospensione cellulare.

In particolare, nel nostro protocollo sperimentale, tutti i campioni ematici sono stati processati entro due ore dal prelievo.

Le cellule progenitrici del sangue periferico sono state analizzate per l'espressione di antigeni di superficie cellulare, mediante analisi citofluorimetrica a 3 colori con l'uso di specifici anticorpi monoclonali (mAb) coniugati alle molecole fluorescenti fluoresceina isotiocianato (FITC), ficDoeritrina (PE), e alloficocianina (APC).

150 µl di sangue periferico sono stati incubati a 4°C per 30 minuti, al buio, con 10 µl di anticorpo monoclonale antihuman-C34 coniugato direttamente con FITC (Becton Dickinson, USA), con 5 µl di anticorpo monoclonale antihuman-CD133 coniugato ad APC (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germania) e con 10 µl di anticorpo monoclonale anti-human kinase insert domain receptor (KDR), coniugato con PE (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA).

E' stato eseguito un controllo costituito da due anticorpi monoclonali diretti contro antigeni non rilevanti, ma della stessa sottoclasse e marcati con gli stessi fluorocromi (controllo isotipico).

Dopo incubazione, per lisare i globuli rossi, sono stati aggiunti 3-4 ml di soluzione lisante (cloruro d'ammonio NH₄Cl) per 5 minuti. I campioni poi sono stati centrifugati per 10 minuti a 400g, e il pellet cellulare ottenuto è stato risospeso in 0,5 ml di PBS.

La frequenza delle cellule positive del sangue periferico per i markers è stata determinata mediante un'analisi *dot-plot 2D-side scatter* della fluorescenza, dopo gating appropriato.

E' stato eseguito un opportuno gating morfologico, per escludere granulociti e detriti e la popolazione di cellule del sangue periferico positive per CD34 risultante, è stata poi analizzata per doppia e tripla espressione di KDR e CD133.

Le EPC circolanti sono state definite come CD34+KDR+, CD133+KDR+, CD34+CD133+KDR.

500000 cellule sono state acquisite e valutate mediante strumento analizzatore FACSCalibur (Franklin Lakes, New Jersey, USA) e i dati sono stati processati usando il programma Macintosh CELL Quest (Becton Dickinson, USA).

7.2.9 Test di valutazione dell'apoptosi di EPC circolanti mediante annessina V in citofluorimetria

L'apoptosi delle cellule CD133+KDR+ è stata valutata con l'analisi citofluorimetrica e si basa sulla capacità dell'annexina V (AnV) di legarsi alla fosfatidilserina (PS).

Durante l'apoptosi le cellule subiscono specifiche modificazioni morfologiche, che portano alla perdita dell'integrità di membrana, alla formazione di corpi apoptotici ed alla successiva morte cellulare. Un cambiamento che avviene nella membrana cellulare durante le prime fasi del processo

apoptotico è la traslocazione della fosfatidilserina dal lato interno della membrana a quello esterno. È possibile rilevare la PS utilizzando l'Annessina V marcata, una proteina di 35kD che in presenza di

specifiche concentrazioni di calcio è in grado di legarsi con alta affinità alla PS.

La traslocazione della PS precede altri eventi, come la perdita dell'integrità della membrana plasmatica, la frammentazione del DNA e la condensazione della cromatina. Perciò l'AnV-FITC può essere usata come indicatore delle cellule in apoptosi precoce.

In particolare 150 µl di sangue periferico sono stati incubati a 4°C per 30 minuti con 5 µl di anticorpo monoclonale antihuman Annexina V coniugato con FITC (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA), con 5 µl di anticorpo monoclonale CD 133 coniugato con APC e con 10 µl di anticorpo monoclonale anti-human KDR, coniugato con PE (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA).

E' stata effettuata la lettura al citofluorimetro e l'apoptosi è stata analizzata dopo isolamento con gate immunologico delle cellule di nostro interesse (CD133⁺KDR⁺), basandosi sull'espressione dell'annexina V.

I dati sono stati processati usando il programma Macintosh CELL Quest (Becton Dickinson, USA).

7.3 Analisi statistica

I dati ottenuti sono stati valutati con un computer Power Macintosh G5 (Apple Computer, Cupertino, CA, USA), utilizzando il pacchetto statistico Statview II (Brain Power Inc, Calabas, CA, USA).

I dati sono espressi come media \pm SD e analizzati mediante l'analisi della varianza (ANOVA), su misure ripetute, con correzione di Bonferroni per confronti multipli, per confrontare le medie tra i gruppi. I valori di $p < 0.05$ sono stati considerati significativi.

Per quanto riguarda l'analisi dei dati di CGRP e delle EPC circolanti, i valori sono espressi come media \pm SD e sono stati analizzati utilizzando il pacchetto statistico JMP in esecuzione su un Mac Pro (Apple, Cupertino, California) e la significatività dei valori è stata analizzata con ANOVA per i valori non accoppiati, mentre per quelli accoppiati è stato usato il T-test. Valori di $p < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

CAPITOLO 8

RISULTATI

8.1 Valutazione dei livelli di pressione arteriosa di pazienti ipertesi essenziali dopo 3 e 6 mesi di terapia con Olmesartan

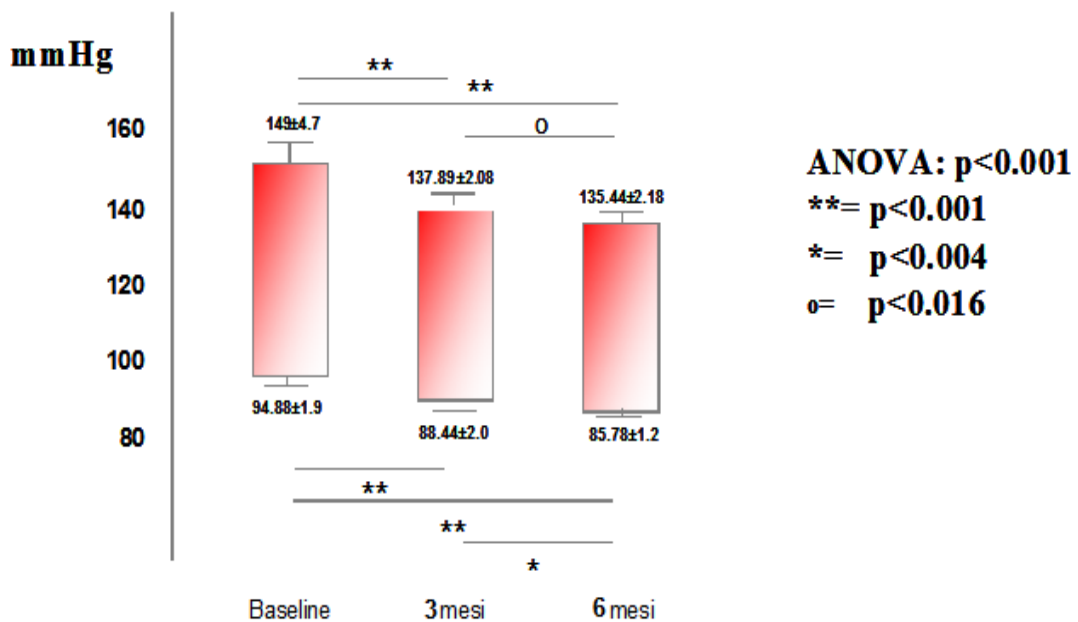


Figura 8.1.1. Pressione arteriosa di pazienti ipertesi trattati con Olmesartan al baseline, 3 mesi e 6 mesi.

L'Olmesartan ha ridotto la pressione arteriosa in tutti i pazienti ipertesi essenziali, già a 3 mesi dall'inizio del trattamento (BP < 140/90 mmHg) ed ha determinato un ulteriore abbassamento della pressione al sesto mese, mantenendo i livelli pressori inferiori rispetto l'inizio del trattamento (Fig.8.1.1).

In particolare, sia la pressione sistolica (149 ± 4.7 mmHg al baseline vs 137.89 ± 2.08 a 3 mesi, $p < 0,001$) che diastolica (94.88 ± 1.9 al baseline vs 88.44 ± 2.0 a 3

mesi, $p < 0.001$) sono risultate significativamente inferiori ai 3 mesi rispetto al baseline.

Anche a 6 mesi, sia la pressione sistolica (149 ± 4.7 mmHg al baseline vs 135.44 ± 2.18 a 6 mesi, $p < 0.001$) che diastolica (94.88 ± 1.9 al baseline vs 85.78 ± 1.2 , $p = 0.001$) sono risultate significativamente ridotte.

Non è risultata significativa la riduzione della pressione sistolica e diastolica riscontrata a 6 mesi di trattamento nei confronti di quella riscontrata a 3 mesi (135.44 ± 2.18 a 6 mesi vs 137.89 ± 2.08 a 3 mesi, $p = 0.016$; 85.78 ± 1.2 a 6 mesi vs 88.44 ± 2.0 a 3 mesi, $p = 0,004$, rispettivamente).

8.2 Valutazione dell'espressione proteica di p22^{phox} in cellule mononucleate del sangue di pazienti ipertesi essenziali dopo 3 e 6 mesi di terapia con Olmesartan

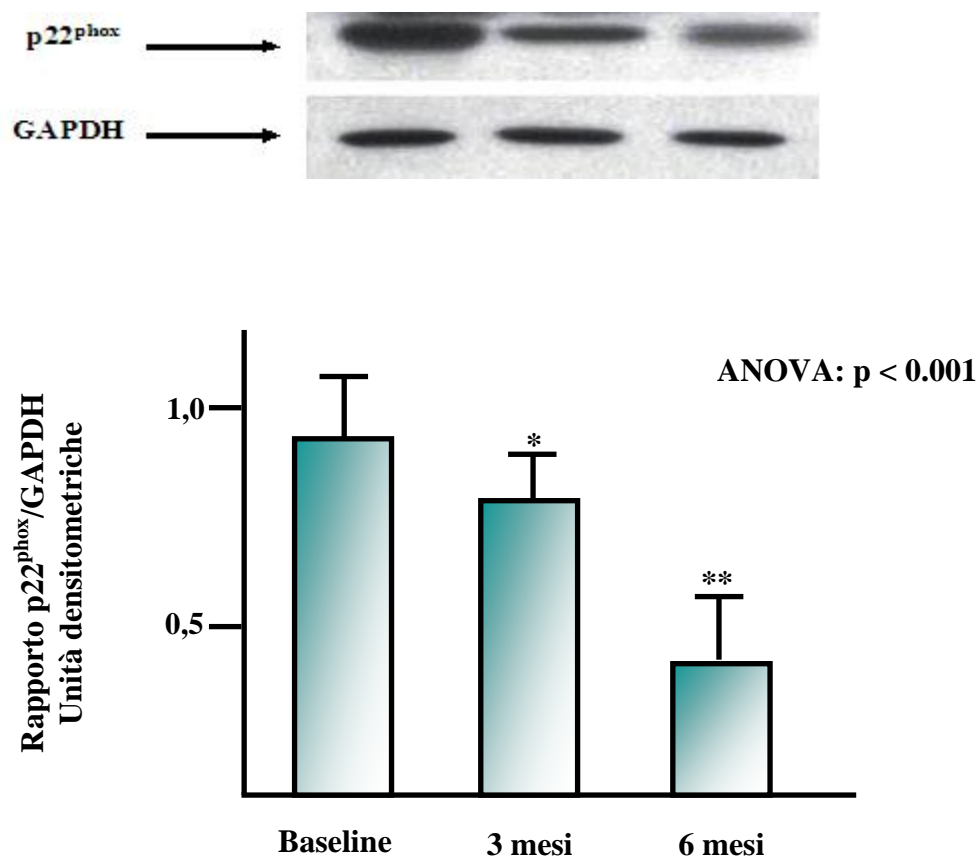


Figura 8.2.1. Espressione proteica di p22^{phox} in cellule mononucleate di pazienti ipertesi essenziali trattati con Olmesartan al baseline, 3 e 6 mesi. Anova a 0, 3 e 6 mesi di trattamento. Sopra, figura rappresentativa di Western Blot per p22^{phox} e GAPDH di un paziente iperteso a 0, 3 e 6 mesi di trattamento con Olmesartan. *p < 0.02 vs 3 mesi; **p = 0.001 vs baseline e 3 mesi.

Il trattamento con Olmesartan ha ridotto significativamente l'espressione proteica di p22^{phox} in cellule mononucleate di pazienti ipertesi (ANOVA: p < 0.001) (Fig. 8.2.1). I livelli di p22^{phox} diminuiscono significativamente dopo 3 mesi di terapia rispetto al baseline (rispettivamente 0.71 ± 0.26 vs 0.93 ± 0.24 unità densitometriche (u.d.), p < 0.001) e si riducono ulteriormente a 6 mesi sia rispetto al baseline (0.45 ± 0.12 vs 0.93 ± 0.24 u.d., p < 0.001) che rispetto a 3 mesi (0.45 ± 0.12 vs 0.71 ± 0.26, p < 0.02).

8.3 Valutazione dell'espressione proteica di HO-1 in cellule mononucleate del sangue di pazienti ipertesi essenziali dopo 3 e 6 mesi di terapia con Olmesartan

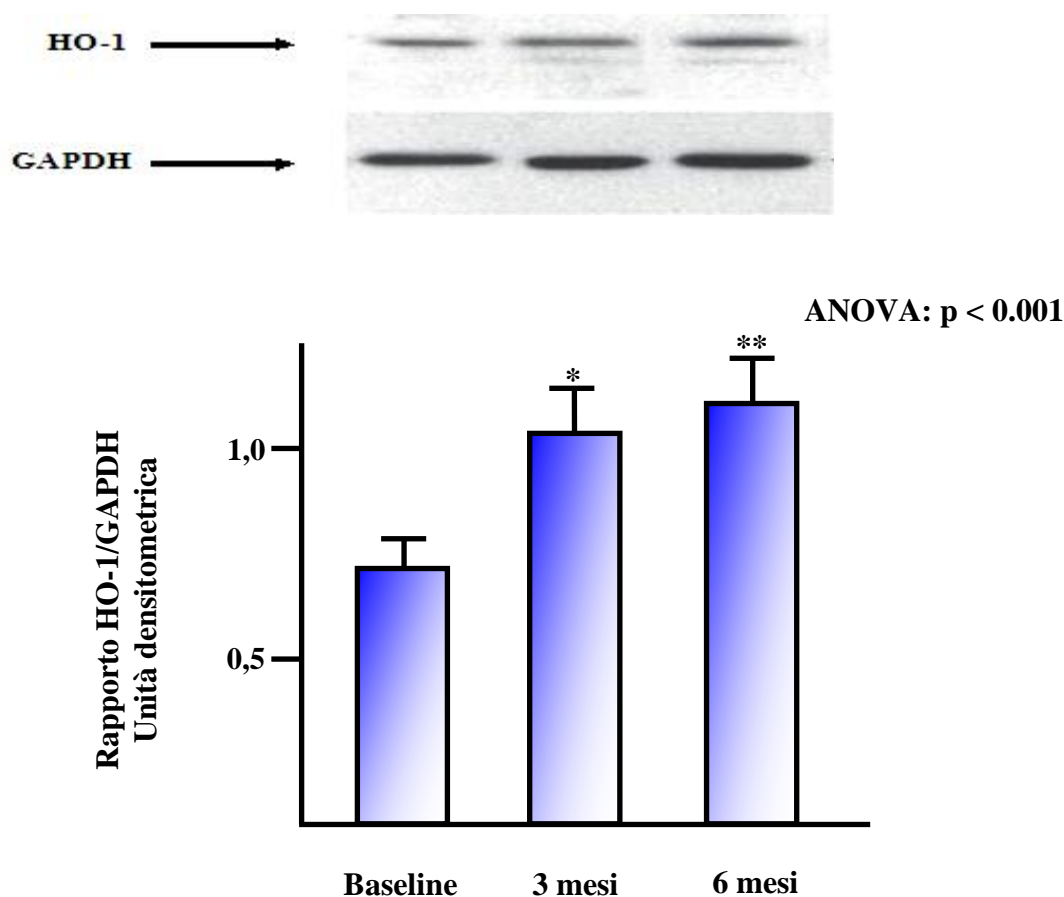


Figura 8.3.1: Espressione proteica di HO-1 in cellule mononucleate di pazienti ipertesi essenziali trattati con Olmesartan al baseline, 3 e 6 mesi. Anova a 0, 3 e 6 mesi di trattamento. Sopra, figura rappresentativa di Western Blot per HO-1 e GAPDH di un paziente iperteso a 0, 3 e 6 mesi di trattamento con Olmesartan. * $p=0.001$ vs baseline, ** $p=0.001$ vs baseline

Il trattamento con Olmesartan ha aumentato significativamente l'espressione proteica di HO-1 in cellule mononucleate di pazienti ipertesi (ANOVA: $p < 0.001$) (Fig. 8.3.1). I livelli di HO-1 aumentano significativamente dopo 3 mesi di terapia rispetto al baseline (rispettivamente 1.10 ± 0.19 vs 0.77 ± 0.071 u.d., $p = 0.001$) e sono significativamente maggiori a 6 mesi rispetto al baseline (1.11 ± 0.19 vs 0.77 ± 0.071 u.d., $p = 0.001$). Non è stata, invece, riscontrata alcuna variazione significativa tra 6 e 3 mesi di trattamento (1.11 ± 0.19 vs 1.10 ± 0.19 u.d., $p = ns$).

8.4 Valutazione dello stato di fosforilazione di ERK 1/2 in cellule mononucleate del sangue di pazienti ipertesi essenziali dopo 3 e 6 mesi di terapia con Olmesartan

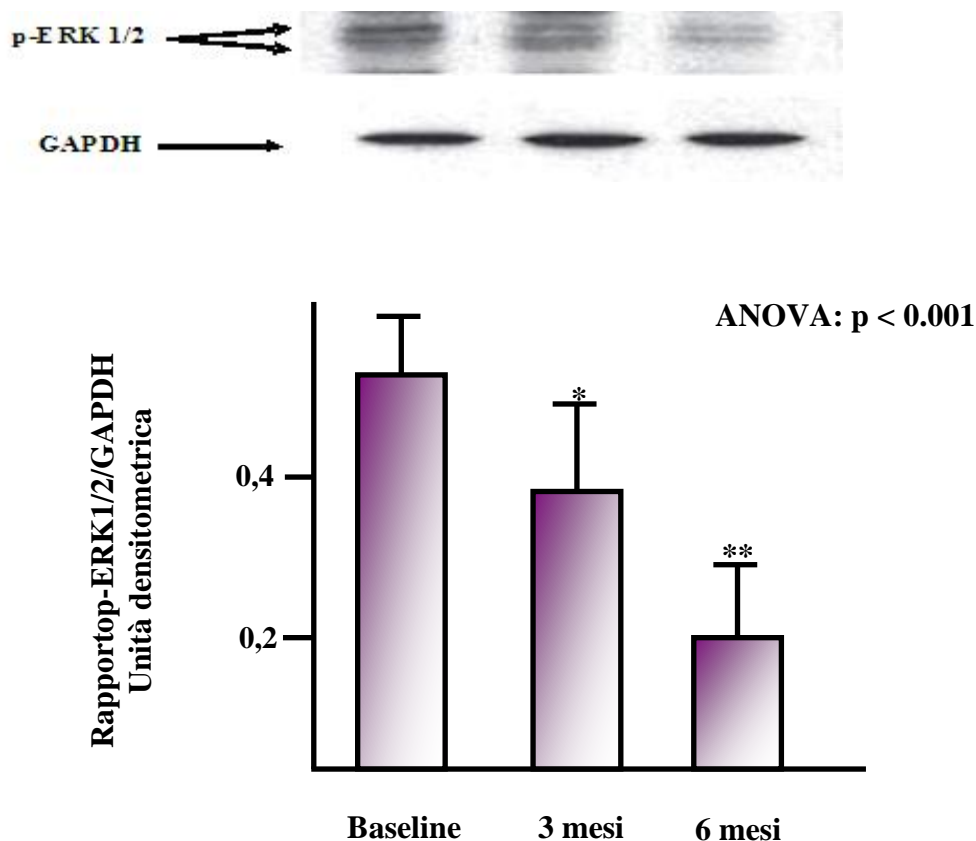


Figura 8.4.1: Espressione proteica di p-ERK1/2 in cellule mononucleate di pazienti ipertesi essenziali trattati con Olmesartan al baseline, 3 e 6 mesi. Anova a 0, 3 e 6 mesi di trattamento. Sopra, figura rappresentativa di Western Blot per p-ERK1/2 e GAPDH di un paziente iperteso a 0, 3 e 6 mesi di trattamento con Olmesartan. * $p = 0.001$ vs baseline, ** $p = 0.001$ vs baseline e 3 mesi.

Il trattamento con Olmesartan ha ridotto significativamente i livelli di fosforilazione di ERK1/2 in cellule mononucleate di pazienti ipertesi dopo 6 mesi di trattamento (ANOVA: $p < 0.001$) (Fig. 8.4.1). I livelli di p-ERK1/2 si riducono significativamente dopo 3 mesi di terapia rispetto al baseline (rispettivamente 0.39 ± 0.14 vs 0.56 ± 0.11 u.d., $p = 0.001$). Dopo 6 mesi di trattamento si riducono ulteriormente ed in maniera significativa sia rispetto al baseline (0.19 ± 0.08 vs 0.56 ± 0.11 , u.d., $p = 0.001$) che rispetto a 3 mesi (0.19 ± 0.08 vs 0.39 ± 0.14 , u.d., $p = 0.001$).

8.5 Valutazione della concentrazione plasmatica delle LDL ossidate di pazienti ipertesi essenziali dopo 3 e 6 mesi di terapia con Olmesartan

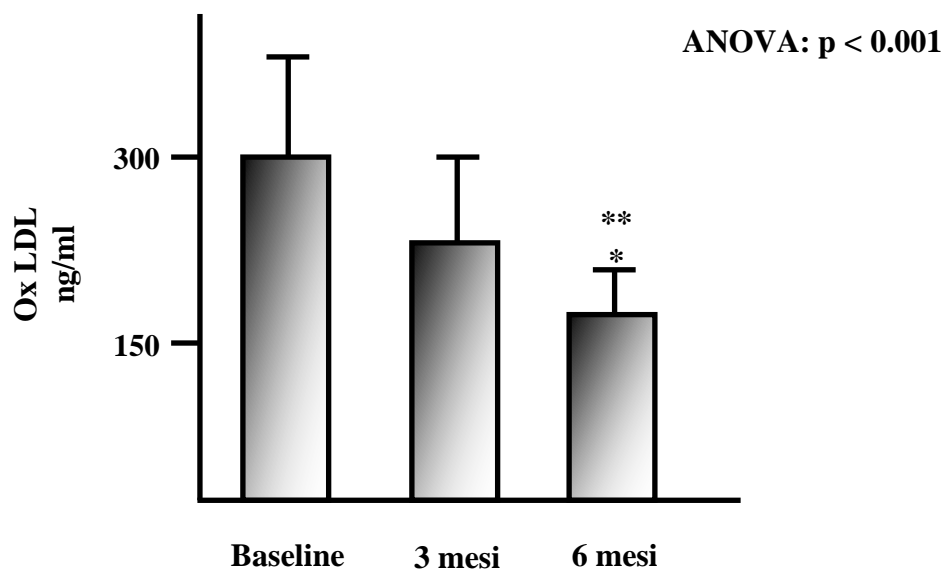


Figura 8.5.1: Valutazione dei livelli di LDL ossidate in plasma di pazienti ipertesi essenziali trattati con Olmesartan. ** $p = 0.001$ vs baseline; * $p = 0.002$ vs 3 mesi.

Il trattamento con Olmesartan è stato in grado di ridurre i livelli di LDL ossidate (oxLDL) (ANOVA: $p < 0.001$). In particolare, a 3 mesi si osserva una riduzione non significativa delle oxLDL (270.06 ± 100.34 vs 300.84 ± 109.13 ng/ml, $p = 0.06$) mentre a 6 mesi di trattamento la riduzione è risultata essere significativa sia rispetto al baseline (171.92 ± 61.83 vs 300.84 ± 109.13 ng/ml, $p = 0.001$) che rispetto a 3 mesi (171.92 ± 61.83 vs 270.06 ± 100.34 ng/ml, $p = 0.002$) (Fig. 8.5.1).

8.6 Valutazione dell'espressione proteica di HO-1 in cellule mononucleate del sangue della seconda coorte di pazienti ipertesi essenziali dopo 3 e 6 mesi di terapia con Olmesartan

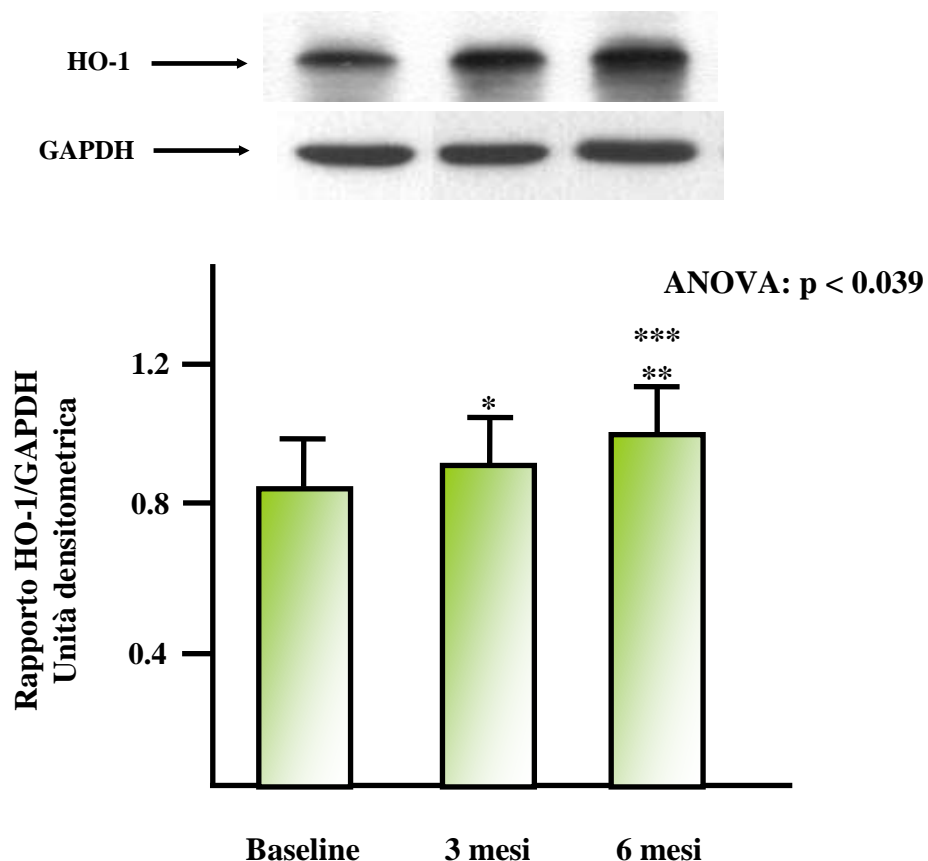


Figura 8.6.1: Espressione proteica di HO-1 in cellule mononucleate della seconda coorte di pazienti ipertesi essenziali trattati con Olmesartan al baseline, 3 e 6 mesi. Anova a 0, 3 e 6 mesi di trattamento. Sopra, figura rappresentativa di Western Blot per HO-1 e GAPDH di un paziente iperteso a 0, 3 e 6 mesi di trattamento con Olmesartan. *** $p = 0.0001$ vs baseline; ** $p = 0.01$ vs 3 mesi; * $p = 0.031$ vs baseline

In linea con i risultati sulla prima coorte di pazienti (vedi Fig. 8.3.1), il trattamento con Olmesartan ha aumentato i livelli di espressione proteica di HO-1 (ANOVA: $p < 0.039$) (Fig.8.6.1). L'espressione è risultata significativamente aumentata a 3 mesi rispetto al baseline (0.95 ± 0.21 vs 0.81 ± 0.21 u.d., $p = 0.031$). Tale aumento è risultato significativo anche a 6 mesi rispetto si al baseline (1.1 ± 0.26 vs 0.81 ± 0.21 u.d., $p = 0.001$) che a 3 mesi di trattamento con Olmesartan (1.1 ± 0.26 vs 0.95 ± 0.21 u.d., $p = 0.01$)

8.7 Valutazione della concentrazione plasmatica del peptide CGRP in pazienti ipertesi essenziali dopo 3 e 6 mesi di terapia con Olmesartan

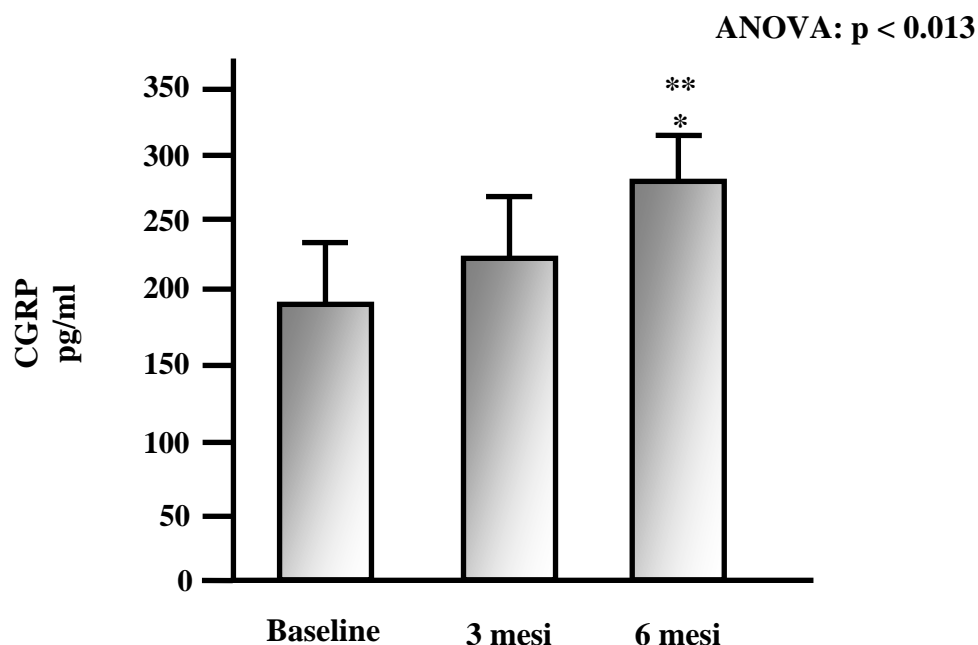


Figura 8.7.1: Livelli di concentrazione plasmatica del Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) in pazienti ipertesi essenziali in terapia con Olmesartan, al baseline, a 3 mesi e a 6 mesi di trattamento. ** $p = 0.0001$ vs baseline; * $p = 0.03$ vs 3 mesi.

Il trattamento con Olmesartan ha aumentato significativamente la concentrazione plasmatica di CGRP (ANOVA: $p < 0.013$) (Fig. 8.7.1).

Già a 3 mesi di trattamento si è osservato un aumento di CGRP (198.81 ± 51.98 pg/ml al baseline vs 218.97 ± 41.13 pg/ml a 3 mesi), ma a 6 mesi l'aumento è risultato significativo sia rispetto al baseline (263.91 ± 43.08 vs 198.81 ± 51.98 pg/ml, $p = 0.001$) che rispetto ai 3 mesi (263.91 ± 43.08 vs 218.97 ± 41.13 pg/ml, $p = 0.03$).

8.8 Effetto del trattamento con Olmesartan sul numero di cellule progenitrici endoteliali circolanti (EPC) in pazienti ipertesi essenziali dopo 3 e 6 mesi di terapia.

Come riportato in tabella 8.8.1, il trattamento con Olmesartan ha determinato un aumento del numero di cellule progenitrici circolanti espresse come CD34⁺KDR⁺, CD133⁺KDR⁺ e CD34⁺ CD133⁺KDR⁺. Tale aumento è risultato significativo dopo 6 mesi di trattamento sia rispetto al baseline che rispetto a 3 mesi.

	Baseline	3 mesi	6 mesi	
CD34 ⁺ KDR ⁺	35.11 ± 25.98	59.11 ± 35.30	112.89 ± 53.44 *§	ANOVA: p < 0.003 *p=0.005 vs baseline § p = 0.002 vs 3 mesi
CD133 ⁺ KDR ⁺	20.90 ± 14.58	49.50 ± 45.20	107.60 ± 37.09 *§	ANOVA: p < 0.0002 * p= 0.0001 vs baseline § p = 0.003 vs 3 mesi
CD34 ⁺ CD133 ⁺ KDR ⁺	3.67 ± 3.61	15.78 ± 18.59	38.11 ± 19.64 *§	ANOVA: p < 0.0028 * p= 0.0007 vs baseline § p = 0.0028 vs 3 mesi

Tabella 8.8.1: Numero assoluto di cellule progenitrici endoteliali circolanti, nelle tre diverse popolazioni considerate, in pazienti ipertesi essenziali durante i 6 mesi di trattamento con farmaco Olmesartan

Le figure 8.8.1, 8.8.2 e 8.8.3 sono una rappresentazione grafica di quanto riportato in tabella 8.8.1.

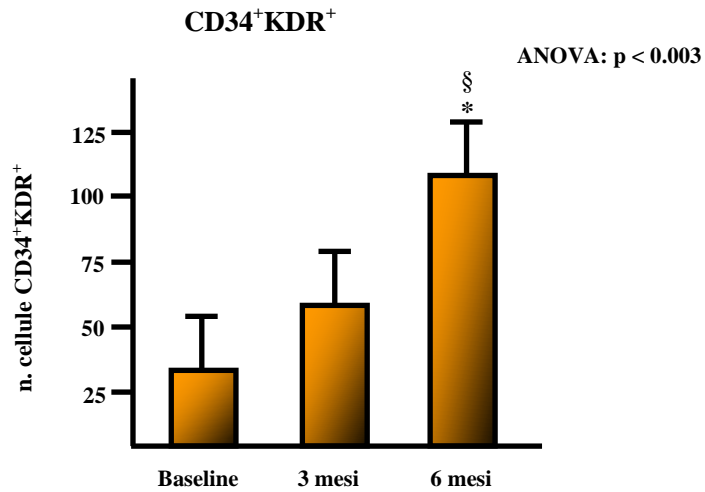


Figura 8.8.1: Numero di cellule CD34⁺KDR⁺ in pazienti ipertesi essenziali, in trattamento con Olmesartan, al baseline, 3 mesi e 6 mesi; * $p = 0.005$ vs baseline; § $p = 0.002$ vs 3 mesi.

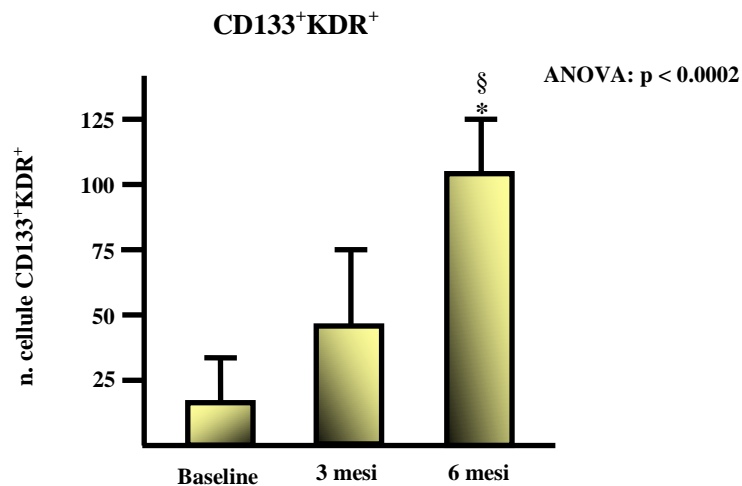


Figura 8.8.2: Numero di cellule CD133⁺KDR⁺ in pazienti ipertesi essenziali, in trattamento con Olmesartan, al baseline, 3 mesi e 6 mesi; * $p = 0.0001$ vs baseline; § $p = 0.003$ vs 3 mesi

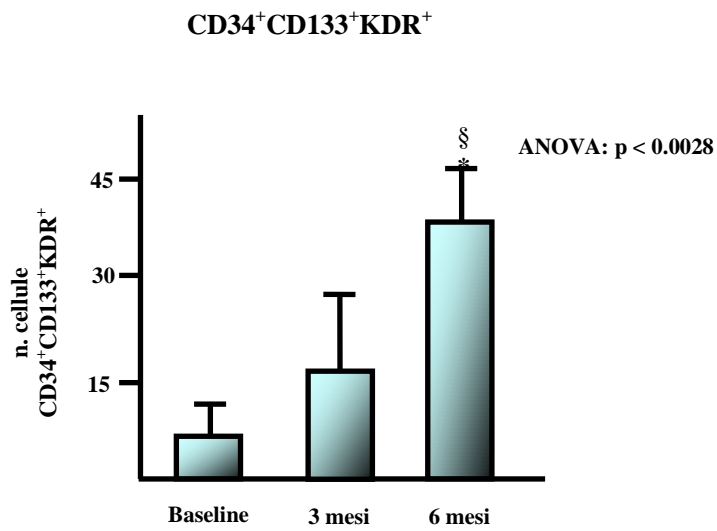


Figura 8.8.3: Numero di cellule CD34⁺133⁺KDR⁺ in pazienti ipertesi essenziali, in trattamento con Olmesartan, al baseline, 3 mesi e 6 mesi; * $p = 0.0007$ vs baseline; § $p = 0.0028$ vs 3 mesi

8.9 Effetto del trattamento con Olmesartan sull'apoptosi di cellule progenitrici endoteliali circolanti (EPC) in pazienti ipertesi essenziali dopo 3 e 6 mesi di terapia.

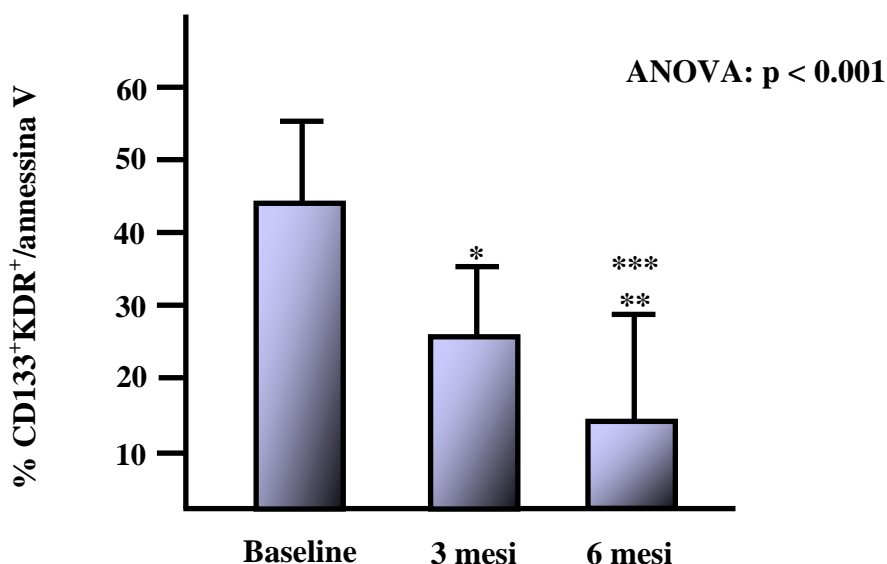


Figura 8.9.1: Valutazione dell'apoptosi delle cellule CD133⁺KDR⁺ in pazienti ipertesi essenziali al baseline, 3 mesi e 6 mesi di terapia con Olmesartan;*** p < 0.001 vs baseline; ** p < 0.004 vs 3 mesi; * p < 0.01 vs baseline.

L'apoptosi nelle cellule EPC è stata valutata misurando al citofluorimetro l'annexina V legata alla fosfatidilserina, marker precoce di apoptosi, espressa sulla superficie delle cellule CD133⁺KDR⁺.

Essa è risultata ridotta in seguito a trattamento con Olmesartan (ANOVA: p < 0.001) (Fig.8.9.1). In particolare la riduzione era significativa già a 3 mesi di trattamento con Olmesartan (27.24 ± 9.64% vs 44.28 ± 12.38%, p < 0.01) e si è ulteriormente ridotta significativamente a 6 mesi sia rispetto al baseline (16.83 ± 15.68% vs 44.28 ± 12.38%, p < 0.001) che rispetto a 3 mesi (16.83 ± 15.68% vs 27.24 ± 9.64%, p < 0.004).

CAPITOLO 9

DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Lo stress ossidativo svolge un ruolo centrale nella patofisiologia dell'ipertensione arteriosa e correla fenomeni quali il rimodellamento cardiovascolare e l'aterosclerosi, complicanze a lungo termine dell'ipertensione arteriosa (Luft FC et al, 2001; Harrison D et al, 2003; Griendling KK et al, 2000).

Il coinvolgimento dello stress ossidativo nella patofisiologia dell'ipertensione ha, quindi, spinto i ricercatori a valutare gli effetti di vari agenti farmacologici impiegati nel trattamento dell'ipertensione arteriosa sullo stress ossidativo (Moser M et al, 1998; Calò LA et al, 2002; Calò LA et al, 2004; Calò LA et al, 2006).

In particolar modo, dato il ruolo cruciale dell'Angiotensina II (Ang II) nell'induzione dello stress ossidativo via attivazione del sistema NADH/NADPH ossidasi, sempre più studi sono stati focalizzati sugli effetti antiossidanti di farmaci antiipertensivi che agiscono sul sistema Renina-Angiotensina (RAS), quali ad esempio gli ACE inibitori (ACEI's) e/o i bloccanti il recettore AT1R dell'Ang II (ARB's) (Calò LA et al, 2002; Izuhara Y et al, 2005).

L'Olmesartan Medoxomil, un bloccante del recettore AT1R dell'Ang II, ampiamente usato nel trattamento dell'ipertensione, è stato visto possedere importanti effetti antiossidanti, che correlano con l'attivazione del sistema dell'NO, e questo è stato dimostrato sia in vitro che in modelli sperimentali animali (Kadowaki D et al, 2007; Fliser D et al, 2005; Oyama N et al, 2010; Kanematsu Y et al, 2006).

Inoltre, ci sono diverse prove indirette, derivanti dai trials clinici condotti nell'uomo, che dimostrano come il farmaco Olmesartan mostri un effetto vasoprotettivo, antinfiammatorio e antiaterosclerotico, che può essere correlato al suo effetto inibitorio sullo stress ossidativo e sul signalling ad esso associato. Nello studio EUTOPIA è stato visto, infatti, che il trattamento con Olmesartan riduce significativamente i livelli di proteina C reattiva, TNF- α e IL-6, riconosciuti markers di infiammazione vascolare e di proteine correlate allo stato infiammatorio e allo stress ossidativo (Fliser D et al, 2004). Nello studio VIOS è stato dimostrato che il farmaco riduce il rapporto di ispessimento intima/lume, nei soggetti ipertesi essenziali, rispetto ai soggetti ipertesi non trattati, tanto da

riportare il rapporto ad un livello pari a quello dei normotesi (Smith RD et al, 2006). Una riduzione del volume delle placche aterosclerotiche nelle carotidi e nelle arterie coronarie è stato visto rispettivamente nello studio MORE (Stumpe KO et al 2007) e OLIVUS (Hirohata A et al, 2010), e questo avvalorava ulteriormente l'ipotesi di un effetto inibitorio sullo stress ossidativo e sul suo signalling come un meccanismo coinvolto negli effetti di Olmesartan osservati in questi studi.

I risultati dei nostri studi sono stati ottenuti *ex vivo* su cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC's). Queste cellule, infatti, sono ampiamente usate in biologia vascolare per studiare *ex vivo* i meccanismi fisiopatologici coinvolti nell'ipertensione e nel rimodellamento cardiovascolare, ed è sempre più riconosciuto il loro ruolo nei vari meccanismi infiammatori, come l'infiltrazione monocitaria, per lo sviluppo di danno d'organo, target dell'ipertensione (Hilgers KF, 2002). Inoltre, è stata dimostrata una correlazione tra stress ossidativo intracellulare leucocitario (cellule mononucleate e polimorfonucleate) ed ipertensione arteriosa (Yasunari K et al, 2002).

Questi tipi di cellule, quindi, sono un utile strumento per studiare i processi coinvolti nell'ipertensione e nello stress ossidativo, e per raccogliere informazioni di un fenomeno generalizzato che può essere esteso alla muscolatura liscia o alle cellule endoteliali, non di facile accesso come le cellule circolanti del sangue (Calò LA et al, 2011).

Nella prima fase del nostro studio, i risultati, ottenuti *ex vivo* su cellule mononucleate di pazienti con ipertensione essenziale, hanno dimostrato come il trattamento con Olmesartan riduce i livelli di espressione proteica di p22^{phox} e aumenta, invece, quella di HO-1; inoltre, riduce lo stato di fosforilazione di ERK1/2 e i livelli plasmatici delle LDL ossidate.

p22^{phox}, è una subunità dell'NADPH ossidasi, cruciale per la generazione di anione superossido (O_2^-); è inoltre, responsabile della riduzione della biodisponibilità di ossido nitrico (NO), in quanto l'NO reagisce con O_2^- per formare perossinitriti (ONOO⁻). Il nostro studio ha dimostrato che il trattamento con Olmesartan riduce i livelli di espressione proteica di p22^{phox} e questo dovrebbe portare ad una ridotta produzione di O_2^- , oltre che di altre specie reattive all'ossigeno (ROS), ad un incremento della biodisponibilità di NO e pertanto, fornire protezione nei confronti della disfunzione endoteliale mediata dallo stress

ossidativo, oltre che dal rimodellamento cardiovascolare, entrambe conosciute come complicanze a lungo termine dell'ipertensione arteriosa. Inoltre, la ridotta espressione di questa subunità, può anche dare una spiegazione razionale sulla riduzione, data dal trattamento con Olmesartan, dei livelli plasmatici di LDL ossidate, come dimostrato nel nostro studio.

L'aumento dell'espressione di HO-1, con Olmesartan, correla con un incremento dello stato antiossidante. HO-1 è l'isoforma inducibile di HO e la sua espressione aumenta in presenza di un aumento dello stato ossidativo. Essa è protettiva nei confronti nello stress ossidativo in quanto converte il gruppo eme in monossido di carbonio (CO) e biliverdina, che successivamente viene metabolizzata in bilirubina, un potente antiossidante. La produzione di CO, un efficace vasodilatatore, oltretutto, può contribuire alla regolazione del tono vascolare e regolare la pressione arteriosa, oltre che la funzione endoteliale. HO-1, per di più, è stato visto possedere effetti antiinfiammatori, antiproliferativi e antiaterosclerotici.

Un ulteriore marker di stress ossidativo è dato dalle LDL ossidate ed esse stesse rappresentano un importante fattore di rischio cardiovascolare. La dimostrazione data dal nostro studio che il trattamento con Olmesartan riduce la concentrazione di LDL ossidate plasmatiche rafforza l'ipotesi che questo farmaco riduce lo stress ossidativo.

La dimostrazione che il trattamento con Olmesartan aumenta l'espressione di HO-1 e riduce l'espressione proteica di p22^{phox} e i livelli di LDL ossidate in pazienti ipertesi essenziali, sottolinea l'effetto benefico di questo farmaco antiipertensivo sullo stress ossidativo e sull'infiammazione.

Le ERK, e il loro stato di fosforilazione, sono strettamente correlate con lo stress ossidativo e l'infiammazione. Esse rappresentano, infatti, un importante effettore nei processi indotti dallo stress ossidativo, che come ultima tappa portano al rimodellamento cardiovascolare e all'aterosclerosi. In particolare le ERK 1/2, facenti parte della famiglia delle MAPK, causano una risposta ipertrofica via fosforilazione di target nucleari (quali ad esempio c-myc, c-jun), portando sia ad un'alterata programmazione trascrizionale, sia ad un'espressione genica associata con l'ipertrofia. Il signalling intracellulare, attraverso i membri della famiglia delle MAPK, incluse le ERK 1/2, è stato fortemente correlato con la risposta ipertrofica cardiovascolare (Kim S et al, 2000).

La riduzione dei livelli di fosforilazione delle ERK 1/2 in cellule mononucleate di pazienti ipertesi essenziali, in trattamento con Olmesartan, incrementa gli effetti positivi che l'Olmesartan esercita sulle complicanze a lungo termine correlate allo stress ossidativo, come il rimodellamento cardiovascolare, e fornisce perciò una spiegazione meccanicistica ai dati ottenuti nello studio VIOS.

E' necessario sottolineare che l'interpretazione dei risultati di questo nostro primo studio, potrebbe essere inficiata dalla difficoltà nel determinare se gli effetti osservati in seguito a trattamento con l'Olmesartan, sono direttamente correlati al blocco del recettore AT1R dell'Ang II o relativi alla normalizzazione della pressione sanguigna. L'Ang II è ben conosciuta nel svolgere un ruolo chiave nella patofisiologia vascolare, soprattutto per quanto riguarda l'infiammazione e il rimodellamento cardiovascolare. Comunque, non è chiaro se questi meccanismi sono mediati da un effetto diretto dell'ormone o indiretto attraverso la sua influenza sull'emodinamica. È estremamente difficile, infatti, separare gli effetti derivanti dall'influenza dell'Ang II sulla regolazione del tono vascolare. Tuttavia, è stato dimostrato che l'infusione cronica di Ang II, indipendentemente dalle eventuali anomalie della pressione sanguigna, attiva un importante meccanismo di trascrizione che causa infiammazione vascolare e il rimodellamento (Zhan Y et al, 2005) e questo perciò va a rafforzare il concetto che l'Ang II svolge un ruolo diretto nell'infiammazione e nel rimodellamento cardiovascolare, via induzione di stress ossidativo (Mehta PK et al, 2007).

A seguito di queste considerazioni, gli effetti osservati in questo primo studio con Olmesartan, possono essere il risultato del suo effetto nel bloccare il recettore AT1R dell'Ang II, che rende così l'ormone disponibile per interagire con il recettore AT2R. Quest'ultimo recettore, infatti, se stimolato determina vasodilatazione, antiproliferazione e riduzione dell'infiammazione e, quindi, è in grado di controbilanciare gli effetti mediati dal legame dell'Ang II al recettore AT1R (Hansen JL et al, 2000).

Abbiamo recentemente dimostrato che il signalling dell'Ang II via recettore AT2R è attivato nei pazienti con sindrome di Bartter/Gitelman (BS/GS), un modello di iporeattività vascolare umana (Calò LA et al, 2010). La sindrome BS/GS è una malattia rara, causata da difetti genetici a livello di trasportatori renali e canali ionici specifici e nonostante questi pazienti presentino alti livelli plasmatici di Ang II e di aldosterone ed un aumento dell'attivazione del sistema

Renina-Angiotensina-Aldosterone (RAAS), sono normo-ipotesi ed hanno una ridotta resistenza periferica oltre che un'iporesponsività agli agenti pressori. I pazienti con BS/GS rappresentano perciò un modello umano endogeno di antagonismo al recettore AT1R dell'Ang II. Questi pazienti, infatti, nonostante l'attivazione del RAAS e l'aumento dei livelli di Ang II, sono protetti dagli effetti mediati dal signalling, sia a breve che a lungo termine, dell'Ang II via recettore AT1R. Nei pazienti con BS/GS si osserva uno sdoppiamento tra la pressione arteriosa e gli effetti mediati dall'Ang II e questo suggerisce che questi pazienti potrebbero fornire ulteriori indicazioni sul signalling dell'Ang II.

Studi da noi effettuati recentemente hanno dimostrato che, in pazienti con BS/GS il signalling dell'Ang II via recettore AT1R è ridotto, fornendoci così un'immagine speculare delle alterazioni osservate nell'ipertensione. Inoltre, abbiamo dimostrato che i pazienti BS/GS hanno un ridotto stress ossidativo (Calò LA et al, 1998), un aumento dell'espressione proteica di HO-1 (Calò LA et al, 2003), un'attivazione del sistema dell'NO (Calò LA et al, 1999; Calò LA et al, 1996), un incremento della vasodilatazione NO-dipendente (Calò LA et al, 2008), e assenza di rimodellamento cardiovascolare (Calò LA et al, 1999; Calò LA et al, 1996; Calò LA et al, 2009).

I risultati di questo primo studio con Olmesartan (Calò LA et al, 2011), insieme a quelli provenienti dai pazienti con BS/GS, confermano, quindi, ulteriormente il ruolo del signalling dell'Ang II via recettore AT2R e gli effetti dei bloccanti il recettore AT1R dell'Ang II (Siragy HM et al 2008).

Nella patofisiologia dell'ipertensione arteriosa, quindi, un ruolo importante è giocato dallo stress ossidativo e dalla disfunzione endoteliale da esso indotta, anche se può sicuramente non essere l'unica causa.

La disfunzione endoteliale definisce un quadro biochimico e molecolare complesso di infiammazione, proliferazione, alterazioni strutturali e funzionali dei vasi e le cellule progenitrici endoteliali circolanti (EPC) giocano un importante ruolo di protezione da queste alterazioni, le quali portano a lungo termine, a danno d'organo renale e cardiovascolare (Hill JM et al, 2003). E' ampiamente dimostrato il ruolo che svolge l'Ang II come potente induttore di stress ossidativo tramite l'attivazione dell'NADPH ossidasi ed il contributo che fornisce nell'instaurarsi dell'ipertensione e delle sue complicanze a lungo termine attraverso l'induzione della disfunzione endoteliale (Griendling KK et al, 2000;

Cai H et al, 2000). La funzione endoteliale, infatti, inclusa la vasodilatazione endotelio-dipendente ed il numero e funzione delle EPC, sono strettamente correlate (Imanishi T et al, 2005; Vasa M et al, 2001); questi parametri risultano alterati nell'ipertensione, e questa alterazione è causata in gran parte dallo stress ossidativo (Haendeler J et al, 2004; Plantinga Y et al, 2007).

La re-endotelializzazione di aree vascolari danneggiate è fisiologicamente raggiunta attraverso la proliferazione delle EPC, oltre che delle cellule endoteliali mature (Reidy MA et al, 1981; Werner N et al, 2002; Urbich et al, 2004). Il numero, la funzione e la capacità proliferativa delle EPC circolanti sono ridotti nell'ipertensione, e questa riduzione è considerata avere un importante ruolo nello sviluppo delle malattie cardiovascolari ed essere quindi predittive di eventi cardiovascolari (Vasa M et al, 2001; Hill JM et al, 2003).

Capire, perciò, i fattori che influenzano sia il numero che la funzione delle EPC ed in particolare la loro riduzione nell'ipertensione, è utile per fornire una conoscenza dei potenziali bersagli di terapie mirate, destinate a promuovere la normalizzazione della funzione vascolare attraverso la stimolazione di EPC circolanti (Calò LA et al, 2014).

Imanishi e collaboratori hanno dimostrato che l'incremento di stress ossidativo indotto da Ang II, causa un aumento dell'invecchiamento delle EPC circolanti, una loro ridotta sopravvivenza, oltre che presentare un'alterata capacità proliferativa (Imanishi T et al, 2005). È stato, inoltre, dimostrato che l'uso di bloccanti il recettore AT1R dell'Ang II, sono in grado di migliorare le disfunzioni di EPC, dando un'ulteriore prova che lo stress ossidativo, mediato da Ang II, influisce sul numero e funzione delle EPC, e conseguente disfunzione endoteliale (Imanishi T et al, 2005; Yao EH et al, 2007).

I risultati ottenuti nella seconda fase del nostro studio su cellule mononucleate di pazienti con ipertensione essenziale, dimostrano come il trattamento per 6 mesi con il farmaco Olmesartan aumenta il numero di EPC circolanti e ne riduce l'apoptosi aumentandone la sopravvivenza; questo per altro concorda con il fatto che c'è una riduzione dello stress ossidativo, come dimostrato nella prima fase del nostro studio (Calò LA et al, 2011).

Inoltre, il Calcitonin Gene-Related peptide (CGRP) plasmatico, un vasodilatatore che previene la senescenza delle EPC, capovolge la senescenza indotta dall'Ang II delle EPC e riduce la pressione arteriosa nei ratti spontaneamente ipertesi (Zhou et

al, 2010), è risultato aumentato in seguito a trattamento con Olmesartan e, confermando quanto dimostrato nella prima fase del nostro studio, questo va di pari passo con un aumento dell'HO-1.

Le EPC circolanti vengono generalmente identificate tramite specifici antigeni di superficie e analizzate o mediante citofluorimetria di flusso, o tramite un saggio che quantifica le colonie che si formano in vitro.

Il preciso criterio per identificare le EPC circolanti in citofluorimetria, rimane tutt'ora una questione controversa, anche se l'espressione combinata di almeno un marker di immaturità/staminalità, come il CD34 o CD133, e di almeno un antigene di origine endoteliale (di solito il KDR) è generalmente accettato come criterio stringente per l'identificazione delle EPC (Sen S et al, 2011).

E', però, difficile stabilire il differente significato biologico delle diverse popolazioni fenotipiche di EPC. Studi sperimentali hanno dimostrato come il numero di cellule EPC circolanti con fenotipo CD34⁺KDR⁺, sia inversamente correlato con eventi di danno vascolare e con l'incremento di rischio cardiovascolare (Fadini GP et al, 2008; Schmidt-Luke C et al 2005; Werner N et al, 2005), mentre le EPC circolanti con fenotipo CD133⁺KDR⁺ e CD34⁺133⁺KDR sono probabilmente correlate allo stato ossidativo cellulare e alla funzione endoteliale (Calò LA et al, 2011). Questo viene anche suggerito dai dati ottenuti nella seconda fase del nostro studio, in cui abbiamo evidenziato un aumento del numero, oltre che della sopravvivenza, di tutte queste popolazioni fenotipiche di EPC, in pazienti ipertesi essenziali trattati per 6 mesi con Olmesartan e collima con un buon quadro biochimico e molecolare della funzione endoteliale in termini di ridotto stress ossidativo e ridotta fosforilazione di ERK1/2 effettore dello stress ossidativo mediato dal signalling dell'Ang II per il rimodellamento cardiovascolare, come dimostrato nella prima fase del nostro studio (Calò LA et al, 2011). Tali dimostrazioni sono ulteriormente rafforzate dall'associazione tra l'aumento del numero di EPC e l'incremento dell'espressione proteica di HO-1 e del CGRP, in pazienti ipertesi essenziali trattati con Olmesartan, dimostrato nella seconda fase del nostro studio.

L'HO-1, infatti, oltre ad avere una potente attività antiossidante, antinfiammatoria (Kim YM et al, 2010; Stocker R et al, 2006) e a ridurre lo stress ossidativo indotto dall'Ang II (Datla SR et al, 2007), è stato dimostrato avere un effetto favorente la re-endotelializzazione, legato alla sua capacità sinergica di aumentare il numero di

EPC circolanti e di ridurre l'invecchiamento (Wu BJ et al, 2009). Il legame tra HO-1 ed EPC sembra essere il CGRP: è stato, infatti, dimostrato che l'induzione della molecola vasodilatante CGRP, che è ridotta nei pazienti ipertesi, previene la senescenza delle EPC, capovolge la senescenza delle EPC indotta da Ang II e porta alla riduzione della pressione arteriosa in ratti spontaneamente ipertesi (Zhou et al, 2010). La sintesi del CGRP è stimolata dall'HO-1/CO pathway e correlata alla produzione di NO (Peng J et al, 2002). Quest'ultima azione, in particolar modo, è legata alla capacità di HO-1 di essere un potente induttore del CGRP, peptide vasodilatatore, e la sua produzione è correlata sia alla produzione di NO (Peng J et al, 2002) che essere stimolato dall'HO-1/CO pathway; la sua espressione e sintesi è significativamente ridotta in pazienti ipertesi (Zhou et al, 2010) e questo rappresenta un ulteriore fattore di rischio per eventi cardiovascolari legati all'ipertensione; esso protegge l'endotelio, inibendo la proliferazione delle cellule muscolari lisce e previene l'invecchiamento delle EPC circolanti, indotta anche dall' Ang II (Zhou et al, 2010).

Dato che l'HO-1, oltre a ridurre lo stress ossidativo mediato dall' Ang II, che è determinante per l'invecchiamento delle cellule EPC circolanti, incrementa il numero di cellule EPC ed aumenta i livelli di CGRP, e considerato che il trattamento con Olmesartan aumenta negli ipertesi essenziali i livelli di HO-1 (Calò LA et al, 2011), non sorprende che l'Olmesartan possa essere in grado di aumentare il numero di EPC circolanti e la loro sopravvivenza verosimilmente via CGRP, come dimostrano i nostri studi.

Ulteriore supporto al ruolo dato dall'Olmesartan, e in generale dai bloccanti il recettore AT1R dell'Ang II, nell'aumento dei livelli di CGRP e nell'incremento del numero e della sopravvivenza delle EPC circolanti, è dato dagli studi sui con BS/GS, un modello umano di antagonismo endogeno al recettore AT1R. In questi pazienti, infatti, abbiamo recentemente dimostrato che c'è un aumento, oltre che una correlazione, tra numero di EPC circolanti e livelli di espressione proteica di HO-1 e, inoltre, i livelli plasmatici di CGRP sono aumentati e correlano con l'aumento dell'espressione proteica di HO-1 e delle EPC circolanti (Calò LA et al, 2011; Calò LA et al, 2012).

I risultati ottenuti nello studio oggetto della mia tesi di Dottorato, confermano, quindi, quelli ottenuti in un modello umano di antagonismo endogeno al recettore AT1R, e rafforzano l'importante relazione che c'è tra stress ossidativo/HO-

1/CGRP/EPC nell'ipertensione e nelle sue complicanze a lungo termine. Essi forniscono, quindi, un supporto meccanicistico razionale per l'effetto vasoprotettivo di Olmesartan, data la sua capacità di aumentare HO-1, CGRP e numero, funzione e sopravvivenza delle EPC circolanti, via riduzione di stress ossidativo indotto dall'Ang II (Calò LA et al, 2014).

Questo studio, perciò, dimostra che Olmesartan ha un'azione vasoprotettiva, determinata dal miglioramento della disfunzione endoteliale, che si realizza verosimilmente attraverso un aumento del numero e della sopravvivenza delle EPC, conseguenza della riduzione dello stress ossidativo indotto dall'Ang II, e mediato attraverso l'aumento dei livelli di HO-1 e di CGRP.

In conclusione, questi risultati, insieme a quelli ottenuti nella prima fase del nostro studio, stabiliscono che l'Olmesartan oltre a possedere proprietà anti-ossidanti, anti-infiammatorie e anti-remodeling, inibisce il signalling associato allo stress ossidativo e suggeriscono, perciò, un ruolo positivo di questo farmaco in termini di protezione dalla disfunzione endoteliale e dal rimodellamento cardiovascolare nei pazienti con ipertensione arteriosa essenziale. I nostri dati, inoltre, forniscono un razionale meccanicistico dell'azione anti-ossidante, anti-infiammatoria e vasoprotettiva, in grado di spiegare gli effetti anti-aterosclerotici, antiinfiammatori e di anti-remodeling riportati rispettivamente dai quattro trials clinici MORE (Stumpe KO et al 2007), OLIVUS (Hirohata A et al, 2010), EUTOPIA (Fliser D et al, 2004) e VIOS (Smith RD et al, 2006).

BIBLIOGRAFIA

Applegate LA, Luscher P, Tyrrell RM. Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. *Cancer Res.* 1991; 51(3): 974-8.

Aruoma OI, Halliwell B, Dizdaroglou M. Iron ion-dependent modification of bases in DNA by the superoxide radical generating system hypoxanthine/xanthine oxidase. *J Biol Chem* 1989; 264: 13024-13028.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275(5302):964-7.

Aslam S. Cardiovascular disease in dialysis patients: do some antihypertensive drugs have specific antioxidant effects or is it just blood pressure reduction? Does antioxidant treatment reduce the risk for cardiovascular disease? *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2008;17(1): 99-105. Review.

Assmus B, Schächinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Döbert N, Grünwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation.* 2002;106(24):3009-17.

Atlas SA. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm.* 2007;(13)[8 Suppl B]:9-20. Review.

Aust SD, Morehouse LA, Thomas CE. Role of metals in oxygen radical reaction. *Free Radic Biol Med* 1985; 1:13-8.

Babior BM. NADPH Oxidase. An Update. *Blood* 1999; 93(5):1464-1476.

Bahlmann FH, de Groot K, Mueller O, Hertel B, Haller H, Fliser D. Stimulation of endothelial progenitor cells: a new putative therapeutic effect of angiotensin II receptor antagonists. *Hypertension.* 2005;45(4):526-9.

Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99: 16093–16098.

Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996;271(5 Pt 1):C1424-37. Review.

Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature* 1993; 315-25. Review.

Birnboim HC, Kanabus-Kominska M. The production of DNA strand breaks in human leukocytes by superoxide may involve a metabolic process. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 82: 6820-6824.

Borger DR and Essig DA. Induction of HSP 32 gene in hypoxic cardiomyocytes is attenuated by treatment with N-acetyl-L-cysteine. *Am J Physiol.* 1998; 274 (Heart Circ. Physiol. 43): H965- H973.

Brosnan MJ, Hamilton CA, Graham D, Lygate CA, Jardine E, Dominiczak AF. Irbesartan lowers superoxide levels and increases nitric oxide bioavailability in blood vessels from spontaneously hypertensive stroke-prone rats. *J Hypertens.* 2002;20(2):281-6.

Cahilly C, Ballantyne CM, Lim DS, Gotto A, Marian AJ. A variant of p22^{phox}, involved in generation of reactive oxygen species in the vessel wall, is associated with progression of coronary atherosclerosis. *Circ Res.* 2000;86(4):391-5.

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular disease: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87:840-844.

Calò LA, Pagnin E, Davis PA, Sartori M and Semplicini A. Oxidative stress-related factors in Bartter's and Gitelman's syndromes: relevance for angiotensin II signaling. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 1518–1525.

Calò LA, Achille C, Pessina. RhoA/Rho-kinase pathway: much more than just a modulation of vasculat tone. Evidence from studies in humans. *Journal of Hypertension* 2007; 25; 259-64.

Calò LA, Bertipaglia L, Pagnin E, Davis PA, Sartori M, Semplicini A, Pessina AC. Effect of doxazosin on oxidative stress related proteins in essential hypertensive patients. *Clin Exp Hypertens.* 2006;28(2):181-8.

Calò LA, Dal Maso L, Caielli P, Pagnin E, Fusaro M, Davis PA, Pessina AC. Effect of olmesartan on oxidative stress in hypertensive patients: mechanistic support to clinical trials derived evidence. *Blood Press.* 2011;20(6):376-82.

Calò LA, Dal Maso L, Pagnin E, Ravarotto V, Facco M, Boscaro E, Maiolino G, Pessina AC, Rossi GP. Effect of olmesartan medoxomil on number and survival of circulating endothelial progenitor cells and calcitonin gene related peptide in hypertensive patients. *J Hypertens.* 2014;32(1):193-9

Caló LA, D'Angelo A, Cantaro S, Bordin MC, Favaro S, Antonello A, Borsatti A. Increased urinary NO₂-/NO₃- and cyclic guanosine monophosphate levels in patients with Bartter's syndrome: relationship to vascular reactivity. *Am J Kidney Dis.* 1996;27(6):784-9.

Calò LA, Davis PA, Giacom B, Pagnin E, Sartori M, Riegler P, Antonello A, Huber W, Semplicini A. Oxidative stress in kidney transplant patients with calcineurin inhibitor-induced hypertension: effect of ramipril. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2002;40(4):625-31.

Calò LA, Davis PA, Milani M, Cantaro S, Antonello A, Favaro S, D'Angelo A. Increased endothelial nitric oxide synthase mRNA level in Bartter's and Gitelman's syndrome. Relationship to vascular reactivity. *Clin Nephrol.* 1999; 51(1):12-7.

Calò LA, Davis PA, Pagnin E, Dal Maso L, Caielli P, Rossi GP. Calcitonin gene-related peptide, heme oxygenase-1, endothelial progenitor cells and nitric oxide-dependent vasodilation relationships in a human model of angiotensin II type-1 receptor antagonism. *J Hypertens*. 2012;30(7):1406-13.

Calò LA, Davis PA, Pagnin E, Schiavo S et al. Linking inflammation and hypertension in humans: studies in Bartter's/Gitelman's syndrome patients. *J Hum Hypertens*. 2007; (22): 223-25.

Calò LA, Facco M, Davis PA, Pagnin E, Maso LD, Puato M, Caielli P, Agostini C, Pessina AC. Endothelial progenitor cells relationships with clinical and biochemical factors in a human model of blunted angiotensin II signaling. *Hypertens Res*. 2011;34(9):1017-22.

Calò LA, Giacon B, Davis PA, Pagnin E, Piccin A, Riegler P, Huber W, Antonello A, Semplicini A. Oxidative stress and TGFbeta in kidney-transplanted patients with cyclosporin-induced hypertension. Effect of carvedilol and nifedipine. *Clin Nephrol*. 2002;58(2):103-10.

Calò LA, Montisci R, Scognamiglio R, Davis PA, Pagnin E, Schiavo S, Mormino P, Semplicini A, Palatini P, D'Angelo A, Pessina AC. High angiotensin II state without cardiac remodeling (Bartter's and Gitelman's syndromes): are angiotensin II type 2 receptors involved? *J Endocrinol Invest*. 2009;32(10):832-6.

Calò LA, Pagnin E, Davis PA, Sartori M, Semplicini A. Oxidative stress-related factors in Bartter's and Gitelman's syndromes: relevance for angiotensin II signalling. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18(8):1518-25.

Calò LA, Puato M, Schiavo S, Zanardo M, Tirrito C, Pagnin E, Balbi G, Davis PA, Palatini P, Pauletto P. Absence of vascular remodelling in a high angiotensin-II state (Bartter's and Gitelman's syndromes): implications for angiotensin II signalling pathways. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(9):2804-9.

Calò LA, Sartore G, Bassi A, Basso C, Bertocco S, Marin R, Zambon S, Cantaro S, D'Angelo A, Davis PA, Manzato E, Crepaldi G. Reduced susceptibility to oxidation of low-density lipoprotein in patients with overproduction of nitric oxide (Bartter's and Gitelman's syndrome). *J Hypertens*. 1998;16(7):1001-8.

Calò LA, Schiavo S, Davis PA, Pagnin E, Mormino P, D'Angelo A; Pessina A. Angiotensin II signaling via type 2 receptors in human model of vascular hyporeactivity: implications for hypertension. *Journal of Hypertension* 2010; 28; 111-18.

Calò LA, Zaghetto F, Pagnin E, Davis PA, Semplicini A, Pessina AC. Effect of manidipine on gene expression and protein level of oxidative stress-related proteins: p22phox and HO-1: relevance for antihypertensive and anti-remodeling effects. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004;43(4):531-8.

Calò LA. Radicali liberi, superossidi, e stress ossidativo nella patogenesi e fisiopatologia dell'ipertensione arteriosa e delle sue complicanze. *Current Therapeutics ADIS International* 1999;1-8.

- Calò LA.** Vascular tone control in humans: insights from studies in Bartter's/Gitelman's syndromes. *Kidney Int.* 2006;69(6):963-6.
- Celermajer DS,** Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet.* 1992;340(8828):1111-5.
- Chan H,** Loughed M, Laher I, Steinbrecher UP. Oxidized low-density lipoprotein inhibits endothelium-dependent vasodilation by an antioxidant-sensitive, lysophosphatidylcholine-independent mechanism. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003;41(6):856-65.
- Chattergoon NN,** D'Souza FM, Deng W, Chen H, Hyman AL, Kadowitz PJ, Jeter JR Jr. Antiproliferative effects of calcitonin gene-related peptide in aortic and pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;288(1):L202-11.
- Chen X,** Touyz RM, Park JB, Schiffrin EL. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension.* 2001;38(3 Pt 2):606-11.
- Cheng J,** Baumhueter S, Cacalano G, Carver-Moore K, Thibodeaux H, Thomas R, Broxmeyer HE, Cooper S, Hague N, Moore M, Lasky LA. Hematopoietic defects in mice lacking the sialomucin CD34. *Blood.* 1996;87(2):479-90.
- Cheng ZJ,** Vapaatalo H, Mervaala E. Angiotensin II and vascular inflammation. *Medical Science Monitor* 2005; 6; 194-205.
- Choi AMK** e Alam J. Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein. *Am J Respir Cell Biol.* 1996; 15: 9-19.
- Chung O,** Unger T. Unopposed stimulation of the angiotensin AT2 receptor in the kidney. *Nephrol Dial Transplant.* 1998;13(3):537-40. Review.
- Clark JE,** Foresti R, Sarathchandra P, Kaur H, Green CJ, Motterlini R. Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction. *Am J Physiol.* 2000;278:H643-H651.
- Clementi E.** Role of nitric oxide and its intracellular signalling pathways in the control of Ca²⁺ homeostasis. *Biochem Pharmacol.* 1998 ;55; 713-8. Review.
- 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(2):257-65.

Cosentino F, Savoia C, De Paolis P, Francia P, Russo A, Maffei A, Venturelli V, Schiavoni M, Lembo G, Volpe M. Angiotensin II type 2 receptors contribute to vascular responses in spontaneously hypertensive rats treated with angiotensin II type 1 receptor antagonists. *Am J Hypertens*. 2005;18(4 pt 1):493-9.

Daff S. NO synthase: structures and mechanisms. *Nitric Oxide* 2010; 23:1-11.

Das UN. Is angiotensin-II an endogenous pro-inflammatory molecule? *Med Sci Monit* 2005; (11): 155-162 .

Datla SR and Griendling KK. Reactive oxygen species, NADPH Oxidases, and Hypertension. *Hypertension* 2010; 56: 325-30.

Datla SR, Justing GJ, Mori TA, Taylor CJ, Kroft KD and Jiang F. Induction of heme-oxygenase-1 in vivo suppresses NADPH oxidase-derived oxidative stress. *Hypertension* 2007; 50:636-642.

Davis KL, Martin E, Turko IV, Murad F. Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:203-36. Review.

Davis MJ, Hill MA. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev*. 1999;79(2):387-423. Review.

Deng PY, Li YJ. Calcitonin gene-related peptide and hypertension. *Peptides*. 2005;26(9):1676-85. Review.

Descamps-Latscha B, Druke T, Witko-Sarsat V. Dialysis-induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences, and therapy. *Semin Dial*. 2001; 14: 193-9.

Dinh DT, Albert G.F, Colin IJ, and Fabiani ME. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clinical science* 2001; (100): 481-92.

Dubey RK, Jackson EK, Lüscher TF. Nitric oxide inhibits angiotensin II-induced migration of rat aortic smooth muscle cell. Role of cyclic-nucleotides and angiotensin 1 receptors. *J Clin Invest*. 1995;96(1):141-9.

Durante W. Carbon monoxide and bile pigments: surprising mediators of vascular function. *Vasc Med* 2002; 7(3): 195-202.

Dzau VJ. Tissue Angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. *Hypertension* 2001; (37): 1047-52.

Eizawa Z, Yui Y, Inoue R, et al. Lysophosphatidylcholine inhibits endothelium-dependent hyperpolarization and N omega-nitro-l-arginine/indomethacin-resistant endothelium-dependent relaxation in the porcine coronary artery. *Circulation* 1995 ; 92 : 3520-3526.

Fadini GP, Baesso I, Albiero M, Sartore S, Agostini C, Avogaro A. Technical notes on endothelial progenitor cells: ways to escape from the knowledge plateau. *Atherosclerosis*. 2008;197(2):496-503.Review.

Finkel T and Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408: 239-247.

Fliser D, Buchholz K, Haller H; EUropean Trial on Olmesartan and Pravastatin in Inflammation and Atherosclerosis (EUTOPIA) Investigators. Antiinflammatory effects of angiotensin II subtype 1 receptor blockade in hypertensive patients with microinflammation. *Circulation*. 2004;110(9):1103-7.

Fliser D, Wagner KK, Loos A, Tsikas D, Haller H. Chronic angiotensin II receptor blockade reduces (intra)renal vascular resistance in patients with type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(4):1135-40.

Friedrich EB, Walenta K, Scharlau J, Nickenig G, Werner N. CD34-/CD133+/VEGFR-2+ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities. *Circ Res*. 2006;98(3):e20-5.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-6.

Galle J, Hansen-Hagge T, Wanner C, Seibold S. Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells. *Atherosclerosis*. 2006; 185(2): 219-26.

Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth*. 2004;93(1):105-13. Review.

Gangula PR, Zhao H, Supowit SC, Wimalawansa SJ, Dipette DJ, Westlund KN, Gagel RF, Yallampalli C. Increased blood pressure in alpha-calcitonin gene-related peptide/calcitonin gene knockout mice. *Hypertension*. 2000;35(1 Pt 2):470-5.

Gehling UM, Ergün S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schäfer B, Hossfeld DK, Fiedler W. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood*. 2000;95(10):3106-12.

Griendling KK, Alexander RW. Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation*. 1997;96(10):3264-5.

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(6):1141-8.

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(10):2175-83. Review.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 2000;86(5):494-501. Review.

- Haagenson KK**, Wu GS. Mitogen activated protein kinase phosphatases and cancer. *Cancer Biol Ther.* 2010;9(5):337-40.
- Hadi HA**, Carr CS, Al Suwaidi J. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc Health Risk Manag.* 2005;1(3):183-98. Review.
- Haendeler J**, Hoffmann J, Diehl JF, Vasa M, Spyridopoulos I, Zeiher AM, Dimmeler S. Antioxidants inhibit nuclear export of telomerase reverse transcriptase and delay replicative senescence of endothelial cells. *Circ Res.* 2004;94(6):768-75.
- Hansen JL**, Servant G, Baranski TJ, Fujita T, Iiri T, Sheikh SP. Functional Reconstitution of the Angiotensin II Type 2 Receptor and Gi Activation. *Circ Res.* 2000; 87:753-759.
- Harrison D**, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol.* 2003; (91)(3A):7A-11A. Review.
- Haurani MJ**, Pagano PJ. Adventitial fibroblast reactive oxygen species as autocrine and paracrine mediators of remodeling: bellwether for vascular disease? *Cardiovasc Res.* 2007;75(4):679-89. Review.
- Hein L**, Barsh GS, Pratt RE, Dzau VJ, Kolbilka BK. Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type 2 receptor in mice. *Nature* 1995; 377 (6551): 744-7.
- Heiss C**, Keymel S, Niesler U, Ziemann J, Kelm M, Kalka C. Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45(9):1441-8.
- Hill JM**, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2003;348(7):593-600.
- Hirohata A**, Yamamoto K, Miyoshi T, Hatanaka K, Hirohata S, Yamawaki H, Komatsubara I, Murakami M, Hirose E, Sato S, Ohkawa K, Ishizawa M, Yamaji H, Kawamura H, Kusachi S, Murakami T, Hina K, Ohe T. Impact of olmesartan on progression of coronary atherosclerosis a serial volumetric intravascular ultrasound analysis from the OLIVUS (impact of OLMesarten on progression of coronary atherosclerosis: evaluation by intravascular ultrasound) trial. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55(10):976-82.
- Honda A**, Matsuura K, Fukushima N, Tsurumi Y, Kasanuki H, Hagiwara N. Telmisartan induces proliferation of human endothelial progenitor cells via PPARgamma-dependent PI3K/Akt pathway. *Atherosclerosis.* 2009;205(2):376-84.
- Horiuchi M**, Koike G, Yamada T, Mukoyama M, Nakajima M, Dzau VJ. The growth-dependent expression of angiotensin II type 2 receptor is regulated by transcription factors interferon regulatory factor-1 and -2. *J Biol Chem.* 1995;270(34):20225-30.

Ichiki T, Kambayashi Y, Inagami T. Multiple growth factors modulate mRNA expression of angiotensin II type-2 receptor in R3T3 cells. *Circ Res.* 1995; 77(6): 1070-76.

Imanishi T, Hano T, Nishio I. Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress. *J Hypertens.* 2005;23(1):97-104.

Imanishi T, Moriwaki C, Hano T, Nishio I. Endothelial progenitor cell senescence is accelerated in both experimental hypertensive rats and patients with essential hypertension. *J Hypertens.* 2005;23(10):1831-7.

Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res.* 2000;87(3):179-83. Review.

Izuhara Y, Nangaku M, Inagi R, Tominaga N, Aizawa T, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C, Miyata T. Renoprotective properties of angiotensin receptor blockers beyond blood pressure lowering. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(12):3631-41.

Johns DG, Dorrance AM, Leite R, Weber DS, Webb RC. Novel signaling pathways contributing to vascular changes in hypertension. *J Biomed Sci.* 2000; (6):431-43.

Kadowaki D, Anraku M, Tasaki Y, Kitamura K, Wakamatsu S, Tomita K, Gebicki JM, Maruyama T, Otagiri M. Effect of olmesartan on oxidative stress in hemodialysis patients. *Hypertens Res.* 2007;30(5):395-402.

Kamata H, Hirata H. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal.* 1999;11(1):1-14.

Kanematsu Y, Tsuchiya K, Ohnishi H, Motobayashi Y, Izawa Y, Ishihara M, Ishizawa K, Abe S, Kawazoe K, Tamaki T. Effects of angiotensin II type 1 receptor blockade on the systemic blood nitric oxide dynamics in Nomega-nitro-L-arginine methyl ester-treated rats. *Hypertens Res.* 2006;29(5):369-74.

Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, Asahara T. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation.* 2001;103(5):634-7.

Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev.* 2000;52(1):11-34. Review.

Kim YM, Pae HO, Park JE, Lee YC, Woo JM, Kim NH, Choi YK, Lee BS, Kim SR, Chung HT. Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(1):137-67.

Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med.* 2001;7(4):430-6.

Koike G, Horiuchi M., Yamada T, Szpirer C, Jacob H.J, and Dzau VJ. Human type 2 angiotensin II receptor gene:cloned, mapped to the X chromosome, and its mRNA is expressed in the human lung. *Biochem Biophys. Res. Commun* 1994; 203(3):1842-50.

Lad L, Schuller DJ, Shimizu H, Friedman J, Li H, Ortiz de Montellano PR, Poulos TL. Comparison of the heme free and bound crystal structures of human heme oxygenase-1. *The Journal of the Biological Chemistry* 2003; 278 (10): 7834- 7843.

Landmesser U, Harrison DG.. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Coron Artery Dis.* 2001 Sep;12(6):455-61.

Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation.* 2004;109(21 Suppl 1):II27-33. Review.

Lee TS, Chau LY. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med.* 2002;8(3):240-6.

Li JY, Avallet O, Berthelon MC, Langlois D, Saez JM. Effects of growth factors on cell proliferation and angiotensin II type 2 receptor number and mRNA in PC12W and R3T3 cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1998;139(1-2):61-9.

Libby P, Aikawa M, Jain MK. Vascular endothelium and atherosclerosis. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;(176 Pt 2):285-306. Review.

Lin CP, Lin FY, Huang PH, Chen YL, Chen WC, Chen HY, Huang YC, Liao WL, Huang HC, Liu PL, Chen YH. Endothelial progenitor cell dysfunction in cardiovascular diseases: role of reactive oxygen species and inflammation. *Biomed Res Int.* 2013;2013:845037. Review.

Luft FC. Mechanism and cardiovascular damage in hypertension. *Hypertension.* 2001;(37) [part 2]:594-98.

Lum H, Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;280(4):C719-41.

Maines MD. The heme oxygenase system and its functions in the brain. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2000; 46; 573-85. Review.

Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37: 517–554.

Majzunova M, Dovinova I, Barancik M and Chan JYH. Redox signaling in pathophysiology of hypertension. *Journal of Medical Bioscience* 2013; 20-69. Review.

Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem*. 1993; 23:17478-88.

Marti CN, Gheorghide M, Kalogeropoulos AP, Georgiopoulou VV, Quyyumi AA, Butler J. Endothelial dysfunction, arterial stiffness, and heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(16):1455-69. Review.

Masuko UF, Maziar ZA, Toshiki F. p22^{phox} Is a Critical Component of the Superoxide-generating NADH/NADPH Oxidase System and Regulates Angiotensin II – Induced Hypertrophy in Vascular Smooth Muscle Cells. *J Biol Chem* 1996; 271(38): 23317-23321.

Mehta PK. and Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292; c82-c97.

Meisinger C, Baumert J, Khuseyinova N, Loewel H, Koenig W. Plasma oxidized low-density lipoprotein, a strong predictor for acute coronary heart disease events in apparently healthy, middle-aged men from the general population. *Circulation* 2005; 112: 651-657.

Minamino T, Christou H, Hsieh CM, Liu Y, Dhawan V, Abraham NG, Perrella MA, Mitsialis SA, Kourembanas S. Targeted expression of heme oxygenase-1 prevents the pulmonary inflammatory and vascular responses to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(15):8798-803.

Modlinger P, Chabrashvili T, Gill PS, Mendonca M, Harrison DG, Griendling KK, Li M, Raggio J, Wellstein A, Chen Y, Welch WJ, Wilcox CS. RNA silencing in vivo reveals role of p22^{phox} in rat angiotensin slow pressor response. *Hypertension*. 2006;47(2):238-44.

Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993; 27: 2002-12. Review.

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

Morena M, Martin-Mateo M, Cristol JP, Canaud B. Rationale for antioxidant supplementation in hemodialysis patients. *Saudi J Kidney Dis Transplant* 2001;12(3): 312-324.

Morita T, Perrella MA, Lee M et al. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995; 92:1475-1479.

Moser M, Frishman W. Results of therapy with carvedilol, a beta-blocker vasodilator with antioxidant properties, in hypertensive patients. *Am J Hypertens*. 1998 ;11(1 Pt 2):15S-22S. Review.

Mukoyama M, Nakajima M., Horichi M., Sasamura H., Pratt R., Dzau VJ. Expression cloning of type angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol. Chem* 1993; 268 (33): 24539-42.

Nath KA, Grande J, Croatt A, Haugen J, Kim Y, Rosenberg ME. Redox regulation of renal DNA synthesis, transforming growth factor-beta1 and collagen gene expression. *Kidney Int.* 1998;53(2):367-81.

Nath KA. Heme oxygenase-1: A provenance for cytoprotective pathways in the kidney and other tissues. *Kidney International* 2006; 70: 432-443.

Nuoet S, Nahmias C. Signal transduction from the angiotensin II AT2 receptor. *Trend Endocrinol Metab.* 2000; 11; 1-6.

Ohkubo N, Matsubara H, Nozawa Y. Angiotensin type 2 receptors are reexpressed by cardiac fibroblast from failing myopathic hamster hearts and inhibit cell growth and fibrillar collagen metabolism. *Circulation* 1997; 96(11): 3954-62.

Ohta K, Yachie A. Development of vascular biology over the past 10 years: heme oxygenase-1 in cardiovascular homeostasis. *J Endovasc Ther* 2004; 11 Suppl 2: II140-150.

Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, Bach FH. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol.* 2003;24(8):449-55. Review.

Oyama N, Yagita Y, Sasaki T, Omura-Matsuoka E, Terasaki Y, Sugiyama Y, Sakoda S, Kitagawa K. An angiotensin II type 1 receptor blocker can preserve endothelial function and attenuate brain ischemic damage in spontaneously hypertensive rats. *J Neurosci Res.* 2010;88(13):2889-98.

Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L- arginine. *Nature.* 1988;(16):664-6.

Papparella I, Ceolotto G et al. Angiotensin II-induced over-activation of p47^{phox} in fibroblasts from hypertensives: which role in the enhanced ERK1/2 responsiveness to angiotensin II? *J Hypertens.* 2005;23(4):793-800.

Patti G, Melfi R, Di Sciascio G. The role of endothelial dysfunction in the pathogenesis and in clinical practice of atherosclerosis. Current evidences. *Recenti Prog Med.* 2005;96(10):499-507. Review. Italian.

Peng J, Lu R, Ye F, Deng HW, Li YJ. The heme oxygenase-1 pathway is involved in calcitonin gene-related peptide-mediated delayed cardioprotection induced by monophosphoryl lipid A in rats. *Regul Pept.* 2002;103(1):1-7.

Plantinga Y, Ghiadoni L, Magagna A, Giannarelli C, Franzoni F, Taddei S, Salvetti A. Supplementation with vitamins C and E improves arterial stiffness and endothelial function in essential hypertensive patients. *Am J Hypertens.* 2007;20(4):392-7.

Qin XP, Ye F, Hu CP, Liao DF, Deng HW, Li YJ. Effect of calcitonin gene-related peptide on angiotensin II-induced proliferation of rat vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* 2004;488(1-3):45-9.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1987; 92: 639-46.

Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, Nishigaki I. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci.* 2013;9(10):1057-69.

Raman M, Chen W and Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 2007; 26: 3100-3112.

Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Davis BH, Wang T, Gregg D, Ramaswami P, Pippen AM, Annex BH, Dong C, Taylor DA. Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation.* 2003;108(4):457-63.

Reidy MA, Schwartz SM. Endothelial regeneration. III. Time course of intimal changes after small defined injury to rat aortic endothelium. *Lab Invest.* 1981;44(4):301-8.

Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein Kinase pathways. *Current opinion in cell biology.* 1997; 9:180-186.

Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol.* 1986;250(5 Pt 2):H822-7.

Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rperetz M, Konig S, Wittig B, Egido J. Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappa b through AT1 and AT2 in vascular smooth muscle cells: molecular mechanism. *Circ Res* 2000; 86; 1266-72.

Ruster C and Wolf G. Renin-Angiotensin-Aldosterone system and progression of renal disease. *Am Soc Nephrol* 2006; (17):2985-91.

Ruster C and Wolf G.. Angiotensin II as a morphogenic cytokine stimulating renal fibrogenesis. *J Am Soc Nephrol.* 2011; (22):1189-99.

Ryter SW, Morse D, Choi AMK. Carbon monoxide and bilirubin potential therapies for pulmonary/vascular injury and disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36: 175–182.

Schiffrin EL, Park JB, Pu Q. Effect of crossing over hypertensive patients from a beta-blocker to an angiotensin receptor antagonist on resistance artery structure and on endothelial function. *J Hypertens.* 2002;20(1):71-8.

Schiffrin EL. Vascular and cardiac benefits of angiotensin receptor blockers. *Am J Med.* 2002;113(5):409-18. Review.

Schmidt-Luke C, Rossig L, Fichtlscherer S et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predict future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation* 2005; 111:2981-7.

Semplicini A, Lenzini L, Sartori M, Papparella I, Calò LA, Pagnin E, Strapazzon G, Benna C, Costa R, Avogaro A, Ceolotto G, Pessina AC. Reduced expression of regulator of G-protein signaling 2 (RGS2) in hypertensive patients increases calcium mobilization and ERK1/2 phosphorylation induced by angiotensin II. *J Hypertens*. 2006;24(6):1115-24.

Sen S, Mc Donald SP, Coates PT, Bonder CS. Endothelial progenitor cells: novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease. *Clin Sci* 2011; 120:263-283.

Shenoy UV, Richards EM, Huang XC, Sumners C. Angiotensin II type 2 receptor-mediated apoptosis of cultured neurons from newborn rat brain. *Endocrinology* 1999; 140: 500-09.

Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1985;311(1152):617-31.

Sies H. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr*. 1991;69(21-23):965-8.

Silverstein RL. Inflammation, atherosclerosis, and arterial thrombosis: role of the scavenger receptor CD36. *Cleve Clin J Med*. 2009;76 (Suppl 2):S27-30.

Siragy HM, Carey RM. The subtype 2 (AT2) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J Clin Invest*.1997; 100; 264-69.

Siragy HM, Jaffa AA, Margolius HS, Carey RM. Renin-angiotensin system modulates renal bradykinin production. *Am J Physiol Reg Int Comp Physiol*.1996; 271 (pt 2): 1090-95.

Siragy HM. Evidence for benefits of angiotensin receptor blockade beyond blood pressure control. *Curr Hypertens Rep*. 2008;10(4):261-7. Review.

Sirker A, Zhang M, Murdoch C, Shah AM. Involvement of NADPH oxidases in cardiac remodelling and heart failure. *Am J Nephrol*. 2007; 27(6): 649-60.

Smillie SJ, Brain SD. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and its role in hypertension. *Neuropeptides*. 2011;45(2):93-104.

Smith RD, Yokoyama H, Averill DB, Cooke L, Brosnihan KB, Schiffrin EL, Ferrario CM. The protective effects of angiotensin II blockade with olmesartan medoxomil on resistance vessel remodeling (The VIOS study): rationale and baseline characteristics. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2006;6(5):335-42.

Stocker R, Perrella MA. Heme-oxygenase-1: a novel drug target for atherosclerotic diseases? *Circulation* 2006; 114 (20): 2178-89.

Strawn WB, Chappell MC, Dean RH, Kivlighn S, Ferrario CM. Inhibition of early atherogenesis by losartan in monkeys with diet-induced hypercholesterolemia. *Circulation*. 2000;101(13):1586-93.

Stumpe KO, Agabiti-Rosei E, Zielinski T, Schremmer D, Scholze J, Laeis P, Schwandt P, Ludwig M; Carotid intima-media thickness and plaque volume changes following 2-year angiotensin II-receptor blockade. The Multicentre Olmesartan atherosclerosis Regression Evaluation (MORE) study. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2007;1(2):97-106.

Taddei S, Viridis A, Mattei P, Ghiadoni L, Sudano I, Salvetti A. Defective L-arginine-nitric oxide pathway in offspring of essential hypertensive patients. *Circulation*. 1996;94(6):1298-303.

Thomas GM, Huganir RL. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosc*. 2004; 5(3): 173-83. Review.

Torres M, Forman HJ. Redox signaling and the MAP kinase pathways. *Biofactors*. 2003;17(1-4):287-96. Review.

Tousoulis D, Andreou I, Antoniadis C, Tentolouris C, Stefanadis C. Role of inflammation and oxidative stress in endothelial progenitor cell function and mobilization: therapeutic implications for cardiovascular diseases. *Atherosclerosis*. 2008;201(2):236-47.Review.

Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, Pagano PJ, Schiffrin EL. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res*. 2002;90(11):1205-13.

Touyz RM. Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of Angiotensin II. *Exp Physiol*. 2005; (90):449-55.

Touyz RM. Reactive oxygen species, Vascular Oxidative stress, and redox signaling in hypertension: What is the clinical significance? *Hypertension* 2004; (44):248-252.

Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 2004; 95(4):343-53. Review.

Vallance P, Chan N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart* 2001; 85: 342-50.

Vane JR, Anggård EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med*. 1990;323(1):27-36. Review.

Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*. 2001;89(1):E1-7.

Volpe M, Musumeci B, De Paolis P, Savoia C, Morganti A. Angiotensin II AT2 receptor subtype: an uprising frontier in cardiovascular disease? *J Hypertens*. 2003;21(8):1429-43. Review.

Wagner FA, van Beurden HE, von den Hoff JW, Adema GJ, Figdor CG. The heme-heme oxygenase system: a molecular switch in wound healing. *Blood*. 2003;102(2):521-8.

Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, Nishimura H, Losordo DW, Asahara T, Isner JM. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2002;105(25):3017-24.

Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med*. 2005;353(10):999-1007.

Werner N, Priller J, Laufs U, Endres M, Böhm M, Dirnagl U, Nickenig G. Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(10):1567-72.

Wu BJ, Midwinter RG, Cassano C, Beck K, Wang Y, Changsiri D, Gamble JR, Stocker R. Heme oxygenase-1 increases endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(10):1537-42.

Yamamoto Y, Watari Y, Brydun A, Yoshizumi M, Akishita M, Horiuchi M, Chayama K, Oshima T, Ozono R. Role of the angiotensin II type 2 receptor in arterial remodeling after wire injury in mice. *Hypertens Res*. 2008; 31(6):1241-9.

Yao EH, Fukuda N, Matsumoto T, Kobayashi N, Katakawa M, Yamamoto C, Tsunemi A, Suzuki R, Ueno T, Matsumoto K. Losartan improves the impaired function of endothelial progenitor cells in hypertension via an antioxidant effect. *Hypertens Res*. 2007;30(11):1119-28.

Yasunari K, Maeda K, Nakamura M, Yoshikawa J. Oxidative stress in leukocytes is a possible link between blood pressure, blood glucose, and C-reacting protein. *Hypertension*. 2002;39(3):777-80.

Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1997;90(12):5002-12.

Zhan Y, Brown C, Maynard E, Anshelevich A, Ni W, Ho IC, Oettgen P. Ets-1 is a critical regulator of Ang II-mediated vascular inflammation and remodeling. *J Clin Invest*. 2005;115(9):2508-16.

Zhou J, Xu X, Liu JJ, Lin YX, Gao GD. Angiotensin II type 2 receptors participate in the regulation of inflammatory cytokine secretion in adult rat

hypertrophied cardiomyocytes. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2008;28(11):1971-3.

Zhou Z, Peng J, Wang CJ, Li D, Li TT, Hu CP, Chen XP, Li YJ. Accelerated senescence of endothelial progenitor cells in hypertension is related to the reduction of calcitonin gene-related peptide. *J Hypertens*. 2010;28(5):931-9.

Zhuo J, Allen AM, Alcorn D, Aldred GP, MacGregor DP, Mendelson FAO. The distribution of angiotensin II receptors. In *Hypertension: pathophysiology, Diagnosis and Management*. Raven Press, NY, USA. 1995; 1739-62.