

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA

IN SCIENZE BIOMOLECOLARI E BIOTECNOLOGICHE

INDIRIZZO: BIOCHIMICA CLINICA E BIOLOGIA MOLECOLARE CLINICA

(CICLO XXVII)

Direttore: Prof. Leonardo A. Sechi

Stress ossidativo associato ad un incremento dei livelli di taurina in pazienti con IRC sottoposti a terapia con statine

Tutor:

Prof. Ciriaco Carru

Co-tutor:

Prof. Angelo Zinellu

Tesi di dottorato di:

Dott.ssa Manuela Sanna

INDICE

1. ABBREVIAZIONI	5
2. INTRODUZIONE	8
2.1. Premessa	8
2.2. Il rene: cenni sulla fisiologia e fisiopatologia del rene	9
2.3. Le patologie renali	12
3. INSUFFICIENZA RENALE CRONICA	15
3.1. Definizione	15
3.2. Stadi dell'insufficienza renale	16
3.3. Incidenza della patologia	18
3.4. Fattori di rischio	19
3.5. Insufficienza renale cronica e patologie cardiovascolare	21
3.6. Le alterazioni del metabolismo lipidico nell'insufficienza renale cronica	23
3.7. Le alterazioni del quadro ossidativo nell MRC	26
4. LO STRESS OSSIDATIVO	28
4.1. Generalità sullo stress ossidativo	27
4.2. La valutazione dello stress ossidativo	30
4.2.1. La malondialdeide (MDA)	32
4.2.2. Il rapporto allantoina acido urico (All/UA)	35

4.2.3. I tioli plasmatici e la valutazione dello stato redox	36
4.3. Gli antiossidanti	39
4.3.1. Misura del potere antiossidante totale (TAEC: Total Equivalent Antioxidant Capacity)	42
4.3.2. La taurina	43
4.3.2.1. Metabolismo della taurina: biosintesi della taurina e dei suoi derivati	45
4.3.2.2. Ruolo antiossidante della taurina	47
5. LA TERAPIA DELLA DISLIPIDEMIA NELL'INSUFFICIENZA RENALE CRONICA	49
5.1. Considerazioni generali sulle statine e cenni di farmacologia	49
5.1.1. Effetti secondari	51
5.1.2. Effetti delle statine a livello cardiovascolare	52
5.1.3. Proprietà antiossidanti delle statine	56
5.1.4. Azione antiinfiammatoria delle statine	57
5.2. Statine e protezione renale	59
5.3. Inibitori dell'assorbimento del colesterolo: Ezetimibe	60
6. SCOPO DEL LAVORO	63
7. MATERIALI E METODI	66
7.1. Soggetti partecipanti allo studio	66

7.2. Quantificazione dei tioli totali	68
7.3. Quantificazione dei tioli ridotti e valutazione dello stato redox	69
7.4. Quantificazione della malondialdeide	71
7.5. Quantificazione del rapporto allantoina acido urico	72
7.6. Quantificazione dei livelli di taurina plasmatica	73
7.7. Quantificazione della capacità antiossidante plasmatica totale con il metodo della TAEC (Total Antioxidant Equivalent Capacity)	74
8. ANALISI STATISTICHE	75
9. RISULTATI	76
10. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	79
11. TABELLE E FIGURE	86
12. BIBLIOGRAFIA	96

1. ABBREVIAZIONI

- ACN: Acetonitrile
- All/UA: Rapporto Allantoina Acido Urico
- BHT: 2,6-di-tetrabutyl-4-methylphenol
- C-HDL: Colesterolo HDL
- CK: Creatinchinasi
- C-LDL: Colesterolo LDL
- Cys: Cisteina
- Cysgly: Cistein Glicina
- CV: Cardio Vascolare
- CYP sistema del citocromo
- eNOS: Nitrossido Sintasi endoteliale
- FITC: Fluoresceina Isotiocianato
- FPP: Farnesilpirofosfato
- GGPP: Geranilgeranilpirofosfato
- Glucys: Glutamincisteina
- GSH: Glutatione
- GTP: Guanosina trifosfato
- Hcy: Omocisteina
- HDL: lipoproteine ad alta densità (High density lipoprotein)
- HMG-CoA reduttasi: Idrossimetilglutaril-CoA reduttasi
- ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule-1
- IDL: Lipoproteine di Densità Intermedia (Intermediate Density Lipoprotein)
- IL-6: Interleuchina 6

- IRA: Insufficienza Renale Acuta
- IRC: Insufficienza Renale Cronica
- IRT: Insufficienza Renale Terminale
- KDIGO: Kidney Disease: Improving Global Outcomes
- LDL: Lipoproteine a Bassa Densità (Low Density Lipoprotein)
- LOX-1: Recettore per le LDL ossidate
- LPL: Lipoproteina Lipasi
- Lp(a): Lipoproteina a
- MDA: Malondialdeide
- MRC: Malattia Renale Cronica
- NO: Ossido Nitrico
- NOS: Nitrossido Sintasi
- NPC1L1: Proteina Niemann-Pick C1-Like 1
- Ox-LDL: Lipoproteine a Bassa Densità Ossidate
- PAI-1: Inibitore 1 del plasminogeno
- PCR: Proteina C Reattiva
- RAS : Renin-Angiotensin System
- R-AT 1: recettore di membrana dell'angiotensina II di tipo I
- ROS: Specie Reattive dell'Ossigeno
- RNS: Specie Reattive dell'Azoto
- SAA: Serum Amyloid A
- sd LDL-c: Particelle di colesterolo LDL piccole e dense
- SOD: Superossido Dismutasi
- SSA: Acido Solfo Salicilico

- TAEC: Total Antioxidant Capacity Equivalent (acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico)
- TAU: Taurina
- TAC: Capacità Antiossidante Totale
- TBP: Tributillfosfina
- TCA: Acido Tricloro Acetico
- TNF-alfa: Fattore di Necrosi tumorale alfa
- VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule-1
- VFG: Velocità di Filtrazione Glomerulare
- VLDL: Lipoproteine a Bassissima Densità (Very Low Density Lipoprotein)
- 4-HNE: : 4-idrossinonenale
- 5-IAF: 5-iodoacetamidefluoresceina

2. INTRODUZIONE

2.1 Premessa

La malattia renale cronica (MRC), rappresenta oggi un rilevante problema di salute pubblica a livello mondiale, sia per le dimensioni epidemiche ormai raggiunte, sia per gli elevati costi sanitari e sociali ed essa correlati. Nei paesi sviluppati il progressivo incremento del numero di pazienti con MRC e di quelli che richiedono una terapia sostitutiva ha raggiunto livelli epidemici con un incremento annuale del 5-8% [Meguid El Nahas A et al 2005; The United States Renal Data System 2004]. Le dimensioni epidemiche della MRC non rappresentano però l'unico dato allarmante. Studi epidemiologici effettuati su pazienti con MRC hanno evidenziato che nei pazienti in fase non dialitica la mortalità dovuta a cause cardiovascolari (CV) aumenta in maniera esponenziale con il progredire della patologia. Infatti le patologie CV, oltre che influenzare negativamente il decorso della MRC, rappresentano la prima causa di morte in questa classe di pazienti che soprattutto nelle fasi terminali della patologia, presentano un rischio 50 volte maggiore di morte per patologie CV piuttosto che per complicanze legate alla progressione della malattia. Ciò deriva dal fatto che tali pazienti presentano un quadro clinico caratterizzato da fattori di rischio tradizionali per le patologie CV quali l'ipertensione, il diabete mellito, l'età avanzata, il genere, la storia familiare, un aumento dei markers infiammatori e dello stress ossidativo che concorrono parallelamente nel regolare, l'insorgenza e l'evoluzione della patologia. Inoltre una condizione di iperlipidemia caratterizzata da elevati livelli di LDL (lipoproteine ad bassa densità) e bassi livelli di HDL (lipoproteine ad alta densità) è presente in tutti gli stadi della patologia renale e concorre con gli altri fattori di rischio a far aumentare l'insorgenza di patologie CV. Generalmente per ridurre la condizione di iperlipidemia nei pazienti con MRC vengono somministrati farmaci ipolipemizzanti come le statine,

che hanno effetti benefici sia nel migliorare il quadro lipidico generale che lo stato ossidativo del paziente. Rimane tuttora oggetto di dibattito l'azione reno-protettiva di questa classe di farmaci. Gli effetti benefici delle statine sono stati ampiamente dimostrati e pare siano una normale conseguenza dell'effetto pleiotropico che questi farmaci hanno nel modulare lo stress ossidativo e l'infiammazione. Malgrado ciò ancora rimangono da chiarire i meccanismi alla base del miglioramento del quadro ossidativo in seguito alla terapia farmacologica. Pertanto, abbiamo voluto monitorare gli effetti di un trattamento ipolipemizzante in pazienti con MRC appartenenti al 3°- 4° stadio della patologia in relazione ad alcuni biomarkers dello stress ossidativo, con l'intento di capire e trovare una spiegazione di come le statine possano regolare lo stress ossidativo. A tale scopo abbiamo monitorato in un gruppo di trenta pazienti con insufficienza renale cronica appartenenti al 3°- 4° stadio della patologia, i livelli plasmatici di taurina (TAU), malondilaldeide (MDA), del rapporto allantoina acido urico (All/UA), la capacità antiossidante plasmatica totale (TAEC), i tioli totali plasmatici e lo stato redox degli stessi in seguito alla somministrazione di un terapia ipolipemizzante.

2.2 Il rene: cenni sulla fisiologia e fisiopatologia del rene

I reni sono organi parenchimatosi escretori dei vertebrati che insieme alle vie urinarie costituiscono l'apparato urinario la cui funzione principale è filtrare il sangue e i prodotti di scarto del metabolismo, per espellerli tramite l'urina. Oltre che la rimozione dei prodotti di scarto del metabolismo azotato, una delle principali funzioni del rene è la regolazione omeostatica del contenuto di acqua e di ioni nel sangue, definita anche bilancio "idrosalino". I reni infatti, mantengono le normali concentrazioni di acqua e

ioni bilanciando l'apporto di tali sostanze con la loro escrezione nelle urine. Le funzioni del rene, comunque, possono essere classificate in quattro categorie generali:

1. partecipa alla regolazione dell'equilibrio idroelettrolitico mediante l'escrezione selettiva di acqua ed elettroliti, in modo da bilanciare l'apporto esterno e la produzione interna degli stessi;

2. regola la produzione, l'assorbimento e l'escrezione di acidi e basi;

3. elimina alcuni prodotti del metabolismo (urea, creatinina, ac. urico, ecc...),

4. produce ormoni che intervengono:

➤ nella regolazione del flusso ematico e renale (renina, angiotensina, prostaglandine)

➤ nella produzione dei globuli rossi (eritropoietina)

➤ nella regolazione del metabolismo fosfo-calcico (calcitriolo)

1. Regolazione dell'equilibrio elettrolitico

Il compito di mantenere il corretto equilibrio idro-salino nell'organismo è affidato al rene, che ogni giorno, per mezzo delle sue unità funzionali, i nefroni, assicura una costante depurazione di circa 150-170 litri di sangue. I reni mantengono le concentrazioni degli ioni in un intervallo di valori normali, bilanciando l'apporto dietetico con la perdita renale.

Negli organismi terrestri, data la maggior difficoltà ad assumere acqua dall'esterno, la regolazione dell'equilibrio idro-salino viene affidata principalmente a meccanismi di tipo conservativo. Il rene attua la sua azione regolatoria in quanto nel caso in cui sia necessario ridurre l'espulsione di acqua, verrà espulsa urina con alta concentrazione di

ioni in modo tale da abbassare la concentrazione osmotica dell'organismo, o viceversa trattenendo ioni e producendo urine diluite, si avrà un innalzamento della concentrazione osmotica. Il meccanismo regolatorio è necessario per controbilanciare l'ingresso irregolare di sali attraverso l'alimentazione e, nei mammiferi, la perdita di acqua e sali attraverso il sudore. In questo modo elementi chimici come sodio, potassio, carbonati, fosfato, ioni calcio, glucosio, aminoacidi, acido urico urea ecc, in seguito a processi di filtrazione, riassorbimento secrezione ed escrezione che avvengono a livello del nefrone, si trovano nel nostro organismo nell'equilibrio adeguato necessario per la vita. Una corretta regolazione del volume del liquido extracellulare comporta il mantenimento della pressione arteriosa nei limiti normali. Quando il volume del liquido extracellulare diminuisce, si abbassa la pressione arteriosa e l'organismo non riesce più a garantire un flusso ematico adeguato al cervello e ad altri organi vitali. Per questo l'apparato urinario e quello cardiovascolare cooperano per assicurare il mantenimento della pressione arteriosa nel range della normalità.

2. Regolazione omeostatica del pH

Le oscillazioni del pH plasmatico sono normalmente mantenute entro un intervallo molto ampio. Nel caso in cui il liquido extracellulare è troppo acido, i reni rimuovono l'eccesso di ioni H^+ e trattengono ioni bicarbonato (HCO_3^-) che agiscono da tampone. Viceversa, quando il liquido extracellulare è troppo alcalino, i reni rimuovono ioni bicarbonato e trattengono ioni H^+ garantendo in entrambi i casi un equilibrio omeostatico del pH plasmatico che garantisce normali processi fisiologici e il susseguirsi di corrette reazioni enzimatiche.

3. Escrezione dei prodotti di scarto.

I reni rimuovono prodotti metabolici di scarto e sostanze estranee, come farmaci e tossine. Il sangue proveniente dalle arterie renali viene depurato e liberato dai materiali di scarto e dai liquidi in eccesso, passando successivamente nelle vene renali.

I prodotti metabolici di scarto comprendono la creatinina che deriva dal metabolismo muscolare e i metaboliti azotati urea e acido urico, nonché prodotti del metabolismo dell'emoglobina, come l'urobilinogeno, che conferisce alle urine il tipico colore giallo.

4. Produzione di ormoni.

I reni hanno anche importanti funzioni endocrine in quanto secernono diversi ormoni ad azione sistemica, quali l'eritropoietina, la renina e 1-25-diidrossicolecalciferolo. L'eritropoietina è una citochina/ormone che regola la formazione e la maturazione dei globuli rossi da parte del midollo osseo nel processo di eritropoiesi, mentre la renina è un enzima che regola la produzione di ormoni implicati nel controllo della pressione arteriosa agendo nel sistema renina-angiotensina-aldosterone. Il rene secerne inoltre altri enzimi che partecipano alla conversione della vitamina D3 in 1-25 diidrossicolecalciferolo, necessario per la regolazione ed il trasporto del calcio, partecipando alla regolazione del bilancio del Ca^{2+} e all'omeostasi dell'osso.

2.2.1. Patologie renali

Le malattie renali possono essere suddivise in tre grandi gruppi, a seconda della sede principale di danno del rene e/o delle vie urinarie:

- Le **glomerulonefriti** che colpiscono il glomerulo renale e possono essere causate da processi immunologici o anche avere una base genetica

- Le **tubulopatie** e le **nefropatie tubulo-interstiziali** che interessano il tubulo renale e possono essere causate da infezioni, ostruzione delle vie urinarie o dall'uso inappropriato di alcuni farmaci
- Le **malattie ereditarie** che comprendono malformazioni congenite renali (come ad esempio il rene policistico) e delle vie urinarie

Le possibili cause delle malattie renali possono essere diverse, quali:

- Infezioni che possono essere batteriche, o più raramente virali
- Sostanze tossiche: farmaci (antiinfiammatori e antidolorifici, soprattutto se usati in maniera inappropriata per dose e durata di terapia), contaminanti presenti nei cibi o sostanze tossiche presenti nell'ambiente.
- Ostruzioni delle vie urinarie che possono essere congenite, spesso ereditarie, o acquisite
- Genetiche
- Malattie metaboliche: diabete, obesità, iper-colesterolemia (nel caso in cui siano presenti contemporaneamente si parla di sindrome metabolica)
- Ipertensione arteriosa

In un soggetto sano, con il progredire dell'età il flusso ematico renale si riduce gradualmente da 1200 ml/min all'età di 30-40 anni a 600 ml/min all'età di 80 anni.

Il fattore causale principale è la diminuzione del letto vascolare del rene e ciò che ne consegue è la riduzione delle velocità di filtrazione glomerulare (VFG), misurata con la clearance della creatinina, che rimane costante sino ai 30-40 anni e in seguito diminuisce linearmente a una velocità media di circa 8 ml/min/1,73 m²/ decennio, in circa in due terzi delle persone anziane non nefropatiche o non sottoposte a terapia antipertensiva. Tuttavia un terzo dei soggetti anziani non mostra alcuna riduzione della

VFG. Questa variabilità indica che fattori diversi dall'invecchiamento potrebbero essere responsabili del calo evidente della funzionalità renale. Per esempio i rialzi pressori, anche se contenuti nell'ambito del range di normalità, sono associati a un accelerazione senile del calo funzionale dell'organo.

La maggior parte delle malattie che non possono essere efficacemente curate evolvono verso l'insufficienza renale, condizione in cui i reni non riuscendo ad assicurare la corretta eliminazione delle scorie non garantiscono una normale composizione dei liquidi corporei. L'insufficienza renale può essere acuta o cronica.

- L'**insufficienza renale acuta** (IRA) può instaurarsi in pochi giorni a causa di malattie renali acute, patologie extrarenali che coinvolgono i reni, shock, complicazioni nella gravidanza, esposizione a farmaci tossici per il rene.
- L'**insufficienza renale cronica** (IRC) comporta la perdita lenta, progressiva ed irreversibile della funzionalità renale e può essere causata da malattie renali o extrarenali. In genere la sua insorgenza lenta ed insidiosa, nella fase iniziale si manifesta con sintomi sfumati e per questo viene spesso trascurata fino alle fasi più avanzate.
- L'insufficienza renale cronica evolve verso l'**insufficienza renale terminale** (IRT), cioè nella perdita totale e irreversibile della funzione renale. In questa fase si rende necessaria la terapia sostitutiva rappresentata elettivamente dal trapianto renale o dalla dialisi. L'insufficienza renale è quindi una patologia complessa che causa altre patologie dette perciò secondarie come, l'ipertensione, l'anemia, una multiforme patologia ossea detta osteodistrofia, neuropatie periferiche, gastropatie e riduce la difesa immunologica da parte di agenti infettivi.

3. L'INSUFFICIENZA RENALE CRONICA (IRC)

3.1 Definizione

L'IRC è una patologia progressiva caratterizzata dalla perdita irreversibile della funzione renale che nelle sue ultime fasi richiede trattamento sostitutivo rappresentato dalla dialisi o dal trapianto del rene. È una patologia multifattoriale altamente diffusa, e risulta essere una normale conseguenza della MRC. La MRC è una patologia caratterizzata dalla presenza di un danno renale evidenziato da alterati parametri biochimici laboratoristici o anatomopatologici, che comportano una ridotta funzionalità renale che perduri da almeno tre mesi indipendentemente dalla patologia di base che è la causa [National Kidney Foundation, 2002]. Questa condizione patologica è caratterizzata da fenomeni infiammatori o sclerotici renali che possono, nel tempo, determinare una riduzione della funzionalità renale con una tendenza progressiva verso l'insufficienza renale cronica.

I pazienti con la patologia conclamata presentano un quadro caratterizzato da:

- Accumulo nel sangue di sostanze azotate e non, normalmente escrete dai reni (urea, creatinina, acido urico ecc)
- Disturbi elettrolitici e dell'equilibrio acido-base (iperpotassiemia, iperfosforemia, acidosi metabolica)
- Alterazioni della diuresi variabili: poliuria (diuresi superiore a 400-500 ml/24 ore), oliguria (diuresi inferiore a 400-500 ml/24 ore) o anuria (diuresi inferiore a 50-100 ml/24 ore)

L'insufficienza renale cronica di solito ha un'insorgenza e una progressione graduale, il tempo che intercorre tra la sua insorgenza e la progressione verso le ultime fasi della

patologia può variare da pochi mesi ad anni, e dipende strettamente dalla causa eziologica e dall'efficace e repentino intervento terapeutico. Negli ultimi stadi della patologia l'insufficienza renale evolve verso l'insufficienza terminale e richiede trapianto del rene o dialisi.

3.2 Stadi dell'insufficienza renale cronica

Nel 2002 la National Kidney Foundation ha definito i criteri di classificazione della patologia renale che sono:

1) Presenza di un danno renale che persiste da un lasso di tempo \geq a 3 mesi, che comporti o meno un alterazione della velocità di filtrazione glomerulare, ma confermato da una biopsia renale o da un marker di danno dell'organo. Tra i markers di danno renale sono incluse, anomalie nella composizione del sangue e delle urine e anomalie nei test di immagine. La presenza di un danno renale conclamato viene diagnosticato a partire da referti laboratoristici come la presenza di albuminuria, presenza di proteine o tracce di sangue di origine renale nelle urine.

2) Un valore di VFG < 60 ml/min/1.73 m² che persiste da un lasso di tempo \geq a 3 mesi con o senza la presenza di un danno renale evidente [Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from kidney disease improving global outcomes (KDIGO)].

Le recenti linee guida nazionali e internazionali riconoscono 5 stadi della malattia ogni uno dei quali è caratterizzato da uno specifico range di velocità di filtrazione glomerulare che diminuisce irreversibilmente al progredire della patologia e dalla presenza concomitante o meno di un danno renale evidente (Tab 1). L'insufficienza

renale è quindi una malattia progressiva e degenerativa che nel quinto e ultimo stadio comporta la perdita irreversibile della funzionalità del rene e richiede un trattamento sostitutivo rappresentato da dialisi o trapianto d'organo.

- Stadio 1: è caratterizzato dalla presenza di danno renale con VFG normale o aumentata ($VFG > 90 \text{ ml/min/1.73m}^2$)
- Stadio 2: è caratterizzato dalla presenza di segni di danno renale con lieve riduzione della VFG ($60 < VFG < 89 \text{ ml/min/1.73m}^2$)
- Stadio 3: è caratterizzato da una riduzione moderata della VFG ($30 < VFG < 59 \text{ ml/min/1.73m}^2$)
- Stadio 4: è caratterizzato da una grave riduzione della VFG ($29 < VFG < 15 \text{ ml/min/1.73m}^2$)
- Stadio 5: è caratterizzato da un'insufficienza renale terminale detta anche fase uremica in quanto i reni hanno completamente perso la loro funzione. Ciò comporta la ritenzione di acqua e di altre sostanze che accumulandosi danno origine alla così detta sindrome uremica. Quest'ultimo stadio è caratterizzato da manifestazioni cliniche evidenti, ematologiche, cardiocircolatorie, nervose, endocrine e ossee e il paziente sulla base del quadro clinico è obbligatoriamente sottoposto a terapia sostitutiva della funzione del rene quali la dialisi o il trapianto d'organo.

Tale classificazione è stata modificata nel 2004 dalla KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes), aggiungendo all'eventuale terapia sostitutiva la lettera T indicante il trapianto e la lettera D indicante la dialisi. La VFG può essere calcolata utilizzando le formule di Cockcroft-Gault, un algoritmo che consente di stimare la clearance della creatinina partendo da valori di creatinemia, età, peso, superficie corporea, sesso ed etnia del paziente. Il valore ottenuto ci dà delle informazioni riguardo alla velocità con cui si forma il filtrato renale a livello del corpuscolo renale.

3.3 Incidenza della patologia

Attualmente la MRC rappresenta un problema di salute pubblica a livello mondiale. Nei paesi sviluppati il progressivo incremento del numero di pazienti con MRC e di quelli che richiedono una terapia sostitutiva ha un incremento annuale del 5-8% [Meguid El Nahas A et al 2005; The United States Renal Data System 2004] tanto che alcuni studi di carattere epidemiologico l'hanno definita una vera e propria epidemia [Stengel B, 2011]. Le ragioni di questo incremento sono numerose. Le più importanti sono l'invecchiamento della popolazione generale e il fatto che il rilievo del danno renale emergente, non è la conseguenza di un aumento delle nefropatie primitive, ma delle complicanze a livello renale dovute a malattie sistemiche (diabete mellito di tipo II, la sindrome metabolica, l'ipertensione arteriosa ecc).

L'aumento dell'incidenza e prevalenza dei pazienti con MRC ha determinato rilevanti complicanze cliniche, infatti oltre a un aumento della prevalenza di forme avanzate di malattia renale, per le quali sono necessarie terapie conservative e/o sostitutive specifiche e complesse, è ormai ampiamente dimostrato che la MRC sin dalle sue fasi più precoci espone a un maggior rischio di sviluppare eventi cerebrovascolari e cardiovascolari più o meno gravi. Le recenti statistiche sulla mortalità indicano che la malattia renale è la nona causa di morte negli Stati Uniti [Schoolwerth AC et al, 2006] e la dodicesima nel mondo [Dirks J et al, 2006]. È stato riscontrato che il 13% della popolazione generale adulta degli Stati Uniti rientra in almeno uno degli stadi della patologia. La prevalenza aumenta sino al 15-30% nelle persone anziane e supera il 50% nei soggetti affetti da malattie cardiovascolari e metaboliche, comportando conseguentemente elevati costi sia sociali che terapeutici [Eknoyan G et al, 2004].

Il grande impatto che questa patologia ha a livello della sanità pubblica è determinato principalmente da due motivi:

il numero dei pazienti è in costante aumento, e in secondo luogo allo stato attuale, data la mancanza di un progetto di screening, si conosce la prevalenza e l'incidenza della patologia solo negli stadi terminali della stessa.

3.4 Fattori di rischio

È ampiamente dimostrato che i soggetti nefropatici presentano un quadro clinico caratterizzato da uno stato infiammatorio e uno stato ossidativo alterati che concorrono parallelamente nel regolare l'evoluzione della patologia [Cachofeiro V et al, 2008].

I fattori di rischio che possono colpire la funzione renale sono molteplici e includono fattori ambientali, patologie metaboliche, autoimmuni, cardiovascolari, infettive o urologiche. Purtroppo i fattori di rischio che più comunemente alterano la funzione renale con tanta insidia, sono estremamente diffusi nel mondo occidentale in quanto legati in gran parte allo stile di vita: età avanzata, ipertensione arteriosa, diabete, sovrappeso, obesità, dislipidemia e fumo di sigaretta [Coresh J et al, 2003], ma anche altri fattori di rischio meno comuni come l'iperomocisteinemia, e l'aumentata produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) regolano l'insorgenza e l'evoluzione della patologia. Questi fattori di rischio comuni alle patologie cardiovascolari fanno sì che questa classe di pazienti presentino già dai primi stadi della patologia un'aterosclerosi accelerata [Lindner A et al, 1974], tanto che le malattie cardiovascolari rappresentano la prima causa di morte negli individui con malattia renale cronica [Berl T et al, 2006; Fried LF et al, 2003] e la patologia renale risulta essere un fattore di

rischio indipendente per le patologie CV. Una condizione non meno importante che caratterizza il quadro clinico di questi pazienti è la presenza di quadro lipidico caratterizzato da iperlipidemia, fattore di rischio indipendente per le patologie cardiovascolari. Con l'eccezione dell'età, i restanti fattori di rischio che caratterizzano la patologia renale possono essere modificabili, sia grazie all'intervento medico/terapeutico, sia in seguito al cambiamento di stile di vita del paziente. Infatti molto possono fare i medici e i pazienti stessi per prevenire e curare l'ipertensione arteriosa (pressione arteriosa > 140/90 mmHg), il diabete, l'obesità, la dislipidemia e per l'astensione dal tabagismo. La responsabilità di intervenire su questi fattori di rischio è importante e deve essere condivisa tra mondo medico e la popolazione generale specialmente alla luce della dimensione socio-economica della IRC. In merito ai risultati osservati in seguito ad un ampio studio clinico "Sharp", effettuato su circa 9 mila pazienti, è stato possibile chiarire i benefici della riduzione dei livelli di colesterolo LDL sugli eventi aterosclerotici, in persone che soffrono di MRC. Per questo motivo uno degli obiettivi principali nell'ambito di questa patologia è quello di sottoporre i pazienti ad un trattamento intensivo e multifattoriale mirato sia a correggere i fattori di rischio cardiovascolari che quelli di progressione del danno renale (ipertensione, anemia, dislipidemia, alterazioni idroelettrolitiche, iperparatiroidismo). Questo consentirebbe una riduzione significativa dell'incidenza di eventi cardiovascolari e un rallentamento della progressione della nefropatia, migliorando così l'aspettativa ma soprattutto la qualità di vita del paziente. Generalmente per ridurre l'iperlipidemia e ridurre i rischi che essa comporta, a questi pazienti vengono somministrati farmaci ipolipemizzanti come le statine che hanno effetti sia nel migliorare il quadro lipidico generale che lo stress ossidativo.

3.5 Insufficienza renale cronica e patologie cardiovascolari

È ormai noto da circa venti anni che i pazienti emodializzati presentano un processo aterosclerotico accelerato [Lindner A et al, 1974] e una maggiore probabilità di incorrere in patologie cardiovascolari rispetto alla popolazione generale. Le malattie cardiovascolari infatti, rappresentano la prima causa di morte non solo nella popolazione generale, ma anche in individui con malattia renale cronica [Berl T et al, 2006; Fried LF et al, 2003]. Approssimativamente il 50% degli individui con malattia renale muore per patologie cardiovascolari [Tonelli M et al, 2006; Foley RN et al, 1998; Herzog CA et al 1998] e il rischio di morte per patologie CV è nettamente più elevato rispetto alla popolazione generale [Go AS et al, 2004; Foley RN 1998; Parfrey PS et al, 1999]. L'elevato rischio cardiovascolare presente in ogni fase della patologia è giustificato dalla presenza di molti fattori di rischio CV [Schiffrin EL et al, 2007; Rodriguez JA et al, 2007], alcuni peculiari di questa condizione clinica, altri comuni nella popolazione generale ma con una prevalenza notevolmente maggiore in questa classe di pazienti (Tab. 2).

Solo negli ultimi anni è stato riscontrato che il maggior rischio di incorrere in complicanze cardiovascolari si estende anche ai pazienti con livelli moderati di IRC che vanno incontro ad eventi di morte dovuti per lo più a cause cardiache ancor prima di essere sottoposti a terapia dialitica [Hunsicker LG, 2004]. L'aumento della morbilità e della mortalità cardiovascolare si ha in tutti gli stadi della patologia renale, anche in pazienti con insufficienza renale moderata che presentano una VFG < 60 ml/min. Alcuni studi hanno dimostrato una correlazione inverse tra i fattori di rischio cardiovascolari e la VFG [Schiffrin EL et al, 2007; Rodriguez JA et al, 2007]. Infatti la maggior parte dei pazienti con IRC che appartengono al 3-4 stadio della patologia

muoiono per lo più per cause cardiovascolari piuttosto che per il progredire della patologia renale sino allo stadio terminale in cui la mortalità cardiovascolare è del 15-30% superiore che in una popolazione di controllo corretta per il fattore età [Sarnak MJ et al, 2003]. Dagli studi di Framingham è emerso che i fattori di rischio CV aumentano notevolmente nei pazienti con una lieve insufficienza renale [Culleton BF et al, 1999] e che l'incremento del rischio CV inizia sin dalle prime fasi della malattia. Uno studio realizzato dal Kaiser Permanente Renal Registry di San Francisco, su più di un milione di adulti, ha dimostrato che alla riduzione del filtrato glomerulare si osserva un aumento del rischio di morte e ospedalizzazione per tutte le cause e per eventi CV. È inoltre ormai ben dimostrato come i fattori di rischio CV tradizionali e non, maggiori o minori, siano responsabili del deterioramento, anche modesto della funzionalità renale. In altri termini il danno funzionale del rene, anche quando espresso dalla sola comparsa di una modestissima proteinuria, non solo risente nella sua progressione dei medesimi fattori di rischio della malattia CV, ma assume a sua volta un peso apparentemente determinante nell'aggravare il livello del rischio globale, l'incidenza di eventi CV e il grado di mortalità e morbilità. Questo non è sorprendente, dal momento che questi fattori sono causa e / o in grado di accelerare i danni renali. Pazienti con IRC hanno inoltre la tendenza a manifestare la "sindrome metabolica", definita da associazione di insulino-resistenza, dislipidemia, iperglicemia, obesità addominale e ipertensione [Chen J et al, 2004]. In aggiunta ai fattori di rischio classici, in questi pazienti ci sono altri fattori di rischio come l'accumulo di tossine uremiche, calcificazioni vascolari e uno stato di infiammazione cronica. Inoltre elevate dosi di PTH rappresentano un fattore di rischio in quanto promuovono i processi che danno inizio al danno endoteliale.

3.6 Le alterazioni del metabolismo lipidico nella malattia renale cronica

La MRC si accompagna a importanti alterazioni sia quantitative che qualitative a carico delle lipoproteine circolanti. La classe lipoproteica interessata varia a seconda dello stadio della malattia ma un quadro lipidico alterato è presente durante tutta la storia naturale della patologia, dalle fasi più precoci sino ad arrivare a quelle più avanzate [Tsimihodimos et al, 2008; Kaysen GA et al, 2009]. È importante sottolineare che le alterazioni del quadro lipidico del paziente nefropatico cronico, tradizionalmente riportate in letteratura, sono quelle tipiche della fase più avanzata della malattia renale. Tuttavia recentemente, grazie ad uno screening precoce, è stato possibile constatare che anche negli stadi precoci della malattia i pazienti presentano un quadro lipidico anomalo, identificabile in maniera differente nei diversi stadi della patologia. Le anomalie quantitative sono rappresentate da un aumento dei trigliceridi plasmatici, una riduzione o aumento del colesterolo HDL (*High Density Lipoprotein*). Questi parametri, utilizzati normalmente nella pratica clinica per stratificare il rischio CV, non rendono immediatamente percepibile l'entità del rischio in questa classe di pazienti, inducendo a far sottovalutare le reali modificazioni proaterogene dovute al quadro dislipidemico di questi pazienti. Infatti insieme alle alterazioni quantitative, nei pazienti con IRC si associano importanti modificazioni qualitative delle lipoproteine. I dati emersi da studi epidemiologici riportati in letteratura indicano che circa il 40-50% dei pazienti con IRC presenta ipertrigliceridemia, mentre un aumento del colesterolo totale si riscontra nel 20-30% dei casi. L'incremento dei trigliceridi è riconducibile sia ad un' aumentata produzione che a una ridotta clearance di questa classe lipoproteica [Batista MC et al, 2004]. La prima condizione si verifica come conseguenza di una ridotta tolleranza ai carboidrati, condizione caratteristica dei pazienti con MRC e dell'aumentata sintesi di lipoproteine a densità molto bassa (Very Low Density Lipoprotein, VLDL) da parte del

fegato [Appel G, 1991]. Una ridotta clearance dei trigliceridi è dovuta invece ad una minore sintesi della lipoprotein lipasi (LPL) indotta da elevati livelli di paratormone e insulino resistenza [Cryer A, 1981]. Inoltre l'incompleto catabolismo delle lipoproteine ricche di trigliceridi fa sì che si accumulino particelle a elevato potere aterosclerotico, usualmente chiamate remnant [McNamara JR et al, 2001]. Gli elevati livelli di trigliceridi non sono sufficienti a spiegare il significativo aumento del rischio CV nel paziente con insufficienza renale cronica, meglio comprensibile quando si considerano le variazioni globali del profilo lipidico della MRC. La riduzione dei livelli plasmatici del colesterolo HDL, con conseguente aumento del rapporto LDL/HDL, è l'altra costante alterazione del profilo lipidico osservabile in questi pazienti. Un'alterazione meno frequente ma ugualmente riscontrata nei pazienti con MRC è un incremento di questa classe lipoproteica (HDL), infatti pare che questi pazienti non svolga le funzioni protettive antiaterosclerotiche che normalmente svolge, ma sembra che piuttosto si comporti come un marcatore di una fase infiammatoria cronica. Queste alterazioni quantitative e qualitative del colesterolo HDL, determinano una ridotta attività protettiva di queste lipoproteine, con conseguente azione pro-aterosclerotica [Van Lenten BJ et al, 2001]. Per quanto riguarda i livelli circolanti del colesterolo totale e del colesterolo LDL, usualmente poco modificati nei diversi stadi della patologia, deve essere ricordato che queste lipoproteine vanno incontro a importanti modificazioni qualitative, strutturali e di funzione. Si ha infatti in questi pazienti un aumento delle particelle di colesterolo LDL "piccole e dense" (sd LDL-c), delle particelle di colesterolo LDL ossidate e delle lipoproteine a densità intermedia (*Lipoproteine di Densità Intermedia*, IDL). Le lipoproteine così "modificate", presentano una maggiore affinità per i macrofagi e una volta che penetrano nella parete vascolare partecipano alla formazione delle cellule "schiumose" (*foamcells*), costituenti fondamentali nella

formazione della placca aterosclerotica. È stato riscontrato inoltre, che i pazienti con MRC presentano elevati livelli della lipoproteina (a) [Lp(a)], [Levine DM et al, 1995; Frischmann ME et al, 2007] fattore di rischio indipendente di aterosclerosi e di eventi ischemici coronarici [Kamstrup PR et al, 2013]. La Lp(a) presenta una omologia strutturale con il plasminogeno e le lipoproteine a bassa densità. Essa infatti, compete con il plasminogeno per il legame con la fibrina, inibendo la fibrinolisi e agisce di conseguenza come fattore pro trombotico [Cardiolink Anno XIV n. 3 Lug-Sett 2010]. L'aumento della [Lp(a)] nell'insufficienza renale è dovuta a una ridotta clearance della stessa [Wilson PW et al, 1998] e i valori più elevati si osservano nei pazienti in terapia dialitica peritoneale [Fried LF et al, 2003]. Inoltre [Lp (a)] è in grado di legarsi ai macrofagi attraverso un recettore altamente affine e specifico che promuove la generazione di cellule schiumose, elementi fondamentali nel processo di aterosclerosi, e la deposizione di colesterolo nelle placche aterosclerotiche.

In conclusione, la MRC si associa a un quadro dislipidemico proaterogeno e l'insieme delle alterazioni del quadro lipidico, contribuiscono, nelle varie fasi della malattia ad incrementare il rischio di morbilità e mortalità dovuta a cause cardiovascolari, oltre che accelerare la progressione del danno renale verso stadi di maggiore compromissione funzionale. Uno studio condotto su una coorte di 130000 pazienti anziani ha mostrato che la probabilità di incorrere in eventi CV risulta significativamente ridotta se i pazienti sono sottoposti ad un appropriato trattamento cardio-protettivo [Shlipark MG et al, 2002]. La riduzione del quadro dislipidemico garantita da un intervento terapeutico repentino, risulta essere la migliore strategia contro le complicanze cardiovascolari nei pazienti con MRC e come raccomandato dalle attuali linee guida del *National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* una terapia aggressiva con statine risulta essere l'intervento più efficace.

3.7 Le alterazioni del quadro ossidativo nella MRC

Lo stress ossidativo può essere considerato uno squilibrio nel rapporto tra produzione e degradazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

In condizioni normali i ROS, per lo più prodotti nei mitocondri in seguito al processo di respirazione mitocondriale, vengono inattivati in seguito all'azione antiossidante di differenti molecole che sono in grado di garantire un equilibrio redox intracellulare.

Tuttavia un'eccessiva produzione di ROS, o un'inefficiente protezione da parte delle specie antiossidanti, possono apportare degli effetti deleteri nell'organismo con rilevanti conseguenze fisiopatologiche. Per questo motivo l'aumento delle ROS è implicato in una moltitudine di patologie, inclusa la malattia renale [Dobashi K et al 2000] dove lo stress ossidativo contribuisce sia allo sviluppo che alla progressione della malattia renale. Uno degli effetti principali dello stress ossidativo è un decremento dell'attività biologica dell'ossido nitrico (NO) [Widlansky ME et al, 2003] che favorisce il processo di disfunzione endoteliale che sta alla base del processo aterosclerotico [Bonetti PO et al, 2003]. La patologia renale è infatti associata già nei primi mesi dell'insorgenza ad un incremento graduale dei biomarkers indicatori dello stato ossidativo. L'aumento dei ROS in questa classe di pazienti potrebbe essere una conseguenza sia di un aumentata produzione di ROS che di una difesa antiossidante compromessa. In ogni caso lo stress ossidativo che ne deriva può accelerare la progressione della lesione renale in quanto potrebbe essere uno dei fattori coinvolti nell'innescare l'infiammazione, responsabile della perdita funzionale dell'organo [Cachofeiro et al, 2008]. Infatti sono numerosi gli studi che hanno riportato una correlazione inversa tra alcuni marcatori dello stress ossidativo e il range di VFG [Dounousi E et al, 2006; Terawaki K et al, 2004].

Biomarcatori plasmatici, indicatori dello stress ossidativo come F₂ isoprostanoidi, aumentata ossidazione delle proteine, aumento della malondialdeide (MDA) [Agarwal R et al, 2004] e un aumento dei livelli di acido urico risultano incrementati in pazienti che appartengono ai diversi stadi della patologia renale compresi, i pazienti appartenenti al 5° stadio [Dounousi E et al, 2006] e in pazienti sottoposti a terapia dialitica prolungata [Ferretti G et al, 2008].

I pazienti con MRC presentano inoltre alti livelli di LDL ossidate [Westhuyzen J et al, 1997; Diepeveen SH et al, 2008] che possono favorire l'insorgenza o la progressione del processo aterosclerotico che caratterizza questa classe di pazienti. Inoltre la presenza di uno stato pro-ossidante associato a diabete mellito, dislipidemia, età avanzata [Diepeveen SH et al, 2008; Portaluppi F et al, 2004; Haffner SM, 2008], comunemente presenti nella popolazione con MRC, [Sarnak MJ et al, 2003] in aggiunta alla somministrazione intravenosa di ferro per correggere la condizione di anemia, può aggravare ulteriormente lo stato di stress ossidativo associato ad uremia. Al momento nonostante la moltitudine di dati presenti in letteratura che evidenziano una condizione di stress ossidativo in questa classe di pazienti, non sono del tutto chiari i meccanismi che li determinano.

4. LO STRESS OSSIDATIVO

4.1 Generalità sullo stress ossidativo

La prima definizione di stress ossidativo risale al 1985 ad opera di Sies H che lo descrive nella seguente maniera: una modificazione dell'equilibrio tra fattori pro- e anti-ossidanti in favore dei primi che può provocare un potenziale danno a cellule e tessuti di un organismo [Sies H et al, 1985; Sies H, 1991]. In realtà è difficile definire lo stress ossidativo ma in generale possiamo dire che con questo termine vengono indicate l'insieme di alterazioni che si producono nei tessuti, nelle cellule e nelle molecole biologiche quando queste sono esposte ad un eccesso di agenti ossidanti sia endogeni che esogeni. In tutti gli organismi aerobi esiste un delicato equilibrio, detto ossido-riduttivo, tra la produzione di sostanze ossidanti, tra cui le specie reattive dell'ossigeno, e il sistema di difesa antiossidante che ha il compito di prevenire e/o riparare l'eventuale danno prodotto. Tessuti diversi presentano differente suscettibilità allo stress ossidativo; ad esempio il sistema nervoso centrale è estremamente sensibile a questo tipo di danno per diverse ragioni che includono un basso livello di enzimi antiossidanti, un elevato contenuto di substrati ossidabili e una gran quantità di ROS prodotte durante le reazioni neurochimiche. Sebbene l'ossigeno sia indispensabile per la sopravvivenza degli organismi aerobi, esso data la sua natura bi-radicalica può generare molecole tossiche e altamente reattive come O^{2-} (anione superossido), H_2O_2 (perossido di idrogeno) e OH^{\cdot} (radicale ossidrilico) maggiormente reattive rispetto all'ossigeno molecolare [Pardini RS, 1995; Murrant CL et al, 2001] in quanto presentano un elettrone spaiato altamente reattivo nell'orbitale di valenza, che può danneggiare le molecole adiacenti sequestrando o donando un elettrone. L'aumentata produzione di ROS può essere dovuta a cause esogene o endogene [Bombiani GD et al, 1990]. Le prime comprendono agenti fisici (radiazioni ionizzanti, raggi UV) chimici (alcol, farmaci, xenobiotici) e

biologici (virus e batteri) [Caporaso N, 2003; Cooke MS et al, 2003]. Le cause endogene invece sono da attribuire ad una iper stimolazione dei sistemi enzimatici associati alla generazione di molecole ossidanti come la NADPH ossidasi della membrana plasmatica o della catena di trasporto degli elettroni, del citocromo P-450 microsomiale, della xantina ossidasi ecc. [Bordeaux JL, 2006]. Tuttavia nel nostro organismo vengono normalmente generate in seguito all'attività cellulare ROS e RNS (Specie Reattive dell'Azoto) che sono essenziali per la vita e giocano un ruolo rilevante nell'economia dell'intero organismo. Infatti, alcune di esse sono coinvolte in diverse funzioni biologiche come il rilassamento della muscolatura liscia, la peristalsi, l'aggregazione piastrinica, la modulazione della pressione sanguigna [Ignarro LJ, 1998], il controllo del sistema immunitario, [Moncada S et al, 1991; Azzi A et al, 2004; Delattre J 2006]. Di conseguenza in un normale ambiente cellulare i ROS sono essenziali per la vita, ma nel caso di produzione eccessiva o esaurimento, la situazione potrebbe diventare deleteria. Nel caso in cui in determinati distretti dell'organismo si abbia un' eccessiva produzione di ROS, data la loro capacità ossidante, possono attaccare e danneggiare molecole endogene, quali lipidi, glicidi, acidi nucleici e proteine, con conseguenti lesioni dapprima circoscritte e poi via via più diffuse, fino ad un coinvolgimento sistemico [Cornelli U et al, 2000]. Si parla in tali casi, di stress ossidativo o ossidante, un fattore emergente di rischio per la salute [Siciliano G et al, 2007]. Il risultato delle reazioni ossidative da parte dei ROS comporta la produzione di una serie di prodotti o sottoprodotti molecolari, che presentano una rilevante importanza clinica in quanto risultano essere dei buoni indicatori dello stato ossidativo di un paziente. È ampiamente documentato che lo stress ossidativo gioca un ruolo rilevante non solo nell'accelerare il fisiologico processo dell'invecchiamento [Halliwell B et al, 2004] ma partecipa anche alla patogenesi e al mantenimento di numerose malattie

infiammatorie e/o degenerative come ad esempio l'aterosclerosi, ipertensione, artrite reumatoide, insufficienza renale cronica il morbo di Parkinson, la malattia di Alzheimer, il diabete mellito, l'obesità le dislipidemie e persino alcune forme di cancro [Irani K, 2000; Babior BM, 2000; Halliwell B et al, 1990; Dalle-Donne I et al, 2006]. In campo scientifico, la ricerca di nuove strategie sperimentali e di strumenti sensibili e specifici che possano fornire delucidazioni su meccanismi d'azione ed effetti dei ROS è in continua evoluzione. Tuttavia rilevare le specie reattive dell'ossigeno risulta essere difficile in quanto queste molecole presentano un'emivita molto breve e la varietà di antiossidanti presenti in vivo in grado di catturare e inattivare le specie reattive è elevatissima. È pertanto indispensabile elaborare delle metodologie che sono in grado di superare questi ostacoli.

4.2 La valutazione dello stato ossidativo

Purtroppo lo stress ossidativo non è una “malattia” nel senso convenzionale del termine, ma una condizione patologica “trasversale” comune a molte malattie che si genera per effetto della rottura dell'equilibrio biochimico. Per questo motivo, al contrario di qualsiasi altra condizione morbosa nota, esso non esibisce una vera e propria sintomatologia, non dà luogo a un quadro clinico peculiare, ma si nasconde in qualche modo tra i segni della malattia di base e, quindi, può essere diagnosticato solo se il clinico, a conoscenza di questa problematica, invita il paziente a sottoporsi a specifiche analisi di laboratorio [Iorio EL et al, 2006]. Purtroppo ancora oggi, nel contesto medico, alla valutazione dello stato ossidativo di un paziente non viene data un'importanza clinica considerevole dato il ruolo trasversale e interdisciplinare che svolge nel contesto di numerose patologie. Nell'ambito di una buona anamnesi, sarebbe corretto effettuare

un esame clinico più accurato capace di dare indicazioni rispetto allo stato pro-ossidante e antiossidante del paziente, in modo da consentire al clinico un immediato inquadramento del problema, evitando così al paziente una serie di conseguenze che comprometterebbero la durata e/o la qualità della vita a breve e medio termine. Mentre è ormai acquisito che un farmaco ipolipemizzante va assunto solo in seguito alla valutazione di un test clinico che documenta una condizione di ipercolesterolemia, la tendenza all'uso di antiossidanti è diffusa anche quando non necessaria senza tener conto dei possibili effetti indesiderati legati ad un eventuale eccesso di antiossidanti. Sarebbe quindi opportuno, eseguire come buona prassi la valutazione dello stato ossidativo di un paziente.

Quando non è possibile una valutazione diretta delle specie radicaliche, si devono applicare dei metodi indiretti, spesso indicati come “finger printing”. Secondo questo approccio si valutano qualitativamente e quantitativamente (nei tessuti e/o nei liquidi extracellulari) la presenza di specie molecolari che avendo subito un attacco da parte dei radicali liberi, risultano modificate [Karlsson J, 1997]. Infatti appare ormai chiaro che se la quantità di ROS è talmente elevata da superare la capacità difensiva dei sistemi antiossidanti, queste possono danneggiare qualsiasi componente biochimico delle cellule, quali lipidi, amminoacidi, proteine, nucleotidi ecc, generando così, da queste, sotto-prodotti (per)ossidati [Therond P, 2006]. Questi ultimi costituiscono i “finger printing”, cioè i testimoni dell'avvenuto stress ossidativo, identificabili e quantificabili che vengono così considerati biomarcatori dello stato ossidante di un paziente [Karlsson J, 1997]. A questo proposito, tra le varie biomolecole rilevabili, la valutazione dei livelli plasmatici di malondialdeide (MDA) e del rapporto allantoina/acido urico (All/UA), la valutazione dei tioli plasmatici sia allo stato ossidato che ridotto, sono stati proposti come marcatori importanti per il monitoraggio dell'ossidazione in vivo innescata

dall'azione dei radicali liberi. In ogni caso nella valutazione dello stato ossidativo globale di un paziente, sarebbe opportuno tener conto sia della componente pro-ossidante che di quella antiossidante. Pertanto bisognerebbe effettuare almeno due test differenti, uno in grado di misurare il livello di produzione dei radicali liberi, e l'altro atto a determinare la capacità o potenzialità antiossidante dell'individuo. Nell'ambito della valutazione dello stato ossidante globale di un individuo, oltre che la valutazione di molecole antiossidanti presenti in circolo, una tecnica rapida riproducibile, poco invasiva e indicativa di un'alterazione del bilancio ossidativo è rappresentata dalla TAEC (Total Antioxidant Capacity Equivalent).

4.2.1 La malondialdeide (MDA)

La Malondialdeide (MDA), con formula chimica $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$ è il principale prodotto della perossidazione degli acidi grassi polinsaturi, si può inoltre originare sia dall'attacco dei radicali liberi al deossiribosio e all'acido sialico [Halliwell B, et al 2004] sia in seguito a processi enzimatici coinvolti nella sintesi delle prostaglandine [Del Rio D et al, 2005]. La MDA si trova nel plasma umano a concentrazioni dell'ordine di 1 μM e nelle urine in concentrazioni di 0 - 3 μM (0 - 0.2 ppm) [Glagau H et al, 1994].

I lipidi, per la diffusa presenza di doppi legami intermolecolari, costituiscono un facile bersaglio per i radicali liberi, infatti sia attraverso l'inversione isomerica che la perossidazione generano una serie di sottoprodotti molecolari di cui uno dei principali è la MDA [Therond P et al, 2006; Miyamoto S et al, 2007; Ferreri C et al, 2005]. La misurazione diretta della produzione di radicali liberi risulta assai difficoltosa, pertanto valutare i livelli di malondialdeide, il "testimone dell'avvenuta ossidazione degli acidi

grassi polinsaturi, rappresenta una tecnica comunemente utilizzata per valutare lo stato ossidativo di un paziente [Moore K et al, 1998; Del Rio D et al, 2005].

La suscettibilità degli acidi grassi poliinsaturi all'attacco radicalico è particolarmente evidente oltre che nella distruzione delle membrane biologiche anche nella formazione di lipoproteine ossidate, con la produzione di perossidi lipidici e dei loro sottoprodotti come le aldeidi. Oltre alla malonildialdeide (MDA) un ulteriore sottoprodotto 4-idrossi-2-alchenale è il 4-idrossi-2-nonenale (4-HNE), che insieme alla MDA rappresentano i maggiori prodotti terminali derivanti dalla rottura degli acidi grassi e dei relativi esteri [Uchida K, 2000].

L'azione ossidativa a carico dei lipidi procede con un meccanismo radicalico a catena definito lipoperossidazione. I radicali liberi che si formano in seguito alle reazioni di ossidazione cellulare sono in grado di attivare il processo di perossidazione lipidica che si sviluppa attraverso tre fasi consequenziali (fig 1):

- iniziazione
- propagazione
- terminazione

Le conseguenze delle reazioni di perossidazione variano a seconda della frazione lipidica coinvolta. Nel caso in cui i lipidi coinvolti siano quelli della membrana plasmatica si avranno delle alterazioni strutturali (perdita della fluidità e permeabilità della membrana) e funzionali (perdita delle funzioni enzimatiche) che sconvolgono l'intero metabolismo cellulare [Vance DE et al, 2002]. Nella prima fase del processo, un radicale ossidrilico sottrae ioni H^+ dalla catena idrocarburica dell'acido grasso (da un gruppo metilenico bis-allilico di un acido grasso polinsaturo), in genere la reazione

avviene a carico di un diene coniugato, cioè un atomo di carbonio posto tra due doppi legami. Il radicale lipidico ($L\bullet$) riarrangia immediatamente a diene coniugato che reagisce con l'ossigeno molecolare formando perossilradicali in posizione +2 e -2 rispetto al carbonio da cui è stato estratto inizialmente l'idrogeno. Questo prodotto ($LOO\bullet$) è altamente reattivo e può ciclizzare e formare un lipoperossido ciclico, da substrati quali l'acido arachidonico ed eicosapentaenoico. Il prodotto ciclico così ottenuto può successivamente frammentarsi e dar luogo a catene alifatiche, contenenti due gruppi carbonilici, formando composti come la malondialdeide (MDA), e il 4-idrossinonenale (HNE). La stabilità e l'elevata reattività dei prodotti che ne derivano sono caratteristiche che rendono queste molecole dannose verso altri costituenti presenti all'interno e all'esterno della cellula, come gli acidi nucleici e le proteine, causando alterazione della funzionalità cellulare [Del Rio D et al, 2005]. La MDA infatti a causa della sua elevata reattività è causa di citotossicità nelle cellule in quanto è in grado di reagire con la deossiadenosina e deossiguanina nel DNA, formando composti mutageni, precursori di carcinogenesi [Marnett LJ, 1999]. Queste possono reagire con gruppi amminici liberi di proteine, fosfolipidi o acidi nucleici formando legami covalenti stabili, tipo basi di Schiff, che inducono alterazioni strutturali di tali molecole biologiche. I legami crociati proteina-MDA-fosfolipide, proteina-MDA-proteina o fosfolipide-MDA-fosfolipide causano infatti diminuzione del grado di libertà e della possibilità di movimento delle molecole stesse, che comportano come ultimo effetto la perdita di fluidità della membrana. Una volta terminato tutto l'ossigeno a disposizione o quando intervengono sostanze antiossidanti che possono donare un atomo di idrogeno o un elettrone, ha luogo la fase di terminazione del processo di lipoperossidazione, dove i radicali formati reagiscono per dare prodotti finali non radicalici inattivi.

La tossicità della MDA coinvolge anche il sistema cardiovascolare, in particolar modo è implicata nei processi di aterogenesi e nell'irrigidimento del tessuto cardiaco e della parete dei vasi, data la sua interazione con le fibre di collagene [Palinski W et al, 1994; Slatter DA et al, 2000]. La MDA è infatti in grado di interagire con i residui di lisina, cisteina e istidina presenti nelle proteine [Esterbauer H et al, 1991; Friguet B et al, 1994] inducendo gravi alterazioni strutturali e funzionali nelle proteine. La MDA inoltre è in grado di apportare modificazioni ossidative delle lipoproteine a bassa densità (LDL) e questo gioca un ruolo fondamentale nell'aterogenesi [Tribble DL, 1999]. È stato dimostrato in vitro che le specie reattive dell'ossigeno prodotte dalle cellule muscolari lisce e dai macrofagi, possono determinare l'idroperossidazione degli acidi grassi polinsaturi dei fosfolipidi presenti nelle LDL. I lipoidroperossidi così prodotti si decompongono determinando la formazione di una varietà di sottoprodotti tossici, tra cui alcune aldeidi, come la MDA, capaci di reagire con i gruppi ϵ -amminici dei residui di lisina presenti nella catena proteica dell'apo B delle LDL, trasformandole in LDL ossidate (oxLDL) [Kumskova et al, 2012].

4.2.2 Il rapporto Allantoina acido urico (All/UA)

L'acido urico o 2,6,8-trihydroxypurine è un composto chimico organico di origine naturale che presenta delle caratteristiche fortemente acide. Appartiene alla famiglia delle triossipurine ed è formato da un anello pirimidinico (α) condensato con un anello imidazolico (β) (fig 2). È il principale prodotto del catabolismo delle purine derivanti dagli acidi nucleici, nucleoproteine e ATP [Johnson RJ et al, 2008]. La produzione dell'acido urico avviene sotto il controllo catalitico della xantina ossidasi che risulta essere l'enzima limitante nella reazione di ossidazione a due step che catalizza la

conversione di ipoxantina in xantina e successivamente ad acido urico (Fig.3). Nella maggior parte dei mammiferi, l'AU viene ulteriormente ossidato ad allantoina ad opera di un enzima epatico, la urato ossidasi (uricasi), ma gli esseri umani ed altri primati superiori hanno perso durante l'evoluzione la via metabolica relativa all'ossidazione [Johnson RJ et al, 2008]. Pare che nell'uomo una mutazione genetica, abbia silenziato il gene implicato nella produzione dell'urato ossidasi, implicato nella conversione dell'acido urico ad allantoina [Nishikimi M et al, 1994]. Diverse studi di paleontologia genetica suggeriscono che la perdita dell'uricasi nell'uomo sia stato un processo graduale iniziato già nel miocene medio [Wu W et al, 1992] (periodo compreso tra 10 e 20 milioni di anni fa), che ha determinato una progressiva perdita dell'attività del gene, seguita da silenziamento totale del gene [Oda M et al, 2002] rappresentando un vantaggio per i mammiferi vegetariani con propensione per la posizione eretta. L'assenza dell'enzima capace di ossidare l'acido urico ad allantoina nell'uomo, fa sì che la quota di allantoina misurabile nel plasma di un individuo derivi da reazioni di ossidazione non enzimatiche mediata da radicali liberi, infatti negli esseri umani le concentrazioni plasmatiche del rapporto All/AU aumentano durante lo stress ossidativo. Per questo motivo la valutazione del rapporto All/AU viene utilizzato negli esseri umani come un marcatore stabile di attività dei radicali liberi in vivo.

4.2.4 I tioli plasmatici e la valutazione dello stato redox

I tioli plasmatici a basso peso molecolare, principalmente rappresentati dal glutatione (GSH) e cisteina (Cys), sono un interessante famiglia di composti che svolgono una moltitudine di funzioni all'interno dell'organismo. Esistono altri tioli a livello plasmatico come l'omocisteina (Hcy), la cisteinilglicina (Cysgly), e la glutamilcisteina

(Glucys), che rappresentano dei componenti cellulari fondamentali e giocano diversi ruoli importanti nel metabolismo e nell'omeostasi cellulare. I gruppi tiolici data l'elevata reattività del gruppo sulfidrilico costituiscono un'importante sistema di difesa antiossidante extracellulare oltre che garantire un'equilibrio redox intracellulare

È noto che elevati livelli di omocisteina e cisteina plasmatica sono associati allo sviluppo di patologie cardiovascolari [Ozkan Y et al, 2002; Nygard O et al, 1997] e nei fenomeni dell'invecchiamento [Shimizu, H et al, 2004; Droge W, 2002]. Elevati livelli plasmatici di omocisteina e cisteina risultano essere un fattore di rischio indipendente per le patologie cardiovascolari [Fowler B, 2005]. Omocisteina e cisteina promuovono l'aterogenesi attivando l'endotelio, promuovendo la proliferazione delle cellule muscolari lisce e alterando in generale l'omeostasi vasale [Hajjar K A, 2001; Lentz SR et al, 1996]. Tuttavia il meccanismo mediante il quale operano la Cys e l'Hcy nel favorire la disfunzione endoteliale non è noto. Alcuni studi suggeriscono che sia la forma ridotta dell'omocisteina a promuovere il danno endoteliale [Starkebaum G et al, 1986; Chambers J C et al, 2001] in quanto in seguito a reazione con l'ossido nitrico (NO) viene trasformata e forma nitrooomocisteina, una molecola molto stabile che potrebbe far diminuire la bio attività del NO con tutte le conseguenze che esso comporta [Stamler JS et al, 1993]. Altri autori quali Sengupta et al, propongono che la forma dannosa dell'omocisteina sia quella legata alle proteine in quanto queste potrebbero essere internalizzate dalle cellule endoteliali via trans citosi e, una volta degradate a livello lisosomiale e rilasciate nel citosol, a causa del potenziale redox intracellulare, potrebbero alterare o modificare le proteine intracellulari causando la disfunzione endoteliale [Sengupta S et al, 2001]. Dall'altro lato molecole come il GSH e la Cysgly hanno funzioni antiossidanti e proprietà antiaterogeniche [Kugiyama K et al, 1998; Lapenna D et al, 1998] data la presenza nella struttura molecolare di gruppi sulfidrilici

(-SH) liberi ai quali viene riconosciuta un'azione "scavenger" diretta nei confronti delle specie ossidanti circolanti. Nel nostro organismo si trovano principalmente in tre forme distinte, ciascuna presente in percentuale differente. La forma più abbondante è la quota di tioli legata alle proteine, segue una piccola frazione di tioli ossidati liberi nel plasma e una ridottissima percentuale di tioli ridotti plasmatici. La percentuale delle tre differenti frazioni è variabile in quanto i differenti tioli interagiscono attraverso reazioni redox scambiando i gruppi -SH e generando un sistema dinamico detto stato redox dei tioli. I tioli hanno quindi una funzione intracellulare critica come tampone redox e sono inoltre sempre più riconosciuti come componenti di un sistema extracellulare di difesa antiossidante. La valutazione quantitativa della frazione dei tioli ridotti rispetto ai tioli totali (determinazione dello stato redox dei tioli), risulta essere un buon indicatore dello stato ossidativo di un paziente. Una modificazione dei livelli fisiologici dello stato redox dei tioli è spesso causa di gravi patologie in quanto induce uno squilibrio intra ed extracellulare del rapporto antiossidanti/ossidanti a livello intra ed extracellulare, che è la causa di una maggiore fragilità della cellula e delle varie strutture biologiche [Julius M et al, 1994; Roberts JC et al, 1987]. Di conseguenza la loro misurazione a livello plasmatico, in molti casi può risultare un valido aiuto sia per valutare la potenzialità antiossidante e antiradicalica dell'organismo sia per individuare una possibile condizione di stress ossidativo, ma anche per verificare la presenza di fattori di rischio per malattie vascolari e cardiovascolari.

4.3 Gli antiossidanti

Gli antiossidanti sono enzimi o molecole di differente complessità in grado di contrastare l'azione lesiva dei radicali liberi, e di esercitare pertanto un'azione protettiva

sull'integrità cellulare. Si distinguono in primari, o preventivi, la cui funzione è quella di impedire o ritardare l'ossidazione tramite rimozione o inibizione dell'agente ossidante, e secondari, la cui funzione è di interrompere l'ossidazione una volta iniziata. Gli antiossidanti possono essere classificati secondo diversi criteri, sulla base dell'origine in endogeni e esogeni, sulla base della struttura chimica in enzimatici e non enzimatici e sulla base della solubilità in liposolubili e idrosolubili.

I requisiti fondamentali di un antiossidante sono: 1) elevata affinità di reazione con l'agente ossidante; 2) la capacità di trasformarsi, in seguito a reazione con le specie ossidanti, in prodotti non radicalici o in prodotti a emivita più lunga che presentano una minore carica ossidante. Generalmente un antiossidante svolge la sua azione in sinergia con altre sostanze antiossidanti. Uno dei meccanismi mediante il quale attuano la loro attività antiossidante consiste nel catturare l'elettrone spaiato ad alta energia della specie radicalica ossidante, trasformandosi essi stessi in un radicale, ma con minore forza ossidante. Possono poi trasferire l'elettrone a un'altra molecola e trasformarsi in un radicale sempre meno reattivo fino allo 'spegnimento' completo, o quenching, della carica radicalica. Sulla base del loro meccanismo d'azione prevalente, risulta molto utile sotto il profilo fisiopatologico, suddividere gli antiossidanti in tre gruppi principali; preventivi, scavenger e di riparo.

In particolare gli **antiossidanti preventivi** sono agenti che attraverso vari meccanismi quali la chelazione di metalli di transizione (transferrina, latto ferrina, aptoglobina, emopossina, ceruloplasmina) il quenching delle ROS (carotenoidi e superossido dismutasi) o l'inattivazione dei perossidi (catalasi e perossidasi) impediscono a monte la perossidazione delle specie chimiche reattive. In questo modo le specie chimiche radicaliche a catena non vengono proprio innescate.

Gli **scavenger** e i **chain breaker**, funzionalmente assimilabili tra loro, sono sostanze chimicamente eterogenee, alcune idrosolubili e altre liposolubili, generalmente a basso peso molecolare e costituiscono la prima linea di difesa estremamente specifica costituita dagli enzimi superossido dismutasi, catalasi, e perossidasi. Una seconda barriera di difesa più specifica, ma non per questo poco efficiente.

Più esattamente gli **scavenger** sono agenti che riducono la concentrazione dei radicali liberi rimuovendoli dal mezzo in cui si trovano, grazie alla loro capacità di interagire direttamente con essi e quindi inattivandoli. Essi comprendono l'ubichinone, composti tiolici, albumina, bilirubina e acido urico.

I **chain breaker** sono invece agenti in grado di bloccare la propagazione delle reazioni radicaliche a catena. Tra questi sono da citare i carotenoidi, tocoferoli e ascorbato. Nel complesso la linea costituita dagli scavenger e chain breaker è in grado di bloccare l'inizio o impedire la propagazione di reazioni radicaliche a catena.

Gli **agenti di riparo** invece, comprendono esclusivamente enzimi che intervengono dopo che il danno di specie reattive si è instaurato. La loro azione, spesso sequenziale, prevede in un primo momento l'identificazione del segmento molecolare ossidato, poi la separazione del segmento ormai inutilizzabile e infine la sintesi e l'inserimento di un nuovo segmento, in sostituzione di quello danneggiato. Appartengono agli agenti di riparo le idrolasi (glicosidasi, lipasi, proteasi), le transferasi, le polimerasi ecc, tutte indispensabili per la riparazione del danno da radicali liberi di importanti molecole biologiche o strutture molecolari (DNA, membrane, proteine ecc). Ovviamente quando queste attività idrolitiche superano la capacità di riparazione, esse si traducono in un ulteriore danno tissutale. Bisogna tener conto che un antiossidante può agire a secondo delle condizioni e/o necessità anche con più di un meccanismo fin ora descritto. Per

esempio, l'albumina è un antiossidante preventivo in quanto la capacità di chelare il rame, il metallo di transizione che catalizza la generazione di radicali alcossilici e perossilici, ma è anche uno scavenger in virtù della sua capacità di donare specificatamente equivalenti riducenti a specie radicaliche, annullandone la potenziale lesività. Analogamente i carotenoidi agiscono sia da antiossidanti preventivi in quanto quercer nei confronti del così detto "ossigeno singoletto" sia da scavenger nei confronti delle varie specie radicaliche.

Il sistema di difesa antiossidante è regolarmente distribuito nell'organismo sia a livello extracellulare che a livello intracellulare. A livello dei liquidi extracellulari, e in particolare nel plasma barriera antiossidante è costituita da un insieme di molecole come l'albumina, la bilirubina, l'acido urico, il colesterolo HDL e vari antiossidanti esogeni introdotti con l'alimentazione o sotto forma di integratori dietetici (ascorbato, tocoferolo, polifenoli ecc.). Un ruolo di particolare importanza è svolto dai gruppi tiolici -SH [Munday R, 1989; Deneke SM, 2000] che essendo caratterizzati dalla presenza di gruppo sulfidrilico altamente reattivo rappresentano un efficace sistema di difesa antiossidante extracellulare. All'interno delle cellule il sistema di difesa antiossidante ha una precisa compartimentalizzazione. È importante sottolineare che gli antiossidanti di tipo enzimatico sono presenti prevalentemente a livello intracellulare, mentre gli altri prevalgono a livello extracellulare. Qui gli agenti liposolubili (es tocoferoli) entrano nella compagine delle membrane e costituiscono la prima linea di difesa contro l'attacco di radicali liberi, mentre quelli idrosolubili (es ascorbato) intervengono soprattutto nel contesto della matrice solubile del citoplasma e degli organuli cellulari.

4.3.1 Misura del potere antiossidante totale (TAEC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

A livello ematico, la difesa nei confronti delle specie ossidanti sia di natura endogena che esogena, e in particolar modo dei radicali liberi, è garantita dalla cosiddetta barriera antiossidante plasmatica. Ne fanno parte sostanze sia di natura esogena (es. ascorbato, tocoferoli, carotenoidi, biflavonoidi ecc) che endogene (es. proteine, bilirubina, acido urico, colesterolo HDL, GSH ecc) [Prior RL et al, 1999].

Ciascuna di queste sostanze possiede un proprio potere o capacità antiossidante, cioè è in grado di opporsi più o meno efficacemente in funzione del proprio potenziale di ossido-riduzione all'azione ossidante delle specie reattive [Bombiani GD et al, 1990].

Tale potere è legato alla capacità dei componenti della barriera antiossidante plasmatica di cedere “equivalenti riducenti” ossia elettroni o atomi di idrogeno alle specie reattive dell'ossigeno, evitando che queste li sottraggano a componenti biochimici essenziali, e prevenendo, in questo modo, l'innescare di pericolose reazioni a catena che potrebbero generare prodotti tossici o dannosi per la cellula [Delattre J, 2006].

I metodi per la valutazione globale dello stato antiossidante si basano sul principio che la riduzione della concentrazione/attività di uno o più componenti biochimici preposti alla neutralizzazione dei ROS in un determinato sistema biologico, è indicativo di un alterazione del bilancio ossidativo determinato da una riduzione delle difese antiossidanti. La valutazione della capacità antiossidante totale del plasma permette quindi di valutare contemporaneamente l'attività cumulativa di più molecole antiossidanti [Huang D et al, 2005; Yeum KJ et al, 2004], offrendo il vantaggio di poter valutare la suscettibilità a variazioni in seguito ad un trattamento antiossidante.

Con il metodo della TAEC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) è possibile misurare la capacità antiossidante del plasma mediante un metodo indiretto, cioè basandosi sulla capacità del campione di inibire l'azione ossidante esercitata nei propri confronti da un sistema generatore di specie ossidanti presente nella soluzione di reazione [Prior RL et al, 1999; Yeum KJ et al, 2004]. Il potere antiossidante del campione testato viene espresso per confronto ai valori misurati per una quantità nota di una molecola antiossidante scelta come sostanza di riferimento (usando l'acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico, TEAC). Alla capacità antiossidante del campione testato concorrono in ordine decrescente, l'albumina (43%), l'acido urico (33%), l'ascorbato (9%), l' α -tocoferolo (3%), la bilirubina (2%) ed una serie di agenti/attività non ancora identificate (10%) [Habdous M et al, 2003]. La maggior parte degli studi presenti in letteratura non riscontrano un'associazione inversa tra una riduzione della capacità anti ossidasica totale plasmatica e un aumento dello stress ossidativo nei pazienti con MRC appartenenti agli ultimi stadi della patologia [Rossi M et al, 2014; Karamouzis I et al, 2008]. Questo può essere dovuto al fatto che la TAEC è una misura cumulativa e aspecifica influenzata da una vasta gamma di specie ossidanti incluse la radiazione e l'inquinamento [Ghiselli A et al, 2000].

4.3.2 La taurina

La taurina è un amminoacido essenziale che si differenzia dagli altri amminoacidi presenti nelle proteine per la presenza di un gruppo solfonico al posto del tradizionale gruppo carbossilico (fig 4). È presente nel cuore, retina, tessuto osseo, cervello e neutrofili [Lubec B et al, 1997; Son HY et al, 2007]. Nell'uomo è uno dei più abbondanti costituenti organici a basso peso molecolare tanto che si ritiene che in un uomo di 70 kg

siano contenuti sino a 70 g di taurina. Nell'organismo, oltre che svolgere la sua ormai nota attività antiossidante, svolge altre importantissime funzioni tra cui quella di neurotrasmettitore, stabilizzatore di membrana, modulatore del calcio intracellulare e regola la fosforilazione delle proteine [Park SH et al, 2006; Lubec B et al, 1997; Yeon JA et al, 2010]. Svolge inoltre un ruolo fondamentale nella sintesi degli acidi biliari facilitando l'eliminazione del colesterolo. Il ruolo che questa molecola ha dal punto di vista biochimico e nutrizionale è stato conosciuto solo in questi ultimi tempi. La taurina è stata definita un nutriente funzionale che potrebbe proteggere da eventi cardiovascolari e da diabete mellito. Infatti i cambiamenti dei livelli plasmatici di taurina nei fluidi biologici e nei tessuti, hanno uno stretto rapporto con l'insorgenza di differenti malattie e pare che un incremento dei livelli di taurina sia inversamente correlato con l'insorgenza di patologie coronariche [Yamori Y et al, 1996], con il morbo di Alzheimer, cancro, epilessia, degenerazione retinica, ritardo della crescita e diabete mellito [Stephen W et al, 2008]. Essa è stata utilizzata in molti studi clinici per curare varie condizioni patologiche come l'ipertensione [Fujita T et al, 1987], il diabete [Franconi F et al, 1995] e l'insufficienza cardiaca [Azuma J et al, 1983].

Una maggiore assunzione di taurina è inversamente proporzionale all'incidenza di malattie coronariche [Yamori Y et al, 1996] ed è stata inoltre associata ad una ridotta resistenza all'insulina [Nandhini AT et al, 2005] considerando che una carenza di taurina è associata ad un' aumentata obesità [Tsuboyama-Kasaoka N et al, 2006].

4.3.2.1 Metabolismo della taurina: biosintesi della taurina e dei suoi derivati

La via metabolica primaria relativa alla sintesi della taurina, negli adulti avviene per lo più nel fegato a partire da un aminoacido essenziale contenente zolfo, la metionina.

La sua sintesi può avvenire anche a partire dalla cisteina ma, in entrambi i casi le reazioni, per poter avvenire, necessitano della presenza di vitamina B6. I neonati invece non essendo in grado di sintetizzare la taurina, assumono la stessa dal latte materno.

La taurina è considerato un metabolita a lento ricambio ma pare che la sua sintesi possa essere significativamente modificata nel corso dello sviluppo [Akahori S et al,1986].

Il ciclo metabolico relativo alla sua sintesi coinvolge numerose molecole contenenti zolfo e differenti reazioni di metilazione, decarbossilazione e ossidazione (fig. 5).

In questa via metabolica la metionina viene inizialmente demetilata a dare omocisteina e serina. La conversione della cisteina a taurina può seguire due vie differenti. In una di queste la cisteina è convertita in acido cisteinsulfonico, che viene successivamente convertito ad acido cisteico in seguito ad una reazione di decarbossilazione acido cisteico dipendente e infine trasformato in taurina. Nell'altra via metabolica relativa alla sua sintesi, l'acido cisteinsulfonico viene convertito a ipotaurina e taurina ma il meccanismo di regolazione e gli enzimi coinvolti nella reazione non sono tuttora ben chiari [Fellman JH et al,1985].

Una delle funzioni fisiologiche della taurina è quella di partecipare alla formazione degli acidi biliari che insieme ai loro coniugati e ai rispettivi sali sono i principali costituenti della bile. La principale funzione degli acidi biliari è quella di facilitare la digestione e l'assorbimento dei lipidi, in quanto data la loro struttura, sono in grado di disperdere in soluzione acquosa sostanze lipidiche non solubili in acqua. Gli acidi biliari prodotti nel fegato rappresentano la principale via di eliminazione del colesterolo in quanto rappresentano il prodotto terminale del catabolismo del colesterolo. Questa via d'eliminazione del colesterolo risulta essere la principale via catabolica nei mammiferi e sebbene molti degli enzimi coinvolti nella sintesi degli acidi biliari siano attivi in molte cellule differenti, il fegato è il solo organo dove avviene la biosintesi. La reazione di

sintesi richiede 17 enzimi ed avviene in diversi compartimenti cellulari quali il citosol, il reticolo endoplasmatico (ER), i mitocondri e i perossisomi. Molti dei metaboliti intermedi risultano essere citotossici per l'organismo, è perciò comprensibile che la sintesi degli acidi biliari sia efficientemente controllata anche in maniera tale da assicurare che la quota neosintetizzata non venga prodotta in eccesso ma sia in linea con il cambiamento delle condizioni metaboliche.

Nella bile umana si trovano due tipi di acidi biliari detti primari che sono presenti nelle rispettive percentuali:

- 1) l'acido colico (acido 3 α , 7 α , 12 α triidrossicolanico) (31%)
- 2) l'acido chenodesossicolico (acido 3 α , 7 α diidrossicolanico) (45%)

Oltre agli acidi biliari primari, nella bile si trovano anche gli acidi biliari secondari come l'acido desossicolico e l'acido litocolico, prodotti rispettivamente dall'acido colico e chenodesossicolico ad opera della flora batterica intestinale (Fig.6).

Questi acidi sono presenti principalmente come coniugati con gli aminoacidi glicina e taurina (con un rapporto di circa 3:1) che si legano al gruppo carbossilico mediante un legame amminico. In seguito al legame con taurina e glicina si vengono a formare i rispettivi sali biliari taurochenodesossicolato di sodio e taurocolato di sodio. Tale coniugazione aumenta l'idrosolubilità degli acidi biliari. È lecito pensare che, dato il ruolo rilevante che la taurina svolge nel nostro organismo, le sue concentrazioni in circolo debbano essere compresi in un range di normalità.

4.3.2.2 Ruolo antiossidante della taurina

In numerose patologie una riduzione dei livelli di taurina pare possa contribuire a favorire il danno ossidativo. La taurina svolge ruolo antiossidante nel nostro organismo e sono numerosi gli studi che hanno messo in evidenza la capacità della stessa di interagire e inattivare una serie di molecole proossidanti che potrebbero causare dei danni alle cellule [Huxtable et al, 1992], È stato riscontrato che la taurina diminuisce nel plasma dei pazienti sottoposti a emodialisi [Suliman M E et al, 1996]. È noto inoltre che la taurina, a livello del reticolo endoplasmatico delle cellule endoteliali è in grado di ridurre lo stress ossidativo causato da molecole di omocisteina [Nowata H et al, 2001] fatto di notevole importanza in quanto l'omocisteina plasmatica è una molecola proaterogena poiché è in grado di ridurre, a livello delle cellule endoteliali, l'espressione e la secrezione di enzimi antiossidanti come la superossido dismutasi (SOD). È stato riscontrato che i pazienti emodializzati con danno renale conclamato mostrano elevati livelli di omocisteina plasmatica [Nowata H et al, 2001] presentando quindi una serie di cambiamenti proaterogenici, e una diminuzione dei livelli di taurina potrebbe aumentare negli stessi il potere aterogeno dell'omocisteina. Resta pertanto da dimostrare un effetto benefico della taurina, se somministrata a pazienti in emodialisi con problemi aterosclerotici. Numerosi studi hanno dimostrato che la taurina ha la capacità di proteggere le cellule dal danno ossidativo indotto da diverse molecole, pertanto la sua azione antiossidante potrebbe essere aggiunta all'elenco delle sue varie funzioni, anche se è necessario chiarire il meccanismo d'azione con il quale questa molecola attua la sua attività antiossidante. Degli studi recenti hanno messo in evidenza che la taurina ha un ruolo protettivo nei confronti dell'organismo in quanto è in grado di regolare la produzione di ROS a livello della catena di trasporto mitocondriale. Il meccanismo mediante il quale questa molecola agisce non è ancora chiaro anche se numerosi studi

suggeriscono che il potere antiossidante della taurina consiste nell'inibire la produzione di ROS a livello mitocondriale [Hansen SH et al, 2006]. Pare che all'interno del mitocondrio, affinché vengano sintetizzate correttamente le proteine della catena di trasporto degli elettroni, sia indispensabile la presenza di molecole di t-RNA coniugate con la taurina. Ne consegue che una carenza di taurina determina una ridotta espressione delle proteine della catena respiratoria, con conseguente accumulo degli elettroni a livello della matrice mitocodriale che favoriscono la formazione di specie reattive dell'ossigeno e aumentata produzione di ROS [Schaffer et al. 2009; Jong et, 2012]

La taurina quindi svolgerebbe la sua azione antiossidante mediante un meccanismo d'azione completamente differente da quello della maggior parte delle specie antiossidanti presenti nel nostro organismo, infatti essa non rimuove o inattiva le specie reattive presenti in circolo come gli atiossidanti che agiscono mediante un meccaismo scavenger, ma inibisce la produzione di ROS a livello della catena di trasporto mitocondrilale. È insito dedurre che i livelli di taurina all'interno del nostro organismo debbano essere mantenuti in un range di valori normali affinché questa molecola possa svolgere attivamente il ruolo protettivo antiossidante.

5. LA TERAPIA DELLA DISLIPIDEMIA NELL'INSUFFICIENZA RENALE CRONICA

5.1 Considerazioni generali sulle statine e cenni di farmacologia

Le statine sono un gruppo di farmaci utilizzati per ridurre i livelli di colesterolo in pazienti con ipercolesterolemia, che presentano pertanto un maggior rischio di incorrere in patologie cardiovascolari [Shepherd J et al, 1995; Sacks FM et al, 1996]. Dal punto di vista farmacologico, sono dei metaboliti di origine fungina che inibiscono selettivamente l'enzima idrossimetilglutaril-CoA reduttasi (HMG-CoA reduttasi) che catalizza, a livello epatico, la tappa iniziale e limitante nella biosintesi del colesterolo. Questo enzima infatti, è responsabile della conversione del 3-idrossi-3-metilglutaril-CoA in mevalonato, un precursore del colesterolo (Fig. 7) [Strippoli GF et al, 2008; Holme I et al, 2010]. Oggi sul mercato Italiano sono commercializzate cinque tipologie di statine, di seguito elencate in ordine di comparsa a partire dagli anni '80: simvastatina; pravastatina, fluvastatina, atorvastatina, rosuvastatina. Le caratteristiche farmacocinetiche delle statine esistenti in commercio presentano grandi differenze, ma le similitudini farmacodinamiche che le accomunano, permettono il loro utilizzo in studi sperimentali, garantendo così un numero sempre crescente di informazioni riguardanti le conseguenze cliniche dovute al loro utilizzo.

L'affinità del farmaco per l'enzima risulta essere da 1000 a 10000 volte maggiore che il suo substrato naturale, e l'inibizione dell'enzima può essere di tipo competitivo, parziale o reversibile, ma il risultato è sempre la mancata sintesi del colesterolo a livello epatico. L'interazione delle statine con l'enzima avviene a

livello di una porzione detta “farmacoforo” un duplicato della porzione del HMG-CoA-reduttasi, che è in grado di inibire l’enzima stesso.

La *biodisponibilità* delle differenti statine varia da valori inferiori al 5% come per la simvastatina sino a valori di circa il 24% come nel caso della fluvastatina. Infatti tutte le statine subiscono un metabolismo di primo passaggio epatico, e meno del 5-20% della dose somministrata raggiunge la circolazione sistemica. Tutte le statine vengono somministrate nella forma attiva tranne la lovastatina e la simvastatina che vengono somministrate come pro-farmaco e attivate a livello epatico. Una volta in circolo tutte le statine presenti in commercio, ad eccezione della pravastatina (50%) e della rosuvastatina (88%) sono legate più del 90 % alle proteine plasmatiche, in particolare all’albumina plasmatica. La vita media del farmaco e i tempi di eliminazione sono molto variabili e vanno da 1 ora sino a 14 ore, però il tempo necessario per osservare gli effetti terapeutici migliori va da 4 a 6 settimane, indipendentemente dalla vita media della specifica statina utilizzata. Circa il 70% dei metaboliti delle statine viene escreto attraverso il fegato e le restante frazioni vengono escrete attraverso le urine o le feci. Tutte le statine, eccetto la pravastatina sono *metabolizzate* dal sistema del citocromo P (CYP). La atorvastatina, lovastatina e simvastatina sono metabolizzate dal CYP3A4, e la fluvastatina dall’isoenzima CYP2C9. Gli inibitori di questi isoenzimi sono i triazolici, la ciclosporina, i farmaci bloccanti i canali del calcio, gli antistaminici e l’omeprazolo. Questi farmaci interagendo con gli isoenzimi responsabili del metabolismo delle statine riducono il metabolismo delle stesse, incrementando l’effetto ipolipemizzante e i possibili effetti avversi.

5.1.1 Effetti secondari

Le statine sono ben tollerate dalla maggior parte dei pazienti infatti l'incidenza di effetti collaterali secondari è molto bassa. La monoterapia con statine è causa di una bassa percentuale di effetti secondari, che si presentano solo nello 0,1% dei casi in relazione alla concentrazione sierica delle stesse. Tra gli effetti collaterali meno gravi e più frequenti ricordiamo; dolori muscolari e alle articolazioni, nausea, disturbi gastrointestinali, cefalea e eruzioni cutanee. Questi disturbi possono essere transitori e scomparire una volta che l'organismo si è adattato al farmaco.

Tra gli effetti collaterali potenzialmente gravi non bisogna sottovalutare:

- Danni epatici

In alcuni casi le statine possono far aumentare notevolmente enzimi epatici che potrebbero causare danni permanenti al fegato. In particolare, i livelli delle transaminasi possono aumentare sino a tre volte il limite superiore. Anche in questo caso l'incidenza è molto bassa essendo stata riscontrata nell'1% dei pazienti trattati, indipendentemente dalla statina e dalla dose somministrata [Bradford RH et al, 1991]. Se l'incremento enzimatico è lieve la terapia può essere continuata tranquillamente ma nel caso in cui l'incremento sia considerevole è necessario interrompere la terapia nell'immediato, e i livelli delle transaminasi diminuiranno sino a ritornare normali nei tre mesi successivi alla sospensione del trattamento [Lennernas H et al, 1997]. Inoltre i problemi epatici possono rimanere asintomatici per molto tempo, quindi i pazienti in terapia devono monitorare la funzionalità epatica mediante esami del sangue.

- Problemi muscolari

Le statine possono causare dolore e fastidio ai muscoli. Il principale evento avverso determinato dalle statine è la miopatia, definita come dolore o debolezza muscolare associata ad aumento dei livelli di creatinichinasi (CK) di almeno 10 volte la norma. Anche in questo caso gli effetti avversi sono dose dipendenti ma fortunatamente si presentano con una frequenza in monoterapia di un caso su 1000 pazienti. Nei casi più gravi le cellule muscolari vanno incontro a rottura (rabdomiolisi) e rilasciano in circolo la mioglobina che può apportare dei danni renali con insufficienza renale acuta. Inoltre il rischio di rabdomiolisi può aumentare notevolmente in caso di interazione delle statine con farmaci inibitori del citocromo p-450 che inibiscono il catabolismo delle statine e ne aumentano la concentrazione plasmatica (genfibrozil, eritromicina, antimicotici, nefazodone, ciclosporine e niacina).

5.1.2 Effetti delle statine a livello cardiovascolare

Il trattamento con statine comporta una notevole riduzione del rischio cardiovascolare in quanto questa classe di farmaci previene queste patologie mediante cinque meccanismi differenti:

- 1) Riduzione del colesterolo plasmatico
- 2) Miglioramento della funzione endoteliale
- 3) Modulazione della risposta infiammatoria
- 4) Stabilizzazione della placca aterosomatica
- 5) Prevenzione della formazione di trombi

L'inibizione dell'enzima HMG-CoA-reduttasi comporta una serie di conseguenze che possono essere riassunte in due gruppi

1) Conseguenze che derivano da interazioni col metabolismo del colesterolo:

- Riducono i livelli del colesterolo totale e del C-LDL [Boekholdt SM et al, 2014] lipoproteine associate con l'insorgenza dell'aterosclerosi e un aumentato rischio cardiovascolare. La ridotta sintesi di colesterolo a livello epatico determina inoltre un'aumentata espressione dei recettori epatici per il LDL-C e della sua clearance nel circolo ematico [Brown MS et al, 1986; Repa JJ et al, 2005]. Ciò comporta un'aumentata rimozione delle LDL circolanti riducendo così i livelli di C-LDL plasmatico.
- Riducono la densità delle proteine LDL, incrementando la grandezza delle stesse, parametro correlato a una ridotta aterogenesi [Packard C et al, 2000]
- Riducono la sintesi epatica di Apo-B 100 e di lipoproteine ricche in trigliceridi (VLDL), riducendo così i livelli di trigliceridi plasmatici [Grundy SM et al, 1998]. A tal proposito, la capacità di ridurre i trigliceridi è direttamente proporzionale al livello iniziale di trigliceridemia e alla potenza della statina.
- Alcune statine determinano un moderato aumento del colesterolo [Lionel H et al, 2005]. Il risultato ultimo di questa serie di cambiamenti determina un riduzione del rapporto colesterolo totale e C-LDL, e del rapporto C-LDL/C-HDL. Essendo i livelli del colesterolo plasmatico strettamente associati con la patologia coronarica, sino ad ora, si ritiene che una riduzione del colesterolo in seguito al trattamento con statine sia l'effetto benefico predominante di questo trattamento. Tuttavia numerosi studi mettono in evidenza l'importanza di ulteriori effetti

benefici oltre che la riduzione dei livelli plasmatici del colesterolo. Infatti alcuni studi [Sacks FM et al, 1996; Ford I et al, 2007] hanno messo in evidenza una riduzione della mortalità dovuta ad eventi cardiaci senza la presenza di una riduzione marcata dei livelli di C-LDL già dopo poco tempo dall'inizio della terapia. Questo è dovuto agli effetti pleiotropici delle statine che contribuiscono ad amplificare gli effetti benefici, indipendentemente dalla riduzione dei livelli di colesterolo. Questi effetti sono presenti già dopo poco tempo dall'inizio della terapia e sono reversibili con la sospensione del trattamento [Takemoto M et al, 2011; Liao JK et al, 2005].

Inoltre, l'evidenza secondo cui l'infiammazione e il sistema immunitario svolgono un ruolo centrale nella patogenesi dell'aterosclerosi, e la dimostrata capacità delle statine, di ridurre i livelli plasmatici di alcuni mediatori dell'infiammazione, hanno rinforzato questa ipotesi [Ridker PM et al, 1999 (3); Musial J et al, 2001].

2) Effetti pleiotropici delle statine correlati al sistema cardiovascolare

Le statine come detto in precedenza, oltre che regolare il profilo lipidico di un soggetto inducono ulteriori effetti benefici a livello del sistema cardiovascolare, per lo più a livello della parete vasale, che sono conosciuti come effetti pleiotropici e spiegano il beneficio addizionale non attribuibile alla sola riduzione del C-LDL [Davignon J, 2004]. Oltre ad inibire l'attività dell'enzima HMG-CoA reduttasi, le statine interferiscono con la formazione di isoprenoidi a partire dal mevalonato [Liao JK, 2002]. Gli isoprenoidi come il farnesilpirofosfato (FPP) e il geranylgeranylpirofosfato (GGPP) derivano dal metabolismo del mevalonato e sono dei marcatori indispensabili nel regolare alcuni processi molecolari. Queste

molecole infatti, mediante un meccanismo di prenilazione, modificano post-traduzionalmente una serie di proteine come la subunità gamma delle proteine G e piccole proteine che si uniscono alla guanosina trifosfato (GTP). Come conseguenza dell'azione delle statine la prenilazione delle proteine G (Rho, Rac, Rac 1, Rab e Ras) si riduce. In linea generale la prenilazione stimola le vie infiammatorie e inibisce meccanismi utili per l'omeostasi endoteliale. Di conseguenza le statine, inibendo la formazione di isoprenoidi (che non favoriscono l'isoprenilazione delle diverse proteine sunnominate), favoriscono l'omeostasi endoteliale. Attraverso questi potenti effetti sulle proteine cellulari, le statine possono indurre una serie di proprietà antiaterosclerotiche e antitrombotiche, come l'inibizione della proliferazione delle cellule muscolari lisce, i processi di adesione cellulare, l'attivazione piastrinica e la secrezione della proteina C reattiva. Le statine inoltre sono in grado di migliorare la funzionalità endoteliale in quanto aumentano la biodisponibilità dell'ossido nitrico sia stimolando direttamente l'attività della e-NOS [Romano M et al, 2000], sia stabilizzando l'm-RNA dello stesso e infine, riducendo la formazione di ROS che sono in grado di inattivare La NOS (Ossido Nitrico Sintasi). Un altro effetto noto delle statine è la riduzione dell'aggregazione piastrinica e la riduzione della formazione di trombossano A2 da parte delle stesse, limitando così la formazione della placca instabile [Lacoste L et al, 1995]. È nota inoltre l'azione delle statine nel regolare positivamente l'espressione dell'attivatore tissutale del plasminogeno e nell'inibire l'espressione dell'endotelina-1, un potente vasocostrittore con azione mitogena [Essig M et al, 1998; Hernandez-Perera O et al, 1998].

5.1.3 Proprietà antiossidanti delle statine

L'efficacia di una terapia antiossidante nella prevenzione delle malattie CV è attualmente oggetto di controversia. Infatti, sebbene alcuni grandi trials clinici non abbiano dimostrato alcun effetto benefico in prevenzione secondaria è ancora molto considerata la teoria secondo la quale la produzione di specie reattive dell'ossigeno abbia un ruolo non secondario nella patogenesi dell'aterosclerosi. L'azione ipolipemizzante di questi farmaci ha un effetto anche a livello dello stress ossidativo, in quanto le statine attraverso dei meccanismi non ancora noti sono in grado di modulare positivamente una riduzione dello stress ossidativo. Il ruolo delle ox-LDL appare centrale nella formazione dell'ateroma, le statine oltre che attenuare l'effetto inibitorio delle oxLDL su eNOS, presentano un'azione anti-ossidante diretta sulle LDL in vitro e ex vivo [Suzumura K et al, 1999; Aviram M et al, 1998 (1)]. A tal proposito, i metaboliti idrossilati dell'atorvastatina inibiscono l'ossidazione di LDL, VLDL e delle lipoproteine ad alta densità [Aviram M et al, 1998 (2)], e "catturano" i radicali liberi dell'ossigeno. Ulteriori studi hanno riportato come le statine inibiscano la capacità dei macrofagi di ossidare le lipoproteine e riducano inoltre l'espressione di CD36 sugli stessi macrofagi, ossia l'espressione di uno specifico recettore per le ox-LDL [Giroux LM et al, 1993; Fuhrman B et al, 2002].

I meccanismi mediante i quali questa classe di farmaci possa ridurre lo stress ossidativo non sono ancora noti malgrado siano numerosi gli studi presenti in letteratura che ne evidenziano questa proprietà. È noto un solo meccanismo mediante il quale le statine inibiscono la produzione di ioni superossido. L'anione superossido è sintetizzato ad opera dell'enzima NADPH ossidasi, enzima che può essere attivato per azione del recettore di membrana dell'angiotensina II di tipo I

(R-AT 1). Le statine bloccando il recettore R-AT 1 inibiscono la fosforilazione della NADPH ossidasi e di conseguenza la inattivano [Cai H et al, 2000; Wassmann S et al, 2001]

5.1.4 Azione antiinfiammatoria delle statine

L'importanza dell'infiammazione nella patogenesi dell'aterosclerosi è ormai lungamente consolidata, infatti il processo infiammatorio ha un ruolo chiave nella patologia aterosclerotica data la presenza di monociti, macrofagi e linfociti T a livello della placca ateromatosa. Il processo infiammatorio è indotto da una serie di condizioni che si vengono a stabilire all'interno della placca, quali: presenza di citochine pro infiammatorie, aumentata produzione di radicali liberi e un deficit di ossido nitrico [Ross R, 1999]. Le statine esplicano il loro effetto benefico sia aumentando la biodisponibilità di ossido nitrico che inibendo la sintesi di varie citochine proinfiammatorie [Vaughan CJ et al, 2000]. Un ulteriore effetto benefico attribuibile all'azione delle stesse è la riduzione plasmatica di un marcatore dell'infiammazione considerato anche un fattore di rischio di malattie coronariche, la proteina C reattiva (PCR) [Ridker PM et al, 1997]. I livelli plasmatici di PCR sembrano essere i predittori più importanti di eventi coronarici futuri. Un recente studio JUPITER [Ridker PM et al, 2008] ha evidenziato come la riduzione dei livelli di PCR al di sotto di 2 mg/L ottenuta con rosuvastatina 20 mg/die in pazienti apparentemente sani e con C-LDL <130 mg/dl, abbia ridotto in maniera significativa l'incidenza a due anni di eventi coronarici acuti. A livello della placca ateromatosa il legame della PCR e del C-LDL comporta una serie di eventi quali, riduce l'espressione della e-NOS, attiva il complemento, inibisce

l'inibitore 1 del plasminogeno (PAI-1) e aumenta l'espressione di molecole di adesione [Torzewski J et al, 1997]. Ne consegue che una riduzione dei livelli plasmatici di della PCR indotta dal trattamento con statine comporta degli effetti benefici nel corso di patologie cardiovascolari. Nella patogenesi e nella progressione della patologia aterosclerotica, le molecole di adesione e le citochine ad azione chemiotattica svolgono anch'esse un ruolo importante [Blake GJ et al, 2001] in quanto mediano l'adesione e la migrazione dei leucociti attraverso l'endotelio dando inizio al processo aterosclerotico. Elevati livelli plasmatici di alcuni mediatori della cascata infiammatoria sono stati associati a rottura della placca e a un aumentato rischio di ricorrenza di eventi CV. Le molecole maggiormente implicate sono la P-selectina, l'IL-6, il TNF-alfa, la forma solubile di ICAM-1 "Intercellular Adhesion Molecule-1" e VCAM-1 "Vascular Cell Adhesion Molecule-1" [Ridker PM et al, 1998; Lindahl B et al, 2000]. Le statine aumentano la stabilità della placca ateromatosa, riducendo l'accumulo di macrofagi a livello della stessa e limitando la produzione di metalloproteinasi da parte dei macrofagi attivati, riducendo così nel complesso, la possibile formazione di trombi [Aikawa M et al, 2001]. Sembra inoltre che le stesse siano in grado di ridurre l'espressione delle molecole di adesione, ma i risultati in questo campo appaiono ancora piuttosto inconsistenti e discordanti [Hackman A et al, 1996; Seljeflot I et al, 2002; Wiklund O et al, 2001].

In ogni caso, gli effetti anti-infiammatori delle statine si sono rivelati indipendenti dall'azione ipocolesterolemizzante e questo è stato confermato da uno studio in vitro che ha dimostrato come una statina modificata, ossia priva dell'azione inibitoria sulla HMG-CoA reduttasi, sia ancora in grado di esercitare una potente e selettiva azione anti-infiammatoria [Weitz-Schmidt G et al, 2001]. Le statine

inoltre contribuiscono a ridurre la formazione delle “foam cells” in quanto sono in grado di ridurre “l’uptake” delle ox-LDL mediante la regolazione dell’espressione del recettore CD-36 lo “scavenger receptor A” e lo specifico recettore per le ox-LDL (LOX-1) [Pietsch A et al, 1996].

5.2. Statine e protezione cardiovascolare e renale nei pazienti con MRC

Negli ultimi anni, grazie agli studi clinici condotti per valutare l’effetto terapeutico delle statine nel corso di differenti patologie, si è assistito ad un continuo progredire delle conoscenze sull’impiego clinico delle stesse. Questi farmaci sono oggi considerati gli agenti di prima scelta nel trattamento dell’ipercolesterolemia, grazie ad un’efficacia ampiamente documentata e un eccellente profilo di tollerabilità e sicurezza [Maron DJ et al. 2000; Ballantyne CM, et al. 2003]. È ormai consolidato il beneficio di una terapia ipolipemizzante nel ridurre il rischio di mortalità e morbilità per cause CV ma è stato inoltre ipotizzato che le statine possano giocare un ruolo anche nei processi coinvolti nella progressione del danno renale. [Afzali B, et al 2004].

Una meta-analisi pubblicata nel 2001 ha dimostrato che qualsiasi trattamento (statine, fibrati, dieta, ecc) in grado di correggere le diverse forme di dislipidemia nel paziente con insufficienza renale, si associa a una significativa riduzione della VFG ($p=0,008$), e riduzione dell’escrezione di proteine nelle urine ($p=0,077$) [Fried LF, et al 2001]. I limiti di questa meta-analisi, tuttavia, sono il numero ridotto di partecipanti per ognuno degli studi considerati e la notevole eterogeneità nei pochi dati disponibili. Da allora sono stati condotti diversi studi per cercare di capire se esistono classi di farmaci ipolipemizzanti caratterizzati da

proprietà "renoprotettive" specifiche oppure, se gli effetti benefici a livello renale dipendano esclusivamente dalla correzione della dislipidemia. Ancora oggi, a causa dei dati discordanti presenti in letteratura riguardo all'effetto nefroprotettivo delle statine in pazienti con malattia renale [Tonelli M et al, 2003; Rahman M et al, 2008], non è raccomandato somministrare questi farmaci per la sola terapia renale, ma per lo più per la prevenzione in questi pazienti degli eventi cardiovascolari. Attualmente in base ai risultati ottenuti nello studio SHARP [Baigent C, et al 2011] la terapia combinata di ezetimibe e simvastatina viene indicata come farmaco di prima scelta nei pazienti con insufficienza renale cronica (VFG compresa tra 15 e 60 e LDL > 130 mg/dl). Infatti la terapia combinata risulta essere l'approccio terapeutico ottimale per le dislipidemie date le differenti caratteristiche farmacodinamiche dei due farmaci e la differente selettività d'azione che, rendono i due farmaci complementari nel ridurre i livelli dei lipidi plasmatici.

5.3 Inibitori dell'assorbimento del colesterolo: Ezetimibe:

La monoterapia con statine è in genere ben tollerata dai pazienti sottoposti a terapia, con bassa frequenza di eventi avversi. Tuttavia in alcuni rari casi è stato osservato che i pazienti trattati non raggiungono un livello auspicabile di riduzione dei lipidi plasmatici, sebbene assumano regolarmente le statine. Inoltre in altri rarissimi casi è possibile che gli effetti secondari del farmaco siano più rilevanti degli effetti benefici. In questi casi è necessario somministrare ai pazienti, trattamenti ipolipemizzanti differenti (ezetimibe, fibrati, resine e acido nicotinic), o trattamenti combinati di una statina con altri farmaci

ipolipemizzanti, con l'intento di ridurre al minimo la dose efficace di statina somministrata. La terapia combinata determina un effetto ipocolesterolemizzante più completo in quanto mira a controllare non solo la sintesi endogena del colesterolo ma anche l'assorbimento del colesterolo a livello intestinale.

Uno dei farmaci maggiormente somministrati è l'ezetimibe, che può essere somministrato anche in monoterapia, nel caso in cui il trattamento con statine non sia indicato o tollerato dal paziente. L'ezetimibe è un farmaco capace di inibire selettivamente l'assorbimento intestinale del colesterolo assunto con la dieta o presente a livello dell'orletto a spazzola dell'intestino tenue. Il bersaglio molecolare dell'ezetimibe è, la proteina Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) [Garcia-Calvo M et al, 2005] un trasportatore degli steroli presente sia nelle cellule epiteliali intestinali che in quelle epatiche. La molecola del farmaco localizzandosi sull'orletto a spazzola dell'intestino tenue inibisce l'assorbimento del colesterolo, riducendo il transito dello stesso dal lume intestinale al fegato. e ne favorisce l'escrezione ad opera di altri trasportatori. Oltre a questo effetto diretto, il diminuito assorbimento di colesterolo determina una sovra regolazione dei recettori delle LDL che contribuiscono a ridurre i livelli plasmatici delle stesse e la probabilità di incorrere in eventi CV [Repa JJ et al, 2005]. Il fatto che il farmaco impedisca il trasferimento del colesterolo dal lume intestinale all'enterocita, favorendone l'escrezione per altre vie è documentato dalla mancata interazione con diversi enzimi. La sua specificità d'azione è rinforzata dal fatto che l'ezetimibe rispetto ad altre classi di farmaci ipolipemizzanti, non inibisce l'attività degli enzimi pancreatici, non sequestra acidi biliari e colesterolo, non influenza l'attività di esterificazione, non influenza le attività delle lipasi presenti nel tratto gastrointestinale, né l'assorbimento di trigliceridi, estrogeni, progestinici

e vitamine liposolubili. L'ezetimibe è generalmente ben tollerato dai pazienti però bisogna tener conto che i pazienti che ricevono la terapia combinata ezetimibe/statine presentano un rischio maggiore, seppur lieve di un aumento dei livelli delle transaminasi epatiche rispetto alla monoterapia con statine. Numerosi studi clinici hanno mostrato l'efficacia della somministrazione di 10 mg al giorno di ezetimibe nell'aumentare del 15-26% l'effetto ipolipemizzante di qualsiasi statina. Questo è determinato dal fatto che i due farmaci agiscono mediante un meccanismo complementare e sinergico detto di "doppia inibizione". Infatti il trattamento con statine che riduce la sintesi endogena del colesterolo, associato ad un trattamento con ezetimibe che ne impedisce l'assorbimento, determina una risposta omeostatica dell'organismo alla necessità di colesterolo che si traduce in un aumento della quota di colesterolo assorbito. Per questi motivi la duplice inibizione operata dall'ezetimibe nell'enterocita e dalla statina nell'epatocita esalta le proprietà farmacodinamiche e gli effetti ipolipemizzanti mediante un meccanismo cooperativo e additivo. Alla luce di queste evidenze le nuove linee guida suggeriscono come trattamento ipolipidemico aggressivo la terapia combinata ezetimibe/simvastatina.

6. SCOPO DEL LAVORO

La MRC è attualmente conosciuta come un problema di salute pubblica in tutto il mondo in quanto nei paesi sviluppati il numero di pazienti patologici ha un incremento annuale del 5-8% [Meguid El Nahas et al, 2005; The United States Renal Data System 2004]. Inoltre la prevalenza degli stadi terminali della patologia è in continuo aumento a livello mondiale e la principale causa di morte soprattutto negli ultimi stadi della patologia è rappresentata dalle patologie CV [Prichard S, 2003]. Questo è una conseguenza del fatto che questa classe di pazienti oltre che essere soggetti ai fattori di rischio classici per le patologie CV, sono particolarmente suscettibili a patologie come l'ipertensione arteriosa, il diabete mellito, dislipidemia, che rappresentano fattori di rischio aggiuntivi per le patologie cardiovascolari [Appel GB et al, 2004; McCulloch PA, 2004; Varmar R et al, 2005]. Ad incrementare ulteriormente il rischio concorrono inoltre altri fattori meno conosciuti come l'iperomocisteinemia, l'infiammazione, la disfunzione endoteliale e lo stress ossidativo frequenti in tutti gli stadi della patologia renale [Prichard S, 2003]. La dislipidemia rappresenta uno dei principali fattori di rischio per le patologie CV e può essere corretto con la somministrazione di una terapia adeguata. Nei pazienti con MRC la terapia della dislipidemia, si avvale principalmente dell'uso di statine somministrate in concomitanza ad altri farmaci ipolipemizzanti che sono in grado di ridurre il tasso di mortalità dovuta a cause CV. Infatti una serie di dati preliminari suggeriscono che la combinazione farmacologica di statine con ezetimibe (EZE), un inibitore dell'assorbimento del colesterolo, apporta degli effetti complementari rispetto a quelli ottenuti con la sola terapia con statine [Dembowski et al, 2009]. Tra gli effetti complementari di maggior rilevanza è stato osservato un miglioramento del

quadro ossidativo e secondo alcuni autori anche un miglioramento della funzionalità renale [Zoja C et al, 2010].

Nonostante questi dati siano ampiamente confermati dalla letteratura, nessun autore è stato in grado di spiegare come le statine possano agire nel modulare la riduzione dello stress ossidativo in questa classe di pazienti.

Lo scopo dello studio è stato quello di valutare l'effetto di un trattamento farmacologico ipolipemizzante combinato, in pazienti con MRC appartenenti al 3°- 4° stadio della patologia, in relazione ad alcuni parametri indicatori dello stato ossidativo del paziente, con l'intento di capire e trovare una spiegazione di come la somministrazione della terapia possa regolare o influenzare lo stress ossidativo.

Trenta pazienti sono stati reclutati in collaborazione con la Clinica Nefrologica dell'Azienda Ospedaliera dell'Università degli Studi di Sassari, e gli stessi sono stati suddivisi in tre gruppi e randomizzati per ricevere tre trattamenti farmacologici differenti per un anno di terapia. Il trattamento farmacologico prevede che il primo gruppo riceva 40 mg di simvastatina al giorno mentre il 2° e il 3° gruppo una terapia combinata di ezetimibe simvastatina 10/20 mg/die, 10/40 mg/die rispettivamente.

In seguito al reclutamento dei pazienti sono stati valutati una serie di parametri bioclinici indicatori dello stato di salute del paziente, con lo scopo di valutare come gli stessi potessero essere modificati in seguito alla somministrazione del trattamento farmacologico (profilo lipidico, tioli totali plasmatici, VFG, creatinina sierica, proteinuria e pressione diastolica e sistolica) (Tab.3).

I biomarcatori indicatori dello stress ossidativo sono stati valutati durante l'intero trattamento farmacologico, ad un tempo basale e a tempi programmati in funzione della possibilità di rivelare le variabilità fisiologiche attese dalla terapia. Essi includono le seguenti biomolecole plasmatiche quali; tioli totali plasmatici, tioli legati alle proteine, MDA, rapporto All/UA, la taurina e la valutazione del potere antiossidante totale plasmatico.

7. MATERIALI E METODI

7.1 Soggetti partecipanti allo studio:

Presso l'istituto di Patologia Medica dell'Azienda Ospedaliera dell'Università degli Studi di Sassari sono stati selezionati 30 pazienti con insufficienza renale cronica che rispettassero i seguenti criteri di selezione:

- Età > 18 anni
- Colesterolo LDL > 100 mg/dl
- Presenza di proteinuria e nefropatia cronica definita come clearance della creatinina > 20 ml/min/1,73 m² con concomitante escrezione proteica urinaria >0.3 g/24h
- Assenza di infezioni del tratto urinario o insufficienza cardiaca conclamata

I pazienti sono stati classificati come pazienti con IRC appartenenti al 3°-4° stadio della malattia e non ricevono trattamento dialitico.

I criteri di esclusione sono rappresentati da:

- Patologia renovascolare evidente o sospetta
- Uropatia ostruttiva
- Diabete mellito di tipo I
- Precedente o concomitante trattamento con steroidi, antiinfiammatori, farmaci immuno soppressivi, vitamina B6, B12, folati o statine

Tutti i pazienti sono stati stabilizzati con un trattamento farmacologico inibitore del sistema RAS (renin-angiotensin system, RAS) per i sei mesi antecedenti al reclutamento. I trenta pazienti reclutati sono stati randomizzati e suddivisi in tre

gruppi differenti, ciascuno costituito da dieci persone, per ricevere una terapia ipolipemizzante con due farmaci differenti, la simvastatina (Simva) e l'ezetimibe (Eze) a differenti dosaggi. Al primo gruppo vengono somministrati 40 mg di Simva al giorno. Al secondo gruppo una terapia combinata di Eze/Simva 10/20 mg al giorno, e al terzo gruppo sempre una terapia combinata di Eze/Simva 10/40 mg al giorno. I parametri biochimici sono stati valutati ad un tempo basale e dopo 4, 8, 12 mesi dall'inizio della terapia.

Il gruppo di controllo è costituito da 30 soggetti sani con caratteristiche simili a quelle dei pazienti, quali l'età e il sesso, e servono esclusivamente per individuare un range di normalità per i valori dei biomarcatori valutati. I criteri di esclusione per i soggetti di controllo sono i seguenti:

- Presenza di diabete
- Ipertensione
- Patologie cardiovascolari o cerebrovascolari
- Patologia renale
- Discrasia
- Tumori
- Patologie vascolari della retina
- Età inferiore ai 18 anni
- Precedente o concomitante trattamento con vitamina B6, B12 o folati

Tutti i soggetti partecipanti allo studio hanno firmato il consenso informato, elaborato in seguito a valutazione e approvazione da parte del comitato etico della Azienda Ospedaliero Universitaria di Sassari e successivamente registrato nel sito <http://clinicaltrials.gov> con il seguente codice NCT00861731.

7.2 Quantificazione dei tioli totali

La valutazione dei tioli totali plasmatici è stata effettuata in elettroforesi capillare con detection laser [Zinellu et al, 2003].

Processamento del campione:

Il sangue raccolto in provette contenenti EDTA come anticoagulante (Becton Dickinson, Rutherford, USA) è stato subito centrifugato a 3000 x g, per 5 minuti a 4°C. Successivamente a 100 µl di plasma vengono aggiunti 10 µl di tributilfosfina (TBP 10 %) con il fine di ridurre i gruppi tiolici. Dopo aver vortexato per 30 secondi si procede con un incubazione a 4°C per venti minuti. Successivamente vengono aggiunti 100 µl di acido tricloroacetico (TCA) al 10% con il fine di precipitare la frazione proteica plasmatica. Il campione viene infatti centrifugato per 10 minuti a 3000 g e successivamente, a 100 µl di surnatante vengono aggiunti 100 µl di Na₃PO₄ 200 mmol/L a pH 12.5 e 25 µl di 5-iodoacetamidefluoresceina (5-IAF) 4,1 mmol/L. Il mix di reazione viene fatto incubare a temperatura ambiente per 10 minuti e successivamente il campione viene diluito di 100 volte e iniettato in elettroforesi capillare LIF.

Condizioni elettroforetiche:

La separazione dei tioli plasmatici è stata effettuata in elettroforesi capillare (P/ACE 5510) con laser a fluorescenza (LIF) e un detector (Beckman, Palo Alto, CA, USA). Per la separazione elettroforetica 14 nL di campione sono stati iniettati con una pressione di 0,5 psi in un capillare di silice fusa per 2 secondi utilizzando una soluzione di sodio fosfato alla concentrazione 5 mmol/L e acido borico alla concentrazione 4 mmol/L. Il capillare presenta una lunghezza totale di

57 cm, un diametro interno di 75 μm ed è posto a 50 cm di distanza dalla finestra di rilevamento. La separazione è stata effettuata in 5 minuti utilizzando come buffer della corsa N-metil-D-glucamina alla concentrazione di 75 mmol/L e pH11. La corsa elettroforetica è stata effettuata ad una temperatura di 40°C, un potenziale di 28 kV e un amperaggio di 70 μA a polarità normale. Dopo ogni corsa il capillare viene riequilibrato effettuando una corsa di un minuto con un tampone della corsa elettroforetica.

7.3. Quantificazione dei tioli ridotti e valutazione dello stato redox

La valutazione dei tioli totali plasmatici è stata effettuata in elettroforesi capillare con detection laser [Carru C et al, 2004].

Processamento del campione

Il sangue raccolto in provette contenenti EDTA come anticoagulante (Becton Dickinson, Rutherford, USA) è stato subito centrifugato a 3000 x g e per 5 minuti a 4°C. Successivamente a 200 μl di plasma vengono aggiunti 50 μl di acido solfo salicilico (SSA) al 15% con il fine di allontanare la frazione proteica. Il campione viene centrifugato per 5 minuti a 2000 g e successivamente a 150 μl di surnatante vengono aggiunti 30 μl di NaOH alla concentrazione di 1 mmol/L.

Successivamente a 50 μl di campione vengono aggiunti 100 μl di buffer sodio fosfato alla concentrazione di 100 mmol/L pH 12,5 e 15 μl di 5-IAF 0,8 mmol/L. Il campione dopo essere stato vortexato per un minuto viene fatto incubare per 15 minuti a temperatura ambiente. Infine il campione ormai derivatizzato viene

diluito 100 volte in acqua prima di essere caricato nelle vials ed iniettato in elettroforesi capillare.

Condizioni elettroforetiche

La separazione dei tioli plasmatici è stata effettuata in elettroforesi capillare (P/ACE 5510) con laser a fluorescenza (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) Per la separazione elettroforetica sia dei tioli ridotti 14 nL di campione sono stati iniettati con una pressione di 0,5 psi in un capillare di silice fusa per 2 secondi utilizzando una soluzione di sodio fosfato alla concentrazione 18 mmol/L e acido borico alla concentrazione 14,5 mmol/L. Il capillare presenta una lunghezza totale di 57 cm, un diametro interno di 75 µm ed è posto a 50 cm di distanza dalla finestra di rilevamento. La separazione è stata effettuata in 9 minuti utilizzando come buffer della corsa N-metil-D-glucamina alla concentrazione di 75 mmol/L e pH11 ad una temperatura di 40,7°C e un potenziale di 28 kV a un amperaggio di 150 µA a polarità normale. Dopo ogni corsa il capillare viene riequilibrato effettuando una corsa di un minuto con un tampone della corsa elettroforetica.

Determinazione dello stato redox dei tioli:

La determinazione dello stato redox dei tioli va calcolata misurando il rapporto tra i tioli ridotti rispetto ai tioli totali plasmatici: $(rCys-Gly + rCys + rHcy + rGSH + rGlu-Cys)/(tCys-Gly + tCys + tHcy + tGSH + tGlu-Cys)$.

7.4. Quantificazione della malondialdeide

La misurazione dei livelli della MDA plasmatica è stata effettuata in elettroforesi capillare come precedentemente descritto da Zinellu A et al [Zinellu A et al, 2011(1)].

Processamento del campione

Il sangue raccolto in provette contenenti EDTA come anticoagulante (Becton Dickinson, Rutherford, USA) è stato subito centrifugato a 3000 x g e per 5 minuti a 4°C. Un volume di 100 µl di plasma è stato mescolato con 1 µl di acqua e 10 µl di BHT (2,6-di-tetrabutyl-4-methylphenol) 5 mM risospeso in etanolo. Al campione sono stati successivamente aggiunti 100 µl di ACN (Acetonitrile) e centrifugati a 3000 x g per 5 minuti a 4°C per precipitare le proteine. Il surnatante è stato direttamente iniettato in elettroforesi capillare.

Condizioni elettroforetiche

La separazione della MDA è stata effettuata in elettroforesi capillare (A MDQ) dotata di un detector diode array (Beckman instruments, CA USA). La quantificazione elettroforetica dell'analita è stata ottenuta utilizzando un capillare di 75 µm di diametro interno, lunghezza totale di 40 cm e di lunghezza effettiva di 30 cm. . La corsa elettroforetica è stata effettuata in una soluzione di tris buffer 200 mmol/L [tris(hydroxymethyl)aminomethane] e acido fosforico 1 mmol/L pH 5.0 ad una temperatura di 15°C e un potenziale di 12 kV a polarità inversa. Dopo ogni corsa il capillare è stato sciacquato per 1 minuto con HCl 0.1 mmol/L ed equilibrato con il buffer della corsa per la durata di un minuto. Con le seguenti

condizioni elettroforetiche è stato così possibile rilevare i livelli di MDA in poco meno di 8 minuti.

7.5. Quantificazione del rapporto allantoina acido urico

La quantificazione dei livelli di allantoina e di acido urico plasmatici è stata effettuata in elettroforesi capillare UV detection come precedentemente descritto da Zienellu et al. [Zienellu A 2011(2)].

Processamento del campione:

Il sangue raccolto in provette contenenti EDTA come anticoagulante è stato subito centrifugato a 3000 x g e per 5 minuti a 4°C.

Un volume di 200 µl di plasma viene filtrato mediante filtri Vivaspın 500 microconcentrators mediante una centrifugazione di 10 minuti a 3000 g per rimuovere le proteine. Il campione filtrato viene direttamente iniettato in elettroforesi capillare.

Condizioni elettroforetiche:

La quantificazione dell'allantoina e dell'acido urico è stata effettuata in elettroforesi capillare (A MDQ) dotata di un detector diode array (Beckman instruments, CA USA). La separazione elettroforetica dell'analita è stata ottenuta utilizzando un capillare di lunghezza totale di 60 cm e di lunghezza effettiva di 10.2 cm. La separazione è stata effettuata in una soluzione di sodio borato 300 mmol/L pH 10.0 e N-metil-glucamina 50 mmol/L, ad una temperatura di 20°C e

un potenziale di 25 kV a polarità normale. Dopo ogni corsa il capillare è stato sciacquato per 0.5 min con acqua ed equilibrato con una soluzione di NaOH 0.5 mmol/L per la durata di un minuto. La separazione è stata monitorata a 190 nm per l'allantoina e a 290 nm per l'acido urico ed è stato possibile rilevare le due molecole in un'unica corsa elettroforetica della durata di 9 minuti.

7.6. Quantificazione dei livelli di taurina plasmatica

La quantificazione dei livelli di taurina plasmatica è stata effettuata in elettroforesi capillare dotata di un laser rilevante la fluorescenza della molecola derivatizzata, come precedentemente descritto da Zinellu et al [Zinellu et al, 2009].

Processamento del campione:

Il sangue raccolto in provette vacutainer contenenti EDTA come anticoagulante è stato immediatamente centrifugato a 3000 g per 5 minuti a 4°C. Successivamente a 50 µl di plasma sono stati aggiunti 50 µl di standard interno (acido omocisteico) 200mmol/L e 100 µl di acido tricloroacetico (TCA) al 10% per precipitare le proteine. In seguito ad un'ulteriore centrifugazione a 3000 g per 5 minuti a 4°C, a 10 µl di surnatante sono stati aggiunti 90 µl di Na₂HPO₄ 100 mmol/L pH 9,5 e 11 µl di FITC (Fluoresceina Isotiocianato St Louis, USA) 25 mmol/L. Dopo un'incubazione di 20 minuti a 100°C il campione è stato diluito 100 volte e direttamente iniettato in elettroforesi capillare.

Condizioni elettroforetiche:

La separazione della taurina è stata effettuata in elettroforesi capillare (P/ACE 5510) dotata di un laser a fluorescenza (LIF) e un detector (Beckman, Palo Alto, CA, USA). Per la separazione elettroforetica 18 nL di campione sono stati iniettati in un capillare di silice fusa di 47 cm di lunghezza e di 75 µm di diametro con una potenza di 12 kV. Il buffer della corsa è sodio fosfato tribasico alla concentrazione 20 mmol/L e pH 11,8. Dopo ogni corsa il capillare viene riequilibrato effettuando una corsa di un minuto con un tampone NaOH 0,5 mmol/L e una successiva corsa di un ulteriore minuto con il tampone della corsa elettroforetica. Con le seguenti condizioni elettroforetiche è stato così possibile rilevare i livelli di taurina in poco meno di 15 minuti.

7.7 Quantificazione della capacità antiossidante plasmatica totale con il metodo della TAEC(Total Antioxidant Equivalent Capacity)

La capacità antiossidante totale del plasma dei pazienti è stata valutata mediante il dosaggio della TAEC eseguito come riportato dagli autori Lewinska et al [Lewinska et al, 2007]

8. ANALISI STATISTICHE

Tutti i risultati sono espressi come valori medi (media \pm DS) o valori mediani (mediana e range). La distribuzione dei variabili presenti nel gruppo di studio sono state valutate mediante il test di Kolmogorov-Smirnov.

Le differenze statistiche presenti tra i controlli e i pazienti sono state confrontate utilizzando il test t di Student o il test Mann-Whitney.

L'effetto dei trattamenti farmacologici è stato valutato mediante analisi statistica ANOVA effettuate su analisi ripetute.

La correlazione esistente tra le variabili è stata valutata mediante il test di correlazione di Pearson.

I calcoli sono stati eseguiti utilizzando il programma Statgraphics Plus Package 5.1 per Windows (Rockville, MD, USA).

9. RISULTATI

Dopo aver reclutato i pazienti e i controlli abbiamo valutato una serie di parametri indicatori dello stato di salute del paziente, per monitorare come gli stessi potevano essere modificati in seguito alla somministrazione del trattamento farmacologico. Come riportato in (Tab. 3), tutti i pazienti reclutati appartengono al 3°- 4° stadio della patologia con valori di VFG $< 60 \text{ ml/mi} \times 1,73 \text{ m}^2$ e valori di creatinina sierica $> 20 \text{ ml/min/1,73m}^2$. Tutti i pazienti con MRC presentano una condizione di iperlipidemia con un quadro clinico caratterizzato da elevati livelli di trigliceridi e di colesterolo LDL rispetto ai soggetti di controllo. I livelli dei tioli totali plasmatici risultano più elevati nei pazienti rispetto ai controlli e in particolare, il 50% dei pazienti presenta una condizione di iperomocisteinemia con valori di Hcy $> 15 \text{ } \mu\text{mol/l}$ rispetto al 10% della popolazione di controllo (Tab. 3). In seguito alla valutazione dei parametri indicatori dello stato ossidativo risulta che tutti i pazienti presentano rispetto ai controlli un quadro ossidativo significativamente alterato in senso pro-ossidante, con rispettivi valori nei pazienti rispetto ai controlli di (MDA nmol/L: 218 ± 147 vs 140 ± 81 , $p = 0,013$), All/UA % ($1,5 \pm 0,7$ vs $0,9 \pm 0,1$ $p < 0,005$) e (stato redox dei tioli %: $10,3 \pm 1,5$ vs $8,2 \pm 2,1$ $p < 0,001$) (Tab.3). I valori basali di MDA e del rapporto All/UA risultano inversamente correlati con la VFG sia nei pazienti che nei controlli ($r = -0,42$ $p = 0,02$) ($r = -0,44$ $p = 0,015$). In seguito alla valutazione dei livelli plasmatici di taurina questi risultano più bassi nei pazienti rispetto ai controlli (Tau $\mu\text{mol/L}$ $51,1 \pm 13,3$ vs $62,3 \pm 16,1$; $p < 0,01$) (Tab.3). I valori di taurina sono inoltre inversamente correlati con i valori di colesterolo totale nei pazienti ma non nei controlli ($r = -0,33$ $p < 0,05$). In seguito alla randomizzazione dei pazienti nei tre gruppi, non sono evidenti delle differenze significative per i parametri clinici

valutati, fatta eccezione per i valori di All/UA nel gruppo tre in cui vengono somministrati 10/40 mg di ezetimibe/simvastatina al giorno rispetto ai gruppi 1 e 3 che ricevono rispettivamente i seguenti trattamenti farmacologici, 40 mg di simvastatina al giorno e 10/40 mg di ezetimibe/simvastatina al giorno (Tab 4).

In seguito alla somministrazione della terapia farmacologica si osserva un miglioramento del quadro lipidico già dopo quattro mesi dall'inizio della terapia in tutti e tre i gruppi trattati. L'effetto più accentuato si osserva nel terzo gruppo dopo 4 mesi di terapia con un decremento del 40% del colesterolo totale, del 62% del colesterolo LDL e del 21% dei trigliceridi (Fig. 8). Sempre nel terzo gruppo dopo 12 mesi di terapia si osserva una riduzione significativa del rapporto LDL/HDL rispetto ai livelli basali ($3,3 \pm 1,6$ mg/dl vs $1,1 \pm 0,5$ mg/dl, $p = 0,001$) e un incremento dell'8% dei valori di colesterolo HDL (fig.8).

Il trattamento farmacologico non ha influito sui valori dei tioli totali plasmatici, mentre i livelli di taurina risultano significativamente aumentati in tutti e tre i gruppi trattati (fig.9-a). In seguito ad un anno di terapia la concentrazione di taurina si normalizza sui livelli di una popolazione normale (oltre $60 \mu\text{mol/L}$). Anche in questo caso l'incremento più accentuato si osserva nel terzo gruppo con un aumento dei livelli di taurina del 31% dopo un anno di trattamento farmacologico (fig 9-d).

Come riportato in (tab.4) in seguito alla terapia di un anno, si osserva una riduzione del 19% dei valori All/UA e della MDA in tutti i pazienti, con un decremento più accentuato nel terzo gruppo dove si osserva una riduzione dei livelli di All/AU del 28% (fig 10) e dei livelli di MDA del 26% (fig 11). Sempre in seguito ad un anno di terapia si osserva un incremento tioli nella loro forma

ridotta con un aumento del 20,7 % dello stato redox dei tioli in tutti i gruppi trattati ma con un effetto leggermente più pronunciato nel terzo gruppo in seguito al trattamento di un anno (+24,7%). La capacità antiossidante totale valutata con il metodo della TAEC non è cambiata in seguito al trattamento farmacologico in nessun gruppo trattato (fig. 12). I valori medi dei livelli di taurina sono inversamente correlati sia prima dell'inizio del trattamento che dopo 4, 8 e 12 mesi dall'inizio della terapia, con i valori medi di MDA ($r = -0,978$, $p = 0,002$) e del rapporto All/UA ($r = -0,975$, $p = 0,025$) in tutti i pazienti inclusi nello studio, mentre in seguito a randomizzazione la correlazione inversa è presente solo nel terzo gruppo con $r = -0,992$, $p = 0,008$ per la MDA e $r = -0,956$, $p = 0,044$ per All/AU. I valori medi della taurina sono inoltre positivamente correlati con i valori dei tioli totali plasmatici ($r = 0,954$, $p = 0,046$) e la correlazione è più forte sempre nel terzo gruppo dove viene somministrata la dose Eze/Simba 10/40 mg/die. In seguito al trattamento farmacologico non è stato riscontrato un miglioramento della funzionalità renale con valori di VFG al tempo basale e dopo un anno di trattamento pressoché invariati $VFG = 55 \pm 30 \text{ ml/min} \times 1,73 \text{ m}^2$, $59 \pm 40 \text{ ml/min} \times 1,73 \text{ m}^2$ ($p = 0,18$ ANOVA). Anche i livelli di proteinuria risultano invariati in seguito ad un anno di terapia mostrando i rispettivi valori basali e post trattamento di $0,99 \pm 1,27 \text{ g/24 h}$ vs $0,85 \pm 0,85 \text{ g/24 h}$ ($p = 0,75$ ANOVA).

10. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'insufficienza renale è associata ad un aumento dello stress ossidativo in tutte le fasi della patologia con l'incremento di una serie di biomarcatori di stress ossidativo quali la MDA, prodotti di ossidazione proteica e aumentata produzione di LDL ossidate [Argarwal 2004; Diepeveen et al, 2004; Witko-Sarsat et al 1998; Ikizler TA et al 2002]. Sebbene la condizione di stress ossidativo in questa classe di pazienti sia ben stata definita, non è ancora ben chiaro il meccanismo che ne determina l'incremento. Sembra inoltre che l'incremento dei ROS possa contribuire ad accelerare la progressione del danno renale, infatti alcuni studi riportano una relazione inversa tra i parametri dello stress ossidativo e la VFG [Go et al, 2004]. In accordo con queste osservazioni abbiamo riscontrato nei pazienti con insufficienza renale appartenenti al 3°-4° stadio della patologia, un significativo aumento di biomarcatori indicatori dello stress ossidativo, quali i livelli plasmatici di MDA, del rapporto All/UA e più bassi livelli dei tioli nella loro forma ridotta, rispetto ai soggetti di controllo. In seguito ad un anno di terapia non abbiamo però osservato un miglioramento della funzionalità renale in quanto i valori di VFG risultano pressoché invariati in tutti e tre i gruppi rispetto ai pazienti di controllo. La terapia ipolipemizzante somministrata ai pazienti nefropatici per ridurre il rischio di insorgenza di patologie cardiovascolari potrebbe in un qual modo influenzare lo stato ossidativo dei pazienti.

Il nostro studio mira a valutare i parametri dello stress ossidativo in pazienti nefropatici sotto trattamento ipolipemizzante, in relazione ai livelli plasmatici di taurina, un potente antiossidante fisiologico con proprietà antiaterosclerotiche e buon indicatore dello stato ossidativo in questa classe di pazienti. Malgrado sia

stato riportato che i livelli di taurina diminuiscono notevolmente negli ultimi stadi della patologia renale in seguito a terapia dialitica [Suliman et al, 1996] non si hanno molte informazioni riguardo i livelli di taurina in pazienti nefropatici appartenenti al 3-4° stadio della patologia.

Nel nostro studio abbiamo riscontrato che al tempo basale tutti i pazienti presentano livelli di taurina più bassi (-18%) rispetto ai soggetti di controllo. In seguito alla terapia ipolipemizzante abbiamo osservato che i livelli di taurina aumentano e si ristabiliscono come i valori dei soggetti sani. L'aumento è stato osservato in tutti e tre i gruppi trattati ma, l'incremento più accentuato è stato riscontrato nei pazienti appartenenti al terzo gruppo (Eze/Sim 10/40 mg/dia), dove in seguito ad un anno di terapia è stato osservato un incremento del 31% dei livelli di taurina plasmatica. Nel terzo gruppo, sottoposto a terapia con le più alte dosi di statina, i livelli di taurina si sono ristabiliti intorno ai valori di una popolazione sana, cioè > di 60 µmol/L. È stato interessante osservare che l'incremento dei livelli di taurina non è determinato da un incremento del suo precursore, la cisteina come precedente riportato da altri autori [Milionis et al, 2003]. Infatti in seguito alla valutazione dei tioli a basso peso molecolare, questi rimangono invariati rispetto ai valori basali in tutti e tre i gruppi anche al termine della terapia farmacologica. Questo sta ad indicare che il trattamento farmacologico non influenza i livelli plasmatici della taurina e il suo incremento è attribuibile ad altre cause. La taurina viene completamente riassorbita a livello del tubulo renale prossimale, di conseguenza un ripristino della funzionalità renale in seguito alla terapia potrebbe spiegare l'innalzamento dei livelli di taurina. Anche in questo caso non abbiamo però riscontrato un miglioramento della funzionalità renale in nessun gruppo di pazienti in quanto i valori di VFG o proteinuria,

indicatori del grado di funzionalità dell'organo, rimangono pressoché invariati durante l'intero trattamento. Questi dati suggeriscono, anche in questo caso, che l'incremento di taurina osservato è attribuibile a cause differenti che il ripristino della funzionalità renale. L'aumento dei livelli di taurina osservato, è probabilmente una conseguenza del trattamento farmacologico a cui sono stati sottoposti i tre gruppi di pazienti. Questa ipotesi è stata proposta precedentemente da Murakami et al che spiega come una terapia ipolipemizzante possa incrementare i livelli di taurina plasmatica [Murakami et al, 2010]. Questo è una conseguenza del fatto che il trattamento ipolipemizzante fa sì che i livelli di colesterolo si stabilizzino in un range di valori normali. Ne consegue che la quota di colesterolo che deve essere eliminata dall'organismo sotto forma di acidi biliari sia inferiore rispetto alla quota che viene eliminata in un soggetto ipercolesterolemico. Infatti il colesterolo viene principalmente eliminato sotto forma di acidi biliari che dopo essersi formati a livello epatico a partire da una molecola di colesterolo, si coniugano con aminoacidi come taurina e glicina per essere poi escreti nella bile. Questa, rappresenta la principale via di eliminazione degli steroli dall'organismo. È quindi la riduzione dei livelli di colesterolo che regola indirettamente un incremento dei livelli di taurina plasmatica in quanto la quota di taurina coniugata agli acidi biliari è drasticamente ridotta passando da una condizione di iperlipidemia a una condizione di normolipidemia. Il conseguente incremento plasmatico della taurina che si ripristina ai livelli di una coorte di pazienti normali, è determinato dal fatto che questa molecola non essendo catturata a livello epatico per la formazione degli acidi biliari secondari, aumenterà a livello plasmatico. In accordo con questa ipotesi, ritroviamo in letteratura dati che evidenziano una correlazione inversa tra i livelli di taurina

plasmatica e i livelli di colesterolo [Choi et al, 2006]. Altri studi, atti a valutare i livelli di taurina plasmatica in un gruppo a regime alimentare ipercolesterolemico, evidenziano come in accordo con l'ipotesi enunciata, i livelli di taurina si riducono notevolmente a livello plasmatico. Infatti essendo maggiore la quota di colesterolo da eliminare sotto forma di acid biliari sarà maggiore la quota di taurina captata a livello epatico che contribuirà alla loro sintesi, determinando una riduzione della stessa a livello plasmatico [Yokogoshi and Oda 2002]. Al contrario come proposto da Murakami et al [Murakami et al, 2010], una terapia ipolipemizzante con statine (che riducono la sintesi del colesterolo endogeno inibendo l'enzima idrossi-metil-glutaril-CoA reduttasi) o ezetimibe (che riduce l'assorbimento del colesterolo a livello intestinale) che riducono i livelli di colesterolo plasmatico, determina un incremento dei livelli plasmatici di taurina in quanto la quota catturata a livello epatico è notevolmente inferiore. Malgrado siano ormai noti dalla letteratura gli effetti delle statine nel ridurre lo stress ossidativo in pazienti diabetici o con un quadro clinico dislipidemico [Kater et al 2010, Kostapanos et al 2011], tutt'oggi si hanno poche informazioni riguardo agli effetti antiossidanti di una terapia combinata in pazienti con MRC [Cachofeiro et al, 2008]. Partendo da questi presupposti abbiamo valutato e monitorato nella coorte di pazienti reclutati alcuni parametri indicatori dello stato ossidativo quali i valori plasmatici di MDA, del rapporto All/UA e dei livelli dei tioli allo stato ridotto, per valutare l'effetto della terapia combinata Eze/simva a differenti concentrazioni, nell'arco di un anno di terapia. Le determinazioni effettuate al tempo basale evidenziano una relazione inversa tra i parametri dello stress ossidativo e la VFG, condizione già riscontrata da differenti autori [Witko-Sarsat et al, 1998; Yilmaz et al, 2006; Dounusi et al, 2006]. Nel corso della terapia

abbiamo riscontrato una riduzione dei livelli di MDA e del rapporto All/UA e la riduzione più accentuata è stata riscontrata nel terzo gruppo in cui è stata somministrata una terapia combinata EZE/SIM 10/40 mg/die. Sempre nel terzo gruppo abbiamo osservato una riduzione più pronunciata rispetto agli due gruppi, dello stato redox dei tioli. In seguito alla valutazione della capacità antiossidante plasmatica totale (TAEC), non abbiamo riscontrato nessun miglioramento dopo un anno di terapia. Questo suggerisce che il trattamento farmacologico non migliora la capacità antiossidante di questi pazienti in accordo con quanto già descritto in letteratura [Cachofeiro V et al, 2008]. Nell'insieme i risultati osservati indicano che in seguito alla somministrazione della terapia si ha una riduzione significativa dello stress ossidativo in tutte e tre i gruppi di pazienti. È stata però dimostrata per la prima volta una relazione inversa tra la riduzione dei parametri dello stress ossidativo e l'aumento dei livelli di taurina plasmatica durante l'intero trattamento ipolipemizzante. Abbiamo osservato infatti, una riduzione lineare dei parametri dello stress ossidativo in relazione alla somministrazione della terapia, in tutti e tre i gruppi di pazienti trattati. Allo stesso tempo abbiamo osservato un incremento lineare dei livelli di taurina dopo 4, 8, 12 mesi dall'inizio della terapia in tutti e tre i gruppi trattati. Inoltre i valori medi dei livelli di MDA e All/UA valutati a 4, 8, e 12 mesi dall'inizio del trattamento risultano essere inversamente correlati ai livelli di taurina valutati nello stesso arco di tempo in tutti e tre i gruppi sottoposti a terapia. Anche in questo caso la correlazione inversa tra questi due parametri è più forte nel terzo gruppo. È ampiamente nota l'azione antiossidante della taurina che rispetto ad altri antiossidanti fisiologici non agisce mediante un meccanismo scavenger nei confronti dei ROS, ma pare agisca mediante un meccanismo differente che regola la produzione di specie reattive

dell'ossigeno [Hansen et al, 2006]. Pare che la taurina sia in grado modulare lo stress ossidativo in quanto stabilizzando l'ambiente mitocondriale è in grado di ridurre e/o inibire la produzione di ROS a livello della catena di trasporto mitocondriale e questa sua azione gli conferisce un ulteriore ruolo da antiossidante. Il meccanismo con il quale attua la sua azione non è ancora del tutto chiaro ma, alcuni autori hanno proposto che la presenza della taurina all'interno del mitocondrio stabilizzi l'ambiente circostante e questo favorisce una corretta sintesi delle proteine della catena di trasporto degli elettroni. In particolare, alcuni autori hanno ipotizzato che il legame della taurina con particolari molecole di t-RNA garantisca la corretta sintesi delle proteine della catena respiratoria [Schaffel et al, 2009; Jong et al, 2011]. È logico dedurre che una carenza di taurina comporta una ridotta produzione dei componenti della catena respiratoria e come risultato, il flusso attraverso la catena di trasporto degli elettroni diminuisce, con conseguente accumulo di elettroni e aumentata produzione di ROS. Il ripristino dei livelli normali di taurina determina un aumento delle molecole di taurina che si coniugano con le molecole di t-RNA. Ciò comporta una corretta sintesi delle proteine della catena di trasporto mitocondriale con il conseguente ripristino di una corretta attività di trasporto degli elettroni con una maggiore produzione di ATP a scapito dell'anione superossido [Schaffel et al, 2009; Jong et al, 2011]. Il meccanismo non è ancora oggi del tutto chiaro ma potremo ipotizzare che un aumento dei ROS nei pazienti con MRC può essere dovuto a una maggiore produzione degli stessi influenzata da bassi livelli di taurina, piuttosto che a una difesa antiossidante compromessa. In conclusione i nostri dati indicano che nei pazienti con MRC sottoposti a terapia ipolipemizzante, si osserva sia un aumento dei livelli di taurina che un notevole

miglioramento dello stato ossidativo del paziente. Inoltre è stata riscontrata una correlazione inversa tra i valori medi di taurina e i valori medi della MDA e All/UA valutati nei diversi intervalli di tempo di terapia. I migliori risultati si osservano sempre in seguito alla somministrazione di una terapia combinata e con le più alte dosi di simvastatina, ma anche i trattamenti con più basse dosi risultano comunque efficaci. Questo effetto trova per la prima volta una spiegazione razionale, infatti abbiamo ipotizzato che la riduzione del colesterolo nel siero consente di ripristinare i livelli normali di taurina che, a sua volta, stabilizzando l'ambiente mitocondriale favorisce la produzione di ATP a scapito di specie reattive dell'ossigeno.

11. TABELLE E FIGURE

Tabella 1. Stadiazione della malattia renale cronica: il valore della velocità di filtrazione glomerulare è indicativo della funzionalità renale. Con l'aggravarsi della nefropatia la velocità di filtrazione glomerulare diminuisce

STADIO	DESCRIZIONE	VFG (ml/min/1.73m ²)	INTERVENTO
1	Danno renale con VFG normale o aumentato	≥ 90	Rallentare la progressione e i rischi associati
2	Lieve riduzione di VFG	89-60	Stima della progressione della MRC
3	Moderata riduzione di VFG	59-30	Valutazione e trattamento delle complicanze associate
4	Severa riduzione di VFG	29-15	Educazione del paziente per un possibile trapianto renale o dialisi
5	IR terminale con compromessa funzionalità renale	< 15	Terapia dialitica o trapianto d'organo

Tabella 2. Fattori di rischio comuni nella popolazione generale e prevalenti nel paziente nefropatico

Comuni nella popolazione generale	Prevalenti nel nefropatico
<ul style="list-style-type: none"> • Età avanzata • Ipertensione • Colesterolo LDL • Diabete • Sedentarietà • Menopausa • Familiarità per la malattia CV • Ipertrofia ventricolare 	<ul style="list-style-type: none"> • Albuminuria/proteinuria • Particelle di colesterolo LDL piccole e dense • Lipoproteina (a) • Calcificazioni vascolari • Stress ossidativo • Infiammazione • Fattori trombo genetici • Disfunzione endoteliale • Sovraccarico di liquidi • Iperattività simpatica

Tabella 3: Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti e dei controlli.
Trattamento terapeutico: gruppo 1 ezetimibe 40 mg/die; gruppo 2 Eze/Simva 10/20 mg/die; gruppo 3 eze/Simva 10/40 mg/die

	Controlli (n=30)	Tutti i pazienti(n=30)	Gruppo 1 (n=10)	Gruppo 2 (n=10)	Gruppo 3 (n=10)
	Media \pm DS o Range mediana				
Sesso [f/m] (%)	11/19 (37%)	11/19 (37%)	2/8 (20%)	4/6 (40%)	5/5 (50%)
Età (anni)	59 \pm 10	60 \pm 11	63 \pm 11	58 \pm 12	59 \pm 9
<i>Profilo renale</i>					
Creatinina (mg/dl)	0,8 \pm 0,24	1,75 \pm 0,77 ^{***}	1,92 \pm 0,98	1,63 \pm 0,62	1,70 \pm 0,71
VFG (ml/min x 1,73 m ²)	-	55 \pm 30	61 \pm 48	52 \pm 19	53 \pm 8
Proteinuria (g/24 h)	-	0,99 \pm 1,27	0,91 \pm 0,63	0,81 \pm 0,81	1,25 \pm 2,00
<i>Profilo lipidico</i>					
Colesterolo totale (mg/dl)	208 \pm 42	239 \pm 43 ^{**}	232 \pm 34	230 \pm 41	254 \pm 53
C-LDL (mg/dl)	131 \pm 39	160 \pm 37 ^{**}	164 \pm 34	156 \pm 32	165 \pm 47
C-HDL (mg/dl)	56 \pm 18	49 \pm 15	47 \pm 12	57 \pm 19	3,26 \pm 1,71
LDL /HDL ratio	2,5 \pm 1,1	3,5 \pm 1,3 ^{**}	3,75 \pm 1,00	3,50 \pm 1,12	151 \pm 80
<i>Tioli totali</i>					
t-CysGly (μ mol/L)	34,8 \pm 6,9	35,6 \pm 8,9	38,8 \pm 9,1	34,4 \pm 8,3	33,6 \pm 9,2
t-Hcy (μ mol/L)	10,7 \pm 3,2	18,4 \pm 11,2 ^{**}	20,7 \pm 15,0 ^{**}	18,5 \pm 11,6	16,0 \pm 5,9
t-Cys (μ mol/L)	222 \pm 49	299 \pm 67 ^{***}	296 \pm 62	281 \pm 51	319 \pm 85
t-GSH (μ mol/L)	4,9 \pm 1,5	6,5 \pm 2,9 ^{**}	6,43 \pm 2,69	5,50 \pm 1,66	7,45 \pm 3,89
Glu-Cys (μ mol/L)	3,2 \pm 0,7	4,3 \pm 1,1 ^{***}	4,41 \pm 1,06	3,94 \pm 1,03	4,53 \pm 1,23
t-Totale (μ mol/L)	275 \pm 55	364 \pm 75 ^{***}	367 \pm 63	344 \pm 60	381 \pm 99
<i>Indicatori SO</i>					
MDA (nmol/L)	140 \pm 81	218 \pm 147 [*]	248 \pm 95	174 \pm 163	230 \pm 163
All/UA ratio (%)	0,90 \pm 0,10	1,5 \pm 0,7 ^{***}	1,7 \pm 0,10	1,1 \pm 0,4 ^a	1,6 \pm 0,6
r-Tioli (%)	10,3 \pm 1,5	8,2 \pm 2,1 ^{***}	8,6 \pm 2,1	8,4 \pm 1,9	7,7 \pm 2,4
<i>Pressione del sangueP</i>					
sistolica (mmHg)	126 \pm 8	130 \pm 9	131 \pm 9	127 \pm 11	132 \pm 8
diastolica (mmHg)	80 (70-90)	80 (60-95)	80 (70-85)	80 (60-95)	80 (70-90)

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 rispetto ai controlli; dopo la randomizzazione le determinazioni basali nei tre sottogruppi sono simili eccetto per ^a p < 0,05 rispetto al gruppo 1 e 3

Tabella 4: Effetto del trattamento ipolipemizzante sui parametri dello stress ossidativo

	Basale	4 mesi	8 mesi	12 mesi	valore p
MDA (nmol/L)					
Tutti i pazienti	218 ± 143	195 ± 129	183 ± 131	176 ± 123*	0.004 (0.97)
Sim 40	248 ± 95	224 ± 113	227 ± 136	220 ± 129	0.250
E/S 10/20	174 ± 163	156 ± 144	146 ± 140	135 ± 119	0.162
E/S 10/40	231 ± 163	206 ± 133	177 ± 114	172 ± 116	0.03 (0.82)
All/UA (%)					
Tutti i pazienti	1.47 ± 0.72	1.33 ± 0.68	1.23 ± 0.56	1.19 ± 0.51	0.002 (0.98)
Sim 40	1.70 ± 0.97	1.66 ± 0.95	1.52 ± 0.75	1.53 ± 0.63	0.231
E/S 10/20	1.14 ± 0.35	1.03 ± 0.21	1.02 ± 0.23	0.92 ± 0.30	0.056
E/S 10/40	1.56 ± 0.64	1.29 ± 0.59***	1.16 ± 0.48*	1.13 ± 0.39	0.03 (0.91)
Tioli ridotti (%)					
Tutti i pazienti	8.2 ± 2.1	8.4 ± 3.1	9.4 ± 2.7*	9.9 ± 2.7***	<0.0001 (0.96)
Sim 40	8.6 ± 2.1	8.1 ± 4.4	9.4 ± 2.7	10.1 ± 2.2*	0.021 (0.64)
E/S 10/20	8.4 ± 1.9	8.4 ± 2.7	9.7 ± 3.1	10.0 ± 4.1	0.077
E/S 10/40	7.7 ± 2.4	8.7 ± 2.0	9.1 ± 2.4	9.6 ± 1.4*	0.17 .68)

*p\0.05; ** p\0.01; *** p\0.001 vs basali. ANOVA e Bonferroni correction

Figura 1. Il processo di perossidazione lipidica inizia con l'estrazione di un idrogeno ad una molecola di acido grasso polinsaturo (PUFA). Il carbonio radicale L[•] presente nella catena idrocarburica, subisce un riarrangiamento per formare un diene coniugato che successivamente reagisce con l'ossigeno molecolare per formare un perossiradicale LOO[•]. Questo prodotto (LOO[•]) è altamente reattivo e può ciclizzare e formare un lipoperossido ciclico.

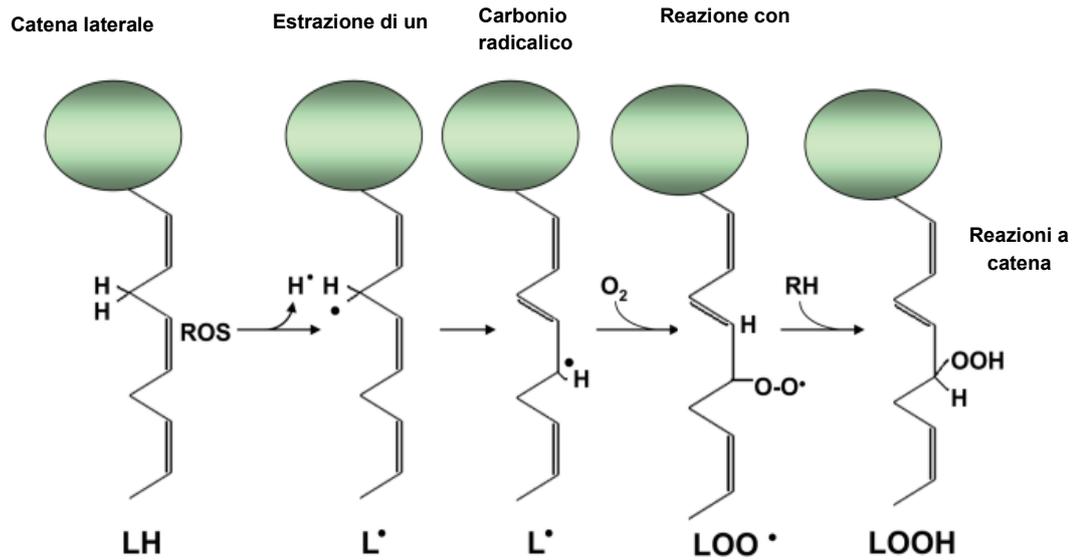


Figura 2. Molecola dell'acido urico

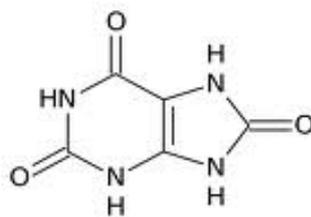


Figura 3. Metabolismo dell'acido urico

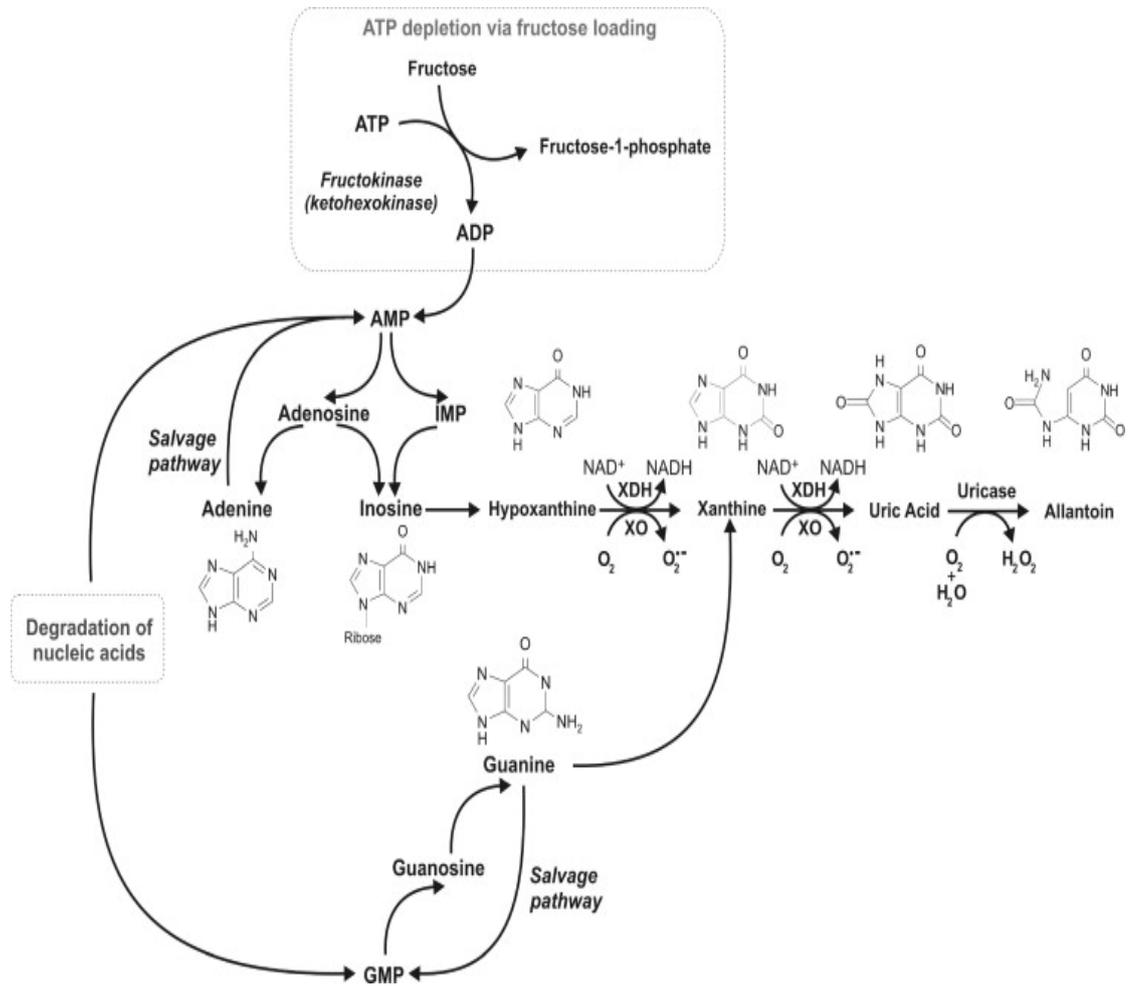


Figura 4: Molecola della taurina

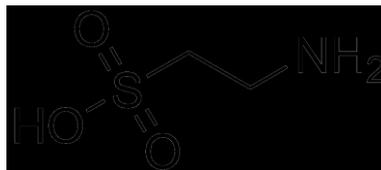


Figura 5. Metabolismo della taurina. *CBS* cistationina beta sintasi, *CD* cisteina deossigenasi, *CL* cisteina liasi, *CSE* cistationina gamma liasi, *GCL* glutammato cistein ligasi, *GGTP* gamma glutamil transpeptidasi, *GPX* glutazione perossidasi, *GR* glutazione reduttasi, *GS* glutazione sintetasi, *HD* ipotaurina deidrogenasi, *MS* metionina sintetasi, *SD* sulfoalanina decarbossilasi

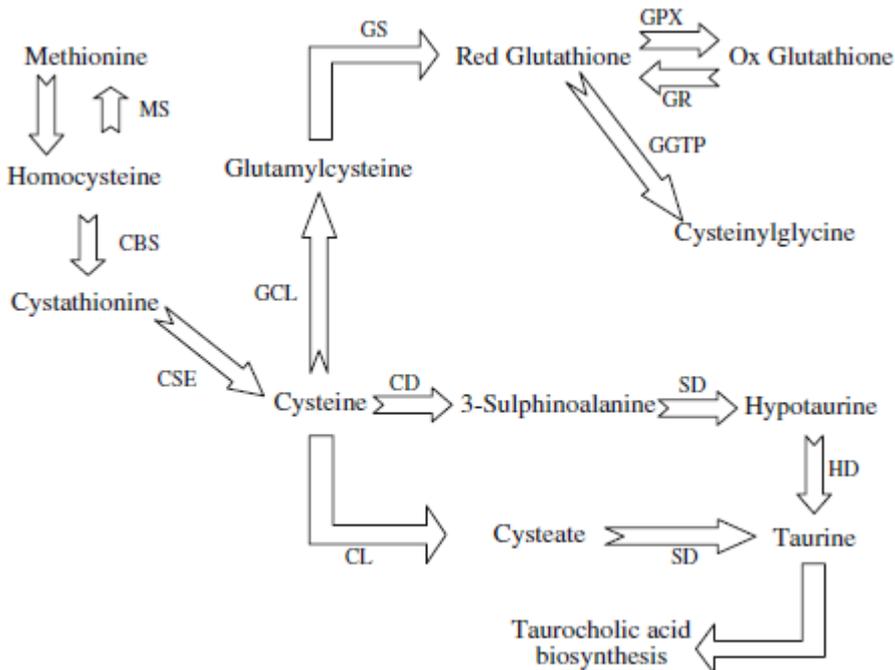


Figura 6: Gli acidi biliari

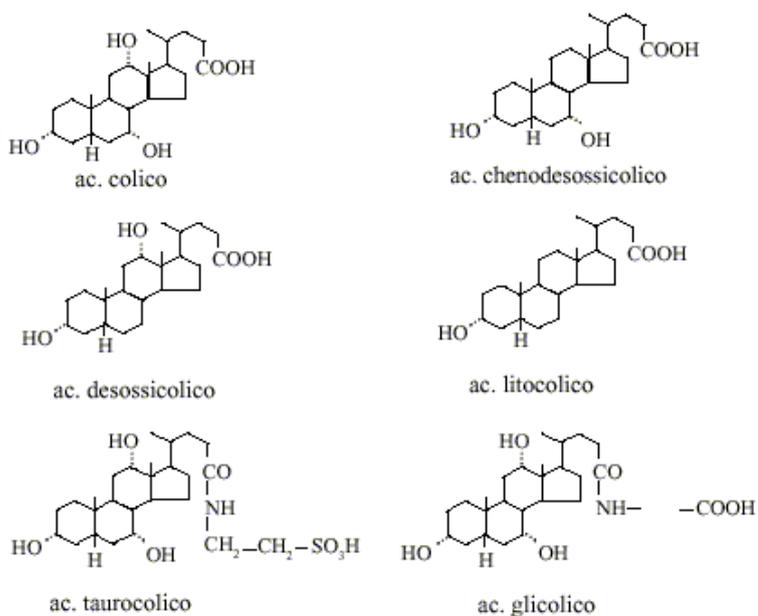


Figura 7: La sintesi del colesterolo

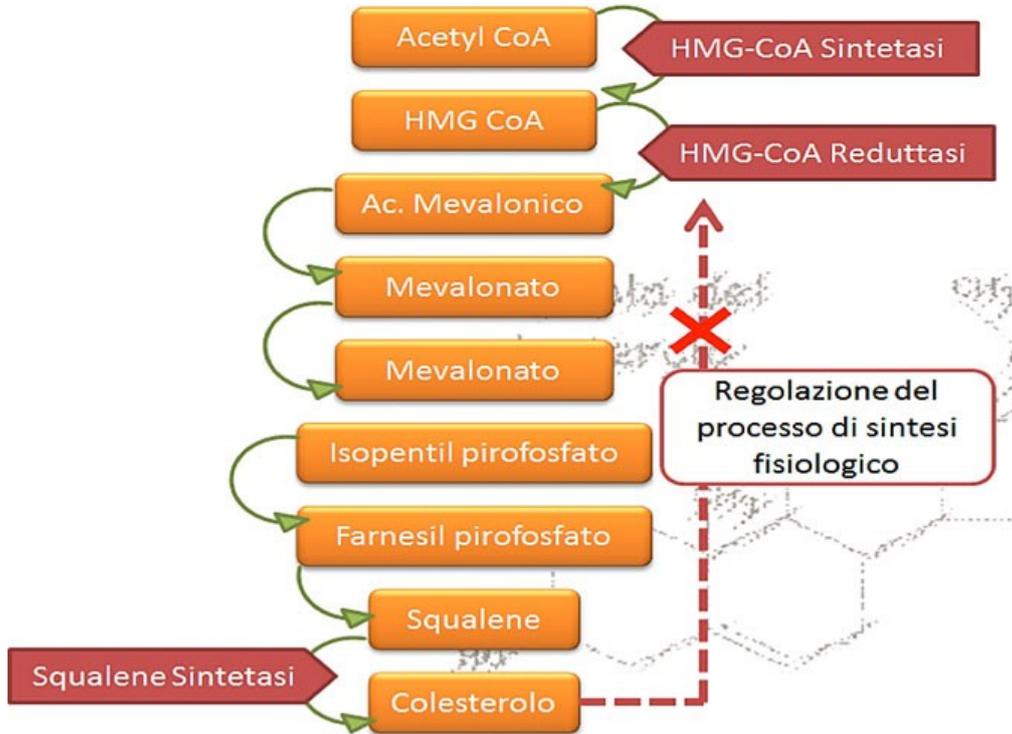


Figura 8: Effetto del trattamento farmacologico sui parametri dei lipidi plasmatici. **(A)** livelli del colesterolo totale (mg/dl). **(B)** livelli di colesterolo LDL (mg/dl) **(C)** livelli di colesterolo HDL (mg/dl) **(D)** livelli dei trigliceridi plasmatici (mg/dl)

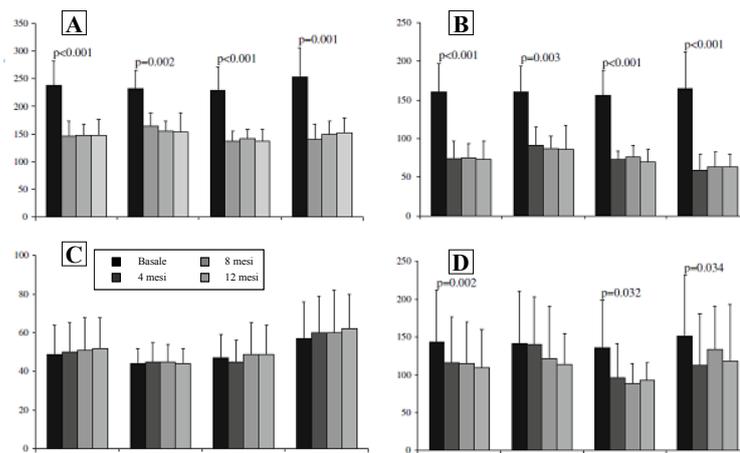


Figura 9. Effetto del trattamento farmacologico sui livelli di taurina plasmatici (A) in tutti i pazienti e per i gruppi che ricevono trattamenti farmacologici differenti (B) gruppo 1 (n=10) che riceve Sim 40 mg/die (C) gruppo 2 (n=10) che riceve Eze/Sim 10/20 mg/die (D) gruppo 3 (n=10) che riceve Eze/Sim 10/40 mg/die. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 vs basali, il valore di p è stato valutato mediante analisi statistica ANOVA.

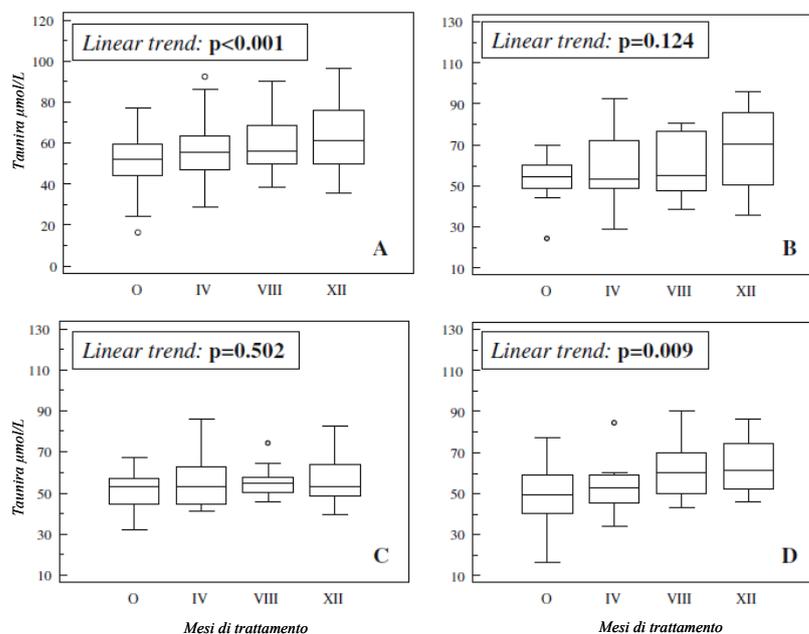


Figura 10: Effetto del trattamento ipolipemizzante sui livelli del rapporto All/AU

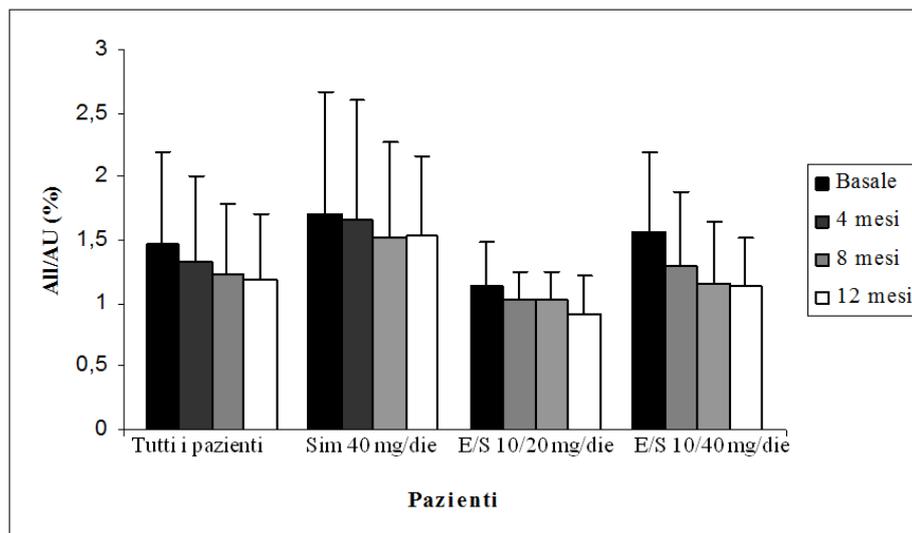


Figura 11: Effetto del trattamento ipolipemizzante sui livelli di malondialdeide

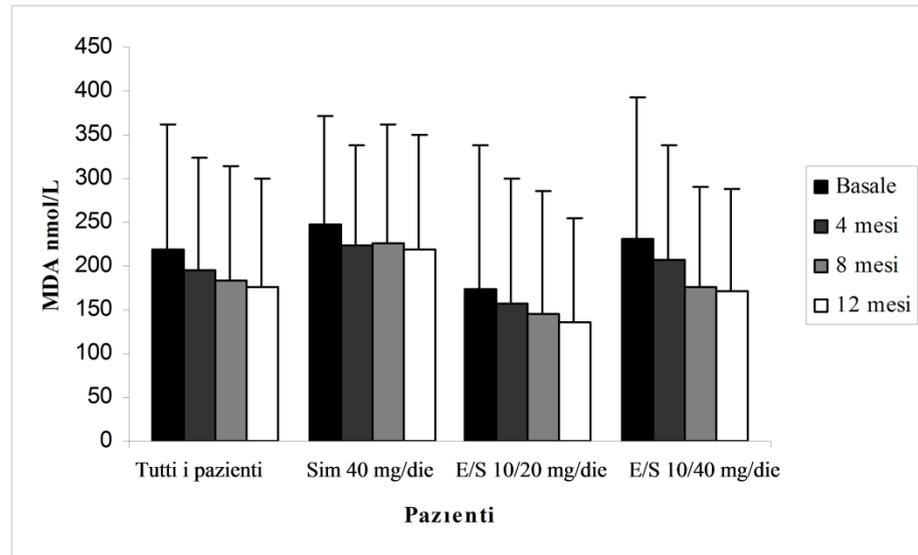
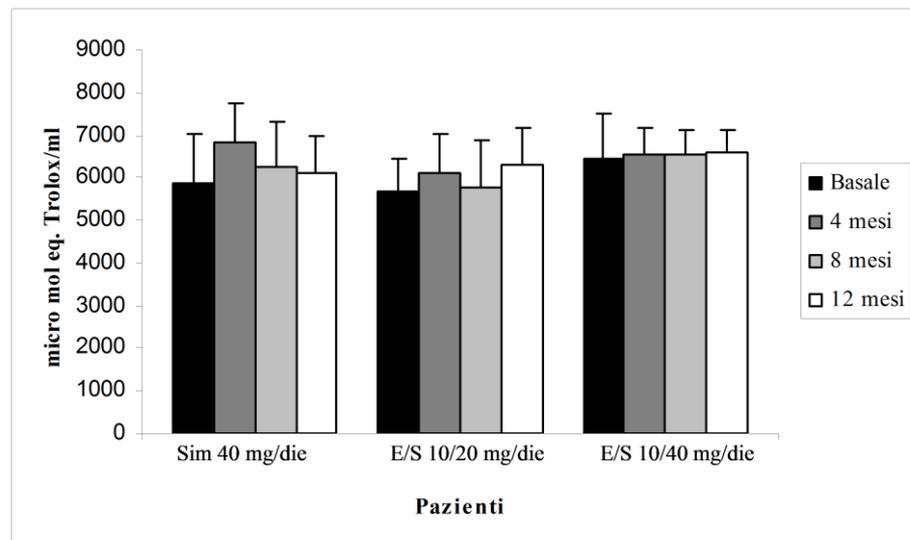


Figura 12: Effetto del trattamento ipolipemizzante sulla capacità antiossidante plasmatica misurata con il metodo della TAEC (Total Antioxidant Capacity Equivalent)



12. BIBLIOGRAFIA

- Agarwal R. *Chronic kidney disease is associated with oxidative stress independent of hypertension*. Clin Nephro 2004; 161:377–383.
- Afzali B, Haydar AA, Vinen K, Goldsmith DJ. *From Finland to fatland: beneficial effects of statins for patients with chronic kidney disease*. J Am Soc Nephrol. 2004; 15: 2161-8.
- Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S, Voglic SJ, Fukumoto Y, Furukawa Y, Shiomi M, Schoen FJ, Libby P. *An HMGCoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro*. Circulation 2001; 103:276-83.
- Akahori, S, Ejiri, K, Sekiba, K. *Taurine concentrations in fetal, neonatal and pregnant rats*. Acta Med Okayama 1986; 40:93-101.
- Appel G. *Lipid abnormalities in renal disease*. Kidney Int 1991; 39:169-83.
- Appel GB, Appel AS. *Angiotensin II receptor antagonists: role in hypertension, cardiovascular disease, and renoprotection*. Prog Cardiovasc Dis. 2004; 47:105-15.
- (1) Aviram M, Hussein O, Rosenblat M, Schlez S, Hayek t, Keidar S. *Interactions of platelets, macrophages, and lipoproteins in hypercholesterolemia: antiatherogenic effects of HMG-CoA reductase inhibitor therapy*. J Cardiovasc Pharmacol 1998; 31:39–45.
- (2) Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS. *Atorvastatin and gemfibrozil metabolites, but not the parent drugs, are potent antioxidants against lipoprotein oxidation*. Atherosclerosis 1998; 138:271–280.

- Azuma, J, Hasegawa, H, Sawamura, A, Awata, N, Ogura, K, Harada H, Yamamura Y, Kishimoto S. *Therapy of congestive heart failure with orally administered taurine*. Clin Ther 1983; 5:389-398.
- Azzi A, Davies KJ, Kelly F. *Free radical biology — terminology and critical thinking*. FEBS Lett 2004; 558:3– 6.
- Baigent C, Landray MJ, Reith C, Emberson J, Wheeler DC, Tomson C, Wanner C, Krane V, Cass A, Craig J, Neal B, Jiang L, Hooi LS, Levin A, Agodoa L, Gaziano M, Kasiske B, Walker R, Massy ZA, Feldt-Rasmussen B, Krairitichai U, Ophascharoensuk V, Fellström B, Holdaas H, Tesar V, Wiecek A, Grobbee D, de Zeeuw D, Grönhagen-Riska C, Dasgupta T, Lewis D, Herrington W, Mafham M, Majoni W, Wallendszus K, Grimm R, Pedersen T, Tobert J, Armitage J, Baxter A, Bray C, Chen Y, Chen Z, Hill M, Knott C, Parish S, Simpson D, Sleight P, Young A, Collins R; SHAR Investigators. *The effects of lowering LDL cholesterol with simvastatin plus ezetimibe in patients with chronic kidney disease (Study of Heart and Renal Protection): a randomised placebo-controlled trial*. Lancet 2011; 377:2181-92
- Batista MC, Welty FK, Diffenderfer MR, Sarnak MJ, Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Asztalos BF, Dolnikowski GG, Brousseau ME, Marsh JB. *Apolipoprotein A-I, B-100, and B-48 metabolism in subjects with chronic kidney disease, obesity, and the metabolic syndrome*. Metabolism 2004; 53: 1255-61.
- Ballantyne CM, Corsini A, Davidson MH, Holdaas H, Jacobson TA, Leitersdorf E, März W, Reckless JP, Stein EA. *Risk for myopathy with statin therapy in high-risk patients*. Arch Intern Med 2003; 163: 553-64.
- Beaudoux JL, Peynet J, Bonnefont-Rousselot D, Therond P, Delattre J, Legrand A. *Cellular sources of reactive oxygen and nitrogen species. Roles in signal transcription pathways*. Ann Pharm Fr 2006; 64:373–381.

- Berl T, Henrich W. *Kidney-heart interactions: epidemiology, pathogenesis, and treatment*. Clin J Am Soc Nephrol 2006; 1:8–18.
- Blake GJ, Ridker PM. *Novel clinical markers of vascular wall inflammation*. Circ Res 2001; 89:763–771.
- Boekholdt SM, Hovingh GK, Mora S, Arsenault BJ, Amarenco P, Pedersen TR, LaRosa JC, Waters DD, DeMicco DA, Simes RJ, Keech AC, Colquhoun D, Hitman GA, Betteridge DJ, Clearfield MB, Downs JR, Colhoun HM, Gotto AM Jr, Ridker PM, Grundy SM, Kastelein JJ. *Very low levels of atherogenic lipoproteins and the risk for cardiovascular events: a meta-analysis of **statin** trials*. J Am Coll Cardiol 2014; 5;64(5):485-94.
- Bombiani GD, Galluzzo A. *Radicali liberi in fisiologia e patologia*. Edizioni Minerva Medica, Torino 1990; Pp19-24.
- Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. *Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23:168-75.
- Bradford RH, Shear CL, Chremos AN, Dujovne C, Downton M, Franklin FA, Gould AL, Hesney M, Higgins J, Hurley DP, Langendorfer A, Nash DT, Pool JL, Schnaper H. *Expanded clinical evaluation of lovastatin (EXCEL) study results, I: efficacy in modifying plasma lipoproteins and adverse event profile in 8245 patients with moderate hypercholesterolemia*. Arch Intern Med 1991; 151:43– 49.
- Brigelius R., Lenzen R., Sies H. *Increase in hepatic mixed disulphide and glutathione disulphide levels elicited by paracqua*. Biochem Pharmacol 1982; 31:1637–1641.
- Brown MS, Goldstein JL. *A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis*. Science 1986; 232:34–47.

- Cachofeiro V, Goicochea M, de Vinuesa SG, Oubinã P, Lahera V, Lunõ J. *Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease*. *Kidney Int Suppl* 2008; 111:S4–S9.
- Cai H, Harrison DG. *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress*. *Circ Res* 2000; 87: 840–44.
- Caporaso N. *The molecular epidemiology of oxidative damage to DNA and cancer*. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:1263–5.
- Carru C, Deiana L, Sotgia S, Pes GM, Zinellu A. *Plasma thiols redox status by laser-induced fluorescence capillary electrophoresis*. *Electrophoresis* 2004; 25:882-9.
- Chambers JC, Ueland PM, Wright M, Doré CJ, Refsum H, Kooner J S. *Investigation of relationship between reduced, oxidized, and protein-bound homocysteine and vascular endothelial function in healthy human subjects*. *Circ. Res.* 2001; 89:187–192.
- Chen J, Muntner P, Hamm LL, Jones DW, Butuman V, Fonseca V, Whelton PKHe J. *The metabolic syndrome and chronic kidney disease in U.S. adults*. *Ann Intern Med* 2004; 3:140-167.
- Choi MJ, Kim JH, Chang KJ. *The effect of dietary taurine supplementation on plasma and liver lipid concentrations and free amino acid concentrations in rats fed a high-cholesterol diet*. *Adv Exp Med Biol* 2006; 583:235–242.
- Conard S, Bays H, Leiter LA, Bird S, Lin J, Hanson ME, Shah A, Tershakovec AM. *Ezetimibe added to atorvastatin compared with doubling the atorvastatin dose in patients at high risk for coronary heart disease with diabetes mellitus, metabolic syndrome or neither*. *Diabetes Obes Metab* 2010; 12:210–218.
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. *Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease*. *FASEB J* 2003,17:1195–214.

- Coresh J, Astor BC, Greene T, Eknoyan G, Levey AS. *Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey*. Am J Kidney Dis 2003; 41:1-12.
- Cornelli U, Cornelli M, Terranova R, Luca S, Belcaro G. *Importanza dello stress ossidativo come fattore di rischio per la morbilità*”. La Medicina Biologica 2000; 1:13–18.
- Cryer A. *Tissue lipoprotein lipase activity and its action in lipoprotein metabolism*. Int J Biochem 1981; 13: 525-41.
- Culeton BF, Larson MG, Wilson PF, Evans JC, Parfrey PS, Levy D. *Cardiovascular disease and mortality in a community-based cohort with mild renal insufficiency*. Kidney International 1999; 22:14-9.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. *Biomarkers of oxidative damage in human disease*. Clinical Chemistry 2006; 52:601–623.
- Davignon J. *The cardioprotective effects of statins*. Curr Atheroscler Rep 2004, 6:27-35.
- Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. *A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress*. Nutrition, Metabolism&Cardovascular Diseases 2005; 15:316-328.
- Delattre J. *Introduction from molecular oxygen to oxidative stress and radical biochemistry*. Ann Pharm Fr. 2006; 64:363.
- Dembowski E, Davidson MH. *Statin and ezetimibe combination therapy in cardiovascular disease*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 2009; 16:183-8.
- Deneke SM. *Thiol-based antioxidants*. Curr Top Cell Regul 2000; 36:151–180.
- Diepeveen SH, Verhoeven GH, van der Palen J, Dikkeschei BL, van Tits LJ, Kolsters G, Offerman JJ, Bilo HJ, Stalenhoef AF. *Oxidative stress in patients with end-*

stage renal disease prior to the start of renal replacement therapy. Nephron Clin Pract 2004; 98:c3–c7.

- Diepeveen SH, Wetzels JF, Bilo HJ, van Tits LJ, Stalenhoef AF. *Cholesterol in end-stage renal disease: the good, the bad or the ugly?* *Neth J Med* 2008; 66:53–61.
- Dirks J, Remuzzi G, Horton S, Schieppati A, Rizvi SAH, Westphal S. *Diseases of the kidney and the urinary system. Disease Control Priorities in Developing Countries.* 2nd edition. Oxford University Press, New York, 2006; 695-706.
- Dobashi K, Ghosh B, Orak JK et al. *Kidney ischemia-reperfusion: modulation of antioxidant defenses.* *Mol Cell Biochem* 2000; 205: 1–11.
- Dounousi E, Papavasiliou E, Makedou A, Ioannou K, Katopodis KP, Tselepis A, Siamopoulos KC, Tsakiris D. *Oxidative stress is progressively enhanced with advancing stages of CKD.* *Am J Kidney Dis* 2006; 48:752–760.
- Droge W. *Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implication for the use of thiol antioxidant.* *Exp Gerontol* 2002; 37:1333–1345.
- Eknayan G, Lameire N, Barsoum R, Eckardt KU, Levin A, Levin N, Locatelli F, MacLeod A, Vanholder R, Wang H. *The burden of kidney disease: improving global outcomes.* *Kidney Int* 2004; 66:1310-4.
- Essig M, Nguyen G, Prie D, Escoubet B, Sraer JD, Friedlander G. *3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors increase fibrinolytic activity in rat aortic endothelial cells. Role of geranylation and Rho proteins.* *Circ Res* 1998; 83:683–90.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. *Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes.* *Free Radic Biol Med* 1991; 11:81-128.

- Fellman JH, Roth E.S. *The biological oxidation of hypotaurine to taurine: Hipotaurine as an antioxidant*. Taurine Biological Actions and clinical perspectives. New York, NY R Liss Inc 1985, p 71-82.
- Ferreri C, Chatgililoglu C. *Geometrical trans lipid isomers: a new target for lipidomics*. ChemBioChem. 2005; 6:1722–1734.
- Ferretti G, Bacchetti T, Masciangelo S, Pallotta G. *Lipid peroxidation in hemodialysis patients: effect of vitamin C supplementation*. Clin Biochem 2008; 41:381–386.
- Foley RN, Parfrey PS, Samak M. *Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease*. Am J Kidney Dis 1998; 32:112-19.
- Ford I, Murray H, Packard CJ, Shepherd J, Macfarlane PW, Cobbe SM. *West of Scotland Coronary Prevention Study Group. Long-term follow-up of the West of Scotland Coronary Prevention Study*. N Engl J Med, 2007; 357:1477-86, 2007.
- Franconi F, Bernardine F, Maltana A, Micelli M, Ciuti M, Mian M, Gironi A, Anichini R, Seghieri. *Plasma and platelet taurine are reduced in subjects with insulin-dependent diabetes mellitus: effects of taurine supplementation*. Am J Clin Nutr 1995; 61:1115-1119.
- Fried LF, Orchard TJ, Kasiske BL. *Effect of lipid reduction on the progression of renal disease: a meta-analysis*. Kidney Int. 2001; 59:260-9.
- Fried LF, Shlipak MG, Crump C et al. *Renal insufficiency as a predictor of cardiovascular outcomes and mortality in elderly individuals*. J Am Coll Cardiol 2003; 41:1364–1372.
- Friguet B, Stadtman ER, Szweda LI. *Modification of glucose-6-phosphate dehydrogenase by 4-hydroxy-2-nonenal. Formation of cross linked protein that inhibits the multicatalytic protease*. J Biol Chem 1994; 269:21639-21643.

- Frischmann ME, Kronenberg F, Trenkwalder E, Schaefer JR, Schaefer H, dieplinger B, Koenig P, Ikewaki K, Dieplinger H. *In vivo turnover study demonstrates diminished clearance of lipoprotein(a) in hemodialysis patients*. *Kidney Int* 2007; 71:1036.
- Fuhrman B, Koren L, Volkova N, Keidar S, Hayek T, Aviram M. *Atorvastatin therapy in hypercholesterolemic patients suppresses cellular uptake of oxidized-LDL by differentiating monocytes*. *Atherosclerosis* 2002; 164:179–185.
- Fujita T, Ando K, Noda H, Ito Y, Sato Y. *Effects of increased adrenomedullary activity and taurine in young patients with borderline hypertension*. *Circulation* 1987; 75:525-532.
- Garcia-Calvo M, Lisnock J, Bull HG, Hawes BE, Burnett DA, Braun MP, Crona JH, Davis HR Jr, Dean DC, Detmers PA, Graziano MP, Hughes M, Macintyre DE, Ogawa A, O'Neill KA, Iyer SP, Shevell DE, Smith MM, Tang YS, Makarewicz AM, Ujjainwalla F, Altmann SW, Chapman KT, Thornberry NA et al. *The target of ezetimibe is Niemann–Pick c1-like 1 (npc1l1)*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:8132–8137.
- Ghezzi, P., Romines, B., Fratelli, M., Eberini, I., Gianazza, A., Casagrande, S., Laragione, T., Mengozzi, M., Herzenberg, L. A., Herzenberg, L. A. *Protein glutathionylation: coupling and uncoupling of glutathione to protein thiol groups in lymphocytes under oxidative stress and HIV infection*. *Mol. Immunol.* 2002; 38;773–780.
- Giroux LM, Davignon J, Naruszewicz M. *Simvastatin inhibits the oxidation of low-density lipoproteins by activated human monocyte-derived macrophages*. *Biochim Biophys Acta* 1993;1165:335–338.

- Glagau H, Hauck RS. *“Kit and method for determining redox status in urine”*. United States Patent 1994; 6:835-554.
- Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. *Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization*. N Engl J Med 2004; 351:1296–1305.
- Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. Free Radic Biol Med 2000; 29: 1106-14.
- Grundy SM. *Consensus statement: role of therapy with “statins” in patients with hypertriglyceridemia*. Am J Cardiol 1998; 81:1B–6B.
- Habdous M, Herbeth B, Vincent-Viry M, Lamont JV, Fitzgerald PS, Visvikis S, Siest G. *Serum total antioxidant status, erythrocyte superoxide dismutase and whole-blood glutathione peroxidase activities in the Stanislas Cohort: influencing factors and reference intervals*. Clin Chem Lab Med. 2003; 41:209–215
- Hackman A, Abe Y, Insull W Jr, et al. *Levels of soluble cell adhesion molecules in patients with dyslipidemia*. Circulation 1996; 93:1334–1338.
- Haffner SM. *Clinical relevance of the oxidative stress concept*. Metabolism 2000;49(2 Suppl 1):30–34.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview*. Meth Enzymol. 1990 186: 1-85.
- Halliwell B, Whiteman M. *Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?* Br J Pharmacol. 2004; 142:231-55.
- Hajjar K A. *Homocysteine: a sulph'rous fire*. J. Clin Invest 2001, 107; 663–664.

- Hansen SH, Andersen ML, Birkedal C, Wibrand F. *The important role of taurine in oxidative metabolism*. Adv Exp Med Biol 2006; 583:129-135.
- Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Navarro-Antolin J, Sanchez-Pascuala R, Hernandez G, Diaz C, Lamas S. et *Effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells*. J Clin Invest 1998; 101:2711–19.
- Herzog CA, Ma JZ, Collins AJ. *Poor long-term survival after acute myocardial infraction among patients on long-term dialysis*. N Engl J Med 1998; 339:799-805.
- Holme I, Fayyad R, Faergeman O. *Cardiovascular outcomes and their relationship to lipoprotein components in patients with and without chronic kidney disease: result from IDEAL trial*. J Intern Med 2010; 267:567-575.
- Huang D, Ou B, Prior RL. *The chemistry behind antioxidant capacity assays*. J Agric Food Chem. 2005; 53: 1841–1856.
- Hunsicker LG. *The consequences and costs of chronic kidney disease before ESRD*. J Am Soc Nephrol 2004; 15:1363.
- Huxtable, R.J. *Physiological action of taurine*. Physiol Res 1992; 72:101-103.
- Ignarro LJ. *Nitric oxide a unique endogenous signaling molecule in vascular biology*. Nobel Lecture 1998; 178–198.
- Ikizler TA, Morrow JD, Roberts LJ, Evanson JA, Becker B, Hakim RM, Shyr Y, Himmelfarb J. *Plasma F-isoprostane levels are elevated in chronic hemodialysis patients*. Clinl Nephrol 2002; 58:190–197.
- Iorio EL, Cinquanta L, Pisano R. *A diagnostic algorithm to manage oxidative stress*. Australasian J Cosmet Surg 2006; 2:26–30.

- Irani K. *Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling.* Circ Res 2000; 87:179-83.
- Jong CJ, Azuma J, Schaffer S *Mechanism underlying the antioxidant activity of taurine: prevention of mitochondrial oxidant production.* Amino Acids 2011; 42:2223-32.
- Johnson RJ, Gaucher EA, Sautin YY, Henderson GN, Angerhofer AJ, Benner SA. *The planetary biology of ascorbate and uric acid and their relationship with the epidemic of obesity and cardiovascular disease.* Med. Hypotheses 2008; 71:22-31.
- Jong CJ, Azuma J, Schaffer S (2011) *Mechanism underlying the antioxidant activity of taurine: prevention of mitochondrial oxidant production.* Amino Acids 2012; 42:2223-32.
- Julius M, Lang CA, Gleiberman L, Harburg E, DiFranceisco W, Schork A. *Glutathione and morbidity in a community-based sample of elderly.* J Clin Epidemiol 1994; 47:1021–1026.
- Kaysen GA. *Lipid and lipoprotein metabolism in chronic kidney disease.* J Ren Nutr 2009; 19:73-77.
- Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG *Extreme lipoprotein(a) levels and improved cardiovascular risk prediction.* J Am Coll Cardiol 2013;61:1146-56.
- Karamouzis I, Sarafidis PA, Karamouzis M, Iliadis S, Haidich AB, Sioulis A, Triantos A, Vavatsi-Christaki N, Grekas DM. *Increase in oxidative stress but not in antioxidant capacity with advancing stages of chronic kidney disease.* Am J Nephrol. 2008; 28:397-404.

- Karlsson J. *Exercise, muscle metabolism and the antioxidant defense*. World Rev Nutr Diet 1997; 82:81-100.
- Kater AL, Batista MC, Ferreira SR. *Synergistic effect of simvastatin and ezetimibe on lipid and pro-inflammatory profiles in pre-diabetic subjects*. Diabetol Metab Syndr 2010; 7:34–37.
- Kendrick J, Shlipak MG, Targher G, Cook T, Lindenfeld J, Chonchol M. *Effect of lovastatin on primary prevention of cardiovascular events in mild CKD and kidney function loss: a post hoc analysis of the Air Force/ Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study*. Am J of Kidney Dis 2010; 55(1):42-9.
- Kostapanos MS, Milionis HJ, Elisaf MS. *An overview of the extra-lipid effects of rosuvastatin*. J Cardiovasc Pharmacol Ther 2008; 13:157–174.
- Kostapanos MS, Spyrou AT, Tellis CC, Gazi IF, Tselepis AD, Elisaf M, Liberopoulos EN. *Ezetimibe treatment lowers indicators of oxidative stress in hypercholesterolemic subjects with high oxidative stress*. Lipids 2011; 46:341–348.
- Kugiyama K, Ohgushi M, Motoyama T, Hirashima O, Soejima H, Misuri K, Yoshimura M, Ogawa H, Sugiyama S, Yasue H. *Intracoronary infusion of reduced glutathione improves endothelial vasomotor response to acetylcholine in human coronary circulation*. Circulation 1998; 97:2299–2301.
- Kumskova EM, Aksenov DV, Konovalova GG, Tikhaze AK, Lankin VZ. *The role of oxidative processes in augmentation of atherogenicity of low density lipoprotein particles*. 2012; 52:61-6.
- Lapenna D, de Gioia S, Ciofani G, Mezzetti A, Uchino S, Calafiore AM, Napoletano A M, Di Ilio C, Cuccurullo F. *Glutathione-related antioxidant defenses in human atherosclerotic plaque*. Circulation 1998; 97:1930–1934.

- Lennernas H, Fager G. *Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. Similarities and differences.* Clin Pharmacokinet 1997; 32:403-25.
- Lentz SR, Sobey C G, Piegors DJ, Bhopatkar MY, Faraci FM, Malinow M R, Heistad DD. *J. Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocyst(e)inemia.* Clin. Invest. 1996; 98:24–29.
- Levine DM, Gordon BR. *Lipoprotein(a) levels in patients receiving renal replacement therapy: methodologic issues and clinical implications.* Am J Kidney Dis 1995; 26:162.
- Lewinska A, Wnuk M, Slota E, Bartosz G. *Total anti-oxidant capacity of cell culture media.* Clin Exp Pharmacol Physiol 2007; 34:781-6.
- Liao JK. *Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins.* J Clin Invest 2002; 110:285-8.
- Liao JK. *Effect of statins on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition beyond low-density lipoprotein cholesterol.* Am J Cardiol 2005; 96:24F-33F.
- Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, venge P, Wallentin L. *Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease.* N Engl J Med 2000; 343 1139–1147.
- Lindner A, Charra B, Sherrard DJ, Scribner BH. *Accelerated Arteriosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis.* N Engl J Med 1974; 290:697.
- Lubec B, Ya-hua Z, Pertti S, Pentti T, Kitzmüller E, Lubec G. *Distribution and disappearance of the radiolabeled carbon derived from L-arginine and taurine in the mouse.* Life Sci 1997; 60:2373-81.
- Ma KW, Greene EL, Raij L. *Cardiovascular risk factors in chronic renal failure and hemodialysis populations.* Am J Kidney Dis.1992; 19:505-13.

- Marnett LJ. *Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde*. *Mutat Res* 1999; 424:83-95.
- Maron DJ, Fazio S, Linton MF. *Current perspectives on statins*. *Circulation* 2000; 101: 207-13.
- McCullough PA. *Cardiovascular disease in chronic kidney disease from a cardiologist's perspective*. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004; 13:591-600.
- McNamara JR, Shah PK, Nakajima K, et al. *Remnant-like particle (RLP) cholesterol is an independent cardiovascular disease risk factor in women: results from the Framingham Heart Study*. *Atherosclerosis* 2001; 154:229-36.
- Meguid El Nahas A, Bello AK. *Chronic kidney disease: the global change*. *Lancet* 2005; 365:331-40.
- Miyamoto S, Ronsein GE, Prado FM, Uemi M, Corrêa TC, Toma IN, Bertolucci A, Oliveira MC, Motta FD, Medeiros MH, Mascio PD. *Biological hydroperoxides and singlet molecular oxygen generation*. *IUBMB Life* 2007; 59:322–331.
- Milionis HJ, Papakostas J, Kakafika A, Chasiotis G, Seferiadis K, Elisaf MS et al. *Comparative effects of atorvastatin, simvastatin, and fenofibrate on serum homocysteine levels in patients with primary hyperlipidemia*. *J Clin Pharmacol* 2003; 43:825–830.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. *Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology*. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109–42.
- Moore K, Roberts LJ. *"Measurement of lipid peroxidation"*. *Free Radic Res* 1998; 28:659–71.
- Munday R. *Toxicity of thiols and disulphides: involvement of free radical species*. *Free Rad Biol Med* 1989; 7:659–673.

- Murakami S, Sakurai T, Tomoike H, Sakono M, Nasu T, Fukuda N. *Prevention of hypercholesterolemia and atherosclerosis in the hyperlipidemia- and atherosclerosis-prone Japanese (LAP) quail by taurine supplementation.* Amino Acids 2010; 38:271-278
- Murrant CL, Reid MB. *Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle.* Microsc Res Tech 2001;55:236–48.
- Musial J, Undas A, Gajewski P, Jankowski M, Sydor W, Szczeklik. *Anti-inflammatory effects of simvastatin in subjects with hypercholesterolemia.* Int J Cardiol 2001; 77:247–253.
- Nandhini AT, Thirunavukkarasu V, Ravichandran MK, Anuradha CV. *Effect of taurine on biomarkers of oxidative stress in tissues of fructose-fed insulin-resistant rats.* Singapore Med J. 2005; 46:82–8.
- National Kidney Foundation. *K/DOQI Clinical practice Guidelines for chronic Kidney disease: evaluation, classification, and stratification.* National Kidney Foundation. Ann J Kidney Dis. 2002; 39:S1-266.
- Nygard O, Nordrehaug J E, Refsum H, Ueland P M, Farstad M, Vollset S E. *Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease.* N Engl J Med 1997;337: 230– 236.
- Nishikimi M, Fukuyama R, Minoshima S, Shimizu N, Yagi K. *Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulono-gamma-lactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man.* J. Biol Chem 1994; 269:13685–13688.
- Nissen S, Tuzcu M, Schoenhagen P, Brown BG, Ganz P, Vogel RA, Crowe T, Howard G, Cooper CJ, Brodie B, Grines CL, De Maria AN. *Effect of intensive*

compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. JAMA 2004;291:1071-80.

- Nowata, H, Tsujino, T; Watari, Y, Emoto, M; Yohoame, M. *Taurine prevents the decrease in expression and secretion of extracellular superoxide dismutase induced by homocysteine.* Circulation 2001; 104:1165-1170.
- Ong HT. *The statin studies: from targeting hypercholesterolaemia to targeting the high-risk patient.* QJM 2005; 98:599–614.
- Ozkan Y, Ozkan E, Simsek B. *Plasma total homocysteine and cysteine levels as cardiovascular risk factor in coronary heart disease.* Int J Card 2002; 82:269–277.
- Packard C, Caslake M, Pastor J. *The role of small, dense low density lipoprotein (LDL): a new look.* Int J Cardiol 2000; 1:S17-22.
- Pardini RS. *Toxicity of oxygen from naturally occurring redox-active pro-oxidants.* Arch Insect Biochem Physiol 1995; 29:101–18.
- Park SH, Lee H, Park KK, et al. *Taurine-responsive genes related to signal transduction as identified by cDNA microarray analyses of HepG2 cells.* J Med Food 2006;9:33–41.
- Palinski W et al, Ord VA, Plump AS, Breslow JL, Steinberg D, Witztum JL. *ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum.* Arterioscler Thromb 1994; 14:605-16.
- Parfrey PS, Foley RN. *The clinical epidemiology of cardiac disease in chronic uremia.* J Am Soc Nephrol 1999; 10:1606-15.
- Pietsch A, Erl W, Lorenz RL. *Lovastatin reduces expression of the combined adhesion and scavenger receptor CD36 in human monocytic cells.* Biochem Pharmacol 1996; 52:433–439.

- Portaluppi F, Boari B, Manfredini R. *Oxidative stress in essential hypertension*. *Curr Pharm Des* 2004;10:1695–1698
- Prichard S. *Risk factors for coronary artery disease in patients with renal failure*. *Am J Med Sci* 2003; 325:209-13.
- Prior RL, Cao G. *In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods*. *Free Radic Biol Med* 1999;27:1173–1181.
- Rahman M, Baimbridge C, Davis BR, Davis BR, Barzilay J, Basile JN, Henriquez MA, Huml A, Kopyt N, Pressel SL, Rosendorff C, Sastrasinh S, Stanford C, ALLHAT Collaborative Research Group. *Progression of kidney disease in moderately hypercholesterolemic, hypertensive patients randomized to pravastatin versus usual care: a report from the Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT)*. *Am J Kidney Dis* 2008; 52:412.
- Repa JJ, Turley SD, Quan G. *Delineation of molecular changes in intrahepatic cholesterol metabolism resulting from diminished cholesterol adsorption*. *J Lipid Res* 2005; 46:779-789.
- Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. *Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men*. *New Engl J Med* 1997; 336:973–79.
- Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks FM, Moye LA, Goldman S, Flaker GC, Braunwald E. *Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators*. *Circulation* 1998; 98:839–844.
- Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks F, Braunwald E. *Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. The Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators*. *Circulation* 1999; 100:230–235.

- Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM Jr, Kastelein JJ, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Glynn RJ, JUPITER Study Group. *Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein*. N Engl J Med 2008; 359: 2195-207.
- Ridker PM, MacFadyen J, Cressman M, Glynn RJ. *Efficacy of rosuvastatin among men and women with moderate chronic kidney disease and elevated high-sensitivity C-reactive protein: a secondary analysis from the JUPITER (Justification for the Use of Statins in Prevention-an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin) trial*. J Am Coll Cardiol 2010; 55:1266-73.
- Roberts JC, Nagasawa HT, Zera RT, Fricke RF, Goon DJ. *Prodrugs of L-cysteine as prospective agent against acetaminophen-induced hepatotoxicity. 2-(Polyhydroxyalkyl)-and 2-(polyacetoxyalkyl)thiazolidine-4(R)-carboxylic acids*. J Med Chem 1987; 30:1891–1896.
- Rodriguez JA, Orbe J, Paramo JA. *[Metalloproteases, vascular remodeling, and atherothrombotic syndromes]*. Rev Esp Cardiol 2007; 60:959–967.
- Romano M, Mezzetti A, Marulli C, et al. *Fluvastatin reduces soluble P-selectin and ICAM-1 levels in hypercholesterolemic patients: role of nitric oxide*. J Invest Med 2000; 48:183–189.
- Ross R. *Atherosclerosis is a inflammatory disease*. Am Heart J 1999; 138:S419-20.
- Rossi M, Campbell KL, Johnson DW, Stanton T, Vesey DA, Coombes JS, Weston KS, Hawley CM, McWhinney BC, Ungerer JP, Isbel N. *Protein-bound uremic toxins, inflammation and oxidative stress: a cross-sectional study in stage 3-4 chronic kidney disease*. Arch Med Res 2014; 45:309-17.

- Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, et al. *The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and recurrent events trial investigators.* N Engl J Med 1996; 335:1001.
- Schaffer SW, Azuma J, Mozaffari M. *Role of antioxidant activity of taurine in diabetes.* Can J Physiol Pharmacol 2009; 87:91–99.
- Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JFE. *Chronic kidney disease. Effects on the cardiovascular system.* Circulation 2007; 116: 85–97.
- Schoolwerth AC, Engelgau MM, Hostetter TH, Rufo KH, Chianchiano D, McClellan WM, Warnock DG, Vinicor F. *Chronic kidney disease: a public health problem that needs a public health action plan.* Prev Chronic Dis 2006; 3:A57.
- Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Cores J, Culleton B, Hamm LL, McCullough PA, Kasiske BL, Kelepouris E, Klag MJ, Parfrey P, Pfeffer M, Raij L, Spinosa DJ, Wilson PW, American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research Clinical Cardiology and Epidemiology and Prevention. *Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention.* Hypertension 2003; 42:1050–1065.
- Seljeflot I, Tonstad S, Hjerermann I, Arnesen H. *Reduced expression of endothelial cell markers after 1 year treatment with simvastatin and atorvastatin in patients with coronary heart disease.* Atherosclerosis 2002; 162: 179–185.
- Sengupta S, Chen H, Togawa T, DiBello P M, Majors A K, Budy B, Ketterer M E, Jacobsen D W. *Relative roles of albumin and ceruloplasmin in the formation of homocystine, homocysteine-cysteine-mixed disulfide, and cystine in circulation.* J Biol Chem 2001; 276:30111–30117.

- Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. *Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group.* N Eng J Med 1995; 333:1301-7.
- Shimizu H, Kiyohara Y, Kato I, Kitazono T, Tanizaki Y, Kubo M, Ueno H, Ibayashi S, Fujishima M, Iida M. *Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study.* Stroke 2004; 35:2072–2077.
- Shlipak MG, Heidenreich PA, Noguchi H, Chertow GM, Browner WS, McClellan MB. *Association of renal insufficiency with treatment and outcome after myocardial infarction in elderly patients.* Ann Intern Med 2002; 137: 555-62.
- Siciliano G, Piazza S, Carlesi C, Del Corona A, Franzini M, Pompella A, Malvaldi G, Mancuso M, Paolicchi A, Murri L. *Antioxidant capacity and protein oxidation in cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis.* J Neurol 2007; 254:575-80.
- Sies H, Cadenas E. *Oxidative Stress: Damage to Intact Cells and Organs.* Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci 1985; 311:617-631.
- Sies H. *Role of reactive oxygen species in biological processes.* Klin Wochenschr 1991; 69:965-8.
- Slatter DA, Bolton CH, Bailey AJ. *The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus.* Diabetologia 2000; 43:550-7.
- Son HY, Kim H, Kwon YH. *Taurine prevents oxidative damage of high glucose-induced cataractogenesis in isolated rat lenses.* J Nutr Sci Vitaminol 2007; 53:324–30.

- Stamler JS, Osborne J A, Jaraki O, Rabbani L E, Mullins M, Singel D, Loscalzo J. *Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen*. J Clin Invest 1993; 91:308–318.
- Stangel B. [Chronic renal failure: an epidemic?]. Presse Med 2011; 40:1020-7.
- Starkebaum G, Harlan JM. *Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine*. J Clin Invest.1986; 77:1370-6.
- Stein EA, Ballantyne CM, Windler E, Sirnes PA, Sussekov A, Yigit Z, Seper C, Gimpelewicz CR. *Efficacy and tolerability of fluvastatin XL 80 mg alone, ezetimibe alone, and the combination of fluvastatin XL 80 mg with ezetimibe in patients with a history of muscle-related side effects with other statins*. Am J Cardiol 2008;101:490–496
- Strippoli GF, Navaneethan SD, Johnson DW. *Effects of statin in patients with chronic kidney disease: meta analysis and meta regression of randomised controlled trials*. BMJ 2008; 336: 645-651.
- Suliman ME, Anderstan B, Bergstrom J. *Evidence of taurine depletion and accumulation of cysteinesulfinic acid in chronic dialysis patients*. Kidney Int 1996; 50: 1713-1717.
- Suzumura K, Yasuhara M, Tanaka K, Suzuki T. *Protective effect of fluvastatin sodium (XU-62–320), a 3-hydroxy- 3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitor, on oxidative modification of human low-density lipoprotein in vitro*. Biochem Pharmacol 1999; 57:697–703.
- Takemoto M, Yokote K. [Prevention, treatment and management of inflammation in atherosclerosis]. Nihon Rinsho 2011; 69:18-24.
- Terawaki K, Yoshimura K, Hasegawa T, Matsuyama Y, Negawa T, Matsushima M, Nakayama M, Hosoya T, Era S. et al. *Oxidative stress is enhanced in correlation*

with renal dysfunction: examination with the redox state of albumin. Kidney Int 2004; 66: 1988–1993.

- The United States Renal Data System (USRDS). *Annual Data Report 2004.* Am J Kidney Dis 2005;45
- Therond P. *Oxidative stress and damages to biomolecules (lipids, proteins, DNA).* Ann Pharm Fr 2006; 64:383–389.
- Tonelli M, Moyé L, Sacks FM, Sacks FM, Cole T, Curhan GC; Cholesterol and Recurrent Events Trial Investigators. *Effect of pravastatin on loss of renal function in people with moderate chronic renal insufficiency and cardiovascular disease.* J Am Soc Nephrol 2003; 14: 1605-13.
- Tonelli M, Wiebe N, Culleton B, House A, Rabatt C, Fok M, McAlister F, Garg AX. *Chronic Kidney disease and mortality risk: a systematic review.* J Am Soc Nephrol 2006; 17:2034-47.
- Torzewski J, Bowyer DE, Waltenberger J, Waltenberger J, Fitzsimmons C, Hombach V, Gabbert HE. *Processes in atherogenesis: complement activation.* Atherosclerosis 1997;132:131–38.
- Tribble DL. *AHA Science Advisory. Antioxidant consumption and risk of coronary heart disease: emphasis on vitamin C, vitamin E, and beta-carotene: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association.* Circulation 1999; 99:591-5.
- Tsimihodimos V, Dounousi E, Siamopoulos CK. *Dyslipidemia in chronic kidney disease: an approach to pathogenesis and treatment.* Am J Nephrol 2008; 28:958-73.
- Tsuboyama-Kasaoka N, Shozawa C, Sano K, Kamei Y, Kasaoka S, Hosokawa Y, Ezaki O. *Taurine (2-aminoethanesulfonic acid) deficiency creates a vicious circle promoting obesity.* Endocrinology. 2006; 147:3276–3284.

- Uchida K. *Cellular response to bioactive lipid peroxidation products*. Free Radic Res. 2000; 33:731-7.
- Vance DE, Vance JE. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. 4th ed. Elsevier, Amsterdam 2002.
- Van der Veen Hinton DR, Incardonna F, Hofman FM. *Extensive peroxynitrite activity during progressive stages of central nervous system inflammation*. J Neuroimmunol 1997; 77: 1-7.
- Varma R, Garrick R, McClung J, Frishman WH. *Chronic renal dysfunction as an independent risk factor for the development of cardiovascular disease*. Cardiol Rev 2005; 13:98-107.
- Vaughan CJ, Gotto AM Jr, Basson CT. *The evolving role of statins in the management of atherosclerosis*. J Am Col Cardiol 2000; 35:1–10.
- Wassmann S, Laufs U, Baumer AT, Muller K, ahlbory K, Linz W, Itter G, Rossen R, Bohm M, Nickenig G. *HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species*. Hypertension 2001; 37:1450–57.
- 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*. Nature Med 2001; 7:687–692.
- Westhuyzen J, Saltissi D, Healy H. *Oxidation of low density lipoprotein in hemodialysis patients: effect of dialysis and comparison with matched controls*. Atherosclerosis 1997; 129:199–205.
- Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF Jr, Vita JA. *The clinical implications of endothelial dysfunction*. J Am Coll Cardiol 2003; 42:1149-60.

- Wiklund O, Mattsson-Hultén L, Hurt-Camejo E, et al. *Effects of simvastatin and atorvastatin on inflammation markers in plasma*. J Intern Med 2001; 251:338–347.
- Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. *Prediction of coronary heart disease using risk factor categories*. Circulation 1998; 97:1837-47.
- Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeille`re-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, Dayer JM, Jungers P, Dru`eke T, Descamps-Latscha B. *Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure*. J Immunol 1998;161:2524–2532.
- Wu W, Muzny DM, Lee CC, and Caskey CT. *Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution*. J Mol Evol 1992; 34:78–84.
- Yamori Y, Nara Y, Ikeda K, Mizushima S. *Is taurine a preventive nutritional factor of cardiovascular diseases or just a biological marker of nutrition?* Adv Exp Med Biol. 1996; 403: 623–629.
- Yeon JA, Kim SJ. *Neuroprotective effect of taurine against oxidative stress-induced damages in neuronal cells*. Biomol Ther 2010; 18:24–31.
- Yeum KJ, Russell RM, Krinsky NI, Aldini G. *Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma*. Arch Biochem Biophys. 2004; 430:97–103.
- Yilmaz MI, Saglam M, Caglar K, Cakir E, Sonmez A, Ozgurtas T, Aydin A, Eyileten T, Ozcan O, Acikel C, Tasar M, Genctoy G, Erbil K, Vural A, Zoccali C. *The determinants of endothelial dysfunction in CKD: oxidative stress and asymmetric dimethylarginine*. Am J Kidney Dis 2006; 47:42–50.

- Yokogoshi H, Oda H (2002) Dietary taurine enhances cholesterol degradation and reduces serum and liver cholesterol concentrations in rats fed a high-cholesterol diet. *Amino Acids* 23:433–439.
- Zinellu A, Carru C, Galistu F, Usai MF, Pes GM, Baggio G, Federici G, Deiana L. N-methyl-D-glucamine improves the laser-induced fluorescence capillary electrophoresis performance in the total plasma thiols measurement. *Electrophoresis* 2003; 24:2796-804.
- Zinellu A; Sotgia S; Scanu B; Chessa R; Gaspa R; Franconi F; Deiana L; Carru C. *Taurine determination by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection: from clinical field to quality food applications*. *Amino Acids* 2009; 36:35–41.
- (1) Zinellu A, Sotgia S, Deiana L, Carru C. *Field-amplified online sample stacking capillary electrophoresis UV detection for plasma malondialdehyde measurement* *Electrophoresis*. 2011;32:1893-7.
- (2) Zinellu A; Sotgia S; Deiana L; Carru C. *Field-amplified sample injection combined with pressure-assisted capillary electrophoresis UV detection for the simultaneous analysis of allantoin, uric acid, and malondialdehyde in human plasma*. *Anal Bioanal Chem* (2011) 399:2855–2861.
- Zoja C, Corna D, Gagliardini E, Conti S, Arnaboldi L, Benigni A, Remuzzi G. *Adding a statin to a combination of ACE inhibitor and ARB normalizes proteinuria in experimental diabetes, which translates into full renoprotection*. *Am J Physiol Renal* *physiol* 2010; 299:F1203-11.