

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE**  
**FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**

*DIPARTIMENTO DI AREA CRITICO MEDICO CHIRURGICA*

*SEZIONE CLINICA MEDICA GENERALE E CLINICHE SPECIALISTICHE*

*UNITA' FUNZIONALE FISIOPATOLOGIA E CLINICA DELL'ATEROSCLEROSI*

*E DELLA TROMBOSI (SSD MED09)*

**DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOPATOLOGIA  
CLINICA E DELL'INVECCHIAMENTO(CICLO XXIV)**

**COMPONENTI EMOREOLOGICHE E  
GENETICHE NELLA MALATTIA VASCOLARE**

CANDIDATO: Dr.ssa **Ilaria Ricci**

COORDINATORE: Prof.ssa **Rosanna Abbate**

TUTOR: Dr. **Francesco Sofi**, Dr.ssa **Cinzia Fatini**

**ANNO ACCADEMICO 2011/2012**

<b>INDICE</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUZIONE</b>	<b>4</b>
<b>1. EMOREOLOGIA</b>	<b>6</b>
1.1 Viscosita' Ematica	
1.2 Viscosità Plasmatica	
1.3 Deformabilità Eritrocitaria	
1.4 Aggregazione Eritrocitaria	
<b>2. OSSIDO NITRICO</b>	<b>26</b>
2.1 Polimorfismi di eNOS	
<b>3. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA</b>	<b>35</b>
3.1 I Polimorfismi del sistema Renina-Angiotensina	
3.2 Ruolo del sistema RAS sulla produzione di nitrossido	
<b>4. EMOREOLOGIA E MALATTIA VASCOLARE</b>	<b>46</b>
4.1 La malattia arteriosa periferica	
4.2 Le complicazioni vascolari nel trapianto renale	
4.3 Emoreologia nella malattia arteriosa periferica	
4.4 Emoreologia nel trapianto renale	
<b>5. NITROSSIDO E MALATTIA VASCOLARE</b>	<b>61</b>
5.1 Ossido nitrico nella malattia arteriosa	
5.2 Polimorfismi eNOS nella malattia arteriosa	
5.3 Ossido nitrico e trapianto renale	
5.4 Polimorfismi eNOS nel trapianto renale	
5.5 Nitrossido ed emoreologia	
<b>6. SISTEMA RAS E MALATTIA VASCOLARE</b>	<b>68</b>
6.1 Ras nella malattia arteriosa periferica	
6.2 Polimorfismi del sistema RAS nella malattia arteriosa	
6.3 Ras nel trapianto renale	
6.4 Polimorfismi RAS nei trapianti renali	

6.5 Polimorfismi del sistema RAS ed emoreologia

**7. RICERCHE PERSONALI**

**73**

7.1 Popolazioni esaminate

7.2 Misure della viscosità ematica e plasmatica

7.3 Misura della deformabilità eritrocitaria

7.4 Misura dell'aggregazione eritrocitaria

7.5 Valutazione del profilo genetico

7.6 Analisi statistica

7.7 Risultati

**8. COMMENTO**

**139**

**BIBLIOGRAFIA**

**144**

## INTRODUZIONE

La malattia arteriosa è una patologia ad eziologia complessa, in cui componenti genetiche ed ambientali interagiscono fra di loro nel determinarne l'insorgenza. Essa può manifestarsi in varie localizzazioni (carotidea, coronarica, addominale ed arterioso-periferica) ed interessa anche il distretto renale. Studi clinici e sperimentali hanno contribuito ad ampliare le conoscenze sui meccanismi patogenetici e sulle basi genetico-molecolari della malattia arteriosa. Negli ultimi anni è stato valutato il ruolo di numerosi geni candidati coinvolti nella modulazione della malattia, in particolare quelli codificanti componenti del sistema renina angiotensina, principale modulatore dell'omeostasi cardiocircolatoria e del monossido di azoto (NO, nitric oxide), come il gene che codifica la NO sintasi endoteliale, responsabile della biosintesi costitutiva nelle cellule endoteliali di NO.

Anche alterazioni delle proprietà emoreologiche in grado di influenzare l'ambiente vascolare in senso pro-aterogenico sono presenti nella malattia arteriosa, come dimostrato da studi clinici e sperimentali. In quest'ultimi anni l'attenzione della ricerca scientifica ha consentito di acquisire nuove conoscenze nell'ambito emoreologico in particolare quelle relative alla capacità del globulo rosso di deformarsi e di dare luogo ad aggregati eritrocitari.

Studi clinici hanno dimostrato il ruolo di un alterato profilo emoreologico nella modulazione del rischio vascolare in soggetti con cardiopatia ischemica (*Bor-Kocukatay et al. 2010*), sordità improvvisa (ISSHL), occlusione venosa retinica (OVR) (*Mannini et al. 2007*) e sclerosi sistemica (*Fatini et al. 2002*). Inoltre è stata dimostrata una correlazione tra componenti genetiche in grado di influenzare l'ambiente vascolare come i polimorfismi del gene *eNOS* e geni codificanti componenti del sistema renina-angiotensina e parametri emoreologici (*Mannini et al. 2007, Fatini et al. 2002*). In particolare è stato dimostrato che varianti polimorfiche correlate ad una ridotta



disponibilità di ossido nitrico influenzavano la deformabilità eritrocitaria (*Mannini et al. 2007, Fatini et al. 2002*). Un alterato ambiente vascolare correlato ad un'alterata risposta reologica geneticamente determinata può modulare il rischio vascolare.

Sulla base dei dati presenti in letteratura abbiamo condotto in due modelli di popolazioni con patologia vascolare (malattia arteriosa periferica e pazienti ad alto rischio cardiovascolare sottoposti a trapianto renale) uno studio fisiopatologico attraverso:

1. La valutazione del profilo emoreologico determinando la viscosità del sangue totale, la viscosità plasmatica e la deformabilità ed aggregazione eritrocitaria.
2. L'analisi dei polimorfismi genetici nei sistemi del nitrossido (*eNOS -786 T>C, eNOS 4 a/4b, eNOS 894 G>T*) e renina angiotensina (*ACE I/D, AGTR1 1166 A>C, AGT M235T*) ed il loro ruolo nella modulazione dei parametri emoreologici.

## 1. EMOREOLOGIA

### La reologia dei fluidi

La *reologia* è la scienza che studia il modo di deformarsi della materia in movimento. Essa infatti sia allo stato solido, liquido o gassoso, è sempre soggetta ad un certo grado di deformazione nel momento in cui viene applicata una forza (*Di Perri et al. 1985*). La deformazione può essere di tipo plastico, cioè irreversibile, o di tipo elastico, cioè reversibile. Per materie allo stato solido la forza capace di indurre la deformazione dovrà essere molto maggiore che per materie allo stato liquido o gassoso, anzi, per i corpi solidi viene identificata una forza soglia, il cosiddetto “**yield stress**”, che è quella forza minima capace di iniziare la deformazione. Possiamo comprendere tale fenomeno quando osserviamo una forza che viene applicata su un solido deformabile tipo un mazzo di carte dove le varie carte scorrono per effetto di una spinta applicata su una sola di esse. La stessa cosa avviene nei liquidi durante il moto laminare. La forza che agisce di taglio su una determinata superficie viene detta sforzo di taglio o sforzo tangenziale o **shear stress** e viene misurata nel sistema C.G.S. in  $\text{dyn/cm}^2$  (*Pearson et al. 2001*). La deformazione di un corpo dipende inoltre anche dalla differenza di velocità raggiunta dai vari piani che scorrono l'uno sull'altro in rapporto alla loro distanza (gradiente di velocità  $dV/dx$  o **shear rate** espresso in  $\text{s}^{-1}$ ). Il rapporto shear stress/shear rate misura invece l'attrito fra i vari piani. Se questo concetto viene traslato ad un fluido prende il nome di viscosità (*Lowe et al. 1988*). La viscosità nel sistema C.G.S. viene misurata in *poise* (P), dal nome di Poiseuille. Si definisce il *poise* (P) come lo sforzo tangenziale di  $1 \text{ dyn/cm}^2$  capace di produrre un gradiente di velocità di  $1 \text{ s}^{-1}$ . Può essere considerata come la forza che si oppone allo scorrimento della materia. La legge di Poiseuille, e quella successiva di Wiedemann-Haghenbach, definiscono il moto di un fluido ideale in un condotto rigido, rettilineo, di diametro K ed a pareti rigide (*Pearson et al. 2001*).

$$Q = \frac{\Delta P \cdot r^4}{l}$$

$$Q = \frac{\Delta P \cdot r^4}{8\eta \cdot l}$$

### **Legge di Poiseuille**

### **Legge di Wiedemann-Hagenbach**

Il parametro Q è la portata che è direttamente proporzionale al gradiente pressorio ( $\Delta P$ ) e alla quarta potenza del raggio del vaso ( $r^4$ ); è invece inversamente proporzionale alla viscosità del fluido ( $\eta$ ) ed alla lunghezza del vaso ( $l$ ). La viscosità è una forza che si oppone allo scorrimento della materia. Essa può anche essere definita

$$\eta = \tau / D$$

come il rapporto tra tensione ( $\tau$ ) e tensione di scorrimento ( $D$ ). Essa diminuisce all'aumentare della temperatura mentre aumenta proporzionalmente con la pressione. I fluidi in cui tale rapporto shear stress/shear rate è costante sono indicati come newtoniani: essi hanno una viscosità che non si modifica in rapporto al gradiente di velocità e non possiedono una soglia di scorrimento; nei fluidi non newtoniani come il sangue la viscosità varia soprattutto al variare della velocità di scorrimento e delle caratteristiche morfo-funzionali della rete circolatoria. Inoltre necessitano di una forza soglia (yield stress) per iniziare il movimento (*Cho et al.2011*).

### **Emoreologia**

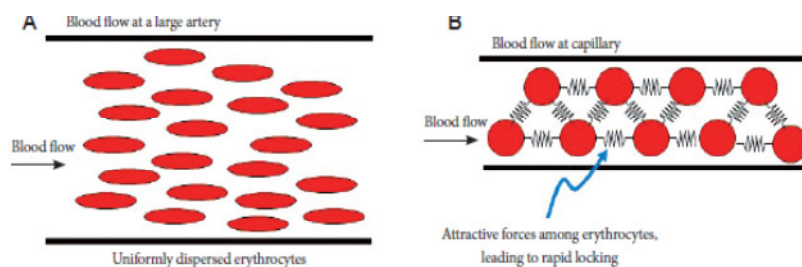
L'emoreologia è quella scienza che studia il flusso sanguigno all'interno di un vaso con una particolare attenzione al comportamento degli eritrociti ovvero quali sono le loro interazioni nel sistema vascolare (*Cho et al.2011*). Il flusso sanguigno è influenzato dalla geometria del vaso, dalla velocità e viscosità ematica (resistenza che il sangue oppone al suo scorrimento). Il sangue scorre in vasi con differente elasticità, spinto ad intermittenza da una pressione variabile in cui la viscosità consente variazioni di flusso con minime oscillazioni della pressione. Oltre allo *shear stress* e allo *shear rate*, il sangue è caratterizzato da uno *yield stress*, cioè da una forza minima richiesta per mettere in moto la colonna liquida. Nei distretti circolatori dove il flusso a volte si

arresta, si deve vincere lo *yield stress* affinché il sangue possa di nuovo scorrere. Le determinanti emoreologiche sono: massa cellulare, viscosità del plasma, deformabilità ed aggregabilità eritrocitaria. Ognuna di esse interviene in definiti settori della circolazione, in relazione al gradiente di velocità che vige in quel settore (Caimi,2002). Quindi il sangue intero è composto di cellule e plasma e può essere considerato un vero e proprio organo. Esso scorre facilmente attraverso i vasi sanguigni a concentrazioni molto più alte grazie alla flessibilità eritrocitaria. Qualunque condizione vada ad alterare la normale fisiologia dell'eritrocita avrà un impatto maggiore sul flusso sanguigno. Durante la sistole la shear rate in una grande arteria è nell'intervallo di 100-2000 s<sup>-1</sup> ma quando già supera i 300 s<sup>-1</sup> la viscosità diminuisce al minimo del valore asintotico poiché i globuli rossi sono dispersi uniformemente dall'alta velocità (Yang et al. 1989). Per il regime di flusso nelle arteriole e nei capillari l'intervallo è di 400-600 s<sup>-1</sup> dovuto ai diametri dei lumi relativamente piccoli. Contrariamente a quanto avviene alle alte shear rate le velocità di scorrimento sono piccole cosicché gli eritrociti non possono essere uniformemente dispersi e tendono ad aggregare influenzando la reologia nella rete micro vascolare (Lipowsky et al 2005, Pries et al.1995). In aggiunta la viscosità varia con la configurazione anatomica di una arteria in particolar modo riguardo al suo spessore a causa delle diverse shear rate alle due localizzazioni. Quando il sangue passa in una biforcazione, il sangue decelera lungo la parete esterna riducendo la shear rate (Cho et al. 2011). Nel flusso delle grandi arterie il sangue diventa meno viscoso perché gli eritrociti sono pienamente dispersi dall'alta velocità di flusso (viscosità del sangue sistolica (SBV) misurata ad una shear rate di 300 s<sup>-1</sup>). Un suo aumento non influenza il flusso poiché in questo caso le forze viscosive sono quasi trascurabili. La viscosità di sangue diastolica (DBV) a 5 s<sup>-1</sup> o meno corrisponde ad una bassa velocità di flusso tipica del microcircolo. Una delle ragioni per cui i valori di DBV sono comunque sempre più grandi di SBV è che l'aggregazione avviene quando il sangue si muove lentamente nei piccoli vasi (Stolz et al. 1999, Rand et al. 1964, Litwin

*et al. 1970, Letcher et al.1981, Mayer et al.1964, Rosenson et al. 1996, Ditzel et al. 1971, Cocklet et al. 2007).*

### **La reologia del microcircolo**

Il mantenimento della perfusione nei piccolo vasi tali come i capillari è una delle piu' importanti sfide nel trattamento delle malattie vascolari. La rete capillare è costituita da arteriole precapillari, letto capillare e venule post capillari; essa è dotata di un alto grado di eterogeneità strutturale poichè ha una distribuzione tipicamente asimmetrica ed irregolare della rete vascolare (*Yu et al. 2010*). La topografia e complessità microvascolare varia nei diversi organi presumibilmente riflettendo i differenti aspetti strutturali e funzionali dei tessuti specifici. Il numero di capillari nel corpo umano è estremamente ampio ed è circa  $2 \times 10^9$  (*Jung et al. 2010*). Le Pressioni di entrata nelle arteriole ed uscita nelle venule sono di 20 mmHg e 10 mmHg rispettivamente. Non solo l'Hct è ridotto ai capillari ma pure i livelli di viscosità sono più bassi rispetto alla viscosità sistemica a causa dell'effetto parete di Fahraeus-Lindqvist (*Lipowsky et al. 1987*). In un capillare, gli eritrociti tendono ad aggregare a causa delle forze attrattive fra i globuli rossi. Quando esse divengono più grandi delle forze disperdenti create dal flusso per esempio a causa dell'iperviscosità l'emostasi può avvenire localmente perché le forze attrattive fra le cellule creano un rapido collegamento fra loro. Susseguentemente, può avvenire danno ai capillari uno dei più comuni aspetti delle anomalie micro vascolari. A livello fisiologico, la shear stress è molto più grande dello stress prodotto cosicchè la perfusione alla rete microvascolare può essere propriamente mantenuta. Il flusso micro vascolare locale può essere acutamente peggiorato dando origine ad un danno al capillare (*Cho et al. 2001*).



**Figura 1:** A) Eritrociti dispersi dal flusso in una grande arteria. B) Eritrociti bloccati quando le forze attrattive sono più grandi delle forze shear prodotte dal flusso sanguigno ai capillari (da Cho ed al. 2011).

### Il modello di Casson

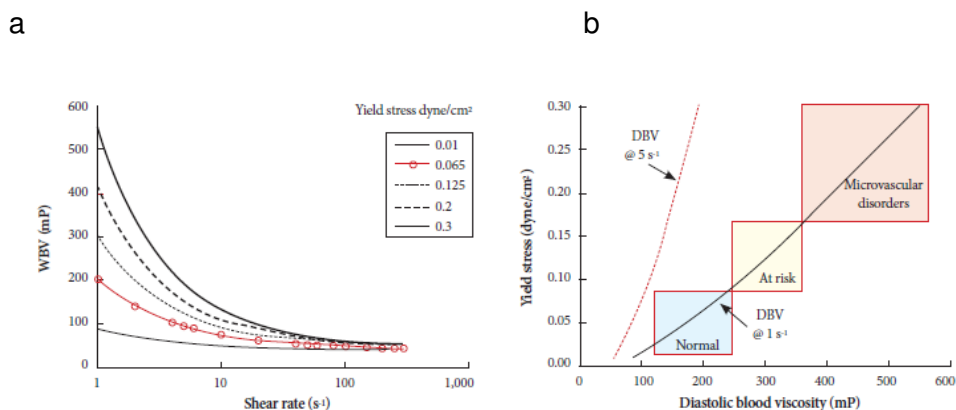
Per valutare lo yield stress può essere usata l'equazione costitutiva del modello di Casson (Cho et al. 1991, Chaturani et al. 1988).

$$\sqrt{\tau} = \sqrt{\tau_y} + \sqrt{\kappa \dot{\gamma}}$$

Dove  $\kappa$  è una costante che rappresenta una viscosità ad alta shear asintotica e  $\tau_y$  è la shear stress prodotta del sangue. Dal modello di Casson si può derivare l'equazione di viscosità di Casson come

$$\mu = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} = \kappa + \frac{\tau_y}{\dot{\gamma}} + 2 \sqrt{\frac{\kappa \cdot \tau_y}{\dot{\gamma}}}$$

La figura sotto a sinistra illustra 5 tipiche curve di viscosità del sangue in funzione della shear rate con  $\kappa$  uguale a 38 mP, in ordine crescente. La curva in rosso rappresenta la viscosità del sangue normale. Lo yield stress è determinato dall'adattamento della curva usando l'equazione di viscosità di Casson.



**Figura 2 :** a) Curve di viscosità ematica in funzione della shear rate. I valori di yield stress sono ricavati usando il modello di Casson b) Yield stress in funzione della viscosità ematica diastolica (modificato da Cho ed al. 2011).

Se lo shear stress prodotto di un paziente supera lo shear stress che serve a mantenere il flusso capillare la situazione può evolvere in ischemia e danno capillare. Usando un modello animale è stato calcolato il valore soglia per la shear stress di parete di  $0.16 \text{ dyne/cm}^2$  che dovrebbe essere la shear stress minima necessaria a mantenere il flusso capillare e prevenire l'aggregazione spontanea degli eritrociti (*Pries et al, 1995*). Tutto ciò è illustrato nella curva in alto a destra che esprime il rapporto fra la yield stress e la pressione diastolica e mostra chiaramente il punto oltre il quale abbiamo un rischio di disturbi vascolari ed il rapporto di proporzionalità diretta tra i due parametri.

### **1.1 LA VISCOSITA' EMATICA**

La viscosità del sangue è una proprietà dinamica. Non si può parlare di una singola viscosità del sangue ma piuttosto si dovrebbe sempre associare questo parametro con la corrispondente shear rate che è stata usata nella sua misura. Questo parametro è dipendente da variabili interne ed esterne che sono diverse nella macro e micro circolazione. Due diversi campioni di sangue possono avere quasi uguali viscosità alle alte shear rate ma sembrano divergere significativamente alle basse shear rate a causa di una differenza nell'aggregazione dei RBC. Possiamo definire il comportamento della viscosità del sangue come il parametro di laboratorio per un particolare campione di sangue dove sono presi almeno due valori: uno alle alte ed uno alle basse shear rate. La viscosità di un fluido è una proprietà temperatura dipendente quindi è fondamentale nella sua misurazione il controllo di questo parametro che di solito è mantenuto a  $37 \text{ °C}$  (*Baskurt et al. Handbook of hemorheology and hemodynamics 2007*).

#### **Ruolo dell'ematocrito**

Un elevato Hct può aumentare l'attrito del sangue intero e ridurre la capacità del sangue di trasportare l'Hb. Per quantificare questo delicato bilancio è stato sviluppato

un parametro conosciuto come indice di rilascio dell'ossigeno (ODI) che è calcolato come rapporto tra Hct ed SBV (velocità del sangue sistolica). L'optimum di ODI avviene in un intervallo di Hct di 0,37-0,38 (*Kameneva et al. 2000*). È stato trovato che il livello ottimale di Hct per il trasporto normale di Hb era 0,38 per gli umani (*Usami et al. 1969*). In un flusso a bassa shear rate dove la velocità di flusso è relativamente piccola, l'ODI diminuiva linearmente con l'Hct. Quindi per regimi di flusso microvascolare, più piccolo è l'Hct più efficacemente l'ossigeno può essere trasportato (*Alexy et al. 2006*). Diversi studi hanno dimostrato che l'elevato ematocrito (*Bottiger et al. ,Kannel et al. 1972*), l'aumentata concentrazione plasmatica di fibrinogeno (*Otto et al. 2002, Meade et al. 1980*) e l'incremento di viscosità ematica (*Lowe et al. 1997*) e plasmatica (*Koenig et al, 1998, Magyar et al. 2003, Levenson et al. 2000*) sono strettamente correlati con le complicazioni trombotiche delle malattie cardiovascolari. È stato inoltre osservato che anche la deformabilità e l'aggregabilità eritrocitaria influiscono sulla viscosità ematica e quindi sul flusso ematico (*Otto et al. 2002, Neumann et al. 1991*), in particolare a livello del microcircolo (*Schmid-Schonbein et al. 1981, Chien 1982 et al., Thomas et al. 1977*). L'effetto "compensatorio" che in talune condizioni cliniche riveste l'incremento dell'ematocrito, è rivolto a rispondere ad uno stimolo ipossico da parte del midollo emopoietico. L'aumento dell'estrazione di ossigeno si associa quindi ad un incremento di ematocrito e di viscosità ematica entro un range di ematocrito limitato a valori di 0,48 – 0,50, dopo di che la curva di dissociazione subisce un importante decremento sino a divenire piatta ed i valori di viscosità del sangue subiscono un incremento patologico. Questo si traduce in una progressiva caduta del flusso a livello microcircolatorio. La progressiva addizione di eritrociti al plasma determina un incremento al disturbo delle linee di flusso, quindi la viscosità ematica aumenta al crescere dell'ematocrito. Occlusioni vascolari sono un evento legato all'aumento della viscosità ematica in soggetti affetti da policitemia vera, sindromi mieloproliferative e anche nella trombocitopenia primaria (*Pearson et al. 2001, Chien et al. 1966, Preston et al. 1974*). Le variazioni dell'effetto dell'ematocrito



sulla viscosità, in funzione delle shear rates, possono essere spiegate dal concetto di “*volume cellulare effettivo*”. Il *volume cellulare effettivo* degli aggregati eritrocitari è superiore al volume delle singole cellule rosse che li compongono; alle basse shear rates, un aumento della concentrazione delle cellule rosse ne promuove l’aggregazione, aumentando così sia l’effettivo volume cellulare che il disturbo al flusso plasmatico, che si riflette con un incremento della viscosità del sangue. Alle elevate shear rates, un aumento della concentrazione cellulare promuove una mutua deformazione delle cellule rosse, evento che porta ad un decremento del volume cellulare effettivo e quindi compensa parzialmente l’aumento in viscosità (*Chien et al. 1972*). La viscosità ematica aumenta con l’età ed in generale è più elevata negli uomini che nelle donne probabilmente a causa dei più elevati livelli di ematocrito (*Crepaldi et al. 1981*). Numerose condizioni di rischio quale l’ipertensione arteriosa, le iperlipidemie, il fumo, la ridotta attività fisica e l’uso di contraccettivi orali si accompagnano ad alterati parametri emoreologici, che possono contribuire più o meno intensamente alla patogenesi delle lesioni ischemiche. La correzione dei principali fattori di rischio vascolare tende a migliorare anche la fluidità ematica. E’ stato osservato l’effetto positivo di trattamenti volti a ridurre la concentrazione ematica di lipoproteine (LDL aferesi) in pazienti affetti da dislipidemie gravi : in tali soggetti si verifica una significativa riduzione della viscosità ematica e plasmatica, ed un effetto positivo sulla riduzione dell’aggregazione e della deformabilità eritrocitaria (*Otto et al. 2002*).

## **1.2 VISCOSITA’ PLASMATICA**

La viscosità plasmatica è determinata dal contenuto in acqua e componenti macromolecolari nel plasma sanguigno. Essendo una soluzione proteica altamente concentrata, una debole interazione molecola-molecola può comunque giocare un ruolo che non è evidenziato dal protidogramma. L’effetto dipende dal suo peso e struttura molecolare che incrementa la capacità aggregante. Inoltre la viscosità dipende anche dalla temperatura e dal PH (*Somer et L. 1987,1993, Chien et al. 1987*).

Una delle ragioni per cui questo parametro viene misurato è oltre alla facile esecuzione anche la sua capacità di servire come marcatore dei livelli di proteine della fase acuta (esempio Fibrinogeno). Alcuni lavori hanno rilevato l'aumento della viscosità plasmatica in stati clinici dove la patologia era correlata con l'incremento dei livelli di proteine plasmatiche (*Meiselman et al. 2006, Stoltz et al. 1999, Lowe, 1988*). A parità di ematocrito l'aumento della viscosità del sangue intero è associata ad un aumento della viscosità del plasma (*Rand et al. 1970*). Oltre al fibrinogeno possono incidere sull'aumento di questo parametro emoreologico anche alcune immunoglobuline (IgM, IgA, IgG) (*Palareti et al. 1986*). L'estensione dell'iperviscosità causata dalle immunoglobuline è dipendente dalla loro concentrazione nel plasma (*Crawford et al. 1985, Farhangi et al. 1978, Kwaan et al. 1999*). In aggiunta la dimensione molecolare delle immunoglobuline è un altro maggiore determinante. Le IgM hanno il più grande effetto seguite da IgA e IgG. Nel caso di IgM oltre 3 g/dL la viscosità aumenta in proporzione alla sua concentrazione plasmatica e poi aumenta acutamente a più alti livelli con manifestazioni di sindrome da iperviscosità (*Rosenson et al. 1996, Kwaan et al. 1999*). Nel mieloma con paraproteinemia IgG monoclonale i sintomi da iperviscosità non sopraggiungono finché il livello plasmatico delle IgG raggiunge 15 g/dL. Nel mieloma IgA avviene con livelli 10 g/dL circa (*Kwaan et al. 2010*). Il plasma può essere considerato un fluido Newtoniano in quanto la sua viscosità non cambia al variare delle shear rate eccetto che in condizioni patologiche come le gammopatie mono e policlonali, iperfibrinogenemie, disfibrinogenemie, presenza di crioglobuline (*Graf et al. 1979*). Le proteine plasmatiche influenzano la viscosità del sangue alle alte shear rate a causa del loro effetto sulla viscosità del plasma ed influenzano anche l'aumento di viscosità a valori più bassi a causa del loro effetto sull'aggregazione eritrocitaria (*Rand et al. 1970, Mayer et al. 1966, Chien et al. 1972*). Se la viscosità plasmatica aumenta oltre 2,0 mPa/s (a 37°C), aumenta progressivamente anche il rischio di eventi clinici legati alla sindrome da iperviscosità (*Lowe et al. 1997, Somer et al. 1987*). Alti livelli di trigliceridi nel plasma possono modificare il comportamento dei globuli rossi nel letto

micro vascolare alterandone il comportamento reologico e l'elasticità dei vasi sanguigni. Questi cambiamenti aumentano la resistenza eritrocitaria nella rete micro circolatoria e l'elevata pressione sanguigna. L'incrementante aggregazione indotta da questi lipidi impedisce un'ossigenazione omogenea dei tessuti periferici (*Maeda et al. 2006*).

### **1.3 DEFORMABILITA' ERITROCITARIA**

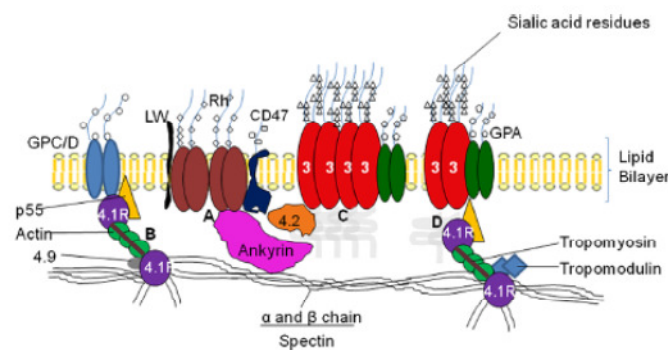
La deformabilità dell'eritrocita viene definita come la capacità del globulo rosso di deformarsi reversibilmente in risposta ad una forza applicata che genera stress sulla cellula (*Delaunay et al. 2007*). Questa caratteristica è indispensabile affinché l'eritrocita possa passare attraverso i capillari di diametro più piccolo delle stesse cellule nel letto microcircolatorio e nei sinusoidi della milza. A livello del macrocircolo invece i globuli rossi tendono ad allinearsi con il loro asse maggiore alla direzione del flusso ematico (*Branemark et al. 1977*). Una qualsiasi alterazione di tale proprietà porta conseguentemente ad una compromissione del normale apporto di ossigeno ai tessuti. La deformabilità dell'eritrocita normale è dovuta alla sua bassa viscosità intracellulare citoplasmatica che si manifesta con un eccesso dell'area della superficie della membrana in relazione al volume cellulare (rapporto superficie/volume) e le proprietà viscoelastiche della membrana. La perdita dell'elasticità che si esplica con l'irrigidimento del globulo rosso può originare dal peggioramento di una o dalla combinazione di tutte queste proprietà (*Baskurt et al. 2009*). Nell'eritrocita senescente o patologico l'attività degli enzimi antiossidanti diminuisce ed il danno ossidativo influenza il citoscheletro e lipidi di membrana aumentandone la rigidità. La disfunzione della pompa ionica fa perdere il potassio e l'acqua, aumenta la concentrazione dell'emoglobina ed aumenta la viscosità del citoplasma. Contemporaneamente il legame emoglobina-citoscheletro concentrazione dipendente danneggia il movimento di membrana influenzando la deformabilità cellulare (*Johnson et al. 1992*). Con il passaggio nella milza e nei capillari l'eritrocita tende a perdere i suoi frammenti di membrana quindi il cambiamento del rapporto superficie volume è sfavorevole da un

punto di vista reologico (*Waugh et al. 1992*). La deformazione è un fenomeno strettamente fisico e reversibile. La legge di Hook ( $F=kDx$ ) ci spiega perché questa proprietà è direttamente proporzionale alla forza ma quando cessa esso tende a riassumere la sua forma a riposo. Se invece abbiamo un processo di trasformazione chimica per cambiamento nella concentrazione ionica, alterazione della struttura emoglobinica o perdita di frammenti di membrana abbiamo un processo irreversibile di irrigidimento (*Baskurt et al. 1996*). Esiste una distinzione fra caratteristiche di deformabilità della cellula intrinseche (proprietà elastiche e viscosi della membrana e del citoplasma) ed estrinseche (rapporto superficie/volume ed elementi intracellulari)(*Meiselman et al. 1978*). Le principali cause di una ridotta deformabilità sono comunque attribuibili ad uno dei seguenti fattori:

#### **Alterazioni a carico dei lipidi di membrana**

La membrana eritrocitaria è composta per il 60% in fosfolipidi [fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), sfingomieline (SM), fosfatidilserina (PS) e componenti minori come fosfatidil inositolo monofosfato (PIP) e fosfatidil inositolo 4,5 bifosfato (PIP<sub>2</sub>), acido fosfatidico (PA), lisofosfatidilcoline (LysoPC) e lisofosfatidiletanolamine (LysoPE). Essi sono distribuiti asimmetricamente: La PS ed il PE nello strato interno la PC e la SM in quello esterno e questo stato è mantenuto da un sistema di trasporto ATP dipendente. Esiste un meccanismo di scambio di fosfolipidi detto flip/flop tra i due foglietti di cui sono responsabili la flippasi che trasloca la PS e la PE dall'interno all'esterno e la floppasi che sposta gli altri lipidi in senso inverso (*Yawata, 2003*). Questo movimento transmembrana è estremamente lento, ma può essere catalizzato da proteine intrinseche attivate da una cascata regolatoria  $Ca^{2+}$ - dipendente e divenire molto rapido (*Bratton et al. 1999, Kamp et al. 2001*). Inoltre abbiamo anche percentuali variabili di colesterolo che regolano la fluidità della cellula (*Rothman et al. 1977*). Dal momento che un globulo rosso immaturo è incapace di sintetizzare composti ex novo a causa della perdita del nucleo, la riparazione ed il rinnovo della membrana avviene ad opera di uno scambio lipidico ed acilazione di acidi grassi con le lipoproteine

plasmatiche. La forma dell'eritrocita è determinata dalle proteine di membrana e dal contenuto fosfolipidico. Questa caratteristica gli permette di mantenere l'aspetto discoidale inoltre riarrangiamenti nel citoscheletro permettono il suo passaggio attraverso i capillari e di ripristinare nuovamente la forma normale senza frammentazione cellulare (Pasini et al. 2006, Yawata, 2003). Una minima alterazione nella composizione lipidica può provocare gravi anomalie morfo-funzionali nella cellula. Altro fattore molto importante è la fluidità di membrana che dipende dalla classe dei fosfolipidi, grado di saturazione degli acidi grassi, lunghezza delle catene aciliche, tipo di colesterolo libero o esterificato, presenza o assenza di composti antipatici come i lisofosfatidi. Quando aumenta il grado di desaturazione degli acidi grassi l'impacchettamento delle code idrofobiche nel core del doppio strato è parzialmente distrutto incrementando quindi la fluidità (Plasenzotti et al. 2007). Uno studio dove i globuli rossi erano trattati con diamide ha portato alla formazione di polimeri di Spectrina ed aumento di fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina dimostrando così un'alterazione della distribuzione dei fosfolipidi come conseguenza di modificazioni del citoscheletro (Haest et al. 1978). Il rapporto molare tra colesterolo e fosfolipidi in condizioni normali varia da 0,9 a 1; se tale rapporto aumenta oltre questo limite superiore si ha una minore fluidità di membrana (Symeonidis et al. 2001). L'aumento della superficie cellulare dovuto all'introduzione di colesterolo porta alla distorsione del contorno cellulare ed a diminuita filtrabilità (Cooper et al. 1978).



**Figura 3:** Struttura della membrana eritrocitaria (da De Oliveira et al. 2010)

### **Alterazioni a livello delle proteine di membrana**

Le proteine di membrana sono divise in proteine periferiche spectrina, actina, proteina 4.1 tipiche del citoscheletro, integrali come la banda 3 e le glicoforine, di ancoraggio anchirina e proteina 4.2 (vedi fig 3). Queste possono essere separate, in base al loro peso molecolare, su gel di SDS-poliacrilamide dopo solubilizzazione delle membrane con SDS (*Fairbanks et al. 1971*). La proteina della banda 3 con il suo sito N terminale associato a parecchie proteine è responsabile nel mantenere il sito di ancoraggio al citoscheletro quindi è fondamentale per la flessibilità e rigidità eritrocitaria. Ad esso si legano anche le anchirine e le proteine 4.2 e 4.1, enzimi glicolitici ed emoglobina. (*Moriyama et al. 1993, De Oliveira et al. 2008, Poole et al. 2000*). Le tre principali proteine del citoscheletro spectrina, actina e proteina 4.1 formano il complesso giunzionale. Le interazioni membrana-citoscheletro che avvengono tramite esso possono essere modulate dalla fosforilazione della proteina 4.1 tramite protein chinasi C, protein chinasi A, calmodulina. Queste fosforilazioni diminuiscono le interazioni proteina 4.1-spectrina-actina e proteina 4.1-banda-3. La deformabilità eritrocitaria è strettamente dipendente da queste interazioni (*De Oliveira, 2008*). Citoscheletro e membrana sono collegate non solo dalle interazioni proteina-proteina ma anche da quella proteina-lipide in questo caso esplicita dal legame diretto spectrina-fosfatidiletanolamina (*De Oliveira, 2008, Ray et al. 2004*). E' stato dimostrato un incremento della rigidità della membrana eritrocitaria, in soggetti affetti da patologie metaboliche come il diabete mellito, che portano ad alterazioni della componente proteica del plasmalemma (*Bratton et al. 1999, Symeonidis et al. 2001*).

### **Influenza dello ione calcio**

Un aumento dei cationi di Calcio intracitoplasmatico nell'eritrocita o l'uso di bloccanti dei canali di questa molecola porta a rilevanti cambiamenti sulla deformabilità (*Oonishi*

*et al. 1997*). L'effetto più importante dell'aumento di calcio sulla membrana è provocato dall'attivazione di una transglutaminasi che causa la fusione covalente delle proteine di membrana mediante ponti in cui è coinvolta la lisina con formazione di polimeri identici a quelli della fibrina ma molto più stabili. Conseguenza è la perdita irreversibile di deformabilità (*Siefring et al. 1978, Lorand et al. 1979*). E' ragionevole pensare che anche una piccola riduzione di attività della pompa del  $Ca^{2+}$  possa portare, in un tempo molto breve rispetto alla vita del globulo rosso, al danno della membrana eritrocitaria (*Lux et al. 1979*). Una concentrazione di  $Ca^{2+}$  in un intervallo di 1-100  $\mu$ M può diminuire la stabilità di membrana in presenza di calmodulina ed oltre il valore 100 anche senza di essa. A livello molecolare tali modificazioni possono essere correlate agli effetti del calcio e della calmodulina sull'interazione spectrina-proteina 4.1 componenti essenziali del citoscheletro (*Takakuwa et. al. 1990*).

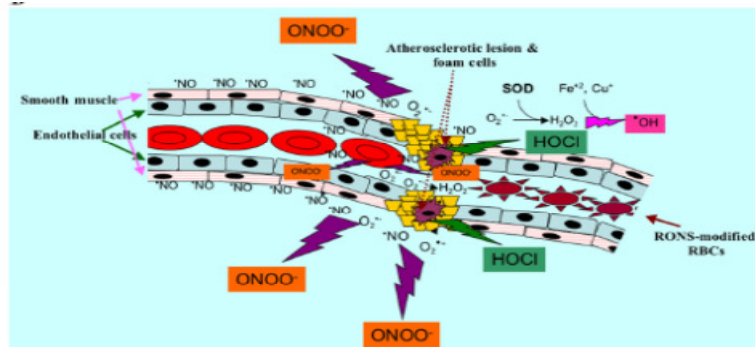
### **Danno di tipo ossidativo**

Ogni giorno gli eritrociti subiscono stress per mezzo di patogeni, eventi fisici come il passaggio nei capillari, ossidativi quando attraversano tessuti ricchi di radicali in lesioni aterosclerotiche. I globuli rossi sono una macchina antiossidante molto efficace nel mantenere una interazione scheletro/membrana funzionale e per rimuovere o riparare proteine/lipidi danneggiati. Infatti pur essendo privi di un proprio apparato proteosintetico riescono a contrastare le alterazioni indotte dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e azoto (RONS) (*Boas et al.1998, Buehler et al. 2004, Minetti et al. 2006,2007*). Gli eritrociti sono in grado di Sequestrare ROS e RONS per migliorare le difese antiossidanti dell'organismo in quanto dotati di un pool enzimatico nella membrana plasmatica (*Martin et al. 2006 ,Nickel et al.2006, Kennet et al.2006*). Esiste l'ipotesi che il globulo rosso incrociando aree infiammate grazie a questa caratteristica contribuisca a detossificare l'area (*Fonseca et al.2001*). L'incontro con un tessuto flogistico dotato di un'intensa produzione di radicali d'altra parte provoca uno sbilanciamento redox (disequilibrio tra componenti ossidati e ridotti all'interno della

cellula). Ciò avviene nei tessuti patologici con produzione di fosfolipidi ossidati e 4 idrossinonenale che provocano un insulto ossidativo capace di superare le difese dell'eritrocita modificandolo e trasformandolo in un vero e proprio proiettile ossidativo in grado di colpire distretti lontani dall'area innescando il danno (*Leitiniger et al. 2005, Leonarduzzi et al. 2005*). L'evento che fa slittare il comportamento da anti a pro ossidante è il danneggiamento dell'eme che interagendo con i perossidi si trasforma in una sorgente di radicali dannosi (*Grinshstein et al. 2003*). Conseguenza è il riarrangiamento del citoscheletro, ossidazione e perdita dell'asimmetria lipidica. La cellula diventa quindi più rigida ed è sottoposta più facilmente a lisi oppure può esporre molecole di segnale come le fosfatidilserine per i monociti o i prodotti avanzati di fine glicazione AGES che di solito sono espressi maggiormente nei diabetici (*Casado et al. 1994, Yelinova et al. 1996, Konukoglu et al. 2002, Minetti et al. 2007*). L'azione dei radicali liberi a carico dei lipidi di membrana è dannosa quando innesca un processo a catena detto di lipoperossidazione che ha come bersaglio gli acidi grassi polinsaturi. Il radicale idrossile ( $\text{OH}^\bullet$ ) cattura un atomo d'idrogeno da un carbonio metilenico nella catena polialchilica dell'acido grasso formando un radicale  $\text{L}^\bullet$  il quale tende a stabilizzarsi formando un diene coniugato che in presenza di ossigeno forma un radicale perossilipidico ( $\text{LOO}^\bullet$ ). Esso segue 2 destini: 1. Può ciclizzare e frammentarsi originando malonildialdeide (MDA) in grado di reagire con i fosfolipidi di membrana impedendo la possibilità di movimento delle molecole con perdita di fluidità. 2. Il gruppo perossilipidico ( $\text{LOO}^\bullet$ ) per le sue proprietà idrofile si approssima nella regione superficiale del doppio strato della membrana facendo ripiegare ad U la catene acilica dell'acido grasso con aumento del suo ingombro sterico alterandola da un punto di vista strutturale e funzionale. La nuova configurazione facilita l'attività della fosfolipasi  $\text{A}_2$  che idrolizza il fosfolipide perossidato in lisofosfolipide ed acido perossilipidico libero con ulteriore danno. La frammentazione e le lesioni molecolari degli acidi grassi insaturi dei fosfolipidi portano alla destrutturazione della membrana cellulare, diminuzione della sua fluidità, perdita delle interazioni lipide-lipide e lipide-proteina e



formazione di regioni idrofile nel core idrofobo (Cestaro *et al.* 1994). Il danno ossidativo può essere caratterizzato anche dalla formazione di aggregati proteici uniti fra loro da ponti disolfuro principalmente costituiti da spectrina (Steck *et al.* 1972, Palek *et al.* 1978, 1979, Liu *et al.* 1979).



**Figura 4:** Disegno schematico delle modificazioni che avvengono nei globuli rossi che scrono in un vaso sanguigno aterosclerotico. Gli eritrociti sono strutturalmente e funzionalmente modificati dai RONS prodotti nel microambiente infiammato. (Da Minetti *et al.* 2008)

### **Emoglobinopatie**

La deossigenazione cellulare provocata dall'Anemia Falciforme causa un aumento nella permeabilità a cationi monovalenti e calcio con conseguente perdita di acqua e ioni. L'incremento conseguente del parametro MCHC (concentrazione emoglobinica media cellulare) provoca una riduzione nella deformabilità. In altre emoglobinopatie si va da un leggero aumento nella permeabilità del potassio nelle cellule talassemiche ad una deidratazione in pazienti con malattia dell'emoglobina C (Clark *et al.* 1980). Nella sferocitosi ereditaria dove ho un difetto o deficienza di una o più proteine componenti la membrana, gli eritrociti hanno una forma anomala, più alte richieste metaboliche e sono prematuramente intrappolati e distrutti dalla milza (Iolascon *et al.* 2010).

### **1.4 AGGREGAZIONE ERITROCITARIA**

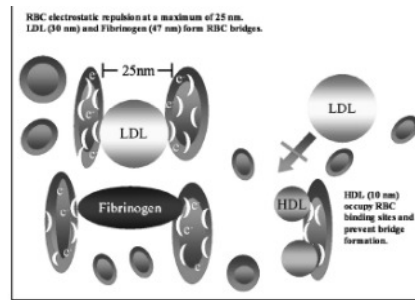
L'aggregazione reversibile degli eritrociti umani è il maggior determinante delle proprietà reologiche del sangue dal momento che influenzano le dinamiche di flusso in vivo e la resistenza allo scorrimento del sangue. I globuli rossi formano aggregati multicellulari lineari o ramificati in vitro quando vengono sospesi nel proprio plasma o in soluzioni contenenti grossi polimeri (es. destrano > 40 KDa) (Baskurt *et al.* Handbook

*of Haemorhology and Hemodynamics, 2007*). Già a metà dell' '800 era stato osservato che se una goccia di sangue umano veniva messa tra due vetrini ed esaminata al microscopio, i globuli rossi si appaiavano l'uno all'altro dalla parte della loro superficie piatta, formando lunghe masse cilindriche come una pila di monete dette rouleaux. L'eritrocita libero all'estremità di queste aderisce ad altri, generando così una rete (*Lister et al. 1958*). Questi aggregati cellulari, dovuti principalmente al fibrinogeno, disturbano le linee di flusso plasmatico e sono perciò grandemente responsabili dell'incremento di viscosità ematica soprattutto alle basse shear rates (*Merril et al. 1963, Chien et al. 1966, Weaver et al. 1969, Poole et al. 1952*).

Questo fenomeno è un processo reversibile in quanto gli aggregati disposti da forze fluido-meccaniche tendono a riformarsi quando esse vengono a mancare. Aumenti anormali di tale parametro emoreologico sono stati osservati in molte malattie associate con disturbi vascolari come diabete mellito o ipertensione. In primo luogo esso è determinato dall'aggregabilità dei globuli rossi ovvero dalle caratteristiche intrinseche cellulari che possono influenzare l'aggregazione e dalle concentrazioni delle macromolecole circolanti a livello plasmatico. Nel sangue il fibrinogeno è uno dei più importanti determinanti della viscosità ematica in quanto tende ad incrementare entrambi questi due parametri: la viscosità plasmatica e l'aggregazione. Ad oggi esistono due modelli coesistenti per l'aggregazione dei globuli rossi: **MODELLO A PONTE** che propone un processo di aggregazione basato sulle forze leganti originate dall'assorbimento di macromolecole sulla superficie di cellule adiacenti quando esse superano le forze disaggreganti generate dalla repulsione elettrostatica, deformazione della membrana e forza di taglio meccanica. Tale modello assomiglia a quello che governa l'agglutinazione con la sola differenza che l'energia di assorbimento delle macromolecole è stata ipotizzata essere di entità minore. Il **MODELLO A DEPLEZIONE** invece più recente propone l'opposto ovvero che l'aggregazione eritrocitaria sia il risultato di una più bassa concentrazione proteica o polimerica vicino alla superficie della cellula nei confronti del mezzo di sospensione (deplezione vicino

alla superficie cellulare). L'esclusione delle macromolecole provoca un gradiente osmotico ed un successivo esaurimento dell'interazione. Anche qui le forze disaggreganti sono di repulsione elettrostatica, deformazione, taglio meccanico. Questi 2 meccanismi però sono in conflitto perché il modello a ponte mi spiega l'aumentata aggregazione conseguente ad un'alta concentrazione proteica o polimerica alla superficie eritrocitaria, mentre il modello deplezione predice esattamente l'opposto. Si tende pertanto a considerare ancora come valido il primo modello (*Baskurt et al. Handbook of Haemorhology and Hemodymamics 2007*). La membrana eritrocitaria possiede una carica globale negativa ad opera dei residui dell'acido acetilneuraminico (acido sialico) che creano una forza repulsiva elettrostatica mentre l'aggregazione invece è dovuta alle forze attrattive di Van der Waals. E' stato visto che la desialilazione a livello di cellule della parete vascolare causa una formazione neointima con un aumento interno di LDL ossidate. Il fibrinogeno può essere assorbito dalla membrana e giocare un ruolo a ponte per aumentare gli eritrociti. Il diametro, il peso e la carica elettrica sono requisiti che determinano la capacità delle proteine di legarsi con i globuli rossi (*Cuniberti et al. 2005*). Molti studi hanno trovato una correlazione negativa tra aggregazione e concentrazione di HDL nel plasma (*Ruhenstroth-Bauer et al. 1987, Zeltser et al. 2004*). L'aggregazione di RBC è responsabile per la maggior parte dell'aumento della viscosità alle basse shear rate nelle quali le forze attrattive di van der Waals legano gli eritrociti. Le proteine plasmatiche con diametro più grande di 25 nm contrastano la carica repulsiva negativa delle membrane degli eritrociti mentre quelle più piccole simili in dimensioni ad HDL tali come albumina (diametro 15 nanometri), sono state associate con più bassa viscosità plasmatica in pazienti con proteinuria. L'HDL con un diametro intorno ai 10 nm è incapace di formare aggregati ma può legare gli RBC ed inibire altre più ampie lipoproteine tali come colesterolo LDL dall'attaccarsi ai globuli rossi. Il blocco di questi siti tramite HDL si risolve in una diminuita aggregazione (*Moriarty et al. 2005*). E' stato suggerito che la protezione di HDL dall'aggregazione dei RBC oltre alla competizione con LDL include l'inibizione di

attività pro coagulante  $\text{Ca}^{2+}$ -indotta sulle membrane degli eritrociti (Rosenson et al. 1998). In letteratura si trovano evidenze della correlazione tra disfibrinogemia ed alterazione di alcuni parametri emoreologici come l'aggregazione eritrocitaria e la viscosità plasmatica (Morsdorf et al. 1997).



**Figura 5** : Proteine plasmatiche ed aggregazione eritrocitaria in base alla loro dimensione (da Moriarty ed al. 2005 modificato da Sloop ed al. 1998)

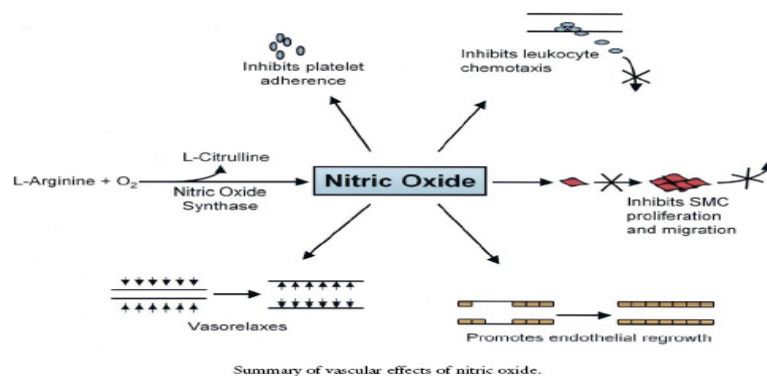
L'aumento dell'aggregazione causa incremento nella resistenza totale vascolare (Gustafsson et al. 1981, Maspers et al. 1990, Vicaut et al. 1994) e nelle arteriole e capillari del microcircolo (Vicaut 1995, Vicaut et al. 1994) dovuta cambiamenti nella viscosità ematica (Cabel et al. 1997). E' ben documentato che l'aggregazione è promossa principalmente da proteine ad alto peso molecolare (Zannad et al. 1992, Lip et al. 2007), Aptoglobina (86-400 kDa), proteina C reattiva, (105 kDa) ceruloplasmina (132 kDa), fibrinogeno (340 kDa), mostravano un forte effetto su aggregazione mentre non succedeva con quelle a più basso peso molecolare tali come  $\alpha$ 1- glicoproteina acida ed  $\alpha$ 1 antitripsina (54 kDa) (Weng et al. 1996, Putnam FW 1984). Nonostante siano stati identificati nella membrana eritrocitaria specifici recettori per la cerulo plasmina (Barnes et al. 1984, Saenko et al. 1990) il fibrinogeno ha un effetto più grande rispetto alle altre proteine plasmatiche sull'aggregazione eritrocitaria (Lominadze et al. 1998, Weng et al. 1996, Game et al. 1996, Letcher et al. 1983, Chen et al. 1993). Esso si lega in modo specifico alla membrana eritrocitaria (Lominadze et al. 2002) che sappiamo subire cambiamenti in uno stato di ipertensione (Lominadze et al. 1998, Lominadze et al. 2002) dove specifici recettori per il fibrinogeno possono essere alterati. Inoltre il legame del fibrinogeno ai suoi recettori endoteliali può attivare la

cascata di segnale che altera la vasoattività attraverso la distruzione di biodisponibilità di ET-1/NO aumentando la permeabilità della cellula. E' stata dimostrata la riduzione della formazione di aggregati eritrocitari in pazienti sottoposti ad aferesi, probabilmente in accordo con la riduzione del livello plasmatico di fibrinogeno che si ottiene in seguito a tale procedura (*Otto et al. 2002, Rampling et al. 1984*).

## 2. OSSIDO NITRICO

Il nitrossido è una molecola chimicamente labile ed è implicata in diversi meccanismi biologici, quali la regolazione del tono vasale, la vasodilatazione secondaria ad eventi di shear-stress, l'inibizione della proliferazione delle cellule muscolari lisce, dell'adesione cellulare all'endotelio e dell'aggregazione piastrinica (*Moncada et al., 1993*). Il NO è un gas con un'emivita di alcuni secondi. Esso viene sintetizzato dalla famiglia degli enzimi NO sintasi (NOS) che attraverso l'ossidazione di L-arginina producono NO e citrullina. Il meccanismo di reazione prevede un'iniziale idrossilazione della L-Arginina, con successiva produzione di N-idrossi-L-arginina. Tale intermedio di reazione può agire nuovamente da substrato per l'enzima e viene ossidato con conseguente formazione di L-Citrullina e NO (*Marletta et al., 2001*). Nell'essere umano sono state definite 3 isoforme : due vengono espresse costitutivamente e sono la NOS neuronale (2x160 kDa) (nNOS o NOS-1 perché è stata scoperta per prima) e la NOS endoteliale (2x134 kDa) (eNOS o NOS3). Entrambe sono forme costitutive che vengono regolate dal calcio, dalla calmodulina e da enzimi che sono modificati in fase post traduzionale. La terza isoforma NOS inducibile (iNOS o NOS2) è invece regolata dalle citochine o altri agenti infiammatori e produce una quantità di NO maggiore delle altre due (*Marletta et al., 2001*). Tutte e tre richiedono molti cofattori per funzionare: BH4 (tetraidrobiopterina), NADPH (nicotinammide adenina di nucleotide fosfato), FAD (flavin adenin di nucleotide), FMN (flavin mononucleotide) (*Ignarro et al. 1999, Napoli et al. 2006*). Le NOS sono enzimi omologhi ed hanno tutti una struttura dimerica. Ciascun monomero contiene un dominio reduttasico ed un dominio ossigenasico (*Govers et al., 2001*). Il primo contiene siti di legame per FAD, FMN, NADPH mentre il secondo per il gruppo eme, per l'arginina e la BH4. Tra le due regioni si trova un sito di legame per la CaM che regola il trasferimento elettronico (*Crane et al., 1997*). I due domini svolgono funzioni cataliticamente distinte: il dominio reduttasico, isolato, sembrerebbe in grado di trasferire gli elettroni dal NADPH, attraverso i due coenzimi flavinici FAD e FMN, al citocromo c, mentre il dominio ossigenasico è in grado di

convertire l'intermedio di reazione N-idrossi-L-arginina in NO e L-citrullina. Inoltre esso possiede un atomo di zinco (Zn) tetraedricamente coordinato a due coppie di residui di cisteina (Cys). Sembra che sia importante nella determinazione della stereospecificità del sito di legame alla tetraidrobiopterina (BH4). Le NO sintasi funzionano come dimero ed il gruppo eme svolge un ruolo essenziale nella dimerizzazione (Marletta, 2001). Gli enzimi eNOS sono espressi da una varietà di tipi cellulari: eNOS è stato identificato nelle cellule muscolari lisce dell'endotelio, miociti cardiaci, cellule dell'osso e neuroni; nNOS in neuroni, muscolo scheletrico, pancreas, reni; iNOS è espresso in qualunque tipo cellulare sotto stimolo di citochine ed è costitutivamente espresso in tessuti come la parete intestinale (Barbato et al., 2004). A livello dell'omeostasi vascolare esplica un ruolo protettivo nel sopprimere l'anormale proliferazione delle cellule del muscolo liscio vascolare (VSMCs) in seguito a molte situazioni patologiche inclusa l'aterosclerosi (Napoli et al., 2001, Ignarro et al., 2004).



**Figura 6** : Effetti vascolari del nitrossido (da Barbato 2004)

Ha molte funzioni regolatorie e metaboliche: controllo dell'omeostasi, della fibrinolisi, delle interazioni tra piastrine e leucociti nella parete arteriosa, della regolazione e della crescita del tono vascolare. Il controllo funzionale delle VSMC e delle cellule sanguigne circolanti è regolato da alcune molecole endogeno-vasoattive come la prostaciclina, il trombossano, l'endotelina, l'angiotensina, le specie ROS attive dell'ossigeno, la bradichinina prodotte dalle cellule endoteliali. Quest'equilibrio può essere alterato da

molti fattori sia endogeni che esogeni: stress psico-fisico, vasospasmo, infiammazione, adesione ed aggregazione piastrino-leucocitaria, trombosi, aterosclerosi ed ipertensione (*Ignarro et al., 1999, Furchgott et al., 1999*). Inoltre il NO può agire direttamente sulle piastrine inibendone l'aggregazione ed l'adesione (*Radomski et al., 1990, Vallance et al., 1992, De Graaf et al., 1992*). La eNOS può essere espressa a livelli più alti in condizioni particolari quali l'esercizio fisico (*Laughlin et al., 2001*), la stimolazione con estrogeni (*Chambliss et al., 2002*), l'ipertermia (*Harris et al., 2003*) e lo shear-stress (*Lam et al., 2006, Balligand et al., 2009*).

### **Regolazione della NOS nelle cellule endoteliali**

Nell'endotelio il nitrossido che agisce come potente vasodilatatore sia in modo autocrino che paracrino, viene sintetizzato da eNOS costitutivo calcio/calmodulina (CaM) dipendente che risiede ancorato alla membrana nel complesso di Golgi (*Rassaf et al., 2002, Liu et al., 1996*). L'enzima è attivato a livelli massimali da elevate concentrazioni di Ca<sup>2+</sup> intracellulare, per influsso di Ca<sup>2+</sup> dall'esterno o per rilascio dai depositi intracellulari. L'attivazione della eNOS può essere indotta da sostanze quali catecolamine e vasopressine, da molecole autacoidi, come la bradichinina e l'istamina e da mediatori di derivazione piastrinica come la serotonina e l'ADP, attraverso proteine G-recettore attivate. La localizzazione sulle caveolae del plasmalemma (piccole invaginazioni della membrana plasmatica in cui sono sequestrate alcune proteine di regolazione) è mediata da modificazioni post traduzionali a livello dell'estremità N-terminale, N-miristoilazioni e N palmitoilazioni. Il contenuto in lipidi delle caveolae è importante per la loro funzione; infatti in condizione di ipercolesterolemia, alterazioni dell'attività dell'enzima possono essere causate da variazioni dell'ambiente lipidico (*Marletta MA et al., 2001*). Un possibile meccanismo regolatorio dell'enzima a livello molecolare è stato proposto da *Ozuyamann e coll.* nel 2008: tramite il trasporto vescicolare eNOS si lega alla caveolina-1 (Cav-1) all'interno delle caveolae, invaginazioni della membrana plasmatica ricche di colesterolo e sfingolipidi (*Feron et al., 1998*). Tale interazione va ad inibire l'attività catalitica di eNOS



in quanto Cav-1 va ad interferire con il legame della CaM in condizioni di basse concentrazioni di calcio citosolico (*Tripathara et al., 2007*). La shear stress all'interno del vaso attiva inoltre i canali del potassio, favorendo l'ingresso di tale ione nella cellula. Il potassio presente all'interno della cellula favorisce la fosforilazione della serina 1177 dell'enzima eNOS ad opera della serina/treonina proteinchinasi Akt/PKB. La fosforilazione della serina 1177 promuove direttamente l'attività dell'enzima, alterandone la sensibilità al calcio e rendendo la sua attività massima a concentrazioni di calcio sub-fisiologiche. L'aumento della concentrazione di calcio è dovuta anche al suo rilascio da parte del reticolo endoplasmatico (*Dimmeler et al., 1999*). L'eNOS si associa inoltre con la proteina heat shock 90 (Hsp90), facilitando in tal modo il legame con la CaM e l'interazione con Akt (*Fulton et al 1999*). Il NO, una volta generato, attiva la guanilato ciclasi, con conseguente produzione di cGMP (guanosina-monofosfato ciclica), che induce il rilassamento muscolare diminuendo la concentrazione di calcio libera intracellulare. Una diminuzione nella concentrazione di calcio citosolica e la defosforilazione di eNOS porta nuovamente al legame dell'enzima con cav1 e la sua rilocalizzazione nel complesso di Golgi da dove può essere trasportato nelle caveole (*Ozuyaman et al. 2008*). Il NO stesso ed i metaboliti NO derivati ( $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$ ), così come gli S-nitroso tioli e i nitrosili metallici, sono coinvolti nel modulare l'omeostasi cellulare, regolando il tono vasale ed inibendo la proliferazione delle cellule del muscolo liscio e l'adesione eritrocitaria (*Bryan et al., 2004*). La mancanza o la ipoprodotzione di NO provoca disfunzione endoteliale, favorendo l'aterosclerosi (*Moncada et al., 1993*). Amminoacidi endogeni come la dimetilarginina asimmetrica (ADMA) e la N monometil L-arginina (L-NMMA) sono invece inibitori di eNOS.

## Regolazione della NOS nell'eritrocita

La sintesi di NO nei globuli rossi ha un distinto meccanismo regolatorio. Per il suo funzionamento sono state proposte due teorie entrambe d'accordo sul fatto che l'emoglobina regola la biodisponibilità di NO.

1. Il NO endotelio derivato è inglobato negli eritrociti ed inattivato dall'ossiemoglobina (HbO<sub>2</sub>) tramite conversione a metemoglobina (MetHb) e nitrato. Si lega poi all'eme libero per formare eme-nitrosil-Hb(HbNO), perde un elettrone ed interagisce con il residuo 93 della cisteina della catena  $\beta$ -globina per formare S nitroso emoglobina (SNO-Hb) (*Pawloski et al., 2001, Wennmalm et al., 1992, Gow et al., 1999*). L'interazione di NO con emoglobina può regolare l'introduzione ed il rilascio dell'ossigeno coinvolto nelle classiche risposte fisiologiche di vasodilatazioni ipossiche e vasostrizioni iperossica nel ciclo respiratorio umano (*Lipton et al., 2001, Palmer et al., 2007*).
2. Il NO reagisce con HbO<sub>2</sub> e deossiemoglobina con un tasso diffusione limitata per produrre nitrato, MetHb e Fe-nitrosil emoglobina (FeHbNO). Il tasso di NO con funzione di sequestro è ridotto 1000 volte dall' emoglobina entro la membrana dei globuli rossi. I tassi di consumo da parte dell'emoglobina intraeritrocitaria e da cellula libera ci suggeriscono che solo quando essa è compartimentalizzata nei RBC produrrà NO da ricche concentrazioni di cellule endoteliali nel muscolo liscio necessario per attivare cGMP e causare vasodilatazione (*Herold et al.,2001, Liu et al.,1998, Vaughn et al.,1998*).

Esistono una serie di barriere diffusionali tra il NO prodotto dalle cellule endoteliali ed i globuli rossi che includono lo strato circolante degli eritrociti e lo strato di RBC alla parete vasale indotto dal flusso e la membrana stessa dell'emazia (*Liao et al.,1999, Vaughn et al.,2000*). Il potenziale rilascio di questo mediatore da parte degli eritrociti potrebbe avere un maggiore impatto nel regolare il flusso sanguigno nel microcircolo perché tende a reagire con l'emoglobina al 40-60% di saturazione che è più alta della



elevate esercitano un effetto vasodilatatorio. Dal momento che la vasodilatazione NO indotta è conseguenza di una riduzione della concentrazione di  $Ca^{2+}$  intracellulare attraverso la via di segnalazione che coinvolge la guanilato ciclasi (GC) e la protein chinasi cGMP-dipendente (PKG), la vasocostrizione sembra correlare con un incremento di tale concentrazione (*Kojda et al., 1999*). Il NO contribuisce alla vasodilatazione vascolare determinando, attraverso la stimolazione della GC, un incremento dei livelli di cGMP e l'attivazione della protein chinasi C (*Tang et al., 2003*). Il NO e il cGMP attivano infatti la protein-chinasi G (PKG), inibendo l'idrolisi del fosfatidilinositolo, con conseguente riduzione della mobilizzazione di calcio intracellulare. La PKG attiva inoltre la miosinafosfatasi, contribuendo a promuovere il rilassamento vascolare. Inoltre, la via di segnalazione NO/cGMP/PKG controbilancia l'attivazione cellulare stimolata da vasocostrittori che agiscono su recettori accoppiati a proteine Gq (es. recettori dell'angiotensina II, dell'endotelina e della vasopressina) (*Tang et al., 2003*).

I processi di contrazione e rilassamento delle cellule muscolari lisce della parete dei vasi sono regolati dall'entità della fosforilazione delle catene leggere della miosina (MLC, myosin light chain), mediata dall'enzima MLCK (myosin light chain kinase) calcio/calmodulina dipendente, e della defosforilazione, attraverso la miosina-fosfatasi (*Somlyo et al., 1994; Davis et al., 1999; Hartshorne et al., 1999*). La MLCK fosforila le MLC attivando la miosina ATPasi e generando forza contrattile, mentre la miosina-fosfatasi agisce controbilanciando questo processo (*Hartshorne et al., 1999*). Le due vie di sintesi del cGMP sono regolate reciprocamente. In quest'ottica è stato proposto che la reazione di NO con l'emoglobina, con formazione di S-nitrosoemoglobina (SNOHb), possa contribuire a regolare il flusso sanguigno e l'ossigenazione tissutale attraverso il legame ed il trasporto con controllo allosterico di NO e  $O_2$  a livello vasale (*Gladwin et al., 2003*). E' stata suggerita l'esistenza di molteplici barriere di diffusione che ostacolano la reazione di NO con l'emoglobina intra-eritrocitaria. Pertanto l'equilibrio tra la produzione di NO a livello endoteliale, la captazione del NO da parte

dell'emoglobina e la presenza di barriere di diffusione cooperano nel regolare la biodisponibilità di NO (*Gladwin et al., 2003*).

## 2.1 I POLIMORFISMI DI eNOS

Da quando il gene eNOS, codificante la NO sintasi endoteliale, è stato sequenziato, sono state individuate diverse alterazioni nella sua sequenza, nella regione del promotore, negli esoni e negli introni. Il gene codificante l'enzima eNOS mappa sul cromosoma 7 nella regione q35-36. Il gene è lungo 4.072 bp ed è formato da 26 esoni e codifica per una proteina di 1203 aa (PM= 135 KD) (*Marsden et al., 1992, Miyahara et al., 1994, Nadaud et al., 1994*). In uno studio è stato clonato ed espresso un promotore funzionale per il gene eNOS umano ed è stato dimostrato un ruolo nella modulazione dei livelli di trascrizione per il gene per il sito di legame sp1 a -103 modulato dal sito GATA a -230. Una mutazione di quest'ultimo riduceva marginalmente l'attività di eNOS (*Zhang et al., 1995*). La presenza di varianti polimorfiche nel DNA in grado di alterare il prodotto proteico dal punto di vista qualitativo o quantitativo può determinare alterazioni nella produzione di NO con conseguente danno cellulare (*Oemar et al., 1998; Candipan et al., 1996; White et al., 1994*).



**Figura 8** : Rappresentazione del gene eNOS e localizzazione dei suoi polimorfismi

### **Polimorfismo eNOS -786 T>C.**

Tale polimorfismo è stato identificato per la prima volta nella popolazione giapponese, in relazione ad uno studio volto ad identificare eventuali varianti di suscettibilità allo spasmo coronarico (*Nakayama et al., 1999*). Il polimorfismo -786 T>C (rs1800779) nella regione 5'- flanking è uno SNP (single nucleotide polymorphism) localizzato nella regione del promotore del gene eNOS che comporta la sostituzione di una timina con

una citosina 786 basi a monte del sito di inizio della trascrizione. Questo polimorfismo è stato identificato per la prima volta da Nakayama e coll. in una popolazione di soggetti con spasmo coronarico. La presenza della variante rara C determina una riduzione dell'attività del promotore di circa il 50% e quindi dell'espressione del mRNA della eNOS, con conseguente ridotta produzione di NO (*Nakayama et al., 1999*). Questo fenomeno potrebbe originare dal legame di una proteina repressore della trascrizione (RPA1) con più alta affinità quando l'allele C è presente (*Lacchini et al., 2010*). Tramite analisi SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) e successivo sequenziamento, sono state identificate nella regione -1533/+44 altre due varianti polimorfiche oltre al polimorfismo -786T>C: il polimorfismo -922A>G ed il polimorfismo -1468T>A. Tali polimorfismi sono risultati essere in linkage disequilibrium tra di loro. Inoltre, attraverso saggi effettuati utilizzando il gene reporter della luciferasi, è stato valutato come variava il tasso di trascrizione del gene in funzione delle diverse varianti polimorfiche. E' stato osservato che, in tale regione, solo il polimorfismo -786T>C sembrava influenzare il livello trascrizionale del gene e, di conseguenza, avere rilevanza fenotipica (*Zhang et al., 1995*).

#### **Polimorfismo eNOS 4 a/4b**

Il polimorfismo eNOS 4a/4b è una VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) localizzata nell'introne 4 del gene eNOS. La variante comune b è caratterizzata da una sequenza di 27 bp ripetuta in tandem 5 volte. Nel caso della variante rara a, invece tale sequenza è ripetuta 4 volte. E' stato evidenziato un effetto cis-acting con il polimorfismo -786T>C nel modulare i livelli di trascrizione del gene (*Wang et al., 2002*). Successivamente, è stato evidenziato come la VNTR nell'introne 4 del gene eNOS sia responsabile della sintesi di microRNA che sembra inibiscano l'espressione genica, contribuendo ad alterare l'acetilazione degli istoni e la metilazione del DNA in regioni adiacenti al 27bp repeat ed a livello del promotore (*Zhang et al., 2008*).

E' stato valutato singolarmente il ruolo di questo polimorfismo in relazione sia all'espressione genica che all'attività enzimatica della proteina eNOS ed è stato

osservato che nonostante i livelli di mRNA in soggetti omozigoti 4a/4a fossero più alti rispetto a quanto osservato per soggetti con genotipo 4a/4b o 4b/4b, l'attività dell'enzima era ridotta rispetto alle due classi genotipiche 4b/4b e 4a/4b (*Dosenko et al., 2006*). In un altro studio l'allele a del gene eNOS è risultato correlare con ridotti livelli plasmatici di metaboliti del NO (nitriti e nitrati): soggetti omozigoti per l'allele 4a mostravano livelli di metaboliti del NO più bassi del 20% rispetto a quelli di soggetti omozigoti per l'allele wilde type (genotipo 4b/4b) (*Whang et al., 1996*). Negli ultimi anni studiando popolazioni genetiche diverse, è stata evidenziata la presenza di alleli rari 4c nella popolazione afro-americana in pazienti con infarto miocardico e tromboembolismo venoso (*Hooper et al., 1999*) mentre la variante 4d solo in pochissimi pazienti con la stesse patologie. Uno studio condotto in Italia ha mostrato che in una popolazione di 489 pazienti con sindrome coronarica acuta il 4% dei pazienti era portatore dell'allele bd, l'1% di ac ed il 4% bc (*Bolli et al., 2007*).

#### **Polimorfismo eNOS 894 G>T**

E' uno SNP (Single Nucleotide Polymorphism) che riguarda specificatamente il nucleotide 894 del gene e consiste in una sostituzione da guanina (G) a timina (T) che, in corrispondenza del residuo aminoacidico 298, comporta la sostituzione di un acido glutammico (Glu) con un acido aspartico (Asp). La localizzazione dell'aminoacido sembrerebbe non interessare il sito catalitico dell'enzima, ma probabilmente influisce sulla stabilità dell'enzima e sulla sua interazione con cofattori o con altri componenti cellulari. E' stato dimostrato che il polimorfismo 894G>T del gene eNOS ha conseguenze funzionali sulla proteina eNOS (*Tesauro et al., 2000*). L'enzima eNOS isolato da pazienti con allele raro 894T era tagliato intracellularmente da una proteasi intracellulare il che potrebbe spiegare il peggioramento nella sua attività (*Fairchild et al., 2001*).

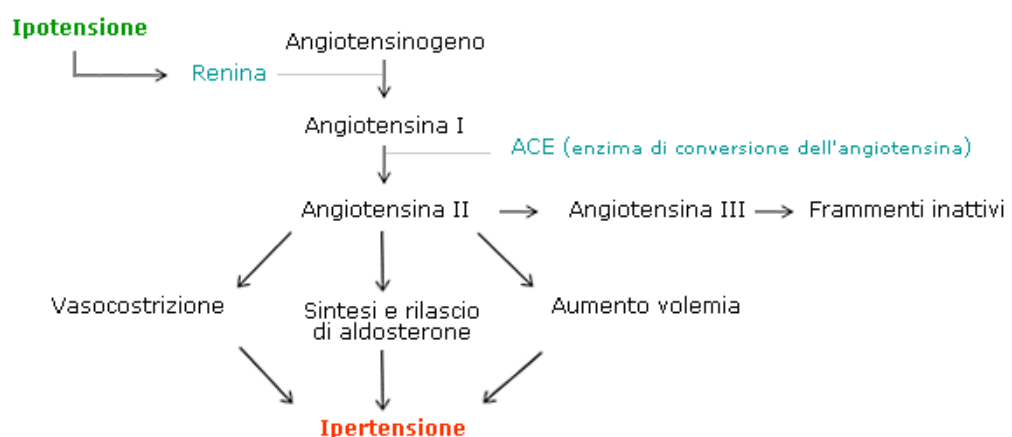
### 3. IL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

Il sistema renina angiotensina è uno dei principali regolatori della pressione sanguigna e dell'omeostasi elettrolitica.

I principali componenti del sistema renina angiotensina sono:

- l'**angiotensinogeno**, una proteina globulare che costituisce il substrato della
- **renina**, enzima che catalizza la conversione proteolitica dell'angiotensinogeno nel decapeptide angiotensina I,
- l'**enzima di conversione dell'angiotensina (ACE)**, una dipeptidilcarbossipeptidasi che converte l'angiotensina I nell'octapeptide angiotensina II,
- l'**angiotensina II**,
- i **recettori dell'angiotensina II**, responsabili della trasduzione degli effetti mediati dall'angiotensina II.

Il prodotto finale di questa cascata enzimatica media vari effetti tra cui la vasocostrizione, il rilascio di aldosterone e catecolamine, la secrezione di prolattina e adrenocorticotropina e la glicogenolisi.



**Figura 9:** Schema del sistema Renina-Angiotensina



## Angiotensinogeno

Il gene codificante l'angiotensinogeno, localizzato sul cromosoma 1 in posizione 1q42-43 (*Isa et al., 1991*) in prossimità del locus della renina (*Gaillard-Sanchez et al., 1990*), è lungo circa 13 kb e comprende 5 esoni e 4 introni (*Menard et al., 1993*). La regione a monte del gene contiene diversi elementi regolatori, tra cui elementi di risposta a glucocorticoidi, estrogeni, a molecole della fase acuta, cAMP e HSE (heat shock-response elements) (*Gaillard et al., 1989; Fukamizu et al., 1990*). Il prodotto del gene è una glicoproteina globulare di 55-60 kDa (*Menard et al., 1993*) composta da 452 residui aminoacidici. L'angiotensinogeno è ritenuto parte della superfamiglia degli inibitori delle serino-proteasi (SERPINE) (*Doolittle, 1983*), ed è una molecola che ha un ruolo fondamentale nella regolazione della pressione sanguigna e nel mantenimento dell'omeostasi idro-elettrolitica. Esso può essere prodotto nel fegato ed in altri tessuti (cuore, vasi sanguigni e tessuto adiposo) e circola come peptide biologico inattivo. Quando un residuo di 7 amminoacidi dell'angiotensinogeno si trova alloggiato in una tasca profonda della renina si realizza l'idrolisi del legame tra la leucina in posizione 10 e la valina in posizione 11 all'estremità amino-terminale (*James et al. 1985*) con conseguente conversione in angiotensina I (*Weber et al. 2001*). L'ulteriore proteolisi mediata dall'enzima di conversione dell'angiotensina I (ACE), una proteasi Zn-dipendente presente in parecchi tessuti, è responsabile del taglio di 2 amminoacidi del decapeptide angiotensina I con conseguente rilascio dell'octapeptide angiotensina II, mediatore finale del sistema (*Morgan et al., 1996*). L'angiotensina I può essere trasformata anche in angiotensina (1,9) da ACE 2, una carbossipeptidasi che media la trasformazione dell'angiotensina II in angiotensina (1,7) (*Donoghue et al 2000*). L'angiotensina II si lega ai due recettori principali AT1 ed AT2. Inoltre può essere idrolizzata da specifiche proteasi per generare altri peptidi, quali l'angiotensina (1-7), che si lega al recettore AT3, e l'angiotensina IV, che si lega al recettore AT4 (*Turner, 2003*).

## Renina

La renina è un enzima secreto da cellule specializzate delle arteriole afferenti del glomerulo renale, le cellule dell'apparato iuxtaglomerulare. La renina matura attiva è una carbossipeptidasi con una massa molecolare di approssimativamente 44 kDa (*Hsueh et al. 1991*) costituita da 340 amminoacidi membro della superfamiglia delle aspartil-proteasi che include anche la pepsina, la catepsina D e la chimosina (*Wood et al 1987*). Il suo substrato è la proteina angiotensinogeno che è presente in circolo e che viene sintetizzata dal fegato. Il gene codificante la renina è localizzato sul cromosoma 1 in posizione 1q32, è lungo 12 kb e comprende 9 esoni e 8 introni (*Hobart et al., 1984*). La renina è sintetizzata come pre-prorenina, la quale viene successivamente convertita in pro-renina in seguito all'immagazzinamento nel reticolo endoplasmatico (*Danser et al., 2008*) delle cellule iuxtaglomerulari; in esse un peptide segnale di 20 amminoacidi è rimosso dalla prorenina immagazzinata nei granuli secretori nell'apparato di Golgi. Successivamente la prorenina è processata a renina attiva mediante separazione di un peptide di 46 amminoacidi dall'estremità N-terminale della molecola dalla tripsina (*Hsueh et al. 1991*). La maggior parte (75%) delle molecole di pro-renina è secreta costitutivamente, mentre il rimanente è veicolato verso i granuli densi di secrezione a pH acido (*Danser et al., 2008*). La renina attiva circolante e la prorenina sono rilasciate principalmente dal rene (*Sealey et al., 1986*). A livello strutturale questo enzima consta di 2 lobi con una lunga e profonda tasca interposta fra loro, (*Sielecki et al. 1989*) la quale rappresenta il sito attivo dell'enzima dove alloggia l'angiotensinogeno. La stimolazione cronica determina un maggiore tasso di conversione della prorenina in renina, contribuendo ad un aumento del rapporto renina/prorenina nel plasma (*Luetscher et al., 1985*). L'attivazione di questo pro-enzima avviene in due modi: una modalità proteolitica (irreversibile) ed una non proteolitica (reversibile) (*Danser et al.,2005*). Sono stati descritti due recettori come mediatori del segnale indotto dalla renina: il mannosio 6-fosfato/recettore del fattore di crescita "insulin-like" (M6P/IGF2R) (*Van Kesteren et al.,1997; Saris et al.,2001; Van*

den Eijnden et al.,2001) e il recettore della prorenina (Nguyen et al., 2002). La renina, una volta sintetizzata, è conservata nei granuli delle cellule iuxtaglomerulari e rilasciata con un processo di esocitosi mediato dal meccanismo di accoppiamento stimolo-secrezione nella circolazione renale e sistemica. La sua produzione è regolata da 4 fattori: 1) un meccanismo baro-recettoriale a livello dell'arteriola afferente renale che intercetta i cambiamenti nella pressione di perfusione dell'organo, 2) i cambiamenti nell'equilibrio del NaCl (sensibile a cambiamenti nella concentrazione del Cl<sup>-</sup> nelle cellule della macula densa del tubulo distale 3) la stimolazione nervo-simpatica tramite stimolazione di recettori beta-1 adrenergici, 4) un feedback negativo dovuto allo stimolo diretto dell'angiotensina II nelle cellule iuxtaglomerulari (Brown et al. 2006). Essa è sintetizzata anche nel cervello, nel tessuto adiposo, nell'ovaio e ci sono dati che evidenziano un suo rilascio anche da parte del cuore e del tessuto vascolare (Atlas et al. 2007).

### **L'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE)**

L'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE o peptidil-dipeptidasi A o chininasi II) è una glicoproteina con due siti attivi carbossiterminali di massa molecolare di 180 kDa che converte l'angiotensina I inattiva nel potente vasocostrittore angiotensina II biologicamente attivo (Griendling et al.,1993; Soubrier et al. 1993). Nell'uomo sono descritte due isoforme dell'enzima, codificate da un gene localizzato in posizione 17q23, lungo 23 kb e contenente 26 esoni e 25 introni. Quella di lunghezza maggiore, detta sACE (somatica), viene trascritta dagli esoni 1-12 e dagli esoni 14-26, mentre l'isoforma più corta, nota come ACE testicolare o germinale (gACE), è trascritta dagli esoni 13-26. Il promotore di sACE si trova nel primo esone del gene, mentre per l'isoforma gACE è localizzato nell' introne 12 (Riordan, 2003; Hubert et al.,1991). L'isoforma somatica è caratterizzata dalla presenza di un dominio intracellulare carbossi-terminale di 28 residui aminoacidici, un dominio transmembrana idrofobico (22 amminoacidi) e due domini extracellulari simili, il dominio N-terminale e il dominio C-terminale, rispettivamente di 612 e 600 residui aminoacidici. Recentemente è stato

identificato un altro gene *ACE* omologo, noto come *ACE 2*, che è risultato essere un regolatore essenziale della funzione cardiaca (*Riordan, 2003; Crackower et al., 2002*).

L'isoforma sACE ha un peptide segnale che la dirige verso la sua localizzazione extracellulare. Tale molecola è altamente espressa in molti tipi di cellule endoteliali, specialmente nei capillari del polmone, dell'intestino tenue e dell'epididimo. In aggiunta alla sua localizzazione sull'endotelio della rete microvascolare renale, c'è abbondante espressione di mRNA e proteina anche sulle cellule dei tubuli prossimali (*Sibony et al. 1993*). La disfunzione endoteliale è associata alla disfunzione nella regolazione della produzione di ACE tissutale locale, con conseguente compromissione del bilancio tra vasocostrizione e vasodilatazione, con proliferazione delle cellule muscolari lisce, infiammazione e stress ossidativo (*Pagliari et al. 2005; Riordan, 2003; Coates, 2003*). L'angiotensina I non è comunque l'unico substrato naturale dell'ACE. Questo enzima è infatti in grado di degradare anche la bradichinina, un peptide vasodilatatore che deriva dalla callicreina, convertendolo in un metabolita inattivo. Inoltre contribuisce anche a diminuire la sintesi del t-PA e a stimolare la sintesi di PGI<sub>2</sub> e di PGE<sub>2</sub> (*Phillipp et al. 1998*).

L'enzima ACE2 è una glicoproteina di membrana presente sulle cellule endoteliali ed epiteliali. La sua presenza è stata osservata principalmente a livello cardiaco, renale e testicolare, con quantità minori nel colon, intestino tenue ed ovaio (*Riordan, 2003*).

### **I recettori dell'angiotensina**

Le azioni dell'angiotensina II nel sistema cardiovascolare sono mediate da due tipi di recettori: AT1 e AT2. Il gene codificante il recettore AT1 (*AGTR1*) è localizzato in posizione 3q21-q25; si estende per 47 kb ed è costituito da 5 esoni separati da 4 introni. L'intera sequenza codificante è contenuta nell'ultimo esone. I diversi mRNA che si ritrovano a livello dei diversi organi del sistema cardiovascolare si formano attraverso fenomeni di splicing alternativo. Non è ancora conosciuto il ruolo funzionale di questi diversi mRNA. Nella regione 5' del gene sono presenti sequenze enhancer ed elementi regolatori che suggeriscono una complessa regolazione dell'espressione genica

(Regitz-Zagrosek et al.,1996). Il gene codificante il recettore AT2 (*AGTR2*) è localizzato in posizione Xq22; è lungo approssimativamente 4 kb e comprende 3 esoni. Entrambi i recettori AT1 e AT2 sono hanno sette domini trans-membrana idrofobici, diversi per i siti di N-glicosilazione ed un potenziale sito di legame alle proteine G. Gli effetti biologici successivi alla stimolazione del recettore AT1 sono mediati dalla generazione di secondi messaggeri fosfolipidi-derivati e dall'attivazione della PKC (protein chinasi C). I recettori dell'angiotensina svolgono un ruolo cruciale nella fisiopatologia del sistema renina angiotensina, mediando gli effetti dell'angiotensina II. Molte funzioni note, come la vasocostrizione, la modulazione dei processi di crescita, le interazioni con il sistema endocrino e il sistema nervoso centrale, la liberazione delle catecolamine, il controllo della sintesi di aldosterone sono mediate da questi recettori. Il recettore AT2 è coinvolto in processi fisiologici come lo sviluppo e il rimodellamento tissutale (inibizione della crescita cellulare e stimolazione dell'apoptosi), la regolazione della pressione sanguigna (vasodilatazione), la natriuresi e l'attività neuronale (Lemarié et al.,2010). La classificazione dei recettori dell'angiotensina si basa sul fatto che AT1 e AT2 mostrano differenti affinità di legame per farmaci specifici: il losartan è specifico per il recettore AT1 ed i farmaci CPG42112A e PD123177 per il recettore AT2 (Regitz-Zagrosek et al., 1996). Sono descritti anche altri recettori quali i recettori AT3 ed AT4, caratterizzati da una bassa affinità per l'angiotensina II e l'angiotensina (1-7) e da un'elevata affinità per l'esapetide angiotensina (3-8), noto come angiotensina IV (Regitz-Zagrosek et al.,1996).

### **L'angiotensina II**

L'angiotensina II è un potente vasocostrittore. Agisce a livello della corteccia surrenale, determinando il rilascio di aldosterone, che stimola i tubuli renali favorendo il riassorbimento di sodio e acqua dalle urine (Brewster et al., 2004). L'effetto risultante è un aumento della quantità di fluido corporeo, che va a compensare eventuali perdite di volume, ed un aumento della pressione sanguigna. L'angiotensina II media anche la crescita e la proliferazione cellulare, stimolando varie citochine e fattori di crescita

(*Carluccio et al., 2001*). Inoltre, promuove la disfunzione endoteliale riducendo la biodisponibilità di ossido di azoto (*Rajagopalan et al., 1996*). L'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE) svolge un ruolo rilevante nel sistema chinina-callicreina. Tale enzima metabolizza la bradichinina, che rappresenta un potente vasodilatatore, formando il peptide inattivo bradichinina 1-5, contribuendo alla regolazione della pressione sanguigna anche attraverso una diversa via di segnalazione. Il riconoscimento del ruolo del sistema renina-angiotensina quale regolatore del tono vascolare e dei meccanismi di segnalazione cellulare ha messo in evidenza come un disequilibrio nelle sue funzioni possa contribuire al danno cardiovascolare (*Ferrario et al., 1997*). E' stato inoltre osservato come l'angiotensina 1-7 compensi gli effetti ipertrofici e profibrotici dell'angiotensina II a livello del cuore e dei vasi (*Langeveld et al., 2005; Machado et al., 2000; Santos et al., 2004*), abbia proprietà antiaterogene e antitrombotiche (*Fraga-Silva et al., 2008; Igase et al., 2005; Igase et al., 2008; Kucharewicz et al., 2002; Lovren et al., 2008*), inibisca lo stress ossidativo e la generazione di specie radicaliche dell'ossigeno (*Benter et al., 2008*) e moduli le funzioni ematopoietiche (*Heringer-Walther et al., 2009*). Meccanismi che coinvolgono secondi messaggeri responsabili della risposta cellulare mediata dal legame dell'angiotensina (1-7) con il suo recettore "mas" includono l'inibizione della via di segnalazione della MAPKK (mitogen activated protein kinase kinase), la stimolazione delle fosfatasi cellulari, l'inibizione della ciclossigenasi 2 e il rilascio di NO (*Nie et al., 2009; Clark et al., 2001, 2003; Giani et al., 2007, 2008; Sampaio et al., 2007; Tallant et al., 2003, 2005*). Un altro componente del sistema-renina angiotensina che è stato successivamente descritto è l'angiotensina (1-12), che deriva dall'angiotensinogeno attraverso una via non renina dipendente e che rappresenta un precursore dell'angiotensina II (*Nagata et al., 2006*).

### 3.1 I POLIMORFISMI DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

#### POLIMORFISMO ACE I/D

Nell'introne 16 del gene *ACE*, codificante l'enzima di conversione dell'angiotensina, è descritto un polimorfismo inserzione/delezione (I/D) di una sequenza Alu di 289 bp. L'allele delezione risulta correlare, secondo un effetto dose-dipendente, con i livelli plasmatici dell'enzima (*Ribichini et al., 1998*). E' stata ipotizzata la presenza di una sequenza silencer all'interno della regione conservata, di tipo Alu, all'interno dell'introne 16 del gene (*Tomilin et al., 1990*). La presenza di tale elemento silencer della trascrizione in questa regione del gene potrebbe spiegare i minori livelli di proteina circolante in presenza dell'allele delezione (*Ribichini et al., 1998*). E' stato recentemente descritto un polimorfismo nell'esone 15 del gene, il polimorfismo 2215G>A in linkage disequilibrium con il polimorfismo I/D. In particolare l'allele 2215A risulta essere in linkage con l'allele I del polimorfismo I/D e l'aplotipo *ACE* 2215A/I risulta correlare con una minore attività trascrizionale del gene (*Suehiro et al., 2004*).

Esiste anche un polimorfismo *ACE* A-240T che consiste in una transizione adenina-timina (A>T) nella regione del promotore del gene; la variante rara T risulta associata a più alti livelli di *ACE* circolante (*Foy et al., 1997*). Il ruolo del polimorfismo *ACE* I/D nel predisporre all'aterosclerosi è stato ampiamente investigato, ed è emerso un suo coinvolgimento nel modulare il processo aterosclerotico nelle sue diverse espressioni cliniche (malattia coronarica, aneurisma dell'aorta addominale, arteriopatia periferica) (*Fatini et al., 2000; Fatini et al., 2005; Basar et al., 2007*). In particolare, la variante allelica D è stata associata a più alti livelli dell'enzima circolante, predisponendo al danno vascolare (*Fatini et al. 2004, Bor Kucukatay et al. 2006*). Molti studi hanno supportato questa affermazione valutando la correlazione con l'infarto miocardico (*Cambien et al. 1992, Tiret et al. 1993*) e la malattia vascolare; in particolare l'allele D è legato all'aumento del tono del muscolo liscio che viene controbilanciato dall'attività del NO nei pazienti aterosclerotici (*Prasad et al. 2000*).

### **POLIMORFISMO DEL RECETTORE AT1 DELL'ANGIOTENSINA**

Il gene per il recettore per l'angiotensina II di tipo 1 (*AGT1R*) è localizzato sul cromosoma 3q21-3q25 (47 kb) ed è composto da 5 esoni che danno luogo ad almeno 4 forme distinte di trascritti, la cui abbondanza relativa varia da tessuto a tessuto. Nella regione 5' del gene sono presenti sequenze enhancer ed elementi regolatori che suggeriscono una complessa regolazione dell'espressione genica (*Regitz-Zagrosek et al., 1996*). Sono stati identificati almeno 20 SNPs dei quali 9 interessano regioni codificanti del gene. In particolare, 2 SNPs sono stati ampiamente studiati: un cambiamento non sinonimo entro la sequenza codificante (573T>C) ed un cambiamento nucleotidico nella regione 3' non tradotta (1166>C). La sostituzione nucleotidica 1166A>C interessa una regione cis-regolatrice che è riconosciuta da uno specifico microRNA (mi-R-155). Quando è presente l'allele raro C, la complementarità delle basi appaiate è interrotta e la capacità del miRNA di interagire con la sequenza di riconoscimento è diminuita. Come conseguenza, l'effetto inibitorio sulla traduzione è minore ed aumenta la densità del recettore AT1 (*Sethupathy et al. 2007*). Il polimorfismo *AGTR1* 1166A>C è stato osservato influenzare la predisposizione alla malattia coronarica (*Fatini et al., 2000*), lo spessore della parete aortica (*Benetos et al., 1996*), e la reattività vascolare (*Henrion et al., 1998*).

### **POLIMORFISMO M235T DELL'ANGIOTENSINOGENO**

Il polimorfismo M235T nel gene codificante l'angiotensinogeno (AGT) consiste nella sostituzione di una treonina con una metionina in posizione 235 della sequenza aminoacidica. A livello del gene, questo si traduce in una transizione timina-citosina (T>C) nell'esone 2. Lo SNP (*AGT* M235T, insieme con lo SNP *AGT* -6G>A, con cui è in stretto linkage disequilibrium, è stato ampiamente studiato in relazione all'ipertensione (*Jeunemaitre et al., 1999*). Inoltre, è stato dimostrato come tale polimorfismo correli, con un effetto dose-dipendente, con i livelli di angiotensinogeno nel plasma (*Schunkert et al., 1997, Jeunemaitre et al. 2008*). L'effetto biologico di questo polimorfismo può essere complesso perché altre mutazioni sullo stesso gene



(-532 C>T, -217A>G, -18C>T, -20A>C e +31T>C) possono giocare un ruolo nella variazione della trascrizione del gene (*Jeunemaitre et al. 1999*.)

### **3.3 RUOLO DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA SULLA PRODUZIONE DI NITROSSIDO**

Negli ultimi anni è stato valutato se l'angiotensina II stimola il rilascio di NO dall'endotelio. A livello sperimentale in preparazioni di muscolo liscio si è visto che essa attivando i recettori AT ne causava la contrazione. Lo stesso fenomeno avviene anche nei recettori delle cellule endoteliali dove essa provoca il rilascio di fattori vasoattivi endoteliali come il NO, la prostaciclina e l'endotelina. In colture cellulari l'angiotensina II aumenta i livelli cellulari di cGMP, suggerendo come il peptide possa stimolare il rilascio di NO. Quindi è ipotizzabile un'attivazione di eNOS ed un aumento di cGMP endogeno. Il rilascio di NO a livello endoteliale contribuisce pertanto a controbilanciare gli effetti sfavorevoli a livello vascolare correlati a livelli elevati di angiotensina II. Il rilascio di NO angiotensina II-indotto può agire a lungo termine sul rimodellamento vascolare perché ha effetti antiproliferativi sul muscolo liscio (*Boulanger et al. 1995*). Studi *in-vitro* condotti su colture cellulari bovine hanno infatti dimostrato che l'angiotensina II attiva eNOS tramite i recettori AT1, contribuendo ad aumentare in breve tempo (1 minuto) ed in modo dose dipendente la produzione di nitrato/nitrito (Nox). Questo effetto è abolito da inibitori della NOS e da antagonisti del recettore AT1 (Dup 753). L'angiotensina II transitoriamente stimola la formazione di IP3 (inositolo 1,4,5 trifosfato) ed aumenta le concentrazioni citosoliche di calcio libero ed il rilascio di NO tramite attivazione di eNOS calcio/calmodulina dipendente tramite recettori AT1. L'attivazione di AT1 stimola la fosfolipasi ed il fosfatidilinositolo con generazione di secondi messaggeri quali IP3 e DAG (diacilglicerolo), che portano rispettivamente alla mobilitazione del calcio intracellulare ed all'attivazione della protein-chinasi C (*Saito et al. 1996*).

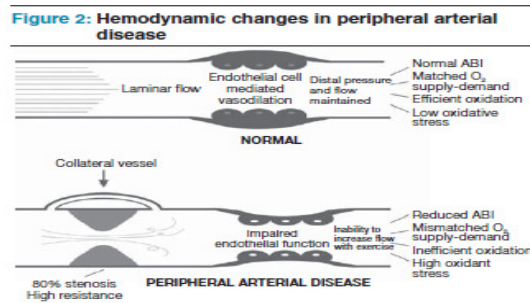
Anche la bradichinina e il recettore dell'endotelina ET1 possono contribuire ad attivare il rilascio di calcio citosolico (*Stoll et al. 1995*). La produzione di NO viene inibita anche da inibitori della protein-chinasi C (*Boulanger et al. 1995*).

## 4. EMOREOLOGIA E MALATTIA VASCOLARE

### 4.1 LA MALATTIA ARTERIOSA PERIFERICA

La malattia arteriosa periferica (PAD, Peripheral Arterial Disease) è una patologia caratterizzata dalla formazione di placche aterosclerotiche a livello degli arti inferiori. Tale processo determina una diminuzione del flusso sanguigno che provoca una sofferenza nei tessuti. Secondo la classificazione di Fontaine abbiamo uno stadio I asintomatico, stadio II claudicatio intermittens definito come disagio nel muscolo del polpaccio all'estensione che si risolve dopo pochi minuti a riposo, stadio III dolore a riposo/dolore notturno, stadio IV necrosi/gangrena con elevato rischio di amputazione dell'arto e morte del paziente (*Diagnosis and management of peripheral arterial disease SIGN Scottish intercollegiate guidelines network 2006, Shamma, 2007, Molisso et al., 2006*). La PAD colpisce il 12-14% della popolazione generale e la sua incidenza aumenta con l'età fino ad arrivare ad oltre il 20% in pazienti con anzianità maggiore di 75 anni (*Hiatt et al. 1995*). Nello studio Edinburgh Artery il principale sintomo che è la claudicatio intermittens avviene raramente sotto i 50 anni ma tende ad aumentare drammaticamente in individui più anziani. Passa da 2,2% nel gruppo di 50-59 anni a 7,7% nel gruppo 70-74 anni. La PAD tende ad essere più frequente negli uomini che nelle donne ma la differenza tra i gruppi diminuisce con il progredire dell'età (*Fowkes 1991, 1997*). Nel TASC II Working Group è stato visto che l'evoluzione a claudicatio con dolore a riposo o gangrena avviene in circa il 15-20% dei pazienti. L'incidenza annuale stimata di ischemia critica dell'arto in Europa e Stati Uniti ha un intervallo tra i 500 e 1000 nuovi casi per milione (*Minar, 2009, Norgren et al. 2007*). Nello studio Framingham Heart è stato osservato un aumento del rischio in persone con età maggiore di 65 anni (*Murabito et al. 1997*) mentre nel NHANES report l'associazione era presente negli ultasettantenni (*Selvin et al. 2004*). Una più alta prevalenza è stata osservata nello studio Cardiovascular Heart: 25% negli anziani fra 80-84 anni e 30% con età superiore agli 85 anni (*Newman et al. 1993*). La malattia può

essere presente anche in persone più giovani sotto i 50 anni che sono a rischio di amputazione dell'arto quando sono confrontati con soggetti più vecchi. (*Levy et al. 1994, Harris et al. 1996, Valentine et al. 1996, Bartolomew et al. 2006*). Nello studio di invecchiamento longitudinale italiano ILSA sulla salute degli anziani condotto in Italia nel 1992-93 su un campione con età compresa tra 65-84 anni in istituti o comunità, le prevalenze dell'arteriopatia periferica per sesso ed età sono risultate superiori nei maschi con un andamento crescente. Secondo stime ISTAT 2006 in Toscana in quell'anno erano affetti da arteriopatia periferica il 6,7% degli uomini ed il 4,5% delle donne. La proiezione ISTAT 2016 nella popolazione con PAD stima una variazione nei maschi del 10,3% mentre le femmine avranno un incremento dell'11% con prevalenza maggiore per i maschi nella fascia 65-74 anni e le femmine oltre i 75 anni. Le previsioni per il 2026 arriveranno ad un incremento del 16,5% e 11% rispettivamente (*Calderoni et al. 2008*). Il principale fattore patogenetico coinvolto nella manifestazione della malattia arteriosa periferica è l'aterosclerosi patologia multifattoriale caratterizzata da molteplici condizioni come la disfunzione endoteliale, alterazioni lipidiche, attivazione delle piastrine, stress ossidativo ed alterato metabolismo e rimodellamento della matrice. Un ruolo rilevante viene anche svolto dall'infiammazione in tutti gli stadi della patologia arteriosa in particolare a livello delle biforcazioni arteriose (*Faxon et al. 2004, Libby et al. 2002*). I pazienti affetti da malattia arteriosa periferica tendono a sviluppare delle lesioni aterosclerotiche di tipo occlusivo nelle arterie che irrorano gli arti inferiori. Sono colpite in ugual misura arterie iliache, vasi femorali, poplitei e tibiali nella gamba (vedi **figura 11**). Da un punto di vista fisiopatologico l'evento primario è sicuramente la ridotta velocità del flusso sanguigno al muscolo attivo causata dal grado e dalla estensione della stenosi e la viscosità ematica che è cruciale nella genesi della claudicatio.



**Figura 10:** La figura in alto mostra una condizione normale dove il flusso del vaso è laminare e la funzione endoteliale viene mantenuta. In basso invece abbiamo una condizione di PAD dove la stenosi o occlusione causa un flusso turbolento, peggiora la funzione dell'endotelio e l'ossigeno diventa insufficiente alla domanda.

La circolazione sanguigna può essere compromessa da occlusioni multiple o sequenziali ma può essere parzialmente compensata dallo sviluppo di rami collaterali (Hiatt, 2006). Episodi ripetuti di ischemia a livello motorio che avvengono durante l'esercizio e la ripercussione post claudicatio sono associati all'aumento dello stress ossidativo (Hickman et al., 1994). Il danno sulla rete vascolare e sul muscolo scheletrico produce radicali liberi dell'ossigeno con conseguente danno ossidativo alle cellule endoteliali e muscolari (in particolar modo a fibre, assoni e mitocondri) (Melov et al., 1995). In un soggetto sano il contenuto enzimatico mitocondriale correla direttamente con la capacità ossidativa muscolare e la performance motoria (Wang et al., 1999). Nei pazienti con PAD a causa della sedentarietà obbligata e alle limitazioni nel movimento, si ha una diminuzione nel contenuto ed attività di tali enzimi: molti studi hanno dimostrato un'aumentata espressione mitocondriale addirittura proporzionale alla gravità della patologia dovuta sicuramente ad un meccanismo compensatorio (Jansson et al. 1988, Lundgren et al. 1989, Hiatt et al. 1996). Un potenziale sito che viene colpito dal danno radicalico è la catena di trasporto elettronica in quanto nel muscolo scheletrico di un paziente PAD abbiamo una ridotta NADH deidrogenasi e citocromo c-reduttasi (Rouslin et al. 1983, Brass et al. 2001). In condizioni normali acidi grassi, proteine e carboidrati sono convertiti ad intermedi acil-CoA tramite il ciclo di Krebs che si legano alla carnitina cellulare con il trasferimento reversibile del gruppo acilico (Bieber et al. 1988, Brass et al. 1980). Uno stress metabolico come avviene in

caso di PAD può provocare accumulo di acil-CoA perché non viene efficacemente ossidato con conseguente aumento di acil-carnitina nel plasma e nel muscolo (*Hiatt et al 1987,1992*); inoltre il fenomeno dell'ischemia/riperfusionne nel letto vascolare può avere un effetto additivo nel danno (*Hiatt, 2006*). Molti studi hanno dimostrato che l'infiammazione è anch'essa coinvolta nello sviluppo della PAD in quanto può essere associata ad uno stato di iper-coagulazione (*Brevetti et al. 2001, Beckmann et al. 2005, McDermott et al. 2004, 2005, Videm et al. 2007, Nylaende 2006, Apostolakis 2006, Esmon 2000*). Questa condizione procoagulante aumenta il rischio di malattie cardiovascolari dal momento che la flogosi contribuisce a tutti gli stadi del processo aterosclerotico (*Ross,1999*). Un aspetto tipico della risposta della fase acuta è l'aumentata sintesi epatica di un gruppo eterogeneo di proteine (PCR, siero amiloide A, aptoglobina a1, acido glicoproteico) (*Sasaki et al.2003*). Il processo infiammatorio vascolare stimola la proliferazione delle cellule muscolari lisce e la crescita della neo intima con conseguente stenosi arteriosa o restenosi in un impianto arterioso e danno endoteliale (*Kornowski et al. 1998; Yutani et al. 1999*). La concomitante presenza di infezioni croniche, fumo, obesità, intolleranza al glucosio può ulteriormente favorire il processo aterosclerotico con conseguente attivazione di marcatori flogistici (*Yudkin et al.,1999, Das ,1985,Young et al. 1991, Van der Meer et al. 2002*). Nei pazienti con claudicatio ed in quelli con stadio più grave di occlusione è stato dimostrato che elevati livelli di fibrinogeno sono predittivi di infarto miocardico (*Banerjee et al.1992, Lassila et al.1993, Thor et al. 2002*). L'aumento dei suoi livelli sierici influenza la struttura del coagulo in quanto origina matrici di fibrina con una struttura difficile da lisare, inoltre induce chemiotassi delle cellule muscolari lisce, monociti e macrofagi (*Mosesson et al.,2001*). Inoltre alterati livelli di D-dimero, tPA, PAI-1 e frammento della protrombina 1, sono associati con un peggioramento funzionale arterioso (*Komarov et al.2002, Signorelli,2007*). Sono state anche evidenziate anomalie nei prodotti di degradazione della fibrina, dei fattori VII ed VIII della coagulazione con conseguente aumento del rischio di eventi trombotici (*Meade et al, 1994, Cortellaro et al. 1994*). La proteina C

reattiva si lega al tessuto danneggiato in modo calcio dipendente attivando il complemento e generando citochine pro infiammatorie. E' stato dimostrato che questa proteina è un fattore predittivo di eventi cardiovascolari e gioca un ruolo significativo nella progressione dell'aterosclerosi in quanto amplifica la risposta flogistica attraverso l'attivazione del complemento e delle cellule endoteliali con conseguente danno tissutale (*Du Clos et al.,2000; Rifai et al.,2001; Ridker et al.,1998, 2000*). Nello studio Physicians' Health Study elevati livelli di PCR sono predittori di PAD (*Ridker et al. 1998*). Nello studio NHANES il valore predittivo era dato dal fibrinogeno ed infine anche i globuli bianchi rappresentavano un marcatore predittivo di malattia (*Selvin ed al. 2004*)(*Wildman et al. 2005*). Nello studio InCHIANTI (*Invecchiare in Chianti*) sono risultati associati con la patologia sia negli uomini che nelle donne visti elevati livelli di fibrinogeno, PCR, IL-6 (*Mc Dermott et al. 2005*). In realtà le citochine sono peptidi solubili che agiscono come importanti regolatori umorali nella cascata infiammatoria (*Van Stick et al. 1990, Beutler 1985*). La IL-6 è fra quelle più studiate nei pazienti con PAD. Essa ha un ruolo nella risposta di fase acuta perché stimola la produzione delle proteine della flogosi a livello epatico (*Elkind et al. 2002, Dibbs et al. 1999; Sehgal et al.1989*). Le citochine inoltre hanno concentrazione più elevata nei diabetici che hanno un rischio ancora più alto di PAD (*Libra et al. 2006*). Studi che hanno valutato il ruolo delle molecole di adesione (E-selectina, L-selectina, P selectina, VCAM-1, ICAM-1) nei pazienti con PAD hanno evidenziato una stretta relazione tra stress fisico ed attivazione leucocitaria che può favorire il rilascio delle molecole di adesione nel flusso sanguigno (*Signorelli et al. 2003*). L'aterosclerosi implica anche la degenerazione delle proteine della matrice extracellulare come conseguenza di una complessa interazione tra fattori genetici, citochine, metallo proteinasi della matrice (MMPs) e sui inibitori (TIMPs). A livello fenotipico abbiamo la dissoluzione e frammentazione del collagene e dell'elastina con evidente espansione della parete vasale. Le MMPs sono una famiglia di enzimi Zn dipendenti che catalizzano la proteolisi di proteine connettivali endoteliali come collagene, fibrinectina, laminina, elastina e proteoglicani (*Van den Steen et*

*al.2001, Borkakoti et al. 2000*). Sono secrete come proenzimi da leucociti, macrofagi, distribuite in sangue ed urina e coinvolte nel rimodellamento tissutale, aggregazione piastrinica, flogosi, riparazione del tessuto, danno miocardico e malattia vascolare (*Sawicki et al.1998, Creemers et al.2001, Death et al.2003*). Il bilancio in vivo tra MMPs/TIMPs indica il livello di attività di queste molecole e se esiste un difetto nella loro regolazione si sviluppano lesioni arteriose che facilitano l'invasione monocitaria (*Visse et al.2003, Dollery et al. 1995*). Tra i fattori tradizionali di rischio di malattia periferica il fumo di sigaretta è in grado di aumentare la probabilità di incidenza della malattia di 4 volte accelerando anche la comparsa dei sintomi di circa una decade (*Powell et al. 1997, Kannel et al. 1972, Price et al. 1999*). Se confrontata con i non fumatori tale tipologia di pazienti ha uno scarso tasso di sopravvivenza perchè i fumatori presentano una evoluzione della patologia verso fenomeni ischemici con alta probabilità di amputazione (*Powell et al. 1990, Lassila et al. 1988*). La cessazione del fumo migliora la sopravvivenza (*Jonason et al. 1987*). Anche il diabete mellito aumenta da 1,5 a 4 volte la probabilità di sviluppare una arteriopatia periferica ed aumenta il rischio di eventi cardiovascolari e di mortalità precoce in questi pazienti (*Kannel et al. 1985, Mac Gregor et al. 1999*). Nel Framingham Heart Study il 20% dei pazienti con claudicatio erano anche diabetici (*Murabito et al.1997, Kannel ,1995*). Nello studio NHANES report i pazienti PAD con diabete salivano al 26% mentre nell' Edinburgh Artery Study la prevalenza della patologia periferica era più alta in coloro che avevano intolleranza al glucosio con incremento del 28% di probabilità di patologia per ogni punto percentuale di Hb A1c (*Selvin et al. 2004, Mc Gregor et al. 1999*). I diabetici con arteriopatia periferica hanno un più alto rischio di ulcerazione ischemica e gangrena, infiammazione vascolare, aggregazione piastrinica e peggiorata funzione fibrinolitica (*American Diabetes Association, 2003*). La dislipidemia correla con la patologia arteriosa periferica nel Framingham Heart Study dove è stato dimostrato aumentare di circa il doppio il rischio di claudicatio intermittens. Nel NHANES report il 60% dei PAD erano ipercolesterolemici mentre nel PARTNERS si arrivava al 77% (*Kannel et al.*



1985, Hirsh et al. 2001, Selvin et al.2004). E' stato calcolato un 10% in più di possibilità di incidenza della malattia per ogni aumento di 10 mg/dl di colesterolo totale. L'incremento anche delle LDL, VLDL e trigliceridi correlava con la patologia mentre quello dell' HDL e dell' apolipoproteina a1 si dimostrava protettivo (Hiatt et al. 1995). Quasi tutti gli studi epidemiologici evidenziano una forte associazione fra ipertensione e PAD. Nel Cardiovascular Health Study il 52% dei pazienti erano ipertesi. Lo studio NHANES mostra una percentuale del 74% mentre il PARTNERS arriva fino a 92%. Nel Framingham Study gli ipertesi sviluppano claudicatio con una probabilità che varia da da 2 a 4 volte. Anche la ridotta funzionalità renale non associata a dialisi o trapianto è stata riconosciuta come fattore di rischio per PAD. Nello studio National Institutes of Health's United States Renal Data System del 1999 l'associazione era del 15% (O'Hare 2005, Annual report Bethesda 2000) nel NHANES report i dati relativi ad una popolazione di soggetti giovani (minori di 40 anni) mostravano una associazione del 24 (O'Hare et al. 2004). L'associazione PAD e malattia renale cronica è risultata essere indipendente da diabete, ipertensione, etnia, età mentre sembra correlare con l'infiammazione vascolare e con l'aumento dei livelli di omocisteina plasmatica (Bartholomew et al., 2006). E' stata suggerita un'associazione tra PAD e livelli alterati di omocisteina, (Mc Dermott et al. 2005) che correlano con il processo aterosclerotico e con la progressione della malattia. Molti studi hanno infine messo in evidenza un ruolo della Lp(a) nella patologia arteriosa periferica (Ridker et al. 2001, Welch et al. 1998).

#### **4.2 LE COMPLICANZE VASCOLARI NEL TRAPIANTO RENALE**

Da quando sono stati effettuati i primi studi sperimentali ed il primo trapianto renale umano con successo a lungo termine nel 1954 ad opera di J. Murray l'evoluzione nelle tecniche chirurgiche e nella messa a punto di farmaci immunosoppressivi ha reso questa metodica un trattamento sicuro per curare la malattia renale (Carrel et al. 1902, Moore et al. 1964, Merril et al. 1956, Kostakis et al. 1977). Nonostante ciò il trapianto è ancora associato con alcune complicazioni post operatorie. La stenosi arteriosa del trapianto renale (TRAS) rappresenta il 75% circa delle complicazioni più critiche che

possono portare ad ipertensione, disfunzione fino alla perdita completa dell'impianto renale. Il tempo in cui tale fenomeno può manifestarsi varia da 3 mesi (TRAS precoce) a 2 anni dopo il trapianto (TRAS tardivo) (*Dimitroulis et al. 2009*). A livello emodinamico la stenosi si sviluppa quando il diametro intraluminale si restringe più del 50% ; ciò può provocare un' ipertensione che non risponde al trattamento conservativo o al persistente deterioramento della funzione renale. Si sospetta di solito TRAS quando avviene un improvviso esordio di ipertensione arteriosa o deterioramento funzionale del trapianto senza rigetto, infezione o ostruzione uretrale (*Wong et al., 1996*). Il sito di stenosi può variare coinvolgendo solo le anastomosi o siti multipli dei vasi (stenosi diffusa) (*Luke et al. 1995*). Le cause di questa complicazione sembrano essere multifattoriali: tecnica di sutura, trauma all'arteria renale, rigetto di tipo vascolare, aterosclerosi del donatore o del ricevente, infezione da citomegalovirus possono essere tutti fattori patogenetici (*Patel et al. 2001*). TRAS tardiva invece di solito origina dall'aterosclerosi del ricevente. Le stenosi diffuse di solito tendono ad avvenire in pazienti con disordini immunologici dell'endotelio vascolare (*O'Connel et al. 1973*). La trombosi arteriosa del trapianto renale (TRAT) è una rara complicanza (0,5%-3,5% dei casi)(*Rouviere et al. 2002*), ma è la maggiore causa di perdita dell'impianto nel periodo precoce post intervento. Si manifesta con riduzione urinaria ed aumento dei valori dei marcatori di funzionalità renale. L'esito è migliore quando risparmia il tronco dell'arteria renale ed influenza solo i più piccoli rami distali. TRAT è di solito dovuta a torsione dell'anastomosi o dissecazione della parete arteriosa. Rari casi possono includere rigetto acuto, compressione esterna da ematoma adiacente, stato ipercoagulativo, grave ipertensione e tossicità dei farmaci immunosoppressivi tali come la ciclosporina o Sirolimus. (*Groggel et al. 1991, Beyga et al. 1998*). La trombosi venosa del trapianto renale (TRVT) è un rara complicazione vascolare precoce e drammatica, conseguente all'intervento (0,5%-4% dei casi) ed una delle principali cause di perdita dell'organo durante il primo mese post trapianto (*Giustacchini et al. 2002*). La genesi può essere multifattoriale: problemi nella tecnica durante l'intervento e condizioni acquisite o

congenite che portano ad uno stato ipercoagulativo del ricevente in particolare deficienza del fattore V che spesso porta a gravi complicazioni tromboemboliche (*Wuthrich et al. 2001*). La vasculopatia che si sviluppa negli organi solidi dei trapianti può essere determinante nel rigetto cronico. Il restringimento dell'intima evolve in occlusione del vaso con un quadro tipico di sclerosi massiva, infiltrazione linfocitaria e monocitaria, diffusa formazione di cellule schiumose e depositi di lipidi extracellulari. E' influenzata anche la media in misura minore (*Wong et al. 1996*). L'immunosoppressione può potenziare questa reazione vasculopatica attraverso infezioni opportunistiche in particolare da citomegalovirus. Altri meccanismi che potrebbero essere coinvolti sono l'anossia dell'impianto, disordini emostatici o metabolismo lipidico e preesistenti placche nelle arterie dell'organo trapiantato. L'allovasculopatia colpisce solo le arterie del trapianto e non quelle dell'ospite. I fattori di rischio come età, sesso, storia familiare, fumo, degenerazione della funzione renale, predisposizione genetica alla progressione dell'insufficienza renale, anemia ed ipertensione correlati al trapianto e secondari alla terapia immunosoppressiva, rigetto acuto ed infezione virale possono condizionare il rischio cardiovascolare nel paziente sottoposto a trapianto renale (*Jardine et al. 2005*). Infatti i pazienti con insufficienza renale cronica ed i trapiantati renali con età superiore ai 65 anni, sono ad aumentato rischio di mortalità cardiovascolare (*Foley et al. 1998, Marcen, 2006*). Una concomitante malattia arteriosa periferica può potenziare il rischio di infarto miocardico (*Marcen, 2006*). Negli ultimi anni sono stati inoltre identificati fattori di rischio non tradizionali in grado di modulare il rischio nei pazienti sottoposti a trapianto renale, quali la proteina C reattiva, l'omocisteina (*Winkelmayer et al. 2004*). Anche la disfunzione endoteliale può essere responsabile di complicazioni cardiovascolari; essa è il prodotto di una interazione tra ambiente vascolare aterogeno associato ed anomalie di perfusione (*Foley et al. 1998*). L'ambiente endoteliale è influenzato da fattori di rischio individuali e genetici che possono contribuire alla regolazione del tono ed omeostasi vascolare (*Bonetti et al. 2003*). Infatti la sua attivazione favorisce un fenotipo aterogenico e l'integrità del vaso è

ridotta poiché i radicali liberi dell'ossigeno determinando lo stress ossidativo riducono la biodisponibilità di NO, un potente vasodilatatore (*Hingorani et al. 2000*) e provocano disfunzione endoteliale. L'endotelio infatti rappresenta una vera e propria barriera meccanica tra sangue e parete vascolare in grado di mediare gli effetti negativi dei fattori di rischio sul vaso. Un endotelio sano garantisce un ambiente antitrombotico per l'effetto di componenti antiaggreganti sulle piastrine (NO e prostaciclina), anticoagulanti (eparina e proteina C/S) o fibrinolitiche (attivatore tissutale del plasminogeno) (*Mc Gorisk et al.1996*). In presenza di disfunzione endoteliale si realizza una riduzione del potenziale anticoagulante ed un aumento della produzione di mediatori pro coagulanti (fattore tissutale ed inibitore dell'attivatore del plasminogeno) che determinano un fenotipo vascolare pro trombotico. Inoltre mediatori piastrino-derivati come la serotonina inducono vasocostrizione e se associati alla presenza di endotelina 1 attivano il processo aterosclerotico (*Golino et al. 1991, Yang et al, 1990, Bonetti et al. 2003*). L'incidenza di malattie vascolari (cardiopatía ischemica, ictus, malattia arteriosa degli arti inferiori) nei pazienti sottoposti a trapianto renale è 4 volte più alta che nella popolazione generale possibilmente è da correlare all'immunoreazione provocata dal trapianto, o indirettamente al trattamento immunosoppressivo. Infatti è stato ipotizzato che per la presenza della dialisi sono maggiormente a progressione della malattia aterosclerotica. Alcuni regimi immunosoppressivi come l'uso di steroidi o inibitori della calcineurina possono modificare la progressione del processo aterosclerotico. Negli ultimi anni sono stati utilizzati come farmaci anti-rigetto due inibitori del segnale di proliferazione (PSIs)/mTOR Sirolimus un antibiotico macrolide prodotto da *Streptomyces* con potente azione immunosoppressiva, antiproliferativa, ed antimigratoria il quale si lega alla immunoprolina citosolica FK506 ed inibisce la FRAP conosciuta anche come via di segnale mTOR. L'Everolimus inibisce pure la via di segnale fosfatidilinositolo 3 chinasi bloccando i fattori di crescita IL-2 e IL-15 mediati che guidano la proliferazione delle cellule T, B e del muscolo liscio vascolare. E' stato dimostrato che questi due farmaci possono attenuare il restringimento della neointima

e l'aterosclerosi nel trapianto in modelli animali di angioplastica ed impianti vasali e cardiaci (*Andrès et al. 2006*). In pazienti che ricevono stent a rilascio di Sirolimus c'è aumento del rischio di trombosi dopo cessazione della terapia antiplastrinica. Questi farmaci possono inoltre indurre iperlipidemia con aumento dei livelli di trigliceridi, LDL, Apo B100 e Apo C-III, possibilmente per aumentata secrezione epatica dei trigliceridi, colesterolo e apoproteine. Dati contrastanti relativi a studi di intervento hanno evidenziato da un lato una diminuzione dell'ateroma in seguito a somministrazione di Sirolimus che agisce sulle LDL e VLDL circolanti, mentre altri non hanno confermato questa osservazione spiegando il fenomeno con la ridotta espressione dei recettori delle lipoproteine ed aumentata espressione dei geni coinvolti nell'efflusso del colesterolo. L'effetto intrinseco sulla prevenzione dell'aterosclerosi e l'aumentato controllo sulla funzione renale potrebbe spiegare la riduzione della morbilità e mortalità cardiovascolare nei pazienti trattati con la terapia immunosoppressiva (*Andres et al. 2006*).

#### **4.3 EMOREOLOGIA NELLA MALATTIA ARTERIOSA PERIFERICA**

Nel corso degli anni sono stati pubblicati alcuni lavori che hanno evidenziato lo stretto legame tra disturbi emoreologici e la malattia arteriosa periferica (*Pretolani et al. 1983, Coccheri et al. 1985, Koenig et al. 1988, Poredos et al. 1996, Dupuy-Fons et al. 1996, Smith et al. 1998, Lee et al. 1999, Koscielny et al. 2004, Mika et al. 2006, Tzoulaki et al. 2007*). E' stato identificato il ruolo di alterati parametri emoreologici nel processo fisiopatologico della malattia arteriosa periferica (*Coccheri et al. 1985*). Nello studio Aachen sono state analizzate le variabili reologiche ed il profilo dei fattori di rischio nei pazienti con malattia arteriosa periferica rispetto ad un gruppo di controllo: la viscosità plasmatica è risultata significativamente elevato nei pazienti con arteriopatìa periferica (*Koscielny et al. 2004*). L'Edinburgh Artery Study attraverso l'analisi di 17 marcatori ematici dopo aggiustamento per i fattori di rischio cardiovascolare ha dimostrato una significativa associazione della viscosità ematica e plasmatica con la malattia (*Tzoulaki et al. 2007*). La viscosità plasmatica è stata

indagata anche in rapporto a diversi gradi di ostruzione periferica ed è risultata aumentata nei claudicanti ed in misura maggiore in pazienti con ischemia critica rispetto ai controlli (*Poredos et al. 1996*). In uno studio dove sono stati valutati contemporaneamente marcatori dell'emostasi reologici ed influenza del fumo sul quadro clinico della PAD è stato dimostrato un ruolo delle componenti reologiche sul rischio di ischemia cronica (*Smith et al. 1998*). Nonostante tutti questi studi concordino sul ruolo di un'alterata fluidità del sangue nella patogenesi della PAD, i dati relativi ai parametri emoreologici in un'ampia popolazione sono pochi (*Tzoulaki et al. 2007*, *Lee et al. 1999*). Spesso la PAD è associata con malattia coronarica e stroke (*Fowkes, 1997*; *Ogren et al. 1993*; *Fowkes et al. 1991*). Nel microcircolo dove le cellule del sangue si modificano per passare attraverso gli stretti capillari, la deformabilità è il maggiore determinante di resistenza al flusso. Anomalie strutturali come quelle evidenziate in alcune patologie come l'arteriopatia periferica possono influenzare il flusso microcircolatorio e/o l'emivita del globulo rosso (*Baskurt et al. 2003*, *Stuart et al. 1990*). Esiste inoltre un rapporto fra endotelio e stress meccanico causato dal flusso. Sia la shear rate che la viscosità contribuiscono alla shear stress ed attraverso l'endotelio regolano l'omeostasi vascolare. Il meccanismo responsabile della trasduzione del segnale vasodilatatore endotelio-dipendente può causare un peggioramento nella risposta endoteliale ai cambiamenti della shear stress di parete che sappiamo aumentare cronicamente in questi pazienti (*Gori et al. 2007*). I leucociti sono trascurabili nella reologia dei grandi vasi sanguigni ma a causa della viscosità molto alta ed adesività quando sono attivati (in particolar modo monociti e polimorfonucleati) essi gravano marcatamente nel microcircolo promuovendo il processo di coagulazione. Le proprietà reologiche dei globuli bianchi possono essere responsabili di ipossia rispetto alla fluidità del sangue (*Dormandy et al. 1986*). Il ruolo dell'aggregazione eritrocitaria nella malattia arteriosa è ben documentato: alcuni studi hanno dimostrato che un aumento nell'aggregazione eritrocitaria causa una diminuzione nel flusso sanguigno locale nei microvasi (*Zilliacus 1951*, *Madow 1956*). I marcatori di flogosi

acuta come fibrinogeno, aptoglobina, ceruloplasmina, a1 antitripsina, sono stati associati con la probabilità di sviluppare eventi ischemici (*Engstrom et al. 2002*). Inoltre sappiamo che queste molecole sono capaci di indurre aggregazione eritrocitaria. E' ben documentato che proteine infiammazione-sensibili possono essere coinvolte nell'induzione e/o mantenimento dell'aumentata adesività/aggegazione eritrocitaria nel sangue periferico (*Weng et al. 1996, 1998*). Il grado di aggregazione eritrocitaria aumenta in soggetti affetti da malattia vascolare rispetto a controlli sani ; inoltre è stata dimostrata una correlazione significativa fra questo parametro emoreologico ed i marcatori della fase acuta in soggetti con aterotrombosi (*Berliner et al. 2005*).

#### **4.4 EMOREOLOGIA NEL TRAPIANTO RENALE**

Uno dei primi studi effettuati sul ruolo dell'emoreologia nell'occlusione arteriosa del trapianto renale è stato condotto su 29 espanti da cadavere. E' stato dimostrato un'incremento significativo nella viscosità plasmatica, aggregazione eritrocitaria, fibrinogeno, trigliceridi, colesterolo. Correlazioni significative sono state trovate tra viscosità o aggregazione e livelli di fibrinogeno e trigliceridi (*Dintenfass et al.1975*). Studi effettuati sui parametri emoreologici in 14 trapiantati prima e dopo l'intervento hanno mostrato una differenza significativa nella viscosità plasmatica nel periodo immediatamente successivo all'operazione con funzione renale stabile. Differenze significative sono state osservate nei livelli di fibrinogeno nei casi con funzione renale normale stabile o rigetto. E' stata dimostrata una correlazione positiva tra viscosità plasmatica e fibrinogeno in pazienti in dialisi e dopo il trapianto. E' stato evidenziato quindi che anomalie nel profilo emoreologico possono portare allo sviluppo di episodi di rigetto e peggioramento della funzione renale (*Wang et al. 1989*). E' stato inoltre valutato l'effetto a lungo termine sul trapianto renale della viscosità ematica e del metabolismo lipidico poiché un alterato ambiente emoreologico può influenzare lo sviluppo di micro e macro angiopatie. Infatti la viscosità ematica alle basse shear ed il fibrinogeno aumentavano in entrambi i gruppi di patologie (*Abendroth et al. 1994*). In uno studio condotto su pazienti sottoposti a trapianto renale da donatore vivente è

stato dimostrato un miglioramento del profilo emoreologico in pazienti con insufficienza renale cronica. La viscosità ematica corretta per l'ematocrito diminuiva significativamente dopo l'intervento. Stessa cosa avveniva con l'aggregazione eritrocitaria, mentre la deformabilità aumentava. I globuli rossi sono fisicamente stressati nel processo prima del trapianto e dall'ambiente plasmatico sfavorevole a causa dell'accumulo di metaboliti che può mettere a dura prova i meccanismi di mantenimento della membrana. Quindi una volta cessate queste condizioni la flessibilità eritrocitaria può aumentare (*Du et al. 2011*). In un esperimento fatto con globuli rossi in vitro incubati con perossido di idrogeno e successiva misura dei livelli di malondialdeide si è visto che l'aumentato stress ossidativo è una delle condizioni presenti nell'insufficienza renale cronica. Esso può causare perossidazione lipidica nella membrana ed alterazione nella sua deformabilità (*Lucchi et al. 2005*). È stata valutata una possibile relazione causale tra l'uso di ciclosporina ed effetti sulla deformabilità ma non è stata osservata una relazione dose-risposta bensì una significativa correlazione tra durata del trattamento e diminuzione nell'indice di deformabilità. Tale effetto tuttavia non è stato riprodotto attraverso dati sperimentali sull'incubazione del farmaco con gli eritrociti. Nonostante l'uso in basse dosi la ciclosporina causa rigidità eritrocitaria che può giocare un ruolo nella patogenesi precoce di complicazioni avverse nefrotossiche associate al regime immunosoppressivo (*Hardemann et al. 1998*). Trapiantati stabili trattati con diverse terapie immunosoppressive sono stati supplementati in uno studio incrociato randomizzato in doppio cieco con olio di pesce e mais per 4 mesi. È stato osservato che la deformabilità diminuiva in coloro che venivano trattati con ciclosporina e tornavano a valori normali dopo supplementazione con entrambi gli olii. La supplementazione aumentava il contenuto di acidi grassi insaturi nei fosfolipidi plasmatici correggendo così la ridotta deformabilità (*Schut et al. 1993*). Si può pertanto ipotizzare che peggiorate proprietà di flusso del sangue abbiano un impatto sulla progressione dell'insufficienza renale cronica poiché aumenta la resistenza

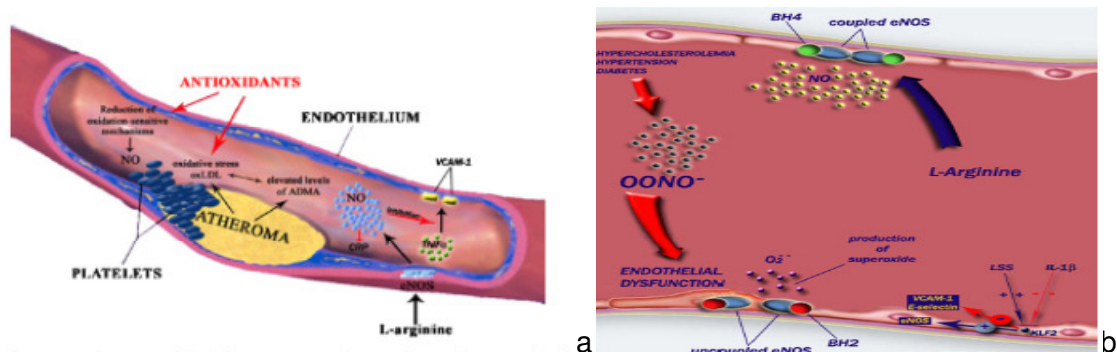


glomerulare al flusso. Pochi dati sono disponibili circa l'impatto dell' emoreologia nell'influenzare il rischio cardiovascolare nei trapiantati renali. Nello studio di Linde et al. 1999, è stato valutato se anomalie emoreologiche siano presenti anche in coloro che hanno un trapianto perfettamente funzionante. E' stato dimostrato che tutte le variabili erano in grado di influenzare la viscosità ematica (ematocrito, fibrinogeno, aggregazione eritrocitaria, BMI, trigliceridi) erano completamente alterate nei pazienti rispetto ai controlli. E' stata ipotizzata un' inappropriata regolazione nella formazione dell'eritrocita (fenomeno dell'eritrocitosi post trapianto), obesità, uso della ciclosporina come immunosoppressore, alti livelli di trigliceridi e bassi livelli di HDL (*Linde et al. 1999*). Nel lavoro di Koppensteiner et al. 1996 invece la reologia del sangue è stata studiata prima e dopo 1 anno dal trapianto e se precedentemente era alterata a causa dell'insufficienza renale non migliorava comunque dopo l'intervento. Il fibrinogeno e l'aggregazione eritrocitaria determinanti della viscosità ematica rimanevano alti ed i valori erano influenzati negativamente anche dall'incremento dell'ematocrito e dall'aggregazione piastrinica (*Koppensteiner et al. 1996*). Nello studio di Mellinghoff et al. 1998 che ha considerato soggetti sottoposti contemporaneamente a trapianto di pancreas e rene sono stati valutati quei parametri determinanti la viscosità plasmatica quali albumina, fibrinogeno,  $\alpha_2$  macroglobulina, colesterolo totale, LDL, HDL, trigliceridi. Tra essi sono risultati correlare con questo parametro emoreologico sia il fibrinogeno che il colesterolo totale (*Mellinghoff et al. 1998*). Recentemente un lavoro del nostro gruppo su soggetti sottoposti a trapianto e seguiti a 12 mesi dall'intervento e con funzione stabile dell'organo ha dimostrato una viscosità ematica significativamente più alta rispetto ai controlli (*Zanazzi et al. 2010*).

## 5.OSSIDO NITRICO E MALATTIA VASCOLARE

### 5.1 OSSIDO NITRICO NELLA MALATTIA ARTERIOSA

Il NO è una molecola che è stata riconosciuta come modulatore della malattia vascolare per i suoi effetti intracellulari che portano al vasorilassamento, rigenerazione endoteliale, inibizione di chemiotassi di leucociti ed adesione piastrinica. E' stata dimostrata un'alterata produzione di NO a livello endoteliale nella patologia aterosclerotica (*Barbato, 2004*). Studi sperimentali condotti su topi transgenici hanno evidenziato che l'over-espressione di eNOS diminuiva la pressione sanguigna ed il colesterolo plasmatico riducendo fino al 40% l'estensione della placca. In presenza di una condizione di dislipidemia si osserva un consumo di NO ed una maggiore produzione di specie reattive dell'ossigeno che contribuiscono a danneggiare il letto vascolare. Le LDL ossidate contribuiscono ad ostacolare l'attività di eNOS rimuovendolo dalle caveolae. Inoltre i lipidi ossidati, consumano NO all'interno della parete del vaso, determinano attivazione di NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B) e di altri mediatori dell'infiammazione (*Barbato, 2004*). Inoltre una diminuita disponibilità di nitrossido altera la superficie dell'intima e promuove l'adesione ed l'aggregazione piastrinica (*Napoli, 2001, Ignarro, 2004*). Recenti studi hanno mostrato gli effetti benefici della somministrazione di L-arginina sull'espressione ed sull'attività di eNOS in condizioni di shear stress nell'aterosclerosi (*De Nigris et al., 2003, George et al., 2004*). Inoltre in presenza di fattori di rischio cardiovascolare quali ipertensione, diabete, ipercolesterolemia, si osserva un incremento nella produzione di superossido. I perossinitriti ed altre specie reattive ossidano  $BH_4$  a  $BH_2$  e biopterina. In presenza di un deficit di tetraidrobiopterina la NOS sintasi tende a comportarsi come una NADPH ossidasi e a produrre superossido invece che nitrossido. La produzione di NO endoteliale inibisce il recettore di adesione VCAM-1 sulla parete vascolare e riduce il livelli circolanti di proteina C reattiva (PCR) (*Napoli et al. 2006*).



**Figura 11:** a) Coinvolgimento dell'ossido nitrico nell'aterogenesi b) Ruolo eNOS nella disfunzione endoteliale e genesi della malattia vascolare (da Napoli et. al 2006)

## 5.2 POLIMORFISMI DEL GENE eNOS NELLA MALATTIA ARTERIOSA

Dati in letteratura hanno evidenziato come polimorfismi nel gene eNOS (*eNOS* - *786T>C* ed *eNOS* *894G>T*) contribuiscano ad influenzare la rigidità delle arterie e questo effetto era maggiormente rilevante nei soggetti portatori delle varianti rare rispetto a quanto osservato nei soggetti wild-type (Mayer et al. 2010). I polimorfismi nel gene sono stati indagati anche nell'arteriopatia periferica ed è stato osservato come l'aplotipo eNOS -786C/4a rappresentasse un fattore indipendente di rischio di malattia solo nel sottogruppo dei fumatori (Sticchi et al. 2010). Il ruolo del gene eNOS polimorfismo è stato studiato anche in relazione alla sclerosi sistemica, una patologia in cui è rilevante il danno a livello della componente microcircolatoria. I dati ottenuti hanno messo in evidenza un'associazione significativa tra la variante rara eNOS 894T e questa patologia (Fatini et al., 2002). E' stato infatti ipotizzato che la variante rara del gene (894T), alterando la quantità di nitrossido prodotto dall'endotelio, possa influenzare la suscettibilità individuale all'aterosclerosi (Hingorani et al., 1999). Negli individui omozigoti per questa variante (genotipo TT) il rischio di sviluppare placche era tre volte più alto rispetto a quello dei soggetti eterozigoti (genotipo GT) e questo aumento risultava indipendente dagli altri fattori di rischio tradizionali, quali il fumo, il diabete, la dislipidemia (Lembo et al., 2001). In considerazione del ruolo ateroprotettivo del NO, l'aumentato rischio di sviluppare lesioni aterosclerotiche e quindi patologie vascolari in pazienti omozigoti 894TT (Hingorani et al., 1999; Hibi et al., 1998) potrebbe

riflettere una riduzione dell'attività enzimatica della nitrossido sintasi endoteliale (eNOS) e, di conseguenza, un minor rilascio di NO da parte dell'endotelio.

### **5.3 OSSIDO NITRICO E TRAPIANTO RENALE**

E' stato ipotizzato un coinvolgimento dell'NO nella glomerulo sclerosi segmentale e focale una patologia che si può sviluppare in seguito a trapianto renale, caratterizzata da proteinuria, ipertensione, resistenza agli steroidi, lesione glomerulare ed evoluzione verso la malattia renale di fine stadio. Il nitrossido è una molecola effettrice della risposta infiammatoria ed è dimostrato il suo contributo al danno glomerulare nei vari stadi della malattia (*Bellos et al. 2011*). Dati di letteratura hanno evidenziato una correlazione del NO con patologie come le glomerulonefriti e la sindrome nefrotica (*Kashem et al. 1996, Trachtman et al. 1996, Kawashima et al. 2007*). Un'alterata biodisponibilità di NO potrebbe contribuire al fenomeno trombogenico associato con l'uso del farmaco Tacrolimus (*Puschel et al. 2012*). In caso di rigetto acuto è stato osservato un aumento nel siero di questa molecola (*Khanafer et al. 2007*) probabilmente come conseguenza delle citochine prodotte in questa fase. I fattori che sono noti influenzare la produzione di NO in un trapianto renale sono: infezioni e stress chirurgico che ne stimolano la secrezione, mentre farmaci come glucocorticoidi e Tacrolimus hanno un effetto inibitorio (*Bellos et al. 2011*).

### **5.4 POLIMORFISMI DEL GENE eNOS NEL TRAPIANTO RENALE**

Attualmente sono scarsi in letteratura lavori che valutano l'associazione del polimorfismo nel gene eNOS con la patologia renale. E' stata esaminata l'associazione tra polimorfismo eNOS 4a/4b e perdita della funzione dell'impianto renale (DGF), rigetto acuto e nefropatia cronica del trapianto. Il tasso di DGF era significativamente più alto in pazienti portatori dell'allele eNOS 4a. La frequenza del rigetto acuto era più alta nei pazienti portatori dell'allele 4a rispetto a quanto osservato nei soggetti con genotipo 4b/4b (*Dutkiewitz et al. 2010*). E' stato dimostrato che il genotipo eNOS 4b/4b si associava ad uno stato non infiammatorio in uno studio dove i pazienti erano stati

raggruppati in base ai livelli di proteina C reattiva in circolo post trapianto, rappresentando un indicatore positivo per l'esito del trapianto (*Sezer et al. 2005*). Al contrario l'allele a è descritto associarsi ad i più bassi livelli di NO plasmatico. Alcuni studi riportano che i genotipi aa ed ab hanno più bassi livelli di NO plasmatico ed una diminuita espressione della proteina (*Tsukada et al. 1998, Hoffman et al. 2005, Yokoyama et al. 2000*). Un altro studio condotto da Akcay sul ruolo di questo polimorfismo nella disfunzione cronica del trapianto non ha evidenziato dati significativi. (*Akcay et al. 2004*). Inoltre l'allele eNOS 4a è risultato protettivo nei confronti dell'ipertensione grave in pazienti con trapianto renale (*Basset et al. 2002*). Inoltre questa variante genetica è stata trovata associata con diabete mellito dopo il trapianto (*Ergun et al. 2010*).

Altri studi in letteratura che hanno indagato il ruolo di un altro polimorfismo nel gene eNOS il polimorfismo eNOS 894 G>T nella nefropatia cronica post-trapianto, non hanno evidenziato un contributo del gene eNOS nella modulazione dell'esito a lungo termine del trapianto (*Yilmaz et al. 2009, Viklicky et al. 2002., Shenker et al. 2003*).

### **EFFETTO DEL NO SULLA DEFORMABILITA' DEI GLOBULI ROSSI**

Il nitrossido una volta sintetizzato nelle cellule endoteliali diffonde verso le adiacenti cellule muscolari lisce e nel lume vascolare (*Butler et al. 1998, Liao et al. 1999*), agendo non solo su leucociti e piastrine ma pure sugli eritrociti legandosi all'eme dell'emoglobina e formando S nitroso emoglobina e metaemoglobina (*Yonetani et al. 1998*). Inoltre i globuli rossi sono in grado di sintetizzare un proprio NO (*Jubelin et al. 1996*).

Korbut e collaboratori hanno dimostrato che NO può avere un effetto regolatorio concentrazione-dipendente sulla deformabilità ed sull'aggregazione eritrocitaria (*Korbut et al. 1993,1996*). Bor-Kucukatay e collaboratori nel 2003 hanno evidenziato una marcata influenza di NO sulla deformabilità eritrocitaria ed il suo effetto regolatorio

sulle proprietà meccaniche cellulari. Inibitori specifici della NOS come L-nitroarginina metil estere (L-NAME) inducono un peggioramento significativo delle proprietà elastiche dei globuli rossi. In particolare è stato osservato un effetto bifasico di NO sulla meccanica eritrocitaria. Infatti è stata rilevata una deformabilità massima ad una data concentrazione dipendente dalla capacità di rilascio di NO da parte di un donatore specifico oltre la quale si assiste ad un peggioramento della deformabilità di membrana. E' stato inoltre osservato che il trasporto ionico attraverso la membrana degli RBC è influenzato da NO, è stato dimostrato che entrambe le attività Na/K ATPasi e Ca/K ATPasi degli RBC sono stimulate da donatori di NO (*Pernollet et al. 1996, Petrov et al. 1994, 1996*). In particolare è stato evidenziato che il blocco del trasporto del K attraverso la membrana degli RBC preveniva l'effetto avverso di L-NAME sulla deformabilità degli RBC. Il deterioramento delle proprietà meccaniche degli RBC è mediato dall'aumento della permeabilità al potassio del globulo rosso. L'aumentato rilascio di questo ione da parte dei RBC è influenzato da metaboliti di NO (es. nitrito e perossinitrito) e può contribuire a modulare la forma eritrocitaria ed il volume dovuto al gradiente osmotico (*Grzelak et al. 2001*). L'effetto di NO sulla deformabilità del globulo rosso sembra correlata ad un'alterazione dei meccanismi di fosforilazione di proteine del citoscheletro (*Oonoshi et al. 1997, Bor Kocukatay et al. 2003*).

### **EFFETTO DELL'AGGREGAZIONE DEI RBC SUL NITROSSIDO**

La regolazione calcio-dipendente della sintesi di NO nelle cellule endoteliali è strettamente correlata alle condizioni emodinamiche alle quali sono esposte (*Vallance et al. 2001*). L'espressione di eNOS può essere modulata dalla grandezza delle forze di shear stress di parete. Gli RBC tendono a migrare lungo l'asse (fenomeno della marginazione). Infatti un'aumentata aggregazione dei RBC risultata ad una minore shear stress di parete provocata da una diminuzione del flusso e/o da una maggiore migrazione assiale, contribuisce a diminuire l'espressione di eNOS. Baskurt e

collaboratori (2004) hanno infatti osservato che una maggiore aggregazione di RBC correla con l'aumento della pressione arteriosa e con il peggioramento della risposta vasodilatatoria NO-mediata oltre che con una diminuzione di espressione di eNOS a livello dei vasi.

## **5.5 POLIMORFISMI eNOS ED EMOREOLOGIA**

Scarsi sono i dati in letteratura relativi al ruolo del gene eNOS nella modulazione dei parametri emoreologici. In uno studio condotto su pazienti affetti da sordità improvvisa è stato osservato come una ridotta biodisponibilità di NO geneticamente determinata correla con una riduzione della deformabilità eritrocitaria (*Fatini et al. 2005*). L'effetto dei polimorfismi nel gene eNOS è stato indagato anche nella sclerosi sistemica ed è stato osservato come la presenza delle varianti rare eNOS -786C ed 894 T modulasse la deformabilità eritrocitaria (*Fatini et al. 2006*). Il legame tra polimorfismo eNOS 894 G>T e variabili emoreologiche è stato indagato anche in pazienti con malattia coronarica. Tale valutazione ha evidenziato come l'indice di aggregazione in soggetti portatori dell'allele eNOS 894 G fosse più alto e come l'indice di disaggregazione (T/2) fosse più basso rispetto a quanto osservato in una popolazione di controllo in presenza dello stesso allele (*Bor-Kocukatay et al. 2010*). La valutazione dell'effetto funzionale dei polimorfismi del gene eNOS sui parametri emoreologici in una popolazione di soggetti sani ha evidenziato come il genotipo eNOS 894 TT si associasse ad una diminuzione dell'aggregazione eritrocitaria mentre il genotipo eNOS 4b/4b determina un aumento dell'aggregabilità dei globuli rossi (*Babaoglu et al. 2011*).

## **6. IL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA NELLA MALATTIA VASCOLARE**

### **6.1 RAS NELLA MALATTIA ARTERIOSA PERIFERICA**

Il sistema renina-angiotensina ha un ruolo significativo nella mediazione delle emodinamiche periferiche e nel processo aterosclerotico sistemico. L'angiotensina II regola la pressione arteriosa ed il volume sanguigno tramite un'azione vasocostrittrice (*Lonn et al. 1994*). Inoltre media pure un numero di processi non emodinamici che sono rilevanti nella patogenesi della malattia arteriosa periferica tali come la crescita cellulare indotta da ipertrofia ventricolare ed il rimodellamento vascolare. Può favorire la fibrosi vascolare, contribuire all'induzione della disfunzione endoteliale e dell'aterosclerosi promuovendo lo stress ossidativo e l'instabilità della placca (*Pratt, 1999*). Tra gli effetti proaterogenici di angiotensina II specialmente in presenza di iperlipidemia possiamo considerare anche la migrazione, la proliferazione e l'ipertrofia delle cellule del muscolo liscio (*Bell et al. 1990*), la produzione di monociti e l'espressione di molecole di adesione che portano al reclutamento dei macrofagi nei vasi (*Tummala et al. 1999*), l'accumulo di matrice extracellulare attraverso la produzione di un fattore trasformante di crescita (*Omura et al. 1994*). La produzione di superossido entro la parete vascolare tramite la via enzima dipendente NADH/NADPH può aumentare l'ossidazione delle LDL (*Givertz, 2001, Hobbs et al. 2004*). È stato evidenziato che il sistema renina-angiotensina può contribuire allo sviluppo ed alla progressione dell'aterosclerosi non solo aumentando la pressione sanguigna ma anche attraverso effetti diretti multipli con un ruolo potenziale come mediatore di vulnerabilità della placca (*Mazzolai et al. 2006*). Il suo ruolo pro infiammatorio è confermato dallo studio di *Ferrario et al. 2006* dove viene evidenziato che un'iper attività del sistema RAS è associata con lo sviluppo di altre malattie come ipertensione, ipertrofia ventricolare sinistra, infarto miocardico ed insufficienza cardiaca. L'Angiotensina II è un componente chiave nella risposta vascolare infiammatoria poiché attiva il reclutamento di cellule infiammatorie alle arterie danneggiate. Tali cellule possono a loro volta avere una propria produzione di Ang II (risposta locale a feedback positivo) perpetuando così



la flogosi. Questo peptide inoltre regola l'espressione delle molecole di adesione, chemochine, citochine e fattori di crescita. Può sovraregolare VCAM-1, ICAM-1 e P-selectina nella parete vascolare (*Graninger et al. 2004*). Un'aumentata espressione di ACE è stata evidenziata in uno studio nel quale viene evidenziato che i macrofagi che si accumulano intorno al cappuccio fibroso giocano un ruolo nella vulnerabilità della placca (*Ohishi et al. 1997, Fukuhara et al. 2000*).

## **6.2 POLIMORFISMI DEL SISTEMA RAS NELLA MALATTIA ARTERIOSA PERIFERICA**

Il ruolo del polimorfismo ACE I/D è stato analizzato nella malattia arteriosa periferica (PAD) in una popolazione di 522 pazienti: non è stata in questo caso trovata alcuna associazione né con l'età di esordio della malattia, né con lo stadio o indice ABI dei pazienti poiché le frequenze fra casi e controlli erano simili e l'analisi univariata presentava nei portatori DD un odds ratio molto bassa (*Renner et al. 2002*). Al contrario invece in un lavoro che ha analizzato una popolazione di 281 pazienti è stata notata invece una associazione fra PAD e portatori dell'allele D in presenza di aplotipo di enos -786C/4a quando veniva valutata l'abitudine al fumo (*Sticchi et al. 2010*). In un gruppo di anziani i polimorfismi M235T dell'angiotensinogeno e ACE I/D non sono risultati significativi nella malattia arteriosa delle basse estremità dopo aggiustamento con vari fattori confondenti fra i quali fumo, diabete, LDL, malattia cardiaca. Solo associando M235T in aplotipo con un altro gene e con l'omozigosi II si è notata una diminuzione del rischio per la malattia (*Li et al. 2007*). Nello studio Rotterdam è stato messo in relazione il polimorfismo ACE I/D ed l'ispessimento dei vasi in una popolazione di adulti anziani. Dopo aggiustamento per età e genere soggetti con allele D avevano una durezza delle arterie più alta. L'associazione era più forte in soggetti sotto i 70 anni (*Mattace Raso et al. 2004*). Successivamente sempre nel solito trial è stata valutata l'associazione dei tre polimorfismi RAS con la manifestazione di rigidità vascolare. L'allele D è associato ad un più basso coefficiente di distensibilità vasale mentre gli altri polimorfismi non avevano associazioni significative (*Sie et al. 2009*). In

uno studio volto a valutare la disfunzione endoteliale l'analisi del polimorfismo ACE ha determinato nella variante DD livelli di colesterolo più bassi, mentre HDL, diametro dell'arteria brachiale e flusso sanguigno basale e post iperemia era simile (*Tanriverdi et al. 2008*).

### **6.3 RAS NEL TRAPIANTO RENALE**

Molti studi clinici hanno evidenziato che il blocco del RAS è utile nel trattamento dell'ipertensione, eritrocitosi post trapianto e riduzione della proteinuria (*Cruzado et al. 2008*). L'uso di inibitori ACE è stato associato con induzione di anemia nei trapiantati con blocco del recettore AT1, riduzione media dell'ematocrito del 3,5% (*Ersoy et al. 2005*) e del tasso di filtrazione glomerulare (*Hiremath et al. 2007*). Uno studio retrospettivo sui trapiantati ha mostrato un aumento di sopravvivenza a 5 anni con il blocco del sistema RAS (*Heinze et al. 2006*). L'effetto benefico dell'azione di RAS sulla diminuita fibrosi è stato negato da una più alta incidenza di vasculopatia nei trapiantati. In un modello di ratto di insufficienza renale cronica il blocco del RAS nel follow up di 34 settimane preveniva la glomerulo sclerosi ma aumentava l'iperplasia dell'intima dell'arteria renale portando a vasculopatia del trapianto (*Smit Van Oosten et al. 2001*). In pazienti che soffrono di ipertensione posttrapianto gli anticorpi IgG che giocano un ruolo nel rigetto acuto vascolare nella prima settimana dopo l'intervento attivano il recettore ATR1. La loro rimozione tramite plasmateresi in combinazione con il blocco farmacologico AT1 porta al miglioramento della funzione renale e sopravvivenza dell'impianto in pazienti positivi a questi anticorpi (*Dragun et al. 2005, Geara et al. 2009*). L'Angiotensina II esercita il suo effetto vasocostrittore in prevalenza sulle arteriole postglomerulari aumentando la pressione idraulica glomerulare e le proteine plasmatiche di ultrafiltrazione. Tale effetto può contribuire alla progressione del danno cronico renale sostenendo la crescita cellulare, l'infiammazione e la fibrosi. L'inibizione dell'attività RAAS quindi è rene-protettiva (*Remuzzi et al. 2005*).

#### 6.4 POLIMORFISMI DEL SISTEMA RAS NEL TRAPIANTO RENALE

E' stato valutato il contributo del polimorfismo ACE I/D allo sviluppo dell'ipertrofia ventricolare sinistra come indicatore di progressione della malattia cardiaca nei trapianti renali : essa si manifestava significativamente più alta fra i portatori dell'allele D (*Fedor et al. 2011*). E' stato visto che i polimorfismi genetici del RAS correlano con la funzione dell'impianto renale. Solo pazienti omozigoti per ACE D avevano un significativo declino nella filtrazione glomerulare confrontata con i portatori omozigoti dell'allele I. Un peggioramento più pronunciato avveniva se donatori ed riceventi erano ambedue DD (*Buscher et al. 2011*). Un ruolo di questo polimorfismo è stato valutato anche nell'ipertensione di trapiantati pediatrici ma non è stata trovata alcuna correlazione significativa (*Serdaroglu et al. 2005*). E' stato poi indagato il ruolo tra polimorfismi del sistema RAS e sviluppo di diabete mellito dopo il trapianto. In una popolazione divisa in trapiantati diabetici e non, nel primo gruppo è stata notata una alta frequenza di AGT TT ed ACE DD suggerendo una sinergia fra questi due geni e lo sviluppo di questa malattia post trapianto (*Ozdemir et al. 2011*). In un'indagine effettuata su 223 trapiantati c'è un picco di associazione tra genotipo AGTR1 e funzione dell'impianto a lungo termine (*Nicod et al. 2002*). Nella valutazione dell'eritrocitosi post trapianto un fenomeno molto importante che può avere anche conseguenze da un punto di vista emoreologico, essa è prevalente negli eterozigoti I/D quando confrontati con gli I/I e all'analisi univariata i portatori dell'allele D avevano un rischio più alto di questa complicazione (*Mikozkadioglu et al. 2004*). Un ruolo nel rigetto acuto refrattario (SRAR) agli steroidi e l'associazione con anticorpi attivanti che hanno come bersaglio il recettore AT1R è stato indagato per i geni polimorfici del RAS. La reazione SRAR era significativamente più alta in genotipo ACE DD e AT1R CC mentre gli anticorpi attivanti il recettore sono stati trovati solo in 14 pazienti su una popolazione di circa 200 persone (*Zhang et al. 2007*). L'allele AGT 235 T influenza indipendentemente il declino a lungo termine nella funzione dell'impianto renale

(Prasad et al.2003). Il polimorfismo AGTR1 è stato visto associato con una diminuzione nella funzione renale post trapianto (Israni et al. 2007). Esiste una percentuale più alta dell'allele AGTR1C negli ipertesi. Pazienti con aplotipo ACE DD/AGTR1 CC hanno più bassa creatinina ed un più alto tasso di escrezione urinaria della proteine (Argani et al. 2007).

## **6.5 POLIMORFISMI DEL SISTEMA RAS ED EMOREOLOGIA**

L'associazione fra il polimorfismo ACE I/D e parametri emoreologici è stata valutata in 28 volontari sani : nessuna relazione significativa è stata trovata tra polimorfismi I/D del gene ACE ed aggregazione eritrocitaria o viscosità ematica e plasmatica. Invece il parametro della deformabilità eritrocitaria aumentava nei portatori del genotipo DD confrontati con quelli II o ID. Stessa cosa avveniva se si confrontavano l'allele D con quello I. Questo fenomeno viene spiegato con il possibile incremento del rilascio di NO (che migliora la deformabilità eritrocitaria) ad opera dell'angiotensina II che va a stimolare il recettore AT1 nella cellula endoteliale (Boulanger et al. 1995,Saito et al. 1996, Siragy e Carey, 1997, Bor-Kucukatay et al. 2006). Il fenomeno dell' eritrocitosi post-trapianto definita come un ematocrito elevato in modo persistente oltre il 51% è legato alla viscosità ematica dal momento che aumenta la quota eritrocitaria nel sangue. Inoltre è interessante focalizzare il ruolo che l'angiotensina II ha nell'attivare i progenitori eritroidi responsabili della maggiore produzione eritrocitaria e nella secrezione inappropriata di eritropoietina (Vlahakos et al. 2003).

## 7. RICERCHE PERSONALI

### 7.1 POPOLAZIONI ESAMINATE

#### MALATTIA ARTERIOSA PERIFERICA (PAD)

Sono stati analizzati 192 pazienti affetti da malattia arteriosa periferica (PAD) divisi in due gruppi (gruppo A e gruppo B) ricoverati presso l'Unità di Chirurgia Vascolare dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, di Firenze. La diagnosi di arteriopatia periferica è stata effettuata sulla base della presenza di sintomi di "claudicatio intermittens", come dolore paralizzante ai polpacci o alle natiche durante l'esercizio, o indice caviglia-braccio (ABI, ankle brachial index) <0,90 a riposo, calcolato in accordo alle raccomandazioni della American Heart Association (*Greenland P et al.,2007*).

**Gruppo A** : costituito da 90 pazienti : 70 maschi (77,7%) e 20 femmine (22,2%), di età mediana 73 anni (range 31-87 anni) e 180 soggetti di controllo, apparentemente sani, confrontabili per età e genere con i pazienti, reclutati da uno studio di popolazione condotto a Firenze di cui 140 maschi (77,7%) e 40 femmine (22,2%), di età mediana 70 anni (range 35-89 anni). I pazienti sono stati anche sottoposti a valutazione clinica e indagine strumentale al fine di indagare la presenza di lesioni aterosclerotiche in altri distretti (elettrocardiogramma e ecocardiogramma, ECO-stress, scintigrafia miocardica e angiografia coronarica) in accordo alle linee guida ACC/AHA (American College of Cardiology/American Heart Association) (*Fleisher LA et al.,2007*). La presenza di stenosi carotidea è stata valutata tramite eco-color Doppler, in accordo ai criteri NASCET (*Barnett HJ et al.,2002*). I criteri di esclusione per i controlli erano costituiti da una storia personale e familiare di malattia cardiovascolare. E' stata raccolta un'anamnesi accurata per ogni singolo soggetto al fine di escludere coloro che potessero avere qualsiasi forma di malattia cardiovascolare. I soggetti sono stati considerati ipertesi in accordo alle linee guida della Società Europea di Ipertensione/ Società Europea di Cardiologia(*ESH/ESC Hypertension guidelines, 2003*) o se in trattamento con farmaci antiipertensivi. La dislipidemia è stata definita in accordo al terzo report del National Cholesterol Education Program (*NCEP*) [*Third report of the*

*National Cholesterol Education Program (NCEP), 2002*], e il diabete è stato valutato secondo i parametri della American Diabetes Association (*Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus, 2003*). Sono stati considerati fumatori sia coloro che fumavano al momento dell'indagine anamnestica che coloro che avevano smesso di fumare da  $\leq 5$  anni. La familiarità positiva per malattia cardiovascolare è stata definita sulla base della presenza di almeno un parente di primo grado che ha sviluppato la malattia entro un determinato limite di età (55 anni per gli uomini e 65 anni per le donne). Tutti i soggetti che hanno partecipato allo studio erano Caucasici, non consanguinei e residenti nella stessa area geografica ed hanno dato il loro consenso alla partecipazione allo studio.

**Gruppo B** : Successivamente è stata esaminata una popolazione di 102 pazienti con un'età mediana di 73 anni range 46-87 anni [81 maschi(79,4%) e 21 femmine(20,6%)]. La diagnosi della malattia ha seguito gli stessi criteri del precedente gruppo A. I controlli sono 67 persone età mediana 51 anni range 23-73 [35 maschi(52,2%) e 32 femmine(47,8%)] reclutati da una popolazione di studio condotta a Firenze. Abbiamo usato uno specifico questionario per identificare controlli liberi da malattia e per escludere soggetti sospettati avere qualche forma di malattia vascolare. Tutti i soggetti hanno dato consenso informato.

Inoltre lo studio emoreologico relativo alla deformabilità ed aggregazione eritrocitaria è stato condotto impiegando due diverse metodologie : nel gruppo A è stata utilizzata la classica tecnica Myrenne mentre nel gruppo B la nuova tecnica L.O.R.C.A.

### **TRAPIANTI RENALI**

Sono stati analizzati 383 pazienti che hanno subito trapianto renale arruolati dal 2007 al 2010 divisi in due gruppi (gruppo A e gruppo B). Essi sono stati seguiti in accordo alle linee guida dell' American Society of Nephrology ed ammessi all'Unità Renale dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi ad almeno 12 mesi dopo il trapianto con funzione renale stabile e nessuna prova clinica di rigetto acuto o cronico dell'impianto renale. Non ci sono prove cliniche o di laboratorio di infezione acuta da

citomegalovirus in nessun paziente. Criteri di inclusione per i pazienti erano: 1) Livello della Clearance della Creatinina  $>60$  mL/min; 2) Livello di creatinina  $\leq 1.5$  mg/dL; 3) Diminuzione dei livelli di creatinina in almeno 6 mesi  $<15\%$ . Tutti i pazienti erano in terapia profilattica immunosoppressiva basati entrambi su ciclosporina a bassa dose/corticosteroidi a bassa dose ed Everolimus o ciclosporina dose standard/corticosteroidi e Mofetil micofenolato. Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad una completa valutazione del rischio cardiovascolare. Lo stato di abitudine al fumo è stato determinato al tempo della raccolta di sangue. I soggetti sono stati classificati come aventi ipertensione secondo le linee guida dell'European Society of Hypertension/European Society of Cardiology o se loro riportavano prendere farmaci antipertensivi. Soggetti diabetici sono stati definiti in accordo all' American Diabetes Association Diabetic. La dislipidemia è stata definita in accordo al Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP-III) o se prendevano farmaci antidislipidemic. Una storia familiare positiva è stata definita quando la presenza di almeno un primo grado relativo che aveva sviluppato CAD prima dei 55 anni per gli uomini e 65 anni per le donne.

**Gruppo A:** E' stato valutata una popolazione di 239 pazienti (156 uomini età mediana 53 anni (17-75 anni), 83 donne età mediana 50 anni (17-74) ad almeno 12 mesi dopo trapianto renale con funzione dell'organo stabile e normale confrontati con 90 soggetti sani (38 uomini età mediana 38 anni (22-63), 52 donne età mediana 41 anni (26-61) senza storia di malattie cardiovascolari o renali. I pazienti ed i controlli sono stati reclutati nel periodo 2007-2008 ed hanno dato il loro consenso informato e lo studio è stato approvato dal comitato etico locale. E' stata raccolta un'anamnesi accurata per ogni singolo soggetto includendo fattori di rischio come ipertensione, trombosi venosa profonda, abitudine al fumo, diabete, epatopatia, rigetto acuto, presenza concomitante di citomegalovirus. Sono stati raccolti dati anche circa l'uso di statine, tipo di anticoagulante usato e sulla terapia immunosoppressiva. In questa popolazione la deformabilità e l'aggregazione eritrocitaria sono state misurate con la classica

metodica Myrenne. Per prima cosa siamo andati a valutare le caratteristiche demografiche, emoreologiche ed ematologiche dei pazienti. Riguardo ai parametri emoreologici abbiamo constatato una viscosità ematica corretta per l'ematocrito significativamente più alta rispetto ai controlli sia alle basse che alle medio alte shear rate. Anche la viscosità plasmatica e la deformabilità eritrocitaria avevano un aumento significativo mentre nessuna differenza è stata riscontrata tra le aggregazioni. Da notare è un abbassamento significativo dei valori di emoglobina nei trapiantati rispetto ai controlli. Abbiamo riscontrato significatività anche nelle variabili demografiche come età e sesso e nei parametri clinici che sappiamo avere una qualche influenza nel profilo emoreologico come fibrinogeno, colesterolo, trigliceridi.

**Gruppo B:** Nel periodo dal 2009 al 2010 è stata raccolta una popolazione di 144 trapiantati renali. Le caratteristiche demografiche erano : età mediana 53 anni (23-84), maschi (69,4%) e femmine (34,6%). Il gruppo di controllo era costituito da 68 soggetti sani [età mediana 51 anni (23-73) ,51,5 % maschi e 48,5 % femmine].

Lo studio emoreologico relativo alla deformabilità ed aggregazione eritrocitaria in questo gruppo è stato condotto impiegando la nuova tecnica L.O.R.C.A.

## **METODI**

### **7.2 MISURE DELLA VISCOSITA' EMATICA E PLASMATICA**

La viscosità del sangue intero e la viscosità plasmatica sono state misurate a 37°C e valutate usando un Viscosimetro Rotazionale Physica MCR 301, Anton Paar che consiste in due superfici cilindriche concentriche una delle quali ruotanti. Questa configurazione è detta cilindro in cilindro (Couette) con il campione che viene sottoposto ad una forza di taglio nell'intervallo fra loro. Il sangue venoso viene raccolto in provette anticoagulate con EDTA e 1,8 ml di campione sono messi nella coppa del viscosimetro evitando accuratamente la formazione di bolle d'aria e sottoposti a shear rate bassissime e medio-alte; in particolare vengono usate, secondo diversi range di

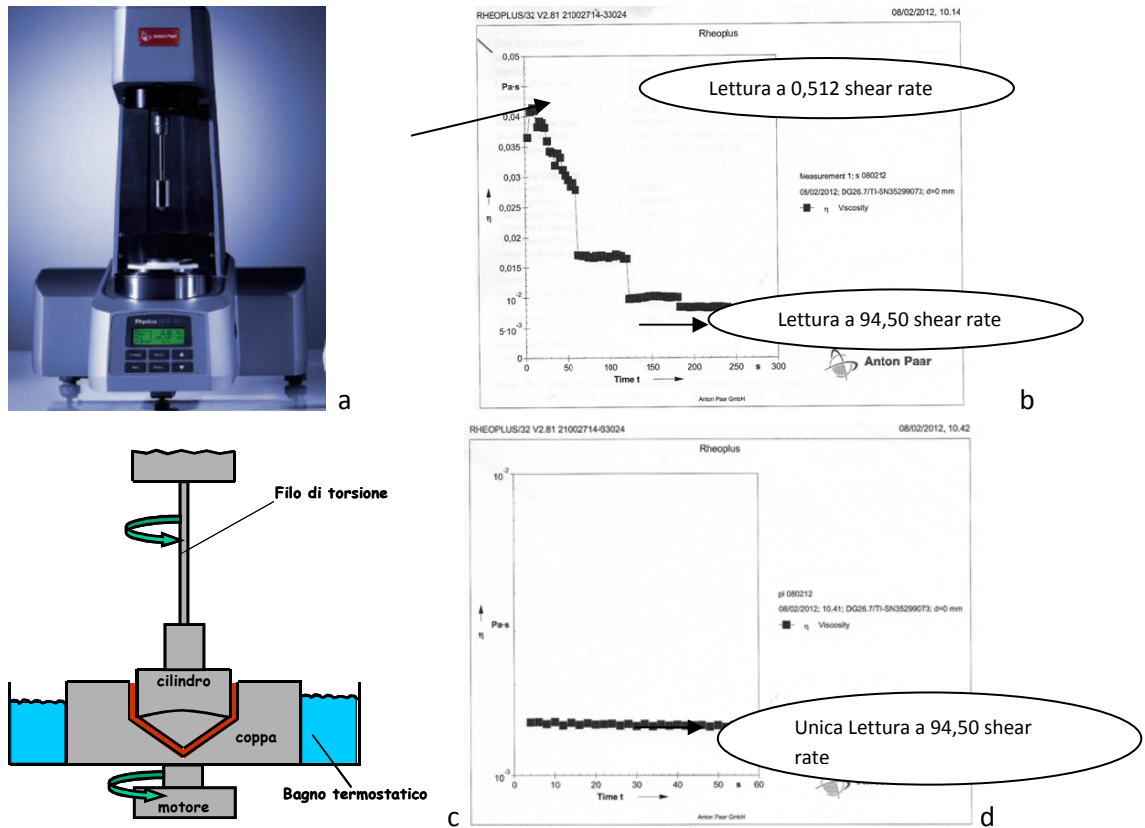


lettura a partire da 0,512/sec fino a 94,5/sec per ogni campione. Nel nostro studio abbiamo preso in considerazione:

- il valore della WBV alle bassissime shear rates ( $0,512 \text{ s}^{-1}$  per 1 minuto alla temperatura costante di  $37^\circ\text{C}$ ) che è influenzata in modo particolare dall'aggregabilità eritrocitaria e sarà perciò tanto maggiore quanto più sarà elevata la tendenza degli eritrociti ad aggregarsi fra loro.
- Il valore della WBV alle medie shear rates ( $94,5 \text{ s}^{-1}$  per 1 minuto alla temperatura costante di  $37^\circ\text{C}$ ) è influenzata in modo particolare dalla deformabilità eritrocitaria e dalla componente plasmatica. Sarà perciò tanto maggiore quanto più bassa sarà la tendenza degli eritrociti a deformarsi.

La temperatura è mantenuta costante durante l'esecuzione del test a  $37^\circ\text{C}$  da un sistema termostatico a pompa collegato al viscosimetro. Il test è iniziato con l'esame delle bassissime shear rates fino a raggiungere le medie, ed ognuna viene esaminata per il tempo di 1 minuto. La shear rate è proporzionale alla velocità di rotazione della coppa attorno al cilindro. I dati registrati vengono moltiplicati per le rispettive costanti ottenendo l'andamento dei valori di emoviscosità. I valori del sangue intero sono stati aggiustati ad un ematocrito del 44% per gli uomini e del 40% delle donne e denominati "viscosità ematica corretta per l'ematocrito".

Il plasma invece viene ricavato centrifugando il campione di sangue intero a 3000 g per 15 minuti a temperatura ambiente in modo da separare la componente plasmatica da quella cellulare. Il suo recupero viene effettuato con l'ausilio di una pipetta Pasteur. Poi viene introdotta la solita quantità di 1,8 ml nella coppa. Le misure di viscosità plasmatica sono ottenute ad un'unica shear rate di  $94,50 \text{ s}^{-1}$  essendo ritenuto il plasma paragonabile ad un liquido newtoniano (solo in alcune condizioni morbose come displasie plasmacellulari, può essere utile eseguire determinazioni a più di una shear rate). Il risultato è una media di 30 letture.



**Figura 13** : a) Viscosimetro Rotazionale Physica MCR 301, Anton Paar b) Grafico di lettura della viscosità ematica c) Schema del meccanismo interno del viscosimetro d)Grafico di lettura della viscosità plasmatica

### 7.3 MISURA DELLA DEFORMABILITA' ERITROCITARIA

La misura della deformabilità eritrocitaria è stata effettuata con due tecniche distinte : una basata sulla filtrazione eritrocitaria, l'altra invece sulla nuova metodica ectacitometrica che negli ultimi anni si sta proponendo come metodo ideale per la misura di questo parametro emoreologico.

#### TECNICA DI FILTRAZIONE ERITROCITARIA

Dopo aver ottenuto il plasma dai campioni di sangue intero con una prima centrifugazione (15min. a 3.000 giri/min.), si passa all'eliminazione del buffy-coat, mediante aspirazione effettuata con l'ausilio di una pipetta Pasteur in vetro connessa ad una pompa a vuoto così da eliminare il plasma e lo strato di leucociti. Poi si aggiunge al fondello di globuli rossi un egual volume di una soluzione con pH 7,4 ed osmolarità 290 e si mescola delicatamente. La provetta viene quindi nuovamente

centrifugata a 3.000 giri per 15 minuti. Si ripete l'operazione di aspirazione e risospensione con la stessa soluzione e successiva centrifugazione per altre 2 volte. All'ultimo lavaggio, viene calcolato il valore dell'ematocrito della sospensione eritrocitaria e impostate le opportune diluizioni da effettuare per ottenere un ematocrito del 5%. Il campione viene quindi inserito, con l'aiuto di un'ago-cannula, nel tubo di analisi del filtrometro Myrenne MF4 il quale consente la determinazione delle caratteristiche reologiche di sospensioni di eritrociti mediante il procedimento della filtrazione attraverso filtri in policarbonato o metallici del diametro di 8 mm e con micropori di 5  $\mu\text{m}$  disposti regolarmente sulla loro superficie, a pressione atmosferica. L'apparecchio misura il volume di sangue filtrato tramite 4 dispositivi optoelettronici, costituiti da una sorgente luminosa a diodi led e da una fotocellula ed effettua una misurazione ogni 4 secondi. L'intervento dell'operatore è ridotto alla preparazione del campione ed alla sua introduzione nel tubo di precisione per la lettura. Il tubo per la lettura è conformato ad "U" evitando così la sedimentazione delle emazie sul filtro e consentendo l'eliminazione di eventuali microbolle. Una volta terminata la lettura un sistema computerizzato stampa i dati memorizzati in funzione del tempo, che per la tipologia di filtri impiegata (*nucleopore*) è di 10 minuti; in particolare vengono riportati:

- ✓ i valori delle tangenti alla curva "*percentuale di filtrato / tempo*" all'inizio della filtrazione (*initial slope*) e nei momenti in cui il sangue non ancora filtrato è l' 80% e poi il 60%, 50%, 40%, 20% (*slope*).
- ✓ il tempo impiegato per filtrare il 50% del campione (*T 50%*).
- ✓ il volume residuo di sangue non filtrato (*minimal value*).
- ✓ il tempo impegnato per raggiungere il valore residuo di sangue (*minimal time*).

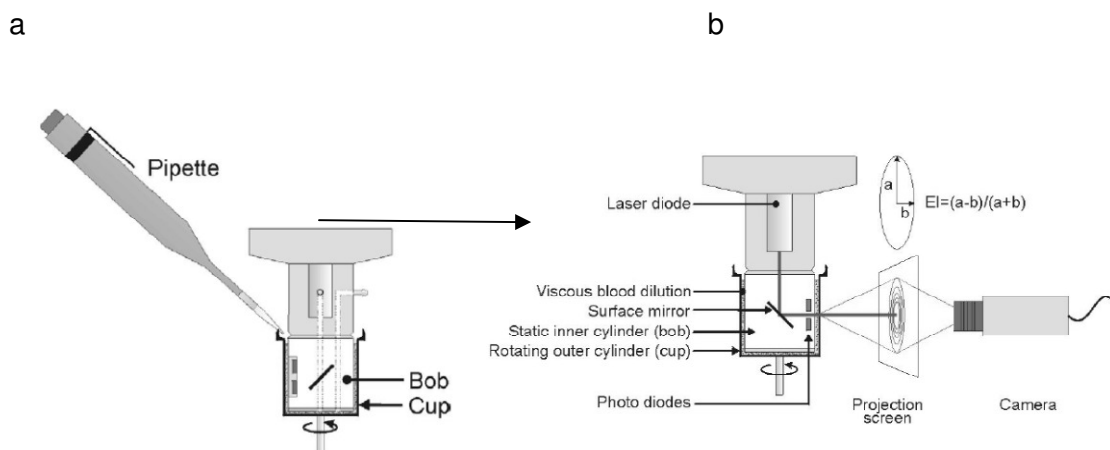
Di particolare interesse risultano essere l'*initial slope*, che ci permette di valutare la velocità iniziale di filtrazione e da cui viene estrapolato l'indice di deformabilità eritrocitaria, ed il *minimal value* che sarà tanto maggiore quanto meno saranno deformabili gli eritrociti. Il programma con il quale il microcomputer (Rockwell AIM 65)

controlla le operazioni di lettura e calcola i parametri descritti è contenuto in una memoria di sola lettura (EPROM).

### **LA TECNICA ECTACITOMETRICA**

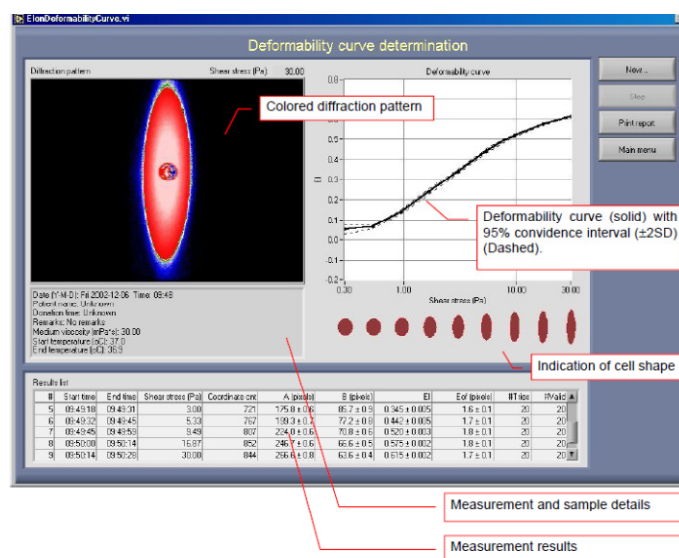
Recentemente ha preso sempre più campo una nuova metodica nella valutazione della deformabilità dei globuli rossi. Essa può essere definita come una tecnica d'indagine basata sulla dispersione di un raggio laser da parte di una sospensione cellulare. E' stata sperimentata per la prima volta nel 1994 da un gruppo olandese dell'Academic Medical Center dell'Università di Amsterdam con a capo M.R. Hardeman il quale ha subito dimostrato la versatilità e la capacità dello strumento nell'indagine della deformabilità ed aggregazione eritrocitaria (Hardeman et al. 1994 part I and Hardeman et al. 1994 part II). Successivamente è stata utilizzata in alcuni lavori che hanno analizzato questo parametro emoreologico in diverse patologie che vanno dalla trombosi venosa profonda (Chwala ed al., 2009), alla malattia arteriosa coronarica (Bor-Kucukatay et al. 2009), obesità (Wiewiora et al. 2006, Wiewiora et al. 2007), ipertensione arteriosa (Cicco et al. 1999, Cicco et al. 2001) in pazienti sottoposti a bypass cardiopolmonare (Gu et al. 2005), malati di erisipela (Biesiada et al. 2006), glaucoma (Vetrugno et al. 2004), Sepsis (Baskurt et al. 1996), Preeclampsia (Pepple et al. 2001), dermatite atopica (Kasperska-Zajac et al. 2009), malaria (Dondorp et al. 1999). In questa esperienza è stato impiegato come strumento di misura il L.O.R.C.A. (analizzatore cellulare rotazionale ottico laser assistito) il quale è fondato sul principio ectacitometrico ; esso consiste di un cilindro ruotante esterno (coppa) con uno montato immobile interno (bob). Viene anche detto sistema a Couette. Importante è il raggio del cilindro (meglio se più lungo) e lo spessore dello strato tra il cilindri (più è sottile, più precisa avremo la diffrazione ed uniforme la shear rate). Gli eritrociti prelevati da sangue anti coagulato con EDTA sono stati sospesi in quantità di 25 µl in una provetta contenente un medium viscoso il PVP polyvinilpirrolidone misurato a 30 Pa in modo che si ottenga un ematocrito dello 0,2-0,3 %. Successivamente dopo agitazione,

tramite una pipetta vengono inseriti 1-1,5 ml della soluzione nell'intercapedine fra i cilindri facendo attenzione a non creare bolle in modo che venga distribuita uniformemente. La sospensione viene mantenuta tramite un termostato ad una temperatura costante (37°C). La shear stress applicata sotto forma di movimento del cilindro viene controllata da un computer e regolata in un intervallo 0,3-30 Pa. La luce del laser attraversa il medium e sarà parzialmente diffratta dai globuli rossi.



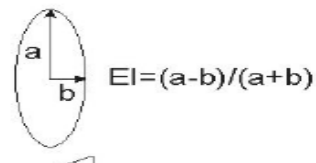
**Figura 14:** a) Schema dell'introduzione della soluzione sangue-PVP nel sistema bob in cup b) Schema della misura reolettica

L'allungamento dei RBC viene misurato da una transizione di forma del cosiddetto modello di diffrazione visibile sullo schermo che rappresenta la popolazione eritrocitaria che sto esaminando.



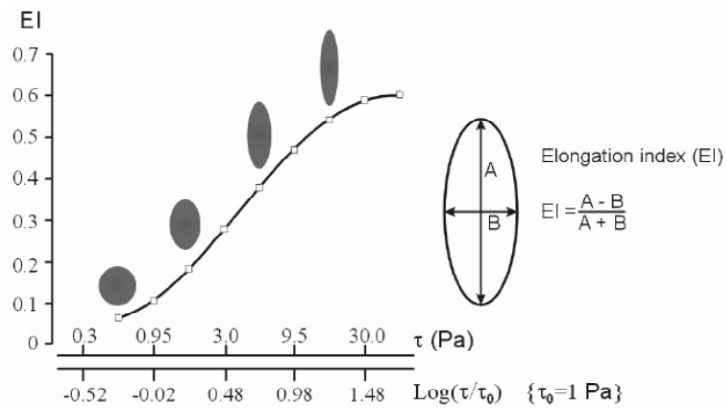
**Figura 15:** In alto a sinistra modello di diffrazione, in alto a destra curva di deformabilità, in basso elenco delle 9 shear stress applicate e relative misure registrate

Esso rappresenta la misura della deformabilità media dei globuli rossi e visivamente si vede il cambiamento della forma del modello da circolare che rappresenta la popolazione a riposo ad ellittica quando le cellule sono sottoposte a shear stress sempre più crescenti. Gli assi maggiore e minore dell'ellisse servono a calcolare l'indice di allungamento (Elongation index EI). Il computer calcola la migliore ellisse corrispondente (curva di misura) e determina l'EI dagli assi orizzontale(B) e verticale(A) secondo l'equazione riportata.



$$EI = \frac{a-b}{a+b}$$

Nel caso in cui fossero presenti cellule veramente rigide l'immagine di diffrazione avrà sovrapposto un componente circolare centrale. Quando gli eritrociti si deformano sotto shear stress crescenti cambiano gradualmente da una morfologia biconcava ed una tardiva ad ellisse e si orientano lungo il vettore del flusso. L'operatore prima della misura deve provvedere ad aggiustare il diaframma della camera in modo che acquisti la massima ampiezza nello schermo così da includere tutta la popolazione. Una volta determinata l'EI in rapporto alle shear stress applicate viene rappresentata in un grafico adiacente (vedi **figura 15**). In questa esperienza sono stati utilizzati dati misurati a 0,3-0,53-3-30 Pa. Nel nostro laboratorio il valore di misura di deformabilità viene preso a 3 Pa (valori più sensibili ai cambiamenti nelle deformabilità ma pure con un più alto coefficiente di variazione). Misurare alle alte shear stress invece è importante perché si è vista una correlazione al rapporto superficie/volume della cellula e viscosità intracellulare o MCHC. Abbiamo ritenuto opportuno non impiegare shear stress maggiori perché già con 30 Pa si raggiungeva il plateau della curva.



**Figura 16:** Grafico della curva di deformabilità indice di elongazione in funzione della shear stress applicata con in alto schema del modello di diffrazione relativo

#### 7.4 MISURA DELL'AGGREGAZIONE ERITROCITARIA

Anche riguardo a questo parametro emoreologico sono state impiegate due tecniche : metodo classico basato sull'aggregometro eritrocitario e nuovo metodo con il principio della sillectometria L.O.R.C.A.

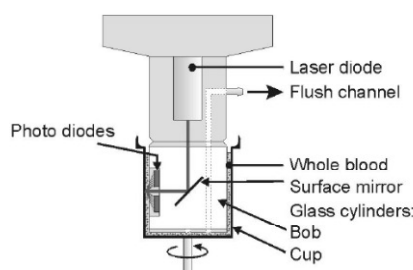
##### AGGREGOMETRO ERITROCITARIO MYRENNE

Lo strumento Myrenne si basa sul principio della trasmissione della luce attraverso sospensioni aggreganti: è una tecnica basata sul metodo cono-piatto dove il primo è ruotante, mentre il secondo rappresentato da un vetrino è fisso. In esso viene posto una piccola quantità di sangue (30 µl). Tramite un tasto la sospensione è dispersa da un'alta shear rate (circa 600 sec<sup>-1</sup>) in modo da disperdere tutti gli aggregati preesistenti per 10 sec. Nel momento in cui cessa la rotazione del cono si formano i rouleaux. Successivamente abbiamo 10 sec di attesa alla conclusione della quale viene data una lettura digitale relativa al cambiamento in trasmittanza che è avvenuto. Questo aggregometro è in grado di dare due indici di aggregazione che dipendono dalla velocità di rotazione del cono: M<sub>0</sub> o stasi ed M<sub>1</sub> a 3s<sup>-1</sup>. Entrambi questi parametri possono essere calcolati dall'area della superficie sotto la curva di intensità della luce che dipende dal tempo trascorso 5 o 10 sec dopo l'arresto del movimento. Più grande è la tendenza del globulo rosso ad aggregare più grande è l'indice di aggregabilità. L'unità di misurazione è controllata da un microprocessore ed esso opera tramite un

fotometro operante nell'infrarosso. Il risultato della misurazione viene evidenziato in un display digitale a 4 cifre come entità media di aggregazione(MEA).

### **LA SILLECTOMETRIA L.O.R.C.A.**

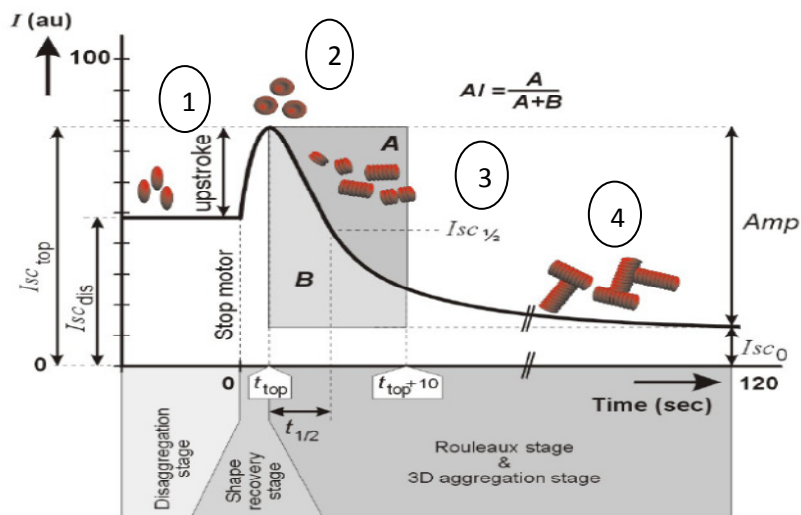
Lo strumento L.O.R.C.A. è in grado anche di effettuare misure di aggregazione eritrocitaria. In questo caso il laser emesso da un diodo una volta che viene trasmesso (backscatter) dallo strato di sangue fra i due cilindri viene raccolto da due fotodiodi e convertito in un segnale elettrico. Il sangue è illuminato e sottoposto contemporaneamente a shear stress dal movimento rotatorio del cilindro.



**Figura 17:** Schema del meccanismo alla base della sillectometria con il raggio laser che passa attraverso i fotodiodi

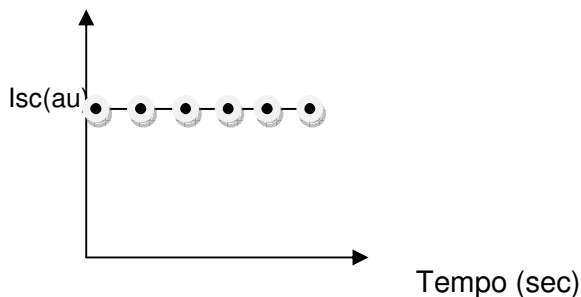
Ciò porta le cellule a deformarsi ed allinearsi in direzione del flusso(FASE DI DISAGGREGAZIONE). La **figura 18** illustra un tipico sillectogramma ovvero un grafico che mi rappresenta tutte le fasi di aggregazione che avvengono nel campione e che viene visualizzato nello schermo dello strumento.





**Figura 18:** Rappresentazione schematica di un silectogramma con le 4 fasi dell'aggregazione eritrocitaria

1) Il plateau iniziale rappresenta lo stadio di disaggregazione: esso origina dal laser che viene trasmesso indietro dagli eritrociti allungati che sono allineati in direzione del flusso (l'intensità della luce correla con lo stato di "allungamento" e dipende dalla shear rate).



Il grafico rappresenta l'intensità della luce trasmessa indietro in unità arbitrarie (Au) in funzione del tempo (massimo 3 secondi) e mi visualizza l'allineamento degli eritrociti provocato dalla shear rate di disaggregazione (500 sec<sup>-1</sup>). È come se rappresentasse in qualche modo la situazione che avviene in vivo dove i globuli rossi sono naturalmente disaggregati dalle shear rate a cui sono sottoposti in circolo.

2) In questa fase l'intensità della luce viene misurata dopo l'arresto del motore. Il risultante tracciato intensità/tempo dipendente viene chiamato SILECTOGRAMMA. Un picco ad alta intensità mostra all'inizio del tracciato come le cellule ritornino alla loro

forma originale. Nello stadio di recupero della forma che segue quindi immediatamente dopo lo stop del motore le cellule collettivamente perdono il loro allineamento e ritornano alla loro forma a riposo biconcava. Abbiamo un concomitante aumento esponenziale della luce trasmessa indietro che viene visualizzata nel sillectogramma da un picco ad alta intensità (UPSTROKE).

3) L'aggregazione inizia quindi durante lo stadio di recupero della forma quando le forze shear esterne non riescono più a mantenere gli eritrociti dissociati. Essi cominciano ad aggregare fianco a fianco come pile di monete (rouleaux) cosicchè la luce trasmessa diminuisce esponenzialmente con un tempo costante di circa 1-3 secondi nel sangue umano normale. Una rappresentazione matematica del sillectogramma produce i parametri dell'aggregazione che vengono usati per valutare l'aggregabilità dei globuli rossi.

**AMPIEZZA(Amp)** nel grafico misurata dall'equazione  $I_{sc\text{top}} - I_{sc0}$  è usata per descrivere l'estensione dell'aggregazione. È adimensionale ed espresso da unità arbitrarie.

**T/2** (sec) descrive invece la cinetica dell'aggregazione ed è il tempo che intercorre finchè l'intensità del picco è ridotta la metà della sua ampiezza (nel punto  $I_{sc1/2}$ ).

**INDICE DI AGGREGAZIONE AI (%)** descrive il comportamento globale dell'aggregazione della sospensione è un valore compreso fra 0-100 e dipende da ambedue i parametri precedenti: l'estensione e la cinetica di aggregazione. A livello del grafico viene determinato dalle aree A e B limitate da  $t=t_{\text{top}}$  e  $t= t_{\text{top}} + 10$  sec quando  $AI=100\% \cdot A/(A+B)$

4) La formazione dei rouleaux è immediatamente seguita dalla formazione dei cosiddetti aggregati 3D nei quali le pile di eritrociti si connettono coda-coda e lato-coda creando così aggregati più ampi. In totale l'intero processo di aggregazione dura 120 secondi.

## Rappresentazione matematica del sillectogramma

$$I(t) = -I_r \cdot e^{-t/tr} + I_f \cdot e^{-t/tf} + I_s \cdot e^{-t/ts} + I_0$$

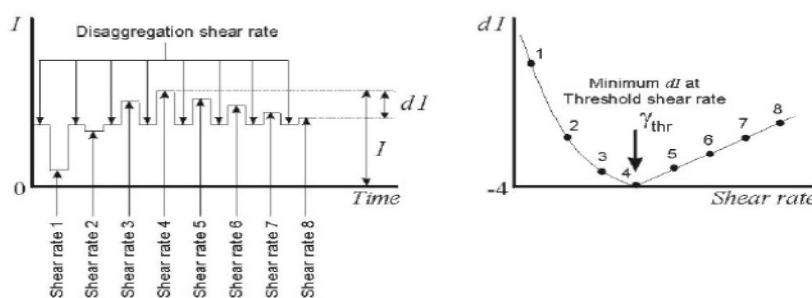


UPSTROKE    ROULEAUX    AGGREGATI 3D

L'equazione mostrata sopra utilizza 3 costanti in funzione del tempo ciascuna della quali mi determina una parte del grafico del sillectogramma.

### Procedura di iterazione

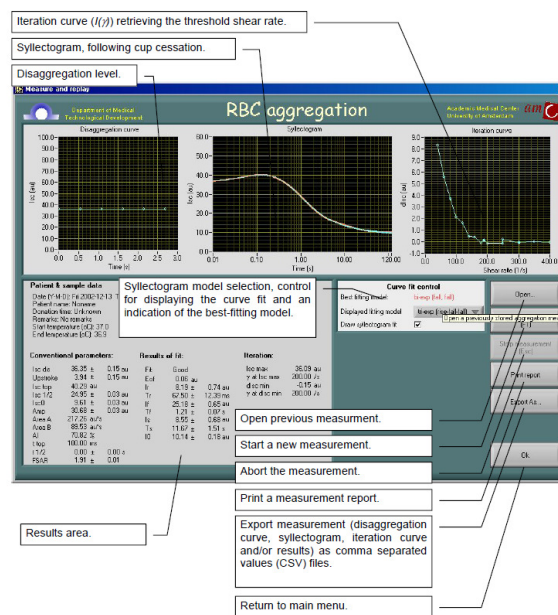
Serve per determinare la shear rate “**soglia**” ( $\gamma_{thr}$ ) un parametro sensibile che occorre per dimostrare l'eventuale iperaggregazione della soluzione. Il programma in primo luogo disaggrega la sospensione degli eritrociti poi procede alla misurazione a date shear rate definite. Una lista di shear rate memorizzate nel software (oppure possono essere impostate dall'operatore) vengono processate per avere un'impressione approssimativa della shear rate soglia. Un algoritmo di ricerca binario viene usato per generare automaticamente 2 shear rate in più scelte centrate tra la shear rate corrente ottimale e le shear rate più alte e più basse. (vedi **figura 19** a sinistra).



**Figura 19:** a sinistra schema dell'algoritmo binario di ricerca delle shear rate; a destra schema del grafico che mi individua la shear rate soglia minima ( $\gamma_{thr}$ ).

La differenza ( $dI_{sc}$ ) tra la luce trasmessa durante la fase di disaggregazione e quella ad ogni shear rate successiva determinata viene messa in grafico. La shear rate con il

dlsc più basso è fissata come shear rate soglia ( $\gamma_{thr}$ ) (vedi **figura 19** grafico a destra). La  $\gamma_{thr}$  è definita la minima shear rate per prevenire l'aggregazione (*Shin et al. 2009*). La figura sotto mostra come nello strumento viene visualizzata la procedura dell'aggregazione con la divisione grafica nelle tre fasi : 1. Disaggregazione, 2. Aggregazione misurata dal sillettogramma, 3. Procedura di reiterazione per la determinazione della shear rate soglia.



**Figura 20** : Come il sillettogramma viene visualizzato nello schermo del L.O.R.C.A : da sinistra stadio di disaggregazione, misura dell'aggregazione eritrocitaria e curva di iterazione. In basso a sinistra valori dell'aggregazione registrati dal programma.

I campioni di sangue da sottoporre a questa procedura richiedono ossigenazione ottenuta mettendo in dei falcon da 50 ml una quantità di sangue intero di almeno 4ml. Questo perché il rapporto ossigeno/sangue deve essere di 1:4. Poi questi vengono adagiati in un agitatore roller in modo che il mescolamento continuo della soluzione favorisca la penetrazione dell'aria nel sangue. Dopo un tempo di incubazione di 15 minuti il sangue assume un colore rosso ciliegia e si può procedere con la misura mettendo 1-1,5 ml di sangue nella coppa dello strumento.

## **7.5 VALUTAZIONE DEL PROFILO GENETICO**

### **Prelievo di sangue**

Per lo studio dei polimorfismi genetici il sangue intero è stato prelevato in provette contenenti EDTA K2 come anticoagulante ed immediatamente posto a 4°C dopo il prelievo. I campioni di sangue intero sono stati conservati a -20°C fino al momento del loro utilizzo.

### **Estrazione di DNA genomico da sangue periferico**

Il DNA genomico è stato estratto da sangue venoso periferico prelevato in EDTA mediante Kit FlexiGene (QIAGEN) in accordo alle istruzioni fornite dalla ditta.

#### **PROTOCOLLO:**

1. Mettere 3 ml di sangue intero in una Falcon da 15 ml e aggiungere 7,5 ml di Buffer FG1. Mescolare per inversione 5 volte.
2. Centrifugare per 5 minuti a 2000xg a temperatura ambiente.
3. Eliminare il sopranatante e lasciare la provetta capovolta per 2 minuti su carta assorbente facendo attenzione a far rimanere il pellet adeso alla parete.
4. Aggiungere 1,5 ml di Buffer FG2/QIAGEN Proteasi (1,5 ml di Buffer FG2 + 15µl di QIAGEN Proteasi) e agitare immediatamente fino a che il pellet non sia completamente omogeneizzato.
5. Invertire la provetta per 3 volte e incubare a 65°C per 10 minuti in un bagnetto termostato.
6. Aggiungere 1,5 ml di isopropanolo (100%) e mescolare per inversione almeno 20 volte fino a che il DNA non diventa visibile come un filamento.
7. Centrifugare il campione per 3' a 2000xg.
8. Eliminare il sopranatante e invertire rapidamente la provetta su carta assorbente.
9. Aggiungere 1,5 ml di etanolo al 70% e agitare per 5".

10. Centrifugare per 3' a 2000xg.
11. Eliminare il sopranatante e lasciare la provetta capovolta per almeno 5' su carta assorbente.
12. Essiccare il pellet per 15' fino a far evaporare tutto il liquido.
13. Aggiungere 1 ml di Buffer FG3, agitare per 5'' a bassa velocità e dissolvere il DNA incubando per 1 h a 65°C in un bagnetto termostato.
14. Centrifugare per 1' a 2000xg.
15. Trasferire il DNA risospeso nel buffer FG3 dalla Falcon in un conetto (Eppendorf) da 1,5 ml per conservarlo.
16. Preparare un conetto con 5 µl di DNA e 3 µl di BPB (blu di bromofenolo) per la corsa elettroforetica su gel di agarosio 0,8%.
17. Su un aliquota di 2 µl del DNA estratto viene misurata la densità ottica a 260nm e 280nm per calcolare la concentrazione di DNA e il rapporto DNA/proteine (Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer).

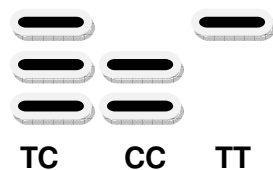
#### **ANALISI DEL POLIMORFISMO eNOS-786 T>C**

La valutazione del polimorfismo eNOS -786 T>C è stata effettuata mediante analisi PCR-RFLP utilizzando la seguente coppia di oligonucleotidi: 5'-GCC CAG CAA GAA TGT AGT GAC-3 (primer senso) e 5'-GGT GTA CCC CAC GTG CAT TCT-3'(primer antisenso). 100 ng di DNA genomico sono stati amplificati con 10 pmol di ciascuna coppia di oligonucleotidi, 0,2 mM di ciascuno dei 4 deossinucleotidi trifosfati, 4 µl di 5x colorless PCR buffer (Promega Italia S.r.l., Italia), 0,5 U di Taq polimerasi (GoTaq polymerase, Promega Italia S.r.l., Italia) per un volume finale di 20 µl. Le miscele di reazione sono state incubate in un DNA thermo-cycler (MJ Research, Inc), utilizzando le seguenti condizioni di amplificazione: un'incubazione a 95°C per 5 min, seguita da 35 cicli ciascuno caratterizzato dalla presenza di uno step a 94 °C per 1 min, uno step a 60 °C per 1 min e uno step a 72 °C per 1 min, seguiti da una reazione finale a 72 °C

per 7 min. Per controllare la resa della reazione, si effettua una corsa elettroforetica degli amplificati su gel di agarosio 2%.

I frammenti, una volta amplificati, sono stati sottoposti a digestione con enzima di restrizione NaeI (Promega Italia S.r.l., Italia). In un volume finale di 20µl, 5 µl di amplificato sono stati digeriti in presenza di 2 µl di buffer 10x, 0,2 µl di BSA e 1U di enzima NaeI che ha come sito di riconoscimento la sequenza 5'-GCC/GGC-3'. I campioni sono stati incubati a 37 °C per 4 ore. Dopo digestione con l'enzima NaeI, 10µl di prodotto sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2%. A seconda del genotipo del soggetto analizzato sarà possibile visualizzare i seguenti frammenti:

#### **DISPOSIZIONE DELLE BANDE SUL GEL**



Nel caso del genotipo omozigote per l'allele T si può visualizzare la presenza di una singola banda di 306 bp mentre per il genotipo eterozigote TC si osservano 3 bande (306bp+225bp+81bp). In presenza del genotipo CC si osservano invece 2 bande di 225bp e 81bp.

#### **ANALISI DEL POLIMORFISMO 4a/4b del gene eNOS**

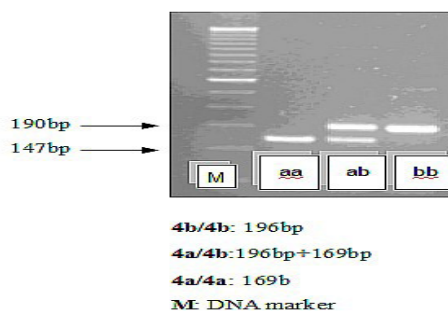
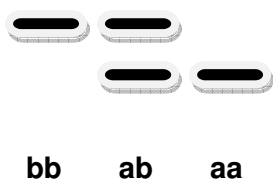
La valutazione del polimorfismo eNOS 4a/4b è stata effettuata mediante analisi PCR utilizzando la seguente coppia di oligonucleotidi:

- 5'-CTATGGTAGTGCCTTGGCTGGAGG-3', (primer senso)
- 5'-ACCGCCAGGGAACTCCGCT-3' (primer antisenso)

100ng di DNA genomico sono stati amplificati con 4 pmol di ciascuna coppia di oligonucleotidi, 0,2 mM di ciascuno dei 4 deossinucleotidi trifosfati , 2 µl di 5x colorless

PCR buffer (Promega Italia S.r.l., Italia), 0,5 U di Taq polimerasi (GoTaq polymerase Promega Italia S.r.l., Italia) per un volume finale di 20  $\mu$ l. Le miscele di reazione sono state incubate in un DNA thermo-cycler (MJ Research, Inc.), utilizzando le seguenti condizioni di amplificazione: incubazione a 95 °C per 5 minuti, seguita da 35 cicli ciascuno caratterizzato dalla presenza di uno step a 94 °C per 1 minuto, uno step a 58 °C per 45 secondi e uno step a 72°C per 45 secondi seguiti da una reazione finale a 72°C per 5 minuti. E' stata poi effettuata una corsa elettroforetica degli amplificati su un gel di agarosio al 3,5%. Nel caso del genotipo omozigote per l'allele raro 4a si può osservare la presenza di una singola banda di 183 bp mentre per il genotipo eterozigote si ottengono 2 bande (183bp + 210bp). In presenza di un genotipo omozigote wild type 4b si osserva una singola banda di ampiezza di 210 bp.

#### SCHEMA DI DISPOSIZIONE DELLE BANDE SUL GEL



#### ANALISI DEL POLIMORFISMO ACE I/D

La valutazione del polimorfismo ACE I/D è stata effettuata mediante analisi PCR utilizzando la seguente coppia di oligonucleotidi: 5'-CTG GAG AGC CAC TCC CAT CCT TTC T-3,(primer senso) e 5'-GA(Y) GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T-



3'(primer antisenso). 100ng di DNA genomico sono stati amplificati con 10 pmol di ciascuna coppia di oligonucleotidi, 0,2mM di ciascuno dei 4 deossinucleotidi trifosfati, 3 µl di 5x color PCR buffer (Promega Italia S.r.l., Italia), 0,5 U di Taq polimerasi (GoTaq polymerase Promega Italia S.r.l., Italia) per un volume finale di 15 µl. Le miscele di reazione sono state incubate in un DNA thermo-cycler (MJ Research, Inc), utilizzando le seguenti condizioni di amplificazione in modalità step-down per evitare condizioni di mistyping:

1. 95°C per 5 min	} x4 cicli	11. 94°C per 1 min	} x 24 cicli
2. 94°C per 1 min		12. 60 °C per 1 min ,5 sec	
3. 70 °C per 1 min		13. 72°C per 1 min	
4. 72°C per 1 min			
5. 94°C per 1 min	} x 4 cicli	14. 72 °C per 7 min	
6. 65°C per 1 min		15. 4°C per 15 min	
7. 72°C per 1 min			
8. 94°C per 1 min	} x 4 cicli		
9. 60°C per 1 min			
10.72°C per 1 min			

E' stata poi effettuata una corsa elettroforetica degli amplificati su un gel di agarosio al 1,2%. Nel caso del genotipo omozigote per l'allele I si può osservare la presenza di una singola banda di 480bp mentre in presenza del genotipo eterozigote ID è possibile visualizzare 2 bande (480bp + 193bp). Nel genotipo omozigote DD si osserva una singola banda di ampiezza di 193bp.

#### DISPOSIZIONE DELLE BANDE SUL GEL



#### DETERMINAZIONE DEI POLIMORFISMI eNOS 894 G>T, AGTR1 1166 A>C, AGT M235T

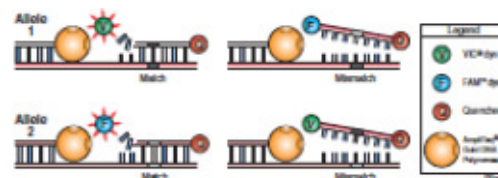
Per la determinazione di questi tre polimorfismi è stata utilizzata la tecnologia TaqMan (APPLIED BIOSYSTEMS). Tale metodica prevede l'utilizzo di una sonda

oligonucleotidica marcata in fluorescenza per la discriminazione genotipica. Tale sonda è caratterizzata dalla presenza di un fluoroforo reporter all'estremità 5' ed un quencher all'estremità 3' con una diversa lunghezza d'onda di emissione. La vicinanza del quencher è in grado di attenuare la fluorescenza emessa dal reporter attraverso il trasferimento di energia per risonanza (FRET, fluorescence resonance Energy transfer). Quando la sonda allele-specifica si lega alla sequenza target durante la fase di amplificazione in PCR viene degradata dalla attività esonucleasica 5'→3' della Taq DNA polimerasi (Applied Biosystem hot-start). Tale degradazione (Fig.21):

-determina la separazione del reporter dal quencher con il conseguente aumento del segnale di fluorescenza emesso dal reporter;

-permette l'estensione del primer di PCR fino alla fine del filamento stampo con conseguente proseguimento della reazione di amplificazione.

L'intensità della fluorescenza emessa è proporzionale alla quantità di ampliconi.



**Figura 21:** Rappresentazione del meccanismo con cui le sonde fluorofore si legano ai filamenti del DNA nella PCR in real time.

**Procedura di genotipizzazione:**

Prima di avviare la procedura di genotipizzazione si dispensa in una piastra multipozzetto da 96 campioni il DNA (3ng/μl), che è stato estratto mediante la metodica precedentemente descritta. La reazione di amplificazione in PCR prevede l'allestimento di una mix contenente: 5 μl di Master Mix SSoFast Probes Supermix with ROX(Bio-Rad) 2x e 0,5 μl di Taqman Genotyping Assay 20x. Per la determinazione dei

polimorfismi eNOS 894G>T, AGTR1 1166A>C e AGT M235T sono stati utilizzati i sequenti assay:

1. NOS3-C\_\_\_\_3219460\_20

2. AGTR1-C\_\_\_3187716\_10

3. AGT-C\_\_\_\_\_1985481\_20

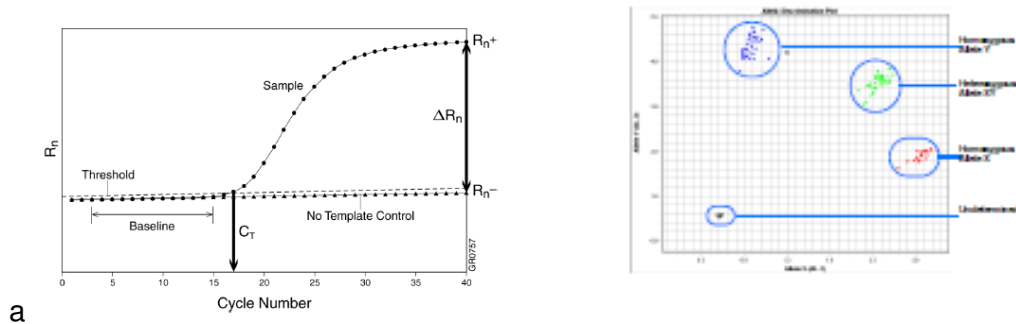
La mix di reazione (5,5 µl) viene dispensata all'interno di una piastra Micro Amp (Fast-Optical 96 well) tramite un supporto automatizzato; successivamente vengono aggiunti e 4,5 µl di DNA genomico (3ng/µl) (Biomek Fx Workstation, Beckman Coulter Inc.). La genotipizzazione è effettuata utilizzando lo strumento real-time Applied Biosystems 7900HT. La reazione prevede le seguenti condizioni di amplificazione:

-95°C →20 secondi

-95°C→0,03 secondi	}	40 cicli
-60°C→ 0,20 secondi		

Per la discriminazione allelica viene usato il software SDS 7900HT tramite il quale possiamo programmare la posizione dei campioni nella piastra, le sonde utilizzate e le condizioni di amplificazione in PCR. Viene effettuata una pre-lettura per registrare la fluorescenza di base. Il software permette di visualizzare il segnale di fluorescenza durante la reazione di amplificazione. Al termine della fase di amplificazione viene nuovamente registrata la fluorescenza all'interno di ciascun pozzetto. Per la valutazione della fluorescenza correlata alla sola reazione di amplificazione, alla fluorescenza registrata al termine della reazione di amplificazione viene sottratta la fluorescenza di base. I risultati sono visualizzati in un grafico a dispersione (allelic discrimination plot), in cui sull'asse delle ascisse è riportata l'intensità di fluorescenza emessa dalla sonda specifica per un allele, mentre sull'asse delle ordinate è riportata l'intensità di fluorescenza emessa dalla sonda specifica per l'altro allele. All'interno del

grafico è quindi possibile individuare 3 diversi cluster, corrispondenti ai diversi genotipi (Fig.22).



**Figura 22:** a) Curva che rappresenta l'amplificazione di ciascun campione nel processo di PCR b) Divisione in cluster dei polimorfismi nel saggio di discriminazione allelica

## 7.6 ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata effettuata mediante l'impiego del programma SPSS (Chicago, USA) per Windows (versione 11.5, Copyright c SPSS Inc). Le variabili continue sono state espresse come media  $\pm$  Deviazione Standard (DS) oppure come mediana (range), e per il confronto dei valori tra i singoli gruppi sono stati usati i test non parametrici Mann-Whitney (confronto fra due gruppi) o Kruskal-Wallis (confronto fra più di due gruppi). La variabili categoriche sono state espresse come percentuali. La frequenza allelica e la distribuzione genotipica sono state ottenute per conta diretta dei geni. L'equilibrio di Hardy-Weinberg per la valutazione della distribuzione genotipica è stato valutato mediante il test  $\chi^2$ .

Il test  $\chi^2$  è stato utilizzato inoltre per la valutazione delle differenze nella distribuzione dei genotipi e nella frequenza allelica tra i singoli gruppi di analisi.

Nell'analisi di regressione logistica è stato determinato il valore di OR (Odds Ratio) con l'intervallo di confidenza (IC) del 95%, ed è stata attribuita una significatività statistica ad un valore di  $p < 0,05$ .

L'analisi di regressione logistica è stata inoltre eseguita per valutare l'associazione delle singole varianti polimorfiche all'interno dei geni presi in esame con la suscettibilità alla malattia.

Nelle analisi del profilo genetico stati considerati due diversi modelli di segregazione: il modello dominante ed il modello recessivo. Il modello dominante consiste nel comparare soggetti con uno o piu' alleli polimorfici con un gruppo base non portatore dell'allele polimorfico cioè soggetti omo- ed eterozigoti per la variante di interesse rispetto agli omozigoti per la variante wild-type (i.e. *eNOS* -786CC+TC vs. -786TT). Il modello recessivo consiste nel comparare soggetti omozigoti per la variante di interesse con i soggetti eterozigoti ed omozigoti per la variante wild-type (i.e. *eNOS* -786CC vs.-786TC+TT).

Età, sesso, diabete, ipertensione, abitudine al fumo e parametri noti influenzare le variabili emoreologiche quali fibrinogeno, colesterolo, HDL ed LDL sono stati inclusi nell'analisi di regressione logistica multivariata.

## 7.7 RISULTATI

### MALATTIA ARTERIOSA PERIFERICA (PAD)

#### Gruppo A

#### Analisi del profilo emoreologico

Nella **Tabella 1** sono riportate le caratteristiche demografiche e cliniche della popolazione in esame. Sono stati analizzati i classici fattori di rischio predisponenti alla malattia come ipertensione, dislipidemia, fumo e diabete la cui prevalenza è risultata significativamente più alta nei pazienti. Il profilo emoreologico ha messo in evidenza valori di viscosità plasmatica ( $P < 0,001$ ) e di deformabilità eritrocitaria ( $P = 0,009$ ) (test di Mann Whitney) significativamente diversi (**Tabella 2**). Tra le variabili ematologiche il fibrinogeno ( $P < 0,001$ ), i trigliceridi ( $P < 0,001$ ) ed i globuli bianchi ( $P < 0,001$ ) sono risultati significativamente più alti nei pazienti, mentre i livelli di colesterolo HDL ( $P < 0,001$ ) sono risultati più bassi. Per valutare il ruolo dei parametri emoreologici sul rischio della malattia, abbiamo effettuato un'analisi di regressione logistica in relazione a differenti terzili di distribuzione delle variabili: viscosità plasmatica [1° terzile  $> 1,30$ , 2° terzile  $1,31-1,38$ , 3° terzile  $> 1,39$ ] e deformabilità eritrocitaria [1° terzile  $< 6,86$ , 2° terzile  $6,87-10,16$ , 3° terzile  $> 10,17$ ]. Un alterato profilo emoreologico in particolare elevati livelli di viscosità plasmatica e ridotti livelli di deformabilità eritrocitaria modulavano significativamente il rischio di malattia : viscosità plasmatica [2° terzile: OR 3,61, 95%CI (1,32-9,86);  $p = 0,01$ ; 3° terzile: OR 12,08, 95%CI 4,88-29,88;  $p < 0,001$ ] e deformabilità eritrocitaria [2° terzile: OR 0,47, 95% CI 0,25-0,89;  $p = 0,02$ ]; 3° terzile: OR 0,49, 95%CI 0,26-0,93;  $p = 0,03$ ] (**Tabella 3**). L'analisi multivariata dopo correzione per età, genere, ipertensione, diabete ed abitudine al fumo (modello 1) ha confermato il ruolo della viscosità plasmatica quale predittore di malattia nei più alti terzili di distribuzione [OR 4,81, 95%CI 1,61-14,37;  $p < 0,001$ ; OR 13,53, 95%CI 5,04-36,33;  $p < 0,005$  per il secondo e terzo terzile rispettivamente]. L'indice di deformabilità

eritrocitaria si confermava marcatore indipendente solo nel 2°terzile (**Figura 1**). Inoltre introducendo nell'analisi di correzione le variabili bio-umorali come fibrinogeno, trigliceridi e colesterolo HDL (modello 2) la viscosità plasmatica rimaneva associata alla malattia arteriosa periferica [OR 5,50 95%CI (1,75-17,25) P=0,003; OR 12,25, 95%CI (4,39-34,14); p<0,001] per il secondo e terzo terzile mentre per la deformabilità abbiamo osservato un trend di associazione (**Figura 2**). Infine abbiamo fatto un'analisi di correlazione tra i parametri emoreologici ed le variabili ematologiche che possono alterare il loro valore (test di Spearman) nei pazienti con PAD: (**Tabella 4**).

Questi dati sono stati oggetto del lavoro “**Alterazioni di parametri emoreologici in pazienti con malattia arteriosa periferica**” Ricci I, Sofi F, Alessandrello Liotta A, Fedi S, Macchi C, Pratesi G, Pulli R, Pratesi C, Abbate R and Mannini L, attualmente sottoposto ad una rivista internazionale (European Journal Vascular and Endovascular Surgery).

**Tabella 1** Caratteristiche demografiche e cliniche della popolazione di studio

Variabile	Pazienti PAD (n=90)	Valori di riferimento(n=180)	P
<i>Caratteristiche demografiche</i>			
Età(anni)*	73(31-87)	70(35-89)	0,24
Sesso n	70/20	140/40	1,0
<i>Caratteristiche Cliniche</i>			
Ipertensione n,%	34(37,8)	28(15,6)	<0,001
Dislipidemia n,%	29(32,2)	40(22,2)	0,07
Abitudine al fumo n,%	38(42,2)	26(14,4)	<0,001
Diabete n,%	16(17,8)	10(5,6)	0,001
*mediana e range			

**Tabella 2** Parametri emoreologici e di laboratorio

Variabili *	Pazienti PAD (n=90)	Valori di riferimento (n=180)	P
<b>V.ematica</b> a 0,512 sec-1 shear rate ,mPa.s native	21,80(10,60-38,67)	22,57(18,00-38,79)	0,06
<b>V.ematica</b> a 94,50 sec-1 shear rate ,mPa.s native	4,42(2,90-5,90)	4,3 (3,94-6,00)	0,76
<b>V.plasmatica</b> a 94,50 sec-1 shear rate ,mPa.s	1,45(1,27-2,00)	1,32(1,24-1,61)	<0,001
<b>Indice di deformabilità eritrocitaria(%)</b>	7,00(1,50-17,40)	8,71(1,76-13,21)	<b>0,009</b>
<b>Aggregazione eritrocitaria</b>	2,90(1,2-6,0)	-	-
<b>Ematocrito(%)</b>	42,0(31,3-52,8)	41,8(36,9-50,3)	0,44
<b>Globuli bianchi(10<sup>9</sup>/L)</b>	6,73(2,93-14,10)	5,92(3,66-11,19)	<0,001
<b>Fibrinogeno(mg/dl)</b>	416(255-666)	351(241-535)	<0,001
<b>Trigliceridi(mg/dl)</b>	132(48-426)	92(18-526)	<0,001
<b>Colesterolo totale(mg/dl)</b>	190(131-316)	200(101-302)	0,15
<b>Colesterolo HDL(mg/dl)</b>	44(20-100)	61(31-106)	<0,001
<b>Colesterolo LDL (mg/dl)</b>	113(46-211)	121(37-234)	0,19

\*mediana e range

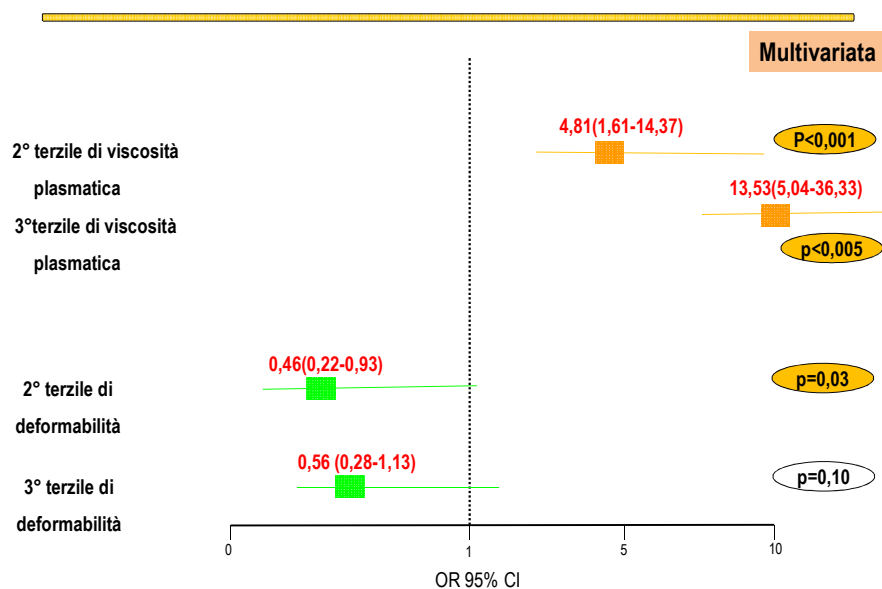
**Tabella 3** Regressione binaria logistica dei parametri emoreologici dei pazienti PAD

Variabili*	OR(95%CI )	P
<b>Viscosità Plasmatica</b>		
2°terzile	3,61(1,32-9,86)	<b>0,01</b>
3°terzile	12,08(4,88-29,88)	<0,001
<b>Deformabilità</b>		
2°terzile	0,47(0,25-0,89)	<b>0,02</b>
3°terzile	0,49(0,26-0,93)	<b>0,03</b>

\*mediana(range)

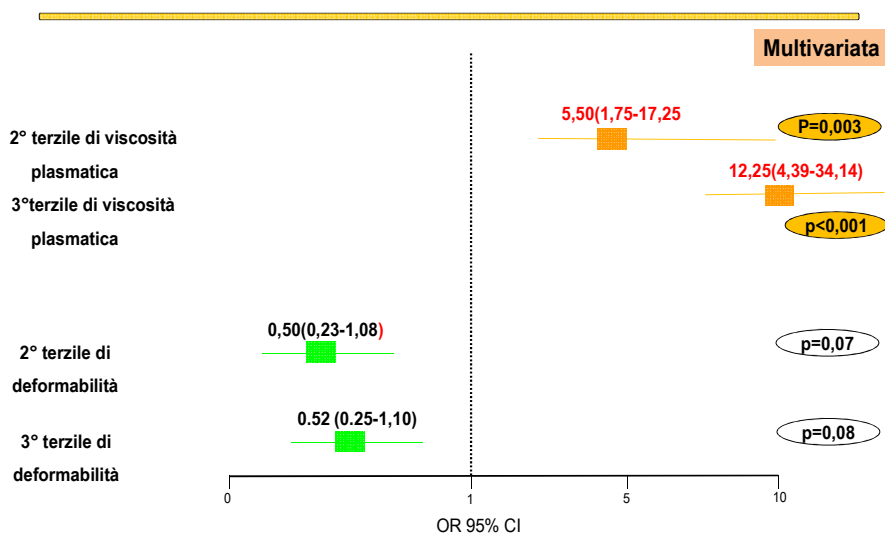


**Figura 1** Analisi di regressione multinominale logistica per i più alti terzili delle variabili emoreologiche in PAD (Modello 1\*)



\*i parametri sono stati corretti per età, sesso, diabete, fumo, ipertensione

**Figura 2** Analisi di regressione multinominale logistica per i più alti terzili delle variabili emoreologiche in PAD (Modello 2\*\*)



\*\*I parametri sono stati corretti oltre che per le variabili del modello 1 anche per fibrinogeno, trigliceridi ed HDL

**Tabella 4 : Correlazioni tra parametri emoreologici ed ematologici**

Variabili*	Emoglobina	Ematocrito	Trigliceridi	Colesterolo	LDL
Viscosità ematica 0,512 s <sup>-1</sup> shear rate nativa	R=0,70 P <sup>a</sup> =<0,001	R=0,70 P <sup>a</sup> <0,001	R=0,11 P <sup>a</sup> =0,30	R=0,14 P <sup>a</sup> =0,20	R= 0,17 P <sup>a</sup> = 0,13
Viscosità ematica 94,50 s <sup>-1</sup> shear rate nativa	R=0,87 P <sup>a</sup> <0,001	R=0,86 P <sup>a</sup> <0,001	R=0,29 P <sup>a</sup> =0,007	R=0,27 P <sup>a</sup> =0,01	R=0,27 P <sup>a</sup> =0,01

a = Correlazione di Spearmann

Variabili*	Fibrinogeno	LDL	Trigliceridi	Globuli bianchi
Viscosità plasmatica	R=0,53 P <sup>a</sup> <0,001	R= -0,17 P <sup>a</sup> =0,12	R=0,18 P <sup>a</sup> =0,08	R=0,26 P <sup>a</sup> =0,01
Aggregazione eritrocitaria	R=0,19 P <sup>a</sup> =0,06	R= -0,20 P <sup>a</sup> =0,07	R=0,32 P <sup>a</sup> =0,003	R=-0,58P <sup>a</sup> =0,61

a =Correlazione di Spearmann

Variabili*	Colesterolo	MCV	MCH	MCHC
Indice di deformabilità	R=0,01P <sup>a</sup> =0,88	R=0,23 P <sup>a</sup> =0,03	R=0,23 P <sup>a</sup> =0,03	R=0,03 P <sup>a</sup> =0,78

a = Correlazione di Spearmann

### **Analisi del profilo genetico**

Nei pazienti con arteriopatia periferica sono stati analizzati i polimorfismi nel gene eNOS e nei geni candidati del RAS : *eNOS -786 T>C*, *eNOS 4a/4b*, *eNOS 894 G>T*, *ACE I/D*, *AGTR1 1166 A>C*, *AGT M235T*. La distribuzione dei genotipi e la frequenza allelica dei polimorfismi analizzati erano in equilibrio di Hardy-Weinberg. Nella **Tabella 5** sono riportate le distribuzioni dei genotipi e la frequenza allelica di ciascun

polimorfismo esaminato sia dei pazienti che dei controlli. I nostri risultati hanno evidenziato una differenza statisticamente significativa tra pazienti e controlli sia nella distribuzione dei genotipi che nella frequenza allelica per il polimorfismo *eNOS 894 G>T* e *AGTR1 1166 A>C* mentre per il polimorfismo *I/D* del gene *ACE* un trend di significatività solo nella distribuzione genotipica (**Tabella 5**). Nei pazienti abbiamo indagato il ruolo dei marcatori genetici nel gene *eNOS* e nei geni del RAS nel modulare il profilo emoreologico. In coloro che erano portatori dell'omozigosi per l'allele C del polimorfismo *eNOS -786 T>C* sono stati osservati più elevati livelli di viscosità ematica a 0,512 shear rate [Mediana(range):TT=20,40 (10,60-38,67), TC=21,80 (12,50-37,20) CC=22,93 (18,60-30,90) P=0,49]. Nella **Figura 3** sono riportati i valori relativi alla deformabilità ed alla aggregazione eritrocitaria in relazione al polimorfismo *eNOS -786 T>C*. La presenza dell'allele C analizzato sia con il modello dominante che con quello recessivo si associava ad una ridotta deformabilità eritrocitaria. Questo effetto non è stato osservato relativamente all'aggregazione eritrocitaria. Per quanto riguarda il polimorfismo *eNOS 894 G>T* la presenza dell'allele T modulava sia la viscosità ematica a 0,512 shear rate nativa [Mediana(range): GG= 19,90 (10,60-38,67), GT=22,65 (12,50-37,20), TT=22,36 (18,60-33,90) P=0,17], che l'aggregazione eritrocitaria [Mediana(range): GG=3,10 (1,2-6,0), GT=2,75 (1,2-5,0), TT=3,45 (2,1-5,0) P=0,25] ma non la deformabilità eritrocitaria [Mediana(range): GG=5,0 (1,70-17,10), GT=9,30 (1,50-17,40), TT=5,80 (1,70-15,10)]. Il polimorfismo *eNOS 4a/4b* non modulava i parametri emoreologici in entrambi i modelli di segregazione. Abbiamo inoltre valutato il ruolo dei polimorfismi del RAS su tali variabili. Nei pazienti portatori dell'allele D del gene *ACE I/D* abbiamo osservato una ridotta deformabilità eritrocitaria [Mediana (range): II=10,00(1,80-17,40), ID=4,60(1,50-17,10), DD=7,05(1,70-15,90) P=0,18] (**Figura 4**). Tale allele non sembrava influenzare le altre variabili analizzate. Relativamente al polimorfismo *1166 A>C* del recettore *AGTR1* i pazienti portatori della variante rara C avevano livelli significativamente più alti di viscosità plasmatica [Mediana(range): AC+ CC= 1,46(1,27-2,00), AA=1,41(1,27-1,71 (P=0,005)]. Inoltre la

presenza in omozigosi di tale variante si associava ad una riduzione della deformabilità eritrocitaria [ AC + CC =5,45(1,60-17,40) AA=6,25 (1,50-15,60) P=0,92]. Per il polimorfismo *AGT M235T* abbiamo osservato come il genotipo omozigote TT si associasse significativamente ad elevati livelli di viscosità plasmatica [Mediana(range) TT=1,51(1,32-2,00) MM+MT=1,44(1,27-1,73)P=0,03].

Per quanto riguarda gli altri parametri emoreologici nei pazienti omozigoti TT abbiamo osservato più elevati livelli di viscosità ematica (V.E.) sia alle basse che alle medio alte shear rate [Mediana(range): V.E.0,512 TT=23,40(10,60-38,67); MM+MT=21,60(14,30-32,60) P=0,61 ; V.E. 94,50 TT=5,10(2,90-5,90) MM +MT =4,30(3,30-5,90) P=0,24, di aggregabilità eritrocitaria [TT=3,30(1,9-4,4) MM+MT=2,8(1,2-5,0) P=0,22 e ridotti livelli di deformabilità eritrocitaria [TT=2,83(1,70-15,10) MM=7,05(1,50-17,40)P=0,20], anche se tali dati non raggiungevano la significatività statistica.

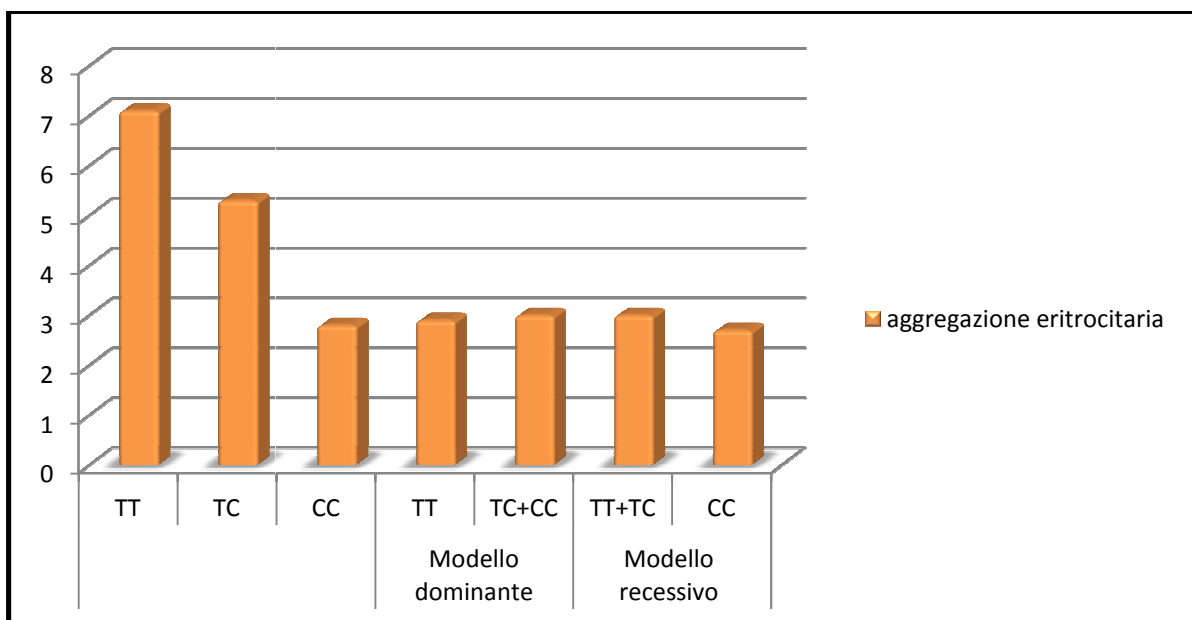
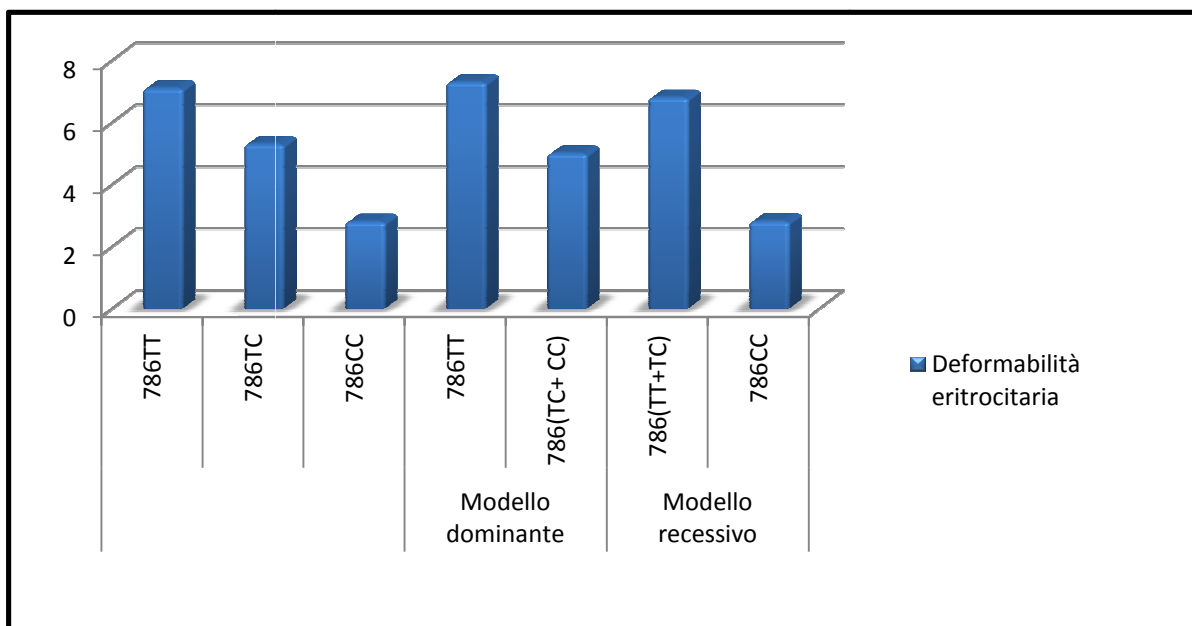
E' stato inoltre valutato il peso del carico allelico relativo ai 6 polimorfismi analizzati sulla modulazione dei parametri emoreologici dopo divisione per terzili della loro distribuzione: [1° terzile 0-3 alleli (40 pazienti), 2° terzile 4-5 alleli (10 pazienti) , 3° terzile 6-8 alleli (22 pazienti)] : Abbiamo osservato una progressiva diminuzione dei valori di deformabilità eritrocitaria dal 1° al 3° terzile di distribuzione del carico allelico [1°terzile=7,00(4,33-9,35), 2°terzile=3,65(1,78-9,23), 3°terzile=3,41(2,00-8,50)P=0,59]. Inoltre nei pazienti portatori di oltre 5 alleli sfavorevoli si osservavano ridotti valori di deformabilità eritrocitaria anche se non statisticamente significativi [0-5=7,00(4,33-9,35) 6-8=3,41(1,93-8,83)P=0,31]. **(Figura 5)**

**Tabella 4** Distribuzione del genotipo e frequenza allelica dei polimorfismi *eNOS* e dei geni del RAS nei pazienti PAD (n=90).

Polimorfismi,genotipo o allele	Pazienti PAD	controlli	P	Polimorfismi,genotipo o allele	Pazienti PAD	Controlli	P
<b><i>eNOS -786 TC</i></b>				<b><i>ACE I/D</i></b>			
(CC)	8(9,6)	29(16,1)		(DD)	24(30,0)	47(26,1)	
(TC)	46(55,4)	95(52,8)	0,36	(ID)	46(58,2)	93(51,7)	<b>0,08</b>
(TT)	29(35,0)	56(31,1)		(II)	9(10,8)	40(22,2)	
(C)	0,37	0,42	0,29	(D)	0,59	0,51	0,13
<b><i>eNOS VNTR 4a/4b</i></b>				<b><i>AGTR1 A/C</i></b>			
(aa)	1(1,2)	5(2,8)		(AA)	33(42,3)	93(51,7)	
(ab)	30(36,1)	47(26,1)	0,20	(AC)	30(38,5)	77(42,8)	<b>0,002</b>
(bb)	52(62,7)	128(71,1)		(CC)	15(19,2)	10(5,6)	
(a)	0,19	0,31	0,38	(C)	0,39	0,26	<b>0,01</b>
<b><i>eNOS 894 GT</i></b>				<b><i>AGTM235T</i></b>			
(TT)	45(54,9)	69(38,3)		(MM)	26(33,0)	57(31,7)	
(TC)	30(36,6)	84(46,7)	<b>0,03</b>	(MT)	40(50,6)	97(53,9)	0,86
(GG)	7(8,5)	27(15,0)		(TT)	13(16,4)	26(14,4)	
(T)	0,27	0,38	<b>0,01</b>	(T)	0,42	0,41	0,99

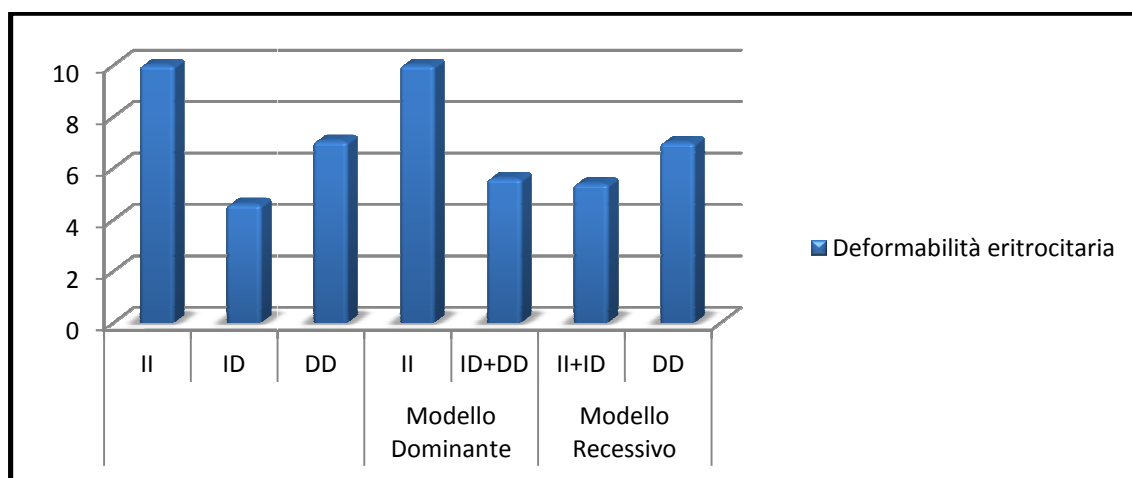
**Figura 3** Deformabilità ed aggregazione eritrocitaria in relazione al polimorfismo eNOS

786T>C

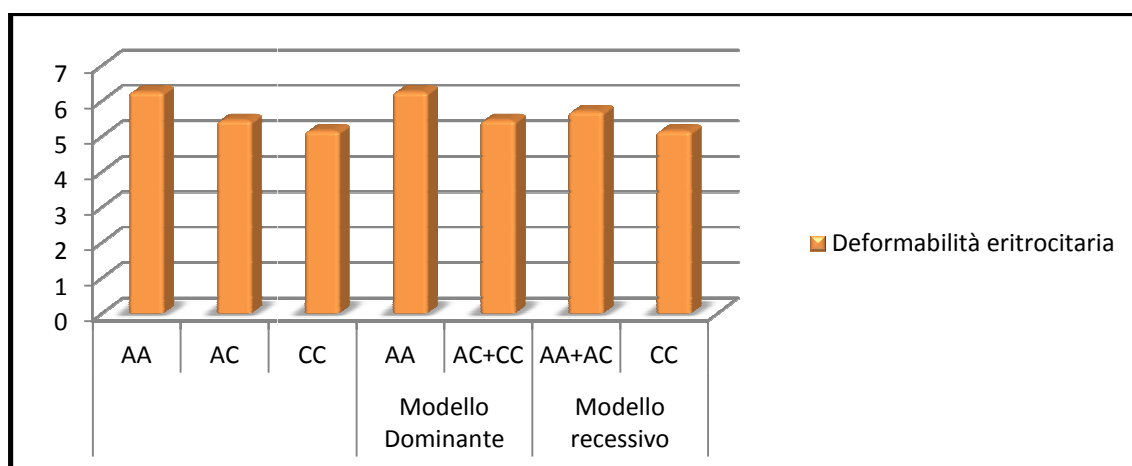


**Figura 4** Deformabilità eritrocitaria in relazione ai polimorfismi del sistema renina angiotensina

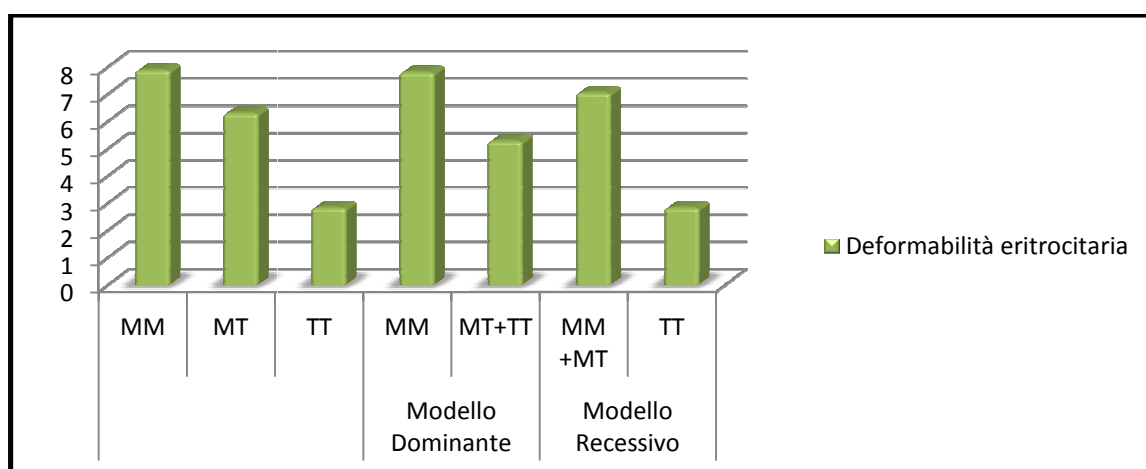
a) Polimorfismo ACE I/D



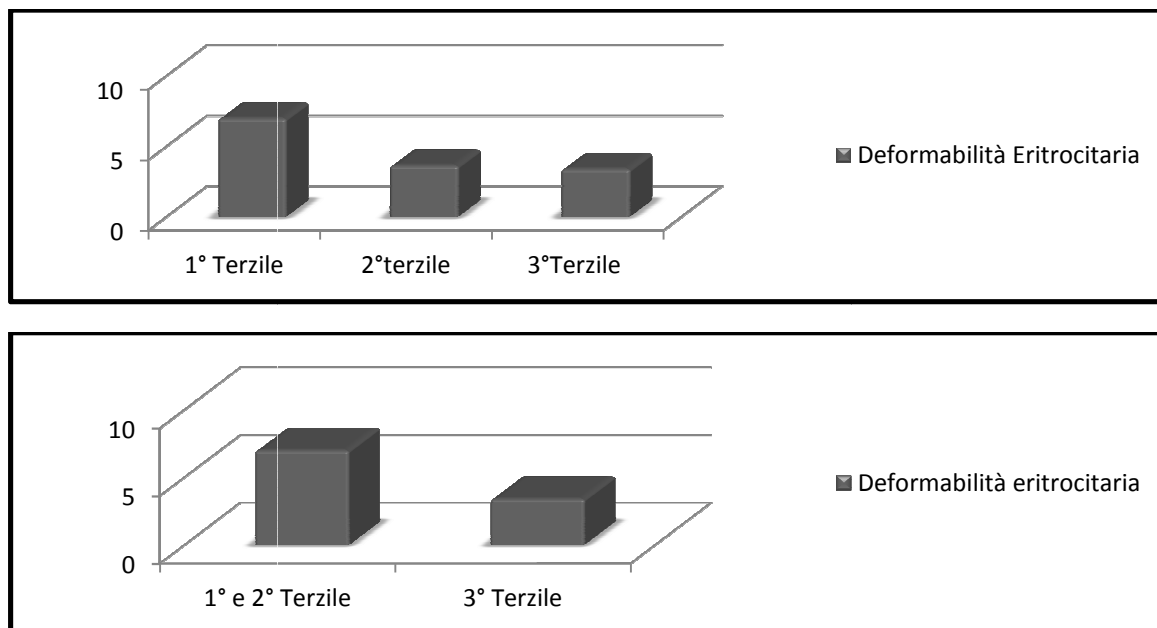
b) Polimorfismo del recettore AGTR1



c) Polimorfismo M235T



**Figura 5** Deformabilità eritrocitaria in accordo ai terzili di distribuzione del carico allelico



### Valutazione della deformabilità ed aggregazione eritrocitaria con la metodica

#### L.O.R.C.A.

La deformabilità e l'aggregazione eritrocitaria sono stati valutati anche con la metodica L.O.R.C.A. in 102 pazienti con arteriopatia periferica.

#### Analisi del profilo emoreologico

Nella **Tabella 6** sono state riportate le caratteristiche, emoreologiche ed ematologiche della popolazione esaminata. In particolare, la viscosità ematica a  $94,50 \text{ s}^{-1}$  corretta per ematocrito, la viscosità plasmatica, e gli indici di aggregazione (AI) e disaggregazione eritrocitaria ( $\gamma_{thr}$ ) risultavano significativamente più elevati nei pazienti mentre gli indici di deformabilità eritrocitaria a 0,3 Pa, 3 e 30 Pa per ambedue ed il tempo medio di aggregazione (T/2) avevano valori significativamente più bassi (**Tabella 6**). Nelle variabili ematologiche si osservava una differenza significativa tra pazienti e controlli relativamente ai livelli di Fibrinogeno ( $P < 0,001$ ), Trigliceridi, ( $P < 0,001$ ), LDL ( $P < 0,001$ ) ed HDL ( $P < 0,001$ ).



**Tabella 6: Variabili emoreologiche ed ematologiche della popolazione PAD**

Variabili	PAD (n=102)	Valori di riferimento ( n=67)	P
<i>Variabili emoreologiche</i>			
V.ematica a 0.512 s <sup>-1</sup> (mPa *s)	22,75(10,40-37,80)	24,90(16,80-40,30)	<b>0,002</b>
V.ematica a 0.512 s <sup>-1</sup> (mPa *s) (Corretto per l'ematocrito)	24,40(17,70-47,20)	23,85(17,30-36,20)	0,87
V.ematica a 94.5 s <sup>-1</sup> (mPa *s)	4,80(2,50-6,50)	4,60(3,70-6,10)	0,13
V.ematica a 94.5 s <sup>-1</sup> (mPa *s) (Corretto per Hct)	5,00(4,00-5,50)	4,50(3,60-6,30)	<b>&lt;0,001</b>
Viscosità plasmatica (mPa *s)	1,51(1,23-1,88)	1,43(1,29-2,00)	<b>&lt;0,001</b>
<i>Deformabilità eritrocitaria</i>			
EI 0,3 Pa	0,071(-0,027-0,201)	0,063(0,18-0,123)	<b>0,002</b>
EI 0,53 Pa	0,093(0,018-0,163)	0,089(0,038-0,133)	0,14
EI 3 Pa	0,335(0,251-0,414)	0,354(0,245-0,408)	<b>&lt;0,001</b>
EI 30 Pa	0,560(0,468-0,636)	0,586(0,355-0,626)	<b>&lt;0,001</b>
<i>Aggregazione eritrocitaria</i>			
AI	70,67(44,19-81,19)	63,09(42,96-74,98)	<b>&lt;0,001</b>
γthr	147,50(65,00-800,00)	100,00(60,00-232,00)	<b>&lt;0,001</b>
T/2	1,46(0,80-5,11)	2,14 (0,90-5,33)	<b>&lt;0,001</b>
<i>Variabili ematologiche</i>			
Ematocrito (%)	42,95(22,90-54,10)	43,20(34,70-50,00)	0,53
Emoglobina (g/L)	13,90(6,80-18,40)	14,30(11,70-16,60)	0,10
Fibrinogeno (mg/dl)	462,00(280,00-907,00)	339,50(233,00-520,00)	<b>&lt;0,001</b>
Colesterolo Totale (mg/dL)	192,00(75,00-288,00)	199,00(123,00-343,00)	0,22
Trigliceridi (mg/dL)	125,50(57,00-451,00)	80,00(33,00-303,00)	<b>&lt;0,001</b>
LDL (mg/dL)	49,00(25,00-201,00)	119,00(44,00-252,00)	<b>&lt;0,001</b>
HDL (mg/dL)	111,00(30,00-185,00)	57,00(33,00-114,00)	<b>&lt;0,001</b>

\* I valori sono espresso come mediana (range)

Per valutare il ruolo di questi parametri emoreologici sul rischio della malattia, abbiamo effettuato un'analisi di regressione logistica in relazione a differenti terzili di distribuzione delle variabili: viscosità ematica 0,512 s<sup>-1</sup> nativa(1°terzile <21,60,2°terzile 21,61-25,16,3°terzile>25,17), viscosità ematica 94,50 corretta per l'ematocrito(1°terzile <4,50,2°terzile 4,51-5,00,3°terzile>5,01), viscosità plasmatica (1° terzile <1,44<2°

terzile 1,45-1,52, 3°terzile >1,53), deformabilità eritrocitaria a 0,3 Pa (1°terzile <0,58, 2°terzile 0,59-0,078, 3°terzile >0,079), a 0,53 Pa (1°terzile <0,080 < 2°terzile 0,081-0,101, 3°terzile >0,102) a 3Pa (1°terzile <0,333 < 2°terzile 0,334-0,354, 3°terzile >0,354), indice di aggregazione (1°terzile <64,32, 2°terzile 64,33-69, 74,3°terzile >69,75) indice di disaggregazione (1°terzile <100, 2°terzile 101-153, 3°terzile >153,33) tempo medio di aggregazione (1°terzile <1,47, 2°terzile 1,48-2,09, 3°terzile >2,10). All'analisi univariata un alterato profilo emoreologico per tutte le variabili analizzate si associava significativamente al rischio di malattia (**Tabella 7**).

**Tabella 7: Regressione binaria logistica dei parametri emoreologici**

Variabili	OR(95%CI)	P
<b>Viscosità ematica</b>		
<b>a 0,512 shear rate nat.</b>		
2°terzile	0,59(0,26-1,32)	0,20
3°terzile	0,33(0,15-0,75)	<b>0,008</b>
<b>Viscosità ematica</b>		
<b>a 94,50 shear rate corr.</b>		
2°terzile	2,64(1,19-5,86)	0,17
3°terzile	14,64(5,04-42,51)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Viscosità Plasmatica</b>		
2°terzile	3,45(1,53-7,78)	<b>0,003</b>
3°terzile	10,42(3,84-28,25)	<b>&lt;0,001</b>
<b>EI(0,3 Pa)</b>		
2°terzile	0,60(0,27-1,34)	0,22
3°terzile	5,57(2,16-14,34)	<b>&lt;0,001</b>
<b>EI(3 Pa)</b>		
2°terzile	7,15(2,87-17,80)	<b>&lt;0,001</b>
3°terzile	2,10(0,94-4,68)	0,06
<b>EI(30 Pa)</b>		
2°terzile	8,93(3,49-22,85)	<b>&lt;0,001</b>
3°terzile	2,31(1,03-5,16)	<b>0,041</b>
<b>Indice di aggregazione(AI)</b>		
2°terzile	4,63(1,85-11,55)	<b>0,001</b>
3°terzile	104,44(21,31-511,72)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Indice di disaggregazione(<math>\gamma</math>thr)</b>		
2°terzile	29,80(8,08-109,93)	<b>&lt;0,001</b>
3°terzile	43,75(11,30-169,37)	<b>&lt;0,001</b>
<b>T/2</b>		
2°terzile	35,87(11,44-112,46)	<b>&lt;0,001</b>
3°terzile	8,36(3,23-21,59)	<b>&lt;0,001</b>

All'analisi multivariata dopo correzione per età, sesso, fibrinogeno, trigliceridi, solo l'aggregazione eritrocitaria si confermava associata alla malattia [OR=13,95 95% C.I. (1,52-127,47)P=0,02]. Infine abbiamo fatto un'analisi di correlazione (Test di Spearman) nei pazienti con PAD. (**Tabella 8**)

**Tabella 8 :Correlazioni tra parametri emoreologici ed ematologici**

Variabili	Emoglobina	Ematocrito	Trigliceridi	Colesterolo	LDL
Viscosità ematica 0,512 s <sup>-1</sup> shear rate nativa	R=0,58 P <sup>a</sup> <0,001	R=0,68 P <sup>a</sup> <0,001	R=0,17 P <sup>a</sup> =0,10	R=0,30 P <sup>a</sup> <0,004	R=0,14 P <sup>a</sup> =0,20
Viscosità ematica 94,50 s <sup>-1</sup> shear rate nativa	R=0,76 P <sup>a</sup> <0,001	R= 0,81 P <sup>a</sup> <0,001	R=0,76 P <sup>a</sup> <0,001	R=0,17 P <sup>a</sup> =0,11	R=0,09 P <sup>a</sup> =0,42

Variabili	Fibrinogeno	Globuli bianchi	trigliceridi	LDL
Viscosità plasmatica	R=0,44 P <sup>a</sup> <0,001	R=0,21 P <sup>a</sup> =0,04	R=-0,20 P <sup>a</sup> =0,85	R=-0,14 P <sup>a</sup> =0,19
Aggregazione Eritrocitaria	R=0,53 P <sup>a</sup> <0,001	R=0,37 P <sup>a</sup> <0,001	R=0,003 P <sup>a</sup> =0,97	R=-0,02 P <sup>a</sup> =0,84
Indice di disaggregazione(ythr)	R=0,54 P <sup>a</sup> <0,001	R=0,17 P <sup>a</sup> =0,13	R=-0,15 P <sup>a</sup> =0,90	R=-0,18 P <sup>a</sup> =0,12
Tempo medio di aggregazione	R=0,55P <sup>a</sup> <0,001	R=0,38 P <sup>a</sup> =0,001	R=0,01 P <sup>a</sup> =0,90	R=-0,18 P <sup>a</sup> =0,79

Variabili	Colesterolo	MCV	MCH	MCHC
Deformabilità eritrocitaria 0,3 Pa	R=0,08 P <sup>a</sup> =0,48	R=0,30 P <sup>a</sup> =0,006	R=0,15 P <sup>a</sup> =0,18	R=0,001 P <sup>a</sup> =0,99
Deformabilità eritrocitaria0,53 Pa	R=0,19 P <sup>a</sup> =0,09	R=0,19 P <sup>a</sup> =0,08	R=0,07 P <sup>a</sup> =0,52	R=0,06 P <sup>a</sup> =0,54
Deformabilità eritrocitaria3Pa	R=0,20 P <sup>a</sup> =0,07	R=0,14P <sup>a</sup> =0,20	R=0,18 P <sup>a</sup> =0,10	R=0,09 P <sup>a</sup> =0,39
Deformabilità eritrocitaria 30 Pa	R=0,09 P <sup>a</sup> =0,40	R=-0,16 P <sup>a</sup> =0,14	R=0,02 P <sup>a</sup> =0,80	R=0,14 P <sup>a</sup> =0,19

a = Correlazione secondo Spearmann

### **Profilo genetico**

Anche in questo gruppo (n=102) sono stati analizzati i polimorfismi dei geni candidati del eNOS e del sistema RAS: eNOS -786 T>C, eNOS 4a /4b, eNOS894 G>T, ACE

*I/D*, *AGTR1 1166 A>C*, *AGT M235T*. La distribuzione dei genotipi e la frequenza allelica dei polimorfismi analizzati erano in equilibrio di Hardy-Weinberg. Nella **Tabella 9** sono riportate le distribuzioni genotipiche e la frequenza allelica di ciascun polimorfismo esaminato sia dei pazienti che dei controlli. I nostri risultati hanno evidenziato una differenza statisticamente significativa tra pazienti e controlli sia nelle distribuzioni genotipiche che nella frequenza allelica per il polimorfismo *ACE I/D* mentre per il polimorfismo *AGT M235T* solo nella distribuzione genotipica.

Nei pazienti abbiamo poi indagato il ruolo dei marcatori genetici nel gene *eNOS* e nei geni del sistema RAS nel modulare il profilo emoreologico. Dall'analisi dei dati è emerso come in presenza della variante rara C sia in omozigosi che in eterozigosi del polimorfismo *eNOS -786 T>C* si osservavano ridotti livelli di deformabilità eritrocitaria (EI 0,53 Pa, 3Pa, 30 Pa) (**Figura 6**). Il genotipo *eNOS-786 CC* si associava ad un aumento della viscosità ematica a  $0,512 \text{ s}^{-1}$  shear rate corretta per l'ematocrito [Mediana(range) TT+TC= 23,10(17,90-33,10) CC=24,95(17,70-47,20) P=0,02] . Tale dato si è mantenuto anche nell'analisi univariata [OR 1,11 95,0% C.I. (1,00-1,23) P=0,03]. La presenza dell'allele *eNOS-786 C* si associava anche ad un incremento degli indici di aggregazione e disaggregazione eritrocitaria (**Figura 7**). Il polimorfismo *eNOS 4a/4b* non è risultato modulare nessun parametro emoreologico.

Per quanto riguarda il polimorfismo 894 G>T abbiamo osservato che il genotipo TT si associava ad una ridotta deformabilità eritrocitaria [Mediana(range) EI 3Pa:GG+GT=0,338(0,251-0,382) TT=0,309(0,259-0,361) P=0,008] e ad elevati indici di aggregazione e disaggregazione eritrocitaria (**Figura 8**). La Viscosità ematica a  $94,50 \text{ s}^{-1}$  shear rate corretta per l'ematocrito aumentava in relazione all'allele T [Mediana(range) GG=23,45(17,90-31,60) GT=24,90(19,40-44,40) TT=23,65(17,70-47,20) (P= 0,03)]. L'analisi univariata ha confermato questo risultato [OR 3,19 95,0%C.I. (1,42-7,19)P=0,05].

Relativamente ai polimorfismi nei geni candidati del RAS, nei pazienti con genotipo DD e portatori dell'allele D del gene ACE I/D abbiamo osservato una ridotta deformabilità eritrocitaria ai più alti valori di shear stress [Mediana(range) 3Pa DD=0,333 (0,251-0,378) II+ID= 0,368 (0,346-0,382)  $P<0,001$  30Pa DD= 0,554 (0,468-0,620) II+ID=0,603 (0,560-0,608)  $P=0,02$ ] (**Figura 9**). Inoltre è stato osservato un effetto dose dipendente delle allele ACE D sulla modulazione dei valori della viscosità ematica nativa alle basse e medio-alte shear rate [Mediana(range) V.E.0,512 s<sup>-1</sup>: II=21,55 (16,50-28,40) ID=22,40 (10,40-32,70) DD=23,15 (14,50-37,80)  $P=0,46$  ; V.E.94,50 II=4,25 (3,90-5,20) ID=4,95 (2,50-6,50) DD=5,00 (3,20-6,50)  $P=0,12$ ].

Per il polimorfismo *AGTR1 1166 A>C* è stata osservata una diminuzione della deformabilità eritrocitaria a tutte le shear stress in presenza del genotipo CC e nei modelli di segregazione [a 3Pa AA+AC=0,337(0,251-0,382) CC=0,304(0,270-0,343)  $P=0,03$ ] (**Figura 9**). L'allele 1166C modulava anche la viscosità ematica corretta per l'ematocrito alle basse e medio-alte shear rate [V.E.0,512 s<sup>-1</sup>: AA=24,45 (17,70-34,00) AC=23,60 (18,90-47,20) CC= 25,85 (19,70-34,90)  $P=0,69$  ; V.E.94,50: AA=5,00(4,10-7,50) AC=4,90 (4,00-6,80) CC=5,10 (4,40-7,00)  $P=0,65$ ].

Relativamente al polimorfismo AGT M235T abbiamo riscontrato una diminuita deformabilità eritrocitaria a tutte le shear stress nei portatori del genotipo TT. (**Figura 9**).

E' stato poi valutato il peso del carico allelico relativo ai 6 polimorfismi sulla modulazione dei parametri emoreologici con la divisione per terzili della loro distribuzione: 1° terzile gruppo di popolazione con <3 alleli (30 pazienti), 2° terzile gruppo da 4-6 alleli (30 pazienti) ,3° terzile >6 alleli (24 pazienti) : all'analisi Kruskal Wallis sono risultati significativi i valori della deformabilità eritrocitaria ad EI 0,53 Pa ( $P=0,02$ ) ed EI 3 Pa ( $P=0,01$ ). Inoltre la presenza di un numero maggiore di 5 alleli sfavorevoli ha permesso di osservare una ridotta deformabilità eritrocitaria [EI 3 <5 alleli 0,340 (0,272-0,380) ; >5 alleli 0,322 (0,259-0,382)  $P=0,03$ ] (**Figura 10**).

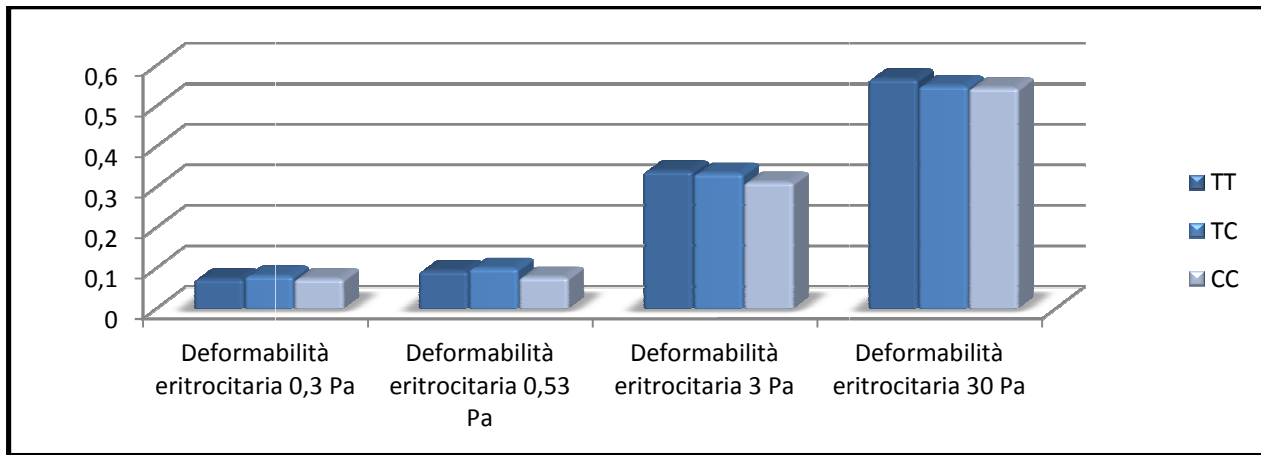
**Tabella 9** Distribuzione del genotipo e frequenza allelica dei polimorfismi del gene *eNOS* e dei geni del sistema RAS nella popolazione di pazienti con PAD il cui profilo emoreologico è stato analizzato con il metodo L.O.R.C.A. (n=102)

Polimorfismi eNOS	pazienti	controlli	P	Polimorfismi RAS	pazienti	Controlli	P
eNOS -786 T>C				<b>ACE I/D</b>			
(CC)	20(21,7)	9(13,4)		(DD)	33(37,5)	19(28,4)	
(TC)	37(40,2)	40(59,7)	0,05	(ID)	46(52,3)	32(47,8)	<b>0,009</b>
(TT)	35(38,0)	18(26,9)		(II)	9(10,2)	16(23,9)	
(C)	0,42	0,43	0,81	(D)	0,64	0,52	<b>0,04</b>
eNOS VNTR 4a/4b				<b>AGTR1 A/C</b>			
(aa)	0(0%)	1(1,5)		(AA)	45(50,0)	31(46,3)	
(ab)	16(17,2)	17(25,4)	0,21	(AC)	38(42,2)	31(46,3)	0,87
(bb)	77(82,8)	49(73,1)		(CC)	7(7,8)	5(7,5)	
(a)	0,09	0,14	0,14	(C)	0,29	0,30	0,80
eNOS 894 G>T				<b>AGTM235T</b>			
(TT)	14(15,2)	8(11,9)		(MM)	30	22(32,8)	
(TC)	35(38,0)	36(53,7)	0,14	(MT)	38	39(58,2)	<b>0,02</b>
(GG)	43(46,7)	23(34,3)		(TT)	23	6(9,0)	
(T)	0,34	0,38	0,41	(T)	0,46	0,38	0,16

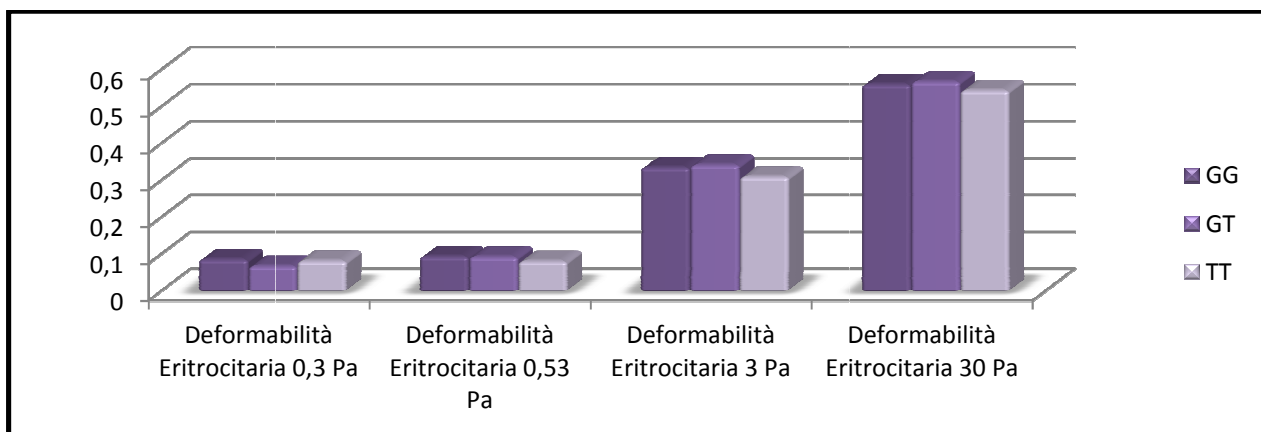
**Figura 6** : Deformabilità eritrocitaria in relazione ai polimorfismi a) *eNOS 786T>C* ed

**b) *eNOS 894 G>T***

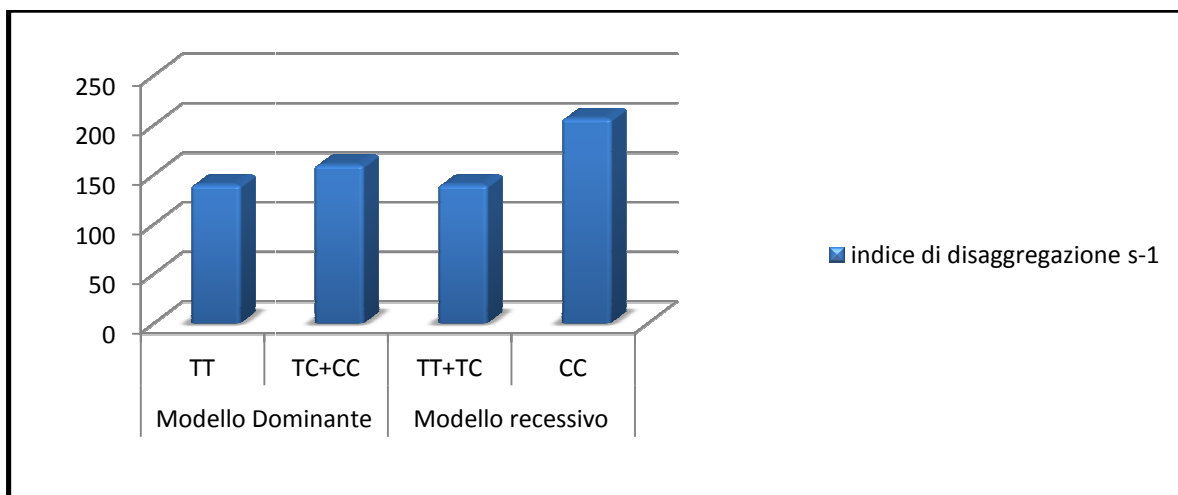
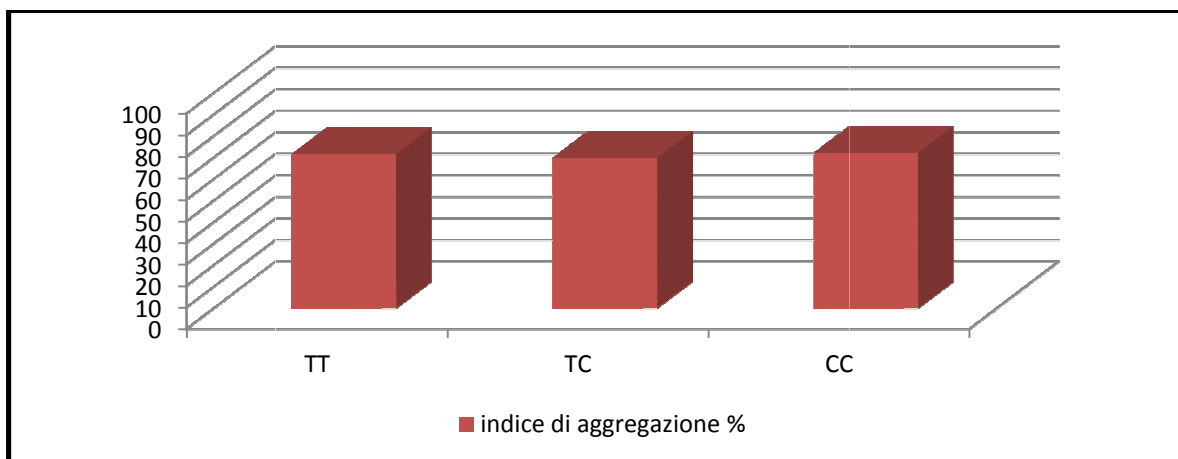
**a) Polimorfismo *eNOS -786 T>C***



**b) Polimorfismo *eNOS 894 G>T***

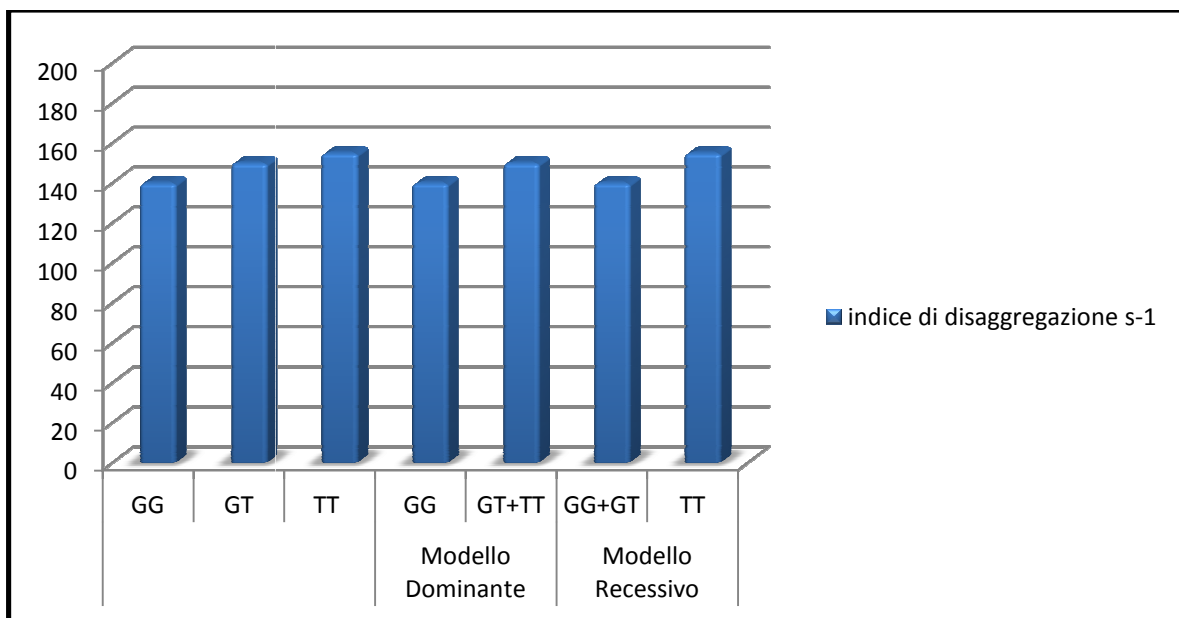
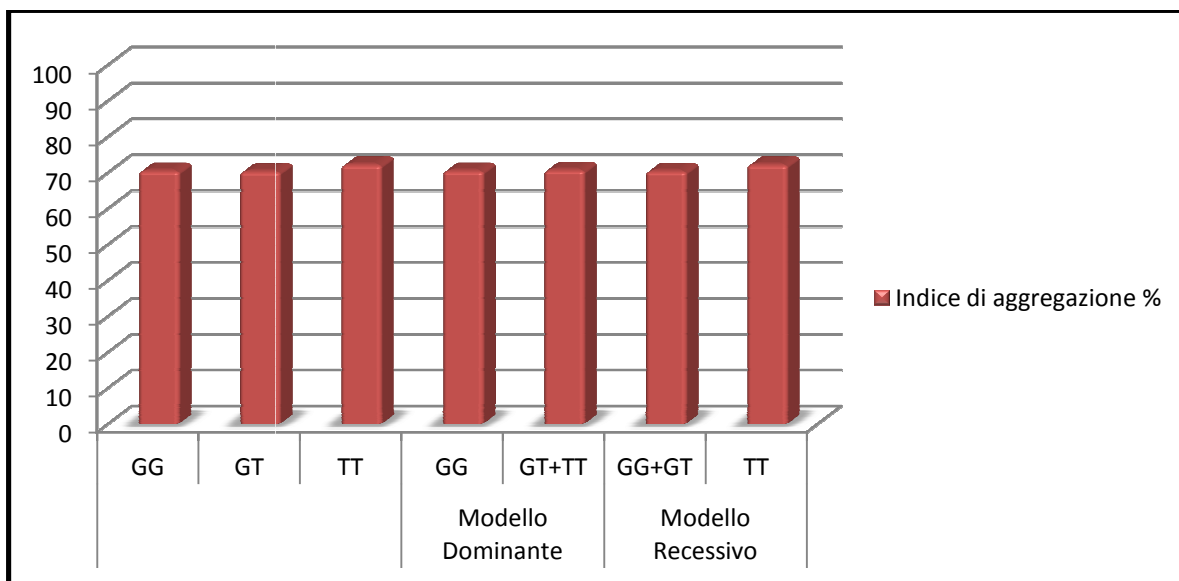


**Figura 7** Indici di aggregazione(AI) e disaggregazione( $\gamma_{thr}$ ) e polimorfismo eNOS-786 T>C



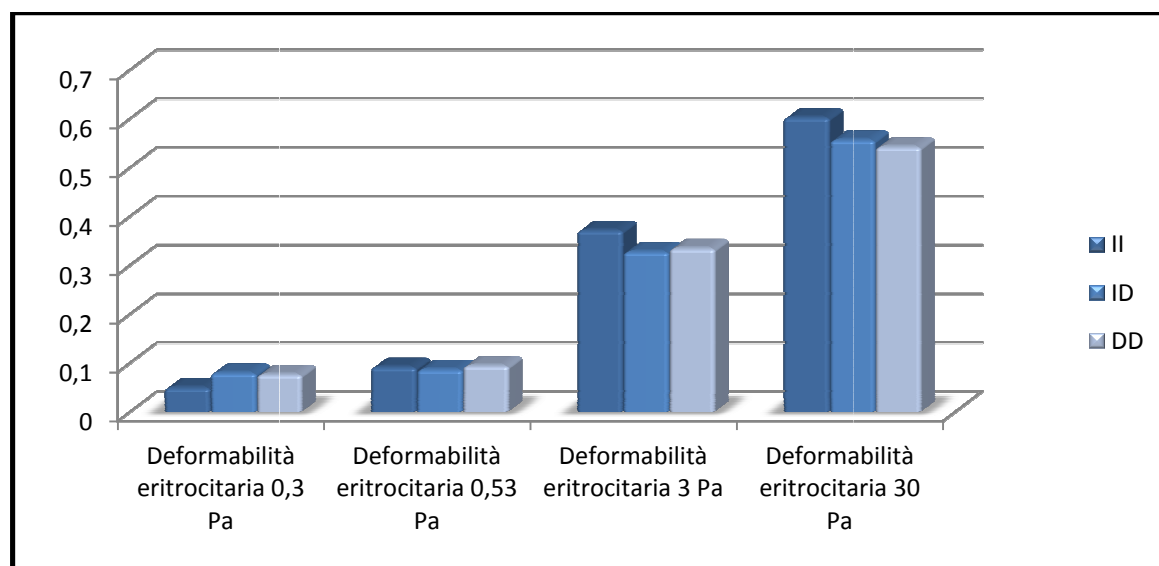


**Figura 8** Indici di aggregazione(AI) e disaggregazione ( $\gamma_{thr}$ ) e polimorfismo 894 G>T

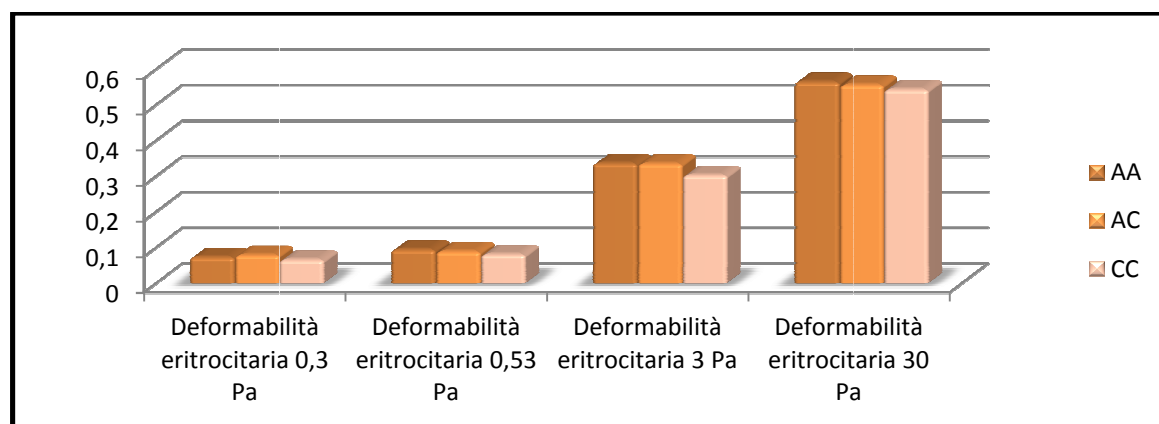


**Figura 9** Deformabilità eritrocitaria e sistema renina angiotensina

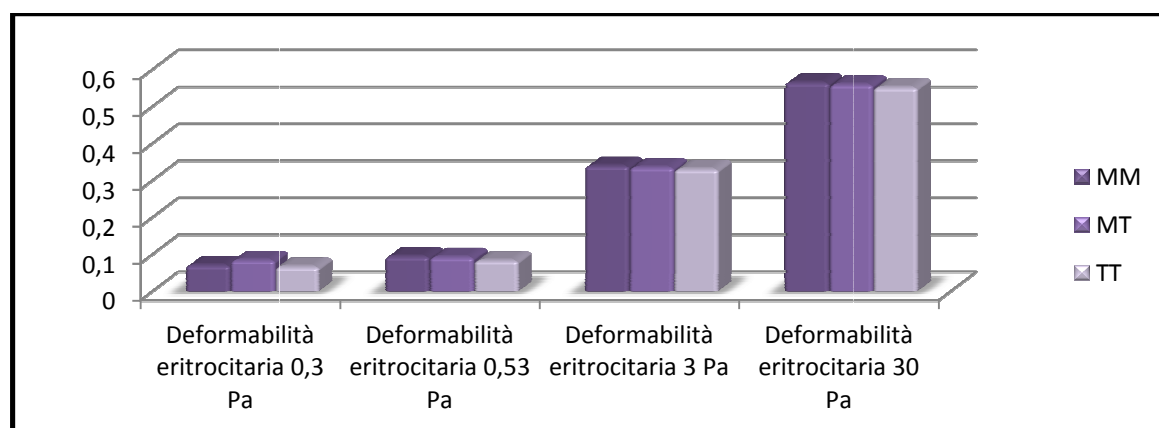
**a) Polimorfismo ACE I/D**



**b) Polimorfismo AGTR1**

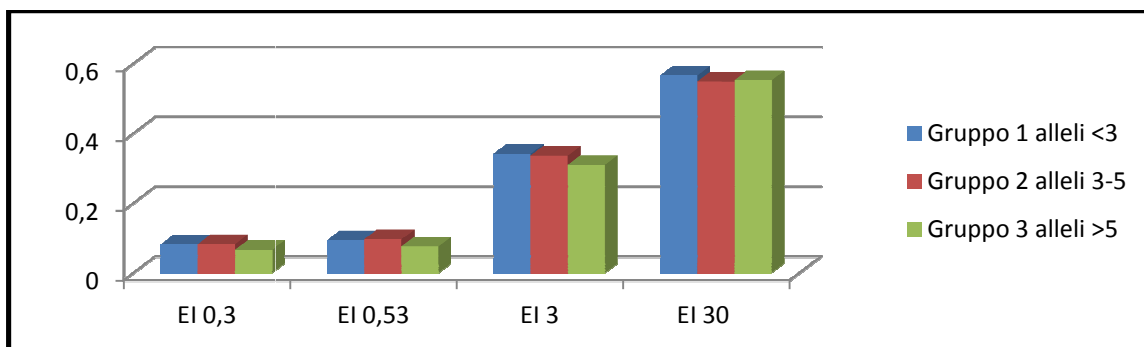


**c) Polimorfismo M235T**

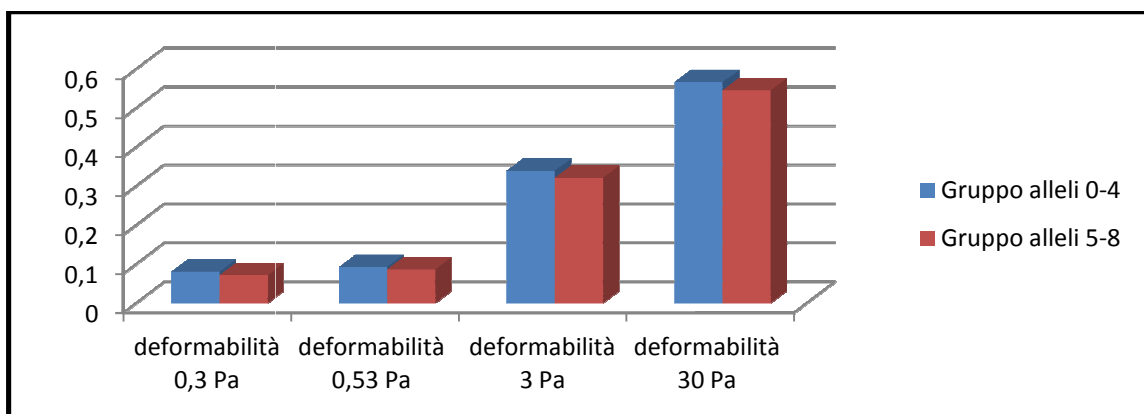


**Figura 10: Deformabilità eritrocitaria in accordo alla divisione in terzili (a) e cut off (b) del carico allelico**

**a**



**b**



## TRAPIANTO RENALE

*“Reologia del sangue e trapianto renale : un'intrigante relazione per la valutazione del rischio cardiovascolare “ (Zanazzi M. ed al. 2010 Transplantation Proceedings)*

### Analisi del profilo emoreologico

Sono stati indagati 239 pazienti che hanno subito trapianto renale confrontati con 90 soggetti sani nei quali la deformabilità e l'aggregazione eritrocitaria sono state misurate con la classica metodica Myrenne. Nella **tabella 10** sono riportate le caratteristiche demografiche, cliniche, emoreologiche ed ematologiche. Oltre ai classici fattori di rischio cardiovascolari (ipertensione, fumo, diabete) sono stati raccolti dati clinici riguardanti dati clinici relativi al rigetto e la concomitante presenza di patologie come la

trombosi venosa profonda e la cardiopatia ischemica. L'analisi delle variabili emoreologiche ha messo in evidenza una viscosità ematica corretta per l'ematocrito significativamente più alta rispetto ai controlli sia alle basse che alle medio-alte shear rate e la viscosità plasmatica, mentre la deformabilità eritrocitaria era più bassa. Nessuna differenza è stata riscontrata nell'indice di aggregazione (**Tabella 10**). Parametri clinici che sappiamo influenzare il profilo emoreologico come fibrinogeno, colesterolo, trigliceridi risultavano significativamente più elevati nei pazienti rispetto ai controlli (**Tabella 10**). Per valutare il ruolo dei parametri emoreologici sul rischio di malattia abbiamo effettuato un'analisi di regressione logistica in relazione ai differenti terzili di distribuzione di tali variabili : viscosità ematica  $0,512 \text{ shear rate s}^{-1}$  corretta per ematocrito [1°terzile  $<20,70$ , 2°terzile  $20,81-26,00$ , 3°terzile  $>26,10$ ], viscosità plasmatica [1°terzile  $<1,34$ , 2°terzile  $1,35-1,44$ , 3°terzile  $>1,45$ ], deformabilità eritrocitaria [1°terzile  $<3,7$ , 2°terzile  $3,8-10,0$ , 3°terzile  $>10,1$ ]. I più alti terzili della viscosità ematica corretta per l'ematocrito, viscosità plasmatica e deformabilità modulavano significativamente il rischio della patologia (**Tabella 11**). L'analisi multivariata dopo correzione per età, sesso, ipertensione, fumo, diabete (**Figura 11** 1°modello) ha confermato il ruolo della viscosità ematica a  $0,512 \text{ s}^{-1}$  shear rate corretta per l'ematocrito [3°terzile OR 45,18 95% C.I. (4,7-426,18),  $P=0,001$ ], la viscosità ematica a  $94,50$  corretta per l'ematocrito [2°terzile OR 6,80 95% C.I. (2,19-21,11)  $P=0,001$ ; 3°terzile [OR 15,63 3,72-65,59  $P=<0,001$ ], la viscosità plasmatica [3°terzile OR 7,96 2,53-25,02  $P<0,001$ ] quali predittori di malattia . Correggendo anche per fibrinogeno, trigliceridi ed HDL(modello 2) le variabili non si confermavano modulare la malattia.

**Tabella 10 : a) Variabili demografiche e cliniche b) emoreologiche ed ematologiche della popolazione esaminata** [\* valori espressi come frequenze, percentuali \*\*I valori sono espressi come mediana (range)]

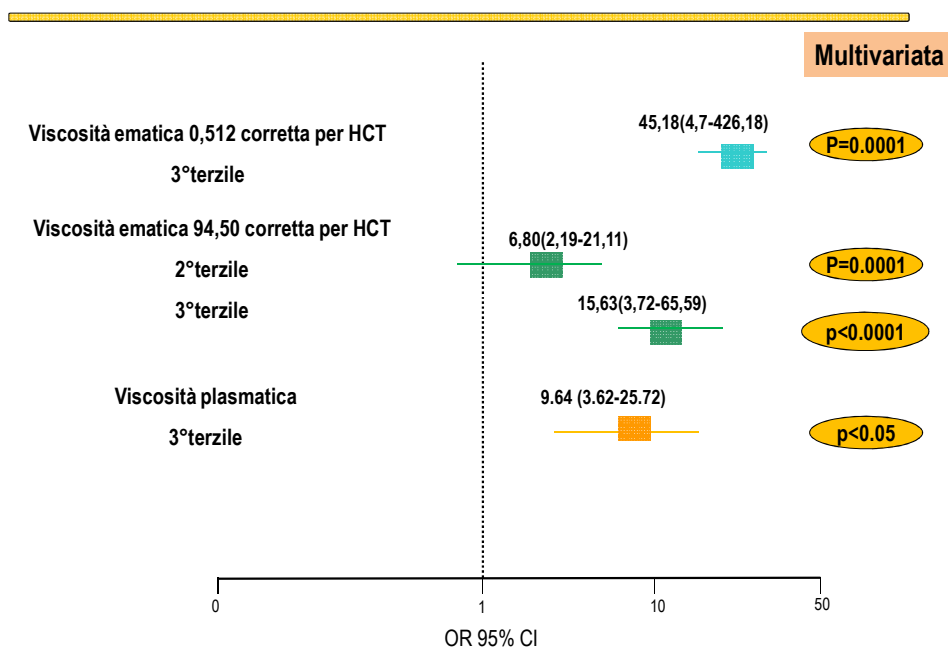
a)	Variabili		Trapianti renali (n=239)	
	<i>Variabili demografiche</i>			
	Sesso (maschi/femmine)*		156/83(65,3/34,7)	
	Età (anni)**		52 (17-75)	
	<i>Variabili cliniche</i>			
	Iperensione*		199(83,3)	
	Diabete*		37(15,5)	
	Fumo*		5(2,1)	
	Statine*		95(39,7)	
	Rigetto acuto*		71(29,7)	
	Rigetto cronico*		47(19,7)	
	Trombosi Venosa Profonda*		25(10,5)	
	Cardiopatie ischemiche*		21(8,8)	
b)	Variabili	Trapianti (n=239)	Valori di riferimento (n=90)	P
	<i>Variabili emoreologiche**</i>			
	V.ematica a 0.512 s <sup>-1</sup> (mPa *s)	20,4 (12,0-43,7)	20,5 (13,4-29,4)	0,2
	V.ematica a 0.512 s <sup>-1</sup> (mPa *s) (Corretto per Hct)	23,5 (10,6-68,5)	19,9 (13,3-27,0)	<0,001
	V.ematica a 94.5 s <sup>-1</sup> (mPa *s)	4,1 (3,0-6,7)	4,1 (3,6-5,3)	0,4
	V.ematica a 94.5 s <sup>-1</sup> (mPa *s) (Corretto per Hct)	4,5 (3,2-8,4)	4,1 (3,3-5,2)	<0,001
	Viscosità plasmatica (mPa *s)	1,39 (1,13-1,90)	1,35 (1,21-1,58)	<0,001
	Deformabilità eritrocitaria	6,4 (1,7-19,9)	11,5 (9,0-18,0)	<0,001
	Aggregazione eritrocitaria	3,0 (1,4-6,4)	2,9 (1,4-4,8)	0,5
	<i>Variabili ematologiche</i>			
	Ematocrito (%)	40,4 (30,3-52,5)	42,0 (36,8-49,1)	0,003
	Emoglobina (g/L)	12,9 (9,9-16,9)	14,2 (11,8-16,9)	<0,001
	Fibrinogeno (mg/dl)	379 (204-914)	330 (227-497)	0,001
	Colesterolo Totale (mg/dL)	214 (115-345)	200 (115-281)	0,01
	Trigliceridi (mg/dL)	162 (50-545)	86 (29-322)	<0,001

**Tabella 11** Regressione binaria logistica dei parametri emoreologici

Variabili	OR(95%CI)	P
<b>Viscosità ematica a 0,512 shear rate corr.</b>		
2°terzile	1,72 (1,00-2,94)	0,04
3°terzile	55,58 (7,47 -413,20)	<0,001
<b>Viscosità ematica a 94,50 shear rate corr.</b>		
2°terzile	4,33(2,33-8,07)	<0,001
3°terzile	12,64(4,80-33,28)	<0,001
<b>Viscosità Plasmatica</b>		
2°terzile	1,25(0,73-2,15)	0,40
3°terzile	5,67(2,49-12,89)	<0,001
<b>Deformabilità</b>		
2°terzile	--	--
3°terzile	5,17(2,67-10,02)	<0,001

**Figura 11** Analisi multivariata nelle variabili emoreologiche nel trapianto renale

1° modello\*



\*Aggiustato per i fattori di rischi età sesso, fumo, ipertensione,diabete

Infine abbiamo fatto un'analisi di correlazione (Test di Spearmann) nei pazienti trapiantati (**Tabella 12**):

**Tabella 12**: Correlazioni tra parametri emoreologici ed ematologici

Variabili	Emoglobina	Ematocrito	Trigliceridi	Colesterolo	LDL
Viscosità ematica 0,512 s <sup>-1</sup> shear rate nativa	R=0,49 Pa<0,001	R=0,51Pa<0,001	R=-0,18 Pa=0,005	R= 0,004Pa=0,94	----
Viscosità ematica 94,50 s <sup>-1</sup> shear rate nativa	R=0,71Pa<0,001	R=0,71 Pa<0,001	R=-0,80Pa=0,23	R= 0,008Pa=0,90	----

Variabili	Fibrinogeno	Globuli bianchi	trigliceridi	LDL
Viscosità plasmatica	R= 0,33Pa<0,001	R=0,17 Pa=0,01	R=0,05 Pa=0,38	----
Aggregazione Eritrocitaria	R=0,22 Pa<0,01	R=-0,14 Pa=0,04	R=0,18 Pa=0,006	----

Variabili*	Colesterolo	MCV	MCH	MCHC
Indice di deformabilità	R=-0,12 Pa=0,07	---	---	---

a =Correlazione di Spearmann

### **Profilo genetico**

Nei pazienti sottoposti a trapianto renale sono stati analizzati i polimorfismi dei geni candidati del nitrossido e del sistema renina-angiotensina : *eNOS -786 T>C*, *eNOS 4a /4b*, *eNOS 894 G>T*, *ACE I/D*, *AGTR1 1166 A>C*, *AGT M235T*. La distribuzione dei genotipi e la frequenza allelica dei polimorfismi analizzati erano in equilibrio di Hardy-

Weinberg (**Tabella 13**). I nostri risultati non hanno evidenziato differenze statisticamente significative tra pazienti e controlli sia nella distribuzione dei genotipi che nella frequenza allelica.

**Tabella 13** Distribuzione del genotipo e frequenze alleliche dei polimorfismi eNOS e del sistema RAS nella popolazione dei trapiantati renali (n=239)

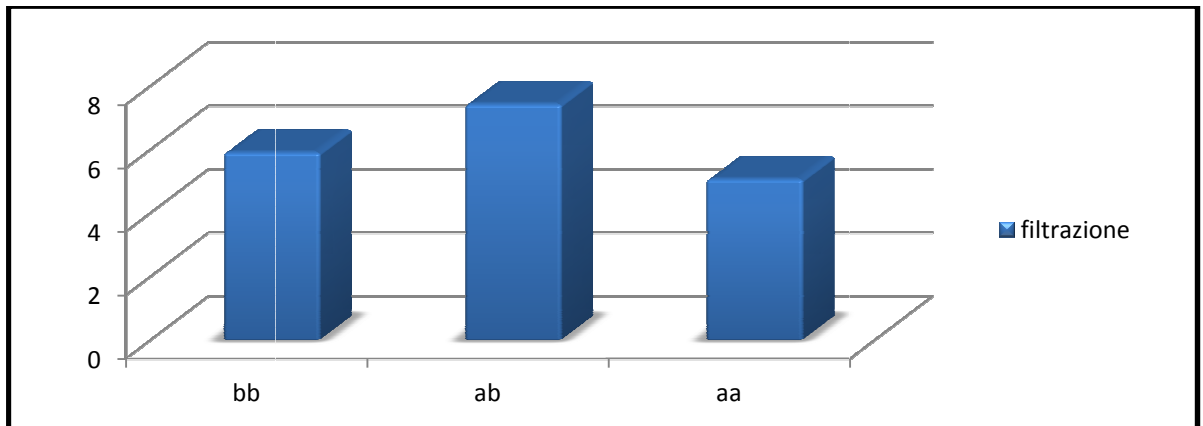
Polimorfismi,genotipo o allele	pazienti	controlli	P	Polimorfismi,genotipo o allele	pazienti	Controlli	P
<b>eNOS -786 TC</b>				<b>ACE I/D</b>			
(CC)	37(15,7)	13(14,4)		(DD)	87(37,7)	26(28,6)	
(TC)	128(54,5)	54(59,4)	0,65	(ID)	104(45,0)	44(48,4)	0,31
(TT)	70(29,8)	23(25,5)		(II)	41(17,3)	20(22,0)	
(C)	0,42	0,44	0,79	(D)	0,59	0,53	0,13
<b>eNOS VNTR 4a/4b</b>				<b>AGTR1 A/C</b>			
(aa)	5(2,1)	1(1,1)		(AA)	115(50,2)	43(47,3)	
(ab)	63(26,8)	23(25,3)	0,80	(AC)	88(38,4)	42(46,2)	0,18
(bb)	167(71,1)	66(72,6)		(CC)	26(11,4)	5(5,5)	
(a)	0,15	0,25	0,71	(C)	0,31	0,28	0,7
<b>eNOS 894 GT</b>				<b>AGTM235T</b>			
(TT)	91(38,9)	31(34,1)		(AA)	59(27,0)	31(34,1)	
(TC)	113(48,3)	47(51,7)	0,75	(AG)	120(34,8)	50(55,0)	0,13
(GG)	30(12,8)	12(13,2)		(GG)	40(18,2)	9(9,9)	
(T)	0,37	0,39	0,58	(G)	0,46	0,37	0,6

Nei trapiantati renali abbiamo indagato il ruolo dei marcatori genetici dei sistemi NO e RAS nel modulare il profilo emoreologico. Nei pazienti portatori del genotipo CC del polimorfismo *eNOS -786T>C* abbiamo osservato un aumento dei valori della viscosità ematica a  $94,50 \text{ s}^{-1}$  nativa [TT=4,19 TC=4,02 CC=4,34]. Nel polimorfismo VNTR 4a/4b i portatori del genotipo aa avevano un incremento della viscosità ematica nativa a  $0,512 \text{ s}^{-1}$  shear rate [bb +ab=20,40 aa=25,94 P=0,04] [OR 1,15 95% C.I. 1,00-1,32 P=0,04] e della viscosità ematica nativa a  $94,50 \text{ s}^{-1}$  shear rate [bb +ab=4,10, aa=4,91



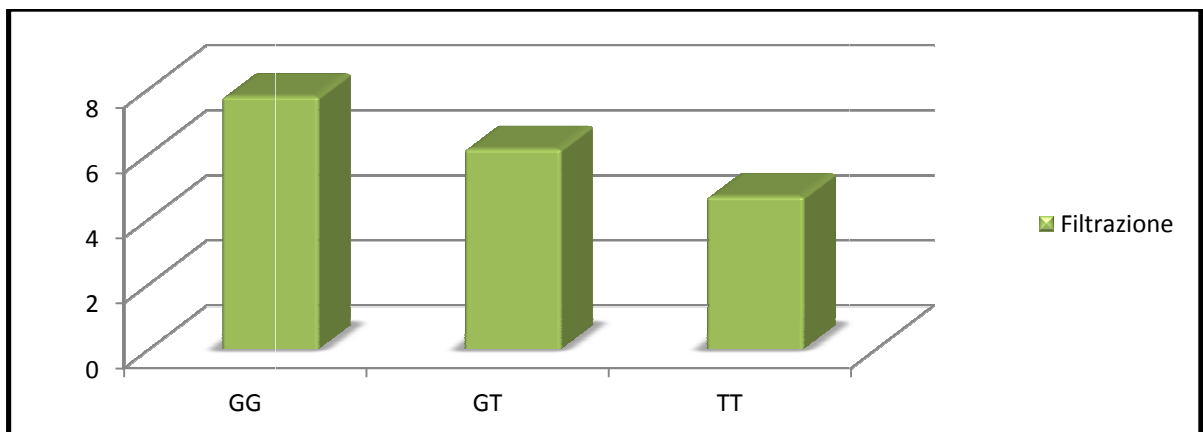
$P=0,02$ ] ed una leggera riduzione dell' aggregazione eritrocitaria [ $bb +ab=3,00$   $aa=3,15$ ]. La deformabilità eritrocitaria risultava ridotta anche se non significativamente ( $P=0,18$ ) nei pazienti omozigoti per la variante rara  $a$  di questo polimorfismo (**Figura 12**); per il polimorfismo 894  $G>T$  la filtrazione eritrocitaria diminuiva in entrambi i modelli di segregazione, dominante e recessivo (**Figura 13**). Abbiamo analizzato il ruolo dei polimorfismi del sistema renina-angiotensina in relazione al profilo emoreologico . La presenza dell'allele  $D$  nel polimorfismo  $ACE I/D$  [ $I=1,39$   $ID=1,37$   $DD=1,41$ ] si associava ad un incremento della viscosità plasmatica e ad una maggiore filtrazione eritrocitaria ma non della viscosità ematica alle basse e medio alte shear rate [V.E  $0,512\ s^{-1}$  nativa  $I=23,30$   $ID+DD=20,15$   $P=0,03$ ; OR  $1,15$  (95% CI  $1,00-1,32$ )  $P=0,03$  e V.E.  $94,50$  nativa  $I=4,20$   $ID+DD=4,07$   $P=0,04$ ] (**Figura 14**). Relativamente al polimorfismo  $AGTR1\ 1166\ A>C$  è stata osservata una associazione positiva tra aumento della viscosità ematica a  $0,512\ s^{-1}$  shear rate corretta per l'ematocrito [ $AA=23,85$ ,  $AC=22,90$ ,  $CC=24,60$ ] e viscosità ematica a  $94,50\ s^{-1}$  shear rate [ $AA=4,50$   $AC=4,50$   $CC=4,80$ ] e genotipo  $CC$ . La filtrazione eritrocitaria invece aumentava nei portatori dell'allele  $C$  (**Figura 14**). Abbiamo osservato un incremento nella viscosità ematica a  $0,512\ s^{-1}$  sia nativa [ $MM=19,80$   $MT=20,55$   $TT=21,50$ ] che corretta per l'ematocrito [ $MM=23,60$   $MT=23,20$   $TT=24,80$ ], della viscosità ematica a  $94,50\ s^{-1}$  nativa [ $MM=4,00$   $MT=4,10$   $TT=4,20$ ], della viscosità plasmatica [ $MM=1,40$   $MT=1,39$   $TT=1,43$ ] e della filtrazione eritrocitaria nei pazienti omozigoti per l'allele  $T$  del polimorfismo  $M235T$  (**Figura 14**). La contemporanea presenza di più varianti polimorfiche dei 6 polimorfismi analizzati non influenzava il profilo emoreologico.

**Figura 12** : Filtrazione eritrocitaria nel polimorfismo VNTR 4a/b

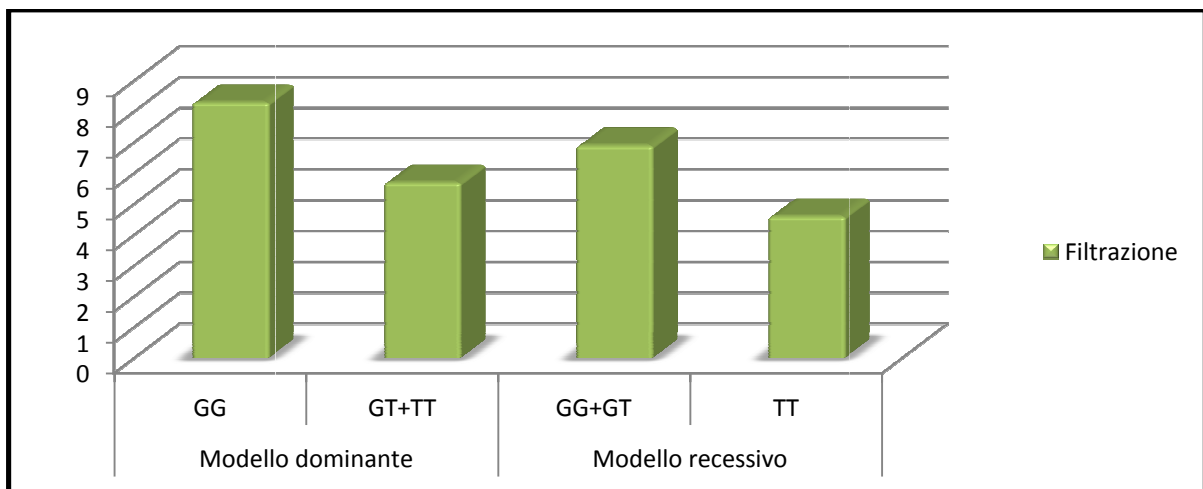


**Figura 13** : Filtrazione eritrocitaria nel polimorfismo eNOS 894 G>T

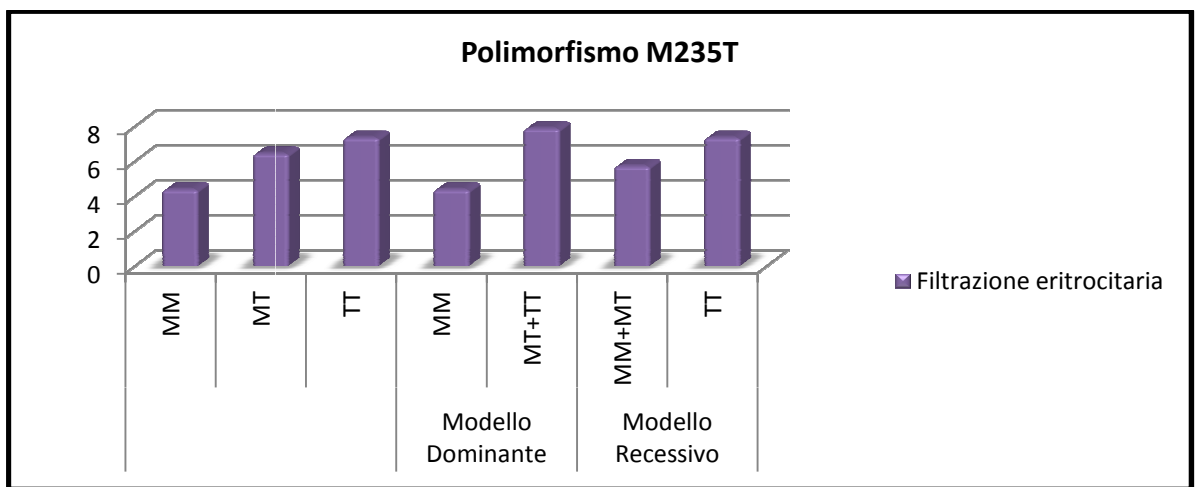
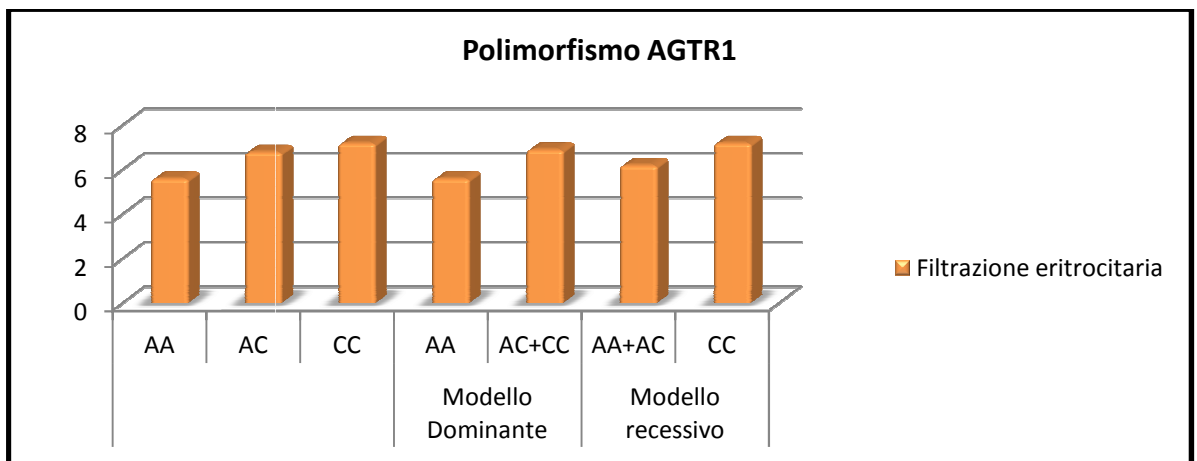
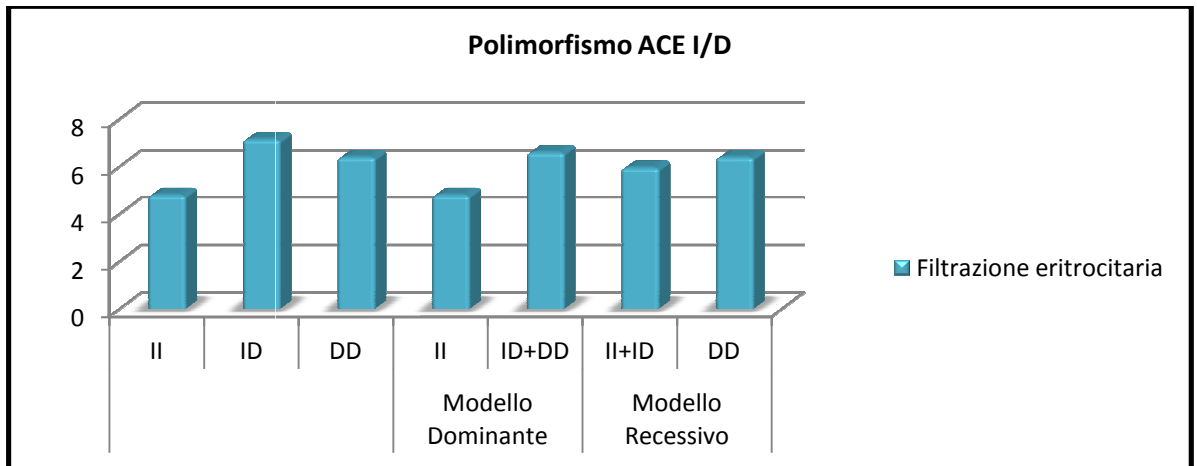
a) Distribuzione in rapporto al genotipo



b) Distribuzione in rapporto ai modelli di segregazione



**Figura 14 : Filtrazione eritrocitaria nel sistema renina angiotensina**



## Valutazione della deformabilità ed aggregazione eritrocitaria con la metodica

### L.O.R.C.A.

La deformabilità e l'aggregazione eritrocitaria sono stati valutati anche con la metodica L.O.R.C.A. in 144 pazienti sottoposti a trapianto renale.

### Analisi del profilo emoreologico

Nella **Tabella 14** sono state riportate le caratteristiche demografiche, emoreologiche ed ematologiche della popolazione esaminata. In particolare la viscosità ematica nativa sia alle basse ( $P=0,001$ ) che alle medio-alte shear rate ( $P=0,001$ ), la viscosità plasmatica ( $P=0,04$ ), l'aggregazione ( $P<0,001$ ) e la disaggregazione eritrocitaria ( $P<0,001$ ) erano significativamente più elevate nei pazienti rispetto ai controlli. Invece la deformabilità eritrocitaria per quanto riguarda le 3 shear stress  $<30$  Pa ( $P=<0,001$  per tutte) ed il tempo medio di aggregazione ( $P<0,001$ ) avevano valori significativamente più bassi. Relativamente alle variabili ematologiche si osservava una differenza significativa tra pazienti e controlli in relazione ai livelli di Fibrinogeno ( $P<0,001$ ) e Trigliceridi, ( $P<0,001$ ) (**Tabella 14**). Per valutare il ruolo dei parametri emoreologici sul rischio della malattia, abbiamo effettuato un'analisi di regressione logistica in relazione a differenti terzili di distribuzione delle variabili: Deformabilità a 0,3 Pa (1°terzile  $<0,049$ , 2°terzile 0,050-0,064, 3°terzile  $>0,065$ ), a 0,53 Pa (1°terzile  $<0,071$ , 2°terzile 0,072-0,093, 3°terzile  $>0,094$ ) a 3Pa (1°terzile  $<0,0332$ , 2°terzile 0,333-0,354, 3°terzile  $>0,355$ ) viscosità  $0,512\ s^{-1}$  nativa (1°terzile  $<21,73$ , 2°terzile 21,74-25,00, 3°terzile  $>25,01$ ), viscosità a 94,50 nativa (1°terzile  $<4,20$ , 2°terzile 4,21-4,70, 3°terzile  $>4,70$ ) viscosità a 94,50 corretta (1°terzile  $<4,50$ , 2°terzile 4,50-5,00, 3°terzile  $>5,00$ ), viscosità plasmatica (1°terzile  $<1,41$ , 2°terzile 1,42-1,47, 3°terzile  $>1,47$ ) aggregazione eritrocitaria (1°terzile  $<62,35$ , 2°terzile 62,35-67,78, 3°terzile  $>67,78$ ) indice di disaggregazione (gammathr) (1°terzile  $<100$ , 2°terzile 100-150, 3°terzile  $>150$ ). All'analisi univariata un alterato profilo emoreologico si associava significativamente al rischio di malattia (**Tabella 15**)

**Tabella 14 Parametri emoreologici e di laboratorio**

Variabili*	Trapianti renali (n=144)	Valori di riferimento (n=68)	P value
<b>Variabili demografiche</b>			
età	53,0(23,0-84,0)	51,50(23,0-73,0)	0,16
sexo	100/44(69,4/30,6)	35/33(51,5/48,5)	<b>0,01</b>
<b>Variabili emoreologiche</b>			
<b>V.ematica</b> a 0,512 sec-1 shear rate , nat.	22,90(10,00-39,60)	24,50(16,80-40,30)	<b>0,001</b>
<b>V.ematica</b> a 0,512 sec-1 shear rate , corr	26,00(13,40-45,00)	23,40(17,30-36,20)	0,066
<b>V.ematica</b> a 94,50 sec-1 shear rate , nat.	4,40(2,90-6,50)	4,60(3,70-6,10)	<b>0,001</b>
<b>V.ematica</b> a 94,50 sec-1 shear rate , corr	4,90(3,60-7,10)	4,50(3,60-6,30)	<b>&lt;0,001</b>
<b>V.plasmatica</b> a 94,50 sec-1 shear rate ,	1,46(1,24-1,74)	1,43(1,29-2,00)	<b>0,041</b>
<b>Indice di deformabilità eritrocitaria</b> shear stress 0,3 Pa	0,053(-0,006-0,114)	0,063(0,018-0,123)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Indice di deformabilità eritrocitaria</b> shear stress 0,53 Pa	0,077(-0,033-0,50)	0,088(0,028-0,133)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Indice di deformabilità eritrocitaria</b> shear stress 3 Pa	0,355(0,182-0,402)	0,354(0,245-0,408)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Indice di deformabilità eritrocitaria</b> shear stress 30 Pa	0,586(0,48-0,62)	0,585(0,355-0,626)	0,884
<b>Indice di aggregazione (%)</b>	66,61(43,74-77,99)	63,10(42,96-74,98)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Indice di disaggregazione</b> ( shear rate s-1)	140(45-800)	100,00(60-232)	<b>&lt;0,001</b>
<b>T/2 (sec)</b>	1,74(0,81-5,19)	2,14(0,90-5,33)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Variabili ematologiche</b>			
<b>Ematocrito (%)</b>	40,15(25,70-51,60)	43,20(34,70-50,00)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Globuli bianchi</b> (10 <sup>9</sup> /L)	7155 (3850-15200)	5900 (3440-9420)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Fibrinogeno (mg/dl)</b>	397,50(267-617)	339(233-520)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Trigliceridi (mg/dl)</b>	154(35-607)	80,00(33-303)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Colesterolo Totale (mg/dl)</b>	215(123-345)	199(123-343)	0,061
<b>Colesterolo HDL (mg/dl)</b>	53(29-97)	57,00(33-114)	0,163
<b>Colesterolo LDL (mg/dl)</b>	124(39-233)	119(44-252)	<b>0,90</b>

\*mediana e rang

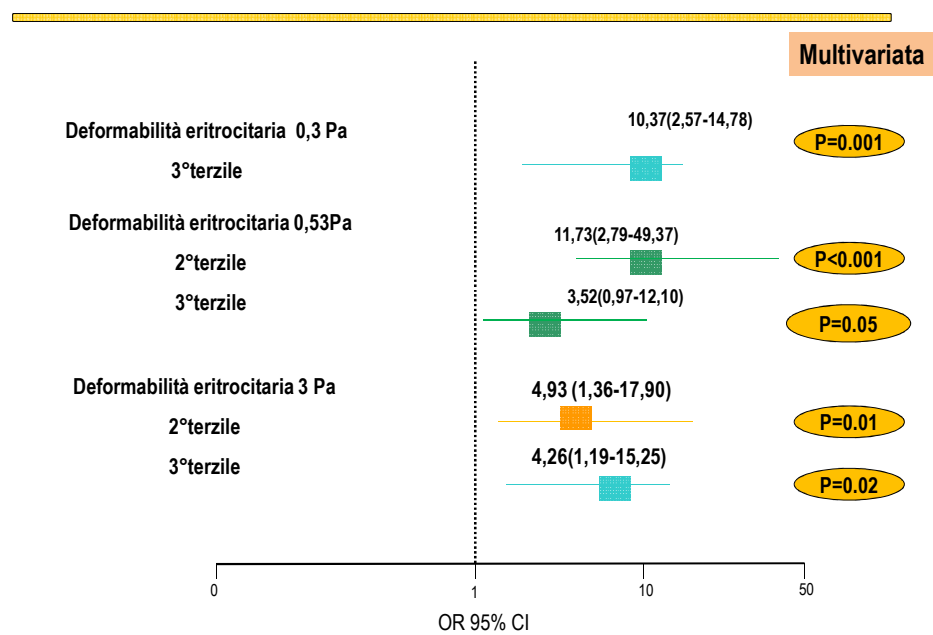
**Tabella 15** Regressione binaria logistica dei parametri emoreologici

Variabili	OR(95%CI)	P
<b>Viscosità ematica a 0,512 shear rate nat.</b>		
2°terzile		
3°terzile	0,48 (0,22-1,04)	0,06
<b>Viscosità ematica a 94,50 shear rate nat.</b>		<b>0,005</b>
2°terzile		
3°terzile	0,28(0,11-0,67)	<b>0,004</b>
<b>Viscosità ematica a 94,50 shear rate corr.</b>		<0,001
2°terzile		
3°terzile	0,19(0,07-0,48)	
<b>Viscosità Plasmatica</b>		<0,001
2°terzile		
3°terzile	1,2(0,62-2,37)	<b>0,56</b>
<b>Deformabilità(0,3 Pa)</b>		0,01
2°terzile		
3°terzile	7,28(2,74-19,34)	
<b>Deformabilità(0,53 Pa)</b>		0,002
2°terzile		
3°terzile	1,55(0,77-3,10)	<b>0,21</b>
<b>Deformabilità(3 Pa)</b>		<0,001
2°terzile		
3°terzile	3,44(1,56-7,57)	
<b>Indice di aggregazione(AI)</b>		<0,001
2°terzile		
3°terzile	1,25(0,63-2,46)	<b>0,52</b>
<b>Indice di disaggregazione (Ithr)</b>		<0,001
2°terzile		
3°terzile	4,41(1,92-10,14)	
<b>T/2</b>		<0,001
2°terzile		
3°terzile	1,65(0,83-3,29)	<b>0,15</b>
	4,53(2,01-10,18)	
	1,27(0,64-2,54)	<b>0,48</b>
	5,60(2,39-13,16)	
	3,04(1,47-6,27)	<b>0,003</b>
	4,55(2,04-10,12)	
	1,39(0,70-2,78)	<b>0,34</b>
	4,87(2,12-11,16)	<0,001

L'analisi multivariata dopo correzione per età, sesso, colesterolo, fibrinogeno, trigliceridi, LDL, HDL ha confermato il ruolo della deformabilità eritrocitaria quale predittore di patologia. [0,3 Pa 2°terzile OR 10,37 (2,57-41,78) P=0,001; 0,53 Pa 2°terzile OR 11,73 (2,79-49,37) P<0,01; 3°terzile 3,52(0,97-12,70) P=0,05 ;3 Pa 2°terzile OR 4,93(1,36-17,90) P=0,01; 3°terzile OR 4,26(1,19-15,25 P=0,02] (**Figura 15**).

Infine abbiamo fatto un'analisi di correlazione (test di Spearman) nei pazienti trapiantati tra parametri emoreologici e variabili ematologiche (**Tabella 16**).

**Figura 15 : Analisi multivariata delle variabili emoreologiche nel trapianto renale \***



\*Corretto per età, sesso, colesterolo, fibrinogeno, trigliceridi, LDL, HDL

**Tabella 16** Correlazioni tra variabili emoreologiche ed ematologiche

Variabili	Emoglobina	Ematocrito	Trigliceridi	Colesterolo	LDL
Viscosità ematica 0,512 s <sup>-1</sup> shear rate nativa	R=0,58 P <sup>a</sup> <0,001	R=0,59 P <sup>a</sup> <0,001	R= -0,17 P <sup>a</sup> =0,01	R=0,10 P <sup>a</sup> =0,15	R=0,01 P <sup>a</sup> =0,81
Viscosità ematica 94,50 s <sup>-1</sup> shear rate nativa	R=0,71 P <sup>a</sup> <0,001	R=0,70 P <sup>a</sup> <0,001	R= 0,003 P <sup>a</sup> =0,96	R 0,07 P <sup>a</sup> =0,28	R=0,08 P <sup>a</sup> =0,31

Variabili	Fibrinogeno	Globuli bianchi	trigliceridi	LDL
Viscosità plasmatica	R= 0,41 P <sup>a</sup> <0,001	R=0,11 P <sup>a</sup> =0,18	R= 0,10 P <sup>a</sup> =0,15	R= -0,23P <sup>a</sup> =0,004
Aggregazione Eritrocitaria	R=0,54 P <sup>a</sup> <0,001	R=0,19 P <sup>a</sup> =0,02	R=0,22 P <sup>a</sup> =0,002	R= 0,28 P <sup>a</sup> <0,001
Indice di Disaggregazione (γthr)	R=0,35 P <sup>a</sup> <0,001	R=0,13 P <sup>a</sup> =0,12	R=0,30P <sup>a</sup> <0,001	R=0,13 P <sup>a</sup> =0,09
Tempo medio di aggregazione	R=-0,52 P <sup>a</sup> <0,001	R=-0,21 P <sup>a</sup> =0,01	R= -0,18 P <sup>a</sup> =0,01	R= -0,30P <sup>a</sup> <0,001

Variabili	Colesterolo	MCV	MCH	MCHC
Deformabilità eritrocitaria 0,3 Pa	R=-0,04 P <sup>a</sup> =0,54	R=-0,09 P <sup>a</sup> =0,20	R=0,02 P <sup>a</sup> =0,77	R=0,25 P <sup>a</sup> =0,001
Deformabilità eritrocitaria 0,53 Pa	R=0,03 P <sup>a</sup> =0,63	R=0,14 P <sup>a</sup> =0,04	R=0,20 P <sup>a</sup> =0,005	R=0,22 P <sup>a</sup> =0,002
Deformabilità eritrocitaria 3Pa	R=-0,005 P <sup>a</sup> =0,94	R=0,54 P <sup>a</sup> <0,001	R=0,56 P <sup>a</sup> <0,001	R=0,28 P <sup>a</sup> <0,001
Deformabilità eritrocitaria 30 Pa	R=-0,09 P <sup>a</sup> =0,17	R=0,14 P <sup>a</sup> =0,04	R=0,13 P <sup>a</sup> =0,07	R=0,03 P <sup>a</sup> =0,68

a = Correlazione secondo Spearmann



## Profilo genetico

Nei pazienti con trapianto renale sono stati analizzati i polimorfismi nei geni candidati del nitrossido e sistema renina-angiotensina (*eNOS -786 T>C*, *eNOS 4a /4b*, *eNOS 894 G>T*, *ACE I/D*, *AGTR1 A>C*, *AGT M235T*). La distribuzione dei genotipi e la frequenza allelica dei polimorfismi analizzati erano in equilibrio di Hardy-Weinberg nella popolazione esaminata (**Tabella 13**). I nostri risultati hanno evidenziato una differenza statisticamente significativa tra pazienti e controlli nella distribuzione dei genotipi del polimorfismo *eNOS 894 G>T* ed *ACE I/D*. Nei pazienti portatori dell'allele C nel polimorfismo *eNOS -786 T>C* abbiamo osservato una diminuzione nella deformabilità a 0,53 Pa e 3 Pa ed un aumento negli indici di aggregazione eritrocitaria in particolare nei portatori del genotipo CC (**Figura 16**). Per quanto riguarda invece il polimorfismo 4a/4b sono stati evidenziati ridotti valori di deformabilità eritrocitaria negli omozigoti per l'allele a del polimorfismo *VNTR 4a/4b* (**Figura 17**). Il polimorfismo *eNOS 894 G>T* non modulava i parametri emoreologici.

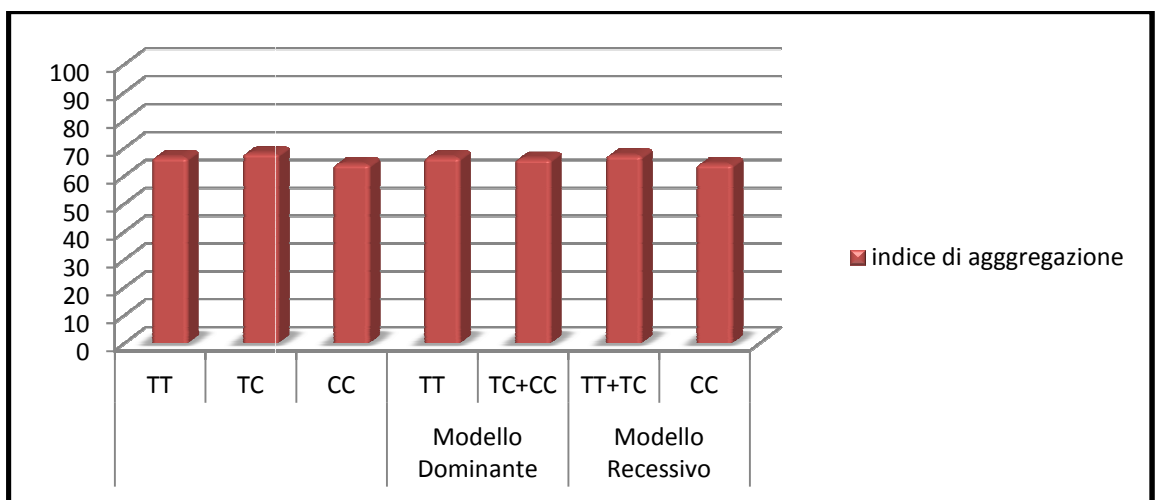
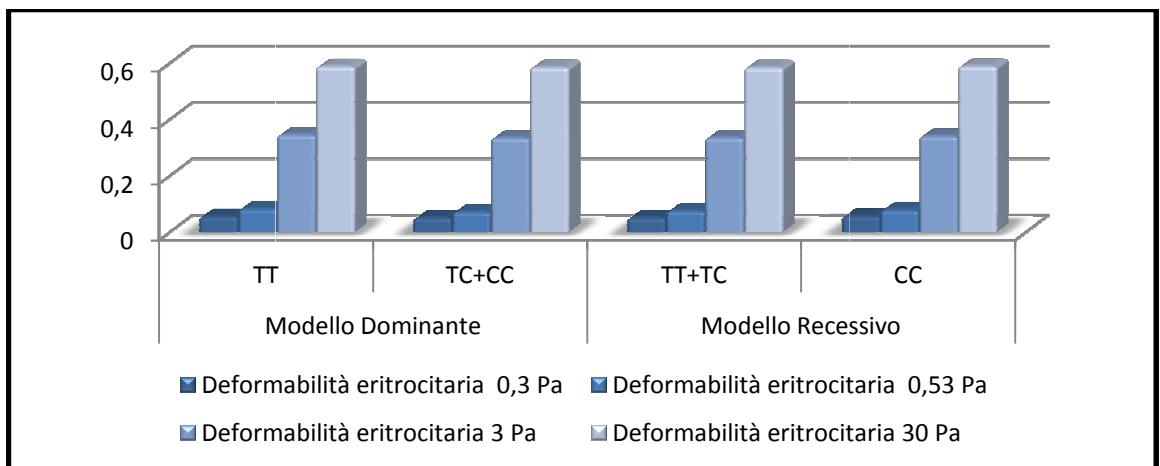
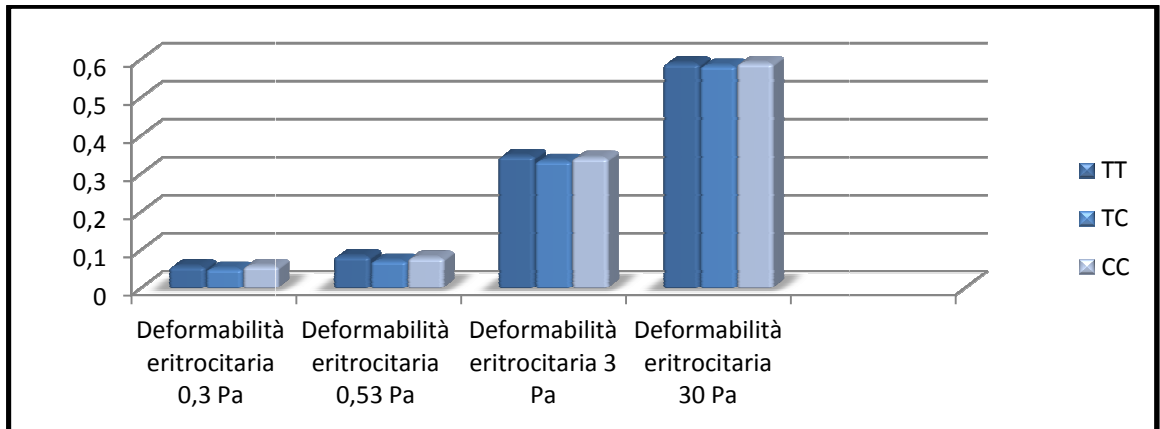
**Tabella 13** Distribuzione del genotipo e frequenze alleliche dei polimorfismi *eNOS* e del sistema RAS nella popolazione dei trapiantati renali (n=144)

Polimorfismi,genotipo o allele	pazienti	controlli	P	Polimorfismi,genotipo o allele	pazienti	Controlli	P
<b>eNOS -786 TC</b>				<b>ACE I/D</b>			
(CC)	33 (23,40)	9(13,2)		(DD)	55(38,99)	19(27,9)	
(TC)	70 (49,64)	41(60,39)	0,18	(ID)	64(45,37)	33(48,5)	0,19
(TT)	38 (26,94)	18(26,5)		(II)	22(15,59)	16(23,5)	
(C)	0,49	0,43	0,40	(D)	0,62	0,52	<b>0,007</b>
<b>eNOS VNTR 4a/4b</b>				<b>AGTR1 A/C</b>			
(aa)	4 (2,83)	1(1,5)		(AA)	64(45,37)	31(45,6)	
(ab)	39 (27,65)	17(25,0)	0,74	(AC)	61(43,24)	32(47,1)	0,64
(bb)	98 (69,48)	50(73,5)		(CC)	16(11,34)	5(7,4)	
(a)	0,16	0,13	0,56	(C)	0,33	0,30	0,73
<b>eNOS 894 GT</b>				<b>AGTM235T</b>			
(TT)	51 (36,15)	8(11,8)		(AA)	38(26,94)	22(32,4)	
(TC)	67 (47,50)	37(54,4)	<b>0,003</b>	(AG)	80(56,72)	39(57,4)	0,44
(GG)	23 (16,30)	23(33,8)		(GG)	23(16,30)	7(10,3)	
(T)	0,41	0,38	0,91	(G)	0,45	0,38	0,29

Nei pazienti portatori dell'allele D del polimorfismo *ACE I/D* abbiamo osservato una ridotta deformabilità eritrocitaria . Nel polimorfismo del recettore *AGTR1* i portatori dell'allele C tendono ad avere deformabilità eritrocitaria più bassa misurata alle shear stress 0,53 mPa [0,082-0,077-0,066; P<0,001] e 3Pa [0,344-0,325-0,333(P=0,002)]. Invece la deformabilità risultava aumentata nei pazienti omozigoti per l'allele T del polimorfismo *AGTM235T* (**Figura 18**). E' stato inoltre valutato il peso del carico allelico relativo ai 6 polimorfismi sulla modulazione dei parametri emoreologici con la divisione in 2 gruppi (cut off) : 1) gruppo con divisione degli alleli da 0-5 a 6-9 2) gruppo con alleli 0-4 e 5-9 . In ambedue i casi abbiamo riscontrato una diminuzione della deformabilità eritrocitaria con l'aumentare del numero degli alleli sfavorevoli (**Grafico 19**).

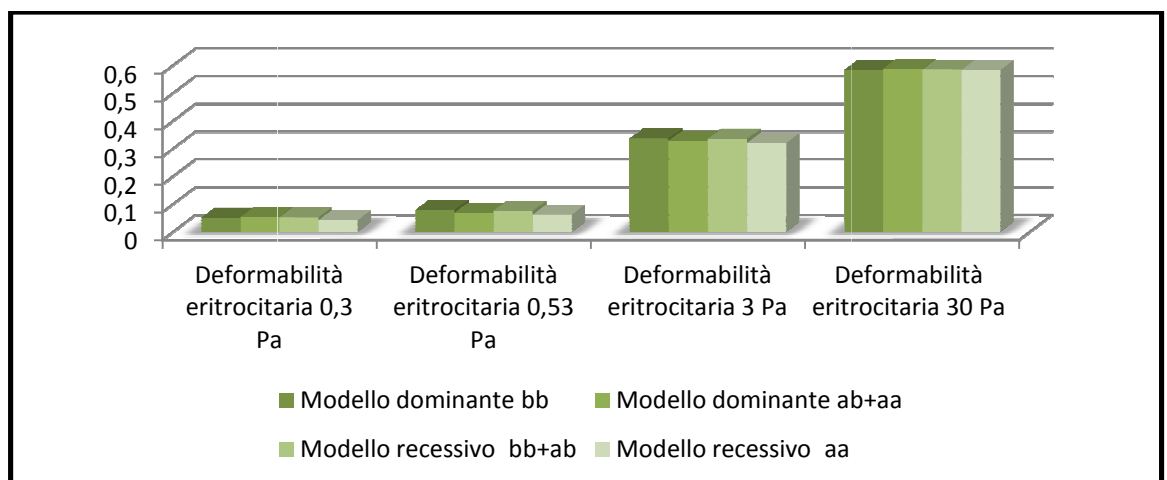
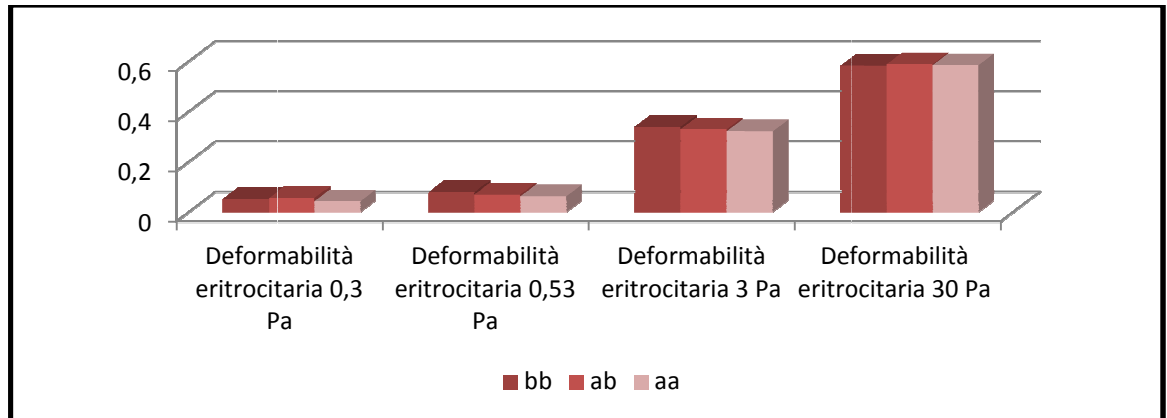
**Figura 16:** Deformabilità ed aggregazione eritrocitaria nel polimorfismo eNOS

786T>C



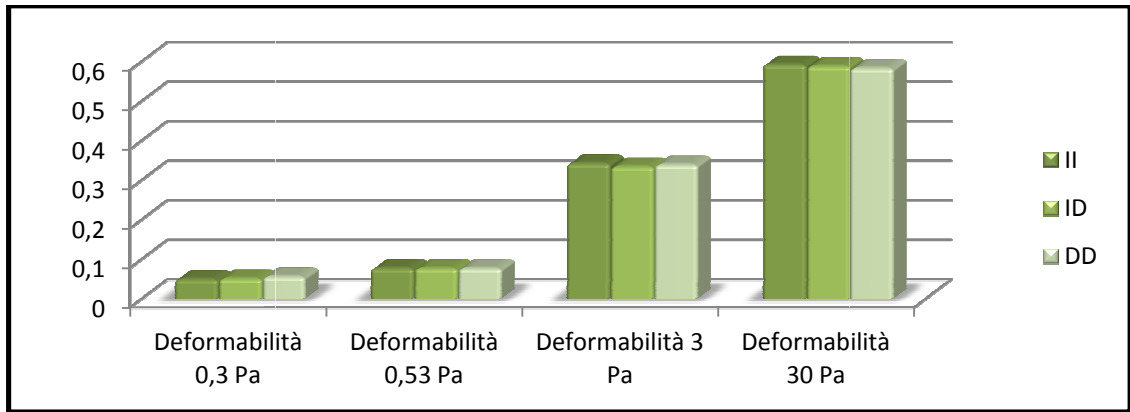
**Figura 17: Deformabilità eritrocitaria nel polimorfismo VNTR 4a/4b a) in relazione al genotipo**

**a) nei due modelli dominante e recessivo**

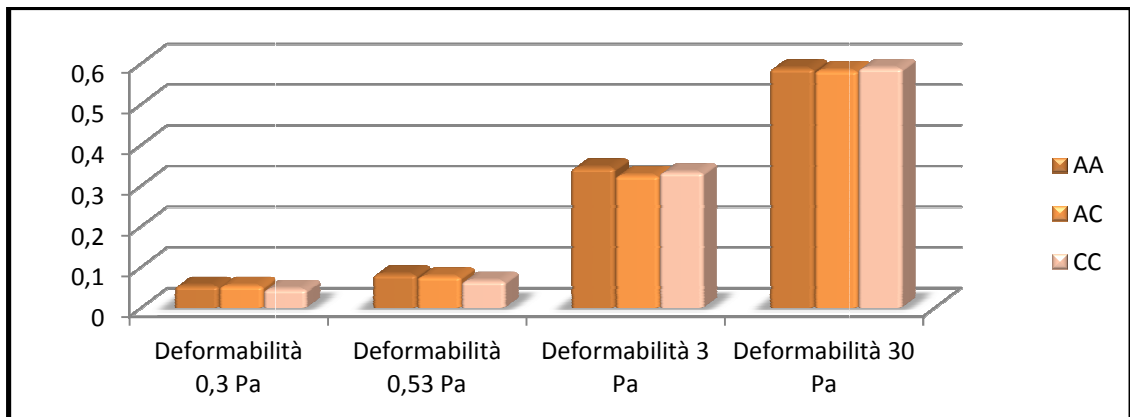


**Figura 18: Deformabilità eritrocitaria nel sistema renina-angiotensina**

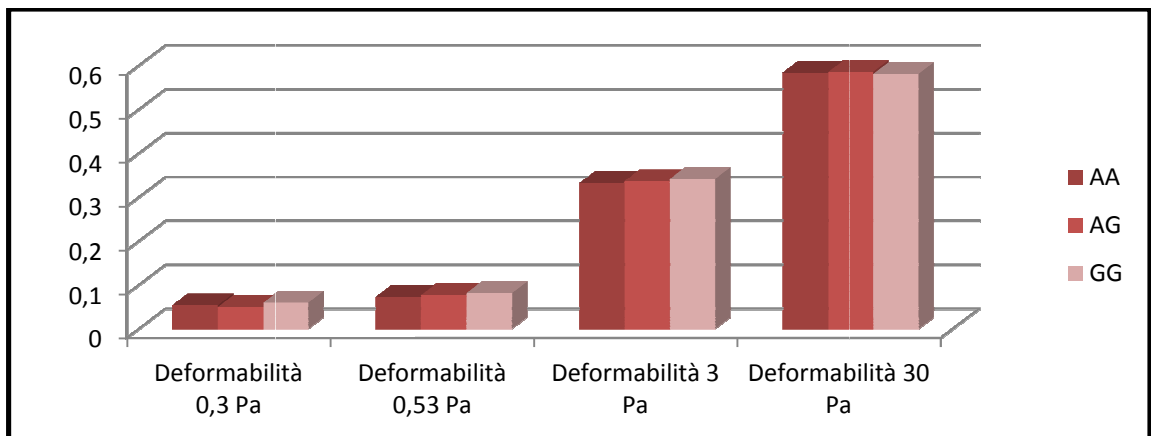
**Polimorfismo ACE I/D**



**Polimorfismo AGTR1 1166 A>C**

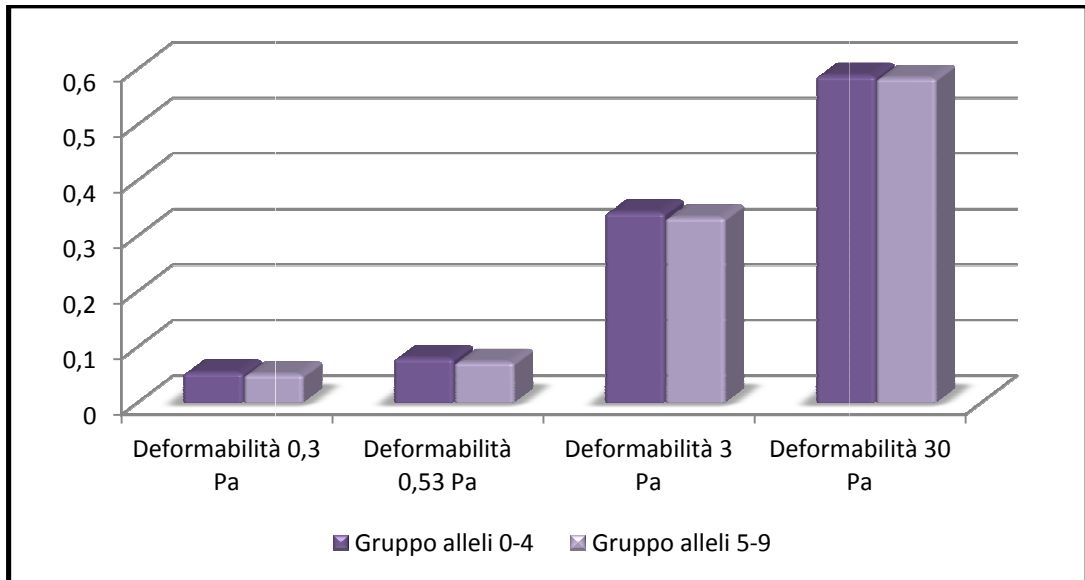


**Polimorfismo M235T**

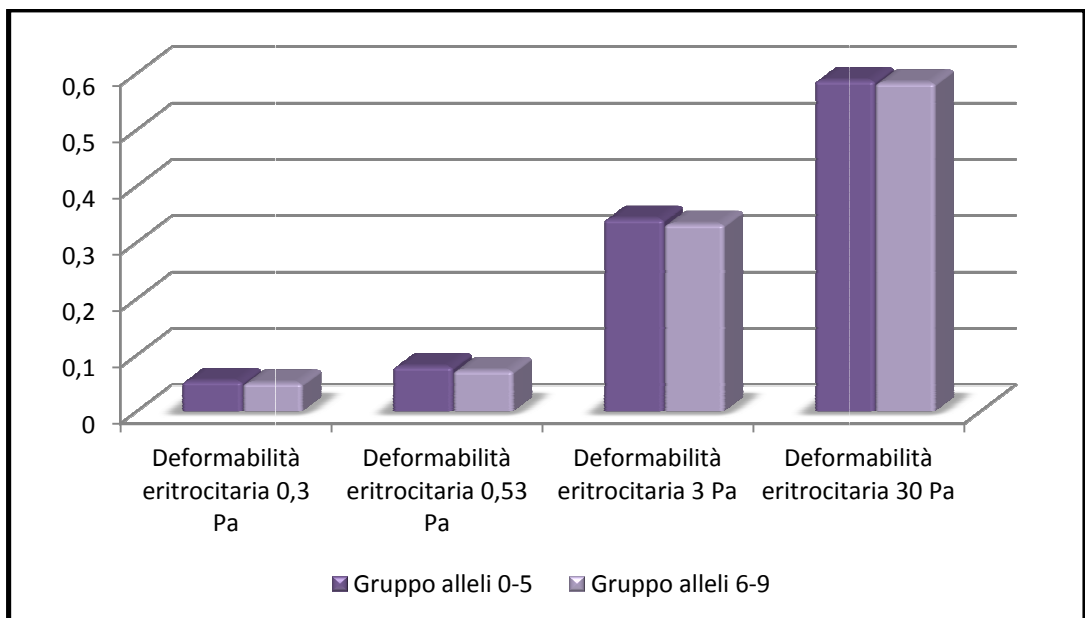


**Figura19 : carico allelico a) gruppo 1 b) gruppo 2**

**a)**



**b)**



## 8.COMMENTO

In questo studio è stato analizzato il profilo emoreologico in due modelli di popolazione con patologia vascolare (malattia arteriosa periferica e pazienti sottoposti a trapianto renale) per la valutazione del profilo di rischio cardiovascolare attraverso la determinazione della viscosità ematica, della viscosità plasmatica e della deformabilità ed aggregazione eritrocitaria. Inoltre sono stati studiati i polimorfismi genetici nei geni candidati della nitrossido sintasi endoteliale (*eNOS -786 T>C*, *eNOS 4 a/4b*, *eNOS 894 G>T*) e del sistema renina-angiotensina (*ACE I/D*, *AGTR1 1166 A>C*, *AGT M235T*) ed il loro ruolo nella modulazione dei parametri emoreologici. Studi clinici hanno analizzato l'associazione tra alcune variabili del profilo emoreologico e la malattia arteriosa periferica (*Pretolani et al. 1983*, *Coccheri et al.1985*, *Koenig et al. 1988*, *Poredos et al. 1996*, *Smith et al. 1998*, *Lee et al. 1999*, *Koscielny et al. 2004*, *Mika et al. 2006*, *Tzoulaki et al. 2007*), dimostrando una correlazione tra aumentati livelli di viscosità plasmatica ed incidenza della malattia (*Koscielny et al. 2004*) e suggerendo un ruolo nello sviluppo della patologia arteriosa periferica (*Tzoulaki et al. 2007*).

Il nostro studio, condotto in un'ampia popolazione, ha indagato tutti i parametri del profilo emoreologico, con particolare attenzione sulla deformabilità ed aggregazione eritrocitaria che sono state valutate attraverso due metodiche: la tradizionale Myrenne e la più recente e sensibile L.O.R.C.A. I nostri risultati hanno messo in evidenza una significativa associazione tra un alterato profilo emoreologico e la patologia. In particolare abbiamo osservato un'aumentata viscosità plasmatica ed una ridotta deformabilità eritrocitaria suggerendo il ruolo di un alterato ambiente vascolare nella modulazione del rischio di malattia. Inoltre abbiamo osservato che l'aumentata viscosità plasmatica si associava alla malattia indipendentemente dai livelli di fibrinogeno e dei lipidi circolanti come colesterolo, trigliceridi, HDL, LDL, che sappiamo essere determinanti di tale parametro emoreologico e modulava il rischio di patologia in

accordo con i dati precedenti (*Ruhenstroth-Bauer et al. 1985, Dupuy-Fons et al. 1996, Cicco et al. 2007*).

L'analisi del profilo emoreologico attraverso lo studio di tutti i suoi parametri è stata condotta anche su una popolazione ad alto rischio cardiovascolare come i pazienti sottoposti a trapianto renale. I nostri risultati che hanno messo in evidenza, anche in questo gruppo, la presenza di un alterato profilo emoreologico, in particolare un'aumentata viscosità ematica e plasmatica ed una ridotta deformabilità eritrocitaria, rinforzando studi clinici i quali dimostrano che un alterato profilo reologico è in grado di compromettere il flusso micro circolatorio nella patologia renale con conseguente aggravamento dell'insufficienza renale ed aumentato rischio cardiovascolare (*Lowe 1987, Linde et al. 1999, Koppensteiner et al. 1996*). E' stato inoltre recentemente dimostrato in uno studio del nostro gruppo che un' iperviscosità, che è in grado di determinare un danno microvascolare, può rappresentare un possibile meccanismo patofisiologico della base della patologia renale; un' alterata fluidità del sangue può infatti influenzare la perfusione del tessuto e determinare un'alterata risposta funzionale (*Zanazzi et al. 2010*).

Una ridotta disponibilità di NO geneticamente determinata può favorire la disfunzione endoteliale e peggiorare l'ambiente vascolare attraverso l'alterazione dei parametri emoreologici. E' stato dimostrato che ridotti livelli di NO correlati alla presenza di varianti polimorfiche funzionali nel gene *eNOS* è responsabile di una ridotta deformabilità dei globuli rossi (*Korbut et al. 1993, Bor-Kucukatay et al. 2003, Bateman et al. 2001*). Inoltre studi condotti su modelli di popolazione con patologia del microcircolo (*Fatini et al. 2002, Mannini et al. 2007*) hanno confermato l'associazione fra polimorfismi genetici del gene *eNOS* ed un alterato ambiente emoreologico. Il ruolo del gene *eNOS* nel modulare la risposta emoreologica in pazienti con patologia vascolare è stato confermato anche in questo studio in cui abbiamo osservato che i pazienti omozigoti per l'allele C del polimorfismo *eNOS -786T>C* avevano una ridotta deformabilità eritrocitaria : dato che è stato osservato in entrambe la patologie



vascolari analizzate. Anche gli altri polimorfismi funzionali del gene *eNOS 4a/4b ed 894 G>T* sono risultati influenzare i parametri emoreologici suggerendo che una ridotta disponibilità di NO geneticamente determinata, attraverso la modulazione della viscosità ematica e dei suoi singoli componenti può essere indirettamente responsabile della patologia vascolare anche in distretti differenti del microcircolo. Il meccanismo attraverso il quale una ridotta disponibilità di NO sia in grado di influenzare le componenti reologiche ed in particolare la deformabilità del globulo rosso è stato oggetto di studi sperimentali. E' stato ipotizzato un effetto regolatorio sulla deformabilità eritrocitaria tramite guanilato ciclasi solubile coinvolta nella produzione di cGMP e studi sperimentali hanno dimostrato il ruolo del NO nel modulare il trasporto ionico attraverso la membrana cellulare (*De Oliveira et al. 1999*) tramite la riduzione dei livelli di calcio citosolici (*Pernollet et al. 1996*).

Nel nostro studio oltre ai polimorfismi nel gene *eNOS* abbiamo analizzato il ruolo dei polimorfismi nei geni del sistema renina-angiotensina in relazione alla modulazione dei parametri emoreologici . I nostri risultati hanno messo in evidenza una associazione tra l'allele D del gene *ACE I/D*, che modula con effetto dose-dipendente i livelli di angiotensina circolante e la deformabilità eritrocitaria.

Studi clinici documentano l'associazione tra polimorfismi nei geni candidati del sistema renina-angiotensina e la suscettibilità all'arteriopatia periferica (*Basar et al. 2007*), ma non ci sono dati relativi al ruolo di questi polimorfismi nell'influenzare i parametri emoreologici in popolazioni con arteriopatia periferica o ad alto rischio cardiovascolare come i pazienti sottoposti a trapianto renale. I risultati del nostro studio, che hanno evidenziato la correlazione tra gene *ACE I/D* e la ridotta deformabilità eritrocitaria, sono pertanto di particolare interesse in quanto permettono di ipotizzare un nuovo meccanismo attraverso il quale il sistema renina-angiotensina, modulando componenti reologiche, sia in grado di influenzare il rischio di malattia. Uno studio sperimentale (*Bor-Kucucatay et al. 2006*) ha analizzato il ruolo del polimorfismo I/D del gene *ACE* nell'influenzare i parametri emoreologici in soggetti sani ma non sono presenti in

letteratura dati relativi al potenziale ruolo dei polimorfismi degli altri geni del sistema renina-angiotensina *AGTR1* e *AGTM235T*. Il nostro studio che ha analizzato il ruolo anche di questi due geni nel modulare i parametri emoreologici è di particolare interesse soprattutto in relazione ad un loro coinvolgimento nell'influenzare la deformabilità eritrocitaria e suggerisce pertanto il coinvolgimento di tutte le componenti del sistema renina-angiotensina nell'influenzare l'ambiente reologico in pazienti ad alto rischio vascolare. Altro dato nuovo che emerge dal nostro studio è stata l'osservazione che la contemporanea presenza di più componenti genetiche funzionali potenzia l'effetto negativo sui parametri emoreologici. Abbiamo osservato che un profilo genetico caratterizzato dalla presenza di 6 varianti polimorfiche si associava ad un peggioramento del profilo fenotipico emoreologico. I polimorfismi analizzati non sembravano influenzare l'aggregazione eritrocitaria mentre un dato interessante potrebbe emergere dall'analisi dell'indice di disaggregazione che è risultato sempre più alto in pazienti portatori della variante rara T del polimorfismo *eNOS 894 G>T*. Questo parametro che indica il minimo livello di shear rate necessario a rompere gli aggregati esistenti è un marcatore emoreologico emergente e rappresenta un indice di stabilità dell'aggregato.

In conclusione lo sviluppo di ricerche indirizzate all'analisi, da un lato, di genotipi funzionali mediante metodologie altamente specifiche determinanti la viscosità ematica, in particolare eritrocitaria e dall'altro, all'analisi di genotipi di "sistemi" fondamentali per la risposta vascolare può offrire uno strumento per una più precisa definizione dei meccanismi coinvolti nella comparsa e nella progressione di alterazioni vascolari che sono alla base di condizioni cliniche caratterizzate da frequente comorbidità e per questo a prognosi peggiore e di più difficile trattamento.

## **Bibliografia**

- **Abendroth D**, Landgraf R, Pfeiffer M, Reininger J, Seidel D, Land W Long-term follow-up of lipid metabolism and rheologic properties after successful pancreas and kidney transplantation Transpl. Int. **1994**;7 Suppl 1:S417-9.
- **Akcay A**, Sezer S, Ozdemir FN, Arat Z, Atac FB, Verdi H, Colak T, Haberal M Association of the genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and endothelial nitric oxide synthase with chronic renal transplant dysfunction. Transplantation. **2004** Sep 27;78(6):892-8.
- **Alexy T**, Pais E, Armstrong JK, Meiselman HJ, Johnson CS, Fisher TC. Rheologic behavior of sickle and normal red blood cell mixtures in sickle plasma: implications for transfusion therapy. Transfusion **2006**;46:912-8.
- **American Diabetes Association**. Peripheral arterial disease in people with diabetes. Diabetes Care **2003**; 26:3333–3341.
- **Andrès V**, Castro C and Campistol J M. Potential role of proliferation signal inhibitors on atherosclerosis in renal transplant patients Nephrol Dial Transplant **2006** ; 21 [Suppl 3]: iii14–iii17.
- **Apostolakis S**, Papadakis EG, Krambovitis E and Spandidos DA: Chemokines in vascular pathology .Int. J. Mol. Med. **2006**,17:691-701.
- **Argani H**, Noroozianavval M, Aghaeishahsavari M, Veisi P, Rashtchizadeh N, Ghorbanihaghjo A, Bonyadi M, Asgarzadeh M, Hamzeiy H. Renin-angiotensin system polymorphisms and renal graft function in renal transplant recipients. Saudi Med. J. **2007** Oct;28(10):1496-502.
- **Atlas SA**. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. J Manag Care Pharm. **2007** Oct;13(8 Suppl B):9-20.
- **Babaoglu MO**, Dikmenoglu N, Ileri-Gurel E, Seringec N, Zoto T, Yasar U, Kayaalp SO, Bozkurt A. Functional effects of endothelial nitric oxide synthase genetic polymorphisms on haemorheological parameters in healthy human individuals. Basic Clin Pharmacol Toxicol. **2011** Mar;108(3):171-6.
- **Balligand JL**, Feron O, Dessy C. eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. Physiol Rev. **2009** Apr;89(2):481-534.
- **Banerjee AK**, Pearson J, Gilliland EL, Goss D, Lewis JD. A six year prospective study of fibrinogen and other risk factors associated with mortality in stable claudicants. Thromb Haemost. **1992** Sep 7;68(3):261-3.
- **Barbato J E** Tzeng E. Nitric oxide and arterial disease. J vasc surg ;**2004** 40 187-193.
- **Barnes G** & Frieden E. Ceruloplasmin receptors of erythrocytes. Biochemical and Biophysical Research Communications **1984** ;125, 157-162.
- **Barnett HJ**, Meldrum HE, Eliasziw M; North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial (**NASCET**) collaborators. The appropriate use of carotid endarterectomy. CMAJ. **2002** Apr 30;166(9):1169-79.
- **Bartholomew JR**, Olin JW. Pathophysiology of peripheral arterial disease and risk factors for its development. Cleve Clin J Med. **2006** Oct;73 Suppl 4:S8-14.
- **Başar Y**, Salmayenli N, Aksoy M, Seçkin S, Aydin M, Ozkök E. ACE gene polymorphism in peripheral vascular disease. Horm Metab Res. **2007** Jul;39(7):534-7.
- **Baskurt O K**, Hardemann M R., Rampling M.W., Meiselman H J. Handbook of hemorheology and hemodynamics. IOS PRESS **2007**.
- **Baskurt OK** and Meiselman HJ, Determination of red blood cell shape recovery time constant in a Couette system by the analysis of light reflectance and ektacytometry. Biorheology 33 **1996**, 489–503.
- **Baskurt OK**, Boynard M, Cokelet GC, Connes P, Cooke BM, Forconi S, Liao F, Hardeman MR, Jung F, Meiselman HJ, Nash G, Nemeth N, Neu B, Sandhagen B, Shin S, Thurston G, Wautier JL; International Expert Panel for Standardization of Hemorheological Methods. New guidelines for hemorheological laboratory techniques. Clin Hemorheol. Microcirc. **2009**;42(2):75-97.
- **Baskurt OK**, Meiselman HJ. Blood rheology and hemodynamics. Semin. Thromb. Hemost. **2003** Oct;29(5):435-50.
- **Baskurt OK**, Yalcin O, Ozdem S, Armstrong J K., and Meiselman H J. Modulation of endothelial nitric oxide synthase expression by red blood cell aggregation . Am J Physiol Heart Circ Physiol **2004**; 286: H222–H229.

- **Basset** el-EA, Berthoux P, Cécillon S, Deplre C, Thibaudin D, De Filippis JP, Alamartin E, Berthou F. Hypertension after renal transplantation and polymorphism of genes involved in essential hypertension: ACE, AGT, AT1 R and ecNOS. Clin. Nephrol. **2002** Mar;57(3):192-200.
- **Bateman** RM, Jagger JE, Sharpe MD, Ellsworth ML, Mehta S, Ellis CG. Erythrocyte deformability is a nitric oxide-mediated factor in decreased capillary density during sepsis. Am J Physiol Heart Circ Physiol. **2001** Jun;280(6):H2848-56.
- **Beckman** JA, Preis O, Ridker PM and Gerhard-Herman M: Comparison of usefulness of inflammatory markers in patients with versus without peripheral arterial disease in predicting adverse cardiovascular outcomes (myocardial infarction, stroke, and death). Am. J. Cardiol. **2005**; 96: 1374-1378.
- **Bell** L, Madri J. Influence of the angiotensin system on endothelial and smooth muscle cell migration. Am J Pathol **1990**;137:7–12.
- **Bellos** JK, Perrea DN, Theodotopoulou E, Vlachos I, Kostakis AI. Nitric oxide production as an indicator of recurrence of focal and segmental glomerulosclerosis following kidney transplantation. Saudi J Kidney Dis Transpl. **2011** Sep;22(5):1030-2.
- **Benetos** A, Safar ME. Aortic collagen, aortic stiffness, and AT1 receptors in experimental and human hypertension. Can J Physiol Pharmacol. **1996** Jul;74(7):862-6.
- **Benter** IF, Yousif MH, Dhaunsi GS, Kaur J, Chappell MC, Diz DI. Angiotensin-(1-7) prevents activation of NADPH oxidase and renal vascular dysfunction in diabetic hypertensive rats. Am J Nephrol. **2008**;28(1):25-33.
- **Berliner** S, Rogowski O, Aharonov S, Mardi T, Tolshinsky T, Rozenblat M, Justo D, Deutsch V, Serov J, Shapira I, Zeltzer D. Erythrocyte adhesiveness/aggregation: a novel biomarker for the detection of low-grade internal inflammation in individuals with atherothrombotic risk factors and proven vascular disease. Am Heart J. **2005** Feb;149(2):260-7
- **Beutler** BA, Milsark IW and Cerami A: Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo. J Immunol **1985**;135: 3972-3977.
- **Beyga** ZT, Kahan BD: Surgical complications of renal transplantation. J Nephrol **1998**;11:137.
- **Bieber** LL. Carnitine. Ann Rev Biochem **1988**;57:261-83.
- **Biesiada** G, Krzemień J, Czepiel J, Teległów A, Dabrowski Z, Spodaryk K, Mach T. Rheological properties of erythrocytes in patients suffering from erysipelas. Examination with LORCA device. Clin Hemorheol Microcirc. **2006**;34(3):383-90.
- **Boas** FE, Forman L, Beutler E. Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia. Proc Natl Acad Sci U S A **1998**;95:3077–81.
- **Bolli** P, Sticchi E, Abbate R, Fatini C. A novel allele of eNOS gene in the Italian population: the actual essence of intron 4 polymorphism. Nitric Oxide. **2007** May;16(3):392-4.
- **Bonetti** PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction. A marker of atherosclerotic risk. Arterioscler Thromb Vasc Biol **2003** 23:168.
- **Borkakoti** N: Structural studies of matrix metalloproteinases. J Mol Med **2000** 78(5): 261-268.
- **Bor-Kucukatay** M, Demir S, Akbay R, Dursunoglu D, Akdag B, Semiz E. Relationship between hemorheology and Glu(298)Asp polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene in patients with coronary artery disease. Mol Biol Rep. **2010** Jan;37(1):171-8.
- **Bor-Kucukatay** M, Demir S, Akbay R, Dursunoglu D, Akdag B, Semiz E. Relationship between hemorheology and Glu(298)Asp polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene in patients with coronary artery disease. Mol Biol Rep. **2010** Jan;37(1):171-8.
- **Bor-Kucukatay** M, Turgut S, Emmungil G, Turgut G, Kucukatay V. Increased deformability of red blood cells is associated with a deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene. Tohoku J Exp Med. **2006** Feb;208(2):147-55.
- **Bor-Kucukatay** M, Wenby RB, Meiselman HJ, and Baskurt O K Effects of nitric oxide on red blood cell deformability AJP-Heart Circ Physiol **2003**; vol 284.
- **Bottiger** L.E., Carlson L.A. Stockholm Prospective Study II--9 years follow-up. Lakartidningen. **1972** ;69:4640 4.
- **Boulanger** CM, Caputo L, Lévy BI. Endothelial AT1-mediated release of nitric oxide decreases angiotensin II contractions in rat carotid artery. Hypertension. **1995** Nov;26(5):752-7.
- **Branemark** PI, Bagge U. Intravascular rheology of erythrocytes in man. Blood Cells. **1977**;3:11-24.

- **Brass EP, Hiatt WR, Gardner AW, Hoppel CL.** Decreased NADH dehydrogenase and ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase in peripheral arterial disease. Am J Physiol **2001**;280:H603- H609
- **Brass EP, Hoppel CL.** Relationship between acid-soluble carnitine and coenzyme A pools in vivo. Biochem J **1980**;190:495- 504.
- **Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Frasch SC, Nakamura T, Henson PM.** Polyamine regulation of plasma membrane phospholipid flip-flop during apoptosis. J Biol Chem. **1999**;274:28113-20.
- **Brevetti G, Martone VD, de Cristofaro T, et al:** High levels of adhesion molecules are associated with impaired endotheliumdependent vasodilatation in patients with peripheral arterial disease. Thromb Haemost **2001**;85: 63-66.
- **Brewster UC, Perazella MA** The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. Am J Med. **2004** Feb 15;116(4):263-72.
- **Brown RD, Thorén P, Steege A, Mrowka R, Sällström J, Skøtt O, Fredholm BB, Persson AE.**Influence of the adenosine A1 receptor on blood pressure regulation and renin release.Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. **2006** May;290(5):R1324-9.
- **Bryan N S et al.** Cellular targets and mechanisms of nitros(yl)ation: an insight into their nature and kinetics in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (**2004**) 101, 4308–4313.
- **Buehler PW, Alayash AI.** Oxygen sensing in the circulation: “cross talk” between red blood cells and the vasculature. Antioxid Redox Signal **2004**;6:1000–10.
- **Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG.**Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter.Nature. **1990** May 24;345(6273):346-7.
- **Büscher R, Nagel D, Finkelberg I, Büscher AK, Wingen AM, Kranz B, Vester U, Hoyer PF.**Donor and recipient ACE I/D genotype are associated with loss of renal function in children following renal transplantation. Pediatr Transplant. **2011** Mar;15(2):214-20.
- **Butler AR, Megson IL, and Wright PG.** Diffusion of nitric oxide and scavenging by blood in the vasculature. Biochim Biophys Acta **1998**;1425: 168–176.
- **Cabel M, Meiselman HJ, Popel AS, Johnson PC.** Contribution of red blood cell aggregation to venous vascular resistance in skeletal muscle. Am J Physiol. **1997** Feb;272(2 Pt 2):H1020-32.
- **Caimi G** Emoreologia e sindromi da iperviscosità Rapporti ISTISAN 03/13 2002.
- **Calderoni R, Pasqua A, Gini R, Francesconi P,** Malattie croniche negli anziani in Toscana stima di popolazioni attuali e proiezioni future Documento ARS Toscana giugno **2008**.
- **Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, Bard JM, Bara L, Ricard S, et al.**Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction.Nature. **1992** Oct 15;359(6396):641-4.
- **Candipan RC, Wang BY, Buitrago R, Tsao PS, Cooke JP.** Regression or progression. Dependency on vascular nitric oxide. Arterioscler Thromb Vasc Biol. **1996** Jan;16(1):44-50.
- **Carluccio M, Soccio M, De Caterina R.** Aspects of gene polymorphisms in cardiovascular disease: the renin-angiotensin system. Eur J Clin Invest. **2001** Jun;31(6):476-88.
- **Carrel A:** La technique opératoire des anastomoses vasculaires et la transplantation des viscères. Lyon Med 98:859, **1902**
- **Casado JA, Merino J, Cid J, Subira ML, Sanchez-Ibarrola A.** The type of interaction with Fc gamma R in human monocytes determines the efficiency of the generation of oxidative burst. Immunology **1994**;83:148–54.
- **Cestaro B, Gandini R, Viani P, Maraffi F, Cervato G, Montalto C, Gatti P, Megali R** Fluorescence-determined kinetics of plasma high oxidability in diabetic patients. Biochem Mol Biol Int. **1994** Apr;32(5):983-94.
- **Chambliss KL, Shaul PW.** Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. Endocr Rev. **2002** Oct;23(5):665-86.
- **Chaturani P, Narasimman S.** Theory for flow of Casson and Herschel-Bulkley fluids in cone-plate viscometers. Biorheology **1988**;25:199-207.
- **Chen C. & Schachter, D.** Elevation of plasma immunoglobulin A in the spontaneously hypertensive rat. Hypertension **1993**.; 21, 731-738.
- **Chien S, Usami S, Taylor HM, Lundberg JL, Gregersen MI.** Effects of hematocrit and plasma proteins on human blood rheology at low shear rates. J Appl Physiol. **1966**;21:81-7.
- **Chien S.** Present state of blood rheology. In: Messmer K, Schmid-Schonbein H, editors. Hemodilution: Theoretical basis and clinical application. Basel: S Karger; **1972**:1-40.

- **Chien S.** Rheology in the microcirculation in normal and low flow states. Adv Shock Res. **1982**;8:71-80.
- **Chien S., J. Dormandy, E. Ernst and A. Matrai .** Clinical Hemorheology. Martinus Nijhoff Publishers, **1987**.
- **Cho YI, Cho D J .** Hemorheology and Microvascular .Disorders **Korean Circ J** **2011**;**41**:**287-295**.
- **Cho YI, Kensey KR.** Effects of the non-Newtonian viscosity of blood on flows in a diseased arterial vessel: part 1: steady flows. Biorheology **1991**;28:241-62.
- **Chwała M, Spannauer A, Teległów A, Cencora A, Marchewka A, Hardeman MR, Dabrowski Z.** Red blood cell rheology in patients with chronic venous disease (CVD). Clin Hemorheol Microcirc. **2009**;41(3):189-95.
- **Cicco G, Carbonara MC, Stingi GD, Pirrelli A.** Cytosolic calcium and hemorheological patterns during arterial hypertension. Clin Hemorheol Microcirc. **2001**;24(1):25-31
- **Cicco G, Cicco S.** Hemorheology and microcirculation in some pathologies of internal medicine Minerva Med. **2007** Dec;98(6):625-31.
- **Cicco G, Vicenti P, Stingi GD, Tarallo, Pirrelli A.** Hemorheology in complicated hypertension. Clin Hemorheol Microcirc. **1999**;21(3-4):315-9.
- **Clark MA, Diz DI, Tallant EA.** Angiotensin-(1-7) downregulates the angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth muscle cells. Hypertension. **2001** Apr;37(4):1141-6.
- **Clark MA, Tallant EA, Tommasi E, Bosch S, Diz DI.** Angiotensin-(1-7) reduces renal angiotensin II receptors through a cyclooxygenase-dependent mechanism. J Cardiovasc Pharmacol. **2003** Feb;41(2):276-83.
- **Clark MR, Shohet SB.** The effect of abnormal hemoglobins on the membrane regulation of cell hydration. Tex Rep Biol Med. **1980-1981**;40:417-29.
- **Coates D .** The angiotensin converting enzyme (ACE). Int J Biochem Cell Biol. **2003** Jun;35(6):769-73.
- **Coccheri S, Palareti G,** Significance of the rheological properties of blood in peripheral vascular pathology; Ric. Clin. Lab. **1985**; 15 : 155-61.
- **Cocklet GR, Meiselman HJ.** Blood rheology. In: Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, Meiselman HJ, editors. Handbook of Hemorheology and Hemodynamics. Washington, DC: IOS Press;**2007**. p.45-71.
- **Cooper RA.** Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and cell function in human red blood cells. J Supramol Struct. **1978**;8:413-30.
- **Cortellaro M, Cofrancesco E, Boschetti C, et al:** Association of increased fibrin turnover and defective fibrinolytic capacity with leg atherosclerosis. The PLAT Group. Thromb Haemost **1994**;72:292-296.
- **Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, Oliveira-dos-Santos AJ, da Costa J, Zhang L, Pei Y, Scholey J, Ferrario CM, Manoukian AS, Chappell MC, Backx PH, Yagil Y, Penninger JM.** Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. Nature. **2002** Jun 20;417(6891):822-8.
- **Crane BR ed al.** The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes Science **1997** 278 425-431.
- **Crawford J, Cox EB and Cohen HJ,** Evaluation of hyperviscosity in monoclonal gammopathies, Amer. J. Med. (1985) 79 1:13-22.
- **Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF and Daemen MJ:** Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? Circ Res **2001**; 89: 201-210.
- **Crepaldi G, Muggeo M, Calabro A, Lapolla A.** Hemorheologic changes in various metabolic syndromes. Ric Clin Lab. **1981**;11 (Suppl 1):59-71.
- **Cruzado JM, Rico J, Grinyo JM,** The renin angiotensin system blockade in kidney transplantation : Transpl. Int **2008** 21 304-13.
- **Cuniberti LA, Martinez V, Schachter J, Magariños G, Meckert PC, Laguens RP, Levenson J, Werba JP.** Sialic acid as a protective barrier against neointima development. Atherosclerosis. **2005** Aug;181(2):225-31.
- **Danser AH, Batenburg WW, van Esch JH, Krop M.** Prorenin anno 2008. J Mol Med (Berl). **2008** Jun;86(6):655-8.
- **Danser AH, Deinum J.** Renin, prorenin and the putative (pro)renin receptor. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. **2005** Dec;6(3):163-5.
- **Das I:** Raised C-reactive protein levels in serum from smokers. Clin Chim Acta **1985**;153: 9-13.
- **Davis MJ, Hill MA.** Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. Physiol Rev. **1999** Apr;79(2):387-423.
- **De Graaf JC, Banga JD, Moncada S, Palmer RM, de Groot PG, Sixma JJ.** Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. Circulation. **1992** Jun;85(6):2284-90.
- **De Nigris F, Lerman LO, Ignarro SW, Sica G, Lerman A, Palinski W, Ignarro LJ, Napoli C.** Beneficial effects of antioxidants and L-arginine on oxidation-sensitive gene expression and endothelial NO synthase activity at sites of disturbed shear stress. Proc Natl Acad Sci U S A. **2003** Feb 4;100(3):1420-5.



- **De Oliveira CF**, Nathan LP, Metze K, Moreno H Jr, de Luca IM, Sucupira M, Zatz R, Zappellini A, Antunes E, de Nucci G. Effect of Ca<sup>2+</sup> channel blockers on arterial hypertension and heart ischaemic lesions induced by chronic blockade of nitric oxide in the rat. Eur J Pharmacol. **1999** Jun 4;373(2-3):195-200.
- **De Oliveira S.**, A.S. Silva-Herdade and C. Saldanha, Modulation of erythrocyte deformability by PKC activity. Clinical Hemorheology and Microcirculation 39(1-4) (**2008**), 363-373.
- **Death AK**, Fisher EJ, McGrath KC and Yue DK: High glucose alters matrix metalloproteinase expression in two key vascular cells: potential impact on atherosclerosis in diabetes. Atherosclerosis **2003** ;168: 263-269.
- **Delaunay J**, The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders. Blood Rev. (**2007**) 21, 1-20.
- **Di Perri T**, Forconi S. Introduzione all'emoreologia clinica. L'Aggiornamento del medico. **1985**;7/3:179.
- **Diagnosis and management of peripheral arterial disease** SIGN Scottish intercollegiate guidelines network October **2006**
- **Dibbs Z**, Thornby J, White BG and Mann DL: Natural variability of circulating levels of cytokines and cytokine receptors in patients with heart failure: implications for clinical trials. J Am Coll Cardiol **1999**;33: 1935-1942.
- **Dimitroulis D.**, Bokus J., Zavos G., Nikiteas N., Karidis N.P., Katsaronis P., and Kostakis A. Vascular Complications in Renal Transplantation: A Single-Center Experience in 1367 Renal Transplantations and Review of the Literature Transplantation Proceedings, (**2009**) 41, 1609-1614.
- **Dimmeler** ed al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation Nature **1999** 399 601-605.
- **Dintenfuss L**, Ibels LS. Blood viscosity factors and occlusive arterial disease in renal transplant recipients. Nephron. **1975**;15(6):456-65.
- **Ditzel J**, Kampmann J. Whole-blood viscosity, hematocrit and plasma protein in normal subjects at different ages. Acta Physiol Scand **1971**; 81:264-8.
- **Dollery CM**, McEwan JR and Henney AM: Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. Circ Res **1995**.;77: 863-868.
- **Dondorp AM**, Angus BJ, Chotivanich K, Silamut K, Ruangveerayuth R, Hardeman MR, Kager PA, Vreeken J, White NJ Red blood cell deformability as a predictor of anemia in severe falciparum malaria. Am J Trop Med Hyg. **1999** May;60(5):733-7.
- **Donoghue M**, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. Circ Res. **2000** Sep 1;87(5):E1-9.
- **Doolittle RF**. Angiotensinogen is related to the antitrypsin-antithrombin-ovalbumin family. Science. **1983** Oct 28;222(4622):417-9
- **Dormandy JA**. The clinical relevance of the flow properties of blood cells. Wien Med Wochenschr. **1986**;136 Spec No:41-3.
- **Dosenko VE**, Zagorij VY, Haytovich NV, Gordok OA, Moibenko AA. Allelic polymorphism of endothelial NO-synthase gene and its functional manifestations. Acta Biochim Pol. **2006**;53(2):299-302.
- **Dragun D**, Muller DN, Brasen JH, ed al. Angiotensin II type 1 receptor activating antibodies in renal allograft rejection N engl J med **2005** 352 558-69.
- **Du Clos TW**: Function of C-reactive protein. Ann Med **2000** ;32:274-278.
- **Du Y**, Yao W, Qian Y, Han M, Wen Z, Ma L Hemorheological changes in patients with living-donor renal transplantation. Clin Hemorheol Microcirc. **2011**;47(3):199-209.
- **Dupuy-Fons C**, Brun JF, Quere I, Bardet L, Janbon C Rheology and occlusive arterial disease of the legs. J Mal Vasc. **1996**;21(3):165-70.
- **Dutkiewicz G**, Domanski L, Binczak-Kuleta A, Pawlik A, Safranow K, Ciechanowicz A, Dziedziczko V, Ciechanowski K. The association between eNOS intron 4 VNTR polymorphism and delayed graft function of kidney allografts. Clin Transplant. **2010** Sep-Oct;24(5).
- **Elkind MS**, Cheng J, Boden-Albala B, et al: Tumor necrosis factor receptor levels are associated with carotid atherosclerosis. Stroke **2000** ;33: 31-37.
- **Engström G**, Lind P, Hedblad B, Stavenow L, Janzon L, Lindgärde F. Long-term effects of inflammation-sensitive plasma proteins and systolic blood pressure on incidence of stroke. Stroke. **2002** Dec;33(12):2744-9.
- **Ergün I**, Keven K, Sengül S, Karabulut HG, Kurultak I, Soypacaci Z, Erbay B. Endothelial nitric oxide synthase gene intron 4 polymorphism predicts new onset diabetes mellitus after transplantation in kidney allograft recipients treated with cyclosporin A. Int Urol Nephrol. 2011 Jun;43(2):543-8. Epub **2010** Jun 18.
- **Ersoy A**, Kahvecioglu S, Ersoy C ed al. Anemia due to losartan in hypertensive renal transplant recipients without posttransplant erythrocytosis. Transplant Proc **2005** 37 2148-50.
- **Esmon CT**: Does inflammation contribute to thrombotic events? Haemostasis **2000**;2: 34-40.

- **Fairbanks** G, Steck TL, Wallach DF. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*. **1971**;10:2606-17.
- **Fairchild** T A, Fulton D, Fontana J T, Gratton J P, McCabe T J, Sessa WC, Acidic Hydrolysis as a mechanism for the cleavage of glu298 asp variant of human endothelial nitric-oxide synthase *J Biol Chem*. **2001** Jul 13;276(28):26674-9.
- **Farhangi** M., Biology, Clinical patterns, and treatment of multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias, in: *The Immunopathologies of Lymphoreticular Neoplasms Comprehensive Immunology*, J.J. Twomey, ed. **1978**, Plenum Medical Book.
- **Fatini** C, Abbate R, Pepe G, Battaglini B, Gensini F, Ruggiano G, Gensini GF, Guazzelli R. Searching for a better assessment of the individual coronary risk profile. The role of angiotensin-converting enzyme, angiotensin II type 1 receptor and angiotensinogen gene polymorphisms. *Eur Heart J*. **2000** Apr;21(8):633-8.
- **Fatini** C, Gensini F, Sticchi E, Battaglini B, Angotti C, Conforti ML, Generini S, Pignone A, Abbate R, Matucci-Cerinic M. High prevalence of polymorphisms of angiotensin-converting enzyme (I/D) and endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) in patients with systemic sclerosis. *Am J Med*. **2002** May;112(7):540-4.
- **Fatini** C, Guiducci S, Abbate R, Matucci-Cerinic M. Vascular injury in systemic sclerosis: angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism. *Curr Rheumatol Rep*. **2004** Apr;6(2):149-55.
- **Fatini** C, Mannini L, Sticchi E, Cecchi E, Bruschetti A, Leprini E, Pagnini P, Gensini GF, Prisco D, Abbate R. eNOS gene affects red cell deformability: role of T-786C, G894T, and 4a/4b polymorphisms. *Clin Appl Thromb Hemost*. **2005** Oct;11(4):481-8.
- **Fatini** C, Pratesi G, Sofi F, Gensini F, Sticchi E, Lari B, Pulli R, Dorigo W, Azas L, Pratesi C, Gensini GF, Abbate R. ACE DD genotype: a predisposing factor for abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. **2005** Mar;29(3):227-32.
- **Faxon** DP, Fuster V, Libby P, et al. Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group III: pathophysiology. *Circulation* **2004**; 109:2617–2625.
- **Fedor** R., Asztalos L., Lócsey L., Szabó L., Mányiné I.S., Fagyas M., Lizanecz E., and Tóth A. Insertion/Deletion Polymorphism of the Angiotensin-Converting Enzyme Predicts Left Ventricular Hypertrophy After Renal Transplantation *Transplantation Proceedings*, (**2011**) 43, 1259–1260.
- **Feron** O ed al. The endothelial nitric oxide synthase –caveolin regulatory cycle *J. Biol. Chem.*. **1998** 273 3125-3128.
- **Ferrario** CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DI. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension*. **1997** Sep;30(3 Pt 2):535-41.
- **Ferrario** CM, Stawn WB Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Proinflammatory Mediators in Cardiovascular Disease *Am J Cardiol* **2006**;98:121–128.
- **Fleisher** LA, Beckman JA, Brown KA, Calkins H, Chaikof E, Fleischmann KE, Freeman WK, Froehlich JB, Kasper EK, Kersten JR, Riegel B, Robb JF; ACC/AHA TASK FORCE MEMBERS, Smith SC Jr, Jacobs AK, Adams CD, Anderson JL, Antman EM, Buller CE, Creager MA, Ettinger SM, Faxon DP, Fuster V, Halperin JL, Hiratzka LF, Hunt SA, Lytle BW, Md RN, Ornato JP, Page RL, Riegel B, Tarkington LG, Yancy CW. ACC/AHA 2007 Guidelines on Perioperative Cardiovascular Evaluation and Care for Noncardiac Surgery: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines on Perioperative Cardiovascular Evaluation for Noncardiac Surgery): Developed in Collaboration With the American Society of Echocardiography, American Society of Nuclear Cardiology, Heart Rhythm Society, Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, and Society for Vascular Surgery. *Circulation*. **2007** Oct 23;116(17):1971-96. Erratum in: *Circulation*. 2008 Aug 26;118(9): e141-2.
- **Foley** RN, Parfrey PS, Samak MJ, Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease *Am.J.Kidney Dis* **1998** 32:112.
- **Fonseca** AM, Porto G, Uchida K, Arosa FA. Red blood cell inhibits activation-induced cell death and oxidative stress in human peripheral blood T lymphocytes. *Blood* **2001**;97:3152–60.
- **Fowkes** FG Epidemiology of peripheral vascular disease. *Atherosclerosis*. **1997** Jun;131 Suppl:S29-31.
- **Fowkes** FG, Housley E, Cawood EH, Macintyre CC, Ruckley CV, Prescott RJ. Edinburgh Artery Study: prevalence of asymptomatic and symptomatic peripheral arterial disease in the general population. *Int J Epidemiol*. **1991** Jun;20(2):384-92.
- **Foy** CA, Rice GI, Ossei-Gerning N, Mansfield MW, Grant PJ. Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphisms in patients characterised by coronary angiography. *Hum Genet*. **1997** Sep;100(3-4):420-5.
- **Fraga-Silva** RA, Pinheiro SV, Gonçalves AC, Alenina N, Bader M, Santos RA The antithrombotic effect of angiotensin-(1-7) involves mas-mediated NO release from platelets. *Mol Med*. **2008** Jan Feb;14(1-2):28-35.



- **Fukamizu A**, Takahashi S, Seo MS, Tada M, Tanimoto K, Uehara S, Murakami K. Structure and expression of the human angiotensinogen gene. Identification of a unique and highly active promoter. *J Biol Chem.* **1990** May 5;265(13):7576-82.
- **Fukuhara M**, Geary RL, Diz DI, Gallagher PE, Wilson JA, Glazier SS, Dean RH, Ferrario CM. Angiotensin-converting enzyme expression in human carotid artery atherosclerosis. *Hypertension* **2000**;35:353–359.
- **Fulton** ed al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt *Nature* **1999** 399 597-601.
- **Furchgott R.F.** Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Biosci. Rep.* **19 (1999)** 235–251.
- **Gaillard I**, Clauser E, Corvol P. Structure of human angiotensinogen gene. *DNA.* **1989** Mar;8(2):87-99.
- **Gaillard-Sanchez I**, Mattei MG, Clauser E, Corvol P. Assignment by in situ hybridization of the angiotensinogen gene to chromosome band 1q4, the same region as the human renin gene. *Hum Genet.* **1990** Mar;84(4):341-3.
- **Game L.**, Voegel, J.-C., Schaaf, P. & Stoltz, J. Do physiological concentrations of IgG induce a direct aggregation of red blood cells: comparison with fibrinogen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **1996**, General Subjects 1291,138-142.
- **Garthwaite J.** Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci.* **2008** Jun;27(11):2783-802.
- **Geara AS**, Azzi J, Jurewicz M, Abdi R The renin-angiotensin system : an old, newly discovered player in immunoregulation. *Transpl. Rew.* **2009**;23 151-158.
- **George J.**, Shmuel S.B., Roth A., Herz I., Izraelov S., Deutsch V., Keren G., Miller H., L-Arginine attenuates lymphocyte activation and anti-oxidized LDL antibody levels in patients undergoing angioplasty. *Atherosclerosis* **174 (2004)** 323–327.
- **Giani JF**, Gironacci MM, Muñoz MC, Peña C, Turyn D, Dominici FP. Angiotensin-(1 7) stimulates the phosphorylation of JAK2, IRS-1 and Akt in rat heart in vivo: role of the AT1 and Mas receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2007** Aug;293(2):H1154-63.
- **Giani JF**, Gironacci MM, Muñoz MC, Turyn D, Dominici FP. Angiotensin-(1-7) has a dual role on growth-promoting signalling pathways in rat heart in vivo by stimulating STAT3 and STAT5a/b phosphorylation and inhibiting angiotensin II-stimulated ERK1/2 and Rho kinase activity. *Exp Physiol.* **2008** May;93(5):570-8.
- **Giustacchini P**, Pisanti F, Citterio F, et al: Renal vein thrombosis after renal transplantation: an important cause of graft loss. *Transplant Proc* **2002**;34:2126.
- **Givertz MM.** Manipulation of the renin-angiotensin system. *Circulation.* **2001** Jul 31;104(5):E14-8.
- **Gladwin MT**, Lancaster JR Jr, Freeman BA, Schechter AN. Nitric oxide's reactions with hemoglobin: a view through the SNO-storm. *Nat Med.* **2003** May;9(5):496-500.
- **Golino P**, Piscione F, Willerson JT, Cappelli-Bigazzi M, Focaccio A, Villari B, Indolfi C, Russolillo E, Condorelli M, Chiariello M. Divergent effects of serotonin on coronary-artery dimensions and blood flow in patients with coronary atherosclerosis and control patients. *N Engl J Med.* **1991**;324:641–648.
- **Gori T**, Dragoni S, Di Stolfo G, Forconi S. Endothelium and haemorheology. *Ann Ist Super Sanita.* **2007**;43(2):124-9.
- **Govers R**, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol.* **2001** Feb;280(2):F193-206.
- **Gow A.J.** et al. The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **(1999)** 96, 9027–9032.
- **Graf C**, Barras JP. Rheological properties of human blood plasma--a comparison of measurements with three different viscometers. *Experientia.* **1979**;35:224-5.
- **Graninger M**, Reiter R, Drucker C, Minar E, Jilma B. Angiotensin receptor blockade decreases markers of vascular inflammation. *J Cardiovasc Pharmacol* **2004**;44:335–339.
- **Gräser T**, Vedernikov YP. Hypoxic contraction in canine basilar arteries: role of endothelium. *Exp Pathol.* **1991**;42(4):245-9.
- **Greenland P**, Bonow RO, Brundage BH, Budoff MJ, Eisenberg MJ, Grundy SM, Lauer MS, Post WS, Raggi P, Redberg RF, Rodgers GP, Shaw LJ, Taylor AJ, Weintraub WS, Harrington RA, Abrams J, Anderson JL, Bates ER, Grines CL, Hlatky MA, Lichtenberg RC, Lindner JR, Pohost GM, Schofield RS, Shubrooks SJ Jr, Stein JH, Tracy CM, Vogel RA, Wesley DJ; American College of Cardiology Foundation Clinical Expert Consensus Task Force (ACCF/AHA Writing Committee to Update the **2000** Expert Consensus Document on Electron Beam Computed Tomography); Society of Atherosclerosis Imaging and Prevention; Society of Cardiovascular Computed Tomography. ACCF/AHA 2007 clinical expert consensus document on coronary artery calcium scoring by computed tomography in global cardiovascular risk assessment and in evaluation of patients with chest pain: a report of the American College of Cardiology Foundation Clinical Expert Consensus Task Force (ACCF/AHA Writing Committee to Update the 2000 Expert Consensus Document on Electron Beam Computed Tomography). *Circulation.* **2007** Jan 23;115(3):402-26.
- **Griendling KK**, Murphy TJ, Alexander RW. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation.* **1993** Jun;87(6):1816-28.

- **Grinshtein N, Bamm VV, Tsemakhovich VA, Shaklai N.** Mechanism of low-density lipoprotein oxidation by hemoglobin-derived iron. *Biochemistry* **2003**;42:6977–85.
- **Groggel CG:** Acute thrombosis of the renal transplant artery: a case report and review of the literature. *Clin Nephrol* **1991**;36:42.
- **Grzelak A, Mazur J, and Bartosz G.** Peroxynitrate activates K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransport in human erythrocytes. *Cell Biol Int* **2001**;25: 1163–1165.
- **Gu YJ, Graaff R, de Hoog E, Veeger NJ, Panday G, Boonstra PW, van Oeveren W.** Influence of hemodilution of plasma proteins on erythrocyte aggregability: an in vivo study in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *Clin Hemorheol Microcirc.* **2005**;33(2):95-107.
- **Gustafsson L, Appelgren L, Myrvold HE.** Effects of increased plasma viscosity and red blood cell aggregation on blood viscosity in vivo. *Am J Physiol.* **1981** Oct;241(4):H513-8.
- **Haest CW, Plasa G, Kamp D, Deuticke B.** Spectrin as a stabilizer of the phospholipid asymmetry in the human erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta.* **1978**;509:21-32.
- **Hardeman MR, Meinardi MM, Ince C, Vreeken J.** Red blood cell rigidification during cyclosporin therapy: a possible early warning signal for adverse reactions. *Scand J Clin Lab Invest.* **1998** Dec;58(8):617-23.
- **Hardeman MR, Goedhart PT, Dobbe JGG, Lettinga KP,** Laser-assisted optical rotational cell analyzer (L.O.R.C.A.) I. A new instrument for measurement of various structural haemorheological parameters. *Clin Hemorheol Microcirc* **1994** vol 14 n 4 pp-605-618.
- **Hardeman MR, Goedhart PT, Schut NH,** Laser-assisted optical rotational cell analyzer(L.O.R.C.A.); II red blood cell deformability : elongation index versus cell transit time *Clin Hemorheol Microcirc* **1994** vol 14 n 4 pp-619-630.
- **Harris LM, Peer R, Curl GR, Pillai L, Upson J, Ricotta JJ.** Longterm follow-up of patients with early atherosclerosis. *J Vasc Surg* **1996**; 23:576–581.
- **Harris MB, Blackstone MA, Ju H, Venema VJ, Venema RC.** Heat-induced increases in endothelial NO synthase expression and activity and endothelial NO release. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2003** Jul;285(1):H333-40.
- **Hartshorne DJ, Hirano K.** Interactions of protein phosphatase type 1, with a focus on myosin phosphatase. *Mol Cell Biochem.* **1999** Jan;190(1-2):79-84.
- **Heinze G, Mitterbauer C, Regele H et al.** Angiotensin –converting enzyme inhibitor or angiotensin II type 1 receptor antagonist therapy is associated with prolonged patient and graft survival after renal transplantation *J am soc nephrol* **2006** 17 889-99.
- **Henrion D, Amant C, Benessiano J, Philip I, Plantefève G, Chatel D, Hwas U, Desmont JM, Durand G, Amouyel P, Lévy BI.** Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism is associated with an increased vascular reactivity in the human mammary artery in vitro. *J Vasc Res.* **1998** Sep-Oct;35(5):356-62.
- **Heringer-Walther S, Eckert K, Schumacher SM, Uharek L, Wulf-Goldenberg A, Gembardt F, Fichtner I, Schultheiss HP, Rodgers K, Walther T.** Angiotensin-(1-7) stimulates hematopoietic progenitor cells in vitro and in vivo. *Haematologica.* **2009** Jun;94(6):857-60.
- **Herold S. and Rehmann, F.J.** Kinetic and mechanistic studies of the reactions of nitrogen monoxide and nitrite with ferryl myoglobin. *J. Biol. Inorg. Chem* (**2001**) 6, 543–555.
- **Hiatt WR.,** Pathophysiology of Intermittent Claudication in Peripheral Arterial Disease **JANUARY 2006** Vol. 10 , Issue 1
- **Hiatt WR, Hirsch AT, Regensteiner JG, Brass EP.** Clinical trials for claudication. Assessment of exercise performance, functional status, and clinical end points. *Vascular Clinical Trialists.* *Circulation.* **1995** Aug 1;92(3):614-21.
- **Hiatt WR, Nawaz D, Brass EP.** Carnitine metabolism during exercise in patients with peripheral vascular disease. *J Appl Physiol* **1987**;62: 2383-7.
- **Hiatt WR, Regensteiner JG, Wolfel EE, Carry MR, Brass EP.** Effect of exercise training on skeletal muscle histology and metabolism in peripheral arterial disease. *J Appl Physiol* **1996**; 81:780-8.
- **Hiatt WR, Wolfel EE, Regensteiner JG, Brass EP.** Skeletal muscle carnitine metabolism in patients with unilateral peripheral arterial disease. *J Appl Physiol* **1992**;73:346-53.
- **Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T, Ochiai H, Kosuge M, Watanabe Y, Yoshii Y, Kihara M, Kimura K, Ishii M, Umemura S.** Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension.* **1998** Sep;32(3):521-6.
- **Hickman P, Harrison DK, Hill A et al.** Exercise in patients with intermittent claudication results in the generation of oxygen derived free radicals and endothelial damage. *Adv Exp Med Biol* **1994**;361:565-70.
- **Hingorani AD .** Polymorphisms in endothelial nitric oxide syntase and atherogenesis: John French Lecture 2000. *Atherosclerosis* **2000** 154:521.
- **Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, Haydock S, Hopper RV, Stephens NG, O'Shaughnessy KM, Brown MJ.** A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation.* **1999** Oct 5;100(14):1515-20.

- **Hiremath S, Fergusson D, Doucette S, et al.** Renin angiotensin system blockade in kidney transplantation : a systematic review of the evidence *Am J transplant* **2007** 7 2350-60.
- **Hirsch AT, Criqui MH, Treat-Jacobson D, et al.** Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. *JAMA* **2001**; 286:1317–1324.
- **Hobart PM, Fogliano M, O'Connor BA, Schaefer IM, Chirgwin JM** Human renin gene: structure and sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1984** Aug;81(16):5026-30.
- **Hobbs SD, Thomas ME, Bradbury AW.** Manipulation of the renin angiotensin system in peripheral arterial disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* **2004** Dec;28(6):573-82.
- **Hoffmann IS, Tavares-Mordwinkin R, Castejon AM, Alfieri AB, Cubeddu LX.** Endothelial nitric oxide synthase polymorphism, nitric oxide production, salt sensitivity and cardiovascular risk factors in Hispanics. *J Hum Hypertens.* **2005** Mar;19(3):233-40.
- **Hooper WC, Lally C, Austin H, Benson J, Dilley A, Wenger NK, Whitsett C, Rawlins P, Evatt BL.** The relationship between polymorphisms in the endothelial cell nitric oxide synthase gene and the platelet GPIIIa gene with myocardial infarction and venous thromboembolism in African Americans. *Chest.* **1999** Oct;116(4):880-6.
- **Hsueh WA, Do YS, Wang PH** Observations on the renal processing and sorting of prorenin. *Can J Physiol Pharmacol.* **1991** Sep;69(9):1327-30.
- **Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F,** Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem.* **1991** Aug 15;266(23):15377-83.
- **Igase M, Kohara K, Nagai T, Miki T, Ferrario CM.** Increased expression of angiotensin converting enzyme 2 in conjunction with reduction of neointima by angiotensin II type 1 receptor blockade. *Hypertens Res.* **2008** Mar;31(3):553-9.
- **Igase M, Strawn WB, Gallagher PE, Geary RL, Ferrario CM.** Angiotensin II AT1 receptors regulate ACE2 and angiotensin-(1-7) expression in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2005** Sep;289(3):H1013-9.
- **Ignarro L.J., G. Cirino, A. Casini, C. Napoli,** Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **34 (1999)** 876–884.
- **Ignarro L.J., Napoli C.,** Novel features on nitric oxide, endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* **6 (2004)** 278–287.
- **Iolascon A, Avvisati RA, Piscopo C.** Hereditary spherocytosis. *Transfus Clin Biol.* **2010** Sep;17(3):138-42.
- **Isa MN, Boyd E, Morrison N, Harrap S, Clauser E, Connor JM.** Assignment of the human angiotensinogen gene to chromosome 1q42-q43 by nonisotopic in situ hybridization [corrected]. *Genomics.* **1990** Nov;8(3):598-600. Erratum in: *Genomics* 1991 Aug;10(4):1110.
- **Israni AK, Li N, Sidhwani S, Rosas S, Kong X, Joffe M, Rebbeck T, Feldman HI.** Association of hypertension genotypes and decline in renal function after kidney transplantation. *Transplantation.* **2007** Nov 27;84(10):1240-7.
- **James MN, Sielecki AR.** Stereochemical analysis of peptide bond hydrolysis catalyzed by the aspartic proteinase penicillopepsin. *Biochemistry* **1985**; 24: 3701-3713.
- **Jansson E, Johansson J, Sylven C, Kaijser L.** Muscle adaptation in intermittent claudication. Side-differences in muscle metabolic characteristics in patients with unilateral arterial disease. *Clin Physiol* **1988**;8:17-29.
- **Jardine A,** Assessing the relative risk of cardiovascular disease among renal transplant patients receiving tacrolimus or cyclosporine *Transplant International* **18 (2005)** 379–384 <sup>a</sup>.
- **Jeunemaitre X, Gimenez-Roqueplo AP, C el erier J, Corvol P** Angiotensinogen variants and human hypertension. *Curr Hypertens Rep.* **1999** Feb-Mar;1(1):31-41.
- **Jeunemaitre X.** Genetics of the human renin angiotensin system. *J Mol Med (Berl).* **2008** Jun;86(6):637-41.
- **Johnson R M and K. Tang,** Induction of a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in human erythrocytes by mechanical stress. *Biochem. Biophys. Acta* **1107 (1992)**, 314–318.
- **Jonason T, Bergstrom R.** Cessation of smoking in patients with intermittent claudication. Effects on the risk of peripheral vascular complications, myocardial infarction and mortality. *Acta Med Scand* **1987**;221:253–260.
- **Jubelin BC and Gierman JL.** Erythrocytes may synthesize their own nitric oxide. *Am J Hypertens* **1996**; 9: 1214–1219,
- **Jung F, Pindur G, Hiebl B, Franke RP.** Influence of capillary geometry on hypoperfusion-induced ischemia: a numerical study. *Appl Cardiopulm Pathophysiol* **2010**;14:229-35.
- **Kameneva MV, Watach MJ, Borovetz HS.** Gender difference in oxygen delivery index: potential link to development of cardiovascular diseases. *Appl Cardiopulm Pathophysiol* **2000**;9:382-7.
- **Kamp D, Sieberg T, Haest CW.** Inhibition and stimulation of phospholipid scrambling activity. Consequences for lipid asymmetry, echinocytosis, and microvesiculation of erythrocytes. *Biochemistry.* **2001**;40:9438-46.
- **Kannel WB, Gordon T, Wolf PA, McNamara P.** Hemoglobin and the risk of cerebral infarction: the Framingham Study. *Stroke.* **1972**;3:409-20.
- **Kannel WB, McGee DL.** Update on some epidemiologic features of intermittent claudication: the Framingham Study. *J Am Geriatr Soc* **1985**; 33:13–18.

- **Kannel WB, Shurtleff D.** The Framingham Study. Cigarettes and the development of intermittent claudication. *Geriatrics* **1973**; 28:61–68.
- **Kannel WB.** Framingham study insights into hypertensive risk of cardiovascular disease. *Hypertens Res.* **1995** Sep;18(3):181-96.
- **Kashem A, Endoh M, Yano N, Yamauchi F, Nomoto Y, Sakai H.** Expression of inducible-NOS in human glomerulonephritis: the possible source is infiltrating monocytes/macrophages. *Kidney Int.* **1996** Aug;50(2):392-9.
- **Kasperska-Zajac A, Brzoza Z, Koczy-Baron E, Jagodzinska J, Slowinska L, Rogala B.** Blood rheological properties in patients with atopic dermatitis (AD). *Inflammation.* **2009** Aug;32(4):242-6.
- **Kawashima H, Kashiwagi Y, Watanabe C, Sato S, Nishimata S, Takekuma K, Hoshika A, Watanabe Y.** NOx (nitrite/nitrate) in patients with pediatric nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* **2007** Jun;22(6):840-3.
- **Kennett EC, Kuchel PW.** Plasma membrane oxidoreductases: effects on erythrocyte metabolism and redox homeostasis. *Antioxid Redox Signal* **2006**;8:1241–7.
- **Khanafar A, Ilham MA, Namagondlu GS, Janzic A, Sikas N, Smith D, Griffiths D, Chavez R, Asderakis A.** Increased nitric oxide production during acute rejection in kidney transplantation: a useful marker to aid in the diagnosis of rejection. *Transplantation.* **2007** Sep 15;84(5):580-6.
- **Kleinbongard P. et al.** Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood* (**2006**) 107, 2943–2951
- **Koenig W, Ernst E, Matrai A.** Blood rheology associated with cardiovascular risk factors and chronic cardiovascular diseases: results of an epidemiologic cross-sectional study *Angiology.* **1988** Nov;39(11):986-95.
- **Koenig W, Sund M, Filipiak B, Doring A, Lowel H, Ernst E.** Plasma viscosity and the risk of coronary heart disease: results from the MONICA-Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **1998**;18:768-72.
- **Kojda G, Laursen JB, Ramasamy S, Kent JD, Kurz S, Burchfield J, Shesely EG, Harrison DG.** Protein expression, vascular reactivity and soluble guanylate cyclase activity in mice lacking the endothelial cell nitric oxide synthase: contributions of NOS isoforms to blood pressure and heart rate control. *Cardiovasc Res.* **1999** Apr;42(1):206-13.
- **Komarov A, Panchenko E, Dobrovolsky A, et al.** D-dimer and platelet aggregability are related to thrombotic events in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Eur Heart J* **2002**;23: 1309-1316.
- **Konukoglu D, Kemerli GD, Sabuncu T, Hatemi HH.** Protein carbonyl content in erythrocyte membranes in type 2 diabetic patients. *Horm Metab Res* **2002**;34:367–70.
- **Koppensteiner R, Derfler K, Ehringer H.** Blood rheology after renal transplantation. *Nephron.* **1996**;74(2):328-32.
- **Korbut R and Gryglewski RJ.** Nitric oxide from polymorphonuclear leukocytes modulates red blood cell deformability in vitro. *Eur J Pharmacol* **1993**;234: 17–22.
- **Korbut R and Gryglewski RJ.** The effect of prostacyclin and nitric oxide on deformability of red blood cells in septic shock in rats. *J Physiol Pharmacol* 47: 591–599, **1996**.
- **Koscielny J, Jung EM, Mrowietz C, Kiesewetter H, Latza R,** Blood fluidity, fibrinogen and cardiovascular risk factors of occlusive arterial disease: Results of the Aachen Study. *Clin. Hemorheol. Microcir.* **2004**; 31: 185–95.
- **Kostakis AJ, White DJG, Calne RY:** Toxic effects in the use of cyclosporine A in alcoholic solution as an immunosuppressant of rat heart allografts. *IRCS Med Sci* **1977**; 5:243.
- **Kucharewicz I, Pawlak R, Matys T, Chabielska E, Buczko W.** Angiotensin-(1-7): an active member of the renin-angiotensin system. *J Physiol Pharmacol.* **2002** Dec;53(4 Pt 1):533-40.
- **Kwaan HC and A. Bongu,** The hyperviscosity syndromes, *Semin Thromb Hemost* 25 (**1999**), 199–208.
- **Kwaan HC** Role of plasma proteins in whole blood viscosity: a brief clinical review. *Clin Hemorheol Microcirc.* **2010**;44(3):167-76.
- **Lacchini R, Silva PS, Tanus-Santos JE.** A pharmacogenetics-based approach to reduce cardiovascular mortality with the prophylactic use of statins. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* **2010** May;106(5):357-61.
- **Lam CF, Peterson TE, Richardson DM, Croatt AJ, d'Uscio LV, Nath KA, Katusic ZS.** Increased blood flow causes coordinated upregulation of arterial eNOS and biosynthesis of tetrahydrobiopterin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2006** Feb;290(2):H786-93.
- **Langeveld B, van Gilst WH, Tio RA, Zijlstra F, Roks AJ.** Angiotensin-(1-7) attenuates neointimal formation after stent implantation in the rat. *Hypertension.* **2005** Jan;45(1):138-41.
- **Lassila R, Lepantalo M.** Cigarette smoking and the outcome after lower limb arterial surgery. *Acta Chir Scand* **1988**; 154:635–640.
- **Lassila R, Peltonen S, Lepantalo M, Saarinen O, Kauhanen P and Manninen V:** Severity of peripheral atherosclerosis is associated with fibrinogen and degradation of cross-linked fibrin. *Arterioscler Thromb* 1993;13: 1738-1742,.
- **Laughlin MH, Pollock JS, Amann JF, Hollis ML, Woodman CR, Price EM.** Training induces nonuniform increases in eNOS content along the coronary arterial tree. *J Appl Physiol.* **2001** Feb;90(2):501.
- **Lee AJ, MC Gregor AS, Hau CM, Price JF, Rumley A, Lowe GDO, Fowkes FGR,** The role of haematological factors in diabetic peripheral arterial disease: the Edinburgh Artery Study; *Br. J. Haemathol.* **1999**; 105: 648-54.



- **Leitinger N.** Oxidized phospholipids as triggers of inflammation in atherosclerosis. *Mol Nutr Food Res* **2005**;49:1063–71.
- **Lemarié CA, Schiffrin EL.** The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* **2010** Mar;11(1):19-31.
- **Lembo G, De Luca N, Battagli C, Iovino G, Aretini A, Musicco M, Frati G, Pompeo F, Vecchione C, Trimarco B.** A common variant of endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is an independent risk factor for carotid atherosclerosis. *Stroke.* **2001** Mar;32(3):735-40.
- **Leonarduzzi G, Chiarpotto E, Biasi F, Poli G.** 4-Hydroxynonenal and cholesterol oxidation products in atherosclerosis. *Mol Nutr Food Res* **2005**;49:1044–9.
- **Letcher, R., Chien, S., Pickering, T. & Laragh, J.** Elevated blood viscosity in patients with borderline essential hypertension. *Hypertension* 1983; 5, 757-762.
- **Levenson J, Garipey J, Del-Pino M, Salomon J, Denarie N, Simon A.** Association of plasma viscosity and carotid thickening in a French working cohort. *Am J Hypertens.* **2000**;13:753-8.
- **Levy PJ, Hornung CA, Haynes JL, Rush DS.** Lower extremity ischemia in adults younger than forty years of age: a community-wide survey of premature atherosclerotic arterial disease. *J Vasc Surg* **1994**; 19:873–881.
- **Li R, Nicklas B, Pahor M, Newman A, Sutton-Tyrrell K, Harris T, Lakatta E, Bauer DC, Ding J, Satterfield S, Kritchevsky SB.** Polymorphisms of angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme associated with lower extremity arterial disease in the Health, Aging and Body Composition study. *J Hum Hypertens.* **2007** Aug;21(8):673-82.
- **Liao JC, Hein TW, Vaughn MW, Huang KT, and Kuo L.** Intravascular flow decreases erythrocyte consumption of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* **1999**;96: 8757–8761.
- **Libby P, Ridker PM, Maseri A.** Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* **2002**; 105:1135–1143.
- **Libra M, Signorelli SS, Bevelacqua Y, et al:** Analysis of G(-174)CIL-6 polymorphism and plasma concentrations of inflammatory markers in patients with type 2 diabetes and peripheral arterial disease. *J Clin Pathol* **2006**; 59: 211-215.
- **Linde T, Sandhagen B, Backman U, Fellström B.** Altered flow properties of blood and increased plasma fibrinogen in cyclosporin-treated renal allograft recipients. *Nephrol Dial Transplant.* **1999** Jun;14(6):1525-9.
- **Lindeman KS, Aryana A, Hirshman CA.** Direct effects of inhaled nitric oxide on canine peripheral airways. *J Appl Physiol.* **1995** May;78(5):1898-903.
- **Lip G. & Beevers, D.** Abnormalities of rheology and coagulation in hypertension. *Journal of Human Hypertension* **2007**; 8, 693-702.
- **Lipowsky HH.** Mechanics of blood flow in the microcirculation. In: Skalak R, Chien S, editors. *Handbook of Bioengineering.* New York: McGraw-Hill; **1987.** p.18-25.
- **Lipowsky HH.** Microvascular rheology and hemodynamics. *Microcirculation* **2005**;12:5-15.
- **Lipton, A.J. et al.** S-Nitrosothiols signal the ventilatory response to hypoxia. *Nature* (**2001**) 413, 171–174.
- **Lister JF.** On the early stages of inflammation. *Philos Trans R Soc.* **1958**;148:645.
- **Litwin MS, Chapman K, Stoliar JB.** Blood viscosity in the normal man. *Surgery* **1970**;67:342-5.
- **Liu J. ed al.** Palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase is necessary for optimal stimulated release of nitric oxide : implications for caveolae localization *Biochemistry* **1996**, 35 13277-13281.
- **Liu SC, Palek J.** Metabolic dependence of protein arrangement in human erythrocyte membranes. II. Crosslinking of major proteins in ghosts from fresh and ATP-depleted red cells. *Blood.* **1979**;54:1117-30.
- **Liu, X. et al.** Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes. *J. Biol. Chem.* (**1998**) 273, 18709–18713.
- **Lominadze D, Joshua IG, Schuschke DA.** Increased erythrocyte aggregation in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* **1998** Jul;11(7):784-9.
- **Lominadze, D. & Dean, W.** Involvement of fibrinogen specific binding in erythrocyte aggregation. *Clinical and Experimental Hypertension* **2002** 517, 41-44.
- **Lonn EM, Yusuf S, Jha P, Montague TJ, Teo KK, Benedict CR, Pitt B.** Emerging role of angiotensin-converting enzyme inhibitors in cardiac and vascular protection. *Circulation.* **1994** Oct;90(4):2056-69.
- **Lorand L, Siefing GE Jr, Lowe-Krentz L.** Enzymatic basis of membrane stiffening in human erythrocytes. *Semin Hematol.* **1979**;16:65-74.
- **Lovren F, Pan Y, Quan A, Teoh H, Wang G, Shukla PC, Levitt KS, Oudit GY, Al-Omran M, Stewart DJ, Slutsky AS, Peterson MD, Backx PH, Penninger JM, Verma S.** Angiotensin converting enzyme-2 confers endothelial protection and attenuates atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2008** Oct;295(4):H1377-84.

- **Lowe GD.** Blood rheology in general medicine and surgery. Baillieres Clin Haematol. **1987** Sep;1(3):827-61.
- **Lowe GDO, Lee AJ, Rumley A, Price JF, Fowkes FG.** Blood viscosity and risk of cardiovascular events: the Edinburgh Artery Study. Br J Haematol. **1997**;96:168-73.
- **Lowe GDO.** Nature and clinical importance of blood rheology. In: Lowe GDO, editor. Clinical Blood Rheology. Boca Raton (FL): CRC press Inc; **1988**:1-10.
- **Lucchi L, Bergamini S, Iannone A, Perrone S, Stipo L, Olmeda F, Caruso F, Tomasi A, Albertazzi A.** Erythrocyte susceptibility to oxidative stress in chronic renal failure patients under different substitutive treatments. Artif Organs. **2005** Jan;29(1):67-72.
- **Luetscher JA, Kraemer FB, Wilson DM, Schwartz HC, Bryer-Ash M.** Increased plasma inactive renin in diabetes mellitus. A marker of microvascular complications. N Engl J Med. **1985** May 30;312(22):1412-7.
- **Luke RG, Curtus J.** Biology and treatment of transplant hypertension. In: Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management, 2nd ed. New York: Raven; **1995**, p 2471.
- **Lundgren F, Dahllöf AG, Schersten T, Bylund-Fellenius AC.** Muscle enzyme adaptation in patients with peripheral arterial insufficiency: Spontaneous adaptation, effect of different treatments and consequences on walking performance. Clin Sci **1989**;77:485-93.
- **Lux SE.** Spectrin-actin membrane skeleton of normal and abnormal red blood cells. Semin Hematol. **1979**;16:21-51.
- **MacGregor AS, Price JF, Hau CM, Lee AJ, Carson MN, Fowke FG.** Role of systolic blood pressure and plasma triglycerides in diabetic peripheral arterial disease. The Edinburgh Artery Study. Diabetes Care **1999**; 22:453–458.
- **Machado RD, Santos RA, Andrade SP.** Opposing actions of angiotensins on angiogenesis. Life Sci. **2000**;66(1):67-76.
- **Madow B, Bloch E H.** The effect of erythrocyte aggregation on the rheology of blood. Angiology. **1956** Feb;7(1):1-15.
- **Maeda N, Cicha I, Tateishi N, Suzuki Y.** Triglyceride in plasma: prospective effects on microcirculatory functions. Clin Hemorheol Microcirc. **2006**;34(1-2):341-6.
- **Magyar MT, Szikszai Z, Balla J, Valikovics A, Kappelmayer J, Imre S, Balla G, Jeney V, Csiba L, Bereczki D.** Early-onset carotid atherosclerosis is associated with increased intima-media thickness and elevated serum levels of inflammatory markers. Stroke. **2003**;34:58-63.
- **Mannini L, Cecchi E, Fatini C, Marcucci R, Alessandriello Liotta A, Matucci-Cerinic M, Abbate R, Gensini GF.** Clinical haemorheology and microcirculation. Ann Ist Super Sanita. **2007**;43(2):144-55.
- **Marcen R.** Cardiovascular risk factors in renal transplantation—current controversies Nephrol Dial Transplant (**2006**) 21 [Suppl 3]: iii3–iii8.
- **Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS.** Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. Biochemistry. **1988** Nov 29;27(24):8706-11.
- **Marletta MA.** Another activation switch for endothelial nitric oxide synthase: why does it have to be so complicated? Trends Biochem Sci. **2001** Sep;26(9):519-21.
- **Marsden PA, Schappert KT, Chen HS, Flowers M, Sundell CL, Wilcox JN, Lamas S, Michel T.** Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. FEBS Lett. **1992** Aug 3;307(3):287-93.
- **Martin FA, Bydlon G, Friedman JS.** SOD2-deficiency, sideroblastic anemia and red blood cell oxidative stress. Antioxid Redox Signal **2006**;8:1217–25.
- **Maspers M, Björnberg J, Mellander S.** Relation between capillary pressure and vascular tone over the range from maximum dilatation to maximum constriction in cat skeletal muscle. Acta Physiol Scand. **1990** Sep;140(1):73-83.
- **Mattace-Raso FU, van der Cammen TJ, Sayed-Tabatabaei FA, van Popele NM, Asmar R, Schalekamp MA, Hofman A, van Duijn CM, Witteman JC.** Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and common carotid stiffness. The Rotterdam study. Atherosclerosis. **2004** May;174(1):121-6.
- **Mayer GA, Fridrich I, Newell J, Szivek J.** Plasma components and blood viscosity. Biorheology. **1966**;3:177-82.
- **Mayer GA.** Blood viscosity in healthy subjects and patients with coronary heart disease. Can Med Assoc J **1964**;91:951-4.
- **Mayer GA.** Relation of the viscosity of plasma and whole blood. Am J Clin Pathol. **1966**;45:273-6.
- **Mayer O Jr, Filipovský J, Pesta M, Cífková R, Dolejšová M, Simon J.** The interaction of endothelial nitric oxide synthase polymorphism and current smoking in terms of increased arterial stiffness. Physiol Res. **2010**;59(4):529-36.
- **Mazzolai L, Hayoz D.** The renin-angiotensin system and atherosclerosis. Curr Hypertens Rep **2006**;8:47-53.
- **McDermott MM, Ferrucci L, Liu K, et al.** D-dimer and inflammatory markers as predictors of functional decline in men and women with and without peripheral arterial disease. J Am Geriatr Soc **2005**; 53:1688–1696.
- **McDermott MM, Guralnik JM, Corsi A, Albay M, Macchi C, Bandinelli S and Ferrucci L:** Patterns of inflammation associated with peripheral arterial disease: In the CHIANTI study. Am Heart J **2005**;150: 276-281.
- **McDermott MM, Guralnik JM, Greenland P, et al:** Inflammatory and thrombotic blood markers and walking-related disability in men and women with and without peripheral arterial disease. J Am Geriatr Soc **2004**;52: 1888-1894.

- **McGorisk GM**, Treasure CB. Endothelial dysfunction in coronary artery disease. *Curr Opin Cardiol*. **1996**;11:341–350.
- **Meade TW**, Cooper JA, Stirling Y, Howarth DJ, Ruddock V and Miller GJ: Factor VIII, ABO blood group and the incidence of ischaemic heart disease. *Br J Haematol* **1994**; 88: 601-607.
- **Meade TW**, North WR, Chakrabarti R, Stirling Y, Haines AP, Thompson SG, Brozovic M. Haemostatic function and cardiovascular death: early results of a prospective study. *Lancet*. **1980**;1:1050-4.
- **Meiselman HJ**, Baskurt OK. Hemorheology and hemodynamics: Dove andare? *Clin Hemorheol Microcirc*. **2006**;35(1-2):37-43.
- **Meiselman HJ**. Rheology of shape-transformed human red cells. *Biorheology*. **1978**;15:225-37.
- **Mellinghoff AC**, Reiningger AJ, Wurzingler LJ, Landgraf R, Hepp KD. Impact of pancreas and kidney transplantation on determinants of blood and plasma viscosity. *Clin Hemorheol Microcirc*. **1998** Jul;18(2-3):175-84.
- **Melov S**, Shoffner JM, Kaufman A, Wallace DC. Marked increase in the number and variety of mitochondrial DNA rearrangements in aging human skeletal muscle. *Nucleic Acids Res* **1995**;23(20):4122-6.
- **Ménard J**. Anthology of the renin-angiotensin system: a one hundred reference approach to angiotensin II antagonists. *J Hypertens Suppl*. **1993** Apr;11(3):S3-11.
- **Merrill EW**, Cokolet GC, Britten A, Wells RE Jr. Non-Newtonian rheology of human blood—Effect of fibrinogen deduced by “subtraction”. *Circ Res*. **1963**;13:48-55.
- **Merrill JP**, Murray JE, Harrison JH: Successful homotransplantations of the human kidney between identical twins. *JAMA* **1956**;160:277.
- **Micozkadioğlu H**, Colak T, Akçay A, Sezer S, Ataç FB, Verdi H, Arat Z, Ozemir FN, Haberal M. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism significantly affects renal posttransplantation erythrocytosis. *Transplant Proc*. **2004** Jan-Feb;36(1):161-3.
- **Mika P**, Spodaryk K, Cencora A, Mika A ,Red blood cell deformability in patients with claudication after pain-free treadmill training. *Clin J. Sport. Med*. **2006**; 16: 335-40.
- **Minar E**. Critical limb ischaemia. *Hamostaseologie*. **2009** Jan;29(1):102-9.
- **Minetti M**, Agati L, Malorni W. The microenvironment can shift erythrocytes from a friendly to a harmful behavior: pathogenetic implications for vascular diseases. *Cardiovasc Res*. **2007** Jul 1;75(1):21-8.
- **Minetti M**, Malorni W. Redox control of red blood cell biology: the red blood cell as a target and source of prooxidant species. *Antioxid Redox Signal* **2006**;8:1165–9.
- **Miyahara K**, Kawamoto T, Sase K, Yui Y, Toda K, Yang LX, Hattori R, Aoyama T, Yamamoto Y, Doi Y, et al. Cloning and structural characterization of the human endothelial nitric-oxide-synthase gene. *Eur J Biochem*. **1994** Aug 1;223(3):719-26
- **Molisso C**, Molisso V, Valutazione medico-legale delle arteriopatie croniche ostruttive degli arti inferiori *G Ital Cardiol* Vol 7 Settembre **2006**.
- **Moncada S**, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. **1993** Dec 30;329(27):2002-12.
- **Moore PD**: Give and Take: The Development of Tissue Transplantation. Philadelphia: W.B. Saunders; **1964**.
- **Morgan L**, Broughton Pipkin F, Kalsheker N. Angiotensinogen: molecular biology, biochemistry and physiology. *Int J Biochem Cell Biol*. **1996** Nov;28(11):1211-22.
- **Moriarty PM**. and Gibson CA. Association between hematological parameters and high-density lipoprotein cholesterol *Curr Opin Cardiol* **2005** 20:318—323.
- **Moriyama R.**, C.R. Lombardo, R.F. Workman and P.S. Low, Regulation of linkages between the erythrocyte membrane and its skeleton by 2,3-DPG. *The Journal of Biological Chemistry* 268 (**1993**), 10990–10996.
- **Morsdorf S**, Jung F, Seyfert UT, Mrowietz C, Pindur G, Wenzel E. Haemostatical and rheological aspects of dysfibrinogenemia. *Clin Hemorheol Microcirc*. **1997**;17:13-9.
- **Mosesson MW**, Siebenlist KR and Meh DA: The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Ann NY Acad Sci* **2001**;936: 11-30.
- **Murabito JM**, D’Agostino RB, Silbershatz H, Wilson WF. Intermittent claudication. A risk profile from The Framingham Heart Study. *Circulation*. **1997** Jul 1;96(1):44-9.
- **Nadaud S**, Bonnardeaux A, Lathrop M, Soubrier F. Gene structure, polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun*. **1994** Feb 15;198(3):1027-33.
- **Nagababu E**. et al. Active nitric oxide produced in the red cell under hypoxic conditions by deoxyhemoglobin-mediated nitrite reduction. *J. Biol. Chem.* (**2003**) 278, 46349–46356.
- **Nagata S**, Kato J, Sasaki K, Minamino N, Eto T, Kitamura K. Isolation and identification of proangiotensin-12, a possible component of the renin-angiotensin system. *Biochem Biophys Res Commun*. **2006** Dec 1;350(4):1026-31.
- **Nakayama M**, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, Motoyama T, Saito Y, Ogawa Y, Miyamoto Y, Nakao K. T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation*. **1999** Jun 8;99(22):2864-70.

- **Napoli C**, De Nigris F, Williams-Ignarro S, Pignalosa O, Sica V, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis: An update *Nitric Oxide* (2006) 15 265–279.
- **Napoli C**, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric Oxide*. 2001 Apr;5(2):88-97.
- **National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases**, Division of Kidney, Urologic and Hematologic Diseases. Patient characteristics. In: United States Renal Data System, USRDS 2000 Annual Data Report. Bethesda, MD: National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Division of Kidney, Urologic, and Hematologic Diseases; 2000:339–348.
- **Neumann FJ**, Katus HA, Hoberg E, Roebuck P, Braun M, Haupt HM, Tillmanns H, Kubler W. Increased plasma viscosity and erythrocyte aggregation: indicators of an unfavourable clinical outcome in patients with unstable angina pectoris. *Br Heart J*. 1991;66:425-30.
- **Newman AB**, Siscovick DS, Manolio TA, et al. Ankle-arm index as a marker of atherosclerosis in the Cardiovascular Health Study. Cardiovascular Health Study (CHS) Collaborative Research Group. *Circulation* 1993; 88:837–845.
- **Nguyen G**, Delarue F, Burcklé C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest*. 2002 Jun;109(11):1417-27.
- **Nickel C**, Rahfs S, Deponte M, Koncarevic S, Becker K. Thioredoxin networks in the malarial parasite Plasmodium falciparum. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:1227–39.
- **Nicod J**, Richard A, Frey FJ, Ferrari P. Recipient RAS gene variants and renal allograft function. *Transplantation*. 2002 Mar 27;73(6):960-5.
- **Nie W**, Yan H, Li S, Zhang Y, Yu F, Zhu W, Fan F, Zhu J. Angiotensin-(1-7) enhances angiotensin II induced phosphorylation of ERK1/2 in mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Mol Immunol*. 2009 Jan;46(3):355-61.
- **Norgren L**, Hiatt WR, Dormandy JA et al. on behalf of the TASC II Working Group. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2007; 33: S1–S75.
- **Nylander M**, Kroese A, Strandén E, et al. Markers of vascular inflammation are associated with the extent of atherosclerosis assessed as angiographic score and treadmill walking distances in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Vasc Med* 2006;11: 21-28.
- **O'Connell TX**, Mowbray JF. Arterial intimal thickening produced by alloantibody and xenoantibody. *Transplantation* 1973;15:262.
- **O'Hare AM**, Glidden DV, Fox CS, et al. High prevalence of peripheral arterial disease in persons with renal insufficiency: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2000. *Circulation* 2004; 109:320–323.
- **O'Hare AM**. Management of peripheral arterial disease in chronic kidney disease. *Cardiol Clin* 2005; 23:225–236.
- **Oemar BS**, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Lüscher TF. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation*. 1998 Jun 30;97(25):2494-8.
- **Ogren M**, Hedblad B, Isacson SO, Janzon L, Jungquist G, Lindell SE. Non-invasively detected carotid stenosis and ischaemic heart disease in men with leg arteriosclerosis. *Lancet*. 1993 Nov 6;342(8880):1138-41.
- **Ohishi M**, Ueda M, Rakugi H, Naruko T, Kojima A, Okamura A, Higaki J, Ogihara T. Enhanced expression of angiotensin-converting enzyme is associated with progression of coronary atherosclerosis in humans. *J Hypertens* 1997;15:1295–130.
- **Omura T**, Kim S, Takeuchi K et al. Transforming growth factor beta 1 and extracellular matrix gene expression in isoprenaline induced cardiac hypertrophy: effects of inhibition of the renin–angiotensin system. *Cardiovasc Res* 1994;28(12):1835–1842.
- **Oonishi T**, K. Sakashita and N. Uyesaka. Regulation of red blood cell filterability by Ca<sup>2+</sup> influx and cAMP-mediated signaling pathways. *Am. J. Physiol.* 273 (1997), C1828–C1834.
- **Otto C**, Geiss HC, Laubach E, Schwandt P. Effects of direct adsorption of lipoproteins apheresis on lipoproteins, low-density lipoprotein subtypes, and hemorheology in hypercholesterolemic patients with coronary artery disease. *Ther Apher.* 2002;6:130-5.
- **Özdemir BH**, Özdemir FN, Ataç FB, Özdemir AA, Haberal M. Angiotensinogen t235 and angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphisms associated with the development of posttransplantation diabetes mellitus in renal allograft recipients. *Transplant Proc.* 2011 Mar;43(2):572-4.
- **Ozüyaman B**, Grau M, Kelm M, Merx MW, Kleinbongard P. RBC NOS: regulatory mechanisms and therapeutic aspects. *Trends Mol Med*. 2008 Jul;14(7):314-22.
- **Pagliari P**, Penna C. Rethinking the renin-angiotensin system and its role in cardiovascular regulation. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2005 Jan;19(1):77-87.
- **Palareti G**, Poggi M, Coccheri S. Haemorheologic effects of plasmin and thrombin-induced fibrinogen derivatives: an in vitro study. In: de Gruyter W, editor. *Fibrinogen-fibrin formation and fibrinolysis*. Berlin; 1986:229.



- **Palek J, Liu SC, Snyder LM.** Metabolic dependence of protein arrangement in human erythrocyte membranes. I. Analysis of spectrin-rich complexes in ATP-depleted red cells. *Blood.* **1978**;51:385-95.
- **Palek J, Liu SC.** Dependence of spectrin organization in red blood cell membranes on cell metabolism: implications for control of red cell shape, deformability, and surface area. *Semin Hematol.* **1979**;16:75-93.
- **Palmer L.A. et al.** S-Nitrosothiols signal hypoxia-mimetic vascular pathology. *J. Clin. Invest.* **(2007)** 117, 2592–2601.
- **Pasini E.M., M. Kirkegaard, P. Mortensen, H.U. Lutz, A.W. Thomas and M. Mann,** In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells. *Blood* **108 (2006)** 791–801.
- **Patel NH, Jindal RM, Wilkin T, et al:** Renal arterial stenosis in renal allografts: retrospective study of predisposing factors and outcome after percutaneous transluminal angioplasty. *Radiology* **2001**;219:663.
- **Patel R.P. et al.** Biochemical characterization of human S-nitrosohemoglobin. *J. Biol. Chem.* **(1999)** 274, 15487–15492.
- **Pawloski, JR et al.** Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity. *Nature* **(2001)** 409, 622–626.
- **Pearson TC, Path FRC.** Hemorheology in the erythrocytosis. *The mount Sinai Journal of Medicine.* **2001**;68:182-91.
- **Pepple DJ, Hardeman MR, Mullings AM, Reid HL.** Erythrocyte deformability and erythrocyte aggregation in preeclampsia. *Clin Hemorheol Microcirc.* **2001**;24(1):43-8.
- **Pernollet MG, Lantoine F, and Devynck MA.** Nitric oxide inhibits ATP-dependent Ca<sup>2+</sup> uptake into platelet membrane vesicles. *Biochem Biophys Res Commun* **1996**; 222: 780–785.
- **Persson PB.** Renin: origin, secretion and synthesis. *J Physiol.* **2003** Nov 1;552(Pt 3):667-71.
- **Petrov V and Lijnen P.** Regulation of human erythrocyte Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange by soluble and particulate guanylate cyclase. *Am J Physiol Cell Physiol* **1996**;271: C1556–C1564.
- **Petrov V, Amery A, and Lijnen P.** Role of cyclic GMP in atrial-natriuretic-peptide stimulation of erythrocyte Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *Eur J Biochem* **1994**; 221: 195–199.
- **Philipp CS, Dilley A, Saidi P, Evatt B, Austin H, Zawadsky J, Harwood D, Ellingsen D, Barnhart E, Phillips DJ, Hooper WC.** Deletion polymorphism in the angiotensin-converting enzyme gene as a thrombophilic risk factor after hip arthroplasty *Thromb Haemost.* **1998** Dec;80(6):869-73.
- **Plasenzotti R., U. Windberger, F. Ulberth, W. Osterode and U. Losert,** Influence of fatty acid composition in mammalian erythrocytes on cellular aggregation. *Clinical Hemorheology and Microcirculation***(2007)**, 37(3) 237–243.
- **Poole J,** Red cell antigens on band 3 and glycophorin A. *Blood Reviews* **14 (2000)**, 31–43.
- **Poole JC, Summers GA.** Correction of E.S.R. in anaemia; experimental study based on interchange of cells and plasma between normal and anaemic subjects. *Br Med J.* **1952**;1:353-6.
- **Poredos P, Zizek B,** Plasma Viscosity increase with progression of peripheral arterial with atherosclerotic disease; *Angiology* **1996**; 47: 259-63.
- **Powell JT, Edwards RJ, Worrell PC, Franks PJ, Greenhalgh RM, Poulter NR.** Risk factors associated with the development of peripheral arterial disease in smokers: a case-control study. *Atherosclerosis* **1997**; 129:41–48.
- **Powell JT, Greenhalgh RM.** Changing the smoking habit and its influence on the management of vascular disease. *Act Chir Scand Suppl* **1990**; 555:99–103.
- **Prasad A, Narayanan S, Waclawiw MA, Epstein N, Quyyumi AA.** The insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene determines coronary vascular tone and nitric oxide activity. *J Am Coll Cardiol.* **2000** Nov 1;36(5):1579-86.
- **Prasad GV, Pinnaduwege D, Parkes RK, Midgley J, Balfe JW, Hegele RA, Bull SB, Cole EH, Logan AG.** Angiotensinogen M235T genotype predicts progression in chronic renal allograft dysfunction. *Transplantation.* **2003** Jan 27;75(2):209-16.
- **Pratt RE.** Angiotensin II and the control of cardiovascular structure. *J Am Soc Nephrol* **1999**; **10**: S120–28.
- **Preston FE, Emmanuel IG, Winfield DA, Malia RG.** Essential thrombocythaemia and peripheral gangrene. *Br Med J.* **1974**;3:548-52.
- **Pretolani E, Zoli I., Battistini G., Salvi P,** Blood filterability in peripheral obstructive arterial disease. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* **1983**; 59: 1912-8.
- **Price JF, Mowbray PI, Lee AJ, Rumley A, Lowe GD, Fowkes FG.** Relationship between smoking and cardiovascular risk factors in the development of peripheral arterial disease and coronary artery disease: Edinburgh Artery Study. *Eur Heart J.* **1999** Mar;20(5):344-53.
- **Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P.** Structure and hemodynamics of microvascular networks: heterogeneity and correlations. *Am J Physiol* **1995**;269:H1713-22.
- **Püschel A, Lindenblatt N, Katzfuss J, Vollmar B, Klar E.** Immunosuppressants accelerate microvascular thrombus formation in vivo: role of endothelial cell activation. *Surgery.* **2012** Jan;151(1):26-36.
- **Putnam FW.** The Plasma Proteins Structure, Function, and Genetic Control. New York, Academic **1984**.
- **Radomski MW, Palmer RM, Moncada S.** Characterization of the L-arginine:nitric oxide pathway in human platelets. *Br J Pharmacol.* **1990** Oct;101(2):325-8.

- **Rajagopalan S, Harrison DG.** Reversing endothelial dysfunction with ACE inhibitors. A new trend. *Circulation.* **1996** Aug 1;94(3):240-3.
- **Rampling MW, Whittingstall P, Linderkamp O.** The effects of fibrinogen and its plasmin degradation products on the rheology of erythrocyte suspensions. *Clin Hemorheol.* **1984**;4:533-43.
- **Rand PW, Barker N, Lacombe E.** Effects of plasma viscosity and aggregation on whole-blood viscosity. *Am J Physiol.* **1970**;218:681-8.
- **Rand PW, Lacombe E, Hunt HE, Austin WH.** Viscosity of normal human blood under normothermic and hypothermic conditions. *J Appl Physiol* **1964**;19:117-22.
- **Rassaf et al.** Plasma nitrosothiols contribute to the systemic vasodilator effects of intravenously applied NO: experimental and clinical study on the fate of NO in human blood *Circ. Res.* **2002** 91 470-477.
- **Ray S. and A. Chakrabarti,** Membrane interaction of erythroid spectrin: surface-density-dependent high-affinity binding to phosphatidylethanolamine. *Molecular Membrane Biology* (**2004**), 21 93–100.
- **Rees DD, Palmer RM, Moncada S.** Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1989** May;86(9):3375-8.
- **Regitz-Zagrosek V, Neuss M, Holzmeister J, Warnecke C, Fleck E.** Molecular biology of angiotensin receptors and their role in human cardiovascular disease. *J Mol Med (Berl).* **1996** May;74(5):233-51.
- **Remuzzi G, Perico N, Macia M, Ruggenenti P.** The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.* **2005** Dec;(99):S57-65.
- **Renner W, Pabst E, Paulweber B, Malaimare L, Iglseider B, Wascher TC, Pilger E.** The angiotensin-converting-enzyme insertion/deletion polymorphism is not a risk factor for peripheral arterial disease. *Atherosclerosis.* **2002** Nov;165(1):175-8.
- **Ribichini F, Steffenino G, Dellavalle A, Matullo G, Colajanni E, Camilla T, Vado A, Benetton G, Uslenghi E, Piazza A.** Plasma activity and insertion/deletion polymorphism of angiotensin I-converting enzyme: a major risk factor and a marker of risk for coronary stent restenosis. *Circulation.* **1998** Jan 20;97(2):147-54.
- **Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP and Hennekens CH:** Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. *Circulation* **1998**; 97: 425-428.
- **Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE and Rifai N:** C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* **2000**;342: 836-843.
- **Ridker PM, Stampfer MJ, Rifai N.** Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA* **2001**; 285:2481–2485.
- **Rifai N and Ridker PM:** High-sensitivity C-reactive protein: a novel and promising marker of coronary heart disease. *Clin Chem* **2001**;47: 403-411.
- **Riordan JF.** Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives. *Genome Biol.* **2003**;4(8):225.
- **Rosenson R.S., A. McCormick and E.F. Uretz,** Distribution of blood viscosity values and biochemical correlates in healthy adults. *Clin Chem* **42 (1996)**, 1189–1195.
- **Rosenson RS, Lowe GD** Effects of lipids and lipoproteins on thrombosis and rheology. *Atherosclerosis.* **1998** Oct;140(2):271-80.
- **Ross R:** Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl JMed* **1999**; 340: 115-126.
- **Rothman JE, Lenard J.** Membrane asymmetry. *Science.* **1977**;195:743-53.
- **Rouslin W.** Mitochondrial complexes I, II, III, IV, and V in myocardial ischemia and autolysis. *Am J Physiol* **1983**;244(6): H743-H748.
- **Rouviere O, Berger P, Beziat C, et al:** Acute thrombosis of renal artery: graft salvage by means of intra-arterial fibrinolysis. *Transplantation* **2002**;73:403.
- **Ruhenstroth-Bauer G, Mossmer J, Ottl J, et al.** Highly significant negative correlations between erythrocyte aggregation value and serum concentrations of high density lipoprotein cholesterol in a sample from a normal population and in patients with coronary heart disease. *Eur J Clin Invest* **1987**; 17:275-279.
- **Ruhenstroth-Bauer G, Porz P, Boss N, Lehmacher W, Stamm D.** The erythrocyte aggregation value as a measure of the risk of myocardial infarction and arteriosclerosis of peripheral arteries. *Clin Cardiol.* **1985** Oct;8(10):529-34.
- **Saenko E. & Yaropolov, A..** Studies on receptor interaction of ceruloplasmin with human red blood cells. *Biochemistry International* **1990**;20, 215- 225.
- **Saito S, Hirata Y, Emori T, Imai T, Marumo F.** Angiotensin II activates endothelial constitutive nitric oxide synthase via AT1 receptors *Hypertension res* **1996** ;19 201-206.

- **Sampaio** WO, Souza dos Santos RA, Faria-Silva R, da Mata Machado LT, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. Hypertension. **2007** Jan;49(1):185-92.
- **Santos** RA, Ferreira AJ, Nadu AP, Braga AN, de Almeida AP, Campagnole-Santos MJ, Baltatu O, Ilescu R, Reudelhuber TL, Bader M. Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. Physiol Genomics. **2004** May 19;17(3):292-9.
- **Saris** JJ, Derkx FH, Lamers JM, Saxena PR, Schalekamp MA, Danser AH. Cardiomyocytes bind and activate native human prorenin : role of soluble mannose 6-phosphate receptors. Hypertension. **2001** Feb;37(2 Part 2):710-5.
- **Sasaki** K, Ma Z, Khatlani TS, Okuda M, Inokuma H and Onishi T: Evaluation of feline serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker. J Vet Med Sci 2003;65: 545-548.
- **Sawicki** G, Sanders EJ, Salas E, Wozniak M, Rodrigo J and Radomski MW: Localization and translocation of MMP-2 during aggregation of human platelets. Thromb Haemost 1998;80: 836-839.
- **Schmid-Schonbein** H, Volger E, Teitel P, Kiesewetter H, Damer V, Heilman L. New haemorrhological technique for the routine laboratory. Recent Adv Cardiovasc Dis. **1981**;2:27S-39S.
- **Schunkert** H. Polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and cardiovascular disease. J Mol Med (Berl). **1997** Nov-Dec;75(11-12):867-75.
- **Schut** NH, Bilo HJ, Popp-Snijders C, Goedhart PT, Wilmink JM. Erythrocyte deformability, endothelin levels, and renal function in cyclosporin-treated renal transplant recipients: effects of intervention with fish oil and corn oil. Scand J Clin Lab Invest. **1993** Aug;53(5):499-506.
- **Sealey** JE, Glorioso N, Itskovitz J, Laragh JH. Prorenin as a reproductive hormone. New form of the renin system. Am J Med. **1986** Dec;81(6):1041-6.
- **Sehgal** PB, Greininger G and Tosato G: Acute phase and immune responses: Interleukin-6. Ann NY Acad Sci 1989;557: 1-583.
- **Selvin** E, Erlinger TP. Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999–2000. Circulation **2004**; 110:738–743.
- **Selvin** E, Marinopoulos S, Berkenblit G, et al. Meta-analysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. Ann Intern Med **2004**; 141:421–431.
- **Serdaroglu** E, Mir S, Berdeli A. Hypertension and ace gene insertion/deletion polymorphism in pediatric renal transplant patients. Pediatr Transplant. **2005** Oct;9(5):612-7.
- **Sethupathy** P, Borel C, Gagnebin M, Grant GR, Deutsch S, Elton TS, Hatzigeorgiou AG, Antonarakis SE. Human microRNA-155 on chromosome 21 differentially interacts with its polymorphic target in the AGTR1 3' untranslated region: a mechanism for functional single-nucleotide polymorphisms related to phenotypes. Am J Hum Genet. **2007** Aug;81(2):405-13.
- **Sezer** S, Uyar M, Akcay A, Arat Z, Kulah E, Ozdemir FN, Haberal M. Endothelial nitric oxide synthase and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms can influence chronic inflammatory state in renal transplant patients. Transplant Proc. **2005** Mar;37(2):776-8..
- **Shammas** N W Epidemiology, classification, and modifiable risk factors of peripheral arterial disease Vascular Health and Risk Management **2007**;3(2) 229–234.
- **Shenker** NS, Haldar NA, Reilly JJ, Bunce M, Welsh KI, Marshall SE. The impact of endothelial nitric oxide synthase polymorphisms on long-term renal allograft outcome. Transpl Int. **2003** Jun;16(6):391-5.
- **Shin** S, Nam JH, Hou JX, Suh JS. A transient, microfluidic approach to the investigation of erythrocyte aggregation: the threshold shear-stress for erythrocyte disaggregation. Clin Hemorheol Microcirc. **2009**;42(2):117-25.
- **Sibony** M, Gasc JM, Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Corvol P. Gene expression and tissue localization of the two isoforms of angiotensin I converting enzyme. Hypertension. **1993** Jun;21(6 Pt 1):827-35.
- **Sie** MP, Yazdanpanah M, Mattace-Raso FU, Uitterlinden AG, Hofman A, Hoeks AP, Reneman RS, Asmar R, Van Duijn CM, Witteman JC. Genetic variation in the renin-angiotensin system and arterial stiffness. The Rotterdam Study. Clin Exp Hypertens. **2009** Jul;31(5):389-99.
- **Siefring** GE Jr, Apostol AB, Velasco PT, Lorand L. Enzymatic basis for the Ca<sup>2+</sup>-induced cross-linking of membrane proteins in intact human erythrocytes. Biochemistry. **1978** Jun 27;17(13):2598-604.
- **Sielecki** AR, Hayakawa K, Fujinaga M, Murphy ME, Fraser M, Muir AK, Carilli CT, Lewicki JA, Baxter JD, James MN Structure of recombinant human renin, a target for cardiovascular-active drugs, at 2.5 Å resolution. Science. **1989** Mar 10;243(4896):1346-51.
- **Signorelli** S. S, Mazzarino MC, Spandidos D.S A. and Malaponte G Proinflammatory circulating molecule in peripheral arterial disease international journal of molecular medicine **2007**;20: 279-286.

- **Signorelli SS, Mazzarino MC, Di Pino L, et al.** High circulating levels of cytokines (IL-6 and TNFalpha), adhesion molecules (VCAM-1 and ICAM-1) and selectins in patients with peripheral arterial disease at rest and after a treadmill test. *Vasc Med* **2003**;8: 15-19.
- **Siragy HM, Carey RM** The subtype 2 (AT2) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J Clin Invest.* **1997** Jul 15;100(2):264-9.
- **Smit van Oosten A, Navis G, Stegeman C A, et al.** Chronic blockade of angiotensin II action prevents glomerulosclerosis but induces graft vasculopathy in experimental kidney transplantation *J pathol* **2001** 194 122-9.
- **Smith FB, Lowe GDO, Lee AJ, Rumley A, Leng GC, Fowkes FGR,** Smoking, hemorheologic factors and progression of peripheral arterial disease in patients with claudication; *J Vasc Surg* **1998**; 28: 129-35.
- **Somer T. and H.J. Meiselman,** Disorders of blood viscosity, *Ann. Med.* **(1993)**, 25 31–39.
- **Somer T.** Rheology of paraproteinaemias and the plasma hyperviscosity syndrome. *Baillieres Clin Haematol.* **1987**;1:695-723.
- **Somlyo AP, Somlyo AV.** Smooth muscle: excitation-contraction coupling, contractile regulation, and the cross-bridge cycle. *Alcohol Clin Exp Res.* **1994** Feb;18(1):138-43.
- **Soubrier F, Cambien F.** Renin-angiotensin system genes as candidate genes in cardiovascular diseases. *Trends Cardiovasc Med.* **1993** Nov-Dec;3(6):250-8.
- **Steck TL.** Cross-linking the major proteins of the isolated erythrocyte membrane. *J Mol Biol.* **1972**;66:295-305.
- **Sticchi E, Sofi F, Romagnuolo I, Pratesi G, Pulli R, Pratesi C, Abbate R, Fatini C.** eNOS and ACE genes influence peripheral arterial disease predisposition in smokers. *J Vasc Surg.* **2010** Jul;52(1):97-102.e1.
- **Stoll M, Stecklings UM, Paul M, et al:** The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells, *J Clin Invest* **1995**; 95: 651-657.
- **Stoltz JF, Singh M, Riha P.** Hemorheology in Practice. Washington, DC: IOS Press;**1999**.
- **Stuart J, Nash GB** Red cell deformability and haematological disorders. *Blood Rev.* **1990** Sep;4(3):141-7.
- **Suehiro T, Morita T, Inoue M, Kumon Y, Ikeda Y, Hashimoto K.** Increased amount of the angiotensin-converting enzyme (ACE) mRNA originating from the ACE allele with deletion. *Hum Genet.* **2004** Jul;115(2):91-6.
- **Symeonidis A, Athanassiou G, Psiroyannis A, Kyriazopoulou V, Kapatais-Zoumbos K, Missirlis Y, Zoumbos N.** Impairment of erythrocyte viscoelasticity is correlated with levels of glycosylated haemoglobin in diabetic patients. *Clin Lab Haematol.* **2001**;23:103-9.
- **Takakuwa Y, Ishibashi T, Mohandas N.** Regulation of red cell membrane deformability and stability by skeletal protein network. *Biorheology.* **1990**;27(3-4):357-65.
- **Tallant EA, Clark MA.** Molecular mechanisms of inhibition of vascular growth by angiotensin-(1-7). *Hypertension.* **2003** Oct;42(4):574-9.
- **Tallant EA, Ferrario CM, Gallagher PE.** Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2005** Oct;289(4):H1560-6.
- **Tang KM, Wang GR, Lu P, Karas RH, Aronovitz M, Heximer SP, Kaltenbronn KM, Blumer KJ, Siderovski DP, Zhu Y, Mendelsohn ME.** Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. *Nat Med.* **2003** Dec;9(12):1506-12.
- **Tanriverdi H, Evrengül H, Dursunoğlu D, Tüzün N, Turgut S, Turgut G, Tanriverdi S, Kiliç D, Kiliç M.** Effect of angiotensin converting enzyme genotype on endothelial function in healthy subjects. *Anadolu Kardiyol Derg.* **2008** Feb;8(1):2-6.
- **Tesouro M, Thompson W C, Rogliani P, Qi L, Chaudhary P P, Moss J** Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *PNAS* march 14 **2000** vol 97 n 6.
- **Thomas DJ, Du Boulay GH, Marshall J, Pearson TC, Ross Russell RW, Symon L, Wetherley-Mein G, Zilkha E.** Cerebral blood-flow in polycythaemia. *Lancet.* **1977**;2:161-3
- **Thor M, Yu A and Swedenborg J:** Markers of inflammation and hypercoagulability in diabetic and nondiabetic patients with lower extremity ischemia. *Thromb Res* **2002**;105: 379-383.
- **Tiret L, Kee F, Poirier O, Nicaud V, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, Amouyel P, et al.** Deletion polymorphism in angiotensin-converting enzyme gene associated with parental history of myocardial infarction. *Lancet.* **1993** Apr 17;341(8851):991-2.
- **Tomilin NV, Iguchi-Aruga SM, Ariga H.** Transcription and replication silencer element is present within conserved region of human Alu repeats interacting with nuclear protein. *FEBS Lett.* **1990** Apr 9;263(1):69-72.
- **Trachtman H, Gauthier B, Frank R, Futterweit S, Goldstein A, Tomczak J.** Increased urinary nitrite excretion in children with minimal change nephrotic syndrome. *J Pediatr.* **1996** Feb;128(2):173-6.
- **Tripatara ed al.** Nitrite-derived nitric oxide protects the rat kidney against ischemia/reperfusion injury in vivo: role for xanthine oxidoreductase *J. Am. Soc. Nephrol.* **2007** 18 570-580.



- **Tsukada T**, Yokoyama K, Arai T, Takemoto F, Hara S, Yamada A, Kawaguchi Y, Hosoya T, Igari Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *J. Biochem Biophys Res Commun.* **1998** Apr 7;245(1):190-3.
- **Tummala PE**, Chen XL, Sundell CL, Laursen JB, Hammes CP, Alexander RW, Harrison DG, Medford RM. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation.* **1999** Sep 14;100(11):1223-9.
- **Turner AJ.** Exploring the structure and function of zinc metalloproteinases: old enzymes and new discoveries. *Biochem Soc Trans.* **2003** Jun;31(Pt 3):723-7.
- **Tzoulaki I**, Murray GD, Lee AJ, Rumley A, Lowe GDO, Fowkes FGR, Inflammatory, haemostatic and rheological markers for incident peripheral arterial disease: Edinburgh Artery Study; *Eur. Heart. J.* **2007**; 28: 354-62.
- **Usami S**, Chien S, Gregersen MI. Viscometric characteristics of blood of the elephant, man, dog, sheep, and goat. *Am J Physiol* **1969**;217: 884-90.
- **Valentine RJ**, Myers SI, Inman MH, Roberts JR, Clagett GP. Late outcome of amputees with premature atherosclerosis. *Surgery* **1996**; 119:487–493.
- **Vallance P** and Chan N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart* **2001**;85: 342–350.
- **Vallance P**, Benjamin N, Collier The effect of endothelium-derived nitric oxide on ex vivo whole blood platelet aggregation in man. *J. Eur J Clin Pharmacol.* **1992**;42(1):37-41.
- **Van den Eijnden MM**, Saris JJ, de Bruin RJ, de Wit E, Sluiter W, Reudelhuber TL, Schalekamp MA, Derckx FH, Danser AH. Prorenin accumulation and activation in human endothelial cells: importance of mannose 6-phosphate receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2001** Jun;21(6):911-6.
- **Van den Steen PE**, Opendakker G, Wormald MR, Dwek RA and Rudd PM: Matrix remodelling enzymes, the protease cascade and glycosylation. *Biochim Biophys Acta* 2001;1528: 61-73..
- **Van der Meer IM**, de Maat MP, Bots ML, *et al:* Inflammatory mediators and cell adhesion molecules as indicators of severity of atherosclerosis: the Rotterdam Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2002**;22: 838-842.
- **Van Kesteren CA**, Danser AH, Derckx FH, Dekkers DH, Lamers JM, Saxena PR, Schalekamp MA Mannose 6-phosphate receptor-mediated internalization and activation of prorenin by cardiac cells. *Hypertension.* **1997** Dec;30(6):1389-96.
- **Van Stick J:** Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* 1990;8:253-278.
- **Vaughn M.W.** *et al.* Effective diffusion distance of nitric oxide in the microcirculation. *Am. J. Physiol.* **(1998)**274, H1705–H1714.
- **Vaughn M.W.** *et al.* Erythrocytes possess an intrinsic barrier to nitric oxide consumption. *J. Biol. Chem.* **(2000)** 275, 2342–2348.
- **Vetruigno M**, Cicco G, Cantatore F, Arnese L, Delle Noci N, Sborgia C. Red blood cell deformability, aggregability and cytosolic calcium concentration in normal tension glaucoma. *Clin Hemorheol Microcirc.* **2004**;31(4):295-302.
- **Vicaut E**, Hou X, Decuyperè L, Taccoen A, Duvellero M. Red blood cell aggregation and microcirculation in rat cremaster muscle. *Int J Microcirc Clin Exp.* **1994** Jan-Apr;14(1-2):14-21.
- **Vicaut E.** Opposite effects of red blood cell aggregation on resistance to blood flow. *J Cardiovasc Surg (Torino).* **1995** Aug;36(4):361-8.
- **Videm V**, Wiseth R, Gunnes S, Madsen HO and Garred P: Multiple inflammatory markers in patients with significant coronary artery disease. *Int J Cardiol* **2007**;118: 81-8.
- **Viklický O**, Hubáček JA, Vítko S, Heemann UW, Vasarhelyi B, Kohnle M, Teplan V, Lácha J, Szabó AJ. G-protein beta-3-subunit and eNOS gene polymorphism in transplant recipients with long-term renal graft function *Kidney Blood Press Res.* **2002**;25(4):245-9.
- **Visse R** and Nagase H: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* **2003**;92: 827-839.
- **Vlahakos DV**, Marathias KP, Agroyannis B, Madias NE. Posttransplant erythrocytosis. *Kidney Int.* **2003** Apr;63(4):1187-94.
- **Wang H**, Hiatt WR, Barstow TJ, Brass EP. Relationships between muscle mitochondrial DNA content, mitochondrial enzyme activity and oxidative capacity in man: alterations with disease. *Eur J Appl Physiol* **1999**;80(1):22-7.
- **Wang J**, Dudley D, Wang XL. Haplotype-specific effects on endothelial NO synthase promoter efficiency: modifiable by cigarette smoking. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2002** May 1;22(5):e1-4.
- **Wang XL**, Sim AS, Badenhop RF, McCredie RM, Wilcken DE. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med.* **1996** Jan;2(1):41-5.
- **Wang XY**, Xia SS, Tang JZ. Clinical significance of hemorrheological parameters in patients with renal transplantation. *J Tongji Med Univ.* **1989**;9(4):232-4.
- **Waugh R E**, N. Mohandas, C.W. Jackson, T.J. Mueller, T. Suzuki and G.L. Dale, Rheologic properties of senescent erythrocytes: loss of surface area and volume with red blood cell age, *Blood* **(1992)**, 79 1351–1358.

- **Weaver JP, Evans A, Walder DN.** The effect of increased fibrinogen content on the viscosity of blood. Clin Sci. **1969**;36:1-10.
- **Weber KT.** Aldosterone in congestive heart failure. N Engl J Med **2001**; 345: 1689-1697.
- **Welch GN, Loscalzo J.** Homocysteine and atherothrombosis. N Engl J Med **1998**; 338:1042–1050.
- **Weng X, Cloutier G, Beaulieu R, Roederer GO.** Influence of acute-phase proteins on erythrocyte aggregation. Am J Physiol. **1996** Dec;271(6 Pt 2):H2346-52.
- **Weng X, Roederer GO, Beaulieu R, Cloutier G.** Contribution of acute-phase proteins and cardiovascular risk factors to erythrocyte aggregation in normolipidemic and hyperlipidemic individuals. Thromb Haemost. **1998** Dec;80(6):903-8.
- **Wennmalm, A. et al.** Dependence of the metabolism of nitric oxide (NO) in healthy human whole blood on the oxygenation of its red cell haemoglobin. Br. J. Pharmacol. (1992) 106, 507–508.
- **White CR, Brock TA, Chang LY, Crapo J, Briscoe P, Ku D, Bradley WA, Gianturco SH, Gore J, Freeman BA, et al.** Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A. **1994** Feb 1;91(3):1044-8.
- **Wiewiora M, Slowinska L, Wylezol M, Pardela M, Kobielski A.** Rheological properties of erythrocytes in patients suffering from morbid obesity. Examination with LORCA device. Clin Hemorheol Microcirc. **2006**;34(4):499-506.
- **Wiewiora M, Sosada K, Wylezol M, Slowinska L, Zurawinski W.** Red blood cell aggregation and deformability among patients qualified for bariatric surgery. Obes Surg. **2007** Mar;17(3):365-71.
- **Wildman RP, Muntner P, Chen J, Sutton-Tyrell K, He J.** Relation of inflammation to peripheral arterial disease in the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999–2002. Am J Cardiol **2005**; 96:1579–1583.
- **Winkelmayer WC, Lorenz M, Kramar R, Förlinger M, Hörl WH, Sunder-Plassmann G.** C-reactive protein and body mass index independently predict mortality in kidney transplant recipients. Am J Transplant **2004**; 4: 1148–1154.
- **Wong W, Fynn SP, Higgins RM, Walters H, Evans S, Deane C, Goss D, Bewick M, Snowden SA, Scoble JE, Hendry BM.** Transplant renal artery stenosis in 77 patients--does it have an immunological cause? Transplantation. **1996** Jan 27;61(2):215-9.
- **Wood JM, Stanton JL, Hofbauer KG.** Inhibitors of renin as potential therapeutic agents. J Enzyme Inhib. **1987**;1(3):169-85.
- **Wuthrich RP:** Factor V Leiden mutation: potential thrombogenic role in renal vein, dialysis graft and transplant vascular thrombosis. Curr Opin Nephrol Hypertens **2001**;10:409-14.
- **Yang WJ.** Biothermal-Fluid Sciences Principles and Applications. New York: 1989 Hemisphere Pub. Corp.
- **Yang ZH, Richard V, von Segesser L, Bauer E, Stulz P, Turina M, Lüscher TF.** Threshold concentrations of endothelin-1 potentiate contractions to norepinephrine and serotonin in human arteries: a new mechanism of vasospasm? Circulation. **1990**;82:188–195.
- **Yawata Y.,** Cell Membrane: The Red Blood Cell as a Model, Wiley, 2003.
- **Yelinova V, Glazachev Y, Khramtsov V, Kudryashova L, Rykova V, Salganik R.** Studies of human and rat blood under oxidative stress: changes in plasma thiol level, antioxidant enzyme activity, protein carbonyl content, and fluidity of erythrocyte membrane. Biochem Biophys Res Commun **1996**;221:300–3.
- **Yilmaz E, Mir S, Berdeli A.** Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene polymorphism in early term chronic allograft nephropathy. Transplant Proc. **2009** Dec;41(10):4361-5.
- **Yokoyama K, Tsukada T, Nakayama M, Hara S, Yamada A, Kawaguchi Y, Hosoya T.** An intron 4 gene polymorphism in endothelial cell nitric oxide synthase might modulate volume-dependent hypertension in patients on hemodialysis. Nephron. **2000** Jul;85(3):232-7.
- **Yonetani T.** Nitric oxide and hemoglobin. Nippon Yakurigaku Zasshi **1998**;112: 155–160.
- **Young B, Gleeson M and Cripps AW:** C-reactive protein: a critical review. Pathology **1991**;23: 118-124.
- **Yu PK, Balaratnasingam C, Cringle SJ, McAllister IL, Provis J, Yu DY.** Microstructure and network organization of the microvasculature in the human macula. Invest Ophthalmol Vis Sci **2010**;51:6735-43.
- **Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ and Coppack SW:** C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? Arterioscler Thromb Vasc Biol **1999**;19: 972-978.
- **Yutani C, Ishibashi-Ueda H, Suzuki T and Kojima A:** Histologic evidence of foreign body granulation tissue and *de novo* lesions in patients with coronary stent restenosis. Cardiology **1999**;92: 171-177.
- **Zanazzi M, Fatini C, Farsetti S, Rosso G, Caroti L, Sticchi E, Liotta AA, Ricci I, Mannini L, Bertoni E, Abbate R, Salvadori M.** Blood rheology and renal transplantation: an intriguing relationship for assessing cardiovascular risk. Transplant Proc. **2010** May;42(4):13 83-4.
- **Zannad F. & Stoltz, J.-F.** Blood rheology in arterial hypertension. J Hypertens **1992**; 10, S69-S78.
- **Zeltser D, Serov J, Mardi T, et al.** Serum lipids as minor determinants of the degree of erythrocyte adhesiveness/aggregation in the peripheral blood of individuals with low grade inflammation and moderately increased serum lipids. Clin Hemorheol Microcirc **2004**; 31:161—167.

- **Zhang G, Wang H, Wang F, Yu L, Yang X, Meng J, Qin W, Wu G, Li J, Yang A, Zhou Y, Zhang R.** Gene polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system and angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal rejection. *Tohoku J Exp Med.* **2007** Nov;213(3):203-14.
- **Zhang MX, Zhang C, Shen YH, Wang J, Li XN, Zhang Y, Coselli J, Wang XL.** Biogenesis of short intronic repeat 27-nucleotide small RNA from endothelial nitric-oxide synthase gene. *J Biol Chem.* **2008** May 23;283(21):14685-93.
- **Zhang R, Min W, Sessa WC.** Functional analysis of the human endothelial nitric oxide synthase promoter. Sp1 and GATA factors are necessary for basal transcription in endothelial cells. *J Biol Chem.* **1995** Jun 23;270(25):15320-6.
- **Zilliacus H.** Intravascular erythrocyte aggregation and the sedimentation reaction in local inflammation in the tissues. *Acta Med Scand.* **1951** Jul 15;140(2):149-51.