

Università degli Studi di Parma

Dottorato di Ricerca in
Farmacologia e Tossicologia Sperimentali



*Alterazioni funzionali e strutturali nel
microcircolo periferico indotte
da angiotensina II: ruolo delle
ciclo-ossigenasi ed effetti di rosuvastatina*

Coordinatore
Chiar.ma Prof.ssa Elisabetta Barocelli

Tutore
Chiar.mo Prof. Vigilio Ballabeni

Dottorando
Dott.ssa Ilaria Rugani

XXIV ciclo - Triennio Accademico 2009 - 2011

INDICE

➤ RIASSUNTO	1
➤ INTRODUZIONE	5
• Microcircolo	5
• Endotelio	7
• Mediatori endoteliali ad azione vasodilatante	8
• Mediatori endoteliali ad azione vasocostrittrice	11
• Disfunzione endoteliale e stress ossidativo	14
• Specie reattive dell'ossigeno nella parete vascolare	15
• Valutazione della funzione endoteliale in condizioni sperimentali	17
• Ipertensione	19
• Alterazioni strutturali dei vasi arteriosi nell'ipertensione	20
• Rimodellamento eutrofico	21
• Rimodellamento ipertrofico	22
• Matrice extracellulare	23
• Rimodellamento delle proteine della matrice extracellulare	24
• Sistema renina-angiotensina	25
• Ruolo di Ang II nel rimodellamento della parete vascolare	28
• Ruolo biologico delle ciclo-ossigenasi	29
• COX-1 nell'ipertensione indotta da Ang II	30
• Statine	30
• Rosuvastatina e sistema cardiovascolare	33
➤ OBIETTIVO DEL PROGRAMMA DI RICERCA	34
➤ MATERIALI E METODI	35

PARTE 1: CONTRIBUTO DERIVANTE DALL'ATTIVAZIONE DI COX-1 E DEI SUOI PROSTANOIDI ATTIVI SUI RECETTORI TP SULLE MODIFICAZIONI MORFOLOGICHE E SULLE COMPONENTI DELLA ECM, CHE CARATTERIZZANO IL RIMODELLAMENTO VASCOLARE

NELLE PICCOLE ARTERIE DI RESISTENZA DI TOPI TRATTATI CRONICAMENTE CON ANG II

• Gruppi di trattamento	35
• Parametri fisiologici	36
• Preparazione delle arterie mesenteriche per lo studio della reattività vascolare	36
• Analisi immunoistochimica di COX-1, collagene di tipo I, fibronectina e analisi istochimica di elastina	37
• Analisi RT-PCR dell'espressione di COX-1 e COX-2	38
• Analisi Western Blot di COX-1 e COX-2	39
• Determinazione della prostaglandina 6-keto-PGF _{1α} e dell'8-isoprostano	40

PARTE 2: EFFETTI DELLA ROSUVASTATINA SULLA DISFUNZIONE ENDOTELIALE E SUL RIMODELLAMENTO VASCOLARE NELLE ARTERIE MESENTERICHE DI RESISTENZA DI RATTI CON IPERTENSIONE INDOTTA DA ANG II: RUOLO DI COX-1

• Gruppi di trattamento	41
• Parametri fisiologici	41
• Preparazione delle arterie mesenteriche per lo studio della reattività vascolare	42
• Ruolo dell'attività di COX-1, di COX-2 e del recettore TP sulla vasodilatazione endotelio-dipendente	42
• Biodisponibilità di NO e generazione di ROS nella vasodilatazione endotelio-dipendente	43
• Tecnica del diidroetidio per la determinazione in situ di anione superossido vascolare	43
• Analisi immunoistochimica di collagene tipo I, fibronectina e analisi istochimica di elastina	44
• Ruolo di COX-1 e della NADPH ossidasi sulla deposizione di collagene di tipo I indotta da Ang II	46
• Analisi RT-PCR dell'espressione di COX-1	46

• Determinazione della prostaglandina 6-keto-PGF _{1α} e dell'8-isoprostano	47
• Determinazione dei livelli plasmatici di malondialdeide (MDA) e colesterolo	48
• Farmaci e soluzioni	49
➤ ANALISI STATISTICA	50
➤ RISULTATI	51

PARTE 1: CONTRIBUTO DERIVANTE DALL'ATTIVAZIONE DI COX-1 E DEI SUOI PROSTANOIDI ATTIVI SUI RECETTORI TP SULLE MODIFICAZIONI MORFOLOGICHE E SULLE COMPONENTI DELLA ECM, CHE CARATTERIZZANO IL RIMODELLAMENTO VASCOLARE NELLE PICCOLE ARTERIE DI RESISTENZA DI TOPI TRATTATI CRONICAMENTE CON ANG II

• Parametri fisiologici	51
• Parametri strutturali	51
• Analisi immunoistochimica di COX-1, collagene di tipo I, fibronectina ed analisi istochimica di elastina	52
• Analisi RT-PCR dell'espressione di COX-1 e COX-2	58
• Analisi Western Blot per COX-1 e COX-2	60
• Determinazione della prostaglandina 6-keto-PGF _{1α} e dell'8-isoprostano	61

PARTE 2: EFFETTI DELLA ROSUVASTATINA SULLA DISFUNZIONE ENDOTELIALE E SUL RIMODELLAMENTO VASCOLARE NELLE ARTERIE MESENTERICHE DI RESISTENZA DI RATTI CON IPERTENSIONE INDOTTA DA ANG II: RUOLO DI COX-1

• Parametri fisiologici	62
• Parametri strutturali	62
• Ruolo dell'attività di COX-1, COX-2 e del recettore TP nella vasodilatazione endotelio-dipendente	64

• Ruolo della NADPH ossidasi e della biodisponibilità di NO nella disfunzione endoteliale	65
• Effetto di rosuvastatina sulla vasodilatazione endotelio-dipendente	66
• Effetto di rosuvastatina sulla produzione di anione superossido e sui livelli di MDA	68
• Analisi immunoistochimica di collagene di tipo I, fibronectina ed analisi istochimica di elastina	69
• Analisi RT-PCR dell'espressione di COX-1	71
• Determinazione della prostaglandina 6-keto-PGF1 α e dell'8-isoprostano	72
➤ DISCUSSIONE	74
➤ CONCLUSIONI	80
➤ BIBLIOGRAFIA	81
➤ RINGRAZIAMENTI	91

RIASSUNTO

L'ipertensione arteriosa è caratterizzata da alterazioni strutturali e funzionali a livello delle piccole arterie di resistenza, come conseguenza di un processo di crescita delle miocellule (rimodellamento ipertrofico) o di riarrangiamento dello stesso tessuto intorno ad un lume più piccolo (rimodellamento eutrofico). Le alterazioni funzionali sono legate alla disfunzione endoteliale, mentre le alterazioni strutturali dipendono dalla fibrosi vascolare. L'angiotensina (Ang) II è coinvolta nello sviluppo e nella progressione di queste alterazioni funzionali e strutturali nelle piccole arterie di resistenza, come dimostrano numerose evidenze cliniche e sperimentali. La fibrosi rappresenta un importante fenomeno associato all'ipertensione indotta da Ang II ed è caratterizzata dalla modificazione dei componenti della matrice extracellulare (ECM), tra i quali il collagene di tipo I e III, la fibronectina e l'elastina. La ciclo-ossigenasi (COX)-1 e i prostanoidi da essa prodotti sono coinvolti nella disfunzione endoteliale indotta da Ang II. E' noto infatti che l'infusione cronica di Ang II si associa ad una aumentata espressione/attività di COX-1 intravascolare, con conseguente iperproduzione di prostanoidi vasoattivi che agiscono sui recettori TP delle cellule muscolari lisce. Recenti studi hanno inoltre dimostrato che il sistema COX-1 è coinvolto anche nello sviluppo e progressione del danno aterosclerotico vascolare.

Nella prima parte del presente progetto di ricerca è stato valutato il contributo di COX-1 e dei prostanoidi attivi sui recettori TP sulle modificazioni morfologiche e sulle componenti della ECM che caratterizzano il rimodellamento vascolare nelle piccole arterie di resistenza di topi trattati cronicamente con Ang II. Gli esperimenti sono stati condotti su topi C57BL/6J maschi di 12-14 settimane di età, omozigoti per delezione genetica del gene COX-1 (*COX-1^{-/-}*) o wild-type (WT) dello stesso ceppo, sottoposti ad

infusione con Ang II. Tre gruppi di topi WT sottoposti a infusione cronica con Ang II sono stati inoltre trattati con SC-560 (inibitore selettivo di COX-1), DFU (inibitore selettivo di COX-2) e SQ-29548 (antagonista del recettore TP del trombossano) per 2 settimane. Le arterie mesenteriche, isolate da questi animali, sono state sottoposte a valutazione della reattività vascolare con l'ausilio del miografo a pressione, allo scopo di determinare i parametri strutturali del vaso (spessore tonaca media, diametro del lume, rapporto media lume e area trasversa della media). Inoltre, è stata quantificata la deposizione di collagene e fibronectina mediante analisi immunoistochimica e di elastina mediante analisi istochimica. L'espressione di COX-1 e COX-2 nelle arterie mesenteriche è stata valutata tramite analisi RT-PCR e Western Blot. Infine, sono stati analizzati i prodotti derivanti da COX-1, coinvolti nelle alterazioni vascolari indotte da Ang II.

I risultati ottenuti dimostrano che Ang II induce un rimodellamento ipertrofico vascolare, un aumento nel deposito di collagene e fibronectina, e una riduzione di elastina. Questi effetti sono antagonizzati da SC-560 e SQ-29549, ma non da DFU. Inoltre, gli effetti di Ang II non risultano più evidenti nei topi COX-1 KO. Negli animali WT Ang II aumenta l'espressione di COX-1 e riduce l'espressione di COX-2, con un incremento concomitante della produzione tissutale di 6-keto-PGF_{1α}, che è bloccata dall'inibizione di COX-1. Questi risultati suggeriscono che il rimodellamento vascolare indotto da Ang II sia, almeno in parte, mediato dall'attivazione di COX-1 e dalla successiva produzione di prostanoidi che agiscono sui recettori TP. Questi dati sono sostenuti dai risultati ottenuti nei topi COX-1-KO, nei quali non è stato osservato alcun effetto da parte di Ang II nel rimodellamento vascolare. E' quindi possibile ipotizzare che il sistema della COX-1 sia coinvolto nella progressione ed evoluzione dell'aterosclerosi, in particolare in quelle forme di ipertensione caratterizzate da una marcata attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone.

Nella seconda parte dello studio, sono stati valutati gli effetti di rosuvastatina sulla disfunzione endoteliale e sul rimodellamento vascolare nelle arterie mesenteriche di resistenza di ratti con ipertensione indotta da Ang II, con particolare riguardo per il ruolo di COX-1. Gli esperimenti sono stati condotti su ratti maschi Sprague-Dawley sottoposti ad infusione con Ang II. Inoltre, gli animali sono stati trattati con rosuvastatina o placebo per due settimane. Lo studio della reattività vascolare è stato eseguito utilizzando la tecnica della micromiografia a pressione. La vasodilatazione endotelio-dipendente è stata valutata mediante infusione di acetilcolina (ACh), in assenza o in presenza di SC-560, Dup-697 (inibitore selettivo di COX-2) o SQ-29548.

La disponibilità di ossido nitrico (NO) è stata valutata in presenza dell'inibitore della NO sintetasi, L-NAME. Dal punto di vista funzionale, il ruolo dello stress ossidativo intravascolare è stato studiato incubando il vaso con acido ascorbico, mentre a livello sistemico è stata valutata la produzione intravascolare di anione superossido mediante tecnica a fluorescenza del diidrotetraidio e la concentrazione plasmatica di malondialdeide. Inoltre, è stata quantificata la deposizione di collagene e fibronectina mediante analisi immunoistochimica, e di elastina mediante analisi istochimica. Il ruolo di COX-1 e della NADPH ossidasi sulla deposizione di collagene indotta da Ang II è stato esaminato trattando gli animali con SC-560 e apocianina (inibitore di NADPH ossidasi). Nelle arterie mesenteriche è stata valutata anche l'espressione dell'mRNA codificante per COX-1 tramite RT-PCR. Infine, sono stati esaminati i livelli dei prodotti derivanti da COX-1, coinvolti nelle alterazioni vascolari indotte da Ang II.

In presenza di tali condizioni sperimentali, rosuvastatina si è dimostrata in grado di normalizzare le alterazioni funzionali e strutturali dei vasi, migliorando la biodisponibilità di NO, riducendo la produzione di anione superossido, determinando una riduzione nel deposito di collagene e fibronectina ed un concomitante aumento del contenuto di elastina nella tonaca media vascolare, attraverso l'inibizione intravascolare

di NADPH ossidasi e una simultanea riduzione della produzione di prostanoidi derivanti da COX-1.

In conclusione, i risultati ottenuti in questo progetto di ricerca forniscono informazioni importanti sui meccanismi responsabili delle alterazioni indotte da Ang II nelle piccole arterie di resistenza. In particolare, emerge un processo di rimodellamento vascolare, caratterizzato da modificazioni nella composizione della ECM, che sono in parte dipendenti dall'attivazione di COX-1 e successiva produzione di prostanoidi vasocostrittori in grado di agire sui recettori TP. Questi meccanismi contribuiscono al danno aterosclerotico derivante da Ang II. Inoltre, i presenti risultati dimostrano che il trattamento con rosuvastatina previene la disfunzione endoteliale, il rimodellamento vascolare e le modificazioni della ECM. Queste evidenze possono avere rilevanza clinica in quanto le statine possono prevenire la progressione del danno cardiovascolare, in particolare nelle forme di ipertensione umana caratterizzata da elevata attività del sistema renina-angiotensina-aldosterone.

INTRODUZIONE

Microcircolo

Il microcircolo rappresenta la sezione del distretto vascolare arterioso nella quale avviene la maggior parte della dissipazione di energia per resistenza al flusso, ed è rappresentato dalle piccole arterie (diametro compreso tra 100-300 micron), dalle arteriole (diametro inferiore a 100 micron) e dalla rete capillare (diametro intorno ai 7 micron)¹. Le piccole arterie contribuiscono probabilmente per il 40-50% alla caduta pressoria pre-capillare, mentre un ulteriore 30% di riduzione della pressione è dovuta al passaggio del sangue attraverso le arteriole di 50-100 micron.

Tutto il sistema cardiovascolare segue un piano comune di organizzazione istologica. I costituenti tissutali sono disposti in tre strati concentrici o tonache. Procedendo dal lume verso l'esterno, si distinguono:

- l'*intima*, rappresentata da cellule endoteliali disposte longitudinalmente e dallo strato sub-endoteliale;
- la *tonaca media*, costituita da un unico strato di fibrocellule muscolari lisce e lamelle elastiche;
- la *tonaca avventizia*, costituita da uno strato di tessuto connettivo lasso con fibre collagene ed elastiche orientate longitudinalmente, da terminazioni nervose ed da uno scarso numero di fibroblasti (Figura 1)².

Le alterazioni delle arterie di resistenza possono svolgere un ruolo significativo nella patogenesi e fisiopatologia dell'ipertensione sia negli animali da esperimento che nell'uomo³. Modificazioni delle proprietà strutturali, meccaniche e funzionali dei piccoli vasi possono determinare una riduzione del lume e quindi un aumento delle resistenze vascolari, partecipando in tal modo all'aumento della pressione sistemica⁴. E' ormai

comprovato il fatto che l'ipertensione arteriosa si accompagna alla presenza di alterazioni strutturali del microcircolo⁵.

In particolare un aumento dello spessore della parete vascolare, insieme ad una riduzione del diametro interno, può svolgere un ruolo molto importante nell'aumento delle resistenze periferiche, oltre a rappresentare un possibile meccanismo adattativo all'aumento del carico pressorio. Queste alterazioni vascolari possono essere causate o influenzate dall'espressione e/o dalla localizzazione topografica delle componenti della matrice extracellulare, come il collagene, fibronectina e l'elastina³.

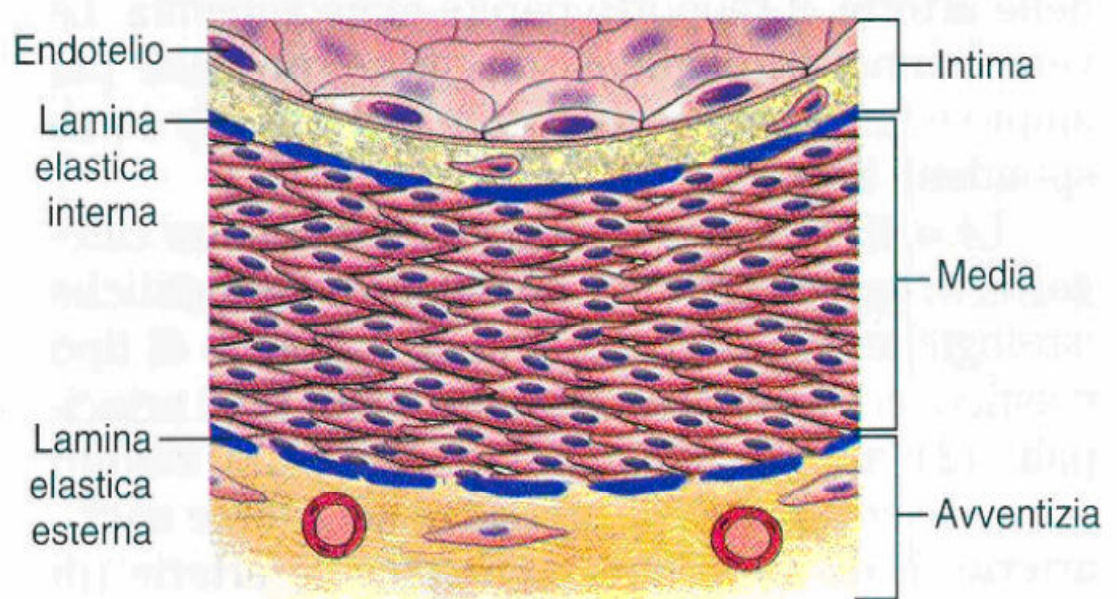


Figura 1. Struttura istologica della parete arteriosa.

Endotelio

L'endotelio è il tessuto che riveste la superficie interna dei vasi sanguigni, ed è costituito da cellule piatte poligonali unite tra loro a formare una membrana sottile.

L'endotelio regola l'omeostasi vascolare attraverso la produzione di numerose sostanze che agiscono localmente nel vaso e nel lume vascolare. Pertanto l'endotelio non può essere considerato come un semplice rivestimento che separa il sangue circolante dalla componente muscolare della parete vascolare. Lo studio delle funzioni della cellula endoteliale configura l'endotelio come un vero e proprio organo con capacità autocrine e paracrine atte a modulare il tono e la struttura vascolare⁶. Parte di queste sostanze sono secrete dalle cellule endoteliali nelle immediate vicinanze (secrezione paracrina), per esercitare i propri effetti sulla parete vasale, o sono immesse nella circolazione (secrezione endocrina) per svolgere la loro azione a distanza, come nel caso delle sostanze che concorrono al controllo del tono vascolare (per esempio l'endotelina). Altre molecole prodotte dall'endotelio esplicano la loro azione rimanendo legate alla superficie delle cellule endoteliali, come accade per le molecole di adesione dei leucociti o per quelle che influenzano la coagulazione. Infatti, in condizioni fisiologiche, l'azione sinergica dei fattori endoteliali consente il mantenimento del tono vascolare e la fluidità del sangue, limitando contemporaneamente il danno infiammatorio del vaso e la proliferazione delle cellule muscolari lisce. L'endotelio inoltre previene lo sviluppo e la progressione del processo aterotrombotico, grazie alle sue capacità di modulare l'aggregazione piastrinica, la proliferazione e migrazione delle cellule muscolari lisce vascolari, l'adesione e la migrazione nello spazio subendoteliale dei monociti, la produzione e l'attività biologica dell'endotelina-1⁶.

Mediatori endoteliali ad azione vasodilatante

Le cellule endoteliali producono tre sostanze principali ad azione vasodilatatoria:

- NO, ossido nitrico o monossido d'azoto
- Prostaciclina (PGI₂)
- Fattore iperpolarizzante endotelio-derivato (EDHF)

Tutte le sostanze con azione vasodilatatoria vengono liberate sia da stimoli di tipo meccanico come lo *shear stress* (stress da stiramento parietale), che da stimoli di tipo biochimico, quali acetilcolina (ACh), istamina, bradichinina, serotonina, sostanza P, neuropeptidi, ecc. L'ossido nitrico (NO) è il primo gas descritto come neurotrasmettitore. La sua sintesi avviene ad opera di un enzima denominato NOS (Nitric Oxide Synthase) del quale sono note tre isoforme, che differiscono per modalità di regolazione e localizzazione. Due di queste dipendono dalla concentrazione di ioni calcio: NOS neuronale (nNOS) e endoteliale (eNOS); la terza, invece, è quella infiammatoria o indotta (iNOS) che è indipendente dalla concentrazione di ioni calcio.

Il NO endoteliale viene sintetizzato dalla cellula endoteliale ad opera dell'enzima eNOS (*endothelial Nitric Oxide Synthase*), a partire dall'aminoacido L-arginina con l'intervento di alcuni cofattori. L'attività della NOS può essere bloccata sperimentalmente da analoghi della L-arginina, quali la N-nitro-L-Argininametilestere (L-NAME)⁷.

Essendo una sostanza molto lipofila, il NO svolge la sua azione sulle cellule muscolari lisce del vaso, causando vasodilatazione tramite attivazione della guanilciclasi e conseguente aumento intracellulare dell'GMPC. Le principali azioni del NO sono tutte GMPC-dipendenti:

1. vasodilatazione per azione inibitrice sulla cellula muscolare liscia vasale;

2. azione antiaggregante piastrinica;
3. rilassamento del muscolo liscio bronchiale, della parete intestinale e dell'utero;
4. inibizione della proliferazione cellulare, soprattutto a carico della cellula muscolare liscia; questa azione assume un notevole significato nel contesto della patogenesi dell'aterosclerosi, delle vasculiti e della re-stenosi post-angioplastica.

Il blocco cronico della sintesi di NO induce l'espressione dell' *angiogenic growth factor* a livello dei capillari. Una volta liberato, la sua emivita oscilla da 6 a 7 secondi per poi essere trasformato in sostanze inattive come nitriti e nitrati; l'ossiemoglobina e i radicali liberi dell'ossigeno (ROS) sono le principali molecole che catalizzano questa reazione. Il suo brevissimo tempo di sopravvivenza spiega perché il NO attua la sua azione solo localmente (azione paracrina) e sulla stessa cellula endoteliale che lo ha generato (azione autocrina), limitando la sua produzione con un meccanismo a feedback negativo sull'enzima eNOS.

Il NO si comporta da *scavenger* dei ROS in modo da poter sia limitare i segnali provenienti dalle specie ossidanti sia, interagendo con esse, dare vita a composti chimici ancora più reattivi. Molti dei danni a carico dei vasi e dei tessuti, osservati in modelli sperimentali di processi infiammatori, possono essere prevenuti sia dalla SOD (superossidodismutasi) che dagli inibitori della NOS, evidenziando così il fatto che sia l'ossigeno che il NO sono importanti mediatori per il danno tissutale e la disfunzione d'organo. La formazione di lipoperossidi, tra cui le lipoproteine a bassa densità (LDL) ossidate, può determinare un effetto citotossico sulle stesse cellule endoteliali con attivazione di fenomeni infiammatori nella parete vascolare; il conseguente reclutamento di cellule infiammatorie provoca l'aumento della produzione locale di ROS. E' interessante notare che l'uso di antiossidanti, come l'alfa tocoferolo e l'acido ascorbico possono migliorare la bioattività del NO, analogamente a quanto sembra

accadere con alcuni farmaci antilipemizzanti della famiglia delle statine, che svolgono effetti favorevoli sulla disfunzione endoteliale.

La cellula endoteliale è in grado di metabolizzare l'acido arachidonico a prostaciclina (PGI_2) e prostaglandina E_2 (PGE_2), con produzione anche di piccole quantità di trombossano (TXA_2). La prostaciclina, uno dei principale vasodilatatori dell'endotelio, agisce incrementando l'AMPc in sinergia con il NO, a livello della miocellula vascolare e delle piastrine e, oltre alla funzione di agente vasoattivo, possiede azione antiaggregante piastrinica. La produzione della prostaciclina inizia per azione dell'enzima fosfolipasi A_2 sui fosfolipidi di membrana con liberazione di acido arachidonico il quale, sotto l'influenza dell'enzima ciclo-ossigenasi, produce endoperossidi di prostaglandine da cui, per azione della prostaciclina-sintetasi, si ottiene la prostaciclina. I principali metaboliti dell'acido arachidonico sono gli eicosanoidi; sia l'acido arachidonico sia i derivati eicosapentanoici sono substrati dell'enzima ciclo-ossigenasi e producono prostaglandine, con azione antiaggregante simile a quella della prostaciclina (PGI_2), e TXA_3 , meno attivo dell'analogo A_2 nel causare aggregazione piastrinica. La prostaciclina (PGI_2) svolge la sua funzione localmente, causando rilassamento della muscolatura sottostante e contrastando l'aggregazione piastrinica. Inoltre essa agisce incrementando l'attività degli enzimi che provvedono al metabolismo degli ester del colesterolo nella cellula muscolare liscia, inibendone l'accumulo da parte dei macrofagi e prevenendo la liberazione dei fattori di accrescimento che causano l'ispessimento della parete vascolare. La capacità dell'endotelio di produrre prostaciclina diminuisce con l'età, in presenza di diabete mellito e durante i processi di aterosclerosi. E' noto che le cellule endoteliali con processi aterosclerotici, e per questo malfunzionanti, reagiscono in modo abnorme agli stimoli vasoattivi circolanti: coronarie indenni rispondono vasodilatandosi all'infusione di acetilcolina, mentre i vasi

aterosclerotici si comportano in maniera diametralmente opposta, proprio a causa di una ridotta liberazione di NO e di prostaciclina da parte dell'endotelio.

Il fattore iperpolarizzante endotelio-derivato (EDHF) è un altro mediatore ad azione vasodilatatoria prodotto dall'endotelio e non ancora ben definito. L'azione dell'EDHF consiste in una temporanea iperpolarizzazione della cellula muscolare liscia tramite l'attivazione dei canali ATP-dipendenti del potassio o del sodio/potassio o entrambi. L'azione di questo fattore probabilmente coinvolge un aumento nel calcio intracellulare, considerato che l'iperpolarizzazione endotelio-dipendente non si attua in assenza di tale ione (Figura 2).

Mediatori endoteliali ad azione vasocostrittrice

In determinate condizioni l'endotelio vascolare può produrre mediatori ad azione vasocostrittrice (EDCFs o *endothelium-derived constricting factors*). Questi fattori, in realtà, svolgono anche altre funzioni, compresa quella di stimolare la crescita delle *Vascular Smooth Muscle Cell* (CMLV). Tra i mediatori ad azione vasocostrittrice sono compresi:

- endotelina-1 (ET-1)
- angiotensina II (Ang II)
- prostanoidi ad azione vasocostrittrice (endoperossidi, TXA₂)
- anione superossido (O₂•) etc⁶.

L'endotelio regola il tono vascolare soprattutto attraverso la produzione equilibrata di NO, endotelina-1 e Ang II.

Le cellule endoteliali producono una delle quattro isoforme di endotelina e, precisamente, l'endotelina-1. A bassa concentrazione l'endotelina-1 ha effetti vasodilatatori ma, a più elevata concentrazione, agisce come potente vasocostrittore.

L'endotelio vascolare produce anche TXA₂ e prostaglandina H₂ attraverso la via della ciclo-ossigenasi. Un recettore complementare è presente su CMLV e piastrine. La stimolazione di questo recettore tende a controbilanciare gli effetti dell'NO e della prostaciclina su entrambi i tipi cellulari.

L'ACE, che converte l'Ang I in Ang II e inattiva la bradichinina, è anche espresso sulla membrana delle cellule endoteliali.

L'Ang II svolge molti effetti aterogeni (promozione della ossidazione delle LDL, attivazione dei macrofagi, stimolazione della proliferazione delle cellule muscolari lisce e della formazione della matrice, etc.). L'Ang II stimola anche la produzione di endotelina-1 e dell'inibitore-1 dell'attivatore del plasminogeno.

Un importante vasocostrittore prodotto dalle cellule endoteliali e dalle CMLV è l'anione superossido. In presenza di ipercolesterolemia, fumo di sigaretta, ipertensione arteriosa, etc, la produzione di O₂• aumenta. Parallelamente la bioattività dell'ON diminuisce a causa della interazione tra NO e O₂•, che procede più rapidamente della reazione tra O₂• e superossido dismutasi. Oltre a questo effetto indiretto, l'anione superossido può anche esplicare effetti vasocostrittori diretti (aumentando, ad esempio, il Ca⁺⁺ intracellulare).

La principale sorgente di superossido e di H₂O₂ nella parete vascolare è la NAD(P)H ossidasi, che è sopraregolata dall'Ang II. Questo effetto può essere un importante legame tra ipertensione ed aterosclerosi⁸ (Figura 2).

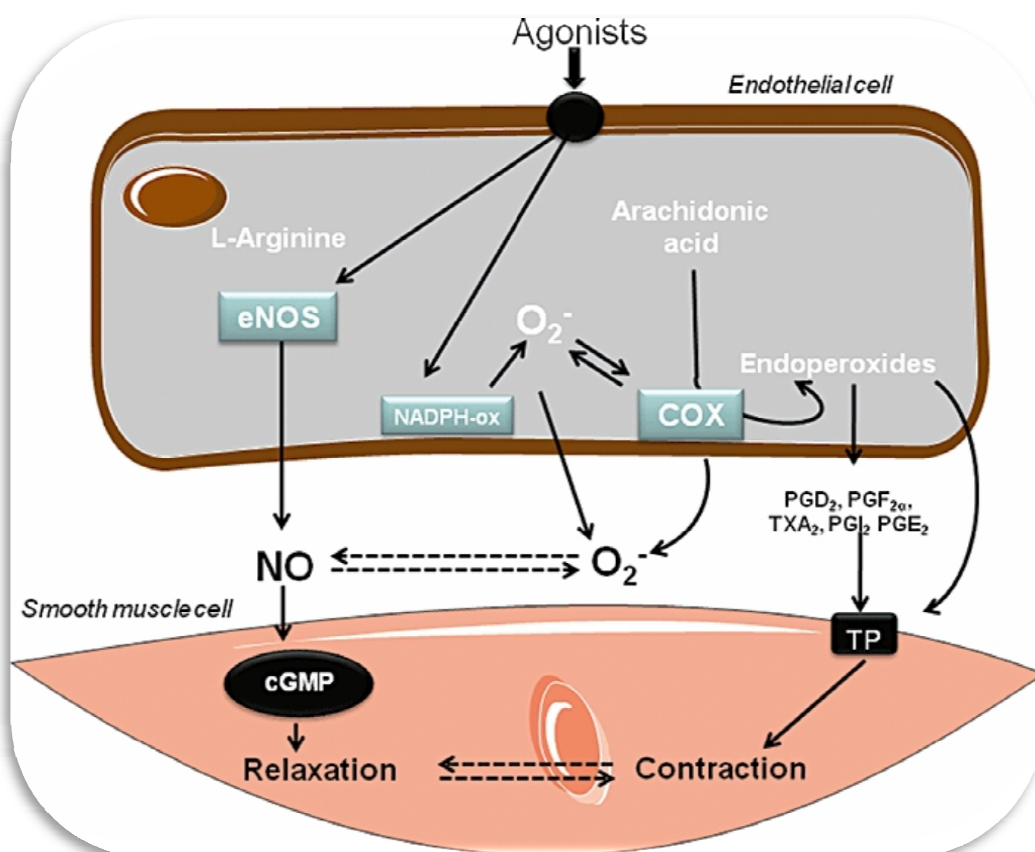


Figura 2. Sostanze vasodilatanti e vasocostrittrici di origine endoteliale: le principali sostanze vasodilatanti prodotte dall'endotelio sono l'ossido nitrico (NO) e la prostaciclina (PGI₂). Il NO può essere attivato da agonisti recettoriali (acetilcolina-Ach, bradichinina-Bk, serotonina-5-HT, ecc.) o da stimoli meccanici (shear stress). Questi meccanismi attivano un enzima, l'NO-sintetasi, che catalizza la produzione di NO. L'NO agisce aumentando le concentrazioni intracellulari di cGMP determinando rilassamento vascolare. In condizioni patologiche, come l'ipertensione, la stimolazione endoteliale determina anche un aumento della produzione di anioni superossido (O₂⁻) per opera della NADPH-ossidasi (NADPH-ox riquadro blu) e della ciclo-ossigenasi (COX). Il superossido rilasciato è in grado di ridurre la biodisponibilità di NO compromettendo la vasodilatazione endotelio-dipendente. Inoltre, la stimolazione di COX produce anche endoperoxidi e di conseguenza trombossano A₂, prostaglandina-E₂, prostaglandina-F_{2α}, prostaglandina-D₂ e la prostaciclina, le quali si legano ad un recettore specifico (TP) presente sulle cellule muscolari lisce causando vasocostrizione⁹.

Disfunzione endoteliale e stress ossidativo

La fisiopatologia della disfunzione endoteliale rappresenta un fenomeno complesso ed articolato, che coinvolge diversi meccanismi. La disfunzione endoteliale è caratterizzata da vasocostrizione, aggregazione piastrinica, adesione leucocitaria e proliferazione delle cellule muscolari lisce ed è stata correlata ad una ridotta biodisponibilità di NO, ad un eccesso di stress ossidativo e ad un'aumentata azione di ET-1.

Un ruolo preminente nella disfunzione endoteliale è stato riconosciuto all'inattivazione dell'NO da parte dei ROS. Le specie reattive dell'ossigeno reagiscono con l'NO producendo perossinitriti, molecole cito-ossidanti, che tramite la nitrificazione delle proteine cellulari endoteliali, ne alterano la funzione; i perossinitriti sono anche coinvolti nell'ossidazione delle LDL, che aumentano così il loro effetto pro-aterogeno¹⁰ e riducono a loro volta la biodisponibilità di NO inibendone la via biosintetica tramite una alterazione della conformazione dei recettori G-dipendenti, con conseguente mancata attivazione della eNOS, oppure inattivando direttamente lo NO per un eccesso di anione superossido.

In modelli animali di ipertensione, un eccesso di stress ossidativo caratterizzato da produzione di elevate quantità di ROS sotto forma di anione superossido, perossido di idrogeno e radicale ossidrilico, è associato a disfunzione endoteliale, come dimostrato da un miglioramento della vasodilatazione endotelio-dipendente dopo l'uso di antiossidanti¹¹.

L'eccesso di stress ossidativo si associa inoltre ad aumento dei processi infiammatori e della formazione di trombi e la sua entità correla con il grado di riduzione della vasodilatazione endotelio-dipendente e con lo sviluppo di eventi cardiovascolari¹².

Specie reattive dell'ossigeno nella parete vascolare

I lipidi, le proteine, i carboidrati e gli acidi nucleici, macromolecole fondamentali del nostro organismo, possono essere danneggiati da reazioni di ossidazione in presenza di ROS: queste sostanze, derivate dal metabolismo dell'ossigeno, sono caratterizzate dalla tendenza a donare ossigeno ad altre sostanze. Molti ROS sono radicali liberi, cioè specie chimiche con uno o più elettroni spaiati, particolarmente instabili e reattivi (anione superossido, radicale idrossilico, radicale nitrossidico, acido ipocloroso, radicale lipoperossilico..); di esse fanno comunque parte anche specie non radicaliche, cioè che non hanno cariche libere (acqua ossigenata, ossigeno singoletto, acido ipocloroso, ozono..). I ROS sono continuamente prodotti nell'organismo umano in seguito ai normali processi metabolici; inoltre essi possono raggiungere il nostro organismo provenendo dall'ambiente esterno.

I ROS sono implicati in molte vie di trasduzione intracellulare che determinano modificazioni della trascrizione genetica e della sintesi proteica e, di conseguenza, un'alterazione della funzione cellulare. All'interno del sistema cardiovascolare, i ROS svolgono un ruolo cruciale nel mantenere l'integrità fisiologica cardiaca e vascolare e un ruolo fisiopatologico nella disfunzione cardiovascolare associata a diverse condizioni cliniche, tra cui l'ipertensione^{13, 14}. I più importanti ROS rilevabili all'interno del sistema vascolare comprendono l'anione superossido ($\bullet\text{O}_2^-$), il perossido di idrogeno (H_2O_2), il radicale idrossile ($\text{OH}\bullet$), e il perossinitrito, specie reattiva dell'azoto (ONOO^-), che sono stati considerati come specie chimiche dannose per l'organismo. In condizioni fisiologiche, i ROS sono prodotti in modo controllato a basse concentrazioni e funzionano come molecole di segnalazione coinvolte nella regolazione delle funzioni di contrazione-rilassamento vascolare e crescita cellulare¹⁵. La produzione di ROS è strettamente regolata dagli antiossidanti endogeni cellulari, che comprendono la

superossido dismutasi (SOD), la catalasi, la tioredoxina, il glutatione e le vitamine antiossidanti. In condizioni fisiologiche, la produzione ed eliminazione dei ROS è mantenuta in equilibrio. Al contrario, in condizioni patologiche, come nell'ipertensione, i ROS sono prodotti in concentrazioni che non possono essere controllate dai meccanismi antiossidanti protettivi utilizzati dalle cellule, determinando uno stato di stress ossidativo¹⁴. Infatti, quando la produzione di $\bullet\text{O}_2^-$ è in eccesso, questo reagisce con NO determinando un sensibile aumento della concentrazione tossica di ONOO⁻ che promuove una serie di effetti negativi sulla funzione cellulare.

Questi comprendono l'alterazione dei fattori di trascrizione, delle chinasi, della sintesi proteica, e dei geni redox-sensibili, che a loro volta influenzano la funzione endoteliale, l'aumento della contrattilità vascolare, la crescita delle cellule della muscolatura liscia vascolare, l'apoptosi, la migrazione dei monociti, la perossidazione lipidica, l'infiammazione e l'aumento del deposito delle proteine della matrice extracellulare (ECM). Tutti questi processi sono profondamente coinvolti nella patogenesi e nella progressione del danno vascolare nelle malattie cardiovascolari^{16, 17}.

I ROS vascolari possono essere prodotti a livello endoteliale, nella muscolatura liscia, nelle cellule avventiziali, e possono essere generati da enzimi diversi. Per quanto riguarda il danno vascolare derivante dall'ipertensione, le principali fonti di ROS sono la xantina ossidasi, l'ossido nitrico sintetasi endoteliale (eNOS) e la NAD(P)H ossidasi¹⁸.

Numerose dimostrazioni sperimentali suggeriscono che la NAD(P)H ossidasi rappresenta la principale fonte di ROS, in particolare di $\bullet\text{O}_2^-$, funzionalmente attiva sia nell'endotelio che nella media e nell'avventizia vascolare¹⁶. L'attivazione di sistemi enzimatici che utilizzano NADH/NADPH come donatore di elettroni per ridurre l'ossigeno molecolare e generare $\bullet\text{O}_2^-$ richiedono l'unione citosolica delle subunità p47phox, p67phox e il legame alla membrana delle subunità gp91phox/Nox1/Nox4 e

p22phox formando un complesso funzionale di enzimi. All'interno della parete vascolare, tutte le subunità di NAD(P)H ossidasi sono espresse a diversi livelli¹⁸.

Valutazione della funzione endoteliale in condizioni sperimentali

Nell'animale da esperimento il modello maggiormente utilizzato è la tecnica micromiografica in *vitro ex vivo*, la quale consente un'attendibile valutazione delle modificazioni funzionali della parete dei piccoli vasi arteriosi ottenuti dal circolo mesenterico dell'animale¹⁹. I vasi arteriosi, del diametro di 100-300 µm, della lunghezza di alcuni millimetri, ottenuti per dissezione, vengono liberati dal tessuto periavventiziale e quindi studiati. Esistono due varianti della tecnica micromiografica: a fili ed a pressione. La tecnica micromiografica a fili prevede di incannulare il vaso con fili d'acciaio di 40 micron di diametro. Ne risulta una preparazione ad anello, che viene montata sul micromiografo. Il vaso può essere sottoposto ad uno stiramento meccanico mediante la vite micrometrica (mentre il trasduttore di forza registra la tensione passiva sviluppata), oppure mantenuto ad uno stretch costante, e stimolato a contrarsi (mediante svariate sostanze quali la noradrenalina, il potassio, la serotonina), permettendo in tal modo la misurazione della tensione attiva sviluppata. Successivamente il vaso, in condizioni di rilasciamento, viene trasferito sullo stativo di un microscopio con lente ad immersione e, mediante un oculare micrometrico (con un ingrandimento complessivo di circa 600 x), viene valutato lo spessore della parete vascolare, gli spessori relativi delle diverse tonache ed il diametro del vaso. Il parametro più indicativo e utile ottenuto con questa tecnica è la struttura della parete, rappresentato dal rapporto tonaca media/lume del vaso, in quanto esso è relativamente indipendente dalle dimensioni del vaso esaminato. Al contrario, lo spessore della tonaca media ed il diametro vascolare sono altamente dipendenti dalle dimensioni del segmento vascolare, ed è pertanto più

difficoltoso il confronto dei parametri misurati in esperimenti diversi in assenza di una rigorosa selezione della sede di prelievo²⁰.

La tecnica micromiografica a pressione prevede invece di incannulare le due estremità del vaso su due microcannule di vetro in una camera miografica e sottoporlo ad una pressione costante di 45 mmHg¹⁹. Dopo aver precontratto il vaso con noradrenalina (10^{-6} M), attraverso un analizzatore video è possibile valutarne il grado di rilasciamento in seguito ad infusione con stimolanti endoteliali. Tale variante, che consente al vaso di acquisire una geometria cilindrica più fisiologica, permette di valutare con più accuratezza, rispetto alla variante a fili, la funzione del vaso, e quindi lo studio della funzione endoteliale.

E' importante ricordare che quando si studia il ruolo dell'endotelio nel controllo del tono vascolare valutando la risposta vasodilatante indotta da sostanze ad azione agonista endoteliale si misura la funzione fasica e/o attivata dell'endotelio. In queste condizioni sperimentali, l'entità della vasodilatazione è una misura della funzione endoteliale nel senso che tanto maggiore è il rilasciamento indotto dall'agonista, tanto maggiore è la funzionalità endoteliale. Utilizzando questa tecnica, è necessario confrontare la risposta degli agonisti endotelio-dipendenti con sostanze che inducono vasodilatazione endotelio-indipendente (essenzialmente nitroderivati quali il nitroprussiato di sodio) così da escludere che eventuali differenze di risposta ad agonisti endoteliali siano in realtà causate da un'alterata risposta contrattile delle cellule muscolari lisce. E' però cruciale che i due diversi agonisti siano infusi a dosi equipotenti, in modo da ottenere livelli di vasodilatazione comparabili.

Ipertensione

Un aumento cronico della pressione arteriosa è spesso associato a malfunzionamento endoteliale nel microcircolo. Sebbene non sia ancora stato chiaramente definito se il malfunzionamento endoteliale rappresenti la causa oppure una conseguenza dell'ipertensione, sembra comunque che esso contribuisca alla progressione della malattia vascolare e del danno di organi vitali correlato a ipertensione^{21, 22}. Pertanto, l'aumento delle resistenze vascolari periferiche è uno dei caratteri distintivi dell'ipertensione. Nei modelli animali di ipertensione e nei pazienti ipertesi si osservano costantemente alterazioni strutturali nelle arterie di bassa resistenza e nelle arteriole, compreso il rimodellamento ipertrofico concentrico delle pareti vascolari associato a un aumento dell'area della sezione trasversale della tonaca media e del rapporto tra media e diametro del lume. L'equilibrio tra fattori endoteliali vasodilatatori, come NO e prostaciclina, e fattori vasocostrittivi, come endotelina e angiotensina II, sembra alterato in presenza di ipertensione²³, che determina non solo il tono arterioso, ma anche il rimodellamento vascolare attraverso la modulazione a livello vascolare della crescita delle SCM e della produzione di ECM. In conclusione, meccanismi vasodilatatori microvascolari possono compensare gli effetti delle stenosi a monte²⁴. Tuttavia, nella maggior parte dei pazienti il malfunzionamento endoteliale, e quindi microvascolare, limita questa risposta compensatoria microvascolare. Inoltre, il malfunzionamento endoteliale può anche favorire processi aterosclerotici e accrescere la risposta infiammatoria dopo ischemia e riperfusione.

Alterazioni strutturali dei vasi arteriosi nell'ipertensione

L'ipertensione è associata a cambiamenti strutturali delle arterie di resistenza, dovuti ad un ispessimento della tonaca media, ad un ridotto diametro del lume e ad un aumento del rapporto media/lume²⁵. Il rimodellamento del sistema vascolare è un processo attivo di modificazioni strutturali che comporta un'alterazione nei processi cellulari, tra cui la crescita, l'apoptosi, la migrazione, l'infiammazione e la produzione di proteine della matrice extracellulare, con conseguente aumento del rapporto media/lume. In particolare l'ipertensione arteriosa è associata a due tipi di rimodellamento vascolare, chiamati rimodellamento eutrofico e ipertrofico²⁶.

Gli studi *in vivo* di valutazione delle resistenze vascolari, in condizione di massima vasodilatazione, forniscono indicazioni interessanti, ma sono difficili da interpretare, in quanto eventuali differenze riscontrate possono essere dovute a modificazioni dell'architettura del distretto vascolare, più che alla struttura del singolo vaso²⁷. E' inoltre molto difficile escludere completamente il ruolo di fattori funzionali²⁸.

Gli studi micromiografici *in vitro* hanno il vantaggio di consentire una misurazione precisa e accurata delle caratteristiche morfologiche dei piccoli vasi, esente da artefatti da fissazione tipici degli studi istologici, ma hanno il limite della relativa invasività della procedura. Infatti, la dissezione e il monitoraggio del singolo vaso sulla attrezzatura micromiografica a pressione/perfusione o a fili presuppone la disponibilità di tessuto idoneo (che nell'uomo si può ottenere in corso di chirurgia di elezione o mediante esecuzione di biopsia di tessuto sottocutaneo)⁷.

Rimodellamento eutrofico

Il rimodellamento eutrofico è caratterizzato da un aumento del rapporto tonaca media/diametro del lume (M/L) senza modificazione della quantità totale di materiale nella parete vascolare, come suggerito dai valori di area traversa della tonaca media (CSA), simili a quelli riscontrabili nei controlli. Pertanto, gran parte delle alterazioni strutturali osservabili nella parete vascolare dei pazienti ipertesi essenziali è attribuibile ad un rimodellamento eutrofico (ovvero un riarrangiamento della stessa quantità di materiale della parete vascolare attorno ad un lume più piccolo), senza crescita cellulare²⁹.

Sperimentalmente il rimodellamento eutrofico è osservabile in modelli in cui il sistema renina-angiotensina svolge un ruolo importante: nelle arterie di resistenza di ratti spontaneamente ipertesi (SHR)³⁰ o nei 2-kidney 1clip Goldblatt ratti ipertesi³¹, mentre nell'uomo è osservabile nell'ipertensione primaria²⁹. Un' ipotesi suggerita per spiegare questi cambiamenti strutturali comporta una combinazione di crescita e di processo apoptotico, in cui la morte programmata delle cellule localizzate in periferia può portare ad una riduzione del diametro vascolare esterno, mentre la crescita delle cellule verso l'interno riduce il diametro del lume³. L'apoptosi è stata segnalata in vari modelli di ipertensione, come nell'aorta di ratti con ipertensione indotta da deossicorticosterone acetato³² e nei ratti sottoposti ad infusione cronica con angiotensina II³³. Tuttavia, è stato anche segnalata una riduzione del processo apoptotico nelle arterie mesenteriche³⁴ e nelle piccole arterie intramiocardiche³⁵ isolate da ratti SHR. E' stato inoltre suggerito che le connessioni tra le cellule muscolari lisce vascolari e la matrice extracellulare potrebbero divenire più labili, consentendo in tal modo ai diversi strati cellulari di scorrere l'uno sull'altro, attraverso un processo mediato dalle integrine.

Sembra pertanto probabile che il processo di rimodellamento vascolare sia intimamente connesso con alterazioni delle proteine della matrice extracellulare, in particolare alle integrine alfa-V³⁶ e la transglutaminasi tissutale³⁷.

Rimodellamento ipertrofico

Il rimodellamento ipertrofico è caratterizzato da crescita cellulare, dovuta a ipertrofia o iperplasia delle cellule muscolari lisce vascolari o aumento della deposizione di proteine extracellulari. In conseguenza di ciò, si determina un aumento del rapporto M/L associato ad un aumento dell'area traversa della tonaca media³.

Sperimentalmente il rimodellamento ipertrofico si osserva in topi ai quali è stata indotta ipertensione tramite innesto sottocutaneo di minipompe osmotiche a rilascio graduale di Ang II³⁸.

E' stato recentemente suggerito che un importante stimolo per il rimodellamento ipertrofico possa essere rappresentato da un aumento dello stress di parete, come conseguenza di un'alterata attività miogena vascolare. La reattività miogena è una risposta vasocostrittoria all'aumento della pressione endoluminale, la quale, rappresenta il meccanismo principale per l'autoregolazione del flusso d'organo o per l'omeostasi della pressione capillare. La perdita di tale attività miogena è stata osservata in pazienti nei quali era presente rimodellamento ipertrofico delle piccole arterie³⁹. Anche l'attivazione del sistema delle endoteline sembra implicato nella genesi del rimodellamento ipertrofico⁴⁰.

Matrice extracellulare

I tessuti non sono costituiti solo da cellule, ma una parte consistente del loro volume è determinato dallo spazio extracellulare, che è costituito da una rete intricata di macromolecole, le quali compongono la matrice extracellulare. La matrice risulta essere costituita da una varietà di proteine e polisaccaridi, secreti localmente e assemblati in stretta associazione con la superficie delle cellule che li producono. Variazioni nel rapporto fra i vari componenti macromolecolari e il modo in cui essi sono organizzati nella matrice spiegano l'enorme diversità di struttura, ognuna adattata ai requisiti funzionali di un particolare tessuto. Tra epitelio e tessuto connettivo la matrice forma una lamina basale, importante per il controllo del comportamento cellulare tradizionalmente, la matrice extracellulare è stata considerata come un compartimento relativamente inerte in grado di stabilizzare l'architettura di un tessuto e attualmente è tuttavia chiaro che essa svolge un ruolo attivo e complesso nel modulare il comportamento delle cellule vicine, influenzandone la sopravvivenza, lo sviluppo, la migrazione, la proliferazione e la funzione. La matrice extracellulare possiede una complessa struttura molecolare e a tutt'oggi le conoscenze sulla sua organizzazione sono incomplete, pur avendo individuato e caratterizzato molti dei suoi maggiori componenti.

Le macromolecole che costituiscono la matrice extracellulare sono secrete localmente dalle cellule del tessuto che, peraltro, hanno un ruolo critico nell'organizzazione strutturale: l'orientamento del citoscheletro di tali cellule può controllare l'orientamento della matrice stessa. Due classi principali di macromolecole extracellulari costituiscono la matrice:

1. catene polisaccaridiche della classe dei glucosaminoglicani (GAGs) legati covalentemente con le proteine in forma di proteoglicani;

2. proteine fibrose, quali collagene, elastina, fibronectina e laminina, che hanno funzione sia strutturale che adesiva.

Nel tessuto connettivo i proteoglicani formano un substrato altamente idratato, sotto forma di gel, in cui sono immerse le proteine fibrose. Il gel di polisaccaridi resiste alle forze di compressione permettendo, allo stesso tempo, la rapida diffusione di nutrienti, metaboliti e ormoni fra il sangue e le cellule costituenti il tessuto. Le fibre collagene rafforzano e aiutano ad organizzare la matrice mentre le fibre di elastina le conferiscono resistenza; infine molte proteine agiscono da strutture di ancoraggio per le cellule⁴¹.

Rimodellamento delle proteine della matrice extracellulare

Cambiamenti nell'espressione e/o nella localizzazione dei componenti della matrice extracellulare sembrano essere implicate nella modulazione della struttura del sistema vascolare di resistenza nell'ipertensione³.

La fibrosi vascolare comporta l'accumulo di proteine nella ECM, come il collagene, l'elastina, la fibrillina, la fibronectina e i proteoglicani, nella media vascolare e contribuisce al rimodellamento strutturale e alla riparazione del vaso⁴². In condizioni fisiologiche l'arteria è costituita da fibre collagene di tipo I e III le quali sono i costituenti principali dell'intima, della media e dell'avventizia, mentre le fibre collagene di tipo IV e V si trovano nelle membrane delle cellule endoteliali e della muscolatura liscia⁴³, insieme ai tipi di collagene I e III⁴⁴. La deposizione delle proteine (ad esempio collagene) contribuisce ad un ispessimento della tonaca media.

Un aumento della deposizione di collagene è stato dimostrato nella tonaca media vascolare nelle piccole arterie di resistenza di topi trattati cronicamente con AngII³⁸ e

nelle arterie di resistenza derivanti da grasso viscerale ottenute da pazienti obesi⁷. E' stato dimostrato anche un aumento nell'espressione dell'mRNA e nella sintesi di collagene di tipo I e III nei fibroblasti di pazienti con ipertensione essenziale⁴⁵.

La crescita cellulare e la deposizione nella matrice extracellulare possono derivare da un aumento della pressione sanguigna o da un aumento di fattori di crescita cellulare come l'endotelina-1⁴⁶, l'angiotensina II⁴⁷, e le catecolamine che agiscono tramite recettori alfa adrenergici⁴⁸.

Un aumento della matrice extracellulare può derivare anche da una riduzione dell'attività delle metalloproteinasi della matrice (MMP), che degradano le proteine della matrice extracellulare. Le MMP sono enzimi proteolitici Zn^{+2} e Ca^{+2} dipendenti che degradano le proteine della matrice extracellulare. Le MMP comprendono collagenasi (ad esempio, collagenasi interstiziale, o MMP-1) che degradano principalmente i collagene interstiziali a tripla elica tipo I-II-III; i cui frammenti sono suscettibili ad ulteriore degradazione da parte delle gelatinasi; le gelatinasi (ad esempio, gelatinasi A [MMP-2] e B [MMP-9]) che digeriscono il collagene denaturato (gelatina) e di tipo IV-V-VII-X ed elastina presente nella membrana basale subendoteliale e le stromalisine (ad esempio, MMP-3, MMP-10, MMP-11) che degradano il nucleo proteico dei proteoglicani, la laminina, la fibronectina e l'elastina⁴⁹. Variazioni dell'attività delle MMP sono implicate nell'accumulo di fibre collagene di tipo IV e V e di fibronectina nella matrice extracellulare delle arterie di resistenza³.

Sistema renina-angiotensina

Nella fisiopatologia dell'ipertensione arteriosa e delle sue complicanze a lungo termine, un ruolo chiave è rappresentato dal sistema renina-angiotensina. Il sistema renina-angiotensina (RAS) è una complessa cascata enzimatico-proteica che, attraverso la formazione di mediatori cellulari, gioca un ruolo importante nel controllo della pressione sanguigna, del tono vascolare, della omeostasi idrosalina e del volume plasmatico regolando le funzioni renali⁵⁰. La renina è un enzima proteolitico depositato nelle cellule iuxtaglomerulari del rene, liberato dalle cellule granulari del glomerulo in risposta a vari stimoli, quali riduzione della pressione arteriosa, diuretici o bassa concentrazione di sodio (che comportano una riduzione del volume sanguigno circolante) o stimoli da parte del sistema nervoso ortosimpatico o altri stimoli anche di natura patologica. Oltre che in questa sede, la renina e tutte le altre componenti del sistema possono essere sintetizzate in maniera comunque regolata, in numerosi altri tessuti dell'organismo, dove sono stati identificati e caratterizzati sistemi renina-angiotensina locali o tissutali, provvisti di un completo apparato enzimatico-proteico⁵¹.

L'azione proteolitica della renina è in grado di scindere l'angiotensinogeno, un peptide prodotto a livello epatico, in un decapeptide inattivo, l'angiotensina I (Ang I). Quest'ultimo passa alla forma attiva grazie ad un altro enzima proteolitico, l'enzima di conversione dell'angiotensina II (ACE) prodotto a livello dell'endotelio dei capillari dove converte l'angiotensina I (decapeptide) in angiotensina II (Ang II, octapeptide), un potente vasocostrittore in grado di determinare un aumento delle resistenze totali periferiche e della pressione arteriosa e che è il principale effettore del RAS⁵¹.

Recentemente è stata attribuita all'Ang II, oltre alla funzione emodinamica, anche un'azione di fattore di crescita e proprietà citochiniche⁵². Infatti, a livello cellulare l'Ang II modula la contrazione, la crescita cellulare, la differenziazione e l'apoptosi;

può favorire la produzione di citochine, l'espressione di molecole di adesione e il conseguente richiamo di cellule dell'infiammazione, la chemiotassi, l'attivazione dei macrofagi, la crescita dei fibroblasti e la sintesi delle proteine della matrice extracellulare attivando il processo di rimodellamento tissutale. L'Ang II possiede quindi azione proinfiammatoria e stimola la produzione di numerosi fattori di crescita, come il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), i recettori per l'insulina e vasocostrittori come ET-1⁵². Ang II media inoltre la secrezione dell'aldosterone, è implicata nella produzione di ROS e interagisce con il sistema dell'NO.

L'Ang II svolge quindi un ruolo cruciale nell'induzione dell'ipertensione arteriosa, attraverso la sua azione sia a breve (stimolazione della contrazione della muscolatura liscia vasale) che a lungo termine, (induzione della crescita cellulare, aumento dei costituenti della matrice extracellulare, induzione della migrazione cellulare e dell'infiammazione). L'Ang II induce le sue azioni biologiche attraverso il legame con due distinti recettori legati alla membrana cellulare, i recettori AT1 e AT2⁵³.

La maggior parte delle azioni biologiche dell'Ang II, compresa la contrazione della cellula muscolare liscia vascolare, la crescita e l'infiammazione, sono mediate dal legame con i recettori AT1. Evidenze recenti indicano che il recettore AT2 può controbilanciare questi effetti, inducendo vasodilatazione, inibendo la crescita cellulare e l'infiammazione e mediando effetti antiipertrofici ed antiapoptotici⁵⁴⁻⁵⁷.

Numerosi dati sperimentali concordano nel suggerire che l'Ang II induca un effetto negativo sulla funzione endoteliale attraverso la liberazione di endotelina-1 dalle cellule endoteliali, la produzione endoteliale di prostanoide vasocostrittori come la PGH₂, e l'inibizione dell'attività della NO-sintetasi attraverso l'attivazione della proteina chinasi C^{58, 59}. Inoltre, studi in vitro ed in vivo nell'animale dimostrano che la somministrazione di Ang II aumenta la produzione di ROS attraverso l'attivazione dell'enzima NADH/NADPH ossidasi di membrana^{60, 61}. In un modello sperimentale di

disfunzione endoteliale secondario all'infusione cronica di Ang II, il blocco dei recettori AT1 normalizza la produzione vascolare di anione superossido e la vasodilatazione indotta dall'acetilcolina, dimostrando il ruolo del recettore AT1 nel determinare stress ossidativo e conseguentemente, disfunzione endoteliale ⁶⁰.

Ruolo di Ang II nel rimodellamento della parete vascolare

L'Ang II svolge un ruolo importante nel controllare sia l'integrità funzionale che strutturale della parete vascolare tramite cambiamenti adattativi del citoscheletro⁶².

Infatti nei piccoli vasi di resistenza, sono stati osservati cambiamenti nella struttura dopo trattamento con Ang II^{63, 64}. Ang II svolge anche un ruolo importante nei processi fisiologici che regolano la pressione sanguigna ed è implicata nei meccanismi patologici della parete vascolare⁶¹.

Inoltre, è stato osservato che l'Ang II modifica le proprietà meccaniche, associate con il rimodellamento vascolare, quali l'aumento della rigidità vascolare e la riduzione dell'elasticità della parete⁶⁵⁻⁶⁷. In numerosi studi, condotti su modelli animali nei quali è stata indotta ipertensione tramite infusione cronica di Ang II, è stato osservato rimodellamento eutrofico⁶³ o ipertrofico^{65, 68}. Il meccanismo alla base del rimodellamento eutrofico indotto da Ang II è stato associato, almeno in parte, ad un aumento dell'apoptosi nella parete vascolare, che potrebbe controbilanciare la proliferazione delle cellule³³. L'Ang II influenza l'architettura e l'integrità della parete vascolare modulando la crescita cellulare e regolando la composizione della matrice extracellulare⁶¹. Viridis et al³⁸ hanno dimostrato che l'Ang II induce un ispessimento della parete vascolare agendo direttamente sulle cellule muscolari lisce, aumentando la produzione delle proteine della ECM. Infatti l'Ang II è in grado di aumentare

l'espressione e la sintesi di fibronectina e collagene di tipo 1 e di ridurre il contenuto di elastina, principali costituenti della ECM della parete del vaso. Inoltre, sia nelle arterie mesenteriche di resistenza che nelle culture di cellule muscolari lisce vasali è stato osservato un aumento di collagene di tipo I a seguito dell'infusione con Ang II⁶⁷. L'Ang II influenza la composizione della ECM riducendo l'espressione di MMP e aumentando l'inibitore endogeno della metalloproteinasi-1. Inoltre, è stato dimostrato un aumento dell'espressione di MMP-1, -3 e -9 nelle VSMC umane, incubate con Ang II⁶⁹ e un' induzione dell'espressione/attività di MMP-2 nelle cellule endoteliali umane⁷⁰ e nelle VSMC di topo⁷¹. Alcuni segnali molecolari indotti da Ang II nell'ipertensione sono mediati da meccanismi indiretti attraverso altri agenti vasoattivi come ET-1, fattori di crescita come TGF- β 1 e PDGF-A, o citochine come il TNF⁶¹.

L'Ang II stimola la produzione di mediatori secondari. In particolare le prostaglandine³⁸ e il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) sono particolarmente importanti in questo contesto^{72, 73}.

Ruolo biologico delle ciclo-ossigenasi

Le COX o prostaglandina endoperossido sintasi sono enzimi chiave per la sintesi dei prostanoidi (prostaglandine, PG e TX) a partire dall'acido arachidonico (Figura 2).

L'acido arachidonico è liberato dai fosfolipidi di membrana grazie all'idrolisi della fosfolipasi A2 ed è trasformato da COX in PGG₂ (attività ciclo-ossigenasica) e rapidamente in PGH₂ (attività perossidasi).

PGH₂ è convertito da specifiche isomerasi nelle prostaglandine (PGE₂, PGF_{2 α} , PGI₂, PGD₂) e nei TXA₂. Esistono due isoforme di COX: COX-1 e COX-2⁷⁴. COX-1 è espressa costitutivamente in molti tessuti umani ed è responsabile della produzione di prostaglandine che controllano le normali funzioni fisiologiche, ad esempio la

protezione della mucosa gastrica e la regolazione del flusso ematico renale. COX-2 non è presente nei tessuti sani ma è indotta da stimoli pro-infiammatori e mitogeni, e promuove la sintesi di prostaglandine in tessuti infiammati e neoplastici. Le due isoforme sono proteine di membrana con una grande omologia strutturale. L'acido arachidonico (AA) accede al sito attivo di entrambi gli enzimi attraverso un canale idrofobico (lo stesso canale è occupato dai anti-infiammatori non steroidei o FANS).

COX-1 nell'ipertensione indotta da Ang II

L'attivazione e l'espressione di COX-1 rappresenta uno dei meccanismi attraverso cui Ang II induce alterazioni vascolari⁷⁵. Il ruolo di COX-1 nel processo aterosclerotico è stato ampiamente dimostrato: in aorta di topi LDL-KO, i prostanoidi derivanti dall'attivazione di COX-1 promuovono ed accelerano il processo aterosclerotico⁷⁶.

Inoltre, nell'aorta di topi con aterosclerosi (topi apo E-KO) è stato osservato che l'inibizione cronica del recettore TP induce un'inibizione del processo aterosclerotico⁷⁷.

Statine

Le statine sono i farmaci più efficaci e meglio tollerati nel trattamento delle dislipidemie per la prevenzione primaria e secondaria delle patologie cardiovascolari (Figura 3). Questi farmaci inibiscono in maniera competitiva la 3-idrossi-3-metilglutaril coenzima A reduttasi (HMG-CoA reduttasi), un enzima, coinvolto nella biosintesi epatica del colesterolo, che catalizza la conversione dell'HMG-CoA a mevalonato⁷⁸. Le statine hanno una formula di struttura molto simile all'idrossimetilglutaril-CoA, ma la loro affinità per l'enzima è molto superiore a quella del substrato naturale ed il legame

del farmaco all'enzima comporta l'inibizione di quest'ultimo ed il blocco della cascata biosintetica che dall'acetil-CoA porta alla formazione di colesterolo. La riduzione di colesterolo nell'epatocita, indotta dalle statine, favorisce un aumento compensatorio dei recettori epatici LDL. Il risultato generale è quello di un aumento della clearance delle LDL nel plasma, un effetto che giustifica la riduzione della colesterolemia⁷⁹. In seguito all'azione delle statine, i trigliceridi e le VLDL si riducono generalmente solo in una quota modesta, mentre il colesterolo HDL aumenta di circa il 10% negli ultimi anni, numerose evidenze in letteratura, hanno documentato altri potenziali effetti delle statine che, oltre all'azione ipocolesterolemizzante, potrebbero contribuire alla riduzione del rischio cardiovascolare. Tra questi effetti "pleiotropici" delle statine sono inclusi il miglioramento della disfunzione endoteliale^{30, 80}, la riduzione della proliferazione delle cellule muscolari lisce⁸¹, l'apoptosi⁸², l'incremento della biodisponibilità di ossido nitrico⁸³, l'azione anti-infiammatoria e la stabilizzazione della placca aterosclerotica^{84, 85}. Infatti, le statine migliorano la vasodilatazione endotelio-dipendente ed aumentano il numero dei progenitori circolanti delle cellule endoteliali, oltre alla riduzione dei livelli di hs-PCR e di altri marcatori dell'infiammazione come il CD40L⁸⁶. Questi farmaci offrono quindi una protezione cardiovascolare a prescindere dai livelli iniziali di colesterolo LDL, in virtù dei loro effetti anti-infiammatori, anti-trombotici e vasculoprotettivi.

Le statine possono interferire già con la prima fase del processo aterosclerotico che prevede l'interazione leucociti/endotelio e la migrazione delle cellule infiammatorie. Sono stati condotti ad esempio studi sperimentali in vitro su diversi tipi cellulari coinvolti nei meccanismi di aterogenesi, quali cellule endoteliali (EC), cellule muscolari lisce (SMC), monociti/macrofagi e linfociti T. La lovastatina riduce l'espressione dell'integrina dimerica CD11b (Mac1) sui monociti e inibisce l'adesione dei leucociti alle EC⁸⁷, mentre altre statine hanno dimostrato di ridurre l'espressione di

VCAM ed E-Selectina sulle EC⁸⁸. Ulteriori studi hanno evidenziato che le statine sono in grado di ridurre l'adesione leucocitaria anche attraverso l'interazione con l'antigene funzionale leucocitario-1 (LFA-1)⁸⁹. In seguito all'adesione alla superficie endoteliale, i leucociti migrano all'interno della parete vascolare richiamati da una sottoclasse di citochine note come chemochine⁹⁰. Anche questa fase dell'aterogenesi può essere modulata dalle statine, che hanno dimostrato di poter ridurre l'espressione di alcune chemochine, quali MCP-1 e IL-8, e regolare la migrazione di SMC, linfociti T ed EC oltre a ridurre l'accumulo di macrofagi nell'ateroma⁹¹. Le statine possono inoltre ridurre la proliferazione delle SMC in condizioni sia ex-vivo che in vitro^{92,93} anche se questi dati vanno interpretati con cautela in considerazione dei potenziali effetti tossici proapoptotici che gli inibitori della HMG-CoA reduttasi possono svolgere su queste cellule. Studi precedenti hanno evidenziato una interazione tra le statine e la via che coinvolge la COX⁸⁰. In uno di questi atorvastatina ha ridotto l'espressione di COX-2 in un modello animale di aterosclerosi³⁰. Tuttavia, il ruolo delle statine nella modulazione della COX-2 e dei prostanoidi da essa derivati, nel contesto della disfunzione endoteliale associata all'ipertensione, è attualmente sconosciuta.

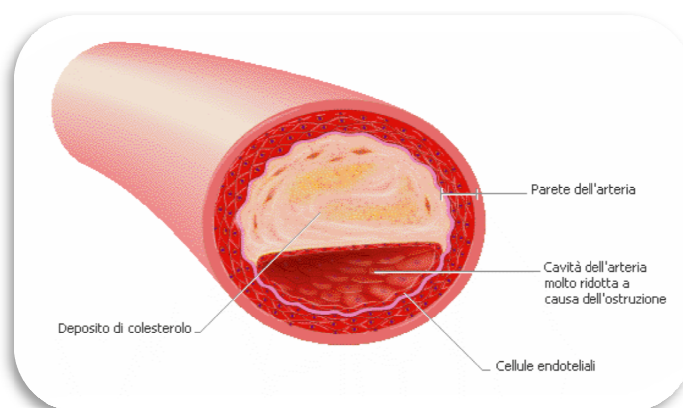


Figura 3. Patologie cardiovascolari

Rosuvastatina e sistema cardiovascolare

Rosuvastatina è la statina di più recente approvazione nel trattamento delle dislipidemie⁹⁴. Essa viene assunta per via orale, è assorbita nel tratto gastro-enterico e raggiunge il picco plasmatico dopo 5 ore dalla sua somministrazione. Si trova legata alle proteine plasmatiche, prevalentemente all'albumina, e raggiunge in grandi quantità il fegato, dove espleta parte della sua funzione biologica. Per valutare i meccanismi d'azione e gli effetti di questa statina sono stati condotti numerosi studi sia su modelli animali che sull'uomo. In particolare, in differenti modelli animali di ipercolesterolemia, di scompenso cardiaco o di diabete mellito, rosuvastatina si è dimostrata in grado di migliorare la funzione endoteliale e di esercitare effetti antiossidanti^{95, 96}. Inoltre una meta-analisi di 14 studi randomizzati, che ha coinvolto più di 90.000 pazienti, ha dimostrato che la riduzione di 1mmol/l dei livelli di colesterolo reduce del 19% la mortalità coronarica. Il programma GALAXY comprende una serie di studi clinici che stanno esaminando l'efficacia e la tollerabilità della rosuvastatina nel migliorare il profilo lipidico aterogenico, nel modificare i marker infiammatori, nel rallentare la progressione dell'aterosclerosi e nel migliorare l'*outcome* cardiovascolare^{94,97}.

OBIETTIVI DEL PROGRAMMA DI RICERCA

Sulla base di queste premesse, il presente programma di ricerca è stato realizzato al fine di:

1) Valutare il contributo derivante dall'azione di COX-1, e dei prostanoidi attivi sui recettori TP, sulle modificazioni morfologiche e sulle componenti della ECM, che caratterizzano il rimodellamento vascolare nelle piccole arterie di resistenza di topi trattati cronicamente con Ang II.

2) Esaminare gli effetti della rosuvastatina sulla disfunzione endoteliale e sul rimodellamento vascolare nelle arterie mesenteriche di resistenza di ratti nei quali è stata indotta ipertensione con Ang II, e verificare se tali effetti coinvolgano COX-1.

MATERIALI E METODI

Tutti gli esperimenti condotti in questo studio sono stati eseguiti in accordo con le direttive dell'European Union Council 86-609, riconosciute dal Governo Italiano.

PARTE 1: CONTRIBUTO DERIVANTE DALL'ATTIVAZIONE DI COX-1 E DEI SUOI PROSTANOIDI ATTIVI SUI RECETTORI TP SULLE MODIFICAZIONI MORFOLOGICHE E SULLE COMPONENTI DELLA ECM, CHE CARATTERIZZANO IL RIMODELLAMENTO VASCOLARE NELLE PICCOLE ARTERIE DI RESISTENZA DI TOPI TRATTATI CRONICAMENTE CON ANG II

Gruppi di trattamento

Gli esperimenti sono stati condotti su topi C57BL/6J maschi, omozigoti per delezione genetica del gene COX-1 (*COX-1^{-/-}*) e topi dello stesso ceppo wild-type (WT) di 12-14 settimane di età, provenienti dai Laboratori Harlan. Sotto anestesia con cloralio idrato, gli animali sono stati sottoposti a impianto sottocutaneo di minipompe osmotiche a liberazione graduale di Ang II (400 ng/Kg/min; Peninsula, Palo Alto, CA, USA) e di soluzione salina negli animali di controllo. Tre ulteriori gruppi di topi WT sono stati sottoposti a infusione cronica con Ang II e trattati anche con:

- 1) SC-560 (inibitore selettivo di COX-1, 5 mg/Kg/die, nel cibo)
- 2) DFU (inibitore selettivo di COX-2, 5 mg/Kg/die nel cibo)
- 3) SQ-29548 (antagonista del recettore TP del trombossano, 2 mg/Kg/die i.p.)

Le dosi di SC-560 e di DFU sono state stimate sulla base di studi precedenti^{98, 99}. SQ-29548 è stato somministrato per via intraperitoneale, a causa della sua ridotta biodisponibilità per somministrazione orale¹⁰⁰.

Parametri fisiologici

Gli animali sono stati sottoposti a misurazione del peso corporeo e della pressione arteriosa sistolica (PAS). La PAS è stata misurata con il metodo tail-cuff (BP recorder 58600, Ugo Basile, Italia)⁷⁵, registrata in condizioni basali e giornalmente durante l'infusione con Ang II, e riportata come media di 3 registrazioni.

Preparazione delle arterie mesenteriche per lo studio della reattività vascolare

Lo studio della reattività vascolare è stato eseguito utilizzando la tecnica della micromiografia a pressione (Myograph, DMT, Aarhus, Danimarca)¹⁰¹. Dopo aver sacrificato l'animale, l'albero mesenterico viene interamente prelevato e mantenuto vitale grazie ad una soluzione salina fisiologica (PSS) contenente: NaCl 120, NaHCO₃ 25, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.18, CaCl₂ 2.5, EDTA 0.026, glucosio 5.5 mmol/L) a pH 7.4.

Successivamente il preparato viene disteso all'interno di una piastra Petri. Mediante l'utilizzo di un microscopio ottico bifocale, si procede all'identificazione della seconda branca di diramazione dell'arteria mesenterica nella porzione prossimale all'intestino, la quale viene liberata dal tessuto connettivale circostante e dalla vena localizzata parallelamente all'arteria in questione. Le arterie così isolate vengono incannulate alle due estremità, poste in una camera miografica e sottoposte ad una

pressione costante di 45 mmHg. E' stato possibile visualizzare su monitor i vasi tramite videocamera posta al di sopra della camera miografica. Con l'ausilio di uno specifico software è stato possibile misurare lo spessore della media e il diametro del lume, i quali, permettono di calcolare il rapporto percentuale tonaca media/lume del vaso e l'area trasversa della media (CSA)⁶⁵.

Analisi immunoistochimica di COX-1, collagene di tipo I, fibronectina e analisi istochimica di elastina

Dopo l'isolamento, le arterie mesenteriche sono state fissate in paraformaldeide al 4% diluita in PBS e mantenute a 4°C tutta la notte. Successivamente i campioni sono stati disidratati in etanolo, chiarificati in xilolo e inclusi in paraffina in una stufetta alla temperatura di 56°C. Sezioni seriate di 8 µm di spessore sono state processate per le colorazioni istochimiche o per le reazioni immunoistochimiche. La procedura immunoistochimica prevede i seguenti passaggi: smascheramento dei siti antigenici tissutali con microonde, in una soluzione tampone di sodio citrato a pH=6; blocco delle perossidasi endogene con acqua ossigenata (H₂O₂) all'1% in metanolo per 30 minuti; blocco dei siti aspecifici con siero normale di capra (GS) (1:20; Sigma Chemicals) per 20 minuti a 37°C. Le sezioni sono state incubate a 4°C per tutta la notte con i seguenti anticorpi primari policlonali di coniglio: anti-COX-1 (diluizione 1:1000, Cayman, cod. Cay-160109), anti-collagene I (diluizione 1:1500, Abcam, cod. ab34710) e anti-fibronectina (diluizione 1:10000, Epitomics, cod. P02751)⁷⁵. Le immunoglobuline primarie sono state diluite in PBS con 0,1% di siero albumina bovina (BSA) e 0,1% di sodio azide (NaN₃). Gli immunoprecipitati sono stati poi rilevati secondo il metodo indiretto streptavidina/perossidasi (Vector Laboratories, Burlingame, CA) in breve, le

sezioni sono incubate con: anticorpo secondario biotinilato; complesso streptavidina/perossidasi; cromogeno 3-3'-diaminobenzidina tetraidrocloruro (DAB). Infine le sezioni sono state controcolorate con emallume di Harris. Tutte le reazioni sono state condotte a temperatura ambiente in camera umida, e il tampone fosfato salino (PBS 1X) è stato utilizzato per i lavaggi delle sezioni tra i diversi passaggi. I controlli negativi sono stati ottenuti sostituendo gli anticorpi primari con siero non immune di coniglio. Le perossidasi endogene e l'attività dell'avidina sono state misurate attraverso l'incubazione delle sezioni con solo DAB o con un complesso streptoavidina perossidasi/DAB. I campioni sono stati esaminati al microscopio ottico al quale è collegata una fotocamera con cui sono state acquisite immagini ad un ingrandimento 40x. L'immunopositività dei campioni è stata quantificata con un software di analisi di immagini (McBiophotonics Image J) e i valori delle aree positive sono stati normalizzati rispetto al totale dell'area esaminata.

L'analisi istochimica delle fibre elastiche e delle fibre collagene è stata eseguita con il metodo di colorazione Verhoeff-Van Gieson indicato per le patologie vascolari¹⁰². Anche in questo caso l'immunopositività è stata quantificata con un software di analisi di immagini (McBiophotonics Image J) e i valori delle aree positive sono stati normalizzati rispetto al totale dell'area esaminata.

Analisi RT-PCR dell'espressione di COX-1 e COX-2

L'espressione dell'mRNA per le isoforme di COX-1 e COX-2 nelle arterie mesenteriche di topo è stata valutata mediante la tecnica RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction). Dopo aver omogeneizzato i preparati di arterie mesenteriche, l'RNA totale è stato isolato tramite Trizol[®] (Life Technologies) e

cloroformio. L'RNA totale è stato utilizzato per la sintesi del cDNA in una reazione condotta utilizzando 2 µl di oligonucleotidi esamerici randomizzati (0.5 µg/µl) con 200 U di MMLV-trascrittasi inversa in tampone contenente 500 µM di dNTP e 10 mM di ditiotreitolo. I campioni di cDNA sono stati sottoposti a PCR in presenza di primer specifici, basati sulla sequenza nucleotidica dei geni che codificano per COX-1 o COX-2 e pro-collagene I. L'efficienza della reazione di RT-PCR è stata controllata attraverso l'impiego di primer specifici per la β -actina di topo. I prodotti di amplificazione sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1,8% e marcati con bromuro di etidio. Le bande di cDNA sono state visualizzate con luce UV, quantificate attraverso analisi densitometrica con un software di analisi di immagini (NIH image) e normalizzate rispetto a quelle di β -actina.

Analisi Western Blot di COX-1 e COX-2

Le arterie mesenteriche sono omogeneizzate tramite buffer di lisi. L'omogenato è stato centrifugato a 20,000 g per 15 minuti a 4°C e il supernatante ottenuto, congelato a -80°C. La concentrazione di proteine è stata determinata per ogni campione tramite metodo Bradford (Protein Assay Kit, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). L'equivalente di 50 µg di proteine lisate sono separate tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide 8% e trasferite su membrana di nitrocellulosa. I siti di legame non specifici sono stati bloccati mediante incubazione per 1 ora, con una soluzione al 5% di latte scremato in polvere (Bio-Rad) in PBS. La membrana è stata poi incubata per tutta la notte a temperatura ambiente con gli anticorpi policlonali di topo anti-COX-1, COX-2, o β -actina. Dopo lavaggio con PBS contenente lo 0.1% di Tween 20 (PBS-T), la nitrocellulosa è stata incubata, a temperatura ambiente per un'ora, con l'anticorpo anti-IgG di topo coniugato

con perossidasi. Il legame antigene-anticorpo è stato visualizzato mediante chemiluminescenza (ECL, Amersham Biosciences, Europe GmbH, Cologno Monzese, Italy) dopo aver posto le membrane a contatto con emulsioni fotografiche (Pierce). L'espressione relativa di COX-1, COX-2 e β -actina è stata quantificata tramite analisi densitometrica delle bande, con un software di analisi di immagini (NIH Image).

Determinazione della prostaglandina-6-Keto $F_{1\alpha}$ e dell' 8-isoprostano

La concentrazione della prostaglandina (PG)-6-keto $F_{1\alpha}$ e dell'8-isoprostano è stata determinata nel mezzo di incubazione di vasi mesenterici isolati. La concentrazione dei prostanoidi è stata misurata mediante un kit commerciale specifico per immunodosaggi enzimatici (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)³⁰. A tale fine, il mezzo di incubazione è stato congelato in azoto liquido dopo la raccolta, conservato a -70°C fino all'esecuzione e i dati ottenuti analizzati secondo le istruzioni del produttore.

PARTE 2: EFFETTI DELLA ROSUVASTATINA SULLA DISFUNZIONE ENDOTELIALE E SUL RIMODELLAMENTO VASCOLARE NELLE ARTERIE MESENTERICHE DI RESISTENZA DI RATTI CON IPERTENSIONE INDOTTA DA ANG II: RUOLO DI COX-1

Gruppi di trattamento

Gli esperimenti sono stati condotti su ratti maschi Sprague-Dowley (250-300 mg), provenienti dai Laboratori Harlan. Sotto anestesia con cloralio idrato, gli animali sono stati sottoposti a impianto sottocutaneo di minipompe osmotiche (Alzet Corp., Palo Alto, CA, USA) a liberazione graduale di Ang II (120 ng/Kg/min) e di soluzione salina negli animali di controllo. Gli animali sono stati trattati con rosuvastatina (10 mg/Kg/die gavage orale) o placebo per due settimane (8 animali per gruppo). La dose di rosuvastatina è stata selezionata sulla base di studi preliminari nei quali sono state saggiate le dosi del farmaco da 1 a 20 mg/Kg/die. La dose di 10 mg/Kg/die, utilizzata nello studio, è risultata essere la minima dose con massimo effetto funzionale, senza interferenza a livello emodinamico.

Parametri fisiologici

Gli animali sono stati sottoposti a misurazione del peso corporeo e della pressione arteriosa sistolica (PAS). La PAS è stata misurata con il metodo tail-cuff (BP recorder 58600, Ugo Basile, Italia)¹⁰³, registrata in condizioni basali e giornalmente durante l'infusione con Ang II, e riportata come media di 3 registrazioni.

Preparazione delle arterie mesenteriche per lo studio della reattività vascolare

Lo studio della reattività vascolare è stato eseguito utilizzando la tecnica della micromiografia a pressione (Myograph, DMT, Aarhus, Danimarca)¹⁰¹, come precedentemente descritto nelle Parte 1. Le vasodilatazioni endotelio-dipendente ed endotelio-indipendente sono state valutate determinando il rilasciamento arteriolare progressivo conseguente a concentrazioni incrementali rispettivamente di acetilcolina (ACh, 0.001-100 $\mu\text{mol/L}$) e di nitroprussiato di sodio (SNP, 0.01-100 $\mu\text{mol/L}$) in vasi precontratti con noradrenalina (NA, 10 $\mu\text{mol/L}$).

Ruolo dell'attività di COX-1, COX-2 e del recettore TP sulla vasodilatazione endotelio-dipendente

La partecipazione di COX-1 e COX-2 nella modulazione della funzione endoteliale è stata valutata mediante curve di concentrazione-risposta all'ACh dopo 30 minuti dall'incubazione del vaso con l'inibitore selettivo COX-1, SC-560 (1 $\mu\text{mol/L}$; Sigma) o con l'inibitore selettivo COX-2, Dup-697 (1 $\mu\text{mol/L}$). Per valutare il ruolo che i recettori TP svolgono nella disfunzione endoteliale, le curve di concentrazione-risposta all'ACh sono state ripetute dopo 30 minuti di incubazione con l'antagonista del recettore TP, SQ-29548 (1 $\mu\text{mol/L}$).

Biodisponibilità di NO e generazione di ROS nella vasodilatazione endotelio- dipendente

Per valutare l'influenza della biodisponibilità di NO sulla risposta dei ROS sulla funzione endoteliale, sono state eseguite curve concentrazioni-risposta all'ACh determinate dopo aver pre-incubato il vaso per 30 minuti con N^o-nitro-L-arginina metilestere (L- NAME; 100 µmol/L), un inibitore dell'NO sintetasi.

Un'ulteriore serie di esperimenti (n=6 per ciascun gruppo) è stata eseguita effettuando una curva concentrazione-risposta all'ACh dopo aver pre-incubato il vaso con l'antiossidante acido ascorbico (100 µM, Sigma). Inoltre, per valutare se nei ratti la ridotta biodisponibilità di NO fosse conseguenza dell'aumentata produzione di ROS, l'ACh è stata infusa anche in presenza di L-NAME e acido ascorbico.

Tecnica del diidroetidio per la determinazione in situ di anione superossido vascolare

La produzione di anione superossido vascolare è stata valutata *in situ* mediante la tecnica a fluorescenza del diidroetidio (DHE, Sigma). Le sezioni dei vasi (8 µm di spessore) sono state eseguite mediante criostato, e immediatamente disposte su vetrino (Super Frost^R plus). In presenza di anione superossido il DHE viene ossidato, si trasforma in etidio e, intercalandosi nel DNA, colora il nucleo esibendo fluorescenze nel rosso (eccitazione a 448 nm ed emissione a 610 nm).

La tecnica prevede diverse fasi di lavoro:

- Incubare i vetrini con una soluzione contenente liquido di Krebs-HEPES per 30 minuti a 37 °C in un bagnetto termostato
- Disporre i vetrini su carta bagnata ed aggiungere il tampone contenente 2 $\mu\text{mol/L}$ di DHE
- Incubazione in camera oscura umidificata per 30 minuti a 37 °C
- Rivelazione mediante un microscopio a fluorescenza.
- Quantificazione delle immagini con uno specifico software in grado di stimare la percentuale del vaso marcata in rosso (McBiophotonics Image J; National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Analisi immunoistochimica di collagene di tipo I, fibronectina e analisi istochimica di elastina

Dopo l'isolamento, le arterie mesenteriche sono state fissate in paraformaldeide al 4% diluita in PBS e mantenute a 4°C per tutta la notte. Successivamente i campioni sono stati disidratati in etanolo, chiarificati in xilolo e inclusi in paraffina in una stufetta alla temperatura di 56°C. Sezioni seriate di 8 μm di spessore sono state processate per le colorazioni istochimiche o per le reazioni immunoistochimiche. La procedura immunoistochimica ha previsto i seguenti passaggi: smascheramento dei siti antigenici tissutali con microonde, in una soluzione tampone di sodio citrato a pH=6; blocco delle perossidasi endogene con acqua ossigenata (H_2O_2) all'1% in metanolo per 30 minuti; blocco dei siti aspecifici con siero normale di capra (GS) (1:20; Sigma Chemicals) per 20 minuti a 37°C. Le sezioni sono state incubate a 4°C per tutta la notte con i seguenti anticorpi primari policlonali di coniglio: anti-collagene I (diluizione 1:1500, Abcam, cod. ab34710) e anti-fibronectina (diluizione 1:10000, Epitomics, cod. P02751)⁷⁵. Le

immunoglobuline primarie sono state diluite in PBS con 0,1% di siero albumina bovina (BSA) e 0,1% di sodio azide (NaN_3). Gli immunoprecipitati sono stati poi rilevati secondo il metodo indiretto streptavidina/perossidasi (Vector): in breve, le sezioni sono incubate successivamente con: anticorpo secondario biotinilato, complesso streptavidina/perossidasi e cromogeno 3-3'-diaminobenzidina tetraidrocloruro (DAB).

Infine le sezioni sono state controcolorate con emallume di Harris. Tutte le reazioni sono state condotte a temperatura ambiente in camera umida, e il tampone fosfato salino (PBS 1X) è stato utilizzato per i lavaggi delle sezioni tra i diversi passaggi. I controlli negativi sono stati ottenuti sostituendo gli anticorpi primari con siero non immune di coniglio. Le perossidasi endogene e l'attività dell'avidina sono state misurate attraverso l'incubazione delle sezioni con solo DAB o con un complesso streptavidina perossidasi/DAB. I campioni sono stati esaminati al microscopio ottico a cui è collegata una fotocamera con cui sono state acquisite immagini ad un ingrandimento 40x. L'immunopositività dei campioni è stata quantificata con un software di analisi di immagini (McBiophotonics Image J) e i valori delle aree positive sono stati normalizzati sul totale dell'area esaminata. L'analisi istochimica delle fibre elastiche è stata eseguita con il metodo di colorazione Tanzer-Unna orceina (1g Orceina, 100 ml Etanolo 80%, 1 ml HCl 37%). Anche in questo caso l'immunopositività è stata quantificata con un software di analisi di immagini (McBiophotonics Image J) e i valori delle aree positive sono stati normalizzati sul totale dell'area esaminata.

Ruolo di COX-1 e della NADPH ossidasi sulla deposizione di collagene di tipo I indotta da Ang II

Per valutare il ruolo di COX-1 e della NADPH ossidasi sulla deposizione di collagene indotta da Ang II e confrontare i loro effetti su quanto osservato con rosuvastatina sono stati utilizzati due ulteriori gruppi di topi WT sottoposti a infusione cronica con Ang II e trattati anche farmacologicamente con:

- 1) SC-560 (inibitore selettivo di COX-1, 5 mg/Kg/die, somministrazione orale)
- 2) Apocianina (inibitore selettivo della NADPH ossidasi, 1,5 mmol/L in acqua)

Gli animali sono stati trattati per due settimane (8 animali per gruppo). La dose di SC-560 e apocianina è stata selezionata sulla base di precedenti studi (Virdis 2011+ Beswick 2001) e in accordo con la quantità di acqua consumata dai ratti.

Analisi RT-PCR dell'espressione di COX-1

L'espressione dell'mRNA per l' isoforma di COX-1 nelle arterie mesenteriche di ratto è stata valutata mediante la tecnica RT-PCR. Dopo aver omogeneizzato i preparati di arterie mesenteriche, l'RNA totale è stato isolato tramite Trizol[®] (Life Technologies) e cloroformio. L'RNA totale è stato utilizzato per la sintesi del cDNA in una reazione condotta utilizzando 2 µl di oligonucleotidi esamerici randomizzati (0.5 µg/µl) con 200 U di MMLV-trascrittasi inversa in tampone contenente 500 µM di dNTP e 10 mM di ditiotreitolo. I campioni di cDNA sono stati sottoposti a PCR in presenza del primer specifico, basato sulla sequenza nucleotidica del gene che codifica per COX-1.

L'efficienza della reazione di RT-PCR è stata controllata attraverso l'impiego di primer specifici per la β -actina di ratto. I prodotti di amplificazione sono stati separati

mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1,8% e marcati con bromuro di etidio. Le bande di cDNA sono state visualizzate con luce UV, quantificate attraverso analisi densitometrica con un software di analisi di immagini NIH (Scion Corporation, Frederick, MD) e normalizzate rispetto a quelle di β -actina.

Determinazione della prostaglandina 6-Keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ e dell'8-isoprostano

La concentrazione della prostaglandina (PG)-6-keto $\text{F}_{1\alpha}$ (metabolita stabile della prostaciclina, COX-1 derivato) e dell'8-isoprostano (prostanoidi COX-2 derivato) è stata determinata nel mezzo di incubazione di vasi mesenterici isolati. La concentrazione dei prostanoidi è stata misurata mediante un kit commerciale specifico per immunodosaggi enzimatici (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). A tale fine, il mezzo di incubazione è stato congelato in azoto liquido dopo la raccolta, conservato a -70°C fino all'esecuzione e i dati ottenuti analizzati secondo le istruzioni del produttore³⁰.

Determinazione dei livelli plasmatici di malondialdeide (MDA) e di colesterolo

La concentrazione plasmatica di MDA, indice di perossidazione lipidica delle membrane cellulari, è stata valutata per mezzo di un kit colorimetrico (Cayman). I campioni di siero sono stati centrifugati per a 1500 g per 10 minuti a 4°C. I livelli plasmatici di MDA sono stati valutati nel sovratanante.

Il colesterolo sierico totale è stato determinato per mezzo di un metodo enzimatico colorimetrico (Roche, Germania). La misurazione dei livelli di colesterolo è stata eseguita utilizzando colesterolo esterasi (CE), colesterolo ossidasi (CO) e perossidasi (POD). Gli esteri del colesterolo, tramite CE, sono scissi in colesterolo libero e acidi grassi. Successivamente la CE catalizza l'ossidazione del colesterolo a colest-4-en-3-one e perossido di idrogeno. Il perossido di idrogeno così formato, può essere utilizzato per ossidare un indicatore (4-aminoantipirina, 4-AAP), reazione catalizzata dalla POD.

L'intensità del colore misurata ad una assorbanza di 512 nm, è direttamente proporzionale alla concentrazione di colesterolo.

Farmaci e soluzioni

Sono stati utilizzati i seguenti farmaci:

SC-56: (5-[4-clorofenile]-1-[4-metossifenile]-3-trifluorometil pirazolo), Sigma Chemicals (St. Louis, MI).

SQ-29548: (7-[3-[2-[(fenilamino)carbonile]idrazino]metil]-7-ossabicyclo[2.2.1] eptano-2-yl] - [1S(1alpha, 2 alpha(Z), 3 alpha, 4 alpha)] -5-acido eptenoico, Cayman Chemical.

DFU: (5,5-dimetil-3-(3-fluorofenile)-4-(4-metilsulfonile)-fenil-2(5H)-furanone, Merck Research Laboratories (Rahway, NJ, USA).

Apocianina: dalla Sigma Chemicals (St. Louis, MI).

Dup-69: (5-bromo-2[4-fluorophenyl]-3-[4-methylsulfonylphenyl]-thiophene), Tocris Bioscience

Acetilcolina: (ACh), Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA.

Nitroprussiato di sodio: (SNP), Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA.

Noradrenalina: (NA), Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA.

Angiotensina II: (Ang II), Peninsula Laboratories, Palo Alto, CA, USA.

Rosuvastatina: Astra Zeneca, Milano, Italia.

N^o-nitro-L-arginina metilestere: (L- NAME), Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA.

Acido ascorbico: (Vit C), Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA.

Le soluzioni dei farmaci sono state preparate in dimetilsolfossido e le successive diluizioni sono state preparate con acqua distillata.

ANALISI STATISTICA

I risultati sono stati espressi come valore percentuale rispetto ai valori di controllo $\pm$ errore standard della media (E.S.M.). La significatività tra le differenze è stata valutata attraverso l'analisi della varianza a una via (ANOVA), seguita dal test di Student-Newman-Keuls. Le differenze tra gruppi sono state considerate statisticamente significative quando il valore di p è risultato inferiore a 0.05 ($P<0.05$). Le risposte vasodilatatrici massimali ottenute con ACh e nitroprussiato di sodio (E_{max}) sono state calcolate come percentuale massima di incremento del diametro del lume. L'elaborazione informatica dei risultati è stata eseguita tramite software commerciale (GraphPad Prism™, versione 5.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, U.S.A.).

RISULTATI

PARTE 1. CONTRIBUTO DERIVANTE DALL'ATTIVAZIONE DI COX-1 E DEI SUOI PROSTANOIDI ATTIVI SUI RECETTORI TP SULLE MODIFICAZIONI MORFOLOGICHE E SULLE COMPONENTI DELLA ECM, CHE CARATTERIZZANO IL RIMODELLAMENTO VASCOLARE NELLE PICCOLE ARTERIE DI RESISTENZA DI TOPI TRATTATI CRONICAMENTE CON ANG II

Parametri fisiologici

Il peso corporeo, valutato immediatamente prima del sacrificio degli animali, è risultato analogo in tutti i gruppi (Tabella 1). In animali sottoposti ad infusione cronica con Ang II, la PAS è risultata significativamente aumentata rispetto agli animali di controllo e non subiva variazioni significative a seguito del trattamento farmacologico.

L'Ang II induce un aumento della pressione sistolica anche nei topi COX-1-/-, seppur meno evidente (Tabella 1).

Parametri strutturali

Alla pressione intraluminale di 45 mmHg il diametro del lume non mostrava differenze significative tra i vari gruppi (Tabella 1). E' stato riscontrato un incremento significativo dello spessore della tonaca media nei topi WT sottoposti ad infusione cronica con Ang II, con conseguente aumento significativo del rapporto media/lume (M/L) e dell'area trasversa della media (CSA), due parametri significativi di rimodellamento ipertrofico vascolare. Queste alterazioni sono risultate parzialmente

ridotte negli animali trattati con SC-560 o SQ-29548, ma non sono state modificate dal DFU (Tabella 1). Nei topi COX-1^{-/-} non è stato osservato l'effetto rimodellante dell'Ang II per assenza dell'enzima COX-1.

Analisi immunoistochimica di COX-1, collagene di tipo I, fibronectina ed analisi istochimica di elastina

Nella media delle arterie mesenteriche di topi WT infusi con Ang II si evidenzia una marcata immunopositività per COX-1 nell'endotelio e nello strato muscolare, e per collagene I e fibronectina nella parete esterna, nella tonaca media e nell'avventizia (Figura 4-5 e Tabella 2). In queste condizioni, SC-560 o SQ-29548 prevengono pressoché completamente la deposizione di collagene I e fibronectina. Al contrario, DFU riduce solo in parte la deposizione vascolare di queste proteine (Figura 5 e Tabella 2). In animali WT infusi con Ang II il contenuto di elastina risulta ridotto rispetto a quanto osservato nella media dei vasi ottenuti da topi di controllo. Questa riduzione è completamente prevenuta dal trattamento con SC-560 o SQ-29548, ma solo in parte contrastata da DFU (Figura 6 e Tabella 2). Gli stessi studi condotti sui vasi dei topi COX-1^{-/-} non hanno evidenziato variazioni significative di collagene di tipo I, fibronectina ed elastina a seguito dell'infusione cronica con Ang II (Figura 6 E,F e 7 e Tabella 2).

TABELLA 1. Parametri fisiologici e strutturali

Parametri	Topi Wild-Type					Topi <i>COX-I</i> ^{-/-}	
	Ctrl (n=8)	Ang II (n=8)	Ang II+SC-560 (n=8)	Ang II+DFU (n=8)	Ang II+SQ (n=8)	Ctrl (n=8)	Ang II (n=8)
Peso corporeo, g	25.5±1.6	25.2±2.8	26.4±2.5	25.4±3.2	25.9±2.9	25.8±3.1	25.3±2.7
PAS, mmHg	106±5	169±7*	157±10*	163±8*	160±6*	104±5	144±6†
Diametro lume, µm	203±9	196±5	202±6	203±4	206±6	208±6	197±5
Spessore media, µm	11.1±0.2	14.5±0.3*	12.5±0.2*†	14.5±0.2*	12.3±0.4*†	11.4±0.3	11.7±0.2
M/L (%)	5.5±0.2	7.4±0.2*	6.2±0.3*†	7.4±0.1*	6.0±0.3*†	5.5±0.1	5.9±0.2
Media CSA, 10³ x µm²	7.4±0.4	9.6±0.4*	7.4±0.3	9.5±0.3*	8.2±0.3	7.8±0.3	7.7±0.1

Ctrl, controlli; SQ, SQ-29548; PAS, pressione arteriosa sistolica; M/L, rapporto tonaca media diametro lume; CSA, area trasversa della tonaca media. * $P < 0.05$ vs Ctrl; † $P < 0.05$ vs Wild-Type Ang II.

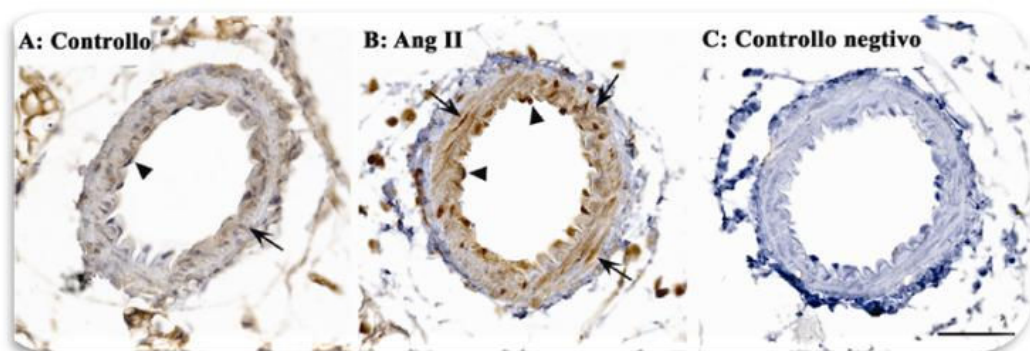


Figura 4. Analisi immunoistochimica di COX-1 nelle piccole arterie mesenteriche di topo di controllo (A) o infusi con Ang II (B). Controllo negativo di COX-1 (C). Scala: 50 μ m

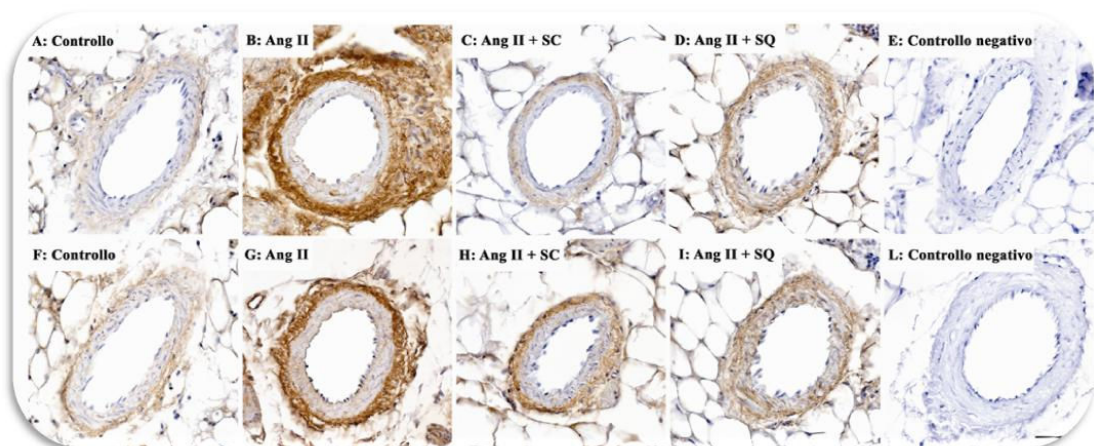


Figura 5. Analisi immunoistochimica di collagene tipo I (A-D, immunopositività marrone) e fibronectina (F-I, immunopositività marrone) nelle piccole arterie mesenteriche di topo WT di controllo, trattati con Ang II, con Ang II+SC-560 (SC), o con Ang II+SQ-29548 (SQ). Controllo negativo di COX-1 (E, L). Scala: 50 μ m

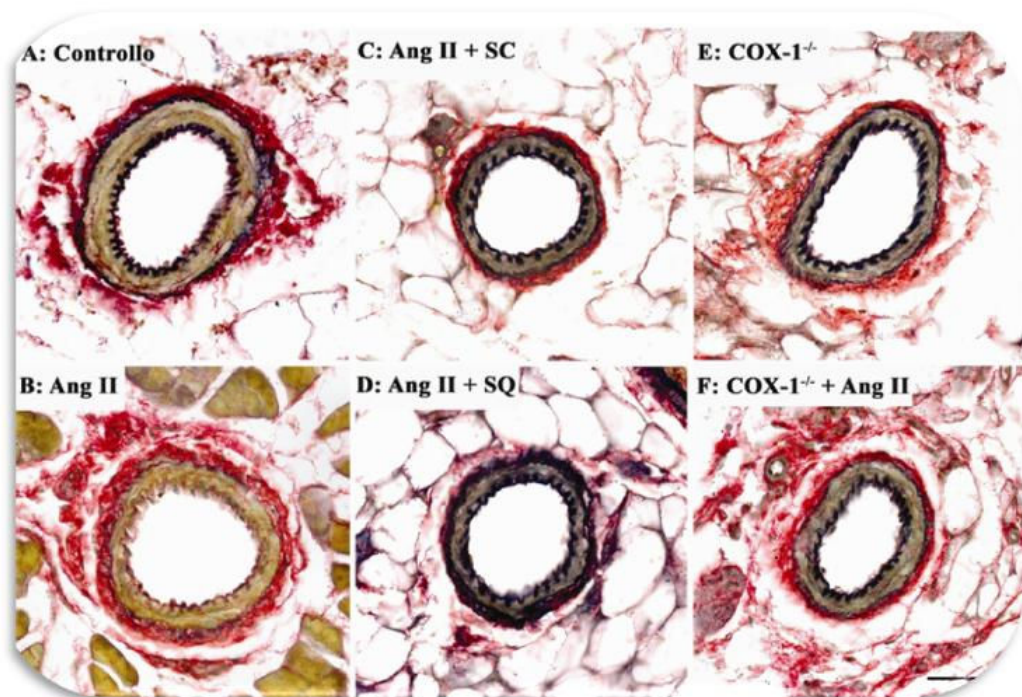


Figura 6. Analisi istochimica Verhoeff-Van Gieson per elastina (nero) e per fibre di collagene (rosso) nelle piccole arterie mesenteriche di topo WT e COX-1^{-/-} (A, E), trattati con Ang II (B, F), con Ang II+SC-560 (SC; C), con Ang II+SQ-29548 (SQ; D). Scala: 50 μ m

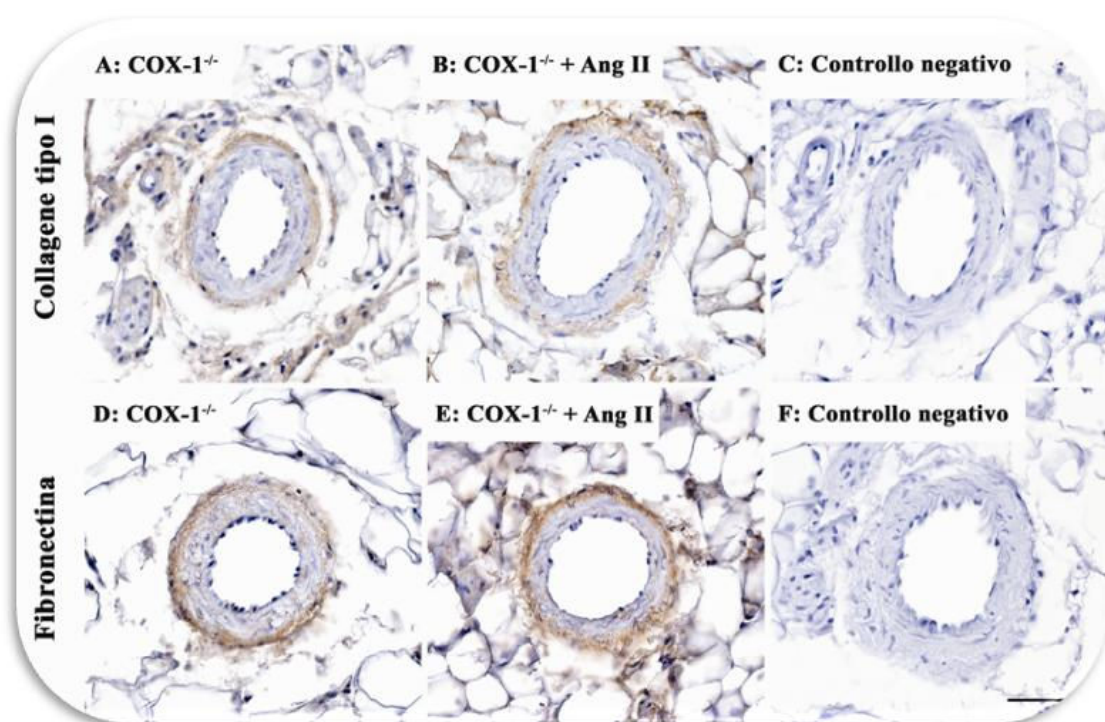


Figura 7. Analisi immunoistochimica di collagene tipo I (A,B immunopositività marrone) e fibronectina (D, E immunopositività marrone) nelle piccole arterie mesenteriche di topo di controllo e COX-1^{-/-} infuso. Scala: 50 μ m

TABELLA 2. Percentuale relativa alle componenti della ECM e ai livelli di 6 Keto-PG F_{1α} e 8-isoprostano

Parametri	Topi Wild-Type					Topi COX-1 ^{-/-}		
	Ctrl (n=8)	Ang II (n=8)	Ang II+SC-560 (n=8)	Ang II+DFU (n=8)	Ang II+SQ (n=8)	Ctrl (n=8)	Ang II (n=8)	
Collagene tipo I	21.6±0.8	34.9±1.6*	22.8±1.6	30.2±1.8*	21.0±1.1	20.9±0.9	21.2±1	
Fibronectina	21.3±1.2	34.6±2.0*	21.5±1.2*	29.8±1.6*	21.8±1.4*	18.6±2.1	19.2±1.3	
Elastina	34.1±2.1	17.9±1.4*	27.8±1.3	18.6±0.4*	30.2±1.5	31.8±1.9	31.3±1.4	
6 Keto-PGF_{1α} (µg/g/ml)	19.6±0.4	40.2±0.7*	10.3±0.4**	38.2±0.4*	37.3±1.6*	8.2±1.2	8.5±0.3	
8-isoprostano (pg/g/ml)	10.3±0.1	8.6±1.0	8.3±0.8	5.4±0.6*	8.2±0.7	10±0.1	10.1±0.9	

Valori espressi come intensità/area (pixels). Ctrl, controlli; SQ, SQ-29548. * P<0.05 vs altri gruppi; ** P<0.05 vs Ang II.

Analisi RT-PCR dell'espressione di COX-1 e COX-2

Nei vasi ottenuti da animali di controllo, l'analisi RT-PCR evidenzia l'espressione dell'mRNA codificante per COX-1 e COX-2. In animali WT infusi con Ang II, si osserva un incremento significativo dell'espressione di COX-1, mentre l'espressione di COX-2 risulta significativamente ridotta. In queste condizioni, il trattamento con i farmaci in studio non produceva variazioni significative dell'espressione delle isoforme COX (Figura 8). Nei topi COX-1^{-/-} l'espressione di COX-1 è completamente assente e l'Ang II non ha indotto alcun effetto su tale espressione, mentre è stata osservata una espressione basale di COX-2 che risulta essere significativamente ridotta dall'Ang II (Figura 8).

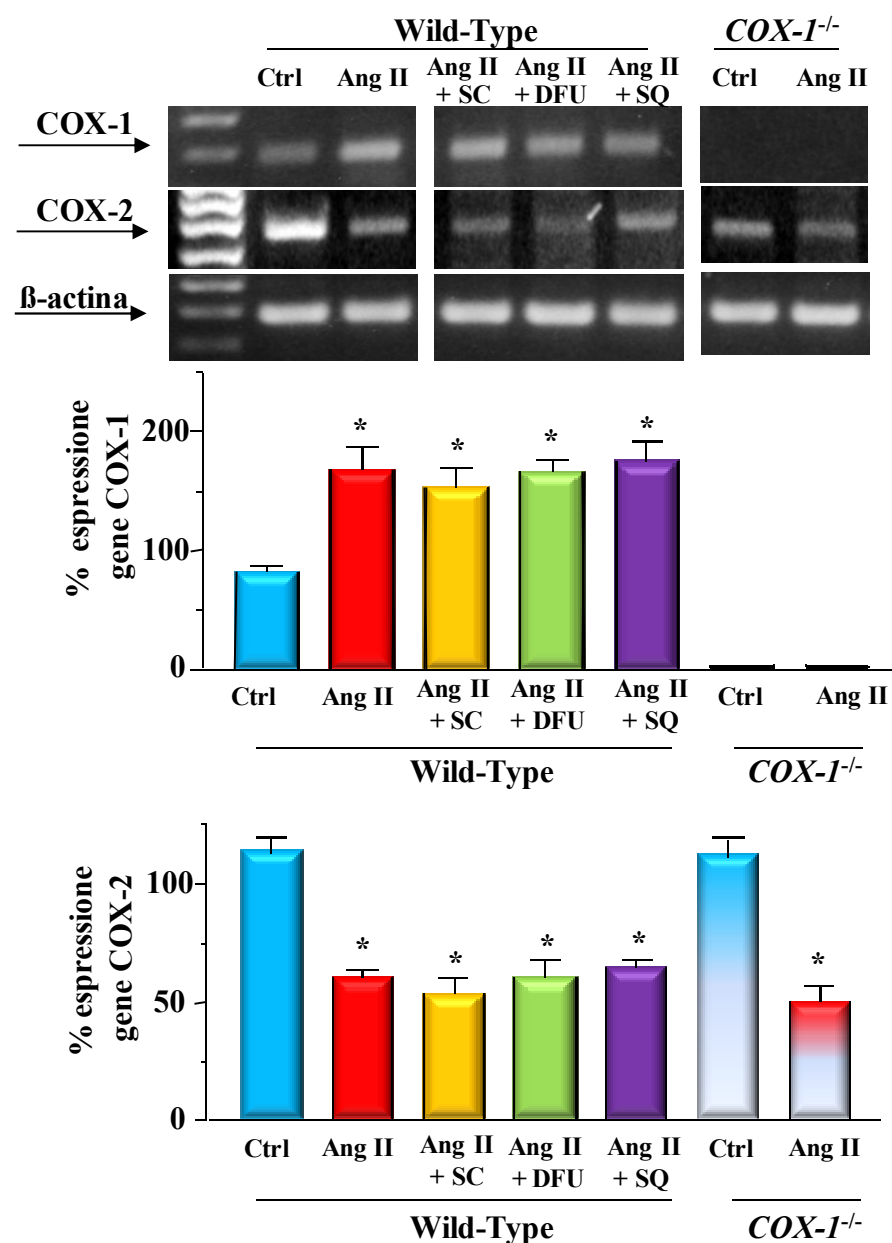


Figura 8. Analisi RT-PCR di COX-1, COX-2 e β -actina in arterie mesenteriche di topi WT controllo (Ctrl) e sottoposti ad infusione cronica con angiotensina (A) II e Ang II+SC-560 (SC), DFU o SQ-29548 (SQ) e in topi COX-1^{-/-} $\pm$ Ang II. I grafici rappresentano l'analisi densitometrica delle bande di cDNA delle isoforme di COX normalizzate con l'espressione della β -actina. Ogni colonna rappresenta la media di 5 esperimenti $\pm$ DS.

* $P < 0.05$ vs Ctrl

Analisi Western Blot per COX-1 e COX-2

Nei vasi ottenuti da animali WT è stata osservata una espressione basale di COX-1 e COX-2. L'Ang II determina una induzione significativa dell'espressione di COX-1 e riduzione dell'espressione di COX-2. I farmaci non hanno effetti sull'espressione di queste due isoforme (Fig. 9).

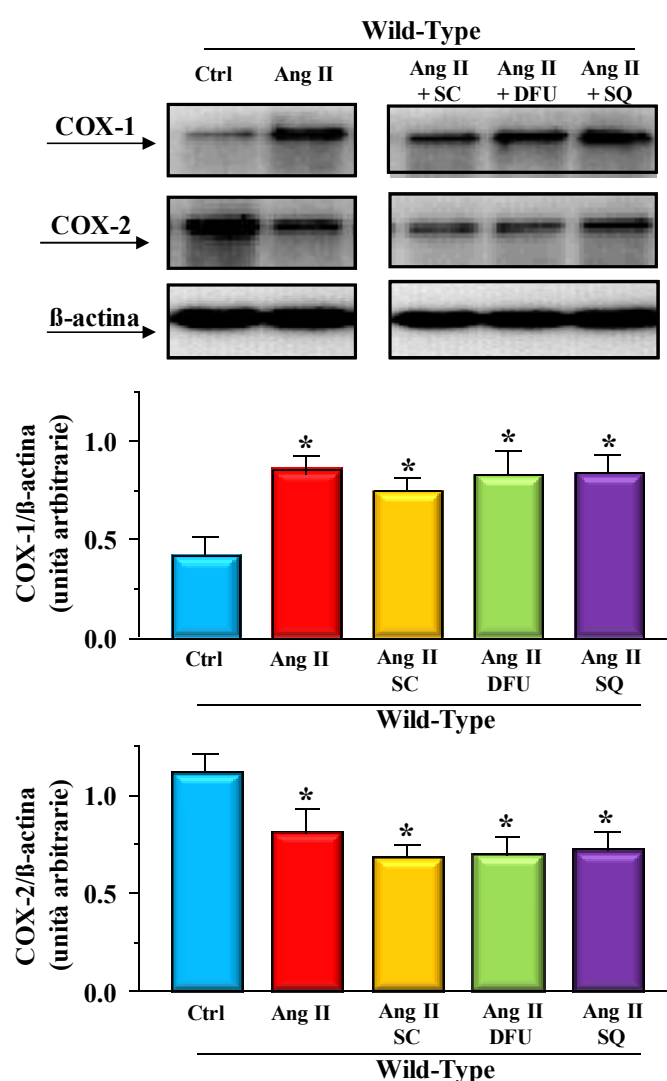


Figura 9. Analisi Western Blot di COX-1, COX-2 e β -actina in arterie mesenteriche di topi WT controllo (Ctrl) e sottoposti ad infusione cronica di angiotensina (Ang) II $\pm$ SC-560, DFU o SQ-560 (SQ). I grafici rappresentano l'analisi densitometrica delle bande di COX-1 e COX-2 normalizzate con l'espressione della β -actina. Ogni colonna rappresenta la media di 5 esperimenti $\pm$ DS. * $P < 0.05$ vs Ctrl

Determinazione della prostaglandina 6-Keto-PGF_{1α} e dell'8-isoprostano

La liberazione di 6 Keto-PG F_{1α} nel mezzo di incubazione dei vasi mesenterici isolati da topi WT trattati con Ang II è risultata più elevata rispetto ai controlli. I livelli di tale prostanoide non sono stati modificati da DFU o SQ-29548, ma la sua liberazione è stata significativamente ridotta dall'SC-560 (Tabella 2). Nei topi COX-1^{-/-} la produzione di 6 Keto-PGF_{1α} non è stata significativamente indotta dall'Ang II.

E' stata osservata una produzione basale di 8-isoprostano che risulta essere parzialmente ridotta dall'Ang II. I livelli di questo prostanoide non sono stati modificati da SC-560, né da SQ-29548, ma sono stati significativamente ridotti dal DFU (Tabella 2). Nei topi COX-1^{-/-} la produzione di 8-isoprostano non è stata significativamente modificata dall'Ang II (Tabella 2).

PARTE 2. EFFETTI DI ROSUVASTATINA SULLA DISFUNZIONE ENDOTELIALE E SUL RIMODELLAMENTO VASCOLARE NELLE ARTERIE MESENTERICHE DI RESISTENZA DI RATTI CON IPERTENSIONE INDOTTA DA ANG II: VALUTAZIONE DEL RUOLO DI COX-1.

Parametri fisiologici

Il peso corporeo, valutato immediatamente prima del sacrificio degli animali, è risultato analogo in tutti i gruppi (Tabella 3). In animali sottoposti ad infusione cronica con Ang II, la PAS risulta significativamente aumentata rispetto agli animali di controllo e non subisce variazioni significative a seguito del trattamento con rosuvastatina (Tabella 3). I livelli di colesterolo plasmatico risultano significativamente ridotti in tutti i gruppi trattati con rosuvastatina (Tabella 3).

Parametri strutturali

Alla pressione intraluminale di 45 mmHg, il diametro del lume non mostra differenze significative nelle arterie mesenteriche di ratti sottoposti ad infusione cronica con Ang II. E' stato invece riscontrato un incremento significativo dello spessore della media, che determina un aumento significativo del rapporto media/lume (M/L) e dell'area trasversa della media (CSA), due parametri significativi di rimodellamento vascolare ipertrofico (Tabella 3). Queste alterazioni indotte da Ang II risultano ripristinate negli animali trattati con rosuvastatina (Tabella 3).

TABELLA 3. Parametri fisiologici e morfologici vascolari

Parametri	Ctrl (n=8)	Rosu (n=8)	Ang II (n=8)	Ang II+Rosu (n=8)
Peso corporeo, g	285±25	289±21	275±32	281±28
PAS, mmHg	112±7	109±6	172±8*	164±9*
MDA, µmol/L	7.5±1.5	8.2±1.7	20.4±2.4*	9.2±1.9
Colesterolo, mg/dL	75±4	60±6†	76±6	55±3†
Diametro lume, µm	222±8	220±9	183±5*	199±5
Spessore media, µm	10.8±0.2	10.6±0.5	14.5±0.2*	11.9±0.2
M/L (%)	4.9±0.2	4.8±0.3	7.9±0.3*	6.0±0.1‡
Media CSA, 10³ x µm²	7.8±0.8	7.9±0.6	8.9±0.4	7.9±0.5

* $P < 0.001$ vs altri gruppi; † $P < 0.05$ vs rispettivi controlli; ‡ $P < 0.01$ vs controlli. Ctrl, controllo; Ang, Angiotensina; Rosu, Rosuvastatina; PAS, pressione arteriosa sistolica, MDA, malondialdeide; M/L, rapporto tonaca media diametro lume; CSA, area trasversa della tonaca media

Ruolo dell'attività di COX-1, COX-2 e del recettore TP nella vasodilatazione endotelio-dipendente

Nei ratti di controllo, la massima vasodilatazione indotta dall'ACh non viene modificata in presenza di SC-560 (inibitore COX-1), Dup-697 (inibitore COX-2), SQ-29548 (antagonista recettore TP; Figura 10 A). Al contrario, nei vasi di ratti infusi con Ang II la vasodilatazione indotta da ACh è attenuata rispetto ai controlli ($P < 0.001$), non viene modificata dal Dup-697 mentre è potenziata, ma non normalizzata, rispetto ai controlli, da SC-560 e SQ-29548 ($P < 0.005$, Figura 10 B).

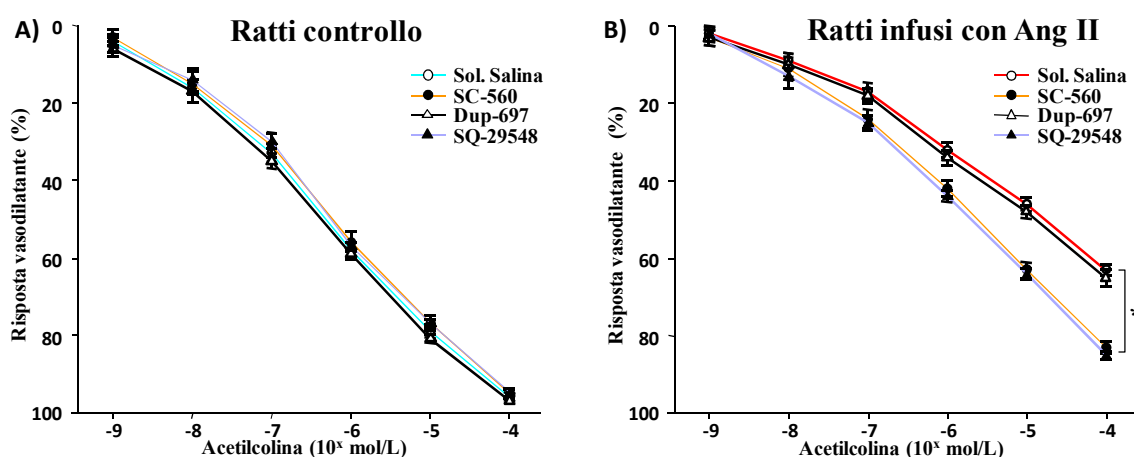


Figura 10. Risposta vasodilatante endotelio-dipendente nelle piccole arterie mesenteriche di ratto di controllo o sottoposto a infusione con Ang II $\pm$ SC-560, Dup-697, SQ-29548 (A,B) I risultati riportati rappresentano la media di 8 esperimenti $\pm$ DS.

* $P < 0.01$ vs Ctrl

Ruolo della NADPH ossidasi e della biodisponibilità di NO nella disfunzione endoteliale

Nei ratti di controllo, la risposta vasodilatante all'ACh è significativamente inibita da L-NAME (Figura 11 A), ma non modificata dall'acido ascorbico (Vit. C). Nei vasi di ratti infusi con Ang II la risposta vasodilatante all'ACh era moderatamente inibita da L-NAME (Figura 11 B). L'infusione di acido ascorbico induce una completa normalizzazione della risposta vasodilatante all'ACh e ripristina l'effetto inibitore indotto da L-NAME (Figura 11 A, B).

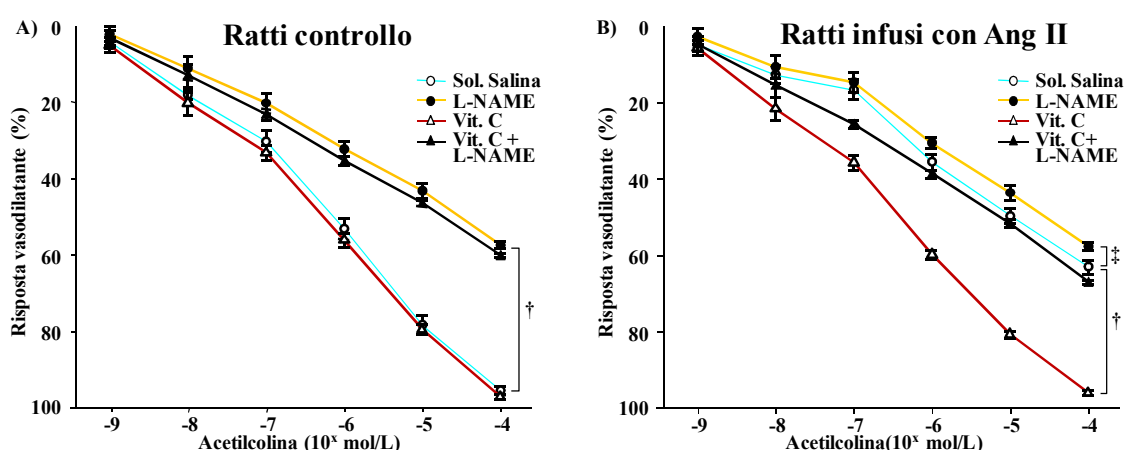


Figura 11. Risposta vasodilatante endotelio-dipendente nelle piccole arterie mesenteriche di ratto di controllo o sottoposto a infusione con Ang II $\pm$ L-NAME, Vitamina C (Vit. C), o entrambe. I risultati riportati rappresentano la media di 8 esperimenti $\pm$ DS.

† $P < 0.001$, ‡ $P < 0.05$

Effetto di rosuvastatina sulla vasodilatazione endotelio-dipendente

La disfunzione endoteliale viene completamente annullata dal trattamento con rosuvastatina. In questi animali la risposta vasodilatante all'ACh viene infatti normalizzata e non più modificata da SC-560, SQ-29548 o dall'acido ascorbico (Figura 12). Nelle arterie dei ratti di controllo si osserva un'inibizione di circa il 40%; nei vasi trattati con Ang II la percentuale di inibizione è significativamente ridotta rispetto ai controlli. La rosuvastatina riporta la percentuale d'inibizione a livello dei controlli (Figura 13).

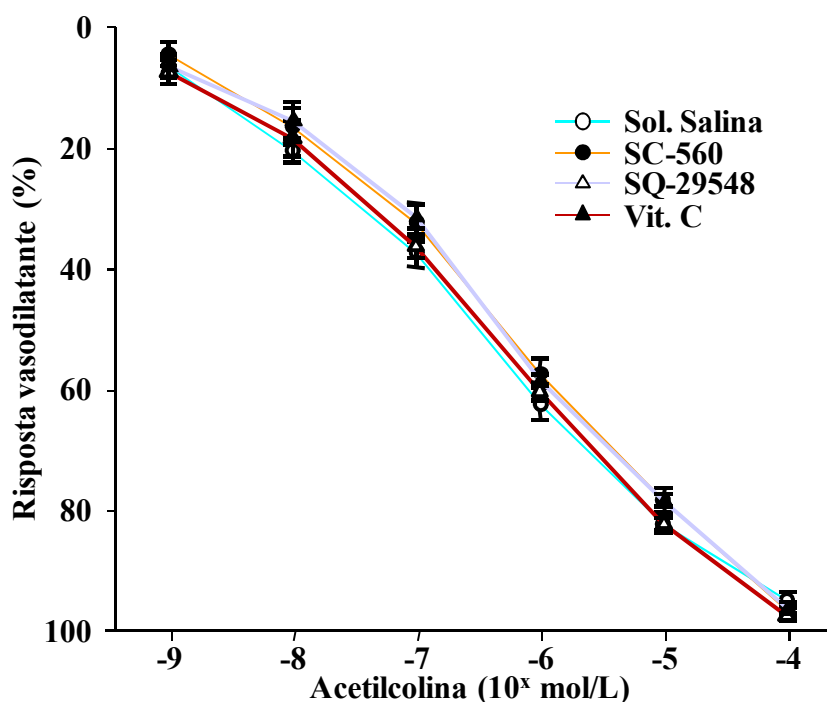


Figura 12. Ratti infusi con Ang II e trattati con rosuvastatina nelle piccole arterie mesenteriche di ratto di controllo o sottoposto a incubazione con soluzione salina, SC-560, SQ-29548, Vitamina C (Vit. C). I risultati riportati rappresentano la media di 8 esperimenti $\pm$ DS.

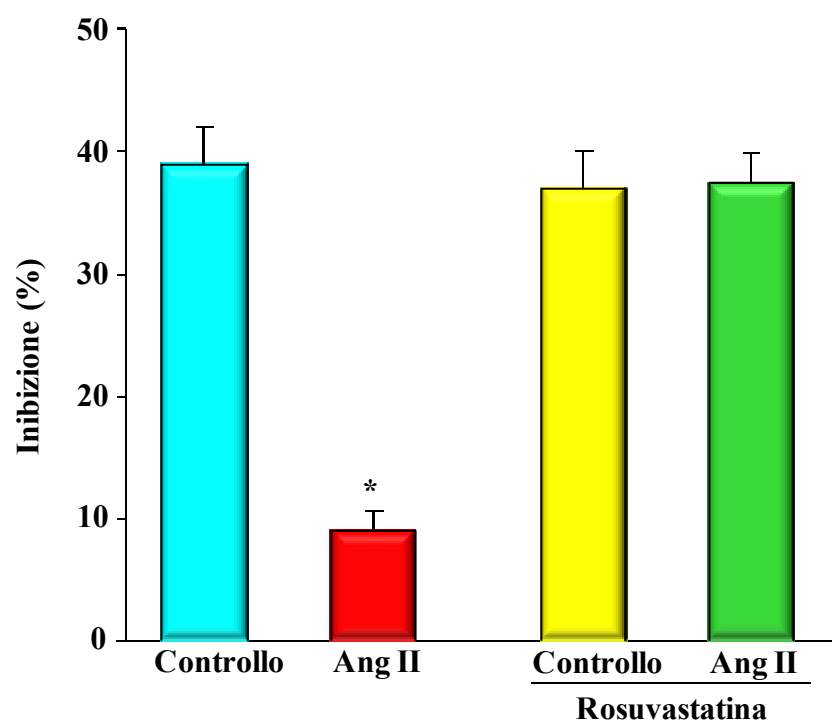


Figura 13. Effetto inibitore di L-NAME sulla risposta vasodilatante massimale indotta dall'ACh. I risultati riportati rappresentano la media di 8 esperimenti $\pm$ DS.

* $p < 0.001$

Effetti di rosuvastatina sulla produzione di anione superossido e sui livelli di MDA

L'analisi a fluorescenza del diidroetidio (DHE), ha rivelato una aumentata produzione di anione superossido nei vasi mesenterici di ratti infusi con Ang II, rispetto ai controlli (Figura 14). L'aumento di anione superossido viene completamente annullato dal trattamento con rosuvastatina (Figura 14).

Gli animali infusi con Ang II mostrano un aumento significativo dei valori plasmatici di malondialdeide i quali sono attenuati da rosuvastatina (Tabella 3).

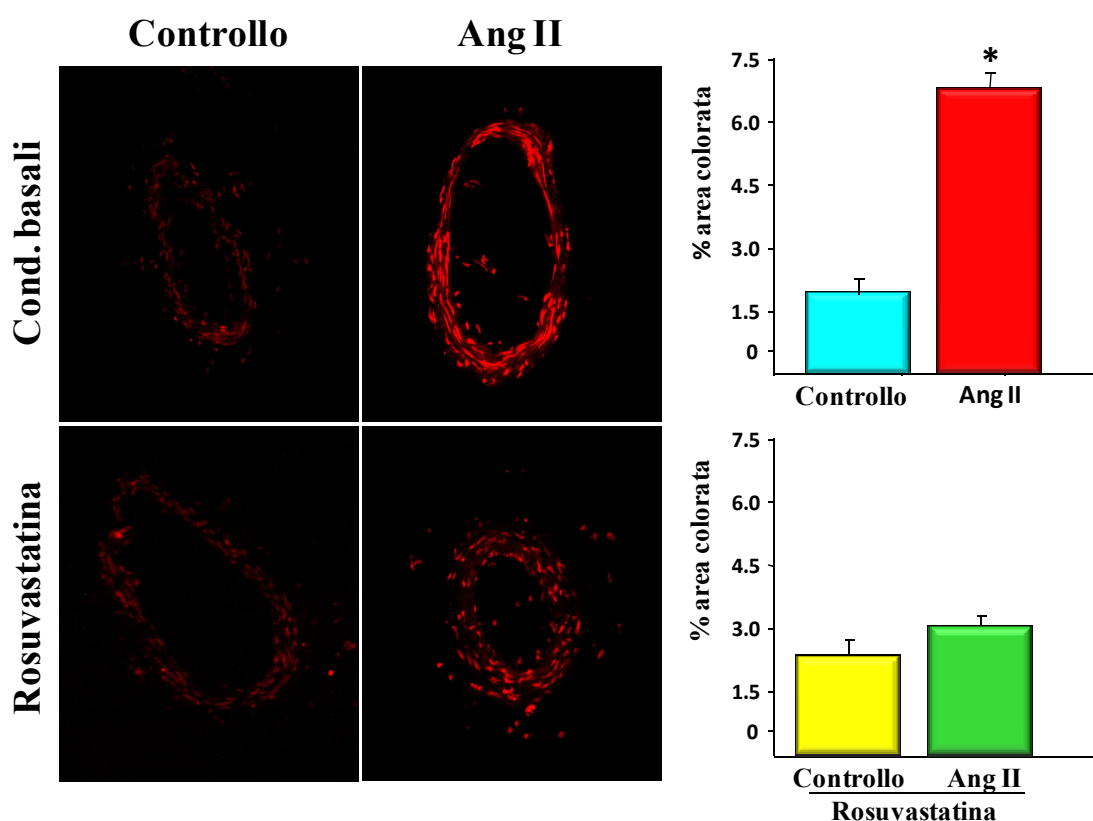


Figura 14. Tecnica a fluorescenza del diidroetidio (DHE) per la determinazione in situ dell'anione superossido vascolare. Nelle arterie mesenteriche di ratti controllo e sottoposti ad infusione cronica di angiotensina (Ang) II $\pm$ Rosuvastatina. Le immagini rappresentano un ingrandimento 40X. I grafici rappresentano l'analisi quantitativa del segnale rosso. Ogni colonna rappresenta la media di 8 esperimenti $\pm$ DS.

* $P < 0.01$ vs altri gruppi

Analisi immunoistochimica di collagene di tipo I, fibronectina e analisi istochimica di elastina

Nella media delle arterie mesenteriche di ratti infusi con Ang II si evidenzia una marcata immunopositività di collagene I nella lamina esterna della tonaca media e avventizia (Figura 15 B e Tabella 4). La rosuvastatina e l'apocianina prevengono questo effetto indotto da Ang II (Figura 15 D - 17 e Tabella 4). Anche nelle arterie mesenteriche di ratti infusi con Ang II si evidenzia una marcata immunopositività di fibronectina (Figura 15 F e Tabella 4). Il contenuto di elastina risulta ridotto rispetto a quanto osservato nella media dei vasi ottenuti da ratti di controllo. Questa riduzione è completamente prevenuta dal trattamento con rosuvastatina (Figura 16 e Tabella 4). Come conseguenza il rapporto collagene/elastina è significativamente aumentato negli animali trattati con Ang II e normalizzato da rosuvastatina (Tabella 4).

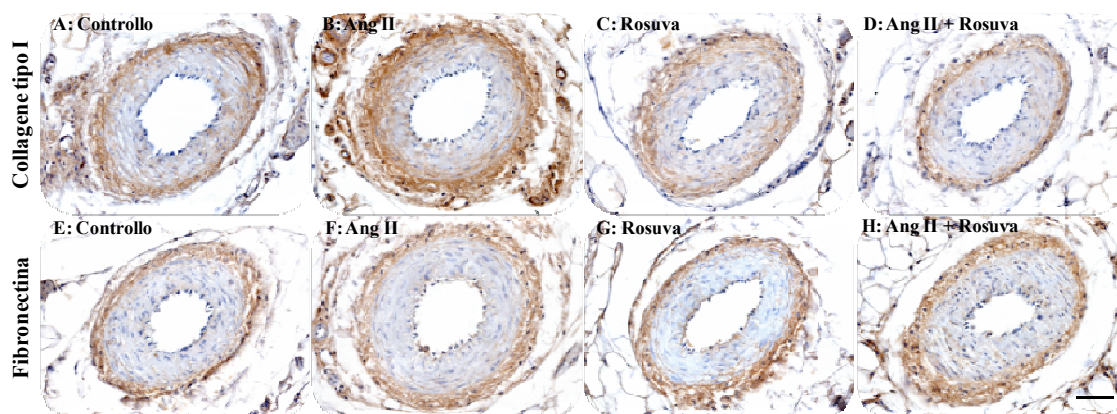


Figura 15. Analisi immunoistochimica di collagene tipo I (pannello superiore, immunopositività marrone) e fibronectina (pannello inferiore, immunopositività marrone) nelle piccole arterie mesenteriche di ratto di controllo e sottoposto ad infusione cronica di angiotensina (Ang) II $\pm$ Rosuvastatina.. Scala: 50 μ m

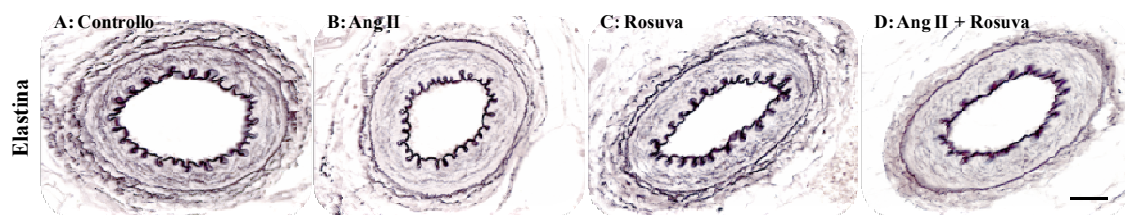


Figura 16. Analisi istochimica con Orceina per elastina (nero) nelle piccole arterie mesenteriche di ratto di controllo e sottoposto ad infusione cronica di angiotensina (Ang) II $\pm$ Rosuvastatina.. Scala: 50 μ m

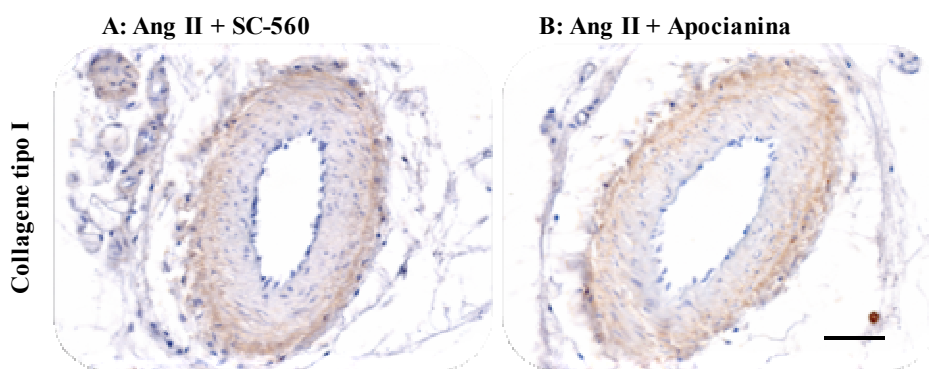


Figura 17. Analisi immunoistochimica di collagene tipo I (immunopositività marrone) nelle piccole arterie mesenteriche di ratto sottoposto ad infusione cronica di angiotensina (Ang) II + SC-560 o Apocianina. Scala: 50 μ m

Analisi RT-PCR dell'espressione di COX-1

Nei vasi ottenuti da animali di controllo, l'analisi RT-PCR evidenziava l'espressione dell'mRNA codificante per COX-1. In animali infusi con Ang II, si osservava un significativo incremento dell'espressione di COX-1, prevenuto dal trattamento con rosuvastatina. La rosuvastatina non influenza l'espressione vascolare di COX-1 nei gruppi di controllo (Figura 18).

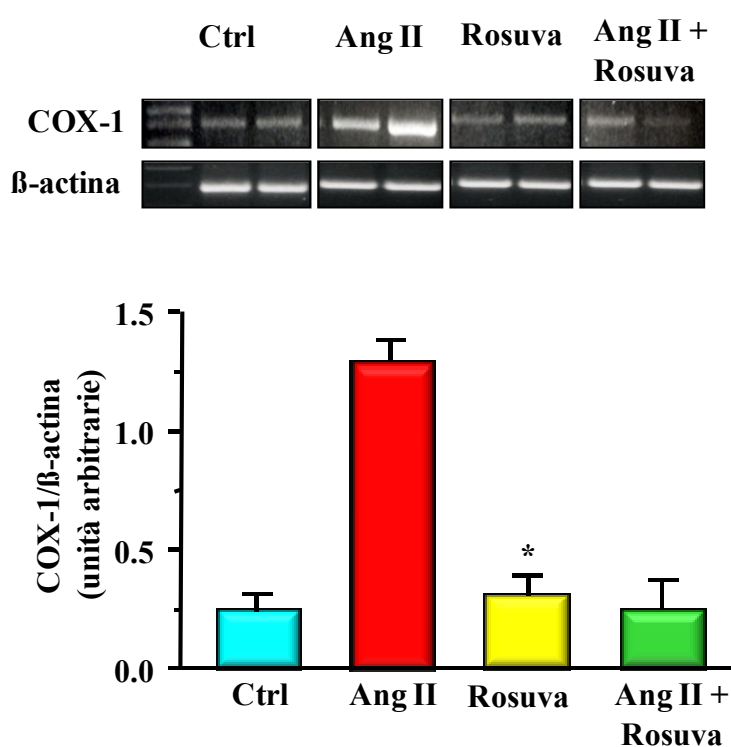


Figura 18. Analisi RT-PCR di COX-1 e β -actina in arterie mesenteriche di ratti di controllo (Ctrl) e sottoposti ad infusione cronica con angiotensina (Ang) II $\pm$ rosuvastatina. I grafici rappresentano l'analisi densitometrica delle bande di cDNA di COX-1 normalizzate con l'espressione della β -actina. Ogni colonna rappresenta la media di 5 esperimenti $\pm$ DS.

* $P < 0.001$ vs Ang II

Determinazione della prostaglandina 6-Keto-PGF1 e dell'8-isoprostano

Nel mezzo di incubazione dei vasi mesenterici isolati da ratti trattati con Ang II la liberazione di 6 Keto-PG F_{1α} □ è risultata maggiore rispetto ai controlli. I livelli di questo prostanoide sono normalizzati dalla rosuvastatina (Tabella 4). Nei ratti trattati con SC-560 e apocianina la produzione di 6 Keto-PGF_{1α} non era significativamente indotta dall'Ang II (Tabella 4).

E' stata osservata anche una produzione basale di 8-isoprostano che non mostra variazioni negli altri gruppi trattati (Tabella 4).

TABELLA 4. Percentuale relativa alle componenti della ECM e ai livelli di 6 Keto-PG F_{1α} e 8-Isoprostano

Parametri	Ctrl (n=8)	Rosu (n=8)	Ang II (n=8)	Ang II-Rosu (n=8)	Ang II-SC-560 (n=8)	Ang II-Apo (n=8)
Collagene tipo I	20.1±1.4	16.4±2.2	35.8±2.1*	20.3±0.9	19.1±1.4	20.6±0.9
Fibronectina	20.5±0.8	20.3±1.1	26.9±1.4†	21.7±1.6	-	-
Elastina	32.5±1.5	31.3±1.9	20.6±0.6*	26.4±0.9	-	-
Collagene/Elastina	0.56	0.52	1.73*	0.76	-	-
6-Keto-PGF _{1α} (ug/g/mL)	17.1±0.7	18.2±0.6	41.3±1.7*	22.0±0.5	17.8±0.9	20.4±0.7
8-Isoprostano (pg/g/mL)	9.1±1.2	8.3±0.7	11.6±1.1	11.1±0.9	9.2±1.1	12.1±1.2

Valori espressi come densità/area (pixels). Ctrl, controlli; Ang, Angiotensina; Rosu, Rosuvastatina; SQ, SQ-29548; Apo, Apocianina. * $P < 0.05$ vs altri gruppi; ** $P < 0.05$ vs Ang II.

DISCUSSIONE

PARTE 1

Il presente studio è stato condotto per valutare il ruolo di COX-1 e dei suoi prostanoidi attivi sui recettori TP sulle modificazioni morfologiche e sulle componenti dell'ECM che caratterizzano il rimodellamento vascolare nelle piccole arterie di resistenza di topi trattati cronicamente con Ang II.

I risultati ottenuti dimostrano che l'infusione di Ang II induce un rimodellamento vascolare ipertrofico, caratterizzato da un aumento del rapporto tonaca media/lume del vaso e da un aumento della CSA, e modifica la composizione della matrice ECM nelle piccole arterie di resistenza, attraverso un aumento della deposizione di collagene I e di fibronectina con una concomitante riduzione del contenuto di elastina.

Abbiamo inoltre osservato che Ang II induce un aumento dell'espressione vascolare di COX-1 e una riduzione dell'espressione di COX-2. In queste condizioni, l'inibizione di COX-1, o il blocco dei recettori TP, ha determinato una riduzione del rimodellamento ipertrofico, della deposizione di collagene e fibronectina, ed un aumento del contenuto di elastina. Questi risultati suggeriscono che il rimodellamento vascolare indotto da Ang II sia, almeno in parte, mediato dall'attivazione di COX-1 e dei prostanoidi da essa prodotti che agiscono sui recettori TP. Questi dati, ottenuti per mezzo di uno studio farmacologico, sono fortemente sostenuti dai risultati forniti dai topi COX-1-KO, nei quali non è stato osservato alcun effetto da parte di Ang II nel rimodellamento vascolare. Pertanto, è possibile ipotizzare che il sistema COX sia coinvolto nella progressione ed evoluzione dell'aterosclerosi, in particolare in quelle

forme di ipertensione caratterizzate da una marcata attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone.

In completo accordo con i risultati funzionali, nel presente studio è stato anche osservato un aumento dell'espressione di COX-1 ed una riduzione di COX-2 dopo infusione con Ang II. Questi dati sono ulteriormente confermati dai risultati ottenuti mediante tecnica immunoistochimica. Questa tecnica ha evidenziato che nei vasi di animali trattati con Ang II si osserva una *up-regulation* di COX-1, localizzata nell'endotelio e nella tonaca media, ed una aumentata deposizione di collagene di tipo I e fibronectina ed una riduzione di fibre elastiche nelle piccole arterie di resistenza⁶³. Queste modificazioni sono completamente prevenute dal trattamento con SC-560 e SQ-29548, ma solo in parte contrastate da DFU. Nei vasi di topi COX-1-KO, il contenuto di collagene, fibronectina, elastina non differivano dai WT, e non erano modificati da Ang II.

Nel presente studio sono stati anche studiati i possibili prostanoidi derivati da COX-1 implicati nelle alterazioni vascolari indotte da Ang II che agiscono sui recettori TP. A questo scopo, è stata valutata la 6-Keto-PGF_{1α} un metabolita stabile della prostaciclina, principalmente prodotta da COX-1, come responsabile del controllo del tono vascolare^{30, 104} e l'8-isoprostano, valutato come il prodotto principale dell'acido arachidonico, presente nel tessuto vascolare degli animali ipertesi, in grado di stimolare la contrazione attivando i recettori TP^{105, 106}. Il rilascio vascolare di 6-Keto-PGF_{1α} è risultato più elevato nel gruppo degli animali sottoposti ad infusione cronica con Ang II, non modificati dal DFU, ma è stato significativamente ridotto da SC-560. Nei topi COX-1-KO la produzione di 6-Keto-PGF_{1α} è risultata assente e non stimolata dall'Ang II, al contrario l'8-isoprostano veniva ridotto dal DFU. Questi risultati dimostrano che il prostanoide derivante da COX-1 e attivo sul recettore TP, è verosimilmente la

prostaciclina, la quale svolge un ruolo fondamentale nella patogenesi del rimodellamento vascolare indotto da Ang II.

Riassumendo, queste osservazioni suggeriscono un ruolo predominante dei prostanoidi derivati da COX-1 che agiscono sui recettori TP nello sviluppo/progressione dell'aterosclerosi vascolare. I risultati del presente studio forniscono la prima dimostrazione che, a livello delle piccole arterie di resistenza murine, la sovraespressione di COX-1 e dei suoi derivati prostanoidi tra i quali la prostaciclina che agiscono sui recettori TP, rappresentano un meccanismo importante con il quale Ang II induce rimodellamento vascolare e promuove la fibrosi.

E' possibile ipotizzare poiché il blocco farmacologico della COX-1 è in grado di prevenire solo in parte il rimodellamento vascolare, che esistano altri meccanismi COX-1-indipendenti, quali l'infiammazione vascolare e l'attività di aldosterone, siano coinvolti nell'azione di Ang II sulle alterazioni vascolari.²²

PARTE 2

Nella seconda parte di questo progetto di studio sono stati valutati gli effetti di rosuvastatina sulla disfunzione endoteliale e sul rimodellamento vascolare indotti da Ang II, ed i possibili meccanismi attraverso i quali questa statina agisce.

Gli esperimenti hanno permesso di osservare che, nelle arterie mesenteriche di resistenza di ratti infusi con Ang II, si manifesta una riduzione della biodisponibilità endoteliale di NO, secondaria ad un incremento intravascolare della generazione di ROS derivanti dal potenziamento dell'attività di NADPH ossidasi. In questo contesto, un aumento nella produzione dei prostanoidi ad azione vasocostrittrice derivanti da COX-1, come prostaciclina, attiva sui recettori TP, contribuisce alla disfunzione endoteliale indotta da Ang II.

Dopo trattamento con rosuvastatina abbiamo osservato una normalizzazione della funzione endoteliale e il ripristino della disponibilità di NO, come documentato dalla completa inibizione della vasodilatazione ACh-indotta ad opera di L-NAME. In presenza di queste condizioni, la risposta vasodilatante all'ACh non era più sensibile all'antiossidante (Vitamina C), al blocco della NADPH ossidasi, all'inibizione della COX-1 o all'antagonismo del recettore TP. In accordo con i nostri dati funzionali, la tecnica del diidroetidio (DHE) ha evidenziato che la produzione di anione superossido vascolare nei vasi mesenterici risulta drasticamente ridotta in presenza di rosuvastatina.

E' stato osservato anche che questa statina riduce significativamente i livelli plasmatici di malondialdeide, un marker sistemico di stress ossidativo. Tutti questi dati dimostrano che a livello dei piccoli vasi mesenterici, rosuvastatina abroga la disfunzione endoteliale indotta da Ang II, ripristinando la biodisponibilità di NO e prevenendo la formazione intravascolare di ROS.

Nel presente studio è stata anche studiata l'influenza di rosuvastatina sulle alterazioni strutturali nelle arterie di resistenza indotte da Ang II. Nel nostro modello sperimentale Ang II induce un rimodellamento vascolare eutrofico, caratterizzato da un aumento del rapporto tonaca media/lume del vaso senza modificazione della CSA, insieme ad una modificazione della composizione della matrice extracellulare, caratterizzata da una aumentata deposizione di collagene I e fibronectina ed una concomitante riduzione del contenuto di elastina. Queste alterazioni sono bloccate da rosuvastatina, come evidenziano i risultati ottenuti mediante tecnica immunoistochimica. Queste osservazioni sono in linea con i risultati ottenuti in modelli transgenici di ipertensione indotta da Ang II, nei quali rosuvastatina riduceva l'espressione di collagene e fibronectina a livello renale¹⁰⁷. Complessivamente i nostri dati dimostrano che, a livello delle piccole arterie di resistenza, la somministrazione

cronica di rosuvastatina può sopprimere le alterazioni della struttura vascolare indotte da Ang II.

Per quanto riguarda i possibili meccanismi coinvolti, i risultati indicano che nelle piccole arterie mesenteriche di resistenza la rosuvastatina interferisce con l'azione induttrice di Ang II su COX-1 inibendone l'espressione vascolare bloccando la produzione del maggior metabolita della prostaciclina, 6-Keto-PGF_{1α}. Questi risultati suggeriscono che rosuvastatina è in grado di proteggere la parete arteriosa nelle malattie cardiovascolari indotte da Ang II sia inibendo la NADPH ossidasi che riducendo l'espressione/attività di COX-1. E' noto che queste vie enzimatiche interagiscono tra loro: una possibile spiegazione può derivare dai risultati ottenuti con i prostanoidi; infatti i livelli di 6-Keto-PGF_{1α} sono stati ridotti dall'incubazione con apocianina, la quale inibisce lo stress ossidativo vascolare tramite l'inibizione di NADPH ossidasi. Al contrario, i livelli plasmatici dell'8-isoprostano non vengono compromessi dall'apocianina, così da escludere un coinvolgimento di COX-2, come dimostrato da precedenti studi condotti su aorta di ratti SHR, dove è stata documentata la produzione di ROS i quali generano endoperossidi derivati da COX-1¹⁰⁸. Questi risultati suggeriscono che rosuvastatina sia in grado di normalizzare la funzione endoteliale a livello dei vasi di resistenza mesenterici nei ratti infusi con Ang II, ripristinando la biodisponibilità di NO, impedendo la produzione di anione superossido intravascolare e riducendo l'espressione di COX-1 e la produzione di 6-Keto-PGF_{1α}. I nostri risultati sono pienamente in accordo con precedenti studi *in vitro* e *in vivo*, condotti in altri distretti vascolari, in modelli animali e umani con patologie vascolari associate alla produzione di ROS, i quali hanno dimostrato, la capacità di rosuvastatina di promuovere un'azione antiossidante per mezzo dell'inibizione della NADPH ossidasi⁹⁶,

I risultati ottenuti dai nostri studi mostrano che rosuvastatina agendo sulla NADPH ossidasi può contrastare la generazione intravascolare di ROS. Questo è confermato dai risultati di immunoistochimica i quali evidenziano un effetto simile di apocianina e rosuvastatina nel prevenire il deposito di collagene a livello vascolare indotto da Ang II.

CONCLUSIONI

L'ipertensione arteriosa è caratterizzata dalla presenza di disfunzione endoteliale e rimodellamento vascolare. I risultati descritti in questa tesi forniscono informazioni importanti sui meccanismi responsabili di queste alterazioni nelle piccole arterie di resistenza. In questi modelli animali, si osserva un rimodellamento vascolare, e modificazioni nella composizione della ECM che sono secondari all'infusione di Ang II, e che dipendono in parte dall'attivazione di COX-1 e dall'azione dei suoi prodotti.

L'Ang II induce un aumento di espressione di COX-1 a livello delle cellule muscolari lisce vascolari, con produzione di prostanoidi compresa la prostaciclina, che agiscono come agonisti dei recettori TP. Questi meccanismi, molto probabilmente, contribuiscono al danno aterosclerotico indotto da Ang II.

Inoltre, i presenti risultati che il trattamento con rosuvastatina previene la disfunzione endoteliale, il rimodellamento vascolare e le modificazioni della ECM nei ratti sottoposti ad infusione cronica con Ang II. Questi effetti dipendono dal ripristino della disponibilità di NO, da una riduzione intravascolare dei ROS derivanti dalla NADPH ossidasi e da una riduzione dell'espressione/attività di COX-1. Queste evidenze possono avere importanti implicazioni cliniche: l'attivazione della NADPH ossidasi e della COX-1 sono noti per determinare il danno aterosclerotico derivante da Ang II, il loro coinvolgimento può rappresentare una valida spiegazione per l'aumento del rischio cardiovascolare in pazienti trattati con inibitori selettivi COX-2. Le statine possono prevenire la progressione del danno cardiovascolare agendo su questi meccanismi, in particolare in quelle forme di ipertensione umana caratterizzata da una elevata attività del sistema renina-angiotensina-aldosterone anche in presenza di un profilo lipidico normale.

BIBLIOGRAFIA

1. Schiffrin EL, Touyz RM. From bedside to bench to bedside: Role of renin-angiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287:H435-446
2. Mulvany MJ. Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News Physiol Sci*. 2002;17:105-109
3. Intengan HD, Schiffrin EL. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: Role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension*. 2000;36:312-318
4. Schiffrin EL. Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. *Am J Hypertens*. 2004;17:1192-1200
5. Rizzoni D, Agabiti-Rosei E. Structural abnormalities of small resistance arteries in essential hypertension. *Intern Emerg Med*. 2011
6. Lüscher TF, Vanhoutte PM. *The endothelium: Modulator of cardiovascular function*. CRC Press; 1990.
7. Viridis A, Santini F, Colucci R, Duranti E, Salvetti G, Rugani I, Segnani C, Anselmino M, Bernardini N, Blandizzi C, Salvetti A, Pinchera A, Taddei S. Vascular generation of tumor necrosis factor- α reduces nitric oxide availability in small arteries from visceral fat of obese patients. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58:238-247
8. Viridis A, Duranti E, Taddei S. Oxidative stress and vascular damage in hypertension: Role of angiotensin ii. *Int J Hypertens*. 2011;2011:916310
9. Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S. Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension. *Br J Pharmacol*. 2009;157:527-536
10. Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part i: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ros. *Circulation*. 2003;108:1912-1916
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;38:606-611
12. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2001;104:2673-2678

13. Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2175-2183
14. Landmesser U, Harrison DG. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Coron Artery Dis.* 2001;12:455-461
15. Touyz RM, Schiffrin EL. Ang ii-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase d in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 1999;34:976-982
16. Touyz RM, Tabet F, Schiffrin EL. Redox-dependent signalling by angiotensin ii and vascular remodelling in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003;30:860-866
17. Touyz RM. Reactive oxygen species in vascular biology: Role in arterial hypertension. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2003;1:91-106
18. Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res.* 2006;71:247-258
19. Viridis A, Neves MF, Amiri F, Viel E, Touyz RM, Schiffrin EL. Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. *Hypertension.* 2002;40:504-510
20. Rizzoni D, Castellano M, Porteri E, Bettoni G, Muiesan ML, Agabiti-Rosei E. Vascular structural and functional alterations before and after the development of hypertension in shr. *Am J Hypertens.* 1994;7:193-200
21. Levy BI, Ambrosio G, Pries AR, Struijker-Boudier HA. Microcirculation in hypertension: A new target for treatment? *Circulation.* 2001;104:735-740
22. Nadar S, Blann AD, Lip GY. Endothelial dysfunction: Methods of assessment and application to hypertension. *Curr Pharm Des.* 2004;10:3591-3605
23. Zhou MS, Jaimes EA, Raij L. Atorvastatin prevents end-organ injury in salt-sensitive hypertension: Role of enos and oxidant stress. *Hypertension.* 2004;44:186-190
24. Briguori C, Anzuini A, Airolidi F, Gimelli G, Nishida T, Adamian M, Corvaja N, Di Mario C, Colombo A. Intravascular ultrasound criteria for the assessment of the functional significance of intermediate coronary artery stenoses and comparison with fractional flow reserve. *Am J Cardiol.* 2001;87:136-141

25. Mulvany MJ. Small artery remodelling in hypertension: Causes, consequences and therapeutic implications. *Med Biol Eng Comput.* 2008;46:461-467
26. Risler NR, Cruzado MC, Miatello RM. Vascular remodeling in experimental hypertension. *ScientificWorldJournal.* 2005;5:959-971
27. Mulvany MJ. Structural abnormalities of the resistance vasculature in hypertension. *J Vasc Res.* 2003;40:558-560
28. Cheng C, Daskalakis C, Falkner B. Alterations in capillary morphology are found in mild blood pressure elevation. *J Hypertens.* 2010;28:2258-2266
29. Porteri E, Rizzoni D, Mulvany MJ, De Ciuceis C, Sleiman I, Boari GE, Castellano M, Muiesan ML, Zani F, Rosei EA. Adrenergic mechanisms and remodeling of subcutaneous small resistance arteries in humans. *J Hypertens.* 2003;21:2345-2352
30. Virdis A, Colucci R, Versari D, Ghisu N, Fornai M, Antonioli L, Duranti E, Daghini E, Giannarelli C, Blandizzi C, Taddei S, Del Tacca M. Atorvastatin prevents endothelial dysfunction in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats: Role of cyclooxygenase 2-derived contracting prostanoids. *Hypertension.* 2009;53:1008-1016
31. Deng LY, Schiffrin EL. Morphological and functional alterations of mesenteric small resistance arteries in early renal hypertension in rats. *Am J Physiol.* 1991;261:H1171-1177
32. Sharifi AM, Schiffrin EL. Apoptosis in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats: Effect of endothelin receptor antagonism. *J Hypertens.* 1997;15:1441-1448
33. Diep QN, Li JS, Schiffrin EL. In vivo study of at(1) and at(2) angiotensin receptors in apoptosis in rat blood vessels. *Hypertension.* 1999;34:617-624
34. Dickhout JG, Lee RM. Apoptosis in the muscular arteries from young spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 1999;17:1413-1419
35. Diez J, Panizo A, Hernandez M, Pardo J. Is the regulation of apoptosis altered in smooth muscle cells of adult spontaneously hypertensive rats? *Hypertension.* 1997;29:776-780
36. Heerkens EH, Shaw L, Ryding A, Brooker G, Mullins JJ, Austin C, Ohanian V, Heagerty AM. Alpha_v integrins are necessary for eutrophic inward remodeling of small arteries in hypertension. *Hypertension.* 2006;47:281-287

37. Bakker EN, Buus CL, Spaan JA, Perree J, Ganga A, Rolf TM, Sorop O, Bramsen LH, Mulvany MJ, Vanbavel E. Small artery remodeling depends on tissue-type transglutaminase. *Circ Res*. 2005;96:119-126
38. Viridis A, Colucci R, Neves MF, Rugani I, Aydinoglu F, Fornai M, Ippolito C, Antonioli L, Duranti E, Solini A, Bernardini N, Blandizzi C, Taddei S. Resistance artery mechanics and composition in angiotensin ii-infused mice: Effects of cyclooxygenase-1 inhibition. *Eur Heart J*. 2011
39. Rizzoni D, Agabiti Rosei E. Small artery remodeling in hypertension and diabetes. *Curr Hypertens Rep*. 2006;8:90-95
40. Amiri F, Viridis A, Neves MF, Iglarz M, Seidah NG, Touyz RM, Reudelhuber TL, Schiffrin EL. Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction. *Circulation*. 2004;110:2233-2240
41. Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev*. 2009;89:957-989
42. Touyz RM. Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: Role of angiotensin ii. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005;14:125-131
43. Thybo NK, Mulvany MJ, Jastrup B, Nielsen H, Aalkjaer C. Some pharmacological and elastic characteristics of isolated subcutaneous small arteries from patients with essential hypertension. *J Hypertens*. 1996;14:993-998
44. Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol*. 2003;200:423-428
45. Delva P, Lechi A, Pastori C, Degan M, Sheiban I, Montesi G, Pea M, Meneguzzi A, Meneguzzi M. Collagen i and iii mrna gene expression and cell growth potential of skin fibroblasts in patients with essential hypertension. *J Hypertens*. 2002;20:1393-1399
46. Park JB, Schiffrin EL. Cardiac and vascular fibrosis and hypertrophy in aldosterone-infused rats: Role of endothelin-1. *Am J Hypertens*. 2002;15:164-169
47. Touyz RM, He G, El Mabrouk M, Schiffrin EL. P38 map kinase regulates vascular smooth muscle cell collagen synthesis by angiotensin ii in shr but not in wky. *Hypertension*. 2001;37:574-580
48. O'Callaghan CJ, Williams B. The regulation of human vascular smooth muscle extracellular matrix protein production by alpha- and beta-adrenoceptor stimulation. *J Hypertens*. 2002;20:287-294

49. Sluijter JP, de Kleijn DP, Pasterkamp G. Vascular remodeling and protease inhibition--bench to bedside. *Cardiovasc Res.* 2006;69:595-603
50. Atlas SA. The renin-angiotensin aldosterone system: Pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm.* 2007;13:9-20
51. Ruster C, Wolf G. Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:2985-2991
52. Skultetyova D, Filipova S, Riecanaky I, Skultety J. The role of angiotensin type 1 receptor in inflammation and endothelial dysfunction. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov.* 2007;2:23-27
53. De Gasparo M. [at(1) and at(2) angiotensin ii receptors: Key features]. *Drugs.* 2002;62 Spec No 1:1-10
54. 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;21:1429-1443
55. Stoll M, Unger T. Angiotensin and its at2 receptor: New insights into an old system. *Regul Pept.* 2001;99:175-182
56. 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;28:1971-1973
57. 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;31:1241-1249
58. Hahn AW, Resink TJ, Scott-Burden T, Powell J, Dohi Y, Buhler FR. Stimulation of endothelin mrna and secretion in rat vascular smooth muscle cells: A novel autocrine function. *Cell Regul.* 1990;1:649-659
59. Harrison DG, Venema RC, Arnal JF, Inoue N, Ohara Y, Sayegh H, Murphy TJ. The endothelial cell nitric oxide synthase: Is it really constitutively expressed? *Agents Actions Suppl.* 1995;45:107-117
60. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. Angiotensin ii-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane nadh/nadph oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest.* 1996;97:1916-1923

61. Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin ii in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev.* 2000;52:639-672
62. Wesselman JP, De Mey JG. Angiotensin and cytoskeletal proteins: Role in vascular remodeling. *Curr Hypertens Rep.* 2002;4:63-70
63. Viridis A, Neves MF, Amiri F, Touyz RM, Schiffrin EL. Role of nad(p)h oxidase on vascular alterations in angiotensin ii-infused mice. *J Hypertens.* 2004;22:535-542
64. Diep QN, El Mabrouk M, Cohn JS, Endemann D, Amiri F, Viridis A, Neves MF, Schiffrin EL. Structure, endothelial function, cell growth, and inflammation in blood vessels of angiotensin ii-infused rats: Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Circulation.* 2002;105:2296-2302
65. Neves MF, Viridis A, Schiffrin EL. Resistance artery mechanics and composition in angiotensin ii-infused rats: Effects of aldosterone antagonism. *J Hypertens.* 2003;21:189-198
66. Belmadani S, Zerfaoui M, Boulares HA, Palen DI, Matrougui K. Microvessel vascular smooth muscle cells contribute to collagen type i deposition through erk1/2 map kinase, alphavbeta3-integrin, and tgf-beta1 in response to ang ii and high glucose. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295:H69-76
67. Briones AM, Rodriguez-Criado N, Hernanz R, Garcia-Redondo AB, Rodrigues-Diez RR, Alonso MJ, Egido J, Ruiz-Ortega M, Salaices M. Atorvastatin prevents angiotensin ii-induced vascular remodeling and oxidative stress. *Hypertension.* 2009;54:142-149
68. De Ciuceis C, Amiri F, Brassard P, Endemann DH, Touyz RM, Schiffrin EL. Reduced vascular remodeling, endothelial dysfunction, and oxidative stress in resistance arteries of angiotensin ii-infused macrophage colony-stimulating factor-deficient mice: Evidence for a role in inflammation in angiotensin-induced vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:2106-2113
69. Browatzki M, Larsen D, Pfeiffer CA, Gehrke SG, Schmidt J, Kranzhofer A, Katus HA, Kranzhofer R. Angiotensin ii stimulates matrix metalloproteinase secretion in human vascular smooth muscle cells via nuclear factor-kappaB and activator protein 1 in a redox-sensitive manner. *J Vasc Res.* 2005;42:415-423
70. Arenas IA, Xu Y, Lopez-Jaramillo P, Davidge ST. Angiotensin ii-induced mmp-2 release from endothelial cells is mediated by tnF-alpha. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;286:C779-784

71. Luchtefeld M, Grote K, Grothusen C, Bley S, Bandlow N, Selle T, Struber M, Haverich A, Bavendiek U, Drexler H, Schieffer B. Angiotensin ii induces mmp-2 in a p47phox-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;328:183-188
72. Harris RC, Zhang MZ, Cheng HF. Cyclooxygenase-2 and the renal renin-angiotensin system. *Acta Physiol Scand*. 2004;181:543-547
73. Lee EY, Shim MS, Kim MJ, Hong SY, Shin YG, Chung CH. Angiotensin ii receptor blocker attenuates overexpression of vascular endothelial growth factor in diabetic podocytes. *Exp Mol Med*. 2004;36:65-70
74. Smith WL, Dewitt DL. Prostaglandin endoperoxide h synthases-1 and -2. *Adv Immunol*. 1996;62:167-215
75. Viridis A, Colucci R, Fornai M, Duranti E, Giannarelli C, Bernardini N, Segnani C, Ippolito C, Antonioli L, Blandizzi C, Taddei S, Salvetti A, Del Tacca M. Cyclooxygenase-1 is involved in endothelial dysfunction of mesenteric small arteries from angiotensin ii-infused mice. *Hypertension*. 2007;49:679-686
76. Pratico D, Tillmann C, Zhang ZB, Li H, FitzGerald GA. Acceleration of atherogenesis by cox-1-dependent prostanoid formation in low density lipoprotein receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:3358-3363
77. Cayatte AJ, Du Y, Oliver-Krasinski J, Lavielle G, Verbeuren TJ, Cohen RA. The thromboxane receptor antagonist s18886 but not aspirin inhibits atherogenesis in apo e-deficient mice: Evidence that eicosanoids other than thromboxane contribute to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1724-1728
78. Girardi JM, Farias RE, Ferreira AP, Raposo NR. Rosuvastatin prevents proteinuria and renal inflammation in nitric oxide-deficient rats. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66:1457-1462
79. Zhou Q, Liao JK. Pleiotropic effects of statins. - basic research and clinical perspectives. *Circ J*. 2010;74:818-826
80. de Sotomayor MA, Perez-Guerrero C, Herrera MD, Jimenez L, Marin R, Marhuenda E, Andriantsitohaina R. Improvement of age-related endothelial dysfunction by simvastatin: Effect on no and cox pathways. *Br J Pharmacol*. 2005;146:1130-1138
81. Rogler G, Lackner KJ, Schmitz G. Effects of fluvastatin on growth of porcine and human vascular smooth muscle cells in vitro. *Am J Cardiol*. 1995;76:114A-116A
82. Guijarro C, Blanco-Colio LM, Ortego M, Alonso C, Ortiz A, Plaza JJ, Diaz C, Hernandez G, Egido J. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase and

- isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ Res*. 1998;83:490-500
83. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: Regulation and function. *Eur Heart J*. 2011
 84. Laufs U. Beyond lipid-lowering: Effects of statins on endothelial nitric oxide. *Eur J Clin Pharmacol*. 2003;58:719-731
 85. Davignon J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation*. 2004;109:III39-43
 86. Andreou I, Tousoulis D, Miliou A, Tentolouris C, Zisimos K, Gounari P, Siasos G, Papageorgiou N, Papadimitriou CA, Dimopoulos MA, Stefanadis C. Effects of rosuvastatin on myeloperoxidase levels in patients with chronic heart failure: A randomized placebo-controlled study. *Atherosclerosis*. 2010;210:194-198
 87. Weber C, Erl W, Weber KS, Weber PC. Hmg-coa reductase inhibitors decrease cd11b expression and cd11b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol*. 1997;30:1212-1217
 88. Cicha I, Beronov K, Ramirez EL, Osterode K, Goppelt-Struebe M, Raaz D, Yilmaz A, Daniel WG, Garlichs CD. Shear stress preconditioning modulates endothelial susceptibility to circulating tnf-alpha and monocytic cell recruitment in a simplified model of arterial bifurcations. *Atherosclerosis*. 2009;207:93-102
 89. Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, Kamata T, Kallen J, Bruns C, Cottens S, Takada Y, Hommel U. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med*. 2001;7:687-692
 90. Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*. 2000;95:3032-3043
 91. Diomedea L, Albani D, Sottocorno M, Donati MB, Bianchi M, Fruscella P, Salmona M. In vivo anti-inflammatory effect of statins is mediated by nonsterol mevalonate products. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1327-1332
 92. Porter KE, Naik J, Turner NA, Dickinson T, Thompson MM, London NJ. Simvastatin inhibits human saphenous vein neointima formation via inhibition of smooth muscle cell proliferation and migration. *J Vasc Surg*. 2002;36:150-157
 93. Axel DI, Riessen R, Runge H, Viebahn R, Karsch KR. Effects of cerivastatin on human arterial smooth muscle cell proliferation and migration in transfilter cocultures. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000;35:619-629

94. Jones PH, Hunninghake DB, Ferdinand KC, Stein EA, Gold A, Caplan RJ, Blasetto JW. Effects of rosuvastatin versus atorvastatin, simvastatin, and pravastatin on non-high-density lipoprotein cholesterol, apolipoproteins, and lipid ratios in patients with hypercholesterolemia: Additional results from the stellar trial. *Clin Ther.* 2004;26:1388-1399
95. Calkin AC, Giunti S, Sheehy KJ, Chew C, Boolell V, Rajaram YS, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA. The hmg-coa reductase inhibitor rosuvastatin and the angiotensin receptor antagonist candesartan attenuate atherosclerosis in an apolipoprotein e-deficient mouse model of diabetes via effects on advanced glycation, oxidative stress and inflammation. *Diabetologia.* 2008;51:1731-1740
96. Whaley-Connell A, Habibi J, Nistala R, Cooper SA, Karuparthi PR, Hayden MR, Rehmer N, DeMarco VG, Andresen BT, Wei Y, Ferrario C, Sowers JR. Attenuation of nadph oxidase activation and glomerular filtration barrier remodeling with statin treatment. *Hypertension.* 2008;51:474-480
97. Leiter LA, Rosenson RS, Stein E, Reckless JP, Schulte KL, Schleman M, Miller P, Palmer M, Sosef F. Efficacy and safety of rosuvastatin 40 mg versus atorvastatin 80 mg in high-risk patients with hypercholesterolemia: Results of the polaris study. *Atherosclerosis.* 2007;194:e154-164
98. Li W, Ji ZL, Zhuo GC, Xu RJ, Wang J, Jiang HR. Effects of a selective cyclooxygenase-1 inhibitor in skov-3 ovarian carcinoma xenograft-bearing mice. *Med Oncol.* 2010;27:98-104
99. Shen CL, Yeh JK, Wang X. Short-term supplementation of cox-2 inhibitor suppresses bone turnover in gonad-intact middle-aged male rats. *J Bone Miner Metab.* 2006;24:461-466
100. Tang M, Cyrus T, Yao Y, Vocun L, Pratico D. Involvement of thromboxane receptor in the proatherogenic effect of isoprostane f2alpha-iii: Evidence from apolipoprotein e- and ldl receptor-deficient mice. *Circulation.* 2005;112:2867-2874
101. Neves MF, Endemann D, Amiri F, Virdis A, Pu Q, Rozen R, Schiffrin EL. Small artery mechanics in hyperhomocysteinemic mice: Effects of angiotensin ii. *J Hypertens.* 2004;22:959-966
102. Brassard P, Amiri F, Schiffrin EL. Combined angiotensin ii type 1 and type 2 receptor blockade on vascular remodeling and matrix metalloproteinases in resistance arteries. *Hypertension.* 2005;46:598-606

103. Viridis A, Colucci R, Fornai M, Blandizzi C, Duranti E, Pinto S, Bernardini N, Segnani C, Antonioli L, Taddei S, Salvetti A, Del Tacca M. Cyclooxygenase-2 inhibition improves vascular endothelial dysfunction in a rat model of endotoxic shock: Role of inducible nitric-oxide synthase and oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;312:945-953
104. Gluais P, Lonchampt M, Morrow JD, Vanhoutte PM, Feletou M. Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the shr aorta: The janus face of prostacyclin. *Br J Pharmacol.* 2005;146:834-845
105. Alvarez Y, Briones AM, Balfagon G, Alonso MJ, Salaices M. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. *J Hypertens.* 2005;23:767-777
106. Welch WJ, Patel K, Modlinger P, Mendonca M, Kawada N, Dennehy K, Aslam S, Wilcox CS. Roles of vasoconstrictor prostaglandins, cox-1 and -2, and at1, at2, and tp receptors in a rat model of early 2k,1c hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293:H2644-2649
107. Park JK, Mervaala EM, Muller DN, Menne J, Fiebeler A, Luft FC, Haller H. Rosuvastatin protects against angiotensin II-induced renal injury in a dose-dependent fashion. *J Hypertens.* 2009;27:599-605
108. Vanhoutte PM, Feletou M, Taddei S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol.* 2005;144:449-458
109. Li W, Asagami T, Matsushita H, Lee KH, Tsao PS. Rosuvastatin attenuates monocyte-endothelial cell interactions and vascular free radical production in hypercholesterolemic mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;313:557-562
110. Sicard P, Acar N, Gregoire S, Lauzier B, Bron AM, Creuzot-Garcher C, Bretillon L, Vergely C, Rochette L. Influence of rosuvastatin on the nad(p)h oxidase activity in the retina and electroretinographic response of spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 2007;151:979-986
111. Kang BY, Mehta JL. Rosuvastatin attenuates ang ii--mediated cardiomyocyte hypertrophy via inhibition of lox-1. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2009;14:283-291

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare innanzitutto il Professor Corrado Blandizzi, un riferimento e un pozzo infinito di conoscenza. Per la sua grande disponibilità, infinita pazienza e per la grande opportunità che mi ha concesso.

Ringrazio infinitamente il Dott. Agostino Viridis per avermi aiutato e indirizzato in questo progetto di studio.

Un ringraziamento particolare a Emiliano amico dai tempi dell'Università e collega che è riuscito a sopportarmi in questi anni in tutti i miei sbalzi di umore: deve essere stata veramente un'impresa ardua!

Matteo e Luca e Rocchina per aver dimostrato disponibilità, per avermi dato numerosi consigli e per la simpatia dimostrata nei mie confronti.

Chiara e Cristina per l'amichevole collaborazione.

Sarebbe troppo lungo, anche se doveroso, ringraziare tutti quelli che hanno collaborato con me in questi anni; tra loro voglio solo ricordare: Oriana Owwad, Narcisa, Elena e Daniele ..

Voglio ringraziare anche la mia collega ed amica Patrizia la cui compagnia e il suo aiuto hanno reso più gradevoli questi anni.

Un ringraziamento speciale è rivolto ai miei genitori, colonne portanti della mia vita.

Ed in fine un grazie a me stessa: in fondo se sono arrivata alla fine di questo lungo percorso universitario, è anche merito mio!!

16 gennaio 2012 ore 9.49

Ilaria